

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Božidar S. Rašković

**HISTOLOŠKA GRAĐA JETRE, CREVA, ŠKRG A I
BUBREGA ŠARANA
(*Cyprinus carpio* L., 1758) GAJENOG U
POLUINTENZIVNOM SISTEMU: EFEKTI
RAZLIČITIH TIPOVA DODATE HRANE**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Božidar S. Rašković

**LIVER, INTESTINE, GILLS, AND KIDNEY
HISTOLOGY OF COMMON CARP
(*Cyprinus carpio* L., 1758) REARED IN SEMI-
INTENSIVE SYSTEM: EFFECTS OF DIFFERENT
SUPPLEMENTAL FEEDS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

KOMISIJA ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE

MENTORI:

dr Vesna Poleksić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Vesna Koko, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Zoran Marković, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ivana Živić, docent
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

DATUM ODBRANE:

REZIME

HISTOLOŠKA GRAĐA JETRE, CREVA, ŠKRGGA I BUBREGA ŠARANA (*Cyprinus carpio* L., 1758) GAJENOG U POLUINTENZIVNOM SISTEMU: EFEKTI RAZLIČITIH TIPOVA DODATE HRANE

Šaran (*Cyprinus carpio* L., 1758) je jedna od najznačajnijih vrsta za srpsku, evropsku i svetsku akvakulturu. I pored toga što se šaran u evropskoj akvakulturi najčešće gaji u poluintenzivnom sistemu, literatura o histologiji vitalnih organa u ovim agroekosistemima je jako oskudna. Stoga su urađena dva šestomesečna eksperimenta u kojima je jednogodišnja šaranska mlad hranjena sa tri različita tipa dodate hrane: žitarice (ŽH), peletirana (PH) i ekstrudirana hrana (EH). Tokom prve godine je korišćena voda iz obližnjeg potoka, dok je u toku druge godine korišćena voda iz arteskog bunara, sa 125 metara dubine. Praćeni su efekti na ribe i to na više različitih nivoa: efekat hrane na morfologiju organa digestivnog trakta (jetra i creva); efekat hrane na morfologiju i ultrastrukturu hepatocita i enterocita; efekat kvaliteta i porekla vode za vodosnabdevanje ribnjaka na morfologiju jetre, škrge i bubrega; efekat hrane na masnokiselinski sastav mesa riba. Razlike u histološkoj građi organa su ispitivane korišćenjem različitih metoda: histometrijskim i stereološkim metodama, polukvantitativnim scoringom histopatoloških promena i parametrima prirasta. Budući da se radi o terenskom istraživanju u proizvodnim uslovima, redovno su kontrolisani fizički i hemijski parametri kvaliteta vode u svakom jezeru. Na kraju eksperimentalnog perioda konstatovane su statistički značajne razlike u prirastu, specifičnoj stopi rasta i konverziji hrane između komercijalnih hrana (PH i EH) i žitarica. Histometrijske analize su pokazale manju površinu jedarnih profila, veću površinu ćelijskih profila i niži odnos jedarnih i ćelijskih profila hepatocita u grupi ŽH u poređenju sa grupama PH i EH. U isto vreme, broj lipidnih kapi u hepatocitima je rastao od početka eksperimenta do jula i avgusta, kada je bio najviši, dok je njihova količina rapidno opadala na kraju sezone gajenja, u septembru i oktobru. Sa druge strane, glikogen je prisutan u svim uzorkovanim ribama tokom celog trajanja eksperimenta. Razlika u visini enterocita nije bila prisutna između grupa, ali je ustanovljena jaka pozitivna korelacija između visine crevnih nabora i mase riba. U distalnom delu creva riba iz svih grupa su ustanovljeni pojedini indikatori enteritisa, ali samo tokom prvih dva meseca gajenja riba. Rezultati histoloških analiza su pokazali da su ribe hranjene komercijalnom dodatkom hranom imale bolji nutritivni status jetre u poređenju sa grupom riba hranjenih žitaricama. Međutim, razlika između grupa PH i EH je utvrđena samo za jedan histometrijski parametar - broj intraepitelih makrofaga. Za procenu zdravstvenog statusa riba korišćene su histopatološke analize, frekvencija pojavljivanja promena i polukvantitativni scoring. Vodosnabdevanje ribnjaka je uzrokovalo značajnu razliku u ribnjačkim jezerima između dve godine eksperimenta. Tokom prve godine, kada je korišćena voda iz potoka, je zabeležen

značajno viši nivo tvrdoće vode, koncentracije rastvorenog kiseonika i pH vrednosti, dok je tokom druge godine, kada je korišćena voda iz arteskog bunara bio prisutan značajno viši nivo elektroprovodljivosti, ukupnog amonijaka i količine ortofosfata. Stopa preživljavanja riba i indeks podobnosti staništa su bili viši u toku druge godine eksperimenta, dok se vrednosti prirasta riba nisu statistički razlikovale između dve godine. Takođe, u toku prve godine eksperimenta, kada je korišćena potočna voda, su oscilacije u većini faktora bile mnogo veće u odnosu na drugu godinu. Ove razlike u kvalitetu vode su uticale na indekse polukvantitativnog skoringa škrge i jetre. Indeksi su bili značajno viši tokom prve godine eksperimenta, što znači da su intenzitet i broj histopatoloških promena bili mnogo veći tokom prve godine eksperimenta. Ukoliko se posmatra stepen korelacije između parametara kvaliteta vode i polukvantitativnog skoringa, dolazi se do zaključka da je nivo pH najznačajniji od posmatranih parametara i ima najveći uticaj na histologiju organa riba. U isto vreme, nije ustanovljena razlika u histopatološkom indeksu između riba hranjenih različitim tipovima hrane. Škrge su se pokazale kao najbolji indikatorski organ u ovoj studiji, jetra kao relativno dobar, dok se bubreg nije pokazao kao dobar indikatorski organ. Odgovor na uticaje spoljašnjih faktora na bubreg je bio limitiran, a korelacije između parametara kvaliteta vode i histopatološkog indeksa na ovom organu nisu ustanovljene, za razliku od škrge i jetre. Međutim, za razliku od većine histopatoloških promena u bubregu, broj regenerisanih nefrona je imao određenu pravilnost i opadao je od početka eksperimenta ka kraju. Analiza masnih kiselina u mesu šarana je pokazala da su ribe hranjene komercijalnom hranom u m znatno veći diverzitet masnih kiselina u mišićima u odnosu na ribe hranjene žitaricama, kao i ribe uzorkovane na početku eksperimenta. Pored toga, utvrđena je značajna razlika u količini masnih kiselina u mesu riba između grupa hranjenih različitim komercijalnom hranom. Tako su ribe iz grupe EH, bile bogate ω -3 masnim kiselinama, a značajno je da su imale visoke nivoe eikozopentanske i dokozoheksanske masne kiseline. Takođe, ribe iz ove grupe pokazuju i visoke vrednosti odnosa ω -3 i ω -6 masnih kiselina, što njihovo meso čini najpovoljnijim za ishranu ljudi.

KLJUČNE REČI: šaran; poluintenzivni sistem; kvalitet vode; prirast; histopatologija; polukvantitativni skoring; histometrija; stereologija; masne kiseline

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Biologija ćelija i tkiva

UDK BROJ: 639.043.2: [597.551.2: 639.311]

ABSTRACT

LIVER, INTESTINE, GILLS, AND KIDNEY HISTOLOGY OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio* L., 1758) REARED IN SEMI-INTENSIVE SYSTEM: EFFECTS OF DIFFERENT SUPPLEMENTAL FEEDS

Carp (*Cyprinus carpio* L., 1758) is one of the most important fish species in Serbian, European and World aquaculture. Despite the fact that in Europe, carp is mostly grown in semi-intensive rearing systems, the literature on the histology of vital organs of carp from this production system is scarce. Therefore, two six-month field experiments were carried out: carp yearlings were fed supplemental feeds: cereals (CF), steam-pelleted (PF) and extruded (EF) compound feed. Different water supply was used each year: in the first year, water supply was from the nearby stream, while in the second year of experiment, water supply was from a tube well 125 m deep. The effects on fish were assessed on several different levels: effects of feed on the histology of the digestive tract (liver and intestine), effects of feed on the morphology and ultrastructure of hepatocytes and enterocytes; effects of pond water quality and origin on the histology of the liver, gills and kidney; effects of supplemental feed on carp fatty acid composition. The histological structure of organs was examined using following methods: histochemistry, stereological methods, semiquantitative scoring of histopathological changes, and growth parameters. During the experiment physical and chemical parameters of water quality in the ponds were monitored. At the end of the experimental period, a significant difference in weight gain, specific growth rate and feed conversion ratio was observed in fish fed compound feeds (PF and EF) compared to fish fed cereals. A smaller nuclear profile area, larger hepatocytes cytoplasmic profile area and lower nucleus/cytoplasm ratio was found in CF-fed fish compared to PF- and EF-fed fish. Regardless of the type of supplementary feed, the number of lipid droplets in hepatocytes was highest in July and August, lipid depletion occurred in September and October, while glycogen was present in hepatocytes throughout the experiment. No size difference between groups was observed for enterocytes, but a strong relationship between length of intestinal folds and fish weight was found. In the first two months of experiments signs of enteritis were found in carp distal intestine. According to histological indicators, extruded or steam-pelleted feed induced better nutritional status of common carp in comparison to cereals. However, the only histometrical difference between groups PF and EF was the number of intraepithelial macrophages. In order to assess the fish health status, a histopathological analysis, alteration frequencies, and semiquantitative scoring of the changes were used. Water supply caused a significant difference in ponds between the two experimental years: ponds supplied from stream water were characterized by higher water hardness, dissolved oxygen and pH values, while those supplied from tube well had higher electroconductivity, total ammonium and

orthophosphates content. Fish survival rate and habitat suitability index were lower in ponds supplied by stream water, while the fish weight gain did not differ between the two water supplies. Moreover, in the first year of experiment, when stream water was used, oscillations of most factors were higher than in the second year. These differences resulted in a higher level of histopathological indices in gills and liver, which reflect higher number and intensity of histological lesions during the first year of experiment. Among the water quality parameters, pH level had the strongest influence on fish. Water supply produced greater influence on the level of histopathological changes than the type of feed applied. Gills confirmed to be the best indicator organ in this study; the liver was a relatively good indicator, while the kidney was the least responsive. The impact of environmental factors on kidney histology was limited, and the correlation between water quality parameters and histological indices of this organ were not found, in contrast to the gills and liver. The only histological parameter in the kidney that could be used as an indicator was the number of regenerated nephrons. Their number showed certain regularity and decreased from the beginning of the experiment to its end. Analysis of fatty acids composition of carp meat showed that carp fed compound feed had larger diversity of fatty acids in muscle compared to fish fed cereals, and fish sampled at the beginning of the experiment. In addition, a significant difference in the amount of fatty acids in fish meat between the groups fed compound feed was found. EF-fed fish had higher levels of ω -3 fatty acids, compared to PF-fed fish. Important levels of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and high ω -3/ ω -6 fatty acid ratio were found in EF fed carp. These findings makes EF fed carp the most favorable for human consumption.

KEY WORDS: common carp; semi-intensive rearing system; water quality; weight gain; histopathology; semiquantitative scoring system; histometry; stereology; fatty acids

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIAL TOPICS: Cell and tissue biology

UDC NUMBER: 639.043.2: [597.551.2: 639.311]

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Osnovne karakteristike vrste.....	2
1.2. Akvakultura šarana.....	4
1.3. Ishrana šarana.....	7
1.4. Anatomija i histologija jetre kod riba.....	9
1.5. Anatomija i histologija distalnog dela creva kod riba.....	14
1.6. Anatomija i histologija škrge kod riba.....	16
1.7. Anatomija i histologija bubrega kod riba.....	20
1.8. Značaj histoloških indikatora u zdravstvenom stanju organa riba.....	23
1.9. Masne kiseline kao pokazatelj kvaliteta mesa kod riba.....	26
2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA	28
3. MATERIJAL I METODE	30
3.1. Dizajn eksperimenta.....	31
3.2. Uzorkovanje.....	33
3.3. Svetlosna mikroskopija.....	34
3.4. Elektronska mikroskopija.....	34
3.5. Morfometrija i stereologija.....	35
3.6. Semikvantitativna analiza histopatoloških promena.....	36
3.7. Parametri prirasta.....	37
3.8. Parametri kvaliteta vode.....	38
3.9. Indeks podobnosti staništa.....	39
3.10. Hemijske analize hrane i mesa ribe.....	40
3.11. Određivanje sadržaja masnih kiselina.....	40
3.12. Statistička analiza.....	41
4. REZULTATI	43
4.1. Parametri rasta.....	44
4.1.1. Parametri rasta na početku i kraju eksperimenta.....	44
4.1.2. Masa i dimenzije riba po periodima.....	45
4.1.3. Vrednosti prirasta riba po periodima.....	47
4.1.4. Vrednosti SGR-a po periodima.....	48
4.1.5. Vrednosti TGC-a po periodima.....	49
4.1.6. Fultonov faktor kondicije po periodima.....	49
4.1.7. Stopa preživljavanja.....	50
4.1.8. Indeks podobnosti staništa.....	50
4.2. Parametri kvaliteta vode.....	50
4.2.1. Parametri kvaliteta vode u prvoj godini istraživanja.....	51
4.2.2. Parametri kvaliteta vode u drugoj godini istraživanja.....	55
4.2.3. Razlike u parametrima između dve godine istraživanja.....	60
4.3. Histologija jetre.....	61
4.3.1. Morfologija hepatocita i acinusnih ćelija.....	62
4.3.2. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima.....	65
4.3.3. Morfometrija hepatocita i acinusnih ćelija.....	69
4.3.4. Histopatološke promene u jetri.....	71
4.3.5. Štapićaste ćelije.....	76
4.3.6. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri.....	77
4.3.6.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri između grupa.....	77
4.3.6.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri između dve godine.....	78

4.4. Histologija distalnog dela creva.....	80
4.4.1. Histopatološke promene na distalnom delu creva.....	81
4.4.2. Enterociti.....	82
4.4.3. Morfometrija enterocita i crevnih nabora.....	83
4.4.4. Intraepitelni makrofagi.....	85
4.4.5. Korelacija između crevnih nabora i mase riba.....	87
4.5. Histologija škruga.....	88
4.5.1. Histopatološke promene na škrugama.....	88
4.5.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škrugama.....	94
4.5.2.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škrugama između grupa.....	94
4.5.2.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škrugama između dve godine.....	95
4.6. Histologija bubrega.....	97
4.6.1. Histopatološke promene u bubregu.....	99
4.6.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu.....	103
4.6.2.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu između grupa.....	103
4.6.2.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu između dve godine.....	104
4.6.3. Nefroni u stadijumu regeneracije.....	106
4.6.4. Ektopično tireoidno tkivo u bubregu.....	107
4.7. Ukupan histopatološki indeks tri posmatrana organa.....	108
4.7.1. Polukvantitativni skoring ukupnih histopatoloških promena između grupa.....	108
4.7.2. Polukvantitativni skoring ukupnih histopatoloških promena između dve godine.....	109
4.8. Uticaj životne sredine na vrednost histopatoloških indeksa škruga, bubrega i jetre.....	109
4.8.1. Korelacija između histopatoloških indeksa i kvaliteta vode.....	109
4.8.2. Kanonijska diskriminantna analiza histopatoloških promena.....	110
4.9. Analiza masnih kiselina u mišićnom tkivu šarana.....	113
5. DISKUSIJA.....	119
5.1. Uticaj ishrane na parametre prirasta ribe i histologiju digestivnog trakta.....	120
5.2. Uticaj kvaliteta životne sredine na histologiju škruga, jetre i bubrega.....	134
5.3. Uticaj ishrane na sastav i količinu masnih kiselina u mišićima.....	148
6. ZAKLJUČCI.....	153
7. REFERENCE.....	159
PRILOZI.....	183

“Form follows function - that has been misunderstood.

Form and function should be one”

Frank Lloyd Wright

(1867-1959)

“Alle ding' sind gift, und nichts ohn' gift; allein die dosis macht,

daß ein ding kein gift ist”

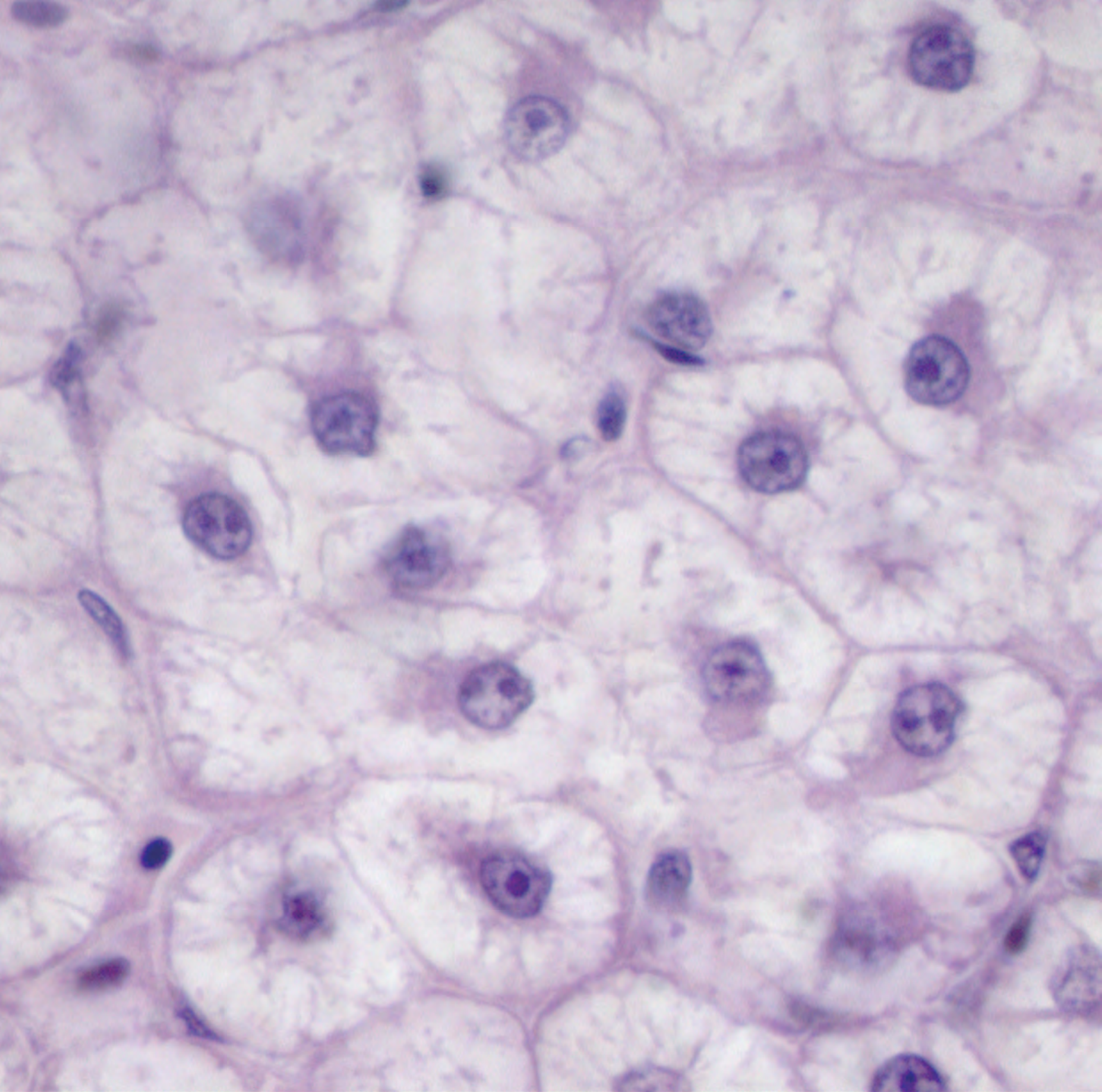
Paracelsus

(1493-1541)

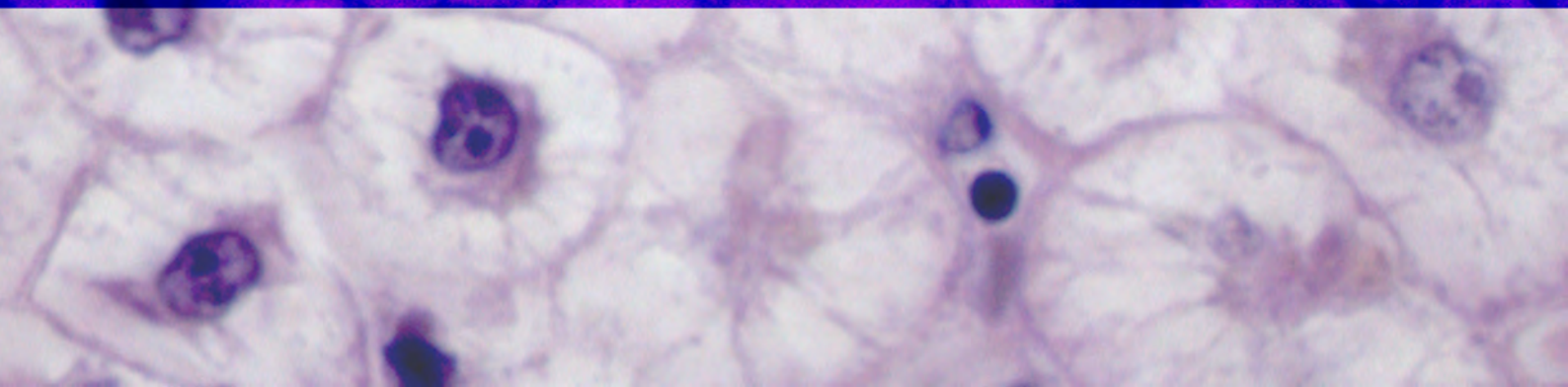
“Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es”

Jean Anthelme Brillat-Savarin

(1755-1826)



1. UVOD



1.1. Osnovne karakteristike vrste

Subphyllum: Vertebrata

Superclassis: Gnathostomata

Classis: Osteichthyes

Infraclassis: Teleostei

Superordo: Ostariophysi

Ordo: Cypriniformes

Familia: Cyprinidae

Cyprinus carpio (Linnaeus, 1758)

Šaran (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) je košljoriba reda Cypriniformes, porodice Cyprinidae (Kalezić, 2001). Porodica Cyprinidae je daleko najbrojnija u ovom redu, sa najmanje 210 rodova i preko 2010 vrsta (He i sar., 2008). Samim tim, porodica Cyprinidae predstavlja najbrojniju porodicu slatkovodnih riba na planeti. Šaran danas ima cirkumpolarno rasprostranjene i može se naći na svakom kontinentu osim na Antarktiku. Početni areal ove vrste je obuhvatao Evropu i Aziju, ali se posle introdukcije vrlo brzo raširio u Severnoj Americi i Africi. Poslednja dva kontinenta koje je šaran počeo da naseljava kao invazivna, alohtona vrsta, često veoma štetna po lokalnu autohtonu faunu riba jesu Australija i Južna Amerika (Pinto i sar., 2005; Zambrano i sar., 2006). Šaran živi u sporotekućim rekama i jezerima sa mekim dnom obraslim vodenim biljkama. Može nastanjivati i vode povećanog saliniteta. Telo mu je izduženo, snažno i zbijeno, pokriveno tamno žuto-zelenim krljuštima ili su pak krljušti manje ili više redukovane (**Slika 1**). Raste do dužine veće od metra i težine preko 30 kg. U usnoj duplji nema zube, ali poseduje ždrelne zube koji mu služe za mlevenje zrnaste hrane. Nema želudac, a samim tim ni kiselu reakciju varenja. Po tipu ishrane je omnivor. U prirodi se hrani zooplanktonom, faunom dna i semenkama makrofita. U našim uslovima ženke šarana uglavnom dostižu polnu zrelost u navršenoj trećoj, a mužjaci u drugoj godini života. Ikru polažu na vodene biljke. Plodnost ženki varira od 25.000 do preko 1.000.000 zrna ikre (Marković, 2010).

Ekološke valence većine faktora kod šarana su vrlo široke i ova riba je karakteristična po tome što je vrlo izdržljiva i veoma dobro podnosi promene u spoljašnjoj sredini. Kao i sve vrste iz familije Cyprinidae i šaran spada u toplovodne vrste riba. Temperaturni opseg vode u kojoj odrasli šaran može da preživi iznosi od 1 do 38 °C (Opuszyński i sar., 1989), a u literaturi se mogu naći podaci da larve imaju najbolji prirast na temperaturi vode od 27 °C (Goolish i Adelman, 1984; Korwin-Kossakowski, 2008). Pored ove činjenice, interesantno je da šaran može da živi u uslovima hipoksije, kada je količina rastvorenog kiseonika u vodi manja od 1 mg O₂/L. Vrsta srodna šaranu - karaš (*Carassius carassius* Linnaeus, 1758), može da preživi i u uslovima potpune anoksije (Johnston, 1975) i prilagođava joj se tako što menja metaboličke puteve i kao krajnji produkt proizvodi etanol i laktat (Johnstone i Bernard, 1983). Šaran ne koristi ovaj metabolički put, ali se na drugi način prilagođava hipoksiji (Zhou i sar., 2000). Karakteristika šarana da dobro podnosi uslove produžene hipoksije mu daje mogućnost da preživi zimu u jezerima pod ledom na veoma niskim temperaturama i sa niskim koncentracijama kiseonika rastvorenog u vodi. Pored širokih raspona temperature i rastvorenog kiseonika u vodi koje šaran može da podnese, ova vrsta se veoma dobro nosi i sa ekstremnim nivoima pH, pa je opseg pH koje šaran toleriše od 5 do 9. I pored toga što šaran ima tako široku ekološku valencu za mnoštvo faktora, ova vrsta se nalazi na IUCN-ovoj crvenoj listi, i svrstana je u takson: VU - ranjiv (engl. vulnerable)(IUCN, 2008).



Slika 1. Šaran, spoljašnji izgled; slika preuzeta sa sajta www.angeln.de

Delovanje šarana na prirodne i ribnjačke vodene ekosisteme je raznovrsno i najčešće se svodi na sledeće:

- smanjuje providnost vode (Pinto i sar., 2005);
- utiče na makrofite uglavnom tako što čupa biljke iz podloge ili ih mehanički oštećuje dok traga za hranom (Hinojosa-Garro i Zambrano, 2004; Miller i Crowl, 2006);
- utiče na kvalitet vodene sredine i smanjuje brojnost faune invertebrata kojima se hrani (Zambrano i sar., 2001);
- resuspenduje sitne čestice sa dna i tako nutrijente koji bi inače ostali na dnu vraća u ekosistem (Zambrano i sar., 2001).

Postoje dve podvrste šarana čije su postojanje populacioni genetičari utvrdili 90-ih godina XX veka: *Cyprinus carpio carpio* (koja živi u Evropi) i *Cyprinus carpio haematopterus* (koja živi u Aziji) (Balon, 1995). Ove podvrste su potom potvrđene metodama molekularne biologije: analizom alozima i mikrosatelita i markerima za mitohondrijalnu DNK (Kohlmann i sar., 2003; Vandeputte, 2003; Kohlmann i sar., 2005). U daljem tekstu kao i u celoj tezi će biti isključivo reč o evropskoj podvrsti šarana, *Cyprinus carpio carpio*.

1.2. Akvakultura šarana

Šaran predstavlja jednu od najznačajnijih gajenih vrsta riba na planeti. Ova riba je počela da se domestifikuje i gaji još u doba Kineskog i Rimskog carstva, ali se još uvek vode polemike gde i kada se to tačno desilo (Balon, 1995). Statistički gledano, to je riba koja je treća po proizvodnji na svetu sa ukupnom količinom od 3.4 miliona proizvedenih tona godišnje (FAO, 2010). Ukoliko se proizvodnja rasčlani po kontinentima, najveća količina se proizvede u Aziji (3.1 miliona tona), a znatno manje u Evropi (184.000 tona). Ostali kontinenti proizvode manje od 100.000 tona šarana godišnje. Zemlje koje su najveći proizvođači gajenog šarana u Evropi prikazane su u **tabeli 1**. Primetno je da prednjače zemlje Istočne Evrope, iako je nakon političkih i ekonomskih promena početkom 90-ih godina XX veka, u ovim zemljama značajno opala proizvodnja ribe (Bekefi i Varadi, 2007). U centralnoj i istočnoj Evropi proizvodnja riba iz familije Cyprinidae čini više od 80%

od ukupne proizvodnje u akvakulturi, i to ako se uzmu u obzir i slatkovodne i morske vrste riba (FAO, 2007).

Tabela 1. Godišnja proizvodnja gajenog šarana u Evropi (FAO, 2010)

Zemlja	Količina (t)
Rusija	60.229
Republika Češka	20.907
Ukrajina	20.045
Poljska	15.433
Mađarska	13.174
Belorusija	12.876
Srbija	10.601
Nemačka	9.711
Moldavija	3.638
Rumunija	2.994

U srpskoj akvakulturi, šaran predstavlja vrstu koja dominira i sa 10.000 t godišnje čini 70% od ukupne riblje proizvodnje u 2010. godini (Marković i sar., 2010). Ukoliko u obzir uzmemo da se u šaranskim ribnjacima u polikulturi sa šaranom gaje i beli amur (*Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844)), beli tolstolobik (*Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes, 1844)), sivi tolstolobik (*Hypophthalmichthys nobilis* (J. Richardson, 1845)), som (*Silurus glanis* Linnaeus, 1758) i smuđ (*Sander lucioperca* Linnaeus, 1758), prinosi po ribnjacima idu do 13.000 t godišnje. Šaranski ribnjaci zauzimaju površinu od 14.000 ha u Srbiji.

Šaran koji se gaji u ribnjacima je domestifikovana vrsta i od divljeg šarana se razlikuje po spoljašnjoj morfologiji, brzini rasta i boljem iskorišćavanju hrane (Bogut i sar., 2006). Tokom viševjekovne selekcije gajenih šarana u ribnjacima, težilo se dobijanju riba sa: brzim tempom rasta, kasnijim polnim sazrevanjem, otpornošću na nepovoljne uslove sredine i bolesti. Prvi pokušaji domestifikacije šarana su zabeleženi tokom XIII veka u srednjovekovnim manastirima (Balon, 2004). Tada je divlji šaran, poreklom iz Dunava, smešten u zemljana jezera i kada

je gajenje i domestifikacija počela, fenotipske karakteristike su polako krenule da se gube. Oblik tela je iz izduženog, vretenastog prešao u oblik karakterističan za gajenog šarana: sa lateralno spljoštenim telom i izraženom grbom. Vrlo brzo su ove gajene varijante počele da gube krljušt i to je poslužilo kao osnov za veštačku selekciju. Danas kod gajenog šarana postoje četiri tipa, čija je podela napravljena na osnovu prisustva krljušti (Kirpitchnikov, 1999):

- šupner (šaran sa krljuštima), čije je celo telo prekriveno krljuštima;
- špigler (maloljuskavi), sa krljuštima u osnovi repa i duž leđa;
- cajler (veleljuskavi), sa krljuštima duž bočne linije, a često i duž leđa i u osnovi peraja;
- lederer (šaran bez krljušti), na kome ili nisu prisutne krljušti ili su prisutne pojedinačno na nekim delovima tela.

Pored oblika tela i krljušti, domestifikovani šaran je promenio boju tela, a možda najvažnija fenotipska karakteristika predstavlja povećanje usta i mogućnost usvajanja semena biljaka i žitarica, kojima je ova riba veštački hranjena. Pored fenotipskih karakteristika, promenila se i fiziologija ovih životinja kod gajenih formi. Crevo kod gajenih vrsta je duže u proseku za 15-25% u odnosu na divljeg šarana (Balon, 2004). Divlji tip šarana je imao više eritrocita, hemoglobina i viši nivo proteina u plazmi, dok su razlike nađene i kod linija sa različitim prisustvom krljušti (Svobodová i sar., 2008). Pored ovih karakteristika, divlji tip šarana ima više glikogena u jetri, a mišići su bolje vaskularizovani i ne zamaraju se tako brzo kao kod domestifikovanog tipa (Balon, 2004). Danas u Evropi postoji veliki broj linija šarana, kao što su npr.: TATA (Mađarska), Dor-70 (Izrael), Ropsha (Rusija), Pohorelice (Češka Republika), Zator (Poljska), Badajoz (Španija), Glinzig (Nemačka) i druge (Kirpitchnikov, 1999).

Šaran se u celom svetu najčešće gaji u zemljanim jezerima, s obzirom na to da je ovaj oblik proizvodnje najisplativiji i donosi najveće prihode. Ova jezera mogu imati različite dimenzije, od relativno malih (nekoliko ari) do više stotina hektara. S obzirom na to da ribnjačka jezera najčešće predstavljaju veštačke

ekosisteme, agroekosisteme, ona zavise od ljudske aktivnosti i u današnje vreme se teži da budu održiva, a da prilaz upravljanju bude ekosistemski (Costa-Pierce, 2003).

U zavisnosti od načina ishrane, primene ihtioloških i agrotehničkih mera razlikuju se tri sistema gajenja šarana (Marković i Mitrović-Tutundžić, 2003):

- Ekstenzivni, koji podrazumeva gajenje šarana bazirano na prirodnoj hrani, zooplanktonu i fauni dna. U Anglo-Saksonskoj literaturi, ovaj sistem se još i naziva: “nasadi i zaboravi” (engl. stock and forget)(Wickins i Lee, 2002); Ovaj način gajenja je bio veoma zastupljen u Evropi u prošlosti i tradicionalan je za zemlje Zapadne Evrope (Kestemont, 1995), a u Srbiji je sporadičan (Marković i sar., 2010);
- Poluintenzivni sistem se bazira na obezbeđivanju proteinske komponente hrane za šarana na račun prirodne hrane, dok se energetske potrebe zadovoljavaju korišćenjem dodatne hrane, obično u obliku ugljenih hidrata. Od agrotehničkih mera se primenjuje dodavanje kalcijum-karbonata. Ovaj oblik gajenja predstavlja dominantan oblik proizvodnje u svetu i procenat njegove zastupljenost je 70% (Tacon i De Silva, 1997), a u Srbiji taj procenat iznosi 95% (Marković i sar., 2010). Izuzetno je važna i vrsta hrane koja se dodaje na ovim ribnjacima, jer njeno poreklo, sastav i način obrade predstavljaju najbitniji faktor za dobar prirast na šaranskom ribnjaku.
- Intenzivni sistem podrazumeva veliki broj riba na malom prostoru sa baziranjem ishrane isključivo na dodatoj hrani. Šaran se u ovom sistemu gaji u mrestilištima, kavezima i protočnim betonskim bazenima (Kestemont, 1995). Ovaj sistem je veoma retko zastupljen u zemljanim bazenima, jer je potrebna dodatna aeracija i konstantan protok vode (Marković, 2010).

1.3. Ishrana šarana

S obzirom na to da se digestivni sistem kod šarana i riba iz porodice Cyprinidae razlikuje od većine kičmenjaka po tome što ne poseduje želudac, samim tim je i fiziologija varenja i usvajanja hranljivih materija drugačija.

Šaran spada u omnivorne vrste, međutim on se hrani različitim tipovima hrane u zavisnosti od uzrasta. U prvih pet dana nakon izvaljivanja iz jajeta, larve poseduju žumančetu kesu i hrane se na račun supstanci uskladištenih u njoj. Nakon toga, mlađ šarana se hrani zooplanktonom, najčešće organizmima iz filuma Rotifera i podklase Copepoda, a kasnije šaran počinje da se hrani organizmima bentosa, puževima, školjkama i drugim mekušcima, insektima, makrofitama, algama, semenjem biljaka, detritusom i drugim organskim materijalom, pa čak i ponekom manjom ribom i žabom (García-Berthou, 2001; Ichinose i sar., 2002; Takeuchi i sar., 2002).

Iako u svetu dominira poluintenzivni sistem gajenja šarana, procena je da se za oko 80% proizvedenog šarana ne koristi moderna, kompletna hrana (Naylor i sar., 2000). U današnje vreme, jedan od najvećih problema u industriji hrane za ribe jeste nestašica ribljeg brašna, koje je osnovni izvor proteina i traženje alternativnog izvora za zadovoljavanje energetske potrebe (Gatlin i sar., 2007; Tacon i Metian, 2008). Šaran je omnivorna vrsta i samim tim i kompletna hrana, kojom se on hrani, sadrži viši nivo ugljenih hidrata.

Kada se prave formulacije hrane, osim minimalnih zahteva koje vrsta ima za hranom (NRC, 1993) proizvođači najviše vode računa o dostupnosti određenih sastojaka i finansijskoj održivosti. Tokom 80-ih godina XX veka je procenjeno da je učešće proteina koji se preporučuje za ishranu šarana u akvakulturi 35% (Watanabe i sar., 1987; Takeuchi i sar., 1989; Lovell, 1991). Međutim, ukoliko se šaran gaji u poluintenzivnoj akvakulturi, on se hrani i sa prirodnom hranom koja je prisutna u jezerima, pa nivo proteina u hrani ne mora da pređe 25%. U isto vreme je ustanovljeno da je gornja granica sadržaja masti u hrani 12% (Kaushik, 1995). Od tada se često, umesto višeg nivoa proteina ili masti u hranu za šarana dodaje visok procenat ugljenih hidrata. Ugljeni hidrati predstavljaju jeftin izvor energije, zadovoljavaju potrebe šarana za energijom iz hrane, a pored toga povećavaju iskoristljivost drugih nutrijenata, kao što su proteini (Degani i sar., 1997). Šaran nema sposobnost da vari celulozu (Kaushik, 1995), ali su u poslednje vreme iz digestivnog trakta šarana izolovani pojedini sojevi mikroorganizama koji mogu da je vare (Bairagi i sar., 2002), mada se aktivnost celulaze u crevima pokazala kao

beznačajna (Stone, 2003).

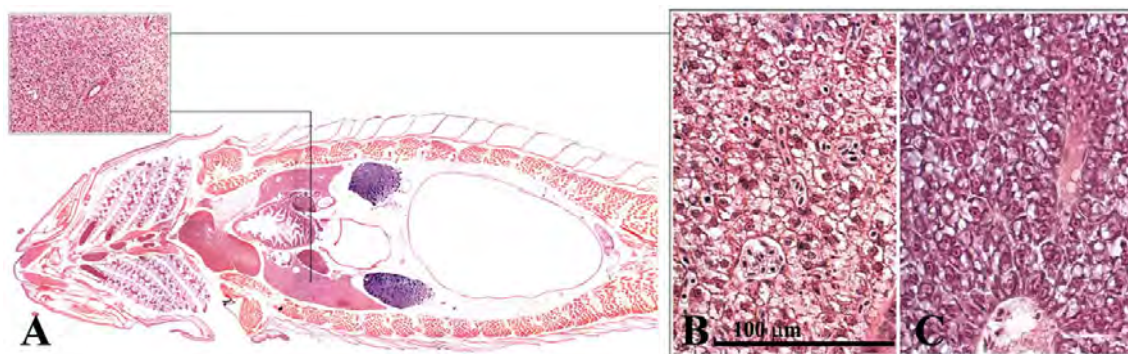
Svarljivost ugljenih hidrata je kod šarana veoma visoka, i to omogućava adekvatnu iskoristljivost skroba iz hrane (Kaushik, 1995). Standardna upotreba hrane u vidu peleta se na šaranskim ribnjacima koristi dugi niz godina, ali je u poslednje vreme, u upotrebu ušla i ekstrudirana hrana. U Srbiji se ova hrana koristi na više od 50% ribnjaka (Marković i sar., 2010). Ekstrudirana hrana poseduje niz pozitivnih osobina u odnosu na peletiranu, i one su: želatinizacija skroba i njegova lakša iskoristljivost (Case i sar., 1992) i poboljšane fizičke osobine pelete: čvrstoća, gustina, tonjenje, sporije raspadanje u vodi (Sørensen, 2012). Želatinizacija skroba je svakako najznačajnija promena u sastojcima hrane koja se dešava tokom ekstrudiranja (Luquet i sar., 1976). Ona omogućava značajno bolju svarljivost i to ne samo ugljenih hidrata, već i proteina i lipida u hrani (Venou i sar., 2003). To je potvrđeno i u eksperimentima sa ishranom šarana, gde je pokazano da je dostupnost i iskoristljivost ugljenih hidrata poboljšana ukoliko je hrana ekstrudirana (Takeuchi i sar., 1990).

1.4. Anatomija i histologija jetre kod riba

Jetra predstavlja najveću žlezdu kod kičmenjaka. Ona spada u mešovite žlezde, zato što ima dve uloge, jednu endokrinu, a drugu egzokrinu (Poleksić i sar., 2003). Endokrina funkcija predstavlja razlaganje glikogena i sekrecija glukoze direktno u krv, preko sinusoidnih kapilara, dok egzokrina funkcija predstavlja lučenje žuči u lumen creva. Uloga jetre je složenija od same sinteze i razlaganja glikogena, jer jetra služi za skladištenje, biotransformaciju i redistribuciju nutrijenata i drugih molekula unetih preko gastrointestinalnog trakta u organizam ribe preko portalne vene. Osim toga, jetra luči hormon somatomedin C (insulin-like growth factor 1) i ispušta ga u krv, a iz krvi uklanja hormone koji cirkulišu (Duan, 1998; Mancera i McCormick, 1998), luči i ispušta u krv albumine, kao i holesterol i lipide (Hinton i sar., 2001). Važna uloga jetre je sinteza vitelogenina, proteina koji je osnova žumanceta koji se ugrađuje u jajne ćelije, kao i horiogenina (Hong i sar., 2009; Rani i sar., 2010). Pored ove dve glavne funkcije jetre, ona ima ulogu i biotransformaciji ksenobiotika (Hinton i sar., 2001). Ove funkcije jetre su prisutne kod svih klasa kičmenjaka.

Jetra riba je relativno čvrst organ, obavijena je seroznom membranom i nalazi se u ventralnom delu tela u abdominalnoj duplji (**Slika 2A**). Ukoliko se posmatra morfologija jetre, pojedini autori tvrde da makroskopski ne postoje režnjevi kao kod jetre sisara (Hinton i sar., 2001). Nasuprot tome, neki autori tvrde da postoje režnjevi jetre i kod riba, npr. da jetra zebrice (*Danio rerio* (F. Hamilton, 1822)) ima tri režnja (Yao i sar., 2012), a jetra šarana 7 režnjeva (Marković, 2010). Boja jetre može da varira od svetlo braon do tamno crvene, u zavisnosti od količine masti i glikogena u njoj, pa do izuzetno blede ili zelene u patološkim stanjima (Zhang i sar., 2007; Sun i Tsai, 2009). Kod šarana je jetrino tkivo prošarano sa pankreasnim i čini strukturu koja se naziva hepatopankreas.

Mikrostruktura jetre pokazuje razlike između riba i sisara (Hinton i Couch, 1998): kod riba ne postoje jetrini režnjići koji su karakteristični za jetru kod sisara, kao ni hepatociti organizovani u nizove, tzv. Remakove gredice. Takashima i Hibiya (1995) tvrde da u zavisnosti od vrste, riba može imati strukture koje nalikuju režnjićima, ali su generalno nejasne. Samim tim ne postoje ni interlobularne vezivne septe i generalno u jetri riba ne postoji velika količina vezivnog tkiva. Vaskularni elementi kod riba: vene, arterije i žučni kanali su razbacani po jetri bez određenog reda (Rocha i sar., 1994) što je razlika u odnosu na sisarsku jetru gde postoji portobilijarni prostor sa portalnim trijadama, koju čine interhepatična vena, arterija i žučni kanalić i koji se uvek nalaze zajedno (Junqueira i Carneiro, 2001) Ponegde se u jetri mogu uočiti veći žučni kanali i hepatične arterije koji su povezani, ali se u toj strukturi najčešće ne nalazi i hepatična vena, a čak i ako se primeti njeno prisustvo, to je verovatno rezultat slučajnosti (Rocha i sar., 1994). U jetru ulaze portalna vena i hepatična arterija, iako neki autori smatraju da hepatična arterija ne postoji (Yao i sar., 2012). Portalna vena sprovodi krv iz creva, koja je bogata nutrijentima i ona prvo prolazi kroz jetru gde eventualne toksične materije koje se nalaze u krvi podležu biotransformaciji (Kleinow i sar., 1987). Po ulasku u jetru, portalna vena se grana na krvne sudove sve manjeg promera, do sinusoidnih kapilara. Sinusoidni kapilari su širi od klasičnih kapilara i oko njih se nalaze fenestrirani endotel (Yao i sar., 2012). Između ćelija endotela i hepatocita se nalazi perisinusoidni (Diseov) prostor koji sadrži stelatne ćelije (Ito-ove ćelije).



Slika 2. A) prikaz položaja jetre u odnosu na telo zebrice; B) hepatociti u jetri mužjaka; C) hepatociti u jetri ženke; preuzeto iz Menke i sar. (2011)

Žučni kanalići sprovode žuč koja se luči u hepatocitima preko većih žučnih kanala (nastaju spajanjem žučnih kanalića) do žučne kese (Grizzle i Rogers, 1976). Žučni kanalići najčešće nisu vidljivi na svetlosnom mikroskopu, dok se na površini žučnih kanala nalazi jednoslojni niskoprizmatični epitel, a ispod njega vezivno tkivo (Takashima i Hibiya, 1995).

Kupferove ćelije nisu prisutne u jetri kod riba, a jedini izuzetak je familija Ictaluridae (Hinton i Pool, 1976). U jetri riba su prisutni makrofagni centri ili češće melano-makrofagni centri koji donekle preuzimaju ulogu Kupferovih ćelija i pored uloge koju imaju u retikulo-endotelnom sistemu imaju i funkciju u skladištenju fosfolipida i gvožđa nastalih nakon eritrofagocitoze, bakterijskih i parazitskih spora, ostataka oštećenih ćelija i ćelijskog debrisa (Agius i Roberts, 2003). Pored uloge u skladištenju, one neutrališu toksične slobodne radikale i katjone nastale lipidnom peroksidacijom. Melanomakrofagni centri se nalaze u parenhimu jetre i njihov broj i veličina zavise od vrste, starosti i zdravstvenog statusa ribe (Agius i Roberts, 2003). Obično su prisutni u blizini hepatičnih arterija, portalnih vena ili žučnih kanalića i sadrže različite tipove pigmenta (Fournie i sar., 2001). Jetra se kod riba razlikuje i u sekreciji vitelogenina kod mužjaka i ženki (**Slika 2B i 2C**). Jetre koje aktivno sekretuju vitelogenin poseduju bazofilne hepatocite sa povećanom količinom masti u njima (Wester i Canton, 1986).

Jetrine ćelije ili hepatociti su ubedljivo najbrojnije ćelije u jetri riba. One su odgovorne za većinu funkcija koju jetra obavlja. Njihov broj čini 87% ukupnog volumena jetre kod potočne pastrmke (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), a procenat

parenhima u istoj studiji iznosi 95% (Rocha i sar., 1997). Slični rezultati su dobijeni ne samo u drugim stereološkim studijama na ribama (90-96%), već i kod pacova (96%)(Weibel i sar., 1969).

Hepatociti su ćelije poligonalnog oblika (najčešće heksagonalnog), boje se slabo bazofilno, za razliku od sisarskih hepatocita, sa malim brojem organela. Njihov oblik, raspored i ultrastruktura varira u zavisnosti od vrste, uzrasta ribe, pola, doba godine, nutritivnog statusa i drugih faktora (Takashima i Hibiya, 1995). Hepatocit tipičnog izgleda za ribe poseduje jedro, sa varijabilnom količinom heterohromatina koji je razbacan po jedru i jedno, krupno jedarce. Jedrova membrana je obično glatka sa većim brojem pora. S obzirom na visoku aktivnost hepatocita, ove ćelije su bogate granularnim endoplazmatičnim retikulumom. Cisterne granularnog endoplazmatičnog retikuluma se ne nalaze na nekom specifičnom mestu u ćeliji i mogu se videti u blizini jedra ili paralelno sa ćelijskom membranom. Agranularni endoplazmatični retikulum se u ćeliji nalazi u maloj količini ili je čak i potpuno odsutan. Ukoliko se može uočiti u ćeliji, ova organela je najčešće pozicionirana u blizini Goldžijevog aparata. Ukoliko je Goldžijev aparat u blizini jedra, on je obično neaktivan, sa malim brojem vezikula, a ukoliko se nalazi u blizini ćelijske membrane, obično su vezikule brojne i smatra se da je aktivan. Mitohondrije su brojne i najčešće pozicionirane u blizini granularnog endoplazmatičnog retikuluma, mada se mogu naći bilo gde u citoplazmi, ali retko u rezervama glikogena. U blizini granularnog endoplazmatičnog retikuluma se mogu naći i lizozomi i peroksizomi. Braunbeck i sar. (1992) navode da hepatociti riba imaju izraženu kompartmentaciju citoplazme i da se razlikuju perinuklearni region u kome su pozicionirani granularni endoplazmatični retikulum, mitohondrije i peroksizomi i periferna zona, koja predstavlja mesto gde se gomilaju rezerve glikogena i lipida. Slična ultrastruktura hepatocita je opisana kod različitih vrsta riba (Storch i sar., 1983; Braunbeck i sar., 1992; Takashima i Hibiya, 1995; Hugla i Thomé, 1999; Grund i sar., 2010; Yao i sar., 2012).

Dve supstance koje se skladište u hepatocitima su glikogen i u manjoj meri lipidi. Partikule glikogena su ili razbacane po citoplazmi ili koncentrisane na jednom mestu u ćeliji. U jetri riba se može razlikovati α - i β -glikogen. α -glikogen se

nalazi u obliku rozeta, dok su partikule β -glikogena obično pojedinačne u ćelijama. U jetri riba se mogu razlikovati dva tipa hepatocita, u zavisnosti od količine glikogena u njima. Prvi tip predstavljaju gore opisani hepatociti. Drugi tip hepatocita su tzv. "svetle ćelije" (engl. pale cells) koje se razlikuju od običnih hepatocita po većoj količini β -glikogena. Ove ćelije su opisane kod atlantskog lososa (*Salmo salar* Linnaeus, 1758)(Speilberg i sar., 1994), potočne pastrmke (Rocha i sar., 1996) i šarana (Fishelson i Becker, 2001). Obično se nalaze u grupicama od 2-3 ćelije na ivicama sinusoida i imaju sličnu unutrašnju organizaciju i granulaciju, a razlikuju se po morfologiji jedra i boji citoplazme. Jedro je kod svetlih hepatocita nepravilnog oblika i liči na jedro makrofaga ili retikulocita. Akumulacija lipidnih kapljica u hepatocitima nije pravilo, može se naći kod riba koje žive u prirodnim uslovima, ali je ona intenzivna kod riba gajenih u akvakulturi što može da ukazuje na neadekvatnost kompletnih, komercijalnih hrana (Takashima i Hibiya, 1995).

