

Veterinar



Znanstveno-stručni časopis studenata veterinarske medicine

Utemeljen 1938.



ISSN: 0303-5409

Godina **2017.**

Godište **55.**

Broj **2.**

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 Hadina
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.
izv. prof. 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,

pred Vama se nalazi novi broj znanstveno-stručnog časopisa studenata veterinarske medicine „Veterinar“. U ovom broju imate priliku pročitati četiri izvorna znanstvena rada, nastala u suradnji studenata veterinarske medicine s njihovim mentorima te jedan skraćeni i prilagođeni prijevod teksta čija je primarna svrha da pomogne studentima u izradi seminara iz kolegija Toksikologija u 8. semestru. Svi su radovi recenzirani od strane dvaju recenzenata. Osim spomenutih radova, i u ovom su broju objavljeni popularizacijski članci studentskih udruga Veterinarskoga fakulteta te nekoliko članaka o studentskim boravcima u inozemstvu u okviru CEEPUS ili Erasmus programa. Osim toga, možete pročitati i dva popularizacijska članka na engleskom jeziku, jedan o Erasmus studijskom boravku studentice iz Meksika na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu te drugi koji su napisali studenti sa studija veterinarske medicine na engleskom jeziku na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. U ovom broju možete doznati zanimljive informacije o ulozi veterinaru u Zoološkom vrtu, čitajući intervju s Jadrankom Borasom, mladim veterinarom zaposlenim u Zoološkom vrtu Grada Zagreba. Zahvaljujući njemu uvodimo novu rubriku u časopis pod imenom „Zoo kutak“ u kojoj ćete, ubuduće, moći pročitati prikaze slučajeva i zanimljivosti o stanovnicima Zoološkog vrta. Nadam se da će vam se tematika ovog broja svidjeti i da ćete ju pronaći korisnom te da ćete, čitajući časopis, prepoznati trud svih koji su sudjelovali u njegovu stvaranju.

Ovim putem pozivam sve zainteresirane autore da nam dostavljaju svoje radove i sudjeluju u stvaranju nadolazećeg broja. Upute autorima možete pronaći na posljednjoj stranici časopisa.

Također, pozivam sve potencijalne oglašivače da odaberu oglašavanje u „Veterinaru“ kao jedan od načina promocije proizvoda, usluga ili tvrtke i da na taj način podrže časopis u budućem razdoblju.

Na kraju, željela bih zahvaliti svim autorima koji su se uključili u stvaranje ovoga broja „Veterinara“, kojeg su odabrali kao mjesto gdje će predstaviti svoje radove, te recenzentima koji su izdvojili svoje vrijeme kako bi postigli da objavljeni radovi imaju veću znanstvenu vrijednost. Zahvaljujem i Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu koji nam pruža veliku potporu i omogućuje izlazak i tiskanje novih brojeva studentskog časopisa „Veterinar“. Velika hvala članovima Uredničkog kolegija i Uredničkog odbora koji uvelike pridonose stvaranju novih brojeva časopisa. Nadam se da ćemo i ubuduće zajedno povećavati kvalitetu njegova sadržaja, tehničkih i grafičkih svojstava, te i dalje s veseljem ulagati mnogo truda u kontinuitet izlazenja i promjene koje će svaki broj činiti još kvalitetnijim.

Iva Benveniste, glavna urednica

Analiza izražaja gena tijekom *in vitro* diferencijacije neurona

Analysis of gene expression during *in vitro* differentiation of neurons

Stojanac, A.^{1*}, I. Alić²



Sažetak

Analiza izražaja gena napravljena je tijekom *in vitro* diferencijacije živčanih matičnih stanica 0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije. U ovom je istraživanju napravljena analiza izražaja gena karakterističnih za živčane matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1) pomoću RT-PCR-a. Rezultati RT-PCR-a uspoređeni su s rezultatima imunocitokemije. Razina izražaja Nestina najveća je tijekom nultog dana diferencijacije i nakon toga smanjuje se tijekom diferencijacije stanica. No, dio stanica ostaje u nediferenciranom obliku i čini 2,5 % početne razine Nestina. Stanice MAP2 izražavaju već nulti dan diferencijacije na razini 16,6 % od maksimalnog izražaja koji se pojavljuje sedmi dan diferencijacije. Izražaj GFAP-a pojavljuje se treći dan diferencijacije i postupno raste do sedmog dana. Imunocitokemijski, GFAP-pozitivne stanice vidljive su tek peti dan u 1 % prebrojenih stanica. Oba sinaptička biljega pozitivna su već nulti dan diferencijacije i razina njihova izražaja postupno se povećava za 70 % od početne vrijednosti, pri čemu je razina Neurologina 1 jača u odnosu na Synapsin 1.

Abstract

Analysis was undertaken of gene expression during *in vitro* differentiation of neural stem cells on days 0, 1, 3, 5 and 7 of differentiation. In this study, expression of genes typical for neural stem cells (Nestin), neurons (MAP2), astrocytes (GFAP) and two synaptic markers (Neurologin 1 and Synapsin 1) were analysed using RT-PCR. The results of RT-PCR were compared with the results of immunocytochemistry. The Nestin expression was highest on day zero of differentiation and then decreased with cell differentiation. Some cells remained undifferentiated, and accounted for 2.5% of the initial Nestin expression. MAP2 expression on day zero of differentiation was 16.6% of the maximum expression occurring on the seventh day of differentiation. GFAP expression was observed on the third day of differentiation and gradually increased. On the fifth day of differentiation immunocytochemical analysis showed that 1% of the counted cells were GFAP positive. Both synaptic markers were already positive on day zero of differentiation and their expression gradually increased to 70% of the initial value. Neurologin 1 expression was stronger than Synapsin 1 expression.

¹Ante Stojanac, student, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
²dr. sc. Ivan Alić, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail: stojanacante@gmail.com

Ključne riječi: živčane matične stanice, neuroni, RT-PCR, izražaj gena, imunocitokemija

Key words: neural stem cells, neurons, RT-PCR, gene expression, immunocytochemistry

UVOD

Matične stanice (*engl. stem cells*) velika su skupina stanica koje se u kontroliranim uvjetima mogu diferencirati u bilo koju vrstu stanica. Matične se stanice dijele na totipotentne, pluripotentne i multipotentne matične stanice. Totipotentna stanica je zigota, jedina stanica iz koje se mogu razviti sve vrste stanica fetusa, ali isto tako i stanice fetalnih ovojnica koje čine posteljicu. Pluripotentne stanice su embrionalne matične stanice koje imaju manju sposobnost diferencijacije od zigote, ali se iz njih mogu razviti sve stanice embrioblasta, odnosno sam zametak. Multipotentne stanice su stanice koje su usmjerene prema određenom organskom sustavu. Živčane matične stanice primjer su multipotentnih matičnih stanica iz kojih će se razviti stanice središnjega i perifernog živčanog sustava. Živčane matične stanice mogu se izolirati iz fetalnog i odraslog mozga te imaju sposobnost diferencijacije u stanice živčanog sustava (neurone i glija-stanice) (Hyttel i sur., 2010.; McGeady i sur., 2014.). Poznato je da se u odraslom mozgu miša i čovjeka živčane matične stanice nalaze u subventrikularnoj zoni i u zrnatom sloju hipokampusa (Gage, 2000.; Mitrečić i sur., 2009.; Watson i sur., 2012.).

U istraživanjima diferencijacije živčanih matičnih stanica veliku ulogu imaju različiti sojevi miševa. Osim uobičajenih sojeva, tzv. divlji tip, uzgojeni su i brojni transgenični sojevi koji se razlikuju po izražaju različitih gena i bjelančevina u različitim vrstama stanica. Ovo je istraživanje napravljeno na transgeničnom soju (THY1 – YFP) koji u svojim živčanim stanicama pod utjecajem neuron-specifičnog promotora *Thy1*-gena izražava zelenu fluorescentnu bjelančevinu (*engl. green fluorescent protein, GFP*) ili jednu od njezinih spektralnih varijanti (zeleni, žuti, crveni i zelenoplavi) (Feng i sur., 2000.). Izražaj ove fluorescentne bjelančevine vidljiv je u svim dijelovima živčane stanice, uključujući jezgru, perikarion i nastavke, sve do terminalnih trnova – spina, što omogućuje vizualiziranje čitave stanice (Bannerman i sur., 2005.).

Iako ovaj soj miša THY1 – YFP postoji petnaestak godina, uzorak fluorescencije do danas nije precizno opisan (Wang i sur., 2006.). Morfološka analiza diferencijacije živčanih matičnih stanica u ovog soja opisana je tijekom

diferencijacije *in vitro*, tijekom embrionalnog razvoja i nakon transplantacije u mozak miša (Alić, 2015.). U navedenom istraživanju opisana je pojava izražaja THY1 – YFP te usporedba s brojnim biljezima matičnih stanica, neurona i astrocita. No, u literaturi nedostaju podaci koji bi na razini analize izražaja gena, odnosno pomoću lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (*engl. real time polymerase chain reaction, RT-PCR*) odredili razinu izražaja biljega koji su specifični za živčane matične stanice, neurone i astrocite, ali i biljega koji sudjeluju u sinaptičkom povezivanju stanica. Kako bismo odredili izražaj gena tijekom diferencijacije neurona u ovom istraživanju, odlučili smo se za tri biljega diferencijacije stanica (nestin, MAP2 i GFAP) te dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1).

Nestin je biljeg živčanih matičnih, odnosno progenitornih stanica tijekom razvoja središnjega živčanog sustava (Lendahl i sur., 1990.). Tijekom diferencijacije živčanih matičnih stanica u neurone ili u glija-stanice dolazi do smanjivanja izražaja Nestina (Dahlstrand i sur., 1995). Nestin-pozitivne stanice opisane su i u progenitornim stanicama prisutnima u odraslom središnjem živčanom sustavu (Morshead i sur., 1994.). Nestin je karakterističan biljeg nediferenciranih stanica središnjega živčanog sustava, ali prisutnost Nestin-pozitivnih stanica opisana je i u tumorskim stanicama živčanog sustava kao i u proliferacijskim endotelnim stanicama (Suzuki i sur., 2010.).

Tipičan biljeg neurona, MAP2 (*engl. microtubule-associated protein 2* – bjelančevina povezana s mikrotubulima 2) sastavni je dio citoskeleta neurona i ima važnu ulogu tijekom diferencijacije stanica (Przyborski i Cambbrey-Deakin, 1995.).

Za razliku od biljega neurona, GFAP (*engl. glial fibrillary acidic protein* – kisela glijalna fibrilarna bjelančevina) tipičan je biljeg astrocita koji se pojavljuje u zrelih staničnih kulturama, odnosno tek krajem fetalnog razdoblja ili čak nakon rođenja jedinke (Gomes i sur., 1999.).

Stvaranje sinapsi između neurona temeljni je proces koji se zbiva tijekom rasta i razvoja, ali i tijekom čitavog života jedinke, a nužno je za normalno obavljanje fizioloških funkcija stanica (Cullen i sur., 2010.). Bjelančevine koje

sudjeluju u stvaranju sinapsi dijele se na presinaptičke i postsinaptičke. Na temelju te podjele u ovom istraživanju korištena su dva sinaptička biljega: Neuroligin 1 (postsinaptički) i Synapsin 1 (presinaptički). Članovi porodice Neuroligin važne su postsinaptičke adhezijske molekule i imaju važnu ulogu u transsinaptičkim interakcijama s neureksinima. Smještaj i sinaptička aktivnost Neuroligina 1 specifična je za ekscitacijske sinapse (Bemben i sur., 2014.). Synapsin 1 ima važnu ulogu u otpuštanju neurotransmitera, aksonogenezi i sinaptogenezi. Osim toga, smatra se da je važan tijekom razvoja živčanog sustava, odnosno sudjeluje u sinaptičkom povezivanju neurona tijekom razvoja (Hedegaard i sur., 2013.).

Na temelju svega navedenoga postavljena je sljedeća hipoteza istraživanja: tijekom diferencijacije neurona doći će do znatnog porasta izražaja gena čiji su proteinski produkti sastavni dio stanice neurona, a također i do porasta izražaja gena koji su važni u stvaranju sinapsi između neurona.

MATERIJALI I METODE

Izolacija živčanih matičnih stanica

Za izolaciju živčanih matičnih stanica korišteni su fetusi 14,5 dana gravidne ženke, soja B6.Cg-Tg (Thy1-YFP) 16Jrs/J (YFP-16). Živčane matične stanice izolirane su iz telencefalona pomoću enzima akutaze (StemPro®Acutase® Cell Dissociation Reagent, Gibco by life Technologies) tako da je usitnjeno tkivo bilo pod djelovanjem akutaze 20 minuta, na temperaturi od 37 °C. Izolirane živčane matične stanice

uzgajane su u 25 mL medija (DMEM/F-12 (1:1) (1X)+GlutaMAX™-I, Gibco by life Technologies) u koji je dodano 500 µL B-27 (B-27®Supplement (50X), Gibco by life Technologies), 250 µL N-2 (N-2 Supplement (100X), Gibco by life Technologies), 250 µL Pen Strep (Penicillin Streptomycin, Gibco by life Technologies), 50 µL FGFb (Recombinant Mouse Fibroblast Growth Factor-basic) i 50 µL EGF (Recombinant Mouse Epidermal Growth Factor). Stanice su uzgajane do pojave neurosfera, nakon čega su disocirane i pripremljene za nasađivanje.

Podloge za diferencijaciju stanica

Stanice su uzgajane na podlogama obloženim Poly-D-lizinom u koncentraciji 500 µg/mL (Poly-D-lysine hydrobromide, SIGMA) koji je stajao 24 sata. Nakon ispiranja Poly-D-lizina sterilnom vodom podloge su obložene lamininom u koncentraciji od 10 µg/mL (Laminin from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma basement membrane) koji je također stajao 24 sata. Tako pripremljene podloge spremne su za nasađivanje stanica.

Stanice su uzgajane na dvjema različitim vrstama podloga. Stanice određene za RT-PCR uzgajane su u triplikatu na plastičnim pločama za diferencijaciju (engl. *6 well plate*) u vremenskim točkama 0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije. Nasuprot tome, stanice koje su određene za imunocitokemiju uzgajane su na obloženim staklima (engl. *cover slips*) promjera 12 mm, koja su smještena u plastične ploče za diferencijaciju (engl. *24 well plate*) u istim vremenskim točkama.

Tablica 1. Istraživani esej, proizvođač i kataloški broj.

Esej	Proizvođač	Kataloški broj
GFAP	Applied Biosystems	Mm01253033_m1
MAP2	Applied Biosystems	Mm00485231_m1
Nestin	Applied Biosystems	Mm00450205_m1
Neuroligin 1	Applied Biosystems	Mm02344305_m1
Synapsin 1	Applied Biosystems	Mm00449772_m1
FG-MOUSE ACTB MGB	Applied Biosystems	4352933E

Diferencijacija stanica

Nakon disocijacije stanica, koja je napravljena pomoću enzima akutaze kako je ranije opisano, stanice su nasađene u koncentraciji od 200 000 do 250 000 stanica po staklu, odnosno 1 000 000 stanica po *wellu* za RT-PCR. Stanice su nasađene u mediju koji ne sadržava čimbenike rasta (FGFb i EGF), a nakon 24 sata promijenjen im je medij koji podržava rast neurona – *neurobasal* (Neurobasal® Medium (1X), Gibco by life Technologies).

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR, engl. *real time –polymerase chain reaction*)

Iz stanica, RNA je izolirana pomoću komercijalnog kita RNeasy® Mini Kit (Qiagen) prema uputama proizvođača. Nakon izolacije ukupne RNA (50 µL) na nanodropu je izračunata koncentracija RNA koja je nakon toga pomoću komercijalnog kita *high capacity* RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) pretvorena u cDNA. Iz dobivene cDNA napravljen je RT-PCR za pet istraživanih gena (Nestin, MAP2, GFAP, Neurologin 1 i Synapsin 1), dok je kao kontrola, odnosno *housekeeping*-gen korišten β-Actin (ACTB MGB) (TaqMan Gene Expression Assays). Istraživani esaji (geni), proizvođač i kataloški broj prikazani su u tablici 1. Svi su istraživani uzorci rađeni u triplikatu s 1 µg cDNA u ukupnom volumenu od 20 µL pomoću uređaja Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System. Relativna kvantifikacija napravljena je pomoću formule $2^{-\Delta CT}$.

Imunocitokemija

Imunocitokemijsko bojenje provedeno je na fiksiranim stanicama. Stanice su nakon fiksacije 4 %-tnim paraformaldehidom (PFA) isprane tri puta po pet minuta PBS-om (engl. *phosphate buffered saline*) te im je dodano 500 µL otopine za permeabilizaciju i blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela (0,2 % triton X-100 (Sigma) u PBS-u + 3 % kozjeg seruma). Blokiranje sekundarnog protutijela trajalo je 60 minuta, nakon čega je stanicama dodano 85 µL otopine primarnog protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u + 1 % kozjeg seruma plus primarno protutijelo) te je ostavljeno u frižideru na +4 °C preko noći. Primarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju prikazana su u tablici 2.

Drugi dan primarna protutijela isprana su PBS-om tri puta po pet minuta. Nakon ispiranja primarnih protutijela, na stanice je stavljena otopina sekundarnih protutijela (0,2 % triton X-100 u PBS-u plus sekundarno protutijelo) te su tako stanice inkubirane dva sata na sobnoj temperaturi u zamračenoj prostoriji. Sekundarna protutijela, podrijetlo, razrjeđenje i proizvođač, upotrijebljena u ovom istraživanju, prikazana su u tablici 3. Dva sata nakon inkubacije isprana su sekundarna protutijela, također tri puta po pet minuta, te je na stanice stavljena fluorescentna boja za jezgre, DAPI u koncentraciji 1 : 8000. Nakon deset minuta, DAPI je isprana, također tri puta po pet minuta te su stanice poklopljene medijem za fluorescentno poklopanje (Dako Fluorescent Mounting Medium).

Tablica 2. Primarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

Protutijelo	Podrijetlo	Razrjeđenje	Proizvođač
GFAP	pile	1 : 250	Abcam (ab4674)
MAP2	pile	1 : 1000	Abcam (ab5392)
Nestin	miš	1 : 200	Millipore (MAB353)

Tablica 3. Sekundarna protutijela upotrijebljena za imunocitokemiju.

Protutijelo	Razrjeđenje	Proizvođač
Alexa Fluor 546 koza anti - miš IgG (H+L)	1 : 1000	Invitrogen (A11003)
Alexa Fluor 546 koza anti - pile IgG (H+L)	1 : 1000	Invitrogen (A11040)

Poklopljeni preparati ostavljeni su u frižideru na +4 °C do mikroskopiranja na konfokalnom mikroskopu (Zeiss, LSM 510 Meta).

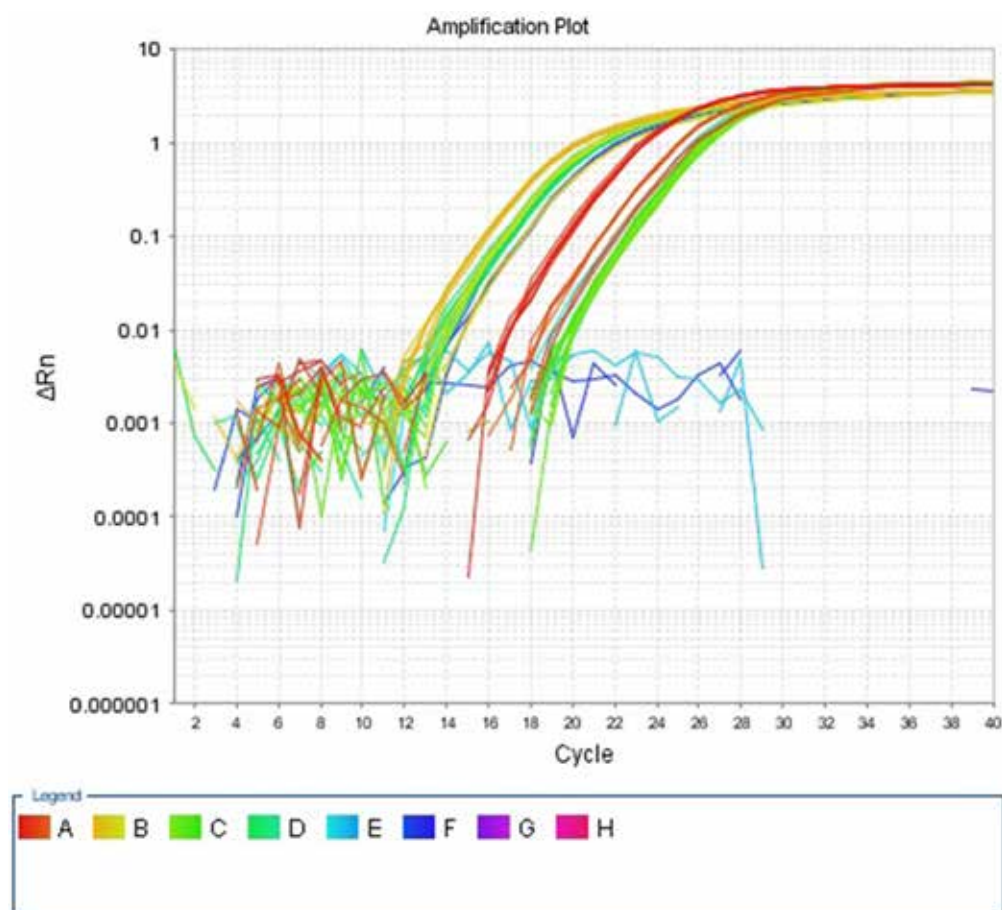
REZULTATI

Kako bi se napravila analiza izražaja gena tijekom diferencijacije neurona iz živčanih matičnih stanica, izolirana je RNA iz koje je pomoću RT-PCR-a određena analiza izražaja gena specifičnih za matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te za sinaptičku aktivnost stanica (Neurologin 1 i Synapsin 1). Razina izražaja pojedinoga gena određena je pomoću standardnog programa u 40 ciklusa. Istraživani geni prelaze prag detekcije u 14. – 18. ciklusu umnažanja (grafikon 1). Osim analize izražaja gena napravljene na razini nukleinskih kiselina, u istim je vremenskim točkama napravljena i imunocitokemija kako bi se rezultati RT-PCR-a usporedili s rezultatima imunocitokemije.

RT-PCR

Tijekom diferencijacije THY1 – YFP stanica, razina izražaja Nestina najviša je nulti dan diferencijacije. Tijekom prvoga dana diferencijacije razina izražaja Nestina još je uvijek visoka, ali je ipak 40 % manja u odnosu na živčane matične stanice. Treći dan diferencijacije, razina Nestina očekivano se smanjuje i za 20 % je manja nego prvoga dana diferencijacije. Tijekom petoga dana diferencijacije razina Nestina gotovo je na istoj razini kao i trećeg dana. Sedmi dan diferencijacije razina Nestina izrazito se smanjuje i čini svega 2,5 % početne vrijednosti izražene u živčanim matičnim stanicama. Budući da je Nestin karakterističan za matične stanice, razina njegova izražaja naglo se smanjuje tijekom diferencijacije stanica, no ipak mali dio stanica ostaje Nestin-pozitivan, odnosno zadržava se u tzv. matičnom obliku (grafikon 2).

Razina izražaja MAP2, tipičnog biljega neurona, izrazito se povećava tijekom diferencijaci-

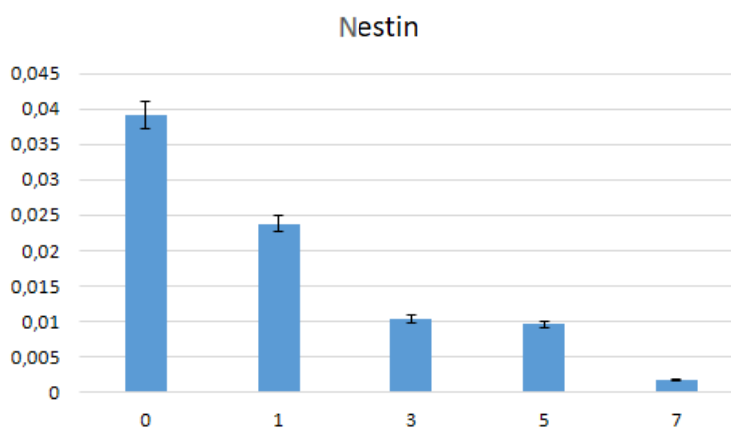


Grafikon 1. Prikaz amplifikacije Nestina i β -Actina tijekom izvođenja RT-PCR-a. Isprekidane plave crte predstavljaju negativnu kontrolu u kojoj nema uzorka pa do amplifikacije nije moglo ni doći.

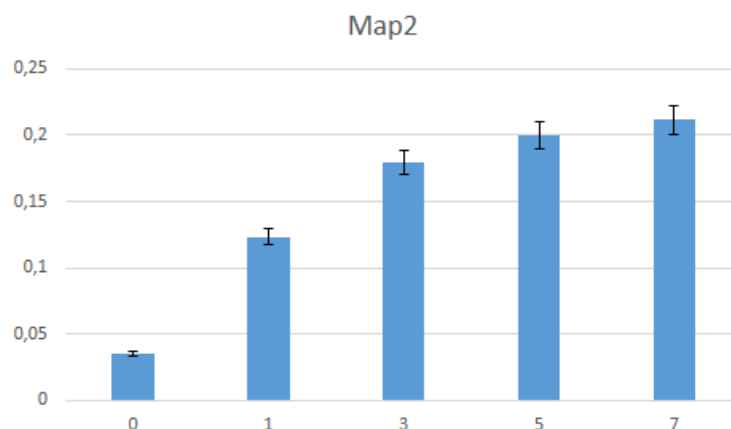
je stanica. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da nulti dan diferencijacije dio stanica izražava MAP2. Iako se radi o živčanim matičnim stanicama koje još nisu krenule u diferencijaciju, razina izražaja MAP2 iznosi 16,6 % izražaja, koji stanice postižu sedmi dan diferencijacije. Budući da su živčane matične stanice predodređene da postanu neuroni, izražavaju MAP2 vrlo rano.

Diferencijacijom stanica naglo se povećava razina izražaja MAP2 tako da 7. dan iznosi 90 % od ukupnog broja stanica u staničnoj kulturi (grafikon 3). Za razliku od tipičnog biljega neurona, izražaj biljega astrocita (GFAP) pojavljuje se tek 3. dana diferencijacije stanica i iznosi 20 % od maksimalnog izražaja koji se pojavljuje sedmi dan diferencijacije stanica (grafikon 4).

