

Оригинални научни рад

## МОРФОМЕТРИЈСКЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЕРИТРОЦИТА КРКУШЕ (*GOBIO OBTUSIROSTRIS*)

Јована Паспаљ, Тања Пљеваљчић, Радослав Декић

Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Младена Стојановића 2,  
78 000 Бања Лука, Република Српска

### Abstract

**PASPALJ, Jovana, Tanja PLJEVALJČIĆ, Radoslav DEKIĆ: MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF ERYTHROCYTES OF COMMON GUDGEON (*Gobio obtusirostris*)**

[University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina]

The environment has a permanent influence on a series of physiological and biochemical processes in the organism, causing certain changes in these processes and functions. Hematological parameters, such as number of erythrocytes, their size, hemoglobine concentration, number of leukocytes and differential blood count, can provide key data in understanding the state of the organism. The number of erythrocytes in the blood of the fishes is constant and the body of the fish maintains this number within certain physiological limits, thanks to the activities of physiological homeostatic mechanisms that provide the balance between the process of erythrocyte formation and their degradation. In this study, the determination of morphometric characteristics of erythrocytes in the species *Gobio obtusirostris* was performed with the aim of obtaining the basic physiological characteristics of the species, as well as determining the degree of sensitivity of the species to changes in the environment. In the research were used the *Gobio obtusirostris* individuals that were caught on the Vrbanja River, in the area before the confluence of the Vrbas River. Blood samples of these fishes were used to make blood smears. A total of 11 individuals of *Gobio obtusirostris* were analyzed, and the analysis included 100 mature red blood cells on each preparation. Besides analyzing mature erythrocytes, the analysis also included young forms. Based on the comparison of all obtained values of the morphometric parameters of erythrocytes of the species *Gobio obtusirostris* with the results of studies by other authors, it can be concluded that the obtained values are lower in relation to the mentioned characteristics in most other species of the Cyprinidae family. By comparing the values of the morphometric characteristics of the immature and mature forms of erythrocytes in *Gobio obtusirostris*, significant differences were found.

**Key words:** erythrocytes, *Gobio obtusirostris*, morphometry

### Сажетак

Животна средина врши константан утицај на низ физиолошких и биохемијских процеса у организму, изазивајући одређене промјене тих процеса и функција. Хематолошки параметри, као што су број еритроцита, њихова величина, концентрација хемоглобина, број леукоцита и диференцијална крвна слика, могу дати кључне податке у разумијевању стања организма. Број еритроцита у крви риба сталан је и тијело рибе одржава овај број у оквиру одређених физиолошких граница, захваљујућу активности физиолошких хомеостатских механизма који одржавају равнотежу између процеса стварања и разградње еритроцита. У овој студији извршено је одређивање морфометријских карактеристика еритроцита код врсте *Gobio obtusirostris* са

циљем добијања основних физиолошких карактеристика врсте, као и одређивања степена осјетљивости врсте на промјене у животној средини. У истраживању су кориштене јединке врсте *Gobio obtusirostris* које су уловљене на ријечи Врбањи на подручју прије самог ушћа у ријеку Врбас. Узорци крви уловљених риба кориштени су за прављење крвних размаза. Укупно је анализирано 11 јединки врсте *Gobio obtusirostris*, а анализа је обухватала 100 зрелих еритроцита на сваком препарату. Поред зрелих форми еритроцита, анализа је обухватала и младе форме. На основу компарације свих добијених вриједности морфометријских параметара еритроцита врсте *Gobio obtusirostris* са резултатима студија других аутора може се закључити да су добијене вриједности ниже у односу на поменуте карактеристике код већине других врста фамилије Сургинидае. Поређењем вриједности морфометријских карактеристика незрелих и зрелих форми еритроцита кркуше утврђене су значајне разлике.

