

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO - MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

Martina Ratko

**Morfologija eritrocita te učestalost pojave jezgrinih nepravilnosti u  
blavora (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775)**

Diplomski rad

Zagreb, 2014. godina

Ovaj je rad izrađen u Laboratoriju za ihtiopatologiju – biološke materijale na Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković pod vodstvom dr. sc. Ivančice Strunjak-Perović, te na Zavodu za animalnu fiziologiju pod vodstvom doc. dr. sc. Zorana Tadića, predan je na ocjenu Prirodoslovno – matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode, modul Kopno.

## Zahvale

Zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ivančici Strunjak Perović na stručnom vodstvu prilikom izrade ovog diplomskog rada. Bez njenog strpljenja, sveobuhvatnog znanja i danih savjeta izrada ovog rada bila bi uvelike otežana.

Također bih se htjela zahvaliti njenim suradnicama iz Laboratorija za ihtiopatologiju, koje su mi velikodušno ustupile svoj laboratorij u svrhu izrade diplomskog rada, te svojim optimizmom i pomoći olakšale monotoniju obrade dobivenih podataka.

Zahvaljujem se i svom suvoditelju doc. dr. sc. Zoranu Tadiću na nepresušnoj podršci i vodstvu. Njegov entuzijizam za područje animalne fiziologije bio je snažan utjecaj pri razvijanju mog vlastitog zanimanja za to područje.

Posebno bih se htjela zahvaliti doc. dr. sc. Duji Lisičiću na pomoći pri odabiru teme mog diplomskog rada, te njegovoj pomoći pri odrađivanju terenskog dijela ovog istraživanja. Pod njegovim vodstvom uvelike sam proširila svoje znanje o biologiji i ekologiji raznih vrsta koje smo susretali prilikom terenskih izlazaka.

Zahvaljujem se i svojim kolegicama, Loreni Derežanin i Paoli Počanić, koje su zajedno sa mnom pod oštrim dalmatinskim suncem neumoljivo pretraživale gustike i suhozidove u potrazi za blavorima.

Najviše bih se htjela zahvaliti svojim roditeljima i sestri, koji su mi bili stalna i nepresušna podrška tijekom cijelog mog školovanja, pa tako i tijekom izrade mog diplomskog rada.

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno – matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

### **Morfologija eritrocita te učestalost pojave jezgrinih nepravilnosti u blavora (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775)**

Martina Ratko

Prirodoslovno – matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Biološki odsjek,  
Rooseveltov trg 6, Zagreb, Hrvatska

Istraživanje je provedeno na vrsti *Pseudopus apodus* (Pallas, 1775) s ciljem istraživanja morfologije eritrocita te utvrđivanja učestalosti pojavljivanja nepravilnih eritrocitnih jezgri odnosno eritrocitnih nuklearnih abnormalnosti (ENA). Jedinke su uzorkovane iz dvije odvojene populacije blavora. Jedna populacija nastanjuje staništa u južnom dijelu Cresa s gotovo zanemarivim antropogenim utjecajem, dok druga obitava na splitskom području čije je stanište izloženo većem antropogenom utjecaju. Podaci su analizirani neparametrijskim statističkim testovima obzirom na mjesto uzorkovanja i spol jedinki. Rezultati pokazuju značajno višu učestalost jezgrinih i citoplazmatskih vakuola kod splitske populacije blavora, zajedno s većom brojnosti mikronukleusa i dvojezgrenih eritrocita. Jezgrene nepravilnosti su nešto brojnije kod creske populacije, međutim taj nalaz se nije pokazao statistički značajan. Nisu pronađene značajne razlike u učestalosti nepravilnosti među spolovima, što dovodi do zaključka kako promjene okolišnih čimbenika imaju jednak utjecaj na oba spola. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdila promjenjivost u učestalosti eritrocitnih nepravilnosti ovisno o sezoni i starosti jedinki blavora.

(66 stranica, 21 slika, 7 tablica, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: blavor, mikronukleus, jezgrene nepravilnosti eritrocita, lokacija, spol

Voditelj: Dr. sc. Ivanjčica Strunjak-Perović

Suvoditelj: Dr. sc. Zoran Tadić, doc.

Ocjenjitelji: Dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović

Dr. sc. Zoran Tadić, doc.

Dr. sc. Sven Jelaska, izv. prof.

Dr. sc. Jasna Lajtner, doc.

Rad prihvaćen: 6. veljače 2014.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

### **Erythrocyte morphology and frequency of nuclear abnormalities in European glass lizard (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775)**

Martina Ratko

Faculty of Science, University of Zagreb, Department of Biology,

Roosevelt square 6, Zagreb, Croatia

Research was conducted on the species *Pseudopus apodus* (Pallas, 1775) with the aim of evaluating erythrocyte morphology and determining baseline values of erythrocytic nuclear abnormalities (ENA). Samples were taken from two separate populations of glass lizards. The first population inhabits the southern part of Island Cres, where anthropogenic influence is very mild, whereas the second occupies the outskirts of Split, a coastal city characterized by higher levels of anthropogenic influence. Data were analyzed using non-parametric statistic tests with reference to location and gender of sampled individuals. Results showed significantly higher nuclear and cytoplasmic vacuolization in glass lizards from the Split area, along with elevated levels of micronuclei and binuclear erythrocytes. Nuclear abnormalities were slightly elevated within the Cres population of glass lizards, but these results were not statistically significant. No significant differences were found between male and female glass lizards, which leads to a conclusion that both genders respond equally to environmental stress. Further research is needed to supplement obtained data with reference to seasonal changes and age of individuals.

(66 pages, 21 figures, 7 tables, 61 literature citations, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Keywords: glass lizard, micronuclei, erythrocytic nuclear abnormalities, location, gender

Supervisor: Dr. sc. Ivanjčica Strunjak-Perović

Co-supervisor: Dr. sc. Zoran Tadić, doc.

Reviewers: Dr. sc. Ivančica Strunjak-Perović

Dr. sc. Zoran Tadić, doc.

Dr. sc. Sven Jelaska, assoc. prof.

Dr. sc. Jasna Lajtner, doc.

Thesis accepted: February 6<sup>th</sup>, 2014

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Cilj istraživanja .....	2
3. Značajke gmazova .....	3
3.1. Porodica Anguidae.....	5
3.2. Blavor ( <i>Pseudopus apodus</i> Pallas, 1775).....	6
4. Hematologija gmazova .....	8
4.1. Sastav krvi gmazova.....	9
4.2. Eritrociti .....	11
4.3. Morfološke promjene eritrocita i njihovih jezgri .....	13
4.4. Hematološki testovi .....	18
5. Materijali i metode.....	20
5.1. Opis istraživanih lokaliteta.....	20
5.2. Uzorkovanje jedinki blavora.....	23
5.3. Uzorkovanje krvi blavora .....	24
5.4. Izrada i analiza krvnih razmaza.....	25
5.5. Statistička obrada podataka.....	26
6. Rezultati.....	27
6.1. Zabilježeni morfološki oblici eritrocita .....	27
6.2. Učestalost pojavljivanja nepravilnosti eritrocita blavora .....	39
6.3. Međuovisnost zabilježenih morfoloških nepravilnosti eritrocita kod blavora.....	40
6.4. Rezultati analize učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o lokaciji.....	42
6.5. Rezultati analize učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o spolu .....	46
6.6. Analiza učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o spolu i lokaciji.....	48
7. Rasprava .....	51
8. Zaključak.....	57
9. Literatura .....	59
10. Životopis .....	66

## Popis skraćenica korištenih u diplomskom radu

BN – dvojezgreni eritrociti (eng. *Binucleated Erythrocytes*)

CV – citoplazmatske vakuole

D.D. – vrste s nedovoljno podataka (eng. *Data-Deficient*)

EN – ugrožene vrste (eng. *Endangered*)

ENA – jezgrine nepravilnosti eritrocita (eng. *Erythrocytic Nuclear Abnormalities*)

JV – jezgrine vakuole

MN – mikronukleus

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici (eng. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*)

PCV – hematokrit (eng. *Packed Cell Volume*)

PN – višejezgreni eritrociti (eng. *Polynucleated Erythrocytes*)

TRBC – ukupan broj eritrocita (eng. *Total Red Blood Cell Count*)

VU – osjetljive vrste (eng. *Vulnerable*)

## 1. Uvod

Gmazovi su ektotermne životinje i prvi kopneni kralješnjaci. Prelazak na kopneni način života zahtijevao je mnoge anatomske i fiziološke promjene. Pošto su gmazovi parafiletička skupina organizama, navedene promjene odvijale su se evolucijski zasebno kod pojedinih skupina; stoga danas posjeduju veliku anatomsku, fiziološku i ekološku raznolikost.

Takva raznolikost se uvelike odražava na hematogram gmazova unutar kojeg možemo vidjeti značajne razlike među blisko srodnim vrstama. Hematologija gmazova je slabo istraživana, te se počela razvijati tek posljednjih nekoliko desetljeća. Početna istraživanja bavila su se osnovnim hematološkim značajkama, te se primjenjuju i danas.

Kao posljedica raznolikog i sveobuhvatnog antropogenog utjecaja na staništa, a time i zdravlje populacija gmazova, počele su se razvijati tehnike određivanja nepovoljnog utjecaja ksenobiotika na hematologiju (poglavito crvene krvne stanice) gmazova. Do sada je istražen mali broj vrsta te su otkrivene velike međuvrsne razlike u načinu odgovora krvnih stanica i hematopoetskog tkiva na metabolički stres jedinki. Dobiveni podaci ukazuju na veliki potencijal pojedinih vrsta kao bioindikatora ekološkog onečišćenja, međutim potrebe za standardizacijom metoda i dobivanjem referentnih vrijednosti za svaku vrstu zahtijevaju dodatna istraživanja.

Blavor je najveći beznogi gušter u Europi. U Hrvatskoj nastanjuje mediteranska staništa smještena u blizini ljudskih naselja. Unatoč velikoj rasprostranjenosti blavora u Hrvatskoj, postoji vrlo malo podataka o postojećim populacijama blavora. Hematologija blavora je također vrlo slabo istražena, te ne postoje referentne vrijednosti o eritrocitnim nepravilnostima za ovu vrstu. Analizom podataka prikupljenim iz dviju populacija blavora (Cres, Split) upotpunit će se dosadašnja saznanja te će predstavljati osnovu za daljnja istraživanja.



## **2. Cilj istraživanja**

Osnovni cilj ovog istraživanja je istražiti morfologiju eritrocita blavora i ustanoviti osnovne referentne vrijednosti eritrocitnih nepravilnosti za ovu vrstu. Kao referentna populacija uzeti su blavori uzorkovani na Cresu, koji žive na staništu s minimalnim antropogenim utjecajem.

Nakon dobivanja osnovnih vrijednosti za eritrocitne nepravilnosti, usporediti ću ih s podacima dobivenim za splitsku populaciju blavora koja živi na staništu pod većim antropogenim utjecajem. Analiza ću također provesti na temelju spola jedinki, kako bih utvrdila postoji li razlika u fiziološkom odgovoru na kvalitetu staništa između mužjaka i ženki.

Prema mojim saznanjima, ovo je prvi ovakav rad na blavorima. Podaci dobiveni ovim istraživanjem mogu poslužiti kao podloga za daljnja istraživanja na područjima ekotoksikologije i ekofiziologije vezanim uz ovu vrstu.

### 3. Značajke gmazova

Prvi gmazovi razvili su se krajem Paleozoika, točnije krajem Devona (prije 350 milijuna godina), iz danas izumrle parafiletičke skupine *Labirinthodontia*. Odlikuje ih prelazak na kopneni način života (smatraju se prvim potpuno kopnenim vrstama), ektotermni metabolizam, razvoj kože prekrivene ljuskama i otporne na isušivanje, razvoj čvrste jajne ovojnice te pojava amnionske embrionalne ovojnice, čija je funkcija dodatna zaštita embrija od vanjskih udaraca. Glavni razvoj gmazovi su postigli tijekom Mezozoika, gdje je došlo do snažne radijacije i pojave predaka recentnih vrsta. Krajem Karbona (prije 285 milijuna godina) dolazi do razvoja tri glavne linije gmazova, iz koje se postupno razvijaju današnji gmazovi, ptice i sisavci (Shine 2005).

Jedan od preduvjeta prelaska na terestrički način života bio je razvoj zaštitnog pokrova. Koža gmazova je suha i nepropusna, te većinom ne sadrži žlijezde. Takva površina štiti jedinku od sunčeve radijacije, abrazije te sprečava pretjeran gubitak vode (isušivanje). Razvitak nepropusnog pokrova razlikuje gmazove od riba i vodozemaca, te onemogućuje ulazak štetnih tvari, poput ksenobiotika, putem kože već ograničava njihov unos na dišni i probavni sustav. Dodatna prilagodba na štetne utjecaje na kopnu su melanofori smješteni u usmini kože gmazova. Promjenama veličine melanofora u koži gmazovi su sposobni poboljšati učinkovitost dobivenog Sunčevog zračenja (Shine 2005) i zaštititi se od pretjeranog UV zračenja.

Od osjetila, gmazovi najviše koriste vid i miris, što je vidljivo po povećanim vidnim i mirisnim režnjevima u srednjem odnosno prednjem mozgu. Imaju pokretne očne kapke i migavicu, čija je uloga čišćenje rožnice. Zmije i neki gušteri ne posjeduju migavicu, već je rožnica zaštićena prozirnim slojem kože (*spectaculum*).

Neke vrste (ljuskaši, premosnici) imaju dodatno Jacobsonov organ, koji se otvara u nosnu šupljinu i pomaže u boljoj detekciji mirisnih čestica. Gmazove također karakterizira pojava timpaničnog uha, odnosno membrane bubnjića koja preuzima ulogu primanja auditornih signala iz okoline (Schwenk 2008).

Još jedna prilagodba na kopneni način života je metanefrički bubreg koji je potpuno odvojen od spolnog sustava. On zahtijeva manju potrošnju vode prilikom izbacivanja dušičnih spojeva, te se kod kopnenih gmazova oni izbacuju u obliku

čvrstih kristala mokraćne kiseline. Izbjegavanje nepotrebnog gubitka vode postignuto je resorpcijom vode u bubrežnim kanalčićima, mokraćnom mjehuru ili kloaki. Izlučivanje soli se postiže žlijezdama.

Gmazovi su razvili unutrašnju oplodnju neovisnu o vodenom okruženju. Većina vrsta su oviparne, te liježu jaja na kopnu. To ne bi bilo moguće bez razvoja amniotskog jaja, koje je obavijeno čvrstom ovojnicom od vapnenca otpornom na isušivanje, ali koja dozvoljava izmjenu plinova s okolinom. Amnionska ovojnica je ispunjena amnionskom tekućinom i obavlja embrio, čime ga amortizira i dodatno zaštićuje od štetnih vanjskih utjecaja. Mladi gmazovi su identični svojim roditeljima te za razliku od vodozemaca ne prolaze metamorfozu (Shine 2005).

Kod vrsta gmazova koje nastanjuju hladnije klime javlja se ovoviviparnost. Jaje se zadržava u jajovodu ženke sve do trenutka izlijeganja. Briga za mlade je zabilježena kod rijetkih vrsta, ponajviše kod krokodila. Neke vrste napuštaju jaja odmah nakon izlijeganja, dok kod nekih vrsta jedno ili oba roditelja brane mlade od predatora (Zaworski, 1987) te im pomažu prilikom hranjenja. Pojačana briga za mlade prisutna je češće te duže traje kod viviparnih vrsta (Branch 1998).

Zahvaljujući svojim prilagodbama na različite životne uvjete, gmazovi danas nastanjuju sva staništa izuzev Arktika i Antarktike. Opisano je preko 9 500 vrsta, koje svrstavamo u tri podrazreda: podrazred Anapsida, čiji su jedini recentni predstavnici red Chelonia (kornjače); podrazred Archosauria koji sačinjavaju krokodili (red Crocodylia); te podrazred Lepidosauria u koji ubrajamo premosnike (red Rhynchocephalia) i ljuskaše (red Squamata).

### 3.1. Porodica Anguidae

Porodica Anguidae, koja se nalazi unutar reda Squamata (ljuskaši), sadrži oko 120 vrsta guštera razdijeljenih u 12 svojti. Pripadnici ove porodice nastanju pretežno sjevernu hemisferu. Potporodica Anguinae, kojoj pripada i blavor, je jedina koja nastanjuje Stari svijet, odnosno Europu, Aziju te sjever Afrike. Druge dvije potporodice naseljavaju sjevernu i središnju Ameriku (potporodice Anniellinae i Gerrhonotinae) odnosno središnju i južnu Ameriku (potporodica Diploglossinae) (Macey i sur. 1999).

Pripadnike ove porodice karakterizira snažan koštani oklop smješten ispod kože građen od osteoderma, te sjajne pravokutne ljuske. U pravilu imaju reducirane prednje i stražnje noge, osim kod potporodica Diploglossinae i Gerrhonotinae čije su vrste zadržale funkcionalne udove s pandama. Većina vrsta ima kožno udubljenje koje se proteže lateralno duljinom tijela; započinje iza usta i dolazi do kloake. Pretpostavlja se da im udubljenje omogućuje dodatno rastezanje tijela u širinu prilikom hranjenja, disanja ili gravidnosti (Vitt i Caldwell 2009). Duljina tijela varira od oko 10 cm do gotovo 1,5 m. Imaju pokretne očne kapke te vanjske slušne otvore. Duljina repa je promjenjiva ovisno o vrsti, te je česta pojava kaudalne autotomije.

Anguidae nastanjuju niz staništa, od pješčanih dina i obala rijeka i potoka, preko gustih listopadnih i borovih šuma do kišnih šuma umjerenog pojasa, gdje se kreću ispod gustog prizemnog pokrova. Većinom su diurnalni, iako su pripadnici potporodice Diploglossinae zamijećeni i u sumrak (Vitt i Caldwell 2009). U vrijeme prestanka aktivnosti povlače se u podzemne nastambe. U pravilu su kopneni organizmi, iako je za neke vrste primijećeno da su fosorijalne (rod *Anguis*, dio vrsta potporodice Diploglossinae) (Gregory 1980) odnosno arborealne (rod *Abronia*) (Formanowitz Jr. i sur. 1990).

Sve vrste su karnivorne, a prehrana im se pretežito sastoji od kukaca, drugih člankonožaca i beskralješnjaka. Veće vrste se dodatno hrane manjim gmazovima, vodozemcima, mladim pticama te manjim sisavcima.

Potporodica Anguinae je pretežno oviparna (uz iznimku roda *Anguis*), ženke liježu 4–20 jaja koje potom inkubiraju (Vitt i Caldwell 2009). Ostale potporodice sadrže ovoviviparne i oviparne vrste, a broj mladih po okotu varira ovisno o veličini

vrste i vivipariji (ovoviviparne vrste u pravilu legu manji broj mladih, kao i manje vrste).

### **3.2. Blavor (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775)**

Blavor (*Pseudopus apodus* Pallas, 1775) nastanjuje područje istočne i jugoistočne Europe te jugozapadne Azije. Hrvatska i Slovenija predstavljaju sjeverozapadnu granicu njegovog areala. Unutar tog područja zabilježene su dvije podvrste: *Pseudopus apodus apodus*, koja pretežno nastanjuje Aziju te staništa istočno od Kavkaza, te *Pseudopus apodus thracius* koju nalazimo na području Balkanskog poluotoka i Turske (Rifai i sur. 2005).

Blavor obitava na suhim do umjereno vlažnim staništima. Visinska rasprostranjenost se proteže od razine mora do 1000 metara nadmorske visine. Lovna staništa uključuju nepokošene livade, maslinike, širokolisne šume s mnogo prizemnog pokrova te područja obraštena grmolikom mediteranskom vegetacijom. On je diurnalna vrsta, koja neaktivni dio dana (noć, najtopliji dio dana) provodi u podzemnim skrovištima (može ih sâm iskopati ili ulazi u skrovišta manjih sisavaca), suhozidima ili ispod veće nakupine kamenja.

