



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Meri Blažević i Iva Ciprić

**Osobitosti kompletne krvne slike *Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*)**

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Maje Belić i doc. dr. sc. Maje Lukač. Predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2020./2021.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Opća hematologija gmazova .....	1
1.2. Morfologija i funkcija stanica .....	2
1.2.1. Eritrociti.....	2
1.2.2. Leukociti.....	4
1.2.2.1. Heterofili.....	4
1.2.2.2. Eozinofili .....	5
1.2.2.3. Bazofili .....	5
1.2.2.4. Limfociti .....	6
1.2.2.5. Monociti.....	7
1.2.3. Trombociti.....	8
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	9
2.1. Opći cilj istraživanja.....	9
2.2. Specifični ciljevi istraživanja .....	9
3. MATERIJALI I METODE .....	10
3.1. Način držanja životinja.....	10
3.2. Uzorkovanje .....	10
3.3. Laboratorijska dijagnostika .....	11
3.3.1. Određivanje hematokrita .....	11
3.3.2. Određivanje broja eritrocita .....	11
3.3.3. Određivanje koncentracije hemoglobina .....	11
3.3.4. Izračunavanje eritrocitnih konstanti .....	12
3.3.5. Određivanje broja leukocita .....	12
3.3.6. Određivanje diferencijalne krvne slike .....	12
3.4 Prikaz i statistička obrada podataka .....	12
4. REZULTATI.....	13
5. RASPRAVA .....	17
6. ZAKLJUČCI.....	20
7. ZAHVALE.....	21
8. LITERATURA.....	22
9. SAŽETAK .....	24
10. SUMMARY .....	25

## 1. UVOD

### 1.1. Opća hematologija gmazova

Gmazovi su jedna od najugroženijih i najmanje istraženih skupina životinja u kojoj su mnoge vrste pred izumiranjem. Do danas je opisano više od deset tisuća vrsta gmazova, koji se odlikuju velikom raznolikosti, čak i među životinjama unutar istog roda. Raznolikost gmazova uvjetovana je različitim prirodnim staništima i sposobnošću prilagodbe na njih, te brojnim unutarnjim (spol, dob, vrsta) i vanjskim čimbenicima (temperatura i prehrana) koji utječu na fiziološka svojstva ovih životinja. Zbog njihove velike raznolikosti, te činjenice da su mnoge vrste zaštićene i time nedostupnije za istraživanja, za mnoge vrste fiziološki i klinički parametri koji bi mogli pomoći u njihovoj zaštiti, ne postoje.

Jedna od najraširenijih metoda za utvrđivanje zdravstvenog stanja jedinke, ali i uvida u fiziološka zbivanja u organizmu je izrada kompletne krvne slike. Kompletna krvna slika gmazova može se podijeliti kao i u sisavaca, na crvenu i bijelu krvnu sliku. Pod crvenu uvrstavamo broj eritrocita, hematokrit, koncentraciju hemoglobina i eritrocitne konstante. Diferencijalna krvna slika, ukupan broj leukocita te morfološka procjena krvnih stanica čine bijelu krvnu sliku. Kod životinja se iz navedenih parametara mogu dijagnosticirati anemije, upale i parazitarne invazije. Hematološka pretraga gmazova mnogo je složenija od sisavaca, jer se sama obrada krvi mora raditi ručno. Razlog tome su specifične različitosti u morfologiji krvnih stanica, a najznačajnija je prisutnost jezgri u svim vrstama stanica, što onemogućava komercijalnu računalnu obradu (BELIĆ i sur., 2017). Vremenski zahtjevna ručna obrada i/ili rijetkost vrste, glavni su razlozi nedostatka podataka o krvnoj slici gmazova, što je u ovom slučaju kritično ugrožena i rijetka vrsta, *Utila iguana*. Latinski naziv vrste *Ctenosaura bakeri* dolazi iz grčkog jezika grč. Ctenos- češalj i grč. Saura- gušter. Endem je na otoku Utila koji se nalazi pokraj karipske obale Hondurasa. Veličine su od 56 cm do 76 cm, ovisno o spolnom dimorfizmu. Ova vrsta uglavnom obitava u mangrovima. Šume mangrova nalaze se u tropskim područjima u zoni plime i oseke. Smatraju se jednim od najproduktivnijih morskih ekosustava (LAZOVIĆ, 2020). *Utila iguane* su omnivori, što podrazumijeva da jedu hranu i biljnog i životinjskog podrijetla. Juvenilne jedinke češće se hrane insketima, dok se prehrana kod odraslih jedinki temelji na biljnoj hrani, poput lišća mangrova i cvijeća. Nadoknađuju proteine hvatajući rakove i male artropode (GUTSCHE, 2003; MARYON i sur., 2020). Smatra se da u prirodi postoji još oko 10000 jedinki podijeljenih u dvije do tri fragmentirane populacije, što ovu vrstu iguane čini kritično ugroženom ponajprije radi gubitka staništa i njegove fragmentacije uslijed urbanizacije i pretjeranom iskorištavanju šumskog

bogatstva. Također, ilegalni lov i grabežljivost invazivnih vrsta mogu biti dodatna prijetnja populaciji.

U ovom radu obraditi će se krvni parametri ove strogo zaštićene vrste. Određivanjem fizioloških krvnih parametara može se pridonijeti utvrđivanju zdravstvenog statusa te očuvanju strogo zaštićene vrste iguane. U istraživanju su obrađeni uzorci krvi ukupno 10 pripadnika vrste *Uta stansburiana*. Budući da ne postoje podaci o fiziološkim vrijednostima krvnih parametara za ovu vrstu iguana, u radu je provedena i usporedba dobivenih parametara sa već postojećim podacima za zelenu iguanu, njima najrodniju vrstu (HARR i sur., 2001). Zelene iguane su jedne od najčešće zastupljenih vrsta u istraživanjima zbog veće sposobnosti prilagodbe suživotu s čovjekom. U divljini obitavaju na drveću prašuma, zbog čega ih se svrstava u arborealne životinje. Zelene iguane vole biti u blizini slatke vode jer su odlični plivači, voda im omogućava bijeg od predatora (CONANT i COLLINS, 1998). S obzirom da postoje referentne vrijednosti hematoloških parametara zelene iguane, često se koriste i kao referentna odrednica za druge vrste iguana. Međutim, zbog manjka informacija i moguće nepreciznosti takve prakse te dalekosežnih posljedica, ovaj rad sekundarno ispituje mogućnost poopćavanja hematološke slike kod srodnih vrsta gmazova. Unaprijeđenje dijagnostičkih metoda rezultiralo bi bržim i efikasnijim liječenjem te očuvanju ugrožene populacije.

## **1.2. Morfologija i funkcija stanica**

Krvne stanice gmazova čine eritrociti, leukociti i trombociti. Granulirani leukociti su heterofili, eozinofili i bazofili, dok se mononuklearni leukociti dijele na limfocite i monocite. Heterofili i eozinofili imaju acidofilne granule u citoplazmi, za razliku od bazofila čije su citoplazmatske granule bazofilne (ARIKAN i ÇICEK, 2013).