**Кључне ријечи:** еритроцити, *Gobio obtusirostris*, морфометрија

## УВОД

Животна средина врши константан утицај на низ физиолошких и биохемијских процеса у организму, изазивајући одређене промјене тих процеса и функција (Ivanc и сар., 2005). Директни и индиректни утицаји загађивача животне средине значајно се одражавају на здравствено стање риба које заузимају различите еколошке нише и зато се рибе сматрају идеалним биоиндикаторима у мониторингу водених екосистема (Јарак, 2013). За праћење здравља и кондиције риба у природним стаништима, као и риба у аквакултури, велику важност имају истраживања која се односе на крв и тјелесне течности (Ivanc и сар., 2005). Истраживања физиолошких особина риба могу бити добар показатељ стања организма, популације и у великој мјери стања животне средине. Хематолошки параметри, као што су број еритроцита, њихова величина, концентрација хемоглобина, број леукоцита и диференцијална крвна слика, могу дати кључне податке у разумијевању стања организма (Кнежевић, 2015). Праћењем што већег броја параметара (физичко-хемијских, биолошких, микробиолошких, тешких метала) у води одређује се њен квалитет, а утврђивање бројности и разноврсности ихтиопопулација које су у њој присутне, те њиховог здравственог статуса, пружа општу слику стања тог воденог система, као и претпоставку његовог будућег развоја (Valić и сар., 2010).

Параметри еритроцитне и леукоцитне лозе представљају веома значајне показатеље здравственог стања и кондиције риба у природним стаништима, као и риба у аквакултури. Број еритроцита у крви риба сталан је и тијело рибе одржава овај број у оквиру одређених физиолошких граница, захваљујући активности физиолошких хомеостатских механизма (Најдаревић и сар., 2015) који одржавају равнотежу између процеса стварања и разградње еритроцита. Број еритроцита у крви риба зависи од полне активности врсте, пола, старости, годишњег доба, кондиције риба, концентрације кисеоника и рН вриједности. Јединке из ријека са слабијим квалитетом воде имају знатно већи број младих, незрелих форми еритроцита и зрелих еритроцита са знатно мањом количином хемоглобина. Као одговор на лоше услове станишта рибе продукују младе форме еритроцита које имају мање вриједности просјечне запремине. Једро ових еритроцита је мање и са нешто измијењеним елипсастим обликом у односу на једро еритроцита јединки из ријека са бољим квалитетом воде. Присуство мање просјечне запремине еритроцита узрокује и мање вриједности просјечне количине хемоглобина по еритроциту, као и мање вриједности укупног хемоглобина (Dekić и сар., 2009).

Еритроцити различитих врста риба, иако имају исте морфолошке карактеристике ћелија са једром, знатно се разликују у величини и облику. Морфометријска анализа нормалних еритроцита може бити основа израде референтних вриједности за поједине врсте риба (Декић и сар., 2012), као и важан показатељ здравственог стања и утицаја различитих фактора на организам. Осим тога, морфометријске анализе еритроцита играју значајну улогу у проучавању патолошких процеса код риба, као и у проучавању њихове активности и навика (Gayatri и Prafulla, 2014). У овој студији извршено је одређивање морфометријских карактеристика еритроцита код врсте *Gobio obtusirostris* са циљем добијања основних физиолошких карактеристика врсте, као и одређивања степена осјетљивости врсте на промјене у животној средини.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

У истраживању су кориштене јединке врсте *Gobio obtusirostris* које су уловљене на ријеци Врбањи на подручју прије самог ушћа у ријеку Врбас. Врбања је ријека смјештена у западном дијелу Босне и Херцеговине (Муџибалић, 1998), а извире на источним падинама планине Влашић, на надморској висини од 1520 m. Тече правцем југоисток-сјеверозапад и у граду Бања Лука улијева се са десне стране у ријеку Врбас на 164 m надморске висине. Дужина главног тока ријеке Врбање од извора до ушћа износи око 84 km, док укупна дужина са притокама износи око 300 km. Поред ријеке Угар, највећа је десна притока ријеке Врбас. Висинска разлика између извора и ушћа износи 1356 m (Докић, 2009).

Електрориболов је спроведен 16. 10. 2017. године. За лов рибе кориштен је електроагрегат марке 'ELT 62 II GI', снаге 3 kW са импулсном истосмјерном струјом и могућношћу прилагођавања излазног напона. Сакупљање риба извршено је помоћу мередова, након чега су рибе смјештене у адекватне контејнере са обезбијеђеном аерацијом. Транспортоване су у просторије Природно-математичког факултета у Бањој Луци, гдје су узети узорци крви који су кориштени за даље анализе.