Najveći je pripadnik svoje porodice te može narasti do 1,3 - 1,4 m duljine (prosječna duljina tijela blavora iznosi 0,8 - 1 m). Tijelo odraslih jedinki je smeđe obojeno, sa svijetlije obojenim (zeleno-smeđim) glavom i trupom. Duž tijela mu se proteže lateralno udubljenje kože. Prednji udovi su potpuno reducirani, dok se ostaci stražnjih udova (2-3 mm duljine) (Rifai i sur. 2005) naziru lateralno od kloakalnog otvora. Posjeduje dug rep (otprilike 1,5 duljine tijela) koji, u opasnosti, može odbaciti kaudalnom autotomijom, a odbačeni rep se može dodatno rastaviti na nekoliko dijelova (prema toj sposobnosti je dobio engleski naziv *glass lizard*).

Aktivni je lovac s raznolikom prehranom koja se sastoji od beskralješnjaka i manjih kralješnjaka. Nije zabilježena razlika u prehrani ovisno o starosti te spolu (Rifai i sur. 2005). Kralješnjaci zauzimaju manji dio prehrane blavora (oko 18 %), a zabilježeni plijen uključuje male sisavce (rod *Crocidura*) te guštere (rodovi *Lacerta* i *Eremias*). Veći dio prehrane zauzimaju artropodne vrste (poglavito ravnokrilci, kornjaši te ličinke leptira) i mekušci (puževi). U slučaju opasnosti koristi pasivne obrambene taktike, poput izvrtanja kloake i hemipenisa, ispuštanja mokraće te

glumljenja smrti (ponašanje rijetko za guštere, međutim često kod zmijskih vrsta) (Hailey i Theophilidis 1987).

Razmnožavanje blavora je slabo istraženo. Mužjaci posjeduju dva hemipenisa. Ženke su oviparne, u jednom leglu proizvedu 6 - 12 jaja. Gestacija traje 45 - 55 dana. Prije izlijeganja jaja ženka iskopa rupu u tlu na osunčanom mjestu u koju će ih položiti. Nakon okota, jaja obavije svojim tijelom te ih ponavljajućim, undulirajućim pokretima inkubira i štiti od dehidracije i pregrijavanja. Temperatura gnijezda prelazi 30 °C u popodnevnim satima (Milton 2010). Nakon izlijeganja mladi su dugi oko 10 cm te su sivkasto obojani. Zabilježeni životni raspon u divljini iznosi oko 20 godina, dok u zatočeništvu mogu doživjeti i do 50 godina.

## 4. Hematologija gmazova

Hematologija je znanost koja se bavi proučavanjem krvi, hematopoetskih organa te krvnih poremećaja. Kod sisavaca se tradicionalno koristi za utvrđivanje bolesti koje utječu na krvne stanice, poput anemije, upalnih procesa, hematopoetskih poremećaja ili pojave hemoparazita. Međutim, slične metode i istraživanja nije moguće primijeniti na gmazove; zbog potrebe modifikacije pristupa hematologija gmazova se tek nedavno počela istraživati. Dosadašnji rezultati na području istraživanja hematologije gmazova ukazuju na široku raznolikost u broju i morfologiji pojedinih krvnih stanica, katkad i među jedinkama istog roda. Stoga je iznimno teško ustanoviti važnost zabilježenih varijacija iz postojećih podataka o drugim skupinama (npr. pticama ili sisavcima).

Veliki napredak u razumijevanju hematologije gmazova postignut je posljednjih godina. Istraživanjem hematoloških značajki i udjela pojedinih krvnih stanica ustanovljene su referentne vrijednosti za velik broj vrsta. Dodatna istraživanja dokumentirala su utjecaj spola, dobi, sezone, zatočeništva i mnogih drugih faktora na hematogram gmazova, te pojasnila utjecaj okoliša te uzročnika zaraznih i parazitarnih bolesti na zdravlje jedinki (Stacy i sur. 2011). Međutim, zbog prevelikog broja vrsta, raznolikosti njihovih staništa i životnih uvjeta, te nestandardiziranog prikupljanja i obrade podataka, interpretacija referentnih vrijednosti je još uvijek nesigurna i upitna, a potreba za daljnjim istraživanjem i boljim razumijevanjem hematologije gmazova i dalje raste.

#### 4.1. Sastav krvi gmazova

Krvna plazma gmazova sačinjava 60 - 80 % krvnog volumena. Najčešće je bezbojnog ili blijedo žutog obojenja, međutim kod nekih guštera je žuto-narančasta (povećana koncentracija karotenoidnih pigmentata) a kod dijela zmijskih vrsta (rodovi *Python*, *Bothrops*, *Mastigodryas*) poprima žuto-zeleno obojenje uzrokovano karotenoidnim pigmentima te riboflavinom. U plazmi nalazimo krvne stanice, otopljene elektrolite (najčešći su natrij, klor i bikarbonati), plazmatske proteine, aminokiseline, glukozu, lipide te dušične spojeve (amonijak, mokraćna kiselina i ureja) (Dessauer 1970). Koncentracije navedenih komponenti mijenjaju se ovisno okolišnim (temperatura, vlažnost, godišnje doba, dostupnost nutrijenata) i fiziološkim varijablama (dob, spol, vrsta, reproduktivni status, tip aktivnosti koju u tom trenutku obavljaju) (Dessauer 1970).

Poput ostalih kralješnjaka, gmazovi posjeduju tri glavna tipa krvnih stanica: eritrocite, leukocite (koji se morfološki dijele na granulirane i negranulirane oblike) i trombocite.

Trombociti gmazova imaju istu ulogu kao trombociti ptica i sisavaca, odnosno sudjeluju u koaguliranju krvi i stvaranju krvnog ugruška. Trombociti su male ovalne do fusiformne stanice. Jezgra je centralno smještena, ovalnog oblika, sa gustom nakupinom kromatina koja se boji tamnoljubičasto Romanovski bojama. Citoplazma je prozirne do blijedo plave boje, te može sadržavati azurofilne granule ili vakuole (naslage glikogena) (Nardini i sur. 2013).

Negranulirani leukociti su limfociti i monociti. Limfociti su dominantni oblik bijelih krvnih stanica kod nekih vrsta vodozemaca (Bricker i sur. 2012). Stanica je okruglog oblika, sa ekscentrično smještenom jezgrom koja sadrži guste nakupine kromatina. Citoplazma je blijede plave boje, međutim tamnija od citoplazme trombocita. Jezgra leukocita je također veća naspram volumena stanice (Jenkins-Perez 2012). Uloga limfocita leži u produkciji imunoglobulina (B - stanice) odnosno imunološkom odgovoru na patogene (T - stanice).

Monociti su varijabilne veličine i oblika (okrugli do ovalni), ovisno o vrsti. Citoplazma se boji blijedo plavo odnosno sivo. Oblik jezgre je također varijabilan, te može biti okrugao, ovalan, bubrežast ili s više pupova. Razlikuju se od eritrocita po



periferno smještenoj jezgri koja sadrži svjetliji kromatin te citoplazmi koja sadrži više raznovrsnih vakuola ili posjeduje spužvast izgled (Jenkins - Perez 2012). Po detekciji mikrobnih infekcija, napuštaju perifernu krv te prelaze u makrofage.

Azurofili su negranulirani leukociti karakteristični samo za gmazove. Njihova klasifikacija još nije razjašnjena. Zmijski azurofili su citokemijski slični neutrofilima sisavaca (Alleman i sur. 1999), dok su azurofili guštera sličniji monocitima sisavaca (Harr i sur. 2001). Stanice su okruglog oblika sa blijedom plavo-sivom citoplazmom koja često sadrži azurofilne granule i vakuole. Jezgre su ekscentrično smještene te okruglog ili ovalnog oblika.

Povremeno se u krvi gmazova javljaju plazma stanice. Jezgra im je okrugla i ekscentrično smještena u stanici, sa gustim nakupinama kromatina. Morfološki su slične azurofilima, međutim citoplazma plazma stanica se boji tamno plavo te ne sadrži granule. Može ih se razlikovati i po prisutnosti Golgijevog aparata koji je vidljiv i okružuje jezgru plazma stanica (Stacy i sur. 2011).

Granulirani leukociti su heterofili, eozinofili i bazofili. Heterofili gmazova su velike okrugle stanice sa svijetlim narančastim granulama. Jezgre su ekscentrično smještene te su okruglog ili ovalnog oblika. Kod guštera jezgre mogu dodatno razviti dva ili više pupa na površini. Pretpostavlja se da im je uloga fagocitoza patogena i stranih čestica.

Eozinofili gmazova slični su onima sisavaca. Citoplazma im je prozirna te sadrži narančaste, crvene ili plavo-zelene granule (Jenkins - Perez 2012; Stacy i sur. 2011). Uloga eozinofila nije u potpunosti razjašnjena, međutim povećan broj se povezuje s parazitskim infekcijama.

Bazofili su male stanice s mnogo malih okruglih tamnoljubičastih granula koje često zaklanjaju jezgru. Jezgra je okruglog oblika s gustim nakupinama kromatina. Uloga im nije poznata, međutim povećane koncentracije povezane su s hemoparazitima i virusnim infekcijama.

## 4.2. Eritrociti

Zreli eritrociti gmazova (poput ptica, riba i vodozemaca) su ovalnog oblika i sadrže jezgru. Citoplazma zrelih eritrocita je blijede žute, narančaste ili ružičaste boje. Jezgra je okruglog do ovalnog oblika, često nepravilnih rubova, nalazi se u središtu stanice te sadrži gusti bazofilni kromatin koji se boji ljubičasto. Poslije vodozemaca, gmazovi posjeduju najveće eritrocite ( $14,8 \times 10,3 \mu\text{m}$  –  $23,4 \times 13,6 \mu\text{m}$ ) (duljina x širina) (Hartman i Lessler 1964). Unutar skupine gmazova, najveće eritrocite posjeduju zmijske, međutim najveću brojnost nalazimo kod guštera (Jenkins - Perez 2012).

Eritropoeza se kod gmazova odvija u ekstravaskularnim dijelovima koštane srži; dio prekursora se također može replicirati u perifernoj krvi. Kod novorođenih gmazova proizvodnja eritrocita se odvija primarno u žumanjčanoj vreći (Vasse i Beaupain 1981).

Eritrociti tijekom sazrijevanja prolaze kroz nekoliko stadija: rubriblast (proeritroblast, pronormoblast), prorubricit (bazofilni eritroblast), bazofilni rubricit (polikromatski eritroblast), polikromatofilni eritrocit (retikulocit) i zreli eritrocit. Eritrociti gmazova se obično oslobađaju u perifernu krv u stadiju rubricita (Campbell i Ellis 2007).

Rani stadiji su veći i okrugliji od zrelih eritrocita. Sadrže veću jezgru a citoplazma je obojena tamnijom plavom bojom. Mogu se replicirati te u tom slučaju dolazi do povećanja njihove brojnosti, pojave dvojezgrenih oblika ili stanica u mitozu. Veću pažnju treba obratiti rubricitima, koji su morfologijom slični limfocitima te nepravilna klasifikacija može utjecati na brojnost bijelih krvnih stanica.

Polikromatofilni eritrociti su okrugliji od zrelih eritrocita sa bazofilnijom citoplazmom. Jezgra je još uvijek povećana, međutim dijelovi su blijedo obojeni te predstavljaju mjesto sinteze hemoglobina (Nardini i sur. 2013). Njihov udio u ukupnom broju eritrocita rijetko prelazi 1 % kod zdravih gmazova, dok se kod ptica i sisavaca nalaze u većem udjelu. Više polikromatofila možemo također naći kod juvenilnih jedinki gmazova te odraslih gmazova u procesu presvlačenja (Campbell i Ellis 2007; Campbell 2004). Procjena udjela polikromatofila i nezrelih prekursora

eritrocita bitna je za dijagnosticiranje anemije, te kako bi se ustanovilo da li je ona regenerativna (Stacy i sur. 2011).

Tijekom normalnog procesa sazrijevanja dolazi do povećanja volumena citoplazme koja gubi svoje plavo obojenje; stanica se izduljuje te dolazi do kondenzacije kromatina u jezgri.

Životni vijek eritrocita gmazova je veći nego kod ptica i sisavaca te iznosi 600 do 800 dana; dulji životni vijek pripisuje se sporijem metabolizmu i ektotermiji (Duguy 1970; Frye 1991). Prilikom starenja eritrocita dolazi do nateknuća citoplazme te prelaska jezgri u okrugli oblik. Jezgra potom prolazi sažimanje, te završava u stadiju piknoze s gustim tamnim kromatinom. U perifernoj krvi gmazova, stari eritrociti se nalaze u malom postotku. Razgradnja starih eritrocita odvija se putem apoptoze (programirane smrti stanica). Takve stanice se uklanjaju iz optoka pomoću fagocita.

### **4.3. Morfološke promjene eritrocita i njihovih jezgri**

Eritrocite nepravilnog oblika se ponekad naziva poikilocitima, te mogu biti posljedica nepravilnog rukovanja s uzorkom ili bolesti (anemija, toksikoze) (Nardini i sur. 2013).

#### **a) Mikrociti i makrociti**

U krvotoku gmazova u malom postotku mogu se zamijetiti stanice morfološki identične zrelim eritrocitima, ali je cijela stanica upola manja od zrelog eritrocita. Oblik stanice je okrugao do ovalan, a citoplazma je blijede žute, narančaste ili ružičaste obojenosti. Jezgra je u pravilu ovalna ili okrugla s gustim tamno ljubičastim kromatinom te smještena u središtu stanice. Rijetko se istražuju, te do sada nije otkrivena poveznica s patološkim poremećajima. Porijeklo i funkcija im nisu istraženi, međutim neki znanstvenici ih povezuju s pojavljivanjem MN-a. Smatraju da stanica teži izbaciti višak nuklearnog materijala (MN) putem egzocitoze, te da u tom procesu nastaje mikrocit (da Silva Souza i Fontanetti 2006).

Makrociti su stanice također morfološki slične zrelim eritrocitima, međutim vidljivo su veće. Stanice su ovalnog oblika, s blijedom žuto-narančastom citoplazmom. Jezgre su znatno veće od jezgara zrelih eritrocita, i u pravilu su ovalnog oblika (Frye 1991). Makrocitoza je kod ljudi uvjetovana nizom poremećaja, poput nedostatka vitamina B12, hipotireozom, retikulocitozom, bolestima jetre te kroničnim izlaganjem benzenskim spojevima, međutim ne postoje podaci o uzrocima i posljedicama makrocitoze kod gmazova.

#### **b) Eritroplastidi i hematogoni**

Eritroplastidi su crvene krvne stanice bez jezgre. Ovalnog su oblika, a citoplazma se boji istom bojom kao i kod zrelih eritrocita. Kod zdravih gmazova se primjećuju u niskoj koncentraciji (<0,5 %) i za sada se smatra da nemaju kliničku važnost (Hawkey i Dennett 1989). Također se mogu zamijetiti u malim količinama hematogoni, gole jezgre bez citoplazme i stanice (Frye 1991).

### c) Jezgrine i citoplazmatske vakuole

Unutar jezgara eritrocita kralješnjaka zabilježena je pojava vakuola. Jezgra može sadržavati jednu ili više vakuola, koje su pravilnog ovalnog oblika te bez obojenja. Uloga i porijeklo im nije detaljno istraženo; neki autori ih povezuju s pojavom aneuploidije (de Campos Ventura i sur. 2007). Ne postoji standardna metoda istraživanja vakuola, te ostaje na izboru pojedinog istraživača da li će ih ispitivati zajedno s ostalim nepravilnostima eritrocitnih jezgri ili zasebno. Do sada nije pronađena značajna ovisnost pojavljivanja jezgrinih vakuola (JV) o spolu, međutim zamijećena je sezonalna varijabilnost, s najvišim vrijednostima zabilježenim u jesenskom (prehibernacijskom) periodu kod zmije *Hierophis gemonensis* (Strunjak - Perović i sur. 2010) te najvišim vrijednostima zabilježenim u proljeće kod orade *Sparus aurata* (Strunjak - Perović i sur. 2009).

Citoplazmatske vakuole (CV) su češće istraživane od JV-a. U pravilu su pravilnog okruglog ili ovalnog oblika, te se moraju razlikovati od artefakata nastalih sporim sušenjem boje te nepravilnim rukovanjem uzorkom. Potrebno ih je također razlikovati od pravokutnih (kvadratnih ili heksagonalnih) inkluzija, koje mogu biti kristali hemoglobina ili posljedica viralnih patogena (Stacy i sur. 2011).

CV se rijetko pojavljuju u eritrocitima kralješnjaka (<1 %) (Salakij i sur. 2002). Mogući uzroci nastanka CV-a uključuju adaptivni fiziološki odgovor organizma, stanični stres uzrokovan procesom apoptoze, posljedice viralnih infekcija, neishranjenosti ili kroničnih bolesti (Pendl 2006). Pojava CV-a zabilježena je kod riba podvrgnutim tretmanima živom (Panigrahi i Misra 1979).

### d) Višejezgreni eritrociti

Nakon mitoze eritrocita moguć je izostanak citokineze, te ne dolazi do diobe stanice. U tom slučaju eritrocit postaje dvojezgren (BN; eng. *binucleated*) ili višejezgren (PN; eng. *polynucleated*), ovisno koliko puta se odvijala mitozna bez citokineze. Takvi se eritrociti u manjim količinama mogu primijetiti u krvi riba, vodozemaca i gmazova (Barni i sur. 2007; Strunjak - Perović i sur. 2009). Fenech (2000) navodi kriterije prema kojima možemo razlikovati dvojezgrene eritrocite: a) obje jezgre moraju imati cjelovite jezgrene ovojnice te biti okružene jednom citoplazmatskom membranom, b) obje jezgre moraju biti otprilike iste veličine i

intenziteta obojenosti, c) jezgre mogu biti povezane nukleoplazmatskim mostom koji ne smije biti širi od  $\frac{1}{4}$  promjera jezgre, d) u slučaju preklapanja jezgri, njihove ovojnice moraju biti jasno vidljive te se moraju moći razlikovati, e) citoplazmatska membrana dvojezgrenog eritrocita mora biti cjelovita i jasno odvojena od susjednih stanica.

Učestalost pojave BN eritrocita pokazuje jaku međuvrsku varijabilnost. U nekim publikacijama autori ih analiziraju zajedno s ostalim nepravilnostima jezgri, dok se kod nekih autora nalaze u zasebnim kategorijama; iz tih razloga teško je uspoređivati zabilježene frekvencije višejezgrenih eritrocita. Najniže vrijednosti zabilježene su kod riba *Puntius altus* i *Poronotus triacanthus* (Jiraungkoorskul i sur. 2007) i iznose 0,007 - 0,1 %. BN eritrociti pokazuju također i sezonalnu varijabilnost, s nižim vrijednostima tijekom hladnih mjeseci (0,0067 - 0,03 %), a višim tijekom toplih mjeseci (0,013 - 0,21 %) (Strunjak - Perović i sur. 2009; da Silva Souza i Fontanetti 2006). Vrijednosti PN eritrocita iznose 0,0067 % i zabilježeni su tijekom toplih mjeseci (da Silva Souza i Fontanetti 2006).

#### **e) Nepravilni oblici eritrocitnih jezgri**

Nepravilni oblici eritrocitnih jezgri (ENA; eng. *erythrocytic nuclear abnormalities*) odnose se na promjene u morfologiji odnosno obliku jezgre crvenih krvnih stanica. Proučavanje takvih nepravilnosti je započelo tek nedavno, te se malo zna o uzrocima i učinku ove pojave. Zbog manjka podataka, autori većine radova ne razlikuju različite tipove nepravilnosti, već ih bilježe i analiziraju zajedno. Smatraju se analogima MN-a, te ih se povezuje sa izloženošću populacija teškim metalima, herbicidima i organskim tvarima poput otpadnih voda i naftnih derivata (Jiraungkoorskul i Sahaphong 2007; de Campos Ventura i sur. 2007; da Silva Souza i Fontanetti 2006).