Kod nekih vrsta riba pankreasno tkivo je odvojeno u zasebnu žlezdu (npr. dužičasta pastrmka (*Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792)) ili je jednostavno rasuto duž intestinalnog trakta (npr. zebrića), ali se kod nekih grupa riba pankreas nalazi u jetri i zajedno čine hepatopankreas, što je slučaj kod šarana. Tu se pankreas nalazi difuzno raspoređen kroz jetru i obično se uočava oko većih krvnih sudova (Takashima i Hibiya, 1995). Morfologija egzokrinog pankreasa je vrlo slična onoj kod sisara. Osnovna jedinica građe je acinus i čine je ćelije sa veoma tamnom, bazofilnom citoplazmom, koje se nazivaju acinusne ćelije i imaju prizmatičan oblik (Roberts, 1989). Kod riba koje se aktivno hrane u ćelijama se uočavaju svetle, eozinofilne, sekretorne granule, koje se još nazivaju i zimogene granule. One su prekursori digestivnih enzima koje egzogeni pankreas luči u lumen creva: amilaze, pankreatične lipaze, tripsinogen i himotripsinogen (Kolkovski, 2001). Ultrastrukturno se ćelije pankreasa odlikuju dobro razvijenim granularnim endoplazmatičnim retikulumom koji se obično nalazi u dve forme: u vidu paralelno naslaganih lamela ili difuzno raspoređen po citoplazmi (Takashima i Hibiya, 1995). Cisterne granularnog endoplazmatičnog retikuluma, kao i diktiozomi Goldžijevog aparata su obično proširene. Apikalne diferencijacije acinusnih ćelija obuhvataju

mikrovile. Endokrini pankreas čine Langerhansova ostrvca ili Brukmanovo telo, koji su razbacani po egzokrinom pankreasu. Njega čine A-ćelije koje proizvode glukagon-like peptid (GLP-1), B-ćelije koje sintetiziraju insulin i D-ćelije koje luče somatostatin (Menke i sar., 2011).

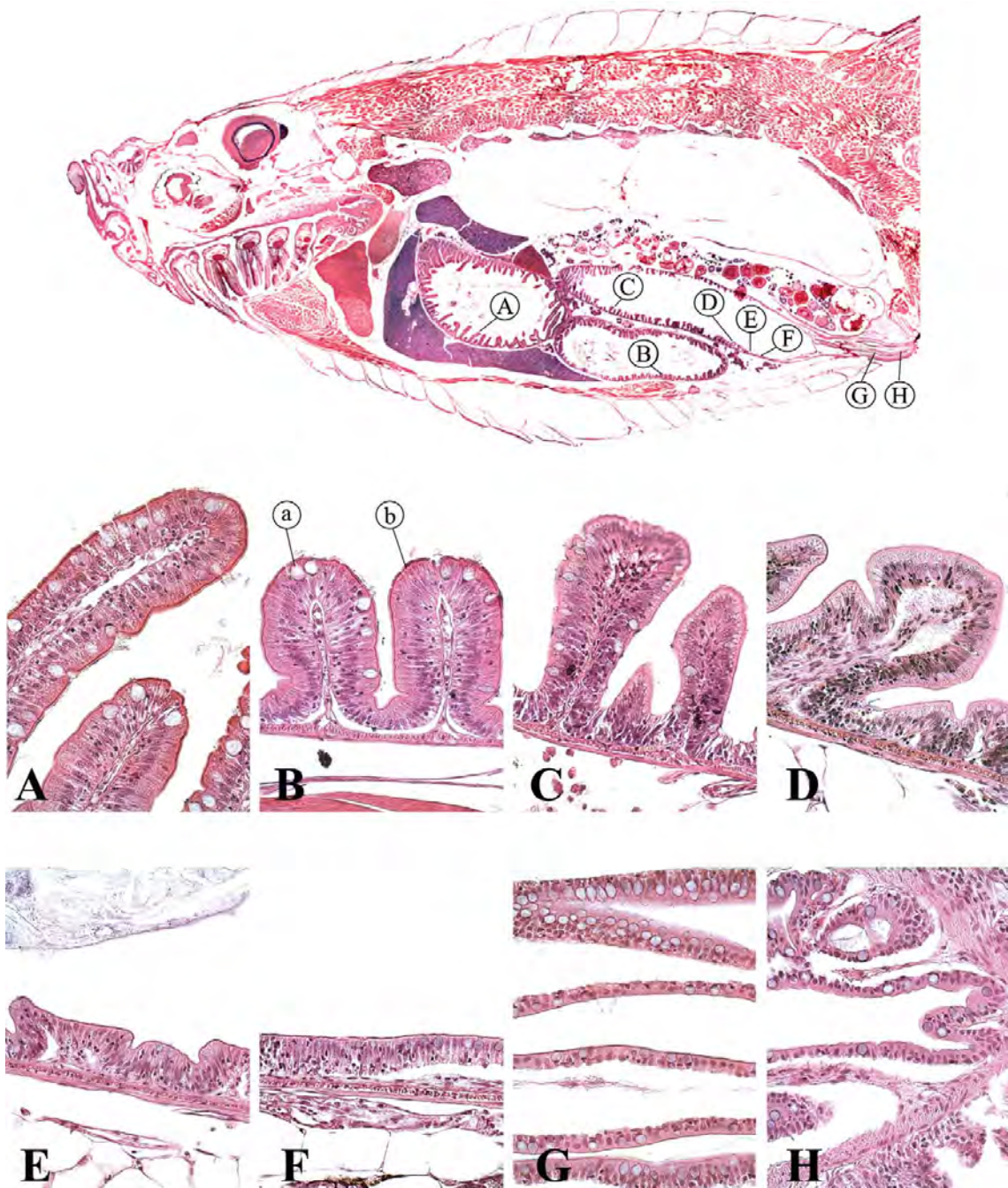
1.5. Anatomija i histologija distalnog dela creva kod riba

Digestivni trakt riba pokazuje izuzetno variranje, u zavisnosti od vrste ribe i načina ishrane (Evans i Claiborne, 2006). Specifičnost digestivnog trakta šarana je što, kao i kod velike većine riba iz porodice Cyprinidae, želudac ne postoji (Genten i sar., 2009). Samim tim nema kisele reakcije u crevima kod šarana, pa tako kompletan digestivni trakt pokazuje neutralnu ili blago baznu reakciju (Al-Hussaini, 1949). Kao što je slučaj i kod sisara, i kod riba karnivorne vrste imaju značajno kraće crevo od herbivornih vrsta, kod kojih je crevo dodatno izuvijano, ali kod šarana ne postoji *pyloric caeca*, karakterističan za neke vrste riba. Pored toga, za crevo riba su karakteristični crevni nabori, a ne *villi intestinales*, koji ne postoje ni kod jedne vrste riba (Ferguson, 1989). Isto tako ne postoji histološka diferencijacija prednjeg i zadnjeg dela creva, kao što je slučaj sa sisarima, već samo funkcionalna diferencijacija i shodno tome, često se navodi postojanje prvog, drugog i trećeg segmenta creva (Ferguson, 1989). Rombout i sar. (2011) u svom revijalnom radu to potvrđuju i generalno dele crevo riba na:

- prvi segment (60-75% ukupne dužine creva) u kome enterociti imaju ulogu u apsorpciji i koji usvajaju amino kiseline i lipide iz hrane (Tocher, 2003);
- drugi segment (15-30% ukupne dužine creva). U ovom segmentu se manje usvajaju proteini, ali je prisutno usvajanje makromolekula iz hrane i to je dokazano u eksperimentima, gde se potvrdilo da se usvajaju HRP (engl. horseradish peroxidase) i feritin (Rombout i sar., 1985). Pored toga, enterociti se karakterišu krupnim supranuklearnim vakuolama i visokom pinocitotskom aktivnošću;
- treći segment (poslednjih 5-15% ukupne dužine creva), u kome enterociti imaju osmoregulatornu aktivnost (Evans i Claiborne, 2006). Osmoregulatorna aktivnost enterocita se potvrđuje izuzetno kratkim

mikrovilima na enterocitima u ovom delu creva, gde ne postoji usvajanje nutrijenata, ili je ono minorno. Stoga se ovaj deo creva obično zanemaruje i kada se govori o zadnjem ili distalnom delu creva, misli se na drugi segment (Rombout i sar., 2011), koji je predmet ispitivanja i u ovom radu.

Histološka građa creva kod riba je slična građi creva kod sisara (**Slika 3**).



Slika 3. A-H Različiti delovi creva i njihova histološka građa kod zebrike: a - mukozne ćelije; b - enterociti; preuzeto iz Menke i sar. (2011)

Sva četiri histološka omotača creva postoje, ali su razvijeni manje ili više, u zavisnosti od vrste ribe i dela creva. U daljem tekstu će biti dat detaljan histološki opis distalnog dela creva (Genten i sar., 2009):

Prvi omotač (sluzokoža ili *tunica mucosa*) čini *lamina epithelialis* i *lamina propria*. *Lamina epithelialis* obuhvata jednoslojni visokoprizmatični epitel, koji na svojoj površini ima dobro razvijene mikrovile, i mukozne ćelije. Epitelne ćelije imaju funkciju i u apsorpciji i u sekreciji (Fontagné i sar., 1998). Mukozne ćelije luče mukus koji se sastoji od vode i glikoproteina velike molekulske težine (Schroers i sar., 2009). *Lamina propria* se sastoji od rastresitog vezivnog tkiva i karakteristična je po velikom broju eozinofilnih granulocita (EG) koje se mogu uočiti u njoj. EG sadrže antimikrobijalne peptide i mogu se uočiti i u degranulisanoj formi. U degranulisanoj formi utiču na adheziju neutrofila i na ovaj način potvrđuju svoju ulogu u urođenom imunitetu i inflamaciji (Reite, 1998). Treći sloj karakterističan za prvi histološki omotač kod sisara - *lamina muscularis*, nije uvek prisutan u distalnom delu creva riba, kod šarana se ne uočava. Drugi omotač je podsluzokoža (lat. *tunica submucosa*) koji se histološki ne razlikuje od *lamina propria*, pa je nekada i nemoguće napraviti razliku između prva dva omotača kod šarana. Jedina histološka razlika između ova dva sloja je povremeno prisustvo većih krvnih sudova u *tunica submucosa*, koji se ne uočavaju u *lamina propria*. Treći omotač je mišićni omotač (*tunica muscularis*) i on je podeljen na dva sloja: *stratum circulare* i *stratum longitudinale*, koji su kod riba dobro razvijeni da bi omogućili peristaltičku aktivnost. Prvi sloj je sloj kružno raspoređenih glatkih mišića, a drugi sloj je sloj longitudinalno raspoređenih glatkih mišića. Poslednji omotač je *tunica serosa* i predstavlja zaštitni omotač. Sastavljena je od ćelija mezotela. Ono što razlikuje histologiju creva od istog kod sisara je odsustvo Brunerovih žlezda (Krause, 2000), kao i Liberkinijevih žlezda i kripta. Međutim, slične žlezde jesu uočene kod riba iz reda Gadiformes (Chatchavalvanich i sar., 2006; Genten i sar., 2009), ali kod šarana njihovo prisustvo nije potvrđeno.

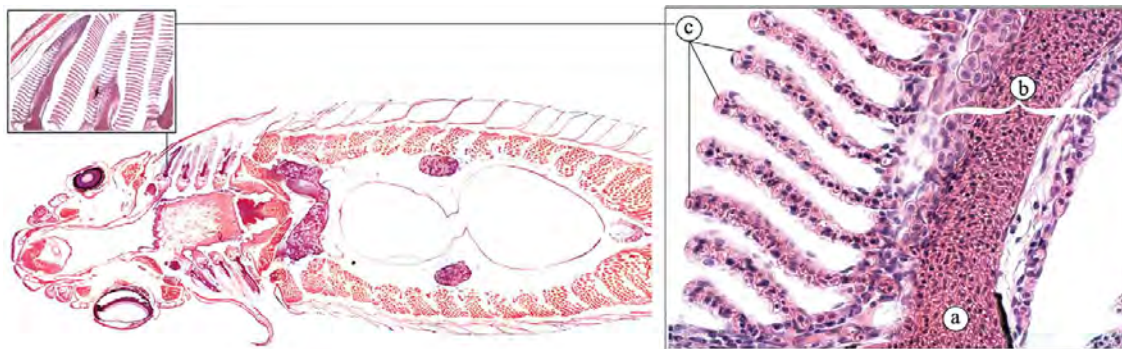
1.6. Anatomija i histologija škrge kod riba

Škrge riba su prvi organ za razmenu gasova koji je evoluirao kod

kičmenjaka i jako su bitne za razvoj veoma kompleksne vaskularne mreže, okružene epitelom koja predstavlja granicu između krvi i vodene sredine. Pored respiracije, njihova funkcija je u regulaciji pH vrednosti u krvi ribe (Marshall, 2002), eliminaciji azotnih jedinjenja iz tela ribe (Wilkie, 2002), regulaciji osmotske i jonske ravnoteže (Marshall, 2002), kao i kiselinsko-bazne ravnoteže (Claiborne i sar., 2002) između telesnih tečnosti ribe i spoljašnje sredine. Zapravo, škrge predstavljaju multifunkcionalni organ koji igra glavnu ulogu u nizu fizioloških odgovora na promene u unutrašnjoj i spoljašnjoj sredini. Uprkos činjenici da ribe poseduju bubreg, škrge su organ koji obavlja većinu funkcija koje kod kičmenjaka obavljaju pluća i bubrezi (Evans i sar., 2005).

Škrge su parni organi smešteni iza glave riba na lateralnim stranama tela, sa obe strane ždrelo, u škržnoj šupljini, zatvorene sa spoljašnje strane pokretnim škržnim poklopcima (operkulumima), koji osim što ograničavaju škržnu duplju, učestvuju i u procesima ventilacije škrge (Lagler i sar., 1977; Poleksić, 1991). Većina košljoriba poseduju pet pari škrge: četiri para holobranhija i jednu pseudobranhiju, čija uloga i funkcija nije razjašnjena do kraja (Bridges i sar., 1998) Svaka škrge se sastoji iz škržnog luka, primarnih lamela i sekundarnih lamela. Škržni luk predstavlja koštanu strukturu i sa elementima koje nosi čini holobranhiju, dok sa njihove konkavne strane polaze skeletni elementi, branhiospine, koje su obložene višeslojnim, mukoznim epitelom i gustatornim kvržicama (Vandewalle i sar., 2000). Holobranhije se sastoje od po dve hemibranhije. Hemibranhije predstavljaju niz dugih, tankih filamenata, škržnih listića koji se zovu i primarne lamele. One se protežu duž konveksne strane škržnog luka i poduprte su hrkavicom.

Sa primarnih lamela polaze brojne sekundarne lamele, kojima se povećava respiratorna površina (**Slika 4**). Smatra se da je respiratorna površina škrge veća za oko 50% u odnosu na ukupnu površinu kože kod riba (Wood, 2001). One polaze u nizovima sa obe strane primarne lamele i imaju oblik polumeseca. Debljine su od 10 do 25 μm (Wood, 2001) i predstavljaju terminalni nivo organizacije škržnog aparata. Sekundarne lamele čine glavnu respiratornu površinu škrge i one su funkcionalna jedinica građe respiratornog aparata.



Slika 4. Levo - prikaz položaja škrge u odnosu na telo zebrice; desno -histološka slika škrge: a - centralni venozni sinus; b - primarna lamela; c - sekundarne lamele; preuzeto iz Menke i sar. (2011)

S obzirom na to da se škržni aparat veoma razlikuje u zavisnosti od grupe riba, kao i u zavisnosti od toga da li ribe žive u slatkoj ili morskoj vodi, histologija u daljem opisu se odnosi na slatkovodne Teleostei, u koje spada šaran.

I primarne i sekundarne lamele su pokriveno epitelom i njegov naziv upravo i zavisi od toga koju lamelu prekriva (Takashima i Hibiya, 1995). Primarni epitel se sastoji od tri ili više slojeva i sačinjeni su od niskoprizmatičnih ćelija, dok se na površini pored niskoprizmatičnih mogu naći i pločaste ćelije (Wilson i Laurent, 2002). Uz bazalnu laminu se nalazi bazalni sloj ćelija, koje su nediferencirane, služe kao progenitorske ćelije i imaju visoke vrednosti odnosa jedra i citoplazme. Ove ćelije su prisutne i u sekundarnom epitelu, međutim mitotska aktivnost ovih ćelija je mnogo veća u primarnom nego u sekundarnom epitelu (Laurent, 1984). U primarnom epitelu su prisutne i hloridne i mukozne ćelije, i one se po pravilu nalaze na površini primarnog epitela. Ispod primarnog epitela se nalazi hrskavičavo tkivo, kao i centralni venozni sud koji je deo arterijsko-venskog sistema prenosa krvi (Olson, 2002). Pored ovih struktura, ispod epidermisa se nalazi i sloj limfoidnog tkiva koji sadrži limfocite i EG.

Epitel koji se nalazi na sekundarnim lamelama u šrkama predstavlja jedinu granicu koja se nalazi između krvi i vode kod riba. Sastoji se od jednog ili dva sloja ćelija da bi bio što efikasniji, slično kao respiratorni epitel koji poseduju kopneni kičmenjaci (Maina, 2002). Pored toga što mu je osnovna funkcija u razmeni gasova, ovo tkivo ima ulogu i u fiziološkim procesima kod riba (Evans i sar., 2005).

Sekundarni škržni epitel se sastoji od više tipova ćelija, ali su dva osnovna tipa: pokrovne ćelije (čine oko 90% broja svih ćelija u sekundarnom epitelu) i hloridne ćelije (oko 9% od ukupnog broja ćelija u sekundarnom epitelu)(Evans i sar., 2005). U sekundarnim lamelama se ispod epitela nalaze kapilari u kojima se obavlja razmena gasova. Kapilare čine potporne ćelije (engl. pillar cells). One su modifikovane endotelne ćelije i karakteristične su za ribe (Wilson i Laurent, 2002). U pravilnim razmacima između potpornih ćelija su kapilari, lakune lamelnog krvnog kanala koji zauzimaju oko 70% ukupne zapremine sekundarne lamele i koji su deo arterijsko-arterijskog sistema prenosa krvi (Olson, 2002).

Epitelne ćelije su poligonalnog oblika, a apikalna površina je veoma velika. Osim razmene gasova, ove ćelije imaju i izvesnu ulogu u razmeni jona i održavanju kiselinsko-bazne ravnoteže kod riba (Perry, 1997). Na apikalnoj membrani ovih ćelija mogu da se uoče mikrovili i/ili mikroplike (Moron i Fernandes, 1996; Perry, 1997; Wilson i sar., 2002). Ove strukture najverovatnije povećavaju aktivnu površinu pri razmeni gasova i imaju ulogu u vezivanju sluzi za površinu ćelija. Najčešće, pokrovne ćelije nisu bogate mitohondrijama, ali imaju dobro razvijen Goldžijev aparat, granularni i glatki endoplazmatični retikulum i brojne vezikule i lizozome (Wilson i Laurent, 2002). Brojne vezikule su zapravo deo mnogobrojnih protonskih pumpi u epitelnim ćelijama i ova činjenica podržava hipotezu da epitelne ćelije imaju ulogu u unosu natrijumovih jona u ćeliju (Wilson i sar., 2000). Veze između epitelnih ćelija su čvrste i na ovaj način je epitel relativno neprohodan za jone, ali su epitelne i hloridne ćelije međusobno povezane dezmozomima (Bartels i Potter, 2004).

Nasuprot epitelnim, hloridne ćelije zauzimaju manju površinu škržnog epitela, ali imaju glavnu ulogu u aktivnim fiziološkim procesima koji se događaju u škragama (Perry, 1997; Evans i sar., 2005). U starijoj literaturi su nazivane hloridnim ćelijama zbog osobine da aktivno eliminišu hloridne jone iz spoljašnje sredine kod morskih vrsta riba, međutim u novijoj literaturi se koristi izraz "ćelije bogate mitohondrijama" (engl. mitochondria-rich cells)(Marshall, 2002). Zbog rogovatnog imena, u daljem tekstu će se ove ćelije i dalje nazivati hloridnim ćelijama. Osnovna karakteristika je, kao što im ime kaže, veoma velik broj

mitohondrija, kao i veoma bogat tubularni sistem. Čelijski tubularni sistem anastomozira i prepleten je sa mitohondrijama, dok Goldžijev aparat nije deo ovog sistema. Sam izgled i ultrastruktura ovih ćelija je u potpunosti zavisna od koncentracije jona u spoljašnjoj sredini i morfologija im varira u zavisnosti od toga da li riba živi u morskoj ili slatkoj vodi (Evans i sar., 2005). Fiziološka uloga im je u izlučivanju i apsorpciji soli, te predstavljaju ključnu strukturu u jonskoj izmeni kod košljoriba - učestvuju u pumpanju soli prema unutrašnjoj strani (apsorpcija) kod slatkovodnih riba, odnosno prema spoljašnjoj strani (ekskrecija) kod morskih (Evans i sar., 1999). Hloridne ćelije su u bliskoj vezi sa površinskim ćelijama primarnog epitela. Locirane su u interlamelarnom prostoru, gde su nepravilno raspoređene, a takođe se nalaze i u bazama primarnih lamela (Wilson i Laurent, 2002).

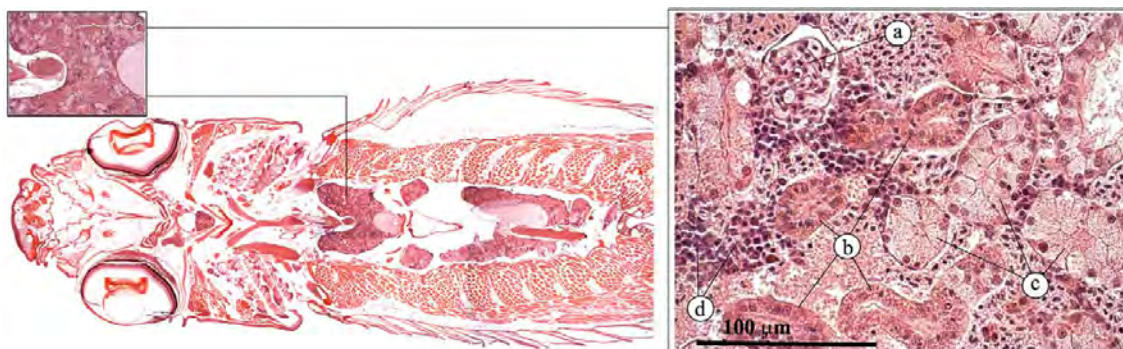
Iako su ova dva tipa ćelija najzastupljenija u škržnom tkivu, pored njih se mogu uočiti i mukozne i neuroepitelne ćelije. Mukozne ćelije su krupne i jajastog su oblika. Njihova osnovna funkcija je lučenje mukusa koji formira zaštitni sloj na površini epitelnog tkiva. Postoji pravilnost u njihovom broju u odnosu na deo primarne lamele: najbrojnije su u distalnom delu primarne lamele, manje su brojne u interlamelarnom prostoru, dok je najmanji broj mukoznih ćelija prisutan u proksimalnom delu primarne lamele (Wilson i Laurent, 2002). Mukusni sloj se karakteriše prisustvom neutralnih i kiselih mucina (Saboia-Moraes i sar., 1996). Neuroepitelne ćelije funkcionišu kao senzori rastvorenog kiseonika u vodi, a uključene su i u regulaciju toka krvi u škragama (Sundin i Nilsson, 2002).

1.7. Anatomija i histologija bubrega kod riba

Bubreg kod riba predstavlja multifunkcionalni organ, jer za razliku od bubrega kod sisara, osim ekskretorne ima ulogu u hematopoezi i u endokrinoj regulaciji organizma. Kao što je već navedeno, iako bubrezi slove za najznačajniji organ u ekskretornom sistemu kod životinja, kod riba tu funkciju uglavnom preuzimaju škrge (Evans i sar., 2005). Tako kod riba škrge kontrolišu većinu pulmonarnih i renalnih funkcija sisara, i većinu amonijačnog otpada ribe ekskretuju preko škrge. Pored ove činjenice, bubreg ipak ima ulogu u regulaciji

osmotske i kiselinsko-bazne ravnoteže kod riba, i naravno u procesu ekskrecije (Evans i Claiborne, 2006). Slatkovodne vrste riba proizvode veoma razređen urin, prvenstveno zbog očuvanja jonske ravnoteže u svojim organizmima.

Bubrezi svoje razviće počinju kao parni organi, međutim kod mnogih familija (Cyprinidae, Salmonidae, Clupeidae, Anguillidae) se nakon toga fuzionišu (delimično ili potpuno) u jedan bubreg, koji je po tipu, kod svih adultnih riba mezonefros (Genten i sar., 2009). Kod svih košljoriba ima retroperitonealan položaj i nalazi se ventralno u odnosu na kičmeni stub (Menke i sar., 2011). Boja bubrega varira od svetlo do tamno braon (u nekim slučajevima i crne) i podeljen je na anteriorni (prednji) i posteriorni (zadnji) bubreg (Roberts, 1989). Ova podela je zasnovana na tome koji se elementi nalaze u sklopu bubrega: u prednjem delu se nalazi hematopoetično, limfoidno i endokrino tkivo i ovaj deo bubrega nema ulogu u ekskreciji, dok zadnji deo bubrega ima dvostruku ulogu: učestvuje u ekskreciji, a pored nefrona je prisutno i hematopoetično i limfoidno tkivo (Reimschuessel, 2001). Interrenalne i hromafine ćelije endokrinog tkiva se obično mogu uočiti oko većih krvnih sudova (Menke i sar., 2011). U daljem tekstu će se pod pojmom bubreg podrazumevati zadnji deo bubrega koji ima ulogu u ekskreciji.



Slika 5. Levo - prikaz položaja bubrega u odnosu na telo zebrice; desno - histološka slika bubrega: a - glomerulus; b - proksimalni i distalni tubulusi; c - sabirni kanalići; d - hematopoetsko tkivo; preuzeto iz Menke i sar. (2011)

Histološki se bubreg košljoriba sastoji iz parenhima, čija je osnovna funkcionalna i morfološka jedinica nefron i strome koja predstavlja hematopoetsko tkivo (**Slika 5**)(Takashima i Hibiya, 1995). S obzirom na veliki diverzitet riba i raznolikost prirodnih staništa u kojima žive i građa bubrega je vrlo raznovrsna

(Evans i Claiborne, 2006). Tako, npr. morske ribe, koje žive u sredini koja je hipertonična u odnosu na unutrašnju sredinu ribe imaju veoma redukovane glomeruluse, ili su glomerulusi čak potpuno odsutni iz bubrega pojedinih vrsta i kod njih nije prisutan distalni segment tubulusa (Evans i Claiborne, 2006). Kod slatkovodnih vrsta to nije slučaj. Glomerulusi su dobro razvijeni i brzina filtracije krvi i količina proizvedenog urina su veoma visoki. Ovo omogućava slatkovodnim ribama proizvodnju hipotoničnog urina i minimalni gubitak jona iz organizma, s obzirom da su slatkovodne ribe hipertonične u odnosu na vodu u kojoj žive i gube jone pasivnim efluksom. Sledi opis histologije bubrega kod slatkovodnih Teleostei:

Nefron slatkovodnih košljoriba se morfološki deli u dva dela:

(1) renalno telašće, koje se sastoji od Malpigijevog telašća i Boumenove kapsule; Malpigijevo telašće čini splet kapilara, oivičenih ćelijama endotela koje su fenestrirane. Boumenovu kapsulu čine dva sloja: parijetalni sloj, koji čini spoljašnji sloj i naleže na bazalnu membranu i visceralni sloj, koji je u direktnom kontaktu sa Malpigijevim telašćom i formira unutrašnji sloj (Grizzle i Rogers, 1976). Između ova dva sloja se nalazi Boumenov prostor, koji preko jednog prelaznog dela (često se u anglosaksonskoj literaturi naziva vratni segment, engl., neck segment) prelazi u proksimalni deo tubulusa. Ćelije visceralnog sloja se nazivaju i podociti i njihova bazalna lamina se često fuzioniše sa bazalnom laminom ćelija endotela koji čine kapilare u Malpigijevom telašću i stvaraju strukturu koja se naziva *lamina densa* (Grizzle i Rogers, 1976). U ovom delu nefrona se odigrava filtracija krvi i to preko barijere koju osim *lamina densa* čine i *lamina rara externa*, koja naleže na podocite i *lamina rara interna*, koja naleže na ćelije endotela. Ova barijera dozvoljava prolaz vode, jona i sitnih molekula iz krvotoka u Boumenov prostor, ali ne i prolaz krupnih i/ili negativno naelektrisanih proteina.

(2) Bubrežne cevčice ili tubulusi, koje čine: proksimalni izuvijani deo tubulusa, središnji deo koji je kratak i uzak i distalni, izuvijani deo tubulusa (Takashima i Hibiya, 1995). Proksimalni deo je podeljen na dva morfološki različita dela: P1 u kome se nalaze mikrovili i P2 u kome mikrovili nisu toliko izraženi, ali se u ćelijama nalaze brojne mitohondrije (Roberts, 1989). Za razliku od

nefrona kod viših kičmenjaka, nefron riba se razlikuje po odsustvu Henlejeve petlje koja se razvila kada su se kičmenjaci pojavili na tlu i koja služi za konzervaciju vode (Hammerman, 2000). Ova činjenica znači da ribe nisu u stanju da proizvode urin koje je hipotoničan u odnosu na krv (Evans i Claiborne, 2006). U središnjem delu tubulusa, na prelazu iz proksimalnog u distalni deo se nalaze niskoprizmatične epitelne ćelije, kod kojih se često može primetiti prisustvo cilija (Genten i sar., 2009) koje pomažu kretanju filtrata kroz nefron.

1.8. Značaj histoloških indikatora u zdravstvenom stanju organa riba

Već dugi niz godina u svetu se koriste histološke metode da bi se bolje odredio zdravstveni status riba u biomonitoringu stanja životne sredine ili eksperimentima ishrane riba. Histologija vitalnih organa se menja u zagađenim ekosistemima, kao i onim gde se na bilo koji način značajnije menjaju parametri životne sredine. U tim slučajevima organi pokazuju odstupanje od normalne strukture i na njima se pojavljuju manje ili veće histopatološke promene. To se dešava u mnogim studijama u prirodnim ekosistemima, gde u zavisnosti od količine teških metala u vodi (Poleksić i sar., 2010; Rajeshkumar i Munuswamy, 2011), prisustva organskog zagađenja (Au i sar., 2004) ili jednostavno promena određenih fizičkih i/ili hemijskih parametara (Pollock i sar., 2007) sredine dolazi do poremećaja u održavanju homeostaze riba. U ribnjacima to najčešće nije slučaj. S obzirom da je ribnjak poluautonomni ekosistem (agroekosistem) u njemu se veštački održavaju uslovi koji su optimalni za život riba. Sa druge strane u ribnjački ekosistem se dodaje velika količina hrane, da bi ribe u što kraćem vremenskom periodu postigle visok prirast. Time se ribnjački ekosistem opterećuje sa alohtonim nutrijentima koji mogu dovesti do pogoršanja kvaliteta vode i uticati na zdravstveno stanje riba i njihovu dobrobit (Tacon, 1995; Kaushik, 1998; Craig i Helfrich, 2002; Segner i sar., 2012).

Prednost u histopatološkoj analizi organa leži u činjenici da su ribe locirane na ili pri vrhu trofičke piramide u vodenim ekosistemima, te su stoga odgovarajući indikatori zagađenja, s obzirom na fenomene biokoncentracije i bioakumulacije (Dallinger i sar., 1987; Polak-Juszczak, 2012). Ciljni organi su obično oni koji su u

neposrednom kontaktu sa vodenom sredinom (škrge i koža), ali i drugi organi na koje zagađenje ima posredan uticaj (jetra, bubreg i gonade). Histopatološke analize doprinose razumevanju efekata polutanata i mehanizama kojima oni deluju na ribe. Takođe, ribe su i model organizmi i rezultati istraživanja na ribama se često ekstrapoliraju na sisare. Za analizu uzoraka organa mogu da se koriste i svetlosna i elektronska mikroskopija, međutim u praksi se najčešće koristi analiza tkiva pod svetlosnim mikroskopom, pošto je ova metoda rutinska i jevtinija.

Međutim, histopatološka metoda ima i jednu negativnu stranu, s obzirom na to da histopatološke promene na organima nisu specifične za određenu grupu toksikanata. Naime, tkivni odgovori na zagađenje su ograničeni i ribe uglavnom imaju isti tkivni odgovor ukoliko su izložene različitim tipovima ksenobiotika (Fernandes i Mazon, 2003; Takashima i Hibiya, 1995). U revijalnom radu koji procenjuje različite metode u toksikologiji riba, van der Oost i sar. (2003) histopatološkoj metodi daju ocenu 3.5 od 5, svrstavajući je u "dobre" metode bioindikacije. U istom radu navode upravo pomenutu činjenicu: metoda jeste relevantna, i toksikološka značajnost je visoka, međutim mogućnost detektovanja specifičnog tipa zagađenosti je niska (van der Oost i sar., 2003). Drugi autori ističu prednosti histopatološkog pristupa i to da je ova metoda veoma korisna za ispitivanje subletalnih, hroničnih efekata različitih ksenobionata na ribu (Wester i Roghair, 1994), kao i osetljivost na niske nivoe zagađenosti u životnoj sredini (Braunbeck, 1994).

Veliki problem u histopatološkim istraživanjima je i subjektivnost same metode. Deskriptivna histopatologija je subjektivna i često zavisi od veštine istraživača i njegovog poznavanja materije. U najvećem broju naučnih radova, intenzitet histopatoloških promena je kategorisan kao: blage, umerene i ozbiljne promene (npr., Greenfield i sar., 2008) ili kao procenat tkiva zahvaćenog promenom (npr. Benli i sar., 2008). Ova subjektivnost se obično prevazilazi uvođenjem morfometrijskih i/ili stereoloških metoda (Hughes i Perry, 1976; Da Costa i sar., 2007; Dulić i sar., 2009; Monteiro i sar., 2009; Madureira i sar., 2012), međutim ove metode su često tehnički komplikovane za izvođenje i zahtevaju mnogo utrošenog vremena. Stoga je optimalno rešenje korišćenje

polukvantitativnih metoda, odnosno skoring sistema. Treba pomenuti dva skoring sistema koji se koriste u proceni histopatoloških promena na tkivima i organima riba. Prvi se bazira isključivo na histologiji škrge (Poleksić i Mitrović-Tutundžić, 1994), dok drugi sistem obuhvata promene na četiri vitalna organa: škrge, bubreg, jetra i koža riba (Bernet i sar., 1999). Oba skoring sistema su bazirana na istom principu: pored obima histopatoloških promena na pojedinom organu ribe, u obzir se uzima i faktor značajnosti promene, koji multiplikuje vrednost obima promene. Detektovane promene se sumiraju po pojedinačnim organima i nakon toga se izračunava ukupni histopatološki indeks. Ovakvi skoring sistemi omogućavaju kvantifikaciju i poređenje između dva ili više istraživanih lokacija ili tretmana. Ova dva skoring sistema se koriste u proceni zagađenja potoka (Camargo and Martinez, 2007), reka (Schmidt-Posthaus i sar., 2001; Zimmerli i sar., 2007; Marchand i sar., 2009), jezera (Nero et al., 2006) i ribnjaka (Rašković et al., 2010).

Histološke analize digestivnog trakta riba se smatraju dobrim indikatorom uhranjenosti i uopšte nutritivnog stanja organa riba (Hinton i sar., 1987; McFadzen i sar., 1997; Green i McCornick, 1999; Caballero i sar., 2003). Crevo i jetra su dva najvažnija organa u procesu varenja i apsorpcije nutrijenata iz hrane, i zato se monitoring ovih organa u eksperimentima ishrane riba smatra obaveznim. Da bi se efikasno pratilo histološko i eventualno histopatološko stanje ovih organa najčešće se koriste polukvantitativne, morfometrijske, histohemijske i imunohistohemijske studije, dok su stereološke i ultrastrukturne studije retke (Rocha i sar., 1997; Olsen i sar., 1999; Olsen i sar., 2000; Wold i sar., 2009). Promene na crevima i jetri riba uslovljene ishranom imaju različit intenzitet i to u zavisnosti od hrane kojom se ribe hrane, kao i od vrste riba. Manjak ribljeg brašna i ulja u globalnoj industriji hrane za ribe uslovljava pojavu zamene proteina i/ili masti u ribljem hrani proteinima i/ili mastima biljnog porekla (Gatlin i sar., 2007; Hardy, 2010). Kod karnivornih i delimično kod omnivornih riba ovi alternativni izvori proteina i/ili masti uzrokuju niže vrednosti glikogena u jetri (Evans i sar., 2005) ili upalu distalnog dela creva kod riba (Baeverfjord i Krogdahl, 1996). Međutim, čak i u hrani u kojoj nema proteina i/ili masti biljnog porekla dolazi do suptilnih promena u jetri u crevima riba, ali se one mogu uočiti samo

morfometrijskim ili stereološkim metodama. Takođe, histološke promene na organima digestivnog trakta su dobar indikator pothranjenosti riba (O'Connell, 1976; Segner i Braunbeck, 1988), prisustva toksičnih materija u hrani (Hodson i Hilton, 1983; Fanta i sar., 2003; Coimbra i sar., 2007) i neadekvatne ishrane (Roberts, 1989; Tacon, 1992; Barrows i sar., 2008).

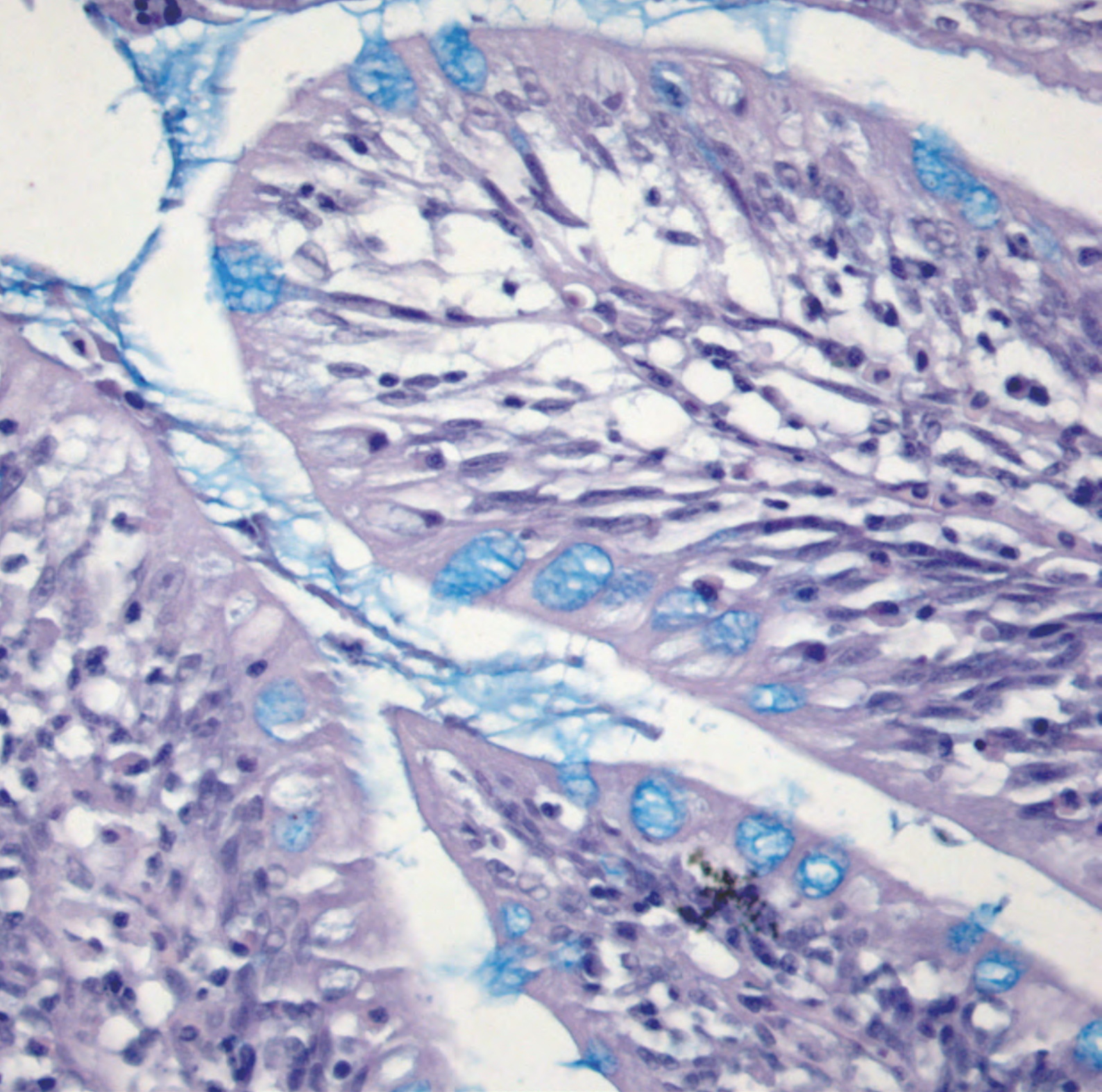
1.9. Masne kiseline kao pokazatelj kvaliteta mesa kod riba

Proučavanje morfologije organa i njihove histologije može nam dati dobar uvid u zdravstveno stanje riba, ali s obzirom na to da se ove ribe gaje zbog ishrane ljudi, veoma je bitan i kvalitet njihovog mesa. Osim osnovnih predispozicija da se u mesu ne nalaze toksikanti, opasni za čoveka, kao što su teški metali (Has-Schön i sar., 2006; Čelechovská i sar., 2007; Castro-González i Méndez-Armenta, 2008; Zrnčić i sar., 2013), pesticidi (Lázaro i sar., 1996; Yang i sar., 2006) ili druga organska jedinjenja (Schechter i sar., 1997; Darnerud i sar., 2006), veoma je bitna i količina i odnos masnih kiselina u mesu riba. Masne kiseline se dele na: nezasićene, mononezasićene i polinezasićene masne kiseline. Polinezasićene masne kiseline se dele u dve klase: ω -3 i ω -6 masne kiseline i razlikuju se po mestu prve dvostruke veze, ukoliko se broji od metil grupe. ω -3 i ω -6 se još nazivaju i esencijalne masne kiseline, jer ih nijedna vrsta sisara ne može sintetisati, već ih moraju unositi u organizam preko hrane (Simopoulos, 1991). U grupi ω -3 masnih kiselina, najbitnije masne kiseline, kako za metabolizam riba, tako i za ishranu ljudi su dve masne kiseline: eikozopentanska (C 20:5; EPA) i dokozeheksanska (C 22:6; DHA)(Simopoulos, 1991; Sargent i sar., 1997). Biohemijska, ćelijska i fiziološka uloga EPA i DHA masnih kiselina je slična kod svih kičmenjaka: imaju aktivnu ulogu u formiranju i funkciji ćelijske membrane i prisutni su kao prekursori parakrinih eikozanoidnih hormona (Sargent i sar., 1999). Ribe su tradicionalno najbolji izvor nezasićenih masnih kiselina, a to se pogotovo odnosi na morske vrste. Vrednosti ovog odnosa kod slatkovodnih vrsta su oko pet puta manje u poređenju sa morskim (Steffens i Wirth, 2005). Bez obzira na ovu činjenicu i slatkovodne vrste riba imaju relativno visok procenat ω -3 masnih kiselina, ali za razliku od morskih riba gde EPA i DHA dominiraju nad linoleinskom (C 18:3; ALA), kod šarana je odnos obrnut (Simopoulos, 1991). Povoljan odnos polinezasićenih

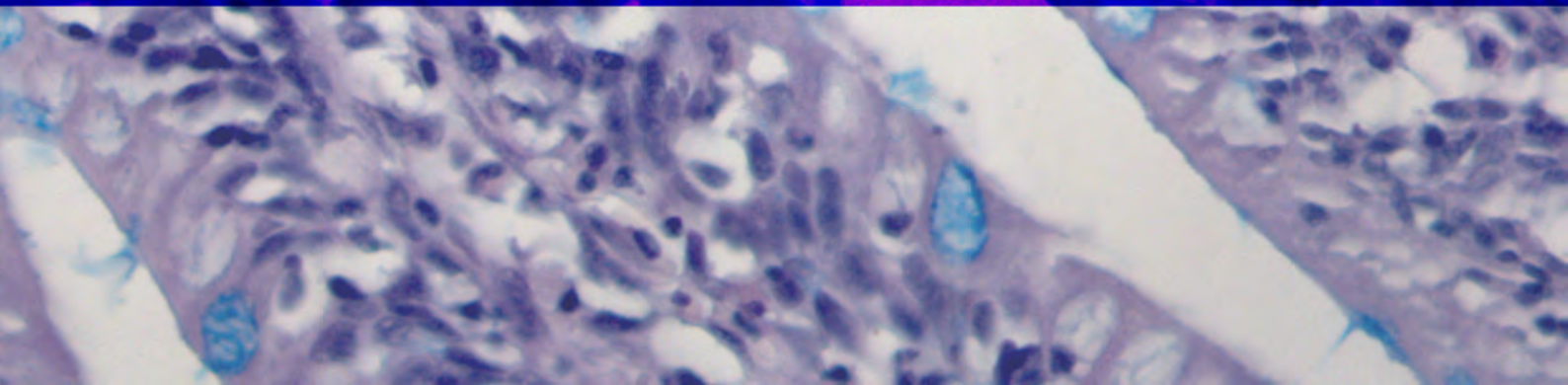
masnih kiselina u mesu riba je veoma značajan za ishranu ljudi (Simopoulos, 2002). Posebno je bitno da masti budu bogate ω -3 masnim kiselinama i da one dominiraju u mesu riba. Povoljan odnos znači visoku vrednost količnika između ω -3 i ω -6 nezasićenih masnih kiselina.

U kliničkim ispitivanjima je dokazano da ljudi koji se hrane ribljim mesom imaju manji rizik od razvijanja kancera debelog creva (Norat i sar., 2005), dijabetesa tipa 2 (Nettleton i Katz, 2005), kardiovaskularnih bolesti (Kris-Etherton i sar., 2002), poboljšanje imunog odgovora (Kelley, 2001), a veoma su bitne i u spermato- i oogenezi, s obzirom da su prekursori prostaglandina (Wathes i sar., 2007). Uporedo sa tim je pokazano da visok nivo EPA i DHA masnih kiselina kod glodara dovodi do supresije kolonalnog kancera (Takahashi i sar., 1997; Sugimura, 2000). Osnovni izvor ove dve aminokiseline kod riba je riblje ulje (Saboia-Moraes i sar., 1996). Sve ove studije dokazuju pozitivne efekte ω -3 masnih kiselina, a posebno EPA i DHA u ishrani ljudi. Stoga je neophodno da gajena riba ima što više sadržaj ω -3 masnih kiselina u mesu, a na to se može uticati ishranom riba.

Ako se analizira sadržaj ω -3 masnih kiselina u mesu šarana, kao i njihov odnos sa ω -6 masnim kiselinama, može se uočiti veoma veliko variranje koje je uzrokovano različitim faktorima uzgoja (Steffens, 1997). Tako, zavisno od načina uzgoja šarana odnos ω -3/ ω -6 masnih kiselina se kretao od 0.1 (Runge i sar., 1987), do čak 3.02 (Sýkora i Valenta, 1978). Ovaj fenomen je ispitivan iz različitih uglova. Tako su ispitivani efekti masnokiselinskog sastava hrane (Steffens, 1997), pola ribe (Fajmonová i sar., 2003), starosti ribe (Geri i sar., 1995), temperature uzgoja (Viola i sar., 1988), ali ni u jednom od ovih radova nije ispitivan efekat tehnološkog procesa prerade hrane. Međutim, kod dužičaste pastrmke (Hilton i sar., 1981) i orade (*Sparus aurata* L., 1758)(Deguara, 1997) je pokazano da korišćenje ekstrudirane ili peletirane hrane ima značajne posledice na različite parametre kvaliteta mesa ovih riba, dok je kod brancina (*Dicentrarchus labrax* L., 1758)(Aslan i sar., 2009) pokazan i značajan efekat korišćenja ova dva tipa hrane na odnos ω -3/ ω -6 masnih kiselina.