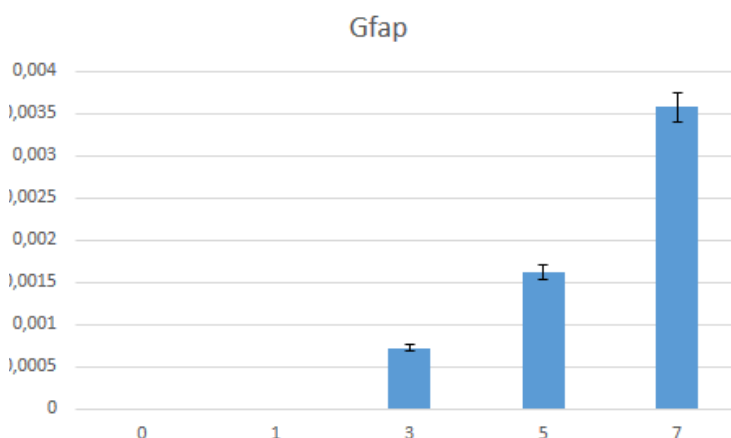
Grafikon 2. Izražaj Nestina tijekom diferencijacije stanica. Izražaj je najjači tijekom nultog dana diferencijacije, odnosno u živčanim matičnim stanicama. Sazrijevanjem stanica dolazi do smanjivanja izražaja Nestina. Legenda: na X osi prikazana je razina izražaja Nestina, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

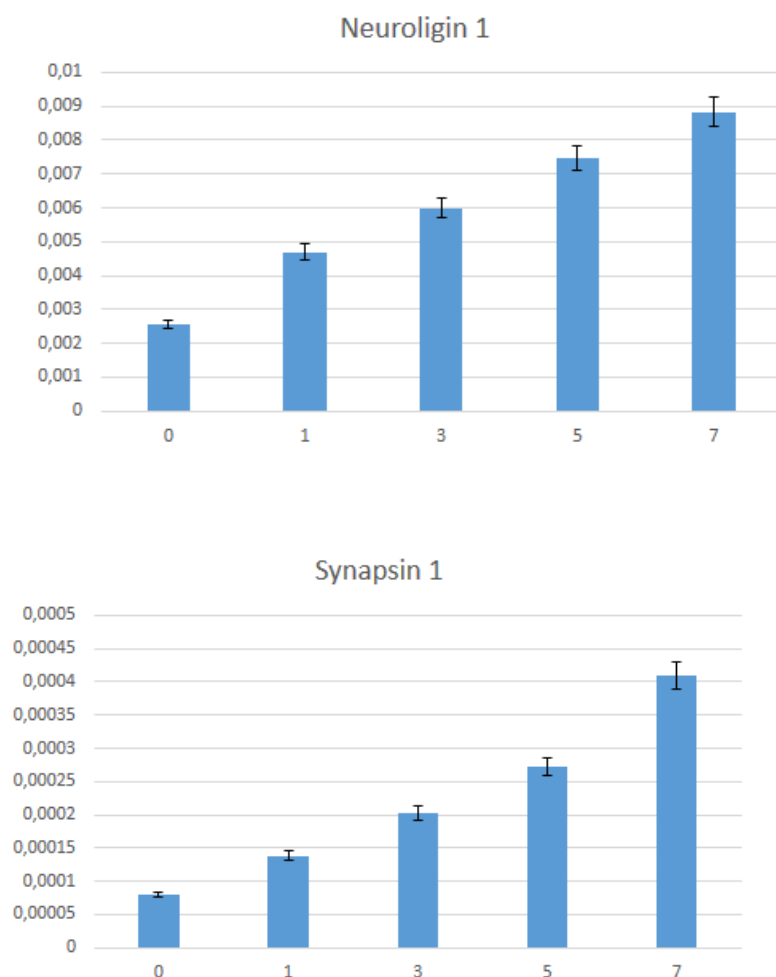


Grafikon 3. Izražaj MAP2 tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog dana diferencijacije mali postotak stanica izražava MAP2, a razina izražaja raste tijekom diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja MAP2, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).



Grafikon 4. Izražaj GFAP-a tijekom diferencijacije stanica. Tijekom nultog i prvog dana diferencijacije nema izražaja GFAP-a. U izrazito malom postotku stanice izražavaju GFAP tijekom trećeg dana, da bi do kraja diferencijacije razina izražaja porasla do svega 3 %. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja GFAP-a, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).





Grafikon 5. Izražaj Neurologina 1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70 % od nultog dana diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja Neurologina 1, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

Grafikon 6. Izražaj Synapsina 1 tijekom diferencijacije stanica. Razina izražaja tijekom diferencijacije stanice povećava se za 70 % od nultog dana diferencijacije. Legenda: na osi X prikazana je razina izražaja Synapsina 1, a na osi Y prikazane su vremenske točke diferencijacije stanica (0., 1., 3., 5. i 7. dan diferencijacije).

Osim biljega matičnih stanica, neurona i astrocita određena je i razina izražaja dvaju sinaptičkih biljega. Izražaj Neurologina 1 pojavljuje se tijekom nultog dana i znatno se pojačava tijekom sedam dana diferencijacije. Razina Neurologina 1 od nultog dana do sedmog dana diferencijacije povećava se za 70 %, što upućuje na izrazitu sinaptičku aktivnost stanica tijekom diferencijacije (grafikon 5). Izražaj Synapsina 1 također se pojavljuje nulti dan diferencijacije i povećava se za 70 % tijekom procesa diferencijacije (grafikon 6). Na grafikonima 5 i 6 jasno je vidljiv znatan porast izražaja obaju sinaptičkih biljega, ali je razina izražaja Neurologina 1 kao postsinaptičkog biljega izrazito veća u odnosu na Synapsin 1 koji je presinaptički biljeg.

Imunocitokemija

Imunocitokemija je napravljena na THY1 – YFP stanicama u istim vremenskim točkama kao i RT-PCR kako bi se rezultati mogli međusobno usporediti. Stanice su nakon fiksacije obojene specifičnim protutijelima za matične stanice (Nestin), za neurone (MAP2) i za astroците (GFAP). Budući da je imunocitokemija napravljena na THY1 – YFP stanicama, koje u određenim neuronima izražavaju zelenu fluorescentnu bjelancevinu, upotrijebljeno je crveno sekundarno protutijelo.

Tijekom nultog dana diferencijacije stanica, od ukupnog broja prebrojenih stanica 99 % stanica je Nestin-pozitivno (slika 1A-C). Svega 1 %

stanica je MAP2 pozitivno i pokazuje kolokalizaciju s Nestin-pozitivnim stanicama.

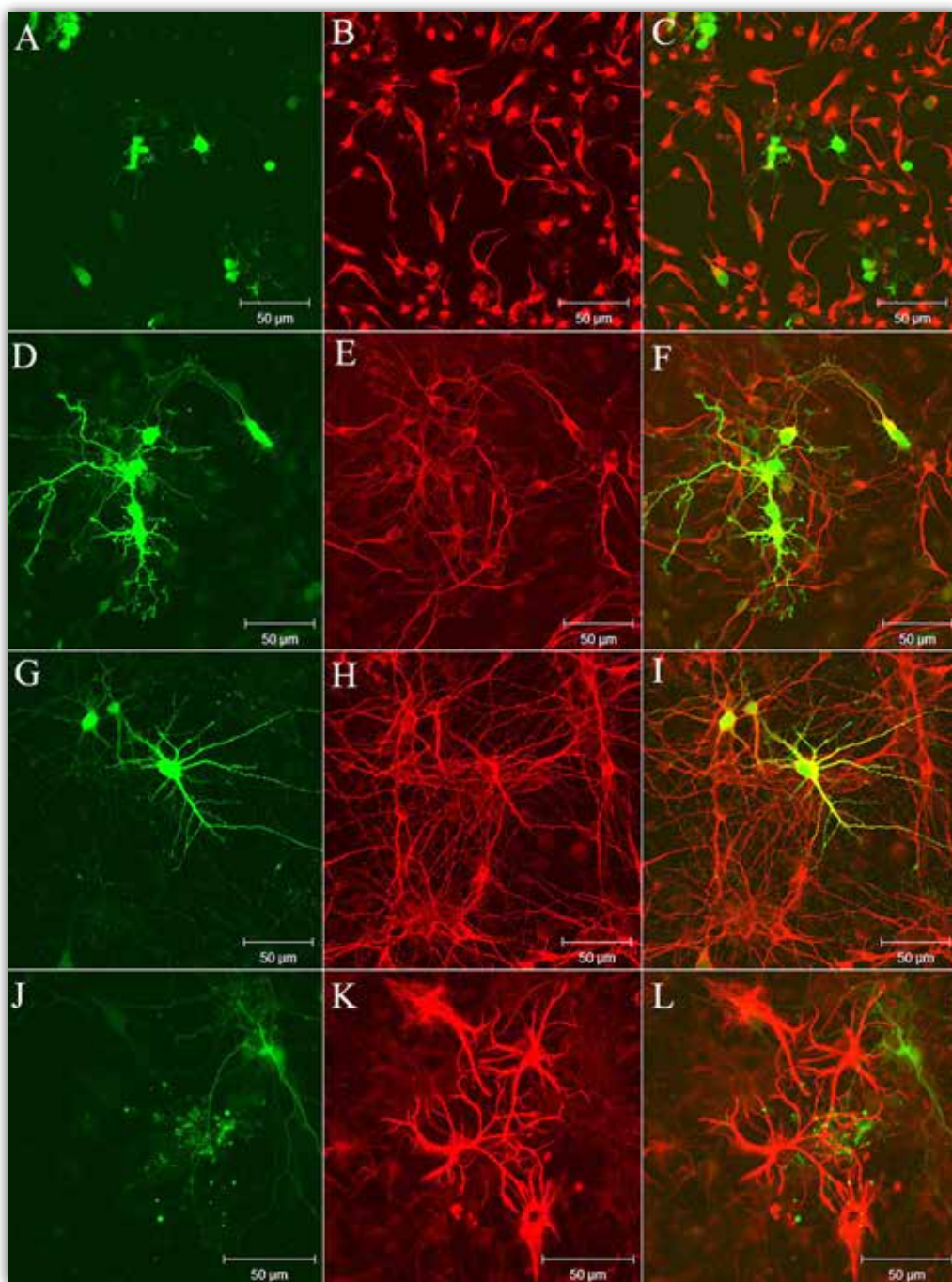
Tijekom prvoga dana diferencijacije stanica 80 % stanica je Nestin-pozitivno, a udio MAP2-pozitivnih stanica povećava se na 20 %. Kako je bilo i očekivano, niti jedna stanica nije GFAP-pozitivna.

Trećeg dana diferencijacije stanica udio Nestin-pozitivnih stanica smanjuje se na 30 %, dok se udio MAP2 pozitivnih stanica povećava na 70 %. Imunocitokemijski nije zabilježena niti jedna GFAP-pozitivna stanica.

Petog dana diferencijacije stanica 15 % stanica je Nestin-pozitivno, dok je udio MAP2 (sli-

Slika 1. Imunocitokemija THY1 – YFP stanica (zeleno) tijekom diferencijacije.

Na slici A-C prikazano je bojenje Nestinom (crveno) nulti dan diferencijacije; D-E prikazano je bojenje s MAP2 (crveno) treći dan diferencijacije; G-I prikazano je bojenje s MAP2 (crveno) sedmi dan diferencijacije te na slici J-L bojenje s GFAP-om (crveno) sedmi dan diferencijacije.



ka 1D-F) pozitivnih stanica porastao na 84 %, a svega 1 % stanica je GFAP-pozitivno. Budući da su stanice petog dana gotovo u potpunosti diferencirane, jasno se vidi da su većina stanica neuroni, a samo mali postotak stanica ostaje u obliku matičnih stanica.

Sedmog dana diferencijacije udio Nestin-pozitivnih stanica pao je na 7 %, a MAP2 (slika 1G-I) pozitivnih stanica porastao na 90 %. Kako se u ovoj vremenskoj točki govori o zreloj i potpuno diferenciranoj kulturi stanica, počeli su se diferencirati i astrociti, pa je udio GFAP (slika 1J-L) pozitivnih stanica narastao na 3 %.

Budući da je imunocitokemija napravljena na transgeničnim stanicama koje u pojedinim neuronima izražavaju YFP, prebrojavanjem je utvrđeno da se tijekom diferencijacije stanica jasno vidi da je udio YFP pozitivnih stanica 20 % i ne mijenja se tijekom diferencijacije stanica.

RASPRAVA

Na živčanim matičnim stanicama provedena je analiza izražaja gena tijekom diferencijacije stanica u pet vremenskih točaka (0., 1, 3., 5. i 7. dan diferencijacije). Svi su uzorci rađeni su u triplikatu kako bi se izbjegla pogreška i smanjila varijabilnost između pojedinih uzoraka. Na uzorcima je određena razina izražaja biljega za matične stanice (Nestin), neurone (MAP2), astrocite (GFAP) te dva sinaptička biljega (Neurologin 1 i Synapsin 1). Rezultati izražaja gena uspoređeni su s rezultatima imunocitokemije te s podacima iz literature.

Izražaj Nestina izrazito je visok nulti dan diferencijacije, odnosno u živčanim matičnim stanicama koje još nisu krenule u diferencijaciju. Visok je izražaj i očekivan budući da se radi o visokospecifičnom biljegu koji je karakterističan za matične stanice. Ovaj nalaz odgovara i nalazu imunocitokemije gdje je prebrojavanjem stanica utvrđeno da je 99 % stanica Nestin-pozitivno. Osim s rezultatima imunocitokemije, ovaj se nalaz u potpunosti slaže i s istraživanjem koje su proveli Lendahl i suradnici (1990.), prema kojemu je Nestin tipičan biljeg progenitornih stanica živčanog sustava, bilo da se radi o neuronima bilo glija-stanicama. Tijekom diferencijacije razina Nestina znatno se smanjuje sa sazrijevanjem kulture, budući da zrele stanice

nisu Nestin-pozitivne. Rezultati RT-PCR-a u potpunosti se podudaraju s rezultatima imunocitokemije. No, vidljiva je razlika trećega i petog dana diferencijacije gdje se na RT-PCR-u očituje ista razina izražaja, dok imunocitokemijski dolazi do znatnog pada s 30 na 15 %. Ovakav se nalaz objašnjava prerastanjem nastavaka diferenciranih stanica zbog čega nije moguće prebrojiti sve nediferencirane stanice (Alić, 2015.).

Izražaj MAP2 vidljiv je već u živčanim matičnim stanicama i iznosi 16,6 % od vrijednosti koju stanice izražavaju sedmi dan diferencijacije kao zreli neuroni. Ovakav nalaz odgovara i nalazu imunocitokemije, što je prikazano na slici 1A-C gdje se jasno vide THY1 – YFP pozitivne (zele- ne) stanice koje su i MAP2-pozitivne. Budući da se radi o živčanim matičnim stanicama koje su predodređene da se diferenciraju uglavnom u neurone, za očekivati je da su pozitivne na bilj- ge neurona. Stanice koje su THY1 – YFP pozitiv- ne jesu zreliji oblici matičnih stanica i više nisu Nestin pozitivne. Prema istraživanju Cortija i suradnika (2006.) u staničnoj kulturi izražaj YFP pod utjecajem *Thy1*-gena zabilježen je isključivo u zrelim neuronima, ali ne i u nediferenciranim neurosferama. Za razliku od navedenog istraživa- nja, u ovom su istraživanju jasno su vidljive THY1 – YFP pozitivne stanice, a rezultati RT-PCR potvrđuju izražaj MAP2 u matičnim stanicama.

Izražaj GFAP-a pomoću RT-PCR-a vidljiv je trećeg dana diferencijacije u izrazito malom po- stotku i postupno raste do kraja diferencijacije stanica. Imunocitokemijski GFAP-pozitivne sta- nice vidljive su tek petoga dana diferencijacije, i to u svega 1 % prebrojenih stanica, a udio im se sedmoga dana povećava do 3 %. Mali postotak astrocita može se objasniti načinom uzgoja koji je ponajprije usmjeren k uzgoju neurona. Izra- žaj GFAP-a trećeg dana diferencijacije, opisan pomoću RT-PCR-a, govori nam da je dio stanica predodređen da postanu astrociti te se „pripre- maju“ u diferencijaciju. No, imunocitokemijski u ovoj vremenskoj točki stanice predodređene da postanu astrociti još uvijek ne izražavaju GFAP. Ovakav nalaz odgovara i nalazu Yuasa (2001.), da razvoju astrocita, koji se u miša pojavljuje tek postnatalno, prethode različiti oblici astro- glije koji se mogu detektirati visokospecifičnim pro- tutijelima poput tenascina-C koji je pozitivan prije GFAP-a. Osim toga, na slici 1 jasno je vid-

ljivo da nema kolokalizacije između GFAP-pozitivnih stanica i THY1 – YFP koji je specifičan za neurone, što se slaže s drugim istraživanjima Fenga i suradnika (2000.) te Cortija i suradnika (2006.).

Izražaj sinaptičkih biljega vidljiv je također tijekom nultog dana diferencijacije stanica, odnosno u živčanim matičnim stanicama. To upućuje na pripremu stanica za diferencijaciju, odnosno za sinaptičko povezivanje stanica koje je nužno za normalnu diferencijaciju. U ovom su radu korištena dva sinaptička biljega, Neuroligin 1, koji je postsinaptički, i Synapsin 1, koji je presinaptički biljeg. Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da se oba biljega tijekom diferencijacije povećavaju za 70 % od početne vrijednosti. No, razina izražaja Neuroligina 1 izrazito je veća od razine Synapsina 1, što upućuje na veću važnost ovog biljega tijekom same diferencijacije stanica. Ovaj nalaz odgovara nalazu Bembena i suradnika (2014.) i potvrđuje veliku važnost Neuroligina 1 kao adhezijske molekule tijekom neurogeneze. S druge strane, Synapsin 1 važan je za razvoj aksona i samu diferencijaciju stanice, pa je porast također očit tijekom diferencijacije (Hedegaard i sur., 2013.).

Naši rezultati pokazuju da se razina izražaja gena u potpunosti podudara s imunocitokemijom, osim u slučaju GFAP-a čiji se izražaj na razini gena pojavljuje dva dana ranije u odnosu na imunocitokemiju, što upućuje na njegovu prisutnost i u stanicama koje su predodređene da postanu astrociti.

ZAHVALA

Zahvaljujemo doc. dr. sc. Dinku Mitrečiću, voditelju Laboratorija za matične stanice na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga. Ovo je istraživanje nagrađeno Rektorovom nagradom 2016., a izrađeno je u sklopu projekta „Young-Brain (EU-ESF)” čiji je voditelj doc. dr. sc. Dinko Mitrečić.

LITERATURA

- ALIĆ, I. (2015): Morfološka analiza nastanka i diferencijacije neurona u staničnoj kulturi, tijekom razvoja zametka i nakon transplantacije u mozak miša uporabom matičnih stanica dobivenih iz mišjeg soja THY1 YFP-16.

Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.

- 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.
- BEMBEN, M. A., S. L. SHIPMAN, T. HIRAI, B. E. HERRING, Y. LI, J. D. BADGER II, R. A. NICOLL, J. S. DIAMOND, K. W. ROCHE (2014): CaMKII phosphorylation of neuroligin-1 regulates excitatory synapses. *Nature Neuroscience* 17, 56–64.
- CORTI, S., F. LOCATELLI, D. PAPADIMITRIOU, C. DONADONI, S. SALANI, R. DEL BO, S. STRAZZER, N. BRESOLIN, G. P. COMI (2006): Identification of a Primitive Brain-Derived Neuronal Stem Cell Population Based on Aldehyde Dehydrogenase Activity. *Stem Cells* 24, 975–985.
- CULLEN, D. K., M. GILROY, H. R. IRONS, M. C. LAPLACA (2010): Synapse-to-neuron ratio is inversely related to neuronal density in mature neuronal cultures. *Brain Res.* 1359, 44–55.
- DAHLSTRAND, J., M. LARDELLI, U. LENDAHL (1995): Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of developing central nervous system. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 84, 109–129.
- 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.
- GOMES, F.C.A., D. PAULIN, V. MOURA NETO (1999): Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 619–631.
- HEDEGAARD, C., K. KJAER-SØRENSEN, L. B. MADSEN, C. HENRIKSEN, J. MOMENI, C. BENDIXEN, C. OXVIG, K. LARSEN (2013): Porcine synapsin 1: *SYN1* gene analysis and functional characterization of the promoter. *FEBS Open Bio.* 3, 411–420.

- HYTTEL, P., F. SINOWATZ, M. VEJLSTED (2010): Essentials of Domestic Animal Embryology. Saunders Elsevier. Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto.
- LENDAHL, U., L. B. ZIMMERMAN, R. D. MCKAY (1990): CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585–595.
- MCGEADY, T. A., P. J. QUINN, E. S. PITZPATRICK, M. T. RYAN (2014): Veterinarska embriologija. Naklada Slap. Zagreb.
- MITREČIĆ, D., S. GAJOVIĆ, R. POCHET (2009): Toward the Treatments with Neural Stem Cells: Experiences from Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Anat. Rec.* 292, 1962–1967.
- MORSHEAD, C. M., B. A. REYNOLDS, C. G. CRAIG, M. W. MCBURNEY, W. A. STAINES, D. MORASSUTTI, S. WEISS, D. VAN DER KOOP (1994): Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13, 1071–1082.
- PRZYBORSKI, S. A., M. A. CAMBRAY-DEAKIN (1995): Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation in vitro. *Brain. Res. Dev. Brain. Res.* 89, 187–201.
- SUZUKI, S., J. NAMIKI, S. SHIBATA, Y. MASTUZAKI, H. OKANO (2010): The Neural Stem/Progenitor Cell Marker Nestin Is Expressed in Proliferative Endothelial Cells, but Not in Mature Vasculature. *J. Histochem. Cytochem.* 58, 721–730.
- YUASA, S. (2001): Development of Astrocytes in the Mouse Embryonic Cerebrum Tracked by Tenascin-C Gene Expression. *Arch. Histol. Cytol.* 64, 119–126.
- 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.



Welcome
to Tallinn
in June 2018





Molekulska karakterizacija APEC sojeva *E. coli* izdvojenih na farmama peradi Republike Hrvatske

Molecular characterization of APEC strains isolated from poultry farms in Croatia

Lozica, L.^{1*}, Ž. Gottstein¹, D. Horvatek Tomić¹

Sažetak

Kolibaciloza uzrokovana ptičjim patogenim sojevima bakterije *Escherichia coli* (APEC) stvara velike gospodarske gubitke u intenzivnoj peradarskoj proizvodnji. Često nastaje kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima. Osim toga, neadekvatni zoohigijenski uvjeti i drugi stresni čimbenici kao što je nesivost mogu utjecati na pojavu bolesti. S obzirom na velike štete koje uzrokuje te postojanje zoonotskog potencijala, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija, može pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. U ovom su istraživanju izdvojeni sojevi *E. coli* iz lešina dostavljenih na patomorfološku pretragu s farmi peradi koje imaju probleme s kolibacilozom. Iz bakterijskih je kultura izdvojena ukupna DNK i određena pripadnost filogenetskim skupinama (A, B1, B2, D) dokazivanjem gena *chuA*, *yjaA* i ulomka DNK TspE4.C2 primjenom PCR reakcije. Utvrđeno je i postojanje pojedinih gena virulencije koji mogu biti pokazatelj patogenosti sojeva. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da postoji velika raznovrsnost filogenetskih skupina *E. coli* što otežava provođenje imunoprofilakse, te su utvrđene razlike u prevalenciji određenih gena virulencija između pojedinih sojeva.

Abstract

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) can cause serious losses in poultry production. It often begins as a secondary infection caused by immunosuppression. Moreover, inadequate zoohygienic conditions and stress, such as the laying period, may cause problems. Due to the great losses and possible zoonotic potential of APEC, molecular characterization and determination of phylogenetic diversity is very important, for it can help in conducting prophylactic measures. During this epizootiological survey, poultry carcasses were brought from farms for pathomorphological examination due to the suspicion of colibacillosis. Afterwards *E. coli* strains were isolated and molecular characterization was undertaken. Some of the most frequent virulence genes which may be indicators of strain pathogenicity were determined. The results showed contamination with different *E. coli* phylogroups according to phylogenetic group markers (*chuA*, *yjaA*, TspE4.C2), with a predominant finding of B2 phylogroup. In addition, some differences in the frequency of certain virulence genes between isolated strains were determined, which could affect the efficiency of immunoprophylactic measures.

Ključne riječi: *E. coli*, APEC, phylogenetic diversity, PCR

Key words: *E. coli*, APEC, filogenetska raznolikost, lančana reakcija polimerazom

UVOD

Kolibaciloza je svaka lokalizirana ili sustavna zarazna bolest uzrokovana gram-negativnom bakterijom *Escherichia coli* koja naseljava sluznične površine (Biđin, 2008.). Patogeni sojevi *E. coli* dijele se na crijevne i izvancrijeve. Sojevi bakterije *E. coli* koji uzrokuju izvancrijeve infekcije (engl. *extraintestinal pathogenic E. coli*, ExPEC) obično su dio fiziološke crijevne mikroflore zdravih životinja. Patogeni sojevi posjeduju čimbenike virulencije pomoću kojih naseljavaju površinu sluznica i uzrokuju bolest. ExPEC sojevi dijele se u četiri patovara – ptičji patogeni sojevi *E. coli* (engl. *avian pathogenic E. coli*, APEC), septikemijski sojevi *E. coli* (engl. *septicaemia associated E. coli*, SePEC), uropatogeni sojevi *E. coli* (engl. *uropathogenic E. coli*, UPEC) i sojevi *E. coli* uzročnici meningitisa novorođenčadi (engl. *newborn meningitic E. coli*, NMEC) (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Antão, 2010.; Mellata, 2013.). Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije kao što su upala zračnih vrećica, koliseptikemija, koligranulomatoza, perikarditis, peritonitis, sinovitis, salpingitis, upala žumanjčane vrećice i sindrom otečene glave. Bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava u peradi stare 3 do 12 tjedana, nakon čega slijedi sistemska infekcija karakterizirana fibrinoznim lezijama i septikemijom koje dovode do uginuća (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Schouleur i sur., 2012.), ali do zaraze može doći i ascendentno, putem reproduktivnog trakta (Landman i sur., 2014.). Zaražavanju dišnog sustava često prethodi infekcija mikoplazmama ili nekim virusom, čime on postaje osjetljiviji (Cordoni i sur., 2016.). Razlog početka infekcije upalom zračnih vrećica jest povećana osjetljivost zbog smanjene količine makrofaga u tom području (Antão, 2010.; Mellata, 2013.), odnosno smanjene sposobnosti fagocitoze makrofaga i neutrofila (Matthijs i sur., 2009.). Isto tako, oštećenje tkiva dišnog sustava virusima karakterizirano je gubitkom cilija i trepetljivih stanica, čime se smanjuje cilijarna aktivnost i čišćenje mukocilijarnog sekreta, te oštećenjem epitela koje omogućuje lakše prijanjanje bakterija (Matthijs i sur., 2009.). Osim toga, neprikladni zoohigijenski uvjeti, stresni čimbenici i soj pilića utječu na osjetljivost zračnih vrećica prema bakteriji.

Kolibaciloza često nastaje i kao sekundarna infekcija zbog imunosupresije uzrokovane drugim bolestima kao što su zarazna bolest burze, zarazna anemija pilića ili Marekova bolest. U tom slučaju mogu je uzrokovati i komenzalni sojevi *E. coli* što objašnjava sve češću pojavu A-sojeva (Dissanayake i sur., 2014.).

Serotipizacija i određivanje seroloških skupina dosad je već provjerena metoda tipizacije APEC sojeva. Oni najčešće pripadaju serovarovima O1, O2, O18 i O78 (Moulin-Schouleur i sur., 2007.; Johnson i sur., 2008.; Ewers i sur., 2009.). Sojeve *E. coli* može se podijeliti u četiri filogenetske skupine: A, B1, B2 i D, određivanjem prisutnosti gena *yjaA* i *chuA*, te ulomka DNK TspE4. C2 lančanom reakcijom polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) (Clermont i sur., 2000.), te u sedam podskupina: A₀, A1, B1, B2₁, B2₂, D1 i D2 (Carlos i sur., 2010.), pri čemu se B2₂ nalazi samo u ljudi. Većina patogenih izvancrijevnih sojeva pripada skupini B2, manji dio skupini D, a komenzalni sojevi skupini A i B1 (Picard i sur., 1999.; Clermont i sur., 2000.; Escobar-Páramo i sur., 2006.; Carlos i sur., 2010.; Maturana i sur., 2011.). Imajući na umu da svi izvancrijevi patovari imaju isto filogenetsko podrijetlo, može se pretpostaviti da postoji zoonotski potencijal ptičjih patogenih sojeva *E. coli* (Moulin-Schouleur, 2007.; Johnson i sur., 2009.; Antão, 2010.). B2 i D filogenetske skupine posjeduju širok spektar čimbenika virulencije od kojih je velik dio epidemiološki vezan uz pojavu slučajeva izvancrijevnih infekcija (Manges i sur., 2007.). Patogeni serovarovi *E. coli* često se mogu izolirati iz crijeva klinički zdravih jedinki, što dokazuje da je često oportunistički patogen. Miješanjem crijevnih i izvancrijevnih sojeva dolazi do međusobne izmjene genetskog materijala i prilagodbe komenzalnih sojeva koji onda postaju sposobni za infekciju. Molekularna epidemiološka istraživanja diljem svijeta utvrdila su nekoliko potencijalnih rezervoara ExPEC-a, kao što su probavni trakt čovjeka, životinje koje se koriste kao izvor hrane, životinjski proizvodi, okoliš kontaminiran otpadnim vodama i kućni ljubimci (Manges i Johnson, 2012.). Najvažniji izvor zaraze zračnih vrećica jesu feces i kontaminirana prašina (Porter, 1998.).

Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju kolibaciloza u nesilica, roditeljskih jata i tovnih pilića,

što dovodi do visokog morbiditeta i mortaliteta, a time i velikih ekonomskih gubitaka u peradarskoj industriji. U roditeljskim jatima teških linija *E. coli* najčešće uzrokuje salpingitis te posljedično peritonitis i septikemiju (Gregersen i sur., 2010.). S obzirom na velike gospodarske štete, utvrđivanje proširenosti APEC sojeva i njihova tipizacija mogu pomoći u provođenju nužnih profilaktičkih mjera kao što je cijepljenje. Zbog raznovrsnosti sojeva trenutačno dostupna komercijalna cjepiva nisu adekvatna, te se sve više podliježe proizvodnji inaktiviranih autogenih cjepiva (Landman, 2014.).

MATERIJAL I METODE

Uzorci

Izdvojeno je 48 sojeva *E. coli* podrijetlom od lešina dostavljenih na patomorfološku pretragu s dvije farme peradi roditeljskih jata teških linija (genetike Ross, Farma 1 i 2) i jedne farme nesilica lake linije (Farma 3) sakupljenih tijekom 2016. godine. Na farmi 1 uzorkovanje je provedeno dva puta, kada je perad bila dobi 43 tjedna i u dobi od 55 tjedana, a na farmi 2 jednom s 15 tjedana, te na farmi 3 četiri puta, kada je perad bila dobi 59, 74, 75 i 79 tjedana.

Izolacija i identifikacija *E. coli*

Prilikom patomorfološke pretrage lešina uzeti su obrisci organa koji su nasadeni na hranjivi agar (Nutrient Agar, Difco, Francuska) i Brilliant Green agar (Oxoid, Velika Britanija) te inkubirani aerobno 24 sata pri 37 °C. Sojevi *E. coli* identificirani su na temelju makroskopskog izgleda kolonija i biokemijskih karakteristika, a identifikacija je dodatno potvrđena metodom MALDI-TOF spektrometrije (engl. *matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight*) i API testom (Biomerieux, Francuska).

Izdvajanje i pročišćavanje DNK

Čiste kulture *E. coli* presađene su na ploče hranjivog agara (Nutrient Agar, Difco, Francuska) i korištene za izdvajanja DNK pomoću Chelex 100 (BioRad, Francuska) prema uputi proizvođača. Izdvojena DNK čuvana je na -20 °C do izvođenja pretrage. Neposredno prije pre-

trage u uzorcima je određena koncentracija DNK pomoću BioDrop uređaja (Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo), a potom je za PCR reakciju koncentracija u uzorcima prilagođena na 20 µg/mL.

Lančana reakcija polimerazom

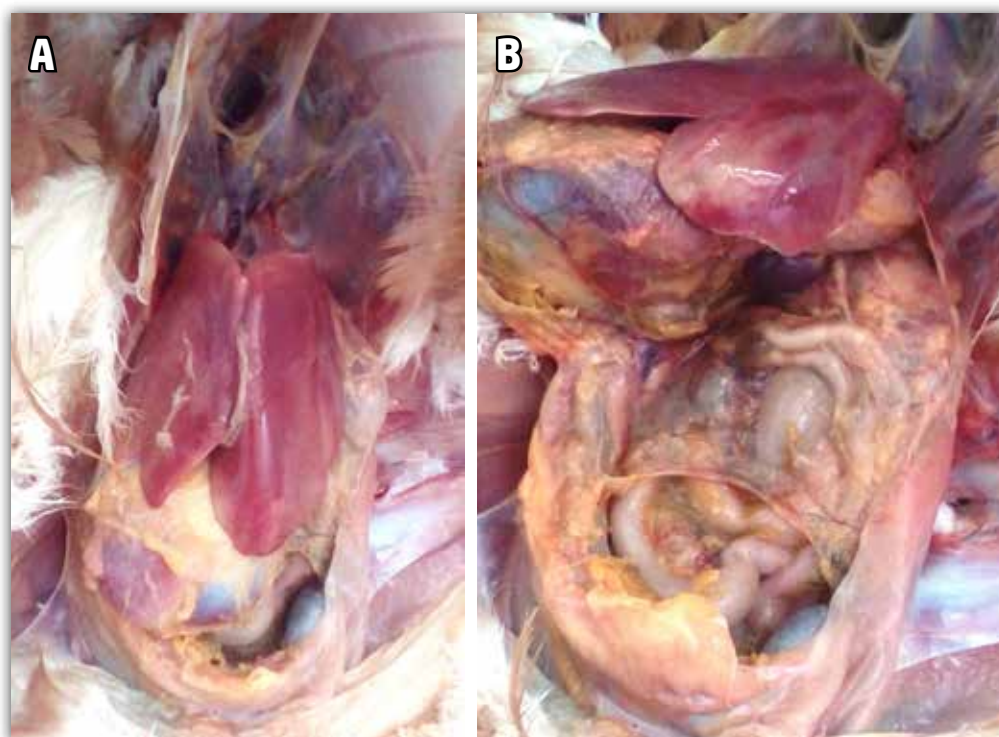
Izvedene su tri multiplex PCR reakcije prema protokolu Clermont i sur. (2000.) za svaki uzorak za sveukupno 22 gena virulencije. U prvoj reakciji korišteno je osam početnica (R1, R2, R3, R4, K12, *chuA*, *yjaA*, TspE), u drugoj pet (*iroN*, *ompT*, *hlyF*, *lss*, *iutA*), a u trećoj devet (*astA*, *irp2*, *papC*, *iucD*, *tsh*, *vat*, *cvi/cva*, *ibeA*, *sitA*). U svakoj PCR reakciji korištene su specifične uzvodne i nizvodne početnice, *master mix* Emerald (Promega, SAD), voda slobodna od RNK/DNK-aza i ranije izdvojena DNK. Ukupan volumen po PCR reakciji bio je 25 µL.

Gel-elektroforeza

Umnošci PCR reakcija razdvojeni su elektroforezom. Za prvu i treću *multiplex* reakciju korišten je 2 %-tni agarozni gel, a za drugu reakciju 3 %-tni gel zbog razlike u veličinama umnožaka. Razdvajanje se izvodilo 30 min na 80 V i 65 mA, a zatim kroz 50 min pri 130 V i 65 mA. Umnošci su vizualizirani primjenom SYBR Safe boje (Invitrogen, SAD).

REZULTATI I RASPRAVA

Klinički je na farmama u oboljelih jedinki primijećeno otežano kretanje, otečenost glave, povremeni problemi s disanjem i proljevom. Patoanatomskom pretragom lešina uočene su kronična purulentna pneumonija uz kazeoznu upalu zračnih vrećica, perikarditis, peritonitis, perihepatitis, hepatomegalija, splenomegalija, tendosinovitis, salpingitis i enteritis. Neke od uočenih patoloških promjena prikazane su na slici 1. Obrisci su uzeti s organa koji su bili patološki promijenjeni ili predstavljaju predilekcijska mjesta za infekciju *E. coli*, kao što su jetra, slezena, pluća, crijeva i jajnik. Uočene makroskopske promjene u većine lešina upućivale su na koliseptikemiju, što je i potvrđeno izdvajanjem *E. coli* u čistoj kulturi iz pretraživanih organa, te potvrđeno i MALDI-TOF metodom pretrage i API testom.



Slika 1. Promjene uočene patomorfološkom pretragom. A. Fibrinozni perihepatitis. B. Fibrinozni polisperitonitis, egg peritonitis.

Na temelju rezultata PCR-a, sojevi su svrstani u filogenetske skupine i podskupine. Od ukupno 48 pretraženih sojeva *E. coli*, većina ih pripada B2 filogenetskoj skupini (52,08 %), a dokazana je i prisutnost drugih skupina - B1 (22,92 %), D (16,67 %) i A (8,33 %). Određena je i učestalost filogenetskih podskupina pri čemu je najzastupljenija bila B2₃ podskupina (47,92 %). Na grafikonu 1 prikazana je usporedba zastupljenosti filogenetskih skupina, a na grafikonu 2 zastupljenost filogenetske podskupine B2₃ na farmama 1, 2 i 3. Na farmi 1 bili su primijećeni teži klinički simptomi te su prilikom patomorfološke pretrage uočene izraženije patološke promjene.

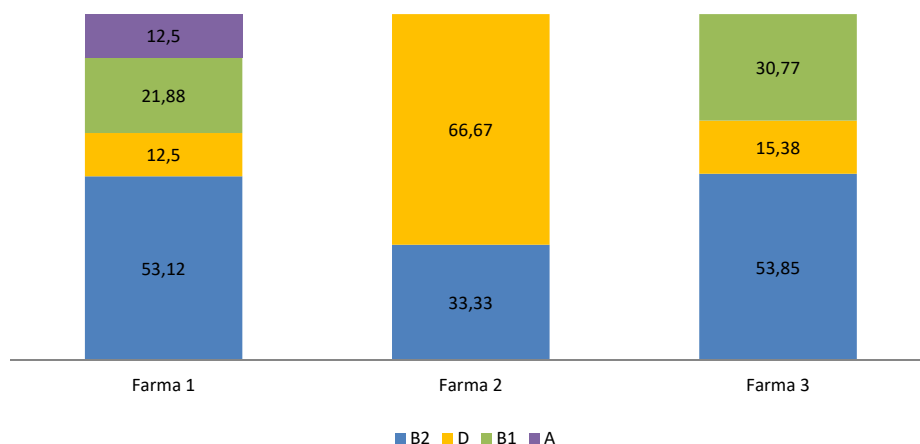
U tablici 1 prikazana je učestalost filogenetskih skupina i podskupine B2₃ po organima iz kojih su uzeti obrisci, pri čemu se može vidjeti da je najzastupljenija skupina B2 najčešće izolirana iz jetre, slezene, folikula i pluća.

U tablici 2 prikazana je učestalost nekih od gena virulencije koji se smatraju važnima za patogenost APEC u pojedinim filogenetskim skupinama. Može se uočiti vrlo visoka učestalost različitih gena virulencije kod filogenetske skupine B1 i B2, a relativno mala u skupine A.

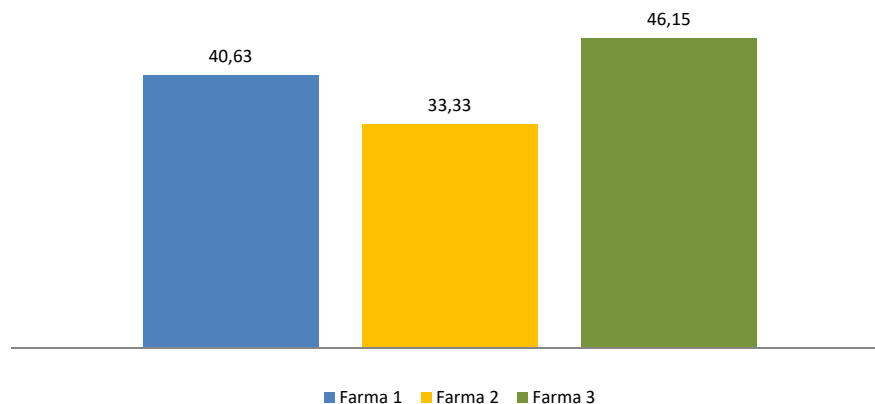
Ptičji patogeni sojevi *E. coli* uzrokuju različite lokalizirane i sistemske infekcije, a bolest najčešće započinje infekcijom dišnog sustava koja se razvije u sistemska infekciju i dovodi do uginuća. Kod nesilica je pak samo nesenje izrazit stres, a hormonski status (visoke razine estrogena) pridonose prijemljivosti na infekciju s *E. coli* koja vrlo često nastupa ascendentno, putem jajovoda (Anon., 2014.). Ovakav status životinja u proizvodnji olakšava simultano zaražavanje različitim sojevima. Podjela sojeva *E. coli* u filogenetske skupine omogućuje razvrstavanje u komezale ili različite patotipove (Cordoni i sur., 2016.). Takvu metodu podjele, koja se temelji na dokazu gena *chuA*, *yjaA* i ulomka DNK TspE4.C2, opisali su Clermont i sur. (2000.). Ona je korištena u ovom istraživanju i pokazala se vrlo korisnom.

Unatoč izrazitoj raznovrsnosti APEC izolata, istraživanja su pokazala sličnosti između NMEC, SePEC, UPEC i APEC sojeva u pripadnosti serogrupama, filogenetskim grupama i posjedovanju faktora virulencije, što upućuje na mogućnost postojanja zoonotskog potencijala APEC sojeva (Ewers i sur., 2007.; Mellata i sur., 2013.; Guabiraba i sur., 2015.). Rezultati iz tablice 1

Grafikon 1. Usporedni prikaz učestalosti filogenetskih skupina na farmama 1, 2 i 3 (%).



Grafikon 2. Prikaz zastupljenosti filogenetske podskupine B2₃ na farmama 1, 2 i 3 (%).



Tablica 1. Prikaz učestalosti filogenetskih skupina i B2₃ podskupine po organima iz kojih su uzeti obrisci.

Organ	Filogenetska skupina				Fil. podskupina
	B2	B1	D	A	B2 ₃
Jetra	6	3	1	1	5
Crijevo	-	2	2	-	-
Jajnik	8	3	2	1	7
Slezena	4	1	-	1	4
Pluća	5	-	1	-	5
Tibiotarzalni zglobov	1	1	-	-	1
Zračne vrećice	1	1	-	1	1
Gušterača	-	-	1	-	-
Gornji dišni putevi	-	-	1	-	-

pokazuju da je najzastupljenija filogenetska skupina (B2) najčešće izolirana iz jetre, folikula, slezene i pluća, gdje su obično i najizraženije patomorfološke promjene. U ovom smo istraživanju, zbog velike zastupljenosti filogenetske skupine B2, provjerili i kojim podskupinama pripadaju APEC sojevi koje smo izdvojili. Metoda utvrđivanja podskupina zasniva se na dokazu svih triju gena koji se koriste i za određivanje filogenetskih skupina (*chuA*, *yjaA*, *TspE4.C2*). Na temelju dokaza tih gena utvrdili smo da je prevalencija skupine B2₃ čak 47,92 % od ukupno pretraženih sojeva, odnosno da 23 od 25 izolata iz skupine B pripada spomenutoj podskupini. U dosadašnjim istraživanjima nijedan APEC soj nije svrstan u skupinu B2₃ za koju se smatra da joj pripadaju samo humani sojevi. Takav rezultat ima veliku važnost jer upućuje na veliku genetsku srodnost izoliranih sojeva različitih životinjskih vrsta i ljudi, a uz to je dodatan pokazatelj zoonotskog potencijala ptičjih patogenih sojeva. Postojanje takvih sličnosti očekivano je

s obzirom na njihovu važnost u omogućivanju preživljavanja bakterija u ekstraintestinalnim uvjetima. Unatoč tome, potvrđuje da postoji mogućnost prijenosa ExPEC sojeva na ljude kao rezultat neadekvatnog postupanja sa životinjama, odnosno manipulacijom lešinama i mesom koje služi za prehranu ljudi.

Prevalencija gena virulencije koje smo određivali, a koji se smatraju važnima za patogenost APEC sojeva, djelomično se slaže s rezultatima sličnih istraživanja drugih autora. U tablici 2 prikazana je njihova učestalost u zajedničkom uzorku i pojedinim filogenetskim skupinama. Može se uočiti veća učestalost različitih gena virulencije kod filogenetskih skupina B1 i B2, a relativno mala u skupine A za koju se smatra da joj pripadaju samo komenzalni sojevi *E. coli*. Rezultati su pokazali veću zastupljenost *papC*, *chuA*, *iutA* i *sitA* gena u teških linija i nesilica s obje farme, za razliku od *irp2*, *astA* i *hlyF* gena koji su zastupljeniji samo kod nesilica s farme 2. Ewers i sur. (2009.) istraživali su jesu li sojevi iz-

Tablica 2. Prikaz učestalosti pojedinih gena virulencije (%).

Geni virulencije	Zajednički uzorak (n=48)	Filogenetska skupina				Filogenetska podskupina
		B2 (n=25)	B1 (n=11)	D (n=8)	A (n=4)	B2 ₃ (n=23)
<i>papC</i>	85,4	76	100	100	75	73,9
<i>tsh</i>	22,9	28	-	50	-	26,1
<i>chuA</i>	68,8	100	-	100	-	100
<i>irp2</i>	4,2	8	-	-	-	8,7
<i>iucD</i>	14,6	16	-	25	25	13,4
<i>iutA</i>	93,8	100	90,9	100	50	100
<i>sitA</i>	62,5	56	81,8	87,5	-	52,2
<i>ibeA</i>	43,8	48	36,4	50	50	43,5
<i>ompT</i>	39,6	36	54,5	50	-	39,1
<i>cvi/cva</i>	27,1	16	63,6	25	-	17,4
<i>astA</i>	31,3	24	45,5	37,5	25	17,4
<i>hlyF</i>	52,1	44	63,6	75	25	47,8

dvojeni iz fecesa klinički zdrave peradi rezervoar izvancrijevnih infekcija i zaključili da zdrava perad može služiti kao genska zaliha (eng. *gene pool*) za ExPEC sojeve. Jedan od mogućih načina širenja zaraze jest i u klaonici putem trupova kontaminiranih fecesom i sadržajem crijeva (Johnson i sur., 2009.). Isto tako, domestikacija životinja imala je neposredan utjecaj na mikrofloru životinja putem pasminske selekcije, prilagodbe hranidbe i zoohigijenskih uvjeta u uzgoju te izloženosti različitim antibioticima. Učestala upotreba antimikrobnih preparata u intenzivnom uzgoju u peradarskoj industriji dovela je do toga da konzumacijom mesa dolazi do razvoja sve veće antimikrobne rezistencije jer perad ima ulogu rezervoara ExPEC-a (Manges i sur., 2007.; Manges i Johnson, 2012.).

Upravo zbog miješanja sojeva među različitim životinjskim vrstama i ljudi te komenzalnih sojeva iz okoliša, važno je pristupiti takvom opće zdravstvenom i gospodarskom problemu na prikladan način. Iz dosadašnjih je istraživanja poznato da se sve češće komenzalni sojevi (B1, A skupine) izdvajaju kao uzročnici bolesti, što znači da na problem treba gledati i s ekološke strane, a ne samo ekonomske i zdravstvene. Iz tog razloga mnogi autori predlažu tzv. *One Health* pristup. Onečišćenjem okoliša kontaminiraju se voda i hrana domaćih životinja, preko kojih se u konačnici indirektno djeluje na zdravlje ljudi.

ZAKLJUČAK

Rezultati upućuju na veliku raznolikost filogenetskih skupina *E. coli* u istim jatima peradi što otežava mogućnost imunoprofilakse. Na prvim dvjema farmama uključenima u epizootiološko istraživanje korišteno je živo i inaktivirano komercijalno cjepivo dostupno na tržištu, ali bez pozitivnog ishoda. Zbog toga se kao trenutačno najbolje rješenje preporučuju inaktivirana autogena cjepiva pripremljena od "stajskih sojeva" *E. coli*. Adekvatnim cijepljenjem peradi mogla bi se smanjiti pojavnost bolesti primarno u peradi, a time i pritisak na ljudsku populaciju kod koje su sve češće infekcije urinarnog trakta uzrokovane ExPEC sojevima genetski vrlo srodnim ptičjim patogenim sojevima *E. coli*. Preventivnim cijepljenjem smanjuje se potreba za antimikrobnom terapijom zaraženih jata. Na taj

bi način smanjena upotreba antibiotika imala pozitivan utjecaj i na zdravlje ljudi te smanjila stvaranje antimikrobne rezistencije koja je sve veći problem. Iz tog je razloga bitno kontinuirano provoditi epizootiološka istraživanja kako bi se pratila i kontrolirala pojavnost i širenje potencijalno opasnih sojeva za samu perad ali i ljudsku populaciju.

LITERATURA

- ANONYMOUS (2014): Colibacillosis in layers: an overview. Hy-Line Technical Update, 1-8.
- ANTÃO, E. M. (2010): Identification of Avian Pathogenic *E. coli* (APEC) genes important for the colonization of the chicken lung and characterization of the novel ExPEC adhesin I. Dissertation. Humboldt- Universität zu Berlin, Berlin, Njemačka.
- BIĐIN Z. (2008): Bolesti peradi; Veterinarski fakultet; Zagreb.
- CARLOS, C., M. M. PIRES, N. C. STOPPE, E. M. HACHICH, M. I. Z. SATO, T. A. T. GOMES, L. A. AMARAL, L. M. M. OTTOBONI (2010): *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. BMC Microbiol. 10, 161-171.
- CLERMONT, O., S. BONACORSI, E. BINGEN (2000): Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl. Environ. Microbiol. 66, 4555-4558.
- CORDONI, G., M. J. WOODWARD, H. WU, M. AL-ANAZI, T. WALLS, R. M. LA RAGIONE (2016): Comparative genomics of European avian pathogenic *E. coli* (APEC). BMC Genomics 17, 960-981.
- DISSANAYAKE, D. R. A., S. OCTAVIA, R. LAN (2014): Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. Vet. Microbiol. 168, 403-412.
- ESCOBAR-PÁRAMO, P., A. LE MENAC'H, T. LE GALL, C. AMORIN, S. GOU-RIOU, B. PICARD, D. SKURNIK, E. DENAMUR (2006): Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. Environ. Microbiol. 8, 1975-1984.

- EWERS, C., G. LI, H. WILKING, S. KIEßLING, K. ALT, E. M. ANTÃO, C. LATUR-NUS, I. DIEHL, S. GLODDE, T. HOMEIER, U. BÖHNKE, H. STEINRÜCK, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2007): Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 163–176.
- EWERS, C., E. M. ANTÃO, I. DIEHL, H. C. PHILIPP, L. H. WIELER (2009): Intestine and environment of the chicken as reservoirs for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains with zoonotic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 184–192.
- GREGERSEN, R. H., H. CHRISTENSEN, C. EWERS, M. BISGAARD (2010): Impact of *Escherichia coli* vaccine on parent stock mortality, first week mortality of broilers and population diversity of *E. coli* in vaccinated flocks. *Avian Pathol.* 39, 287–295.
- GUABIRABA, R. i C. SCHOUER (2015): Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol. Lett.* 362, 1–8.
- JOHNSON, T. J., Y. WANNEMUEHLER, C. DOETKOTT, S. J. JOHNSON, S. C. RO-SENBERGER, L. K. NOLAN (2008): Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3987–3996.
- JOHNSON T. J., C. M. LOGUE, Y. WANNEMUEHLER, S. KARIYAWASAM, C. DOETKOTT, C. DEBROY, D. G. WHITE, L. K. NOLAN (2009): Examination of the source and extended virulence genotypes of *Escherichia coli* contaminating retail poultry meat. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 657–667.
- LANDMAN, W. J. M., G. J. BUTER, R. DIJKMAN, J. H. H. VAN ECK (2014): Molecular typing of avian pathogenic *Escherichia coli* colonies originating from outbreaks of *E. coli* peritonitis syndrome in chicken flocks. *Avian Pathol.* 43, 345–356.
- MANGES A.R. i J. R. JOHNSON (2012): Foodborne origins of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Clin. Infect. Dis.* 55, 712–719.
- MANGES A. R., S. P. SMITH, B. J. LAU, C. J. NUVAL, J. N. S. EISENBERG, P. S. DIETRICH, L. W. RILEY (2007): Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case-control study. *Foodborne. Pathog. Dis.* 4, 419–431.
- MATTHIJS, M., M. P. ARIAANS, R. M. DWARS, J. H. H. VAN ECK, A. BOUMA, A. STEGEMAN, L. VERVELDE (2009): Course of infection and immune responses in the respiratory tract of IBV infected broilers after superinfection with *E. coli*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 77–84.
- MATURANA, V. G., F. DE PACE, C. CARLOS, M. M. PIRES (2011): Subpathotypes of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) exist as defined by their syndromes and virulence traits. *Open. Microbiol. J.* 5, 55–64.
- MELLATA, M. (2013): Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 916–932.
- MOULIN- SCHOULEUR, M., M. RÉPÉRANT, S. LAURENT, A. BRÉE, S. MIG-NON- GRATEAU, P. GERMON, D. RASSCHAERT, C. SCHOUER (2007): Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.*, 45, 3366–3376.
- PICARD, B., J. S. GARCIA, S. GOURIOU, P. DURIEZ, N. BRAHIMI, E. BINGEN, J. ELION, E. DENAMUR (1999): The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 67, 546–553.
- PORTER, R. A. JR. (1998): Bacterial enteritides of poultry. *Poult. Sci.* 77, 1159–1165.
- SCHOUER, C., B. SCHAEFFER, A. BRÉE, A. MORA, G. DAHBI, F. BIET, E. OSWALD, J. MAINIL, J. BLANCO, M. MOULIN-SCHOULEUR (2012): Diagnostic strategy for identifying avian pathogenic *Escherichia coli* based on four patterns of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 50, 1673–1678.



Životne, prehrambene navike i stavovi studenata druge godine studija veterinarske medicine

The life habits, nutritional habits and attitudes of veterinary medicine students

Prišlin, M.^{1*}, L. Pinčan^{1*}, O. Šiftar^{1*}, A. Shek Vugrovečki², L. Radin², L. Vranković², J. Aladrović²

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je steći uvid u životne i prehrambene navike te stavove studenata veterinarske medicine. U istraživanju je sudjelovalo 275 studenata (83,33 % upisanih studenata tijekom tri akademske godine). Upitnik je sadržavao podatke o antropometrijskim mjerama te pitanja gdje se ispitanici hrane i koliko obroka dnevno uzimaju, učestalost konzumiranja mesa, povrća, mlijeka i mliječnih proizvoda, tekućine, stupanj tjelesne aktivnosti, učestalost konzumiranja alkohola, kave, cigareta i energetskih pića te stavove o pretilosti i utjecaju studiranja na fizičko zdravlje. Prosječne vrijednosti tjelesne mase, visine i indeksa tjelesne mase veće su kod muških ispitanika, dok se oko 19 % studentica smatra pretilim. Studenti konzumiraju više obroka dnevno, jedu više mesa i piju više tekućine od studentica. Ispitanici konzumiraju ribu više puta tjedno kao i mlijeko i mliječne proizvode. Većina ispitanika konzumira alkohol, dok kavu, cigarete te energetske napitke konzumiraju ograničeno. Većina ispitanika procjenjuje da obveze tijekom studiranja utječu na njihovo fizičko zdravlje. Fizička aktivnost u osoba ove dobi trebala bi biti izraženija, a konzumacija alkohola i kave manja. Životne i prehrambene navike te stavovi različiti su ovisno o spolu ispitanika.

Abstract

The aim of this study was to gain insight into the life habits, nutritional habits and attitudes of students of veterinary medicine. The study involved 275 students (83.33 % of enrolled students). The questionnaire contained information about anthropometric measures and questions about where the respondents were eating and how many meals a day they ate, the frequency of consumption of meat, vegetables, milk and dairy products, also the frequency of fluid intake, the degree of physical activity, the frequency of consumption of alcohol, coffee, cigarettes and energy drinks their attitudes regarding obesity, and the influence of studying on their physical health. The average values of body mass, height and body mass index were higher in male students, while about 19 % of female students considered themselves obese. Male students consume more meals a day, eating more meat and drinking more liquids. Students consume fish several times a week, as well as milk and dairy products. Most respondents consume alcohol while coffee, cigarettes, and energy drinks are consumed in a limited way. Most students estimate that their obligations during their studies affect their physical health. Physical activity in people of this age should be more pronounced, while alcohol and coffee consumption should be lower. Life and nutritional habits and attitudes vary depending on the sex of the students.

