

بيان التركيب النسيجي لمخيخ الارانب المحلية بأعمار مختلفة

خديجة خالد امين أ.د. أياد حميد ابراهيم
قسم انسجة واجنة، كلية الطب البيطري، جامعة تكريت

مستخلص

صممت الدراسة الحالية لمعرفة التركيب النسيجي لمخيخ الأرانب بأعمار مختلفة، تم قتل الحيوانات بعد التخدير بجرعه الكلوروفورم، تم تشريح الجمجمه وأخذ عينه المخيخ وغسلها بالماء الجاري و تثبيتها بفورمالين 10% و اجريت بعدها التقنيه النسيجية وتم الصبغ بالهيماتوكسيلين والإيوسين و بعدها تم قياس سمك طبقات قشره المخيخ . أشارت الدراسة إلى القشرة المخيخية بثلاث طبقات محاطة بالسحايا تلك هي الطبقة الجزيئية و طبقة خلايا بركنجي والطبقة الجزيئية التي تحتوي على ألياف متسلقه تتواصل معا ومع الألياف العصبيّة النخاعينية وطبقه الخلايا الحبيبية كما ان سمك الطبقات يزداد مع تقدم العمر وكانت طبقة خلايا بركنجي اقل حجما و سمكا في المرحلة المبكرة و المتأخرة مقارنة في منتصف العمر .
الكلمات المفتاحية : المخيخ ، الدماغ ، الارانب المحلية.

A statement of the histological structure of the cerebellum of local rabbits at different ages

Khadiga khalid ameen , Prof. Dr Ayad Hameed Ibraheem
Department of histology, College of Veterinary Medicine, Tikrit University

Abstract :

The current study was designed to know the histological structure of the cerebellum of rabbits of different ages. The animals were killed after anesthesia with a dose of chloroform. The skull was dissected, a cerebellar sample was taken, washed with running water, and fixed with 10% formalin. After that, the histological technique was performed and staining was done with hematoxylin and eosin, and then the thickness was measured. Layers of the cerebellar cortex. The study indicated that the cerebellar cortex has three layers surrounded by meninges. These are the molecular layer, the Purkinje cell layer, the molecular layer that contains climbing fibers that communicate with each other and with myelinated nerve fibers, and the granule cell layer. The thickness of the layers also increases with age, and the Purkinje cell layer was smaller and thicker in... Early and late stage compared in middle age.

1. مجموعة A: عمر من 1-30 يوم وزن -150 200 غم.
 2. مجموعة B: عمر من 180-360 يوم وزن 1000-2000 غم.
 3. مجموعة C: عمر من 360 يوم فما فوق وزن 2000-2500 غم.
- وضعت الارانب في أقفاص حديدية عند البيت الحيواني في كلية الطب البيطري/ جامعة تكريت حيث تم شراء الارانب من مزعة خاصة بتربية الارانب من احدى قرى محافظة صلاح الدين وتم فحص الحيوانات للتأكد من خلوها من الامراض والاصابات الجلدية وكما موضح في الشكل(1).



الشكل(1): صورته لمجموعة الأرانب في الأقفاص الحديدية عند البيت الحيواني

4.3 عملية التخدير والتشريح

Anaesthetization and Dissection

أجريت عملية التخدير قبل عملية الذبح باستخدام الكلوروفورم ثم تم قتل الحيوانات بطريقة الذبح وبمعدل 10 حيوانات اسبوعياً حيث تم فتح الجمجمة بواسطة سكين وأدوات تشريح خاصة واستخراج الدماغ من كل عينة حيث وضعت في ماء جاري للغسل

1: المقدمة Introduction

الجهاز العصبي يعتبر من الأجهزة عالية التركيب والفعالية الوظيفية في كل المملكة الحيوانية ويشير بشكل عام الى ذكاء الأنواع، إن ارتباط الذكاء ببقاء الكائن الحي لذلك فإن الجهاز العصبي يمتلك العديد او الكثير من التكيفات مع الكائنات التي تسهل عملية التحكم والتنسيق⁽¹⁾.

يعد المخيخ جزء مهم من الدماغ حيث يلعب دور حاسم في التنسيق الحركي والتوازن ويشارك ايضاً في الوظائف المعرفية⁽²⁾، ويعتبر المخيخ هو احد اكثر الهياكل ثبات في CNS في اطار تجديد الخلايا حيث يتم انشاء الخلايا العصبية المخيخية بشكل طردي ومركزي من مصادر مختلفة في مراحل نمو مختلفة⁽³⁾. يقع المخيخ في الطرف الخلفي أعلاه الدماغ المؤخر وخلف القشرة، يحتوي المخيخ على خلايا عصبية اكثر من بقية الدماغ⁽⁴⁾. تنظم الخلايا ضمن طبقة خارجية تسمى القشرة المخيخية ومنطقة القلب الداخلية، تنقسم القشرة المخيخية الى ثلاث طبقات، الطبقة الخارجية تسمى الطبقة الجزيئية (ML) وتحتوي على تشجرات من خلايا بركنجي، محاور الخلايا الحبيبية، خلايا دبقية والخلايا العصبية النجمية⁽⁵⁾.