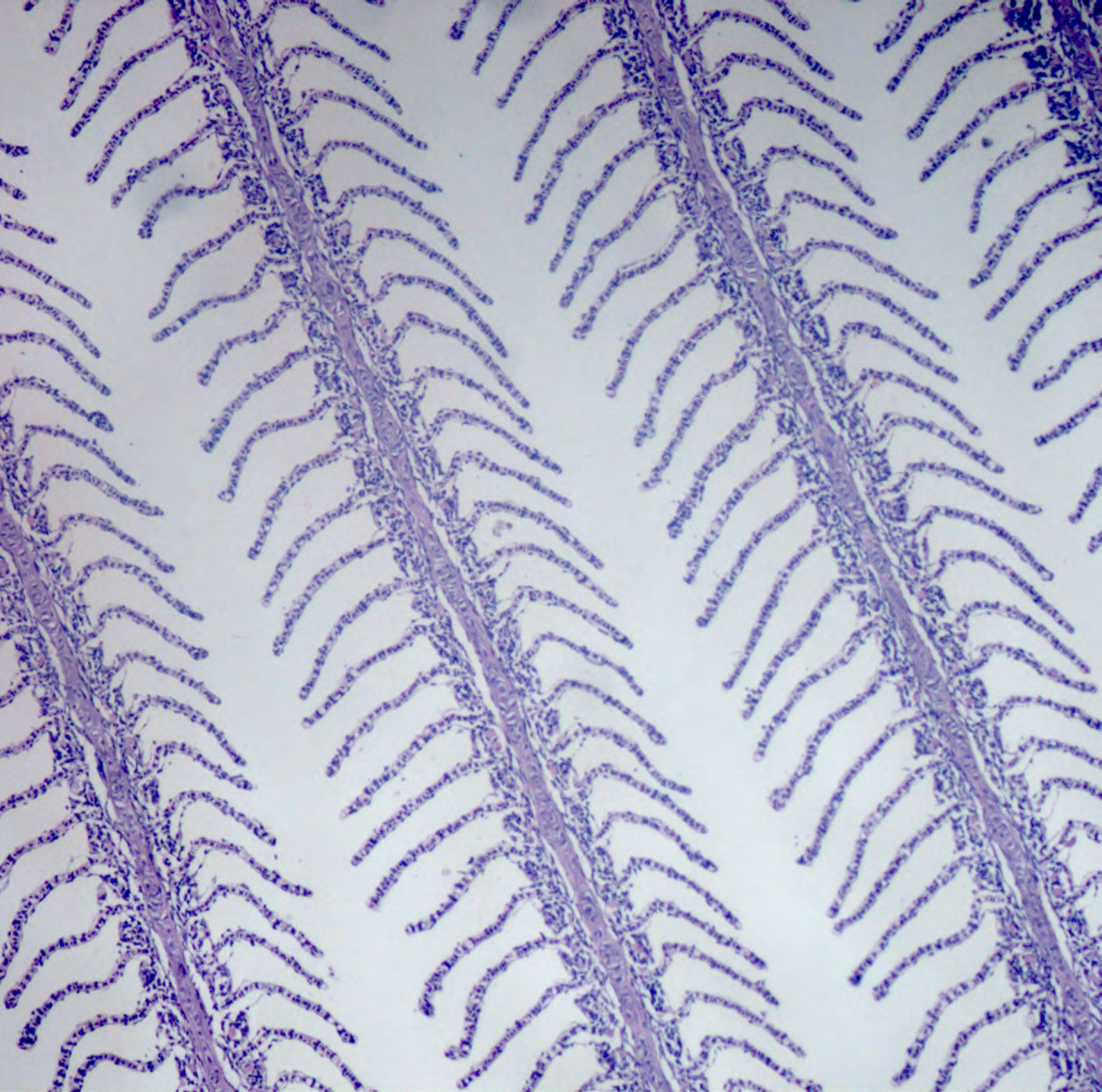


2. PREDMET I CILJ ISTRAŽIVANJA

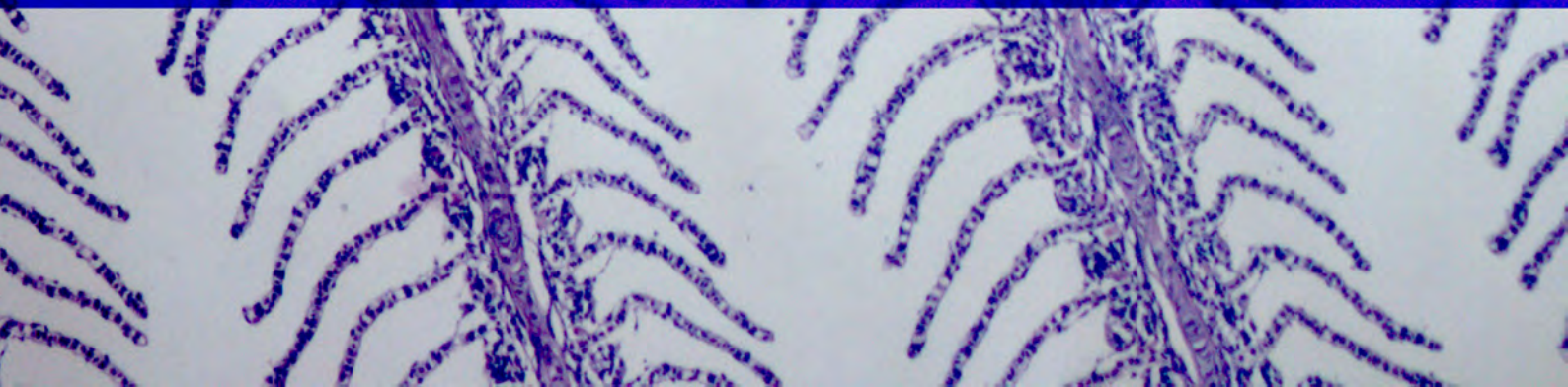


Cilj istraživanja disertacije je utvrđivanje histološke građe i mogućih razlika koje nastaju u građi/funkciji četiri vitalna organa (jetre, creva, škrge i bubrega) šarana (*Cyprinus carpio* L., 1758) upotrebom tri tipa dodate hrane u poluintenzivnom sistemu gajenja. Pravci istraživanja, su podeljeni u tri aspekta:

- Prvi aspekt se odnosi na direktno dejstvo hrane na digestivni sistem riba. Ispitana je detaljna histološka građa jetre, kao i ultrastrukturni izgled ćelija jetre - hepatocita. Pored jetre, fokus će biti i na histologiji distalnog dela creva, kao i ultrastrukturne građe epitelnih ćelija creva - enterocita. Morfometrijskim i stereološkim metodama su utvrđene eventualne razlike u histološkoj građi hepatocita i enterocita između tri grupe riba, hranjenih različitim hranama. Očekuje se da promene na nivou metabolizma, nastale hranjenjem različitim tipovima hrane, uzrokuju i histološke promene na nivou ćelija, koje se mogu evaluirati korišćenjem morfometrijskih i stereoloških metoda.
- Drugi aspekt disertacije se odnosi na efekat hrane na kvalitet životne sredine, odnosno na fizičke i hemijske parametre vode u jezeru u kojoj riba živi i u povratnoj sprezi, potencijalni uticaj vode na histologiju ispitivanih organa. Škrge i bubrezi su organi koji reaguju i na male promene u životnoj sredini, a jetra je multifunkcionalni organ, koji pored funkcije u ishrani ima i funkciju u metabolizmu toksičnih materija koje ribe unose u organizam. Cilj je ispitivanje histopatoloških promena koje uzrokuje kvalitet vode u svakom od jezera, a pored deskriptivnih nalaza, pristupiće se i polukvantitativnom histopatološkom scoringu, radi lakšeg poređenja između grupa. Takođe, jedan od aspekata je da se ustanovljava korelacija između pojedinih parametara kvaliteta vode i histopatoloških promena na ispitivanim organima.
- Treći aspekt disertacije se odnosi na analizu količine i sastava masnih kiselina u mesu šarana. Cilj ispitivanja je utvrđivanje eventualne razlike između grupa, kao i efekat ishrane na odnos između ω -3 i ω -6 masnih kiselina.



3. MATERIЈAL I METODE



3.1. Dizajn eksperimenta

Eksperiment je realizovan na oglednom dobru Poljoprivrednog fakulteta u Beogradu „Radmilovac“, u Centru za ribarstvo i primenjenu hidrobiologiju. U eksperimentu su korišćena tri jezera pravougaonog oblika, dimenzija: 36 x 25 x 2 m, a ukupne površine 900 m². Pre početka eksperimenta, svako jezero je temeljno očišćeno od vegetacije i zemljana površina je pokrivena gašenim krečom (Ca(OH)₂) od 550 kg/ha, što je standardna agrotehnička mera koja se primenjuje pre punjenja jezera vodom. U prvoj godini eksperimenta (2008. godina) jezera su punjena vodom iz obližnjeg potoka, kao i iz dva površinska bunara dubine 6m. U drugoj godini eksperimenta (2009. godina), jezera su punjena vodom koja je pumpana iz podzemnog bunara sa dubine od 125 m. U svako od ova tri jezera je nasadeno po 400 jedinki šarana (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) starosti dvanaest meseci. Šarani su izlovljeni iz komercijalnog šaranskog ribnjaka "Sveti Nikola" u Neuzini i transportovani do Centra u plastičnim vrećama kojima je dodat kiseonik, da ne bi došlo do hipoksije. Smešteni su u posebno jezero, koje nije korišćeno u eksperimentu i omogućena im je adaptacija na nove uslove sredine koja je trajala tri nedelje. Nakon ovog perioda, riba je raspoređena u eksperimentalna jezera i u svakom od njih hranjena različitim tipom dodate hrane:

- u prvom jezeru korišćene su žitarice (mešavina semena pšenice, ječma i kukuruza u razmeri 1:1:1)(ŽI);
- u drugom jezeru korišćena je peletirana komercijalna hrana (PH);
- u trećem jezeru korišćena je ekstrudirana komercijalna hrana (EH).

Proizvođač hrane je bila kompanija "Veterinarski zavod" iz Subotice. Procentualni sastav hrane korišćene u eksperimentu po deklaraciji proizvođača, kao i hemijski sastav hrane, su prikazani u **tabeli 2**. Iz tabele se može uočiti, da između peletirane i ekstrudirane hrane postoji razlika samo u vlazi, dok i peletiranu i ekstrudiranu hranu karakteriše veći sadržaj proteina, lipida i pepela, a manji vlakana i dostupnih ugljenih hidrata u odnosu na žitarice. Sve analize hemijskog sastava riblje hrane urađene su u laboratorijama Naučnog instituta za veterinarstvo Srbije iz Beograda.

Tabela 2. Sastojci i hemijski sastav hrane korišćene u eksperimentu (%)

Sastojci	Hrana		
	ŽI	PH	EH
Pšenica	33.3	22.0	22.0
Kukuruz	33.3	30.0	30.0
Ječam	33.3		
Riblje brašno		5.0	5.0
Punomasno sojino brašno		28.0	28.0
Tostirano sojino brašno		6.4	6.4
Kvasac		6.0	6.0
Kalcijum karbonat		0.8	0.8
Monokalcijum fosfat		0.5	0.5
Natrijum hlorid		0.1	0.1
Lizin		0.2	0.2
Mineralno-vitaminski premiks*		1.0	1.0
<i>Hemijski sastav hrane</i>			
Proteini	11.3	28.5	26.5
Masti	3.3	8.0	7.8
Vlakna	7.4	3.3	3.5
Vlažnost	9.8	12.0	9.4
Pepeo	1.9	4.7	4.7
Nitrogen-Free Extract (NFE)	66.2	45.5	46.1

* Sastav mineralno-vitaminskog premiksa (Proizvođač: Veterinarski Zavod, Srbija) (kg^{-1} hrane): totalni Ca (%) min. 1.6; totalni P (%) min. 1.2; Vitamin A (IU/kg) min. 15.000; Vitamin D3 (IU/kg) min. 2.500; Vitamin E (mg/kg) min. 90; Vitamin C (mg/kg) min. 200; Lizin (%) min. 2.3; Metionin i Cistin (%) min. 1.2; Ukupna energija 18.9 MJ/kg; Metabolička energija 15.0 MJ/kg.

Količina hrane kojom je riba hranjena razlikovala se od meseca do meseca: maj 0.2-0-5%; jun 0.5-3%; jul 2-3%; avgust 2-3%; septembar 1-3%; oktobar 0.5-2%, u odnosu na ukupnu biomasu riba u svakom od ispitivanih jezera (Marković, 2010). Međutim, ukoliko riba nije konzumirala hranu koja je uneta prethodni dan u jezero, sledećeg dana je ovaj procenat smanjen. Takođe, ukoliko su bili nepovoljni parametri kvaliteta vode u jezeru, riba taj dan nije hranjena. Izostavilo se hranjenje i dan pred uzorkovanje, kao i dan nakon uzorkovanja, jer zbog stresa nakon izlova riba jedan određeni vremenski period ne konzumira hranu. Pratila se i količina algi u jezeru i ukoliko je primećena povećana količina modrozelenih algi, primenjivana je agrotehnička mera zakrečavanja sa gašenim krečom, što je dovodilo do sedimentacije i uklanjanja ovih organizama.

Ogled je započet 29.04.2008. i trajao je tokom cele proizvodne sezone, do 27.10.2008. Ponovljen je naredne godine (replikacija) i trajao je od 20.04.2009. do 18.10.2009. Naredne godine je postupak pripreme jezera za eksperiment bio identičan onom iz prve godine, a za eksperiment su korišćena ista jezera. Na svakih 15 dana od početka eksperimenta, u obe godine istraživanja, povlačenjem mreže u jezerima, kontrolnim izlovom je hvatan probni uzorak od 50 riba. Na osnovu ovog uzorka, računata je prosečna biomasa riba u jezeru i korigovana je količina dodate hrane kojom je riba hranjena. U isto vreme, ovim ribama je određivana telesna masa korišćenjem digitalne vage JCA (Birotehna, Smederevo), te dužina i visina tela, korišćenjem ihtiometra.

Pri dizajniranju eksperimenta, vodilo se računa da uslovi i tehnologija gajenja budu što sličniji onima koji se koriste na komercijalnim ribnjacima koji gaje šarana.

3.2. Uzorkovanje

Pre početka eksperimenta, žrtvovano je osam riba da bi se utvrdilo histološko stanje organa pre hranjenja dodatnom hranom. Jednom mesečno, nakon kontrolnog izlova izdvajane su po dve ribe iz svakog jezera i žrtvovane, a na završetku ogleda je žrtvovano po pet riba iz svakog jezera (ukupno 34 ribe po grupi). Ribe su pre žrtvovanja anestetizirane u rastvoru benzokaina, a žrtvovane su probadanjem lobanje ribe oštrom iglom i razaranjem kičmene moždine. Nakon žrtvovanja uzorkovana su četiri organa za histološku analizu: škrge, jetra, creva i bubreg. Uzorci škrge su uzimani odmah nakon žrtvovanja životinje. Nakon uklanjanja levog operkuluma, uzorkovan je drugi škržni luk i fiksiran. Ostali organi su uzeti odmah nakon pravljenja reza na ventralnoj strani ribe i uz pomoć pincete i makaza su prenošeni na podlogu koja je ohlađena ledom. Veći delovi tkiva su korišćeni za svetlosnu mikroskopiju, dok su manji delovi tkiva (debljine oko 5 mm) korišćeni za elektronsku mikroskopiju.

Uzorci mesa šarana za analizu masnih kiselina (iz 3 ribe) uzeti su na početku eksperimenta i na kraju eksperimenta i to iz svakog od jezera po tri nasumično izabrane ribe. Uzorci riba su, do laboratorijskih ispitivanja, čuvani na -

18 °C. Riba je ostavljena sat vremena na sobnoj temperaturi, zatim su odvojeni glava i rep, pažljivo je uklonjena koža i utroba, a meso ribe homogenizovano. Analiza sastava masnih kiselina u mesu šarana i ukupnih lipida za analizu masnih kiselina urađena je u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

3.3. Svetlosna mikroskopija

Da bi se napravili histološki preseki za analizu na svetlosnom mikroskopu korišćen je protokol po Humasonu (1979). Nakon fiksiranja u 4%-tnom formalinu (Lach-Ner, Republika Češka), uzorci su smešteni u automatski procesor tkiva Leica TP 1020 (Leica, Austrija) i sprovedeni kroz rastući gradijent etanola (70% - 2 x 30 minuta, 85% - 30 minuta, 95% - 30 minuta, 100% - 2 x 30 minuta), da bi nakon dehidracije uzorci stajali 2 x 30 minuta u ksilenu. Nakon dehidratacije, tkiva su kalupljena u parafinu koji je prethodno rastopljen na 60°C. Kalupi su montirani na plastične držače i sečeni na mikrotomu SM 2000R (Leica, Austrija). Preseci debljine 5 µm su nakon kratkog vremena u vodenom kupatilu smeštani na mikroskopske pločice. Uzorci na pločicama su rehidratirani i bojani u automatizovanom centru za bojenje preparata ST 4040 (Leica, Austrija). Histološka bojenja preseka koja su korišćena u radu su:

- Hematoksilin eozin (HE),
- Periodic acid-Schiff (PAS),
- Alcian blue pH 2.5 (AB)
- Alcian blue pH 2.5/Periodic acid-Schiff (AB/PAS)

Alcian blue bojenja su kontrastirana sa hematoksilinom. Sva histološka bojenja su rađena po metodi Bancroft i Stevens (1977). Obrada histoloških uzoraka je urađena u laboratoriji za histologiju Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.4. Elektronska mikroskopija

Manji parčići tkiva, koji su korišćeni za elektronsku mikroskopiju, su fiksirani u rashlađenom 4%-nom glutaraldehidu (Merck, Nemačka) u 0.1M fosfatnom puferu (pH 7.2), preko noći. Nakon ispiranja tkiva u fosfatnom puferu,

ono je postfiksirano u 1%-nom osmijum tetraoksidu (Merck, Nemačka), rastvorenom u fosfatnom puferu (pH 7.2) i kontrastirano 0.25%-nim vodenim rastvorom uranil-acetata. Tkivo je ostavljeno na 4°C, preko noći i dehidratirano serijom etanola rastuće koncentracije (po 15 min: 30% - 50% - 70% - 96% - 100% - 100% etanol i propilen oksid u razmeri 1:1 - propilen oksid). Po završetku dehidratacije tkivo je kalupljeno u Epoksi smole (Sigma-Aldrich, Nemačka) i sečeni su polutanki preseki debljine 1 µm na ultramikrotomu LKB III (Broma, Švedska). Polutanki preseki su bojeni toluidin plavim i pregledani na svetlosnom mikroskopu. Delovi pogodni za elektronsku mikroskopiju su trimovani i na ultramikrotomu sečeni na debljinu od 100 nm, nakon čega su montirani na bakarne mrežice. Preseci na bakarnim mrežicama su bojeni olovo-citratom u instrumentu za automatsko kontrastiranje EM AC20 (Leica, Austrija). Obojeni i neobojeni preseki su posmatrani na transmisionom elektronskom mikroskopu Philips CM12 (Philips, Holandija), fotografisani digitalnom kamerom Megaview III (Olympus, Nemačka) sa kompjuterskim softverom Soft Imaging System (Olympus, Nemačka). Uzorci za elektronsku mikroskopiju su obrađeni u Centru za elektronsku mikroskopiju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

3.5. Morfometrija i stereologija

Sa tri mikroskopska preseka jetre i creva je fotografisano po pet digitalnih mikrografija (ukupno 15 mikrografija po organu) od kojih je slučajnim izborom na deset mikrografija urađena morfometrijska analiza. Na svakoj od deset mikrografija jetre je izmerena površina pet ćelijskih i pet jedarnih preseka (ukupno 50 po ribi) i računat je njihov međusobni odnos (Ostaszewska i sar., 2005b). Pored toga izmerena je i površina jedarnih preseka 50 acinusnih ćelija u pankreasu. Na presecima creva je izmerena dužina crevnih nabora (u proseku 60 crevnih nabora po ribi), visina enterocita i visina supranuklearne zone enterocita (ukupno 50 po ribi) (Zakęś i sar., 2008). Određivan je i broj mukoznih ćelija na dužini od 100 µm crevnih nabora (Ostaszewska i sar., 2011). Na elektronskim mikrografijama jetre, ćelije su slikane na uvećanju od 2650x i po 20 mikrografija je korišćeno za određivanje volumenske gustine lipidnih kapi u ćelijama. Na slike je interpolirana testna mreža (P_T), a gustina lipidnih kapljica je određivana point-

counting metodom tako što su brojane tačke koje su padale na lipidne kapi (P_{Pi}) (Weibel i sar., 1966). Gustina mrežice je iznosila (area per point): 10.000 μm^2 sa 21 x 15 tačaka na mikrografiji (ukupno 315), a sama mrežica je postavljena na mikrografiju po principu slučajnosti (kompjuterski random offset). Volumenska gustina (V_{Vi}) je računata po sledećoj formuli:

$$V_{Vi} = \frac{P_{Pi}}{P_T}$$

Sva morfometrijska merenja su urađena korišćenjem softvera ImageJ 1.41o (Rasband, 2011).

3.6. Semikvantitativna analiza histopatoloških promena

Pored deskriptivnih, histološki preseki jetre, škrge i bubrega su ocenjivani i semikvantitativnom analizom, korišćenjem metode Bernet i sar. (1999). Praćena je vrsta i stepen histopatoloških promena na organima. Promene na organima su po vrsti klasifikovane u pet različitih grupa (rp, engl. reaction pattern) i svaka promena (alt, engl. alteration) ima vrednost od 1 do 3 u zavisnosti od značaja lezije (w - faktor značajnosti, engl. importance factor):

- 1) cirkulatorne promene: hemoragije, hiperemije ili aneurizme (1) i intercelularni edem (1);
- 2) regresivne promene: strukturne promene na ćelijama (1), promene u citoplazmi (1), depoziti u ćelijama (1), promene na jedru (2), atrofija ćelije (2), nekroza ćelije (3);
- 3) progresivne promene: hipertrofije (1) i hiperplazije (2);
- 4) inflamatorne promene: pojava eksudata (1), aktivacija retikuloendotelnog sistema (1) i infiltracija leukocita u tkivo (2);
- 5) neoplazije: prisustvo benignih (2) i malignih (3) tumora u organima

Pored faktora značajnosti određivan je i intenzitet zahvaćenosti svakog tkiva (a - engl. score value), a on se kretao od 0 (normalna morfologija), preko 2 (blaga promena tkiva) i 4 (umerena promena tkiva) do 6 (ozbiljna alteracija tkiva).

Množenjem ova dva faktora dobijala se vrednost koja je označavala histopatološki skor za svaku kategoriju promena:

$$I_{\text{org rp}} = \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rp alt}} \times w_{\text{org rp alt}})$$

za histopatološki indeks organa:

$$I_{\text{org}} = \sum_{\text{rp}} \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rp alt}} \times w_{\text{org rp alt}})$$

i za ukupni histopatološki indeks tri ispitivana organa:

$$I_{\text{org}} = \sum_{\text{org}} \sum_{\text{rp}} \sum_{\text{alt}} (a_{\text{org rp alt}} \times w_{\text{org rp alt}})$$

rp - kategorija histopatološke promene, org - organ (L-jetra, G-škrge, K-bubreg), alt - vrsta histopatološke promene, a - vrsta promene, w - faktor značajnosti

Podrazumeva se da što je viši skor dobijen, to je i histopatološka promena po kategoriji, organu ili za sva tri organa značajnija.

3.7. Parametri prirasta

Parametri prirasta koji su korišćeni u ovom istraživanju su:

- prirast riba izražen u gramima i procentima (engl. body weight gain, BWG),
- specifična stopa rasta (engl. specific growth rate, SGR),
- koeficijent rasta za toplotnu jedinicu (engl. thermal unit growth coefficient, TGC),
- konverzija hrane (engl. food conversion ratio, FCR),
- stopa preživljavanja (engl. survival rate, SR) i
- faktor kondicije (engl. condition factor, CF).

Izračunavanje prirasta riba obavljeno je uz pomoć formula:

$$\text{BWG (g)} = W_t - W_o$$

$$\text{BWG(\%)} = \frac{W_t - W_o}{W_o} \times 100$$

W_t – prosečna masa riba na kraju posmatranog perioda (g), W_o – prosečna masa riba na početku posmatranog perioda (g)

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_o}{t} \times 100$$

W_t – prosečna masa riba na kraju posmatranog perioda (g), W_o – prosečna masa riba na početku posmatranog perioda (g) i t – broj dana u posmatranom periodu.

$$TGC = \frac{\sqrt[3]{W_t} - \sqrt[3]{W_o}}{T \times \Delta t} \times 1000$$

W_t – prosečna masa riba na kraju posmatranog perioda (g), W_o – prosečna masa riba na početku posmatranog perioda (g), T – temperature vode (°C) i Δt – dužina trajanja posmatranog perioda (broj hranidbenih dana).

$$FCR = \frac{D_d}{W_t - W_o}$$

D_d – količina pojedene hrane u posmatranom periodu (g), W_t – masa riba na kraju posmatranog perioda (g) i W_o – masa riba na početku posmatranog perioda (g).

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100$$

N_t – broj riba na kraju posmatranog perioda i N_o – broj riba na početku posmatranog perioda.

$$CF = \frac{W}{L^3} \times 100$$

W – masa tela ribe (g) i L – ukupna dužina tela ribe (cm).

3.8. Parametri kvaliteta vode

Uporedo sa parametrima prirasta i histološkim parametarima, praćeni su i parametri kvaliteta vode u svakom od jezera tokom trajanja eksperimenta. Pojedini fizički i hemijski parametri vode su određivani svakodnevno i to su: temperatura, količina rastvorenog kiseonika, elektroprovodljivost, pH i providnost vode. Svi parametric, osim providnosti, su mereni korišćenjem multifunkcionalnog uređaja Multi 350i (WTW, Nemačka). Providnost vode je određivana korišćenjem

Sekijevog diska, koji je spuštan u vodu do momenta do kada nije više vidljiv, a potom merena vrednost kada se disk uoči. Pored ovih, mereni su i dodatni parametri, na svake dve nedelje: tvrdoća vode, ortofosfati i ukupni fosfati, potrošnja kalijum-permanganata, količina nitrata i amonijaka u vodi i ukupni azot. Voda za analize je uzorkovana u prethodno očišćene plastične boce zapremine 1 L, sa dubine od približno 10 cm ispod površine. Analiza vode je urađena u Institutu za javno zdravlje “Milan Jovanović Batut” u Beogradu. Vrednosti nejonizovane frakcije amonijaka su naknadno izračunavane korišćenjem tabelarnih vrednosti iz literature (Piper i sar., 1986).

3.9. Indeks podobnosti staništa

Indeks podobnosti staništa (IPS; engl. habitat suitability index), koji se koristi samo za šarana, je računat za svako jezeru u eksperimentu po metodi Edwards i Twomey (1982). Ovaj indeks predstavlja kvantifikaciju različitih abiotičkih parametara u životnoj sredini, a cilj je da se na osnovu reproduktivnih parametara, pokrivenosti dna jezera biljkama, veličinom litoralne zone i kvalitetom vode dođe do broja čija je maksimalna vrednost 1 i on predstavlja optimalnu životnu sredinu za šarana. Minimalna vrednost je 0 i u takvoj životnoj sredini šaran ne može da preživi. U ribnjačkim jezerima korišćenim u našem eksperimentu biljaka nije bilo, reproduktivni parametri, kao i veličina litoralne zone je bila irelevantna (ceo ribnjački ekosistem je litoralna zona, zbog maksimalne dubine od 1.5 m), tako da je jedini abiotički parametar koji je imao uticaj na šarana u ovom istraživanju bio kvalitet vode. Kvalitet vode je bio izračunavan po sledećoj formuli:

$$IPS = C_{WQ} = \frac{V_6 + 2 \times \sqrt{V_7 \times V_9} + 2 \times V_{12} + V_{14}}{6}$$

V_6 – maksimalna vrednost turbiditeta tokom istraživanja (umesto turbiditeta korišćena providnost vode), V_7 – maksimalna letnja temperatura vode u jezeru, V_9 – maksimalna letnja temperatura vode u litoralnoj zoni (s obzirom na to da je cela zona ribnjaka litoral, umesto V_9 korišćena je V_7), V_{12} – minimalna količina rastvorenog kiseonika u vodi tokom letnjih meseci, V_{14} – prosečan nivo pH tokom godine

Ove vrednosti su očitavane sa grafika koji su prikazani u Edwards i Twomey (1982) i sve se kreću od 0 (minimalna vrednost) do 1 (optimalna vrednost).

3.10. Hemijske analize hrane i mesa ribe

Procenat vode u mesu je određivan gravimetrijski, sušenjem do konstantne težine u pećnici na 110 °C tokom 24 h. Sadržaj proteina je određivan metodom po Kjeldahl-u na automatskom aparatu za destilaciju proteina Tecator Kjeltex Auto 1030 Analyser (Foss Benelux, Belgija). Sadržaj masti je određivan metodom kisele hidrolize na aparatu Soxtec System 1047 (Foss, Švedska), koja je praćena ekstrakcijom u petrolej etru (temperatura ključanja 40-60°C) na aparatu Soxtec System HT6 (Foss, Švedska). Procenat pepela u uzorcima je određivan sušenjem uzoraka u porcelanskim avanima u pećnici na 600°C preko noći. Sirova vlakna su ekstrahovana uz pomoć aparata Tecator 1020 (Foss, Švedska) na temperaturi od 550 °C u trajanju od 2 h. Metode ekstrakcije su opisane u priručniku Međunarodnog udruženja analitičkih hemičara (AOAC, 1990). Sve hemijske analize mesa ribe urađene su u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

3.11. Određivanje sadržaja masnih kiselina

Ukupni lipidi, za određivanje masnih kiselina, ekstrahovani su metodom ubrzane ekstrakcije rastvaračima na aparatu ASE 200 (Dionex, SAD). Homogenizovani uzorak, pomešan sa dijatomejskom zemljom, ekstrahovan je smešom heksana i izo-propanola u 33 ml ekstrakcionoj ćeliji, na temperaturi od 100°C i pod pritiskom od 1500 psi. Dobijeni ekstrakt uparen je u struji azota, na 50°C, do suvog ostatka masti. Metilestri masnih kiselina su pripremljeni transesterifikacijom sa trimetilsulfonijum-hidroksidom, prema metodi EN ISO 5509:2000. Analizirani su na gasnom hromatografu GC/FID 2010 (Shimadzu, Japan) na cijanopropil-aril kapilarnoj koloni HP-88 (100 m × 0,25 mm × 0,20 µm; J&W Scientific, SAD). Temperature injektora i detektora su bile 250°C, odnosno 280°C. Noseći gas je bio azot, a protok 1,33 ml/min, sa odnosom splita 1:50. Injektovana zapremina bila je 1 µL. Temperatura peći kolone bila je programirana u opsegu od 125° do 230°C. Ukupno vreme trajanja analize bilo je 50,5 minuta. Metilestri masnih kiselina su identifikovani na osnovu retencionih vremena,

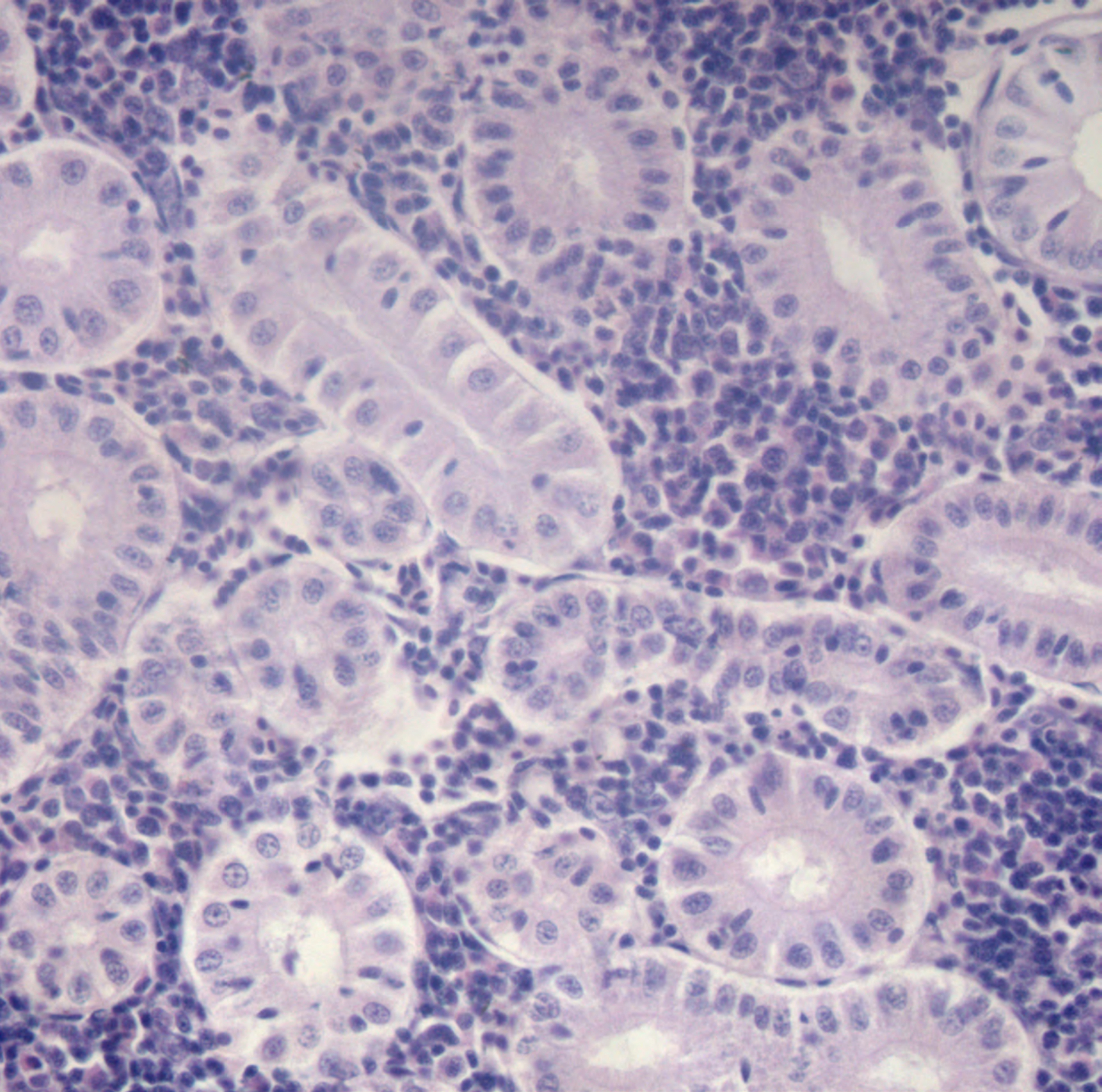
poređenjem sa retencionim vremenima pojedinačnih jedinjenja u standardu smeše metilestara masnih kiselina, Supelco 37 Component FAME Mix (Bellefonte, SAD). Sadržaj masnih kiselina izražen je kao procenat od ukupno identifikovanih masnih kiselina. Analiza sastava masnih kiselina u mesu šarana i hrani za ribe, urađena je u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa u Beogradu.

3.12. Statistička analiza

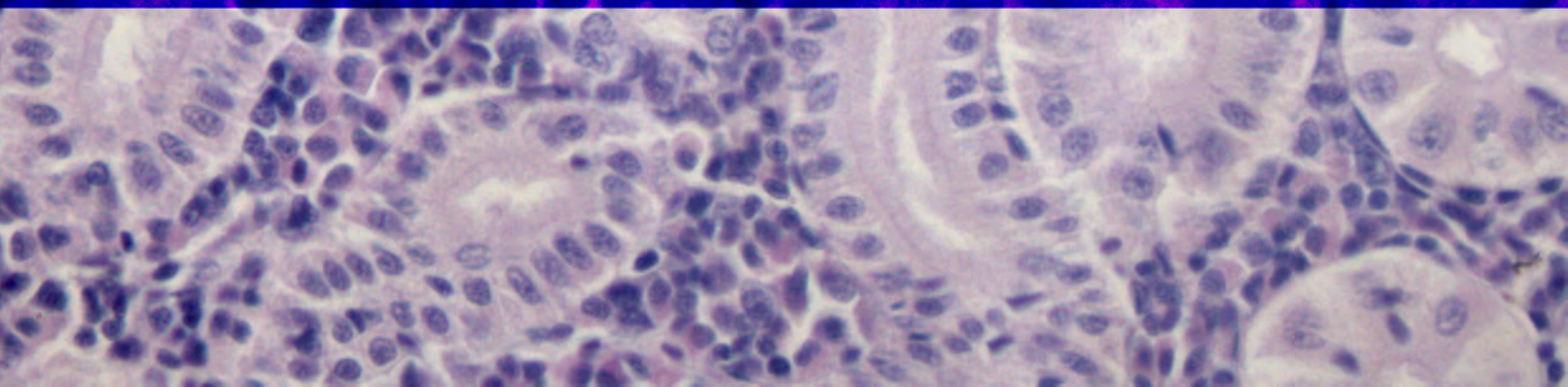
Poređenja parametara u istraživanju između različitih grupa su urađena korišćenjem parametarske ili neparametarske statistike, u zavisnosti od toga da li je koeficijent varijacije u grupi podataka bio manji ili veći od 30%. Ukoliko je koeficijent varijacije bio veći od 30% korišćena je neparametarska statistika, a ukoliko je koeficijent varijacije bio manji od 30%, podaci su morali da zadovolje i test homogenosti varijanse. Za izračunavanja homogenosti varijanse korišćen je Leveneov test. Tek ako su podaci zadovoljili uslov i prošli ovaj test, oni su obrađivani parametarskom statistikom. Sledi lista parametara i vrsta testova kojim su podaci statistički obrađivani:

- **Analiza varijanse praćena sa Takijevim testom:** morfometrijski parametri creva
- **Kruskal-Volis test:** parametri prirasta, morfometrijski i stereološki parametri jetre, polukvanitativna analiza histopatoloških promena između grupa
- **Man-Vitni U test:** polukvanitativna analiza histopatoloških promena između prve i druge godine
- **Pirsonova korelacija:** korelacija prirasta i dužine vilusa
- **Spirmanova korelacija:** korelacije između prirasta u obe godine eksperimenta, korelacije između parametara kvaliteta vode i polukvanitativni histološki indeksi
- **Analiza principijelnih komponenti:** poređenje masnih kiselina po grupama
- **Kanonijska diskriminantna analiza:** analiza histopatoloških promena između tkiva i godina istraživanja

Svi podaci su prikazani kao srednje vrednosti \pm standardna devijacija. Podaci su obrađivani u programu Statistica 6.0 (StatSoft, SAD). Statistička značajnost prihvatana je za $p < 0.05$. U tabelama je nivo statističke značajnosti obeležavan sa različitim slovima u eksponentu: ista slova u redu - nema statističke značajnosti; različita slova u redu - postoji statistička značajnost.



4. REZULTATI



4.1. Parametri rasta

Pored ukupnih parametara rasta koji su izračunavani na kraju eksperimenta, praćeni su i parametri po periodima. Meseci su grupisani po sledećem principu: maj i juni - prvi period, juli i avgust - drugi period, septembar i oktobar - treći period. Ovakvo grupisanje je omogućilo da razdvojimo periode u kojima je razvijena prirodna hrana u ribnjaku (I period), period sa visokim temperaturama i povišenim intenzitetom metabolizma u kome je prirodna hrana u ribnjaku prisutna u tragovima (II period) i period u kome postepeno dolazi do opadanja temperature vode u ribnjaku, samim tim se snižava metabolizam riba, a prirodna hrana se ponovo pojavljuje u ribnjaku, ali u manjoj količini u odnosu na prvi period (III period).

4.1.1. Parametri rasta na početku i kraju eksperimenta

U **tabeli 3** je prikazana prosečna pojedinačna masa riba na početku i kraju eksperimenta.

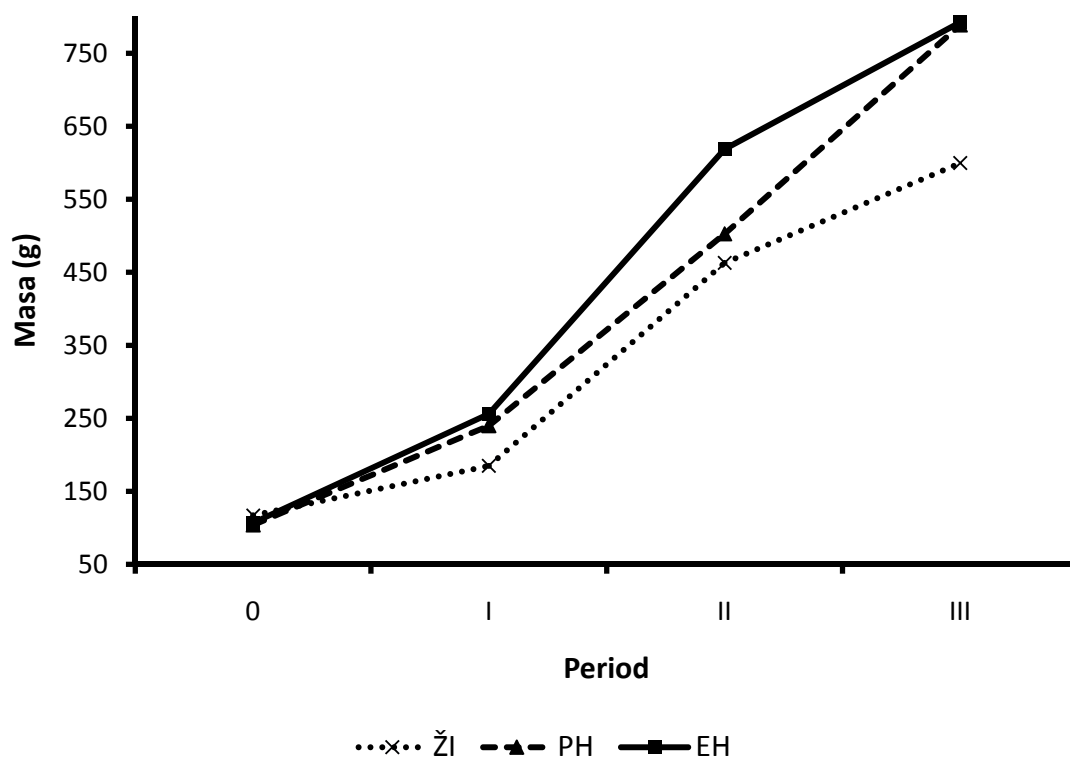
Tabela 3. Parametri rasta na početku i kraju eksperimenta; vrednosti u istom redu koje su obeležene različitim slovima u eksponentu pokazuju statistički značajne razlike ($p < 0.05$)

Parametri	Grupa			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Masa riba na početku eksperimenta (g)	109.9 ± 24.0	103.0 ± 24.0	106.8 ± 23.0	0.177
Masa riba na kraju eksperimenta (g)	599.6 ± 218.9 ^a	788.7 ± 253.0 ^b	792.4 ± 310.4 ^b	0.000
Prirast (g)	482.5 ± 202.05 ^a	684.7 ± 234.6 ^b	685.6 ± 289.6 ^b	0.000
Prirast (%)	397.0 ± 206.8 ^a	623.1 ± 134.7 ^b	614.2 ± 35.6 ^b	0.000
Dužina riba na početku eksperimenta (cm)	19.76 ± 0.94	18.87 ± 1.41	19.20 ± 0.91	0.743
Dužina riba na kraju eksperimenta (cm)	32.52 ± 1.30 ^a	36.27 ± 0.95 ^b	34.98 ± 0.91 ^{ab}	0.000
Visina riba na početku eksperimenta (cm)	5.47 ± 0.02	5.27 ± 0.17	5.58 ± 0.27	0.367
Visina riba na kraju eksperimenta (cm)	9.67 ± 1.02	11.03 ± 1.26	11.23 ± 1.11	0.436
SGR (% / dan)	1.09 ± 0.23 ^a	1.38 ± 0.18 ^b	1.34 ± 0.20 ^b	0.002
TGC	0.98 ± 0.28 ^a	1.27 ± 0.19 ^b	1.25 ± 0.01 ^b	0.003
FCR (g)	1.76 ± 0.46 ^a	1.54 ± 0.75 ^b	1.56 ± 0.80 ^b	0.000
Početna vrednost FC	1.52 ± 0.22	1.54 ± 0.23	1.50 ± 0.19	0.430
Krajnja vrednost FC	1.68 ± 0.34	1.64 ± 0.34	1.76 ± 0.70	0.109

Na početku eksperimenta nije bilo razlike između prosečne mase ribe u jezerima. Na kraju eksperimenta su grupe riba hranjene komercijalnim hranama pokazivale više prosečne vrednosti mase riba i prirasta u odnosu na žitarice ($p < 0.05$).

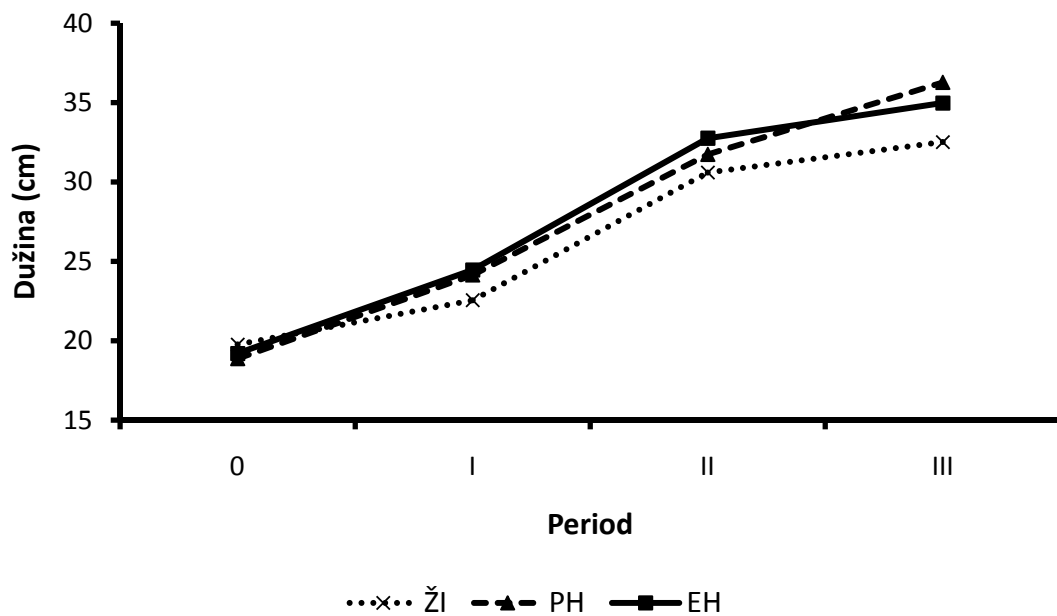
4.1.2. Masa i dimenzije riba po periodima

Vrednosti prosečne mase, dužine i visine riba su se povećavale tokom trajanja eksperimenta u svim grupama (**Grafici 1, 2 i 3**). Umesto kretanja prosečne mase riba po periodima, obrađeno je kretanje prirasta po periodima i ono je detaljno opisano u sledećem odeljku (**4.1.3.**).



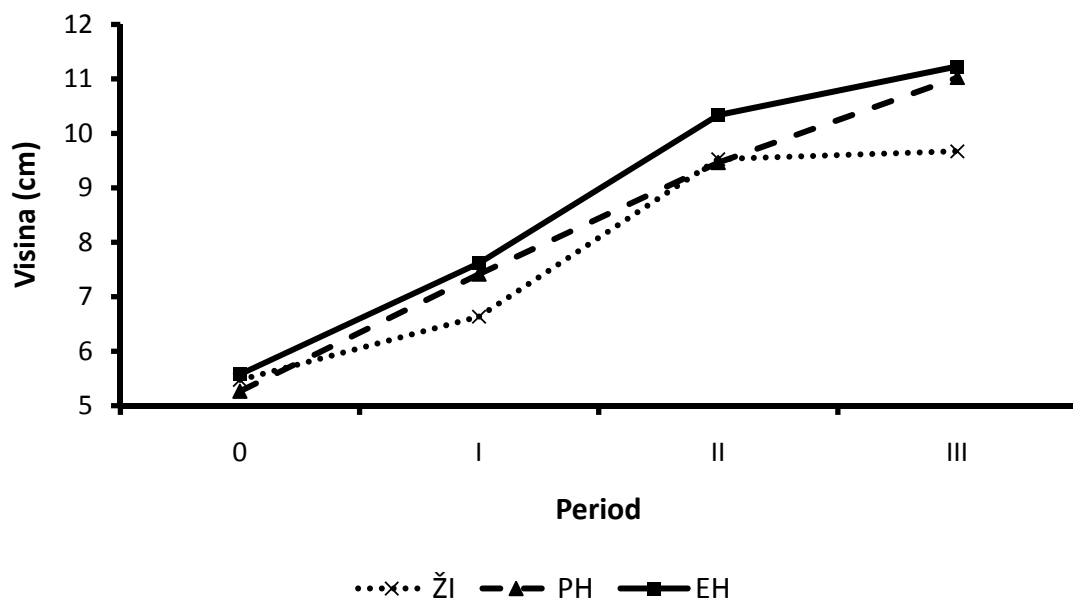
Grafik 1. Prosečna masa riba tokom trajanja eksperimenta po grupama

Prosečne vrednosti dužina riba na kraju eksperimenta su pokazale statistički značajnu razliku između grupe riba hranjene žitaricama i grupe hranjene peletiranom hranom (**Tabela 3**; $p < 0.001$). Ribe hranjene žitaricama su dostigle manju dužinu od grupe hranjene peletiranom hranom, dok se obe ove grupe nisu statistički razlikovale od grupe hranjene ekstrudiranom hranom.



Grafik 2. Prosečna dužina riba tokom trajanja eksperimenta po grupama

Vrednosti visine riba se nisu statistički razlikovale između grupa na kraju eksperimenta (Tabela 3).



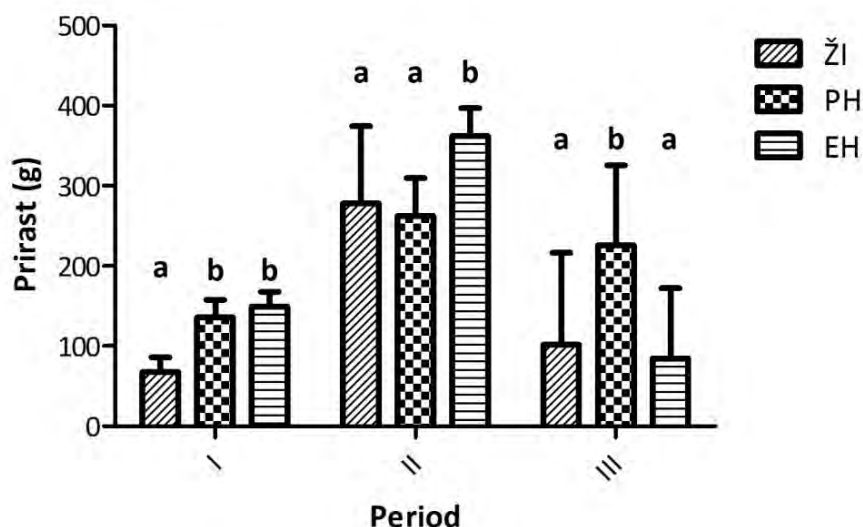
Grafik 3. Prosečna visina riba tokom trajanja eksperimenta po grupama

Ukoliko posmatramo kretanje parametara dužine i visine riba po periodima, primetna je pravilnost koja važi za oba ova parametra, da statistički značajna

razlika postoji samo u I periodu ($p < 0.05$), kod obe grupe riba hranjenih komercijalnom hranom u odnosu na ribe hranjene žitaricama. U II i III periodu nije bilo statistički značajne razlike između grupa ni u dužini ni u visini riba.

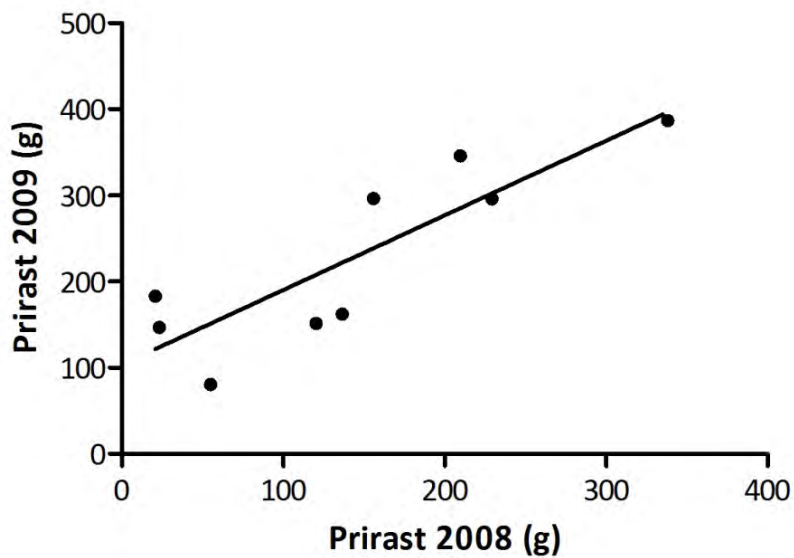
4.1.3. Vrednosti prirasta riba po periodima

Prirast riba u sva tri jezera je u obe godine eksperimenta pokazivao određenu pravilnost. Prikaz kretanja prirasta po periodima se može videti na **grafiku 4**. U prvom periodu ribe u grupama EH i PH su imale statistički značajno viši prirast u odnosu na grupu riba hranjenih žitaricama ($p < 0.05$). U toku drugog perioda, ribe iz grupe EH su prirastale više u odnosu na druge dve grupe ($p < 0.05$), dok je u trećem periodu grupa riba hranjenih peletiranom hranom pokazivala najviše vrednosti prirasta u odnosu na druge dve grupe ($p < 0.05$). S obzirom na to da su vrednosti prirasta u procentima bile slične vrednostima prirasta u gramima, ove vrednosti su prikazane samo u **tabeli 3**, a nisu date po periodima.