### **1.2.1. Eritrociti**

Prosječan životni vijek eritrocita gmazova je oko 600-800 dana, što je znatno duže nego u sisavaca čiji eritrociti žive u prosjeku 120 dana. Smatra se da je takav duži životni vijek posljedica sporijeg metabolizma gmazova koji se odražava i na produkciju i sazrijevanje eritrocita (CAMPBELL i ELLIS, 2007). Eritrociti gmazova su elipsoidne stanice koje u svom centralnom dijelu imaju položenu okruglu ili ovalnu jezgru koja sadrži gusti kromatin. Za razliku od ptičjih glatkih granica jezgri, jezgre kod gmazova imaju nepravilne granice. Citoplazma stanica je često narančasto – ružičaste boje. Nezreli (polikromatofilni) eritrociti sadrže jezgru sa manje gustim kromatinom, dok im je citoplazma nešto bazofilnije obojena od zrelih eritrocita. Nezrele eritrocite možemo fiziološki naći u perifernoj krvi gmazova, osobito kod mlađih životinja (CAMPBELL i

GRANT, 2010). Takvi nezreli eritrociti često su manji od zrelih eritrocita, sferičnog su oblika te tek trebaju postati spljoštene elipsoidne stanice. Nezreli eritrociti gmazova, fiziološki mogu biti prisutni u većem broju kod juvenilnih jedinki (npr. morskih kornjača), te u razdoblju presvlačenja kože (kod zmija i guštera). Mitotske aktivnosti u eritrocitima uobičajene su u perifernoj krvi gmazova. Također, u perifernoj krvi mnogih gmazova često pronalazimo okrugle do nepravilne bazofilne inkluzije u citoplazmi eritrocita koje su najčešće artefakti nastali pripremom razmaza i nemaju kliničko značenje. No, kod nekih vrsta gmazova, elektronskim mikroskopom je utvrđeno da su takve inkluzije u eritrocitima zapravo degenerirani organeli, primjerice endoplazmatski retikulum (CLARK i sur., 2001). Ostali artefakti prisutni u citoplazmi eritrocita su vakuole, čiji nastanak se može smanjiti pažljivom i pravilnom izradom razmaza.

Referetne intervale za ukupan broj eritrocita (RBC, engl. red blood cell), koncentraciju hemoglobina te hematokrit (HCT) vrlo teško je ustanoviti za gmazove i ostale ektotermne životinje zbog njihove fiziološke prilagodbe na različite vanjske i unutarnje čimbenike. Unutarnji čimbenici uključuju vrstu, spol, dob te fiziološki status životinje; dok vanjski čimbenici podrazumijevaju godišnje doba, temperaturu, stanište, prehranu, pojavu bolesti, stres povezan sa zatočeništvom te samu venepunkciju koja može imati znatan utjecaj na hemogram (LOPEZ-OLVERA i sur., 2003; WILKINSON, 2004).

Postupak venepunkcije je značajan iz razloga što se u gmazova limfne žile nalaze direktno uz krvne žile te kao rezultat nepravilne venepunkcije možemo dobiti uzorak u kojem su zapravo krv i limfa pomiješani (CRAWSHAW, 1996).

Najčešći poremećaji crvene krvne slike u gmazova vezani su za razvoj anemije. Etiologija anemija u gmazova je slična onoj opisanoj u sisavaca i ptica. Anemija može biti regenerativna: hemoragična (zbog krvarenja) i hemolitička (zbog povećane destrukcije eritrocita) i neregenerativna (zbog smanjene produkcije eritrocita). Hemoragična anemija je najčešće uzrokovana traumatskim ozljedama i vanjskim parazitima, iako se u obzir moraju uzeti i koagulopatije i ulcerozne lezije koje se pojavljuju nešto rjeđe. Hemolitička anemija javlja se kod invazije hemoparazitima, te sekundarno sa septikemijom, i toksemijom. Neregenerativna anemija češći je oblik anemije kod gmazova i gotovo uvijek prati kronične upale uzrokovane bakterijama, virusima ili mikoplazmama. Ostali mogući uzroci uključuju kroničnu jetrenu ili bubrežnu bolest, neoplaziju i hipotireoidizam (CAMPBELL, 2015).

Povećan broj nezrelih eritrocita upućuje na povećanu eritropoetsku aktivnost i javlja se kao odgovor na anemiju. Gmazovi imaju dugo vrijeme regenerativnog odgovora, npr. u poluvodenih kornjača je tek nakon 30 dana od inducirane anemije zamijećen početak regenerativnog odgovora dok je potpuna regeneracija zabilježena tek nakon nekoliko tjedana. Usporedbe radi, u kunića

regenerativni odgovor uslijedi za 5 dana. Smatra se da je spori odgovor u gmazova djelomično posljedica dugog razvoja rubriblasta u koštanoj srži. Produženo vrijeme regenerativnog odgovora mora se uzeti u obzir prilikom postavljanja dijagnoze anemije (ROVIRA, 2010).

Referentne vrijednosti broja eritrocita za mužjake zelene iguane kreću se između 1 i  $1.7 \times 10^6/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001).

### **1.2.2. Leukociti**

Zbog brojnih razlika u morfologiji ovih stanica između različitih vrsta gmazova, sama klasifikacija leukocita može biti doista izazovna. Općenito ih možemo podijeliti u dvije primarne skupine: granulocite i mononuklearne leukocite. Granulocite dijelimo u dvije skupine – bazofile te acidofile u koje ubrajamo eozinofile i heterofile. Eozinofile i heterofile međusobno razlikujemo po obliku i boji njihovih citoplazmatskih granula. Bazofili, limfociti i monociti pronađeni u perifernoj krvi gmazova morfološki u velikoj mjeri nalikuju istoimenim stanicama sisavaca i ptica. S druge strane, azurofili koji su specifični leukociti isključivo za gmazove, se kod zmija smatraju zasebnom vrstom stanica, dok se u guštera i kornjača najčešće opisuju kao monociti sa azurofilnim granulama, odnosno azurofilni monociti (CAMPBELL, 2015).

Referentne vrijednosti ukupnog broja leukocita za mužjake zelene iguane kreću se između 11.1 i  $24.6 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001).

#### **1.2.2.1. Heterofili**

Heterofili gmazova su velike (10-23  $\mu\text{m}$ ), okrugle stanice bezbojne citoplazme koje sadrže eozinofilne, štapičaste citoplazmatske granule (SAINT GIRON, 1970). Povremeno se fiziološki u perifernoj cirkulaciji mogu pronaći degranulirani heterofili (HARR i sur., 2001). Jezgra zrelog heterofila je uglavnom ekscentrično položena u stanici, okrugla je ili ovalna oblika, sa gustim kromatinom. Neke vrste guštera, kao što su zelena iguana (*Iguana iguana*) ili Utila iguana (*Ctenosaura bakeri*), koja je i predmet ovog istraživanja, imaju heterofile sa segmentiranom jezgrom. Funkcionalno, ova vrsta stanica ekvivalentna je neutrofilima sisavaca te se smatra da se ponaša kao heterofili ptica za koje je karakteristično da se primarno oslanjaju na mehanizam ovisan o kisiku za uništavanje fagocitiranih mikroorganizama (CAMPBELL, 2015). Tijekom toksemija, jakih upala i infekcija u krvi se mogu pronaći i toksični heterofili koji imaju plavu citoplazmu sa plavim do ljubičastim granulama i vakuolama.

Referentne vrijednosti apsolutnog broja heterofila za mužjake zelene iguane kreću se između 1.0 i  $5.4 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001). Referentna vrijednost relativnog broja heterofila za mužjake zelene iguane iznosi 23.84%.

#### **1.2.2.2. Eozinofili**

Eozinofili gmazova su u većini krvnih razmaza velike (11-17  $\mu\text{m}$ ), okrugle stanice, svijetlo plave citoplazme sa okruglom do ovalnom jezgrom, koja u ponekih vrsta guštera može biti i segmentirana. Jezgra je najčešće položena centralno ili blago ekscentrično, dok citoplazma obiluje eozinofilnim granulama (SAINT GIRONS, 1970). Citoplazmatske granule nekih vrsta gmazova, primjerice iguana, boje se plavo i nakon primjene benzidin peroksidaze. Primjena benzidin peroksidaze podrazumijeva citokemijsku metodu za razlikovanje citoplazmatskih granula na Wright – Giemsinim razmazima. Navedeno svojstvo u nekih vrsta gmazova omogućuje diferencijaciju između heterofila i eozinofila (HARR i sur., 2001). Od ukupnog postotka leukocita u krvi zdravih gmazova, eozinofili čine 7% do 20%. Iako njihova funkcija kod gmazova nije u potpunosti istražena, abnormalno povišena koncentracija eozinofila povezuje se sa parazitskim invazijama ili drugim vrstama antigenske stimulacije (STACY i sur., 2011).