¹ Marina Prišlin, Loredana Pinčan, Ozren Šiftar, student/-ica, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

² dr. sc. Ana Shek Vugrovečki, dr. sc. Lada Radin, dr. sc. Lana Vranković, prof. dr. sc. Jasna Aladrović, Zavod za fiziologiju i radiobiologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
prislin.marina@gmail.com,
pincanloredana@gmail.com,
osiftar@vef.hr

Ključne riječi: studenti, životne i prehrambene navike, stavovi

Key words: students, life and nutrition habits, attitudes

UVOD

Upisivanjem na fakultet studenti su suočeni s rastućim brojem obveza i znatno većim opterećenjem nego do tad (Abdulghani i sur., 2011.; Sathya Devi i Mohan, 2015.) te stoga studenti mijenjaju i prehrambene navike (Papadaki i sur., 2007.). Kvaliteta prehrane tada ovisi o navikama stečenima u obitelji (Neumark-Sztaineri sur., 2003.; Larson i sur., 2007.; Burgess-Champoux i sur., 2009.), o namirnicama koje su im dostupne za pripremu obroka ili koje se koriste za pripremu obroka koje konzumiraju u restoranima studentske prehrane. Upravo u doba studiranja povećavaju se umni napor i tjelesna aktivnost, stoga je raznolika prehrana, koja količinom i kvalitetom osigurava dovoljan unos hranjivih tvari, iznimno važna.

Zbog povećanog opterećenja životne se navike studenata mijenjaju, provode manje vremena spavajući (Abraham i Scaria, 2015.) i baveći se sportskim aktivnostima (Buckworth i Nigg, 2004.). Promjena životnih navika može imati za posljedicu promjene u sastavu, učestalosti i količini hrane koju studenti konzumiraju (Sajwani i sur., 2009.). Doručak je obrok koji studenti najčešće preskaču (Colić Barić i sur., 2003.; Pincan i sur., 2015.), a upravo taj obrok ima velik utjecaj na kognitivne sposobnosti i brzinu protoka informacija u radnoj memoriji pri učenju (Pollitt i Mathews, 1998.). Razloge preskakanja doručka možemo potražiti u izostanku navike konzumiranja doručka, nedostatku vremena ili zato što nisu pod nadzorom roditelja (djeca i adolescenti učestalije konzumiraju ovaj obrok (Colić-Barić i Šatalić, 2002.).

Suočavanje s novim životnim preprekama dovodi do posezanja za različitim stimulansima kao što su kava, energetska pića, cigarete te sklonost konzumaciji alkohola i lakih droga (Presley i sur., 1993.). O'Brien i sur. (2008.) utvrdili su da velik broj studenata u SAD-u konzumira energetska pića s alkoholom.

Opći je trend u svijetu porast tjelesne mase (Huang i sur., 2004.; Hanning i sur., 2007.) i indeksa tjelesne mase (Cluskey i Grobe, 2009.; Al-Rethaiaa i sur., 2010.) kod adolescenata. Pretilost se smatra velikim problemom današnjice, ali zbog vremena koje studenti provode na društvenim mrežama koje nameću stavove o lijepom, društveno prihvatljivom, pa time i o

idealnom fizičkom izgledu, studenti mogu imati pogrešnu percepciju o vlastitoj tjelesnoj masi (Sampasa-Kanyinga i sur., 2016.; Hazzard i sur., 2017.).

Tempo i opterećenost obvezama tijekom studiranja veterinarske medicine nameću potrebu za dobrom organizacijom vremena kako bi prehrana i fizička aktivnost bile uravnotežene te kako fizički i psihički naponi ne bi poremetili zdravstveno stanje studenata. Stoga je cilj rada bio steći uvid u prehrambene navike, učestalost konzumiranja alkohola, kave, energetskih pića i cigareta, učestalost fizičke aktivnosti te stavove o vlastitom izgledu.

ISPITANICI I METODE

Istraživanje je provedeno na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na studentima druge godine studija veterinarske medicine tijekom tri akademske godine, od 2014. do 2017. tijekom ljetnog semestra. Prije početka ispitivanja studenti su bili upoznati s ciljevima istraživanja. U istraživanju su sudjelovali dobrovoljno, a ispunjavanje anketnog listića bilo je anonimno. U anketi je sudjelovalo 275 studenata od ukupno upisanih 330 studenata tijekom tri godine (83,33 %). Pritom je bilo 218 studentica (79,27 %) i 57 studenata (20,73 %).

Anketni listić sastojao se od 24 pitanja. Napravljen je prema predlošku Senta i sur. (2004.) i modificiran za ovo istraživanje. Za ispunjavanje ankete bilo je potrebno oko 15 minuta. Na osnovi upisane tjelesne mase i visine ispitanika izračunat je indeks tjelesne mase ($ITM = \text{masa} / \text{visina}^2$) kao i u istraživanju Huang i sur., 2004. Pitanja su obuhvaćala gdje se ispitanici hrane i koliko obroka dnevno uzimaju, učestalost konzumiranja mesa, povrća, mlijeka i mliječnih proizvoda, tekućine, stupanj tjelesne aktivnosti, učestalost konzumiranja alkohola, kave, cigareta i energetskih pića.

Podaci dobiveni istraživanjem analizirani su u statističkom programu Statistica 12. Normalnost distribucije podataka provjerena je pomoću Shapiro-Wilk's W-testa. Rezultati antropometrijskih mjerenja prikazani su kao srednja vrijednost $\pm$ standardna devijacija ($m \pm SD$). Rezultati ankete prikazani su učestalošću odgovora za pojedini izbor odgovora.

Značajne razlike između studentica i studenata provjerene su Studentovim – t-testom u slučaju normalne razdiobe i Mann Whitneyevim U-testom kad distribucija podataka nije slijedila Gaussovu krivulju. Značajne razlike frekvencija odgovora studenata utvrđene su pomoću F-testa. Statistički značajnom smatrana je razlika na razini $p < 0,05$.

REZULTATI I RASPRAVA

Tijekom tri akademske godine (2014./2015. – 2016./2017.) drugu godinu studija veterinarske medicine upisalo je u prosjeku 20 % studenata i 80 % studentica. U istraživanju je sudjelovalo 83,33 % upisanih studenata.

Tijekom studiranja zbog izrazite fizičke aktivnosti te umnog napora važna je pravilna prehrana, i u energetske smislu i u zadovoljavanju nutritivnih potreba. Muški su ispitanici u ovom radu imali značajno veću tjelesnu masu, visinu i ITM u odnosu na studentice ($p < 0,05$; tablica 1). U ovom je istraživanju utvrđeno da 83,42 % djevojaka i 73,21 % mladića ima poželjan raspon ITM-a (tablica 2). U skupini studenata uočen je značajno veći postotak ispitanika ($p < 0,05$; tablica 2) u kategoriji $>25,0 - 30,0$, no kako se radi o fizički aktivnim osobama, može-

mo pretpostaviti da značajan udio u povećanoj masi ima i povećana mišićna masa studenata, a ne isključivo masno tkivo (Bosanac, 2012.). Također je kod 1,38 % studentica utvrđen indeks tjelesne mase veći od 30 (tablica 2), dok su Al-Rethaiaa i sur. (2010.) utvrdili 15,7 % pretilih studenata u Saudijskoj Arabiji.

Kako bi dobili uvid u percepciju ispitanika o vlastitoj tjelesnoj masi, tj. kako osoba percipira svoj izgled u odnosu na masu i tjelesnu kondiciju, ispitanici su odgovarali na pitanje o stavu o pretilosti. Uglavnom ne misle da su pretili (84,35 %), no uočena je značajna razlika između studenata i studentica jer studentice (17,43 %) u većem postotku smatraju da su pretile u odnosu na studente (6,82 %; $p < 0,05$; tablica 3). Kada se odgovori koreliraju s izračunatim ITM-om koji je najrasprostranjenija tehnika kojom se dovodi u vezu tjelesna masa i visina, uočen je trend pogrešne percepcije o tjelesnoj masi. Naime, značajno veći broj studentica (18,81 %) smatra se pretilim iako se njihov ITM kreće u poželjnom rasponu (18,5 – 25,0) u odnosu na svoje muške kolege (5,26 %, $p < 0,05$; grafikon 1). Slične su rezultate utvrdili Frank i sur. (2017.) kod adolescenata u Brazilu, dok Ursoniu i sur. (2011.) nalaze kod trećine adolescentica percepciju da su pretile, a imaju normalan ITM.

Tablica 1. Tjelesna visina, masa i indeks tjelesne mase studenata i studentica veterinarske medicine druge godine studija.

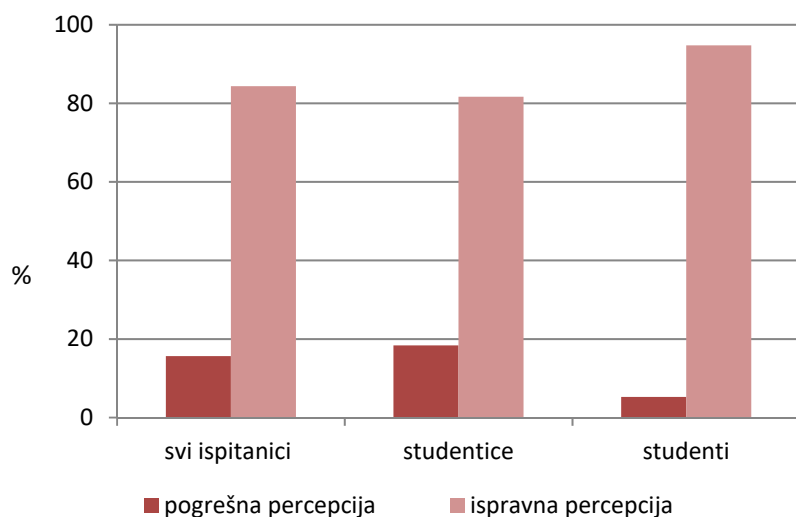
Parametri	Svi ispitanici	Studentice	Studenti
Visina (m)	1,71 ± 0,09	1,68 ± 0,06	1,83 ± 0,08 *
Masa (kg)	63,57 ± 11,35	60,3 ± 9,54	76,08 ± 10,94 *
Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	21,69 ± 3,07	21,4 ± 3,11	22,83 ± 2,71 *

*Statistički značajna razlika s obzirom na spol ($p < 0,05$)

Tablica 2. Distribucija indeksa tjelesne mase studenata i studentica veterinarske medicine druge godine studija (%).

Indeks tjelesne mase (kg/m ²)	Svi ispitanici	Studentice	Studenti
<18,5	9,16	10,59	5,36
18,6 – 25,0	81,69	83,42	73,21
25,1 – 30,0	8,06	4,61	21,43*
>30,1	1,09	1,38	0

*Statistički značajna razlika s obzirom na spol ($p < 0,05$)



Grafikon 1. Postotak studenata koji imaju pogrešnu percepciju o vlastitoj tjelesnoj masi.

U Americi više od trećine ispitanih adolescenata pogrešno procjenjuje svoju tjelesnu masu (Abraham i sur., 2014.).

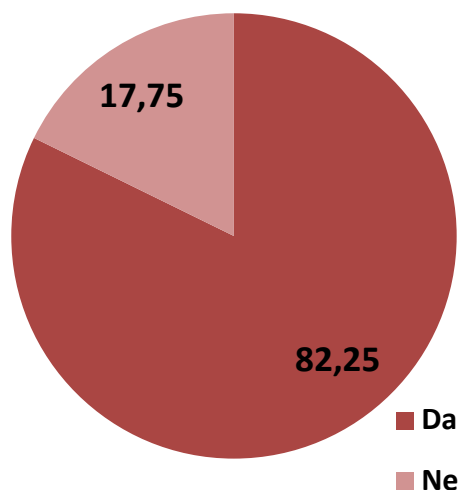
Što se tiče učestalosti konzumiranja obroka, 62,68 % ispitanika uzima 3 i više obroka dnevno, te 61,75 % svakodnevno jede svježe pripremljene obroke. Studenti u većem postotku jedu 5 ili više puta (14,04 %; $p < 0,05$) dnevno za razliku od studentica (6,85 %; tablica 3). Obroke studenti konzumiraju najčešće u restoranima društvene prehrane i kod kuće (79,71 %) (tablica 3). Pritom više od 50 % ispitanika smatra svoje obroke nezdravima. Doručak ne konzumira više od pola (50 %) ispitanika, neovisno o spolu (tablica 3). Trend preskakanja doručka uočen je i u istraživanju Nnanyelugo i Okeke (1987.) te Colić-Barić i sur. (2003.).

Više od 60 % ispitanika pije 1 – 2 L tekućine dnevno, dok studenti u značajno većem postotku piju 2 i više litara tekućine ($p < 0,05$; tablica 3) što odgovara dnevnim potrebama za tekućinom (Bender i Bender, 1997.). Studentice u statistički značajno većem postotku piju do 1 L tekućine dnevno u odnosu na studente (21,92 %, odnosno 1,75 %; $p < 0,05$). Konzumacija malih količina tekućine može dovesti do smanjenja kognitivnih funkcija (Pross, 2017.).

Velika zauzetost brojnim obvezama na fakultetu studentima nameće preraspodjelu vremena tijekom dana što utječe i na vrijeme provedeno spavajući. Većina ispitanika provodi 6 – 7 sati dnevno spavajući (68,86 %). U traja-

nju sna kod ispitanika nisu utvrđene značajne razlike s obzirom na spol (tablica 3). Manjak sna utječe na rezultate studiranja i narušava fizičko i psihičko zdravlje (Abraham i Scaria, 2015.).

Stupanj tjelesne aktivnosti smanjuje se u adolescentskoj dobi u odnosu na mlađu populaciju (Stone i sur., 1998.). U istraživanju je utvrđeno da se 28,73 % ispitanika bavi sportskom aktivnošću 2 – 3 puta tjedno (tablica 3) što je više od prosjeka u Hrvatskoj (Delaš, 2016.). Također, oko 50 % ispitanika ne bavi se sportom što može utjecati na kondiciju i fizičko zdravlje. Naime, većina ispitanika u ovom istraživanju procjenjuje da obveze tijekom studiranja utječu na njihovo fizičko zdravlje (grafikon 2) pri čemu



Grafikon 2. Učestalost odgovora na anketno pitanje „Smatrate li da vrijeme provedeno na fakultetu utječe na vaše fizičko zdravlje?“ (%).

Tablica 3. Svakodnevne navike i stavovi studenata i studentica veterinarske medicine druge godine studija (%).

Pokazatelj	Svi ispitanici	Studentice	Studenti
Količina obroka dnevno			
1 – 2	28,99	28,31	31,58
3 – 4	62,68	64,84	54,39
5 ili više	8,33	6,85	14,04*
Svježina svakodневnih obroka			
Da	61,75	62,61	58,73
Ne	38,25	37,39	41,27
Mjesto prehrane			
Isključivo vlastiti dom	9,42	10,5	5,26
Restoran društvene prehrane (menza)	10,87	10,05	14,04
Kombinirano	79,71	79,45	80,7
Smatraju da se zdravo hrane			
Da	49,28	47,49	56,14
Ne	50,72	52,51	43,86
Svakodnevno konzumiranje doručka			
Da	52,63	54,39	45,61
Ne	47,37	45,61	54,39
Svakodnevni unos tekućine			
Do 1 L	17,75	21,92	1,75*
1 – 2 L	61,59	63,01	56,14
3 L ili više	20,65	15,07	42,11*
Spavanje			
Do 5 h	10,99	11,11	10,53
6 – 7 h	68,86	70,83	61,4
8 – 9 h	19,05	17,13	26,32
10 ili više	1,1	0,93	1,75
Pretilost			
Da	15,65	17,43	6,82*
Ne	84,35	82,57	91,18*
Učestalost bavljenja sportom			
Svakodnevno	8,21	7,12	12,28
2 – 3x tjedno	28,73	29,83	26,32
1x tjedno	13,43	13,74	12,28
Nikad	49,63	49,76	49,12

*Statistički značajna razlika s obzirom na spol (p < 0,05)

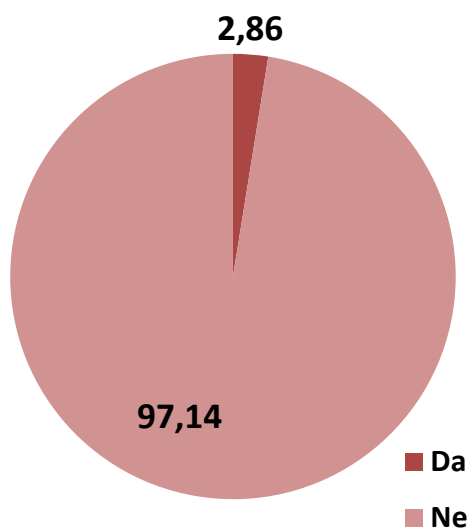
Tablica 4. Učestalost konzumiranja mesa, povrća, ribe i proizvoda iz mora, mlijeka i mliječnih proizvoda (% ispitanika).

Pokazatelj	Ukupno	Studentice	Studenti
Meso			
Nikad	2,86	3,72	0
Manje od 1x tjedno	2,86	3,72	0
Više puta tjedno	29,8	35,64	10,53*
Svakodnevno	64,48	56,91	89,47*
Povrće			
Nikad	1,9	1,94	1,75
Manje od 1x tjedno	5,7	4,85	8,77
Više puta tjedno	32,32	33,5	28,07
Svakodnevno	60,08	59,71	61,4
Riba i morski proizvodi			
Nikad	2,54	2,74	1,75
Manje od 1x tjedno	40,94	40,64	42,11
Više puta tjedno	54,35	54,34	54,39
Svakodnevno	2,17	2,28	1,75
Mlijeko i mliječni proizvodi			
Nikad	3,62	3,2	4,48
Manje od 1x tjedno	4,71	5,48	1,49
Više puta tjedno	69,57	65,3	73,13
Svakodnevno	25,73	26,02	20,9

*Statistički značajna razlika s obzirom na spol ($p < 0,05$)

značajno veći broj studentica smatra da im je fizičko zdravlje narušeno obvezama vezanim uz studiranje (84,86 % odnosno 73,68 %). Sathya Devi i Mohan (2015.) također su kod velikog broja studenata u Indiji utvrdili prisutnost psihičkog i fizičkog stresa.

Unos mesa kod studenata u istraživanju bio je značajno veći ($p < 0,05$; tablica 4) u odnosu na studentice, što su utvrdili i Colić-Barić i suradnici (2003.). Učestalost vegetarijanskog stila života u ovom istraživanju prisutna je kod 2,86 % ispitanika, i to samo kod studentica (grafikon 3). Frekvencija pozitivnog odgovora manja je nego u Americi gdje se o vegetarijanstvu izjašnjava oko 6,7 % ukupne populacije te su brojnije vegetarijanke (Perry i sur., 2001.; Stahler, 2006.).

**Grafikon 3.** Učestalost odgovora na anketno pitanje „Jeste li vegetarijanac, vegan i sl.“ (%).

Tablica 5. Učestalost konzumacije alkohola, kave, energetskih napitaka, cigareta i slatkiša studenata i studentica veterinarske medicine druge godine studija (% ispitanika).

Pokazatelj	Svi ispitanici	Studentice	Studenti
Alkohol			
Vino	31,2	33,33	24,47
Pivo	24,04	21,55	31,91*
Žestoka pića	31,46	33	26,6
Ne	13,3	12,12	17,02
Energetska pića			
1 limenka	9,09	9,63	7,02
2 – 3 limenke	10,55	11,47	7,02
3 ili više limenke	5,45	5,96	3,51
Ne	74,91	72,94	82,45
Kava			
1 šalica	30,91	29,36	36,84
2 – 3 šalice	21,82	23,85	14,04
3 ili više	6,55	6,88	5,26
Ne	40,73	39,91	43,86
Cigarete			
Više od 10 cigareta dnevno	10,55	10,55	10,53
Do 10 cigareta dnevno	24,36	25,23	21,05
Ne	65,09	64,22	68,42

*Statistički značajna razlika s obzirom na spol ($p < 0,05$)

S obzirom na energetske potrebe populacije studenata, unos povrća trebao bi biti 5 – 6 serviranja (Bosanac i Gašparović, 2008.), dok smo u ovom radu uočili da samo 60,08 % ispitanika svakodnevno konzumira povrće u svojoj prehrani (tablica 4).

U konzumaciji ribe i proizvoda iz mora uočeno je da većina ispitanika, čak 54,35 % konzumira ribu više puta tjedno (tablica 4). Kako su ribe izvrstan izvor n-3 višestruko nezasićenih masnih kiselina (engl. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), konzumacija ribe je poželjna jer su PUFA-e vrlo važne u procesu učenja, pamćenja i vizualne obrade informacija (Van der Wurff i sur., 2016.). Isti je trend uočen kod konzumacije mlijeka i mliječnih proizvoda (tablica 4) koji su dobar izvor kalcija potrebnog u fazi intenzivne koštane pregradnje i rasta (Hall, 2016.).

Ljudi zbog fizičkih i psihičkih opterećenja učestalije pribjegavaju konzumaciji alkohola, cigareta i nezdravoj hrani (Von i sur., 2004.). U ovom je radu utvrđeno da studenti u vrlo visokom postotku konzumiraju alkohol (86,7 %; tablica 5). Budući da u anketi nije istražena učestalost konzumacije, ne može se utvrditi koliko često studenti konzumiraju alkohol za razliku od Presley i sur. (1993.) koji su utvrdili konzumaciju alkohola u oko 45 % studenata na tjednoj osnovi. Studenti statistički značajno učestalije konzumiraju pivo za razliku od studentica ($p < 0,05$; tablica 5), dok za vino i žestice nije uočena statistički značajna razlika među spolovima. Konzumiranje alkohola problem je koji je uočen i kod studenata u Americi (Hendricks i sur., 2004.), Njemačkoj (Keller i sur., 2008.) te Koreji (Lee i sur., 2001.). Na pitanje o konzumi-

ranju energetske pića tijekom učenja oko 25 % ispitanika odgovorilo je potvrdno (tablica 5), dok se u istraživanju Malinauskas i sur. (2007.) navodi da 50 % studenata u Sjevernoj Karolini konzumira energetska pića tijekom učenja. Osim alkohola i energetske napitke studenti konzumiraju kavu i cigarete. U ovom istraživanju 40,73 % ispitanika ne konzumira kavu, a 65,09 % studenata ne puši cigarete (tablica 5) što je u skladu s radom Everett i sur. (1999.). Pušači su u ovom istraživanju podijeljeni u tzv. lake pušače koji konzumiraju do 10 cigareta dnevno i skupinu koja puši više od 10 cigareta dnevno (Subar i sur., 1990.). Konzumacija manja od deset cigareta dnevno utvrđena je kod 24,36 % od ukupnog broja ispitanika (tablica 5).

ZAKLJUČAK

Na osnovi rezultata može se zaključiti da su prosječne vrijednosti tjelesne mase, visine i indeksa tjelesne mase veće kod muških ispitanika u odnosu na ispitanice te da oko 19 % studentica pogrešno procjenjuje tjelesnu masu i smatra se pretilim. Studenti konzumiraju više obroka dnevno, jedu više mesa i piju više tekućine u odnosu na studentice. Ispitanici oba spola konzumiraju ribu više puta tjedno kao i mlijeko i mliječne proizvode. Većina ispitanika konzumira alkohol, dok kavu, cigarete te energetske napitke konzumiraju ograničeno. Većina ispitanika procjenjuje da obveze tijekom studiranja utječu na njihovo fizičko zdravlje. Fizička aktivnost u osoba ove dobi trebala bi biti izraženija, a konzumacija alkohola i kave manja.

ZAHVALA

Autori se zahvaljuju Jasni Sačar na izvanrednoj tehničkoj podršci.

LITERATURA

- ABDULGHANI, H. M., A. A. AL KANHAL, E. S. MAHMOUD, G. G. PONNAMPERUMA, E. A. AL-FARIS (2011): Stress and its effects on medical students: a cross-sectional study at a college of medicine in Saudi Arabia. *J. Health Popul. Nutr.* 29, 516-522.
- ABRAHAM, J., J. SCARIA (2015): Influence of sleep in academic performance - An integrated review of literature. *IOSR-JNHS* 4, 78-81.
- AL-RETHAIAA, A. S., A. E. A. FAHMY, N. M. AL-SHWAIIYAT (2010): Obesity and eating habits among college students in Saudi Arabia: a cross sectional study. *Nutr. J.* 9, 39.
- BENDER, D. A., A. E., BENDER (1997): Nutrition, a reference book. Oxford University Press, Oxford, New York, Melbourne, Toronto.
- BOSANAC, V. (2012): Optimiranje organizirane prehrane studenata smještenih u čakim domovima prema konceptualnom modelu. Disertacija. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- BOSANAC, V., I., GAŠPAROVIĆ (2008): Program prehrane, beta ver., Inovacija 09-1930, Hrvatska autorska agencija – Centar za intelektualno vlasništvo d.o.o, Zagreb.
- BUCKWORTH, J., C. R. NIGG (2004): Physical activity, exercise, and sedentary behavior in college students. *J. Am. Coll. Health* 53, 28-34.
- BURGESS-CHAMPOUX, T. L., N., LARSON, D., NEUMARK-SZTAINER, P. J., HANNAN, M. STORY (2009): Are family meal patterns associated with overall diet quality during the transition from early to middle adolescence? *J. Nutr. Educ. Behav.* 41, 79-86.
- CLUSKEY, M., D. GROBE (2009): College weight gain and behavior transitions: male and female differences. *J. Am. Diet. Assoc.* 109, 325-329.
- COLIĆ BARIĆ, I., Z., ŠATALIK, Ž., LUKEŠIĆ (2003): Nutritive value of meals, dietary habits and nutritive status in Croatian university students according to gender. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 54, 473-484.
- COLIĆ BARIĆ, I., Z., ŠTALIĆ (2002): Breakfast quality differences among children and adolescents in Croatia. *Int. J. Food Sci. Nutr.* 53, 79-87.
- DELAŠ, M. (2016): Živjeti zdravo hrvatski nacionalni program promicanja zdravlja. Meso, prvi hrvatski časopis o mesu 3, 190.
- EVERETT, S. A., C. G. HUSTEN, L. KANN, C. W. WARREN, D. SHARP, L. CROSSET (1999): Smoking initiation and smoking patterns among us college students. *J. Am. Coll. Health* 48, 55-60.