Grafik 4. Kretanje prirasta po periodima i grupama u toku eksperimenta; različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa u istom periodu ($p < 0.05$)

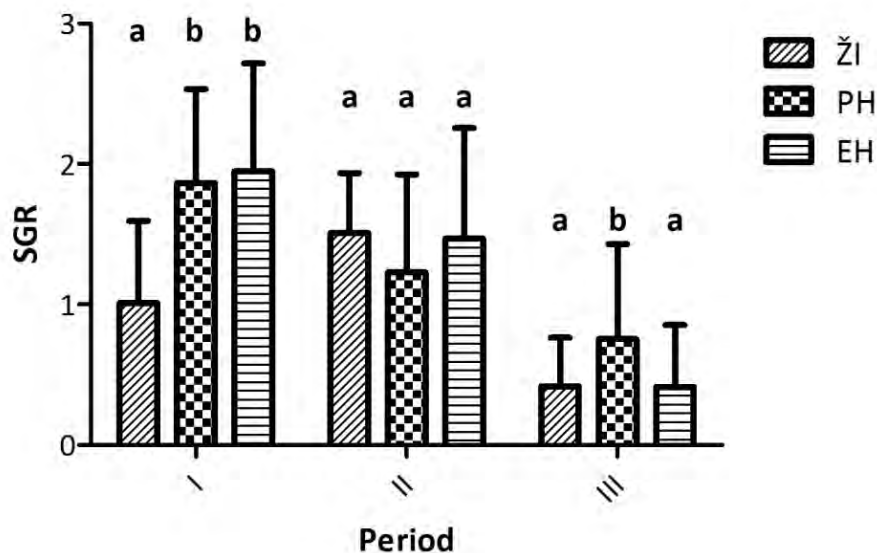
Ukoliko se rezultati iz obe godine sjedine, kretanje prirasta pokazuju veoma slične vrednosti kao i u toku svake od dve godine istraživanja, posmatrane pojedinačno. To je potvrđeno računanjem koeficijenta korelacije između dve godine istraživanja koji je vrlo visok ($R = 0.860$, $p = 0.003$; **Grafik 5**).



Grafik 5. Korelacija prirasta između dve godine eksperimenta

4.1.4. Vrednosti SGR-a po periodima

Ukupna vrednost SGR-a tokom trajanja eksperimenta pokazuje više vrednosti kod riba hranjenih komercijalnom hranom od žitarica (Tabela 3; $p=0.002$). Ukoliko se uporede vrednosti po periodima (Grafik 6), u okviru prvog perioda, vrednosti SGR-a su više u grupama EH i PH u odnosu na ŽI ($p<0.05$).

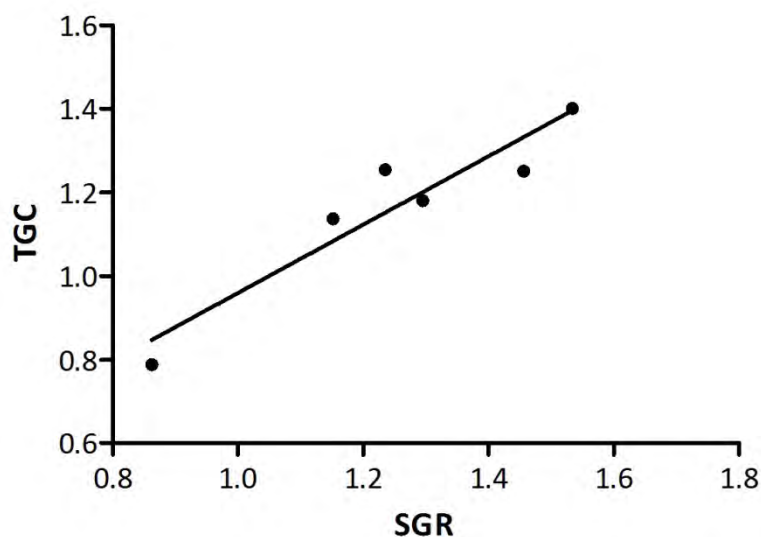


Grafik 6. Kretanje SGR-a po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta; različita slova označavaju statistički značajne razlike između grupa u istom periodu ($p<0.05$)

U drugom periodu su se vrednosti SGR-a kod komercijalnih hrana smanjile, dok se vrednost kod riba hranjenih žitaricama povisila, pa tako između grupa nije bilo statistički značajnih razlika. Vrednosti SGR-a karakteriše nagli pad u svim jezerima tokom trećeg perioda. Ipak, u okviru trećeg perioda, ribe koje su hranjene peletiranom hranom pokazuju najviše vrednosti SGR-a ($p < 0.05$).

4.1.5. Vrednosti TGC-a po periodima

Vrednosti TGC-a dobijenih u eksperimentu u potpunosti korespondiraju sa vrednostima SGR-a. To se može videti na **grafiku 7** i potvrda toga je veoma visok koeficijent korelacije koji iznosi 0.942 ($p = 0.005$). Zbog sličnih vrednosti i odsustva razlike između ova dva parametra prirasta nije prikazano kretanje TGC-a po periodima.

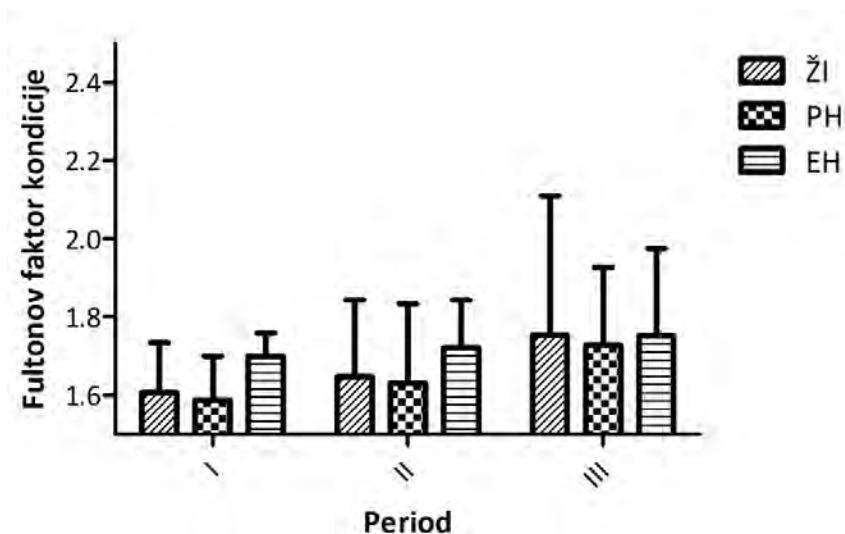


Grafik 7. Korelacija između TGC-a i SGR-a tokom trajanja eksperimenta

4.1.6. Fultonov faktor kondicije po periodima

Vrednosti Fultonovog faktora kondicije nisu pokazivali razliku između grupa na početku eksperimenta (**Tabela 3**). Iako su u toku eksperimenta ove vrednosti rasle u odnosu na početne, ni u jednom trenutku, kao i na kraju eksperimenta ove vrednosti se nisu razlikovale između grupa (**Grafik 8**). Ukoliko se vrednosti Fultonovog faktora kondicije posmatraju po periodima, primetno je da nema statistički značajne razlike između grupa riba ni u jednom periodu. Iako

su vrednosti ovog faktora u grupi EH bile više od druge dve grupe u periodima II i III, ova razlika nije statistički značajna.



Grafik 8. Kretanje SGR-a po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta

4.1.7. Stopa preživljavanja

Stopa preživljavanja riba u jezerima se razlikovala između dve godine studija. U prvoj godini prosečna stopa preživljavanja po završetku eksperimenta je iznosila $59.16 \pm 4.69\%$, dok je u drugoj godini istraživanja prosečna stopa preživljavanja iznosila $87.76 \pm 2.80\%$. Razlika je potvrđena i preko statističkih testova, korišćenjem analize varijanse ($p < 0.001$).

4.1.8. Indeks podobnosti staništa

Kao što je slučaj sa stopom preživljavanja i vrednosti indeksa podobnosti staništa su pokazivale statistički značajnu razliku između dve godine istraživanja ($p = 0.006$). U toku prve godine istraživanja indeks podobnosti staništa je iznosio 0.040 ± 0.013 , dok je u drugoj godini istraživanja ovaj indeks imao vrednost od 0.206 ± 0.053 .

4.2. Parametri kvaliteta vode

S obzirom na činjenicu da je voda kojom su se jezera napajala bila iz različitih izvora u svakoj od dve godine istraživanja, u radu su parametri kvaliteta vode prikazani odvojeno za svaku godinu.

4.2.1. Parametri kvaliteta vode u prvoj godini istraživanja

Tokom prve godine istraživanja za napajanje jezera je korišćena kombinacija površinske vode iz obližnjeg potoka i bunarske vode iz dva bunara koji se nalaze blizu ribnjačkih jezera. U **tabeli 4** se mogu videti prosečne vrednosti parametara kvaliteta vode sumirani u toku cele sezone gajenja.

Tabela 4. Prosečne vrednosti kvaliteta vode po jezerima tokom prve godine istraživanja; različita slova u eksponentu označavaju statistički značajnu razliku u okviru istog parametra ($p < 0.05$)

Parametar	Jezero			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Temperatura (°C)	23.81 ± 5.92	23.67 ± 5.79	23.45 ± 5.64	0.865
Providnost (m)	14.14 ± 3.52 ^a	16.33 ± 3.22 ^b	14.14 ± 3.05 ^a	0.000
Elektroprovodljivost (μS/cm)	949.7 ± 77.1 ^a	1044.9 ± 75.0 ^b	959.2 ± 99.2 ^a	0.000
Kiseonik (mg/L)	11.27 ± 5.38	10.50 ± 4.72	10.66 ± 5.80	0.398
pH	9.66 ± 0.66	9.65 ± 0.61	9.66 ± 0.63	0.993
Nitrati (mg/L)	3.61 ± 1.96	3.15 ± 2.02	3.49 ± 3.11	0.891
Utročak KMnO ₄ (mg/L)	75.49 ± 46.14	65.20 ± 35.39	74.95 ± 38.09	0.780
Tvrdoća vode (dH)	20.73 ± 3.23	22.63 ± 3.22	20.02 ± 2.73	0.115
Ortofosfati (mg/L)	0.035 ± 0.050	0.059 ± 0.089	0.034 ± 0.048	0.563
Ukupni fosfor (mg/L)	0.40 ± 0.24	0.35 ± 0.18	0.41 ± 0.17	0.751
Amonijačni azot (mg/L)	0.12 ± 0.10	0.17 ± 0.14	0.11 ± 0.07	0.467
Nejonizovani amonijak (mg/L)	0.10 ± 0.05	0.14 ± 0.07	0.08 ± 0.05	0.293
Ukupni azot (mg/L)	3.38 ± 1.05	3.32 ± 1.22	3.76 ± 1.46	0.750

Razlike između jezera su bile prisutne samo za dva parametra: za providnost i elektroprovodljivost. U oba slučaja se razlikovalo jezero PH, odnosno vrednosti oba parametra su bile više u jezeru u kome su ribe hranjene peletiranom hranom. Preporučene minimalne vrednosti elektroprovodljivosti prilikom gajenja šarana iznose 300 μS/cm a vrednosti u sva tri jezera su više od ove granične vrednosti. Izmereni minimumi po jezerima su bili: 728.0 μS/cm (EH), 911.0 μS/cm (PH) i 755.0 μS/cm (ŽI). Providnost je u jezeru PH bila najveća tokom svih meseci eksperimenta, nekada je dostizala i vrednosti od 27 cm. Vrednosti su oscilirale iz meseca u mesec sa prosečnim vrednostima tokom trajanja eksperimenta od 14.14 (ŽI i EH) do 16.33 u jezeru PH.

Ove prosečne vrednosti su uglavnom u okviru preporučenih za gajenje šarana (Boyd, 1982). Međutim, u pojedinim vremenskim periodima je primećeno da neki faktori izlaze iz tih granica i to su:

- 1. Temperatura** – Prosečna temperatura vode tokom eksperimenta u svim jezerima nije prelazila 28 °C. Ukoliko analiziramo ekstremne vrednosti, u maju mesecu temperatura vode je dostigla 34.6 °C (jezero ŽI), dok je tokom septembra najniža temperatura izmerena u jezerima bila 12.4 °C (jezera PH i ŽI). Ove vrednosti su očekivane za umereno kontinentalnu klimu u kojoj se naša zemlja nalazi. Temperatura vode u jezerima oscilira podjednako i nijedno jezero ne odskaje u pogledu temperaturnih vrednosti (**Tabela 5**).

Tabela 5. Vrednosti temperature po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	27.2 (22.0-34.6)	27.9 (18.8-34.4)	26.8 (16.9-32.3)	27.1 (20.2-30.6)	19.7 (12.4-26.6)	15.8 (12.6-19.6)
PH	26.1 (21.8-32.5)	27.4 (19.8-33.3)	26.9 (17.3-31.5)	27.3 (19.9-31.1)	19.8 (12.4-27.6)	15.7 (12.6-19.4)
EH	26.3 (21.6-33.2)	27.5 (19.2-33.2)	26.2 (17.3-30.6)	26.7 (20.7-30.6)	19.6 (12.6-28.3)	15.7 (12.5-19.1)

- 2. Količina rastvorenog kiseonika u vodi** - vrednost količine rastvorenog kiseonika u vodi ne bi trebala da bude manja od 2 mg/L, jer pri tim uslovima dolazi do otežane razmene gasova i moguć je pomor ribe, a kao optimalna vrednost se navodi 5 mg/L. U jezerima je u pojedinim danima izmereno čak samo 0.7 mg/L (25.07.2008. jezera EH i PH), međutim ove vrednosti su bile kratkotrajne i nakon jednog dana su se vraćale u normalu. U danima kada je količina rastvorenog kiseonika bila niska nije primećen pomor ribe. Pravilnost u promeni količina rastvorenog kiseonika u vodi se odražavala na sva jezera podjednako (**Tabela 6**). Vrednosti u jezeru ŽI su često bile više od jezera u kojima je za ishranu riba korišćena komercijalna hrana, ali ta vrednost nigde nije pokazala statistički značajnu razliku.

Najniže vrednosti rastvorenog kiseonika u vodi su bile tokom juna i jula, međutim ni tada u proseku nisu padale ispod 5 mg/L. Tokom trajanja eksperimenta vrednosti rastvorenog kiseonika su bile u optimalnim vrednostima u maju, septembru i oktobru, dok je u toku letnjih meseci (juni, juli i avgust) dolazilo do pojave veoma niskih minimalnih vrednosti.

Tabela 6. Vrednosti količine rastvorenog kiseonika po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	13.2 (6.1-23.5)	8.0 (4.1-16.2)	6.9 (1.0-23.3)	14.0 (7.7-22.2)	13.9 (4.8-23.3)	12.8 (5.3-26.7)
PH	13.1 (5.2-20.3)	8.0 (2.9-16.4)	5.9 (0.7-15.6)	12.3 (2.4-19.4)	12.8 (4.5-19.4)	12.5 (6.3-21.7)
EH	11.3 (5.6-20.7)	8.6 (2.8-16.5)	5.8 (0.7-11.6)	11.5 (1.7-23.7)	12.2 (4.2-27.0)	15.1 (4.6-33.7)

3. pH – u toku 2008. godine pH vrednosti su veoma oscilirale od meseca do meseca, s tim što su u toku prvog meseca (maj) prosečne, maksimalne i minimalne vrednosti bile niže u odnosu na ostale mesece. Maksimalne izmerene vrednosti su se često približavale pH od 11 koji je letalan za ribe (juli i oktobar mesec - sva tri jezera) i u tim mesecima su se i prosečne vrednosti išle iznad 10. Kretanje vrednosti pH je bilo slično za sva tri jezera tokom trajanja eksperimenta i ni u jednom jezeru nije zabeleženo značajnije odstupanje (**Tabela 7**).

Tabela 7. Vrednosti pH vrednosti po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	8.82 (7.74-9.61)	9.51 (7.57-10.36)	9.81 (7.32-10.70)	9.74 (8.67-10.45)	9.65 (9.10-10.23)	10.39 (9.78-10.93)
PH	8.61 (7.75-9.42)	9.46 (7.78-10.10)	10.06 (9.33-10.90)	9.55 (8.82-10.26)	9.69 (9.08-10.29)	10.37 (9.74-10.84)
EH	8.52 (7.89-9.19)	9.50 (7.86-10.10)	10.04 (9.18-10.96)	9.66 (8.47-10.56)	9.66 (9.03-10.04)	10.34 (9.83-10.85)

4. Utrošak kalijum permanganata – ovaj parametar koji je važan pokazatelj količine organske materije u vodi je bio značajno niži tokom prva dva meseca eksperimenta, u maju i junu (**Tabela 8**). Tokom jula, avgusta, septembra i oktobra, prosečne vrednosti hemijske potrošnje kiseonika nisu padale ispod 80 mg/L, sa maksimalnim pojedinačnim vrednostima od 122 mg/L u jezeru u kome su ribe hranjene ekstrudiranom hranom tokom oktobra.

Tabela 8. Vrednosti utroška kalijum permanganata po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	18.4 (10.8-26.0)	43.1 (5.1-81.0)	80.5 (69.0-92.0)	90.0 (82.0-98.0)	92.0 (76.0-108.0)	79.0 (55.0-103.0)
PH	14.1 (7.2-21.0)	34.6 (4.2-65.0)	86.5 (74.0-99.0)	83.5 (82.0-85.0)	87.5 (73.0-102.0)	85.0 (67.0-103.0)
EH	23.2 (12.4-34.0)	42.5 (7.0-78.0)	89.5 (84.0-95.0)	105.0 (92.0-118.0)	83.0 (67.0-99.0)	106.5 (91.0-122.0)

5. Količina ukupnog amonijaka (TAN, engl. total ammonia nitrogen) i njegove nejonizovane frakcije (IAN, engl. ionized ammonia nitrogen) u vodi – poznato je da je količina amonijaka u vodi jedan od najznačajnijih parametara vodene sredine za ribe. Zato su rezultati prikazani u dve tabele: kao ukupna količina amonijaka u vodi (**Tabela 9**) i njegove nejonizovane frakcije koja je najopasnija za ribe (**Tabela 10**). Tokom trajanja eksperimenta, u prvoj godini su primećene niže vrednosti samo u prvom i poslednjem mesecu (maj i oktobar). Tokom ostalih meseci, vrednosti su se kretale oko prosečnih (0.13 za ukupni amonijak, odnosno 0.11 za nejonizovanu frakciju). Primetno je da su ova dva parametra sličnih vrednosti, a to se dešava zbog visokih nivoa pH i temperature, koji utiču na procenat nejonizovane frakcije u ukupnom amonijaku u vodi.

Tabela 9. Vrednosti ukupnog amonijaka u vodi po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	0.04 (0.01-0.08)	0.22 (0.08-0.35)	0.13 (0.12-0.14)	0.12 (0.08-0.15)	0.17 (0.07-0.26)	0.06 (0.02-0.10)
PH	0.05 (0.01-0.10)	0.25 (0.18-0.31)	0.18 (0.17-0.18)	0.16 (0.11-0.21)	0.27 (0.06-0.47)	0.06 (0.06-0.06)
EH	0.10 (0.01-0.20)	0.19 (0.15-0.22)	0.11 (0.09-0.13)	0.15 (0.12-0.18)	0.09 (0.04-0.13)	0.04 (0.03-0.04)

Tabela 10. Vrednosti nejonizovane frakcije amonijaka po mesecima tokom prve godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	0.03 (0.01-0.06)	0.18 (0.07-0.29)	0.13 (0.12-0.14)	0.09 (0.04-0.13)	0.12 (0.05-0.19)	0.04 (0.01-0.07)
PH	0.02 (0.01-0.02)	0.20 (0.16-0.24)	0.18 (0.17-0.18)	0.09 (0.05-0.13)	0.18 (0.04-0.32)	0.04 (0.03-0.04)
EH	0.04 (0.01-0.08)	0.15 (0.13-0.17)	0.11 (0.09-0.13)	0.07 (0.06-0.08)	0.06 (0.02-0.10)	0.02 (0.01-0.02)

Zbog gore opisanih uslova sredine u jezerima, koji variraju u svim jezerima istovremeno i ne pokazuju značajne razlike između jezera, rezultati kvaliteta vode po grupama su spojeni i u daljem tekstu posmatrani kao jedna vrednost. Na ovaj način su parametri kvaliteta vode upoređivani sa drugom godinom eksperimenta i histopatološkim vrednostima.

4.2.2. Parametri kvaliteta vode u drugoj godini istraživanja

Tokom druge godine istraživanja za napajanje jezera, korišćena je voda iz arteskog bunara, sa dubine od 130 m. Primetno je da su mnogi parametri kvaliteta vode drugačiji od parametara izmerenih tokom prve godine istraživanja i prosečne vrednosti po jezerima su prikazane u **tabeli 11**.

Tabela 11. Prosečne vrednosti kvaliteta vode po jezerima tokom druge godine istraživanja; različita slova u eksponentu označavaju statistički značajnu razliku u okviru istog parametra ($p < 0.05$)

Parametar	Jezero			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Temperatura (°C)	22.75 ± 2.99	22.73 ± 2.98	22.58 ± 2.88	0.870
Providnost (m)	11.51 ± 4.32	13.95 ± 3.05	12.54 ± 3.29	0.615
Elektroprovodljivost (μS/cm)	2073.3 ± 108.9	2026.4 ± 99.9	2002.4 ± 119.4	0.154
Kiseonik (mg/L)	4.08 ± 1.48	3.65 ± 1.76	3.75 ± 1.88	0.107
pH	8.93 ± 0.12 ^b	8.96 ± 0.13 ^b	9.07 ± 0.16 ^a	0.000
Nitrati (mg/L)	6.04 ± 4.23	4.03 ± 1.39	4.83 ± 1.29	0.610
Potrošnja KMnO ₄ (mg/L)	71.71 ± 11.26	70.00 ± 7.53	81.62 ± 15.56	0.062
Tvrdoća vode (dH)	6.13 ± 2.93	5.55 ± 2.86	3.76 ± 1.43	0.086
Ortofosfati (mg/L)	0.247 ± 0.121	0.196 ± 0.072	0.216 ± 0.131	0.621
Ukupni fosfor (mg/L)	0.48 ± 0.45	0.57 ± 0.64	0.58 ± 0.75	0.965
Amonijačni azot (mg/L)	0.32 ± 0.26	0.35 ± 0.25	0.42 ± 0.30	0.584
Nejonizovani amonijak (mg/L)	0.11 ± 0.08	0.10 ± 0.07	0.11 ± 0.09	0.924
Ukupni azot (mg/L)	2.49 ± 0.69	2.00 ± 2.12	3.16 ± 1.63	0.784

Tokom 2009. godine, još je bilo manje faktora koji su pokazivali razliku u kvalitetu vode između grupa. Naime, od svih ispitivanih parametara, samo je pH pokazivao statistički značajnu razliku (0.045) između jezera i njegova vrednost je bila viša u jezeru EH.

Kao i u prikazu rezultata za prethodnu godinu istraživanja i sada su detaljnije dati parametri koji su bitni za zdravlje riba, kao i oni koji izlaze iz okvira preporučenih vrednosti za gajenje šarana u toku druge godine trajanja eksperimenta:

- 1. Temperatura** - Za ralik od prve godine istraživanja, prosečna temperatura vode nije prelazila 25 °C. Pored toga, ekstremne vrednosti su mnogo manje nego tokom prve godine istraživanja. Maksimalna vrednost temperature vode je iznosila 30.3 °C i zabeležena je u mesecu junu (jezera PH i ŽI), dok je tokom oktobra najniža temperatura izmerena u jezerima imala vrednost 16.3 °C (jezero EH). Temperature po mesecima su umerenije i primetno je

da su se prosečne temperature vode kretale u sličnom nivou tokom svih meseci istraživanja, osim u oktobru kada su zbog hladnijeg vremena i niže temperature vazduha i temperature vode bile niže. Kao i u prvoj godini istraživanja, temperatura vode u jezerima oscilira podjednako i nijedno jezero ne odskaje u pogledu temperaturnih vrednosti (**Tabela 12**).

Tabela 12. Vrednosti temperature po mesecima tokom druge godine trajanja istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	25.0 (23.7-24.9)	23.0 (17.4-30.3)	24.0 (20.4-27.8)	25.0 (23.1-28.0)	22.1 (19.2-25.0)	18.4 (16.5-20.4)
PH	24.3 (23.7-24.9)	23.0 (17.4-30.3)	24.0 (20.4-27.8)	25.0 (23.1-28.0)	22.1 (19.2-25.0)	18.4 (16.5-20.4)
EH	24.5 (23.5 -25.5)	22.8 (17.3-28.2)	23.9 (21.1-27.0)	24.8 (22.8-27.6)	22.0 (19.3-24.7)	18.2 (16.3-20.3)

2. Količina rastvorenog kiseonika - Prosečne vrednosti količine rastvorenog kiseonika u vodi su bile izuzetno niske tokom druge godine istraživanja (**Tabela 13**). U toku prva dva meseca su se kretale oko 5 mg/L, međutim, počevši od jula vrednosti su naglo pale, a zatim lagano rasle do kraja eksperimenta i oktobra meseca, ali proseci nisu više prelazili vrednost od 5 mg/L. Iako su vrednosti bile niže od onih izmerenih tokom 2008. godine, interesantno je da su niže minimalne vrednosti izmerene u prvoj godini eksperimenta. Minimalne vrednosti su iznosile 1.0 mg/L (EH), 1.1 mg/L (PH) i 1.2 mg /L (ŽI). I ove godine nije primećen pomor riba u danima kada je količina rastvorenog kiseonika bila niska. Pravilnost u promeni količina rastvorenog kiseonika u vodi se odražavala na sva jezera podjednako. Tokom druge godine trajanja eksperimenta vrednosti rastvorenog kiseonika su bile u okviru optimalnih vrednosti samo u maju i junu mesecu.

Tabela 13. Vrednosti količine rastvorenog kiseonika po mesecima tokom druge godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	5.1 (5.0-5.3)	5.2 (2.0-7.8)	4.0 (2.1-6.1)	3.5 (1.8-5.7)	3.4 (1.7-5.9)	4.2 (1.3-8.9)
PH	4.3 (3.6-5.0)	5.5 (2.2-12.6)	3.3 (1.2-7.5)	3.0 (1.1-7.1)	3.3 (1.7-5.9)	3.2 (2.0-4.8)
EH	5.0 (3.6-6.4)	5.3 (2.5-13.0)	2.7 (1.0-5.0)	2.9 (1.2-5.6)	3.9 (1.6-6.7)	4.2 (2.1-8.2)

3. pH - vrednosti pH u drugoj godini istraživanja su se kretale drugačije u poređenju sa prvom godinom (**Tabela 14**). Dok je tokom meseca maja prve godine eksperimenta prosečni nivo pH bio relativno nizak, nakon toga su se vrednosti podigle iznad 9.5 i ostale na tom nivou do kraja eksperimenta, u drugoj godini istraživanja vrednosti su od početka do kraja eksperimenta oscilirale između 8.85 i 9.21. Pravilnosti u oscilacijama nije bilo, a i maksimalne vrednosti su bile mnogo niže od onih izmerenih tokom 2008. godine i kretale su se od 9.25 - 9.40, u zavisnosti od jezera. Za razliku od prve godine studija, pH vrednosti u jezeru EH su bile više od pH vrednosti u drugim jezerima i to u svim mesecima, osim u maju.

Tabela 14. Vrednosti pH po mesecima tokom druge godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	9.21 (9.17-9.25)	9.04 (8.75-9.18)	8.85 (8.70-9.00)	8.86 (8.68-9.20)	8.92 (8.80-9.40)	8.97 (8.80-9.11)
PH	8.89 (8.83-8.94)	8.98 (8.77-9.15)	8.94 (8.78-9.40)	8.88 (8.24-9.00)	8.96 (8.70-9.36)	9.05 (8.91-9.20)
EH	9.06 (9.03-9.09)	9.08 (8.84-9.25)	8.93 (8.86-8.99)	8.95 (8.82-9.12)	9.15 (8.44-9.47)	9.20 (8.82-9.40)

4. Utrošak kalijum permanganata - slično kao i tokom prve godine

istraživanja, vrednosti potrošnje kalijum permanganata su bile niske tokom prvog meseca (**Tabela 15**), mada vrednosti nisu niske kao u prvoj godini eksperimenta. Počevši od juna dolazi do skoka vrednosti (oko 2 puta i te vrednosti se održavaju na visokom nivou, osim u jezeru EH gde tokom septembra i oktobra dolazi do još jednog povišavanja vrednosti, ovog puta iznad 94 mg/L). Kao što je slučaj i sa vrednostima pH, temperature i rastvorenog kiseonika u vodi i ovde su maksimalne vrednosti niže nego tokom prve godine istraživanja i ni u jednom mesecu ne prelaze 91.8 mg/L, osim u jezeru gde su ribe hranjene ekstrudiranom hranom, gde je maksimalna vrednost zabeležena u oktobru i iznosila je 115.4 mg/L.

Tabela 15. Vrednosti utroška kalijum permanganata po mesecima tokom druge godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	30.5 (10.0-51.0)	68.2 (66.8-69.6)	71.4 (66.4-76.4)	66.6 (65.5-67.7)	79.2 (66.7-91.8)	83.5 (82.7-84.2)
PH	32.5 (7.0-58.0)	69.5 (62.6-76.4)	73.0 (63.2-82.7)	71.1 (70.4-71.7)	70.8 (65.1-76.5)	71.7 (67.1-76.4)
EH	44.5 (12.0-77.0)	71.1 (69.1-73.0)	66.6 (66.4-66.8)	74.4 (70.8-78.0)	94.5 (93.6-95.5)	103.8 (92.3-115.4)

5. Količina amonijaka u vodi (TAN) i njegova nejonizovana frakcija (IAN)

- s obzirom na to da je u drugoj godini istraživanja korišćena voda iz arteskog bunara, nije ni čudno da su vrednosti TAN-a u vodi značajno više nego tokom 2008. godine (**Tabela 16**). Vrednosti TAN-a su i 10 puta više tokom druge godine istraživanja. U isto vreme nejonizovana frakcija ne pokazuje znatno više vrednosti u poređenju sa prvom godinom istraživanja (**Tabela 17**). Razlog ovoj pojavi su niže vrednosti pH i temperature tokom druge godine istraživanja. Kao i većina drugih parametara kretanje TAN-a i IAN-a je slično u svim jezerima. Primetno je i da vrednosti konstantno rastu od maja do oktobra.

Tabela 16. Vrednosti ukupnog amonijaka u vodi po mesecima tokom druge godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	0.01 (0.01-0.01)	0.07 (0.02-0.18)	0.49 (0.20-0.80)	0.36 (0.23-0.53)	0.61 (0.34-0.79)	0.77 (0.64-0.90)
PH	0.01 (0.01-0.01)	0.06 (0.02-0.15)	0.37 (0.24-0.51)	0.41 (0.18-0.78)	0.55 (0.25-0.74)	0.55 (0.49-0.61)
EH	0.01 (0.01-0.01)	0.05 (0.02-0.14)	0.32 (0.08-0.64)	0.42 (0.20-0.72)	0.47 (0.33-0.74)	0.61 (0.57-0.64)

Tabela 17. Vrednosti nejonizovane frakcije amonijaka po mesecima tokom druge godine istraživanja; u tabeli su prikazane prosečne vrednosti, a ispod njih su u zagradama dati intervali, odnosno najniže i najviše izmerene vrednosti u toku jednog meseca

Jezero	Maj	Jun	Jul	Avg	Sep	Okt
ŽI	0.01 (0.01-0.01)	0.03 (0.01-0.07)	0.13 (0.05-0.19)	0.10 (0.06-0.14)	0.17 (0.09-0.22)	0.20 (0.17-0.23)
PH	0.01 (0.01-0.01)	0.02 (0.01-0.05)	0.10 (0.06-0.14)	0.12 (0.05-0.22)	0.17 (0.09-0.23)	0.15 (0.14-0.15)
EH	0.01 (0.01-0.01)	0.02 (0.01-0.06)	0.09 (0.02-0.19)	0.15 (0.06-0.27)	0.17 (0.11-0.24)	0.22 (0.19-0.24)

4.2.3. Razlike u parametrima između dve godine istraživanja

S obzirom na to da su razlike između jezera bile minimalne i u prvoj i u drugoj godini istraživanja, sva jezera u jednoj godini su spojena i time je omogućeno njihovo poređenje. Primećene su značajne razlike u kvalitetu vode i promeni različitih parametara između dve godine istraživanja. Ukoliko uporedimo parametre u okviru godina istraživanja, primetno je da su tokom 2008. godine izmereni značajno viši nivo vrednosti pH, tvrdoće vode i količine rastvorenog kiseonika, dok su u toku 2009. godine izmerene više prosečne vrednosti elektroprovodljivosti, količine ortofosfata i amonijačnog azota, što je i dokazano korišćenjem statističkih analiza (**Tabela 18**).

Tabela 18. Poređenje parametara kvaliteta vode između dve godine istraživanja; različita slova u eksponentu označavaju statistički značajnu razliku u okviru istog parametra ($p < 0.05$)

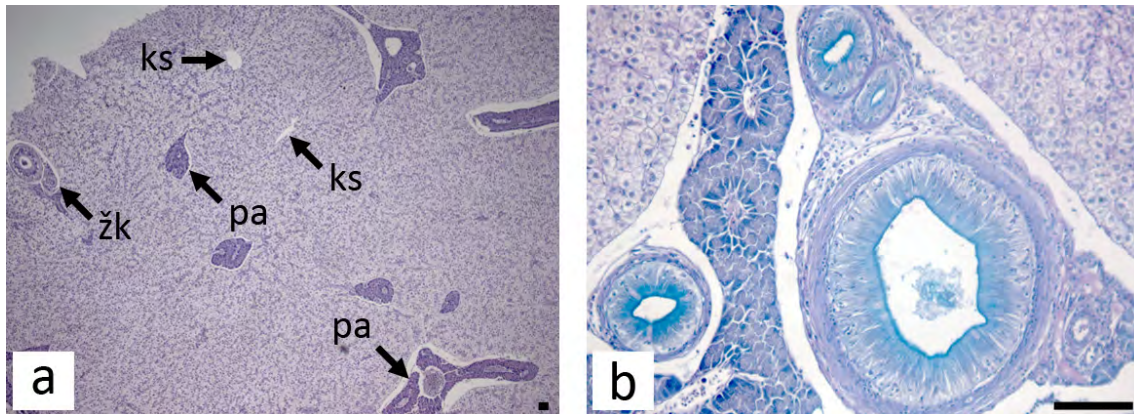
Parametar	Godina		p-vrednost
	2008	2009	
Temperatura (°C)	23.86 ± 4.65	22.80 ± 2.32	0.394
Providnost (m)	14.88 ± 1.72	16.33 ± 3.22	0.187
Elektroprovodljivost (µS/cm)	987.0 ± 71.6 ^a	2051.1 ± 107.9 ^b	0.000
Kiseonik (mg/L)	11.00 ± 2.97 ^a	3.99 ± 0.91 ^b	0.000
pH	9.63 ± 0.54 ^a	9.00 ± 0.11 ^b	0.000
Nitrati (mg/L)	3.42 ± 1.89	4.97 ± 2.47	0.082
Utrošak KMnO ₄ (mg/L)	71.88 ± 33.75	73.41 ± 11.93	0.858
Tvrdoća vode (dH)	21.13 ± 2.14 ^a	5.07 ± 2.14 ^b	0.000
Ortofosfati (mg/L)	0.043 ± 0.046 ^a	0.224 ± 0.091 ^b	0.000
Ukupni fosfor (mg/L)	0.387 ± 0.118	0.619 ± 0.637	0.141
Amonijačni azot (mg/L)	0.13 ± 0.07 ^a	0.34 ± 0.24 ^b	0.001
Nejonizovani azot (mg/L)	0.11 ± 0.08	0.11 ± 0.08	0.916
Ukupni azot (mg/L)	3.38 ± 1.20	2.55 ± 1.34	0.182

Ono što je takođe bitno posebno naglasiti, a što se vidi iz tabela u odeljcima 4.2.1. i 4.2.2. i pomenuto je u tekstu je da su minimalne i maksimalne vrednosti parametara vode koji su mereni svakodnevno po godinama istraživanja ekstremnije tokom 2008. nego tokom 2009. godine.

4.3. Histologija jetre

Jetra svih riba iz eksperimenta je generalno pokazivala normalnu morfologiju tokom celog trajanja eksperimenta. U jetri šarana se ne uočavaju reznjevi i ne postoje vezivne pregrade, lobulusi kao ni vaskularni elementi organizovani u portalne trijade, što je karakteristično za jetru sisara (**Slika 5a**).

Hepatociti nisu organizovani u Remakove gredice, ali čine nizove, koji povremeno anastomoziraju. Vaskularizacija je izražena, sa najčešće krupnim krvnim sudovima. Vidljive su vene, arterije i sinusoidni kapilari. Pored vaskularnih elemenata, u jetri se nalaze i žučni kanali i kanalići. Unutrašnjost žučnih kanalića čine holangiocyte: jednoslojan niskoprizmatičan epitel ili jednoslojan visokoprizmatičan epitel koji na svom apikalnom delu luči mukus, koji se boji plavim pri korišćenju PAS/AB bojenja.

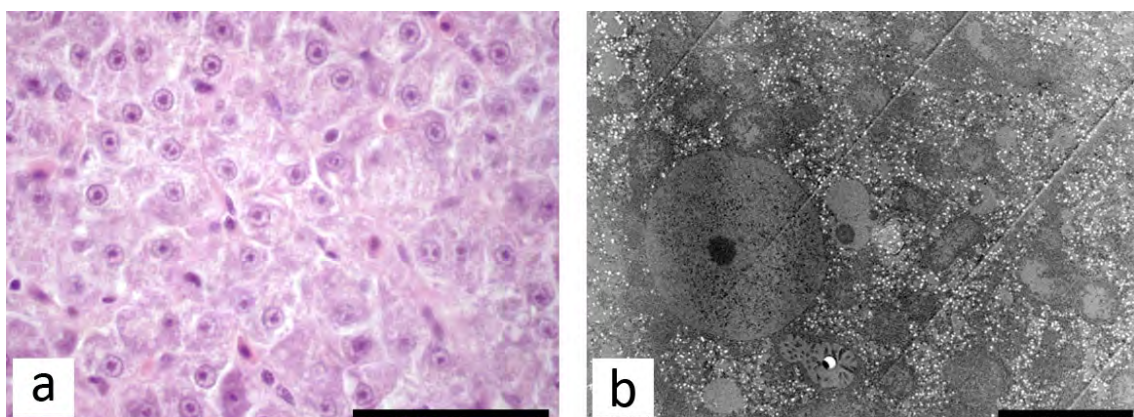


Slika 6. Histološki preseki jetre: a) struktura jetre; ks - krvni sud; pa - pankreas; žk - žučni kanalić; (HE x50); b) Žučni kanalići, pankreasno tkivo organizovano u acinuse i krvni sudovi u jetri (PAS/AB x200); bar = 50 μ m

Visina epitela zavisi od blizine žučnog kanalića portalnoj veni. Posebna odlika familije Cyprinidae, pa i šarana koji spada u ovu grupu riba je prisustvo egzokrinog pankreasa u jetri. Pankreasno tkivo je organizovano u acinuse koji se nalaze oko krvnih sudova (Slika 6a i 6b). Ono se boji tamno ljubičasto pri HE bojenju, odnosno tamno plavo pri PAS/AB bojenju.

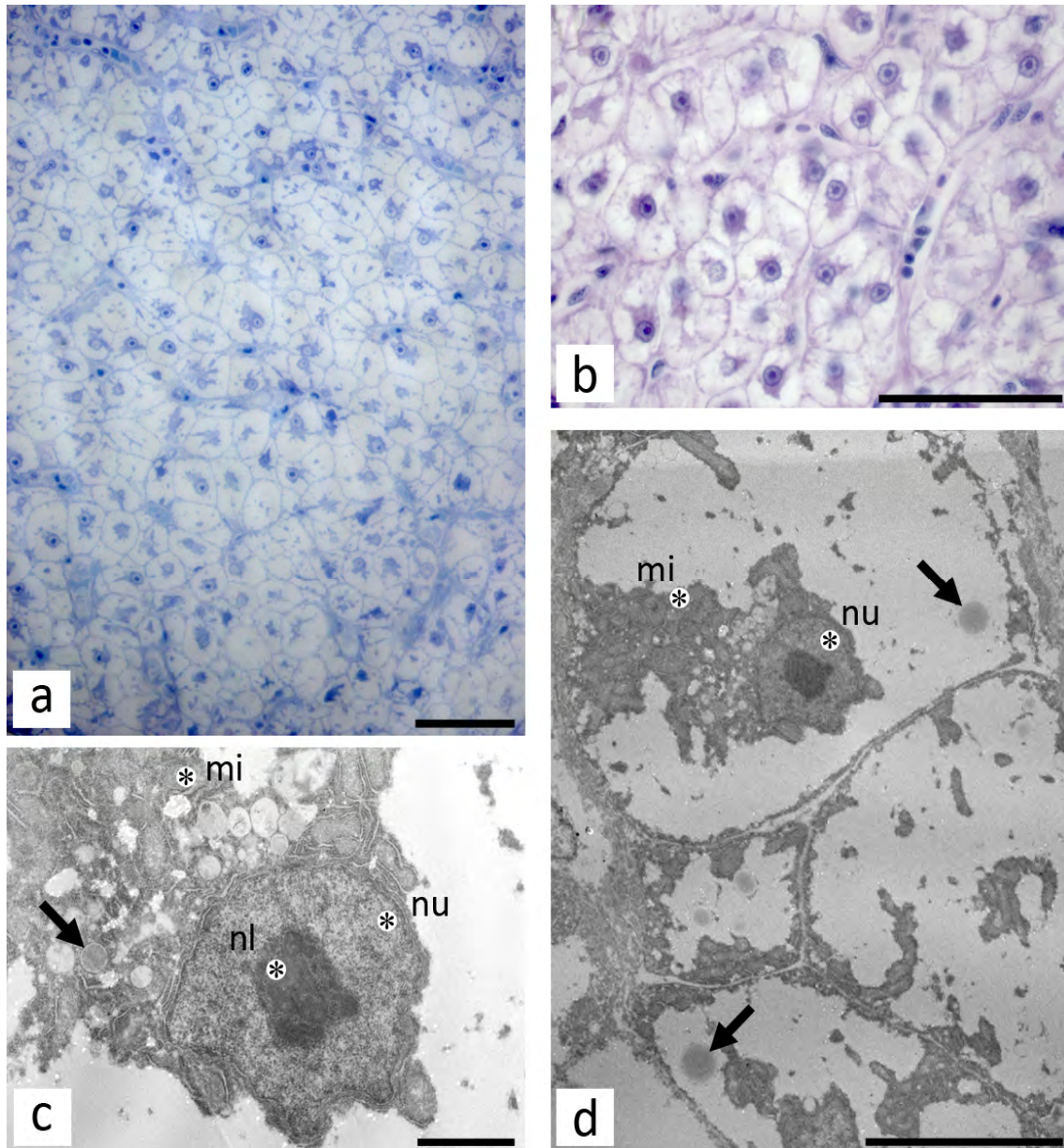
4.3.1. Morfologija hepatocita i acinusnih ćelija

Hepatociti šarana iz eksperimenta su krupne ćelije sa jednim jedrom, koje je najčešće euhromatično. U ćelijama je vidljivo jasno diferencirano jedarce i koje je na elektronskom mikroskopu bilo izrazito tamne boje. Kompartmantacija hepatocita je bila prisutna od početka do kraja sezone gajenja.



Slika 7. Izgled hepatocita u toku prvog meseca gajenja: a) svetlosna mikrografija (PAS x1000; bar = 50 μ m); b) elektronska mikrografija (x4400; bar = 5 μ m)

Ova generalna slika hepatocita se nije menjala tokom trajanja studije, ali je primetna razlika u morfologiji hepatocita sa početka eksperimenta i tokom prvog meseca eksperimenta, u poređenju sa periodom juni-oktobar.



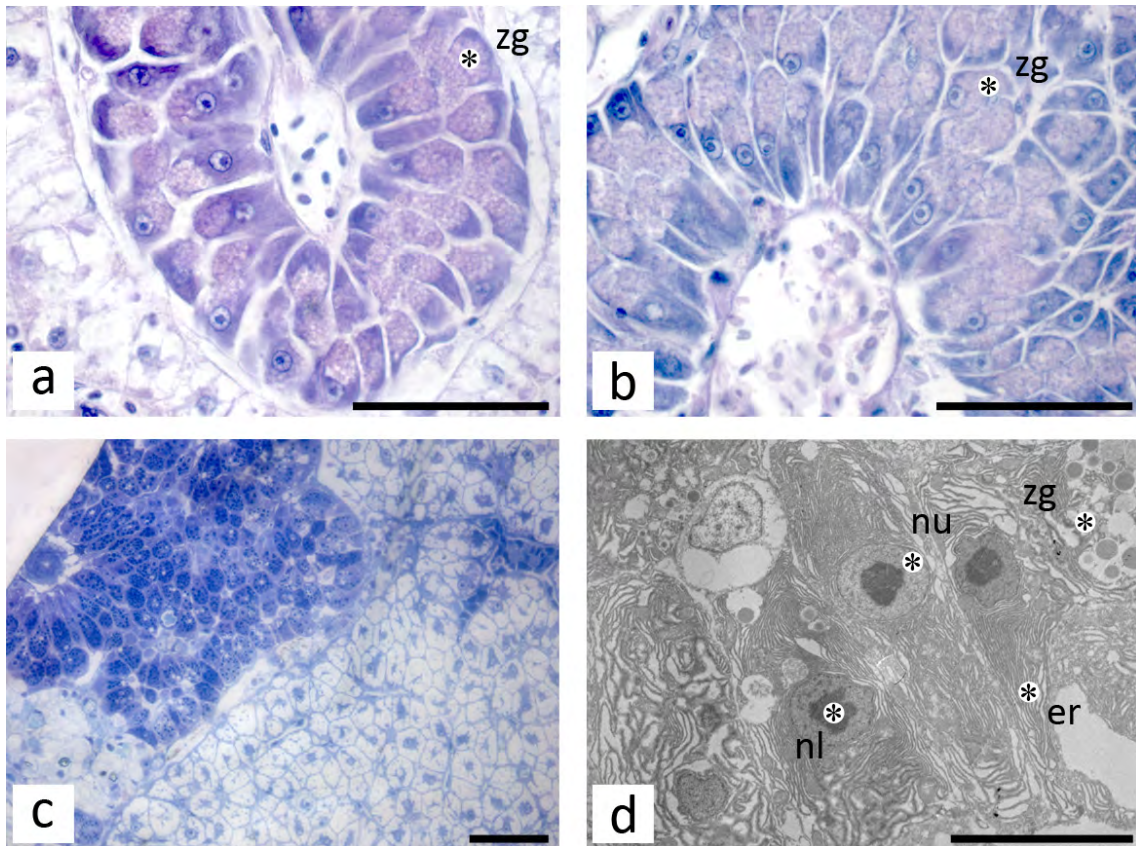
Slika 8. Hepatociti riba iz eksperimenta u toku septembra: a) hepatociti (TB x400; bar = 50 μ m); b) hepatociti (HE x1000; bar = 50 μ m); c) hepatocit - transmisioni elektronski mikroskop (x8800; bar = 2 μ m); d) hepatocit - transmisioni elektronski mikroskop (x2650; bar = 10 μ m); mi - mitohondrije; nu - jedro; nl - jedarce; strelica - lipidne kapi

Hepatociti riba uzorkovanih na početku eksperimenta su bili slične

morfologije kao kod riba uzorkovanih u maju mesecu: na svetlosnom mikroskopu citoplazma ćelija je bila granulirana i bojala se bazofilno upotrebom HE bojenja, odnosno roze pri PAS bojenju (**Slika 7a**). Ćelijska membrana se međutim, slabo uočavala, dok su pojedina jedra bila sitna, skupljena ili piknotična.

Počevši od juna meseca u hepatocitima je prisutna vakuolizacija. Vakuole su isprva malog dijametra, a nakon nekoliko meseci, u zavisnosti od jedne do druge individue, se spajaju i šire u ćeliji. Počevši od septembra najveći deo ćelije čini vakuola koja potpuno potiskuje citoplazmu i zauzima samo mali prostor oko jedra (**Slika 8a, 8b i 8d**). Jedro je krupno i euhromatično, a u njemu se nalazi jedarce (**Slika 8c i 8d**). Hromatin u jedru je granularne strukture, a heterohromatin je uglavnom pozicioniran na periferiji jedra. U citoplazmi se od organela mogu još uočiti mitohondrije, koje su na preseccima kružnog ili izduženog oblika i granulirani endoplazmatični retikulum (**Slika 8c i 8d**). Vakuola služi kao skladište rezervnih materija i u njoj se nalaze glikogen i/ili lipidne kapi.

Preparati jetre su bili pozitivni pri PAS bojenju i time pokazivali prisustvo glikogena tokom celog trajanja eksperimenta. Lipidne kapi u hepatocitima su pokazivale sezonsku promenu i njihova količina se menjala od meseca do meseca. Ti rezultati su detaljno prikazani u sledećem odeljku (**4.3.2.**). Ćelije egzokrinog pankreasa su izdužene, i boje se tamno ljubičasto pri HE bojenju, odnosno tamno plavo pri PAS/AB bojenju (**Slika 9a i 9b**). Od početka do kraja eksperimenta ćelije egzokrinog pankreasa su bile veoma aktivne i u svima se moglo videti prisustvo mnogobrojnih zimogenih granula (**Slika 9a-d**). Zimogene granule su bile roze boje na preparatima bojenim PAS/AB i HE. Samu ćeliju je moguće podeliti na apikalni i bazalni deo i to tako što se jedro obično nalazilo pri bazalnom polu ćelije, dok se sekrecija zimogenih granula odvijala na apikalnom polu ćelije. Ultrastrukturno, u svim acinusnim ćelijama je bilo primetno krupno heterohromatično jedro, sa izrazito vidljivim jedarcetom (**Slika 9d**), slično kao i kod hepatocita.



Slika 9. Čelije egzokrinog pankreasa organizovane u acinuse kod riba iz eksperimenta: a) HE x1000; bar = 50 μ m; b) PAS/AB x1000; bar = 50 μ m; c) TB x400; bar = 50 μ m; d) transmisioni elektronski mikroskop (x2650; bar = 10 μ m); nu - jedro; nl - jedarce; zg - zimogene granule; er - granulisani endoplazmatični retikulum

Od organela dominiraju granulisani endoplazmatični retikulum i Goldžijev aparat. Cisterne endoplazmatičnog retikuluma se protežu kroz celu ćeliju i aranžirane su paralelno jedna drugoj. U ćeliji su vidljive i mitohondrije, koje su posedovale identičnu morfologiju kao i kod hepatocita.