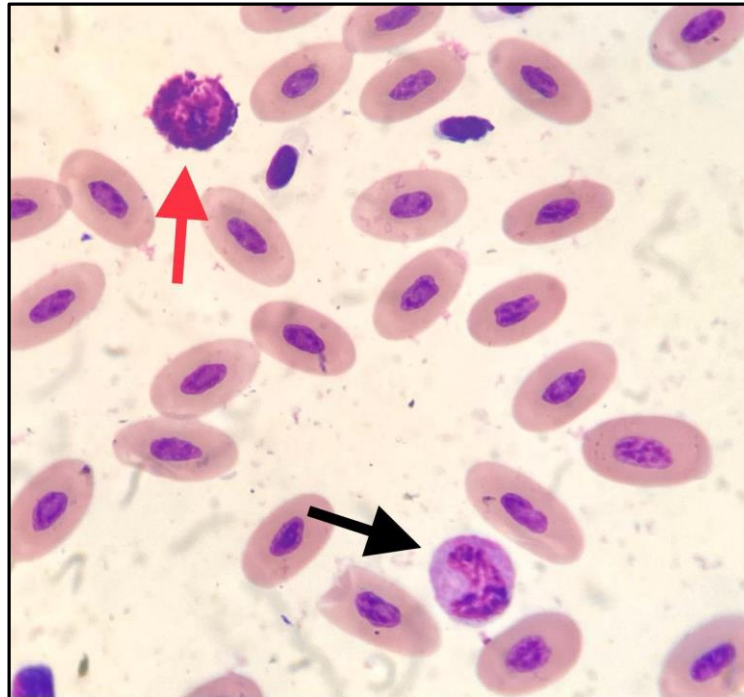
Referentne vrijednosti apsolutnog broja eozinofila za mužjake zelene iguane kreću se između 0.0 do  $0.3 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001). Referentna vrijednost relativnog broja eozinofila za mužjake zelene iguane iznosi 0.66%.

#### **1.2.2.3. Bazofili**

Bazofili gmazova su male (8-15  $\mu\text{m}$ ), okrugle stanice, najčešće na istom krvnom razmazu mnogo manje od heterofila i eozinofila. Same stanice sadrže veliki broj okruglih, bazofilnih (tamnoplavih do ljubičastih), metakromatskih granula (SAINT GIRONS, 1970). Granule su najčešće toliko guste da prekrivaju jezgru, no u slučajevima kada je jezgra vidljiva možemo uočiti da nije segmentirana i da je položena blago ekscentrično. Postoje jasne razlike u veličini samih bazofila između različitih vrsta gmazova; gušteri imaju manje bazofile, dok su veći zabilježeni kod krokodila i kornjača (SAINT GIRONS, 1970). Također, sam postotak bazofila u krvi znatno varira između vrsta, a raspon unutar kojeg se kreću je 40% - 65%. Postotak bazofila u krvi može biti iznad fizioloških granica te se u tim slučajevima smatra da se najčešće radi o hemoparazitu ili virusnim infekcijama. Funkcija bazofila u gmazova nije u potpunosti istražena (STACY i sur., 2011).



Referentne vrijednosti apsolutnog broja bazofila za mužjake zelene iguane kreću se između  $0.1$  i  $1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001). Referentna vrijednost relativnog broja bazofila za mužjake zelene iguane iznosi 2.65%.



Slika 1. Krvni razmaz Uta iguane: a) crvenom strelicom označen je bazofil; b) crnom strelicom označen je azurofilni monocit (Izvor: Arhiva Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta).

#### 1.2.2.4. Limfociti

Limfociti gmazova su gotovo isti kao i limfociti ptica i sisavaca. Limfociti su okrugle stanice koje variraju u svojoj veličini; od malih ( $5-10 \mu\text{m}$ ) do velikih (više od  $15 \mu\text{m}$ ). U krvnom razmazu se mogu naći u različitim oblicima ovisno o tome na koji način prijanjaju uz susjednu stanicu (SAINT GIRONS, 1970; SYPEK i BORYSENKO, 1988). Jezgra je okrugla i položena centralno ili blago ekscentrično u stanici. Citoplazma malog zrelog limfocita je homogena, blago bazofilna, i nema vakuola i granula. U nekim limfocitima mogu se pronaći male azurofilne granule. S druge strane, veliki limfociti imaju veći volumen citoplazme te im je jezgra vrlo svijetla. Uz navedene oblike limfocita, u krvnom razmazu gmazova mogu se pronaći i plazma stanice koje su svojim volumenom ponešto veće od tipičnih limfocita. Jezgra plazma stanica je okrugla ili ovalna te ekscentrično položena (CAMPBELL, 2015). Limfocite gmazova, slično kao i u ptica i sisavaca, možemo kategorizirati na T-limfocite i B-limfocite s odgovarajućim funkcijama, uključujući proizvodnju protutijela i stanični imunski odgovor. Morfološki, na krvnom razmazu ne možemo

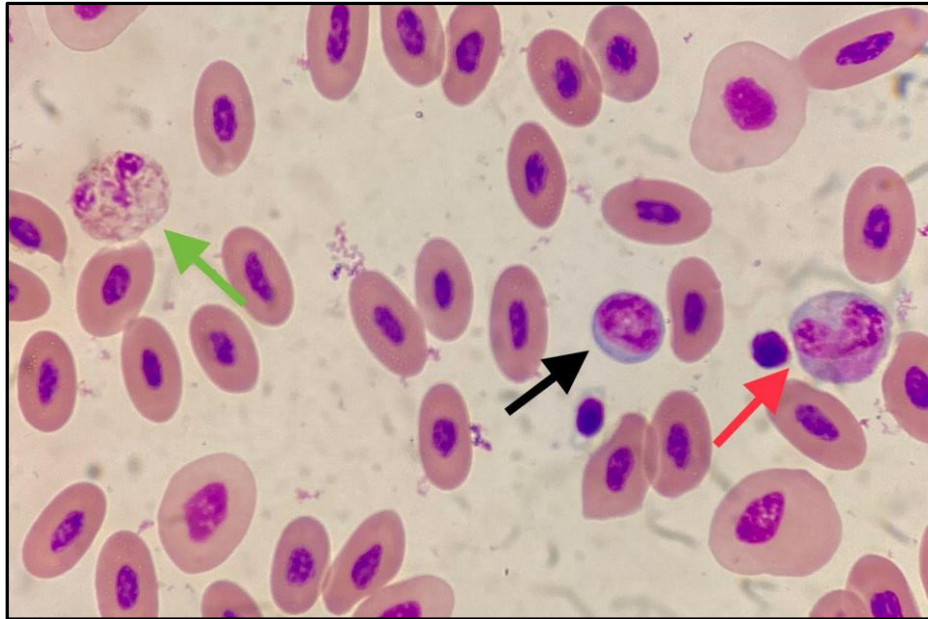
diferencirati ove dvije vrste limfocita. U većine vrsta gmazova, limfociti su dominantna vrsta leukocita i čine oko 80% ukupnog broja leukocita. Limfocitoza, odnosno povećan broj limfocita, javlja se kod životinja koje su pod upalom, bakterijskom ili virusnom infekcijom ili parazitarnom invazijom te kod cijeljenja rana. Limfopenija, odnosno smanjen broj limfocita, se povezuje s pothranjenosti te viškom egzogenih ili endogenih kortikosteroida (STACY i sur., 2011).