- FRANK, R., G. S. CLAUMANN, E. P. FELDEN, D. A. SILVA, A. PELEGRINI (2017): Body weight perception and body weight control behaviors in adolescents. *J. Pediatr. (Rio J)* DOI: 10.1016/j.jpeds.2017.03.008
- HALL, J. E. (2016): Pulmonary ventilation. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 13rd Ed., Elsevier, Inc. str. 495-502.
- HANNING, R. M., S. J. WOODRUFF, I. LAMBRAKI, L. JESSUP, P. DRIEZENAND, C. C. MURPHY (2007): Nutrient intakes and food consumption patterns among ontario students in grades six, seven, and eight. *Can. J. Public Health* 98, 12-16.
- HAZZARD, V. M., S. L. KAHN, K. R. SONNEVILLE (2017): Weight misperception and disordered weight control behaviors among U.S. high school students with overweight and obesity: Associations and trends, 1999-2013. *Eat. Behav.* 26, 189-195.
- HENDRICKS, K. M., N., HERBOLD, T., FUNG (2004): Diet and other lifestyle behaviours in young college women. *Nutr. Res.* 24, 981-991.
- HUANG, T. K., N. C. HOWARTH, B. H. LIN, S. B. ROBERTS, M. A. MCCRORY (2004): Energy intake and meal portions: associations with bmi percentile in u.s. children. *Obes. Res.* 12, 1875-1885.
- IBRAHIM, C., S. S. EL-KAMARY, J. BAILEY, D. M. ST GEORGE (2014): Inaccurate weight perception is associated with extreme weight management practices in us high-school students. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 58, 368-375.
- KELLER, S., J. E., MADDOCK, W., HANNÖVER, J. R., THYRIAN, H. D., BASLER (2008): Multiple health risk behaviours in German first year university students. *Prev. Med.* 46, 189-195.
- LARSON, N. I., D., NEUMARK-SZTAINER, P. J., HANNAN, M., STORY (2007): Family meals during adolescence are associated with higher diet quality and healthful meal patterns during young adulthood. *J. Am. Diet. Assoc.* 107, 1502-1510.
- LEE, M. S., J. W., LEE, M. K., WOO (2001): Study on the factors influencing food consumption by food frequency questionnaire of university students in Taejeon. *Korean J. Community Nutr.* 6, 172-181.
- MALINAUSKAS, B. M., V. G. AEBY, R. F. OVERTON, T. CARPENTER-AEBY, K. BABER-HEIDAL (2007): A survey of energy drink consumption patterns among college students. *Nutr. J.* 6, 35.
- NEUMARK-SZTAINER, D., P. J., HANNAN, M., STORY, J., CROLL, C. PERRY (2003): Family meal patterns: association with sociodemographic characteristics and improved dietary intake among adolescents. *J. Am. Diet. Assoc.* 103, 317-322.
- NEUMARK-SZTAINER, D., M., WALL, M. STORY, J. A., FULKERSON (2004): Are family meal patterns associated with disordered eating behaviours among adolescents? *J. Adolesc. Health* 35, 350-359.
- NNANYELUGO, D. O., E. C., OKEKE (1987): Food habits and nutrient intakes of Nigerian University students in traditional halls of residence. *J. Am. Coll. Nutr.* 6, 369-374.
- O'BRIEN, M. C., T. P. MCCOY; S. D. RHODES, A. WAGONER, M. WOLFSON (2008): Caffeinated cocktails: energy drink consumption, high-risk drinking, and alcohol-related consequences among college students. *Acad. Emerg. Med.* 15, 453-460.
- PAPADAKI, A., G., HONDROS, J. A., SCOTT, M., KAPSOKEFALOU (2007): Research report eating habits of University students living at, or away from home in Greece. *Appetite* 49, 169-176.
- PERRY, C. L., M. MCGUIRE, D. NEUMARK-SZTAINER, M. STORY (2001): Characteristics of vegetarian adolescents in a multiethnic urban population. *J. Adolesc. Health*. 29, 406-416.
- PINCAN, L., M. PRIŠLIN, O. ŠIFTAR, K. PEREZ, A. SHEK VUGROVEČKI, L. RADIN, J. ALADROVIĆ (2015): Životne i prehrabene navike studenata druge godine studija veterinarske medicine. *Zbornik radova Veterinarski dani 2015 znanstveno-stručni skup s međunarodnim sudjelovanjem, Opatija*, 195-204.
- POLLITT, E., R. MATHEWS (1998): Breakfast and cognition: an integrative summary. *Am. J. Clin. Nutr.* 67, 804S-813S.
- PRESLEY, C. A., P. W. MEILMAN, J. R. CASHIN,

- R. LYERIA (1993): Alcohol and drugs on American college campuses. Use, consequences, and perceptions of the campus environment. Volume I: 1989-91. Carbondale, Ill: Core Institute.
- PROSS, N. (2017): Effects of dehydration on brain functioning: a life-span perspective. *Ann. Nutr. Metab.* 70, 30–36.
 - SAJWANI, R. A., S. SHOUKAT, R. RAZA, M. M. SHIEKH, Q. RASHID, M. S. SIDIQUE, S. PANJU, H. RAZA, S. CHAUDHRY, M. KADIR (2009): Knowledge and practice of healthy lifestyle and dietary habits in medical and non-medical students of Karachi, Pakistan. *J. Pak. Med. Assoc.* 59, 650-655.
 - SAMPASA-KANYINGA, H., J. P. CHAPUT, H. A. HAMILTON (2016): Use of social networking sites and perception and intentions regarding body weight among adolescents. *Obes. Sci. Pract.* 2, 32-39.
 - SATHYA DEVI, R., S. MOHAN (2015): A study on stress and its effects on college students. *IJSEAS* 1, 449-456.
 - SENTA, A., J., PUCARIN-CVETKOVIĆ, J., DOKO JELINIĆ (2004): Kvantitativni modeli namirnica i obroka. Medicinska naklada, Zagreb.
 - STAHLER, C. (2006): How many adults are vegetarian? *Vegetarian J.* 4, 1-5.
 - STONE, E. J., T. L. MCKENZIE, G. J. WELK, M. L. BOOTH (1998): Effects of physical activity interventions in youth. Review and synthesis. *Am. J. Prev. Med.* 15, 298-315.
 - SUBAR, A. F., L. C., HARLAN, M. E., MATTSON (1990): Food and nutrient intake differences between smokers and non-smokers in the U.S. *Am. J. Public Health* 80, 1323-1329.
 - URSONIU, S., S. PUTNOKY, B. VLAICU (2011): Body weight perception among high school students and its influence on weight management behaviors in normal weight students: a cross-sectional study. *Wien Klin. Wochenschr.* 123, 327-333.
 - VAN DER WURFF, I. S. M., C., VON SHACKY, K. BERGE, P. A., KIRSCHNER, R. H. M. DE GROOT (2016): A protocol for a randomised controlled trial investigating the effect of increasing omega-3 index with krill oil supplementation on learning, cognition, behaviour and visual processing in typically developing adolescents. *BMJ Open* 6: e011790.
 - VON, D., S. EBERT, A. NGAMVITROJ, N. PARK, D.H. KANG (2004): Predictors of health be-

8TH - 17TH OF DECEMBER 2017
ZAGREB, CROATIA

ENDS ON 6TH OF NOVEMBER, 2017 23:59 CET

TNT
TRAINING NEW TRAINERS



Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union



Morfometrijske osobitosti spermija jarčeva francuske alpine

Morphometric characteristics of spermatozoa in French alpine bucks

Rakić, K.^{1*}, S. Vince², I. Žura Žaja³

Sažetak

Cilj ovog istraživanja bio je odrediti morfometrijske osobitosti glave i repa spermija jarčeva francuske alpine i dobivene vrijednosti usporediti s onima u dostupnoj literaturi. Uzorci ejakulata uzimani su pomoću umjetne vagine jednom tjedno u jarčeva (n = 12) starosti 1 – 4 godine tijekom 3 mjeseca. Na obojenim razmazima sjemena Bloomovom metodom (n = 144) provedena je morfometrijska analiza na 7289 spermija. Morfometrija spermija određena je pomoću kompjutorski potpomognutog programa za analizu slika, SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Croatia). Vrijednosti morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva francuska alpina uglavnom se nisu razlikovale od vrijednosti istih pokazatelja drugih pasmina jarčeva dostupnih u literaturi, osim kod Barbari pasmine jarčeva. Morfometrijska analiza ejakulata jarčeva mogla bi postati pouzdana standardna metoda procjene kakvoće ejakulata, no potrebno je standardizirati morfometrijske vrijednosti pokazatelja glave i repa spermija i povezati ih s kvalitetom ejakulata i plodnošću jarčeva.

Abstract

The aim of this study was to determine the morphometric parameters of the spermatozoa head and tail in ejaculates from French alpine bucks, and to compare the values obtained with those in the available literatures. The samples of ejaculates were taken by artificial vagina from bucks (n = 12) aged 1 - 4 years on a weekly basis over 3 months. Morphometric analyses were performed on 7289 spermatozoa in stained semen smears by Bloom's method (n = 144). Sperm cell morphometry was carried out using a computer-assisted program package for image analysis, SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Croatia). The values of the morphometric parameters of the spermatozoa head and tail in French alpine bucks generally did not differ from the values of the same parameters of other breeds of bucks in the available literature, except for Barbari bucks. Morphometric analysis of the bucks' ejaculate could be a reliable standard method for sperm quality assessment, but it is necessary to standardize the morphometric values of the spermatozoa head and tail parameters, and relate them to semen quality, as well as the fertility of the bucks.

Ključne riječi: jarčevi, spermiji, morfometrijska analiza

Key words: bucks, spermatozoa, morphometric analysis

UVOD

Upravljanje rasplodivanjem domaćih životinja ima, među ostalim, tendenciju smanjenja broja rasplodnjaka na farmama i centrima za umjetno osjemenjivanje uz istodobnu potražnju, odnosno selekciju izvrsne kakvoće ejakulata. S obzirom na važnost spermija u reproduktivnom procesu, razvijeno je mnoštvo metoda za analizu kakvoće i funkcije spermija (Hidalgo i sur., 2005.). Procjena kakvoće sjemeni način je procjene potencijala plodnosti rasplodnjaka te je sredstvo pomoću kojega se izračunava broj doza spermija za umjetno osjemenjivanje koje se mogu dobiti od jednog ejakulata. Gubljenje spermija jedan je od pokazatelja u standardnoj procjeni ejakulata rasplodnjaka koji se najčešće koristio, dok je morfološka analiza spermija imala sekundarno mjesto u primjeni, jer je za spomenutu analizu potrebno mnogo više vremena zbog složenosti metodologije.

Sustavi računalno potpomognute morfometrijske analize sperme (engl. *computer-assisted sperm morphometry analysis*, ASMA) unaprijedili su procjenu morfologije spermija, s precizno ponavljajućim mjerenjima dimenzija glave spermija u različitim životinjskih vrsta (Gravance i sur., 1996.), uključujući jarčeve (Hidalgo i sur., 2006., Gravance i sur., 1996., Hidalgo i sur., 2005.). Nadalje, morfometrijska mjerenja glave spermija mogu se koristiti u boljim klasifikacijskim tehnikama primjenom postupaka statističkog modeliranja. U tom pogledu ASMA tehnologija i multivarijatne statističke metode, uključujući diskriminacijsku analizu i grupiranje podataka, uspješno su korištene za procjenu morfoloških klasa/podskupina glave spermija u nekoliko životinjskih vrsta (Thurston i sur., 2001., Buendía i sur., 2002., Estes i sur., 2006., Rubio-Guillén i sur., 2007.).

Računalna analiza slike sve se više primjenjuje u različitim dijagnostičkim postupcima u kliničkim laboratorijima, što omogućuje numeričku ocjenu i najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnom pregledu (Nafe, 1991., Russack, 1994.) te time omogućuje objektivnu kvantifikaciju određenih pokazatelja, poput morfometrijskih osobitosti spermija. Sustav za analizu slike sastoji se od mikroskopa, kamere visoke rezolucije, monitora, računala i programa za prihvata i analizu slike. Pomoću videokamere

svjetlosni mikroskop sliku pretvara u analogni električni signal koji se potom u računalu digitalizira u elemente slike nazvane pikseli (Bartels i Thompson, 1994.). Ljudsko oko u stanju je razlučiti 30 – 40 nijansi sivila po slici, dok računal može razlučiti 256 nijansi po svakom pikselu (Kisner, 1988.). Digitalni signal može se pretvoriti u analogni signal i biti prikazan na monitoru snažne rezolucije koji omogućuje prepoznavanje istraživanih detalja staničnih struktura. Najčešće korištena metoda jest interaktivna računalna analiza slike, gdje se računalnim mišem dijelom automatski, dijelom ručno, ocrtavaju konture struktura koje su od interesa za mjerenje (Kardum, 2016.).

Baak (1985.) definira morfometriju kao kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama. Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog je značenja što se može koristiti standardno obrađeni materijal, primjerice razmaz sjemeni obojen eozin-nigrozinskom metodom. Osim toga, rezultati mjerenja (primarni podaci) mogu se koristiti za izračun novih podataka (sekundarni podaci), koji se tada mogu statistički obraditi (Oberholzer i sur., 1991.). Prednost je u tome što je jeftina i tehnički jednostavna metoda, a mogu se određivati različiti planimetrijski pokazatelji (Baak, 1985., Van Diest i sur., 1991., Kardum, 2016.).

Cilj je ovoga istraživanja odrediti morfometrijske osobitosti glave i repa spermija jarčeva francuske alpine i usporediti dobivene vrijednosti s onima u dostupnoj literaturi.

MATERIJALI I METODE

Polučivanje ejakulata

Jarčevima je ejakulat polučen pomoću umjetne vagine nakon skoka na fantom (koza u estrusu), što je obavljala uvijek ista osoba/veterinar na koju su jarčevi bili naviknuti. Svakom jarcu ejakulat je polučen 4 puta mjesečno, ukupno 12 puta tijekom pokusnog razdoblja od 3 mjeseca.

Postupak bojenja

Postupak supravitalnog bojenja prema Bloomu uključuje primjenu boja eozina i nigrozina.

Pritom se jedna manja kap sjemena, veća kap eozina i dvije kapi nigrozina nakapavaju na jednu stranu čiste, odmašćene i zagrijane predmetnice. Potom se kapljice čistim štapićem pažljivo promiješaju i načini se razmaz koji se suši na toplom mjestu. Mrtvi se spermiji, koji nisu imali cjelovitu staničnu membranu, oboje eozinom (crveno), dok cjelovite stanične membrane živih spermija ne popuštaju boje te ostaju neobojeni. Boja nigrozina odgovorna je za stvaranje tamne pozadine koja olakšava procjenu spermija.

Morfometrijska analiza spermija

Računalna analiza slike napravljena je na osobnom računalu korištenjem programa SFORM (VAMSTEC, Zagreb, Hrvatska). Sustav se sastoji od kamere u boji visoke rezolucije (Donpisha 3CCD) koja sliku svjetlosnog mikro-

skopa Olympus BX 41, vidljivu pod objektivom povećanja 40 x, digitalizira i prenosi u osobno računalo. Morfometrijska analiza spermija jarčeva provedena je na obojenim razmazima sjemena Bloomovom metodom jer je njome vidljiv središnji dio repa spermija. Ukupno je analizirano 144 obojenih razmaza spermija. Na njima je izmjereno približno 50 spermija po svakom obojenom razmazu. Analizirane su samo glave spermija koje se nisu preklapale s drugim spermijima ili nečistoćama i repovi koji nisu bili pre-savijeni. Granice glave, središnjeg djela i repa spermija označavane su interaktivno (najprije glava, zatim središnji dio, a potom rep spermija) uz ručnu korekciju računalnim mišem (slika 1). Za glavu i središnji dio spermija određene su: površina (μm^2), opseg (μm), minimalni i maksimalni polumjer (μm), dužina i širina (μm), a za rep spermija određena je dužina u mikrometri-

Slika 1. Morfometrijska analiza spermija u programu SFORM.



ma. Pokazatelji oblika za glavu spermija izračunati su prema Hidalgo i sur. (2005.) pomoću primarnih pokazatelja, i to: pravilnost (engl. *regularity*; $\pi \times \text{dužina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}$), naboranost (engl. *rugosity*; $4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2$), eliptičnost (engl. *ellipticity*; $\text{dužina} / \text{širina}$) i elongacija (engl. *elongation*; $(\text{dužina} - \text{širina}) / (\text{dužina} + \text{širina})$). Izračunata je i duljina spermija ($\text{dužina glave} + \text{dužina repa spermija}$) te različiti omjeri primarnih pokazatelja: $\text{dužina glave} / \text{dužina spermija}$, $\text{dužina glave} / \text{dužina repa}$,

$\text{dužina repa} / \text{dužina spermija}$, $\text{opseg glave} / \text{dužina spermija}$, $\text{površina glave} / \text{dužina spermija}$, $\text{dužina glave} \times \text{širina glave} / \text{dužina spermija}$.

Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka učinjena je pomoću programskog paketa SAS 9.4 (Statistical Analysis Software 2002-2012 by SAS Institute Inc., Cary, SAD). Deskriptivna statistika napravljena je pomoću modula PROC MEANS i PROC FREQ.

Tablica 1. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti glave spermija jarčeva.

Pokazatelji glave spermija	Varijacije unutar istih jarčeva				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina (μm)	8,79-9,28	8,80-9,29	0,28-0,57	3,18-6,16	8,76-9,74	8,73-9,70	0,35-0,55	4,08-5,98	9,17	9,11	0,52	5,66
Širina (μm)	4,76-4,97	4,80-4,98	0,23-0,33	4,64-6,57	4,74-5,23	4,81-5,21	0,19-0,36	3,95-7,31	4,19	4,87	0,29	5,89
Minimalni polumjer (μm)	2,13-2,24	2,16-2,23	0,13-0,17	5,66-7,55	2,16-2,36	2,16-2,35	0,11-0,18	4,71-8,05	2,21	2,22	0,15	6,87
Maksimalni polumjer (μm)	4,53-4,79	4,51-4,78	0,15-1,29	3,41-6,24	4,53-5,02	4,51-5,01	0,19-0,28	4,17-5,96	4,74	4,72	0,27	5,65
Površina (μm ²)	34,28-38,44	35,08-38,08	2,35-4,21	6,63-10,99	35,72-41,77	34,69-41,77	1,95-4,15	5,47-10,47	37,35	36,83	3,46	9,27
Opseg (μm)	23,37-24,75	23,52-24,68	0,79-1,39	3,37-5,47	23,31-25,79	23,37-25,79	0,79-1,25	3,31-4,94	24,43	24,29	1,19	4,89
Eliptičnost	1,80-1,91	1,85-1,93	0,09-0,12	5,05-6,20	1,85-1,93	1,85-1,93	0,09-0,12	4,62-5,85	1,88	1,87	0,1	5,57
Elongacija	0,30-0,32	0,30-0,32	0,02-0,03	7,51-9,32	0,30-0,32	0,30-0,32	0,02-0,03	7,05-9,89	0,3	0,3	0,03	8,29
Naboranost	0,78-0,79	0,78-0,80	0,02-0,02	2,32-3,07	0,78-0,80	0,78-0,80	0,02-0,03	2,32-3,40	0,79	0,79	0,02	2,81
Pravilnost	0,94-0,96	0,94-0,95	0,02-0,03	2,32-3,00	0,94-0,95	0,94-0,95	0,02-0,03	2,48-3,08	0,95	0,95	0,03	2,69

Eliptičnost = $\text{dužina} / \text{širina}$, Elongacija = $[(\text{dužina} - \text{širina}) / (\text{dužina} + \text{širina})]$, Naboranost = $[4\pi \times \text{površina} / \text{opseg}^2]$, Pravilnost = $[\pi \times \text{dužina} \times \text{širina} / 4 \times \text{površina}]$

Dob jarčeva kategorizirana je u tri skupine: skupina 1 (1 – 1,5 godina), skupina 2 (> 1,5 – 2,5 godine), skupina 3 (> 2,5 godine).

REZULTATI

Pojedinačni morfometrijski pokazatelji glave i repa spermija

Morfometrijska mjerenja određena su na ukupno 7289 spermija. Budući da je postojala razlika između morfometrijskih podataka “ži-

vih spermija” (neobojenih) i “mrtvih spermija” (obojeni), koji su bili statistički značajno različiti (veća dužina, širina, površina te opseg glave i spojnog dijela repa), za daljnju su analizu uvršteni morfometrijski pokazatelji samo živih spermija (N = 6567). Zbog toga što se svakom jarcu ejakulat uzimao više puta, deskriptivnim je podacima prikazana varijacija unutar jedinki (jarčeva), između jedinki po svakom datumu uzimanja ejakulata te ukupna varijacija morfometrijskih pokazatelja glave i repa (tablice 1, 2 i 3).

Tablica 2. Deskriptivni pokazatelji morfometrijskih osobitosti repa spermija jarčeva.

Pokazatelji središnjeg dijela repa i dužina repa spermija	Varijacije unutar istih jedinki				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina središnjeg dijela (µm)	12,41-13,30	12,35-13,45	0,59-0,89	4,64-6,71	12,56-13,75	12,45-13,62	0,45-0,86	3,51-6,74	12,95	2,89	0,74	5,69
Širina središnjeg dijela (µm)	1,80-2,20	1,74-1,87	0,34-0,80	20,02-36,23	1,69-2,18	1,65-2,03	0,31-0,66	18,60-32,00	1,9	1,8	0,47	24,54
Minimalni polumjer središnjeg dijela (µm)	0,40-0,49	0,37-0,52	0,14-0,22	31,51-46,06	0,41-0,50	0,41-0,52	0,12-0,19	26,36-44,37	0,46	0,52	0,16	35,34
Maksimalni polumjer središnjeg dijela (µm)	6,38-6,84	6,36-6,94	0,32-0,41	4,97-6,08	6,44-7,08	6,39-7,02	0,24-0,44	3,67-6,67	6,65	6,62	0,39	5,89
Opseg središnjeg dijela (µm)	28,51-30,69	28,40-30,69	1,15-1,79	3,97-6,04	28,57-31,49	28,46-31,25	1,05-1,78	3,59-5,69	29,64	29,46	1,65	5,58
Površina središnjeg dijela (µm ²)	17,57-19,95	17,63-19,92	1,23-2,91	7,06-15,22	17,70-21,41	17,56-20,39	1,30-2,43	7,30-12,83	18,87	18,55	2,19	11,62
Dužina repa (µm)	49,12-54,19	49,73-55,12	2,09-2,97	4,16-5,57	49,21-54,73	49,45-55,02	1,18-2,61	2,36-4,88	51,28	50,75	2,75	5,36

Tablica 3. Deskriptivni pokazatelji ostalih morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva.

Različite mjere glave i repa spermija	Varijacije unutar istih jedinki				Varijacije između jarčeva (prema datumu uzorkovanja)				Ukupno			
	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Interval srednje vrijednosti	Interval medijane vrijednosti	Interval standardne devijacije	Interval koeficijenta varijacije (%)	Srednja vrijednost	Medijan	Standardna devijacija	Koeficijent varijacije (%)
Dužina spermija (µm)	57,91-63,63	58,25-64,65	2,22-3,83	3,74-6,19	58,00-64,47	58,25-64,88	1,22-2,90	2,08-4,74	60,48	59,85	3,02	4,99
Dužina glave / Dužina spermija	0,15-0,15	0,15-0,15	0,01-0,01	4,13-5,61	0,15-0,16	0,15-0,16	0,01-0,01	4,26-5,33	0,15	0,15	0,01	4,98
Dužina glave / Dužina repa	0,17-0,18	0,17-0,18	0,01-0,01	4,87-6,66	0,18-0,19	0,17-0,19	0,01-0,01	5,02-6,31	0,18	0,18	0,01	5,90
Dužina repa / Dužina spermija	0,85-0,85	0,84-0,85	0,01-0,01	0,72-1,01	0,84-0,85	0,84-0,85	0,01-0,01	0,75-0,91	0,85	0,85	0,01	0,89
Opseg glave / Dužina spermija	0,39-0,41	0,39-0,41	0,01-0,02	3,86-5,93	0,40-0,42	0,39-0,42	0,01-0,02	3,52-5,27	0,41	0,4	0,02	4,65
Površina glave / Dužina spermija	0,59-0,63	0,60-0,63	0,04-0,05	6,03-8,85	0,60-0,65	0,60-0,64	0,03-0,06	6,01-9,66	0,62	0,62	0,05	7,74
Dužina glave x Širina glave / Dužina spermija	0,72-0,76	0,71-0,76	0,05-0,07	6,94-10,26	0,72-0,78	0,72-0,78	0,05-0,08	6,71-10,44	0,75	0,74	0,07	8,7

Dužina spermija = dužina glave + dužina repa

RASPRAVA

Uobičajeno se pretrage ejakulata u spermija jarčeva rade vizualnim metodama, pri čemu se procjenjuje broj normalnih i broj abnormalnih spermija na osnovi izgleda glave i repa spermija, što bi značilo da se populacija spermija u ejakulatu dijelila na udio normalnih spermija i udio abnormalnih spermija. Standardnim procjenama morfologije spermija ne može se temeljito procijeniti rasplodna sposobnost mužjaka, jer ne omogućuje objektivnu analizu

malih, ali značajnih razlika koje postoje između spermija u različitim uzorcima. Upotrebom različitih programa računalne analize slike (spermija) dobile su se mnogo preciznije i detaljnije morfometrijske mjere, što je uvelike pomoglo u boljoj procjeni morfologije spermija, a čime se smanjuju varijacije u procjeni građe spermija te u detekciji suptilnih razlika među pojedinim spermijima koje se ne mogu detektirati subjektivnim metodama (Sancho i sur., 1998., Hidalgo i Dorado, 2009.). U dostupnoj literaturi postoji tek nekoliko studija u kojima je provedena mor-

fometrijska analiza spermija u jarčeva. Zbog mogućnosti velike varijacije u podacima pokazatelja spermija izmjerenih morfometrijskom analizom između različitih laboratorija (podatak koji se navodi u literaturi) dobiveni rezultati ovog istraživanja uspoređeni su dostupnima iz literature. Tako su Sinha i sur. (2014.) u jarčeva slične dobi kao i u ovom istraživanju (2 do 4 godina), koristeći se također računalno potpomognutom morfometrijskom analizom spermija, istu metodu bojenja razmaza, ali za jarčeve pasmine Barbari, dobili vrijednosti koje su u nekim parametrima odstupale od rezultata ovog istraživanja. Usporedbom podataka našega istraživanja (podebljane vrijednosti) s podacima iz istraživanja Sinha i sur. (2014.) uočljivo je da su se srednje vrijednosti površine glave spermija ($37,35 \pm 3,46$ prema $29,40 \pm 0,16$ (μm^2)) te površina ($18,87 \pm 2,19$ prema $8,54 \pm 0,05$ (μm^2)) i širina središnjeg dijela repa spermija ($1,9 \pm 0,47$ prema $0,66 \pm 0,01$ (μm)) najviše razlikovale, dok je u vrijednostima svih ostalih morfometrijskih pokazatelja spermija bilo minimalnih razlika. Tako su vrijednosti morfometrijskih pokazatelja spermija našeg istraživanja uglavnom bile veće (podebljane vrijednosti) od vrijednosti morfometrijskih pokazatelja spermija Barbari pasmine: površina glave $29,40 \pm 0,16$ prema $37,35 \pm 3,46$ (μm^2), dužina glave $7,89 \pm 0,06$ prema $9,17 \pm 0,52$ (μm), širina glave $4,26 \pm 0,04$ prema $4,19 \pm 0,29$ (μm), opseg glave $24,90 \pm 0,14$ prema $24,43 \pm 1,19$ (μm), eliptičnost glave $1,86 \pm 0,02$ prema $1,88 \pm 0,1$, naboranost glave $0,60 \pm 0,01$ prema $0,79 \pm 0,02$, elongacija glave $0,30 \pm 0,01$ prema $0,3 \pm 0,03$, pravilnost glave $0,90 \pm 0,01$ prema $0,95 \pm 0,03$, površina središnjeg dijela repa $8,54 \pm 0,05$ prema $18,87 \pm 2,19$ (μm^2), dužina središnjeg dijela repa (μm) $12,48 \pm 0,06$ prema $12,95 \pm 0,74$, širina središnjeg dijela repa $0,66 \pm 0,01$ prema $1,9 \pm 0,47$ (μm), dužina repa $48,14 \pm 0,23$ prema $51,28 \pm 2,75$ (μm). Nasuprot tome, vrijednosti primarnih morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija jarčeva u ovom istraživanju gotovo su istovjetne s vrijednostima istih pokazatelja dobivenih u istraživanju Wibowoa i sur. (2013.), koji su istraživali razlike u morfometrijskim pokazateljima spermija između četiri lokalno uzgajane pasmine jarčeva. Hidalgo i Dorado (2009.) mjerili su morfometrijske pokazatelje glave spermija Florida jarčeva obojanih Diff-Quik metodom, gdje

su prikazane vrijednosti bile podjednake vrijednostima izmjerenim u ovom istraživanju, jedino se vrijednost površine glave spermija malo više razlikovala.

ZAKLJUČAK

U ovom su radu prvi put izneseni detaljni rezultati morfometrijskih pokazatelja glave i repa spermija u jarčeva pasmine francuska alpina. Morfometrijski pokazatelji spermija pod utjecajem su različitih genetskih i čimbenika okoliša koje dodatno treba istražiti, no dobivene vrijednosti i nove spoznaje ovim istraživanjem pomoći će u budućim istraživanjima. Morfometrijska analiza ejakulata jarčeva mogla bi postati pouzdana standardna metoda procjene kakvoće ejakulata, no potrebno je standardizirati morfometrijske vrijednosti pokazatelja glave i repa spermija i povezati ih s kvalitetom ejakulata i plodnošću jarčeva. Povezivanje tih standarda omogućilo bi kvalitetniju selekciju jarčeva u centrima za umjetno osjemenjivanje te pružilo relevantna saznanja o pravilnosti spermatogeneze i spermiogeneze u jarčeva.