4.3.2. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima

Količina lipidnih kapi u hepatocitima pokazuje značajne promene između grupa hranjenih različitom hranom (**Tabela 19**). Iz tabele je očigledno da ukoliko posmatramo promene po grupama postoji razlika, i to sa najvišim prosečnim procentom kod riba hranjenih peletiranom hranom, dok se najmanja količina lipidnih kapi uočavala u hepatocitima kod riba hranjenih žitaricama. Procenat

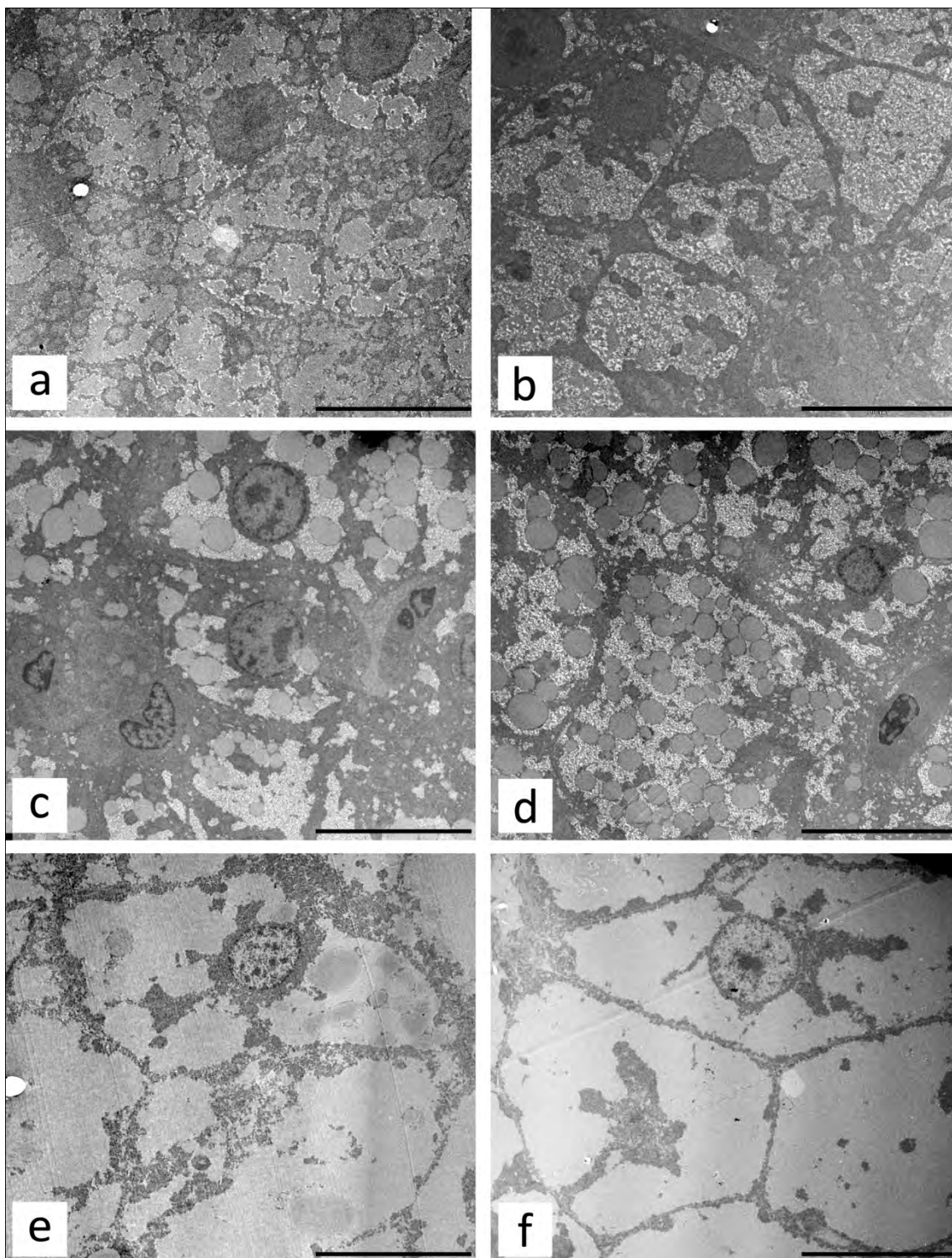
lipidnih kapi kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom je bio između ove dve grupe i sve ove razlike su bile statistički značajne ($p < 0.05$).

Tabela 19. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima (%); poređenje između grupa

Mesec	Grupa			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Maj	5.54 ± 2.70	7.54 ± 2.90	5.92 ± 2.43	0.557
Jun	8.69 ± 1.49 ^a	10.57 ± 1.76 ^{ab}	12.95 ± 5.76 ^b	0.008
Jul	5.49 ± 1.65 ^a	22.60 ± 5.53 ^b	16.12 ± 5.20 ^c	0.000
Avgust	6.65 ± 2.44 ^a	21.12 ± 2.67 ^b	11.84 ± 2.62 ^c	0.000
Septembar	0.18 ± 0.47 ^a	6.20 ± 3.74 ^b	1.15 ± 1.45 ^a	0.000
Oktoabar	0.00 ± 0.00	0.24 ± 0.36	0.00 ± 0.00	0.188

Ukoliko se ovi rezultati razlože po mesecima, da bi se posmatrale promene tokom sezone gajenja, primetno je da je sličan odnos prisutan tokom većine meseci (**Grafik 9; Tabela 20; Slika 10**).

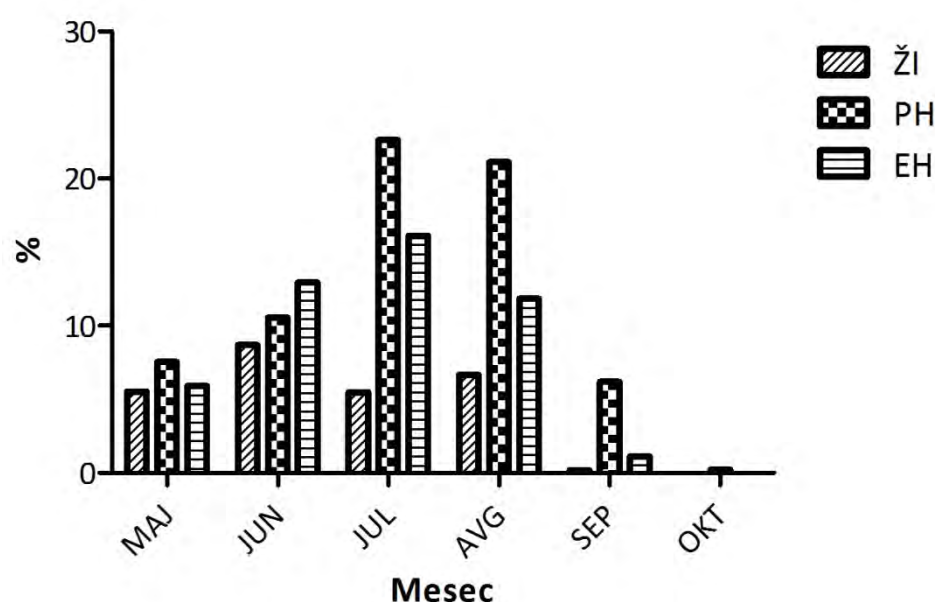
Tokom prvog i poslednjeg meseca sezone gajenja nije primećena razlika u količini lipidnih kapi u hepatocitima između različitih grupa, ali je od jula do septembra najviše vrednosti pokazivala grupa riba hranjenih peletiranom hranom. Od grupe PH su se razlikovale grupa riba hranjenih žitaricama, u kojoj je u istom periodu zabeležena najmanja volumenska gustina lipidnih kapi i grupa riba hranjenih ekstrudiranom hranom, gde je volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima pokazivala intermedijarnu vrednost. Ova pravilnost je jedino poremećana u junu mesecu, kada su hepatociti najbogatiji lipidima bili konstatovani kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom. Konstatovana vrednost je bila viša od riba hranjenih žitaricama, ali se nije razlikovala od grupe riba hranjenih peletiranom hranom.



Slika 10. Ilustracija promene broja i površine lipidnih kapi u hepatocitima tokom sezone gajenja u grupi riba hranjenih peletiranom hranom: a) maj; b) jun; c) jul; d) avgust; e) septembar; f) oktobar; x2650; bar = 10 μ m

Tabela 20. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima (%); poređenje između meseci u okviru grupe

Mesec	Grupa		
	ŽI	PH	EH
Maj	5.54 ± 2.70 ^a	7.54 ± 2.90 ^a	5.92 ± 2.43 ^a
Jun	8.69 ± 1.49 ^b	10.57 ± 1.76 ^{ab}	12.95 ± 5.76 ^b
Jul	5.49 ± 1.65 ^a	22.60 ± 5.53 ^c	16.12 ± 5.20 ^b
Avgust	6.65 ± 2.44 ^a	21.12 ± 2.67 ^c	11.84 ± 2.62 ^b
Septembar	0.18 ± 0.47 ^c	6.20 ± 3.74 ^b	1.15 ± 1.45 ^c
Oktobar	0.00 ± 0.00 ^c	0.24 ± 0.36 ^d	0.00 ± 0.00 ^c
P vrednost	0.000	0.000	0.000



Grafik 9. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima (%); poređenje između meseci

Razlika u vrednostima postoji i ukoliko posmatramo odvojene grupe tokom sezone gajenja. U rezultatima se uočava pravilnost u promeni količine lipidnih kapi u hepatocitima i ta pravilnost je slična u svim grupama. Volumenska gustina lipidnih kapi u hepatocitima u maju se kretao između 5.5 i 7.5% u zavisnosti od grupe, i konstantno se uvećavala tokom juna, jula i avgusta, da bi tokom septembra sadržaj lipidnih kapi počeo da se smanjuje. U mesecu oktobru u dve od tri grupe (ŽI i EH) lipidne kapi nisu uočene u hepatocitima, a u grupi riba hranjenih

peletiranom hranom je procenat lipidnih kapi u ćelijama kvantifikovan u tragovima - 0.24%. Grupa riba hranjenih žitaricama je sporije akumulirala lipidne kapi u ćelijama jetre i najvišu vrednost je dostizala u junu mesecu, dok su druge dve grupe najvišu vrednost dostizale tokom jula i bile su dva (EH) i tri (PH) puta više u odnosu na maksimalnu vrednost u grupi riba hranjenih žitaricama.

4.3.3. Morfometrija hepatocita i acinusnih ćelija

Da bi se bolje ispitaio metabolizam hepatocita u toku eksperimenta primenjene su morfometrijske metode i merenje jedarnih i ćelijskih profila, i izračunat je odnos između ove dve mere. U **tabeli 21** se mogu videti rezultati ovih parametara tokom celog trajanja eksperimenta.

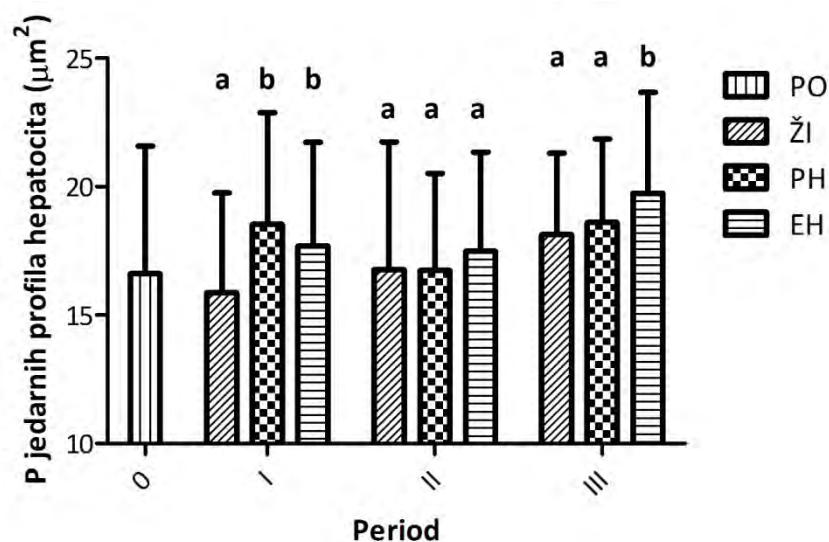
Tabela 21. Histomorfometrijski parametri hepatocita i acinusnih ćelija. Različita slova u eksponentu označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0.05$)

Morfometrijski parametar	Grupa			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Površina jedarnih profila hepatocita (μm^2)	17.25 \pm 4.07 ^a	18.04 \pm 3.76 ^b	18.58 \pm 4.08 ^c	0.001
Površina ćelijskih profila hepatocita (μm^2)	198.89 \pm 56.58 ^a	175.49 \pm 47.94 ^b	184.60 \pm 60.29 ^c	0.002
Odnos jedarnih i ćelijskih profila hepatocita (N/C)	0.09 \pm 0.03 ^a	0.11 \pm 0.03 ^b	0.11 \pm 0.04 ^b	<0.001
Površina jedarnih profila acinusnih ćelija (μm^2)	15.76 \pm 3.54 ^a	16.20 \pm 3.35 ^a	14.25 \pm 4.89 ^b	0.009

Rezultati ukazuju na to da je površina jedarnih profila hepatocita najniža kod riba hranjenih žitaricama, dok je najviša vrednost jedarnih profila izmerena kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom. Između ovih vrednosti se nalazi grupa riba hranjenih peletiranom hranom. Sve razlike nađene između vrednosti površine jedarnih profila hepatocita su statistički značajne ($p < 0.05$). Površina ćelijskih profila hepatocita je takođe pokazala različitu vrednost kod svake od tri grupe u eksperimentu. Ćelijski profili hepatocita su pokazivali sledeću relaciju: ŽI > EH > PH. Kao što je slučaj i sa jedarnim profilima i ovde su razlike između sve tri grupe statistički značajne ($p < 0.05$). Odnos između ove dve vrednosti je pak pokazao niže vrednosti kod riba hranjenih žitaricama u poređenju sa grupama hranjenim

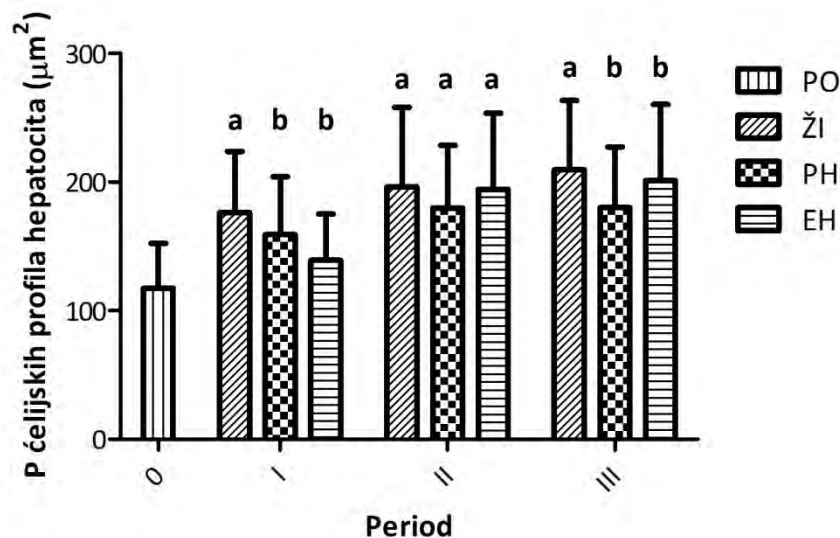
komercijalnom hranom (PH i EH; $p < 0.05$). Vrednosti između dve grupe riba hranjenih komercijalnim hranama se nisu međusobno razlikovale. Za razliku od hepatocita, površina jedarnih profila kod acinusnih ćelija je bila najniža kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom. Više vrednosti su izmerene kod riba hranjenih žitaricama i peletiranom hranom i statistički su se bile značajne ($p < 0.05$), međutim međusobno se nisu razlikovale.

Ukoliko se poredi kretanje jedarnih profila hepatocita po periodima očevidno je da vrednosti u svim grupama rastu tokom trajanja eksperimenta (**Grafik 10**). U I periodu su vrednosti jedarnih profila riba iz grupe ŽI niže od druge dve grupe ($p < 0.05$), u II periodu između grupa nema razlika, dok su vrednosti u grupi EH značajno više ($p < 0.05$) od druge dve grupe tokom III perioda istraživanja.



Grafik 10. Kretanje površine jedarnih profila hepatocita po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta; različita slova pokazuju statistički značajne razlike između grupa u istom periodu ($p < 0.05$)

Kao što je slučaj i sa površinom jedarnih profila i površina profila hepatocita pokazuje trend povećanja vrednosti u svim grupama od početka ka kraju eksperimenta (**Grafik 11**). Promene vrednosti po periodima pokazuju značajnu razliku između grupe riba hranjenih žitaricama i druge dve grupe, koje su hranjene komercijalnim hranama u I ($p < 0.05$) i III periodu ($p < 0.05$). U oba perioda ribe hranjene žitaricama su imale više vrednosti površine profila hepatocita. U toku drugog perioda nije bilo razlike između grupa.



Grafik 11. Kretanje površine profila hepatocita po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta; različita slova pokazuju statistički značajne razlike između grupa u istom periodu ($p < 0.05$)

Pored ovih morfoloških parametara, polukvantitativno je skorovano prisustvo količine zimogenih granula u acinusnim ćelijama i stepen vakuolizacije hepatocita kod riba u eksperimentu. Iako vrednosti između grupa nisu pokazivale značajnu razliku, bilo je primetno da su u maju oba ova parametra imala značajno niže vrednosti nego kod riba u ostalim mesecima u eksperimentu ($p < 0.001$ za vakuolizaciju hepatocita i $p = 0.003$ za količinu zimogenih granula u acinusnim ćelijama).

4.3.4. Histopatološke promene u jetri

U toku eksperimenta su uočene različite histopatološke promene u jetri i frekvencija njihovog pojavljivanja je prikazana u **tabeli 22**. Može se uočiti da većina promena nije bila teže prirode i da su spadale u reverzibilne promene. Histopatološke promene koje su nađene na najviše preparata su kongestija sinusoida (72% od ukupnog broja uzoraka) i fibroza krvnih sudova (55%). Fibroza krvnih sudova je najčešće bila praćena prisustvom eozinofilnih granulocita (66%), koje su se nalazile uglavnom u vezivnom tkivu krvnih sudova, mada su povremeno primećivane i u jetrinom parenhimu. Promene koje su takođe bile česte su i prisustvo adipoznih ćelija u i oko pankreasnog tkiva (33%) i infiltracija (ekstravazacija) leukocita u parenhim (19%). Ostale promene su bile retke, s

obzirom na to da su uočene na manje od 10% od ukupnog broja uzoraka. One su obuhvatale nekrozu pankreasa (9%) i jetre (5%), vakuolizaciju acinusnih ćelija pankreasa (7%), prisustvo staza u krvnim sudovima (4%), hidropsku degeneraciju (3%) i prisustvo melano-makrofagnih centara (MMC) u jetri (2%). Paraziti u jetri su uočeni na 5% preparata.

Tabela 22. Frekvencija pojavljivanja histopatoloških promena i parazita u jetri tokom dve godine istraživanja (%)

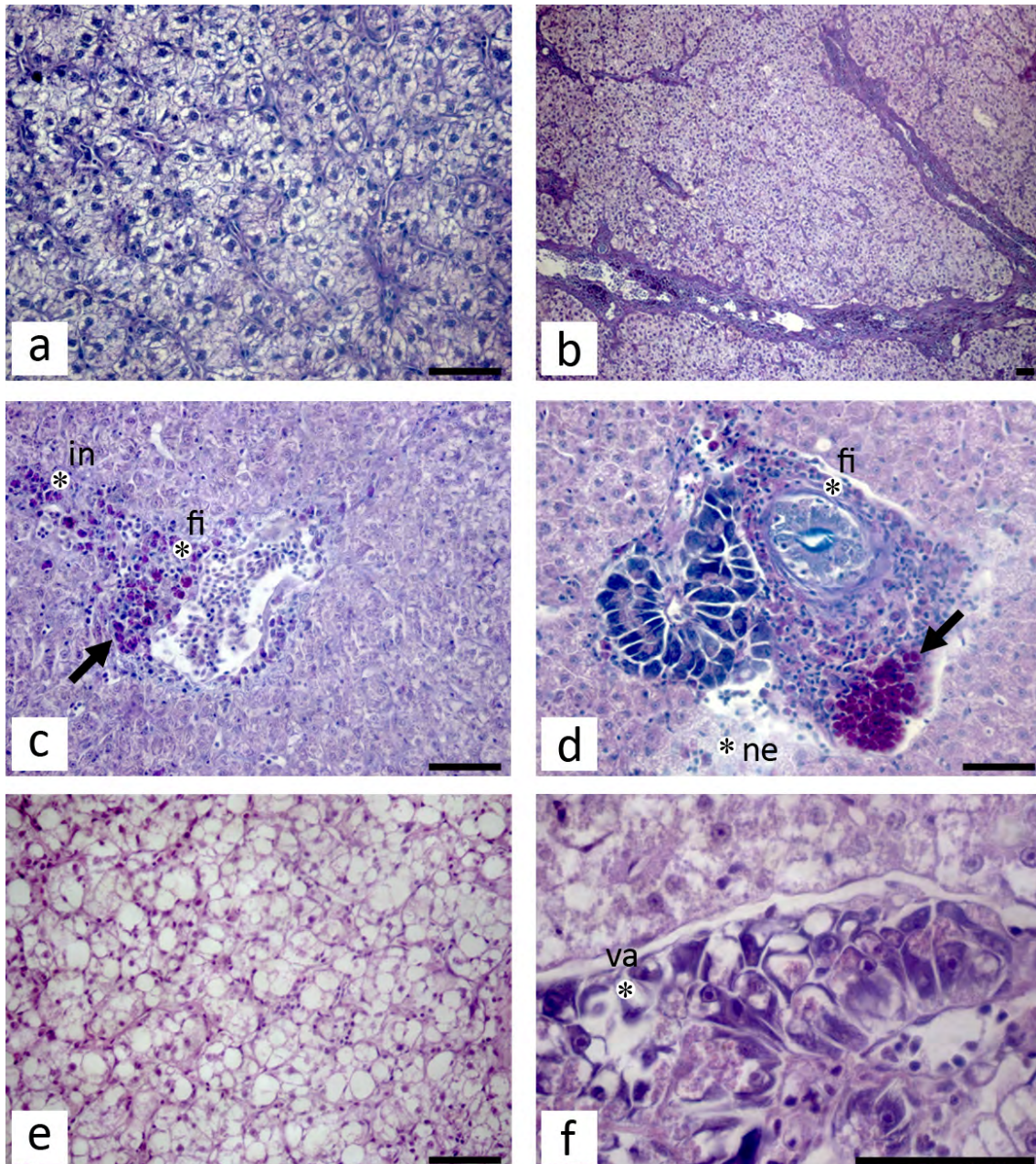
Tip histopatološke promene	Procenat riba sa prisutnom promenom
Kongestija sinusoida	71.6
Prisustvo EG	66.2
Fibroze u krvnim sudovima	55.4
Prisustvo adipocita u pankreasu	32.4
Infiltracija tkiva leukocitima	18.9
Nekroza pankreasa	9.5
Hidropska degeneracija acinusnih ćelija	6.8
Nekroza parenhima jetre	5.4
Staze u krvnim sudovima	5.4
Paraziti u jetri	5.4
Hidropska degeneracija hepatocita	2.7
Prisustvo MMC-a	1.4

Kongestija sinusoida spada u cirkulatorne promene i karakteriše se po velikoj količini krvi koja se nalazi u sinusoidima i usporavanjem toka krvi. Na nekim preparatima se uz kongestiju mogla uočiti i fibroza sinusoida, odnosno zadebljanje bazalne lamine (**Slika 11a**). Međutim, fibroza se najčešće uočavala na krvnim sudovima većeg promera, gde je obuhvatala manje ili veće površine vena i arterija. U nekim slučajevima je pojava fibroze toliko uznapredovala da je drastično popunjavala ili delimično zatvarala lumen krvnog suda (**Slika 11b i 11c**). Pored krvnih sudova, fibroze su se mogle uočiti i u žučnim kanalićima (**Slika 11d**), međutim fibroze u parenhimu jetre, kao ni pojava ožiljnog tkiva (engl. scar tissue) u ovom istraživanju nisu uočene. U fibroznom tkivu koje je uočavano u krvnim sudovima, veoma često su se nalazili i EG (**Slika 11c**). One se karakteristično boje na histološkim preparatima. Ukoliko se primenjuje PAS bojenje, boja granula im je

intenzivno roze, dok se pri HE bojenju, kao što im ime kaže, boje eozinofilno, odnosno roze-crvenkaste su boje (**Slika 11c i 11d**). Pored toga što su se najčešće pojavljivale u krvnim sudovima, EG su često bili uočavani i u neposrednoj blizini parazita u jetri (**Slika 13a i 13b**). Vrlo često su EG, nalaženi na preparatima u blizini parazita ili patologija, pokazivali degranulaciju citoplazme. Infiltracija tkiva leukocitima je promena sa relativno niskom frekvencijom i čak i kada je nalažena, nikada nije obuhvatala veći deo tkiva. Infiltracija je uočavana neposredno oko krvnih sudova, odakle je i došla njihova ekstravazacija (**Slika 11c**). Pored parenhima, infiltracija je neretko zahvatala i krvne sudove.

Hidropska degeneracija ćelija se karakteriše pojavom vakuola u ćelijama. Međutim, ove vakuole ne smeju biti pomešane sa vakuolama u kojima se skladište rezervne materije: glikogen i lipidi i koje su gore navedene. One su pravilnog, okruglog oblika, karakterišu se time da se ne boje pozitivno na eosin, ni na PAS bojenje, a u unutrašnjosti se nalazi tečnost. Pored toga, ove vakuole često pomeraju jedro u stranu ćelije, ka ćelijskoj lamini. Neka jedra postaju piknotična, a nedugo zatim može doći i do nekroze hepatocita. Slično hepatocitima, ove vakuole se pojavljuju i u acinusnim ćelijama (**Slika 11f**) i to 2.5 puta češće, međutim sa još uvek niskom frekvencijom (6.8%). Histopatološko stanje jetre zahvaćene hidropskom degeneracijom se može videti na **slici 11e** i ne može se pomešati sa vakuolama koje su prisutne kao skladišta rezervnih materija. Melanomakrofagni centri u jetri su bili veoma retki i uočeni su na samo jednom preparatu.

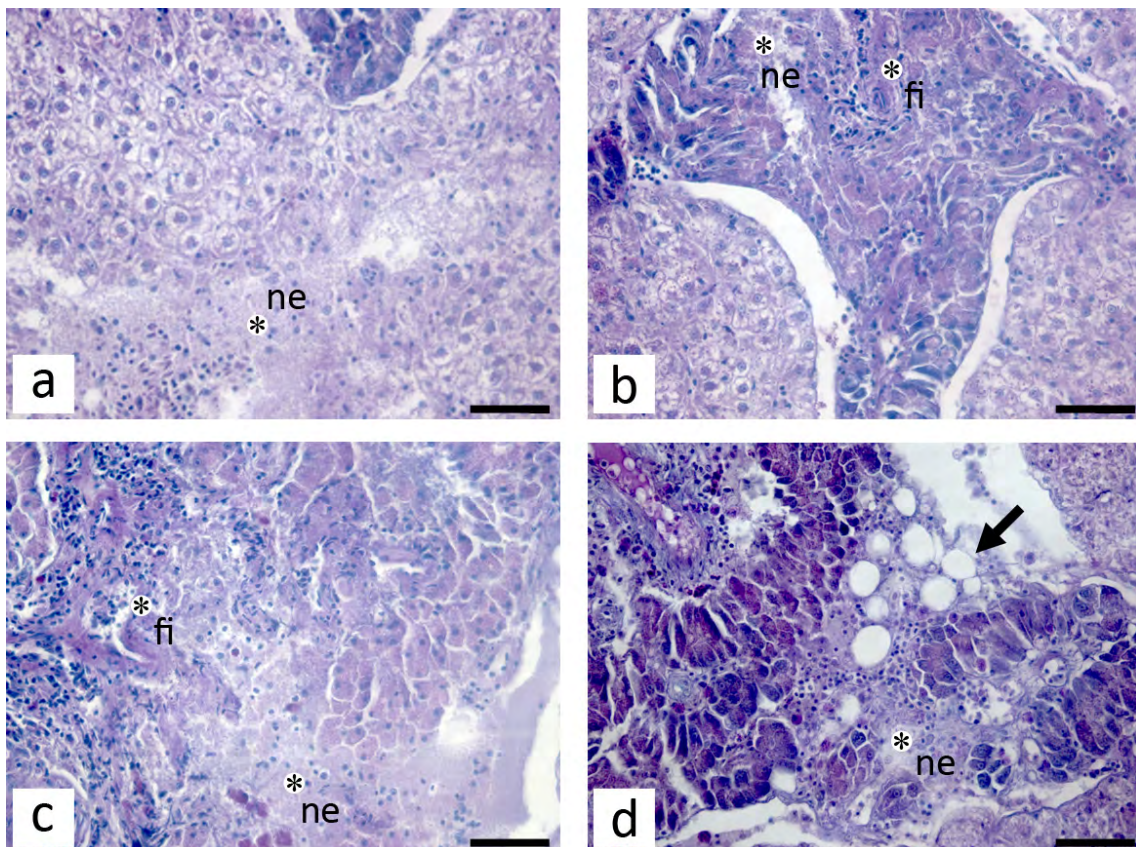
Najozbiljnija primećena histopatološka promena u eksperimentu bila je nekroza, ali je njeno prisustvo u eksperimentu bilo fokalno i nikada nije zahvatalo više od 6% tkiva jetre i 10% pankreasnog tkiva. Nekroza je vrlo retko obuhvatala stromu u jetri, već su njome uglavnom bili zahvaćeni hepatociti (**Slika 12a**). U slučajevima nekroze dolazilo je do kariorekse i kariolize, cepanja ćelijskih membrana i razlaganja citoplazme. Međutim, kao što je već navedeno ove promene su se uočavale fokalno i hepatociti koji su se nalazili oko nekrotičnog tkiva su imali piknotička jedra ili potpuno normalan izgled ćelija. Nekroza u pankreasu je bila skoro duplo češća i pored ćelija pankreasa, uvek je obuhvatala i nekrozu krvnih sudova koji se nalaze okruženi pankreatičnim tkivom (**Slika 12b**).



Slika 11. Histopatološke promene na hepatopankreasnom tkivu riba iz eksperimenta: a) kongestija sinusoida (HE x400); b) fibroza krvnih sudova jetre (HE x100); c) infiltracija leukocita u jetrin parenhim, fibroza krvnog suda i prisustvo EG (AB/PAS x400); d) fibroza oko žučnih kanalića, nekroza jetrinog parenhima i prisustvo EG (AB/PAS x400); e) hidropska degeneracija hepatocita (HE x400); vakuolizacija pankreasnog tkiva (HE x1000); in - infiltracija, fi - fibroza, ne - nekroza, va - vakuolizacija; strelice - EG; bar = 50 μ m

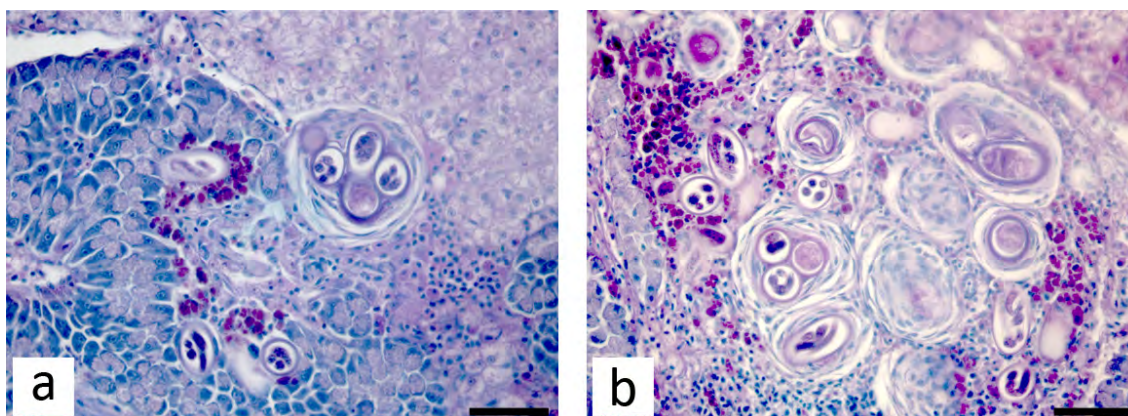
Stoga, ova dva tipa nekroze nisu prikazana odvojeno u rezultatima. Nekrotične ćelije acinusa nikada nisu bile vakuolizovane, već su jedra bila

piknotična ili je dolazilo do potpune kariolize, dok je ćelija, iako nefunkcionalna, najčešće bila ispunjena zimogenim granulama, čiji je sadržaj bio rasut u citoplazmi (Slika 12c). U tim slučajevima ostaci zimogenih granula nisu pokazivali karakterističnu granulaciju, a na AB/PAS presecima su bili svetlije boje, ukoliko se uporede sa zimogenim granulama koje nisu lizirane. Vakuolizovane acinusne ćelije su u citoplazmi imali različit broj zimogenih granula, te su nekada bili potpuno bez zimogenih granula, a nekada sa velikom količinom granula u njoj, pa tako izgleda da sinteza enzima nije u vezi sa vakuolizacijom ovih ćelija. Pored nekroze i vakuolizacije u pankreasu je uočena i pojava adipocita. Kao što se može videti na slici 12d masne ćelije se infiltriraju u pankreas i oko njih je vidljiva nekroza ćelija pankreasa.



Slika 12. Teže promene na hepatopankreasnom tkivu riba iz eksperimenta: a) nekroza parenhima jetre (AB/PAS x400); b) i c) nekroza i fibroza pancreasnog tkiva (AB/PAS x400); d) infiltracija adipoznog tkiva u pankreas (strelica) i nekroza u njegovoj neposrednoj blizini (AB/PAS x400); ne - nekroza, fi - fibroza; bar = 50 μ m

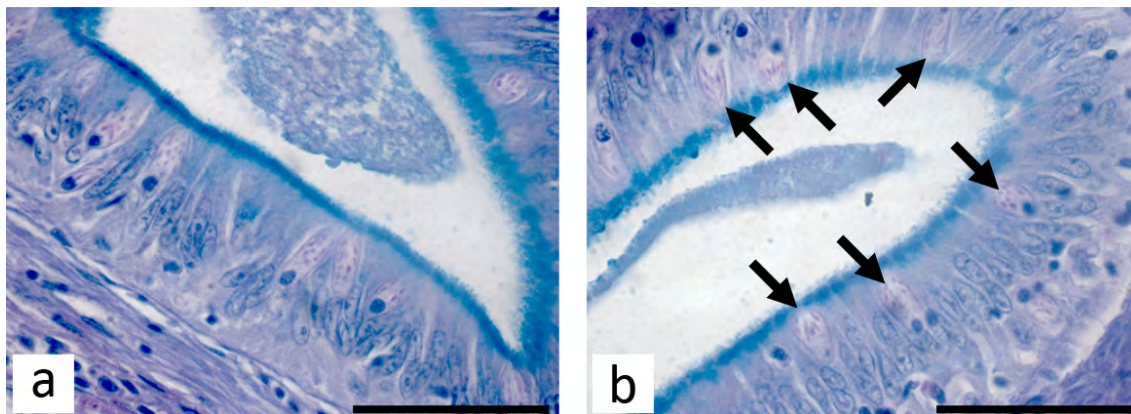
Paraziti u jetri su retko uočavani, na manje od 5% pregledanih uzoraka. Međutim, na preparatima gde su uočavani obično ih je bio veliki broj. Svi paraziti koji su mogli da se uoče u jetri su spadali u nematode, odnosno njihove larve, s obzirom na to da su bili ućaureni, a oko čaura se uočavalo fibrozno tkivo. Larve su češće nalažene u pankreasu nego u jetrinom parenhimu. U sve tri grupe su nalaženi paraziti i prevalencija je bila slična. Oko larvi nematoda je dolazilo do nekroze pankreasnog tkiva (**Slika 13a i 13b**).



Slika 13. Prisustvo larvi nematoda u jetri riba iz eksperimenta: a) nekroza pankreasa oko čaure (HE x400); b) prisustvo EG oko čaura parazita (HE x400); bar = 50 µm

4.3.5. Štapićaste ćelije

U blizini larvi nematoda u pankreasu primećene su i štapićaste ćelije, karakteristične za ribe. Najveći broj štapićastih ćelija se nalazio u epitelnom tkivu žučnih kanalića (**Slika 14a**), a neke su uočene i u egzokrinom pankreasu. Njihova lokacija je intraepitelna i one su umetnute između epitelnih ćelija i na manjem uvećanju mikroskopa podsećaju na mukozne ćelije. Ono po čemu se ove ćelije razlikuju od mukoznih ćelija je karakterističan izgled na većim uvećanjima mikroskopa na kome se uočava debela membrana, koja ima izgled kapsule i intracelularne inkluzije, tzv. štapići, po kojima su ove ćelije i dobile ime (štapićaste ćelije, engl. rodlet cells). Jedro je potisnuto u donji deo ćelije i liči na jedro mukoznih ćelija. Na preparatima se uočavaju ćelije u dva različita oblika: jedan koji se označava kao “zrela ćelija”, koji je upravo opisan, i drugi, kada je ćelija izbacila svoj unutrašnji sadržaj (**Slika 14b**): tada je oblik ćelije nepravilan i veličina je smanjena, štapići u ćelijama nisu uočljivi, a jedro pokazuje znake piknoze.



Slika 14. Veliki broj štapićastih ćelija (strelice) u epitelnom sloju žučnih kanalića: a) i b) AB/PAS x1000; bar = 50 μ m

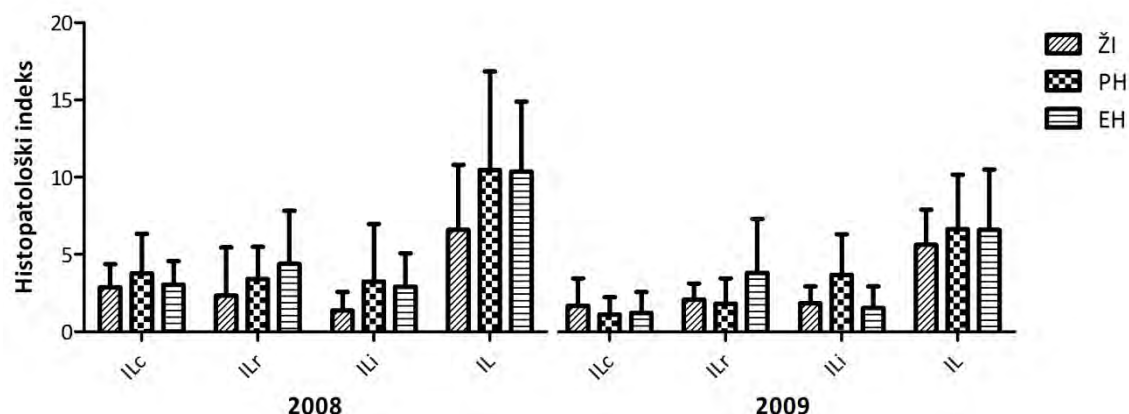
Ukoliko se prati pojava histopatoloških promena tokom trajanja eksperimenta, primetno je da su dve promene: prisustvo fibroza i EG u jetri, bile znatno više u toku prva dva meseca, odnosno u periodu maj-jun u odnosu na period od jula do oktobra ($p < 0.05$). Nakon toga je broj promena nađenih u jetri bio u opadanju. Ostale histopatološke promene nisu pokazivale sezonski karakter.

4.3.6. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri

Da bi se histopatološke promene u jetri kvantifikovale, primenjen je polukvantitativni skoring promena. Posmatrane su promene između grupa riba hranjenih različitom hranom, kao i između dve godine, da bi se uspostavile korelacije sa kvalitetom vode.

4.3.6.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri između grupa

Nijedna kategorija promena u jetri nije pokazivala razliku između grupa hranjenih različitom hranom tokom 2008. godine (**Grafik 12**). Jezero u kome su gajene ribe hranjene žitaricama je pokazivalo tendenciju manje frekvencije i intenziteta histopatoloških promena, međutim ove razlike nisu potvrđene statističkom obradom podataka. Ukupni indeks promena u jetri je sa statističkom značajnošću od $p = 0.07$ pokazao da nema razlike između grupa.



Grafik 12. Polukvantitativni skoring histoloških promena u jetri riba iz eksperimenta u okviru grupa, prikazanih u toku obe godine studija: ILc - indeks cirkulatornih promena; ILr - indeks regresivnih promena; ILi - indeks inflamatornih promena; IL - ukupni histopatološki indeks jetre

U toku druge godine studije (**Grafik 12**) dobijeni su slični rezultati kao i u prvoj godini. Histopatološke promene u jetri ni u jednoj kategoriji, kao i u ukupnom indeksu nisu pokazale statistički značajnu razliku. I ovaj put je indeks promena na ribama hranjenim žitaricama bio najniži, ali ovaj put je p-vrednost ukupnog indeksa bila znatno viša nego u toku 2008. godine ($p=0.740$).

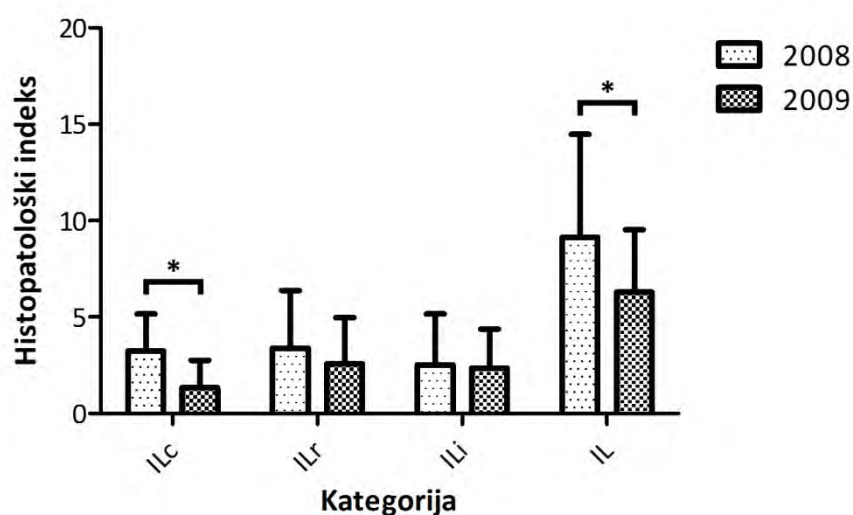
4.3.6.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri između dve godine

Razlike u histopatološkim promenama u jetri između dve godine su nađene za četiri promene (**Tabela 23**). Vrednosti indeksa fibroze i kongestije krvnih sudova su bile statistički značajno više u prvoj godini eksperimenta ($p<0.05$). Za razliku od ove dve promene, prisustvo adipocita u pankreasu i infiltracija leukocita su bile frekventnije u drugoj godini studije ($p<0.05$). Sve ostale promene nisu pokazivale statistički značajnu razliku između godina. Većina promena je bila niskog intenziteta i to je osnovni razlog zbog čega promene nisu bile statistički značajne.

Tabela 23. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u jetri između dve godine istraživanja

Histopatološka promena	Godina		p-vrednost
	2008	2009	
Fibroza krvnih sudova	2.32 ± 1.79 ^a	1.34 ± 1.26 ^b	0.013
Kongestija krvnih sudova	3.04 ± 1.57 ^a	1.22 ± 1.26 ^b	0.000
Staze u krvnim sudovima	0.19 ± 0.98	0.13 ± 0.48	0.395
Povećano prisustvo EG ćelija	2.00 ± 1.45	1.59 ± 1.29	0.296
Melanomakrofagni centri	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.11	0.231
Infiltracija leukocita	0.26 ± 0.89 ^a	0.38 ± 0.69 ^b	0.034
Hidropska degeneracija hepatocita	0.11 ± 0.63	0.00 ± 0.00	0.253
Prisustvo adipocita u pankreasu	0.21 ± 0.44 ^a	0.80 ± 1.14 ^b	0.008
Nekroza acinusnih ćelija	0.15 ± 0.44	0.11 ± 0.39	0.864
Nekroza hepatocita	0.06 ± 0.23	0.03 ± 0.12	0.696

Ukoliko se promene grupišu po kategorijama, kao rezultat se dobija da je histopatološki indeks značajno viši u prvoj godini eksperimenta u poređenju sa drugom ($p < 0.05$; **Grafik 13**). Primetno je i to da su cirkulatorne promene najviše doprinele razlici između godina, jer jedino između njih postoji statistički značajna razlika ($p < 0.05$).

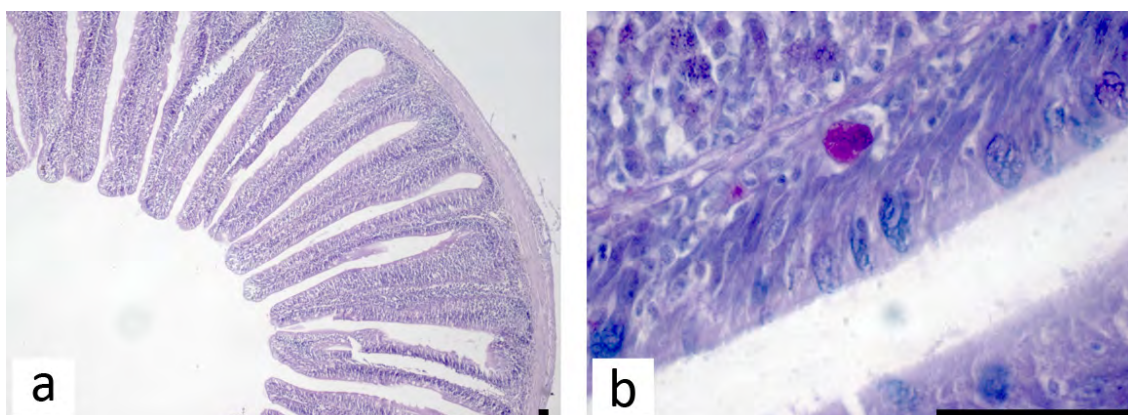


Grafik 13. Polukvantitativni skoring histoloških promena u jetri riba iz eksperimenta u okviru kategorija, prikazanih po godinama studija: ILc - indeks cirkulatornih promena; ILr - indeks regresivnih promena; ILi - indeks inflamatornih promena; IL - ukupni histopatološki indeks jetre; * $p < 0.05$

I u drugim kategorijama su histopatološke promene u prvoj godini bile više nego u drugoj, međutim nijedna od njih nije pokazivala statističku značajnost u intervalu poverenja od 95%.

4.4. Histologija distalnog dela creva

Distalni deo creva je u svim grupama pokazivao normalnu građu tokom trajanja eksperimenta. Crevo riba je prava cev u kojoj su vidljivi mnogobrojni crevni nabori, prosti i nerazgranati (**Slika 15a**). Histološki, razlikuju se četiri omotača: *tunica mucosa*, *tunica submucosa*, *tunica muscularis* i *tunica serosa*. *Tunica mucosa* je podeljena na dva podsloja: *lamina epithelialis* i *lamina propria*. U *lamina epithelialis* su se nalazila tri tipa ćelija (**Slika 15b**): jednoslojne, visokoprizmatične epitelne ćelije (enterociti), krupne peharaste, mukozne žlezde, koje su se bojile pozitivno i na AB i na PAS bojenju i intraepitelni makrofagi (IM).

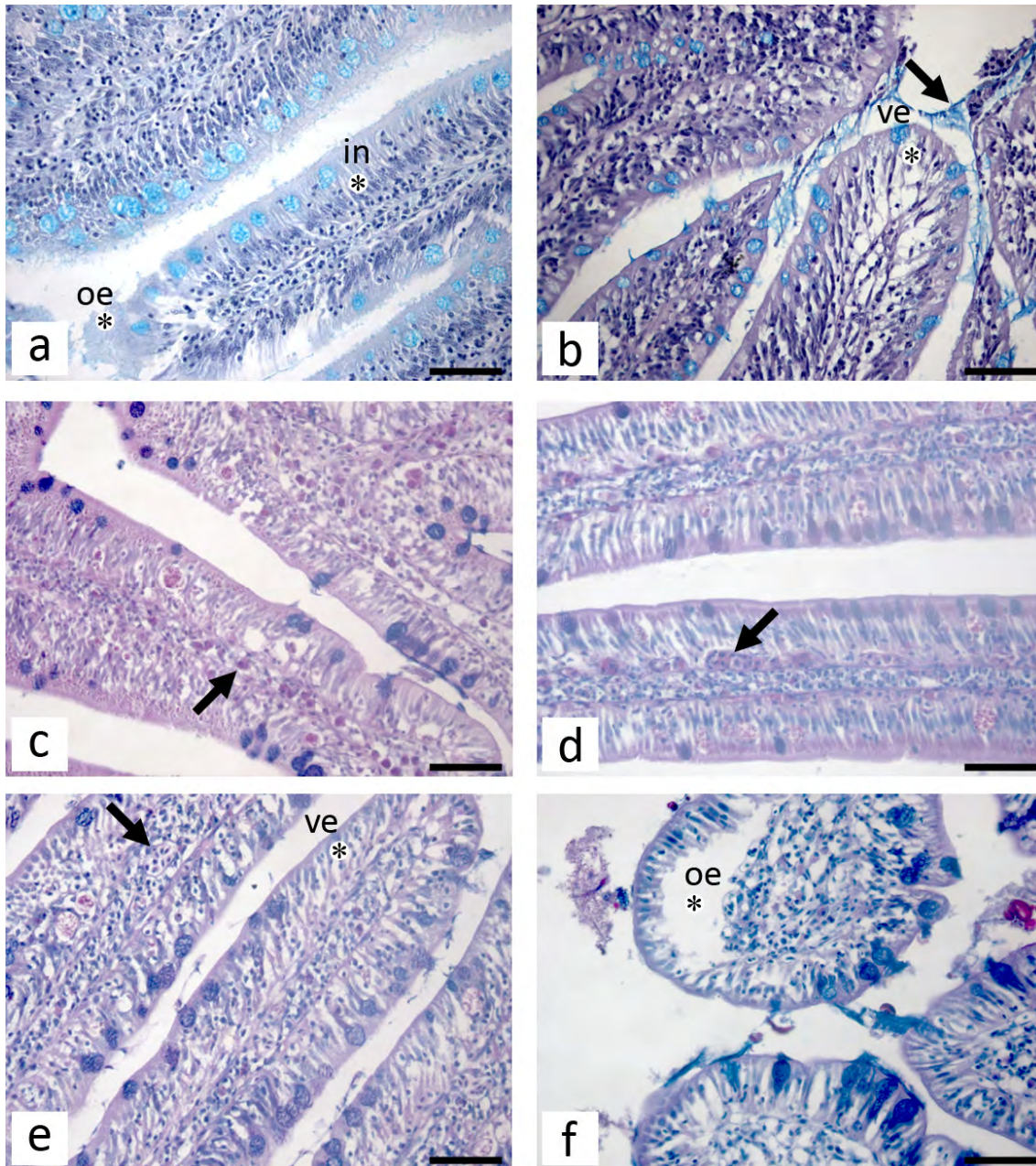


Slika 15. Izgled creva kod riba iz eksperimenta: a) crevni nabori i lumen creva (HE x50); b) ćelije u *lamina epithelialis* (AB/PAS x1000); bar = 50 µm

Iznad jedara enterocita, u supranuklearnom prostoru se uočavaju vakuole. *Lamina propria* se nalazi ispod *lamina epithelialis*, varijabilne je širine i čini je rastresito vezivno tkivo. U njoj se uočavaju kapilari, kao i EG i limfociti, i nije moguće odrediti mesto prelaza u sledeći omotač: *tunica submucosa*, koja je takođe izgrađena od rastresitog vezivnog tkiva. Ispod *tunica submucosa* se nalazi *tunica muscularis*, sa dva sloja mišića, unutrašnjim cirkularnim i spoljašnjim longitudinalnim, dok poslednji sloj čini *tunica serosa*, koja pokriva crevo i sastavljena je od mezotela.

