

Ово дело је заштићено лиценцом Креативне заједнице Ауторство – некомерцијално – без прерада¹.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.



¹ Опис лиценци Креативне заједнице доступан је на адреси creativecommons.org.rs/?page_id=74.

"Сва права задржава издавач. Забрањена је свака употреба или трансформација електронског документа осим оних који су експлицитно дозвољени Creative Commons лиценцом која је наведена на почетку публикације."

"Sva prava zadržava izdavač. Zabranjena je svaka upotreba ili transformacija elektronskog dokumenta osim onih koji su eksplicitno dozvoljeni Creative Commons licencom koja je navedena na početku publikacije."

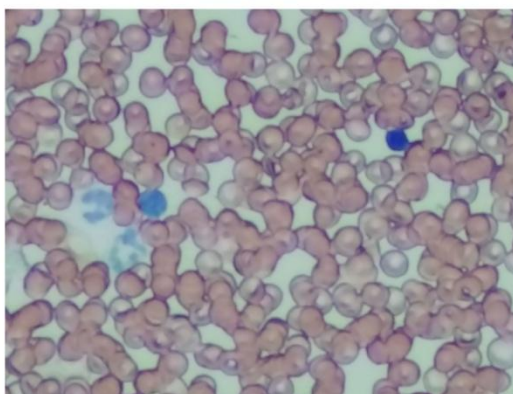
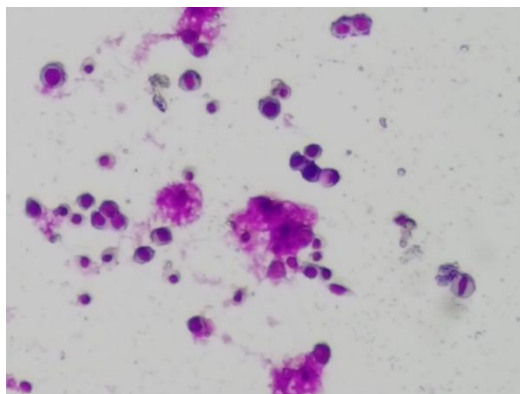


УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ
ПРИРОДНО-МАТЕМАТИЧКИ ФАКУЛТЕТ
ДЕПАРТМАН ЗА БИОЛОГИЈУ И ЕКОЛОГИЈУ



Татјана Челић Исидора Кешелъ Дијана Травичић

ПРАКТИКУМ ИЗ ФИЗИОЛОГИЈЕ ЖИВОТИЊА 2



Нови Сад, 2024

Назив уџбеника:

ПРАКТИКУМ ИЗ ФИЗИОЛОГИЈЕ ЖИВОТИЊА 2

Аутори:

Др Татјана Челић, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Др Исидора Кешељ, доцент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Дијана Травичић, асистент
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Рецензенти:

Др Татјана Костић, редовни професор
Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

Др Предраг Вујовић, редовни професор
Биолошки факултет
Универзитет у Београду

Лектор:

Анадол Гегич

Издавач:

Природно-математички факултет
Универзитет у Новом Саду

За издавача:

Др Милица Павков Хрвојевић, редовни професор,
декан Природно-математичког факултета у Новом
Саду

ISBN

978-86-7031-671-3

Практикум (електронско издање) је одобрен за употребу одлуком Наставно-научног већа Природно-математичког факултета у Новом Саду на 34. седници одржаној 20. 6. 2024. године (решење број 0602-07-252/24-6 од 20. 6. 2024. године).

CIP - Каталогизација у публикацији
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

591.1(075.8)(076)

ЧЕЛИЋ, Татјана, 1987-

Практикум из Физиологије животиња 2 [Електронски извор] / Татјана Челић, Исидора Кешељ, Дијана Травичић. - Нови Сад : Природно-математички факултет, Департман за биологију и екологију, 2024. - 87 стр. : илустр.

Начин приступа (URL): https://www.pmf.uns.ac.rs/studije/epublikacije/biologija/celic_keselj_travicic_praktikum_iz_fiziologije_zivotinja_2.pdf. - Опис заснован на стању на дан 18.9.2024. - Насл. с насловног екрана. - Библиографија.

ISBN 978-86-7031-671-3

1. Кешељ, Исидора, 1990- 2. Травичић, Дијана, 1994-
а) Физиологија животиња -- Практикуми

COBISS.SR-ID 152401929

Предговор

Практикум из Физиологије животиња 2 написан је према програму за истоимени предмет, као и предмет Упоредна физиологија животиња, за студенте биологије Природно-математичког факултета Универзитета у Новом Саду.

Практикум је дизајниран тако да студентима пружи прилику да истраже теоријске концепте које су обрадили на предавањима кроз практичне експерименте, анализе података и дискусије. Кроз рад у лабораторији студенти ће имати прилику да развију не само теоријско разумевање, већ и практичне вештине које су неопходне за будуће истраживачке и професионалне изазове у области физиологије животиња.

Овај практикум је покушај да се материјал доступан студентима у форми кратких протокола допуни и формира у практикум.

Велику захвалност дугујемо свим наставницима чији је рад, као фундаменталан и стога незаменљив, допринео да настане и овај практикум: проф. др Десанки Марић, проф. др Ирени Симоновић, проф. др Татјани Костић, проф. др Силвани Андрић и проф. др Соњи Каишаревић. Такође, велику захвалност за сву помоћ као и здраве експерименталне животиње одгајане на Департману за биологију и екологију, дугујемо Весни Бајагић.

Драги студенти, желимо вам успешан и продуктиван рад, у нади да ће вам ово искуство бити инспирација за будуће научне подухвате.

Аутори

Садржај

1. Телесне течности и систем за циркулацију	7
1.1 Хемолимфа	8
1.2. ВЕЖБЕ	9
Узимање узорка хемолимфе виноградарског пужа (<i>Helix pomatia</i> L.)	9
Узимање узорка хемолимфе ларве кукурузног пламенца (<i>Ostrinia nubilalis</i> Hbn.)	10
Доказивање одсуства појаве коагулације хемолимфе	11
Посматрање процеса меланизације у хемолимфи ларве кукурузног пламенца	11
Посматрање хемоцита на нативном препарату	12
Посматрање хемоцита на обојеном размазу хемолимфе ларви кукурузног пламенца	12
Квалитативно доказивање протеина у хемолимфи виноградарског пужа	13
Квалитативно доказивање угљених хидрата у хемолимфи виноградарског пужа	14
Одређивање концентрације хлорида у хемолимфи виноградарског пужа	14
1.3. Крв	17
1.3.1. Уобличени елементи крви	17
1.3.2. Хемостаза	21
1.4. ВЕЖБЕ	23
Узимање узорка крви рибе и пацова	23
Одређивање хематокритске вредности крви рибе и пацова	24
Диференцијална крвна слика и леукоцитарна формула рибе и пацова	24
Одређивање броја уобличених елемената у периферној крви рибе и пацова	26
Хемостаза и коагулација крви	28
Одређивање концентрације глукозе у хемолимфи и серуму ензимском методом (GOD-POD)	29
2. Респираторни систем и транспорт гасова	33
2.1. Респираторни органи	33
2.2. Транспорт гасова- респираторни пигменти	34
2.3. ВЕЖБЕ	35
Упоредни преглед варирања концентрације хемоглобина у телесним течностима (крв рибе и пацова)	35
Посматрање кристала глобинске компоненте хемоглобина	37
Посматрање Teihmann-ових кристала	37

Доказивање присуства гвожђа у крви	38
3. Физиологија гастроинтестиналног тракта	40
3.1. Функционални региони дигестивног тракта	40
3.1.1. Дигестивни систем пужа	40
3.1.2. Дигестивни систем птице	41
3.1.3. Дигестивни систем сисара	42
3.2. ВЕЖБЕ	43
Варење код виноградарског пужа (<i>Helix pomatia L.</i>)	43
Узорковање цревног садржаја виноградарског пужа	43
Доказивање присуства ензима у цревном садржају пужа	44
Доказивање присуства протеиназе у цревном садржају пужа	45
Доказивање присуства/одсуства амилазе и сахаразе у цревном садржају пужа	45
Доказивање присуства липазе у цревном садржају пужа	45
Варење код кокошке (<i>Gallus gallus domesticus L.</i>)	46
Одређивање рН вредности садржаја желуца и дуоденума	46
Припрема екстракта панкреаса и дуоденума	47
Доказивање присуства ензима панкреаса	47
Доказивање присуства протеиназе у екстракту панкреаса кокошке	48
Доказивање присуства/одсуства амилазе и сахаразе у екстракту панкреаса кокошке	48
Доказивање присуства липазе у екстракту панкреаса кокошке	48
Доказивање присуства/одсуства амилазе у садржају желуца и дуоденума	48
Варење код пацова (<i>Rattus norvegicus L.</i>)	49
Одређивање рН вредности садржаја желуца и дуоденума	50
Припрема екстракта панкреаса, дуоденума и јетре	50
Доказивање присуства ензима панкреаса	51
4. Физиологија екскреторног система	53
4.1. Бубрег кичмењака	53
4.1.1. Ендокрина регулација промета воде и електролита код сисара	55
4.2. Екскреција азотних материја	56
4.3. ВЕЖБЕ	56
Одређивање концентрације урее у серуму методом по Berthelot-у	56

Одређивање концентрације креатинина у серуму методом по Jaffe-у	58
5. Репродуктивни систем сисара	61
5.1. Мушки репродуктивни систем	62
5.1.1. Сперматогенеза и грађа сперматозоида	63
5.2. ВЕЖБЕ	65
Релативна маса одабраних репродуктивних органа мужјака пацова.....	65
Изолација и одређивање броја сперматозоида каудалног дела епидидимиса пацова	66
5.3. Женски репродуктивни систем	68
5.3.1. Еструсни циклус.....	70
5.4. ВЕЖБА.....	71
Праћење еструсног циклуса женке пацова	71
6. Терморегулација	74
6.1 Температурна класификација животиња	74
6.1.1 Ектотерми.....	74
6.2. ВЕЖБЕ	76
Испитивање улоге глицерола у снижавању тачке мржњења телесних течности	76
Квалитативно одређивање присуства глицерола у хемолимфи виноградарског пужа и гусенице кукурузног пламенца	76
Одређивање концентрације глицерола у хемолимфи	77
7. Експериментални модели	80
Европски кукурузни пламенац (<i>Ostrinia nubilalis</i> , Hübner)	80
Виноградарски пуж (<i>Helix pomatia</i> , Linnaeus)	81
Бабушка (<i>Carassius gibelio</i> , Bloch).....	82
Лабораторијски пацов (<i>Rattus norvegicus domestica</i> , Berkenhout), Вистар сој.....	83
Прилози.....	84
Библиографија	86

1. Телесне течности и систем за циркулацију

Систем за циркулацију телесних течности представља један од хомеостатских ефекторских система који обезбеђује стабилност унутрашње средине организма. Овим системом се кроз организм транспортује телесна течност, а путем ње и гасови, хранљиве материје, специфичне хемијске материје које се синтетишу у једним ћелијама и доспевају до других. Поред тога, излучивањем у телесне течности, ћелије се ослобађају продуката метаболизма.

Према сложености телесних течности које циркулишу у организму различитих животиња и на основу еволуције система за циркулацију, разликују се четири типа телесних течности: хидролимфа, хемолимфа, крв и лимфа.

Хидролимфа је најпростија телесна течност која циркулише у каналном или гастроваскуларном систему. Овај тип телесне течности и система за циркулацију присутан је код сунђера (Porifera), дупљара (Coelenterata) и трепљастих црва (Turbellaria). Хидролимфа не поседује сопствене органске и неорганске материје, и њен хемијски састав зависи од спољашње средине у којој животиња живи. Приликом проласка хидролимфе кроз канални или гастроваскуларни систем, долази до дифузије кисеоника и хранљивих материја у ћелије, као и до ослобађања угљен-диоксида и продуката метаболизма у хидролимфу, путем које се уклањају из организма.

Код животиња на вишем еволутивном степену развоја дошло је до усложњавања телесних течности, као и диференцијације система судова за њихов транспорт. На основу сложености и особина разликују се следећи типови сложених телесних течности: хемолимфа, крв и лимфа.

Хемолимфа је сложена телесна течност која поседује сопствене неорганске и органске материје, респираторне пигменте и ћелијске елементе (хемоците). Хемолимфа се креће у отвореном систему за циркулацију, у којем телесна течност долази у директан контакт са ћелијама, јер се делом креће кроз васкуларне судове, након чега се излива у међућелијске просторе, лакуне и синусе. Течност кроз судове покреће кинетичка енергија коју генерише пулсаторни орган (срце или васкуларни судови) или се кретање одржава активношћу телесне мускулатуре. У отвореном систему за циркулацију брзина протока телесне течности је мала, притисак је низак и променљив и у великој мери зависи од активности животиње. Због тога, отворени систем за циркулацију имају углавном мање активне животиње мале масе: мекушци (Mollusca), са изузетком главоножаца, зглавкари (Arthropoda), бодљокошци (Echinodermata) и плашташи (Tunicata).

Крв је најсложенија телесна течност животињских организама, коју карактерише стабилност у погледу органског и неорганског састава. Састоји се од течне компоненте (крвни серум/плазма) и ћелијских елемената (еритроцити, леукоцити, тромбоцити). Крв се креће у затвореном систему за циркулацију, који представља много ефикаснији систем за циркулацију телесне течности. У њему телесна течност циркулише у континуалном систему васкуларних судова, а размена материја између телесне течности и ткива одвија се на нивоу капилара. Протицање крви кроз овај систем омогућавају контракције пулсирајућих судова или, најчешће, срца које функционише као снажна пумпа. У затвореном систему за циркулацију, притисак је знатно виши и стабилнији у односу на

отворени систем и већа је брзина кретања телесне течности. Поред тога, развили су се механизми који омогућавају прерасподелу крви у телу усмеравајући је у правцу органа који су у том тренутку метаболички најактивнији. На овај начин омогућен је бржи и ефикаснији транспорт кисеоника и хранљивих материја до сваке ћелије, што задовољава потребе активнијих животиња. Затворени систем за циркулацију присутан је код виших црва (Annelida), главоножаца (Cephalopoda) и свих кичмењака (Vertebrata).

Приликом филтрације крви на нивоу капилара, течна компонента крви формира интерстицијалну течност која долази у директан контакт са ћелијама. Један део интерстицијалне течности се враћа у капиларе, док се остатак сакупља у лимфне капиларе и формира **лимфу**, која се даље транспортује у систем лимфних судова, улива се у венски систем и на тај начин се поново враћа у крв. Ћелије из лимфе усвајају кисеоник и хранљиве материје, а угљен-диоксид и продукти метаболизма се из ћелија враћају у лимфу, а затим у крв. Пошто настаје из интерстицијалне течности, са којом крв и околне ћелије непрестано размењују супстанце, лимфа нема стабилан састав, али у основи је слична крвној плазми. Садржај протеина у лимфи је мањи него у плазми, али зависи од ткива у којем лимфа настаје. Поред тога, садржи и факторе коагулације и лимфоците.

1.1 Хемолимфа

Хемолимфа је сложена телесна течност која циркулише у отвореном систему за циркулацију. Хемолимфа садржи сопствене неорганске и органске материје, респираторне пигменте и ћелијске елементе (хемоците).

Поред **воде**, која чини око 95% хемолимфе, од **неорганских састојака** присутни су хлориди (0,6-0,7%), најчешће у облику натријум-хлорида, као и бикарбонати и фосфати. **Органске материје** присутне у хемолимфи су протеини, угљени хидрати и липиди. **Протеини** хемолимфе имају различите функције у организму као што су: резервни протеини, транспортни протеини (липофорини), ензими и њихови инхибитори (нарочито инхибитори протеаза), оваријални протеини, респираторни пигменти и други. Карактеристика хемолимфе је и присуство велике концентрације слободних аминокиселина, које поседују различите функције, нпр. градивна улога, регулација осмоларности, извор енергије и формирање кутикуле. **Глукоза** представља основну енергетску материју за ћелије. Концентрација глукозе у хемолимфи у великој мери зависи од физиолошке активности животиње: максимална је концентрација када се животиња налази у фази активног физиолошког стања, а минимална у фази физиолошке пасивности (летаргије). У хемолимфи инсеката је у великој концентрацији присутан и дисахарид **трехалоза**, који представља енергетски извор за многа ткива. Тrehалоза такође функционише као криопротектант, смањујући тачку мржњења хемолимфе, стабилизујући ћелијске мембране и штитећи их од пуцања. **Липиди** нису заступљени једнако код свих представника. Липиди се у хемолимфи углавном налазе везани за носаче тј. транспортере, нпр. липофорине у хемолимфи инсеката. У хемолимфи се могу налазити и различите органске киселине, полиоли и продукти катаболизма протеина и нуклеинских киселина.

Хемоцити представљају уобличене елементе хемолимфе. Њихова концентрација је различита код различитих врста, али постоје и варирања у броју хемоцита унутар исте врсте, као и код једне јединке у односу на годишња доба. У време када су животиње активне, концентрација хемоцита је повећана (пролеће, лето, рана јесен), а током зиме, када се животиња налази у фази летаргије, концентрација хемоцита је смањена. Имају различите функције, укључујући фагоцитозу страних честица, енкапсулацију вишећелијских паразита, затварање рана након повреде како би се спречило истицање хемолимфе, као и важну улогу у метаболизму. Генерално је прихваћено да постоје три функционална типа хемоцита: основна ћелија, фагоцитне ћелије и нефагоцитне ћелије.

Основне ћелије (прохемоцити) су матичне ћелије од којих настају остали типови хемоцита. **Фагоцитне ћелије** штите организам тако што врше фагоцитозу и уклањање разних страних тела (микроорганизама, партикула некротичних ткива, итд). Ове ћелије у цитоплазми поседују већи или мањи број хетерогених гранула (лизозомалних, базофилних и мукополисахаридних) и вакуоле. У **нефагоцитне ћелије** се убрајају плазматоцити, еноцитоиди (кристалне ћелије), хемоцити у којима се налазе респираторни пигменти и др. Плазматоцити имају функцију у стварању плазматоцитног чепа и спречавању изливања хемолимфе при озледи животиње. Еноцитоиди (кристалне ћелије) садрже проензим профенолоксидазу, који има значајну улогу у имунском одговору.

Имунски одговор бескичмењака ограничен је на неспецифичне инфламаторне одговоре, у великој мери посредоване хемоцитима и њиховим продуктима. Главни имунски одговори код бескичмењака укључују: фагоцитозу, енкапсулацију, цитотоксичност и синтезу и ослобађање микробицидалних агенаса.

Енкапсулација подразумева обухватање већих страних тела, који не могу бити фагоцитирани, као што су паразити и нематодe, где је неопходно учешће већег броја хемоцита. Приликом енкапсулације долази до тамњења капсуле - меланизације. Меланинска капсула спречава раст и репродукцију патогена што доводи до његовог угинућа. Неколико међупродуката у синтези меланина је цитотоксично и доприноси елиминацији патогена.

1.2. ВЕЖБЕ

Узимање узорка хемолимфе виноградарског пужа (*Helix pomatia* L.)

Потребан материјал:

- | | |
|-------------------|---------------------|
| • ссHCl | • пинцета |
| • вата | • игла |
| • стаклени штапић | • стаклени левак |
| • сахатно стакло | • стаклене епрувете |

Поступак вежбе

Добијање веће количине хемолимфе постиже се пункцијом плућне вене, срца или плућа пужа. Да би се плућна вена учинила приступачном потребно је претходно урадити декалцификацију љуштуре пужа у одговарајућој зони концентрованом HCl.

Животиња се узме у леву руку тако да јој се врх љуштуре придржава кажипрстом, док се гротло љуштуре затвори палцем, да би се спречио излазак стопала животиње из љуштуре. Припремљени тампон вате намота се на стаклени штапић, умочи се у мању количину концентроване HCl (која се успе у мало сахатно стакло) и пажљиво превлачи преко љуштуре док се не формира провидни „прозор” (Слика 1.1.). Процес декалцификације прати формирање пене коју је потребно одстрањивати млазом воде из чесме, да би се могао контролисати ток растварања љуштуре. Када љуштура на месту третираном HCl-ом постане провидна као стакло („прозор”), „прозор” се разбије помоћу пинцете и направи се отвор на месту где плућна вена улази у преткомору срца.



Слика 1.1. Поступак сакупљања хемолимфе из виноградарског пужа

Палцем, кроз отвор гротла, животиња се потискује у љуштуру, а тиме кроз направљени отвор на љуштури истискује се и део површине плућа. Опрезним убодом игле или чиоде начини се отвор на вени и брзим покретом животиња се постави изнад левка, који се налази на епрувети. Хемолимфа ће почети да капље. Да бисмо добили већу количину хемолимфе потребно је и даље потискивати тело животиње кроз отвор гротла помоћу палца. На овај начин се из једне животиње може добити и до 2 ml хемолимфе.

Узимање узорка хемолимфе ларве кукурузног пламенца (*Ostrinia nubilalis* Hbn.)

Потребан материјал:

- пинцета
- маказице
- микротубе
- 0,05% раствор фенилтиоуреа

Поступак вежбе

Хемолимфа ларви (гусеница) сакупља се након одсецања задњег пара лажних ножица, благим истискивањем (Слика 1.2.). Хемолимфа се сакупља у микротубе са 0,05 ml 0,05 % фенилтиоурее, на хладном, како би се спречио процес меланизације. Из једне ларве може да се добије до 0,1 ml хемолимфе.



Слика 1.2. Поступак сакупљања хемолимфе из ларве кукурузног пламенца

Доказивање одсуства појаве коагулације хемолимфе**Потребан материјал:**

- микроскопске плочице
- игле

Поступак вежбе

На предметну плочицу сипати 2-3 капи хемолимфе и оставити на пола сата. Након истека тог времена, провлачењем игле или чиоде преко капи утврдити да ли је хемолимфа коагулисала. Забележити опажања.

Посматрање процеса меланизације у хемолимфи ларве кукурузног пламенца**Потребан материјал:**

- пинцета
- маказице
- микротубе
- 0,05% раствор фенилтиоурее

Поступак вежбе

Фенилтиоуреа је добро познати и широко коришћен инхибитор фенолоксидазе, кључног ензима у процесу меланизације који катализује оксидацију фенола. За посматрање процеса меланизације потребно је припремити две микротубе. У једну микротубу додати 0,05 % раствор фенилтиоуреа. Одсецањем лажне ножице и благим притиском сакупити део хемолимфе из ларве у микротубу без фенилтиоуреа, а део хемолимфе у микротубу са фенилтиоуреом. Посматрати промене боје хемолимфе. Забележити опажања.