U pravilu razlikujemo tri kategorije nepravilnosti. Mjehuričaste jezgre sadrže pupove (izdanke) na jezgri. Neki autori ih povezuju s MN-om, te smatraju da su pupovi početni stadij formacije MN-a (Fenech 2000). Mjehuričaste jezgre se često razdjeljuju prema veličini pupova u "*blebbed*" (jezgre s manjom evaginacijom ovojnice ispunjenom kromatinom) i "*lobed*" (jezgre s većom evaginacijom i mogućim sekundarnim grananjem pupova) (da Silva Souza i Fontanetti 2006, Jiraungkoorskul i

sur. 2007). Ovakav tip nepravilnosti je rijedak kod zdravih populacija; učestalost pojavljivanja kreće se od 0,067 % (Jiraungkoorskul i sur. 2007) do 0,24 % (Van Ngan i sur. 2007).

Druga zabilježena kategorija jezgrinih nepravilnosti su urezane jezgre (neki autori ih navode kao bubrežaste). Ovaj tip deformacije karakterizira invaginacija jezgrine ovojnice do polovice njene širine odnosno duljine. Učestalost urezanih jezgri je kod nekih vrsta niska, te iznosi 0,003 – 0,007 % (de Campos Ventura i sur. 2007; Jiraungkoorskul i sur. 2007), dok druga istraživanja bilježe puno višu učestalost od 0,25 % do 0,34 % (Van Ngan i sur. 2007).

Zadnja zabilježena kategorija nepravilnosti je segmentirana jezgra. Definira se kao invaginacija jezgrene ovojnice za više od polovice njene širine odnosno duljine, te je neki smatraju početnom fazom nastanka višejezgrenih eritrocita (Costa i Costa 2007). Također ima nisku učestalost pojavljivanja u zdravim populacijama (0 – 0,08 %) (Van Ngan i sur. 2007).

#### **f) Mikronukleus**

Mikronukleusi su tvorbe koje nastaju tijekom diobe stanice, kao posljedica loma acentričnih dijelova kromosoma ili cijelih kromosoma ili disfunkcije diobenog vretena. Tijekom telofaze stvori se jezgrena ovojnica oko takvih fragmenata, tvoreći mikronukleus (MN). U interfazi, kromatin MN-a se odmotava te poprima morfologiju osnovne jezgre (Fenech 2000).

Brojna istraživanja na području hematologije kralješnjaka pokušala su odrediti osnovne vrijednosti učestalosti pojavljivanja MN-a kod zdravih jedinki, te ustanoviti ovisnost pojavljivanja o spolu i dobi jedinke, godišnjem dobu te učinku pojedinih kemikalija (PAH, kanalizacijske i otpadne vode, herbicidi) i teških metala (kadmij, bakar, živa).

Osnovne vrijednosti učestalosti spontanog pojavljivanja MN-a su kontinuirano niske kod populacija koje nisu bile izlagane genotoksičnim agensima, međutim dolazi do interspecijskih varijacija. Kod riba udio MN-a se kreće od 0,017 % kod *Sparus aurata* (Strunjak - Perović i sur. 2009), 0,03 % kod *Puntius altus* (Jiraungkoorskul i sur. 2007), do 0,06 % kod vrste *Trematomus newnesii* (Van Ngan i sur. 2006).

Prosječni udio MN-a kod vrste *Oreochromis niloticus* nalazi se u navedenom rasponu te iznosi 0,04 % (de Campos Ventura i sur. 2007), međutim pokazuje sezonalnu varijabilnost s najnižim vrijednostima u kasnu jesen (0,0067 %) a najvišim tijekom ljetnih mjeseci (0,034 %) (da Silva Souza i Fontanetti 2006).

Vrijednosti MN-a kod gmazova su također niske. Za zmijske vrste iznose 0 - 0,03 % (Strunjak - Perović i sur. 2010; Schaumburg i sur. 2012). Nešto niže vrijednosti zabilježene su kod guštera *Iguana iguana* (0,01 %) i *Ctenosaura pectinata* (0,005 %), a nešto više vrijednosti opažene su kod vrsta *Caiman latirostris* (0,087 %) i *Tupinambis meriana* (0,095 %) (Schaumburg i sur. 2012).



#### **4.4. Hematološki testovi**

Pri proučavanju hematoloških značajka krvi gmazova, postoji standardizirana skupina testova koja se provodi u svrhu utvrđivanja zdravlja jedinke. Ova vrsta testova je pogodna i zbog toga što za njihovu provedbu nije potrebno žrtvovati životinju što je posebno važno kada se radi o ugroženim vrstama. Hematološki parametri koji se odnose na eritrocite uključuju određivanje hematokritske vrijednosti ili PCV (eng. *packed cell volume*), ukupni broj eritrocita (TRBC; eng. *total red blood cell count*), količina hemoglobina u krvi te u posebnim slučajevima broj retikulocita (nezrelih oblika eritrocita). Osim diferencijalne krvne slike, analizom krvnog razmaza može se utvrditi prisutnost hemoparazita, te postojanje virusnih inkluzija u eritrocitima (Nardini i sur. 2013). Hemoparaziti gmazova kod mladih i starijih jedinki mogu uzrokovati poremećaje poput hemolitičke anemije, koji potom utječu na kondiciju jedinke. Krvni razmazi upotrebljavaju se i kod provedbe mikronukleus i ENA testa.

##### ***Mikronukleus test***

U sklopu istraživanja genotoksičnosti određenih kemikalija, istraživači gotovo uvijek provode MN test, čija je svrha određivanje učestalosti pojavljivanja mikronukleusa u eritrocitima životinja. Mnogi zagađivači utječu nepovoljno na DNA stanica, uzrokuju lom ili oštećenje kromosoma ili onemogućuju ispravno djelovanje diobenog vretena i kinetohora. Proučavanje prisutnosti MN-a pokazao se do sada kao jednostavan, brz i pouzdan način utvrđivanja oštećenja kromosoma, te preko toga procjene štetnosti okolišnih zagađivača.

Od uzoraka za provođenje MN testa najčešće se koristi krv iz koštane srži ili perifernih žila. Metoda je prvi puta opisana u humanoj medicini pri čemu su se koristili limfociti, a kasnije je prilagođena za uporabu na životinjama. Ustanovljeno je nekoliko karakteristika prema kojima se potvrđuje prisutnost MN-a: a) promjer MN-a ne smije biti veći od 1/3 promjera jezgre, b) razlikuju se od artefakata nastalih bojanjem preparata po tome da ne refraktiraju svjetlost, c) nisu povezani ili spojeni s jezgrom, d) u slučaju da MN dodiruje jezgru, njegova ovojnica se lako i vidljivo mora razlikovati od jezgrine ovojnice, e) MN-i se jednako boje kao i stanična jezgra (Fenech 2000; Jiraungkoorskul i sur. 2007).

Pri provođenju MN testa kod gmazova, krvni razmaz se izrađuje izravno iz uzorka krvi jedinke. Najčešće se koristi Wright-Giemsa metoda bojanja jezgri, iako neki autori navode akridin oranž kao pouzdaniju metodu jer različito boja DNA i RNA, te se ne veže na artefakte koji ne sadrže nukleinske kiseline (Costa i Costa 2007). Za analizu obojenog razmaza koristi se svjetlosni mikroskop. Dobiveni rezultati se izražavaju putem postotka ili promila, ovisno o zapaženoj koncentraciji i nahodanju autora, te kao takvi ulaze u daljnje statističke obrade.

### **ENA test**

Posljednjih godina se, uz MN test, počeo razvijati i ENA test (eng. *erythrocytic nuclear abnormalities test*), koji se koristi za procjenu morfološke oštećenosti odnosno deformiranosti jezgre eritrocita. Uspješno je primijenjen kod svih skupina kralješnjaka čiji eritrociti posjeduju jezgru. Deformacije jezgre se analiziraju pretragom krvnih razmaza (uzorci krvi, bojanje i izrada razmaza isti su kao za MN test, te se oba testa mogu obavljati istovremeno). Nakon prebrojavanja, rezultati se također izražavaju u postocima ili promilima, te se dalje statistički obrađuju. ENA test se sve češće koristi zajedno sa MN testom. Iako mehanizam nastanka promjena oblika jezgri nije u potpunosti razjašnjen, sve više istraživača nastanak tih promjena pripisuje djelovanju citotoksičnih i genotoksičnih tvari te ga smatra komplementarnim mikronukleus testu (Ayllón i Garcia-Vasquez 2001). Međutim, nedostatak ovog testa leži u problemu standardizacije kategorija jezgrinih nepravilnosti i nomenklaturi navedenih kategorija što je posljedica nedovoljne istraženosti deformacija eritrocitnih jezgri. Ovaj test je osnovni test kojim sam se koristila prilikom analize hematološke slike proučavanih populacija blavora.

## 5. Materijali i metode

### 5.1. Opis istraživanih lokaliteta

Jedinke blavora su uzorkovane iz dvije različite mediteranske populacije; sjeverna populacija nastanjuje južni dio otoka Cresa u blizini naselja Punta Križa, dok se južna populacija nalazi nekoliko kilometara sjeverno od grada Splita u blizini naselja Klis (Slika 1). Navedena staništa predstavljaju sličan tip eumediteranskog staništa, međutim razina i vrsta antropogenog utjecaja je različita.

Na creskom staništu prevladavaju mediteranski travnjaci obrašteni makijom, u kojoj dominiraju tršlja (*Pistacia lentiscus*) i zelenika (*Ilex aquifolium*). Od drvenastih vrsta najčešće su šume česmине odnosno hrasta crnike (*Quercus ilex*) sa slabo razvijenom prizemnom vegetacijom (Kovačić i sur. 2008). Istraženi lokaliteti na Cresu su pod slabim indirektnim antropogenim utjecajem. Prevladava ekstenzivno stočarstvo, te je često vidljiva degradacija vegetacijskih zajednica uzrokovana ispašom ovaca. Izuzev stočarstva, nije zabilježen drugi oblik antropogenog utjecaja (Slika 2).

Sličan oblik vegetacije prevladava i na splitskom području. Dio područja zauzimaju mediteranski travnjaci koji su mjestimično održavani košnjom. Šume crnog jasena (*Fraxinus ornus*) su degradirane do stadija makije, unutar koje prevladavaju žuka (*Spartium junceum*), kupina (*Rubus fruticosus*) i drača (*Paliurus spina-christi*). Na ovom području se dodatno nalaze i česminove šume (*Quercus ilex*) (Kovačić i sur. 2008). Staništa su pod snažnim antropogenim utjecajem. Smještene su u blizini grada Splita, te dolaze pod utjecaj ispušnih plinova sa obližnjih prometnica te lokalnih industrijskih postrojenja. Dio staništa pretvoren je u poljoprivredna zemljišta (maslinike, voćnjake, vrtove); uporaba pesticida i herbicida na tim područjima predstavlja dodatan antropogeni utjecaj na lokalnu floru i faunu (Slika 3).

Creska staništa su smještene na niskoj nadmorskoj visini te otvorena u smjeru mora, stoga imaju nešto više prosječne vrijednosti gibanja zraka zabilježene tijekom terenskog rada (oko 3 m/s). Uzorkovanim jedinkama blavora je dodatno izmjerena kloakalna temperatura na mjestu ulova pomoću kloakalnog termometra, u svrhu korelacije dobivenih vrijednosti s učestalostima pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti. Prosječna vrijednost kloakalne temperature iznosila je  $26,85 \pm 4,27$  °C.



**Slika 1. Prikaz istraživanih lokaliteta (preuzeto s [www.googlemaps.com](http://www.googlemaps.com))**



**Slika 2. Lokalitet Cres. Fotografirao: Duje Lisičić.**



**Slika 3. Lokalitet Split. Fotografirao: Duje Lisičić.**

## 5.2. Uzorkovanje jedinki blavora

Tijekom proljetnog razdoblja 2011. godine blavori (*Pseudopus apodus*, Pallas 1775) su uzorkovani na dvije lokacije. U travnju je uzorkovana populacija na Cresu, a tijekom svibnja uzorkovane su jedinke sa splitskog područja. Ukupno je uzorkovano 55 jedinki na obje lokacije (19 iz creske i 36 iz splitske populacije) (Slika 4).

Izlazak na teren obavljao se dva puta dnevno – u ranim prijepodnevnim satima, kada blavori izlaze iz skloništa radi termoregulacije i hranjenja, te u popodnevnim satima. Izlazak na teren tijekom najtoplijeg dijela dana nije proveden zbog male vjerojatnosti pronalaženja jedinki. Između dnevnih izlazaka na teren uzorkovane jedinke su obrađivane. Biometrijski podaci i uzorci krvi uzimani su od odraslih jedinki koje su nakon 24-satnog zadržavanja puštene na istom mjestu gdje su i nađene.



Slika 4. Blavor (*Pseudopus apodus*)  
(fotografija preuzeta s [www.euroherp.com](http://www.euroherp.com))

### **5.3. Uzorkovanje krvi blavora**

Krv je uzorkovana tijekom sredine dana (između 10 i 13 sati) blavorima zagrijanim na otprilike 28 °C pomoću obične svjetiljke (svrha zagrijavanja blavora na tu temperaturu bila je imitiranje temperatura izmjerenih na terenu). Izvagani su, izmjerena im je kloakalna temperatura pomoću ručnog termometra i određen spol.

Krv blavora uzorkovana je iz repne vene (Jenkins - Perez 2012). Zbog sposobnosti kaudalne autotomije, posebna pažnja je posvećena vađenju krvi te tijekom uzorkovanja krvi niti jedna jedinka nije odbacila rep u samoobrani. Prije uzorkovanja, mjesto uboda je dezinficirano, kako bi se spriječile potencijalne infekcije koje bi mogle naštetiti životinji.

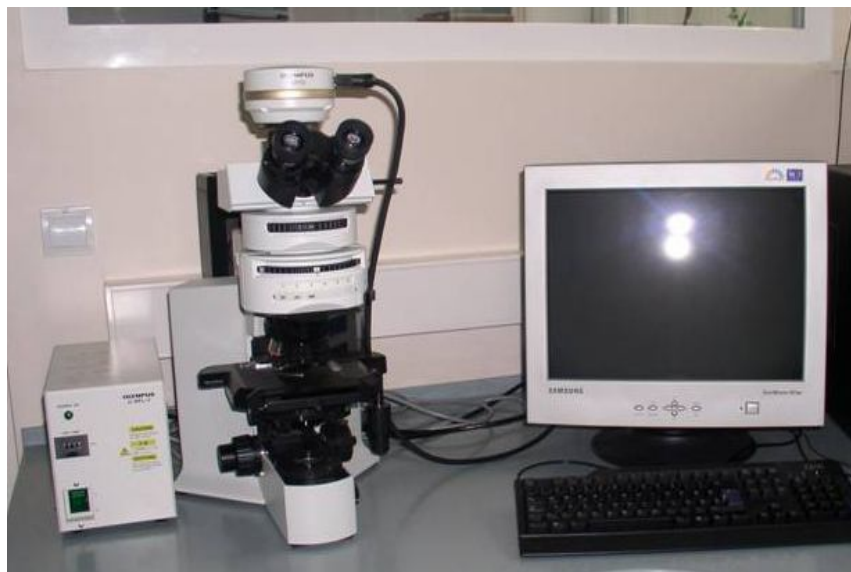
Za vađenje krvi uzete su injekcije od 5 mL, s promjerom igle 0,45 mm. Ukupno je uzorkovano oko 1 mL krvi (ovisno o veličini životinje), što predstavlja najmanji korisni volumen krvi za ovu vrstu i ne dovodi u pitanje zdravlje životinje (Nardini i sur. 2013). Nakon vađenja krvi, mjesto je ponovno dezinficirano, te je jedinka vraćena na mjesto pronalaska nakon prestanka krvarenja na mjestu uboda.

#### 5.4. Izrada i analiza krvnih razmaza

Krvni razmazi rađeni su odmah nakon vađenja krvi. Za svaku jedinku izrađena su po tri krvna razmaza. Pri izradi razmaza, korištena je tehnika paralelnog razmazivanja (Jenkins - Perez 2012) kako bi se što više smanjila mogućnost deformiranja ili puknuća stanica. Kap krvi kapnuta je na predmetno stakalce te razvučena pomoću drugog stakalca kako bi se dobio ujednačen jednostruki sloj krvnih stanica. Stakalca su potom ostavljena da se suše na zraku.

Krvne razmaze sam bojala prema metodi po Pappenheim-u, koja koristi dvije različite boje: May - Grünwald za bojanje acidofilnih elemenata i neutrofilnih granula u bijelim krvnim stanicama, te Giemsa boju koja boji kromatin jezgri, zajedno s citoplazmom monocita i limfocita. Na preparate sam prvo nanijela May - Grünwald boju, ostavila da djeluje sedam minuta i isprala destiliranom vodom. Nakon toga nanijela sam Giemsa boju (koju sam prethodno razrijedila u destiliranoj vodi u omjeru 2:1) i ostavila da djeluje 15 minuta. Potom sam isprala preparate i ostavila ih u kosom položaju da se osuše na zraku.

Preparate sam mikroskopirala koristeći svjetlosni mikroskop (Olympus BX51) (Slika 5) pod imerzijskim povećanjem (1000x). Ukupno je pregledano 3000 eritrocita po jedinci.



Slika 5. Svjetlosni mikroskop Olympus BX51 (fotografirala: Ivančica Strunjak-Perović)



## 5.5. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka koristila sam programe Microsoft Office Excel 2007 i Statistica 12. Budući da je Kolmogorov-Smirnov test normaliteta pokazao nepravilnu distribuciju za većinu mjerenih parametara, u daljnjoj statističkoj obradi korišteni su neparametrijski testovi.

Pomoću programa Microsoft Office Excel svi mjereni parametri analizirani su ovisno o lokaciji i spolu te su prikazani kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija, najmanje i najveće zabilježene vrijednosti.

Daljnja obrada podataka obavljena je u programu Statistica 12. Kako bih ustanovila postoji li značajna poveznica između pojedinih kategorija koristila sam Spearman-ov test korelacije (Tablica 2).

Za utvrđivanje značajnih razlika između mjerenih parametara koristila sam Mann-Whitney U test (test sume rangova). Mann-Whitney U test je neparametrijski test koji analizira međusobno nezavisne uzorke. Kao rezultat daje *p* vrijednost, odnosno vjerojatnost da su opažene razlike statistički značajne pri  $p \leq 0,05$ .

## **6. Rezultati**

U sklopu terenskog istraživanja uzorkovano je ukupno 55 jedinki. Na Klisu je uzorkovano 36 jedinki, među kojima su 19 ženki, 14 mužjaka i tri jedinke neutvrđenog spola. Iz creske populacije blavora uzorkovano je 19 jedinki (pet ženki i 14 mužjaka).

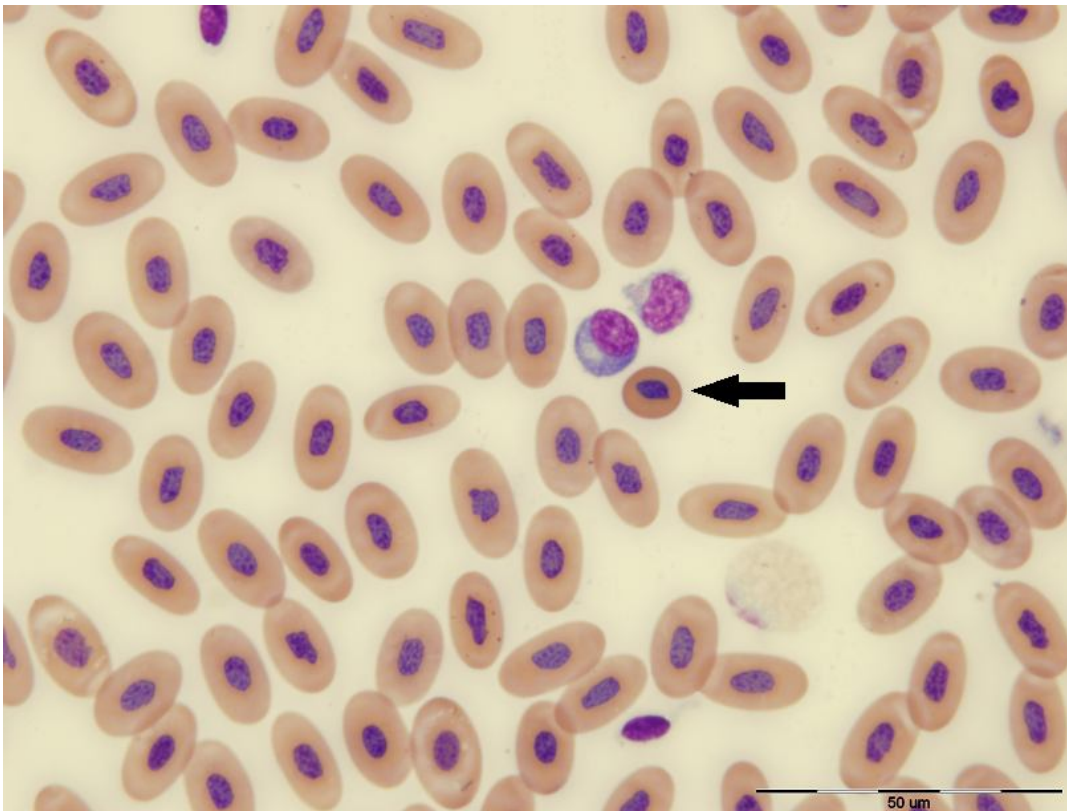
### **6.1. Zabilježeni morfološki oblici eritrocita**

Većina promatranih eritrocita (>85 %) bili su pravilnog oblika, s okruglom do ovalnom jezgrom unutar koje se nalazio gusti, tamno-ljubičasto obojeni kromatin. Citoplazma eritrocita blavora bila je svijetlo žute do ružičaste obojenosti, bez granulastih inkluzija, ostataka degradiranih organela ili kristala hemoglobina. Nije zabilježena prisutnost hemoparazita ili viralnih inkluzija.