### Хематолошке анализе

Узорци крви за хематолошке анализе узети су пункцијом срца стерилном и оштром иглом, уз примјену правила стерилног рада. Величина игле подешавана је према величини животиње. Узорци крви сакупљени су у претходно парафинисану посуду, након чега је приступљено прављењу крвних размаза. Припремљени крвни размази осушени су на ваздуху и након припреме за бојење, бојени су методом по Рарпенheim-у.

### Одређивање морфометријских карактеристика еритроцита

Укупно је анализирано 11 јединки врсте *Gobio obtusirostris*, а анализа је обухватала 100 зрелих еритроцита на сваком препарату. Површина сваког еритроцита одређена је помоћу микроскопа са камером Leica LAS E2 уз одговарајући софтвер на Природно-математичком факултету Универзитета у Бањој Луци. Код сваког еритроцита одређене су вриједности сљедећих параметара: дужа оса еритроцита, краћа оса еритроцита, дужа оса једра и краћа оса једра. На основу тих података израчунате су површине еритроцита и једра према обрасцу:

$$P = \frac{x}{2} * \frac{y}{2} * \pi$$

гдје је  $x$  дужа оса еритроцита, односно једра, а  $y$  краћа оса еритроцита, односно једра.

Поред зрелих форми еритроцита, анализа је обухватала и младе форме. У студији је утврђена укупна учесталост развојних форми еритроцита у односу на 1000 зрелих еритроцита.

Статистичка обрада података спроведена је помоћу програма Microsoft Office Excel 2007.

## РЕЗУЛТАТИ

Резултати ових истраживања представљени су кроз вриједности о морфометријским карактеристикама зрелих еритроцита и њихових младих форми (табеле 1 и 2), као и учесталост појављивања младих форми еритроцита. Приликом сазријевања еритроцита појављује се више фаза, односно прелазних облика, а у овим истраживањима заступљеност незрелих форми еритроцита приказана је укупно. Резултати добијени мјерењем дуже и краће осе еритроцита и једра кориштени су за израчунавање површине еритроцита и једра.

**Табела 1.** Вриједности морфометријских параметара зрелих еритроцита кркуше *Gobio obtusirostris*

	Дужа оса еритроцита (µm)	Краћа оса еритроцита (µm)	Укупна површина еритроцита (µm <sup>2</sup> )	Дужа оса једра (µm)	Краћа оса једра (µm)	Укупна површина једра (µm <sup>2</sup> )
<b>Средња вриједност</b>	<b>10,16</b>	<b>6,83</b>	<b>109,24</b>	<b>4,90</b>	<b>2,84</b>	<b>21,92</b>
<b>Стандардна девијација</b>	0,371	0,167	6,078	0,782	0,118	2,983
<b>Минимум</b>	9,68	6,62	101,34	4,35	2,64	18,12
<b>Максимум</b>	10,91	7,16	120,32	7,31	3,04	30,40
<b>Коефицијент варирања %</b>	3,65	2,45	5,56	15,95	4,15	13,59

Поред зрелих форми еритроцита, анализа је обухватала и младе форме. У Табели 2 представљене су вриједности морфометријских параметара незрелих форми еритроцита: дужа и краћа оса еритроцита, односно једра, као и укупна површина еритроцита и једра.

**Табела 2.** Вриједности морфометријских параметара незрелих форми еритроцита кркуше *Gobio obtusirostris*

	Дужа оса еритроцита (µm)	Краћа оса еритроцита (µm)	Укупна површина еритроцита (µm <sup>2</sup> )	Дужа оса једра (µm)	Краћа оса једра (µm)	Укупна површина једра (µm <sup>2</sup> )
<b>Средња вриједност</b>	<b>7,90</b>	<b>6,62</b>	<b>82,13</b>	<b>4,07</b>	<b>3,04</b>	<b>19,47</b>
<b>Стандардна девијација</b>	0,158	0,199	2,630	0,218	0,129	1,493
<b>Минимум</b>	7,69	6,35	79,32	3,66	2,78	16,24