LITERATURA

- BAAK, J. P. A. (1985): The principles and advances of quantitative pathology. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 9, 89-95.
- BARTELS, P. H., D. THOMPSON (1994): The Video Photometer. In: *Image Analysis. A Primer for Pathologists*. Raven Press, Ltd., New York, pp. 29-57.
- BUENDÍA, P., C. SOLER, F. PAOLICCHI, C. GAGO, B. URQUIETA, F. PÉREZ-SÁNCHEZ, E. BUSTOS-OBREGÓN (2002): Morphometric characterization and classification of alpaca sperm heads using the Sperm-Class Analyzer® computer assisted system. *Theriogenology* 57, 1207-1218.
- ESTESO, M. C., A. J. SOLER, M. R. FERNANDEZ-SANTOS, A. A. QUINTERO-MORENO, J. J. GARDE (2006): Functional significance of the sperm head morphometric size and shape for determining freezability in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal sperm samples. *J. Androl.* 27, 662-670.
- GRAVANCE, C. G., R. VISHWANATH, C. PITT, P. J.

- CASEY (1996): Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205-1215.
- HIDALGO, M., J. DORADO (2009): Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108-110. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2009.10.006>
 - HIDALGO, M., I. RODRÍGUEZ, J. DORADO (2006): Influence of staining and sampling procedures on goat sperm morphometry using the Sperm Class Analyzer. *Theriogenology* 66, 996-1003.
 - HIDALGO, M., I. RODRÍGUEZ, J. DORADO SANZ, C. SOLER (2005): Effect of sample size and staining methods on stallion sperm morphometry by the Sperm Class Analyzer. *Vet. Med.* 50, 24-32.
 - KARDUM, M. (2016): Biološke osobitosti leukocita i antioksidacijski status u mliječnih krava hranjenih dodatkom lanenog sjemena i organskog selena. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska.
 - KISNER, H. J. (1988): Principles and clinical application of image analysis. *Clin. Lab. Med.* 8, 723-736.
 - NAFE, R. (1991): Planimetry in pathology-a method in its own right besides stereology in automatic image analysis. *Exp. Pathol.* 43, 239-246.
 - OBERHOLZER, M., H. CHRISTEN, R. ETTLIN, M. BUSER, M. OESTRECHER, R. GSCHWIND (1991): Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstrated on simple, multipurpose analysis system. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 13, 316-320.
 - RUBIO-GUILLÉN, J., D. GONZÁLEZ, J. J. GARDE, M. C. ESTESO, M. R. FERNÁNDEZ-SANTOS, J. E. RODRÍGUEZ-GIL, N. MADRID-BURY, A. QUINTERO-MORENO (2007): Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. *Reprod. Dom. Anim.* 42, 354-357.
 - RUSSACK, V. (1994): Image cytometry: current applications and future trends. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 31, 1-34.
 - SINHA, C., S. YADAV, B. YADAV, J. KUMAR, K. D. SINGH (2014): Objective assessment of sperm morphometry of Barbari bucks. *Indian J. Small Rumin.* 20, 129-131.
 - THURSTON, L. M., P. F. WATSON, A. J. MILEHAM, W. V. HOLT (2001): Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. *J. Androl.* 22, 382-394.
 - VAN DIEST, P. J., J. P. A. BAAK (1991): Morphometry. In: Bibbo M. *Comprehensive cytopathology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 946-964.



34th

WORLD VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS



Barcelona, Spain | May 5 - 8, 2018



Bromirani retardanti plamena i perfluorirane tvari

Brominated flame retardants and perfluorinated chemicals

Preveo: Srebočan, E.

Sažetak

Bromirani retardanti plamena i perfluorirane tvari smatraju se poznatim onečišćivačima okoliša. U proteklih nekoliko desetljeća spoznale su se činjenice o njihovoj raspodjeli u okolišu, divljim životinjama i ljudima, ali putevi transformacije u okolišu i živim organizmima, način štetnog djelovanja i učinak koji imaju na organizme nisu do kraja razjašnjeni. Pritom su razina onečišćenja i mogući štetni učinak na domaće životinje i kućne ljubimce uvelike zanemareni. Laboratorijska istraživanja na pokusnim životinjama i slučajna otrovanja pokazuju da izloženost ovim spojevima može imati ozbiljne posljedice za zdravlje u smislu reproduktivne toksičnosti s endokrinim poremećajem, imunotoksičnosti, neurotoksičnosti i kancerogenosti. Na osnovi laboratorijskih i terenskih istraživanja smatra se da izloženost farmских životinja ovim tvarima može imati štetan učinak na njih i ljude koji konzumiraju njihovo meso i/ili mliječne proizvode. Iako su neki od spojeva iz skupine bromiranih retardanata plamena zabranjeni za upotrebu ili su dragovoljno povučeni iz upotrebe od strane proizvođača, izloženost ljudi i životinja tim tvarima još će dugo biti prisutna kao što je slučaj s kloriranim organskim molekulama koje zaostaju u velikim količinama u raznim proizvodima. Stoga su potrebna daljnja istraživanja u smislu dugotrajne izloženosti i njihovih posljedica, iako su na tržište došle nove tvari na bazi broma.

Abstract

Brominated flame retardants and perfluorinated compounds are considered emerging environmental pollutants. Over the past few decades, there has been a great deal of progress in understanding and distribution of these pollutants in the global environment, wildlife, and humans. Although monitoring studies have clearly shown the presence of BFRs and PFCs worldwide, their environmental/biological transformation and toxicology, pathways, and mode of action have not been fully understood or described. Furthermore, the contamination levels and potential negative effects of these toxic pollutants in domestic and pet animals have been largely ignored. Laboratory animal studies and animal poisoning case studies have shown that exposure to BFRs and/or PFCs may result in serious health detriment, including endocrine disruption leading to reproductive and immune dysfunction, birth defects, neurotoxicity and certain types of cancer. On the basis of laboratory and field study results, environmental exposure to farm animals to BFRs and PFCs is of a great concern because these compounds can affect animal health, as well as serve as a source of human exposure via consumption of contaminated meat and/or dairy products. Although some BFRs have been banned or voluntarily withdrawn by manufacturers, human/animal exposure to these chemicals will continue for a long time, as is the case with chlorinated organic chemicals that exist in large quantities in consumer products. Therefore, research is needed to address the long-term consequences of exposure to these chemicals, although new brominated replacement chemicals have entered the market.

S odobrenjem gđe Laure Pritchard (Permissions Supervisor – Global Rights Department, ELSEVIER) ovaj je tekst skraćeni i prilagođeni prijevod 64. poglavlja iz knjige: Gupta, R. C.: *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 2nd Edition Elsevier, 2012. Primarna svrha mu je da pomogne studentima 4. godine u izradi seminara vezanog za ovu problematiku koji je obvezni dio nastave iz kolegija Toksikologija u 8. semestru.

prof. dr. sc. Emil Srebočan,
Zavod za farmakologiju i
toksikologiju, Veterinarski
fakultet Sveučilišta u Zagrebu

*e-mail:
emil@vef.hr

DOSADAŠNJE SPOZNAJE

Uz već dobro poznate štetne učinke polihalogenih aromatskih ugljikovodika (poliklorirani bifenili (PCB), polibromirani bifenili (PBB), poliklorirani dibenzodioksini (PCDD), poliklorirani dibenzofurani (PCDF) i policikličkih aromatskih ugljikovodika (benzpiren, fluoranten, piren, antracen) koji se svi svrstavaju u stabilne organske onečišćivače (SOZ; engl. *persistent organic pollutants*, POP), u novije vrijeme (iako se oni koriste već 60 godina) spoznalo se da su polibromirani derivati difenilnih etera (PBDE) skupina kemijskih tvari koje pripadaju bromiranim retardantima plamena (BRP), i perfluorirane tvari (PFT), također sveprisutni onečišćivači okoliša sličnih fizikalno-kemijskih svojstava kao i navedeni spojevi. Kao takvi predstavljaju "nove onečišćivače" koji mogu štetno djelovati na životinje i ljude, i to na globalnoj razini. Njihova upotreba najčešće ne rezultira izravnom izloženošću domaćih i divljih životinja i ljudi, nego zbog navedenih fizikalno-kemijskih i biokemijskih svojstava oni dugo zaostaju u okolišu i prisutni su u svakoj komponenti globalnog sustava što ima za posljedicu trajnu izloženost životinja i ljudi te pridonosi negativnom učinku na zdravlje. Ova je spoznaja rezultirala činjenicom da su i neki od njih godine 2010. na Stokholmskoj konvenciji o SOZ-ovima stavljeni na tu listu.

Unatoč činjenici da su proizvodnja i upotreba ovih tvari smanjene i stavljene pod kontrolu, onečišćenje okoliša i štetni učinci na životinje i ljude nastavljaju se. Od bromiranih tvari još su uvijek na tržištu bromirani derivati bisfenola, difenil-etera i ciklododekana, dakle tri skupine ovih tvari koje se proizvode u velikim količinama. Procjenjuje se da je proizvedeno više od jednog milijuna metričkih tona PBDE-a. Iako je proizvodnja penta i okta-brom mješavine smanjena, proizvodnja dekabromdifenil-etera (deka-BDE) u nekim se državama nastavlja. Ta se mješavina ne proizvodi u Švedskoj i nekim državama SAD-a od 2007. godine, u Europskoj uniji od 2008. a Kanadi od 2009. EU je u 2011. zabranila upotrebu heksabromociklodekana (HBCD) u svim polistirenima za izolaciju zgrada. Općenito, od PBDE-a i ostalih bromiranih i kloriranih retardanata plamena u proizvodnji i upotrebi su HBCD, dekabromdifenil-eter, tetrabromobisfenol-A (TBBFA), tris(1-kloro-2-propil) fosfat, tris(2-kloroetil) fosfat i Dekloran Plus.

Bromirani retardanti plamena ugrađuju se u pokućstvo, tekstil, poliuretanske pjene, plastiku u električnoj i elektroničkoj opremi, pločice za elektronske krugove, zastore, tepihe itd., da bi zadovoljile sigurnosne standarde od požara. Velike količine koje se proizvode i strukturna sličnost tih kemijskih tvari s dobro poznatim štetnim tvarima za okoliš i ljudsko i životinjsko zdravlje, kao što su klorirani ugljikovodici (DDT i dr.) i polikloriranih bifenila (PKB) glavni su razlog za zabrinutost u budućnosti. Osim toga, polibromirani dibenzodioksini (PBDD) i polibromirani dibenzofurani (PBDF), koji se stvaraju pri sagorijevanju BRP-a u spalionicama smeća, imaju toksikološke karakteristike kloriranih homologa, ali su toksičniji od PBDE-a. Kao i ostali organohalogeni, i BRA-a su ubikvitarni u okolišu, bioakumuliraju se i biomagnificiraju, stoga mogu biti vrlo štetni za zdravlje životinja i ljudi.

Perfluorirane tvari služe u proizvodnji posuđa za postizanje otpornosti na visoku temperaturu, kemijske tvari i abraziju, kupki za zaštitu metala, kao surfaktanti, u proizvodnji sredstava za čišćenje, sprečavanje korozije, u proizvodnji polimera, herbicida i insekticida, kozmetici, farmaceutskih proizvoda; maziva, boja, laštila, tapeciranju, tekstila, tepiha, zaštitnih premaza, kupki za elektronske gravure, alkalnih čistila, sredstva za poliranje poda, fotografskih filmova, čistača i ljepila za zubala, zaštitni papira koji dolazi u dodir s hranom (tanjuri, pakiranja za hranu, vrećice, zamotuljci) i koji ne dolazi u dodir s hranom (kartoni na sklapanje, maske).

Najčešće prisutne tvari u uzorcima okoliša, životinja i ljudi iz skupine PFT-a jesu perfluoroktansulfonska kiselina (PFOSK) i perfluorooktanska kiselina (PFOK). Iako se te tvari proizvode od 1950-ih, tek je 2001. godine objavljen rad u kojemu se izvještava o njihovoj globalnoj pojavi. Osim spomenutih dviju tvari iz skupine PFT-a, u okolišu se rjeđe utvrđuje prisutnost i drugih tvari iz te skupine, kao što su perfluorobutan - sulfonat, perfluoroheksan - sulfonat (PFHxS), perfluorononanoična kiselina (PFNK), perfluorodekanoična kiselina (PFDK), perfluoroundekanoična kiselina (PFUnDK), perfluorodekanoična kiselina (PFDOK) i perfluorooktansulfonamid (PFOSA). Utvrđeno je također da se PFT nakuplja u farmakih životinja i kućnih ljubimaca kao što su kokoši, goveda, koze, konji, svinje i drugi kralježnjaci.

Fizikalno-kemijske karakteristike bromiranih retardanata plamena

Tetrabromodifenol-A kao retardant plamena najviše se proizvodi u svijetu. Ta je tvar vrlo reaktivna i kovalentno je vezana za polimerne strukture, što smanjuje mogućnost oslobađanja u okoliš za razliku od aditivnih retardanata. Rabi se u nekoliko tipova polimera koji se ugrađuju u pločice elektronskih krugova. Ovaj je retardant plamena visoko liposolubilna i slabo topljiv u vodi. Prisutan je u zraku, tlu i sedimentu, ali ne i u vodi. Njegova je prisutnost dokazana i u jajima ptica, humanom mlijeku i serumu pupčane vrpce. Eterski derivati TBBPA-e biološki su aktivni što može negativno djelovati na zdravlje. Heksabromciklododekan (HBCD) primarno služi kao aditivni retardant plamena u termoplastičnim polimerima koji su sastavni dio stirenskih smola. Uz to, dobro je topljiv u organskim otapalima i vrlo malo topljiv u vodi. Istraživanja dokazuju da je ovaj retardant vrlo stabilan, s vremenom poluraspada od tri dana u zraku, ali 2025 dana u vodi, s faktorom biokoncentracije od otprilike 18 100 u pastvrce.

Polibromirani difenilni eteri građeni su od dvaju fenilnih prstena međusobno povezanih atomom kisika. Fenilni prsteni mogu sadržavati od 1 do 10 atoma broma što omogućuje stvaranje 209 kongenera. Točan identitet i struktura pojedinog kongenera u različitim komercijalnim pripravcima ovise o proizvođaču i pojedinom proizvodu.

Polibromirani derivati difenilnih etera strukturno su slični PCB-ima (poliklorirani bifenili), pa im je i štetan učinak na organizme sličan, a očituje se poremećajima u funkciji živčanog, imunskog i endokrinog sustava. Ove tvari također imaju učinak na metabolizam endogenih tvari organizma, ali i ksenobiotika. Atomi broma u usporedbi s atomima klora "reaktivniji" su, odnosno lakše napuste molekulu u kojoj se nalaze, što omogućuje lakši metabolizam PBDE-a u usporedbi s PCB-om. Poznato je da se iz PBDE-a pirolizom (sagorijevanje s nedovoljno kisika) na 900 °C oslobađaju PBDF-ovi i PBDD-ovi, a količina stvorenih onečišćivača ovisi o uvjetima pirolize.

Fizikalno-kemijske karakteristike perfluoriranih tvari

Perfluorirane tvari posjeduju ionske i neutralne karakteristike. Fluorirani organski spojevi zbog termodinamički stabilnih kovalentnih veza između atoma ugljika i fluora u pravilu su netoksični, teško se metaboliziraju i nisu hlapljivi. Hidroksilirani derivati, koji su lako hlapljivi, zajedno sa sulfonamidnim derivatima u okolišu se prevode u stabilne perfluoroalkilne karboksilne ili sulfonske kiseline.

Neki su PFT-i topljivi u vodi u tragovima, a neki s posebnim karakteristikama vežu se za razne površine, uključujući i globuline krvi.

Stabilnost veze ugljik-fluor pridonosi postojanosti PFT-a u prirodi i sposobnosti bioakumulacije i biomagnifikacije. Za PFOSK je dokazano da se biokoncentrira u bentoske nevertebrate i bioakumulira u predatore 5 – 20 puta. PFT-i su također dokazani u divljih životinja i ljudi. Bjeloglavi orao, riječna vidra i dobri dupin nakupljaju PFOSK u jetri u koncentracijama koje se mjere u ppm-ima. Nadalje, fluorirane kiseline nađene su u oceanskoj vodi, arktičkom ledu, okolišu i živim organizmima. Stoga se PFT-i mogu smatrati ubikvitarnim u okolišu.

Toksokinetika BFR-a

Tetrabrombisfenol A (TBBFA) u organizam primarno ulazi hranom, usprkos njegovoj niskoj koncentraciji u prosječnom obroku. Bioraspodjela u cirkulaciji mu je vrlo niska zahvaljujući brzom metabolizmu, upućujući na mali potencijal bioakumulacije i posljedični štetni učinak.

Heksabromciklododekan (HBCD) resorbira se iz probavnog kanala, a glavni izvori izloženosti ljudi i kućnih ljubimaca jesu hrana i prašina. Postoje tri glavna diastereoizomera u komercijalnom proizvodu HBCD-a, i to su α , β i γ , s time da je γ -diastereoizomer zastupljen s preko 70 %. Visoke koncentracije HBCD-a u nekim predatorima pokazuju da su ti spojevi stabilni i da se biomagnificiraju. No, većina prvih istraživanja nije razdvajala diastereoizomere nego su se bavila komercijalnim mješavinama HBCD-a. Novija istraživanja pokazuju da je α -diastereoizomer najprisutniji u živom svijetu što pokazuje da je najstabilniji, a ujedno je dokazano da po-

jedini diastereoizomeri posjeduju različite fizi-kalne i kemijske karakteristike.

Velika je razlika u metabolizmu pojedinih PBDE-a kongenera i komercijalnih pripravaka. Ona je posljedica razlike u resorpciji, distribuciji, biotransformaciji i ekskreciji, a ovisi o vrsti životinje i posebno o broju atoma broma kojih može biti od 4 do 10. Što je broj atoma broma manji, kongeneri se bolje resorbiraju, sporije biotransformiraju i izlučuju te dulje ostaju u organizmu (topljivi su u mastima), posebno u masnome tkivu, koži i jetri.

Toksokinetika perfluoriranih tvari

Malo je podataka o metabolizmu ovih tvari u domaćih životinja. U laboratorijskih životinja utvrđeno je da se PFOSK i PFOK dobro resorbiraju oralno, ne metaboliziraju i slabo izlučuju. Nakon resorpcije te se tvari primarno odlažu u jetri, gdje ih ima najviše, zatim bubrege i serum. PFOSK i PFOK imaju tendenciju vezanja za β -lipoproteine, albumin i proteinski nosač masnih kiselina sintetiziranih u jetri. Izlučivanje PFT-a varira ovisno o dužini ugljikova lanca, vrsti i spolu životinje. Kod tumačenja štetnih učinaka PFT-a treba uzeti u obzir razlike u izlučivanju vezane za spol i vrstu životinje.

Mehanizam djelovanja bromiranih retardanata plamena

Tetrabromobisfenol-A (TBBFA) smatra se znatnim onečišćivačem okoliša zahvaljujući njegovoj akutnoj i kroničnoj toksičnosti utvrđenoj u nekoliko životinjskih vrsta. Njegova je prisutnost utvrđena u različitim supstratima kao što su zrak, tlo, voda, sediment, ali i u mišićnom tkivu ptica iz područja koje obrađuje elektronički otpad u Kini, zatim u dobrog dupina i morskog psa bika s obale Floride, te u lignjama iz Atlantskog oceana. TBBFA je citotoksičan, imunotoksičan i agonist je tireoidnog hormona (TH), uzrokuje poremećaje u reprodukciji (remeti prijenos signala estrogena), toksičan je *in vitro* za stanice mozga štakora gdje uzrokuje oksidacijski stres, remeti protok kalcijevih iona i djelovanje dopamina. *In vivo* u pomlatka štakora uzrokuje slušne poremećaje, slično PCB-ima. Poremećaj homeostaze hormona štitnjače

smatra se najvažnijim štetnim učinkom BRP-a, odnosno TBBFA-e. TBBFA ima sličniju strukturu tiroksinu (T_4) nego što je imaju PCB-i i veže se za transtiretin (TTR) s većim afinitetom nego T_4 .

Heksabromociklododekan (HBCD) je drugi po redu najkorišteniji retardant plamena koji eksperimentalno uzrokuje endokrini poremećaj s reproduktivnom toksičnošću. Štetni je učinak najizraženiji tijekom razvoja, pa je tako utvrđena smanjena gustoća kostiju i smanjena količina retinoida, kao i pojačan imunosni odgovor. Izomeri HBCD-a uzrokuju endokrini poremećaj s antiandrogenim učinkom čime se inhibira aromataza i djeluje se na receptore steroidnih hormona. Osim toga, kao i ostali BRP-i, HBCD može uzrokovati poremećaje u homeostazi tireoidnog hormona što dovodi do pada koncentracije T_4 i povećanja tireoidno-stimulirajućeg hormona (TSH). Eksperimentalna istraživanja upućuju da niske doze HBCD-a mogu poremetiti receptorski posredovanu transaktivaciju TH hormona.

Rezidue polibromiranih difenil-etera (PBDE) utvrđene su u zraku u zatvorenom prostoru, kućnoj prašini i hrani. Postrojenja za obradu kanalizacijskog otpada i biološke čestice smatraju se glavnim izvorima PBDE-a. Više od polovice kanalizacijskog mulja proizvedenog godišnje u SAD-u odlaže se na poljoprivredna tla kao gnojivo. Utvrđeno je da tlo koje je tretirano kanalizacijskim muljem može biti visoko kontaminirano s PBDE-ima, stoga takva upotreba kanalizacijskog mulja može rezultirati onečišćenjem biljaka izravno ili neizravno kroz tlo. U pašnih životinja, kao što su goveda, ingestija tla može dovesti do nakupljanja PBDE-a u mesu i mliječnim proizvodima, naime pašna goveda dnevno spontano pojedu do 1 kg tla, ovisno o godišnjem dobu, klimi i gustoći trave.

U serumu kućnih mačaka utvrđene su visoke koncentracije PBDE-a zbog njihove visoke izloženosti kućnoj prašini. Visoke koncentracije PBDE-a utvrđene su i u tkivima velikih panda i crvenih panda u sužanjstvu (38 – 2158 ng/g na masnu težinu (m/t), zatim u mlijeku (1100 – 2600 pg/g m/t) i masti krava (1300 – 2600 pg/g m/t). U arktičke lisice koncentracije PBDE-a vrlo su niske (26 – 31 ng/g m/t), dok su u jetri kalifornijske morske vidre više (2423 ng/g m/t), a u potkožnom masnom tkivu (*blubber*) kalifornijskih morskih lavova izrazito visoke (569 – 24

343 ng/g m/t). U masnom tkivu polarnih medvjeda u Kanadi utvrđene su niske koncentracije (4,6 – 11 ng/g m/t).

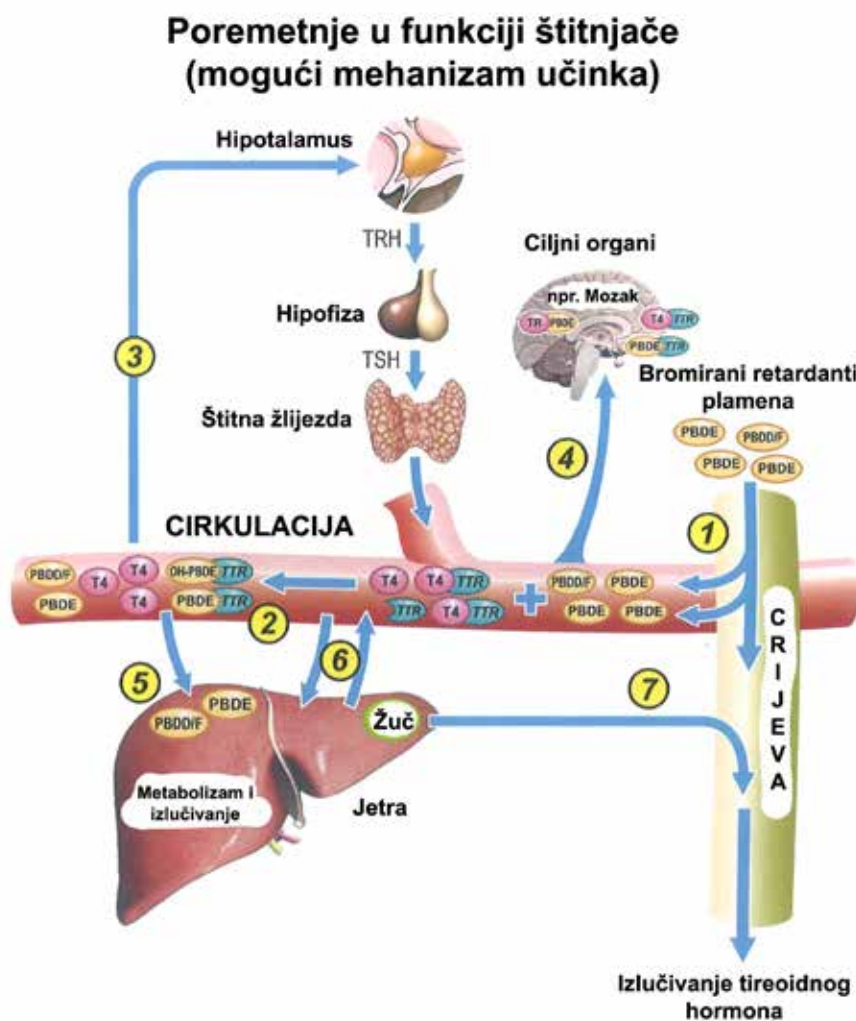
Domaće životinje, kućni ljubimci i ljudi putem zraka, vode, prašine i hrane izloženi su djelovanju PBDE-a. Koncentracije PBDE-a u ljudi i životinja porasle su eksponencijalno od 70-ih u SAD-u, Kanadi i Švedskoj, što se u Sjevernoj Americi pripisuje većoj upotrebi penta-BDE smjese u odnosu na ostali dio svijeta. Zbog lipofilnosti PBDE-i lako prelaze placentu, ulazeći u fetus što remeti razvojni proces u ljudi i životinja.

S obzirom na to da se PBDE-i primarno koriste u zatvorenom prostoru, podataka o divljim i farmским životinjama ima malo. Nekoliko istraživanja upućuje na činjenicu da izloženost PBDE-ima u koncentracijama utvrđenima u okolišu povećava rast ptica i uzrokuje promjene u udva-

ranju kod američkog sokola. No, istraživanja na laboratorijskim životinjama pokazuju da PBDE mješavine, kao i pojedini kongeneri koji čine te mješavine, utječu na živčani, endokrini, reproduktivni i imunosni sustav.

Kao što je već rečeno, glavni štetni učinak PBDE-a i drugih BRP-a odnosi se na homeostazu tiroksina. BRP-i ulaze u organizam putem probavnog sustava odakle se resorbiraju u cirkulaciju. T_4 se sintetizira i oslobađa u cirkulaciju iz štitne žlijezde. U cirkulaciji BRP-i i njihovi metaboliti mogu imati kompetitivni učinak s T_4 i istisnuti ga s njegova proteinskog nosača, transtiretina (TTR) u serumu, što će rezultirati njegovim metabolizmom u jetri i izlučivanjem. Smanjena količina cirkulirajućeg T_4 povećava otpuštanje TSH sustavom povratne sprege hipotalamus-hipofiza, što inducira povećanu

Slika 1. (1) Mogući mehanizam kojim BRP remeti homeostazu hormona štitnjače (TH). PBDE je korišten kao primjer za sve BRP-ove. (1) BRP-ovi ulaze u cirkulaciju iz probavnog sustava. (2) BRP-ovi (izvorna molekula kao i njezini metaboliti) mogu istisnuti tiroksin (T_4) s njegova proteinskog nosača transtiretina (TTR) u serumu, što će rezultirati njegovim metabolizmom u jetri i izlučivanjem. (3) Smanjena količina cirkulirajućeg T_4 povećava otpuštanje TSH sustavom povratne sprege hipotalamus-hipofiza, što inducira povećanu sintezu i izlučivanje T_4 od strane štitne žlijezde. (4) BRP vezan za TTR kao i T_4 vezan za TTR dospjet će do ciljnih organa, kao što je npr. mozak, u kojemu se mogu vezati za TH receptore i izazvati fiziološki i štetan učinak. (5) U jetri, BRP aktiviraju jezgrine receptore, što inicira transkripciju i translaciju enzima koji metaboliziraju T_4 te dovode do eliminacije nastalih metabolita. (6) U jetri se nadalje povećava ulazak i metabolizam T_4 , (7) ali i izlazak T_4 i njegovih metabolita koji idu u serum ili žuč.



sintezu i izlučivanje T_4 od strane štitne žlijezde. BRP vezan za TTR kao i T_4 vezan za TTR dospjet će do ciljnih organa, npr. mozga, u kojemu se mogu vezati za TH receptore i izazvati fiziološki i štetan učinak. U jetri BRP aktivira jezgrine receptore, što inicira transkripciju i translaciju enzima koji metaboliziraju T_4 te dovode do eliminacije nastalih metabolita. U jetri se nadalje povećava ulazak i metabolizam T_4 , ali i izlazak T_4 i njegovih metabolita koji idu u serum ili žuč.