Посматрање хемоцита на нативном препарату

Потребан материјал:

- хемолимфа
- микроскоп
- микроскопске плочице
- покровна стакла
- лабораторијска маст

Поступак вежбе

Неколико капи хемолимфе ставити на микроскопску плочицу и покрити покровним стаклом, чије су ивице намазане лабораторијском машћу. Тиме се добија једна врста коморе. Уочити облик, величину и амебоидно кретање хемоцита, посматрајући препарат у замраченом видном пољу. Оставити препарат под микроскопом на 30 - 60 минута, поново погледати препарат, уочити плазмодијуме. Забележити опажања.

Посматрање хемоцита на обојеном размазу хемолимфе ларви кукурузног пламенца

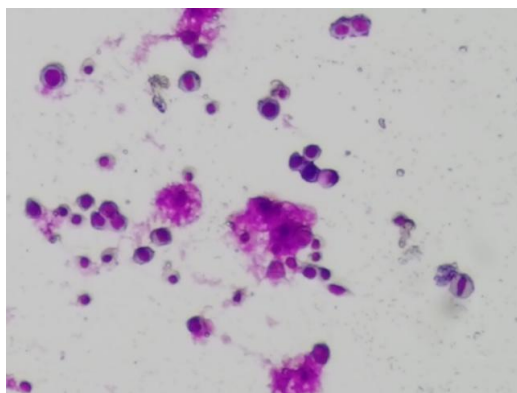
Потребан материјал:

- | | |
|--|--------------------|
| • хемолимфа | • дестилована вода |
| • микроскоп | • Пастерове пипете |
| • микроскопске плочице | • имерзионо уље |
| • Giemsa раствор | • стаклени штапић |
| • засићен раствор литијум карбоната (Li_2CO_3) | |

Поступак вежбе

На микроскопску плочицу нанети неколико капи хемолимфе, направити размаз и оставити 20 - 30 минута да се осуши. Хемокити се боје Giemsa раствором. Добро осушен размаз хемолимфе прелити Giemsa раствором (прави се са дестилованом водом у односу 1:9) и инкубирати 30 минута. По истеку инкубације, препарат је 30 секунди потребно испрати засићеним раствором

литијум-карбоната, након чега се препарат испира дестилованом водом. Пре посматрања под микроскопом, оставити препарат да се потпуно осуши.



Слика 1.3. Обојени размаз хемолимфе кукурузног пламенца

Посматрати препарат под микроскопом и уочити различите форме хемоцита (Слика 1.3.). На препарат стакленим штапићем нанети кап имерзионог уља и посматрати препарат под имерзијом. Забележити опажања.

Квалитативно доказивање протеина у хемолимфи виноградарског пужа

Потребан материјал:

- хемолимфа
- епрувете
- аутоматске пипете и наставци
- филтер папир
- дестилована вода
- Millon-ов реагенс
- пламеник

Поступак вежбе

У епрувету сипати 1 ml хемолимфе пужа и додати исту количину дестиловане воде, а потом загревати на пламенику. Услед високе температуре долази до таложења протеина и настајања белог талоба. Пипетом пребацити супернатант у чисту епрувету и сачувати за доказивање присуства угљених хидрата. У епрувету са белим талогом сипати 1-2 ml Милоновог реагенса и загревати. Појава мрко-наранџасте боје талоба представља позитивну Милонову реакцију и доказује присуство протеина у талогу, односно у хемолимфи.

Квалитативно доказивање угљених хидрата у хемолимфи виноградарског пужа

Потребан материјал:

- епрувете са филтратом из претходног задатка
- аутоматске пипете и наставци
- Fehling-ов реагенс (Fehling I и Fehling II)
- пламеник

Поступак вежбе

Присуство угљених хидрата у хемолимфи проверава се Fehling-овом реакцијом. У епрувету са супернатантом из претходног задатка додати Fehling I и Fehling II у размери 1:1 и загревати до појаве црвеног талога. Позитивна Фелингова реакција доказује присуство редукујућих шећера, као што је глукоза, у хемолимфи.

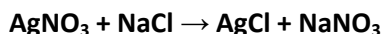
Одређивање концентрације хлорида у хемолимфи виноградарског пужа

Потребан материјал:

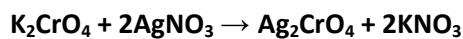
- | | |
|--------------------------------|------------------|
| • епрувете | • бирета |
| • аутоматске пипете и наставци | • 70% етанол |
| • филтер хартија | • 10% K_2CrO_4 |
| • ерленмајери | • N/50 $AgNO_3$ |

Поступак вежбе

Концентрација хлорида у хемолимфи одређује се Mohr-овом пробом. Како би се уклонили протеини из хемолимфе, потребно је помешати 0,5 ml хемолимфе пужа и 9,5 ml 70% етанола. Због денатурације протеина, долази до појаве белог талога, те је неопходно профилирати узорак кроз филтер хартију. Пренети 5 ml бистрог филтрата у ерленмајер тиквицу (филтрат садржи 0,25 ml хемолимфе). Концентрација хлоридних јона у хемолимфи одређује се титрањем сребро-нитрата и хроматних јона као индикаторима. У филтрат додати индикатор K_2CrO_4 (калијум-хромат), који је жуте боје и титрисати $AgNO_3$ све док жута боја индикатора не пређе у стабилну наранџасту. Забележити утрошак $AgNO_3$. Јони сребра реагују са хлоридима из узорка, при чему настаје растворљиви сребро-хлорид ($AgCl$), док се не потроши $NaCl$ из хемолимфе:



Да би се могао регистровати крај реакције уводи се K_2CrO_4 , као индикатор који са првом сувишном капи $AgNO_3$ даје нерастворљиви сребро-хромат (Ag_2CrO_4) који формира наранџаст талог:



Сваки утрошени милилитар N/50 AgNO_3 одговара 1,17 mg NaCl. Резултат изразити у mg % или mg/100 ml хемолимфе. Потребно је имати у виду запремину хемолимфе у филтрату, па је резултат потребно помножити одговарајућим фактором како би се добила количина хлорида у 100 ml хемолимфе.

Концентрација хлорида у хемолимфи се израчунава према следећој формули:

$$\text{Хлориди [mg \%]} = V * 1,17 * F$$

V - запремина утрошеног AgNO_3 [ml];

F- фактор за израчунавање количине хлорида у 100 ml (зависи од количине хемолимфе у којој је рађена титрација).

Простор за белешке

1.3. Крв

Крв, као најсложенију телесну течност животињских организама, карактерише стабилност у погледу органског и неорганског састава. Састоји се од течне компоненте (крвни серум/плазма) и ћелијских елемената. Компоненте које улазе у састав серума/плазме могу се поделити на неорганске и органске. **Неорганску компоненту** чини вода која је у плазми заступљена око 91% и налази у облику слободне воде која служи као растварач, и везане воде, која је везана за протеине, нарочито албумине. У крви се налази и око 0,6 - 0,9 % неорганских соли од којих доминирају хлориди, затим бикарбонати, фосфати и сулфати. Ове соли су дисосоване при физиолошкој рН крви од 7,3 до 7,5. Од катјона у серуму/плазми налазе се натријум, калијум, калцијум, магнезијум, као и мало гвожђа, брома, мангана, цинка и бакра. **Органску компоненту** серума/плазме чине протеини, липиди, глукоза, метаболички производи итд. Протеине плазме чине албумини, глобулини и фибриноген. **Албумини** имају молекулску масу од 69 kDa и лако се растварају у води. Албумини су одговорни за око 80 % укупног онкотског притиска. Имају важну улогу у транспорту различитих супстанци као што су хормони, аминокиселине, стероиди, витамини и масне киселине. **Глобулини** имају молекулску масу 176 kDa - 1300 kDa. Фракција глобулина се може поделити у субфракције: α_1 , α_2 , β_1 , β_2 , γ глобулини и фибриноген. α и β глобулини преносе хормоне и јоне метала, док γ глобулини (имуноглобулини) учествују у имуну одговору. Фибриноген се због свог великог физиолошког значаја издваја у посебну фракцију. Важна физиолошка улога фибриногена је учешће у процесу коагулације крви. Непротеинска азотна једињења плазме чине пептиди, аминокиселине, уреа, мокраћна киселина, креатинин и креатин, алантоин и амонијак у траговима. У групу безазотних састојака органске компоненте плазме улазе глукоза, липиди и метаболички производи. **Глукоза** представља један од основних извора енергије и из тог разлога мора стално бити доступна у адекватној количини у крви. Глукоза има и пластичну улогу јер улази у састав различитих ткива. Количина глукозе у крви зависи од животињске врсте, али не зависи само од одређеног систематског положаја него и од одређених биолошких карактеристика. **Липиди** у плазми налазе се у облику неутралних простих масти, глицерида и у облику разних липоида: холестерола, фосфатида. Липиди се у крви транспортују као липопротеини због њихове хидрофобне природе. У плазми се такође налазе мале количине интермедијерних и метаболичких продуката угљених хидрата и масти као што су млечна, пирогрођана и лимунска киселина, кетонска тела итд.

Након центрифугирања крви кичмењака, раздвајају се три главне компоненте. Плазма чини отприлике 55% укупног волумена крви код здравих људи. Еритроцити чине другу главну компоненту крви (око 45% волумена крви код људи). Остале крвне ћелије, чине само мали удео крви. Део крви који чине еритроцити назива се хематокрит. Хематокрит значајно варира међу кичмењацима (од 20 до 65%) и може варирати код појединца у зависности од физиолошког стања.

1.3.1. Уобличени елементи крви

Уобличене елементе крви чине еритроцити или црвена крвна зрнца, леукоцити или бела крвна зрнца, и тромбоцити или крвне плочице. Код одраслих особа, црвена крвна зрнца, многа бела

крвна зрнца и тромбоцити се формирају у коштаној сржи. Хематопоеетске матичне ћелије су ћелије коштане сржи које су способне да производе све типове крвних ћелија. Од хематопоеетске матичне ћелије настају два типа специјализованих матичних ћелија (прогениторне ћелије): одвојене групе ћелија прогенитора за мегакариоците, лимфоците, еритроците, еозинofile и базофиле, док неутрофили и моноцити настају из заједничког прогенитора. Број уобличених елемената крви резултат је динамичке равнотеже између њиховог настанка и пропадања. Концентрација (број/ mm^3) уобличених елемената у крви бабушке, пацова и човека дат је у Табели 1.1.

Табела 1.1. Концентрација уобличених елемената у крви бабушке, пацова и човека.

	Еритроцити (број/ mm^3)	Леукоцити (број/ mm^3)	Тромбоцити (број/ mm^3)
Бабушка (<i>Carassius gibelio</i>)	$1 \times 10^6 - 1,8 \times 10^6$	10,000 – 90,000	20,000 – 100,000
Пацов	$6 \times 10^6 - 7 \times 10^6$	14,000 – 16,000	800,000 – $1,5 \times 10^6$
Човек	$3,9 \times 10^6 - 5,5 \times 10^6$	6,000 – 10,000	200,000 – 500,000

Еритроцити, или црвена крвна зрнца, најбројније су ћелије у крви кичмењака. Најважнија функција еритроцита је транспорт гасова, кисеоника, угљен-диоксида и азот-оксида, као и одржавање ацидо-базне равнотеже. Код различитих животињских врста еритроцити се разликују по броју, величини и структури, те стога и по својој способности да транспортују гасове. Током еволуције се број еритроцита повећавао на рачун смањења величине, односно површине еритроцита. Број еритроцита је регулисан динамичком равнотежом између еритропоезе, тј. процеса стварања еритроцита и процеса разградње еритроцита. Стимулус за еритропоезу је хипоксија (смањење парцијалног притиска кисеоника у плазми артеријске крви), односно свако стање које доводи организам у хипоксију. Физиолошки регулатор еритропоезе и хемијски посредник између хипоксије и стимулације еритропоезе је еритропоетин. Врсте са већим бројем еритроцита имају еритроците мањег дијаметра и обрнуто. Дијаметар еритроцита код риба је 13 μm , док је код човека и пацова 7 μm . Код већине кичмењака, еритроцити имају једро и друге органеле. Међутим, сисари, неке рибе и неки водоземци имају еритроците без једра. Заправо, еритроцити сисара немају једро, митохондрије и друге органеле, укључујући и рибозоме. Као резултат тога, еритроцит сисара не може обављати синтезу протеина или ћелијску деобу. Тиме је смањена стопа метаболизма еритроцита и економичнија потрошња кисеоника. Еритроцити имају у основи округли или овални облик (нпр. код риба), иако је већина еритроцита сисара обликована као биконкавни дискови (дискови са удубљењима на обе стране).

Леукоцити представљају комплексне ћелијске структуре које су активно укључене и одговорне за одбрану организма од инфекција и болести. Поседују једро различитог облика и величине, еластичну мембрану која им омогућује амебоидно кретање као и способност дијапедезе, односно пролазак између ендотелијалних ћелија и излазак у везивно ткиво. Леукопоеза представља процес формирања различитих форми леукоцита диференцијацијом плурипотентне матичне ћелије коштане сржи, под утицајем интерлеукина и колонијастимулирајућих фактора. Број леукоцита представља динамичку равнотежу између процеса стварања леукоцита и њиховог пропадања, и може да варира у зависности од физиолошког стања организма. Поред физиолошких стања, и разна обољења доводе до повећања броја леукоцита (леукоцитоза),

односно смањења броја леукоцита (леукопенија). Према пореклу, облику једра и изгледу цитоплазме леукоцити су сврстани у три популације: 1) полиморфонуклеарни леукоцити (гранулоцити) који се могу поделити на три подпопулације а) неутрофилни гранулоцити, б) еозинофилни гранулоцити в) базофилни гранулоцити; 2) моноцити; 3) лимфоцити. **Диференцијална крвна слика** представља тест на основу којег се може одредити концентрација сваке од наведених класа леукоцита (леукоцитарна формула). Леукоцитарна формула за рибу, пацова и човека је приказана у Табели 1.2.

Табела 1.2. Леукоцитарна формула за рибу, пацова и човека

	Неутрофили	Базофили	Еозинофили	Лимфоцити	Моноцити
Бабушка(<i>Carassius gibelio</i>)	7-8%	4-5%	1-2%	80-82%	4%
Пацов	20-25%	0,1-0,2%	2-4%	70-75%	2-8%
Човек	60-65%	0,1-0,5%	2-4%	20-25%	2-8 %

Основно обележје гранулоцита је сегментираност једра и присуство специфичних гранула које садрже активне материје. **Неутрофили** су најзаступљенији гранулоцити у крви кичмењака. Одликује их једро са 4 до 6 сегмената и грануле у цитоплазми које се боје киселим и базним бојама. Основна улога неутрофила је одбрамбена, и остварују је фагоцитозом и секрецијом антибактеријских и проинфламаторних супстанци које доприносе уклањању страних тела. **Еозинофилни гранулоцити** поседују једро са два сегмента и грануле у цитоплазми које се боје киселим бојама. Главна функција еозинофила је у имунском одговору усмереном против паразитских инфекција, коју остварују дегранулацијом. Еозинофили су обично малобројни у циркулацији кичмењака (чине око 3 % свих леукоцита), али њихов број може знатно порасти као одговор на стимулус, попут тешке инфекције паразитским црвима. **Базофили** су гранулоцити са једром бубрежастог облика подељеним на неправилне сегменте. У периферној циркулацији пацова има их мање од 0.2%, те их је због тога релативно тешко пронаћи на крвном размазу. Грануле у цитоплазми базофила боје се базним бојама. Базофили напуштају систем за циркулацију и накопљају се у међућелијској течности на месту инфекције или друге упале, ослобађајући једињења која стимулишу инфламаторни одговор: паракрине факторе, укључујући хистамин и простагландине, који вазодилатацијом повећавају проток крви до места инфекције. Због тога што ослобађају ове инфламаторне медијаторе, имају важну улогу у алергијским реакцијама. **Моноцити** имају овално, бубрежасто или једро у облику потковице, које је обично смештено ексцентрично. Од свих уобличених елемената крви, моноцити први улазе у циркулацију и ту се задржавају кратко (72 сата), брзо напуштају крвоток и улазе у међућелијску течност где постају много већи и развијају се у макрофаге. Као и неутрофили, макрофаги су фагоцити. Поред тога, имају способност да штетне агенсе који су “непознати” и непрепознатљиви компоненти специфичног имунског система, обраде и искажу на својој површини у форми препознатљивој за Т лимфоците, те се због тога називају професионалне антиген презентујуће ћелије. Макрофаги имају кључну улогу у имунском одговору организма и представљају спону између неспецифичног (природног, урођеног) и специфичног (адаптивног, стеченог) имунитета. **Лимфоцити** су једина

класа леукоцита која има способност да специфично препозна антиген, па су одговорни за две основне особине адаптивног имунитета: специфичност и постојање имунолошке меморије. Лимфоцити су најситније ћелије беле крвне лозе, округлог облика. Уколико им је дијаметар између 6 μm и 8 μm називају се мали лимфоцити, док су уколико им је дијаметар до 18 μm велики лимфоцити. У циркулацији постоји и мали број средњих лимфоцита. Најбројнији у циркулацији су мали лимфоцити. Карактерише их крупно, овално, централно постављено једро са малим улегнућима. Могу да се сврстају у неколико група према томе какве типове површинских маркера експримирају на мембрани. Разликују се две главне групе лимфоцита: **Т лимфоцити**, који се диференцирају у тимусу, и **Б лимфоцити** који сазревају у Bursi Fabricii птица, или код животиња које немају бурсу, у јетри фетуса и коштаном сржи, органима по функцији еквивалентним Bursi Fabricii. Сви лимфоцити имају капацитет за реализацију ефекторних имунских механизма усмерених ка специфичним штетним агенсима, односно имају кључну улогу у специфичном имунском одговору. Овај специфични имунски одговор се остварује ефекторним механизмима посредованим ћелијама (носиоци су Т лимфоцити) и ефекторним механизмима посредованим антителима – хуморални имуни одговор (носиоци су Б лимфоцити). Трећу групу лимфоцита чине тзв. ћелије природне убице или НК ћелије (*engl. natural killer*) које се и морфолошки и функционално разликују од Т и Б лимфоцита. Бројчани однос између појединих врста леукоцита, односно процентуални удео појединих врста леукоцита у њиховом укупном броју представља леукоцитарну формулу.

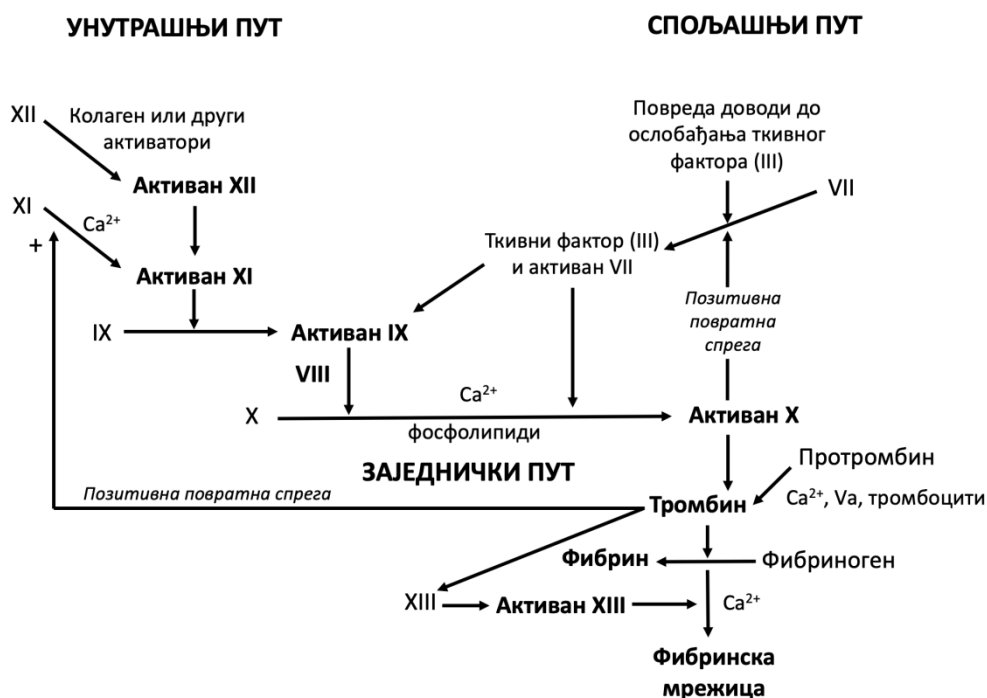
Тромбоцити сисара су мале ћелије, зрнастог облика, које немају једро и обично имају полуживот од око 4 дана. Мегакариоцити, огромне ћелије у коштаном сржи, формирају тромбоците стварајући избочења цитоплазме и избацујући их у циркулацију у процесу тромбопоезе. Од укупног броја тромбоцита произведених у коштаном сржи, 60 % -70 % се налази у циркулацији, а остатак углавном у слезини. На обојеном крвном размазу тромбоцити се често налазе у групицама. Сваки тромбоцит има периферну хијаломерну зону (светлоплаву и провидну) и грануломерну зону (средишње подручје које садржи љубичасте грануле). Мембрана тромбоцита поседује бројне рецепторне протеине. Грануломерна зона у средини тромбоцита садржи грануле које су испуњене специфичним биолошким активним молекулама неопходним за остваривање функције тромбоцита. Тромбоцити других кичмењака (риба, водоземаца, гмизаваца и птица) су овалне ћелије са једром, светло обојене цитоплазме са малим бројем ацидофилних гранула. Тромбоцити имају велики број значајних функција у организму које се могу сумирати на улогу у процесу хемостазе (заустављања крварења) и улогу у заштити организма. У процесу заустављања крварења тромбоцити учествују директно, стварањем тромбоцитног чепа или прстена, и индиректно, секрецијом активних молекула које учествују у појединим фазама хемостазе. Поред учешћа у процесу заустављања крварења, тромбоцити имају и заштитну функцију у организму. Услед позитивног наелектрисања имају способност агрегације (бивају привучени од стране негативно наелектрисаних бактерија) и могу да врше опсонизацију бактерија и тако их учине пријемчивијим фагоцитним ћелијама. Такође, имају могућност фагоцитирања ситних партикула вируса или некротичног ткива, због присуства лизозомалних гранула богатих хидролитичким ензимима.