Ukupno sam zabilježila 10 kategorija nepravilnosti, od kojih su četiri vezane uz morfologiju stanice (mikrociti, makrociti, eritroplastidi, CV), a šest je vezano uz promjene sâme jezgre (ENA, MN, JV, mitotični eritrociti, BN, PN).

### a) Mikrociti

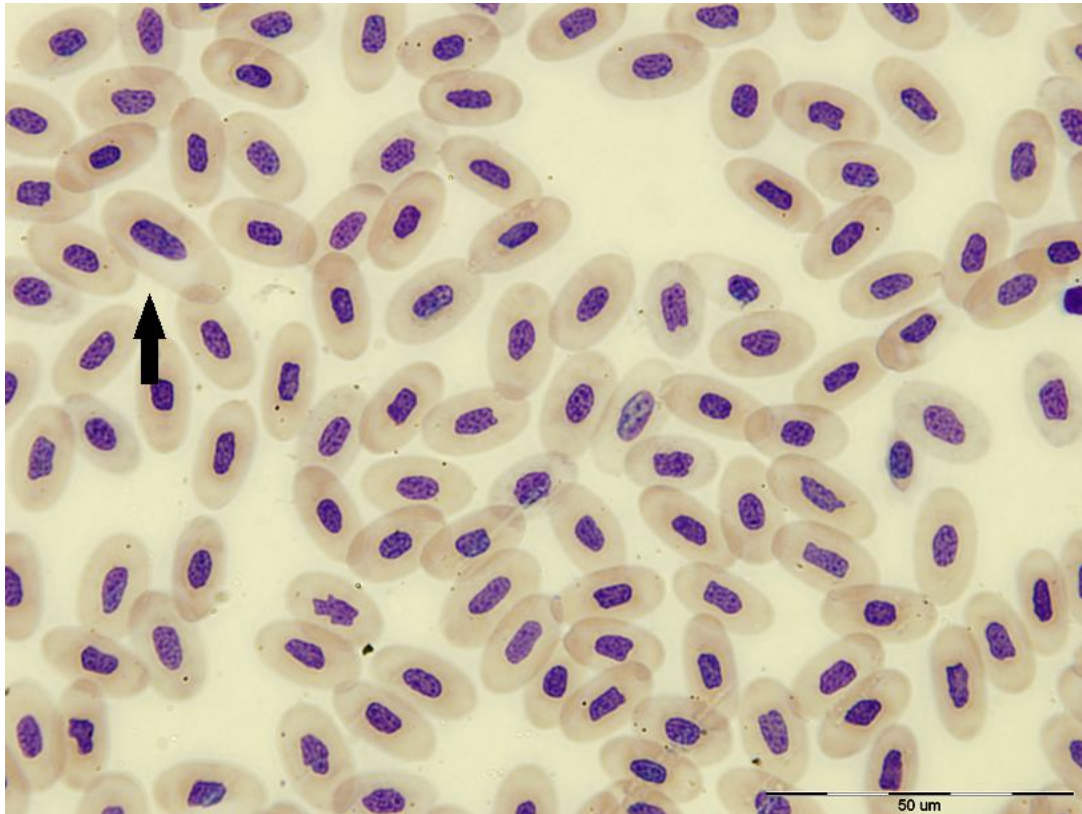
Mikrociti su upola manjih dimenzija od zrelih eritrocita, te se periodično pojavljuju u perifernoj krvi blavora (Slika 6). Morfološki su jednaki zrelim oblicima eritrocita - stanice su okruglog oblika s jezgrom u središtu. Jezgra sadrži nešto gušći kromatin koji se također boji tamno ljubičasto. Citoplazma je jednake obojenosti kao kod zrelih eritrocita.



Slika 6. Mikrocit (označen strelicom).

## b) Makrociti

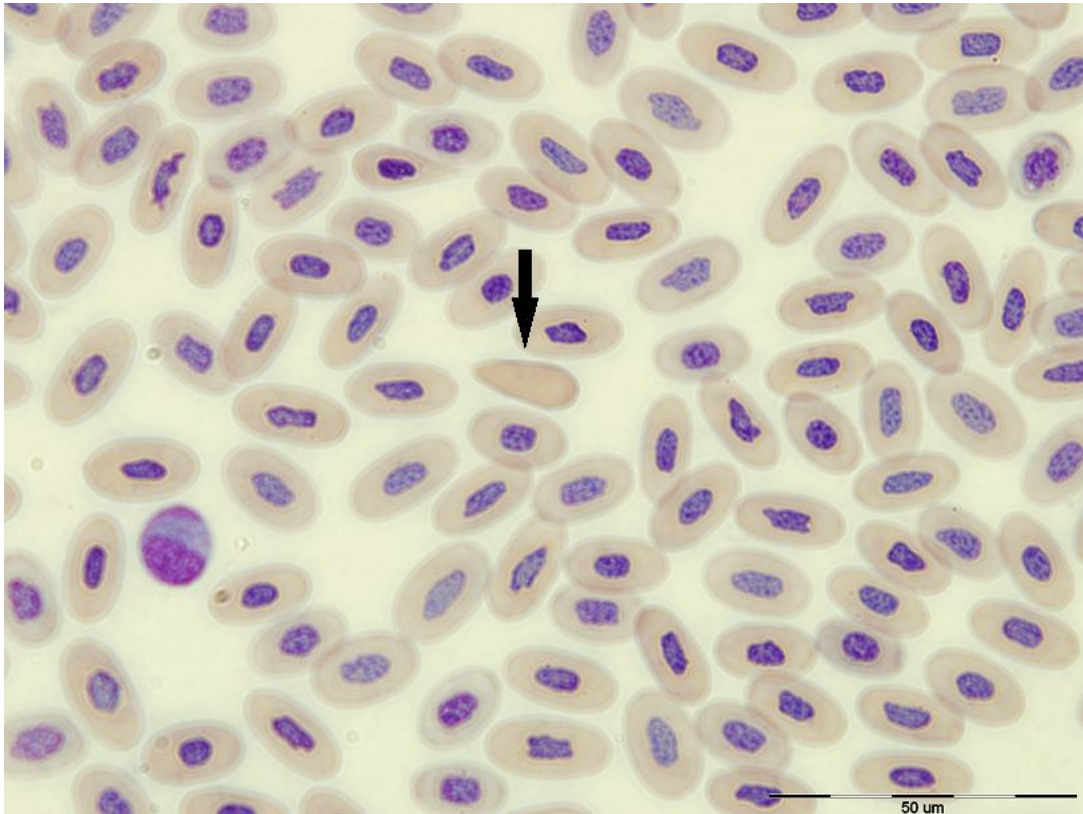
Makrociti predstavljaju uvećanu formu zrelih eritrocita (Slika 7). Stanica i jezgra su ovalnog oblika te su u pravilu gotovo dvostruko veći od normalnih eritrocita. Obojanost jezgre i citoplazme je ista kao kod ostalih eritrocita.



Slika 7. Makrocit (označen strelicom).

### c) Eritroplastidi

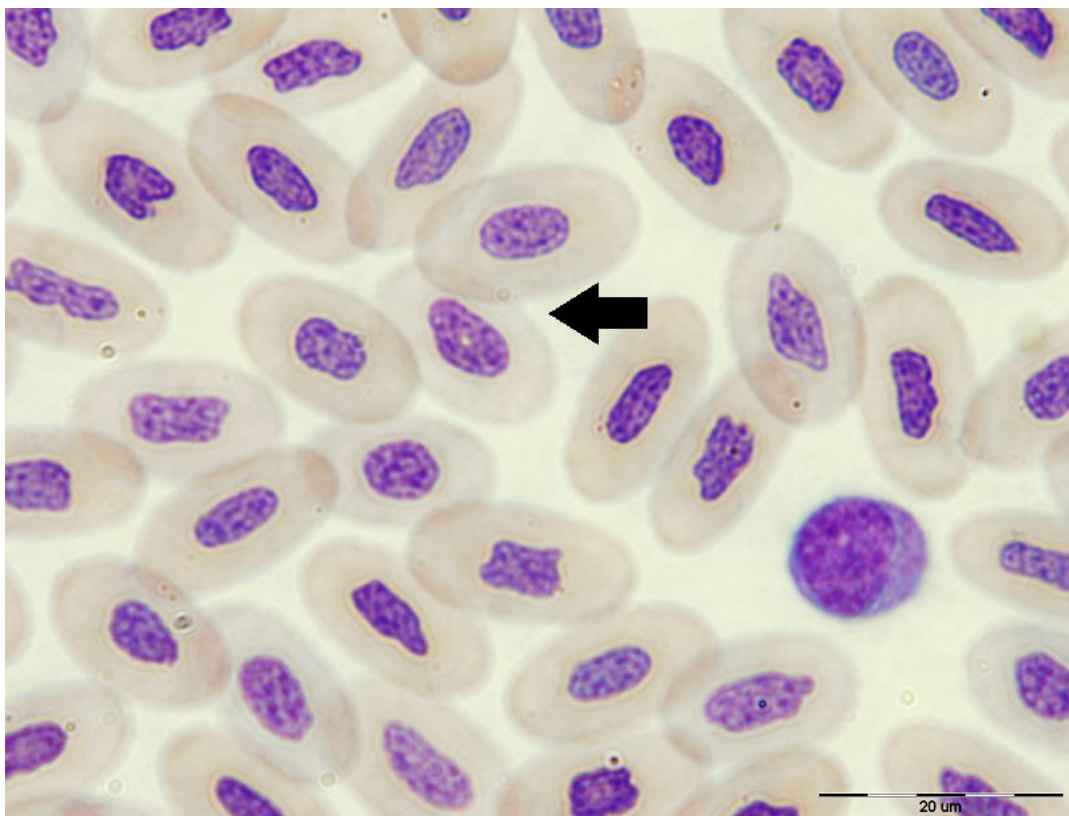
Eritroplastidi su crvene krvne stanice koje ne sadrže jezgru (Slika 8). Citoplazma je obojena prozirno, svijetlo plavo ili blijedo žuto. Veličina stanice je u pravilu ista kao kod zrelih eritrocita, međutim zabilježeni su i manji oblici.



Slika 8. Eritroplastid (označen strelicom).

#### d) Jezgrine vakuole (JV)

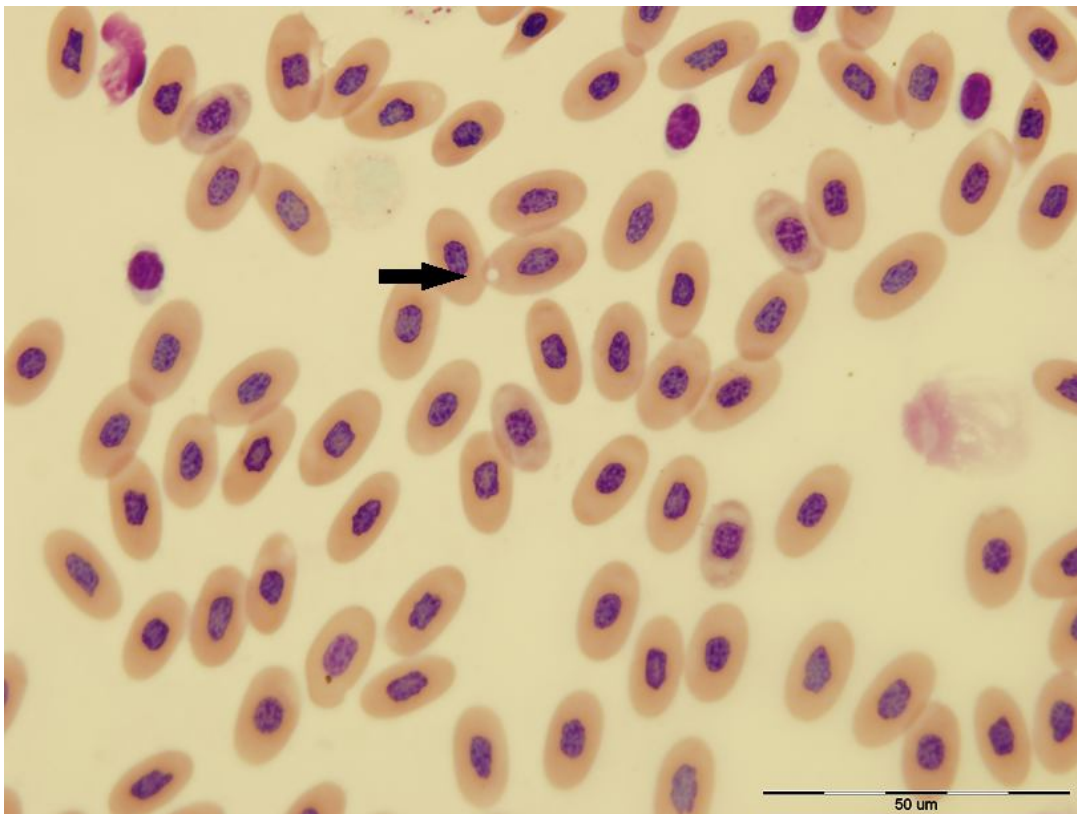
Jezgrine vakuole zabilježene su u niskoj učestalosti u eritrocitima blavora. To su okrugle nebojene inkluzije, jasno odijeljene od okolnog kromatina (Slika 9). Unutar jedne jezgre nalazila sam u pravilu po jednu vakuolu, međutim njihov broj znao je dosezati i tri JV-e po stanici.



Slika 9. Jezgrina vakuola (označena strelicom).

### e) Citoplazmatske vakuole (CV)

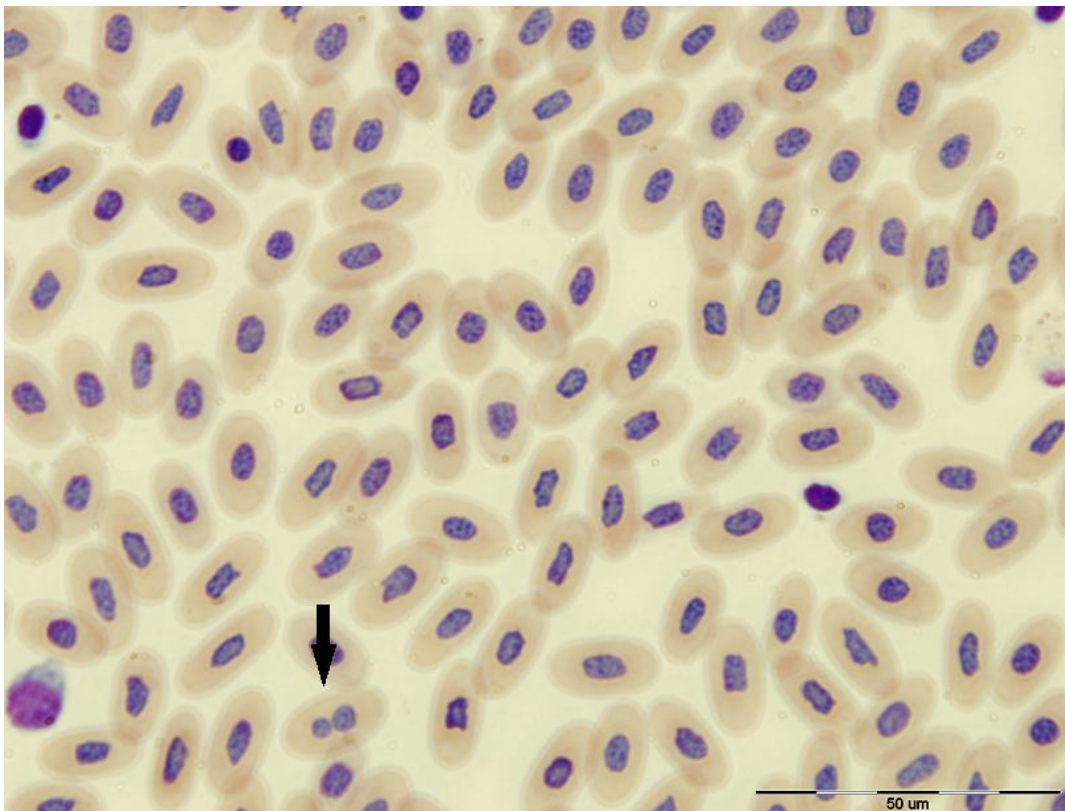
Citoplazmatske vakuole sam definirala kao okrugle do ovalne inkluzije unutar citoplazme eritrocita bez obojenja (Slika 10). Smještaj vakuola nije bio stalan, kao ni njihov broj. Minimalni broj CV-a po stanici bio je jedan, a maksimalno sam nalazila tri CV-e unutar stanica.



Slika 10. Citoplazmatska vakuola (označena strelicom).

#### f) Dvojezgreni eritrociti (BN)

Eritrociti koji su sadržavali dvije jezgre, okružene vlastitim ovojnicama te jasno odijeljene, smješteni su u kategoriju dvojezgrenih eritrocita (BN; eng. *binucleated*). Jezgre su otprilike istih veličina te sadrže jednako obojen, tamno ljubičast, kromatin. Citoplazma je iste obojenosti kao kod zrelih eritrocita (Slika 11).

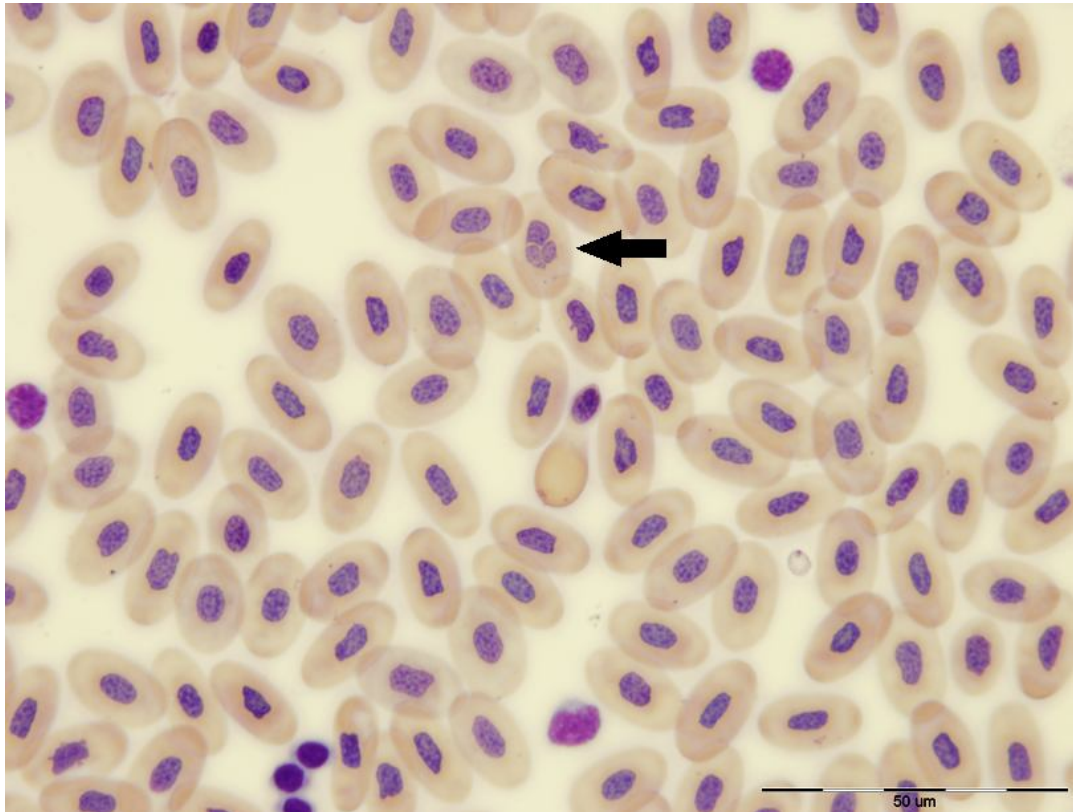


Slika 11. Dvojezgreni eritrocit (označen strelicom).