4.4.1. Histopatološke promene na distalnom delu creva

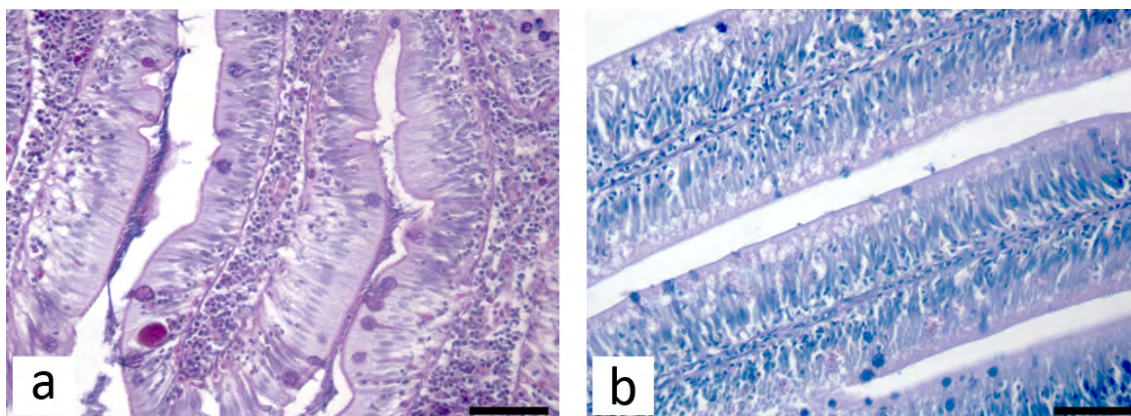
Na distalnom delu creva riba iz eksperimenta nije dolazilo do većih histopatoloških promena.



Slika 16. Histopatološke promene distalnog dela creva šarana iz eksperimenta: a) in - infiltracija leukocita u *tunica mucosa*, oe - odlubljivanje enterocita (AB x400); b) intenzivno lučenje mukusa (strelica), ve - vakuolizacija enterocita (AB x400); c) povećano prisustvo EG u *lamina propria*. EG su PAS pozitivne (strelica; PAS/AB x400); d) hiperemija u krvnim sudovima (strelica; PAS/AB x400); e) dilatacija krvnog suda (strelica); ve - vakuolizacija enterocita (PAS/AB x400); f) oe - odlubljivanje enterocita; vidljivi su ostaci hrane u lumenu creva (PAS/AB x400); bar = 50 μ m

Povremeno je uočavana infiltracija leukocita u *lamina epithelialis* (Slika 16a), povećano lučenje mukusa (Slika 16b), kao i pojava EG u *lamina propria*-i (Slika 16c). Pored ovih promena, česte su bile i promene na cirkulatornom sistemu u crevima. Prisutna je hiperemija (Slika 16d) i dilatacija krvnih sudova (Slika 16e). Međutim, ove promene su konstatovane nezavisno od grupe riba i ni na jednom preparatu nisu bile široko rasprostranjene, već su bile lokalnog karaktera. Još jedna promena, koja ne spada u karakter histopatoloških, je uočena na ribama u eksperimentu, a to je vakuolizacija enterocita (Slika 16b i 16e). Ono što je odlikovalo ove enterocite je prisustvo vakuola malog do srednjeg promera, a najizraženija vakuolizacija se dešavala u distalnom delu crevnog nabora (Slika 16b i 16e). U crevu šarana nisu bili vidljivi paraziti.

Karakteristika distalnog dela creva kod riba u eksperimentu je da je u prva dva meseca trajanja eksperimenta u obe godine *lamina propria* u svim grupama bila deblja (Slika 17a) nego ostalih meseci (Slika 17b), dok je na kraju eksperimenta, obično u septembru i oktobru obe godine, dolazilo do odlublivanja enterocita sa distalnog dela crevnih nabora (Slika 16a i 16f). Prisustvo EG u *lamina propria* je takođe bilo brojnije u toku prva dva meseca.

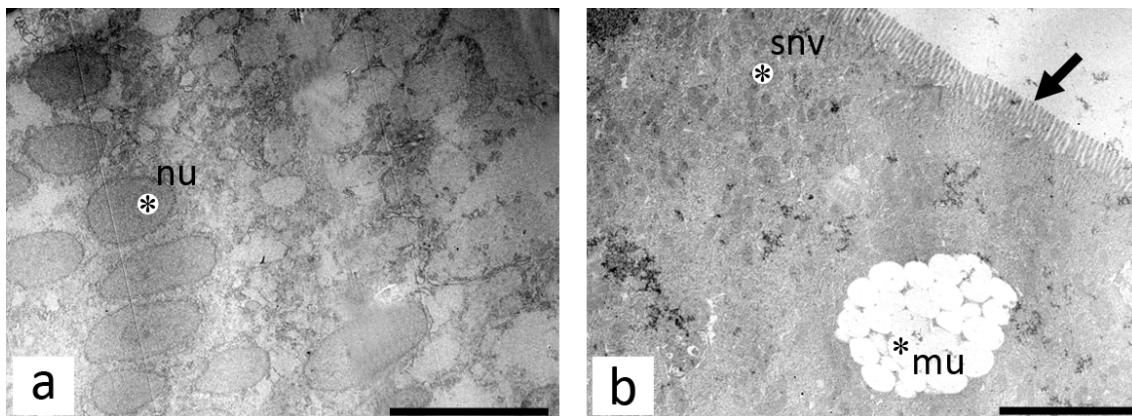


Slika 17. Razlika u širini *lamina propria* distalnog dela creva: a) početak eksperimenta (PAS/AB x400); b) kraj eksperimenta (PAS/AB x400); bar = 50 µm

4.4.2. Enterociti

Enterociti na preparatima imaju izdužen izgled i ove ćelije su postavljene paralelno jedna drugoj. Polaze sa bazalne lamine koja čini granicu između *lamina*

propria i *lamina epithelialis*. Jedra enterocita imaju izdužen oblik i smeštena su u bazalnom delu ćelije (**Slika 18a**). Iznad jedara, u enterocitima su prisutne vakuole, tzv. supranuklearne vakuole (**Slika 18b**), koje se boje tamnije pri HE i PAS bojenju, a na elektronskom mikroskopu su takođe tamne. Pored supranuklearnih vakuola, u enterocitima su prisutne i druge vakuole. Apikalni deo ćelijske membrane je diferenciran u mikrovile, koji su vidljivi pri korišćenju i svetlosnog i elektronskog mikroskopa (**Slika 18b**). Ovakva, uniformna, morfologija enterocita se nije razlikovala između grupa i nije se razlikovala između riba na početku, tokom i na kraju eksperimenta.



Slika 18. Elektronska mikrografija enterocita: a) bazalni deo ćelije, nu - jedro (x2650; bar = 10 µm); b) apikalni deo ćelije, mu - mukus; snv - supranuklearne vakuole, strelica - mikrovili (x4400; bar = 5 µm)

4.4.3. Morfometrija enterocita i crevnih nabora

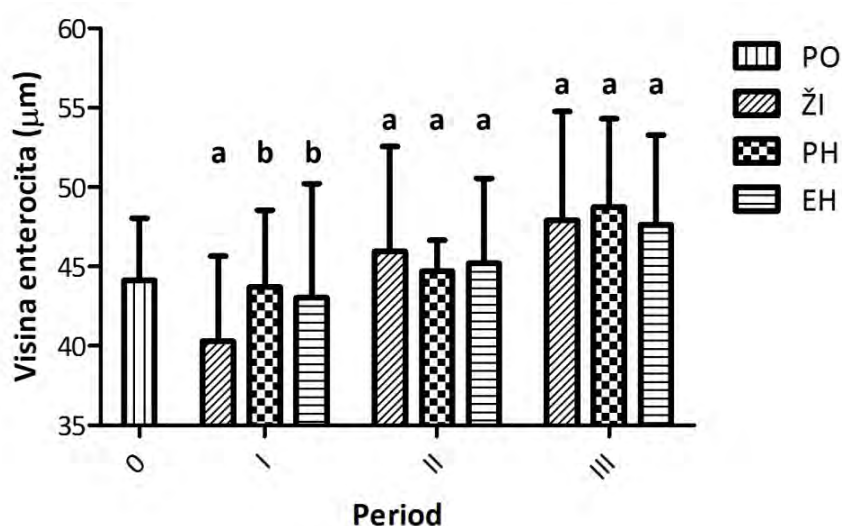
Da bi imali bolji uvod u metabolizam crevnih ćelija tokom ovog eksperimenta, mereni su neki histološki parametri enterocita i to njihova visina i visina supranuklearne zone (**Tabela 24**). Međutim, nijedan od ova dva parametra nije pokazao razlike između grupa. Visina enterocita je bila najveća kod grupe riba hranjene peletiranom hranom, međutim ta razlika nije bila statistički značajna ($p=0.084$). Slično visini enterocita, visina supranuklearne zone je bila najniža kod grupe riba koje su hranjene žitaricama, međutim ni ova razlika nije bila statistički značajna ($p=0.376$). Pored ova dva parametra kvantifikovane su i mukozne ćelije u crevnim naborima i njihov broj se takođe nije razlikovao između grupa (**Tabela 24**). Jedini histološki parametar koji je pokazivao statistički značajnu razliku

između svih grupa je bila dužina crevnih nabora. Crevni nabori su bili najkraći u grupi riba hranjenih žitaricama, dok su najduži bili u grupi riba hranjenih ekstrudiranom hranom (**Tabela 24**).

Tabela 24. Rezultati histomorfometrijskih merenja enterocita i crevnih nabora

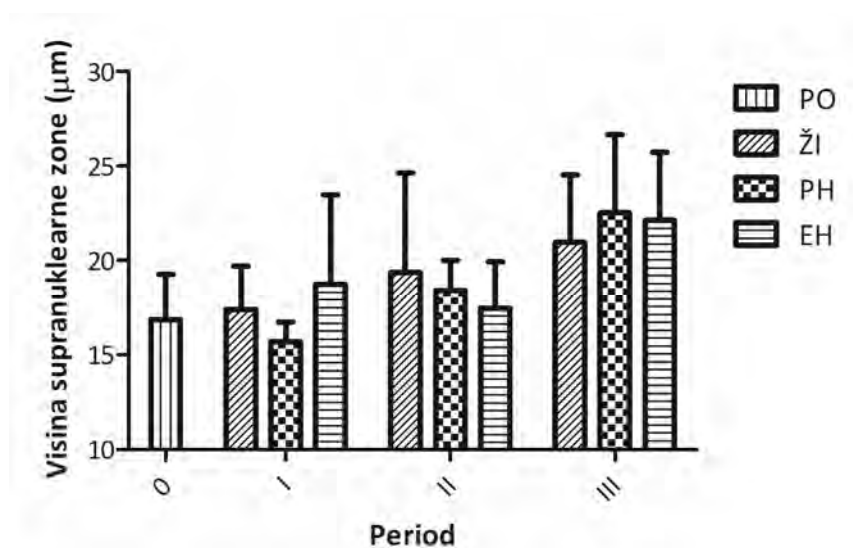
Morfometrijski parametar	Grupa			p-vrednost
	ŽI	PH	EH	
Visina enterocita (μm)	45.64 \pm 11.31	46.54 \pm 9.86	45.88 \pm 10.86	0.084
Visina supranuklearne zone (μm)	19.69 \pm 5.84	19.95 \pm 5.95	19.99 \pm 6.15	0.376
Broj mukoznih ćelija na 100 μm	3.51 \pm 1.59	3.86 \pm 1.80	3.25 \pm 1.60	0.099
Dužina crevnih nabora (μm)	1196.71 \pm 248.80 ^a	1330.87 \pm 333.09 ^b	1355.39 \pm 266.21 ^c	0.017

Kretanje ovih morfometrijskih parametara po periodima je takođe pokazivalo određenu pravilnost. U I periodu visina enterocita u grupi ŽI je bila značajno niža u odnosu na druge dve grupe ($p < 0.05$), ali u druga dva perioda nije bilo promena između grupa (**Grafik 14**). Takođe, visina enterocita koju su ribe imale u III periodu je bila veća u odnosu na inicijalnu grupu i ribe u prvom i drugom periodu ($p < 0.05$).



Grafik 14. Kretanje visine enterocita po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta; različita slova pokazuju statistički značajne razlike između grupa u istom periodu ($p < 0.05$)

Za razliku od visine enterocita, visina supranuklearne zone se nije razlikovala između grupa ni u jednom periodu (**Grafik 15**).

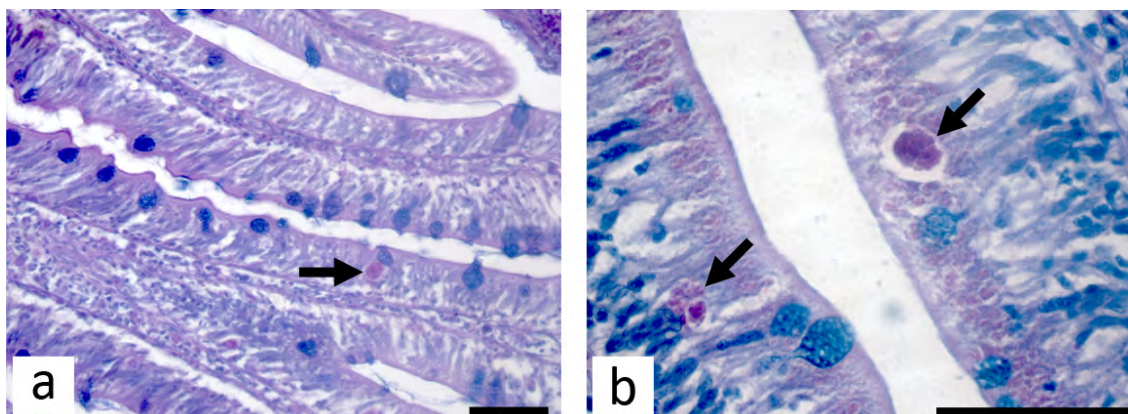


Grafik 15. Kretanje visine supranuklearne zone enterocita po periodima i grupama tokom trajanja eksperimenta

Međutim, kao što je slučaj i sa visinom enterocita i visina supranuklearne zone je bila najviša u III periodu i ove vrednosti se razlikuju u odnosu na druga dva perioda i inicijalnu grupu ($p < 0.05$).

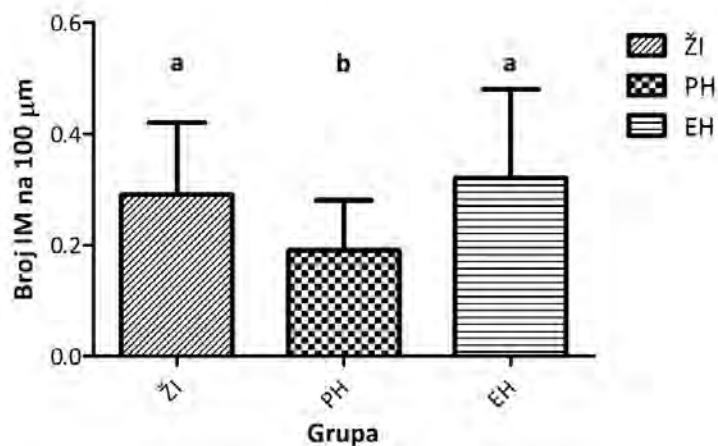
4.4.4. Intraepitelni makrofagi

U distalnom crevu šarana, duž epitela su vrlo često uočavani intraepitelni makrofagi (IM). Po položaju su se nalazili između ćelija jednoslojnog visokoprimitičnog epitela u *tunica mucosa*. Na preparatima bojenim PAS bojenjem, poprimali su jarko roze nijansu (**Slika 15b, 16c, 17a, 19a i 19b**), dok se na AB i HE bojenju ne boje pozitivno, već ostaju bezbojni. Ove ćelije su uglavnom imale loptasti oblik (na preseku kružni), nekada su bile potpuno okrugle i kompaktne, a nekada granulisane ili degranulisane (**Slika 19b**). IM su češće lokalizovani na proksimalnom delu epitelnog sloja, uz bazalnu laminu ili u nivou jedara epitelnih ćelija i vrlo retko su nalažene na distalnom delu epitela. Nekada su, uz pojavu IM, uočavane i EG, uglavnom u *lamina propria*.



Slika 19. Intraepitelni makrofagi (strelice) u crevima riba iz eksperimenta: a) AB/PAS x400; b) AB/PAS x1000; bar = 50 µm

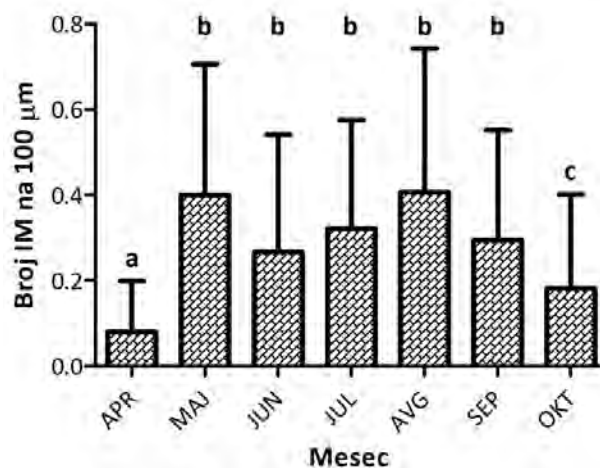
Ukoliko posmatramo količinu IM u crevima po grupama, primetno je da su ribe hranjene ekstrudiranom hranom i žitaricama posedovale znatno veći broj IM od riba hranjenih peletiranom hranom (Grafik 16; $p < 0.05$).



Grafik 16. Broj IM ćelija na 100 µm prikazan po grupama

Broj IM se menjao tokom trajanja eksperimenta (Grafik 17). Pre početka eksperimenta, ribe su u crevima imale mali broj IM. Kako je započeto sa dodatnim hranjenjem, broj ovih ćelija je počeo da se povećava.

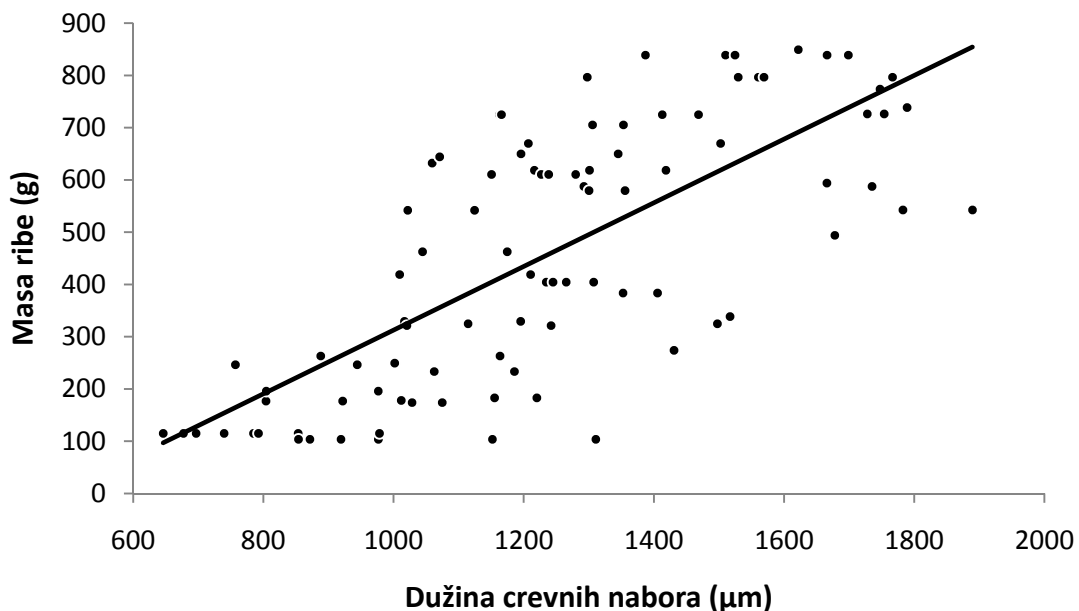
U periodu od maja do septembra, broj IM se značajno povećao u odnosu na početak eksperimenta. U toku poslednjeg meseca (oktobra), broj IM je značajno opao i razlikovao se od broja koji je bio prisutan kod riba od maja do septembra ($p < 0.001$), ali je još uvek bio viši nego kod riba sa početka eksperimenta ($p < 0.05$).



Grafik 17. Broj IM prikazan po mesecima, od početka do kraja eksperimenta; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između meseci ($p < 0.05$)

4.4.5. Korelacija između crevnih nabora i mase riba

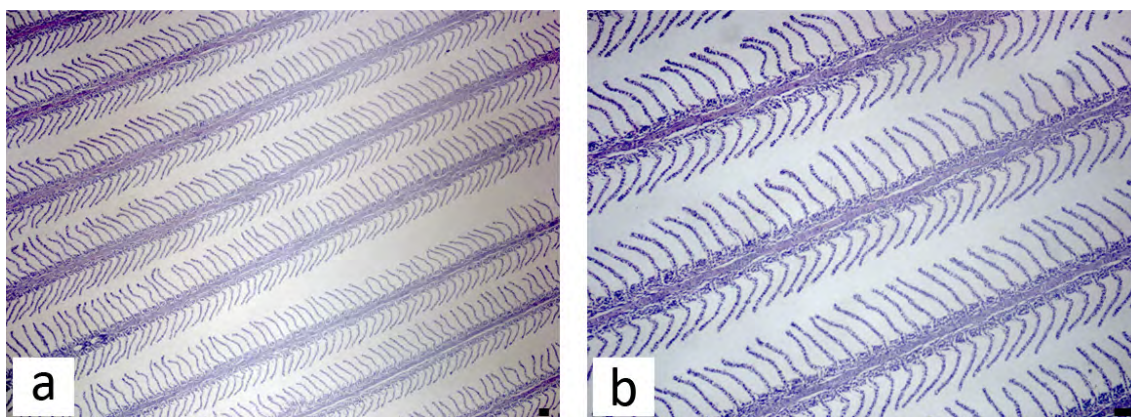
U eksperimentu je ustanovljena jaka pozitivna korelacija između individualne mase riba i dužine crevnih nabora. Obe vrednosti su se progresivno uvećavale od početka do kraja eksperimenta. Njihova linearna regresija je prikazana na **grafiku 18**. Koeficijent korelacije je iznosio $r = 0.730$, a nivo statističke značajnosti $p < 0.001$.



Grafik 18. Korelacija između individualne mase riba i dužine crevnih nabora riba u eksperimentu

4.5. Histologija škrगा

Histologija škržnog aparata nije pretrpela veća oštećenja tokom trajanja eksperimenta. Iako je većina riba na škrगama imala histopatološke promene, velika površina škržnog preparata je bila funkcionalno normalna i nije bila zahvaćena promenama (**Slika 20a i 20b**).



Slika 20. Histologija škržnog aparata u delu gde nije dolazilo do histopatoloških promena: a) HE x50; b) HE x100; bar = 50 μ m

Sve primarne lamele su polazile sa škržnog luka i išle su paralelno jedna drugoj, a sa njih su polazile mnogobrojne sekundarne lamele. Sve su bile sastavljene od jednog reda kapilara između kojih su se nalazile potporne ćelije. Sekundarne lamele koje nisu bile zahvaćene histopatološkim promenama su iznad kapilara imale jedan sloj pločastih, epitelnih ćelija. Duž primarnih lamela se prostirao krvni sud, a pored njega često je uočavana i hrskavica koja u škržnom aparatu ima potpornu funkciju. Primarne lamele su bile pokrivena višeslojnim epitelom i osim ćelija epitela, u njemu su se mogle videti i mukozne i hloridne ćelije.

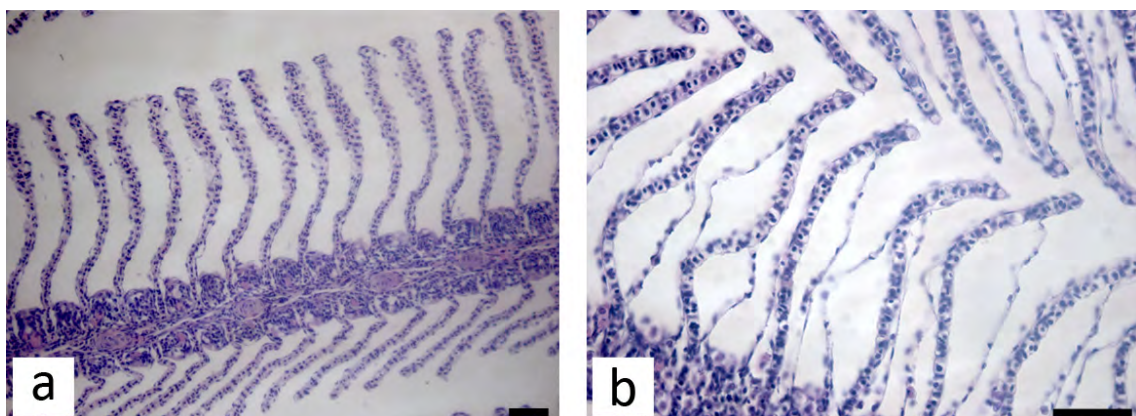
4.5.1. Histopatološke promene na škrगama

Najčešće primećene histopatološke promene na škrगama u toku obe godine eksperimenta su prikazane u **tabeli 25**. Iz tabele se može primetiti da su se četiri promene pojavljivale na preko 40% pregledanih histoloških preparata škrगा šarana: hiperemija, izdizanje respiratornog epitela, srastanje vrhova primarnih lamela i interlamelarna proliferacija.

Tabela 25. Frekvencija pojavljivanja histopatoloških promena i parazita na škragama tokom dve godine istraživanja (%)

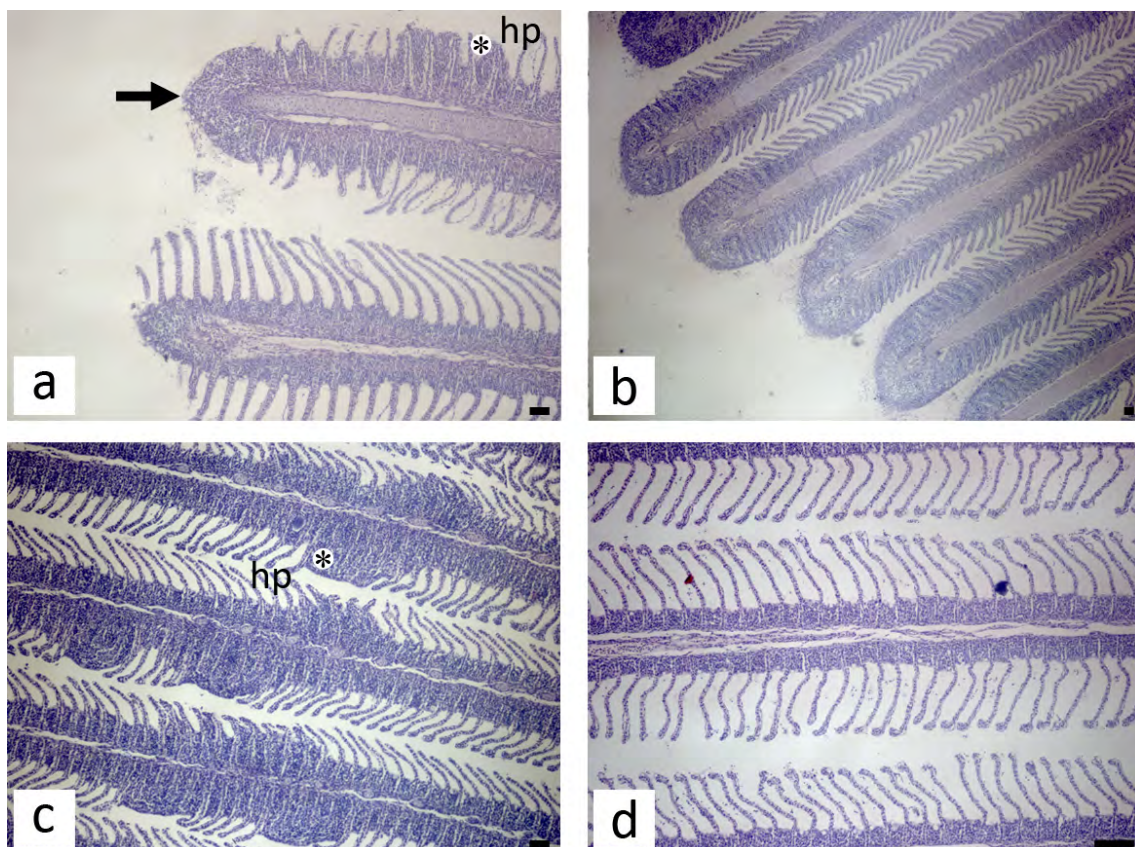
Tip histopatološke promene	Procenat broja riba sa prisutnom promenom
Cirkulatorne promene	
Hiperemija	60.5
Staze	24.7
Hematomi	13.6
Lamelarne telangiektazije	9.9
Promene u morfologiji škrगा	
Izdizanje respiratornog epitela	54.3
Prošireni vrhovi sekundarnih lamela	6.2
Srastanje vrhova primarnih lamela	69.1
Interlamelarna proliferacija epitela	40.7
Ireverzibilne promene	
Potpune fuzije lamela	1.2
Nekroze	4.9
Paraziti	
<i>Trichodina sp.</i>	27.1
Trematoda	32.1
Ciste parazita	23.4

Najfrekventnija cirkulatorna promena je bila hiperemija, koja je primećena u kapilarima sekundarnih lamela (60.5%; **Slika 21a**).



Slika 21. Blage promene uočene na škragama iz eksperimenta: a) hiperemija (HE x200); b) izdizanje respiratornog epitela (HE x400); bar = 50 µm

Pri većoj prokrvljenosti lamela i slabom kretanju krvi u njima, dolazi do pojave nagomilavanja više od jednog eritrocita u kapilarima sekundarnih lamela, što je označeno kao hiperemija. U isto vreme može doći i do širenja lumena kapilara, ali ova pojava nije konstatovana odvojeno od hiperemije. Ostale tri najčešće lezije su spadale u grupu promena na morfologiji škruga. Izdizanje respiratornog epitela je konstatovano na 54.3% preparata, i ova promena predstavlja pojavu edema između sloja epitelnih ćelija i kapilara (**Slika 21b**). Ovaj sloj se infiltrira tečnošću, koja vrši pritisak na sloj epitelnih ćelija, odvaja ga od sloja pilarnih ćelija i na taj način se povećava barijera između krvi i vode, što otežava razmenu gasova.



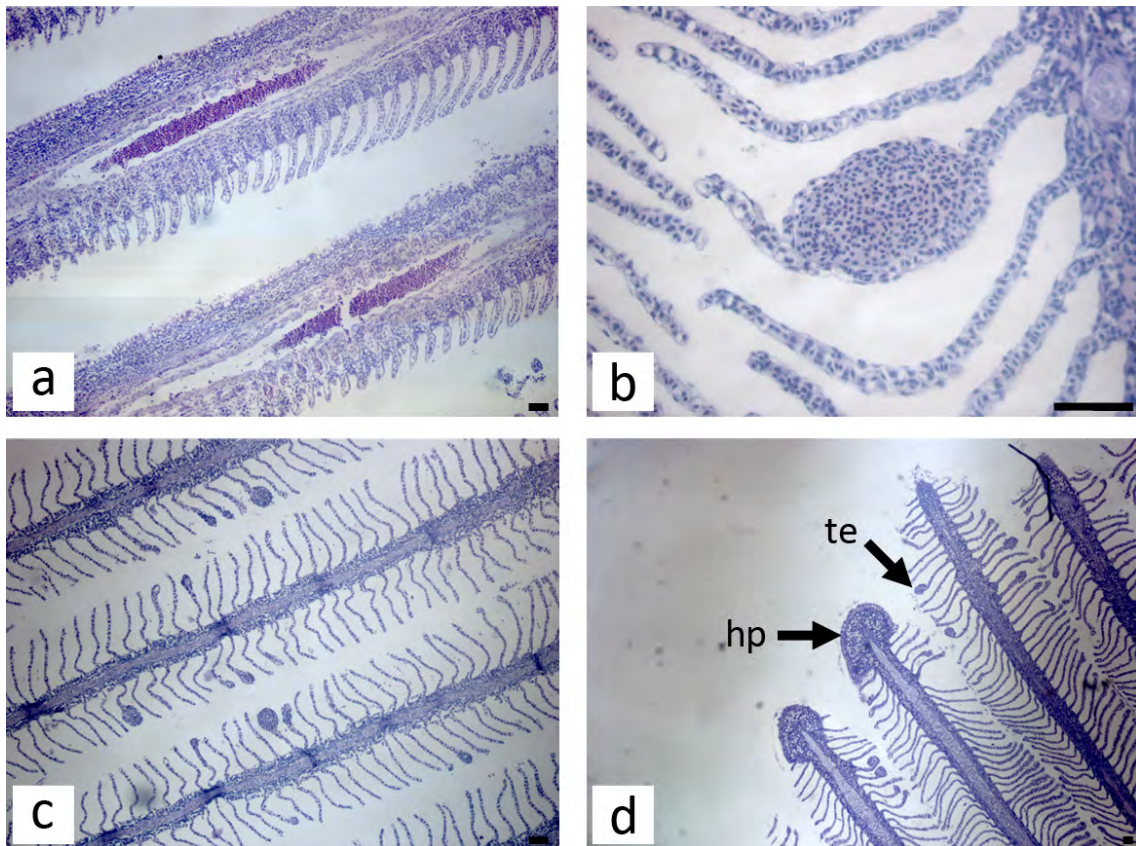
Slika 22. Različiti tipovi hiperplazije na škragama riba iz eksperimenta: a) donja lamela je normalnog histološkog izgleda, dok je na gornjoj lameli prisutna hiperplazija (strelica; HE x100); b) hiperplazija vrhova svih primarnih lamela u škržnom aparatu (HE x50); c) interlamelarna hiperplazija (HE x100); d) hiperplazija vrhova primarnih lamela (HE x200); bar = 50 μ m

Druge dve promene predstavljaju hiperplaziju epitelnih ćelija koje popunjavaju prostor između lamela. Ukoliko se hiperplazija epitela događa na vrhovima primarnih lamela, ova promena se naziva srastanje vrhova primarnih lamela (69.1%; **Slika 22a i 22b**). Međutim, ukoliko se hiperplazija dešava između sekundarnih lamela naziva se - interlamelarna proliferacija epitela (40.7%; **Slika 22a i 22c**). Slično kao i kod izdizanja respiratornog epitela, povećava se rastojanje između krvi i vode. Pored ova dva mesta na kojima se dešavala hiperplazija epitela, nekada je bilo moguće primetiti da se hiperplazija dešava i na vrhovima sekundarnih lamela (**Slika 22d**). Pojava hiperplazije na vrhovima sekundarnih lamela je bila mnogo ređa od dve prethodno pomenute vrste hiperplazije i frekvencija pojavljivanja je iznosila samo 6.2%. Ovaj tip hiperplazije je karakterističan za vrhove sekundarnih lamela i ima sličan mehanizam i funkciju kao hiperplazija koja za cilj ima srastanje primarnih lamela.

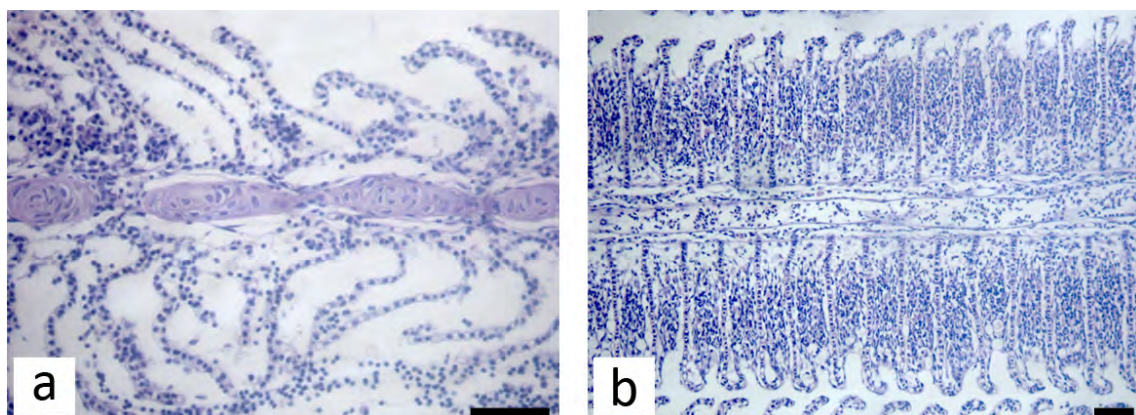
Pored hiperemije uočene su još neke cirkulatorne promene na škragama, ali sa nižom frekvencijom pojavljivanja. Cirkulatorne promene predstavljaju usporavanje toka krvi u krvnim sudovima (staze) ili potpuno zaustavljanje toka krvi, odnosno pojavu hematoma, kao i širenje terminalnih kapilara i pojavu telangiektazija. Staze se karakterišu drugačijom bojom krvi na histološkim preparatima pri HE bojenju (**Slika 23a**). U ovom istraživanju su bile prisutne na škragama svake četvrte ribe. Hematomi su primećeni na 13.6% preparata (**Slika 23b**). Često, kada su hematomi prisutni, dolazi i do ruptуре ćelijske membrane kapilara, s obzirom na to da membrana često ne može da istrpi pritisak krvi, međutim ni na jednom pregledanom preparatu u ovom istraživanju to pucanje ćelijske membrane i razlivanje krvi nije bilo uočeno. Lamelarne telangiektazije su se uvek nalazile na terminalnim kapilarima i nikada nisu uočene samo na jednoj lameli, već su zahvatale 2-10 sekundarnih lamela u neposrednoj blizini (**Slika 23c i 23d**).

Ireverzibilne promene na škragama su obuhvatale pojavu nekroza (**Slika 24a**) i potpunih fuzija primarnih lamela (**Slika 24b**). Ove dve najteže promene na škragama su bile veoma retke i totalna fuzija primarnih lamela je uočena samo na jednom preparatu (1.2%), dok su nekroze bile prisutne sa učestalošću od 4.9%, ali

su uočavane fokalno i ni na jednom preparatu nisu zahvatale veliku površinu škržnog aparata.

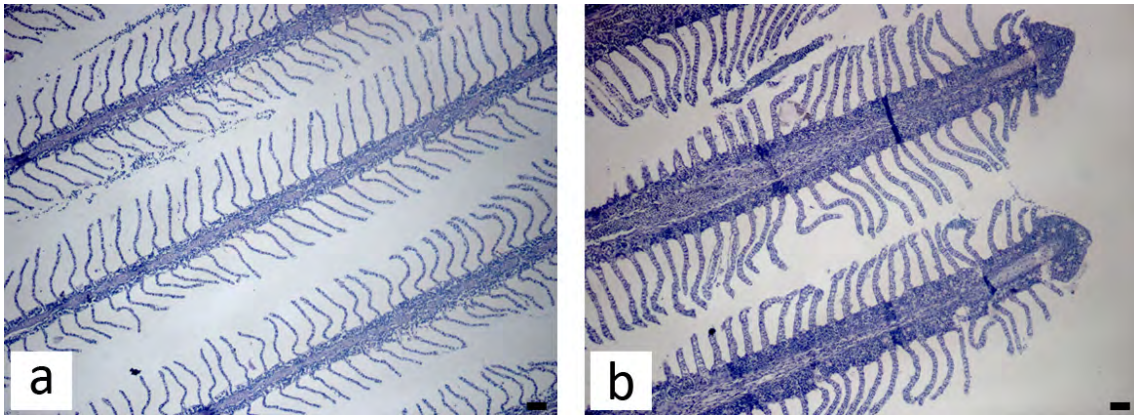


Slika 23. Cirkulatorne promene na škragama riba iz eksperimenta: a) staze u centralnim venoznim sinusima (HE x100); b) hematom na sekundarnoj lameli (HE x400); c) telangiektazije (HE x100); d) te - telangiektazije; hp - hiperplazija epitela na vrhovima primarnih lamela (HE x50); bar = 50 μ m



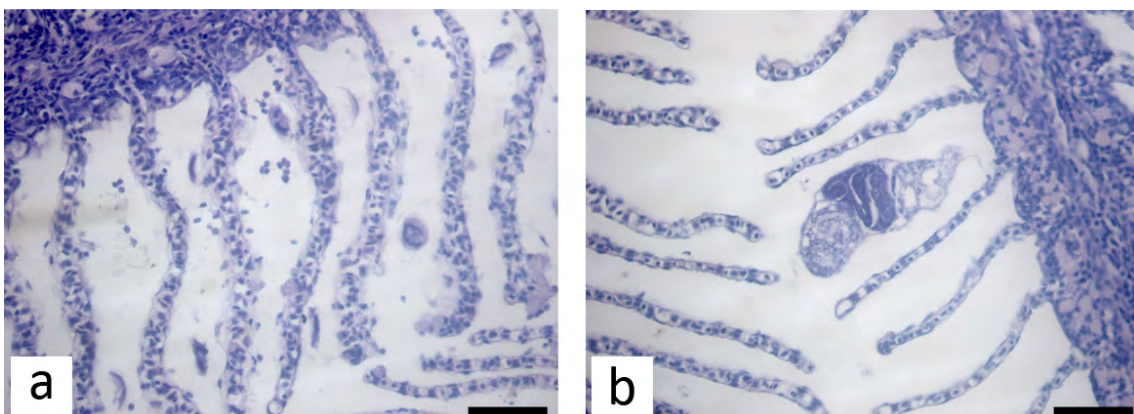
Slika 24. Najteže i ireparabilne promene na škragama riba iz eksperimenta: a) nekroza epitelno tkiva (HE x400); b) potpuna fuzija primarnih lamela (HE x200); bar = 50 μ m

Pored ovih promena na većini preparata je uočena i jedna pravilnost. Debljina sekundarnih lamela se menjala od proksimalnog dela primarne lamele, gde je bila minimalna, i gotovo potpuno atrofirala (**Slika 25a**) do zadebljanih sekundarnih lamela, gotovo hipertrofisanih, koje su se mogle primetiti na distalnom delu primarnih lamela (**Slika 25b**).

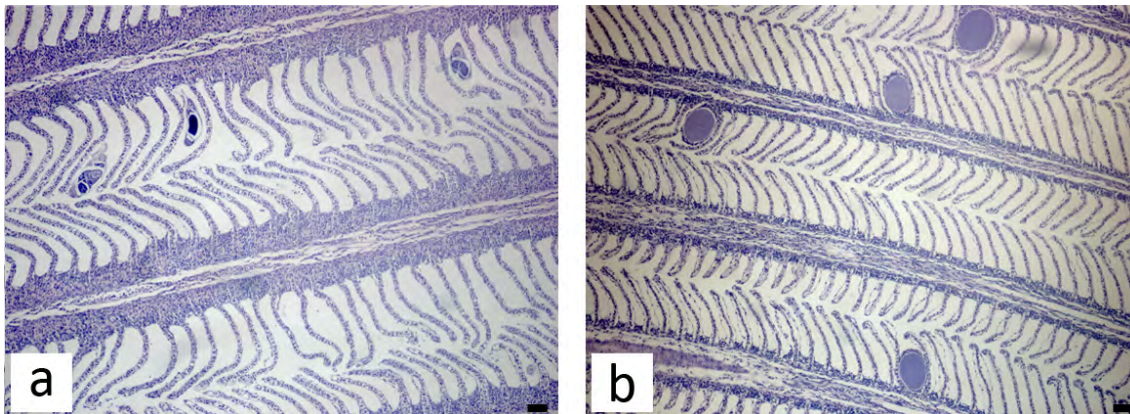


Slika 25. Razlika u debljini sekundarnih lamela u zavisnosti od lokacije: a) izuzetno tanke sekundarne lamele prisutne u proksimalnom delu primarnih lamela (HE x100); b) zadebljale sekundarne lamele prisutne na distalnom delu istih primarnih lamela (HE x100); bar = 50 μ m

Pojedine histopatološke promene na škragama su se javljale i zbog prisustva parazita. Paraziti koji su uočavani na škragama su najčešće bili: *Trichodina* sp. (**Slika 26a**) i trematode (**Slika 26b** i **27a**), kao i *Epitheliocystis* sp. koji se primećivao između sekundarnih lamela (**Slika 27b**).



Slika 26. Prisustvo parazita na škržnom aparatu riba iz eksperimenta: a) veliki broj *Trichodina* sp. u interlamelarnom prostoru (HE x400); b) metilj koji se pijavkom zakačio za sekundarnu lamelu (HE x400); bar = 50 μ m



Slika 27. Prisustvo parazita na škržnom aparatu riba iz eksperimenta: a) tri metilja u interlamelarnom prostoru (HE x100); b) *Epitheliocystis* sp. u interlamelarnom prostoru (HE x100); bar = 50 μ m

Nije bilo razlike u broju parazita između grupa u eksperimentu. U pojedinim periodima, dolazilo je do masovne infestacije škrge parazitima, ali su one bile prisutne u svim jezerima i grupama podjednako. Frekvencija pojavljivanja parazita na škragama je iznosila oko 30% od ukupnog broja pregledanih preparata (**Tabela 25**).

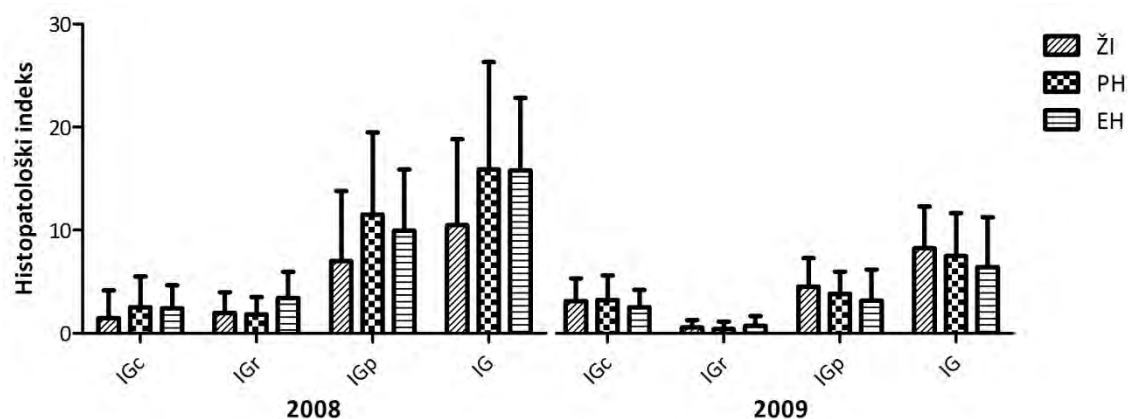
4.5.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škragama

Slično kao što je slučaj i sa histopatološkim promenama u jetri, radi lakšeg praćenja, promene na škragama su ispitivane između grupa riba hranjenih različitom hranom. Nakon toga, prikazano je upoređivanje histopatoloških promena između dve sezone gajenja.

4.5.2.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škragama između grupa

Ukoliko uporedimo histopatološki indeks promena na škragama između riba koje su hranjene različitom hranom, primetićemo da nema razlike, kako ni u jednoj kategoriji, tako ni u prvoj ni u drugoj sezoni gajenja (**Grafik 19**). Tokom 2008. godine progresivne promene na škržnom aparatu su najviše doprinele ukupnom histopatološkom ideksu, dok je smanjenje i regresivnih i progresivnih promena u 2009-oj godini posledično uticalo i na niži ukupni histopatološki indeks. U prvoj godini gajenja je primetan i niži histopatološki indeks progresivnih promena na

škragama, kao i ukupni indeks kod grupe riba hranjenih žitaricama.



Grafik 19. Polukvantitativni skoring histoloških promena na škragama riba iz eksperimenta u okviru grupa, prikazanih u toku obe godine studija: IGc - indeks cirkulatornih promena; IGr - indeks regresivnih promena; IGp - indeks progresivnih promena; IG - ukupni histopatološki indeks škruga

Ova razlika, međutim, nije bila statistički značajna. p-vrednost indeksa progresivnih patoloških promena na škragama je iznosila 0.209, dok je p-vrednost u poređenju ukupnog škržnog histopatološkog indeksa iznosila 0.162.

4.5.2.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škragama između dve godine

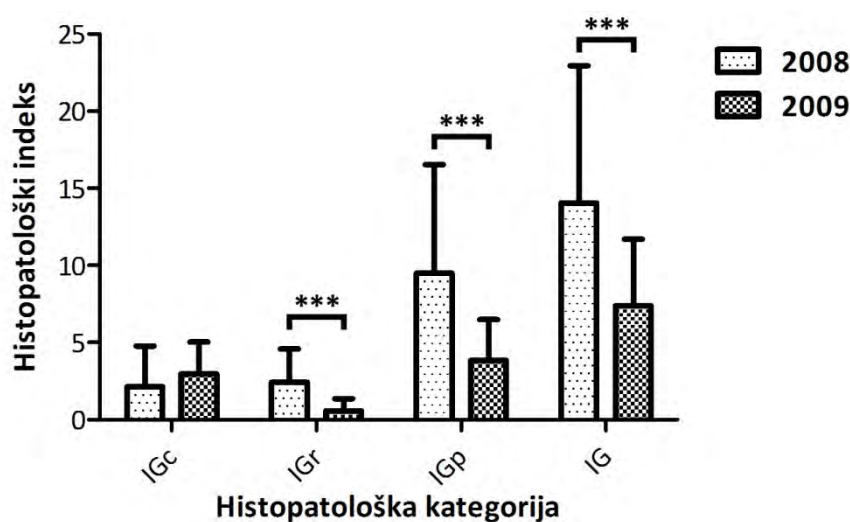
Za razliku od poređenja histopatoloških promena na škragama između grupa, razlike između godina su očigledne i značajne. Veliki broj histopatoloških lezija je pokazivao razliku između godina (**Tabela 26**), a u njoj se uočava i određena pravilnost.

Naime, sve cirkulatorne promene koje su statistički značajne su bile više u drugoj godini istraživanja, dok su promene na epitelnim ćelijama bile značajno više u prvoj godini istraživanja. Tu su spadali prisustvo hematoma ($p < 0.001$) i hiperemija u kapilarima sekundarnih lamela ($p = 0.045$). Prisustvo staza u centralnim venoznim sinusima je bilo više u drugoj godini istraživanja, dok su lamelarne telangiektazije bile više u prvoj godini istraživanja, ali u oba slučaja nije bilo statistički značajnih razlika.