1.2.2. Хемостаза

Хемостаза је процес заустављања крварења из оштећеног крвног суда и спречавања губитка крви, при чему се истовремено крв унутар васкуларног система одржава у течном стању. Скуп сложених, међусобно повезаних системских механизма делује како би се спречило прекомерно отицање крви, а истовремено одржао наометан ток крви у оштећеном крвном суду. Када је крвни суд пресечен или оштећен, повреда покреће низ догађаја који доводе до затварања оштећеног подручја и спречавања даљег губитка крви. Хемостаза се одвија у неколико фаза: 1) спазам крвног суда; 2) формирање тромбоцитног чепа или прстена (привременог хемостатског чепа или прстена); 3) коагулација; 4) ретракција и фибринолиза коагулума и урастање везивног ткива.

Спазам крвног суда се дешава локално, у зони повреде, и доприноси смањеном протоку крви, потпомаже адхезију тромбоцита на субендотелну површину и активацију процеса коагулације. До спазма долази контракцијом глатке мускулатуре у зиду крвног суда. Узрок контракције је нервни рефлекс који полази од рецептора за бол, као и локално ослобађање вазоконстрикторних супстанци. **Формирање тромбоцитног чепа или прстена** посредују агрегирани активирани тромбоцити. Позитивно наелектрисани тромбоцити, привучени негативним наелектрисањем, вежу се преко својих рецептора за колаген и Von Willebrand-ов фактор. Адхезија активира тромбоците, они избацују параподије, дегранулирају тј. секретују различите активне молекуле који додатно активирају неактивирани тромбоцити. Нестабилна агрегација тромбоцита у привременом чеку се стабилизује и претвара у дефинитивни угрушак помоћу фибрина, који настаје у процесу коагулације. **Коагулација или згрушавање крви** је прелазак крви из течног агрегатног стања у чврсто-гел агрегатно стање. Основна реакција је претварање растворљивог протеина крвне плазме, фибриногена, у нерастворљиви фибрин. Формирање фибрина подразумева каскаду ензимских реакција и низ фактора коагулације. Већина фактора коагулације су по биохемијској структури зимогене (неактивне форме) ензима са активношћу серин протеаза, који се активирају у каскадним реакцијама (Слика 1.4.). Конверзија фибриногена у фибрин катализована је тромбином. Процес укључује ослобађање два пара пептида из сваког молекула фибриногена. Преостали део, фибрински мономер, затим полимеризује са другим молекулима мономера како би формирао фибрин. Фибрин је првобитно лабава мрежа испреплетаних нити која се конвертује формирањем ковалентних укрштених веза у густу, чврсту масу. Тромбин је серин-протеаза која настаје из протромбина, деловањем активираних фактора X. Фактор X може бити активан или унутрашњим или спољашњим путем (Слика 1.4.). Почетна реакција у унутрашњем путу је конверзија неактивног фактора XII у активан фактор XII (XIIa). Ова активација, коју катализују кининоген и каликреин, може бити изазвана *in vitro* излагањем крви стаклу, или *in vivo* колагеним влакнима испод ендотела. Спољашњи пут се покреће ослобађањем ткивног тромбопластина. Фосфолипиди из агрегираних тромбоцита и Ca^{2+} су неопходни за потпуну активацију фактора X. Укратко, процес коагулације се одвија тако што активирани унутрашњи и/или активирани спољашњи пут(еви) активирају фактор X, а он (уз присуство тромбоцита, Ca^{2+} и Va) условљава прелазак протромбина у тромбин. Тромбин даље катализује хидролитичку разградњу и одвајање фибринопептида од фибриногена, и тиме омогућава спонтану полимеризацију мономера фибрина и настајање полимера фибрина, односно фибринске

мрежице. Фибринска мрежица је у почетку растресита маса испреплетаних влакана, те је формиран коагулум крхк. Брзо се конвертује у стабилнију форму деловањем активираниог фибрин стабилизирајућег фактора (XIIIa), а уз присуство Ca^{2+} јона. Фибрин формира ковалентне укрштене везе и растресити коагулум прелази у стабилнију, чврсту форму. Последња фаза хемостазе представља **ретракцију и фибринолизу коагулума и урастање везивног ткива**. Нити фибринске мрежице су преко крајева фибрина повезане са испустима псеудоподија активираних тромбоцита. Контракtilни систем, кога чине актински и миозински молекули удружени у хијаломерној зони тромбоцита, својом контракtilном активношћу повлачи фибринске нити и проузрокује ретракцију коагулума и избацивање серума у околни простор. За ретракцију коагулума одговорни су адреналин и норадреналин, серотонин и ендотелин преко својих рецептора на тромбоцитима, као и велики број молекула аденозин трифосфата (АТФ). У зону повреде мигрирају фиброцити, те се формира ново везивно ткиво. Такође, епителијалне ћелије око повређене површине пролиферишу и на тај начин се регенерише повређена површина. **Фибринолиза коагулума** представља разлагање коагулума и процес је супротан коагулацији. Као и за процес коагулације, и за фибринолизу је потребно учешће великог броја активних фактора. Активна компонента фибринолитичког система је плазмин, протеаза која лизира фибрин и фибриноген. Плазмин настаје од неактивног прекурсора, плазминогена, деловањем три ензима: каликреином, ткивним активатором плазминогена и урокиназним активатором плазминогена, а након разградње коагулума се брзо деактивира.



Слика 1.4. Коагулација – каскадне реакције активације фактора коагулације

1.4. ВЕЖБЕ

Узимање узорка крви рибе и пацова

Потребан материјал:

- маказе
- игла
- шприц
- микроскопска плочица

Поступак вежбе

Код рибе се крв узима из каудалне вене смештене у хемалном каналу. Место убода се налази у нивоу бочне линије, која се код већине риба веома јасно уочава на телу. Игла се убада бочно, у део тела који се налази непосредно иза аналног пераја, све до дубине док не удари у кичмени стуб (Слика 1.5.). Након пробадања крвних судова смештених у хемалном каналу у игли се појављује крв. Кап крви потребно је накапати на микроскопску плочицу, на којој ће се правити крвни размаз. Код риба крв коагулише веома брзо, па је потребно користити крв за даље анализе врло кратко, или у шприц за узорковање крви додати малу запремину антикоагуланса (хепарина).



Слика 1.5. Поступак узимања крви рибе из каудалне вене

Код пацова се крв узима из репне вене, након одсецања малог вршног дела репа, прва кап крви се обрише, а наредна кап се накапа на микроскопску плочицу на којој ће се правити крвни размаз (Слика 1.6.) или на сахатно стакло, одакле се узима одговарајућа запремина крви помоћу аутоматске пипете. Када је потребна већа количина крви, крв се сакупља након декапитације пацова. Како би се спречила коагулација крви, у епрувету у коју се сакупља крв додаје се На-цитрат. Оваква крв назива се цитратна крв.

Одређивање хематокритске вредности крви рибе и пацова

Потребан материјал:

- цитратна крв
- Wintrob-ова епрувета
- шприц за узимање цитратне крви
- дугачка игла
- центрифуга

Поступак вежбе

Хематокритска вредност одређује се помоћу Wintrob-ове епрувете, стаклене епрувете висине 110 mm, која је калибрисана у размаку 1-100 mm; на њој су означене две скале, растућа 1-10 и опадајућа 9-0.

Специјалним шприцем узети цитратну крв и дугачком иглом лагано напунити Wintrob-ову епрувету до ознаке 10. У току пуњења пазити да врх игле буде испод површине крви. Ставити епрувете у центрифугу и центрифугирати 15 минута на 2000 обртаја у минути. На растућој скали прочитати процентуалну запремину елемената, а на опадајућој запремину плазме. Вредност за елементе помножити бројем 0,96, јер је утврђено да око 4% плазме заостаје између исталожених еритроцита.

На основу вредности хематокрита, броја еритроцита и концентрације хемоглобина могу се израчунати вредности хематолошких индекса (Прилог 1).

Диференцијална крвна слика и леукоцитарна формула рибе и пацова

Потребан материјал:

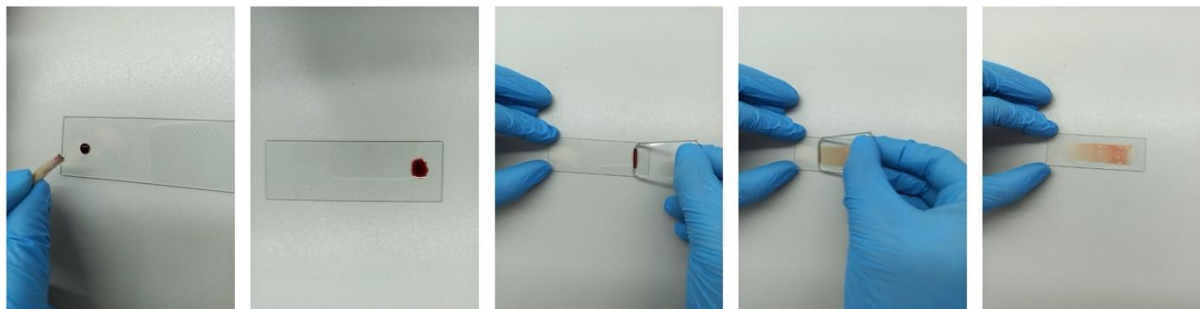
- | | |
|---------------------------|--------------------|
| • крв рибе | • Giemsa раствор |
| • крв пацова | • дестилована вода |
| • микроскоп | • Пастерове пипете |
| • микроскопске плочице | • кедрово уље |
| • May-Grünwald-ов раствор | |

Поступак вежбе

Прављење крвног размаза

Узети кап крви рибе/пацова и накапати на микроскопску плочицу. Другу микроскопску плочицу прислонити ужим крајем уз прву, под углом од 45° или нешто мањим, тако да се кап крви равномерно разлије уз ивицу горње плочице. Равномерним покретом руке, умереном брзином, повући горњу плочицу по доњој, услед чега се крв развуче у танком слоју на доњој микроскопској плочици (Слика 1.6.). Уколико је размаз крви сувише дебео на једном крају, или ако су поља

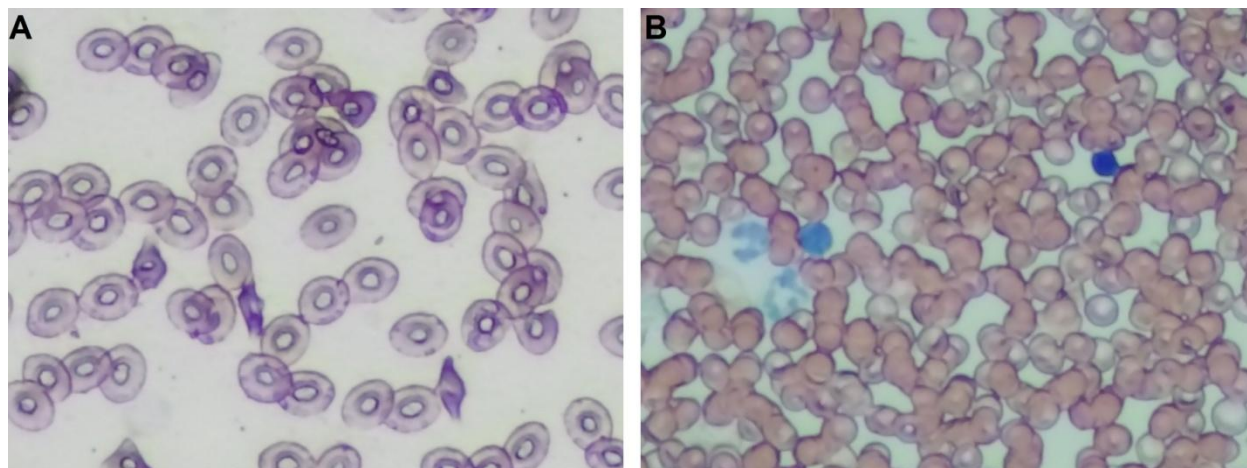
пругаста, размаз је неправилно направљен и потребно је поступак поновити. Плочице са крвним размазом оставити у хоризонталном положају да стоје на ваздуху све док се крв не осуши.



Слика 1.6. Прављење крвног размаза узорковањем крви пацова

Бојење крвног размаза по Papenheim-у

На свеж и добро осушен размаз додати 25-30 капи May-Grünwald-овог раствора, и оставити га на препарату три минута. Не одливајући боју, после три минута додати 60 капи дестиловане воде. Минут после додавања дестиловане воде одлити течност и препарат прелити Giemsa раствором. Giemsa раствор је пре употребе потребно разблажити 10 пута дестилованом водом. После 20 - 30 минута одлити боју, препарат опрати дестилованом водом (и једну и другу страну), обрисати га папирном ватом са доње стране и оставити на носач да се осуши. На осушени препарат ставити кап кедровог уља и посматрати под имерзијом.



Слика 1.7. Крвни размаз рибе (А) и пацова (В) обојен по Papenheim-у

Леукоцитарна формула

На основу диференцијалне крвне слике могуће је одредити леукоцитарну формулу: бројчани однос између појединих врста леукоцита тј. процентуални удео појединих врста леукоцита у њиховом укупном броју.

Одређивање броја уобличених елемената у периферној крви рибе и пацова

Потребан материјал:

- крв рибе
- крв пацова
- Neubauer-ова комора
- покривна стакла
- аутоматска пипета и наставци
- микротубе
- Hayem-ов раствор
- Türk -ов раствор
- Rees-Ecker-ов раствор

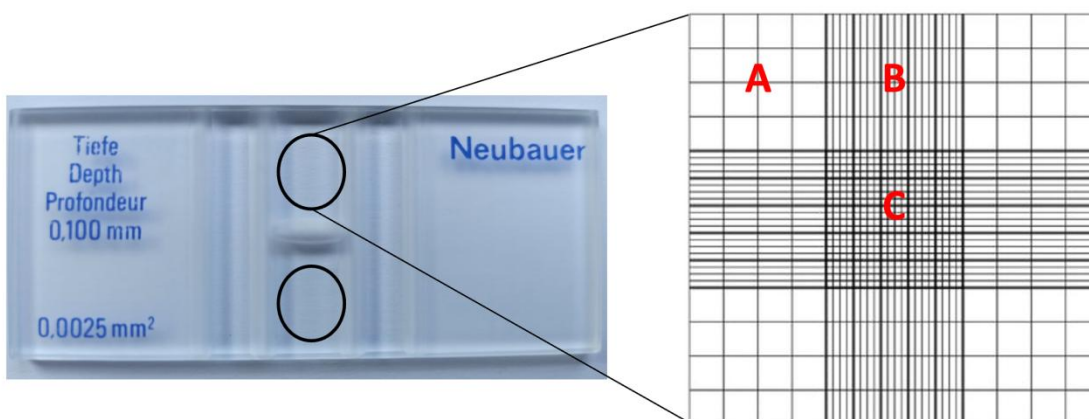
Поступак вежбе

Neubauer-ова комора (хемоцитометар) за бројање уобличених елемената крви најчешће се користи у клиничким лабораторијама и у научно-истраживачком раду. Састоји се од дебелог предметног стакла на коме су урезана 4 жљеба, између којих се налазе три поља. Средње поље је тако избрушено да је за 0,1 mm ниже од бочних поља. Оно је подељено на два дела једним попречним жљебом. У оба дела средњег поља урезана је мрежица за бројање крвних елемената. Дужина једне странице мрежице износи 3 mm; укупна површина је 9 mm². Мрежица се састоји из 9 великих квадрата, чија је површина 1 mm² (Слика 1.8.).

Велики квадрати у угловима (А квадрати), подељени су на 16 мањих квадрата. Површина сваког малог квадрата је 1/16 mm². У А квадратима броје се леукоцити.

Велики средишњи квадрати (В квадрати) подељени су на 16 мањих квадрата, а сваки мањи је подељен на 5 правоугаоника (4 правоугаоника и по два полуправоугаоника). Сваки правоугаоник има површину од 1/80 mm². У В квадратима се броје еритроцити.

Централни велики квадрат (С квадрат) подељен је такође на 25 мањих, а сваки мањи квадрат је још подељен на 16 малих квадрата површине 1/400 mm². У С квадрату се броје тромбоцити.



Слика 1.8. Neubauer-ов хемоцитометар и изглед мрежице

Припрема Neubauer-ове коморе

Бочна поља Neubauer-ове коморе овлажити и поставити предметно стакалце на комору, тако да прекрива обе мрежице. Поставити Neubauer-ову комору под микроскоп и пронаћи мрежицу у видном пољу.

Поступак при узимању крви за одређивање броја еритроцита

Пре почетка рада у микротубе додати 995 μl Наует-овог раствора (за разблажење еритроцита). Код пацова се крв узима из репа, а код рибе се крв узоркује из каудалне вене (поступак описан раније), након чега се 5 μl узорка крви преноси у микротубу са Наует-овим раствором. На овај начин узорак крви смо разблажили 200 пута.

Пре почетка бројања еритроцита узорак добро промешати.

Поступак при бројању еритроцита

Еритроцити се броје у 8 правоугаоника великог В квадрата, при чему се полуправоугаоници при бројању занемарују. Броје се сви еритроцити који се налазе у правоугаонику, као и они који се налазе на две одабране граничне линије (нпр. горња и лева). Броји се у три понављања, па се потом одреди средња вредност.

Израчунавање:

Површина сваког правоугаоника је $1/80 \text{ mm}^2$, а висина коморе је 0,1 mm. Броји се у 8 правоугаоника (тако је површина у којој се броје еритроцити једнака $1/80 \text{ mm}^2 \times 8 = 0,1 \text{ mm}^2$). Када помножимо површину ($0,1 \text{ mm}^2$) висином коморе (0,1 mm) добијемо запремину у којој се броје еритроцити тј. $0,01 \text{ mm}^3$ ($1/80 \text{ mm}^2 \times 8 \times 0,1 \text{ mm} = 0,01 \text{ mm}^3$). Ознака X(8) представља средњу вредност избројаних еритроцита, а R одговарајуће разблажење. Пошто је резултат потребно изразити по mm^3 (μl), потребно је средњу вредност броја еритроцита помножити разблажењем (200) и фактором 100 ($0,01 \text{ mm}^3 \times 100 = 1 \text{ mm}^3$). Резултат се може изразити по литру, ако се добијена вредност помножи са 10^6 .

$$\text{Ery [broj}/\mu\text{l}] = X(8) * 100 * R$$

На основу броја еритроцита, концентрације хемоглобина и вредности хематокрита могу се израчунати вредности хематолошких индекса (Прилог 1).

Поступак при узимању крви за одређивање броја леукоцита

С обзиром на то да се за бројање леукоцита код рибе и пацова користе различита разблажења крви поребно је припремити две микротубе са одговарајућим запреминама Türk -овог реагенса.

За бројање леукоцита у крви пацова потребно је крв разблажити 20 пута, због чега у микротубе треба аутоматском пипетом додати 190 μl Türk-овог реагенса (и касније додати 10 μl крви).

За бројање леукоцита у крви рибе потребно је крв разблажити 200 пута, због чега у микротубе треба аутоматском пипетом додати 995 μl Türk-овог реагенса (и касније додати 5 μl крви).

Код пацова се крв узима из репа, након чега се 10 μl узорка крви преноси пипетом у микротубу са Türk-овим раствором.

Код рибе се крв узоркује из каудалне вене након чега се 5 μl узорка преноси у микротубу са 995 μl Türk-овог реагенса.

Пре почетка бројања леукоцита узорак добро промешати.

Поступак при бројању леукоцита

Леукоцити се броје у 16 мањих квадрата великог А квадрата. Броје се сви леукоцити који се налазе у квадрату, као и они који се налазе на две одабране граничне линије (нпр. горња и лева). При бројању се иде у смеру осмице. Броји се у три понављања, па се потом одреди средња вредност.

Израчунавање:

Површина сваког малог квадрата је $1/16 \text{ mm}^2$, а броји се у 16 малих квадрата ($1/16 \text{ mm}^2 \times 16 = 1 \text{ mm}^2$). Висина коморе је 0,1 mm. Када помножимо површину (1 mm^2) висином коморе (0,1 mm) добијемо запремину у којој се броје леукоцити тј. 0.1 mm^3 ($1 \text{ mm}^2 \times 0,1 = 0,1 \text{ mm}^3$), па се због тога добијена средња вредност броја леукоцита- X(16) множи разблажењем (R) и фактором 10, и на тај начин се добија број леукоцита у mm^3 (μl) разблажене крви. Резултат се може изразити по литру, ако се добијена вредност помножи са 10^6 .

$$Leu [broj/\mu l] = X(16) * 10 * R$$

Поступак при бројању тромбоцита

У микротубу ставити 190 μL раствора за бојење тромбоцита (Rees-Ecker-ов раствор) и додати 10 μl крви. Промешати на вортекс-мешалици и оставити на око 30 минута. За то време припремити комору као што је описано код бројања еритроцита. Тромбоцити се броје у 80 квадратића (5 већих квадрата) С квадрата. Добијена средња вредност броја тромбоцита- X(80) множи се разблажењем (R) и фактором 5, и на тај начин се добија број тромбоцита у mm^3 (μl) разблажене крви. Резултат се може изразити по литру, ако се добијена вредност помножи са 10^6 .

$$Thr [broj/\mu l] = X(80) * 5 * R$$

Хемостаза и коагулација крви

Потребан материјал:

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| • крв пацова | • стаклени штапић |
| • цитратна крв | • микроскопска плочица |
| • крвна плазма | • ињекциона игла |
| • крвни серум | • центрифуга |
| • раствор CaCl_2 | • штоперица |
| • Стаклена епрувета | • водено купатило |

Поступак вежбе***Добијање крвног серума и крвне плазме***

За добијање крвног серума, у епрувету је потребно ставити 2 - 3 ml крви и оставити 5 - 15 минута на собној температури како би коагулисала. Стакленим штапићем коагулум одлепити од зида епрувете, а затим центрифугирати 10 минута на 1500 обртаја/мин. Крвна плазма добија се центрифугирањем крви у којој је спречен процес коагулације (цитратна крв).

Испитивање брзине коагулације крви пацова

Под брзином коагулације подразумева се време које је потребно да би се формирала прва фибринска нит.

На микроскопску плочицу ставити већу кап крви. Када крв падне на предметно стакло укључити штоперицу. Ињекционом иглом сваких 15 секунди провући кроз кап. Када се игла повуче до краја капи потребно је иглу подићи да би се уочио моменат појаве првог кончића на њеном врху. Тог тренутка искључити штоперицу и забележити време.

Доказивање улоге Ca^{2+} јона у процесу коагулације

Обележити четири епрувете бројевима од 1 до 4. У епрувете бр. 1 и 2 додати по 0,5 ml цитратне крви, у епрувету бр. 3 додати 0,5 ml крвне плазме (добијене у процесу одређивања хематокритске вредности), а у епрувету бр. 4 додати 0,5 ml крвног серума (добијеног у процесу посматрања коагулације крви *in vitro*). У епрувете 2, 3 и 4 додати по 0,2 ml раствора CaCl_2 . Све епрувете оставити у воденом купатилу 10 мин. на 38°C, а потом установити у којим је епруветама дошло до коагулације.