Referentne vrijednosti apsolutnog broja limfocita za mužjake zelene iguane kreću se između  $5.0$  i  $16.5 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001). Referentna vrijednost relativnog broja limfocita za mužjake zelene iguane iznosi 64.24%.

#### **1.2.2.5. Monociti**

Monociti gmazova su općenito najveća vrsta leukocita u perifernoj cirkulaciji kako u sisavaca, tako i u gmazova. Variraju u svom obliku od okruglih do ameboidnih stanica te sadrže jezgru koja također pokazuje varijabilnosti u obliku; može biti okrugla, ovalna ili reznjevita (oblika graha). Jezgrin kromatin je manje gust i svjetliji od kromatina limfocita. Citoplazma zauzima veći dio stanice, obilna je i može varirati u boji od svijetloplave do svijetlosive. U citoplazmi monocita možemo pronaći fagocitirani materijal, vakuole te azurofilne ili eozinofilne granule. Monocitne stanice gmazova čine i monocitni azurofili, odnosno azurofil (CAMPBELL, 2015). Azurofili su stanice nepravilna oblika, po veličini neznatno manje od tipičnih monocita. Jezgra im je nesegmentirana i nepravilno okrugla do ovalna, ali može biti i oblika graha. Citoplazma ovih stanica je bazofilna, nešto tamnija od citoplazme monocita. Također, u citoplazmi se može pronaći i manji broj azurofilnih granula različitih veličina (CAMPBELL i ELLIS, 2007). Azurofili su česti u krvnim razmazima gmazova, što je kroz povijest dovelo do mnogih rasprava po pitanju njihove diferencijacije i klasifikacije. Smatra se da je pojava azurofila specifična za gmazove jer se u manjem broju mogu naći u krvi kornjača, krokodila te guštera, dok se u većem broju pojavljuju u krvi zmija (RASKIN, 2000). Citokemijski, azurofili zmija su vrlo slični neutrofilima sisavaca (pozitivni na benzidin peroksidazu, sudan crnu – BVDA i periodičnu kiselinu – Schiff), dok su s druge strane azurofili guštera sličniji monocitima sisavaca (pozitivni na kiselu fosfatazu, a negativni na benzidin peroksid i BVDA). U skladu s tim podacima, preporuča se da se u krvnim razmazima zmija azurofili broje odvojeno, dok se kod ostalih vrsta gmazova broje zajedno sa monocitima. Abnormalno povećane vrijednosti azurofila u perifernoj cirkulaciji povezujemo sa upalama, odnosno bakterijskim infekcijama, osobito kronične faze (STACY i sur., 2011).

Referentne vrijednosti apsolutnog broja monocita za mužjake zelene iguane kreću se između  $0.2$  i  $2.7 \times 10^3/\mu\text{L}$  (HARR i sur., 2001). Referentna vrijednost relativnog broja monocita za mužjake zelene iguane iznosi 8.61%.



Slika 2. Krvni razmaz *Uta iguane*: a) zelenom strelicom označen je heterofil; b) crnom strelicom označen je limfocit; c) crvenom strelicom označen je azurofilni monocit (Izvor: Arhiva Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta).

### 1.2.3. Trombociti

Za razliku od trombocita sisavaca, koji se smatraju fragmentima citoplazme megakariocita, trombociti gmazova, ptica, vodozemaca i riba imaju jezgru te predstavljaju različitu liniju stanica koja najvjerojatnije potječe od tromboblata iz hematopoetskih tkiva. Morfološke značajke trombocita su slične onima u malih limfocita te ih je stoga teško i diferencirati na krvnom razmazu. Trombociti predstavljaju male, ovalne do elipsoidne stanice nepravilnih granica citoplazme. Za vrijeme vađenja krvi i/ili pripreme krvnog razmaza mnogo se trombocita aktivira ili jednostavno rupturira. Aktivirani trombociti redovno čine nakupine vidljive na razmazu te mogu sadržavati citoplazmatske vakuole, dok se rupturirani trombociti pojavljuju u obliku slobodnih jezgri s glatkim kromatinom. Nakupine trombocita mogu pomoći u njihovoj identifikaciji i/ili diferencijaciji od malih limfocita. Funkcija trombocita je identična onoj u sisavaca, a uključuje ulogu u hemostazi i cijeljenju rana. Također, aktivirani trombociti mogu imati i fagocitnu aktivnost što podrazumijeva fagocitozu bakterija, nukleoproteinskog debrisa, eritrocita, hemosiderina i melanina. U slučaju pojave trombocitopenije u krvnoj slici, nužno je isključiti težak ili spor proces vađenja krvi, kašnjenje u obradi uzoraka, zgrušane uzorke i laboratorijske pogreške. Kao i kod sisavaca, i kod gmazova postoje mnoge diferencijalne dijagnoze koje se povezuju s trombocitopenijom (STACY i sur., 2011).

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

### 2.1. Opći cilj istraživanja

U svrhu očuvanja i zaštite zdravlja ugrožene životinjske vrste, cilj ovog znanstvenog rada bilo je prikupiti što više hematoloških podataka kritično ugrožene vrste guštera *Utila iguana*. Zbog manjka informacija i moguće nepreciznosti u laboratorijsko-kliničkoj obradi, ovaj rad sekundarno ispituje mogućnost poopćavanja hematološke slike kod nekih vrsta gmazova.



Slika 3. *Utila iguana* (Izvor: Arhiva Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta).

### 2.2. Specifični ciljevi istraživanja

1. Utvrditi hematološke parametre periferne cirkulacije *Utila iguane*.
2. Utvrditi eventualna patološka stanja u hemogramu.
3. Usporediti dobivene podatke ovog istraživanja sa već poznatom hematološkom slikom zelene iguane (*Iguana iguana*).

### 3. MATERIJALI I METODE

Od Zoološkog vrta grada Zagreba zatražen je klinički pregled i izrada kompletne krvne slike Utila iguana u svrhu utvrđivanja zdravstvenog stanja životinja. Dobiveni rezultati korišteni su za izradu ovog rada uz odobrenje Zoološkog vrta kao vlasnika životinja i Etičkog povjerenstva Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

#### 3.1. Način držanja životinja

Sve životinje uključene u ovo istraživanje uzgojene su u zatočeništvu i držane su u istim, reguliranim uvjetima u Zoološkom vrtu grada Zagreba, gdje su i uzeti uzorci krvi.

#### 3.2. Uzorkovanje

Istraživanje je provedeno na 10 odraslih Utila iguana (*Ctenosaura bakeri*) koje se nalaze u Zoološkom vrtu grada Zagreba. Sve životinje kojima smo vadili krv iz ventralne repne vene su adulti, od toga dvije ženke i osam mužjaka. Nakon vađenja krvi napravljeni su dupli krvni razmazi za svaku jedinku, iz krvi koja se nalazila u brizgalici (bez heparina), a ostatak je stavljen u eppendorf epruvete s dodanim heparinom. Uzorci krvi su odmah nakon uzorkovanja dostavljeni u laboratorij Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu.



Slika 4. Venepunkcija iz ventralne repne vene (Izvor: Arhiva Zavoda za patofiziologiju Veterinarskog fakulteta).

### **3.3. Laboratorijska dijagnostika**

Prikupljeno je oko 1 mililitar krvi od svake životinje. Količina krvi je varirala ovisno o brzini zgrušavanja i suradljivosti životinje. Odmah po prispjeću uzorka u laboratorij određeni su hematokrit, koncentracija hemoglobina i ukupan broj eritrocita. Dupli krvni razmazi za svaku jedinku obojeni su Wright- Giemsinom otopinom za bojanje.

#### **3.3.1. Određivanje hematokrita**

Iz eppendorf epruveta krv je navučena pomoću hepariniziranih mikrocjevčica koje su potom na jednom kraju zatvorene plastelinom. Pripremljene cjevčice postavljene su u uređaj za centrifugu na 5000 okretaja u minuti kroz 5 minuta. Nakon završetka centrifugiranja vrijednost hematokrita očitana je na ručnom čitaču za hematokrit.