Максимум	8,22	7,09	89,42	4,38	3,23	21,44
Коефицијент варирања %	2,00	3,00	3,20	5,35	4,24	7,66

Поређењем вриједности морфометријских карактеристика незрелих и зрелих форми еритроцита кркуше утврђене су значајне разлике. Средња вриједност укупне површине еритроцита показује веће вриједности код зрелих форми еритроцита (средња вриједност укупне површине еритроцита зрелих форми износи  $109,24 \mu\text{m}^2$ , а незрелих форми  $82,13 \mu\text{m}^2$ ). Средња вриједност површине једра већа је код зрелих форми еритроцита у односу на незреле форме (зреле форме  $21,92 \mu\text{m}^2$ /незреле форме  $19,47 \mu\text{m}^2$ ).

Осим тога, у студији је утврђена укупна учесталост развојних форми еритроцита у односу на 1000 зрелих еритроцита (Табела 3). Укупна учесталост незрелих форми еритроцита код јединки кркуше *Gobio obtusirostris* износи  $7,68 \pm 1,53 \%$ .

**Табела 3.** Вриједности заступљености незрелих еритроцита представљених на 1000 зрелих еритроцита *Gobio obtusirostris*

Вриједности заступљености незрелих форми еритроцита	(‰)
Средња вриједност	7,68
Стандардна девијација	1,53
Минимум	1,50
Максимум	16,00

## ДИСКУСИЈА

На основу компарације свих добијених вриједности морфометријских параметара еритроцита врсте *Gobio obtusirostris* са резултатима студија других аутора, може се закључити да су добијене вриједности ниже у односу на поменуте карактеристике код већине других врста фамилије Сурпинидае. Добијена средња вриједност за површину зрелих еритроцита у истраживању је  $109,24 \pm 6,078 \mu\text{m}^2$ , док је средња вриједност површине једра износила  $21,92 \pm 2,983 \mu\text{m}^2$ . Декић и сар. (2012) проучавајући врсту *Telestes tohiensis* која насељава Дабарско поље наводе вриједност за површину еритроцита од  $152 \mu\text{m}^2$ , а за површину једра вриједност од  $24,30 \mu\text{m}^2$ . Наведене вриједности доста су веће у односу на добијене вриједности морфометријских параметара кркуше у овој студији. Осим тога, Кнежевић (2015) истражујући морфометријске карактеристике требињске гаовице *Delminichthys ghetaldii* наводи више вриједности површине еритроцита, али и површине једра (површина једра варира је од  $26,32 \pm 3,46 \mu\text{m}^2$  до  $38,36 \pm 3,46 \mu\text{m}^2$ ), на основу чега се може закључити да су једра требињске гаовице већа у односу на једра кркуше. За разлику од вриједности морфометријских карактера код требињске гаовице, код врсте *Tinca tinca* утврђене су двоструко веће вриједности површине еритроцита, али мање вриједности површине једра (Декић и сар., 2012). На

основу тога може сезакључити да су једра *Gobio obtusirostris* површином већа у односу на једра еритроцита врсте *Tinca tinca*. Постоје бројни разлози због којих се данас врше интензивна истраживања морфометријских параметара еритроцита код различитих врста. Gayatri и Prafulla (2014) наводе да су морфометријске карактеристике еритроцита најбитније када је у питању патологија код риба, те да поменути параметри могу играти важну улогу у откривању здравственог стања риба. Промјене морфометријских параметара потенцијално могу указивати на ране знакове клиничке патологије, као и на нарушеност стања квалитета воде. Тако Томова и сар. (2009) указују на промјене вриједности дуже и краће осе еритроцита код врсте *Carassius gibelio* код јединки које су излагане различитим концентрацијама цинка. Осим тога, утврђено је да димензије еритроцита условно могу да се мијењају у стању хипоксије када долази до бубрења еритроцита и повећања вриједности хематокрита, што за последицу има повећање способности преноса кисеоника ових ћелија. Промјене вриједности хематолошких индекса узроковане хипоксијом и бубрењем еритроцита имају за последицу промјену волумена плазме и ослобађање еритроцита из депоа (услед интензивне синтезе еритроцита) (Jensen и сар., 1993). Данас се сматра да најважнија улога еритроцита (пренос кисеоника и угљен-диоксида) зависи од односа између запремине и површине еритроцита, те да због тога мањи еритроцити показују бољи и интензивнији ниво размјене гасова у односу на веће еритроците (Jensen и сар., 1993; Hartman и Lessler, 1964). Snyder и Sheafor (1999) су у свом истраживању покушали указати на зависност величине еритроцита од степена еволуције циркулаторног система, због чега је постојала претпоставка да су већи еритроцити примитивна карактеристика, те да постоји тенденција њиховог смањења током еволуције. Оваква хипотеза није доказана и контрадикторна је подацима да се код неких водоземаца срећу већи еритроцити у односу на еритроците риба.