Одређивање концентрације глукозе у хемолимфи и серуму ензимском методом (GOD-POD)**Потребан материјал:**

- | | |
|--------------------------------|---|
| • аутоматске пипете и наставци | • серум пацова |
| • микротубе | • стандардни раствор глукозе (5 mmol/l) |
| • хемолимфа пужа | • реагенс |
| • серум рибе | |

Реагенс садржи: ензим глукоза оксидазу (12000 U/l), ензим пероксидазу (<1000 U/l), 4-aminoantipyrine – 4-ААП (> 0,3 mM), фенол (4 mM), фосфатни пуфер pH 7,4.

Поступак вежбе

Обележити микротубе за слепу пробу, стандард и узорак (хемолимфа или серум). У све микротубе додати 1 ml реагенса и инкубирати у воденом купатилу на 37°C, 5-10 минута. У одговарајуће микротубе додати 10 µl узорка и 10 µl стандарда, промешати садржај и инкубирати на 37°C, 10

минута. По завршетку инкубације измерити апсорбанце слепе пробе, стандарда и узорка на спектрофотометру. Апсорбанце се мере на таласној дужини од 500 nm.

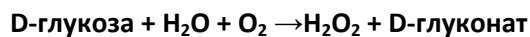
Израчунавање

На основу стандарда познате концентрације (C_{st}), апсорбанце стандарда (A_{st}) и апсорбанце узорка (A_{uz}) може се израчунати концентрација глукозе у узорку према следећој формули:

$$\text{Глукоза (mmol/l)} = \frac{C_{st} * A_{uz}}{A_{st}}$$

Принцип методе

Глукоза се под дејством ензима глукоза оксидазе оксидује до глюконата и водоник-пероксида.



Фенол, 4-ААП и водоник-пероксид у присуству пероксидазе прелазе у црвено обојено једињење (енгл. quinoneimine dye):



Интензитет боје пропорционалан је концентрацији глукозе у узорцима.

Простор за белешке

Простор за белешке

2. Респираторни систем и транспорт гасова

Респирација (дисање) је процес непрекидне размене гасова између организма и спољашње средине. Континуално усвајање кисеоника и елиминација угљен-диоксида есенцијални су за одржавање хомеостазе. У току респирације, молекули кисеоника се транспортују од спољашње средине до ћелија, а у ћелијама до унутрашње мембране митохондрија, где се одвијају оксидациони процеси у којим настаје енергија у форми АТФ, али и угљен-диоксид, који се ослобађа у спољашњу средину.

Процес респирације може да се подели на две фазе: спољашња респирација (вентилација, размена гасова и транспорт гасова до ћелија) и унутрашња респирација (ћелијско дисање).

Код нижих бескичмењака, нарочито оних који живе у воденој средини, размена гасова се одвија преко површине тела, док су се код сложенијих животиња развили различити респираторни органи. Да би размена гасова била што ефикаснија, већина респираторних органа и површина изграђена је од **респираторне јединице**: финог, нискоцилиндричног, једнослојног епитела танких мембрана (респираторни епител) који је у блиском контакту са васкуларним системом (лакунама отвореног циркулаторног система или капиларима затвореног циркулаторног система). Респираторни епител мора да буде влажан како не би дошло до оштећења осетљивих мембрана. Код животиња које имају веће потребе за кисеоником, вентилација олакшава стално обнављање спољашњег медијума који је у контакту са респираторном површином.

Усвајање и губитак гасова одвијају се процесом једноставне **дифузије**, што значи да се гасови крећу са места где је њихов парцијални притисак већи на место где је мањи, односно кисеоник ће ући у организам само уколико је његов парцијални притисак са спољашње стране већи од парцијалног притиска са унутрашње стране површине кроз коју се обавља размена.

2.1. Респираторни органи

Респираторни органи се према функцији у размени гасова могу поделити на:

- 1) основне респираторне органе: интегумент, шкрге, трахеје и плућа;
- 2) помоћне респираторне органе: измењена цревна мукоза и гасна жлезда код риба, ваздушне кесе код птица, и др.

Дисање преко интегумента је најраспрострањенији начин размене гасова, присутан у мањој или већој мери код свих животиња. Интегумент може бити основни и једини респираторни орган, основни уз неки помоћни, или помоћни респираторни орган. Како би размена гасова била ефикасна, интегумент мора да поседује особине респираторног епитела.

Шкрге су респираторни органи животиња које живе у воденој средини. Код бескичмењака су шкрге ектодермалног порекла и једноставне грађе, док су код хордата ендодермалног порекла и

сложеније структуре. Шкрге могу бити основни респираторни орган уз додаток помоћних респираторних органа или помоћна респираторна површина. Код бескичмењака се разликује неколико типова шкрга: кожные шкрге (могу бити основни или помоћни респираторни орган) и физичке и трахеалне шкрге (помоћни органи уз трахеални систем).

Размена гасова код инсеката и других животиња из групе Tracheata одвија се преко трахеја. **Трахеје** представљају систем разгранатих цевчица испуњених ваздухом, преко којих се кисеоник преноси директно до ћелија, без учешћа телесне течности. С обзиром на специфичан начин транспорта гасова, трахеје нису изграђене од респираторног епитела какав је присутан код других респираторних органа. Елиминација угљен-диоксида се највише одвија преко интегумента.

Плућа су главни респираторни орган код кичмењака, ендодермалног су порекла и са спољашњом средином комуницирају преко различито развијених дисајних путева. Ваздух на респираторној површини се обнавља активном вентилацијом. Неки копнени бескичмењаци поседују дифузни тип плућа, код којих се размена гасова обавља искључиво дифузијом молекула гасова.

2.2. Транспорт гасова- респираторни пигменти

Мала растворљивост кисеоника у води је главни органишавајући фактор у ефикасном транспорту овог молекула до свих ћелија код сложених вишећелијских организама. Стога су се развили респираторни пигменти, металопротеини који реверзибилно везују кисеоник на нивоу респираторних површина и транспортују га до ткива где се отпушта и дифундује у ћелије.

Основна функција респираторних пигмената је транспорт гасова, пре свега кисеоника, али имају и улогу у одржавању ацидо-базне равнотеже. Респираторни пигменти могу бити присутни растворени у телесним течностима или неким од уобличених елемената телесне течности, али се могу наћи и ван система за циркулацију, нпр. у мишићном ткиву или ћелијама које су лоциране близу респираторних површина (нпр. трахеја или шкрга). Сви респираторни пигменти су по структури **металопротеини**- комплекси метала и протеина.

Према структури и распрострањености код појединих група животиња, респираторни пигменти су класификовани у пет група: хемоглобин, хемеритрин, хлорокруорин, хемоцијанин и ахроглобин.

Хлорокруорин је респираторни пигмент зелено-жуте боје. Налази се екстрацелуларно, растворен у хемолимфи четири фамилије морских полихета (Polichaeta). Хлорокруорин је хемопротеин велике молекулске масе. Активни центар је атом гвожђа, који улази у састав порфирина.

Хемеритрин садржи гвожђе које се не налази у саставу порфирина, него је директно везано за протеински део молекула. Јавља се код два раздела морских црва (Sipunculida и Priapulida), једне групе шкољки (Brachiopoda) и код представника морских чланковитих црва (Annelida). Може бити љубичасте боје или је безбојан, што зависи од степена оксидације (оксидисан – љубичаст).

Хемоцијанин се налази растворен у хемолимфи мекушаца (Mollusca) и зглавкара (Arthropoda). Структура хемоцијанина се значајно разликује код ове две групе животиња и одвојеног су еволутивног порекла. У сваком активном центру хемоцијанина налази се два атома бакра који је

директно везан за протеин велике молекулске масе. Један молекул кисеоника се везује за два атома бакра, при чему долази до њихове оксидације и преласка из Cu(I) у Cu(II). Деооксигенисани хемоцијанин је безбојан, али постаје плаве боје при оксигенацији.

Хемоглобин је најраспрострањенији респираторни пигмент, заступљен и код бескичмењака и код кичмењака. То је једини респираторни пигмент заступљен у крви кичмењака, и готово сви кичмењаци имају хемоглобин који се увек налази у еритроцитима. Његова концентрација варира у зависности од врсте и њеног положаја у еволутивном низу. Тако, сисари и птице имају 10-18 g %, а водоземци, гмизавци и рибе 5-10 g % хемоглобина. Бескичмењачки хемоглобин се налази у циркулацији (екстрацелуларни) или се, као код кичмењака, налази у специјализованим ћелијама.

Молекул хемоглобина може да се састоји од једне или више субјединица, при чему је свака субјединица изграђена од протеинске компоненте- глобина и простетичне групе- хема. Структура хема у свим молекулима хемоглобина је иста, а хемоглобин се разликује по саставу и структури глобина, као и броју субјединица које су повезане у једну функционалну целину. Молекул кисеоника се реверзибилно везује за гвожђе у хему, односно свака субјединица хемоглобина има једно везно место за кисеоник. При везивању кисеоника, гвожђе не мења валенцу, тако да овај процес није процес оксидације него оксигенације. Аминокиселински састав глобинских ланаца је карактеристичан за врсту тј. представља један од критеријума за систематизацију врста. Ова специфичност, поред осталог, изражава се и у кристалној форми глобинске компоненте хемоглобина која је карактеристична за дату врсту. Кристализацијом хема настају Teihmann-ови кристали. Пошто је хем исти код свих врста то су и Teihmann-ови кристали исти.

2.3. ВЕЖБЕ

Упоредни преглед варирања концентрације хемоглобина у телесним течностима (крв рибе и пацова)

Потребан материјал :

- хемоглобинометар по Sahly-ju
- капиларне пипете
- 0,1 N HCl
- стаклени штапић
- дестилована вода

Поступак вежбе

Концентрација хемоглобина у крви рибе бабушке и пацова одређује се методом по Sahli-у, односно, претварањем хема у хематин (хлорхемин) и упоређивањем боје са бојом стандардног раствора. Принцип методе је да под утицајем киселине (HCl) долази до хемолизе еритроцита и до одвајања хема од глобина. Гвожђе из хема оксидише и хем прелази у хематин (хлорхемин) који

има карактеристичну мрку боју. Интензитет боје зависи од присутне концентрације хемоглобина (што је боја тамнија значи да има више хемоглобина). Хемоглобинометар по Sahli-ју се састоји од статива, градуисане покретне епрувете и две обојене, непокретне стаклене цеви (Слика 2.1.). Покретна епрувета на једној страни има скалу 10 - 140 и она се односи на процентне вредности, а на супротној страни 2 - 22 која се односи на g %.



Слика 2.1. Хемоглобинометар по Sahli-у

Пипетом узети 0,1 N HCl и у градуисану епрувету хемоглобинометра сипати до ознаке 10. Затим, помоћу одговарајуће пипете узети 0,02 ml крви и пажљиво додати у раствор HCl у градуисаној епрувети. Пипету испрати увлачењем раствора HCl да не би дошло до стварања грудвица хлорхемина. Садржај у градуисаној епрувети измешати стакленим штапићем, поставити епрувету у сталак и сачекати 15 минута да би се еритроцити у киселини хемолизирали, а хемоглобин прешао у хематин. По истеку времена пажљиво, кап по кап, додавати дестиловану воду другом капиларном пипетом, уз мешање стакленим штапићем, све док се боја раствора у епрувети не изједначи са бојом стандардних цевчица. Када се установи да су боје изједначене, прочитати вредности на скали 10 - 140 и на скали 2 - 22.

На основу концентрације хемоглобина, броја еритроцита, и вредности хематокрита могу се израчунати вредности хематолошких индекса (Прилог 1).

Посматрање кристала глобинске компоненте хемоглобина

Потребан материјал :

- микроскоп
- микроскопске плочице
- покровна стакла
- чачкалице
- кедрово уље

Поступак вежбе

Ставити кап крви на микроскопску плочицу. Коагулацију спречити дефибринацијом (кап крви на микроскопској плочици лагано окретати чачкалицом и одстрањивати кончиће фибрина). На удаљености од око 2 mm од капи крви ставити кап кедровог уља, а затим чачкалицом интензивно помешати обе капи и покрити покровном љуспицом (кедрово уље одузима воду и формирају се кристали). После око два сата појављују се глобински кристали, различитог облика и величине (Слика 2.2.).



Слика 2.2. Глобински кристали хемоглобина пацова

Препарат посматрати под микроскопом, уочити и нацртати кристале.

Посматрање Teihmann-ових кристала

Потребан материјал :

- микроскоп
- микроскопске плочице
- покровна стакла
- NaCl
- глацијална сирћетна киселина

Поступак вежбе

Ставити кап крви на микроскопску плочицу, додати малу количину NaCl и стакленим штапићем промешати да би се со растворила у капи крви. Загревати на пламенику све док се препарат не осуши, али тако да загревање не пређе 40°C. На суви препарат ставити кап глацијалне сирћетне киселине, покрити љуспицом и загревати до тачке кључања сирћетне киселине, све док не испари. Уз љуспицу пажљиво додати сирћетну киселину и наставити загревање. Поновити поступак све док мрка боја крви не пређе у плаво-зелену боју. Када се препарат охлади, посматрати кристале помоћу микроскопа. Уочити боју, облик, величину кристала, као и разлике на препаратима.

Загревањем у присуству глацијалне сирћетне киселине се хемоглобин разлаже у две компоненте: протеинску компоненту глобин и простетичну групу хем, која са киселином гради хематин (хлорхемин). Кристали хематина се могу уочити под микроскопом.

Доказивање присуства гвожђа у крви

Потребан материјал :

- посуде за жарење
- штипаљке
- стаклени штапић
- ccHCl
- дестилована вода
- 200/N калијум фери-цијанид

Поступак вежбе

У посуду за жарење ставити неколико капи крви. Штипаљком прихватити посуду и загревати све дотле док крв не добије метализирану (сивкасту) боју. Стакленим штапићем утврдити да ли је жарење завршено (ако се крв лепи потребно је наставити жарење све дотле док се материјал не почне крунити). Стакленим штапићем састругати пепео и измрвити. У посуду за жарење додати 5 - 6 капи ccHCl , 2 - 3 ml дестиловане воде, па садржај поново загревати до кључања дестиловане воде. Потом, кад се садржај охлади, пренети га у епрувету, додати неколико капи раствора калијум фери-цијанида и загревати. После десетак минута раствор добија карактеристичну плаву боју ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ -гвожђе(III)хексацијаноферат(II); Пруско плаво) која потврђује присуство гвожђа у узорку.

Простор за белешке

3. Физиологија гастроинтестиналног тракта

Сва органска једињења су резервоари хемијске енергије. Међутим, само део те енергије животињски организам може да искористи. Животиње се сусрећу са низом материја из спољашње средине (сварљивих и несварљивих), те кроз процес исхране бирају једињења која ће снабдети организам неопходним хранљивим материјама.

Хранљиве материје представљају главни извор енергије сваког организма, неопходне за изградњу ћелија и одржавање животних функција. Кроз низ физичких и хемијских трансформација храна се претвара у облике доступне за апсорпцију. Сложени макромолекули (протеини, угљени хидрати и липиди) се у процесу дигестије разграђују на простије јединице (амино-киселине, моносахариде, масне киселине и глицерол). Храна се разлаже дејством биокатализатора – **ензима** који катализују разградњу специфичних врста хемијских веза. Детаљан списак дигестивних ензима сисара налази се у Прилогу 2. У зависности од места на ком делују ензими, варење се може поделити на интрацелуларно, екстрацелуларно и мембранско.

Интрацелуларно варење подразумева варење унутар ћелије, **мембранско варење** се одвија на мембрани ентероцита танког црева у присуству ензима дипептидаза и дисахаридаза, док се **екстрацелуларно варење** одвија унутар црева, у оквиру гастроинтестиналног тракта у чији лумен се улива садржај гастроинтестиналних жлезда.

Интрацелуларно варење заступљено је код једноћелијских организама и организама код којих је црево непотпуно развијено, као што су сунђери (Porifera), дупљари (Coelenterata), плjosнати црви (Platyhelminthes), док је код неких врста интрацелуларно варење комбиновано са екстрацелуларним – мекушци (Mollusca) и бодљокожци (Echinodermata). Код већине животиња заступљена су сва три типа варења. Дигестија код кичмењака (Vertebrata) се највећим делом остварује екстрацелуларно, док се мали број ензимских реакција дигестије протеина одвија унутар ћелија.

3.1. Функционални региони дигестивног тракта

3.1.1. Дигестивни систем пужа

Дигестивни тракт пужа се састоји из усне дупље, једњака, желуца, дигестивне жлезде (хепатопанкреас) и танког црева које се наставља у ректум.

Механичка обрада хране почиње у усној дупљи деловањем помоћних органа за варење – **радула**. Радула представља апарат за храњење присутан код неких врста мекушаца. Чини је назубљено везивно ткиво чијим се повлачењем напред-назад изазива стругање хране. У усну дупљу се изливају секрет пљувачних жлезда који садрже ензим амилазу и омогућавају да поред механичке обраде почиње и дигестија угљених хидрата, тачније скроба.

Дигестивна жлезда (хепатопанкреас) продукује ензиме кључне за разлагање угљених хидрата, протеина и масти – амилазе, протеазе, липазе. Поред њих, хепатопанкреас секретује и ензиме

целулазу, хитиназу и нуклеазе који су одговорни за разградњу целулозе, хитина и нуклеинских киселина пореклом из хране. Своје продукте дигестивна жлезда излучује у **желудац** где се у највећој мери одвијају ензимске реакције у циљу дигестије макромолекула. На нивоу желуца, танког црева, али и хепатопанкреаса одвија се апсорпција аминокиселина, масних киселина и простих шећера. Складиштење липида, гликогена и калцијума, као и отклањање штетних компоненти се такође делом одвија у дигестивној жлезди.

Несварене материје се накопљају у цреву и преко ректума избацују у спољашњу средину.

3.1.2. Дигестивни систем птице

Дигестивни тракт птице састоји се из усне дупље, једњака, вољке, желуца, црева, цекума, ректума и клоаке. Кљун, језик и усна дупља имају улогу у хватању и механичкој обради хране. У усну дупљу уливају се продукти пљувачних жлезда који поред мукуса, излучују и ензим амилазу услед чијег дејства почиње варење угљених хидрата. Храна се даље потискује у једњак. **Вољка** представља кесасто проширење једњака у торакалном делу и има улогу укладиштењу хране. **Желудац** се састоји из два дела: жлезданог и мишићног. Контракцијом глатких мишића једњака храна доспева до жлезданог дела желуца где почиње дигестија хране под дејством секрета два типа жлезда, тубуларних које секретују мукус и гастричних жлезда које секретују хлороводоничну киселину (HCl) и пепсин, након чега прелази у мишићни део желуца. Крупније партикуле хране могу да се врате (рефлукс) у жлездани део желуца како би се повећала концентрација ензима неопходних за варење протеина. Глатка мускулатура мишићног дела желуца подељена је на дугачке, добро дефинисане снопове који су концентрично распоређени и својом контракцијом омогућавају додатну механичку обраду хране током дигестије. Зидови мишићног дела желуца садрже бројне жлезде чији секрет богат протеинима формира кутикулу која облаже унутрашњост желуца и на тај начин га штити од киселог садржаја пореклом из жлезданог дела. Слој кутикуле је углавном зелене, смеђе или жуте боје која потиче од жучних пигмената приспелих из црева. Танко црево је примарно место ензиматске дигестије и апсорпције нутријената. У **дванаестопалачно црево** (дуоденум) уливају се секретни панкреаса и жучне кесе. Панкреасни сок код птица богат је ензимима **амилаза, липаза, трипсин, химотрипсин, карбоксипептидаза А, Б и Ц, нуклеаза и еластаза**. На мембрани ентероцита, олигомери добијени дигестијом хране у присуству панкреасних ензима, бивају хидролизоване на мање молекуле (моносахариде, нуклеотиде, аминокиселине...) и у таквом облику апсорбовани у крвоток. **Цекум** (сесум) се налази на прелазу танког у дебело црево. Дебело црево се протеже од цекума до клоаке. У ректуму, вода, електролити, као и неки нутријенти (шећери, аминокиселине) бивају апсорбовани. **Клоака** представља комору у коју се улива дигестивни и урогенитални тракт. Несварени делови хране, заједно са урином се скупљају у клоаки и избацују у спољашњу средину.

3.1.3. Дигестивни систем сисара

У функционалном смислу, дигестивни систем сисара се може поделити на предње, средње и задње црево. У предње црево убраја се усна дупља, ждрело, једњак и желудац. Храна се прихвата у усну дупљу, садржај се анализира помоћу рецептора за укус, даље се ситни, растапа под дејством пљувачног сока и започиње хемијска разградња угљених хидрата (скроба) и емулгованих масти. Садржај се даље потискује преко ждрела кроз једњак до желуца, где почиње дигестија протеина и наставља се дигестија емулгованих масти. Желудац представља кесасто проширење црева и код човека се састоји од кардијачног, фундусног и пилоричног региона. У нивоу кардијачног дела желуца налазе се тзв. кардијачне жлезде које луче слуз и у овом делу се улива садржај једњака. Фундусни део желуца садржи тзв. фундусне гастричне жлезде које се састоје из три типа секреторних ћелија: паријеталне (или оксинтичне) ћелије одговорне за секрецију хлороводоничне киселине (HCl) и унутрашњег фактора, пептидергичне (главне) ћелије које секретују пепсиноген и гастричну липазу, и мукозне ћелије које луче слуз, као и неуроендокрине и ендокрине ћелије које секретују гастроинтестиналне хормоне. У пилорусном делу желуца налазе се тзв. пилорусне жлезде које излучују алкални сок (сиромашан ензимима) који штити слузокожу желуца од киселог садржаја. Код сисара танко црево је подељено на дуоденум и танко црево у ужем смислу. Средње и задње црево представљају место апсорпције продуката дигестије протеина, угљених хидрата и липида, као и витамина, минерала и воде. У гастроинтестиналном систему кичмењака панкреас игра велику улогу у дигестији угљених хидрата, протеина и масти и своје секрете излучује на нивоу дванаестопалачног црева (дуоденума). Продукт јетре, жуч, такође се излучује у дуоденум и учествује у дигестији масти.

Дигестија у усној дупљи

Механичка обрада хране почиње у усној дупљи деловањем помоћних органа за варење (зуби). Мукозни секрет из пљувачних жлезда излива се у усну дупљу и има улогу у размекшавању и натапању хране. Поред механичке обраде, у усној дупљи почиње дигестија угљених хидрата, пре свега скроба, дејством ензима **птијалина** (α -амилаза) који разлаже скроб на малтозу и α -граничне декстрине, и масти које су унете у емулгованом облику (нпр. масти из мајчиног млека сисара) дејством **лингвалне липазе**.