الارانب من الثدييات الصغيرة المستأنسة والشائعة لها فترة انجابية قصيرة وتنتج مواليد عديدة ولها نمو مشيمي مشابه للإنسان⁽⁶⁾. حيث تم قبول الارانب على نطاق واسع كنموذج في الأبحاث⁽⁷⁾. ولذلك زاد توافرها للاستخدام السريري بشكل كبير في الطب البيطري⁽⁸⁾.

2: طريقة العمل The Method of Work

حيوانات الدراسة Experimental animals

استخدمت في هذه الدراسة ثلاثون ارنب محلي وزعت على ثلاث مجاميع :



الشكل (3): صورته توضح
وضع عينات الدماغ والمخيخ في الفورمالين 10٪

2.5.3 مرحلة الغسل Washing

غسلت العينات بماء الحنفيه الجاري لمدة نصف ساعة لأزاله الفورمالين من النسيج.

3.5.3 مرحلة الانكاز Dehydration

مررت العينات بسلسلة تصاعدية من الكحول الايثيلي (50٪-70٪-80٪-90٪-100٪-100٪) وذلك لغرض سحب الماء من العينات لمدة ساعتين لكل تركيز.

4.5.3 مرحلة التصفية Clearing

استخدم الزايلول لغرض الترويق مرتين ولمدة نصف ساعة في كل مرة وذلك لجعل العينات اكثر شفافية.

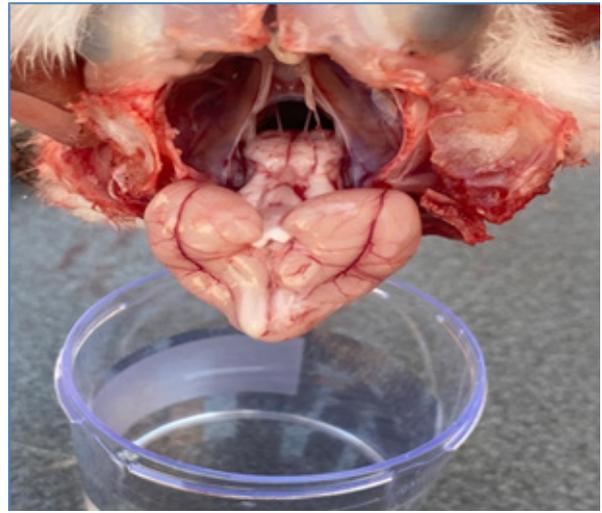
5.5.3 مرحلة التثريب Infiltration

وضعت العينات في شمع البارافين المنصهر الذي درجة انصهاره 60 درجة مئوية مرتين ولمدة ساعتين مكررة على كل خطوة.

6.5.3 مرحلة الطمر Embedding

طمرت العينات بشمع البارافين وذلك بصب الشمع المنصهر وبهدوء في قالب نحاسي خاص وكتبت المعلومات الخاصة بالعينه على ورقة صغيرة وضعت بواسطة ملقط

ثم وضعت في محلول الفورمالين (10٪) كل على حدى في علب لحفظ العينات احتوت على فورمالين (10٪) وعلمت العلب من رقم 1 الى رقم 10. أخذت عينات من كل دماغ شملت وكما موضح في الشكل (2):
● قشرة ونخاع المخيخ.



الشكل (2):
صورته توضح تشريح الجمجمة و أخذ العينات منها

5.3 تحضير المقاطع النسجية

Reparation of microscopic section

حضرت المقاطع النسجية للعينات حسب طريقة المقترحه⁽⁹⁾. وحسب الخطوات التالية:

1.5.3 مرحلة التثبيت Fixation

بعد عملية التثريب اخذت العينات ومن ثم وضعت في محلول التثبيت بنسبة 10٪ من الفورمالين لمدة مايقارب 24 ساعة في درجة حرارة الغرفة وكما موضح في الشكل (3). اذ حضر محلول الفورمالين كالآتي:

- فورمالين (10ml) Formalin .
- ماء مقطر (90ml) Distilled water .