#### **3.3.2. Određivanje broja eritrocita**

Krv je navučena u male heparinizirane cjevčice od 5  $\mu\text{L}$  koje su potom uronjene u eppendorf epruvetu sa 995  $\mu\text{L}$  Natt - Herrick's otopine. Eppendorf epruveta se protresla kako bi se krv iz cjevčice pomiješala sa Natt-Herrick's otopinom.. Nakon 10 minuta kapljica krvi je stavljena u Neubauerovu komoricu. Eritrociti su brojani na 5 kvadratića u središnjem velikom kvadratu, a ukupan broj eritrocita dobiven je formulom:

$$\text{Broj eritrocita u 5 kvadratića} \times 10\,000 = \text{broj E}/\mu\text{L}$$

#### **3.3.3. Određivanje koncentracije hemoglobina**

Koncentracija hemoglobina određena je kolorimetrijskom cijanomethemoglobinskom metodom prema protokolu Internacionalnog Vijeća za Standardizaciju u Hematologiji (ICSH) na UV-VIS spektrofotometru (Helios Gamma, Thermo Spectronic). Prije očitavanja apsorbancije, krv pomiješana sa reagensom centrifugirana je na 5000 rpm/5 minuta kako bi se jezgre hemoliziranih eritrocita istaložile na dno epruvete.



### 3.3.4. Izračunavanje eritrocitnih konstanti

Prosječni volumen eritrocita (**MCV, engl. mean corpuscular volume**) izračunat je prema formuli:

$$\text{MCV (fL)} = (\text{HCT} \times 10) / \text{RBC}$$

HCT = hematokrit

RBC = broj eritrocita

Prosječna količina hemoglobina u pojedinom eritrocitu (**MCH, engl. mean corpuscular hemoglobin**) izračunata je prema formuli:

$$\text{MCH (pg)} = (\text{Hb} \times 10) / \text{RBC}$$

Hb = vrijednost hemoglobina

Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitu (**MCHC, engl. mean corpuscular hemoglobin concentration**) izračunata je prema formuli:

$$\text{MCHC (g/dL)} = \text{Hb (g/dL)} \times 10 / \text{PCV (\%)}$$

### 3.3.5. Određivanje broja leukocita (WBC)

Ukupan broj leukocita određen je brojanjem na obojenim razmazima pod povećanjem 40x. Leukociti se broje u 10 vidnih polja, a rezultat izražava formulom:.

Ukupan broj leukocita/ $\mu\text{L}$  = srednja vrijednost broja leukocita u 10 vidnih polja x kvadrat povećanja (HARVEY, 2001.).

### 3.3.6. Određivanje diferencijalne krvne slike (DKS)

Diferencijalna krvna slika određivana je na obojenim krvnim razmazima pod imerzijskim povećanjem pri čemu je izbrojano 200 leukocita. Diferencirani su heterofili, bazofili, eozinofili, monociti i limfociti.

## 3.4 Prikaz i statistička obrada podataka

T-testom za jedan uzorak testirane su razlike u hematološkim parametrima vrste Utila iguana i zelena iguana. T-test na jednom uzorku analizira statističko odstupanje srednje vrijednosti uzorka od hipotetske aritmetičke sredine populacije te testira nultu hipotezu formuliranu tako da pretpostavlja da se srednja vrijednost zadane populacije ne razlikuje značajno od određene referentne vrijednosti. U ovom slučaju, hematološki parametri zelene iguane uzeti su kao referentna vrijednost za usporedbu odstupanja parametara iguane s bodljikavim repom na razinama statističke značajnosti od  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  i  $p < 0,001$ . Hematološki parametri zelene iguane korišteni su kao referentne vrijednosti za druge vrste iguana te je ovim postupkom ispitana preciznost te prakse. Podaci su obrađeni u statističkom programu SPSS 21.0.

#### 4. REZULTATI

Pregledom životinja ustanovljeno je da jedna ženka ima ugriznu ranu u predjelu vrata. Kod navedene životinje utvrđen je upalni leukogram. Kod druge ženke je utvrđena anemija. Zbog navedenih odstupanja, hematološki podaci te dvije ženke nisu uzeti u obzir prilikom statističke obrade podataka. Kod jedne životinje nije dobiveno dosta krvi za određivanje hemoglobina, pa kod te jedinke nisu izračunate MCH i MCHC konstante.

Tablica 1. Hematološki parametri klinički zdravih mužjaka *Utila iguane*.

Parametri	n	Mean ( $\pm$ SD)	Median	Range
Eritrociti ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8	0.84 ( $\pm 0.21$ )	0.80	0.48–1.12
HCT (%)	8	34.13 ( $\pm 3.31$ )	34.50	27–38
Hemoglobin (g/dL)	7	9.78 ( $\pm 0.95$ )	9.97	7.94–10.77
MCV (fL)	8	433.62 ( $\pm 138.05$ )	380.85	303.57–729.17
MCH (pg)	7	1.29 ( $\pm 0.46$ )	1.10	0.84–2.18
MCHC (g/dL)	7	29.03 ( $\pm 1.32$ )	28.49	27.68–31.42
Total WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	18.70 ( $\pm 3.29$ )	18.00	15.52 – 25.28
Heterofili (%)	8	19.88 ( $\pm 5.08$ )	19.00	12–30
Heterofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	3.82 ( $\pm 1.68$ )	3.38	2.05 – 7.58
Eozinofili (%)	8	0.75 ( $\pm 1.04$ )	0.50	0–3
Eozinofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	0.13 ( $\pm 0.18$ )	0.08	0 - 0.51
Bazofili (%)	8	12.13 ( $\pm 4.94$ )	12.50	4–18
Bazofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	2.22 ( $\pm 0.83$ )	2.57	0.76 – 3.03
Limfociti (%)	8	57.88 ( $\pm 7.66$ )	59.50	43–68
Limfociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	10.70 ( $\pm 1.54$ )	11.04	8.32 – 12.86
Monociti (%)	8	9.38 ( $\pm 4.84$ )	10.00	1–15
Monociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8	1.83 ( $\pm 1.12$ )	1.79	0.17 – 3.79



Tablica 2. Hematološki parametri anemične ženke (ženka 1) i ženke s upalnim leukogramom (ženka 2).

<b>Parametri</b>	<b>Ženka 1</b>	<b>Ženka 2</b>
Eritrociti( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	0.49	1.03
HCT (%)	20	40
Hemoglobin (g/dL)	9.34	10.59
MCV (fL)	408.16	388.35
MCH (pg)	1.91	1.02
MCHC (g/dL)	46.7	26.48
Total WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	19.52	24.96
Heterofili (%)	31	13
Heterofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	6.05	3.24
Eozinofili (%)	2	0
Eozinofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.39	0
Bazofili (%)	11	7
Bazofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	2.15	1.75
Limfociti (%)	51	74
Limfociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	9.96	18.47
Monociti (%)	5	6
Monociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.98	1.50

Podaci za zelenu iguanu koji su korišteni za usporedbu preuzeti su iz rada Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas (HARR i sur., 2001).

Tablica 3. Usporedba hematoloških parametara Utila iguane (n=8) dobivenih u ovom istraživanju sa literaturnim podacima za zelenu iguanu.