Uzevši u obzir ulogu tireoidnog hormona u razvoju organizma i opisani poremećaj u njegovoj homeostazi od strane BRP-a, može se zaključiti da je to jedan od znatnih štetnih učinaka na organizam kod izloženosti BRP-a.

Eksperimentalna istraživanja pokazuju da komercijalne mješavine BRP-a dovode do nakupljanja u različitim tkivima, uključujući i mozak, što upućuje na činjenicu da PBDE-i prolaze i moždanu barijeru (i placentarnu barijeru) uzrokujući suptilne promjene u mozgu i dramatične promjene u količini cirkulirajućeg tireoidnog hormona, te reproduktivne smetnje. Osim učinka na tireoidni hormon, PBDE-i djeluju i na kolinergičnu neurotransmisiju koja je vezana za memoriju i motorne funkcije.

Mehanizam djelovanja perfluoriranih tvari

Prisutnost perfluoriranih tvari (PFT) utvrđena je u serumu peradi, svinja, goveda, konja, pasa i koza u Japanu. Najviše koncentracije kongenera PFT-a utvrđene su za PFOSK i PFOK, i to učestalo u većini uzoraka. Koncentracije PFO-SK-a u serumu životinja kreću se od 0,57 do 4,9 ng/g, a PFOK-a od 0,05 do 2,5 ng/g na vlažnu težinu. Perfluorirane su tvari utvrđene i u serumu divljih životinja kao što su amurski tigar, veliki panda i crveni panda. Jetre polarnih medvjeda s Swalbarda i serumi dobrih dupina s Bermuda također sadržavaju relativno visoke koncentracije PFT-a, od kojih su koncentracije PFOSK-a najviše u usporedbi s ostalim kongenerima. Jetra polarnog medvjeda sadržava 1290 ng/g na vlažnu težinu PFOSK-a, i čak 2940 ng/g na vlažnu težinu PFHxS-a. U serumu dvaju dobrih dupina s Bermuda utvrđeno je 49 ng/g PFOSK-a na vlažnu težinu.

Perfluorirane tvari, posebno PFOSK i PFOK, uzrokuju povećanje jetre i hepatocelularni adenom u štakora. Pretpostavlja se da je mehanizam tog učinka agonistički učinak u indukciji receptora proliferacije peroksizoma (PFAR- α), što je i potvrđeno u nekoliko pokusa na miševima i štakorima izloženim PFOSK-u i PFOK-u. U pokusima je utvrđena indukcija peroksimske proliferacije čiji je prvi učinak upravo bio aktivacija PFAR- α -a. Ovaj mehanizam toksičnog učinka uzrokuje stvaranje tumora (primarno u jetri) kod štakora, tvarima koje nisu genotoksični karcinogeni. S obzirom na to da nekoliko PFT-a može aktivirati PFAR- α , ove tvari mogu također inducirati proliferaciju peroksizoma mijenjajući metabolizam i transport masti, što je i eksperimentalno potvrđeno. Također je eksperimentalno potvrđeno da ove tvari induciraju sintezu jetrenih mikrosoma. Ima dokaza da te tvari ujedno imaju visok potencijal u poremećaju reprodukcije i razvoja.

KRATICE

PCB – poliklorirani bifenili
 PBB – polibromirani bifenili
 PCDD – poliklorirani dibenzo-p-dioksini
 PCDF – poliklorirani dibenzofurani
 POP – persistent organic pollutants, stabilni organski onečišćivači
 PBDE – polibromirani difenil-eteri
 BRP – bromiranim retardantima plamena
 PFT – perfluorirane tvari
 HBCD – heksabromciklodekana
 TBBFA – tetrabrombisfenol-A
 PFT – polifluorirane tvari
 PFOSK – perfluorooktan-sulfonska kiselina
 PFOK – perfluorooktanska kiselina
 PFHxS – perfluorobutansulfonat, perfluoroheksan-sulfonat
 PFNK – perflorononanoična kiselina
 PFDK – perfluorodekanoična kiselina
 PFUnDK – perfluoroundekanoična kiselina
 PFDOK – perflorododekanoična kiselina
 PFOSA – perfluorooktansulfonamid
 PBDD – polibromirani dioksini
 PBDF – polibromirani dibenzofurani
 PFHxS – perfluoroheksan sulfonat
 PFAR- α – α -receptor peroksizomske proliferacije



2nd EVSS
Croatia 2018

2. EUROPSKI SEMINAR STUDENATA VETERINARSKE MEDICINE

Što je EVSS?

EVSS je seminar koji organizira studentska udruga IVSA, a namijenjen je prvenstveno studentima veterinarske medicine iz cijele Europe. Seminar traje četiri dana, a glavni mu je cilj unaprjeđenje stručnih kompetencija i povezivanje („networking“) na međunarodnoj razini. Programom koji se sastoji od predavanja i radionica obuhvaćene su mnogobrojne teme, s naglaskom na praktičnim vještinama i iskustvu stručnjaka.

Zašto sudjelovati na EVSS-u?

Sudjelovanjem na EVSS-u moći ćete iskusiti izvrsnost veterine u Europi i uvidjeti značaj kulturnih raznolikosti. Također, imat ćete priliku sudjelovati u kreiranju budućnosti veterinarske medicine učeći i raspravljajući o najnovijim znanstvenim dostignućima i unaprjeđujući međunarodnu suradnju stjecanjem novih poznanstava.

Datum i lokacija

14. 6. - 17. 6. 2018.

Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu

IVSA Hrvatska

2016./2017.

Ako me pitate da jednom riječju opišem protekle dvije godine u IVSA-i, ne bih mogla. S njih više, možda. Sreća, smijeh, putovanja, organizacija, prijateljstva, učenje, zabava, nezaboravni trenuci samo su neke koje mi trenutačno padaju na pamet.

I ove smo godine mnogo putovali, organizirali razmjene, prikupljali sredstva za rad udruge, pa idemo redom.

Najprije smo ujesen krenuli put Brna, Češka, gdje smo prisustvovali još jednom u nizu već tradicionalnih Cro-Slo-Austro-Czech vikenda koji zauzima posebno mjesto u našim srcima i gdje je zabava uvijek zagarantirana! U proljeće su kolege iz Beča preuzeli ulogu domaćina i organizirali zabavno-edukativni vikend te predali palicu nama, sljedećim organizatorima.

Kao glavnu godišnju razmjenu odabrali smo kolege iz Wrocława te odlučili prkositi zimi i zaputiti se u Poljsku sredinom prosinca. Jesmo li dobro odabrali? Itekako! Prekrasan pitoreskni Wrocław u mnogo čemu nas je oduševio, a domaćini su dali sve od sebe da nam razmjena ostane u lijepom sjećanju.

Između planiranja i realiziranja putovanja organizirali smo već poznate *Slatke dane na Vef-u* te uveli i *Kviz na Veterini* kao novi način prikupljanja sredstva za rad udruge, koji se pokazao odličnim novim projektom i s kojim ćemo nastaviti u novoj akademskoj godini.



Slika 1. Brno, Češka.



Slika 2. CSAC, Beč, Austrija.



Slika 3. Wrocław, Poljska.

Slika 4. Kviz u studenskim prostorijama.



Slika 5. Krabi, Tajland.



Slika 6. Gala večera, 66. IVSA kongres, Kuala Lumpur, Malezija.



Kao šlag na kraju godine došlo je putovanje u Maleziju i Tajland na 66. međunarodni IVSA kongres, koje je jako teško sumirati i staviti na papir jer smo otkrili totalno novi i drugačiji svijet, stoga će slike obaviti moj posao i nadam se prenijeti barem dio ugođaja koji je vladao tamo. Također, kolegica i ja prisustvovala smo WSAVA kongresu u Kopenhagenu, Danska, kao dio IVSA volontera, gdje smo bili dio organizacijskog tima, ali i imale priliku slušati brojna zanimljiva predavanja.

IVSA pruža mnogo toga, od upoznavanja kolega s domicilnog fakulteta do stvaranja najboljih prijatelja u Kini ili Africi, upoznavanja novih kultura i fakulteta diljem svijeta, sudjelovanja na brojnim kongresima, simpozijima, radionicama, ali ono što je najvažnije, obogaćivanje studentskog života i stvaranje uspomena za cijeli život. Još nisi član? Ne znam što čekaš ☺

Ovo je moj posljednji izvještaj kao predsjednice ove udruge. Mogla bih pisati melodrame koliko mi je IVSA promijenila život i izgradila me kao osobu, ali prije svega želim zahvaliti svim članovima koji su me slušali, trpjeli i zajedno sa mnom gradili i ojačali udругu, bez vas bih bila nemoćna. Također jedna velika hvala dekanu i upravi, koji nas podržavaju i guraju naprijed. Došlo je vrijeme da mlađe snage preuzmu kormilo i ja im želim mnogo sreće u daljnjem radu. Kako bi rekli – *all good things must come to an end eventually, but the next experience awaits! Over and out.*

Predsjednica IVSA Hrvatske 2015. – 2017.
Nina Vukušić

Reptilomanija+

2017.

Od 10. do 14. svibnja 2017. na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu održana je 5. po redu edukativna izložba egzotičnih životinja Reptilomanija+ u organizaciji Udruge studenata veterinarske medicine „Equus“. Sama Reptilomanija ove je godine bila izvrsno medijski popraćena. Osim što je najava izložbe objavljena na svim društvenim mrežama, prenijeli su je i vodeći dnevni tiskani mediji, a naši studenti organizatori gostovali su i u brojnim radijskim i televizijskim emisijama. Izložbu je 10. svibnja u 12 sati svečanim govorom, pred upravom Fakulteta, nastavnicima i studentima otvorio dekan Veterinarskog fakulteta prof. dr. sc. Nenad Turk.

Ovogodišnja je izložba bila rekordna u brojnim segmentima. Izloženih 60 vrsta egzotičnih kućnih ljubimaca u pet dana održavanja pogledalo je više od 12 000 zadovoljnih posjetitelja, gotovo



Slika 1. Intervju za TV.



Slika 2. Izložbeni prostor.



Slika 3. Tijekom izložbe.

Slika 4. Jemenski kameleon (*Chameleon calyptratus*).



Slika 5. Pjegavi zelembač (*Timon lepidus*).



Slika 6. Zeleni piton (*Morelia viridis*).



Slika 7. Grupni posjet osnovne škole.



dva puta više nego protekle godine, a u organizaciji je sudjelovalo 50 studenata volontera. U suradnji s Hrvatskom veterinarskom komorom popratna predavanja koja su se 12. i 13. svibnja održavala u sklopu izložbe bila su bodovana za prijavljene veterinare s 4 boda za aktivno i 3 za pasivno sudjelovanje. Također, ove su godine prvi put održana kratka predavanja o fiziologiji gmazova za skupine osnovnih i srednjih škola. I ove smo godine uspješno nastavili suradnju s Hrvatskim herpetološkim društvom „Hyla“ i Životinjskim kutkom Zoološkog vrta Zagreb.

Za kraj, ostaje nam samo zahvaliti svima na velikoj potpori koju su nam pružili. Posebna hvala dekanu Veterinarskog fakulteta prof. dr. sc. Nenadu Turku na velikoj pomoći i povjerenju koje nam je i ove godine pružio. Velika hvala i svim studentima, asistentima, docentima i profesorima koji su nam pomogli u organizaciji ovako velikog projekta. Nadamo se da se sljedeće godine ponovno vidimo.

Katarina Marjanović

SportVEF

2016./2017.

SportVEF je studentska sportska udruga koja djeluje na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Članovi SportVEF-a sudjeluju u raznim sveučilišnim natjecanjima i promicanju kulture zdravog življenja putem sportskih aktivnosti. Također, sudjeluju u sportsko-edukativnom događaju „Humanijada“, koji okuplja sve fakultete biomedicinskog područja iz Hrvatske i susjedne nam Bosne i Hercegovine. Udruga je sastavni dio velike udruge studenata veterinarske medicine (USVM) i članovi udruge sudjeluju u djelovanju USVM-a.

Svake godine naši se studenti natječu u sveučilišnim sportskim natjecanjima. Ekipe veterine sudjeluju u ekipnim sportovima kao što su futsal, odbojka i košarka u muškoj i ženskoj konkurenciji, također se pojedinci natječu u individualnim sportovima kao što su stolni tenis i karate. Naši članovi pomažu i u provođenju nastave iz Tjelesne i zdravstvene kulture. Imamo dugogodišnju tradiciju sportskih natjecanja, pa su tako studentske prostorije ispunjene trofejima iz raznih natjecanja.

Jednom godišnje studenti odlazi na Humanijadu, tradicionalni međunarodni, sportsko-edukativni susret studenata biomedicinskih fakulteta na kojemu se, uz natjecanja u različitim sportovima, studenti educiraju i potiču na druženje. Humanijada je međunarodni sportsko-edukativni susret biomedicinskih fakulteta koji se održava još od 1993.

godine. Na njoj sudjeluju svi fakulteti biomedicinskog područja iz Hrvatske i Bosne i Hercegovine. Humanijada, kao takva, čini jedinstven događaj koji kroz sport i zabavu te razmjenu iskustava i razvijanje timskoga rada čini okosnicu međuljudskih i profesionalnih odnosa među budućim stupovima zdravoga načina života i življenja. Ovaj je događaj 2017. godine proslavio svoju dvadeset i petu obljetnicu. Studenti Veterinarskoga fakulteta sudjeluju na ovom sportsko-edukativnom događaju od njezina osnutka, pa tako želimo da se ta tradicija i na-



Slika 1. Natjecanje u odbojci.



Slika 2. Studenti Veterinarskog fakulteta na Humanijadi 2017.

Slika 3. Najuspješnija Humanijada za Vef.



stavi. Mladi sportaši Veterinarskoga fakulteta vrlo su uspješni u sportovima koji se igraju na Humanijadi pa tako svake godine osvajaju velik broj medalja i time promiču Fakultet u akademskim krugovima te potiču buduće mlade generacije da se također pridruže Humanijadi i nastave se baviti sportom i promocijom veterinarske medicine putem sporta.

Natjecanja se provode u osam sportova (odbojka na pijesku, odbojka, tenis, stolni tenis, futsal, rukomet, košarka, plivanje) u muškoj i ženskoj konkurenciji. Uz sport organiziran je i zabavni program. Na prošlogodišnjoj Humanijadi bilo je više od 700 natjecatelja s 15 fakulteta. Humanijada 2017. održana je od 3. do 7. svibnja u Termama Tuhelj u Tuheljskim Toplicama. USVM SportVEF i ove je godine bio jedan od sudionika sa svojih 37 natjecatelja u ekipnim i pojedinačnim sportovima. Ova je godina bila najuspješnija za sportaše veterine jer smo osvojili izvrsno treće mjesto u ukupnom poretku, a naša je studentica Sara Klobučar proglašena za najbolju sportašicu Humanijade 2017.

Jurica Horvat



AGROPROTEINKA

* Call centar: 072/500-605

*Poziv se naplaćuje po cijeni pozova prema fiksnoj mreži Vašeg telekom operatera

A gdje je Wrocław?

Promjene su dobra stvar. Nakon što je tvoja omiljena destinacija posljednjih pet godina Heinzelova 55, a omiljeno vrijeme *u zoru*, zaista poželiš promjenu. Moje je ime Ines Papak i studentica sam 6.godine na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu. Provela sam pet mjeseci u Wrocławu, na zapadu Poljske, u sklopu Erasmusove studentske razmjene.

Na studentsku razmjenu možete otići u sklopu programa „studij” ili „praksa”, i to u one zemlje s kojima je Veterinarski fakultet u Zagrebu potpisao ugovor o studentskoj razmjeni. Nakon gledanja svih videopriloga o fakultetima diljem Europe, poput Rumunjske, Španjolske, Češke, moj je prvi izbor bila Poljska. Papirologija, papirologija, papirologija. Kako se obično ne volim prisjećati negativnih uspomena, nerijetko započinjem prepričavanje svog Erasmus iskustva sa „Sjednem ja u bus za Wrocław...”. Svim studentima bio je omogućen smještaj u studentskom domu, no kao dugogodišnja stanovnica SD-a „Stjepan Radić”, odlučila sam se za privatni smještaj u stanu.

Fakultet se nalazi u samome centru grada. Uređen je vrlo slično našem, osim što je dio u kojemu borave i liječe se velike životinje smješten izvan grada.

Veterinarski fakultet u Wrocławu godišnje upisuje 150 studenata i u prosjeku 20 stranih. Svi Erasmus studenti studiraju sa stranim studentima po engleskom programu. Nisu nas mazili. Imali smo preslik poljskog programa, poljskih kolokvija, poljskih predavanja i, ako s engleskim niste na „ti”, našli biste se pred velikim poteškoćama. Budući da fakultet ima velik broj stranih studenata, imali smo posebnu refe-



Slika 1. Poljski dio planinskog lanca.



Slika 2. Jedan od preko 300 patuljaka ispred ulaza na Veterinarski fakultet.



Slika 3. Glavni trg Wrocławu u šarenom baroknom duhu.

Slika 4. Japanski vrt u Wrocławu.



Slika 5. Kastracija kuje.



Slika 6. Moj novi krzneni poljski prijatelj Kofi.



radu. Teta Agnieszka (koja ne smije biti nespo-
menuta) olakšala nam je život na fakultetu u
svakom mogućem smislu – od borbe s birokra-
cijom, preko motivacijskih razgovora do dru-
ženja između predavanja. Oh, predavanja, koja
NISU obavezna, nikad nisu počinjala prije 9 sati.

Većinu svog boravka na fakultetu provela
sam u klinici za pse i mačke te za egzotične ži-
votinje. Izluđivali smo profesore entuzijazmom
pa nam je bilo omogućeno da radimo gotovo
sve. Neke su stvari bile obavezne, tako da je
svaki student morao napraviti kastraciju mačke
i psa, kuje i mačka. Skidanje kamenca sa zubi te
postavljanje gipsa postale su naše specijaliza-
cije. Bili smo jako važni. Jako sretni. Fascinirala
me kolegijalnost među studentima i pristupač-
nost profesora. Nakon nekog vremena dobijeh
dojam da je tvoj profesor to jutro ustao i došao
na fakultet zbog tebe.

Jako su brzo došli ispitni rokovi. Erasmus
studentima je omogućen izlazak na ispit i po
peti put u roku od mjesec dana. Većina stude-
nata koji su bili u mojoj grupi ispite su prolazili
iz prvoga puta bez prevelike pripreme. Pripre-
mali bi se svega nekoliko dana čitajući bilješke s
vježbi. Sva su pitanja bila više puta ponavljana
ili su bila iz dijelova nastave koju smo praktič-
no radili. Jednom kad stvari napraviš sam, teže
ih zaboraviš. Nisu nam bile potrebne skripte ni
pitanja s prijašnjih rokova. Profesori su nam po-
slali skripte, a tijekom vježbi jasno su nam da-
vali do znanja što je bitno i što će tražiti od nas
na ispitima. Probleme su imali samo studenti
koji nisu tečno govorili engleski jezik, ali strpl-
jenje koje su profesori imali s njima bilo je nem-
jerljivo.

Izlazili smo van svaki ponedjeljak (to je u
Wrocławu studentski dan), petak i subotu jer
grad koji ima 130 000 studenata stvarno je mje-
sto za izlaske. Vremena je bilo za sve, putova-
nja, druženja i izlaske. Ispiti su se položili i bilo
je vrijeme za povratak. U Heinzelovu 55.

Jednog sam Poljaka povela sa sobom.
Za uspomenu.

Ines Papak

Moja češka **ERASMUS** avantura

Zovem se Tanja Strišković, studentica sam šeste godine veterine i bila sam na Erasmusu! Zvuči nevjerovatno znam; kako netko tko studira na našem fakultetu ima vremena za Erasmus? Otkad sam se vratila, susrela sam se s brojnim pitanjima poput: Jesi izgubila godinu? Jesu li ti išta priznali? Jesi li redovita? Ista ova pitanja motala su se i po mojoj glavi kada se razvila ideja o prijavljivanju. Koliko god ja razmišljala o tome, svaki put bih završila sa zaključkom da što god se dogodilo kada se vratim, i dalje ću biti na dobitku. Nije bilo na odmet ni to što su se ljudi vraćali s Erasmusom gotovo ekstatični. Upustila sam se tako u razgovor s većim brojem Erasmus veterana i praktički se sve svodilo na jedno te isto: „Gledaj, pljuvat češ krv s papirologijom i prije nego odeš i kad se vratiš, i poželjet češ odustati više puta, ali kad jednom tamo dođeš, sve se isplati.“ Pa sam se tako, kao redovita studentica koja je dotad davala sve ispite u roku, odlučila pridružiti Erasmus svijetu i dovesti iskustvo studiranja na novu razinu.

Moja je Erasmus avantura započela u veljači 2016. godine, kad su se otvorile prijave i trebalo je izabrati strano sveučilište. Zajedno s još jednom kolegicom sa svoje godine upustila sam se u danonoćno istraživanje fakulteta, gledanja promotivnih filmova te uspoređivanja kurikuluma. Naš fakultet zaista ima velik izbor ponuđenih fakulteta i odluka nije bila laka, no na kraju, uz nekoliko savjeta starijih studenata, odlučila sam se za Sveučilište Veterinarskih i farmaceutskih znanosti u Brnu, Češka. Predivan mirni studentski gradić od 400 000 stanovnika činio se jako dobrim izborom. Nakon vijesti da sam prihvaćena samo sam htjela spakirati kofere i sjesti na autobus, no trebalo



Slika 1. Težak studentski život u Češkoj.



Slika 2. Proljeće na kampusu.



Slika 3. Moj Kaunicovy studentské koleje 5 mjeseci.

je pričekati još punih godinu dana do odlaska. Naravno, vrijeme je proletjelo i nisam se niti okrenula, već sam bila s koferom u ruci i kartom u džepu, spremna otići živjeti u nepoznat grad i na strano sveučilište na punih pet mjeseci.

Za vrijeme mog boravka u Brnu bila sam smještena u studentskom domu za studente našeg sveučilišta (Veterinarskog i Farmaceutskog fakulteta). Kaunicovy studentské koleje je studentski dom s kapacitetom za 500 studenata izgrađen 1922. godine, no 1939., nakon nacističke okupacije, prenamijenjen je u policijski zatvor i sjedište Gestapa. Srećom, nakon Drugoga svjetskog rata opet se vratio u svoju prvotnu ulogu te sam upravo ovo mjesto pet mjeseci svojega života u Češkoj zvala domom. Dom se nalazi na predivnoj lokaciji, udaljen 15 minuta pješice od fakulteta. U blizini doma je i šuma, veliki park, bazen i zvjezdarnica, no ono što je bilo najveći plus jest Topas bar u sklopu doma s najboljom *pizzom* u gradu i puno jefti-

ne pive ☺. Osim doma, i fakultet oduzima dah. Veliki kompleks zgrada s glavnom zgradom koja ima kafić i predivnu novu knjižnicu. Klinike su podijeljene po vrsti životinja, a za studente koji se žele baviti konjičkim sportom izgrađena je jahaća dvorana u kojoj je moguće polaziti satove škole jahanja. Budući da je primarni razlog mog odlaska u Brno bila Klinika za konje, mogu reći da ni ovdje nisam ostala ni malo razočarana. Izrazito ljubazan tim stručnjaka koji se svakodnevno susreće s velikim brojem pacijenata i zahvata učinio je moje studiranje na ovom fakultetu izvrsnim. Koliko god sam vremena tamo provela, uvijek se našlo nešto zanimljivo.

No, unatoč predivnoj lokaciji i izvrsnom fakultetu ono što je najviše obilježilo moj boravak u Češkoj bili su, naravno, ljudi. Pedeset studenata iz cijele Europe koji doručkuju, ručaju, večeraju i studiraju zajedno pet mjeseci savršen je recept za doživotna prijateljstva. Kada s nekim provedeš cijeli semestar dijeleći sve, i sretne i tužne trenutke, upознаš osobu u jako kratkom vremenu tako duboko da ne možeš više ni zamisliti da se prije nekoliko mjeseci niste nikad ni susreli. Kada me ljudi pitaju jesi li što naučila, ne znam ni kako da odgovorim. Misliš li, jesam li naučila nešto novo vezano uz struku? Jesam. Uz druge kulture i vjere? Jesam. Jesam li naučila novi jezik? Jesam i to. Ali ono što najviše od svega iz ovog iskustva cijenim jest da sam naučila da MOGU. Mogu spakirati kofer i otići u stranu zemlju gdje ne poznajem nikoga i prilagoditi se. Mogu naći u nekoliko mjeseci tako bliske prijatelje da su mi gotovo obitelj. Mogu slušati potpuno drugačija mišljenja od svojih i pristupiti im otvorena uma. Upravo to je, čini mi se, bit Erasmosa. Da upoznaš samoga sebe, izgradiš se i proširiš na načine na koje ne možeš ako se krećeš uvijek u istoj okolini. Ako ne riskiraš, kaže se, ni ne profitiraš. Pa kako onda da se brinem hoću li produljiti studiranje za jednu godinu ako znam da sam već apsolutno profitirala ☺.

Tako da, studenti, budite hrabri i iskoristite ono što vam se nudi, neće vam biti žao.

Voli vas Erasmus veteranka ☺

Tanja Strišković

Slika 4. Pacijent klinike za ptice u šetnjici.



Slika 5. Jahaći paviljon na kampusu.



ERASMUS ljetna praksa

Tenerife, Kanarsko otočje

Dragi čitatelji, vjerujem da je većina vas upoznata s Erasmus ljetnom praksom. Sigurna sam da postoji nekolicina vas koji imaju želju otići, pa se nadam da će vas moji doživljaji i iskustvo inspirirati da se odlučite na to.

Moja ljetna praksa u trajanju od dva mjeseca odvijala se u gradu Santa Cruz de Tenerife, u privatnoj klinici Hospital Veterinario Taco. Za one koji ne znaju, Tenerife je najveći otok Kanarskog arhipelaga koji broji sedam otoka vulkanskoga podrijetla. Na njemu se nalazi vulkan – nacionalni park Teide koji je svojom visinom od 3718 metara najviši vrh Španjolske, ali i otoka cjelokupnog Atlantskog oceana te treći po veličini vulkan na svijetu.

Priča kreće 30. svibnja u kasnim popodnevnim satima u zračnoj luci Franjo Tuđman. Let Zagreb – Barcelona – Tenerife Norte sveukupno traje oko 6+ sati, uz čekanja između presjedanja. Kad sam stigla na njihov aerodrom, dočekala me gusta magla i kiša uz jak vjetar. Prva stvar kao upozorenje: ako idete, uvijek birajte aerodrom na jugu jer postoji velika mogućnost da će vam se let preusmjeriti sa sjevernog zbog loših vremenskih uvjeta. Čak i usred ljeta. Vožnja do grada traje 15 minuta. Busevi često voze, nema kašnjenja, a karta se može kupiti kod vozača ili na autobusnoj stanici. Ja sam smještaj pronašla u samom centru Santa Cruz, a klinika u kojoj sam odradivala praksu nalazila se na periferiji grada, u predgrađu Taco. Inače grad Santa Cruz izvrsno je povezan tramvajskim i autobusnim linijama i tijekom dana i noću. U klinici sam provodila 30 radnih sati tjedno, međutim kada je opseg posla bio veći, a osoba manje, uvijek se ostajalo dulje. Koncept rada je takav da smo mi studenti na praksi uvijek radili u timu glavnog doktora. Od samoga početka do kraja pacijentova boravka u klinici bili smo dužni pratiti njegovo stanje i u svakom trenutku spremni izvijestiti voditelja smjene o tome. Ujutro su prve na red dnevnih obaveza dolazile konstante stacioniranih pacijenata. Konstante su uključivale uzimanje trijasa, provjeru pacijentova stanja, hranjenje, izvođenje iz bokseva, promjena povoja



Slika 1. Panza de burro, Teide.