Дигестија у желуцу

Садржај доспео из једњака даље подлеже дејству желудачних ензима. Гастричне жлезде желуца продукују ензим у виду зимогене (неактивне) форме – **пепсиноген**, који у киселој средини прелази у активну форму – **пепсин**. Овај ензим врши хидролизу протеина, тако што раскида пептидне везе. **Химозин** је ензим који је важан за дигестију протеина у желуцу код младунаца сисара. Као и пепсин, секретује се у облику зимогене форме – **прохимозин**, а за његову активацију одговорна је кисела средина желуца. Химозин катализује реакцију преласка казеиногена у казеин, који је главни протеин млека. Поред разградње протеина, у желуцу је у малој количини присутан ензим желудачна липаза који је задужен за разградњу масти. Овај ензим може да разграђује само масти унете у већ емулгованом облику (млеко, мајонез, сладолед, итд.).

Дигестија у цреву

Даље варење хране се наставља у дуоденуму где се уливају изводни канали жучне кесе и егзокриног панкреаса. Панкреасни сок садржи неколико ензима који су одговорни за разградњу протеина. **Панкреасна α -амилаза** хидролизује α -1-4 гликозидну везу скроба, раздваја га на малтозу и α -граничне декстрине. Панкреасне протеазе се секретују у зимогеној форми – **трипсиноген** и **химотрипсиноген**. Трипсиноген се у процесу интестиналне дигестије активира у присуству **цревне ентерокиназе** и прелази у форму **трипсина**. Химотрипсиноген прелази у активну форму **химотрипсин** у присуству трипсина. Ова два ензима спадају у ендопептидазе, док егзопептидазе представља група ензима **прокарбоксипептидазе** које активира трипсин и цревна ентерокиназа те прелази у активну форму **карбоксипептидаза**. Панкреасни сок садржи још и **рибонуклеазе** и **дезоксирибонуклеазе** који хидролизују нуклеинске киселине.

Жуч секретују ћелије јетре (хепатоцити) и она се складишти у жучној кеси (пацови немају жучну кесу). Жучне соли активирају панкреасну липазу и емулгују масти, чиме се повећава површина за дејство липазе која ће их даље разложити.

Финални процес дигестије дешава се на нивоу танког црева. **Брунерове жлезде** и **Либеркинове крипте**, луче цревни сок алкалног садржаја који у себи поседује ензиме. Амилаза и липаза су ензими који се у мањој мери сусрећу на овом нивоу дигестије. Највише заступљени ензими су дисахаридазе **малтаза**, **сахараза** и **лактаза**. Танко црево представља и место деловања **аминопептидазе** и **карбоксипептидазе**.

Продукти дигестије сложених макромолекула (моносахариди, аминокиселине и триглицериди) се на нивоу танког црева апсорбују у крв или лимфу и даље транспортују у организму.

3.2. ВЕЖБЕ

Варење код виноградарског пужа (*Helix pomatia* L.)

Узорковање цревног садржаја виноградарског пужа

Потребан материјал :

- пинцета
- маказе
- епрувета
- левак
- дестилована вода

Поступак вежбе

Напомена: један дан пре извођења вежбе, оставити животиње без хране и воде како би садржај ензима у цревном соку био што већи.

Животињи разорити љуштуру и пажљиво одвојити црево које се лако уочава због тамне боје која потиче од цревног садржаја (Слика 3.1.). Када се издвоји довољна дужина црева, пресећи га на једном крају и садржај излити у епрувету. Потребно је изоловати 1 ml цревног садржаја. Након тога, цревни садржај разблажити додавањем 1 ml дестиловане воде и добро промешати.



Слика 3.1. Поступак изоловања цревног садржаја виноградарског пужа

Доказивање присуства ензима у цревном садржају пужа

Потребан материјал :

- епрувете
- аутоматске пипете и наставци
- вата
- фибрин
- 5% NaOH
- раствор сахарозе
- раствор скроба
- биљно уље
- фенолфталеин

Поступак вежбе

Епрувете обележити бројевима од 1 до 4. У сваку епрувету додати 0,5 ml разблаженог садржаја црева пужа. У овако припремљене епрувете додати следеће компоненте:

епрувета 1	парче фибрина		
епрувета 2	0,5 ml раствора сахарозе		
епрувета 3	0,5 ml раствора скроба		
епрувета 4	0,5 ml биљног уља	1-2 капи фенолфталеина	1-2 капи 5% NaOH

Све епрувете добро промешати, зачепити ватом и ставити у водено купатило на 40°C, 40 минута. Повремено промешати садржај епрувета. Након инкубационог периода урадити следеће реакције:

Доказивање присуства протеиназе у цревном садржају пужа

Потребан материјал :

- 2,5% CuSO_4
- 5% NaOH

Поступак вежбе

По истеку инкубационог периода извадити прву епрувету из воденог купатила и урадити Биуретску реакцију. У раствор додати 0,5 ml 5% NaOH и неколико капи 2,5% CuSO_4 . Знак позитивне реакције је појава љубичасте боје раствора.

Доказивање присуства/одсуства амилазе и сахаразе у цревном садржају пужа

Потребан материјал :

- раствор Fehling I
- раствор Fehling II
- шпиритусна лампа

Поступак вежбе

По истеку времена извадити епрувете 2 и 3 и урадити Fehling-ову пробу. Направити смесу Fehling I и Fehling II (1:1) и додати у претходно припремљен раствор тако да смеша Fehling I и Fehling II буде у истој запремини као и раствор у епруветама. Епрувете загревати. Појава црвеног талога је знак присуства редукјујућих шећера.

Доказивање присуства липазе у цревном садржају пужа

Поступак вежбе

Током задатог инкубационог периода у четвртој епрувети, уколико је у цревном садржају присутна липаза, уље се разграђује на глицерол и више масне киселине.

Индикатор фенолфталеин у базној средини даје интензивно црвено обојење, док је у неутралној и киселој средини безбојан. Стога, смањење интензитета црвене боје због промене рН средине и потпуно ишчезавање црвеног обојења представљају доказ присуства одговарајућег ензима.

Варење код кокошке (*Gallus gallus domesticus* L.)

Потребан материјал :

- маказе
- конац за подвезивање
- епрувета
- игла

Поступак вежбе

Након декапитације кокошке, потребно је отворити абдомен и разгледати цревни тракт. Потребно је уочити вољку, жлездани и мишићни део желуца, дуоденум, панкреас, жучну кесу, танко и дебело црево.

Напомена: у што краћем року након декапитације подвезати део између жлезданог и мишићног дела желуца, као и део између мишићног желуца и дуоденума.

Пункцијом жучне кесе издвојити жуч у једну епрувету.

Одређивање рН вредности садржаја желуца и дуоденума

Потребан материјал :

- сахатно стакло
- пинцета
- маказе
- траке за мерење рН вредности

Поступак вежбе

Отворити желудац и дуоденум и издвојити мало садржаја на сахатно стакло. Одредити рН вредности садржаја жлезданог и мишићног дела желуца, као и садржаја дуоденума. Вредности записати у табелу 3.1.

Табела 3.1. рН вредност садржаја желуца и дуоденума

Химус	рН вредност
жлездани део желуца	
мишићни део желуца	
Дуоденум	

Припрема екстракта панкреаса и дуоденума

Потребан материјал :

- епрувете
- левци
- филтер папир
- газа
- тарионик
- кварцни песак
- физиолошки раствор

Поступак вежбе

Извадити део панкреаса (око 1 g). Мацерирати панкреас у тарионику уз постепено додавање 15 - 20 ml физиолошког раствора. 3/4 смесе профильтрирати кроз филтер хартију, а преосталу 1/4 кроз двоструку газу. Обе епрувете држати на леду.

Отворити дуоденум и испрати га од слузи. Скалпелом остругати слузокожу (око 1 g) и мацерирати у тарионику. Постепено додати 5-10 ml физиолошког раствора и цео садржај профильтрирати кроз филтер папир, на леду.

Доказивање присуства ензима панкреаса

Потребан материјал :

- епрувете
- аутоматске пипете и наставци
- вата
- фибрин
- 1% Na₂CO₃
- 5% NaOH
- раствор скроба
- раствор сахарозе
- биљно уље
- фенолфталеин

Поступак вежбе

Епрувете обележити бројевима од 1 до 4. У епрувете 1 - 3 додати 1 - 2 ml екстракта панкреаса добијеног филтрирањем кроз филтер папир, а у епрувету број 4 додати 1 - 2 ml екстракта панкреаса добијеног филтрирањем кроз газу. У овако припремљене епрувете додати следеће компоненте:

епрувета 1	парче фибрина	2,5 ml 1% Na ₂ CO ₃		
епрувета 2	0,5-1 ml раствора скроба			
епрувета 3	0,5-1 ml раствора сахарозе			
епрувета 4	0,5 ml биљног уља	1-2 капи фенолфталеин	1-2 капи 5% NaOH	3 капи жучи

Све епрувете добро промешати, зачепити ватом и ставити у водено купатило на 40°C, 40 минута. Повремено промешати садржај епрувета. Након инкубационог периода урадити следеће реакције.

Доказивање присуства протеиназе у екстракту панкреаса кокошке

Потребан материјал :

- 2,5 % CuSO_4
- 5% NaOH

Поступак вежбе

По истеку инкубационог периода извадити епрувету 1 из воденог купатила и урадити Биуретску реакцију. У раствор из прве епрувете додати 0,5 ml 5 % NaOH и неколико капи 2,5 % CuSO_4 . Знак позитивне реакције је појава љубичасте боје раствора.

Доказивање присуства/одсуства амилазе и сахаразе у екстракту панкреаса кокошке

Потребан материјал :

- раствор Fehling I
- раствор Fehling II
- шпиритусна лампа

Поступак вежбе

Направити смесу Fehling I и Fehling II (1:1) и додати у раствор друге и треће епрувете тако да смеса Fehling I и Fehling II буде у истој запремини као и раствор у епрувети. Епрувете загревати. Појава црвеног талоба је знак присуства редукујућих шећера.

Доказивање присуства липазе у екстракту панкреаса кокошке

Поступак вежбе

У четвртој епрувети у току инкубационог периода, ако је у екстракту панкреаса присутан ензим липаза, долази до разградње уља на глицерол и више масне киселине.

Индикатор фенолфталеин у базној средини даје интензивно црвено обојење, док је у неутралној и киселој средини безбојан. Стога, смањење интензитета црвене боје због промене рН средине и потпуно ишчезавање црвеног обојења представљају доказ присуства одговарајућег ензима.

Доказивање присуства/одсуства амилазе у садржају желуца и дуоденума

Потребан материјал :

- сахатно стакло
- Пастерова пипета
- Луголов раствор

Поступак вежбе

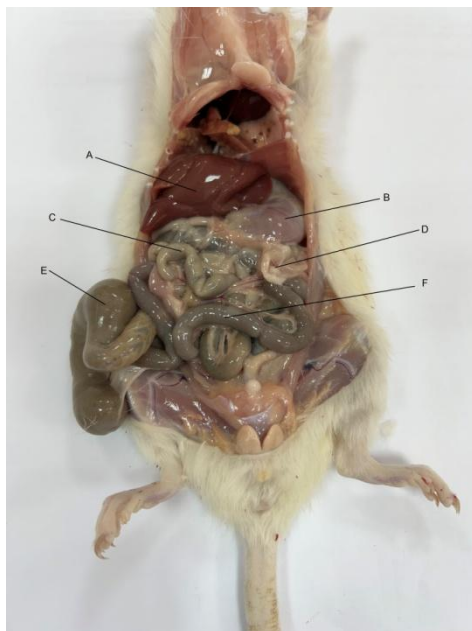
На једно сахатно стакло ставити малу количину садржаја желуца, а на друго садржај дуоденума и додати неколико капи Луголовог раствора. Уочити добијену боју раствора и закључити да ли је амилаза присутна или одсутна .

Варење код пацова (*Rattus norvegicus* L.)**Потребан материјал :**

- маказе
- конач за подвезивање
- пинцета

Поступак вежбе

Након декапитације пацова, отворити абдомен и разгледати цревни тракт. Потребно је уочити једњак, желудац, дуоденум, панкреас, јетру, танко и дебело црево (Слика 3.2.).



Слика 3.2. Дигестивни систем пацова. А- јетра, В- желудац; С- танко црево; D-панкреас; Е-цекум (саесит); F- дебело црево

Напомена: у што краћем року након декапитације направити три лигатуре, једну на улазу у желудац, другу на прелазу желуца у дуоденум и трећу на преласку дуоденума у остатак танког црева.

Одређивање рН вредности садржаја желуца и дуоденума

Потребан материјал :

- сахатно стакло
- пинцета
- маказе
- траке за мерење рН вредности

Поступак вежбе

Отворити желудац и дуоденум и издвојити малу количину садржаја на сахатно стакло. Одредити рН вредности садржаја желуца, као и садржаја дуоденума. Вредности записати у табелу 3.2.

Табела 3.2. рН вредност садржаја желуца и дуоденума

Химус	рН вредност
Желудац	
Дуоденум	

Припрема екстракта панкреаса, дуоденума и јетре

Потребан материјал :

- епрувете
- левци
- филтер папир
- газа
- тарионик
- кварцни песак
- физиолошки раствор

Поступак вежбе

Извадити панкреас. Мацерирати панкреас у тарионику уз постепено додавање 15 - 20 ml физиолошког раствора. 3/4 смесе профильтрирати кроз филтер хартију, а преосталу 1/4 кроз двоструку газу. Обе епрувете држати на леду.

Отворити дуоденум и испрати га од слузи. Скалпелом остругати слузокожу (око 1 g) и мацерирати у тарионику. Постепено додавати 5 - 10 ml физиолошког раствора и цео садржај профильтрирати кроз филтер папир, на леду.

Део јетре пренети у тарионик и мацерирати га уз додатак кварцног песка. Додавати постепено 10 ml физиолошког раствора. Садржај профильтрирати кроз филтер хартију.

Доказивање присуства ензима панкреаса

Оглед припремити по узору на доказивање присуства ензима панкреаса код кокошке.

Напомена: уместо жучи у четврту епрувету додати припремљен екстракт јетре.

Присуство/одсуство ензима пептидаза, амилаза, сахараза и липаза урадити по узору на протокол наведен у оквиру вежбе *Варење код кокошке*.

Простор за белешке

4. Физиологија екскреторног система

Запремина воде и састав хранљивих материја у телесним течностима су контролисани од стране различитих, пре свега нервних, интегришућих центара, који регулишу функцију екскреторних органа који уклањају одређене материје из организма, док друге враћају из уринарног филтрата назад у организам. На овај начин се одржава стабилност ванћелијске течности, што обезбеђује неометано функционисање ћелија.

Осмотска регулација представља регулацију укупне концентрације свих осмотски активних супстанци растворених у телесној течности. Будући да ћелија не може активно да транспортује воду, осмотска регулација се огледа у преносу растворених супстанци кроз ћелијску мембрану, мењајући осмотски градијент. **Јонска регулација** подразумева одржавање концентрације датог јона у ћелији. **Екскреција азота** је пут којим животиње излучују амонијак, уреу или мокраћну киселину као крајњи продукт катаболизма протеина.

Различити механизми омогућавају осмотску хомеостазу организма. Сунђери, као примитивне животиње, користе **контракtilне вакуоле** којима избацују штетне материје и вишак воде из организма директно у спољашњу средину. Друге простије животиње, као што су плџснати црви, имају **протонефридије** које представљају примитивни функционални аналог тубула бубрега кичмењака. Протонефридија се састоји из тубуле са пором (нефридиопора) на једном крају и терминалне ћелије на другом крају. Кроз канал протонефридије пролази течност коју усмеравају флагеле или цилије које се протежу од стране специјализованих ћелија. Неке врсте имају *пламене ћелије* које поседују сноп цилија, а друге врсте имају *соленоците* које имају једну до две флагеле које се протежу у лумен канала. Протонефридије имају главну улогу у осморегулацији, али немају могућност излучивања амонијака, па животиње избацују амонијак директно преко површине тела. **Метанефридије** се срећу код мекушаца и чланковитих црва. Већина мекушаца има једну метанефридију са кесастим проширењем, док чланковити црви имају по једну метанефридију у сваком телесном сегменту. Тубула метанефридије код чланковитих црва почиње нефростомом која сакупља течност из целома, течност пролази дуж канала који се завршава нефридиопором која је у контакту са спољашњом средином. Екскреторни органи ракова су **антеналне/максиларне жлезде** смештене у главеном региону. Свака жлезда састоји се од целомског мешка, дугачког изувијаног канала и бешике која се завршава екскреторном пором у контакту са спољашњом средином. Код инсеката, баланс јона и воде регулисан је преко функције **Малпигијевих судова**. То су тубуларне структуре које се изливају у задње црево, а на другом крају се слепо завршавају. Секрети тубуларних ћелија Малпигијевих судова производе примарни урин. Великом броју кичмењака централни орган за регулацију промета воде и јона јесте **бубрег**, међутим, многе врсте користе и друге органе као што су : шкрге, кожа и дигестивна слузокожа.

4.1. Бубрег кичмењака

Бубрези учествују у одржавању хомеостазе организма контролишући запремину и осмоларност, односно хемијски састав излученог урина. Основна функционална јединица бубрега је **нефрон**.

Број нефрона варира код различитих врста кичмењака (рибе –неколико десетина, човек – око милион). Нефрон започиње Малпигијевим телашцем у кори бубрега, у којем се одвија филтрација крви. Ово телашце се састоји из *Bowman-ове чауре* која обавија сплет капилара – *гломерул*. Bowman-ова чаура (проширени део тубула) се наставља на проксимални део тубуле која се у кори бубрега неколико пута увија и спушта у срж бубрега где гради *Хенлеову петљу*. Канал се даље проширује и гради дистални део тубуле који се улива у сабирне каналиће који се даље уливају у бубрежне чашице, а оне се настављају у бубрежну карлицу. Од сваког бубрега полази мокровод или уретер, којом се мокраћа одводи у мокраћну бешику из које се урин елиминише из организма.

Морске кошљорибе обично немају дисталне тубуле и имају релативно слабо развијен гломеруларни апарат за филтрацију, што се обично надокнађује активном секрецијом растворених супстанци. Неке морске рибе су агломеруларне. Нефрони слатководних кошљориба структурно су слични нефронима водоземаца и гмизаваца, изграђени су из гломерула и кратких тубула. Хенлеова петља је карактеристична само за птице и сисаре, док у нефронима осталих кичмењака изостаје.

У бубрезима сисара су заступљена два типа нефрона– *кортикални* и *јукстамедуларни*. Гломерули кортикалних нефрона смештени су у спољашњем делу кортекса и имају кратке Хенлеове петље, док јукстамедуларни нефрони имају гломеруле смештене у унутрашњем делу кортекса и дугачке Хенлеове петље које залазе дубоко у медулу бубрега. Ови нефрони реапсорбују већи проценат гломерулског филтрата и важни су за стварање концентрованог урина.

Крв у бубрег доспева преко бубрежне артерије која се грана у интерлобуларне артерије од којих се одвајају аферентне артериоле која се грана у капиларну мрежу – гломерул, унутар Bowman-ове чауре. Гломерул конвергира у еферентну артериолу, што је врло специфично јер капилари прелазе у артеријске судове на нивоу нефрона. На нивоу проксималних и дисталних тубула нефрона еферентна артериола прелази у још једну капиларну мрежу тзв. *перитубуларна капиларна мрежа*. Капилари се даље уливају у интерлобуларну вену из које крв доспева до бубрежне вене. У случају јукстамедуларних нефрона, еферентна артериола прелази у другу капиларну мрежу која улази у медулу бубрега и прати Хенлеову петљу, тзв. *ваза ректа (vasa recta)*. Прва капиларна мрежа – гломерулска капиларна мрежа омогућава ултрафилтрацију крви под високим притиском, док друга капиларна мрежа – перитубуларна и ваза ректа, омогућава реапсорпцију течности из ткива у капиларе и представља мрежу ниског притиска.

Филтрација крви и стварање примарног урина дешава се на нивоу гломерула. Филтрација се дешава кроз гломеруларну мембрану коју чини ендотел фенестрираних капилара, базална мембрана и подоцити. Подоцити представљају ендотелне ћелије које облажу капиларе гломерула и формирају филтрационе прорезе дуж зидова капилара. Мезенгијалне ћелије присутне у гломерулу, захваљујући присуству контрактилних елемената, могу да мењају пречник капилара и проток крви кроз њих. У примарни урин пролазе сви састојци крви осим протеина и еритроцита. По проласку кроз тубуларни систем нефрона, примарни урин трпи значајну промену састава и волумена. Натријум се реапсорбује на нивоу проксималних тубула, узлазног крака Хенлеове

петље и дисталних тубула, док се највећа количина калијума реапсорбује на нивоу проксималних тубула. На нивоу дисталних тубула, реапсорпција натријума је факултативна и одвија се под контролом хормона, а на вишим нивоима нефрона је облигаторна и одвија се активним транспортом. На нивоу проксималних тубула потпуно се реапсорбују неке органске материје као што су: глукоза, аминокиселине, витамини, хормони, као и 75% воде, али крајњи продукти метаболизма азотних једињења се избацују урином и само се незнатан део реапсорбује у крв (уреа, урска киселина и креатинин). У Хенлеовој петљи одвијају се процеси задужени за концентровање урина. Силазни крак врши реапсорпцију воде, а узлазни је непропустљив за воду и у том делу се реапсорбују електролити. Урин је на изласку из Хенлеове петље хипоосмотски у односу на плазму. На нивоу дисталних тубула наставља се концентровање урина, секретују се јони водоника, калијум и неки лекови.

4.1.1. Ендокрина регулација промета воде и електролита код сисара

Деловање неколико хормона је кључно за регулацију бубрежне функције: **антидиуретични хормон (вазопресин)**, **ангиотензин II**, **алдостерон**, атријални нетриуретични пептид и паратиреоидни хормон. Поред тога, бубрег синтетише **ренин**, еритропоетин и активни облик витамина Д_е.