Parametri	Utila iguana		Zelena iguana	
	Mean ( $\pm$ SD)	Range	Mean ( $\pm$ SD)	Range
Eritrociti ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )***	0.84 ( $\pm$ 0.21)	0.48 – 1.12	1.3 ( $\pm$ 0.2)	1.0 – 1.7
HCT (%)	34.13 ( $\pm$ 3.31)	27 - 38	34 ( $\pm$ 3.9)	29.2 – 38.5
Hemoglobin (g/dL)***	9.78 ( $\pm$ 0.95)	7.94 – 10.77	8.6 ( $\pm$ 0.2)	6.7 – 10.2
MCV (fL)***	433.62 ( $\pm$ 138.05)	303.57 – 729.17	266 ( $\pm$ 27)	228 - 303
MCHC (g/dL)***	29.03 ( $\pm$ 1.32)	27.68 – 31.42	25.1 ( $\pm$ 2.3)	22.7 – 28.0
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	18.70 ( $\pm$ 3.29)	15.52 – 25.28	15.1 ( $\pm$ 5.9)	11.1 – 24.6
Heterofili (%)	19.88 ( $\pm$ 5.08)	12-30	23.84	-
Heterofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	3.82 ( $\pm$ 1.68)	2.05 – 7.58	3.6 ( $\pm$ 2.3)	1.0– 5.4
Eozinofili (%)	0.75 ( $\pm$ 1.04)	0-3	0.66	-
Eozinofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	0.13 ( $\pm$ 0.18)	0 - 0.51	0.1 ( $\pm$ 0.2)	0.0 – 0.3
Bazofili (%)	12.13 ( $\pm$ 4.94)	4 - 18	2.65	-
Bazofili ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )***	2.22 ( $\pm$ 0.83)	0.76 – 3.03	0.4 ( $\pm$ 0.3)	0.1 – 1.0
Limfociti (%)	57.88 ( $\pm$ 7.66)	43 - 68	64.24	-
Limfociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	10.70 ( $\pm$ 1.54)	8.32 – 12.86	9.7 ( $\pm$ 4.5)	5.0 – 16.5
Monociti (%)	9.38 ( $\pm$ 4.84)	1 -15	8.61	-
Monociti ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1.83 ( $\pm$ 1.12)	0.17 – 3.79	1.3 ( $\pm$ 0.9)	0.2 – 2.7

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  statistički značajna razlika između mužjaka iguane s bodljikavim repom i zelene iguane.

Tablica 1., prikazuje srednje vrijednosti i raspon parametara crvene i bijele krvne slike za svih 8 mužjaka. Srednja vrijednost broja eritrocita iznosi  $0.84 \times 10^6/\mu\text{L}$ , te se raspon kreće između  $0.48 - 1.12 \times 10^6/\mu\text{L}$ . Vrijednosti hematokrita nalaze se unutar raspona 27% – 38%, dok vrijednosti hemoglobina variraju između  $7.94 - 10.77 \text{ g/dL}$ . Srednja vrijednost ukupnog broja leukocita iznosi  $18.70 \times 10^3/\mu\text{L}$  te se vrijednosti kreću u rasponu  $15.52 - 25.28 \times 10^3/\mu\text{L}$ . U diferencijalnoj krvnoj slici najviše su bili zastupljeni limfociti u rasponu od 43% do 68%. Raspon apsolutnih vrijednosti broja limfocita kreće se između  $8.32 - 12.86 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Nakon limfocita, po zastupljenosti slijede heterofili (12%-30%) i bazofili (4%-18%). Apsolutne vrijednosti broja heterofila nalaze se u rasponu  $2.05 - 7.58 \times 10^3/\mu\text{L}$ , dok se raspon vrijednosti bazofila kreće između  $0.76 - 3.03 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Najniža zabilježena zastupljenost je postotak eozinofila (0% - 3%), dok je vrijednost monocita nešto veća (1% - 15%). Raspon apsolutnih vrijednosti broja eozinofila je  $0 - 0.51 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Apsolutne vrijednosti monocita kreću se između  $0.17 - 3.79 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Tablica 2. prikazuje odstupanja u hematološkim parametrima bolesnih ženki. Kod ženke 1 zabilježena je niska vrijednost hematokrita (20%) te niska vrijednost broja eritrocita ( $0.49 \times 10^6/\mu\text{L}$ ). Ženka 2 ima povećan ukupan broj leukocita ( $24.96 \times 10^3/\mu\text{L}$ ), od kojih prevladavaju limfociti (74%). U tablici 3. srednje vrijednosti ovih parametara uspoređene su s literaturnim podacima za srodnu vrstu zelena iguana (*Iguana iguana*) (HARR i sur., 2001).

## 5. RASPRAVA

U dosadašnjim istraživanjima *Utila iguane* nije rađena hematološka analiza, pa stoga u literaturi nema podataka o hematološkim parametrima za ovu vrstu. Prema našem saznanju, ovaj rad je prvi koji donosi vrijednosti kompletne krvne slike *Utila iguana*.

Vrijednosti parametara crvene krvne slike, poput broja eritrocita, hemoglobina i hematokrita najvažniji su dijagnostički pokazatelji anemije. Prema literaturnim podacima zelenih iguana zabilježene su razlike u hematokritu između ženki i mužjaka jer prosječan HCT mužjaka iznosi 34%, dok je kod ženki 38% (HARR i sur., 2001). U ovom istraživanju utvrđeni hematokrit mužjaka *Utila iguane* kretao se između 27% i 38% (Tablica 1.) što nije značajno odstupalo od literaturnih podataka za zelenu iguanu (Tablica 3). U jedne ženke izmjeren je znatno niži hematokrit u odnosu na ostale životinje, svega 20%, što je ukazivalo na anemiju, zbog čega ta životinja nije uključena u statističku obradu podataka. No, zbog otkrivenog stanja, provedena je daljnja obrada te je životinja stavljena na odgovarajuću terapiju.

Dok za hematokrit nije uočena značajna razlika između zelene i *Utila iguane*, kod ukupnog broja eritrocita i hemoglobina primjećene su statistički značajne razlike između navedenih vrsta. Kod *Utila iguane* zabilježene su niže vrijednosti broja eritrocita ( $0.48 - 1.12 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ) nego u zelene iguane ( $1.0$  i  $1.7 \times 10^6 / \mu\text{L}$ ). Na broj eritrocita gmazova mogu utjecati brojni vanjski i unutarnji čimbenici, a u većine gmazova taj parametar je fiziološki povišen u proljeće nakon hibernacije (MACHADO i sur., 2006). Životinje u ovom istraživanju nisu hibernirale u vrijeme vađenja krvi, međutim ne možemo isključiti utjecaj ostalih čimbenika na broj eritrocita. U radu o zelenim iguanama prema kojem smo uspoređivali podatke napomenuto je da su dobivene vrijednosti broja eritrocita veće od već poznatih rezultata dosadašnjih istraživanja (HARR i sur., 2001). Stoga smatramo da je vrlo vjerojatno da su vrijednosti broja eritrocita kod *Utila iguana* fiziološki niže od zelene iguane.

Koncentracija hemoglobina *Utila iguane* kretala se u ovom istraživanju od 7.94 do 10.77 g/dL dok su referentne vrijednosti zelene iguane za navedeni parametar nešto niže, između 6.7 i 10.2 g/dL. Koncentracija hemoglobina se općenito kod gmazova kreće od 5.5 g/dL do 12 g/dL (CAMPBELL i ELLIS, 2007). U guštera je zamijećen najveći afinitet vezanja kisika i zasićenost eritrocita hemoglobinom (JACOBSON, 2007). Usporedbom koncentracija hemoglobina *Utila iguane* i zelene iguane, ustanovljeno je da *Utila iguana* ima značajno više koncentracije hemoglobina od zelene iguane, na što ukazuje veći MCHC.

Usporedbom vrijednosti eritrocitnih konstanti očekivano je zabilježena statistički značajna razlika. Volumen eritrocita (MCV) *Utila iguane* kretao se između 303.57 – 729.17 fL i bio je

značajno veći od volumena eritrocita zelene iguane 228 i 303 fL. Prema literaturnim podacima MCV se kod gmazova kreće od 200 do 1200 fL (MITCHELL, 2009).