Tabela 26. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena na škragama između dve godine istraživanja

Histopatološka promena	Godina		p-vrednost
	2008	2009	
Hiperemija	1.15 ± 1.48 ^a	1.63 ± 1.23 ^b	0.045
Staze	0.48 ± 1.15	0.72 ± 1.28	0.159
Lamelarne telangiektazije	0.17 ± 0.45	0.07 ± 0.24	0.284
Hematomi	0.00 ± 0.00 ^a	0.70 ± 1.49 ^b	0.000
Izdizanje respiratornog epitela	1.74 ± 1.57 ^a	0.33 ± 0.55 ^b	0.000
Hiperplazija respiratornog epitela	1.23 ± 1.58 ^a	0.24 ± 0.48 ^b	0.005
Potpune fuzije lamela	0.03 ± 0.12	0.00 ± 0.00	0.070
Nekroze	0.09 ± 0.23 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.008

Histopatološke promene na ćelijama respiratornog epitela su bile značajno više tokom prve godine, i obuhvatale su izdizanje ćelija respiratornog epitela i hiperplazije ćelija primarnog epitela. S tim što je u ovoj tabeli hiperplazija epitelnih ćelija prikazana objedinjeno, odnosno svi tipovi hiperplazija su sumirani i prikazani kao jedna promena, za razliku od **tabele 25**.



Grafik 20. Polukvantitativni skoring histoloških promena na škragama riba iz eksperimenta u okviru kategorija, prikazanih po godinama studija: IGc - indeks cirkulatornih promena; IGr - indeks regresivnih promena; IGp - indeks progresivnih promena; IG - ukupni histopatološki indeks škrगा; *** p<0.001

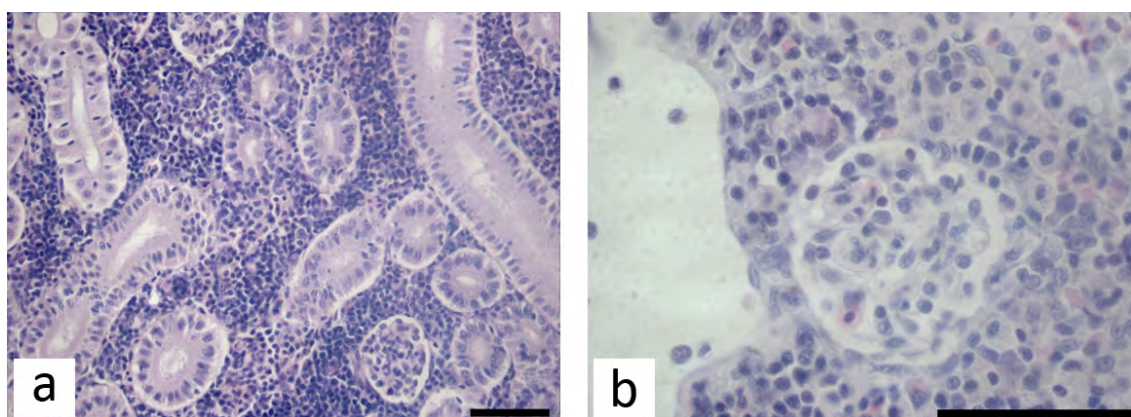
Pored toga ireverzibilne promene (potpune fuzije lamela i nekroze) su bile

značajno više u prvoj godini istraživanja, štaviše nijedna ireverzibilna promena nije uočena u toku druge godine eksperimenta. Nekroze su značajno više u prvoj godini istraživanja ($p=0.008$), dok statistička značajnost za potpune fuzije primarnih lamela nije ustanovljena ($p=0.070$). Potvrda ovih činjenica je data na **grafiku 20**, gde su ove promene grupisane po kategorijama. Sa grafika se vidi da postoje značajne razlike između dve godine istraživanja za regresivne ($p<0.001$) i progresivne ($p<0.001$) histopatološke promene na škrigama, kao i za ukupni histopatološki indeks škriga ($p<0.001$).

Bitno je još pomenuti da neke histopatološke promene koje su veoma često prisutne u drugim istraživanjima, ovde nisu nalažene ni na jednom preparatu. Radi se o hipertrofiji ćelija respiratornog epitela, povišenom broju mukusnih ćelija u škrigama, kao i njihovom prisustvu u sekundarnim lamelama. Još neke patologije koje se inače retko uočavaju na preparatima škriga nisu pronađene ni u ovom istraživanju, kao što su: račvanje primarnih ili sekundarnih lamela i poremećaji u hrskavičavom tkivu u primarnim lamelama. Pored toga ni povećan broj hloridnih ćelija u tkivu primarnih lamela nije primećen.

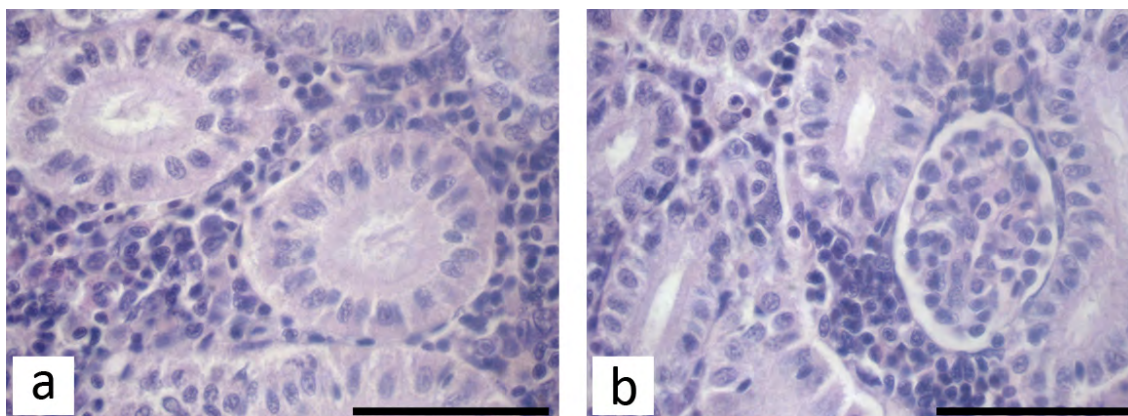
4.6. Histologija bubrega

Na histološkim presecima posteriornog bubrega kod šarana iz eksperimenta su bile vidljive tri različite strukture. Najveći deo bubrega je zauzimalo intersticijalno tkivo (**Slika 28a**).



Slika 28. Delovi bubrega šarana iz eksperimenta na kojima nisu prisutne histopatološke promene; a) HE x400; b) HE x1000; bar = 50 μ m

Ono ima funkciju hematopoeze i u njemu se uočavaju limfoidno tkivo i zrele krvne ćelije, kao i mijeloblastne ćelije. Pored hematopoetičnog tkiva, u intersticijalnom tkivu se nalaze glomerulusi i tubulusi. Glomerulusi se sastoje od Malpigijevog telašca i Boumenove kapsule (**Slika 28a, 28b i 29b**).



Slika 29. Delovi bubrega šarana iz eksperimenta na kojima nisu prisutne histopatološke promene; a) HE x1000; b) HE x1000; bar = 50 μ m

Malpigijevo telašće čini splet kapilara koji se nalaze na prelazu iz aferentne arteriole, koja ulazi u glomerulus i eferentne arteriole, koja ga napušta. Pored kapilara, u glomerulusu su vidljive i ćelije mezangijuma, a Malpigijevo telašće okružuje Boumenova kapsula. Kapsula je uglavnom kružnog oblika na preseccima i čini je parijetalni sloj, odnosno pločast, jednoslojan epitel i visceralni sloj koji naleže na kapilare Malpigijevog telašca i čine ga podociti. Iz glomerulusa polaze dugački cevasti nastavci koji se nazivaju tubulusi (**Slika 28a, 29a i 29b**). Oni su na histološkim preseccima razbacani bez reda po intersticijalnom tkivu i u zavisnosti od preseka su okrugli ili nepravilnog oblika. U proksimalnim delovima tubulusa epitelne ćelije, koje uokviruju lumen, na apikalnim delovima imaju izražene mikrovile, dok tubulusi u distalnom delu ne pokazuju ovo svojstvo. Takođe, u intersticijumu je prisutan i značajan broj krvnih sudova, kao i sabirni kanalići većeg promera, u koje se izlivaju ekskretorni produkti iz distalnog dela tubulusa.

Međutim, interesantno je da je od svih pregledanih organa šarana u eksperimentu, bubreg posedovao najveći deo tkiva zahvaćenog histopatološkim promenama, kao i najviši nivo nekroza, što će biti detaljnije predstavljeno u sledećem odeljku.

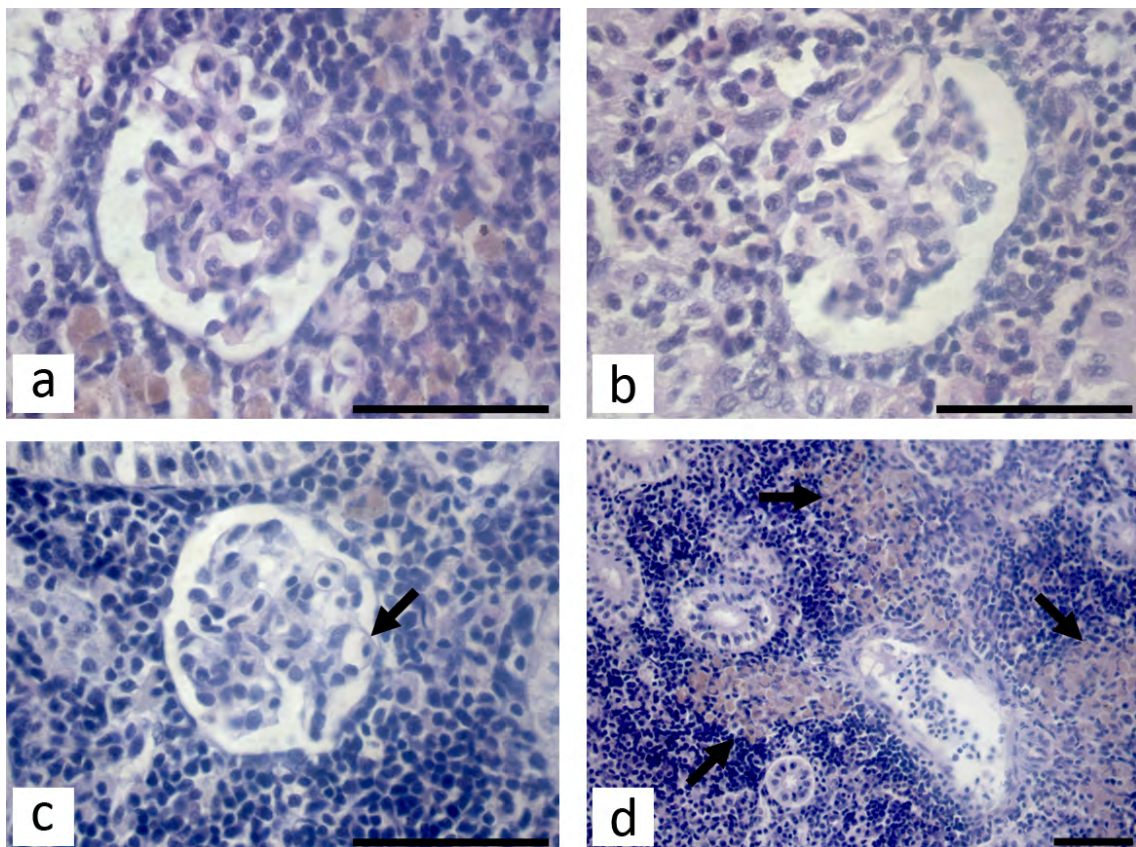
4.6.1. Histopatološke promene u bubregu

Frekvencija pojavljivanja promena u bubregu je prikazana u **tabeli 27**. Promene su klasifikovane u zavisnosti od toga da li su uočavane na glomerulusima, tubulusima ili intersticijalnom tkivu. Dve promene koje su se najčešće pojavljivale na pregledanim preparatima su dilatacija Boumenove kapsule (61%) i hidropska degeneracija tubulusa (65%). Ove dve promene su jedine koje su nalažene na više od 50% preparata. Veoma česta promena na glomerulusima je bila širenje kapilara u Malpigijevom telašcu (46%), kao i povećano prisustvo makrofagnih centara u intersticijumu (44%). Ostale promene su obuhvatale skupljanje lumena tubulusa (25%), staze u krvnim sudovima (22%) i nekroze glomerulusa (16%) i tubulusa (15%). Promene koje su nalažene na deset i manje procenata su fibroze krvnih sudova (10%) i zadebljala membrana Boumenove kapsule (5%), dok su tri promene zabeležene na samo jednoj ribi u toku istraživanja: hiperemija u glomerulusima, hipertrofija jedara tubulusa i nekroza intersticijuma.

Tabela 27. Frekvencija pojavljivanja histoloških promena tokom obe godine eksperimenta (%)

Tip histopatološke promene	Procenat broja riba sa prisutnom promenom
Promene na glomerulusima	
Dilatacija Boumenove kapsule	61.2
Zadebljala membrana Boumenove kapsule	5.0
Širenje kapilara u glomerulusima	46.2
Hiperemija u glomerulusima	1.2
Nekroza glomerulusa	16.2
Promene na tubulusima	
Hidropska degeneracija tubulusa	65.0
Hipertrofija jedara tubulusa	1.2
Skupljanje lumena tubulusa	25.0
Nekroza tubulusa	15.0
Promene u intersticijumu	
Povećano prisustvo MC-a u intersticijumu	43.7
Staze u krvnim sudovima	22.5
Fibroze u krvnim sudovima	10.0
Nekroza intersticijuma	1.2

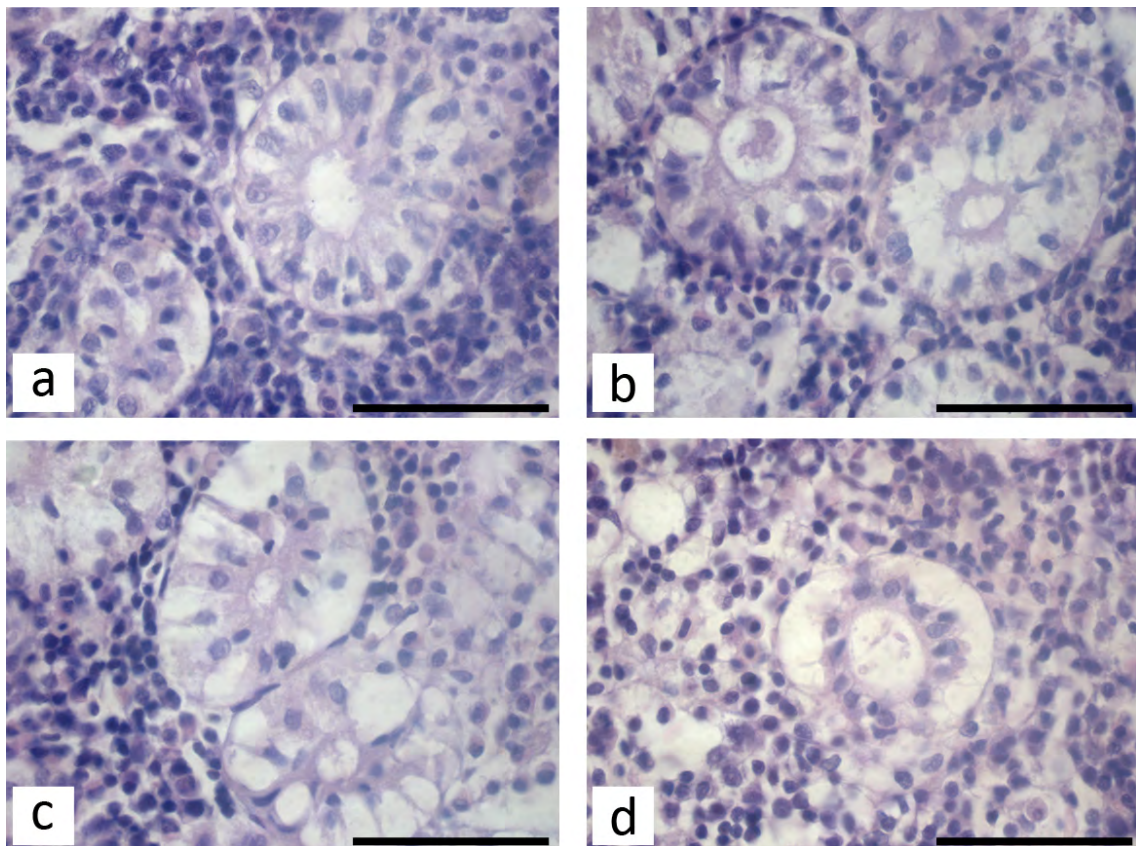
Histopatološke promene su skoro podjednako zahvatale sve delove nefrona u bubregu. Promene sa visokom učestalošću pojavljivanja su zabeležene i na tubulusima i na glomerulusima, kao i u intersticijalnom tkivu. Dilatacija Boumenove kapsule dovodi do nakupljanja tečnosti oko Malpigijevog telašca i poremećaja u izlučivanju. Intenzitet dilatacije i razmak između Malpigijevog telašca i Boumenove kapsule je bio različit kod različitih riba (**Slika 30a i 30b**), ali su nekada razlike bile prisutne i u istoj jedinki, gde su pojedini glomerulusi bili bez bilo kakvih promena, dok je kod drugih primećena dilatacija Boumenove kapsule u znatnoj meri.



Slika 30. Histopatološke promene u bubregu riba iz eksperimenta: a) Srednje izražena dilatacija Boumenove kapsule i povećan broj makrofaga oko nje (HE x1000); b) Jače izražena dilatacija Boumenove kapsule (HE x1000); c) Prošireni kapilari u Malpigijevom telašcu (strelica; HE x1000); d) Povećan broj makrofagnih centara u bubrežnom tkivu (strelice; HE x200); bar = 50 μ m

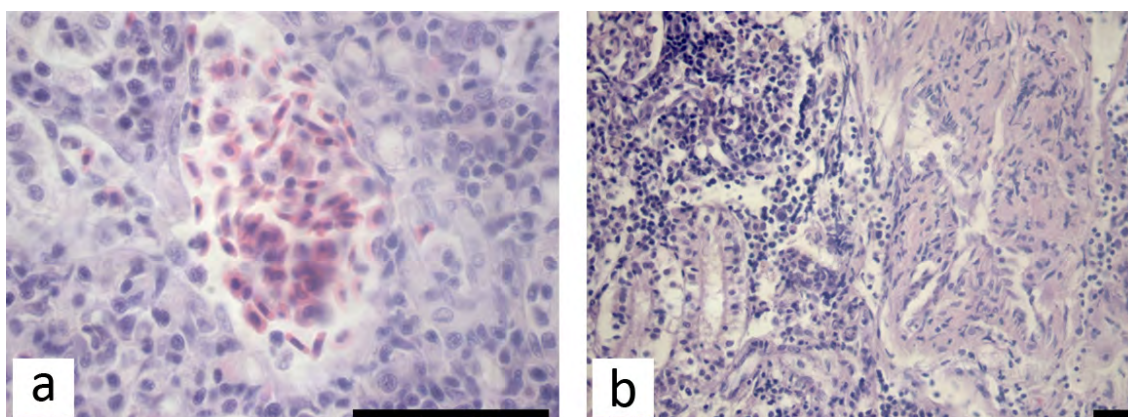
Na preparatima se dilatacija Boumenove kapsule jasno razlikuje od normalnih glomerulusa koji se vide na **slikama 28a, 28b i 29b**. Pored dilatacije,

veoma česta promena u Malpigijevom telašcu je i širenje kapilara (**Slika 30c**). Ova promena obuhvata proširenje kapilarnog lumena i promene na ćelijama mezangijuma. Na nekim preparatima se u dilatiranim kapilarima moglo uočiti i više od jednog eritrocita, a ukoliko je uočen veći broj eritrocita, konstatovana je hiperemija. Zadebljala membrana Boumenove kapsule je prisutna u relativno malom broju uzoraka i odlikuje se hipertrofijom parijetalnog sloja epitelnih ćelija koje se nalaze na bazalnoj membrani. Najčešća primećena histopatološka promena na tubulusima je bila hidropska degeneracija epitelnih ćelija tubulusa (**Slika 31**). Kao i kod hepatocita, ova promena predstavlja pojavljivanje vakuola u epitelnim ćelijama koje su pravilnog, okruglog oblika i ispunjene tečnošću. Ukoliko promena dugo traje, vakuole ispunjavaju sve veću zapreminu ćelije i negde mogu dovesti do rupture ćelijske membrane i smrti ćelije. Različiti stepen vakuolizacije tubularnih ćelija je ilustrovan na **slikama 31a-d**.



Slika 31. Različiti stepen hidropske degeneracije tubulusa u bubregu riba iz eksperimenta: a) Slabo izražena hidropska degeneracija (HE x1000); b) i c) umerena hidropska degeneracija (HE x1000); d) veoma izražena hidropska degeneracija (HE x1000); bar = 50 μ m

Paralelno sa pojavom vakuola, jedro i citoplazma se pomeraju ka ćelijskoj membrani i na kraju čine tanak prsten uz membranu. Interesantno je da određena pravilnost ne postoji, pa se jedra mogu uočiti ili na bazalnom (**Slika 31c i 31d**) ili na apikalnom polu ćelije (**Slika 31b**). Pored hidropske degeneracije, na četvrtini pregledanih uzoraka su prisutne i promene u dijametru lumena tubulusa. Konstrikcija tubularnog lumena se karakterisala time da se tubularni lumen kod riba na nekim preparatima skoro potpuno zatvarao i da u tim slučajevima bubrežni kanalić nije mogao pravilno da funkcioniše. Hipertrofija jedara epitelnih ćelija tubulusa je bila prisutna kod svih tubulusa u regeneraciji (**Slika 34a i 34b**), međutim, ona nisu ubrajana u patološke promene, već samo jedra ćelija koje su se nalazile u već razvijenim tubulusima i koja su pokazivala veću dimenziju od normalne. Promene u intersticijalnom tkivu, osim jednog preparata na kome je zabeležena nekroza, nisu zahvatale hematopoetično tkivo. Većina promena je primećena na krvnim sudovima: staze (**Slika 32a**), gde je krv ostajala duže vremena u krvnim sudovima i fibroze krvnih sudova (**Slika 32b**).

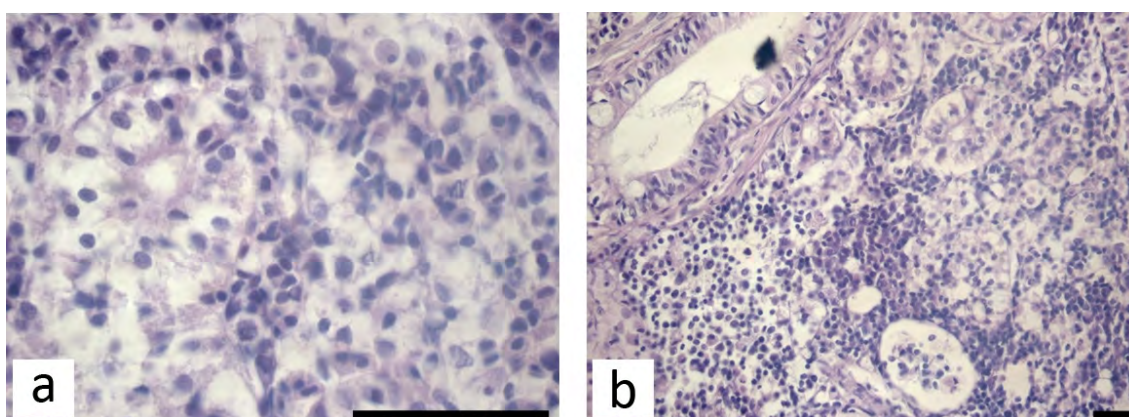


Slika 32. Histopatološke promene u bubregu riba iz eksperimenta: a) prisustvo staze u krvnom sudu (HE x1000); b) prisustvo fibroze i nekroze u bubrežnom tkivu (HE x200); bar = 50 μ m

Međutim, najčešća promena je povišen broj makrofagnih centara u intersticijumu. Kao i u jetri, ovi centri predstavljaju agregate makrofaga, s tim što za razliku od jetre, gde su obično udruženi sa pigmentom melaninom, u bubregu najčešće melaninskih granula i melanocita nema, te su obojeni bleđožučkasto ili braon bojom (**Slika 30d i 35**). Makrofagni agregati se nalaze razbacani po

intersticijumu, između hematopoetičnog tkiva. U normalnom stanju, ovi agregati su malog promera i sastavljeni od 5-10 ćelija (**Slika 35**), dok su u patološkom stanju magrofagni agregati brojniji (**Slika 30d**) i mnogo gušće raspoređeni nego pri nepatološkim stanjima.

Još jedna specifičnost patologija u bubrežnom tkivu je visok procenat prisustva nekrotičnih promena. Nekroze su uglavnom uključivale pucanje ćelijskih membrana, piknozu jedara i rasipanje ćelijskog sadržaja (**Slika 33a**), ali je nekada dolazilo i do potpune degeneracije bubrežnog tkiva (**Slika 33b**).



Slika 33. Nekroze u bubrežnom tkivu: a) degeneracija tubulusa i intersticijalnog tkiva oko njega (HE x1000); b) potpuna degeneracija glomerulusa i pojedinih tubulusa i nekroza intersticijalnog tkiva bubrega u donjem levom uglu mikrografije (HE x200); bar = 50 μ m

Ni kod jedne ribe iz eksperimenta u bubregu nije primećeno prisustvo parazita.

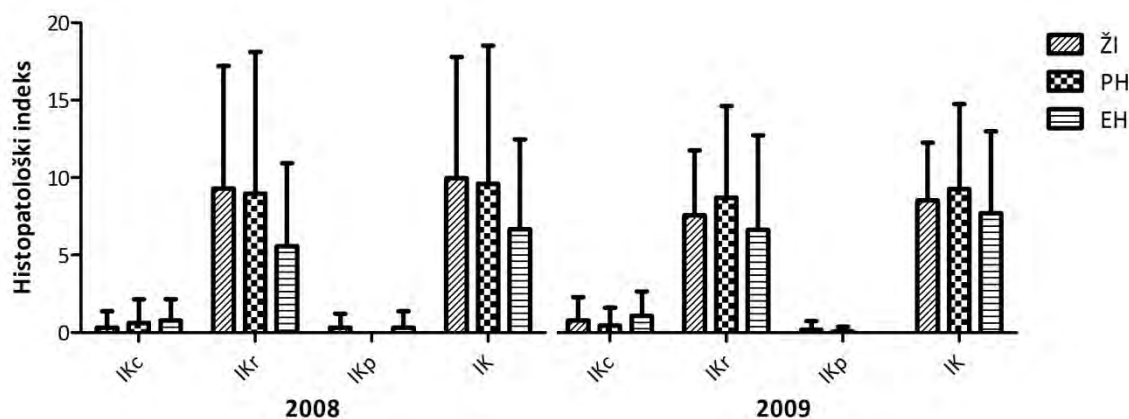
4.6.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu

Prikaz polukvantitativnog skoringa histopatoloških promena u bubregu je podeljen na dva dela, u prvom delu je prikazan odnos između različitih grupa riba, dok je drugi deo prikaz poređenja između dve godine istraživanja.

4.6.2.1. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu između grupa

Nijedna od kategorija histopatoloških promena se nije razlikovala među grupama u toku 2008. godine (**Grafik 21**). U histopatološkom indeksu regresivnih

promena, kao i u ukupnom histopatološkom indeksu ribe hranjene ekstrudiranom hranom su pokazivale tendenciju nižih vrednosti, i te vrednosti nisu bile statistički značajne.



Grafik 21. Polukvantitativni skoring histoloških promena u bubregu riba iz eksperimenta u okviru grupa, prikazanih u toku obe godine studija: IKc - indeks cirkulatornih promena; IKr - indeks regresivnih promena; IKp - indeks progresivnih promena; IK - ukupni histopatološki indeks bubrega

Kao i u prvoj godini istraživanja, i u drugoj godini nije bilo promena ni u jednoj histopatološkoj kategoriji (**Grafik 21**).

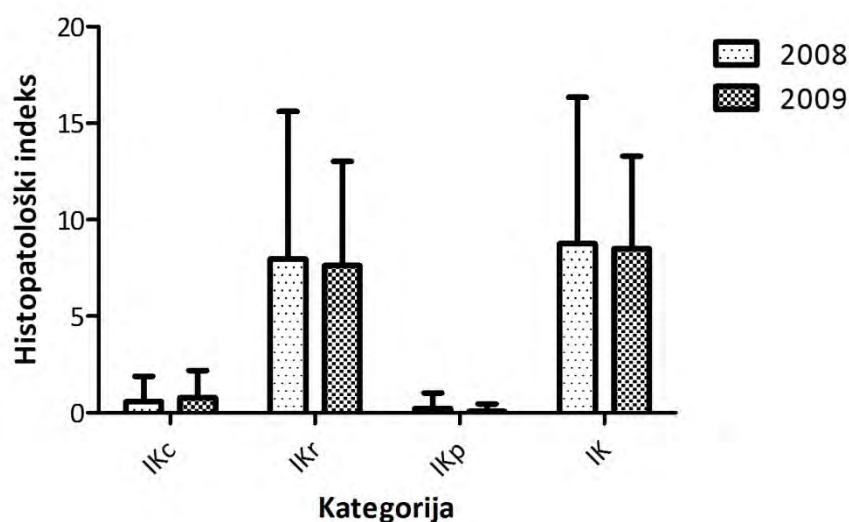
4.6.2.2. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu između dve godine

Za razliku od škrge i jetre, histopatološke promene u bubrezima nisu pokazivale veliku razliku između dve godine istraživanja (**Tabela 28**). Zapravo je jedina statistički značajna razlika ustanovljena kod širenja kapilara u Malpigijevom telašcu. Ova promena je bila češća tokom prve godine istraživanja.

Ukoliko posmatramo histopatološke promene po kategorijama, primetno je da nema razlika između dve godine istraživanja (**Grafik 22**). Istovremeno, vidljivo je da su regresivne promene u bubregu kategorija koja je najznačajnije doprinela ukupnom histopatološkom indeksu. Cirkulatorne i progresivne promene su bile veoma retke i njihov indeks ni u jednoj godini istraživanja nije prešao vrednost 1. Istovremeno, vidljivo je da su regresivne promene u bubregu kategorija koja je najznačajnije doprinela ukupnom histopatološkom indeksu.

Tabela 28. Polukvantitativni skoring histopatoloških promena u bubregu između dve godine istraživanja

Histopatološka promena	Godina		p-vrednost
	2008	2009	
Dilatacija Boumenove kapsule	2.33 ± 2.14	1.85 ± 1.97	0.264
Zadebljala membrana Boumenove kapsule	0.12 ± 0.41	0.03 ± 0.12	0.500
Širenje kapilara u glomerulusima	1.46 ± 1.65 ^a	0.65 ± 1.16 ^b	0.006
Nekroza glomerulusa	0.28 ± 0.63	0.28 ± 0.53	0.839
Hidropska degeneracija tubulusa	1.63 ± 1.58	2.32 ± 1.77	0.103
Skupljanje lumena tubulusa	0.39 ± 0.88	0.69 ± 1.24	0.234
Nekroza tubulusa	0.25 ± 0.61	0.28 ± 0.55	0.783
Makrofagni centri	0.64 ± 0.67	0.77 ± 0.75	0.496
Staze	0.57 ± 1.34	0.76 ± 1.41	0.276
Fibroze u krvnim sudovima	0.20 ± 0.68	0.18 ± 0.56	0.844
Nekroza intersticijuma	0.11 ± 0.61	0.01 ± 0.08	0.407

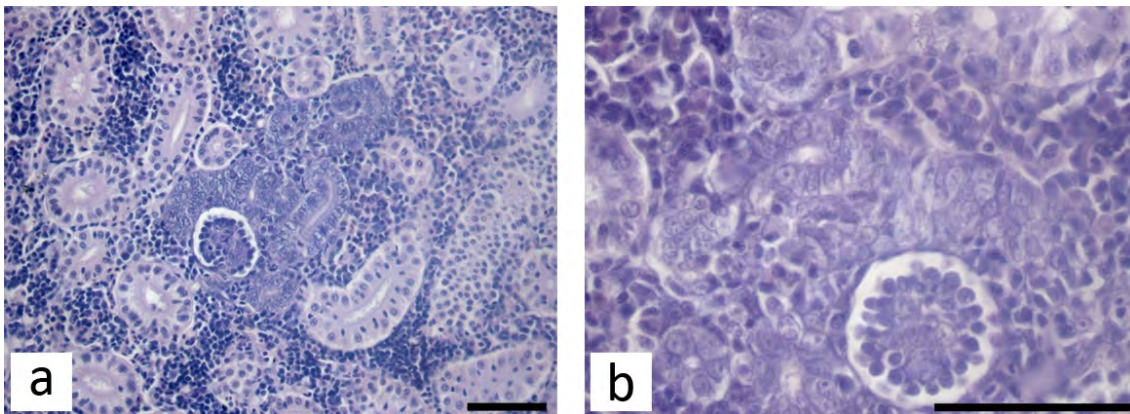


Grafik 22. Polukvantitativni skoring histoloških promena u bubregu riba iz eksperimenta u okviru kategorija, prikazanih po godinama studija: IKc - indeks cirkulatornih promena; IKr - indeks regresivnih promena; IKp - indeks progresivnih promena; IK - ukupni histopatološki indeks bubrega

Cirkulatorne i progresivne promene su bile veoma retke i njihov indeks ni u jednoj godini istraživanja nije prešao vrednost 1.

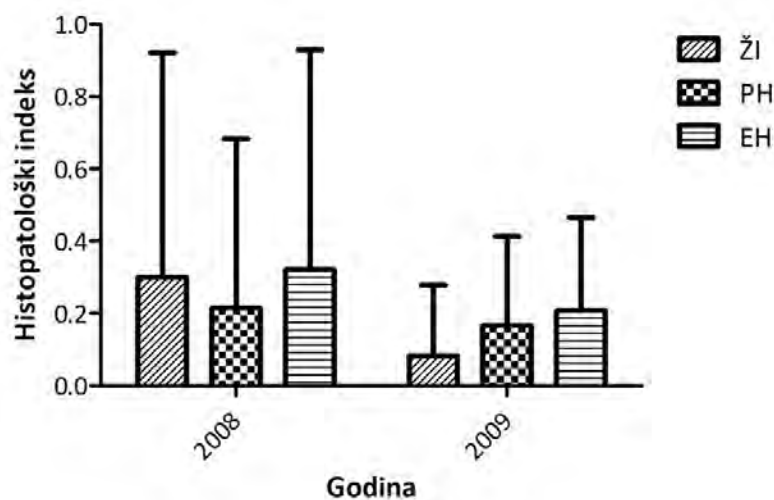
4.6.3. Nefroni u stadijumu regeneracije

Pored histopatoloških promena u bubregu, primećeni su i bubrezi koji su bili u stanju regeneracije (**Slika 34a i 34b**). Ovi regenerišući tubulusi i glomerulusi su se odlikovali izuzetnom bazofilijom ćelija i manjom dimenzijom od normalnih glomerulusa i tubulusa. Pored bazofilije, karakteristično za epitelne ćelije bubrežnog kanalića je i izuzetno krupno i euhromatinsko jedro (**Slika 34b**).



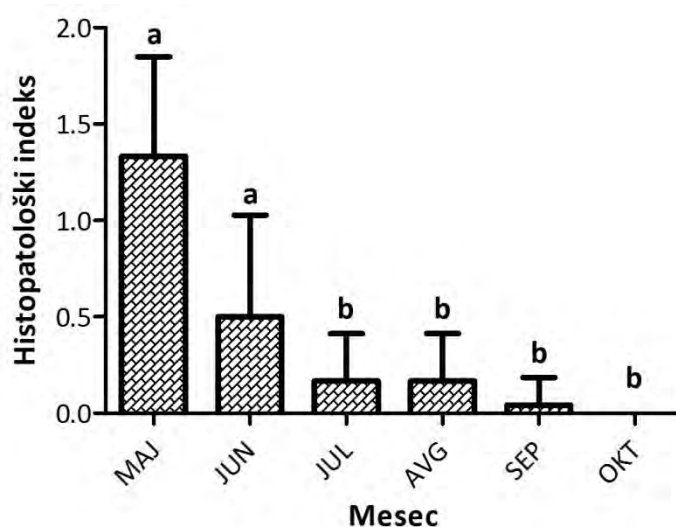
Slika 34. Regenerisani tubulusi i glomerulusi; a) HE x400; b) HE x1000; bar = 50 µm

Broj nefrona u stadijumu regeneracije je bio viši tokom prve godine eksperimenta, u odnosu na drugu, ali ne i statistički značajno viši ($p=0.210$; **Grafik 23**). Njihov broj se nije razlikovao između grupa, ni u prvoj ($p=0.871$) ni u drugoj ($p=0.422$) godini istraživanja.



Grafik 23. Broj nefrona u stadijumu regeneracije (i tubulusi i glomerulusi) tokom prve i druge godine eksperimenta

Međutim, ukoliko posmatramo frekvenciju njihovog pojavljivanja tokom trajanja eksperimenta, možemo primetiti da je prisustvo regenerisanih nefrona bilo mnogo češće tokom prvih dva meseca trajanja eksperimenta ($p < 0.05$; **Grafik 24**). Ova pravilnost je bila prisutna tokom obe godine istraživanja i odnosi se na sve grupe riba. U poslednjem mesecu eksperimenta u obe godine nisu primećeni nefroni u stadijumu regeneracije.

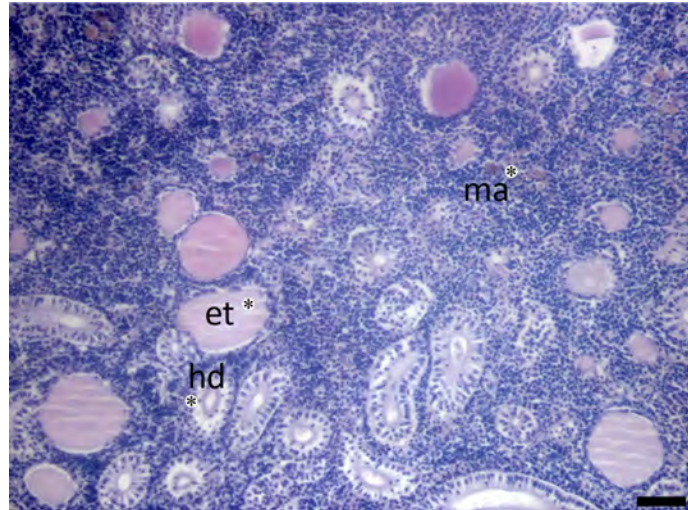


Grafik 24. Pojava regenerisanih nefrona u toku trajanja eksperimenta posmatrano po mesecima; različita slova označavaju statistički značajnu razliku između meseci ($p < 0.05$)

4.6.4. Ektopično tireoidno tkivo u bubregu

U bubregu šarana je primećeno i ektopično tireoidno tkivo, a količina i frekvencija pojavljivanja nije zavisila od grupe. Tireoidno tkivo se sastojalo od folikula, koga čine epitelne ćelije - tireocite, formirajući lumen folikula i koloid koji se luči u lumen i boji ljubičasto pri HE bojenju (**Slika 35**).

Ektopično tireoidno tkivo se najčešće nalazilo distalno od centra preseka, odnosno na unutrašnjim ivicama renalnog tkiva. Povremeno je bilo moguće uočiti ektopično tireoidno tkivo i bliže centralnom delu preseka, ali to ne spada u patološku promenu. Ni u prvoj ($p = 0.416$) ni u drugoj ($p = 0.772$) godini eksperimenta nije nađena razlika između grupa u količini ektopičnog tireoidnog tkiva.



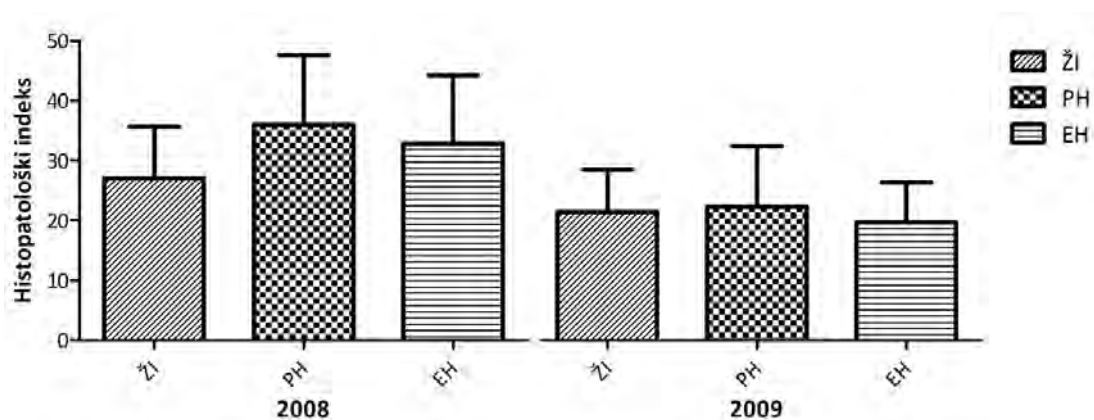
Slika 35. Prisustvo ektopičnog tireoidnog tkiva u bubregu: et - ektopično tireoidno tkivo, ma - makrofagni agregati, hd - hidropska degeneracija (HE x200); bar = 50 μ m

4.7. Ukupan histopatološki indeks tri posmatrana organa

U ovom poglavlju su prikazani ukupni histopatološki indeksi, odnosno suma histopatoloških promena na škragama, jetri i bubregu. Slično kao i kod pojedinačnih organa, indeksi su poređeni između grupa i između dve godine.

4.7.1. Polukvantitativni skoring ukupnih histopatoloških promena između grupa

Kao što je slučaj i sa svim prethodno prikazanim histopatološkim indeksima, između grupa ni u jednoj godini istraživanja nije bilo statistički značajne razlike (Grafik 25).

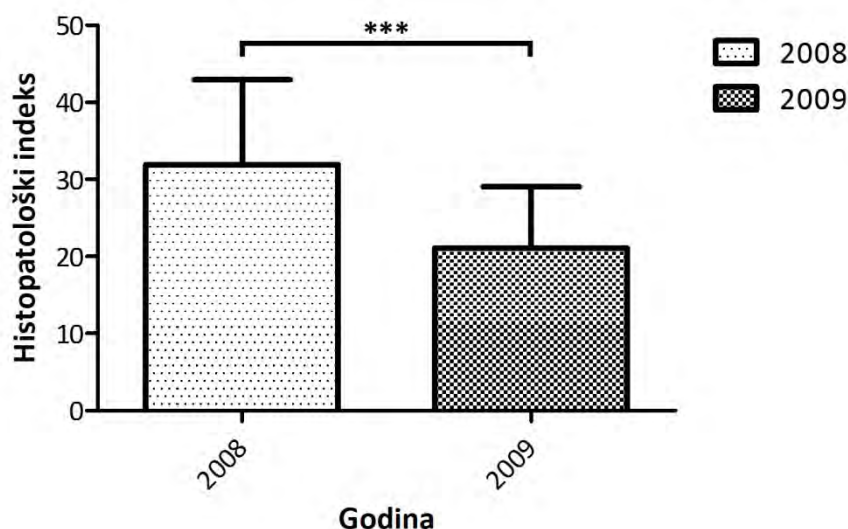


Grafik 25. Polukvantitativni skoring ukupnih histoloških promena na škragama riba iz eksperimenta u okviru grupa, prikazanih u toku obe godine studija

U prvoj godini je statistička značajnost promena između grupa bila na nivou od $p=0.076$, dok je statistička značajnost u drugoj godini iznosila $p=0.722$

4.7.2. Polukvantitativni scoring ukupnih histopatoloških promena između dve godine

S obzirom na statistički značajne razlike između indeksa škrge i jetre između godina, ove razlike su se odrazile i na ukupan histopatološki indeks (**Grafik 26**).



Grafik 26. Polukvantitativni scoring ukupnih histoloških promena riba iz eksperimenta, prikazanih po godinama studija; *** $p<0.001$

Tako je polukvantitativni indeks histopatoloških promena u prvoj godini značajno viši tokom 2008., nego tokom 2009. godine.

4.8. Uticaj životne sredine na vrednost histopatoloških indeksa škrge, bubrega i jetre

Da bi detaljnije ispitali interakcije između parametara kvaliteta vode i intenziteta i broja histopatoloških promena na ribama, urađene su korelacije, kao i kanonijska diskriminantna analiza histopatoloških promena na ribama.

4.8.1. Korelacija između histopatoloških indeksa i kvaliteta vode

Korelacija između histopatoloških indeksa pojedinih organa i parametara kvaliteta vode je prikazana u **tabeli 29**. Najznačajnija pozitivna korelacija, sa

najvišim koeficijentom je ustanovljena između pH i histopatoloških indeksa škrge i jetre, kao i ukupnih histopatoloških indeksa. Pored nje, pozitivno su korelirani i nivoi elektroprovodljivosti i potrošnje kalijum permanganata sa histopatološkim indeksom škrge i ukupnim histopatološkim indeksom. Vrednosti ustanovljenih korelacija su u principu niske, sa četiri vrednosti između 0.33 i 0.46. Vrednosti koeficijenta korelacije više od 0.50 su ustanovljene za tri parametra (pH i IG, pH i IT, elektroprovodljivost i IT; sve tri korelacije $p < 0.05$). Interesantno je i da histopatološki indeks bubrega šarana u ovom istraživanju nije pokazao ni pozitivnu, ni negativnu korelaciju ni sa jednim parametrom kvaliteta vode.

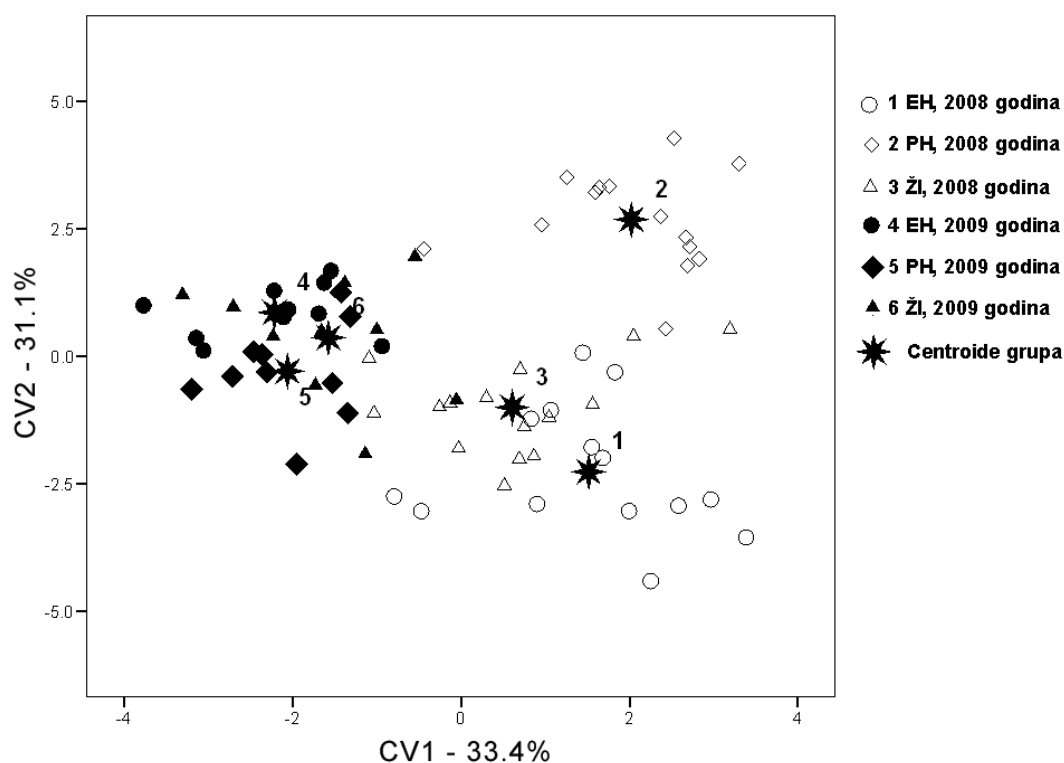
Tabela 29. Korelacija između histopatološkog indeksa i parametara kvaliteta vode; IG - histopatološki indeks škrge; IK - histopatološki indeks bubrega; IL - histopatološki indeks jetre; IT - ukupni histopatološki indeks; parametri koji su statistički značajni su označeni zvezdicom (Spirmanov koeficijent korelacije; $p < 0.05$)

	IG	IL	IK	IT
Amonijačni azot	-0.19	-0.02	-0.27	-0.30
Nejonizovani amonijak	0.03	-0.02	-0.09	-0.03
Nitrati	-0.03	0.08	-0.10	-0.06
Elektroprovodljivost	0.46*	0.24	0.17	0.53*
pH	0.51*	0.34*	0.15	0.60*
Kiseonik	0.28	0.15	0.04	0.22
Potrošnja KMnO_4	0.33*	0.03	0.10	0.33*

Pored toga, nije pokazana statistički značajna korelacija između nivoa amonijačnoga azota, nejonizovanog amonijaka, količine nitrata i rastvorenog kiseonika u vodi i bilo koje grupe histopatoloških promena. Između ostalih parametara kvaliteta vode i histopatoloških promena nisu rađene korelacije, jer nisu postajale indicije u literaturi da bi mogli da utiču na promenu u histologiji organa riba.

4.8.2. Kanonijska diskriminantna analiza histopatoloških promena

Kanonijska diskriminantna analiza je pokazala umereno razdvajanje između šest grupa koje su ispitivane u ovom istraživanju (**Grafik 27**).



Grafik 27. Rezultati kanonijske diskriminantne analize primenjene na histopatološke promene u tri analizirana tkiva (prikazane samo dve funkcije po kojima je došlo do najvećeg stepena razdvajanja): CV - kanonijska funkcija

Kao što se može primetiti na **grafiku 27**, mnogo je veći doprinos razdvajanju po funkcijama dala godina u kojoj su ribe gajene, odnosno izvor vode koji je u toj godini korišćen, nego tip hrane. Pored toga, histopatološke promene kod riba iz druge godine istraživanja su u proseku bile mnogo uniformnije od riba iz prve godine istraživanja, što je primetno na istoj slici gde su centroide grupa zbijene veoma blizu jedna drugoj. Dve kanonijske funkcije (CV) zajedno su objašnjavale 64.5% ukupne varijabilnosti (CV1 - 33.4% i CV2 - 31.1%). Riba iz prve godine su se razdvajale od riba iz druge godine istraživanja duž prve kanonijske funkcije, uglavnom preko kongestije krvnih sudova u jetri, izdizanja respiratornog epitela, interlamelarne proliferacije, širenja kapilara u Malpigijevom telašcu i fibroze krvnih sudova u jetri. Razdvajanju po drugoj kanonijskoj osi su uglavnom doprinele samo dve histopatološke promene i to: fuzija vrhova primarnih lamela i nekroza glomerulusa. Svih pet kanonijskih funkcija su prikazane u **tabeli 30**.