### g) Višejezgreni eritrociti (PN)

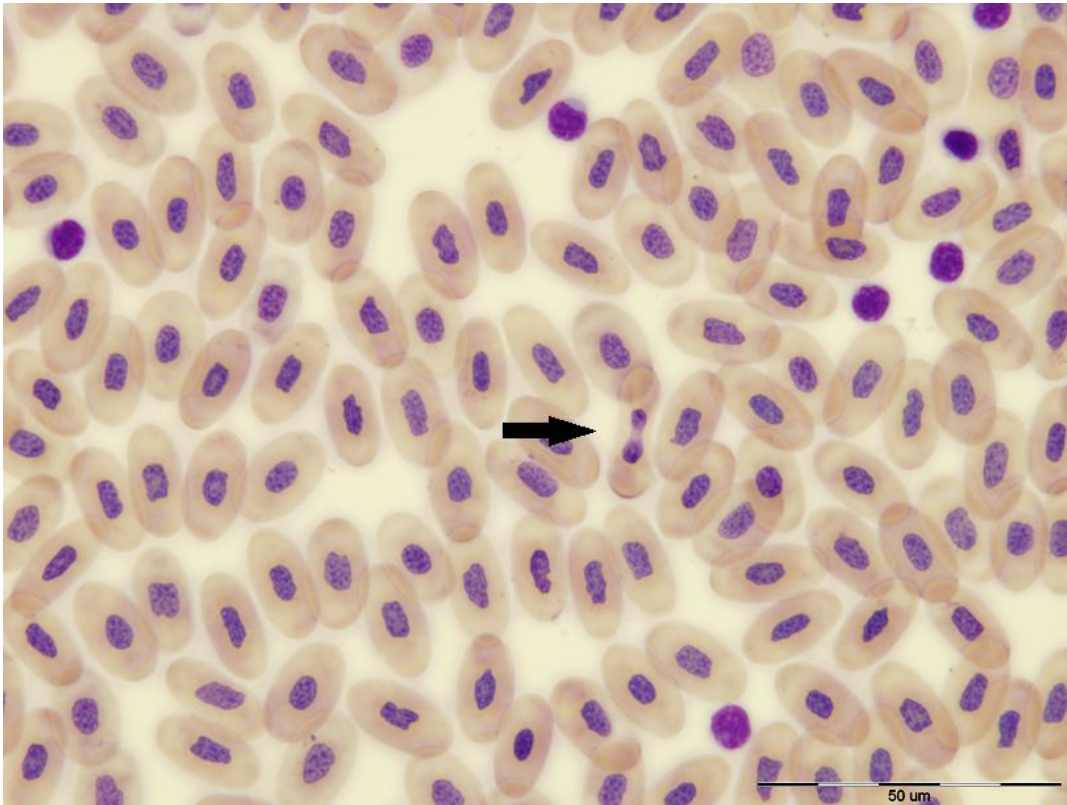
Višejezgreni eritrociti (PN; eng. *polynucleated*) sadrže više od dvije jezgre istih morfoloških značajki, spomenutih kod BN eritrocita. Maksimalni broj jezgri koje sam zabilježila unutar eritrocita iznosio je tri (Slika 12).



Slika 12. Trojezgreni eritrocit (označen strelicom).

## h) Mitotični eritrociti

Zabilježila sam nekoliko eritrocita u telofazi mitoze. Karakterizirao ih je izduženi oblik stanice te jezgre u procesu razdvajanja u dvije zasebne jezgre (Slika 13).

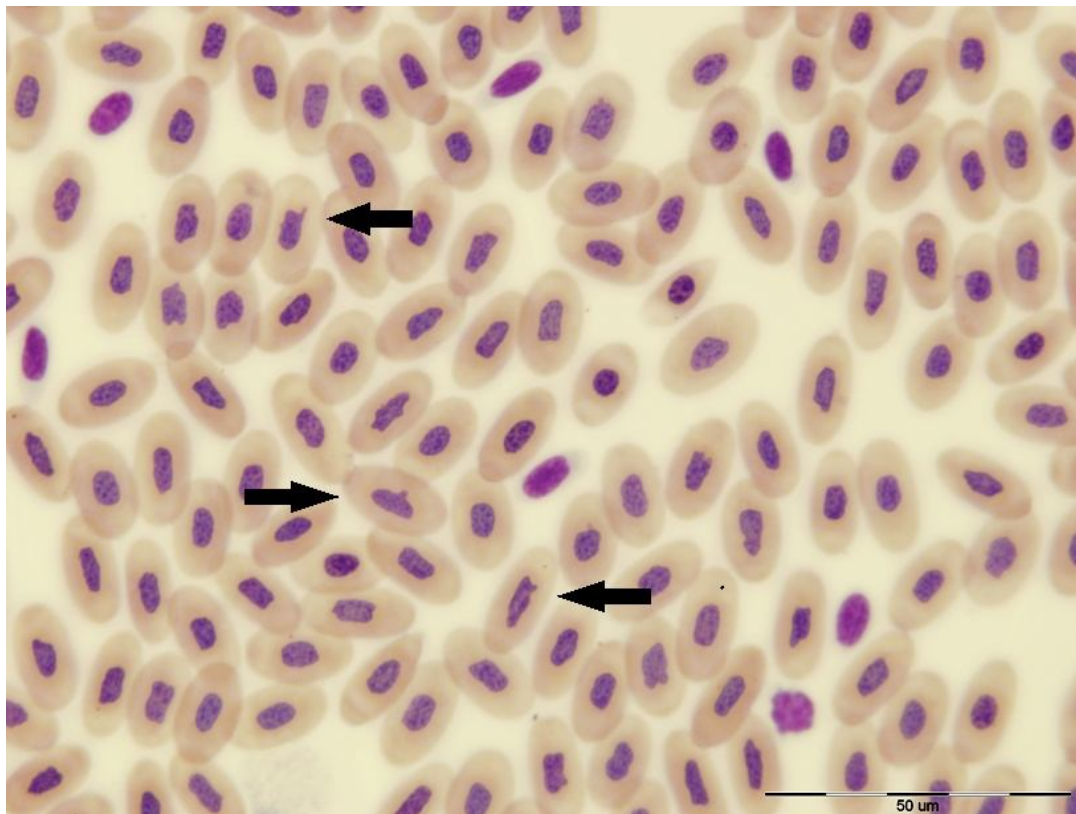


Slika 13. Mitotičan eritrocit (označen strelicom).

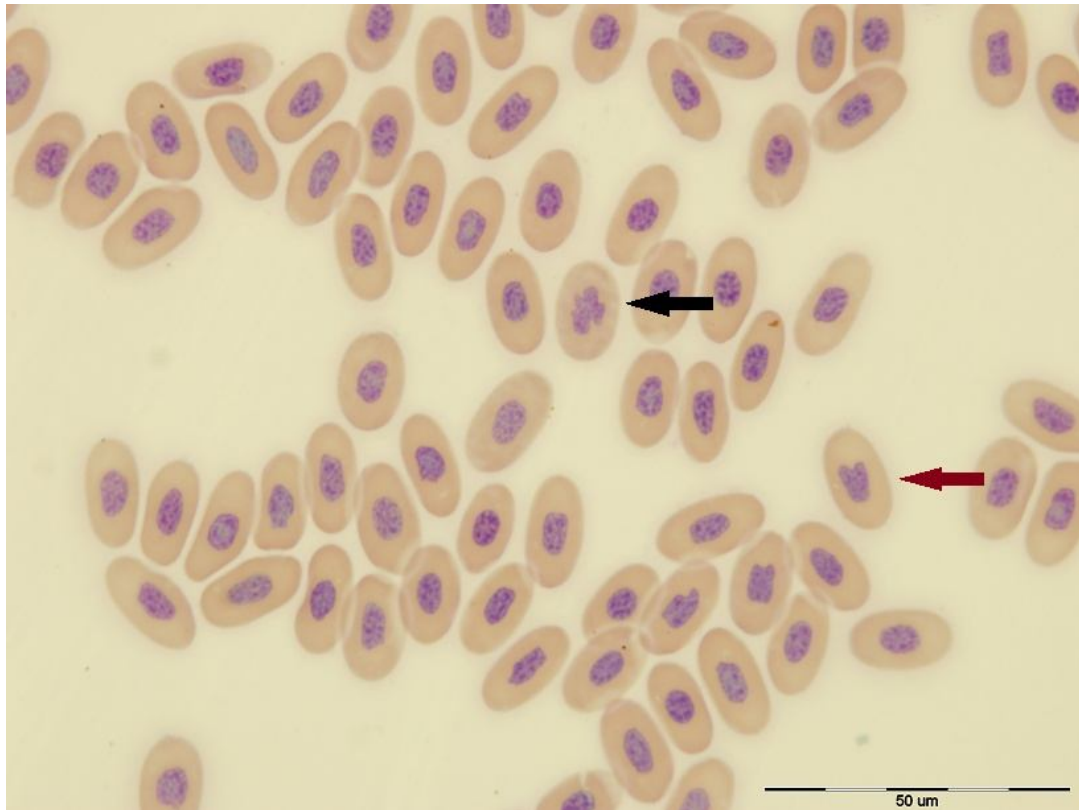
### i) Nepravilni oblici eritrocitnih jezgri (ENA)

Nepravilni oblici eritrocitnih jezgri (ENA, eng. *erythrocytic nuclear abnormalities*) zabilježene su kod svih jedinki, te su podijeljene u tri podkategorije ovisno o njihovim morfološkim značajkama:

- **Mjehurićaste jezgre** – sadrže jednu ili više evaginacija jezgrene ovojnice (Slika 14);
- **Urezane jezgre** – jezgra je urezana do polovice svoje duljine odnosno širine, a urezani prostor je ispunjen citoplazmom (Slika 15);
- **Segmentirane jezgre** – invaginacija jezgrene ovojnice za više od polovice njene duljine/širine (Slika 15).



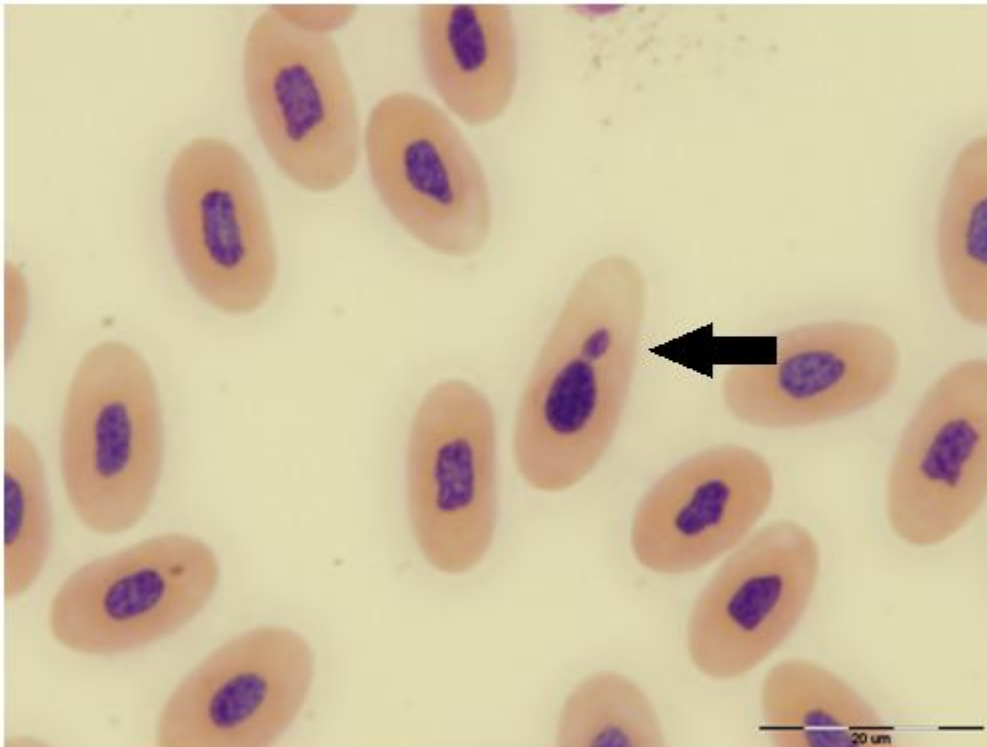
Slika 14. Mjehurićaste jezgre (označene strelicama).



**Slika 15. Urezana jezgra (označena crvenom strelicom) i segmentirana jezgra (označena crnom strelicom).**

### j) Mikronukleus (MN)

Mikronukleus je tijelo okruglog oblika, obavijeno ovojnicom, koje sadrži kromatin tamno ljubičaste obojenosti te čiji promjer ne prelazi 1/3 promjera jezgre. Nalazi se u njevoj blizini ili pomaknut prema citoplazmatskoj membrani. Zabilježen je samo jedan MN po stanici (Slika 16).



Slika 16. Mikronukleus (označen strelicom).

## 6.2. Učestalost pojavljivanja nepravilnosti eritrocita blavora

Ukupno je uzorkovano 55 jedinki blavora. Za sve podatke izračunate su srednje vrijednosti, standardna devijacija, minimalne te maksimalne vrijednosti. Rezultati su izraženi u postocima i prikazani u Tablica 1.

Najveću učestalost pojavljivanja pokazale su jezgrine nepravilnosti eritrocita. Među njima najbrojnije su urezane jezgre ( $8 \pm 2,2$  %), potom slijede mjehurićaste ( $4,64 \pm 2,14$  %) i segmentirane jezgre ( $0,29 \pm 0,16$  %). JV-e zabilježene su s učestalošću od  $0,16 \pm 0,25$  %. Preostale kategorije zastupljene su s učestalošću manjom od 0,1 %. Među njima su najčešći mikrociti ( $0,08 \pm 0,08$  %). Mikronukleusi i dvojezgreni eritrociti se pojavljuju jednako često među uzorkovanim blavorima (0,02 %). Manju učestalost pojavljivanja pokazuju citoplazmatske vakuole (0,017 %) i makrociti (0,007%).

Najrjeđi oblici morfoloških nepravilnosti eritrocita su mitotični eritrociti (0,004 %), eritroplastidi (0,003 %) i trojezgreni eritrociti (0,0012 %). Mitotični eritrociti zabilježeni su kod jedne jedinke iz creske populacije i pet jedinki iz splitske populacije. Eritroplastidi pokazuju slične rezultate – češće su zabilježeni među splitskim blavorima. Trojezgreni eritrociti zabilježeni su kod jedne jedinke iz creske i jedne iz splitske populacije.

Tablica 1. Učestalosti pojavljivanja morfoloških promjena u eritrocitima blavora. N - broj uzorkovanih jedinki; Min - najmanja učestalost pojavljivanja; Max - najveća učestalost pojavljivanja.

Kategorije morfoloških promjena eritrocita		n	Sr. vrijednost $\pm$ st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)
ENA	Mjehurićaste jezgre	55	$4,64 \pm 2,14$	1,77	11,44
	Urezane jezgre	55	$8 \pm 2,2$	4,21	12,73
	Segmentirane jezgre	55	$0,29 \pm 0,16$	0,03	0,69
MN		55	$0,02 \pm 0,04$	0	0,17
Mikrocit		55	$0,08 \pm 0,08$	0	0,36
Makrocit		55	$0,007 \pm 0,014$	0	0,033
JV		55	$0,16 \pm 0,25$	0	0,82
CV		55	$0,017 \pm 0,052$	0	0,267
BN		55	$0,02 \pm 0,04$	0	0,13
PN		55	$0,0012 \pm 0,0062$	0	0,033
Eritroplastidi		55	$0,003 \pm 0,01$	0	0,033
Mitotični eritrociti		55	$0,004 \pm 0,013$	0	0,066

### **6.3. Međuovisnost zabilježenih morfoloških nepravilnosti eritrocita kod blavora**

Devet kategorija morfoloških nepravilnosti eritrocita podvrgnuto je Spearman-ovom testu kako bi se ustanovilo postoji li međuovisnost u pojavljivanjima pojedinih kategorija. Dobiveni podaci su također korelirani s kloakalnom temperaturom blavora izmjerenom na mjestu uzorkovanja jedinki. Rezultati testa prikazani su u Tablica 2.

Spearman-ov test korelacije pokazao je slabu ali značajnu povezanost između pojavljivanja CV-a sa MN-om ( $r = 0,27$ ), mikrocitima ( $r = 0,33$ ) i JV-om ( $r = 0,27$ ). JV-e pokazuju umjerenu negativnu povezanost s mjehurićastim ( $r = -0,56$ ) i segmentiranim jezgrama ( $r = -0,53$ ). Test je pokazao jaku pozitivnu povezanost među podkategorijama jezgrenih nepravilnosti eritrocita; najbolje su korelirane mjehurićaste i segmentirane jezgre ( $r = 0,74$ ), nešto slabije mjehurićaste i urezane ( $r = 0,46$ ), dok je najslabija povezanost zabilježena između urezanih i segmentiranih jezgara ( $r = 0,36$ ).

Dvojezgreni eritrociti nisu pokazali značajnu povezanost s niti jednom drugom kategorijom. CV i makrociti su pokazali slabu povezanost s kloakalnom temperaturom ( $r = 0,27$  i  $r = 0,28$ ).

MN pokazuje slabu statistički neznačajnu povezanost s mikrocitima ( $r = -0,12$ ), makrocitima ( $r = -0,13$ ) i BN-om ( $r = -0,07$ ), što se podudara sa zabilježenim rezultatima (MN nije nađen niti u jednom makrocitu, mikrocitu ili dvojezgrenom eritrocitu). Slabu pozitivnu statistički neznačajnu korelaciju MN ima u odnosu s jezgrenim nepravilnostima (ENA). Iako je učestalost pojave mikronukleusa u pozitivnoj korelaciji sa jezgrinim nepravilnostima ta korelacija nije signifikantna.

Tablica 2. Rezultati Spearman-ovog testa korelacije. MN - mikronukleus; JV - jezgrene vakuole; CV - citoplazmatske vakuole; BN - dvojezgreni eritrociti; T (kloaka) – kloakalna temperatura. Crveno su označeni statistički značajni rezultati ( $p < 0,05$ ).