10.5.3 مرحلة التثبيت Mounting

تم تغطية المقاطع بغطاء زجاجي Cover slid بعد وضع قطرة صغيرة من (D.P.X) تركت الشرائح بعدها على صفيحة ساخنة درجة حرارتها 40 درجة مئوية وذلك لتجفيف الشريحة بسرعة وتحفظ بعدها في الصناديق الخاصة بها.

6.3 مرحلة الفحوصات والقياسات المجهرية

للمقاطع النسجية والتصوير المجهرية

بعد إتمام مراحل التقطيع النسيجي وأصبحت الشرائح النسجية جاهزة تم فحصها باستخدام المجهر الضوئي وأجريت عملية التصوير بواسطة المجهر الضوئي التصويري والمزود بكاميرا رقمية نوع سوني. القياسات المجهرية: تم استخدام المقياس العيني لقياس قشرة ونخاع المخيخ حيث تم استخراج معامل التصحيح 2.5 من خلال مطابقة مقياس العيني مع مسطرة المنصة ثم بعد ذلك مقارنة قياسات كل مجموعة مع المجاميع الأخرى لبيان الأهمية الإحصائية.

7.3 التحليل الاحصائي

تم تحليل البيانات إحصائياً للتجارب الثلاث باستخدام التصميم العشوائي الكامل- Completely Ran- domized Designs (CRD) لدراسة تأثير المعاملات في الصفات المدروسة، قورنت الفروقات المعنوية بين المتوسطات باستخدام اختبار دنكن مُتعدد الحدود وعند مستوى احتمالية ($P < 0.05$) حيث تم عرض النتائج على شكل (المتوسط الحسابي \pm الخطأ القياسي). استعمل البرنامج الإحصائي في التحليل الإحصائي على وفق النموذج الرياضي الآتي: $Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$ إذ إن: Y_{ij} = قيمة المشاهددة j العائدة للمعاملة i.

μ = المتوسط العام للصفة المدروسة.

T_i = تأثير المعاملة i ، المعاملات (العمر) (C-A)

E_{ij} = الخطأ العشوائي الذي يتوزع توزيعاً طبيعياً

ومستقلاً بمتوسط يساوي صفراً وتباين متساوٍ قدره s_2e .

ولصقت على جوانب القوالب ومررت ابرة ساخنة بالقرب من العينة للتخلص من الفقاعات حولها ان وجدت ثم تركت لتبرد وتتصلب وبعدها تم ازلتها من القالب بعد التأكد من تصلبها باستخدام التبريد.

7.5.3 مرحلة عمل المقاطع Sectioning

وضع القالب على الحامل المثبت على جهاز المشراح الدوار وقطعت العينات بسمك 6 مايكرومتر للحصول على شرائح نسجية وبعدها نقلت الى الحمام المائي الدافئ بدرجة حرارة 38 مئوية لغرض نشر العينة وبعدها رفعت المقاطع على شريحة زجاجية معلم عليها بقلم ماسي (معلومات العينة) قبل مسحها بالالبيومين (Mayers albumin) وضعت الشرائح على صفيحة ساخنة درجة حرارتها 40 درجة مئوية وتركت لتجف لمدة 24 ساعة.

8.5.3 مرحلة الهدرجة Rehydration

مررت العينات في هذه المرحلة بسلسلة كحولات تنازلية (100%-90%-80%-70%-50%).

9.5.3 مرحلة التلوين Staining

بعد ان تمت عملية تجفيف الشرائح الزجاجية تمت عملية التلوين بصبغة الهيماتوكسلين و الايوسين كالأتي:

1. لونت المقاطع بملون الهيماتوكسلين لمدة 5 دقائق وتم غسلها في ماء حنفية جاري لتمييز اللون.
2. تم غسل المقاطع النسجية بماء الحنفية الجاري وذلك بوضعها في اواني الصبغ الزجاجية لغرض إزالة الصبغة الزائدة ولتمييز اللون.
3. لونت بعد ذلك المقاطع النسجية بملون الايوسين لمدة 40 ثانية وتم غسلها في اواني الصبغة الزجاجية بكحول 70% ولمدة 5 ثواني.
4. مررت الشرائح بسلسلة تصاعدية من الكحول 70%-100% لمدة 3 دقائق لكل تركيز ووضعت الشرائح في الاواني الزجاجية فيها زايلول لمدة 5 دقائق للترويق.

اللب (المادة البيضاء) في المخيخ وجد بأنه ضيق مقارنة مع قشرة المخيخ الواسعة وذلك من خلال القياسات الواردة في النتائج، وحزم الالياف في المادة البيضاء لها دور اتصال واشتباك مع الالياف العصبية في طبقات القشرة المختلفة.