Ренин се ослобађа из јукстагломеруларног апарата, као одговор на пад крвног притиска, што детектују барорецептори у артеријским судовима. Јукстагломеруларни апарат се састоји из јукстагломеруларних ћелија које луче ренин и налазе се у зиду аферентне артериоле. Поред ових ћелија у јукстагломеруларни апарат спада и макула денза (*macula densa*), ћелије дисталног тубула које налажу на јукстагломеруларне ћелије, и својим паракриним сигнаlima утичу на лучење ренина и гломерулску филтрацију. С повећањем концентрације ренина започиње каскада догађаја од којих је прва реакција прелазак ангиотензиногена у ангиотензин I чија се даља конверзија одвија у присуству ангиотензин конвертујућег ензима у ангиотензин II. Овај ензим делује на ћелије коре надбубрежне жлезде да синтетише и секретује хормон алдостерон. На нивоу нефрона, алдостерон делује на дисталне тубуле тако што повећава реапсорпцију натријума и воде у крв, а повећава и секрецију калијума у урин, што резултира повећањем крвног притиска.

Велики пораст у лучењу антидиуретичког хормона (вазопресин) се дешава услед пада волумена крви. Лучење овог хормона регулисано је од стране осморецептора који се налазе у антериорном делу хипоталамуса. Неуросекреторне ћелије са телима неурона у супраоптичком и паравентрикуларном нуклеусу хипоталамуса, луче вазопресин на нивоу неурохипофизе. Вазопресин даље путем крвотока доспева до дисталних тубула бубрега где стимулише реапсорпцију воде. Везивањем хормона за рецепторе на мембранама ћелија дисталних тубула, активира се сигнална каскада која за крајњи физиолошки одговор има уметање функционалних канала за воду (аквапорина) у мембрану бубрежних тубула, што доводи до веће реапсорпције воде и повећања крвног притиска.

4.2. Екскреција азотних материја

Крајњи продукти катаболизма угљених хидрата и липида су: угљен-диоксид (транспортује се циркулаторим системом до респираторних површина одакле се ослобађа у спољашњу средину) и вода (ћелије је задржавају, или се елиминише уколико је присутна у вишку). Проблем за ћелију могу да представљају крајњи продукти катаболизма протеина и нуклеинских киселина, пре свега амонијак, који је за већину животиња токсичан.

У зависности од тога који је крајњи продукт катаболизма протеина животиње можемо поделити на:

- **Амониотеличне** – крајњи продукт катаболизма протеина је **амонијак** (морски и слатководни бескичмењаци)
- **Уреотеличне** – крајњи продукт катаболизма протеина је **уреа** (адулти водоземаца, водене корњаче, сисари)
- **Урикотеличне** – крајњи продукт катаболизма протеина је **мокраћна киселина** (сувоземни бескичмењаци, птице, гмизавци)

Сисари производе уреу као основни екскреторни продукт катаболизма аминокиселина. Концентрација уреје зависи од физиолошког стања организма. Однос концентрације уреје у урину и у крви (серуму) је показатељ ефикасности филтрацијског притиска на нивоу гломерула. Код сисара се излучује и мокраћна киселина, али као крајњи продукт катаболизма нуклеинских киселина.

Креатинин је производ метаболизма мишића. У слободној форми налази се у крви и урину, а у највећој мери се излучује урином. Количина креатинина је у директној корелацији са мишићном масом, те је брзина стварања креатинина у организму константна. Концентрација креатинина у плазми је одређена равнотежом између његовог стварања и излучивања. С обзиром на то да је брзина стварања креатинина у организму константна, а количина његове бубрежне екскреције зависи од гломерулске филтрације, онда је и концентрација креатинина у серуму директан показатељ гломерулске филтрације.

4.3. ВЕЖБЕ

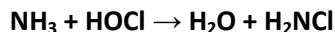
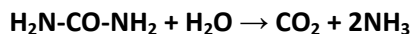
Одређивање концентрације уреје у серуму методом по Berthelot-у

Потребан материјал :

- | | |
|-------------------------------|--------------------------------|
| • раствор уреазе | • крвни серуми |
| • хипохлоритни раствор | • дестилована вода |
| • фенол-нитропрусидни раствор | • епрувете/кивете |
| • стандардни раствор уреје | • аутоматске пипете и наставци |

Поступак вежбе

Метода се заснива на разградњи урее под дејством ензима уреазе на угљен-диоксид и амонијак. Настали амонијак реагује са хипохлоритом, при чему се формира хлорамин и вода.



Настали хлорамин даље реагује са фенолом, у присуству нитропрусида као катализатора, при чему се формира индофенол, једињење плаве боје. Интензитет плаве боје је пропорционалан количини урее у узорку који се анализира.

Прављење стандардне криве

Седам епрувета обележити бројевима од 1 до 7. За формирање стандардне криве користимо раствор стандарда урее, чија је концентрација 5 mmol/l. Од поменутог стандарда направити серију разблажења по следећем протоколу:

Табела 4.1. Поступак прављења стандардне криве урее

	стандард урее	дестилована вода	коначна концентрација
стандард 1	0,4 ml раствора урее (5 mmol/l)	/	5 mmol/l
стандард 2	0,2 ml стандарда 1	0,2 ml	2,5 mmol/l
стандард 3	0,2 ml стандарда 2	0,2 ml	1,25 mmol/l
стандард 4	0,2 ml стандарда 3	0,2 ml	0,625 mmol/l
стандард 5	0,2 ml стандарда 4	0,2 ml	0,3125 mmol/l
стандард 6	0,2 ml стандарда 5	0,2 ml	0,1562 mmol/l
стандард 7	0,2 ml стандарда 6	0,2 ml	0,078 mmol/l

Напомена: након сваког додавања раствора у епрувету, добро промешати на вортекс мешалици.

Узети 11 нових епрувета. Прву обележити као слепу пробу (СП) и додати 0,025 ml дестиловане воде. Наредне епрувете обележити бројевима од 1 до 7. У прву епрувету додати 0,025 ml садржаја првог стандарда (стандард 1 из табеле). У другу епрувету додати 0,025 ml разблаженог стандарда (стандард 2 из табеле) и тако редом.

Узорке серума рибе, птице, пацова и говечета разблажити 10 пута (0,1 ml серума и 0,9 ml дестиловане воде). У епрувете 8 - 11 додати по 0,025 ml разблаженог узорка.

У све епрувете (укључујући слепу пробу, стандардне растворе и узорке) додати 0,1 ml ензима уреазе.

Епрувете затворити и ставити у водено купатило на 37°C, 15 минута. Током периода инкубације ензим уреазе каталише хидролизу урее до амонијака и карбамата. Даље се карбамат спонтано разлаже на угљен-диоксид и амонијак.

Након истека времена инкубације, извадити епрувете и у сваку додати 5 ml хипохлоритног реагенса и 5 ml фенолног нитропрусидног реагенса. Епрувете затворити и вратити у водено купатило још 20 минута. Мерити вредност апсорбанце добијених раствора на таласној дужини 640 nm помоћу спектрофотометра. Очитане вредности апсорбанце пропорционалне су садржају насталог индофенола, тј. првобитном садржају урее у стандарду/узорку.

Конструисати стандардну криву на основу концентрације стандардних раствора и вредности апсорбанци добијених на спектрофотометру. На x-оси означити вредности концентрације стандарда, на y-оси вредности очитаних апсорбанци стандардних раствора. Спајањем тачака добија се стандардна крива, помоћу које одређујемо вредности концентрације урее у узорцима. Узети у обзир почетно разблажење узорка.

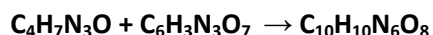
Одређивање концентрације креатинина у серуму методом по Jaffe-у

Потребан материјал :

- аутоматске пипете и наставци
- епрувете
- серум пацова
- стандард креатинина
- 5% трихлорсирћетна киселина
- раствор пикринске киселине
- 2 M NaOH
- 10% NaOH
- Jaffe-ов реагенс
- дестилована вода

Поступак вежбе

Jaffe-ова метода се заснива на реакцији креатинина са пикринском киселином у алкалном окружењу при чему настаје једињење наранџасте боје која потиче од комплекса креатинин пикрата, чији се интензитет може одредити колориметријски мерењем апсорбанце на 520 nm.



Ради успешније реакције потребно је уклонити протеине из узорка серума, што постижемо таложењем протеина трихлорсирћетном киселином.

Пре почетка извођења вежбе потребно је припремити раствор пикринске киселине и Jaffe-ов реагенс.

Раствор **пикринске киселине** припремити растварањем 7,5 g пикринске киселине у 500 ml дестиловане воде. Раствор је засићен, тако да ће на дну остати талог, те га је пре употребе потребно профильтрирати.

Jaffe-ов реагенс се припрема мешањем 5 ml пикринске киселине са 1 ml 10% NaOH. Раствор је неопходно направити непосредно пре извођења реакције.

У једну епрувету додати 5 ml серума пацова, 4,5 ml 5% трихлорсирћетне киселине, промешати и оставити 5 минута на собној температури. Узорак центрифугирати 10 минута на 3500 обртаја/мин. За узорак ослобођен од протеина користити добијени супернатант.

Раствор следеће пробе, стандарда и узорка припремити на следећи начин:

	Слепа проба	Стандард	Узорак (серум)
дестилована вода	4,5 ml	4,5 ml	
стандард креатинина (2 mg/ml)			4 ml
узорак (без протеина)			0,5 ml
Jaffe-ов реагенс	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml
2M NaOH			0,5 ml

Након 10 минута измерити апсорбанце на спектрофотометру на 520 nm. На основу очитаних вредности апсорбанци, израчунати концентрацију креатинина у узорку.

Простор за белешке

5. Репродуктивни систем сисара

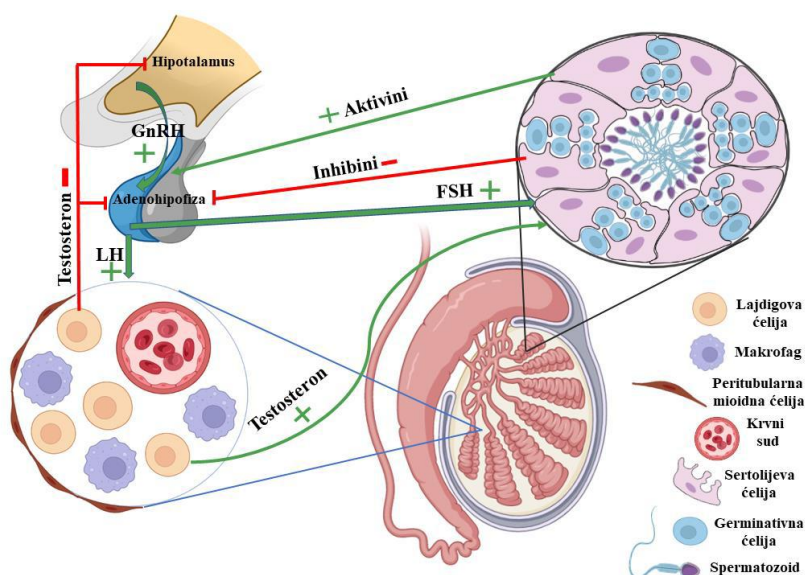
Вишеструке активности ћелија, ткива и органа у телу координисане су узајамним дејством неколико типова хемијских медијатора: неуротрансмитера, ендокриних хормона, неуроендокриних хормона, паракрина, аутокрина, цитокина. Ендокрини хормони преносе се циркулаторним системом до циљних ћелија у телу, где се везују за рецепторе и иницирају бројне реакције. Неки ендокрини хормони утичу на различите врсте ћелија у телу. Други хормони утичу углавном на специфична циљна ткива јер ова ткива имају обиље рецептора за дати хормон. Вишеструки хормонски системи играју кључну улогу у регулацији скоро свих функција тела, укључујући метаболизам, раст и развој, равнотежу воде и електролита, понашање, репродукцију, итд. У основи, све хормонске молекуле, по својој природи, спадају у три групе: протеини и полипептиди, стероиди и деривати аминокиселина. Иако концентрације многих хормона у плазми флукутирају као одговор на различите стимулусе који се јављају током дана, сви до сада проучавани хормони су помно контролисани. У већини случајева, ова контрола ради се путем негативне повратне спреге, механизма који обезбеђује одговарајући ниво хормона усмерен ка циљном ткиву. Након што стимулус изазове ослобађање хормона, стања или производи који су резултат деловања хормона имају тенденцију да потисну његово даље ослобађање. Другим речима, хормон има ефекат негативне повратне спреге како би се спречила прекомерна секреција хормона или прекомерне активности у циљном ткиву. Контролисана варијабла понекад није стопа секретованог хормона већ степен активности циљног ткива. Стога, само када активност циљног ткива порасте на одговарајући ниво, повратни сигнали ће до ендокрине жлезде постати довољно моћни да успоре даље лучење хормона. Повратна регулација хормона може се појавити на свим нивоима, укључујући транскрипцију гена и транслационе кораке укључене у синтезу хормона, као и кораке укључене у обраду хормона или ослобађање ускладиштених хормона.

Опстанак сваке врсте захтева усклађени развој и функционисање репродуктивног система. Овај комплексан процес интеграције физиолошких механизма контролисан је од стране ендокриног и нервног система. Важну улогу у развоју, функционисању и регулацији репродуктивног система имају хипоталамус и хипофиза. Хипофиза је мала жлезда, која лежи у sella turcica, коштаном шупљини на бази мозга, а повезана је са хипоталамусом хипофизном дршком. Физиолошки гледано, хипофиза се састоји од: предњег режња хипофизе, такође познатог као аденохипофиза, и задњег режња хипофизе, илити познатог као неурохипофиза. Између њих је мала, релативно аваскуларна зона, pars intermedia, која је много мање развијена код људи али је већа и много функционалнија код неких нижих животиња. Секреција хормона хипофизе под контролом је хормонских или нервних сигнала хипоталамуса. Секрецију хормона предњег режња хипофизе контролишу тзв. ослобађајући или инхибирајући хормони хипоталамуса који се луче унутар хипоталамуса а затим спроводе до предњег режња хипофизе кроз ситне крвне судове тзв. хипоталамо-хипофизни портни систем. У предњем режњу хипофизе, ови ослобађајући и инхибирајући хормони делују на циљне ћелије жлезде и тиме контролишу њихово лучење. Неурони хипоталамуса који синтетишу и луче ослобађајуће и инхибирајуће хормоне почињу у различитим деловима хипоталамуса и шаљу своја нервна влакна на eminentia mediana,

продужетак ткива хипоталамуса у дршку хипофизе. Завршеци ових влакана се разликују од већине завршетака у централном нервном систему, будући да у њиховој функцији није пренос сигнала са једног неурона на други већ да лаче хипоталамо-ослобађајуће и -инхибирајуће hormone. Ови hormone се одмах апсорбују у хипоталамо-хипофизни портни систем и преносе се директно у синусе предњег режња хипофизе. Функција ослобађајућих и инхибирајућих hormone је да контролишу секрецију hormone предњег режња хипофизе. Један од ослобађајућих hormone хипоталамуса је и гонадотропин-ослобађајући hormone (engl. Gonadotropin-releasing hormone, GnRH), који изазива ослобађање два гонадотропна hormone предњег режња хипофизе, лутеинизирајући hormone (engl. Luteinizing hormone, LH) и фоликулостимулирајући hormone (engl. Follicle-Stimulating Hormone, FSH). Код мужјака, хипоталамус показује тонични образац секреције hormone, док код женки постоји циклични образац секреције, што резултира цикличним променама у репродуктивном систему.

5.1. Мушки репродуктивни систем

Репродуктивна функција значајно се мења током живота. Координација хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине неопходна је за нормалну функцију тестиса код мужјака, укључујући нормалну продукцију тестостерона и мушку фертилност. Пулсативна секреција гонадотропин-ослобађајућег hormone (engl. Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) из хипоталамуса стимулише биосинтезу хипофизних гонадотропина, лутеинизирајућег hormone (engl. Luteinizing hormone, LH) и фоликулостимулирајућег hormone (engl. Follicle-Stimulating Hormone FSH), који заузврат одржавају интрагонадалну продукцију тестостерона и сперматогенезу. Механизам негативне повратне спреге, контролисан довољно повећаном количином тестостерона, одговоран је за смањење секреције GnRH из хипоталамуса и гонадотропина у циркулацију из хипофизе.



Слика 5.1. Шематски приказ хипоталамо-хипофизно-гонадалне осовине мужјака

Тестиси су изграђени од семиниферних тубула, изувијаних каналића дуж којих су распоређене герминативне ћелије у различитим степенима развоја, као и интерстицијалног ткива које се налази између семиниферних тубула. Зидови семиниферних тубула обложени су герминативним ћелијама и Сертолијевим ћелијама. Сертолијеве ћелије су велике и пружају се од базалне мембране тубула до лумена канала. Суседне Сертолијеве ћелије су близу базалне мембране и чврсто су повезане, стварајући крвно-тестикуларну баријеру која спречава пролазак великих молекула из интерстицијалног ткива у лумен тубула. Семиниферне тубуле се завршавају у *rete testis* и заједно дају *ductuli efferens* који спроводе тестикуларну течност и сперматозоиде у епидидимис.

На епидидимису разликујемо главу (*caput*), тело (*corpus*) и реп (*cauda*). Глава епидидимиса прима сперматозоиде из *ductuli efferens*, који затим пролазе кроз тело епидидимиса, након чега доспевају у реп у коме се и депонују. Сперматозоиди који напуштају тестис и доспевају у главу епидидимиса нису покретни, и тиме нису способни да оплоде јајну ћелију. Тек након проласка кроз епидидимис сперматозоиди сазревају, стичу прогресивну покретљивост и способност пенетрације у ооциту, док се њихова коначна матурација завршава у женском репродуктивном тракту у процесу капацитације. Сперматозоиди из репа улазе у *vas deferens* (семеовод), а затим у уретру. *Vas deferens* транспортује зреле сперматозоиде од тестиса до спајања са каналима семених везикула, уз додатак садржаја семених везикула, до уретре. Даље се сперматозоиди транспортују изван репродуктивног система путем ејакулације, у склопу семене течности.

Семене кесице су највећи акцесорни органи мужјака. Основна функција семених кесица је њихов допринос у формирању семиналне плазме код већине сисарских врста. Састоје се од серије тубуларних алвеола обложених веома активним секреторним епителом. Семене кесице екскретују семену течност која садржи зреле сперматозоиде и семену плазму.

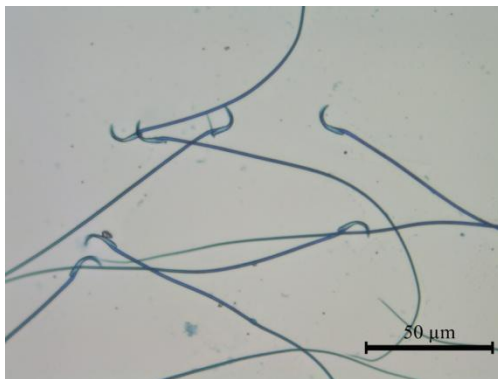
Простата се налази у простору испод мокраћне бешике и изнад перинеалне мембране. Основна функција простате је секреција и магационирање флуида који је компонента семене течности. Током ејакулације простата истискује флуид у уретрални канал и заједно са остатком садржаја чини сперму. Уретрални канал пролази од уринарног мехура кроз центар простате до пениса омогућавајући проток сперме и урина.

5.1.1. Сперматогенеза и грађа сперматозоида

Сперматогенеза, која код људи траје 74 дана, док код пацова траје 54 дана, представља процес који је неопходан за финалну диференцијацију сперматогонија у сперматозоиде и укључује три различите функционалне фазе које се дешавају у семиниферним тубулама тестиса: митоза, мејоза и спермиогенеза. Високо комплексна серија молекуларних догађаја током сперматогенезе захтева одговарајућу интеракцију између Сертолијевих, герминативних и тубуларних ћелија епитела, и интегритет крвно-тестикуларне баријере. Сперматогоније су у семиниферним тубулама лоциране у близини ламине проприје и у блиском су контакту са Сертолијевим ћелијама. FSH-индуковани фактори раста пореклом од Сертолијевих ћелија стимулишу диференцијацију сперматогонија.

Сперматогоније митотичком деобом дају једну нову сперматогонију и једну примарну сперматоцит. Из примарне сперматоците настаће две секундарне сперматоците, а из њих мејотичком деобом настају четири сперматиде, са хаплоидним бројем хромозома. Последња фаза, спермиогенеза, есенцијална је за диференцијацију сперматозоида. Током спермиогенезе, хаплоидне округле сперматиде пролазе структурне и функционалне промене. Сперматиде немају способност деобе и њихова прогресивна трансформација траје 23 дана код човека, 22 дана код пацова и 14 дана код мишева. Трансформација сперматиде укључује процесе морфолошке и функционалне диференцијације укључујући формирање акрозома, кондензацију хроматина и елиминацију вишка цитоплазме. Диференцијација сперматиде у сперматозоиде подразумева бројне догађаје као што су паковање ДНК са протаминима, формирање акрозома и вратног дела као и формирање репа.

Сперматозоид чине два главна одељка, глава и реп (Слика 5.1.). Морфолошке особине сперматозоида, укључујући облик главе и дужину репа, разнолики су код сисара. Углавном ширина и дужина главе сперматозоида варирају због варијација у величини и организацији акрозома и једра. Глава сперматозоида садржи хаплоидни нуклеус, са густо спакованим хроматином, акрозом и егзоцитичне грануле са ензимима који обезбеђују пенетрацију сперматозоида до јајне ћелије. Екстрануклеарни и екстраакрозомални региони присутни су у главеном региону сперматозоида.



Слика 5.1. Обојен препарат сперматозоида пацова

Такође, присутни су и цитоплазматски одељци дефинисани мембраном акрозома, једарном мембраном и ћелијском мембраном. С друге стране, реп сперматозоида повезан је са главеним регионом вратним делом и може бити подељен у три сегмента: средишњи део, главни део и врх репа. Вратни део је најближи глави и садржи дегенерисане центриоле, које имају мање структурних карактеристика и садрже мање протеина у односу на типичне центриоле у соматским ћелијама. Средишњи део дефинисан је цитоскелетним структурама окруженим митохондријама. Главни део репа сперматозоида садржи фиброзни омотач који окружује цитоскелет. Врх сперматозоида представља завршни део и наставак је главног дела без икаквих додатних структура. Дужина вратног дела и завршног дела репа је најчешће веома мала, док дужине средишњег и главног дела варирају код различитих врста сисара.