Kategorije nepravilnosti eritrocita	Mjehurićaste jezgre	Urezane jezgre	Segmentirane jezgre	MN	Mikrocit	Makrocit	JV	CV	BN	T (kloaka)
Mjehurićaste jezgre	1,00000	<b>0,45606</b>	<b>0,73980</b>	0,17844	0,06421	-0,05063	<b>-0,56218</b>	-0,05219	0,19426	0,02646
Urezane jezgre	<b>0,45606</b>	1,00000	<b>0,35693</b>	0,06047	-0,03790	-0,03633	-0,05408	0,01876	0,06422	-0,10802
Segmentirane jezgre	<b>0,73980</b>	<b>0,35693</b>	1,00000	0,11432	0,11442	-0,04496	<b>-0,53117</b>	0,05755	0,19167	0,18277
MN	0,17844	0,06047	0,11432	1,00000	-0,11783	-0,12863	0,08751	<b>0,27021</b>	-0,07080	0,03064
Mikrocit	0,06421	-0,03790	0,11442	-0,11783	1,00000	0,11711	0,03435	<b>0,32526</b>	-0,04592	0,13549
Makrocit	-0,05063	-0,03633	-0,04496	-0,12863	0,11711	1,00000	0,13133	0,02057	0,17410	<b>0,28388</b>
JV	<b>-0,56218</b>	-0,05408	<b>-0,53117</b>	0,08751	0,03435	0,13133	1,00000	<b>0,26922</b>	-0,23883	-0,01255
CV	-0,05219	0,01876	0,05755	<b>0,27021</b>	<b>0,32526</b>	0,02057	<b>0,26922</b>	1,00000	-0,19522	<b>0,27272</b>
BN	0,19426	0,06422	0,19167	-0,07080	-0,04592	0,17410	-0,23883	-0,19522	1,00000	0,10749
T (kloaka)	0,02646	-0,10802	0,18277	0,03064	0,13549	<b>0,28388</b>	-0,01255	<b>0,27272</b>	0,10749	1,00000



#### **6.4. Rezultati analize učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o lokaciji**

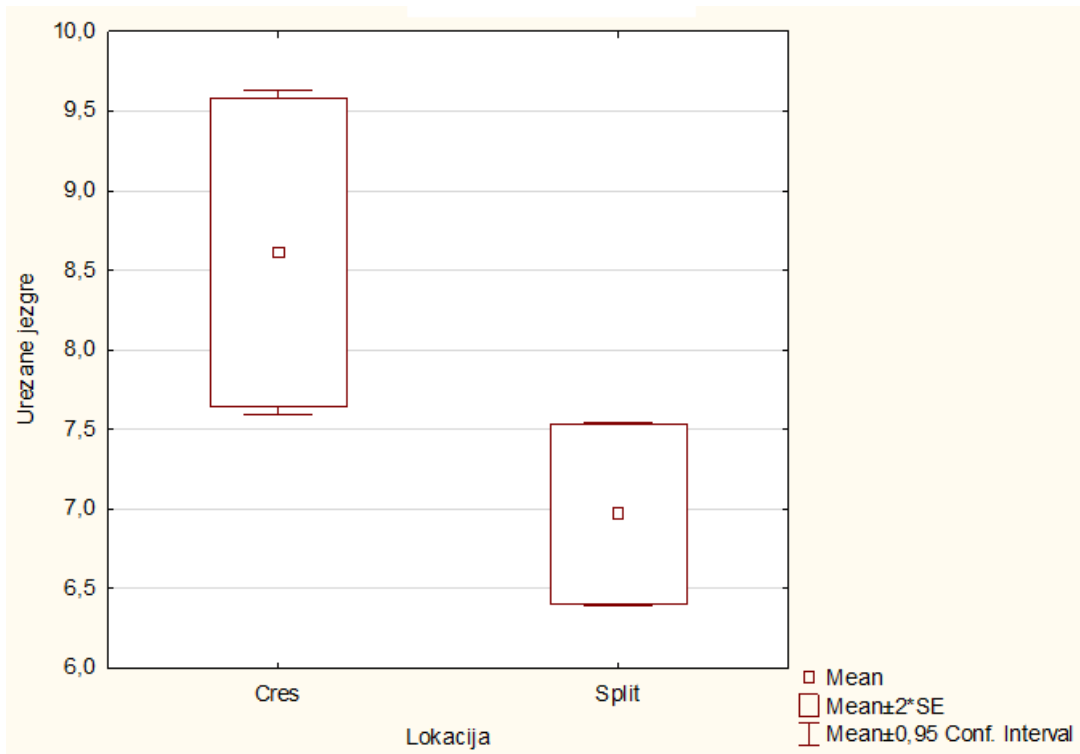
Dobiveni podaci o učestalosti pojavljivanja nepravilnosti kod eritrocita blavora s obzirom na mjesto uzorkovanja pokazali su da MN ima dvostruko veću učestalost u splitskoj populaciji nego u creskoj, međutim ta razlika se nije pokazala statistički značajnom. Udio MN-a u ukupnom broju eritrocita je nizak, te se kreće od 0 % do 0,17 %. Udio mikrocita i makrocita je sličan MN-u, i ne mijenja se značajno ovisno o populaciji. Mikrociti su ipak češće zabilježeni od makrocita u obje populacije. Dvojezgrene stanice se opet češće javljaju u creskoj populaciji blavora ( $0,03 \pm 0,04$  %), međutim ta razlika također nije statistički značajna (Tablica 3).

Mann-Whitney U test pokazao je statistički značajnu razliku za JV-e ( $p < 0,01$ ; Slika 18) i CV-e ( $p < 0,05$ ; Slika 19). Obje kategorije imaju veću brojnost unutar splitske populacije, dok ih vrlo rijetko bilježimo u creskoj. Učestalost pojavljivanja JV-a se kreće od 0 % do 0,82 %, a CV-e se pojavljuju u 0 - 0,27 % promatranih eritrocita.

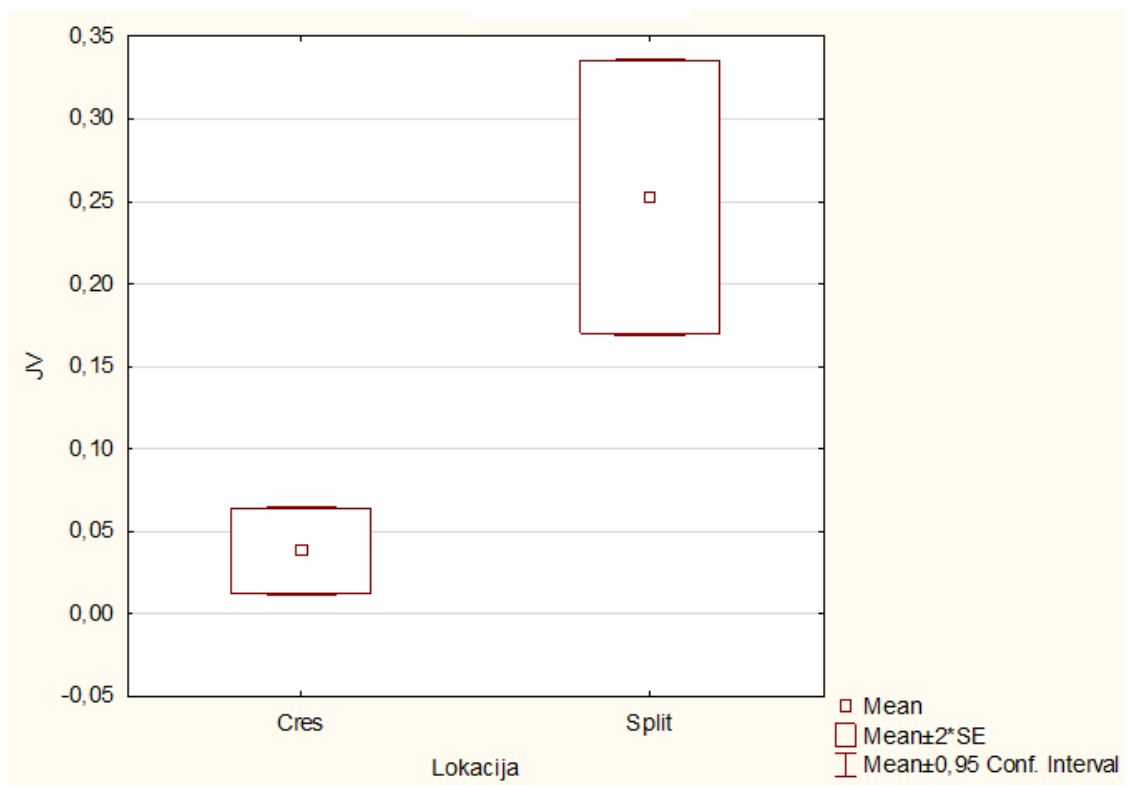
Unutar skupine jezgrinih nepravilnosti, statistički značajnu razliku pokazuju samo urezane jezgre (Slika 17), dok ostale kategorije ne pokazuju ovisnost u učestalosti pojavljivanja i promatrane lokacije. Dvije skupine se pojavljuju češće unutar creske populacije (mjehurićaste, urezane), dok se segmentirane pojavljuju u gotovo jednakom udjelu u obje populacije (oko 0,3 %). Prema brojnosti, najčešće su urezane jezgre (6,97-8,61 %), potom slijede mjehurićaste (4,16-4,46 %), a najrjeđe su segmentirane jezgre (0,29 %).

Tablica 3. Deskriptivna statistika i rezultati Mann-Whitney U testa ovisno o lokaciji s koje su jedinice uzorkovane. N - ukupan broj uzorkovanih jediniki; Min - najmanja zabilježena vrijednost; Max - najveća zabilježena vrijednost. ENA – jezgrene nepravilnosti eritrocita; MN – mikronukleus; JV – jezgrene vakuole; CV – citoplazmatske vakuole; BN – dvojezgreni eritrociti. Crveno su označeni statistički značajni rezultati (p<0,05).

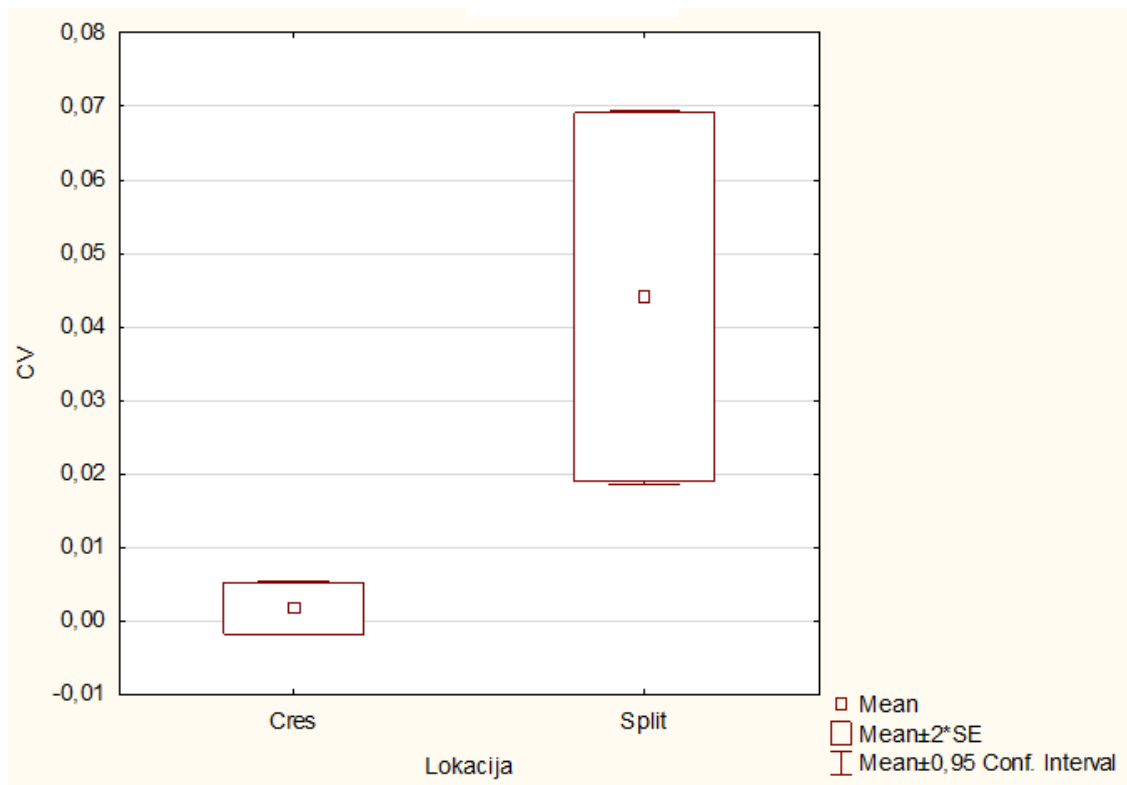
Kategorije nepravilnosti eritrocita		Cres				Split				Mann-Whitney U test		
		n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	U vrijednost	Z vrijednost	p vrijednost
ENA	Mjehurićaste jezgre	19	4,46 ± 1,28	2,23	8,1	36	4,16 ± 2,22	1,26	11,44	263	1,3894	0,16470
	Urezane jezgre	19	8,61 ± 2,12	4,21	12,73	36	6,97 ± 1,70	3,73	10,20	176	<b>2,9293</b>	<b>0,00339</b>
	Segmentirane jezgre	19	0,29 ± 0,12	0,03	0,57	36	0,28 ± 0,21	0,03	0,81	275,5	1,1681	0,24273
MN		19	0,01 ± 0,02	0	0,07	36	0,02 ± 0,04	0	0,17	287	-0,9646	0,33472
Mikrocit		19	0,09 ± 0,09	0	0,39	36	0,12 ± 0,12	0	0,57	318,5	-0,4071	0,68393
Makrocit		19	0,005 ± 0,012	0	0,033	36	0,013 ± 0,018	0	0,067	276	-1,1593	0,24632
JV		19	0,04 ± 0,06	0	0,16	36	0,25 ± 0,25	0	0,82	156	<b>-3,2833</b>	<b>0,00102</b>
CV		19	0,002 ± 0,008	0	0,033	36	0,044 ± 0,075	0	0,267	224	<b>-2,0797</b>	<b>0,03755</b>
BN		19	0,03 ± 0,04	0	0,13	36	0,013 ± 0,023	0	0,1	268	1,3009	0,19328



Slika 17. Udio urezanih jezgri zabilježenih na obje lokacije.



Slika 18. Udio jezgrenih vakuola (JV) na obje lokacije.



Slika 19. Udio citoplazmatskih vakuola (CV) na obje lokacije.

## 6.5. Rezultati analize učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o spolu

Ukupno su uzorkovane 24 jedinke ženskog i 28 jedinki muškog spola na obje lokacije. Za tri jedinke nije bilo moguće odrediti spol, te su izuzete iz ove statističke obrade podataka. Rezultati pokazuju malu, ali definitivnu razliku u učestalosti pojavljivanja određenih kategorija nepravilnosti među spolovima (Tablica 4). Međutim, gledano prema spolovima i neovisno o lokaciji, ne postoje značajne razlike u promatranoj distribuciji.

Mužjaci u prosjeku imaju više vrijednosti mjehurićastih i urezanih jezgri, MN-a i dvojezgrenih eritrocita. Od jezgrinih nepravilnosti, najvišu učestalost imaju urezane ( $8 \pm 2,2$  %) i mjehurićaste jezgre ( $4,64 \pm 2,14$  %). Segmentiranih jezgri ima znatno manje ( $0,28 - 0,29$  %) te im je brojnost jednaka kod mužjaka i kod ženki. MN ima nisku učestalost ( $0,024 \pm 0,037$  %), kao i dvojezgreni eritrociti ( $0,021 \pm 0,036$  %).

Kod ženki veću učestalost imaju mikrociti, makrociti i citoplazmatske vakuole. Jezgrene vakuole se podjednako pojavljuju među mužjacima i ženkama ( $0,16 - 0,17$  %). Mikrociti dolaze češće od makrocita (kao što je bio slučaj i u analizi podataka ovisno o lokaciji), međutim veća im je brojnost kod ženki, gdje iznosi  $0,14$  %. Citoplazmatske vakuole se kod ženki pojavljuju s učestalosti od  $0,047$  %.

Tablica 4. Deskriptivna statistika i rezultati Mann-Whitney testa ovisno o spolu uzorkovanih jedinki. N - ukupan broj uzorkovanih jedinki; Min - najmanja zabilježena vrijednost; Max - najveća zabilježena vrijednost. ENA – jezgre nepravilnosti eritrocita; MN – mikronukleus; JV – jezgre vakuole; CV – citoplazmatske vakuole; BN – dvojezgreni eritrociti.

Kategorije nepravilnosti eritrocita		Ženke				Mužjaci				Mann-Whitney U test		
		n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	U vrijednost	Z vrijednost	p vrijednost
ENA	Mjehurićaste jezgre	24	4,07 ± 1,64	1,71	8,1	28	4,64 ± 2,14	1,77	11,44	279	-1,037	0,29969
	Urezane jezgre	24	7,11 ± 1,67	3,73	10,24	28	8 ± 2,2	4,21	12,73	255	-1,4776	0,13950
	Segmentirane jezgre	24	0,28 ± 0,22	0,03	0,81	28	0,29 ± 0,16	0,03	0,69	289	-0,8535	0,39335
MN		24	0,015 ± 0,024	0	0,1	28	0,024 ± 0,037	0	0,165	289	-0,8535	0,33634
Mikrocit		24	0,14 ± 0,14	0	0,57	28	0,08 ± 0,08	0	0,36	274	1,1288	0,25831
Makrocit		24	0,012 ± 0,019	0	0,067	28	0,007 ± 0,014	0	0,033	299	0,6699	0,39094
JV		24	0,17 ± 0,19	0	0,6	28	0,16 ± 0,25	0	0,82	269	1,2206	0,21076
CV		24	0,047 ± 0,076	0	0,263	28	0,017 ± 0,053	0	0,267	265,5	1,2848	0,09990
BN		24	0,019 ± 0,029	0	0,1	28	0,021 ± 0,036	0	0,133	737	0,0826	0,92486

## **6.6. Analiza učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti ovisno o spolu i lokaciji**

Od ukupno 24 uzorkovane ženke, pet pripada creskoj populaciji blavora, dok ostalih 19 pripada splitskoj. Kod ženki sa Cresa zabilježena je veća učestalost mjehurićastih i urezanih jezgri, MN-a i BN-a. Tri navedene kategorije (mjehurićaste i urezane jezgre, BN) su također učestalije u Creskoj populaciji u prethodnoj analizi ovisnoj o lokaciji (Tablica 3). S druge strane, MN bi prema istoj analizi trebao biti učestaliji u splitskoj populaciji, međutim kod ženki je suprotan slučaj (Tablica 5).

Ženke splitske populacije sadrže veću brojnost mikrocita i makrocita te JV-a i CV-a. Ti su podaci u skladu s očekivanjima, te se poklapaju s rezultatima analize učestalosti ovisno o lokaciji (Tablica 3). Segmentirane jezgre se jednakom učestalošću pojavljuju među ženkama obje populacije, što je također u skladu s prethodnom analizom. Međutim, kod ženki ni jedna kategorija nije pokazala statistički značajnu promjenu u brojnosti nepravilnih oblika eritrocita (Tablica 5).

Ukupno je uzorkovano 28 mušjaka (po 14 jedinki s obje lokacije). Creska populacija pokazuje povećanu brojnost urezanih jezgri i BN-i; ti se rezultati poklapaju s rezultatima dobivenim u Tablica 3. I kod mušjaka segmentirane jezgre ne pokazuju razliku u brojnosti među populacijama (0,3 %). Do promjene dolazi pogledamo li rezultate brojnosti mikrocita i makrocita; u analizi ovisnoj o lokaciji brojnost im je bila veća u splitskoj populaciji, dok kod samih mušjaka ne pokazuju promjene između lokacija (Tablica 6).

Kod mušjaka blavora mjehurićaste jezgre su brojnije u splitskoj populaciji, za razliku od sveukupnih rezultata u kojima brojnost mjehurićastih jezgri raste unutar creske populacije (Tablica 3). S druge strane, veća brojnost CV-a u splitskoj populaciji mušjaka poklapa se s prijašnjim analizama. Statistički značajnu učestalost kod mušjaka pokazuju MN-i (Slika 21) i JV-e (Slika 20) – obje kategorije su brojnije unutar splitske populacije mušjaka blavora (Tablica 6).