وذكرت الابحاث⁽¹³⁾ بان المخيخ له كذلك اتصال مع الاذن الداخلية بواسطة الياف عصبية حسية مصدرها من العقد العصبية الدهليزية Vestibular ganglion (مسؤولة عن التوازن).

من خلال دراسة نسيج الدماغ تبين وجود خلايا عصبية بشكل شريط ملتوي (S shape) يمثل ما يعرف بقرن آمون Hippocampus والممتد في المادة البيضاء حيث تألف من خلايا عصبية انتظمت بشكل صف الى صفين مع خلايا دبقية وكان متواجداً في كل مراحل العمر المختلفة حيث ان هذا المكان يعمل على تحويل الذاكرة القصيرة المدى الى ذاكرة طويلة المدى وذكرت الابحاث⁽¹⁴⁾ بان هذا القرن له القابلية على تكوين خلايا عصبية جديدة .

جدول(1): يوضح القياسات المجهرية لطبقات الدماغ والمخيخ عند عمر من 1 يوم - 30 يوم

المخيخ Cerebellum				
اللب او المادة البيضاء White matter	طبقة الخلايا الحبيبية Granular cell layer	طبقة خلايا بركنجي Purkinje layer	الطبقة الجزئية Molecular layer	A
50	170	30	225	A1
45	228	49	298	A3
57.5	138	22	265	A6
100	125	25	300	B1
55	400	62.5	225	B3
137	90	32.5	225	C9

وأستعمل لرسم الاشكال البيانية البرنامج الاحصائي GraphPad Prism (8.0.1).

3 : النتائج والمناقشة

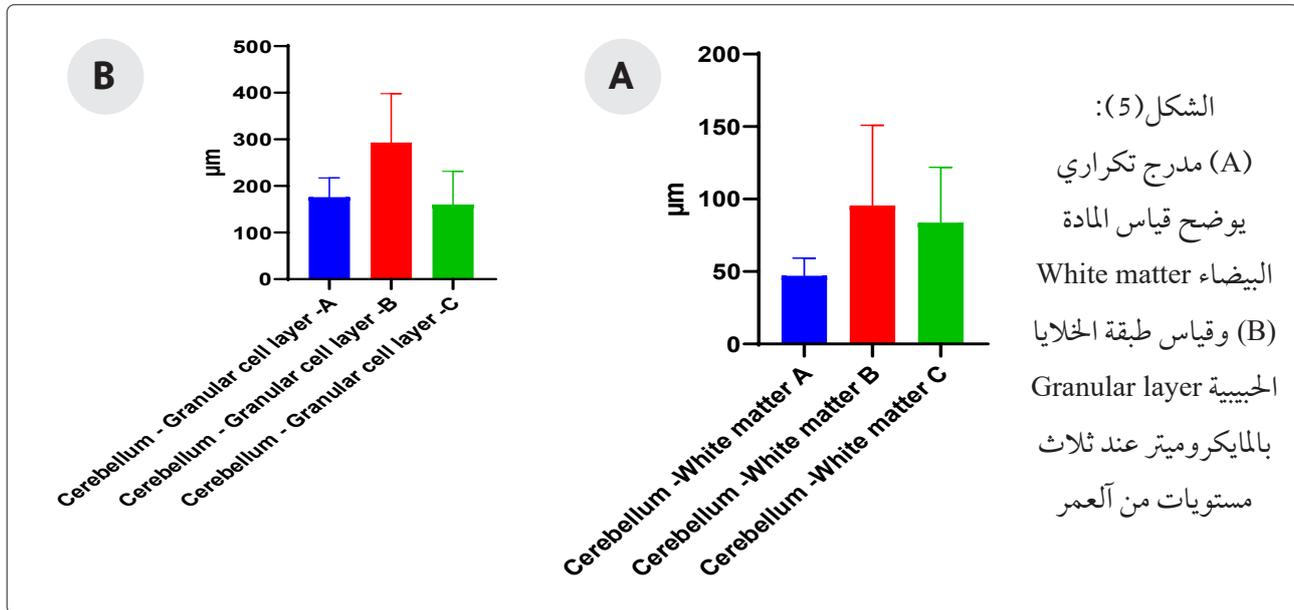
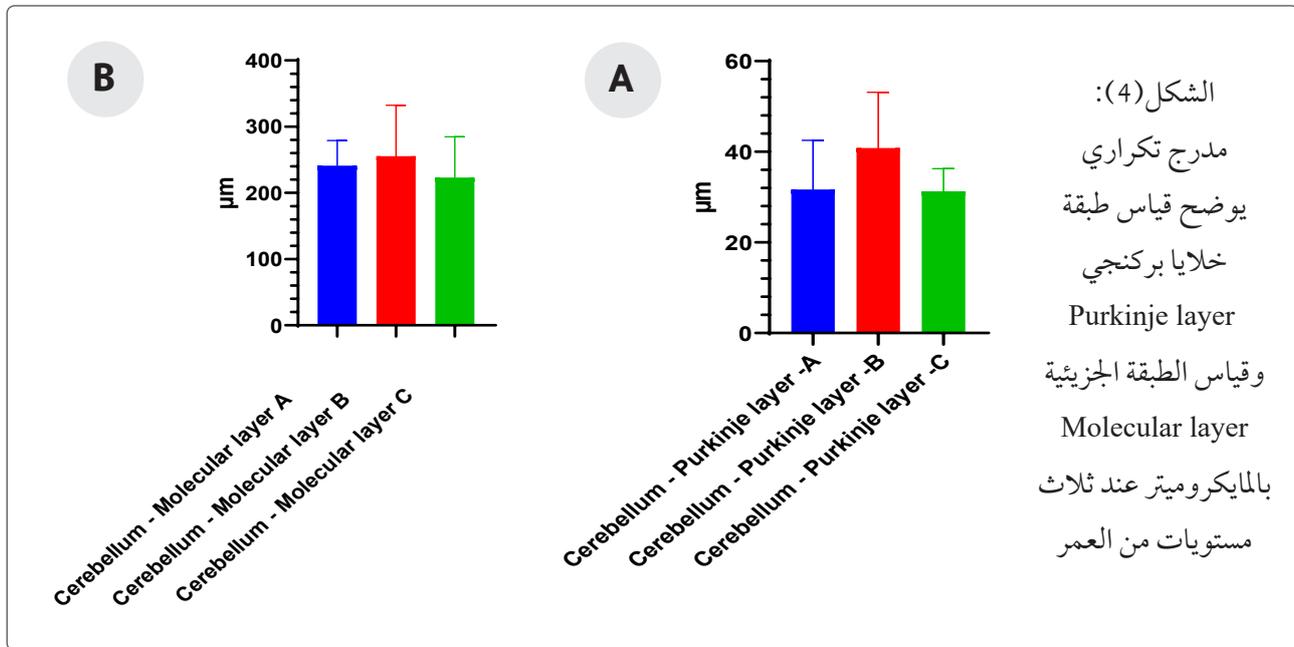
Results and Discussion