Slika 2. Los Gigantes.



Slika 3. Pripreme za operaciju.

Slika 4. Tradicionalne kuće uz plantaže banana.



Slika 5. Stacionar.



Slika 6. Las Teresitas.



drenova, vađenje krvi i na samom kraju terapija. Sve se to moralo obaviti do početka rada ambulate, odnosno konzultacija.

Ujutro su konzultacije počinjale u 10 sati, a trajale su sve do podneva, nakon čega bi slijedila kirurgija i operacije. Opseg konzultacija varirao je od onog opširnijeg i općeg kod novih pacijenata do detaljnijeg i usmjerenijeg kod pacijenata na terapiji. Prvo bi se obavio cjelokupni pregled životinje, unijela bi se anamneza, a nakon toga bi voditelj smjene napravio ultrazvučnu pretragu. Kod većine pacijenata s problemima gastrointestinalnog, krvožilnog i urogenitalnog sustava obavlja se primarna i kontrolna ultrazvučna dijagnostika. Po mojoj procjeni 70 – 80 % pacijenata bude pregledano UZV sondom. Ambulanta je standardizirana i opremljena svim potrebnim aparatima, uključujući i CT. Nakon ambulate odlazi se u operacijski blok ispred kojega se obavljaju završne pripreme pacijenta i kirurga. Prije svakog zahvata obave se interne konzultacije između doktora i ulazi se u salu. Zahvati su pomno planirani, a njihova težina ovisi. Na dnevnoj se razini obavljaju tzv. rutinske operacije, sterilizacije i kastracije, no ima i dosta složenih, poput uklanjanja stranih tijela iz jednjaka i piloričnog sfinktera, osteosinteza i jedna kraniotomija. Uz pravilo minimalne invazivnosti, najprije se pristupa endoskopskoj pretrazi tamo gdje ju je moguće izvesti. Poslijeoperacijska njega pacijenta jedan je od posljednjih zadataka u radnom danu za nas praktičare. Kad bismo sa sigurnošću ustvrdili da je pacijent stabilno, naš bi dan bio i službeno završen.

Druga strana prakse jednako je lijepa i opuštajuća kao i ova prva. Imala sam priliku proputovati cijeli otok. Sjeverni je dio prašumski, zeleniji, u gorju s gustom maglom, dok na obali sija izrazito jako tropsko sunce više od 12 sati dnevno. Jug je pustinski, bez vjetrova uz prekrasne pješčane plaže i mnogo više turista. Fenomen "Panza de burro", vrh Teidea, prašuma Anaga, Los Gigantes i El Medano zasigurno su mjesta koja morate posjetiti ako se nađete na otoku. Priroda je predivna, ljudi su jako ljubazni i uvijek spremni pomoći. Ne govore svi engleski, ali i ono malo španjolskog iz telenovela bit će vam dovoljno za sporazumijevanje. Hrana je dosta specifična, zasitna i bogata. Moja preporuka definitivno su *arepas* i *bocadillo con carne mechada*. Toliko od mene.

**Hasta luego Tenerife.
Matija Vukojević**

CEEPUS ljetna škola akvakulture Sarajevo 2017.

Ljetna škola akvakulture održana je u srpnju 2017. godine u organizaciji Veterinarskoga fakulteta u Sarajevu u okviru CEEPUS programa (*Central European Exchange Program for University Studies*). Cilj ljetne škole bio je edukacija studenata o uzgoju akvatičnih organizama te mjerama kontrole i prevencije njihovih bolesti, u trajanju od sedam dana. Sudjelovali su Veterinarski fakulteti Zagreb, Sarajevo i Beograd, s ukupno osam studenata među kojima su, uz mene, bile i kolegice Gabriela Krivić, Stella Lukman i Katarina Miljak.

Naša avantura započela je pogrešnim skretanjem s autoceste zbog čega smo putovali nekoliko sati dulje i vidjele Bosnu i Hercegovinu mnogo više od planiranog. Unatoč kašnjenju, naši dragi domaćini u Sarajevu, na čelu s profesoricom Almedinom Zuko, bili su iznimno gostoljubivi i nisu nam zamjerali. Sljedeći je dan po programu bio obilazak fakulteta uz predavanja profesorice A. Zuko i profesora Adnana Jažića koji su nas upoznali s razvojem akvakulture u BiH, suvremenim metodama uzgoja riba te menadžmentom i ekonomikom ribogojilišta. Također, imali smo kratak pregled najvažnijih bolesti riba, njihovog praćenja i kontrola te su nas upoznali i s legislativom u akvakulturi.

Sljedeće je jutro uslijedilo putovanje prema Mostaru na kojemu nam se pridružila naša draga profesorica Lidija Kozačinski. Podijeljeni u dva kombija, praćeni tradicionalnom muzikom, uživali smo u razgledu predivne prirode i mnogih uzgajališta slatkovodnih riba. Pristali smo u Salakovcu gdje nam je profesorica L. Kozačinski održala predavanje o HACCP-u te smo imali priliku vidjeti kako se on na tom uzgajalištu i



Slika 1. Sudionici ljetne škole s profesorom Adnanom Jažićem na Veterinarskom fakultetu u Sarajevu.



Slika 2. Profesorica Lidija Kozačinski sa svojim „pucama“ u Salakovcu.



Slika 3. Pregled ribe.

Slika 4. Uzimanje materijala za pretragu.



Slika 5. Posljednji dan u Neumu.



Slika 6. S domaćinima na čevapima kod Želje.



Slika 7. U obilasku Baščaršije.



provodi.

Nakon dolaska u Mostar, zahvaljujući predivnim profesoricama, posjet jednomu od uzgajališta odgođen je za jutro poslije, a mi smo cijelo poslijepodne proveli na bazenima te u razgledavanju grada. U šest sati ujutro bili smo u Blagaju gdje nam je demonstriran pregled riba te način uzorkovanja i slanja materijala na pretragu, u čemu smo i sami imali priliku sudjelovati.

Slijedio je put prema Pelješcu. Nakon prelaska granice, nastavili smo put prema Stonu gdje nas je dočekao naš profesor Alen Slavica. Odveo nas je na uzgajalište dagnji i kamenica te opisao postupak njihova uzgoja, a imali smo ih priliku i degustirati. Put nas je dalje vodio ponovno u Neum gdje smo poslijepodne i iduće jutro, do povratka u Sarajevo, proveli uglavnom na plaži.

Nakon dolaska u Sarajevo naša je ljetna škola službeno završila i došlo je vrijeme za rastanak. Nakon što smo se oprostili s profesorima, odlučili smo naš posjet još malo produljiti kako bismo bolje upoznale grad, popile nekoliko dobrih kava i isprobale sve vrste baklava.

Za kraj bih željela zahvaliti docentu Zoranu Vrbancu koji nam je pomogao s prijavom i omogućio prisustvovanje ovoj ljetnoj školi. Svakome bih preporučila da se prijavi na jednu od mnogih ljetnih škola koje CEEPUS nudi jer će, uz dodatnu edukaciju u području veterinarske medicine, steći lijepa poznanstva i dobro se zabaviti.

Karla Klobučar, studentica 6.godine

Guinea pig generation

The test run

Moving to Zagreb was a fairly major adjustment for everyone but definitely a step in the right direction. The city is very calm and has a relaxed and pleasant atmosphere. Of course the weather was a bit of a surprise to some who saw real snow or had a snowball fight for the first time in their lives. The only major challenge for us in Zagreb proved to be the language barrier such as the simple fact that you need double the time to get anything done because the lady in the office dealing with foreign resident's papers might not actually speak English. This of course is a Murphy moment since most people here have a very good level of English and are willing to communicate and help.

Since there were only 7 international students in the whole University we greatly depended on each other, both in our studies and outside of Uni making us a tight group. The University and all who had contact with us there have been immensely helpful and welcoming, with our inquiries ranging from "What's an OIB?" through "How do I apply for an exam?" down to even "Where can I find a dentist?" Literally everything was new for us, but at the same time we ourselves posed an entirely new experience and challenge to the professors. All the hand-outs and presentations had to be translated and the lessons had to be held in a completely diffe-



Fig. 1. Beginning of second year for the English section – Ajda, Irisz, Juliette, Olivia, Adaya and David.



Fig. 2. In Dubrovnik for the Summer School 2017.



Fig. 3. English students enjoying practical in Anatomy with prof. Đuras.

Fig. 4. Tj and David having fun on Histology slides.



Fig. 5. The last Histology practical of the first year, with prof. Kužir.



rent language. In the end all the professors made an immense effort, some even taking extra English lessons and checking materials with their teachers. Of course a slide slips in here and there in Croatian, but according to some professors it is basically the same language so it doesn't really matter anyway. It was and to some extent it still continues to be an adjustment for both sides, one that poses numerous challenges, but is at the same time balanced in its rewards. We still come across new aspects of our University and we definitely have a lot left to discover in Croatia; and so the adventure continues!

English students, 2nd year now

43RD WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION CONGRESS AND 9TH FASAVA CONGRESS

25-28 September, 2018 | Singapore



Congress organizer

Kenes International Organizers of Congresses S.A., Rue François-Versonnex
7, 1207 Geneva, Switzerland Tel: +41 22 908 0488 | Fax: +41 22 906 9140



Remember is to live again

When I think about the experience I had in Zagreb, I just smile. Studying abroad for me was an impossible thing to do. One year ago it sounded like a wish coming true. I decided to apply and I was accepted, luckily, by UNIZG. At the beginning I was afraid, nervous but also excited. Arriving in a country, a city, where you don't understand a word you hear or all the advertisements you see, is hard.

Day by day you realize how amazing that experience will be, you start to live happily every day you spend there. Then, the strange city is not strange anymore. It becomes your second home.

Studying abroad taught me about how kind people can be. All the Croatian students that supported me in that period were unbelievable. The interest they showed in a different culture and to a totally strange Mexican, made me feel at home. As well the professors, who proved to me why UNIZG has higher education. Thank you, guys and professors, for all the support.

Every day I spent in Zagreb was a gift and I was impressed by every small detail, and that's why I felt so alive living there. The differences between my culture and Croatia were huge, so I was living a different world every day.

Now I am back in Mexico, the biggest challenge is never to let a potential extraordinary day, be just ordinary. I am still excited, I feel passionate about my bachelor's degree, about living well every second I spend, always trying to have fun, smile and be happy, and make this life the best I can.

I feel grateful with life for all the things that it gave me in Zagreb. Hopefully I was able



Fig. 1. My Chinese and Italian family.



Fig. 2. Being happy at Plitvice Lakes National Park.



Fig. 3. Spending a day at Sljeme.

Fig. 4. Trying to be as cool as Croatians by drinking coffee like them. The beautiful cathedral just right behind me.



Fig. 5. This was one of my favorite places to see the sunrise.



to teach something to the people I met, and I would like to thank you for the amazing things I learned directly or indirectly. This experience totally changed the way I think now and the way I see life.

Zagreb, Croatia is my second home now, we will see each other again.

Let's celebrate life every day.

Hvala Hrvatska

Thank you Croatia

Nicole Cristiano

BSAVA
Congress

20
18

5-8 April 2018 Birmingham, UK

Veterinar

Zoološkog vrta grada Zagreba

Zoološki vrt grada Zagreba jedan je od dvaju zooloških vrtova u Hrvatskoj. Prostire se na površini od 7 hektara, a nalazi u parku Maksimiru, gotovo u središtu grada. U njemu posjetitelji mogu vidjeti 275 različitih vrsta životinja – sisavaca, ptica, gmazova, vodozemaca, riba i beskralježnjaka. Osim toga, Zoološki vrt grada Zagreba sudjeluje u programima zaštite ugroženih vrsta, organizira različita događanja te nudi posjetiteljima različite obrazovne programe. Kako bismo iz prve ruke saznali informacije o ulozi veterinara u Zoološkom vrtu, razgovarali smo s Jadrankom Borasom, mladim veterinarom zaposlenim u Zoološkom vrtu grada Zagreba. U razgovoru s njim otkrio nam je detalje iz studentskih dana i kako je biti veterinar Zoološkog vrta te zanimljivosti o njegovim stanicama.

Što vas je navelo da upišete veterinarsku medicinu?

Oduvijek sam maštao o tom, ali nisam očekivao da ću to završiti. U moje vrijeme većina je ljudi upisivala veterinu nakon srednje veterinarske škole, a ja sam završio gimnaziju. Oduvijek sam bio u kontaktu sa životinjama i to mi je bila želja. S godinama je bilo podijeljenih osjećaja, kad sam vidio što sve veterinar može raditi i nisam bio oduševljen sa svime. Ali na kraju je sve savršeno završilo.

Čime ste se najviše bavili za vrijeme studiranja?

Na početku sam se pokušavao baviti sportom u slobodno vrijeme, ali kasnije je ostalo vremena samo za fakultet i učenje zbog napornog rasporeda. Za vrijeme studiranja volontirao sam na kirurgiji tijekom 5. godine studija te preko ljeta po veterinarskim ambulantama u Osijeku. Sve je krenulo sa speleologijom na 2. godini faksa, kada smo išli na teren zajedno s ekipom s PMF-a i bavili se gmazovima.



Slika 1. Aplikacija anti-helmintika.



Slika 2. Medicinski trening primata (Hanuman langur).

To me i usmjerilo prema tim vrstama životinja. Kad god smo nailazili na životinje, poput malih zmija koje nisu imale prvi obrok u toj godini i za koje smo vidjeli da neće preživjeti, nosili smo ih našim kućama, hranili i puštali u prirodu sljedeće godine na istu lokaciju gdje su i pronađene.

Kakav ste bili student?

Vrlo dobar.

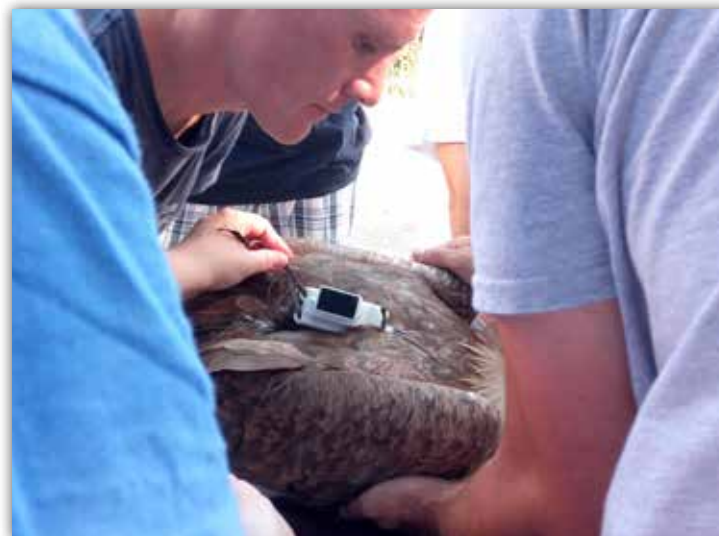
Jeste li sudjelovali u nekoj od studentskih udruga i kojoj?

Od studentskih udruga sudjelovao sam u EQUUS-u, gdje je najbolji dio bio kad smo radili studentsku prostoriju u kojoj su se počeli održavati tulum.

Slika 3. Pregled bjeloglavog supa.



Slika 4. Postavljanje telemetrijskog uređaja na bjeloglavog supa.



Ima li nešto za čime žalite, što niste proživjeli i iskoristili kao student?

Upravo te studentske razmjene, ipak one daju mladim studentima neku širu perspektivu i da vide što se radi vani i u principu da shvate da nije kod nas tako loše. Znam koliko meni u ovom poslu pomaže što često putujem, vidim kako drugi rade, pa ili naučim mnogo bolje raditi ili shvatim da već vrlo dobro radim.

Jeste li kao student zamišljali da ćete se baviti ovime što radite danas?

Iskreno nisam se mogao nadati. Da me itko pitao, uvijek bih rekao da će to biti nešto s divljim životinjama, ali nisam bio previše optimističan. Ipak postoje samo dva Zoološka vrta u Hrvatskoj.

Ukratko nam opišite svoj život nakon što se završili fakultet.

Počeo sam raditi u veterinarskoj stanici u Osijeku, gdje sam odradio staž. U to su vrijeme tražili veterinara pripravnika u Zoološkom vrtu u Osijeku, prijavio sam se i dobio posao. Ostao sam tamo sedam godina. Prije godinu i pol zaposlio sam se u Zoološkom vrtu grada Zagreba, nakon što je kolega otišao u mirovinu. Ovdje je dobro što su me slali na veterinarske konferencije gdje sam upoznao druge veterinare i prikupio kontakte za razmjenu iskustava i literature, jer na fakultetu zaista malo učimo o ovome i dosta je teško naći informacije, no sad je to već druga priča. U početku mi je velik problem bilo što bih ja kao veterinar u Zoološkom vrtu trebao raditi. U tome mi je doktorica Ingeborg Bata mnogo pomogla. Bili su zadovoljni sa mnom i zadržali su me. Specijalizaciju sam odradio na kirurgiji, stručni poslijedi-

plomski, jer je jedno vrijeme bio pravilnik po kojemu se veće operacije moglo raditi samo uz završeni specijalistički studij. Što se tiče *wildlife* specijalizacije, to su sve vanjski, europski programi te planiram nešto u tom smjeru.

Mislite li da je potrebno zaposliti još veterinara?

Što se tiče opsega posla, mislim da bi bilo potrebno zaposliti još jednog veterinara u skoroj budućnosti. Ušli smo u sustav Balai (Direktiva EU 92/65), a to je direktiva EU prema kojoj se nad uzorkom od 25 do 40 % životinja koje žive u skupinama moraju provesti određeni dijagnostički postupci, od zaraznih bolesti do svega ostalog da bi se ta životinja mogla proglasiti zdravom. Svaki pet godina moramo nad svima provesti neki zdravstveni *screening* i to je mnogo posla. Zatim, životinje koje dolaze kod nas moraju provesti određeno vrijeme u karantenskom objektu. Osim toga, imamo sklonište i oporavište za strogo zaštićene divlje životinje gdje ima dosta posla jer dolaze životinje u svakakvim stanjima. Ranjene srne, udarene automobilima, i tako dnevno od 5 do 10 životinja. Odlično je što doktorica Ingeborg Bata vodi azil za strogo zaštićene divlje životinje tako da ona životinje koje su za trajnu skrb smješta u azil. Osim toga, administracije ima uvijek.

Opišite nam jedan vaš radni dan.

To je dosta teško jer skoro nijedan dan nije isti. U pravilu svaki dan počinje vizitom postojećih pacijenata koje obidemo i podijelimo terapije koje je potrebno dati u obliku injekcija – puhaljkom, puškom, dok peroralnu terapiju mogu dati i timaritelji za vrijeme hranjenja. Poslije toga uglavnom slijede sastanci gdje o pojedinim životinjama raspravljaju veterinar, nutricionist i biolog. Radno bi vrijeme trebalo biti od 8 do 16 sati i da 10 dana radimo pa smo četiri dana slobodni. Problem je što nikad nismo slobodni ta

četiri dana, uglavnom 12 dana radimo pa smo dva dana slobodni, s tim da dok je jedan veterinar na godišnjem, drugi radi konstantno. Ovdje je super što se nas dvoje možemo pokrivati. U Osijeku sam bio jedini veterinar pa sam se i s godišnjeg odmora morao vraćati. Mislim da je bilo kojem veterinaru vrlo slično, jer uglavnom nema fiksnog radnog vremena. S tim sam se pomirio kad sam upisao fakultet. Tijekom noći



Slika 5. Monitoring anestezije lava.



Slika 6. Trening morskog lava.

zasad ovdje nema poziva, osim u izvanrednim situacijama. Zaštitari ih noću obilaze i uglavnom sve životinje spavaju.

Koje su po vama prednosti i nedostaci rada kao veterinar u zoološkom vrtu?

Nedostaci su radno vrijeme, jer ničija obitelj to baš i ne cijeni, ali odavno sam se pomirio s tim. Prednost su životinje s kojima radimo i pro-

vodimo vrijeme. Sve su različite vrste i bitno je biti stalno u kontaktu s njima, jer u slučaju da se nešto dogodi moraju biti istrenirane da svojevoljno dolaze. Npr. majmuni dopuštaju auskultaciju, da se uzme bris ždrijela, nosa, te ponekad sami dolaze i pokazuju što ih boli. Moraju biti naviknuti na tebe tako da znaju da im želiš pomoći.

Jeste li s nekom jedinkom razvili poseban odnos?

Za istaknuti nemam nikoga, npr. s čimpanzama sam stvarno super, ali me mužjak tek nakon godinu i pol počeo prihvaćati, no onda sam morao uzeti uzorak za DNA analizu i počupao mu par dlaka. Otada on čeka i čekat će cijeli život da me udari. Taj je dio odnosa meni smiješan, a vjerojatno i njemu. S druge strane, s morskim lavom teškim 300 kg možeš raditi što god želiš, ako razviješ odnos s njim. Ne mogu reći da mi je itko najdraži.

Opišite nam najkompliciraniji slučaj.

Zapravo su svi komplicirani jer dosta dugo treba da bi se shvatilo o čemu se radi. Uglavnom su sve redovite pretrage (bakteriološke, parazitske) negativne. Imali smo jedan slučaj osteosarkoma kod medvjeda, gdje je došlo do patološkog loma lopatice, ali rendgen nije mogao probiti da bismo vidjeli u kakvom je stanju lopatica i što se dogodilo. S patohistologije je došao nalaz da je to normalno koštano proliferativno tkivo i sljedeći put kad smo ponovili patohistološku pretragu, rezultat je bio osteosarkom. Medvjed je bio 19 godina star, doslovno simbol Zoološkog vrta i, kako je bio bolestan četiri mjeseca, svaki dan smo bili zajedno. I tada moraš eutanazirati takvu životinju jer više nije reagirao na lijekove i kvaliteta života mu je bila narušena.

S kojom vam je vrstom najteže raditi?

U veterinarskom je dijelu najteže s majmunima i mor-

Slika 7. Vadenje krvi languru prije operacije.



Slika 8. RTG pretraga medvjeda poslije operacije.



skim lavovima, kod kojih je jako teška anestezija i jako dobro pamte. Jednom kada vide puhaljku ili pušku znaju za cijeli život što je to. S druge strane, zebre i antilope su veliki paničarite ako ih tretiraš, drugi put kad shvate što se događa, uspaniče se, skaču i probijaju ogradu pa treba procijeniti u kojem slučaju smiješ nastaviti i kad prestati.

Ima li novosti u pomlatku životinjskog svijeta i kojim se novim stanovnicima možete pohvaliti?

Stigla nam je mlada ženka patuljastog vodenkonja za našega starog mužjaka Otta, ali je još premala da bi ju spajali s njim jer je on težak 280 kg, a ona tek 98 kg. Svake godine ima rakuna, kapucina i drugih raznih vrsta životinja. Zatim mladi lavići od prošle godine i morski lav, najatraktivniji za ljude. Ima mnogo rođenja, od patagonijskih mara, kapibara te se jako puno ptica gnijezdi, pogotovo u novoj afričkoj volijeri koja je otvorena ove godine, gdje su se one dobro snašle. Osim toga, radimo na tome da držimo životinje koje su u prirodi ugrožene ili kritično ugrožene jer je jedan od najvažnijih ciljeva modernih zoooloških vrtova očuvanje ugroženih vrsta. Stoga se s nekim vrstama životinja, koje su izumrle ili je broj jedinki na svijetu malen, radi reintrodukcija. Uz to, radimo i na reintrodukciji risova u suradnji s Fakultetom. Radimo i s Eko centrom Beli, tj. oporavilištem za bjeloglave su-pove, gdje im pružamo veterinarsku podršku.

Usporedba Zooološkog vrta grada Zagreba sa Zooološkim vrtom i akvarijem grada Osijeka?

To su sasvim različiti zooološki vrtovi, od površine do vrsta koje se u njima drže. Osječki je dvostruko veći te se uglavnom drže veliki papkari i kopitari, poput žirafa, zebri, antilopa te velikih zvijeri, dok je ovaj u Zagrebu manji, gradski, uređeniji, vrt s više novaca i s kompliciranijim i skupljim vrstama za držanje. U Osijeku sam bio jedini veterinar, dok ovdje imam podršku. I Fakultet i Institut su bliže pa je jednostavnije i mnogo se kvalitetnije može raditi.

Kakva je suradnja s drugim zooološkim vrtovima u Hrvatskoj i Europi?

U načelu jako dobra. Zagreb je ipak institucija koja je već 20 godina članica Europskog udruženja zoooloških vrtova i akvarija te Svjetskog udruženja zoooloških vrtova i akvarija. Sudjeluje se na mnogo projekata zajedno s drugim zooološkim vrtovima diljem svijeta, a moja je suradnja s drugim ZOO vrtovima jako dobra. U kontaktu sam s veterinarima iz Europe, osobito Budimpešte, Praga i Beča koji su relativno blizu. Tomu u prilog ide i Konferencija veterinarar zoooloških vrtova, koja se održava jednom godišnje i na kojoj prisustvuje 500 do 700 veterinarar iz različitih ZOO vrtova pa izmjenjujemo iskustva.

Postoji li neka vrsta životinje koju trenutačno nemate u Zooološkom vrtu, a htjeli biste imati?

U Osijeku sam četiri godine radio sa žirafama i jako su mi se svidjele, zbog svoje izrazite kompliciranosti, od probavnog preko lokomotornog do mentalnog sustava koji je jako čudan – u jednom trenu su jako inteligentne, dok u drugom nisu i izrazito su plašljive pa s njima stvarno treba znati raditi.

Na koji se način studenti veterinarske medicine mogu uključiti u rad ZOO vrta?

Imamo već nekoliko studenata koji su uključeni. Ne samo da se mogu uključiti u rad veterinarar nego i kao edukatori. Najčešće imamo studente koji promatraju ponašanje životinja, npr. kad spajamo neke životinje ili prilikom promjene prehrane. To zvuči jednostavno, ali je zapravo dosta komplicirano, jer nam trebaju validni podaci te osoba mora znati kako se životinja ponaša i što je u tome negativno, a što pozitivno. Studenti mogu raditi kao timaritelji ili kao volonteri u dječjem zooološkom vrtu, gdje su domaće životinje, ili s nama i našim tehničarima. Osim toga, mogu se uključiti i u vanjske projekte, s risovima, supovima, vukovima itd.

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 RADOVI

- Analiza izražaja gena tijekom in vitro diferencijacije neurona 2
- Molekulska karakterizacija APEC sojeva *E. coli* izdvojenih na farmama peradi Republike Hrvatske 13
- Životne, prehrambene navike i stavovi studenata druge godine studija veterinarske medicine 21
- Morfometrijske osobitosti spermija jarčeva francuske alpine 31

IZ STRUČNE LITERATURE

- Bromirani retardanti plamena i perfluorirane tvari 39

POPULARIZACIJSKI ČLANCI

- IVSA Hrvatska 2016./2017. 46
- Reptilomanija+ 2017. 48
- SportVEF 2016./2017. 50
- A gdje je Wrocław? 52
- Moja češka ERASMUS avantura 54
- ERASMUS ljetna praksa, Tenerife, Kanarsko otočje 56
- CEEPUS ljetna škola akvakulture, Sarajevo 2017. 58
- Guinea pig generation, The test run 60
- Remember is to live again 62

ZOO KUTAK

- Veterinar Zoološkog vrta grada Zagreba 64