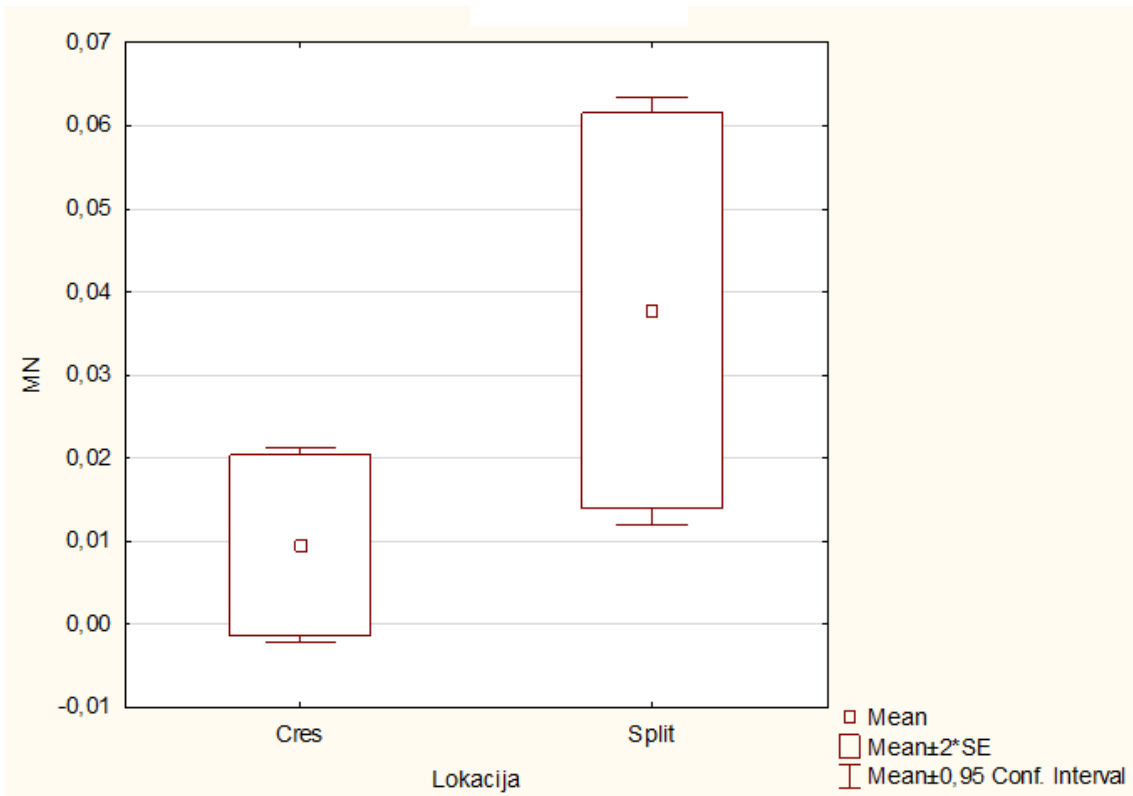
Tablica 5. Deskriptivna statistika i rezultati Mann-Whitney U testa kod ženki blavora ovisno o lokaciji.

Kategorije nepravilnosti eritrocita ženki		Cres				Split				Mann-Whitney U test		
		n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	U vrijednost	Z vrijednost	p vrijednost
ENA	Mjehurićaste jezgre	5	4,76 ± 1,92	3,19	8,1	19	3,88 ± 1,56	1,71	6,76	33	0,9951	0,31966
	Urezane jezgre	5	8,46 ± 1,34	7,13	10,24	19	6,75 ± 1,58	3,73	9,82	21	1,8481	0,06458
	Segmentirane jezgre	5	0,26 ± 0,07	0,16	0,36	19	0,29 ± 0,24	0,03	0,81	41	0,4264	0,66975
MN		5	0,02 ± 0,02	0	0,03	19	0,01 ± 0,03	0	0,1	41,5	0,3909	0,69583
Mikrocit		5	0,12 ± 0,15	0	0,39	19	0,14 ± 0,14	0	0,57	37	-0,7108	0,47719
Makrocit		5	0	0	0	19	0,02 ± 0,02	0	0,07	27,5	-1,3861	0,16571
JV		5	0,08 ± 0,08	0	0,16	19	0,19 ± 0,2	0	0,6	33	-0,9951	0,31966
CV		5	0	0	0	19	0,059 ± 0,082	0	0,26	25	-1,5638	0,11786
BN		5	0,032 ± 0,04	0	0,097	19	0,016 ± 0,026	0	0,1	37	0,7108	0,47719

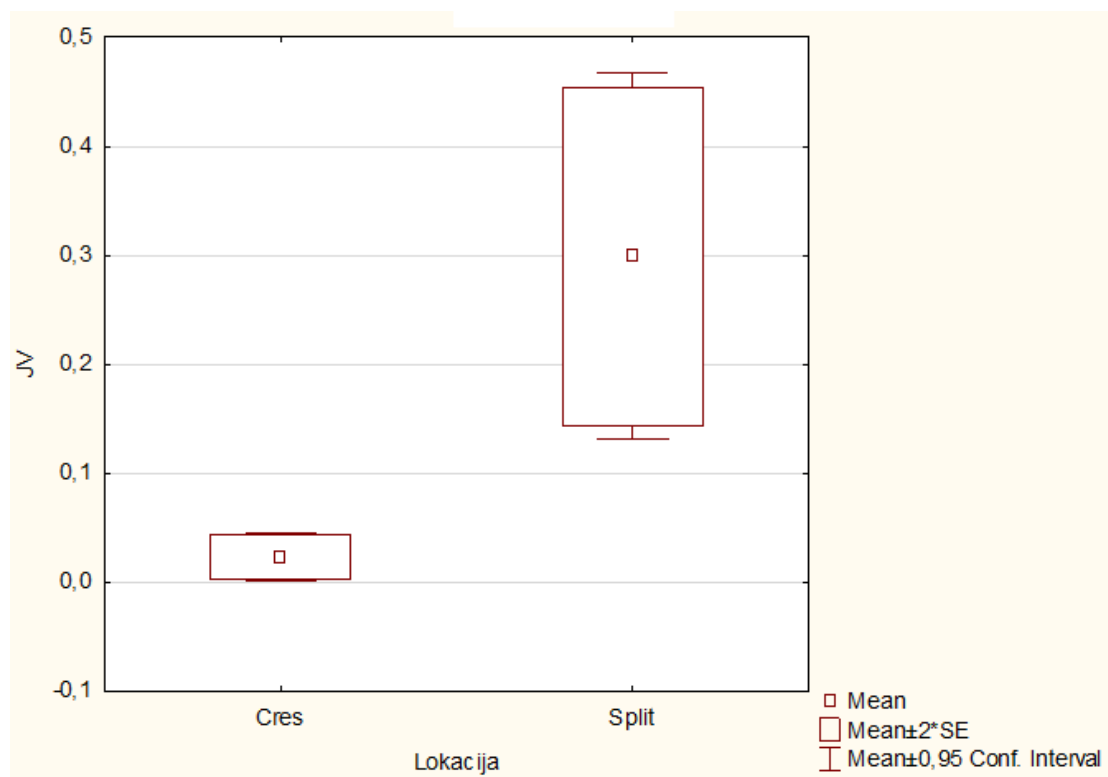
Tablica 6. Deskriptivna statistika i rezultati Mann-Whitney U testa kod mužjaka blavora ovisno o lokaciji.

Kategorije nepravilnosti eritrocita mužjaka		Cres				Split				Mann-Whitney U test		
		n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	n	Sr. vrijednost ± st. devijacija (%)	Min (%)	Max (%)	U vrijednost	Z vrijednost	p vrijednost
EN A	Mjehurićaste jezgre	14	4,35 ± 1,04	2,23	5,75	14	4,94 ± 2,87	1,77	11,44	93	0,2067	0,83619
	Urezane jezgre	14	8,67 ± 2,37	4,21	12,73	14	7,33 ± 1,85	5,03	10,20	61	1,6770	0,09352
	Segmentirane jezgre	14	0,3 ± 0,13	0,03	0,57	14	0,28 ± 0,19	0,06	0,69	78,5	0,8730	0,38266
MN		14	0,01 ± 0,02	0	0,07	14	0,04 ± 0,04	0	0,17	53,5	<b>-2,0217</b>	<b>0,04320</b>
Mikrocit		14	0,081 ± 0,058	0	0,2	14	0,085 ± 0,098	0	0,363	88,5	0,4135	0,67921
Makrocit		14	0,01 ± 0,01	0	0,03	14	0,01 ± 0,01	0	0,03	96,5	0,0459	0,96335
JV		14	0,024 ± 0,038	0	0,133	14	0,3 ± 0,3	0	0,82	51	<b>-2,1365</b>	<b>0,03263</b>
CV		14	0,002 ± 0,009	0	0,033	14	0,031 ± 0,072	0	0,267	76	-0,9878	0,32321
BN		14	0,031 ± 0,046	0	0,133	14	0,012 ± 0,021	0	0,066	77	0,9412	0,34623





Slika 20. Udio jezgrenih vakuola (JV) kod mužjaka na obje lokacije.



Slika 21. Udio mikronukleusa (MN) kod mužjaka na obje lokacije.

## 7. Rasprava

Analiza krvi provedena je na ukupno 55 jedinki blavora. Među njima nalaze se 24 ženke i 28 mužjaka; za tri jedinke nije bilo moguće odrediti spol te su izuzete iz statističke analize podataka. Zabilježene su manje razlike između mužjaka i ženki, međutim Mann-Whitney U test je pokazao kako te razlike nisu statistički značajne, što pokazuje da ne postoje razlike u učestalosti pojavljivanja tipova eritrocitnih nepravilnosti ovisno o spolu kod blavora. Slični rezultati dobiveni su i kod guštera *Tupinambis merianae* (Schaumburg i sur. 2012), koji također nije pokazivao značajne razlike ovisno o spolu i starosti jedinki.

Drugačiji je slučaj kod zmija, gdje je zabilježena značajna razlika u učestalosti pojavljivanja ENA i CV-a kod vrste *Hierophis gemonensis* ovisno o spolu (Strunjak - Perović i sur. 2010). Kod šara poljarica ženke imaju veće udjele CV-a, dok su kod mužjaka brojnije ENA. Ti se rezultati donekle poklapaju s dobivenim vrijednostima kod blavora, gdje ženke također imaju nešto više vrijednosti CV-a, dok se mjehuričaste i urezane jezgre češće nalaze kod mužjaka. Segmentirane jezgre su zastupljene u jednakim udjelima među mužjacima i ženkama, što se ne poklapa s podacima dobivenim u prethodno spomenutom istraživanju.

Na području Cresa uzorkovano je 19 jedinki, dok je iz splitske populacije uzorkovano 36 blavora. Od promatranih devet kategorija eritrocitnih nepravilnosti, tri su pokazale značajna odstupanja u učestalosti ovisno o lokaciji s koje su jedinke uzorkovane (urezane jezgre, JV-e i CV-e). Pošto podaci o učestalosti eritrocitnih nepravilnosti ne postoje za blavore, u Tablica 7 su navedene referentne vrijednosti za te nepravilnosti zabilježene kod drugih skupina kralješnjaka čiji eritrociti sadrže jezgre te sam dodala i referentne vrijednosti zabilježene kod blavora iz ovog istraživanja (upisane vrijednosti pripadaju creskoj populaciji blavora, koja obitava na staništu pod vrlo slabim antropogenim utjecajem).

Jezgrine vakuole su jedan oblik nepravilnosti koji je pokazao značajne razlike u učestalosti pojavljivanja među populacijama blavora. Pokazuju otprilike šest puta veću brojnost u splitskoj populaciji, što je u skladu s mojom hipotezom. Unutar creske populacije, koja obitava na staništu pod vrlo slabim antropogenim utjecajem, zabilježena brojnost JV-a iznosi 0,04 %, što se poklapa s vrijednostima zabilježenim

kod zdravih populacija nekih riba i gmazova. Uzrok pojave vakuola u jezgri nije istražen, međutim neki autori smatraju da nastaju kao posljedica apoptotičnih i nekrotičnih procesa u stanicama (de Campos Ventura i sur. 2007). Mogući razlog većeg udjela JV-a na području Splita je uporaba pesticida i herbicida na poljoprivrednim površinama kojima taj predio obiluje (maslinici, voćnjaci, vrtovi). Istraživanje utjecaja herbicida atrazin na krv ribe *Oreochromis niloticus* pokazalo je značajan porast u učestalosti JV-a kod viših koncentracija herbicida (de Campos Ventura i sur. 2007).

Povećanoj brojnosti JV-a mogu pridonositi i drugi faktori, poput godišnjeg doba i starosti jedinke. Kod zmija, na primjer, udio JV-a dostiže maksimalne vrijednosti u jesen, prije početka hibernacije (Strunjak - Perović i sur. 2010), dok krv riba sadrži više JV-a u proljeće (Strunjak - Perović i sur. 2009). Kako bi se utvrdilo da li postoji takva sezonalna varijabilnost i kod blavora, potrebno je provesti dodatna istraživanja u ljetnim i jesenskim mjesecima. Rezultati dobiveni ovisno o starosti jedinke također pokazuju interspecijsku varijabilnost; kod nekih vrsta rastu starenjem jedinke dok kod drugih opadaju (Strunjak - Perović i sur. 2009; Carrasco i sur. 1990). Treći čimbenik koji može utjecati na brojnost JV-a je spol jedinke. Kod mužjaka blavora zabilježena je značajna razlika u brojnosti JV-a ovisno o lokaciji, s većim vrijednostima utvrđenim kod splitske populacije.

Spearman-ov test korelacije pokazao je značajnu povezanost između JV-a i CV-a, što znači da postoji velika vjerojatnost da se ova dva oblika nepravilnosti pojave zajedno. Zajednički uzrok za obje kategorije bi objasnio ovu povezanost, međutim za to su potrebna daljnja istraživanja.

Citoplazmatske vakuole su također značajno učestalije u splitskoj populaciji. Kod eritrocita blavora zabilježila sam pojavu samo jedne CV-e po stanici; kod drugih vrsta taj broj može biti i veći. Postoji malo literaturnih podataka o brojnosti CV-a; kod zmije *Hierophis gemonensis* taj broj iznosi 11,06 % (Strunjak - Perović i sur. 2010), dok eritrociti zmije *Homalopsis buccata* sadrže manje od 1 % (Salakij i sur. 2002).

Citoplazmatske vakuole se mogu spontano pojavljivati u eritrocitima kao fiziološka adaptacija organizma (Canfield 1998), tijekom apoptoze uzrokovane ishemičnim ili osmolarnim stresom, zbog nedostatka faktora rasta ili kao posljedica

viralnih inkluzija. Smatra se da su većina reverzibilne; u suprotnom mogu dovesti do smrti stanice (Pendl 2006). Točni uzroci nisu ustanovljeni, međutim zabilježena je povećana brojnost eritrocita s vakuolama kod riba u doticaju s kemikalijama poput žive (Panigrahi i Misra 1979) i malationa (Sawhney i Johal 2000), te kod jedinki ozračenih gama zračenjem (Anbumani i sur. 2012). Malation je oblik insekticida u čestoj uporabi u poljoprivredi i kućanstvima. Može biti opasan za životinje koje se pretežno hrane beskralješnjacima (poput blavora), međutim vjerojatnost bioakumulacije je niska (malation se raspada nakon 15-17 dana pod utjecajem bakterija i sunčeve svjetlosti). Veću opasnost od bioakumulacije i biomagnifikacije predstavlja živa, koja dolazi u tlo i kopnene vode putem industrijske aktivnosti. Split je industrijski vrlo razvijeno područje s nizom industrijskih postrojenja (željezara, tvornica betona i dizel motora, brodogradilište) što neizbježno negativno utječe na okoliš. Povećana brojnost JV-a i CV-a kod blavora koji naseljavaju splitsko područje mogao bi ukazivati na negativni antropogeni utjecaj na ovom području.

Splitske jedinice imaju također povećan udio MN-a, međutim ta razlika nije se pokazala statistički značajnom. Udio MN-a kod zdravih populacija je nizak i rijetko premašuje 0,1 %. Predstavlja najčešće istraživanu kategoriju eritrocitnih nepravilnosti, te se pokazao kao pouzdan i vrlo osjetljiv indikator genotoksičnosti pojedinih kemikalija (Van Ngan i sur. 2007). Rezultati analize eritrocita blavora pokazali su značajnu korelaciju između pojavljivanja MN-a i CV-a, međutim nije ustanovljena povezanost između MN-a i mikrocita, koji se također češće pojavljuju u splitskoj populaciji blavora. Takav nalaz se ne poklapa s hipotezom da mikrociti nastaju kao posljedica egzocitiranja MN-a iz stanice kako bi se ona riješila viška oštećenog genetičkog materijala (da Silva Souza i Fontanetti 2006; Shimizu i sur. 1998, 2000). Mogući uzrok nepodudaranja rezultata je uzorkovanje premalog dijela populacije blavora; u tom slučaju je u budućim istraživanjima potrebno uložiti veći lovni napor.

Slično učestalosti pojavljivanja jezgrinih i citoplazmatskih vakuola, MN može biti induciran anorganskim (bakar, kadmij, živa) i organskim tvarima (otpadne i kanalizacijske vode) te gama zračenjem (Anbumani i sur. 2012). Istraživanje na ribi *Oreochromis niloticus* pokazalo je da MN-i mogu biti inducirani povećanim koncentracijama herbicida (da Silva Souza i Fontanetti 2006), do kojih splitski blavori puno lakše dolaze jer žive u poljoprivrednoj zoni.

Dodatni faktori koji utječu na brojnost MN-a, a koji nisu antropogenog karaktera uključuju godišnje doba i starost jedinke. Veći udio MN-a nađen je kod punoglavaca žaba nego kod odraslih jedinki. Ta se pojava može objasniti povećanim stupnjem eritropoeze kod mlađih jedinki, te činjenicom da žive u vodi gdje su u stalnom kontaktu s onečišćivačem (Barni i sur. 2007). Brojnost MN-a kod riba je najveća tijekom ljetnih mjeseci (Strunjak - Perović i sur. 2009; da Silva Souza i Fontanetti 2006). Iznimka su zmiје, kod kojih MN-i postižu najveću učestalost tijekom zimskih mjeseci (Strunjak - Perović i sur. 2010).

Mjehuričaste jezgre su drugi podtip ENA po brojnosti kod blavora (prvi su urezane, a najmanje ima segmentiranih jezgri). Navedene kategorije pokazuju vrlo snažnu međusobnu korelaciju. Neki autori smatraju da mjehuričaste jezgre predstavljaju ostatke citoplazmatskog mosta koji je povezivao glavnu jezgru s MN-om (Anbumani i sur. 2012); nakon odvajanja MN-a citoplazmatski most se povlači natrag prema jezgri i ostavlja izbočinu na površini. U sklopu ovog istraživanja nisam uspjela potvrditi povezanost između ove dvije kategorije. Iako im brojnost raste paralelno s brojnosti MN-a kod mužjaka i ženki, MN je brojniji u splitskoj populaciji blavora a mjehuričaste jezgre u creskoj. Dapače, učestalost sva tri podtipa ENA je veća od referentnih literaturnih vrijednosti zabilježenih kod drugih organizama. Moguće objašnjenje leži u premalom broju uzorkovanih jedinki iz creske populacije, što je uzrokovalo manju osjetljivost statističkih analiza na trendove u brojnosti ovih kategorija.

Iz statističke analize izuzeti su eritroplastidi, mitotični i trojezgreni eritrociti. Trojezgreni eritrocit zabilježen je kod svega dvije jedinke (jedne iz creske a druge iz splitske populacije blavora), zbog čega ga nije bilo moguće podvrgnuti daljnjoj statističkoj obradi. Eritroplastidi i mitotični eritrociti zabilježeni su češće kod splitske populacije blavora. Kod dviju jedinki splitskih blavora zabilježeni su eritroplastidi, a kod pet jedinki opaženi su mitotični eritrociti; nasuprot tome obje kategorije zabilježene su samo kod jedne jedinke iz creske populacije blavora.

Povećane koncentracije obje kategorije povezane su s većim stupnjem eritropoeze čiji je cilj u kratkom vremenskom periodu stvoriti više stanica za prijenos kisika. Stimulacija eritropoeze te ubrzano uklanjanje oštećenih eritrocita povezani su sa promjenama u ishrani, patološkim poremećajima te sveukupnim metaboličkim

stresom jedinke kakav se može pojaviti u slučaju povećane prisutnosti ksenobiotika u okolišu (Barni i sur. 2007).