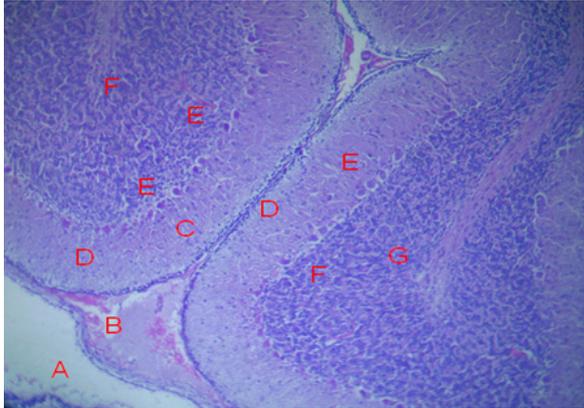
أجريت هذه الدراسة على المخيخ في الارانب المحلية وبثلاث مستويات من العمر وذلك لمعرفة التغيرات والتطور النسجي لدماغ هذه الحيوانات حيث ان المعروف ان هذا التطور حسب مذكرته البحوث العلمية⁽¹⁰⁾. بأن مراحل التطور تستمر في الدماغ الى ما بعد الولادة من حيث تطور الخلايا العصبية والدبقية. الدراسة المتعلقة بمخيخ الارانب ذكرت ان المخيخ له تلافيف وفصين متصله بواسطة ما يعرف بالدودة Vermis، يغطي المخيخ كما في الدماغ بالسحايا التي تؤلف ما يعرف بالحيمة Tentorium cerebelli هذا الوصف الشكلي مشابه لما ذكره⁽¹¹⁾. يشار الى ان فصي الدماغ في الارانب ترتبط عن طريق الجسم الثفني Corpus callosum.

قشرة المخيخ احتوت على الطبقات الثلاث بدءاً من الطبقة الجزئية والمؤلفة من خلايا عصبية صغيرة ونجمية إضافة الى عدد من الخلايا الدبقية الساندة وهذه الطبقة مع طبقتي خلايا بركنجي والطبقة الحبيبية انتضمت في مراحل العمر المختلفة مع ازدياد وسماكة القشرة بتطور العمر، كما لوحظ ان خلايا بركنجي بدأت بأزدياد الحجم ايضاً بتقدم العمر واعتبرت هذه الخلايا اكبر حجماً من خلايا الدماغ والمخيخ الأخرى وذكر⁽¹²⁾ وصف تلك الخلايا وقابليتها العالية على وظيفة التوازن والحركات الارادية بالتنسيق داخليا مع المادة البيضاء للمخيخ وخلايا الطبقة الحبيبية والجزئية من خلال الالياف العصبية المتسلقة ومع النخاع الشوكي عن طريق الاتصال بالالياف العصبية الطرفية الصادرة الى اطراف وجذع الكائن الحي.