5.2. ВЕЖБЕ

Релативна маса одабраних репродуктивних органа мужјака пацова

Потребан материјал :

- прибор за дисекцију
- петри посуда
- филтер папир
- физиолошки раствор
- вага

Поступак вежбе

Адултном мужјаку пацова измерити телесну масу. Након декапитовања животињу поставити дорзално на подлогу за дисекцију. Подићи кожу на средини вентралне површине користећи пинцету. Сећи кожу, поткожне мишиће и трбушни зид тупим делом маказа окренути надолу. Сећи према дну ребара, а затим у другом правцу према гениталним отворима. Прегледати репродуктивне органе и пажљиво изоловати оба тестиса и измерити их, сваки тестис посебно. Уочити и изоловати семене везикуле. Измерити масу пуних семених везикула, а затим истиснути њихов садржај и измерити масу празних семених везикула. Уочити и изоловати вентралну простату и измерити њену масу, а затим уочити и изоловати дорзалну простату и измерити њену масу. Приликом изолације, органе очистити од околног ткива и затим их мерити на ваги. Изоловане органе чувати у петри посуди, на филтер папиру натопљеном физиолошким раствором. Резултате мерења унети у табелу 5.1. у виду апсолутних вредности, а затим израчунати релативне вредности масе појединих органа у односу на телесну масу. Вредности изразити на 100 g телесне масе животиње.

Табела 5.1. Апсолутна и релативна маса одабраних репродуктивних органа мужјака пацова

Телесна маса животиње (ТМ): _____

	Леви тестис	Десни тестис	Семене везикуле (пуне)	Семене везикуле (празне)	Вентрална простата	Дорзална простата
Апсолутна маса (mg)						
Релативна маса (mg/100 g ТМ)						

$$\text{Релативна маса органа} = \frac{\text{апсолутна маса органа [mg]}}{\text{ТМ [g]}} * 100$$

Изолација и одређивање броја сперматозоида каудалног дела епидидимиса пацова

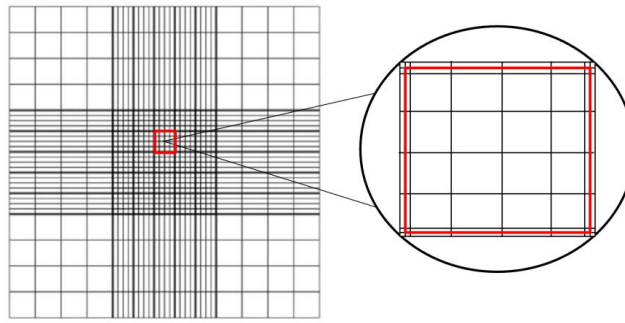
Потребан материјал :

- прибор за дисекцију
- филтер папир
- Петри посуде
- игла (25G)
- водено купатило
- епрувета запремине 12 ml
- медијум за изолацију и презервацију сперматозоида (1% M199 у HBSS са додатком 20 mM HEPES buffer и 5% BSA)

Поступак вежбе

Коришћењем адултног мужјака пацова из претходне вежбе изоловати каудални део епидидимиса. Изолацију сперматозоида из каудалних епидидимиса радити према процедури прописаној од стране Светске здравствене организације уз модификације за изолацију сперматозоида пацова. Каудалне епидидимисе након жртвовања животиње брзо извадити, ставити на филтер папир и околно масно ткиво уклонити. Тако очишћене епидидимисе ставити у петри посуду са 4 ml медијума за изолацију и презервацију сперматозоида и боцкати их иглом да би омогућили сперматозоидима да се ослободе у медијум током инкубације од 10 минута на 37°C у воденом купатилу. Након инкубације, сперматозоиде који су ослобођени у медијум сакупити у епрувету. Суспензију сакупљених сперматозоида центрифугирати 5 минута/700 g на собној температури. Супернатант уклонити, а талог сперматозоида ресуспендовати у 5 ml медијума. Одредити број и концентрацију сперматозоида коришћењем Neubauer-ове коморе (хемоцитометра).

Neubauer-ова комора користи се за бројање различитих ћелија, између осталог и сперматозоида. Изглед мрежице приказан је на Слици 5.2. У зависности од разблажења узорка и броја сперматозоида, броји се у различитим деловима коморе. Због прецизности коначног резултата, потребно је избројати најмање 200 сперматозоида. Броје се само цели сперматозоиди, с главом и репом, при чему је посебно важно да се један исти сперматозоид не броји више пута. Граница једног квадратића (0,2 mm x 0,2 mm) одређена је средњом од три линије које дефинишу квадрат (Сл. 5.2, црвена линија на десном панелу). Броје се сви сперматозоиди унутар тог централног квадрата (унутар црних линија), као и они чије су главе између две унутрашње линије. Не броје се сперматозоиди чије су главе између две спољашње линије. Сперматозоиди чији је највећи део главе на централној линији броје се само ако је та линија доле или лево, а не броје се ако је линија горе или десно. У зависности од тога у колико квадрата коморе се сперматозоиди броје, као и од тога колико пута је узорак претходно разблажен, примењује се одговарајући начин израчунавања броја и концентрације сперматозоида. Прво се, имајући у виду запремину узорка у коме се је бројало (површина x 0.1 mm дубина коморе) израчуна број сперматозоида у тој запремини. Уколико је узорак разблажен вредност се помножи одговарајућим разблажењем, а даљим прерачунавањем резултат се може изразити као број сперматозоида у једном mm³ (μl), или као број сперматозоида у једном ml.



Слика 5.2. Изглед мрежице на Neubauer-овом хемоцитометру

Пример рачунања у случају да се бројало у 5 квадрата централног квадрата:

Хемацитометар је дубок 0,1 mm, а 25 великих квадрата представљају површину од 1 квадратног милиметра. Запремина 25 квадрата је 0,1 μ l. Ако су сперматозоиди бројани у 5 квадрата, пребројани су у 0,02 μ l ($0,1/5=0,02$). Стога је потребно помножити број пребројаних сперматозоида у 5 квадрата са 50.000 ($0,05 \cdot 10^6$) како бисмо одредили колико би сперматозоида било у 1 ml ($1000/0,02=50.000$; обично изражавамо концентрацију сперматозоида у броју/ml). Међутим, како бисте добили концентрацију оригиналног узорка сперматозоида, морате такође добијену бројку помножити фактором разблажења (R). Једначина која следи користи се за рачунање броја сперматозоида у 5 квадрата ($X(5)$):

$$\text{Концентрација [број/ml]} = R * X(5) * 0,05 * 10^6$$

Укупан број сперматозоида добија се множењем броја сперматозоида у 1 ml бројем ml суспензије сперматозоида у епрувети.

5.3. Женски репродуктивни систем

За разлику од мужјака, репродуктивни систем женки карактерише изражена ритмичност промена које се понављају у одређеном интервалу, а резултат су цикличног образа електричне, а потом и секреторне активности GnRH неурона хипоталамуса, што условљава цикличну секрецију гонадотропних хормона хипофизе, затим и хормона оваријума. Ове цикличне промене се могу посматрати као периодичне припреме за фертилизацију и трудноћу. Гонадотропни хормони (FSH и LH) одржавају активност гонада и иницирају цикличну синтезу полних стероидних хормона. Ове цикличне промене у образцу секреције хормона оваријума даље диктирају промене на свим стероид-зависним органима и означене су као еструсни циклус код свих сисара или као менструални циклус код примата.

Женски репродуктивни систем се састоји од пара јајника повезаних са јајоводима који су даље повезани или са једним утериним телом (човек) или са два одвојена утерина тела (глодари). Утерус је повезан са цервиксом како би га раздвојио од вагиналног канала. Код глодара, јајници су обавијени бурзом (танком мембранозном структуром) како би се заштитили од перитонеалног окружења. Бурза није континуирана код људи, што омогућава могућност ектопичне трудноће у перитонеуму. Код већине глодара, два одвојена утерина тела воде у један цервикс. Међутим, код хрчака и веверица, бикорнуатни утерус води у два цервикална канала.

Промене оваријума које се јављају током менструалног циклуса потпуно зависе од гонадотропних хормона FSH и LH. У одсуству ових хормона, јајници остају неактивни, што је случај током целог детињства, када скоро да нема секретованих гонадотропних хормона хипофизе. У доби од 9 до 12 година, хипофиза почиње да лучи прогресивно више FSH и LH, што доводи до почетка нормалног месечног циклуса који почињу између 11 и 15 година (код жена). Овај период промене назива се пубертет, а време од првог менструалног циклуса назива се менарха. FSH и LH стимулишу своје циљне ћелије оваријума комбиновањем са високо специфичним FSH и LH рецепторима на мембрани циљних ћелија оваријума. Заузврат, активирани рецептори повећавају секреторну активност као и раст и пролиферацију ћелија.

По рођењу, свака јајна ћелија је окружена једним слојем гранулоза ћелија - примордијални фоликул. Током детињства, гранулоза ћелије обезбеђују исхрану јајне ћелије која се одржава у свом примордијалном стању у стадијуму профаза I мејотичке деобе. Затим, након пубертета, када почиње значајно лучење FSH и LH из предњег режња хипофизе, оваријуми, заједно са неким од фоликула унутар њих, почињу да расту. Прва фаза раста фоликула је умерено повећање саме јајне ћелије, која се двоструко до троструко повећава у пречнику. Затим следи раст додатних слојева гранулоза ћелија у неким фоликулима. Ови фоликули су познати као примарни фоликули.

Током првих неколико дана сваког менструалног циклуса, концентрације и FSH и LH бивају благо до умерено повећане, при чему је повећање FSH нешто веће од LH и претходи му неколико дана. Ови хормони, посебно FSH, изазивају убрзани раст од 6 до 12 примарних фоликула сваког месеца (код жена). Почетни ефекат је брза пролиферација гранулоза ћелија, што доводи до много више слојева ових ћелија. Поред тога, у неколико слојева изнад гранулоза ћелија, развија се друга маса

ћелија које се називају тека ћелије. Након ране пролиферативне фазе раста, која траје до неколико дана, маса гранулоза ћелија лучи фоликуларну течност која садржи високу концентрацију естрогена. Акумулација ове течности изазива појаву антрума унутар масе гранулоза ћелија. Рани раст примарног фоликула до антралног стадијума се стимулише углавном самим FSH. Долази до убрзаног раста, што доводи до још већих фоликула званих везикуларни фоликули. После недељу или више дана раста - али пре него што дође до овулације - један од фоликула почиње да прераста све остале; преосталих 5 до 11 фоликула у развоју инволуирају (процес који се назива атрезија), и ови фоликули постају атретични. Најчешће један фоликул достиже пречник од 1 до 1,5 cm у време овулације и назива се зрели фоликул. Овулација, код жене која има нормалан менструални циклус од 28 дана, се најчешће јавља 14 дана након почетка менструације. LH је неопходан за коначни раст фоликула и овулацију. Без овога хормона, чак и када су доступне велике количине FSH, фоликул неће напредовати до фазе овулације. Отприлике два дана пре овулације, стопа лучења LH од стране предњег режња хипофизе значајно расте (6 до 10 пута) и достиже врхунац око 16 сати пре овулације. FSH се такође повећава око два до три пута у исто време, а FSH и LH делују синергистички да изазову брзо отицање фоликула током последњих неколико дана пре овулације. LH такође има специфичан ефекат на гранулоза и тека ћелије, претварајући их углавном у ћелије које луче прогестерон. Дакле, стопа лучења естрогена почиње да опада око један дан пре овулације, док све веће количине прогестерона бивају секретоване. Управо у овом окружењу брзог раста фоликула, смањења лучења естрогена након продужене фазе прекомерног лучења естрогена, и покретања лучења прогестерона, долази до овулације. Без почетног преовулаторног пораста LH, овулација се неће десити.

Током првих неколико сати након избацивања јајне ћелије из фоликула, преостале гранулоза и тека ћелије се брзо мењају у ћелије лутеина. Увећавају се у пречнику два или више пута и постају испуњене липидним инклузијама које им дају жућкасти изглед. Овај процес се назива лутеинизација, а укупна маса ћелија заједно се назива жуто тело. Естрогени и прогестерон излучени од стране жутог тела, имају повратне ефекте на аденохипофизу, одржавајући ниску стопу секреције FSH и LH. Поред тога, лутеинске ћелије луче мале количине хормона инхибина. Инхибини инхибиторно делују на нивоу аденохипофизе, посебно на секрецију FSH. Ниске концентрације FSH и LH у циркулацији доводе до потпуног дегенерисања жутог тела. У овом тренутку, изненадни престанак лучења естрогена, прогестерона и инхибина жутог тела уклања повратну инхибицију аденохипофизе, омогућавајући јој да почне поново да лучи повећане количине FSH и LH. FSH и LH покрећу раст нових фоликула, започињући нови циклус оваријума.

Повезан са месечном цикличном производњом естрогена и прогестерона оваријума је циклус ендометријума материце који се дешава у следећим фазама: пролиферација ендометријума материце, развој секреторних промена у ендометријуму и десквамација ендометријума, што је познато као менструација. На почетку сваког месечног циклуса, већина ендометријума је деквамирана менструацијом. После менструације остаје само танак слој строме ендометријума и једино епителне ћелије које су преостале су оне које се налазе у преосталим дубљим слојевима ендометријума. Под утицајем естрогена, које оваријум лучи у све већој количини током првог

дела циклуса оваријума, ћелије строге и епителне ћелије брзо пролиферишу. Површина ендометријума се реепителизира у року од 4 до 7 дана након почетка менструације. Затим, током наредних недеља и по дана, пре него што дође до овулације, ендометријум се у великој мери повећава у дебљини. У време овулације, ендометријум је дебео од 3 до 5 милиметара.

5.3.1. Еструсни циклус

Цикличне промене у току еструсног циклуса уочавају се и на епителу вагине. Под утицајем естрогена, долази до корнификације вагиналног епитела, док прогестерон доводи до секреције мукуса, пролиферације епитела и дијапедезе леукоцита. Међутим, ове промене у току менструалног циклуса нису јасно изражене, за разлику од еструсног циклуса пацова где се на основу садржаја и изгледа ћелија на препарату вагиналног бриса тачно могу разграничити поједине фазе еструсног циклуса. Дужина еструског циклуса код већине често коришћених лабораторијских глодара је краћа (4 – 5 дана) у поређењу са мање коришћеним глодарима (заморци) који показују дужи циклус (више од две недеље). Један од фактора који бива у основи продуженог периода еструсног циклуса код замораца је формирање функционалног жутог тела у одсуству парења. На основу цитологије вагиналног бриса и пропорције вагиналних епителних ћелија, кератинизованих епителних ћелија и леукоцита, еструсни циклус глодара може се поделити у четири фазе.

У стандардном циклусу од четири дана, редослед фаза укључује:

- 1) **Проеструс**, дан преовулације у којем преовлађују овалне епителне ћелије са централно постављеним нуклеусом.
- 2) **Еструс**, дан овулације и фаза пријемчивости за парење, при чему долази до корнификације епителијалних ћелија под утицајем естрогених хормона. Корнификоване ћелије су мртве, па слабо примају боју и на препарату вагиналног бриса се виде као безбојне или врло бледо обојене. Неправилног су облика и већег дијаметра од епителијалних ћелија.
- 3) **Метеструс**, дан непријемчивости у којем постоји мешавина кератинизованих епителних ћелија и леукоцита.
- 4) **Диеструс**, још један дан непријемчивости при чему се у вагиналном брису може запазити мноштво леукоцита, као и присуство епителијалних и корнификованих ћелија. Прогестерон је одговоран за десквamacију орожног епитела, а поред тога стимулише дијапедезу леукоцита ка месту десквamacије, тако да леукоцити доминирају на препарату вагиналног бриса. Присуство великог броја леукоцита је свакако физиолошки веома оправдано, јер штити огољени ендометријум утеруса од директног контакта са микроорганизмима.

Еструсни циклус код сисара се, у зависности од врсте, може понављати неколико пута током сезоне (уколико није дошло до оплодње). Такве животиње називају се **полиеструсне**. На пример код кобиле се еструс јавља сваких 21 дан, код овце сваких 16, а код пацова сваких 4-5 дана. Уколико се еструс у сезони парења јавља само једанпут, а следећи тек после извесног времена, такве животиње се зову **моноеструсне** (нпр. куја). Циклично ослобађање LH и FSH неопходно је за настанак овулације код животиња код којих је овулација спонтана – **спонтани овулатори**.

Међутим, код неких врста до повећаног ослобађања гонадотропних хормона, а тако и овулације, долази само након парења или неког другог стимулуса из спољашње средине. На пример, код зечице овулација наступа тек после парења, али је може изазвати и само присуство мужјака или чак присуство друге женке. Ова, тзв. **рефлексна овулација**, регулисана је аферентним импулсима који полазе из гениталија, чула вида, слуха и мириса, а који конвергирају на нивоу вентралног хипоталамуса и провоцирају предовулаторно повећање секреције LH из аденохипофизе.

На појаву еструса, поред доминантних ендокриних фактора (систем повратних спрега у оквиру хипоталамо-хипофизно-гонадне осовине), знатно утичу и сигнали из спољашње средине, као што су промене у амбијенталној температури, у дужини дана које прате смену сезона, количина и квалитет доступне хране и др. Карактер репродуктивног циклуса је усклађен са условима спољашње средине, тако да омогући оплодњу, гравидитет и долазак младунаца на свет у периоду који је најпогоднији за њихово преживљавање.

5.4. ВЕЖБА

Праћење еструсног циклуса женке пацова

Потребан материјал :

- дестилована вода
- метиленско плаво
- капалица
- микроскопска плочица
- изрезбарена микроскопска плочица
- папирна газ
- држачи за сушење препарата
- микроскоп

Поступак вежбе

Добијање вагиналног бриса женке пацова

Животињу држати у левој руци, а у десну руку узети капалицу са мало дестиловане воде (Слика 5.3.). Садржај капалице истиснути у вагину, а након тога извући вагинални брис и ставити на микроскопску плочицу. Нативно погледати у којој фази еструсног циклуса се животиња налази (без покровног стакла), а затим обојити препарат.

Бојење препарата вагиналног бриса

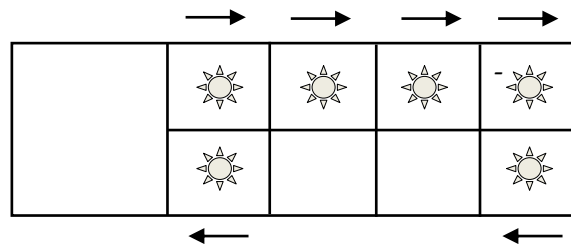
Препарат је потребно осушити на собној температури, а затим га поставити на држаче. Прелити препарат метиленским плавим и оставити до 20 - 30 мин. Након истека времена, испрати дестилованом водом и оставити да се осуши на собној температури. Пожељно је препарат обрисати папирном газом са леђне стране. Посматрати препарат под микроскопом без покровног стакла на малом увећању.



Слика 5.3. Узимање вагиналног бриса женке пацова

Посматрање трајних препарата

Трајни препарат вагиналног бриса се добија тако што се обична микроскопска плочица изрезбари дијамантском оловком (Слика 5.4.). Брис се узима сваког дана, на претходни начин, и наноси у поља на микроскопској плочици. Посматрати и прочитати четири трајна препарата.



Слика 5.4. Трајни препарат вагиналног бриса

☀ -Брис узет у току једне недеље и понедељак наредне недеље; празна поља представљају суботу и недељу тј. дане када се брис није узимао

Простор за белешке

6. Терморегулација

Температура организма је важна за одржање хомеостазе и правилно функционисање свих органских система животиње. Температура одређује стопу метаболизма, па тиме и потребу животиње за храном. Многе биохемијске реакције су веома осетљиве на промене температуре, а температура ткива утиче и на биофизичке процесе као што су дифузија и осмоза, на конформацију и функционалност протеина, вискозитет ћелијских течности, флуидност ћелијске мембране.

Телесна температура зависи од количине топлотне енергије садржане у јединици масе ткива. Количина топлотне енергије у организму зависи од степена продукције топлоте кроз метаболичке реакције, као и од степена размене топлоте са околином (усвајање или губитак топлоте).

6.1 Температурна класификација животиња

За температурну класификацију животиња важна су два кључна критеријума: способност организма да метаболички производи топлоту и способност одржавања релативно стабилне телесне температуре. Већина животиња нема способност метаболичке производње топлоте и ове животиње се називају **ектотерми**, јер њихову телесну температуру одређују спољашњи услови. Такве животиње најчешће немају стабилну телесну температуру, и називају се још и **поикилотерми**. У ову групу се убраја већина бескичмењака, рибе, водоземци и гмизавци. Ови организми контролишу телесну температуру, али то углавном и постижу понашањем, тако што бирају околину одговарајуће температуре. Животиње које загревају своја ткива метаболичком производњом топлоте називају се **ендотерми**. Иако ендотерми не морају бити терморегулатори, већина њих јесте. Животиње које су способне да одрже сталну телесну температуру се називају **хомеотерми**. Терморегулација код хомеотерма се постиже физиолошким механизмима, а не само понашањем. У ову групу се убрајају птице и сисари. Код неких животиња могу се јавити просторне или временске разлике у температури. Ова појава се назива хетеротермија. **Хетеротерми** су способни за различите степене топлотне продукције, али уопштено не регулишу телесну температуру у оквиру уског опсега.

6.1.1 Ектотерми

Ектотерми насељавају различита станишта, од оних са стабилним температурним условима до станишта која се одликују израженим температурним варирањима, на дневном или годишњем нивоу. Температурна варирања су нарочито изражена код копнених станишта где дневна температура може да достигне 50°C, да би се ноћу смањила на -50°C, док је у воденој средини температура релативно стабилна.

Активност ектотерма зависи од спољашње температуре. Не троше енергију на терморегулацију и одржавају низак ниво метаболизма. Регулација телесне температуре код ектотерма омогућена је физичким механизмима, због слабе изолације и велике топлотне проводљивости, тако да је размена топлоте са околином значајнија него продукција топлоте. Главни начин регулације

телесне температуре код ектотерма је промена понашања, тако да је омогућена боља апсорпција топлоте из околине или боље одавање топлоте са површине тела.

С обзиром на то да телесна температура многих ектотерма у великој мери зависи од спољашње температуре, смрзавање телесних течности је претња за врсте које живе у срединама где је спољашња температура испод 0°C. Ектотерми који живе у оваквим условима користе две стратегије за преживљавање ниских температура: толеришу екстрацелуларно замрзавање телесних течности или избегавају замрзавање и одржавају течно стање и на температурама далеко испод нуле. Код обе групе су присутне бројне физиолошке и биохемијске адаптације.

Код животиња које толеришу замрзавање, долази до замрзавања ткива и формирања леда у екстрацелуларној течности. Уколико се кристали леда формирају унутар ћелије, могу да оштете ћелијске мембране, али и да изазову хиперосмотски стрес због повећања осмоларности интрацелуларне течности. Екстрацелуларно формирање кристала леда олакшано је захваљујући постојању нуклеатора - молекула који контролишу формирање екстрацелуларног леда. Ипак, прекомерно формирање леда у екстрацелуларној течности, може да услови хипертонични стрес, изласка воде из ћелија и њиховог скупљања, што може довести до ћелијске смрти. Због тога се код многих животиња које су отпорне на замрзавање у интрацелуларној течности акумулирају супстанце као што су глицерол и трехалоза, које повећавају осмотски притисак у ћелији и спречавају излазак воде, али такође стабилизују макромолекулске структуре.