Prosječna koncentracija hemoglobina u eritrocitima (MCHC) Utila iguane također je bila znatno veća (29.03 g/dL) od iste u zelene iguane (25.10 g/dL). Prosječna vrijednost koncentracije hemoglobina (MCHC) u gmazova se kreće od 22 do 41 g/dL (NEVAREZ, 2009). Zbog dobivenih odstupanja u vrijednostima eritrocitnih konstanti uočena je različitost Utila iguane u odnosu na zelenu iguanu. Veći MCHC Utila iguane ukazuje na veću koncentraciju hemoglobina u eritrocitima. Za parametar MCH nije bilo moguće provesti usporedbu zbog nedostatka podataka o navedenom parametru zelene iguane.

Iz navedenih parametara crvene krvne slike uočeno je da Utila iguana ima fiziološki niži broj eritrocita, ali su ti eritrociti veći i zasićeniji hemoglobinom nego u zelene iguane. Možemo postaviti sumnju da su razlike u vrijednostima crvene krvne slike uvjetovane djelovanjem vanjskih čimbenika, prvenstveno staništa. Utila iguane u usporedbi sa staništem zelene iguane, žive na niskim nadmorskim visinama, uz korijenje drveća i slanu vodu. Kako bi potvrdili navedenu sumnju potrebno je dodatno istražiti utjecaj vanjskih čimbenika na hemogram.

Bijela krvna slika jedan je od najznačajnijih pokazatelja funkcije imunološkog sustava i otkrivanja upalnih procesa u organizmu. Kod gmazova je odgovor na upalni proces uvjetovan povećanim brojem heterofila i limfocita. Heterofilija i skretanje u lijevo su najčešće obilježje akutnih i kroničnih upala, dok vrlo jake akutne infekcije mogu rezultirati heteropenijom sa pomakom u lijevo i toksičnim promjenama (STACY i sur., 2011). U ovom istraživanju zamijećen je upalni proces kod ženke koja je za vrijeme uzorkovanja imala ugriznu ranu u području vrata. Izradom diferencijalne krvne slike nađene su plazma stanice i povećan broj limfocita što je ukazivalo na kroničan upalni proces (Tablica 2). Životinja je stavljena na odgovarajuću antibiotsku terapiju i nakon tri tjedna ponovljeno je vađenje krvi pri čemu je ustanovljen normalan broj ukupnih leukocita sa blagom heterofilijom i brojem limfocita unutar fizioloških granica.

Usporedbom rezultata ovog istraživanja s literaturnim podacima bijele krvne slike zelene iguane nisu ustanovljene statistički značajne razlike, osim u broju bazofila. Apsolutni broj bazofila Utila iguane ( $0.76 - 3.03 \times 10^3/\mu\text{L}$ ) značajno je veći u odnosu na apsolutni broj bazofila zelene iguane koji se kreće u rasponu  $0.1 - 1.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ . Veći postotak bazofila zabilježen je kod šest mužjaka Utila iguane, dok su vrijednosti dva mužjaka približno jednake vrijednostima zelene iguane. Prilikom statističke obrade podataka, nije bilo moguće provesti usporedbu relativnih vrijednosti bazofila, zbog nedostatka podataka za pojedinačnu jedinku zelene iguane. Bazofilija može upućivati na prisutnost hemoparazita i virusnu infekciju. Kako u životinja uključenih u ovo istraživanje nisu nađeni hemoparaziti, niti je potvrđena virusna infekcija smatramo da je povišeni

broj bazofila također vrsno svojstvo *Uta stansburiana*. Budući da funkcija bazofila u gmazova nije do kraja razjašnjena mogući razlozi povišenog broja ovih leukocita u gmazova općenito trebaju tek biti istraženi (STACY i sur., 2011).

Hematološki parametri ove vrste guštera nisu bili predmet niti jednog dosadašnjeg istraživanja, stoga smatramo da dobiveni rezultati doprinose poznavanju fizioloških osobitosti krvne slike *Uta stansburiana* što opet doprinosi boljem razumijevanju, a time i kvalitetnijoj zaštiti ove ugrožene vrste životinja. Nedostaje istražiti biokemijske i mikrobiološke parametre s ciljem detaljnijeg uvida u fiziologiju i zdravstveno stanje.

## 6. ZAKLJUČCI

Sukladno dobivenim rezultatima možemo zaključiti sljedeće:

- Utvrđeni su hematološki parametri kod 10 jedinki *Utila iguane* pri čemu nisu zabilježene izraženije varijacije među parametrima kod klinički zdravih jedinki, dok su dvije klinički promijenjene jedinke imale odstupanja u navedenim parametrima.
- Kod dvije jedinke promijenjeni hematološki parametri su ukazivali na anemiju, odnosno upalni proces.
- Usporedbom dobivenih rezultata crvene krvne slike klinički zdravih *Utila iguana* sa literaturnim podacima za zelenu iguanu utvrđeno je da je *Utila iguana* imala značajno niži broj eritrocita i značajno višu koncentraciju hemoglobina, te više eritrocitne konstante, MCV i MCHC.
- Usporedbom parametara bijele krvne slike klinički zdravih *Utila iguana* sa referentnim vrijednostima zelene iguane ustanovljen je značajno veći apsolutni broj bazofila kod *Utila iguane* u odnosu na zelenu iguanu. Za bolje razumijevanje i pravilno tumačenje ovakvog nalaza potrebna su daljnja istraživanja funkcije bazofila i promjena njihovog broja u različitim patološkim stanjima.
- Podaci dobiveni ovim istraživanjem utvrđuju hematološke parametre klinički zdravih *Utila iguana*, što doprinosi boljem poznavanju osobitosti krvne slike ovih životinja, a time omogućuje brže i učinkovitije otkrivanje patoloških stanja.
- Potrebno je provesti određivanje biokemijskih parametara krvi u svrhu detaljnijeg i sveobuhvatnijeg utvrđivanja fizioloških i patofizioloških osobitosti ove vrste gmazova.

## **7. ZAHVALE**

Zahvaljujemo izv. prof. dr. sc. Maji Belić i doc. dr. sc. Maji Lukač na uloženom trudu, vremenu, pomoći te stručnom vodstvu tijekom izrade ovog znanstvenog rada. Također, zahvaljujemo osoblju Zoološkog vrta u Zagrebu na omogućenom pristupu životinjama te izdvojenom vremenu. Posebne zahvale studentu Siniši Faraguni na izrazitom strpljenju, razumijevanju i suradljivosti prilikom rada u laboratoriju na Zavodu za patofiziologiju na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujemo se svojim obiteljima i prijateljima na razumijevanju.



## 8. LITERATURA

1. ARIKAN, H., ÇIÇEK, K. (2013): Haematology of amphibians and reptiles: a review. NorthWest J. Zool 10, 190-209.
2. BELIĆ, M., TURK; R., LUKAČ; M., VERŠEC; I., ROBIĆ; M. (2017): Hematologija gmazova.
3. CAMPBELL, T. W., GRANT, K. R. (2010): Clinical Cases in Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology. Ames, IA: Wiley Blackwell, 67-87.
4. CAMPBELL, T., C. ELLIS (2007): Avian and exotic animal hematology and cytology 3rd edition. Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa.
5. CAMPBELL, W. TERRY (2015): Exotic animal hematology and cytology.
6. CLARK, P., HOHNSTONE, A. C., ELLISON, R, GOOLD, M. (2001): Inclusions in the erythrocytes of eastern water dragons (*Physignathus lesueurii*). Aust Vet J 79(1):61–62.
7. CONANT, R., COLLINS, T.J. (1998): A field guide to reptiles and amphibians: eastern and central North America. Houghton Mifflin Harcourt.
8. CRAWSHAW, G. J. (1996): Comparison of plasma biochemical values in blood and blood-lymph mixtures from red-eared sliders, *Trachemys scripta elegans*. Bull ARAV 6:7–9.
9. GUTSCHE, A. (2003): *Ctenosaura bakeri*. Utila Island Swampers. Iguana; 10(2): 28-30.
10. HAAR, E. K., ALLEMAN, R., DENNIS, M, MAXWELL, K. L., LOCK, A. B., BENNETT AVERY, R., JACOBSON, R. E. (2001): Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference ranges in green iguanas.
11. HARVEY, J. W. (2001): Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. W. B. Saunders Company. Philadelphia. p. 18.
12. JACOBSON, E. R. (2007): Infectious Diseases and Pathology of Reptiles: Color Atlas and Text. Cabo Raton, Florida.
13. LAZOVIĆ, T. (2020): Važnost zaštite i značaj bioma mangrova. Završni rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet.
14. LÓPEZ-OLVERA, J. R., J. MONTANÉ, I. MARCO, A. MARTÍNEZ-SILVESTRE, J. SOLER, S. LAVÍN (2003): Effect of venipuncture site on hematologic and serum biochemical parameters in marginated tortoise (*Testudo marginata*). J. Wildl Dis. 39, 830–836.