جدول (2): التحليل الاحصائي لطبقات المخيف عند ثلاث مستويات من العمر

Treatments	Cerebellum			
	White matter(μm)	Granular cell layer (μm)	Purkinje layer (μm)	Molecular layer (μm)
A	47.1 ± 4.98 a	176.2 ± 16.71 a	31.7 ± 4.42 a	241.0 ± 15.56 a
B	90.3 ± 20.71 a	254.4 ± 46.62 a	37.2 ± 5.97 a	233.6 ± 37.96 a
C	83.7 ± 12.11 a	160.3 ± 22.53 a	31.3 ± 1.59 a	223.3 ± 19.48 a

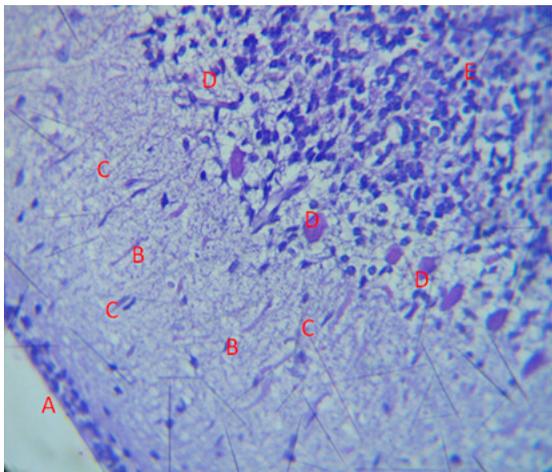
Means with the same letter are not significantly different ($P \leq 0.05$)



الشكل (7) : الغشاء السحائي لقشرة المخيخ (A) وعاء دموي سحائي (B) اخاديد المخيخ (C) الطبقة الجزيئية (D) طبقة خلايا بركنجي (E) الطبقة الحبيبية (F) لب المخيخ (G). (H&E X10).

3.3 مجموعة A6

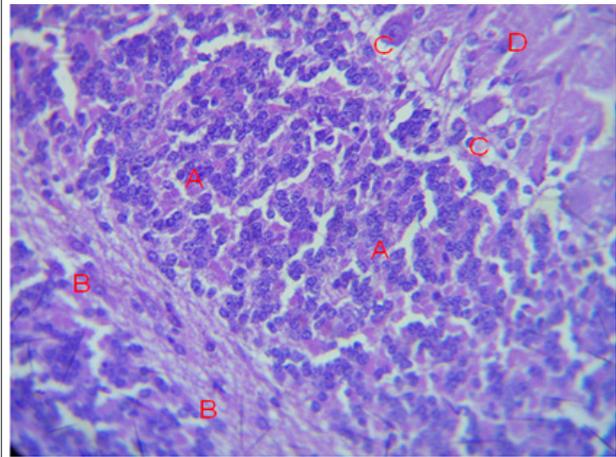
قشرة المخيخ مغطاة بالغشاء السحائي المحتوي على خلايا دبقية مع خلايا دم بيض ثم الطبقة الجزيئية المحتوية على خلايا عصبية دقيقة ودبقية مع انتشار عدد من الشعيرات الدموية ذات المسار الطولي باتجاه عمق القشرة، طبقة خلايا بركنجي ظهرت بشكل متفرق ومعظمها متوسطة الحجم متواصلة مع الطبقتين الجزيئية والحبيبية من خلال الالياف العصبية وكما موضح في الشكل (8).



الشكل (8): قشرة المخيخ، الغشاء السحائي المحتوي على خلايا دبقية وخلايا دم بيض (A) الطبقة الجزيئية وفيها خلايا عصبية دقيقة (B) اوعية دموية شعرية (C) طبقة خلايا بركنجي (D) الطبقة الحبيبية (E). (H&E X40).

1.3 مجموعة A1

اللب او المادة البيضاء للمخيخ فيها حزم اليااف عصبية وحوها عدد من الخلايا الساندة والالياف العصبية تلك فيها تواصل مع الالياف العصبية للطبقة الحبيبية المحيطة بها وتواصلها عن طريق الالياف المتسلقة وكما موضح في الشكل (6).