Поређењем вриједности морфометријских карактеристика незрелих и зрелих форми еритроцита кркуше утврђене су значајне разлике. Код незрелих форми еритроцита забиљежене су доста мање просјечне вриједности за дужу осу еритроцита у односу на зреле еритроците (зреле форме 10,6  $\mu\text{m}$ /незреле форме 7,90  $\mu\text{m}$ ). Средња вриједност за краћу осу незнатно је већа код зрелих форми еритроцита (зреле форме 6,83  $\mu\text{m}$ /незреле форме 6,62  $\mu\text{m}$ ), као и средња вриједност укупне површине еритроцита која показује веће вриједности код зрелих форми еритроцита (средња вриједност укупне површине еритроцита зрелих форми износи 109,24  $\mu\text{m}^2$ , а незрелих форми 82,13  $\mu\text{m}^2$ ). Средња вриједност површине једра већа је код зрелих форми еритроцита у односу на незреле форме (зреле форме 21,92  $\mu\text{m}^2$ /незреле форме 19,47  $\mu\text{m}^2$ ).

За разлику од добијених вриједности код кркуше, Кнежевић (2015) наводи да су вриједности морфометријских параметара незрелих форми еритроцита код требињске гаовице *Delminichthys ghetaldii* веће у односу на вриједности зрелих форми еритроцита. Супротно овим наводима, Декић и сар. (2012) за врсту *Telestes metohiensis* констатују веће вриједности морфометријских карактеристика еритроцита код зрелих форми у односу на младе форме еритроцита, слично као код *Gobio obtusirostris*.

Поред наведених параметара, истраживањем је утврђена и укупна учесталост развојних форми еритроцита у односу на 1000 зрелих еритроцита. Укупна учесталост незрелих форми еритроцита код јединки кркуше *Gobio obtusirostris* износи  $7,68 \pm 1,53$  %. Бројна истраживања показују да је учесталост незрелих форми еритроцита већа код

јувенилних јединки, док се та пропорција са старошћу смањује (Декић и сар., 2012). Такође, Kashiwagi и сар. (1965) су проучавајући врсту *Oncorhynchus keta* утврдили да се број незрелих форми еритроцита са старошћу смањује, а истовремено се повећава број зрелих еритроцита.