Друга стратегија за преживљавање ниских температура је избегавање смрзавања. Телесне течности се могу охладити испод њихове температуре смрзавања, односно подвргавају се суперхлађењу, при чему нема формирања кристала леда. Кристала леда неће бити уколико нема нуклеатора за иницијацију формирања кристала, тако да је један од механизма суперхлађења елиминација потенцијалних нуклеатора из телесних течности. Телесне течности појединих ектотерама задржавају течно стање на температурама испод нуле захваљујући присуству антифриз супстанци које колигативним механизмима снижавају тачку мржњења, повећавајући концентрацију растворених супстанци у телесној течности. На пример, телесна течност многих инсеката може да садржи различите полихидроксилне алкоhole, као што је глицерол, чија концентрација расте у зимским условима. Глицерол делује као антифриз и снижава тачку мржњења на -17°C. На овај начин животиње могу да преживе ниске температуре, при чему се одржава релативно нормално функционисање организма. Неке животиње поседују протеине и гликопротеине који снижавају тачку мржњења телесних течности неколигативним механизмима, везујући се за кристале леда и спречавајући њихов раст.

6.2. ВЕЖБЕ

Испитивање улоге глицерола у снижавању тачке мржњења телесних течности

Потребан материјал :

- глицерол
- физиолошки раствор
- пипете
- 6-well плоча
- термометар

Поступак вежбе

За испитивање улоге глицерола у снижавању тачке мржњења, неопходно је припремити растворе глицерола различите концентрације (Табела 6.1.). На 6-well плочи означити поља у које ће бити стављени раствори. Након припреме раствора, сипати их у одговарајуће место на плочи и ставити плочу у замрзивач. Проверити после једног или два сата да ли је дошло до замрзавања? Забележити запажања.

Табела 6.1. Упутство за припрему раствора глицерола

	Глицерол	Физиолошки раствор
Г1	0 ml	10 ml
Г2	2 ml	8 ml
Г3	3 ml	7 ml
Г4	4 ml	6 ml
Г5	5 ml	5 ml
Г6	6 ml	4 ml

Квалитативно одређивање присуства глицерола у хемолимфи виноградарског пужа и гусенице кукурузног пламенца

Потребан материјал :

- епрувете
- аутоматске пипете и наставци
- 2% CuSO_4
- 30% NaOH
- узорци хемолимфе

Поступак вежбе

Означити епрувете за слепу пробу и узорке хемолимфе. Пре рада потребно је уклонити протеине из хемолимфе додавањем 5% трихлорсирћетне киселине у односу 1:1. Након пет минута на собној температури, центрифугирати 10 минута на 3500 обртаја/мин. За одређивање присуства глицерола, користи се супернатант. У сваку епрувету додати 0,2 ml воде/супернатанта, 1 ml 1% CuSO_4 и 1 ml 30% NaOH . У присуству глицерола долази до развоја плавозелене боје раствора услед стварања комплекса бакар-глицерола. Уочити промене боје раствора слепе пробе и узорака и забележити запажања.

Одређивање концентрације глицерола у хемолимфи**Потребан материјал :**

- микротубе
- стаклене епрувете
- аутоматске пипете и наставци
- кивете за спектрофотометар
- раствор глицерола
- дестилована вода
- реагенс I (18 mg/mL натријум перјодат, 10% (v/v) сирћетна киселина, 77 mg/mL амонијум ацетат)
- реагенс II (1% (v/v) ацетилацетон у изопропанолу)
- узорци хемолимфе

Поступак вежбе

Означити епрувете за слепу пробу и узорке хемолимфе. Пре рада потребно је уклонити хеомците из хемолимфе центрифугирањем узорака 10 минута на 2000 обртаја/мин и супернатант разблажити пет пута дестилованом водом.

За одређивање концентрације глицерола у узорку, неопходно је направити стандардну криву коришћењем раствора глицерола познате концентрације. За формирање стандардне криве користимо основни раствор стандарда глицерола (СГ), чија је концентрација 10 mg/ml. Од поменутог стандарда треба направити разблажења (C1 - C5) према Табели 6.2.

Табела 6.2. Упутство за припрему стандардних раствора глицерола.

	стандард глицерола	дестилована вода	коначна концентрација
C1	1 ml СГ (10 mg/ml)	9 ml	1 mg/ml
C2	0,75 ml СГ (10 mg/ml)	9,25 ml	0,75 mg/ml
C3	0,5 ml СГ (10 mg/ml)	9.5 ml	0,5 mg/ml
C4	0,25 ml СГ (10 mg/ml)	9,75 ml	0,25 mg/ml
C5	1 ml C1	9 ml	0,1 mmol/l

Напомена: након додавања свих састојака у епрувету, добро промешати на вортекс-мешалици.

Након тога, обележити нове микротубе. Прву микротубу обележити ознаком СП (слепа проба), а преосталих пет ознакама стандарда (C1 - C5). Означити микротубе са узорцима хемолимфе. У

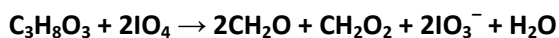
означене тубе ставити 0,2 ml воде (у СП), стандарда (C1-C5) или узорка и 0,2 ml Реагенса I. Промешати садржај на вортекс-мешалици и инкубирати 10 минута на собној температури. Након тога, у микротубе додати 0,625 ml Реагенса II и промешати садржај на вортекс-мешалици. Помоћу спектрофотометра измерити апсорбанцу на таласној дужини 410 nm. Апсорбанца се мери у две временске тачке, 15 минута и 25 минута након додавања Реагенса II.

За конструисање стандардне криве, потребно је на x-осу унети вредности концентрација стандарда, а на y-осу вредности промене апсорбанце ($\Delta A = A_{25 \text{ мин}} - A_{15 \text{ мин}}$). Спајањем тачака се добија стандардна права помоћу које се одређује концентрација глицерола у узорцима.

Концентрација глицерола у узорцима се израчунава према следећој једначини:

$$\text{Глицерол [mg/ml]} = \frac{\Delta A_{\text{узорка}} - \Delta A_{\text{слепа проба}}}{\text{нагиб стандардне криве}}$$

Коришћена метода заснована је на две реакције: Malaprade-овој и Hantzsch-овој. Оксидација глицерола према Malaprade-овој реакцији производи формалдехид, мрављу киселину и јодат.



Квантификација глицерола из формалдехида се спроводи на основу формирања 3,5-диацетил-1,4-дихидролутидина произведеног у реакцији циклизације формалдехида са ацетилацетоном (Hantzsch-ова реакција), чија апсорбанца се мери спектрофотометријски.

Простор за белешке

7. Експериментални модели

Европски кукурузни пламенац (*Ostrinia nubilalis*, Hübner)

Систематска класификација

Царство:	Animalia	
Тип:	Arthropoda	
Класа:	Insecta	
Ред:	Lepidoptera	
Фамилија:	Crambidae	
Род:	Ostrinia	
Врста:	<i>O. nubilalis</i>	

Кукурузни пламенац је врста лептира (мољца) пореклом из Европе, где је широко распрострањен, али га такође има и у Северној Америци, Северној Африци, Азији, тј. на читавој северној хемисфери. Број генерација се разликује у зависности од климатских услова. У нашим крајевима ова врста је униволтна- са једном генерацијом, или биволтна- са две генерације, што је нарочито изражено последњих деценија.

Кукурузни пламенац је холометаболни инсект чији животни циклус се карактерише проласком кроз потпуну метаморфозу са четири стадијума развића: јаје, гусеница (ларва), лутка и мољац (имаго). Женке, старости 3-4 дана, полажу 20-50 јаја дневно, а период овипозиције траје око 14 дана, тако да током живота женка положи у просеку 400-600 јаја. Из јајета се развијају гусенице (ларве) дужине око 1,6 mm са тамносмеђом хитинском капсулом главе и телом бледожуте боје. Стадијум гусенице нормално пролази кроз пет развојних степена (инстара). Прелазак у сваки наредни инстар праћен је пресвлачењем гусенице. Гусеница последњег-петог инстара дугачка је око 20 mm, а широка око 2 mm.

Гусенице летње генерације се улуткавају у току јула и августа. Лутка је жутобраон боје, која брзо прелази у тамносмеђу и мрку. Гусенице које излазе из јаја крајем августа, не улуткавају се када достигну пети инстар, већ улазе у дијапаузу, и у овом стању мировања остају до пролећа, када прелазе у следећи стадијум- лутку. У току дијапаузе гусенице се не хране, а укупна метаболичка активност је сведена на минимум. Дијапаузирајуће гусенице су отпорне на ниске температуре (и до -20°C), и могу преживети смрзавање екстрацелуларних течности. Из тог разлога *O. nubilalis* се у оквиру групе инсеката отпорних на хладноћу, сврстава у инсекте отпорне на смрзавање.

Из лутке се развија адулт-мољац. Мољци се одликују полним диморфизмом. Женке су светло-жуте до светлобраон боје са две тамне цик-цак линије распоном крила од 25 до 34 mm и крупније од мужјака. Мужјаци су тамнобраон боје, такође са кривудаваом линијом, али бледожуте боје, распона крила од 20 до 26 mm.

Виноградарски пуж (*Helix pomatia*, Linnaeus)

Систематска класификација

Царство:	Animalia
Тип:	Mollusca
Класа:	Gastropoda
Ред:	Stylommataphora
Фамилија:	Helicidae
Род:	Helix
Врста:	<i>H. pomatia</i>



Виноградарски пуж је једна од најраспрострањенијих врста пужева из породице Helicidae. Поседује љуштuru браон или жуте боје, са 5-6 завоја и великим отвором, висине око 25-35 mm, а ширине око 25-40 mm. Унутар љуштуре се налази труп са свим унутрашњим органима. Глава пужа је јасно издвојена усним отвором, очима и два пара пипака. Стопало сачињава један снажан мишићни орган чија је доња површина проширена у облику табана и служи за клизање тела по тлу при кретању. Насељавају различита станишта, шуме, баште, винограде и преферирају влажнија станишта и ниже температуре.

Виноградарски пужеви су хермафродити. У стаништима са умереном климом се размножавају од краја маја до септембра. Полажу јаја у групама (40—80). Полагање јаја увелико зависи од падавина, јер тло мора бити добро навлажено. Пречник јаја је 5,5 до 6,5 mm. Младунци излазе након 3-4 недеље. Полну зрелост достижу након 2 до 5 година. Иако им је животног век до 35 година, ретко се у природи могу пронаћи јединке старије од 10 година.

Неповољне услове животне средине виноградарски пуж може да преживи уласком у стање дорманције- естивације или хибернације. Виноградарски пуж је потпуно неактиван током зимских месеци. У јесен се укопава мало испод нивоа земље и затвара ушће љуштуре епифрагмом. На пролеће избацује епифрагму и постаје активан. Активност се наставља до јесени, када поново улази у хибернацију. Активност ове врсте је уско повезана са влажношћу, а тиме и с падавинама. У условима топлог, али сувог времена пужеви могу бити потпуно неактивни током дужег периода и ући у стање естивације. Копнени пужеви током естивације се повлаче у своје шкољке, затварају улаз епифрагмом да би се смањио губитак воде испаравањем и смањила брзина метаболизма, што продужава време преживљавања под фиксном резервом метаболичког горива у условима ограничене количине извора енергије.

Бабушка (*Carassius gibelio*, Bloch)

Систематска класификација

Царство:	Animalia	
Тип:	Chordata	
Класа:	Actinopterygii	
Ред:	Cypriniformes	
Фамилија:	Cyprinidae	
Род:	Carassius	
Врста:	<i>C. gibelio</i>	

Бабушка је слатководна риба, по карактеристикама припада породици шарана средње величине и углавном не прелази тежину од 3 kg и дужину од 45 cm. Сребрнкасте је боје, понекад са благим златним тоном. Пореклом је из Сибира, али данас је распрострањена широм Азије и Европе.

Полну зрелост примерци ове врсте постижу у 3. или 4. години живота. Бабушка се у нашим крајевима размножава гиногенезом, из неоплођених јаја, јер се у водама много тешко проналазе мужјаци ове врсте, а по неким тврдњама уопште их и нема. Гиногенеза подразумева укрштање полно зреле женке са мужјацима сродних врста из групе шарана (Cyprinidae) - обичним шараном и другом белом рибом. Сперматозоиди других врста улазе у јаје, али не долази до оплодње. Полаже од 160,000 до 380,000 јаја. Мрести се у плитким, топлим обалама на потопљеној вегетацији.

Настањује углавном језера и реке са мирнијим током. Чест је становник стајаћих вода и речних рукаваца. Сваштојед је, креће се по дну и ту проналази храну, најчешће се храни мекушцима и воденом вегетацијом. У зимском периоду се укопава у муљ, што јој омогућава да преживи веома ниске температуре. Јединке које настањују језера селе се у речна ушћа да би избегле ниску концентрацију кисеоника у води током зиме.

Лабораторијски пацов (*Rattus norvegicus domestica*, Berkenhout), Вистар сој

Систематска класификација

Царство:	Animalia
Тип:	Chordata
Класа:	Mammalia
Ред:	Rodentia
Фамилија:	Muridae
Род:	Rattus
Врста:	<i>R. norvegicus</i>



Глодари чине 95% свих огледних животиња укључених у истраживања због високог репродуктивног капацитета са великим бројем потомака и кратким периодом гестације, могућности да се истражује на неколико генерација у кратком времену, малог животног века, једноставног узгајања и манипулисања, великог броја база података доступних истраживачима широм света, њихових генетичких, биолошких и бихејвиоралних карактеристика сличних онима код људи, итд.

Лабораторијски пацов је сој подврсте *Rattus norvegicus domestica* који се узгаја за коришћење у научним истраживањима. Вистар албино пацови су сој који је развијен на Вистар институту 1906. године за употребу у биолошким и медицинским истраживањима. Вистар пацов је тренутно један од најпопуларнијих сојева који се користе за лабораторијска истраживања. Карактеристике га широка глава, дуге уши и дужина репа која је увек мања од дужине тела. Просечна телесна маса одраслих пацова јесте 250 до 520 g, при чему су мужјаци крупнији од женки. Просечан животни век пацова износи од 2,5 до 3,5 године.

Пацови су животиње које су активне углавном ноћу, односно у току ноћи се хране, уносе воду и паре се. Чуло вида је слабо развијено. Пацови достижу полну зрелост са навршених 50-60 дана старости, а парење започиње са три месеца старости. Женке су полиестричне, при чему се еструс јавља на сваких 4-5 дана. Еструс започиње у ноћним сатима и траје око 20 сати. Систем парења је полигамни, односно један мужјак и 2 до 6 женки бивају у истом кавезу. Гравидне женке се пре партуса одвајају у посебне кавезе. Гестацијски развој траје 21-23 дана, а у леглу се обично налази 6 до 12 младунаца.

Лабораторијски пацови уносе воду и хране се по вољи (*ad libitum*) пелетираном храном за глодаре која садржи 20-27% протеина. Неопходно им је обезбедити бихејвиоралне и физиолошке потребе као и социјалну интеракцију. Мужјаци нису агресивни када се држе заједно, и ово је бољи начин узгајања, мада је прихватљиво и појединачно узгајање када је то неопходно. Микроамбијентална температура за пацове треба да буде 19-23°C, а релативна влажност ваздуха 40-70%.

Прилози

Прилог 1. Одређивање вредности хематолошких индекса

На основу броја еритроцита (Er), концентрације хемоглобина (Hb) и вредности хематокрита (Ht) могу се израчунати вредности хематолошких индекса.

MCV (средња вредност запремине еритроцита) израчунава се помоћу хематокритске вредности и броја еритроцита према следећој формули:

$$MCV [\mu m^3] = \frac{Ht[\%]}{Er[broj/L]} * 10$$

MCH (средња вредност количине хемоглобина у еритроциту) представља просечну тежину хемоглобина у еритроцитима изражену у пикограмима. Израчунава се по следећој формули:

$$MCH [pg] = \frac{Hb[g/L]}{Er [broj/L]}$$

MCHC (средња вредност концентрације хемоглобина у еритроциту) израчунава се из односа концентрације хемоглобина и хематокритске вредности, а изражава се у процентима. Израчунава се по следећој формули:

$$MCHC [\%] = \frac{Hb[g/L]}{Ht [\%]} * 10$$

Прилог 2. Дигестивни ензими сисара

ЕНЗИМ	СУПСТРАТ	АКТИВАТОР	МЕСТО ПОРЕКЛА
пепсин	протеин или полипептид	хлороводонична киселина (HCl)	фундусне жлезде желуца
трипсин	протеин или полипептид	цревна ентерокиназа	егзокрини панкреас
химотрипсин	протеин или полипептид	трипсин	егзокрини панкреас
карбоксипептидаза	протеин или полипептид	трипсин	егзокрини панкреас
ентеропептидаза	трипсиноген		цревна мукоза
амино-пептидазе	полипептиди		цревна мукоза
карбоксипептидазе	полипептиди		цревна мукоза
дипептидазе	дипептиди		цревна мукоза
пљувачна α -амилаза	Скроб	хлоридни јони Cl^-	пљувачне жлезде
панкреасна α -амилаза	Скроб	хлоридни јони Cl^-	егзокрини панкреас
малтаза	малтоза		цревна мукоза
лактаза	лактоза		цревна мукоза
сахараза	сахароза		цревна мукоза
α -декстриназа	α -гранични декстрини		цревна мукоза
трехалаза	трехалоза		цревна мукоза
лингвална липаза	триглицериди		лингвалне жлезде
желудачна липаза	триглицериди		Желудац
колипаза	масне капи	трипсин	егзокрини панкреас
панкреасна липаза	триглицериди		егзокрини панкреас
фосфолипаза	фосфолипиди	трипсин	егзокрини панкреас
рибонуклеаза	РНК		егзокрини панкреас
дезоксирибонуклеаза	ДНК		егзокрини панкреас
нуклеотидазе	нуклеотиди		цревна мукоза
нуклеозидазе	нуклеозиди		цревна мукоза

Библиографија

Andrić, S., Kostić, T., Andrić, N., Zorić, S. (2005) Uporedna fiziologija životinja: skripta za studente biologije. WUS, Novi Sad. ISBN 86-7031-074-0.

Brenner R. M., West N. B. (1975). Hormonal regulation of the reproductive tract in female mammals. *Annual review of physiology*, 37, 273–302.

Cannarella, R., Condorelli, R.A., Mongiò, L.M., La Vignera, S., Calogero, A.E., 2020. Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1728.

Channing C. P., Schaerf F. W., Anderson L. D., Tsafirri A. (1980). Ovarian follicular and luteal physiology. *International review of physiology*, 22, 117–201.

Cvijić, G., (1995) Eksperimentalna fiziologija II: sa praktikumom. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd. ISBN 86-7078-002-H.

Davidović, V. (2003) Uporedna fiziologija životinja. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd. ISBN 86-17-11288-3.

Ganong, W.F. (2010) Review of medical physiology, 23rd Edition, Lange Medical Books, McGraw-Hill, New York. ISBN 978-0071605670.

Guyton A.C., Hall J.E. (2011) Textbook of medical physiology 12th edition, Saunders Elsevier, Philadelphia, PA. ISBN 978-1-4160-4574-8.

Ghasemi, V., Moharramipour, S., & Sendi, J. J. (2013). Circulating hemocytes of Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella* Zell.(Lep: Pyralidae) and their response to thermal stress. *Invertebrate Survival Journal*, 10(1), 128-140.

Gu, N.-H., Zhao, W.-L., Wang, G.-S., Sun, F., 2019. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 17, 66.

Hill, R.W., Wyse G.A., Anderson, M. (2016) Animal physiology, 4th edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts. ISBN 978-1-605-35471-2.

Robaire B., Chan P. (2023) Handbook of Andrology, 3rd Edition. American Society of Andrology, East Dundee, IL.

Jabbour H. N., Kelly R. W., Fraser H. M., Critchley H. O. (2006). Endocrine regulation of menstruation. *Endocrine reviews*, 27(1), 17-46.

Johnson, M.H. (2013) Essential reproduction. 7th Edition. A John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK. ISBN 978-1-4443-3575-0.

- Kibble J.D., Halsey C.R. (2008) Medical Physiology: The Big Picture ISBN 978-0-07-148567-8
- Klasing, K.C. (1999) Avian gastrointestinal anatomy and physiology. In *Seminars in avian and exotic pet medicine* WB Saunders. p. 42-50
- Klowden, M.J. (2013) Physiological Systems in Insects, 3rd Edition. Elsevier Inc., London, UK. ISBN 978-0-12-415819-1.
- Kuhn, J., Müller, H., Salzig, D., & Czermak, P. (2015). A rapid method for an offline glycerol determination during microbial fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(3), 252-255.
- Moyes, C.D., Schulte, P.M. (2014) Principles of Animal Physiology, 2nd Edition. Pearson Education Limited, Essex, England. ISBN 978-1-292-02638-1.
- Parvinen, M., Ventelä, S., 1999. Local regulation of spermatogenesis: A living cell approach. *Human Fertility*, 2, 138–142.
- Perrard, M.-H., Sereni, N., Schluth-Bolard, C., Blondet, A., d’Estaing, S.G., Plotton, I., Morel-Journel, N., Lejeune, H., David, L., Durand, P., 2016. Complete Human and Rat *Ex Vivo* Spermatogenesis from Fresh or Frozen Testicular Tissue. *Biology of Reproduction*, 95, 89–89.
- Popović, Ž. (2016) Život u dijapauzi. Zadužbina Andrejević, Beograd. ISBN 978-86-525-0268-4.
- Santos, L. O., Rocha, S. F., Barra, C. M., Tubino, M., & Rocha Junior, J. G. (2022). A Simple, Rapid, and Reliable Titrimetric Method for the Determination of Glycerol at Low Concentration. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 33, 530-540.
- Simonović I., Marić D. Praktikum i odabrana poglavlja iz Uporedne fiziologije. Novi Sad, Prirodno-matematički fakultet, [Institut za biologiju].
- Teves, M.E., Roldan, E.R.S., 2022. Sperm bauplan and function and underlying processes of sperm formation and selection. *Physiological reviews*, 102, 7–60.
- Van Weel P.B. (1961) The comparative physiology of digestion in molluscs. *American Zoologist*, 245-252.