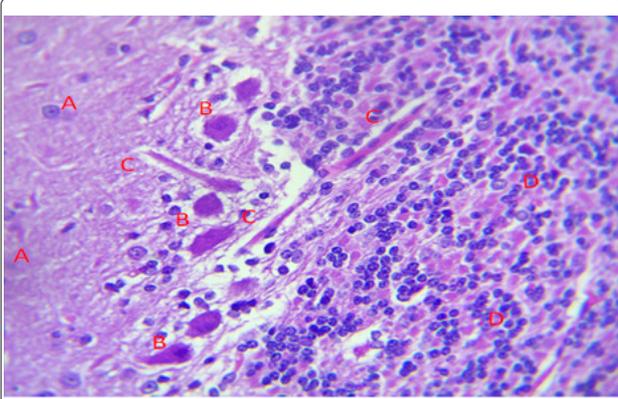


الشكل (6): الطبقة الحبيبية لقشرة المخيخ وفيها خلايا عصبية صغيرة ودبقية (A) حزم اليااف العصبية في لب المخيخ (B) طبقة خلايا بركنجي (C) الطبقة الجزيئية (D). (H&E X40).

2.3 مجموعة A3

تلايف اوطيات المخيخ مغطاة بالغشاء السحائي حيث وجدت اوعية دموية تحت الغشاء وامتد الغشاء بين اخاديد المخيخ مغطيا لقشرة المخيخ، الطبقة الجزيئية المجاورة للسحايا فيها اعداد محدودة من الخلايا العصبية والدبقية وظهرت بشكل باهت وتحتها وجدت طبقة الخلايا العصبية بركنجي ثم الطبقة الحبيبية داكنة الصبغة وفيها اعداد كبيرة من الخلايا العصبية والدبقية ولب المخيخ محاط بالطبقة الحبيبية احتوى على حزم اليااف عصبية محدودة وكما موضح في الشكل (7).

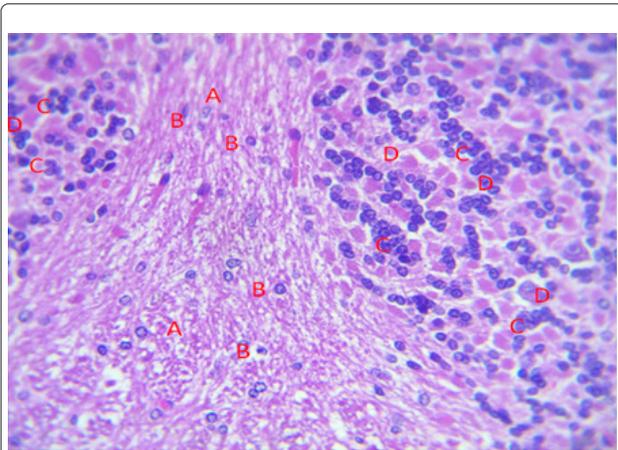
والطبقة الحبيبية الداخلية، كما وجدت اعداد من الاوعية الدموية الصغيرة المتجهة من القشرة صوب النخاع مخرقة الطبقة الحبيبية والخلايا الهرمية الصغيرة العصبية وكما موضح في الشكل (10).



الشكل (10): قشرة المخيخ، طبقة الخلايا الجزئية وفيها خلايا عصبية هرمية (A) طبقة الخلايا العصبية الكبيرة (خلايا بركنجي) (B) اوعية دموية (C) طبقة الخلايا الحبيبية (D).

6.3 مجموعة C9

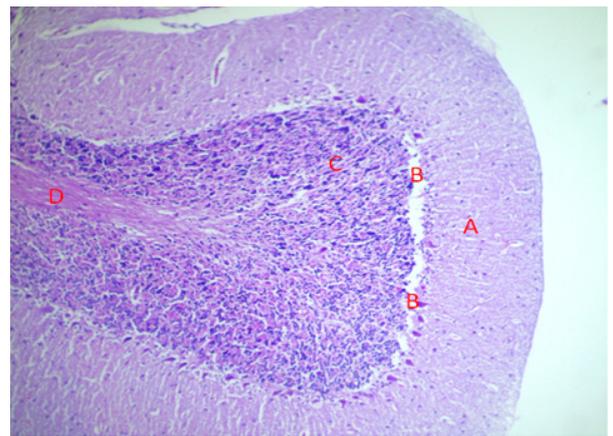
لب المخيخ احتوى على حزم الالياف العصبية وفيها خلايا دبقية والياف اللب متشابكة مع الياف عصبية من خلايا بركنجي وكذلك حزم الياف الطبقة الحبيبية المجاورة لللب المخيخ وكما موضح في الشكل (11).