## ЗАКЉУЧАК

Морфометријске карактеристике еритроцита несумњиво су веома битан индикатор здравственог стања код риба, али и промјена у станишту у којем дата врста живи. На основу компарације свих добијених вриједности морфометријских параметара еритроцита врсте *Gobio obtusirostris* у овој студији са резултатима студија других аутора може се закључити да су добијене вриједности ниже у односу на поменуте карактеристике код већине других врста фамилије Cyprinidae. Добијена средња вриједност за површину зрелих еритроцита у истраживању је  $109,24 \pm 6,078 \mu\text{m}^2$ , док је средња вриједност површине једра износила  $21,92 \pm 2,983 \mu\text{m}^2$ . Добијена средња вриједност површине незрелих еритроцита је  $82,13 \pm 2,630 \mu\text{m}^2$ , а средња вриједност укупне површине једра код незрелих еритроцита износила је  $19,47 \pm 1,493 \mu\text{m}^2$ . Закључује се да незреле форме еритроцита показују мању просјечну вриједност површине у односу на средњу вриједност површине зрелих еритроцита. Учесталост незрелих форми еритроцита код јединки кркуше *Gobio obtusirostris* износила је  $7,68 \pm 1,53 \%$ . С обзиром на то да су морфометријске карактеристике специфичне за врсту, јако је тешко вршити некритичка поређења, нарочито уколико се ради о таксонима који нису довољно истражени. Такође, да би се могла вршити релевантна поређења морфометријских параметара, треба узети у обзир све факторе унутрашње средине организма, као и стања средине у којој одређена врста живи, како би се тако добијени подаци могли сматрати егзактним.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dekić, R., Ivanc, A., Bakrač-Bećiraj, A., Bošković, J., Lolić, S.: Hematološki parametri riba kao indikatori stanja životne sredine, 4. Međunarodna konferencija „Ribarstvo“ – Zbornik predavanja, str. 204–210, 2009.
2. Dekić, R., Ivanc, A., Lukač, M., Krnić, J.: Morfometrijske karakteristike eritrocita *Telestes metohiensis* (Steindacher, 1901). *Veterinaria* 61(3–4): 115–127, 2012.
3. Докић, М.: **Слив ријеке Врбање – ресурси и екологија**. Народна библиотека „Иво Андрић“ Челинац, 2009.
4. Gayatri A., Prafulla M.: The Morphometrical Characterisation of Normal Blood Cells of Two airbreathing fishes, *Clarias batrachus* and *Anabas testudineus*, *International Research Journal of Biological Sciences* 3(11): 37–41, 2014.
5. Hajdarević E., Hasanović T., Omeragić A., Adrović A., Skenderović I., Bajrić A.: Karakteristike eritrocita babuške (*Carassius gibelio*) iz jezera Vidara, XX Savjetovanje o biotehnologiji 20(22): 435–439, 2015.
6. Hartman, F.A., Lessler, M.A.: **Erythrocyte measurements in fishes, amphibia and reptiles**. Department of Physiology, the Ohio State University, Ohio, 1964.

7. Ivanc, A., Hasković, E., Jeremić, S., Dekić, R: Hematological Evaluation of welfare and health of fish, *Praxis veterinaria* 53(3): 191–202, 2005.
8. Jarak, M: Diferencijalna i citokemijska analiza krvnih stanica babice balavice (*Parablennius sanguinolentus* Pallas, 1814). Sveučilište u Zagrebu Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb, 2013.
9. Jensen, FB., Nikinmaa, M., Weber, ME.: **Environmental Perturbations of Oxygen Transport in Teleost Fishes: Causes, Consequenses and Compensations**. In: Fish Ecophysiology. London 163–179, 1993.
10. Kashiwagi, M., Yoshida, F., Sato, R.: Blood cell constituents of chum salmon, *Onchirhynchus keta*, Department of fisheries, Faculty of Agriculture, Tohoku University, Japan, 1965.
11. Knežević, Z: Morfometrijske karakteristike eritrocita *Delminichtys ghetaldii*. Diplomski rad, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Banjoj Luci, 2015.
12. Mučibabić, B: **Geografski atlas BiH**. Sarajevo: Geodetski zavod BiH. ISBN 9958-766-00-0, 1998.
13. Snyder, G., Sheafor, B.: Red Blood Cells: Centerpiece in the Evolution of the Vertebrate Circulatory System, Department of Environmental, Population and Organismic Biology, University of Colorado and Biology Department, Mount Union College, Ohio, 1999.
14. Tomova, E., Ardaudov, A., Velcheva, I: Changes in the Erythrocytes Indexes Of *Carassius gibelio* (Pisces, Cyprinidae) under the Influence of Zinc. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2009.
15. Valić, D., Vardić, I., Kapetanović, D., Kurtović, B., Tomec, M., Teskeredžić, Z., Raspor, B., Dragun, Z., Strižak, Ž., Teskeredžić, E.: Kvaliteta vode i zdravstveno stanje riba rijeke Sutle. Laboratorij za akvakulturu i patologiju akvatičnih organizama, Zavod za istraživanje mora i okološa, Institut Ruđer Bošković, 2010.

Примљено: 15.11.2018.

Одобрено: 10.12.2018.