15. MACHADO, C.C., L. F. N. SILVA, P. R. R. RAMOS and R. K. TAKAHIRA (2006): Seasonal influence on hematologic values and hemoglobin electrophoresis in Brazilian Boa constrictor amarali. *J. Zoo. Wildl. Med.* 37, 487 – 491.
16. MARYON, D., BROWN, T., LEE, C. D. (2020): *Ctenosaura bakeri* (Uta Spiny-tailed Iguana): DIET, Project: Conservation of the Critically Endangered Uta Spiny tailed Iguana (*Ctenosaura bakeri*) on Uta, Honduras.
17. MITCHELL, M. A. (2009): Snakes, in Mitchell MA, Tully TN (eds): *Manual of Exotic Pet Practice*. St Louis, MO, Saunders/Elsevier, pp 136-163.
18. NEVAREZ, J. (2009): Crocodylians, in Mitchell MA, Tully TN (eds): *Manual of Exotic Pet Practice*. St. Louis, MO, Saunders/Elsevier, pp 112-135.
19. RASKIN, R. E. (2000): Reptilian complete blood count. In: Fudge A (ed), *Laboratory Medicine: Avian and Exotics*. Philadelphia, PA: WB Saunders.
20. ROVIRA AMANOD, R. I. (2010): Hematology of reptiles, in: Weiss DJ, Wardrop KJ (eds.): *Schalm's veterinary hematology*. Iowa, Wiley- Blackwell, pp 1004-1011.
21. SAINT GIRONS, M. C. (1970): Morphology of the circulating blood cell. In: Gans C, Parsons T (eds), Vol. 3, *Biology of the Reptilia*. New York: Academic Press
22. STACY, N., ALLEMAN, A. R., SAYLER K. (2011): *Diagnostic hematology of reptiles*.
23. SYPEK, J., BORYSENKO M. (1988): Reptiles. U: *Vertebrate blood cells* (Rowley, A. F., Ratcliffe, N. A., Ur.). Cambridge University Press, Cambridge. 211–56.
24. WILKINSON, R. (2004): Clinical pathology. In: McArthur S, Wilkinson R, Meyer J (eds), *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.

## 9. SAŽETAK

### Meri Blažević i Iva Ciprić: Osobitosti kompletne krvne slike *Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*)

*Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*) strogo je zaštićena i rijetka vrsta kojoj je na svijetu preostalo svega jedno prirodno stanište – otok Utila pokraj karipske obale Hondurasa. Obzirom na to da kao vrsta obitavaju u mangrovima, cijela populacija se nalazi pod prijetnjom od istrebljenja zbog gubitka staništa, ilegalnog lova te grabežljivosti invazivnih vrsta. Do sada nisu rađena istraživanja dijagnostičkih parametara ove vrste gmazova. Cilj ovog istraživanja bio je izraditi kompletnu krvnu sliku *Utila iguana*, ustanoviti eventualna patološka stanja u hemogramu i usporediti dobivene rezultate hematološke pretrage sa literaturnim podacima srodne vrste, zelene iguane. Istraživanje je provedeno na ukupno 10 odraslih životinja, od čega 2 ženke i 8 mužjaka. Sve istraživane životinje se cijeli svoj život nalaze u zoološkom vrtu grada Zagreba, gdje je i provedeno uzorkovanje krvi. Odmah po uzorkovanju, krv je dostavljena u laboratorij na ručnu obradu. Određeni su hematološki parametri crvene i bijele krvne slike. U jedne ženke je ustanovljena anemija, dok se kod druge ženke zbog opsežnih ozljeda na vratu razvio upalni proces što je rezultiralo upalnim leukogramom. Usporedbom dobivenih rezultata s literaturnim podacima srodne vrste zelena iguana (*Iguana iguana*) uočena je podudarnost vrijednosti hematokrita, ukupnog broja leukocita, te apsolutnog i relativnog broja svih vrsta leukocita, osim bazofila. Također je ustanovljeno da su srednje vrijednosti koncentracije hemoglobina, te eritrocitnih konstanti (MCV i MCHC) *Utila iguane* bile značajno više dok je broj eritrocita bio značajno niži nego u zelene iguane. Navedene razlike u fiziološkim vrijednostima mogu biti posljedica vanjskih čimbenika, odnosno razlike u staništu između dvije vrste iguane. U daljnjim istraživanjima, a u svrhu boljeg određivanja fiziološkog statusa životinja, potrebno je odrediti biokemijske parametre krvi i provesti ostale neinvazivne dijagnostičke metode kao što su mikrobiološka pretraga kože, sluznica i tjelesnih izlučevina, te parazitološka pretraga.

Ključne riječi: *Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*), strogo zaštićena vrsta, hematološki parametri

## 10. SUMMARY

### **Meri Blažević i Iva Ciprić: The peculiarities of the full blood count of the *Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*)**

*Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*) is a highly protected and rare animal species which has only one natural habitat left in the whole world – the Island of Utila near the Caribbean coast of Honduras. Regarding the fact that, as a species, these animals reside in mangroves, the whole population is under the threat of losing their habitat and becoming extinct, as well as in danger of poachers and invasive predators. As a result of that, there are no existing researches on the diagnostic parameters of this species so far. The aim of this research was to make the complete blood count of the *Utila* iguanas, to establish the possible pathological conditions in the hemogram and to compare the results of the hematological parameters with the existing literary data on the related species, the green iguana. The research was carried out on the total of 10 adult animals, out of which there were 2 female and 8 male animals. All the animals included in the research have been living all their life in the Zagreb City Zoo, where the blood sampling was carried out as well. Immediately after the sampling, the blood was delivered to the lab for further processing. The hematological parameters of the red and white blood count values were established. One female was diagnosed with anemia, whereas another female developed an inflammatory process due to multiple, massive injuries on the neck, which resulted in inflammatory leukogram. By comparing the obtained results with the literary data on the related species – the green iguana (*Iguana iguana*), a compliance of certain parameters has been established, i.e. hematocrit, the overall number of leukocytes, as well as the absolute and relative number of leukocytes, except basophils. Furthermore, it has been established that the average values of the hemoglobin values, as well as the erythrocyte constants (MCV and MCHC) of the *Utila* iguana were significantly higher, whereas the number of erythrocytes was significantly lower than by green iguanas. These differences in physiological values may be due to external factors, i.e. differences in habitat between the two species of iguana. For the purpose of the establishing the physiological status of the animals more precisely, further researches should aim at establishing the biochemical blood parameters, as well as conducting some other non – invasive diagnostical methods, such as microbiological tests of skin, mucosa and bodily fluids, and finally parasitological tests.

Key words: *Utila iguana* (*Ctenosaura bakeri*), highly endangered species, hematological parameters