الشكل (11): حزم الالياف العصبية لللب المخيخ (A) خلايا دبقية (B) طبقة الخلايا الحبيبية وفيها مجاميع خلايا حبيبية (C) الياف عصبية بين الخلايا الحبيبية (D). (H&E X40)

4.3 مجموعة B1

نسيج المخيخ يحتوي على القشرة والنخاع، قشرة المخيخ فيها الطبقة الخارجية وهي الطبقة الجزئية وفيها خلايا عصبية صغيرة وحول الخلايا العصبية وجدت خلايا دبقية وحزم الالياف العصبية المرتبطة مع طبقة الخلايا العصبية كبيرة الحجم (خلايا بركنجي) المنتظمة بشكل صف من الخلايا تحت الطبقة الجزئية، والطبقة الداخلية من قشرة المخيخ احتوت على طبقة الخلايا الحبيبية واسعة الانتشار المواجهة لللب المخيخ المحتوي على حزم الالياف العصبية الممتدة بشكل طولي وكما موضح في الشكل (9).



الشكل (9): قشرة المخيخ، الطبقة الجزئية وفيها الياف عصبية وخلايا عصبية صغيرة (A) طبقة خلايا بركنجي الكبيرة الحجم (B) طبقة الخلايا الحبيبية متعددة الخلايا العصبية (C) لب المخيخ وفيه حزم الالياف العصبية (D). (H&E X10)

5.3 مجموعة B3

قشرة المخيخ احتوت على الطبقات الثلاث الخارجية وهي الطبقة الجزئية المغطاة بالسحايا وهذه الطبقة احتوت على حزم الالياف العصبية وخلايا عصبية هرمية صغيرة الحجم قليلة العدد والطبقة الوسطى المحتوية على خلايا بركنجي كبيرة الحجم مع وجود خلايا لنفس النوع متوسطة الحجم والياف هذه الطبقة متواصلة مع الياف الطبقة الجزئية الخارجية

Anaesth Analg. 2008;35:365–73.

Suvarna, S.K., Layton, C., Bancroft, J. D., 2018. Bancroft, s theory and practice of histological techniques, 8th ed. Churchill Livingstone Elsevier Philadelphia. Pp, 176 -725.

Raquel, A ., Almeida, d., phelipe, o ., Luciano, D and Corla, M (2021) Central nervous system development in rabbits Anat. record. 304 (6) 1313–1328.

Rai, R., Iwanaga, J., Shokouhi, G., Oskouian, R. J., & Tubbs, R. S. (2018). The tentorium cerebelli: a comprehensive review including its anatomy, embryology, and surgical techniques. *Cureus*, 10(7).

Sato, J., Yamada, M. Koheyashi , R and tsuchitani , M. (2015). morphometric analysis of progressive change in cerebellar cortex of rabbit covered by abnormal synaptogenesis . *J . toxicol pathol.*28.2. 73-78.

Jay, M., Victor , J ., Kathleen , E ., Dora , E and minor, L . (2012) the cerebellum and the vestibular system. A textbook 6th ed.N.Y.

Anna , H ., Mannarino , M and Kelsey . L (2022) Hippocampus what is it, location , function and more. *Amer , J . neuroradiology*

المصادر References

Timiras, P. S., Vernadakis, A., & Sherwood, N. M. (2013). *Nervous System. The Fetus and Neonate*, 261.

Zhang, Z., Narayan, S., Su, L., Al-Alawyat, H., Liu, J., & Kannan, S. (2019). Cerebellar injury and impaired function in a rabbit model of maternal inflammation induced neonatal brain injury. *Neurobiology of learning and memory*, 165, 106901.

Ponti, G., Peretto, Bonfanti, L ,(2008): Genesis of Neuronal and Glial progenitors in the Cerebellar Cortex of Peripuberal and Adult Rabbits. *PLos One*. 10, 3(6) 2366.

Herculano-Houzel, S. (2009). The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Frontiers in human neuroscience* 3, 31.

Tan, J., Simpson, J. I., & Voogd, J. (1995). Anatomical compartments in the white matter of the rabbit flocculus. *Journal of Comparative Neurology*, 356(1), 1-22.

Julik, E., Zack, S., Adrian, B., Maredia, S., Parsa, A., Poole, M., Fisher, R. E. (2012). Functional anatomy of the forelimb muscles of the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Journal of Mammalian Evolution*, 19(4), 277–304.

Feng L, Liu J, Chen J, Pan L, Feng G. Establishing a model of middle cerebral artery occlusion in rabbits using endovascular interventional techniques. *Exp Ther Med*. 2013;6:947–52.

Brodbelt DC, Blissitt KJ, Hammond RA, Neath PJ, Young LE, Pfeiffer DU, Wood JL. The risk of death: the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities. *Vet*