Ektotermne vrste poput guštera imaju sporiji metabolizam i dugovječnije eritrocite naspram endotermnih vrsta životinja. Iz tih razloga mogu biti osjetljiviji na učinke ksenobiotika. Do ingestije ksenobiotika dolaze prvenstveno preko svoje ishrane, a mogu se zaraziti i preko udisanja čestica aerosola koje nastaju izgaranjima u industrijskim kompleksima. Blavori se nalaze pri vrhu hranidbene mreže u svojem staništu zbog čega postoji opasnost bioakumulacije i biomagnifikacije teških metala i štetnih organskih spojeva u njihovim tkivima.

Poznato je da su teški metali vrlo stabilni spojevi koji dugo ostaju u okolišu. Njihov negativan učinak se svodi na sprečavanje polimerizacije aktinskih tubula i formacije diobenog vretena tijekom mitoze (Jiraungkoorskul i Sahaphong 2007).

MN i ENA se sve češće koriste kao biomarkeri u proučavanju mutagenog i genotoksičnog potencijala pojedinih supstanci. Promjene koju uzrokuju u morfologiji stanica i jezgri eritrocita su subletalne, međutim nanose stres organizmu i oslabljuju ga. Time životinja postaje podložnija infekcijama i bolestima (Barni i sur. 2007). Unatoč dosadašnjem napretku u razumijevanju učinaka ksenobiotika na žive organizme, zbog kompleksnosti njihovog utjecaja na okoliš i metabolizam pojedinih životinja potrebna su dodatna istraživanja kako bi se ustanovili točni uzroci pojava eritrocitnih nepravilnosti.

Tablica 7. Referentne učestalosti pojedinih kategorija eritrocitnih nepravilnosti kod riba, vodozemaca i drugih gmazova.

Vrsta	Mjehuričaste jezgre (%)	Urezane jezgre (%)	Segmentirane jezgre (%)	MN (%)	Mikrocit (%)	Makrocit (%)	JV (%)	CV (%)	BN (%)	Izvor
<b>Ribe</b>										
<i>Bathygobius soporator</i>				2,23						Galindo i Moreira 2009
<i>Catla catla</i>				0,90						Anbumani i sur. 2012
<i>Dicentrarchus labrax</i>				0,13						Strunjak-Perović i sur. 2009
<i>Mugil spp.</i>				0,20						Strunjak-Perović i sur. 2009
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0,018			0,02					0,006	Andreikenaite i sur. 2007
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,01	0,003		0,04			0,052		0,02	de Campos Ventura i sur. 2007
<i>Oreochromis niloticus</i>	0-0,02			0,01-0,03	0-0,01				0,01-0,02	da Silva Souza i Fontanetti 2006
<i>Oreochromis niloticus</i>				0,00						da Rocha i sur. 2011
<i>Oreochromis niloticus</i>				0,03						Matsumoto i sur. 2006
<i>Poronothus triacanthus</i>	0,03-0,13	0,26		0,17					0,1	Jiraungkoorskul i Sahaphong 2007
<i>Puntius altus</i>	0,003-0,01	0,02-0,03		0,03					0,007-0,01	Jiraungkoorskul i sur. 2007
<i>Sparus aurata</i>				0,017			0,063		0,108	Strunjak-Perović i sur. 2009
<i>Sparus aurata</i>				0,1-0,4						Costa i Costa 2007
<i>Trematomus newnesi</i>	0,16-0,24	0,26-0,34	0-0,08	0,06-0,12						Van Ngan i sur. 2006
<b>Vodozemci</b>										
<i>Lithobates catesbeianus</i>				0,01						da Rocha i sur. 2012
<i>Rana perezi</i>	0,16	0,08		0						Marques i sur. 2009
<b>Gmazovi</b>										
<i>Boa constrictor</i>				0,01						Zuniga-Gonzales i sur. 2000, 2001
<i>Caiman latirostris</i>				0,087						Poletta i sur. 2008
<i>Ctenosaura pectinata</i>				0,005						Zuniga-Gonzales i sur. 2001
<i>Hierophis gemonensis</i>				0,03			0,04	11,06		Strunjak-Perović i sur. 2010
<i>Iguana iguana</i>				0,01						Zuniga-Gonzales i sur. 2001
<i>Mastigophis flagellum</i>				0,03						Zuniga-Gonzales i sur. 2000, 2001
<i>Pituophis depei</i>				0,01						Zuniga-Gonzales i sur. 2000, 2001
<i>Tupinambis merianae</i>				0,095						Schaumburg i sur. 2012
<i>Pseudopus apodus</i>	4,46	8,61	0,29	0,01	0,09	0,005	0,04	0,002	0,03	Ratko 2014

## 8. Zaključak

Ovaj rad predstavlja prvi izvještaj o osnovnim vrijednostima učestalosti pojavljivanja eritrocitnih nepravilnosti kod blavora. Iz dobivenih rezultata promatrane su učestalosti devet kategorija nepravilnosti stanica i jezgri eritrocita koje se u velikoj mjeri poklapaju s rezultatima dobivenim kod ostalih gmazova, te nekih vodozemaca i riba.

Nakon obrade i analize dobivenih podataka mogu zaključiti sljedeće:

- Nakon detaljnog istraživanja literature te obrade uzoraka krvi blavora uspostavila sam 10 kategorija eritrocitnih nepravilnosti: mikrociti, makrociti, jezgrene vakuole (JV), citoplazmatske vakuole (CV), mikronukleus (MN), dvojezgreni eritrociti (BN), višejezgreni eritrociti (PN), eritroplastidi, mitotični eritrociti i eritrociti s nepravilnim jezgrama (ENA), koji se dodatno dijele u tri podtipa (mjehurićaste, urezane i segmentirane jezgre).
- Obradom podataka creske populacije blavora ustanovila sam referentne vrijednosti učestalosti pojavljivanja navedenih kategorija. Creska populacija izabrana je kao referentna jer je pod slabim antropogenim utjecajem.
- Analizom krvi blavora nisu pronađene značajne razlike među spolovima, te na temelju toga mogu zaključiti kako mužjaci i ženke posjeduju uniforman odgovor na ksenobiotike neovisno o spolu.
- Spearman-ov test korelacije pokazao je značajnu i snažnu ovisnost između podkategorija jezgrinih nepravilnosti. Značajna povezanost postoji također između citoplazmatskih vakuola i mikronukleusa, mikrocita i jezgrenih vakuola. Jezgrine vakuole su značajno negativno korelirale s mjehurićastim i segmentiranim jezgrama. Slaba povezanost zabilježena je između učestalosti pojavljivanja citoplazmatskih vakuola i makrocita s kloakalnom temperaturom blavora.
- Analizom podataka ovisno o lokaciji s koje su jedinke uzorkovane ustanovljeno je da postoji razlika između dviju populacija. Učestalosti pojavljivanja



eritrocitnih nepravilnosti su u većini slučajeva više kod splitske populacije. Značajna razlika u učestalosti zabilježena je za jezgrine i citoplazmatske vakuole, koje se češće pojavljuju kod splitskih blavora. Creska populacija sadrži više udjele jezgrinih nepravilnosti te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se ustanovio razlog njihovoj višoj učestalosti unutar navedene populacije. Analizom podataka ovisno o spolu i lokaciji ustanovljena je značajno viša učestalost mikronukleusa i jezgrinih vakuola unutar splitske populacije blavora.

- Zbog ektotermije, sporijeg metabolizma te visokog položaja u hranidbenom lancu postoji stvarna opasnost dugoročnog nakupljanja štetnih tvari u tkivima blavora. Stoga su potrebna dodatna istraživanja koja će se detaljnije pozabaviti kvalitetom njihovog staništa te utjecajem promjena i poremećaja staništa na hematogram blavora i ekspresiju nepravilnosti u njihovim crvenim krvnim stanicama, kao i laboratorijska toksikološka istraživanja kako bi se utvrdila uzročno-posljedična veza izloženosti blavora genotoksičnim agensima.

## 9. Literatura

Alleman A. R., Jacobson E. R., Raskin R. E. (1999): Morphologic, Cytochemical Staining and Ultrastructural Characteristics of Blood from Eastern diamondback rattlesnakes (*Crotalus adamanteus*). *Am. J. Vet. Res.* 60:507-514.

Anbumani S., Mohankumar M. N., Selvanayagam M. (2012): Flow cytometric assessment of DNA damage in the fish *Catla catla* (Ham.) exposed to gamma radiation. *J. Adv. Biotech.* 11:36-40.

Andreikėnaitė L., Baršienė J., Vosylienė M. Z. (2007): Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) treated with heavy metal mixture and road maintenance salts. *Acta Zool. Lit.* 17:213-219.

Ayllón F., Garcia-Vasquez E. (2001): Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49:221-225.

Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M., Fenoglio C. (2007): Evaluation of *Rana ssp. esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquat. Toxicol.* 81:45-54.

Branch B. (1998) Field guide to snakes and other reptiles of Southern Africa. Third revised edition. Ralph Curtis Books Publishing, Sanibel Island.

Bricker N. K., Raskin R. E., Densmore C. L. (2012): Cytochemical and immunocytochemical characterization of blood cells and immunohistochemical analysis of spleen cells from two species of frog, *Rana (Aquarana) catesbeiana* and *Xenopus laevis*. *Vet. Clin. Pathol.* 41:353-361.

Canfield P. J. (1998): Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust. Vet. J.* 76:793-800.

Campbell T. W. (2004): Hematology of Reptiles. U Thrall M. A. (ur): *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 259-276.

Campbell T. W., Ellis C. K. (2007): Avian and exotic animal hematology and cytology. Yowa State Press, Blackwell.

Carrasco K. R., Tilbury K. L., Meyers M. S. (1990): Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47:2123-2136.

Costa P. M., Costa M. H. (2007): Genotoxicity assessment in fish peripheral blood: a method for a more efficient analysis of micronuclei. J. Fish Biol. 71:148-151.

Da Rocha C. A. M., Cohsolacao Almeida V. H., da Silva Costa A., Sagica-Junior J. C., Nascimento J. A. (2012): Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in bullfrog tadpoles (*Lithobates catesbeianus*) treated with copper sulphate. Int. J. Gen. 2:6-11.

da Rocha C. A. M., da Fonseca Gomez C., Goncalves Rubeiro Junior R. F., da Silva Pinheiro R. H. (2011): Detection of micronuclei and other nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* exposed to potassium dichromate. Global Vet. 7:301-304.

da Silva Souza T., Fontanetti C. S. (2006): Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. Mutat. Res. 605:87-93.

de Campos Ventura B., de Fransceschi de Angelis D., Marin-Morales M. A. (2007): Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. Pestic. Biochem. Phys. 90:42-51.

Dessauer H. C. (1970): Blood Chemistry of Reptiles: Physiological and Evolutionary Aspects. U Gans C., Parsons T. C. (ur): Biology of the Reptilia, Volume 3. Academic Press, San Diego, 1-72.

Duguy R. (1970): Numbers of Blood Cells and Their Variations. U Gans C., Parsons T. C. (ur): Biology of the Reptilia, Volume 3. Academic Press, San Diego, 93-109.

Fenech M. (2000): The *in vitro* micronucleus technique. Mutat. Res. 455:81-95.

Formanowitz Jr. D. R., Brodie Jr. E. D., Campbell J. A. (1990): Intraspecific Aggression in *Abronia vasconcelosii* (Sauria, Anguinae), a Tropical Arboreal Lizard. *Biotropica* 22:391-396.

Frye F. L. (1991): Hematology as applied to clinical reptile medicine. U Frye F. L. (ur): Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry, Volume 1, 2<sup>nd</sup> edition. Krieger, Melbourne.

Galindo T. P., Moreira L. M. (2009): Evaluation of genotoxicity using the micronucleus assay and nuclear abnormalities in the tropical sea fish *Bathygobius soporator* (Valenciennes, 1837) (Teleostei, Gobiidae). *Genet. Mol. Biol.* 32:394-398.

Gregory P. T. (1980): Physical Factor Selectivity in the Fossorial Lizard *Anguis fragilis*. *J. of Herpetol.* 14:95-99.

Hailey A., Theophilidis G. (1987): Cardiac responses to stress and activity in the armoured legless lizard *Ophisaurus apodus*: Comparison with snake and tortoise. *Comp. Biochem. Physiol.* 88:201-206.

Harr K. E., Alleman A. R., Dennis P. M. (2001): Morphologic and Cytochemical Characteristics of Blood Cells and Hematologic and Plasma Biochemical Reference Ranges in Green iguanas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218:915-921.

Hartman F. A., Lessler M. A. (1964): Erythrocyte measurements in fishes, Amphibia and reptiles. *Biol. Bull.* 126:83-88.

Hawkey C. M., Dennett T. B. (1989): Color atlas of comparative veterinary hematology: normal and abnormal blood cells in mammals, birds and reptiles. Iowa State University Press, Ames.

Jenkins-Perez J. (2012): Hematologic Evaluation of Reptiles: A Diagnostic Mainstay. *Vet. Tech.* 1-8.

Jiraungkoorskul W., Sahaphong S. (2007): Efficacy of ascorbic acid reducing waterborne copper toxicity in butterflyfish (*Poronotus triacanthus*). *J. Biol. Sci.* 7:620-625.

Jiraungkoorskul W., Sahaphong S., Kosai P., Kim M. H. (2007): Micronucleus test: the effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). Research J. Environ. Toxicol. 1:27-36.

Kovačić S., Nikolić T., Ruščić M., Milović M., Stamenković V., Mihelj D., Jasprica N., Bogdanović S., Topić J. (2008): Flora Jadranske obale i otoka – 250 najčešćih vrsta. Školska knjiga d.d. i Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Macey J. R., Schulte II J. A., Larson A., Tuniyev B. S., Orlov N., Papenfuss T. J. (1999): Molecular Phylogenetics, tRNA Evolution, and Historical Biogeography in Anguid Lizards and Related Taxonomic Families. Mol. Phylogenet. Evol. 3:250-272.

Marques S. M., Antunes S. C., Pissarra H., Pereira M. L., Gonçalves F., Pereira R. (2009): Histopathological changes and erythrocytic nuclear abnormalities in Iberian green frogs (*Rana perezi* Seoane) from a uranium mine pond. Aquat. Toxicol. 91:187-195.

Matsumoto S. T., Mantovani M. S., Malagutti M. I. A., Dias A. L., Fonseca I. C., Martin-Morales M. A. (2006): Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. Genet. Mol. Biol. 29:148-158.

Milto K. D. (2010): A Record of Natural Nest of *Pseudopus apodus*. Russ. J. Herpet. 17:41-42.

Nardini G., Leopardi S., Bielli M. (2013): Clinical Hematology in Reptilian Species. Vet. Clin. Exot. Anim. 16:1-30.

Panigrahi A. K., Misra B. N. (1979): Effect of mercury on the morphology of erythrocytes in *Anabas scadens*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23:784-878.

Pendl H. (2006): Morphological changes in red blood cells of birds and reptiles and their interpretation. Isr. J. Vet. Med. 61:1-12.

Poletta G. L., Kleinsorge E., Paonessa A., Mudry M. D., Larriera A., Siroski P. A. (2011): Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74:852-859.

Rifai L., Abu Baker M., Al Shafei D., Disi A., Mahasneh A., Amr Z. (2005): *Pseudopus apodus* (Pallas 1775) from Jordan, with notes on its ecology. *Herpetozoa* 18:133-140.

Salakij C., Salakij J., Apibal S. (2002): Hematology, Morphology and Ultrastructural Characteristics of Blood Cells in King cobras (*Ophiophagus hannah*). *Vet. Clin. Pathol.* 31:116-126.

Salakij C., Salakij J., Suthunmapinunta P., Chanhome L. (2002): Hematology, morphology and ultrastructure of blood cells and blood parasites from puff-faced watersnakes (*Homalopsis buccata*). *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* 36:35-43.

Sawhney A. K., Johal M. S. (2000): Erythrocyte alterations induced by malathion in *Channa punctatus* (Bloch). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64:398-405.

Schaumburg L. G., Poletta G. L., Siroski P. A., Mudry M. D. (2012): Baseline values of micronuclei and comet assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84:99-103.

Schwenk K. (2008): Comparative anatomy and physiology of chemical senses in nonavian aquatic reptiles. U Thewissen J. G. M., Nummela S. (ur.) *Sensory evolution on the threshold; Adaptations in secondarily aquatic vertebrates*. University of California Press, Berkeley.

Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G. M. (1998): Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J. Cell. Biol.* 140:1307-1320.

Shimizu N., Shimuara T., Tanaka T. (2000): Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.* 448:81-90.

- Shine R. (2005): Life-History evolution in reptiles. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:23-46.
- Stacy N. I., Alleman A. R., Sayler K. A. (2011): Diagnostic Hematology of Reptiles. *Clin. Lab. Med.* 31:87-108.
- Strunjak-Perović I., Čož-Rakovac R., Topić-Popović N., Jadan M. (2009): Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 35:287-291.
- Strunjak-Perović I., Lisičić D., Čož-Rakovac R., Topić-Popović N., Jadan M., Benković V., Tadić Z. (2010): Evaluation of micronucleus and erythrocytic nuclear abnormalities in Balkan whip snake *Hierophis gemonensis*. *Ecotoxicology* 19:1460-1465.
- Troiano J. C., Vidal J. C., Gould J. (1997): Haematological and reference intervals of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, Laurenti, 1768) in captivity. *Comp. Haematol. Int.* 1:109-112.
- Van Ngan P., Gomes V., Passos M. J. A. C. R., Ussami K. A., Campos D. Y. F., da Silva Rocha A. J., Pereira B. A. (2006): Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station "Comandante Ferraz", King George Island. *Polar. Biol.* 30:209-217.
- Vasse J., Beaupain D. (1981): Erythropoiesis and haemoglobin ontogeny in the turtle *Emys orbicularis* L. *J. Embryol. Exp. Morph.* 62:129-138.
- Vitt L. J., Caldwell J. P. (2009): Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles, 3<sup>rd</sup> Edition. Academic Press, San Diego.
- Zaias J., Norton T., Fickel A. (2006): Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St. Catherine's Island, Georgia. *Vet. Clin. Pathol.* 35:321-325.
- Zaworski J. P. (1987): Egg guarding behavior by male Gekko gecko. *B. Chicago Herpet. Soc.* 22:193.

Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Luna-Aguirre J., González-Rodríguez A., Zamora-Perez A., Gómez-Meda B. C., Ventura-Aguilar A. J., Ramos-Ibarra M. L., Ramos-Mora A., Ortiz G. G., Gallegos-Areola M. P. (2000): Spontaneous micronuclei in peripheral blood erythrocytes from 54 animal species (mammals, reptiles and birds): part two. *Mutat. Res.* 467:99-103.

Zúñiga-González G., Torres-Bugarín O., Zamora-Perez A., Gómez-Meda B. C., Ramos-Ibarra M. L., Martínez-González S., González-Rodríguez A., Luna-Aguirre J., Ramos-Mora A., Ontiveros-Lira D., Gallegos-Areola M. P. (2001): Differences in the number of micronucleated erythrocytes among young and adult animals including humans. Spontaneous micronuclei in 43 species. *Mutat. Res.* 494:161-167.

[www.euroherp.com](http://www.euroherp.com) (15. siječnja 2014)

[www.googlemaps.com](http://www.googlemaps.com) (9. siječnja 2014)



## 10. Životopis

### OSOBNNE INFORMACIJE

Datum rođenja: 10. veljače 1988. godine  
Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska  
Adresa: Vugrovečka 40, Sesvete, Zagreb  
Broj telefona: 098 941 0445  
E-mail: martina.ratko@gmail.com

### OBRAZOVANJE

**2011. – 2014.** Diplomski studij "Ekologija i zaštita prirode", Modul Kopno, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
**2007. – 2011.** Preddiplomski studij biologije, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek  
**2004. – 2006.** XV. Gimnazija, International Baccalaureate Program (Diploma Program)  
**2002. – 2004.** XV. Gimnazija, International Baccalaureate Program (Middle Years Program)  
**1994. – 2002.** Osnovna škola Luka, Sesvete

### STRANI JEZICI

Engleski jezik (napredni stupanj u govoru i pismu)  
Španjolski jezik (srednji stupanj u govoru i pismu)  
Francuski jezik (osnovni stupanj u govoru i pismu)

### VOZAČKA DOZVOLA

Posjedujem vozačku dozvolu B kategorije.