Tabela 30. Grupisane korelacije između diskriminišućih varijabli i standardizovanih kanonijskih diskriminantnih funkcija (kanonijska diskriminantna analiza primenjena na histopatološke promene u tri ispitivana tkiva); G - škrge, L - jetra, K - bubreg; * - promene u okviru jedne funkcije

Histopatološka promena	Broj funkcije				
	CV1	CV2	CV3	CV4	CV5
Kongestija krvnih sudova u jetri (L)	.320*	-.061	-.132	.160	.024
Izdizanje respiratornog epitela (G)	.305*	-.133	.059	.009	.083
Interlamelarna proliferacija (G)	.236*	.010	.015	.102	.153
Širenje kapilara u Malpigijevom telašću(K)	.195*	.041	.079	-.078	.183
Fibroze krvnih sudova (L)	.191*	.021	.055	-.090	-.127
Hipertrofija jedara tubularnih ćelija (K)	.100*	.060	.043	-.066	.002
Srastanje vrhova primarnih lamella (G)	.173	.177*	-.101	-.155	-.099
Nekroza glomerulusa (K)	.009	.143*	-.043	.086	.015
Zadebljala membrana oko glomerulusa (K)	.080	-.132*	-.012	.079	.017
Nekroza parenhima u jetri (L)	.041	-.119*	.073	.066	-.077
Hiperemija u Malpigijevom telašću (K)	.061	-.098*	.088	-.073	-.073
Infiltracija adipocita u pankreas (L)	-.228	.041	.331*	.116	.104
Nekroza pankreasa (L)	.044	-.070	.256*	-.014	-.124
Dilatacija Boumenove kapsule (K)	.030	.018	-.243*	-.029	-.042
Prisustvo EG u jetri (L)	.125	-.047	.070	-.340*	.146
Totalne fuzije primarnih lamela	.049	-.087	-.203	.316*	.184
Staze u krvnim sudovima (G)	-.060	.006	-.138	-.299*	.039
Smanjivanje lumena tubulusa (K)	-.141	.058	.202	.222*	.141
Hidropska degeneracija u jetri (L)	.036	-.026	-.099	.150*	.096
Nekroza intersticijuma u bubregu (K)	.025	-.055	-.103	.146*	.031
Povišeno prisustvo MC-a u bubregu (K)	-.046	.064	.124	.124*	-.087
Nekroza tubulusa (K)	-.039	-.002	-.086	-.180	.345*
Prisustvo MMC-a u jetri (L)	-.084	-.013	-.048	-.167	.339*
Hidropska degeneracija tubularnih ćelija (K)	-.138	.051	-.116	-.083	.257*
Prisustvo hematoma (G)	-.213	.025	-.089	-.182	-.257*
Infiltracija leukocita u jetri (L)	-.005	.127	.016	-.215	.248*
Nekroze tkiva škržnog aparata (G)	.063	-.183	.137	-.001	-.242*
Hiperemija ćelija respiratornog epitela (G)	-.107	.052	.124	-.045	-.236*
Prisustvo staza u bubregu (K)	-.055	.037	.104	.000	-.166*
Fibroza krvnih sudova u bubregu (K)	-.013	.034	-.062	.128	.161*
Lamelarne telangiektazije (G)	.084	.089	.083	-.068	.095*
Prisustvo staza u jetri (L)	.049	.075	.072	-.024	-.079*

4.9. Analiza masnih kiselina u mišićnom tkivu šarana

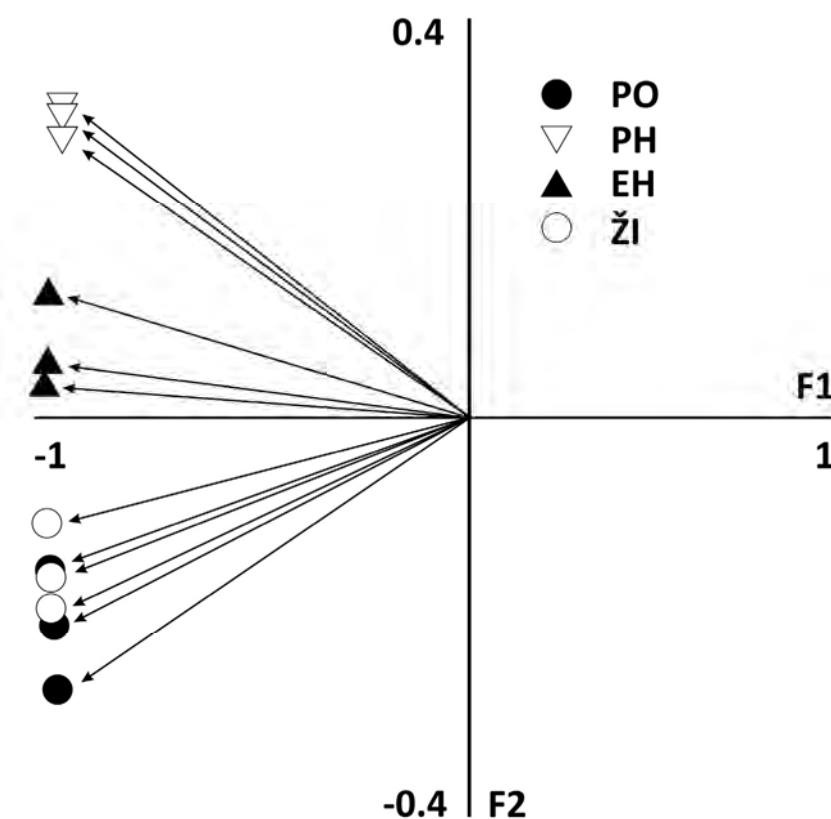
Ukoliko uporedimo procenat masti u mesu šarana sa početka eksperimenta (PO), sa ribama nakon završetka eksperimenta, primetno je povećanje u grupama riba hranjenih žitaricama i ekstrudiranom hranom (**Tabela 31**). U isto vreme, grupa riba hranjenih peletiranom hranom se nije razlikovala od grupe sa početka eksperimenta, kao ni od grupe EH, ali je razlika u procentu lipida bila prisutna u odnosu na grupu riba hranjenih žitaricama.

Tabela 31. Procenat lipida u mišićima riba iz eksperimenta. Različita slova u eksponentu označavaju statistički značajnu razliku između grupa ($p < 0.05$)

	PO	ŽI	PH	EH
Procenat lipida	1.40±0.04 ^a	3.90±1.19 ^c	1.88±0.35 ^{ab}	3.30±0.40 ^{bc}

Da bi se prikazao uticaj tipa hrane na celokupni masnokiselinski sastav mesa riba, kao i stepen promena do kojih su pojedini tipovi ishrane doveli u odnosu na početnu grupu, izvršena je PCA analiza grupa hranjenih riba u funkciji masnokiselinskog sastava mesa riba (**Grafik 28 i 29**). U PCA analizi zadržane su samo dve ose koje nose 95% (F1) i 4.3% (F2) ukupne inercije. Rezultati PCA analize pokazuju da je masnokiselinski sastav mesa riba hranjenih žitaricama najbliži grupi sa početka eksperimenta, dok je do najvećih promena u odnosu na početak eksperimenta došlo kod riba hranjenih peletiranom hranom (**Grafik 28**). Masnokiselinski sastav mesa riba iz grupe EH pokazuje podjednaku sličnost sa grupama PO i PH.

Da bi se utvrdila statistička značajnost uočenih odnosa, masnokiselinski sastavi svih uzoraka su međusobno upoređeni koristeći Pirsonovu korelaciju. Sve ispitane slučajeve je karakterisao visok stepen statističke značajnosti ($p < 0.001$), kao i visok stepen korelacije (koeficijent korelacije $r > 0.8$). Dobijeni rezultati su u potpunosti potvrdili zaključke izvedene iz PCA analize (**Tabela 32**). Naime, najveći stepen korelacije je između grupa ŽI i PO. S druge strane, najniži koeficijenti korelacije karakterišu uzorke riba iz grupe PH u poređenju sa grupama PO i ŽI.



Grafik 28. PCA analiza vrsta ishrane u zavisnosti od sastava masnih kiselina mesa riba

Masnokiselinski sastav mesa riba iz grupe EH pokazuje najniže vrednosti koeficijenta korelacije u poređenju sa grupom ŽI, dok su koeficijenti u poređenju sa druge dve grupe (PH i PO) neznatno viši.

Tabela 32. Korelacioni matriks masnokiselinskih sastava mesa riba sa početka eksperimenta (PO) i nakon završetka eksperimenta (ŽI, PH i EH)

Grupa	PO	ŽI	PH	EH
PO	1.000			
ŽI	0.983	1.000		
PH	0.886	0.861	1.000	
EH	0.967	0.946	0.966	1.000

Sadržaj masnih kiselina u mesu riba sa početka eksperimenta i riba hranjenih sa tri različita tipa hrane je prikazan u **tabeli 33**.

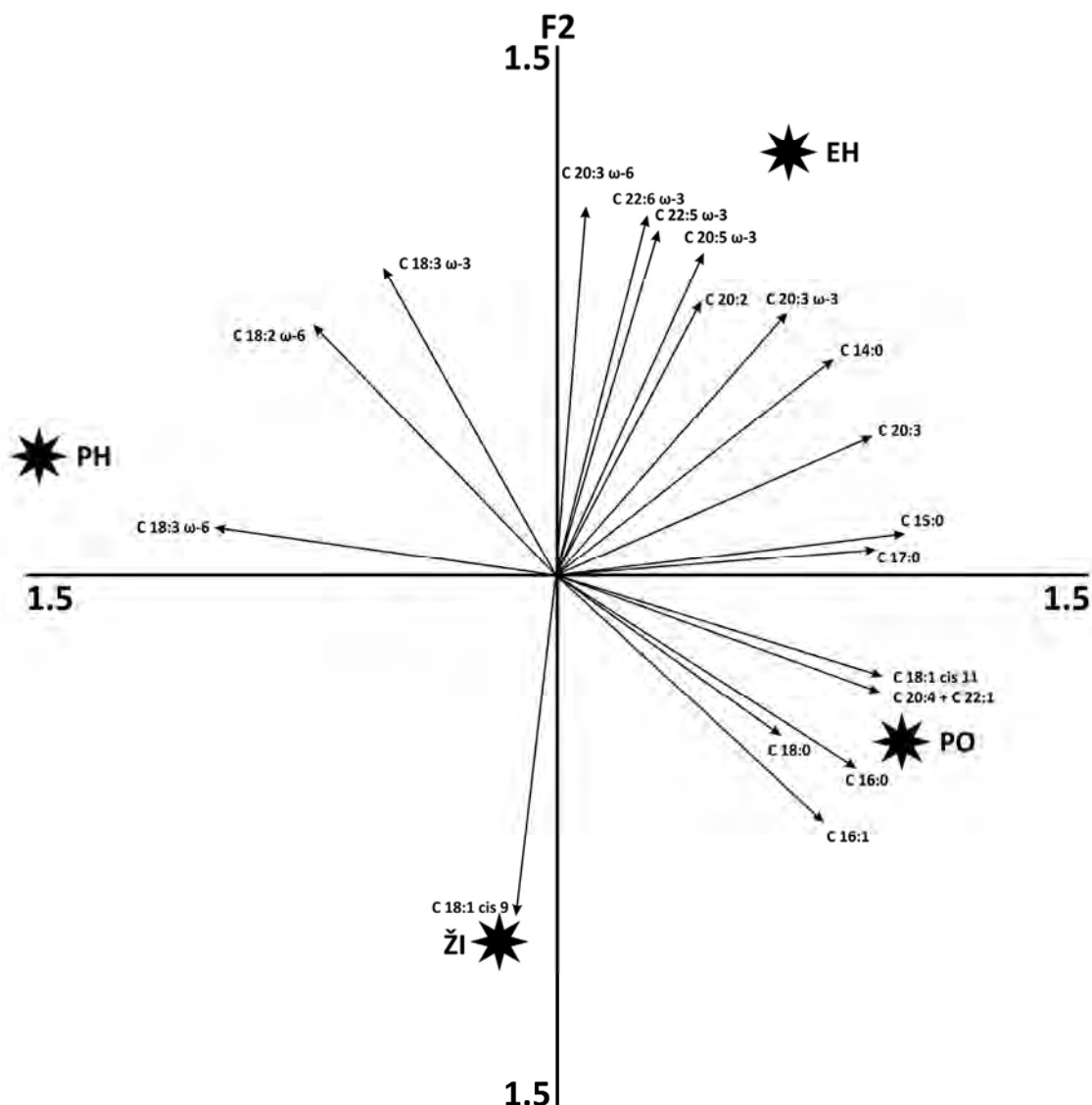
Tabela 33. Sastav masnih kiselina u mesu riba sa početka eksperimenta (PO) i kraja eksperimenta (grupe ŽI, PH i EH) prikazan po grupama i sastav masnih kiselina u hrani kojom su ribe hranjene (u procentima); SFA - zasićene masne kiseline, MUFA - mononezasićene masne kiseline; PUFA - polinezasićene masne kiseline

Masna kiselina	Meso				Hrana		
	PO	ŽI	PH	EH	ŽI	PH	EH
C 14:0	1.14 ± 0.03	0.87 ± 0.05	0.64 ± 0.02	1.62 ± 0.08	0.17 ± 0.02	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04
C 15:0	0.40 ± 0.03	0.25 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.38 ± 0.03	-	-	-
C 16:0	22.21 ± 0.93	20.65 ± 1.08	16.36 ± 0.70	19.36 ± 0.40	17.05 ± 0.60	13.26 ± 0.62	12.00 ± 0.71
C 17:0	0.55 ± 0.06	0.23 ± 0.03	0.17 ± 0.09	0.41 ± 0.07	-	-	-
C 18:0	7.26 ± 0.35	4.99 ± 0.54	4.54 ± 0.16	4.70 ± 0.09	1.38 ± 0.11	3.90 ± 0.15	3.60 ± 0.17
C 20:0	-	-	-	-	0.37 ± 0.07	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.02
Σ SFA	31.57 ± 1.35	26.99 ± 1.29	21.85 ± 0.71	26.47 ± 0.45	18.97 ± 0.80	17.51 ± 0.92	15.93 ± 0.83
C 16:1	7.60 ± 0.28	6.73 ± 0.35	3.13 ± 0.18	4.93 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.18 ± 0.04
C 18:1 cis 9	39.01 ± 2.23	48.02 ± 0.77	37.67 ± 1.44	34.86 ± 1.55	21.74 ± 1.02	25.50 ± 1.13	23.57 ± 1.32
C 18:1 cis 11	4.06 ± 0.15	3.56 ± 0.24	0.99 ± 0.57	3.55 ± 0.15	-	-	-
C 20:1	2.49 ± 0.06	2.07 ± 0.06	1.46 ± 0.11	2.97 ± 0.07	-	-	-
Σ MUFA	53.16 ± 1.79	60.37 ± 0.80	43.24 ± 0.94	46.31 ± 1.42	21.83 ± 1.02	25.75 ± 1.15	23.75 ± 1.34
C 18:2 ω-6	9.53 ± 0.95	6.76 ± 1.73	28.04 ± 0.07	17.07 ± 0.95	57.12 ± 2.11	50.04 ± 2.00	53.24 ± 1.41
C 18:3 ω-3	1.32 ± 0.25	0.72 ± 0.17	2.76 ± 0.08	2.17 ± 0.08	2.08 ± 0.11	5.05 ± 0.21	5.51 ± 0.26
C 18:3 ω-6	0.04 ± 0.04	0.23 ± 0.05	0.39 ± 0.12	0.16 ± 0.02	-	-	-
C 20:2	0.66 ± 0.07	0.29 ± 0.02	0.55 ± 0.07	0.68 ± 0.08	-	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.01
C 20:3 ω-3	0.71 ± 0.06	0.51 ± 0.27	0.34 ± 0.10	1.49 ± 0.13	-	-	-
C 20:3 ω-6	0.92 ± 0.08	0.74 ± 0.10	0.99 ± 0.07	1.09 ± 0.29	-	0.18 ± 0.04	0.18 ± 0.01
C 20:5 ω-3	0.24 ± 0.06	0.20 ± 0.04	0.23 ± 0.06	0.76 ± 0.15	-	0.36 ± 0.01	0.32 ± 0.02
C 20:4 + C 22:1	1.25 ± 0.26	0.97 ± 0.41	0.67 ± 0.11	0.98 ± 0.21	-	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.03
C 22:5 ω-3	0.11 ± 0.11	0.08 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.65 ± 0.16	-	-	-
C 22:6 ω-3	0.50 ± 0.18	0.22 ± 0.02	0.76 ± 0.19	2.16 ± 0.79	-	0.46 ± 0.04	0.47 ± 0.03
Σ PUFA	15.26 ± 1.93	12.38 ± 0.68	34.90 ± 0.35	27.21 ± 1.42	59.20 ± 2.50	56.09 ± 2.10	59.72 ± 1.62
Σ ω-6	12.39 ± 1.40	10.65 ± 0.67	30.64 ± 0.15	19.98 ± 1.23	57.12 ± 2.11	50.22 ± 2.02	53.42 ± 1.41
Σ ω-3	2.87 ± 0.54	1.72 ± 0.22	4.27 ± 0.26	7.23 ± 1.21	2.08 ± 0.11	5.87 ± 0.23	6.30 ± 0.27
Σ ω-3 / Σ ω-6	0.23 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.37 ± 0.07	0.04 ± 0.005	0.10 ± 0.05	0.12 ± 0.04

Osnovna zajednička karakteristika sva četiri ispitivana uzorka mesa riba iz eksperimenta je najviša zastupljenost oleinske kiseline (C 18:1; $p < 0.001$) u odnosu na sve ostale masne kiseline. Međutim, pored ove zajedničke karakteristike, masnokiselinski sastav mesa šaranske mlađi hranjenih različitim tipovima hrane, kao i onaj kod kontrolne grupe, karakteriše niz specifičnosti. One su jasno prikazane na kombinovanom PCA grafiku (**Grafik 29**) na kojem su prikazani, kako međusobni odnosi detektovanih masnih kiselina (strelice), tako i njihovi odnosi prema ispitivanim tipovima hrane i kontrolnom uzorku (zvezdice).

PCA grafik jasno prikazuje da se meso riba iz grupa PH i EH, izdvaja po zastupljenosti PUFA, grupe ŽI po zastupljenosti oleinske kiseline, a grupe PO po

zastupljenosti zasićenih masnih kiselina i nekih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA).



Grafik 29. Kombinovani PCA grafik koji prikazuje međusobne odnose detektovanih masnih kiselina (strelice), i njihov odnos prema grupama (zvezdice) hranjenim različitim tipovima hrane (ŽI, PH i EH), kao i uzorku sa početka eksperimenta (PO)

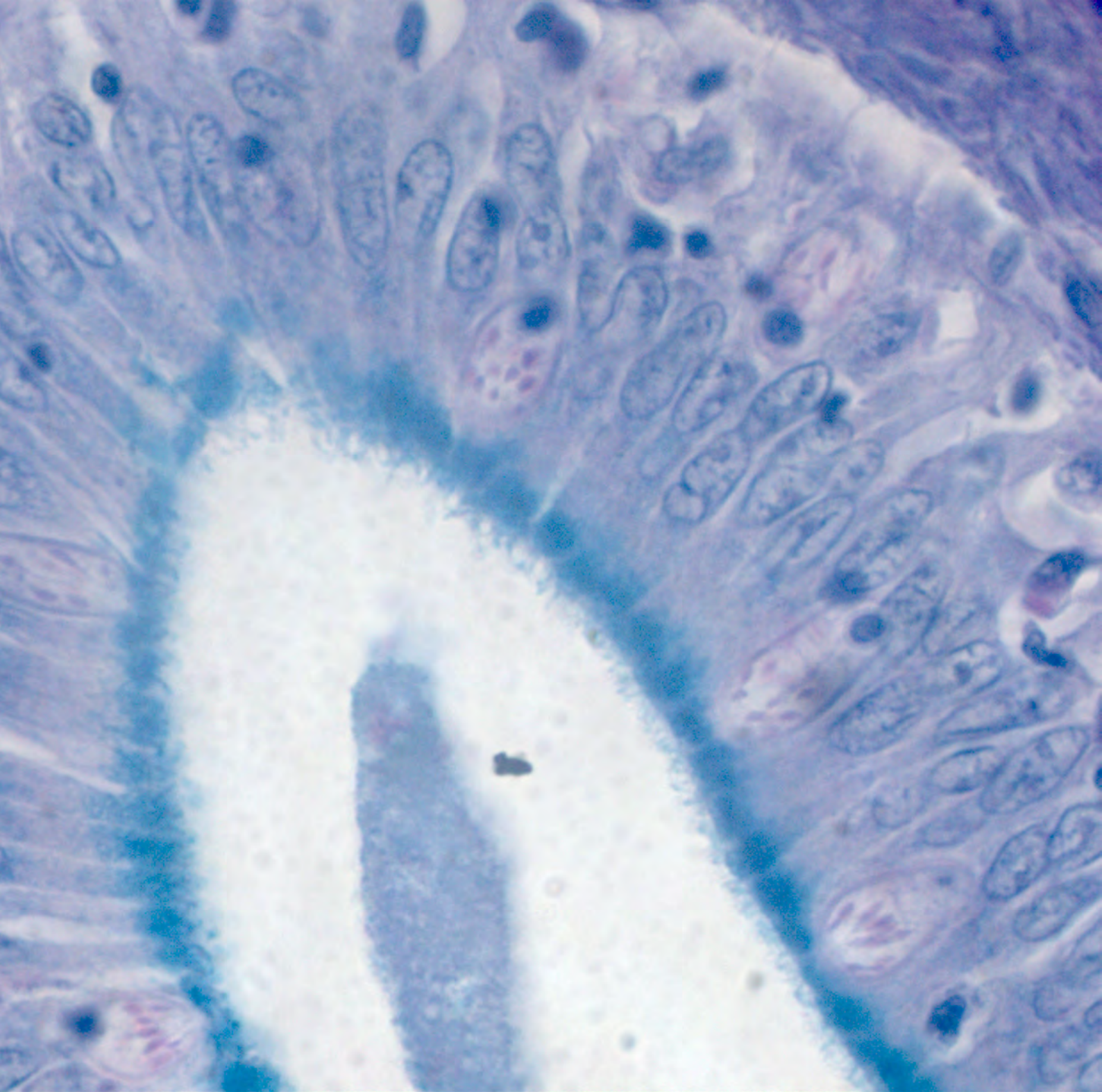
To je vidljivo i u tabeli 3, gde je primetno da meso riba hranjenih žitaricama karakteriše najveća zastupljenost oleinske kiseline u odnosu na sve tri druge grupe ($p < 0.05$). Pored toga, oleinska kiselina je toliko dominantna u masnokiselinskom profilu da linolnu kiselinu (C 18:2), treću po zastupljenosti u ovom uzorku, karakteriše čak sedam puta manji udeo u ukupnim masnim kiselinama od oleinske kiseline.

Masnokiselinski sastav mesa grupe PO se razlikuje po visokoj zastupljenosti zasićenih masnih kiselina (SFA), od bilo koje druge grupe ($p < 0.05$). Od zasićenih masnih kiselina, najprisutnije su bile palmitinska (C 16:0), stearinska (C 18:0) i miristinska (C 14:0) kiselina. Palmitinska kiselina je bila najzastupljenija u sve tri grupe riba na kraju eksperimenta, kao i u grupi sa početka eksperimenta ($p < 0.001$). Naime, iako je njena zastupljenost u grupi PO statistički značajno viša, nego kod riba iz grupa PH ($p = 0.007$) i EH ($p = 0.048$), to nije slučaj u odnosu na ribe iz grupe ŽI. Što se tiče stearinske kiseline ona je bila statistički značajno viša u grupi PO u odnosu na sva tri preostala uzorka ($p < 0.025$). Za razliku od ove dve masne kiseline, miristinska kiselina je statistički značajno zastupljenija u mesu riba hranjenih ekstrudiranom hranom ($p < 0.006$).

Grupe riba hranjenih komercijalnom hranom (EH i PH) su imale znatno viši sadržaj polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) od grupa hranjenih žitaricama i riba sa početka eksperimenta ($p < 0.05$). Međutim, zastupljenost pojedinih PUFA u ove dve grupe je veoma različita. U grupi PH veoma je zastupljena linolna kiselina, koja je statistički značajno viša u poređenju sa ostale tri grupe u eksperimentu ($p < 0.001$). Za razliku od njih, za masnokiselinski sastav mesa riba hranjenih ekstrudiranom hranom je najkarakterističniji visok udeo ω -3 masnih kiselina (7.23%), koji je statistički značajno viši u odnosu na ostale tri grupe ($p < 0.05$). Veća zastupljenost ω -3 kiselina kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom je posledica pojave viših ω -3 masnih kiselina. Tako, su dokožoheksanska (C 22:6; DHA; 2.16%), eikozopentanska (C 20:5; EPA; 0.76%) i eikozotrijenska (C 20:3; ETE; 1.49%) kiselina imale više zastupljenosti u grupi EH u poređenju sa ostale tri grupe. Naravno, kako ga karakteriše najveći udeo ω -3 kiselina, meso šarana hranjenih ekstrudiranom hranom karakteriše i najviša vrednost odnosa ω -3/ ω -6 masnih kiselina.

Analiza PCA grafika, pored međusobnog odnosa masnih kiselina ukazuje da ribe hranjene ekstrudiranom hranom karakteriše i najuravnoteženiji sastav masnih kiselina, s obzirom na to da je najveći broj vrsta masnih kiselina karakterističan upravo za ovu grupu.

Za razliku od masnokiselinskog profila mesa šarana, u hrani kojom su ribe hranjene prisutna je dominacija linolne kiseline. Ova masna kiselina je brojnija u hrani u odnosu na meso šarana i to kod sve tri grupe hrane i čini više od polovine svih masnih kiselina u hrani (50.04 - 57.12%). Pored linolne kiseline, visok procenat u ribljoj hrani čine i oleinska i palmitinska kiselina. Ove tri masne kiseline su zaslužne za ukupno 88.8% (PH i EH) i 95.9% (ŽI) od svih masnih kiselina detektovanih u hrani. Primetan je i znatno niži diverzitet masnih kiselina u hrani u odnosu na mišiće riba nakon završetka eksperimenta (u svim grupama: SFA, MUFA i PUFA), a pogotovo PUFA viših masnih kiselina. Taj broj je iznosio 19 u mišićima, 8 u žitaricama kojima su ribe hranjene, odnosno 13 u komercijalnim hranama.



5. DISKUSIJA



Diskusija je podeljena na tri dela, s obzirom na tri različita pravca istraživanja. Prvi deo diskusije je posvećen parametrima prirasta i morfologiji creva i hepatocita, kao i efektima koji su različiti tipovi hrane prouzrokovali na digestivni trakt ribe. Drugi deo diskusije je posvećen kvalitetu vode u ribnjaku i histopatološkim promenama u jetri, škragama i bubregu. Ovaj deo će obuhvatati i diskusiju o korelacijama između kvaliteta vode i morfologije unutrašnjih organa i njihove histopatologije. Na kraju će biti dat i kratak osvrt na kvalitet mesa ribe i efekata različitih tipova hrane na količinu i odnos ω -3 i ω -6 masnih kiselina u mesu šarana. Ove masne kiseline su veoma značajne za ishranu ljudi i imaju mnogobrojna pozitivna svojstva na opšte stanje zdravlja kod ljudi.

5.1. Uticaj ishrane na parametre prirasta ribe i histologiju digestivnog trakta

Rezultati prirasta riba na kraju eksperimenta se poklapaju sa rezultatima koji su objavljeni u drugim studijama u kojima je gajen jednogodišnji šaran u uslovima umereno-kontinentalne klime koja vlada u centralnoj i istočnoj Evropi, a gde je startna masa bila slična (Hartvich i sar., 2003; Kocour i sar., 2003; Vandeputte i sar., 2008). Ovi autori su objavili podatke u kojima je telesna masa riba u drugoj godini na kraju sezone gajenja u poluintenzivnom sistemu iznosila 543.8 g (Hartvich i sar., 2003), 659.0 g (Vandeputte i sar., 2008) i 522.0 g (Kocour i sar., 2003), što je u skladu sa podacima dobijenim za žitarice iz našeg eksperimenta (599.6 g). Vrednosti koje smo dobili kada su korišćene peletirana i ekstrudirana hrana su više od ovih vrednosti (788.7 g i 792.4 g). U udžbenicima se obično nalaze niže vrednosti, kao npr. kod Billard (1999) koji na kraju druge godine procenjuje težinu ribe na oko 400-500 g. Horváth i sar. (2002) prijavljuju još niže prosečne vrednosti telesne mase oko 100-350 g na kraju druge godine gajenja, ali se one odnose na ekstenzivnu tehnologiju gajenja. Iako je jedna od namera ovog eksperimenta bila da se riba nakon druge godine dovede do konzumne veličine od preko 1200 g, to ipak nije postignuto. Razlog je kasni nasad, jer da je nasad realizovan početkom marta, riba bi mogla da se hrani prirodnom hranom već tokom marta i aprila i pri tom bi ostvarila bolji prirast, s obzirom na važnost ishrane u prvim mesecima sezone (Billard, 1999). Potrebno je napomenuti da prirodna hrana u šaranskim ribnjacima (pre svih zooplankton i zoobentos)

predstavlja veoma bitan deo ishrane šarana (Billard, 1999; Horváth i sar., 2002; Marković, 2010; Dulić i sar., 2011). Međutim, s obzirom na to da između jezera u našem eksperimentu nije bilo razlike u količini prirodne hrane, ni u 2008-oj (Dulić i sar., 2010), ni u 2009-oj godini (Dulić, neobjavljeni podaci), smatrali smo da prirodna hrana nije značajno uticala na razlike između grupa. U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica koju su ustanovili Rahmann i sar. (2010), da šaran ignoriše prirodnu hranu ukoliko mu je ponuđen alternativni izvor hrane.

Možemo ustanoviti da su rezultati SGR i FCR-a iz eksperimenta slični drugim eksperimentima u kojima je jednogodišnji šarana gajen u zemljanim jezerima u kontinentalnom delu Evrope. Urbanek i sar. (2010) su izveli sličan eksperiment u kome je šaran hranjen isključivo jednom vrstom žitarica (raž, kukuruz ili pšenica). Vrednosti FCR-a koje su ostvarile ribe prihranjivane kukuruzom i pšenicom se poklapaju sa jezerom u kome je riba hranjena žitaricama, iako je SGR znatno niži od postignutog u našem eksperimentu (Urbánek i sar., 2010). U sličnoj studiji koju su objavili Vacha i sar. (2007) su dobijeni znatno viši nivoi FCR-a, sa vrednošću od preko 3. Nivoi FCR-a u našem eksperimentu, kada su u pitanju komercijalne hrane, su niži (Mazurkiewicz, 2009; Mráz i sar., 2010) ili slični (Przybył i Mazurkiewicz, 2004; Mazurkiewicz i sar., 2011) vrednostima publikovanim u drugim studijama. Vrednosti SGR-a su mahom više, nego vrednosti u našem eksperimentu (Przybył i Mazurkiewicz, 2004; Mazurkiewicz, 2009; Mráz i sar., 2010; Mazurkiewicz i sar., 2011), ali se mora voditi računa da su hrane kojima je šaran hranjen uglavnom bile sa višim nivoom proteina (32-35%). U hranama sa višim nivoom proteina raste i odnos proteina i energije i samim tim ribe brže prirastaju, sa vrednostima SGR-a od 1,16 - 4,31% na dnevnom nivou (Mazurkiewicz, 2009). Iako je opšte prihvaćeno da šaran, kao vrsta koja je adaptirana na život u toploj vodi, raste od marta do oktobra (Billard, 1999), njegov rast nije linearan, već se menja od meseca do meseca (Feldlitz i Milstein, 2000) i kriva rasta varira u zavisnosti od velikog broja faktora, ali je u skladu sa von Bertalanfijevim modelom (Lorenzen, 1996). Tokom I perioda, u kome se riba prilagođava na dodatnu hranu, evidentno je da su vrednosti dužine, visine, prirasta, SGR-a, visine enterocita i površine jedarnih preseka hepatocita niže u

grupi ŽI. Na severnoj hemisferi, šaran ima najviše vrednosti prirasta tokom letnjih meseci (Fernández-Delgado, 1990), što se pokazalo i u našem eksperimentu. Razlog tome je povišen nivo temperature koja ubrzava metabolizam šarana i ubrzava njegovo kretanje, potragu za hranom i brzinu unošenja hrane (Oyugi i sar., 2012). Drugi autori apostrofiraju povoljan odnos između kiseonika i temperature, koji ima uticaj i na prirast ribe, jer se na višim temperaturama usvaja veća količina hrane, ali samo kada je i kiseonik u vodi na optimalnom nivou (Mallekh i Lagardère, 2002). Ova pojava je karakteristična za poikilotermne životinje i objašnjava visoke vrednosti prirasta u drugom periodu (Buentello i sar., 2000), čak i kada se radi o ribama hranjenim žitaricama, koje u ovom periodu pokazuju iste vrednosti SGR-a kao i ribe hranjene peletiranom hranom. Na višoj temperaturi vode kod većine riba dolazi do boljeg rada proteolitičkih (Peres i Oliva-Teles, 1999) i amilolitičkih (Kuz'mina i sar., 2003) enzima i samim tim i efikasnijeg varenja i usvajanja hrane. Tako je i kod šarana, gde podaci pokazuju da kada se temperatura spusti sa 37 °C na 25 °C, nivoi proteolitičkih i amilolitičkih enzima opadnu na dvostruko niže vrednosti (Hidalgo i sar., 1999). Potvrda ove činjenice je da se nivo SGR-a izjednačio u svim grupama tokom II perioda u eksperimentu i da je iskoristljivost hrane mnogo veća, pa tako i grupa ŽI raste istom brzinom kao i druge dve grupe. Interesantno je da je u III periodu riba hranjena peletiranom hranom imala viši nivo od druge dve hrane. Verovatan razlog je, što nakon pada temperature vode u III periodu i smanjenog lučenja enzima u crevima, riba mnogo bolje vari peletu koja je mekša (Thomas i van der Poel, 1996) i koja je u momentu kada padne na dno ribnjaka već poluraspadnuta i fizički manja. Fizičke osobine pelete umnogome mogu da utiču na svarljivost i usvajanje hrane (Sørensen, 2012). S obzirom da je to jedina razlika između dve komercijalne hrane, a da je ova pojava prisutna u svakoj od dve godine eksperimenta, kao i u ponovljenom eksperimentu na komercijalnom ribnjaku u Srbiji (Ćirić i sar., 2013), ovo je jedini logičan odgovor. Da bi se detaljnije opisao uticaj temperature na ishranu i prirast, koristi se TGC. Ovaj parametar je dobar pokazatelj rasta riba u akvakulturi, ukoliko se temperaturni režimi drastično razlikuju među jezerima (Jobling, 2003). Međutim, s obzirom da se temperatura vode između jezera nije značajnije razlikovala, ni TGC nije pokazao razlike u odnosu na SGR.

Marković (2010) navodi da bi masa riba hranjenih ekstrudiranom hranom trebalo da bude znatno viša u poređenju sa ribom hranjenom žitaricama. Riba koja je bila hranjena žitaricama u našem eksperimentu jeste imala statistički značajno manji prirast i težinu na kraju eksperimenta. Ovi rezultati su i potvrđeni, u ponovljenom eksperimentu koji je sproveden tokom jedne sezone gajenja na komercijalnom ribnjaku u Srbiji, i gde su rezultati prirasta imali slične odnose kao i u našem eksperimentu (Ćirić i sar., 2013). Uzrok ove razlike je svakako bio viši nivo proteina u peletiranoj i ekstrudiranoj hrani u odnosu na žitarice (Kaushik, 1995). Osim višeg nivoa proteina, kompletna hrana je i termički obrađena, što smanjuje nivo antinutritivnih faktora koji su prisutni u žitaricama (Francis i sar., 2001) i poboljšava usvajanje polisaharida u crevima, što omogućava bolji rast (Burel i sar., 2000). Pozitivni efekti u prirastu su dobijeni i kada je ekstrudirana hrana bila upoređivana sa peletiranom na drugim vrstama riba (Ballestrazzi i sar., 1998; Booth i sar., 2000; Venou i sar., 2003), ali u našem slučaju nije postojala razlika u prirastu između riba hranjenih sa ova dva tipa hrane.

Primetno je da su ribe na početku eksperimenta i u prva dva meseca trajanja eksperimenta imale niz negativnih histoloških promena, sa pojavom većeg broja fibroza i EG, poremećajima u cirkulaciji i nižim vrednostima visine enterocita i supranuklearne zone enterocita u crevima, kao i površine jedarnih i ćelijskih profila hepatocita u jetri riba. Postoje dva verovatna uzroka koji su doveli do ovoga. Prvi uzrok predstavlja adaptacija na nove životne uslove koji su se dogodili nakon transporta sa komercijalnog ribnjaka na eksperimentalno dobro Poljoprivrednog fakulteta, gde je eksperiment rađen. Niz studija na različitim vrstama riba je pokazao promene u nivoima hormona, najčešće kortizola, zatim nivoima hematokrita, glukoze i laktata u krvi tokom transporta (Iversen i sar., 1998; Gomes i sar., 2003; Acerete i sar., 2004). Ove promene kod riba uzrokuju i supresiju imunog sistema i neumitnu pojavu eritrodermatitisa koga izaziva bakterija *Aeromonas* sp. (McCarthy, 1975; Wiklund i Dalsgaard, 1998). Transport riba je nekada uzrok i izuzetno visokog mortaliteta kod riba, čak i do 80% u nekim slučajevima (Fotis i sar., 1994). Pored samog transporta, ribe doživljavaju i temperaturni stres koji takođe ima uticaj na pad imunog sistema, pogotovo na

smanjenje broja B- i T-limfocita (Engelsma i sar., 2003). U prvoj godini eksperimenta, pojava para kormorana na oglednom dobru je uzrokovala dodatni stres kod riba (Kortan i Adámek, 2011; Kortan i sar., 2011). Ove promene u metabolizmu riba, uzrokovane stresom, su jedan od razloga histoloških promena na unutrašnjim organima. Drugi razlog, možda i važniji, je zimski period, koji ribe provode u zimovnicima, kada velika gustina nasada stresira ribe, a prestanak hranjenja ih izgladnjuje. Zimsko gladovanje, kao i većina prolongiranih perioda nehranjenja, po pravilu ne uzrokuje promene u telesnoj masi po početku sezone gajenja, zahvaljujući tzv. kompenzatornom rastu, kojim riba u kratkom vremenskom roku nadoknađuje period gladovanja i veoma brzo vraća izgublenu masu (Xie i sar., 2001; Zhu i sar., 2001). Međutim, gladovanje kod riba je poznato kao jedan od najznačajnijih negativnih uzroka koji dovode do teških histoloških promena, pre svega u jetri i crevima (Theilacker, 1986; Ba-Omar i sar., 1998; Gisbert i Doroshov, 2003; Rios i sar., 2004; Rios i sar., 2007), mada i drugi organi, kao npr. koža, trpe promene pri gladovanju (Caruso i sar., 2010). U objavljenim studijama najčešće se, radi lakše kvantifikacije histoloških parametara, pribegava morfometriji. Tako su Power i sar. (2000), mereći površinu ćelijskih i jedarnih profila hepatocita orade, Souza i sar. (2001) pakua (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), Watanabe (1985) japanskog glavoča (*Chaenogobius annularis* Gill, 1859) i Ostaszweska i sar. (2006) linjaka (*Tinca tinca* L., 1758) dobili niže vrednosti kod riba koje su gladovale od kontrolne grupe, hranjene u regularnim intervalima. Pored toga, ribe koje nisu dobijale hranu, su imale niži procenat lipida, proteina i glikogena, a povećan procenat vode u jetri (Power i sar., 2000). Ovi podaci govore o tome, da s obzirom na to da ne postoje rezervne materije, u jetri dolazi do smanjivanja volumena ćelija, a pošto nema sinteze proteina, jedro takođe smanjuje svoju veličinu. Tako Foster i Moon (1991) smatraju, da je smanjenje volumena ćelije, kao i cele jetre i faktora kondicije riba posledica hipometabolizma. To je slučaj i u našem eksperimentu, s obzirom na to da inicijalna populacija, koja je uzorkovana odmah nakon izlova iz zimovnika, ima najniže vrednosti površine ćelijskih i jedarnih profila hepatocita, kao i vrednosti Fultonovog faktora. U eksperimentima sa gladovanjem, ribe su u stanju da izdrže i 6 meseci bez hrane bez značajnih histopatoloških promena u jetri (Rios i sar., 2007), što je potvrđeno i

u našem eksperimentu. Na kraju perioda gladovanja i početku našeg eksperimenta nije primećeno povećanje u broju i površini MMC-a u jetri koje su zabeležili Rios i sar. (2007) i koji predstavljaju prvi znak pogoršanja zdravstvenog stanja jetre. Čim su ribe ubačene u jezera i započele hranjenje (već tokom meseca maja), vrednosti površine ćelijskih i jedarnih profila hepatocita se povećavaju. U podacima iz literature, hepatociti vraćaju svoj normalni izgled i količinu glikogena u njima veoma brzo, već nakon 7 dana od ponovnog početka hranjenja (Power i sar., 2000; Souza i sar., 2001).

Grupa naučnika iz Nemačke su u seriji studija urađenim na vrsti hanos (*Chanos chanos*, Forsskal 1775), koja je jedna od najvažnijih vrsta za akvakulturu Azije, primetili svakodnevne promene na hepatocitima tokom menjanja režima ishrane, izgladnjivanja i hranjenja različitim vrstama hrane (Storch i Juario, 1983; Storch i sar., 1983; Segner i Juario, 1986). Došli su do zaključka da se promene na hepatocitima događaju brzo i da je i promena ultrastrukture ćelija izuzetno dinamična (Storch i sar., 1983). Tokom trajanja našeg eksperimenta, vrednosti površine jedarnih profila hepatocita uglavnom prate kretanje prirasta. Naime, u prva dva perioda potpuno odslikavaju odnose prirasta, međutim u III periodu to nije slučaj. Površina jedarnih preseka hepatocita je veoma dobar indikator metaboličkog stanja ćelije (Strüssmann i Takashima, 1990). To je potvrđeno u raznovrsnim eksperimentima i došlo se do zaključka, da grupe koje su hranjene prirodnom (*Artemia nauplii*) ili komercijalnom hranom imaju veću površinu nuklearnih preseka hepatocita (Ostaszewska i sar., 2008; Kamaszewski i sar., 2010), dok ribe koje su hranjene alternativnim izvorima proteina ili masti imaju niže vrednosti (Ostaszewska i sar., 2005a; Yamamoto i sar., 2008). Pri tome, moguće je da uticaj na veličinu jedarnih profila ima i poliploidija (Bachmann i Cowden, 1967). U isto vreme površina preseka hepatocita najverovatnije ima veze sa količinom rezervnih supstanci u ćeliji (Foster i Moon, 1991). Grupa naučnika iz Poljske smatra da je veličina hepatocita u direktnoj vezi sa lipidnim kapima u jetri (Ostaszewska i sar., 1999; Ostaszewska i sar., 2005a; Kamaszewski i sar., 2010), ali to u našem slučaju nije slučaj. Površina ćelijskih preseka konstantno raste, dok procenat lipidnih kapi u njima raste i dostiže maksimalne vrednosti tokom letnjih

meseci, ali od tada vrednosti opadaju. Razlika verovatno proizilazi iz načina gajenja, jer su njihovi eksperimenti sprovedeni u laboratoriji, a merenja urađena na jetri riba na kraju eksperimenta. Ribe su sprečene u lokomotornoj aktivnosti i iz tog razloga ne troše rezervne materije na plivanje, kao što je slučaj u našem eksperimentu. Da bi objedinili podatke o površini jedarnih i ćelijskih preseka hepatocita, koristili smo indeks N/C, koji predstavlja količnik ove dve veličine. I površina ćelijskih i jedarnih profila hepatocita su više kod riba koje su hranjene ekstrudiranom, od riba hranjenih peletiranom hranom, ali je vrednost N/C ostala ista. Vrednosti N/C su niže nego u drugim eksperimentima (Ostaszewska i sar., 2005b; Zakęś i sar., 2008), ali mora se voditi računa da su u pitanju bile druge vrste riba, kao i drugačiji sistemi gajenja (intenzivni u odnosu na poluintenzivni).

Kod gajenih riba se često nalazi povišen broj ili količina lipidnih kapi (triglicerida) u hepatocitima (Caballero i sar., 1999). Uzrok steatoze može biti visok nivo lipida u hrani (Makol i sar., 2009) ili poremećaj u metabolizmu jetre (Wolf i Wolfe, 2005), mada neki autori smatraju da sve ribe koje se intenzivno gaje imaju tendenciju nagomilavanja masti u hepatocitima (Speare, 2000; Manera i sar., 2003). Steatoza ne spada u teže promene u jetri, a jedan od uzroka nastajanja može da bude i prelaz sa prirodne na veštačku hranu (Spisni i sar., 1998). Dva najčešća indikatora steatoze u jetri su pomeranje jedra hepatocita na periferiju ćelije i uvećanje veličine ćelije, usled deponovanja velike količine masnih kapljica (Caballero i sar., 1999). U našoj studiji su jedra hepatocita uglavnom bila postavljena centralno. Pojedina jedra su nalažena dislocirana samo na početku eksperimenta, kada se riba prilagođavala novom staništu, a uzrok može da bude i zimsko gladovanje (Ostaszewska i sar., 2006). Veličina ćelija je opadala u sledećem nizu: ŽI > EH > PH, ali nije zavisila od količine lipidnih tela u ćelijama, već je najvećim delom odražavala količinu akumuliranog glikogena (Foster i Moon, 1991). Volumenska gustina lipidnih kapi je niža nego kod Caballero i sar. (1999), ali prati nivo lipida i proteina u hrani (Ostaszewska i Sawosz, 2004; Boglino i sar., 2012). U drugim eksperimentima je ipak zaključeno, da je za povišenu količinu lipidnih kapi u hepatocitima bitniji nivo masti, nego nivo proteina u hrani (Mandrioli i sar., 2012). Količina skladištenih lipida u jetri se razlikuje od vrste do

vrste, s obzirom na različiti način funkcionisanja organizma i održavanje samog metabolizma. Šaran ima tendenciju nagomilavanja lipida u visceralnoj duplji i stvaranje tzv. visceralne masti (Spisni i sar., 1998), pa je samim tim logično da ima manju količinu lipida u jetri u odnosu na oradu na kojoj su Caballero i sar. (1999) radili istraživanje. Međutim, u eksperimentima u kojima je orada hranjena hranom sa biljnim uljima upola kraće (3 meseca), dobijene su slične vrednosti kao u našem eksperimentu (Caballero i sar., 2004). Ovaj procenat volumenske gustine lipida hepatocita je potvrđen i u studijama na ćelijskim kulturama lososa (Krøvel i sar., 2010), dok je u dugoročnim, intenzivnim hranjenjima atlantskog halibuta (*Hippoglossus hippoglossus* L., 1758) komercijalnom hranom, procenat lipidnih kapi bio i tri puta viši nego u našem eksperimentu (Bolla i sar., 2011). Vakuolizacija hepatocita se povećava počev od početka eksperimenta ka njegovom kraju i ovi podaci su u skladu sa studijom koju su objavili Caballero i sar. (2004). Couch (1993) je nazvao ove vakuolizovane hepatocite sa centralno postavljenim jedrom „normalni hepatociti dobro hranjenih riba“, a prisutni su u većini objavljenih rezultata eksperimenata, gde su ribe gajene intenzivno ili u laboratoriji i navodi se da je reč u normalnim hepatocitima (Ibarz i sar., 2010; Bolla i sar., 2011; Mandrioli i sar., 2012). Pored toga, neki autori su hranili šarana hranom sa alternativnim izvorima masti i dobili potpuno drugačije hepatocite, sa dislociranim jedrima i krupnim, pravilnim okruglim vakuolama u sredini ćelije (Yılmaz i Genc, 2006). Ovi hepatociti odgovaraju histološkoj slici steatoze opisanoj u Spisni i sar. (1998). Pojavom vakuola u našem eksperimentu se ne narušava intracelularna kompartmentacija. Od uočenih organela uglavnom se vide samo jedro, granularni endoplazmatični retikulum, mitohondrije i ponegde Goldžijev kompleks. Slična morfologija hepatocita i procenti volumenske gustine lipida u ćeliji su izmereni i kod šarana u kontrolnim grupama, koji je gajen komercijalnom hranom sa 35% proteina, u eksperimentu gde su ribe hranjene peletama kontaminiranim endosulfanom (Braunbeck i Appelbaum, 1999). Pored toga, Fishelson i Becker (2001) su kod šarana koji žive u prirodnim uslovima takođe uočili povećan broj hepatocita koji su bogati vakuolama.

Nekoliko autora je objavilo povećanje aktivnosti enzima pankreasa kada je

šaran hranjen sa različitim nivoom ugljenih hidrata u hrani (Kheyyali i sar., 1989; Shimeno i sar., 1997). U našoj studiji nije bilo razlike u količini zimogenih granula ukoliko se uporede različite grupe, verovatno iz razloga što je sva hrana bila veoma bogata ugljenim hidratima (>43%). Razlika u površini jedarnih profila kod acinusnih ćelija je stoga pripisana višoj temperaturi obrade hrane i višem procentu želatinizacije skroba kod ekstrudirane hrane. Želatinizacija automatski omogućava i lakšu ingestiju ugljenih hidrata i nižu metaboličku aktivnost kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom (Burel i sar., 2000). Prisustvo adipocita u pankreasu je često u eksperimentima ishrane riba (Kamaszewski i sar., 2010) i u vezi je sa povećanom količinom visceralnog adipoznog tkiva kod riba.

Štapićaste ćelije su karakteristične za ribe, ne mogu se uočiti ni kod jedne druge klase kičmenjaka, kao ni kod invertebrata. Njihova morfologija je karakteristična i one se odlikuju kapsulom u kojoj se nalazi nekoliko štapićastih inkluzija po kojima su i dobile ime. Iako su uočene još krajem XIX veka, priroda ovih ćelija i njihova uloga u organizmu riba je i dalje predmet rasprava. Ove ćelije se nalaze u različitim tipovima tkiva i to najčešće u epitelnom tkivu: koži (Iger i Abraham, 1997), škragama (Leino, 2001), crevu (Bielek, 2002), bubrežnom kanaliću (Leino, 2001; Bielek, 2002; Kramer i Potter, 2002), endotelu (Manera i sar., 2001), ali i u mezotelu (Dezfuli i sar., 2000). U našem eksperimentu ove ćelije su uočene u pankreasu i u žučnim kanalićama, uglavnom u blizini parazita. U revijalnom radu Manera i Dezfuli (2004) je prikazan tabelarni pregled vrsta riba i tkiva u kome su nalažene štapićaste ćelije i iz nje se može zaključiti, da je ovo prvi put da su kod šarana ove ćelije uočene u žučnim kanalićima.

I dan danas se naučnici spore oko prirode ovih ćelija, pa neki veruju da one predstavljaju ciste parazita (Bielek i Viehberger, 1983; Fishelson i Becker, 1999), drugi da predstavljaju imune ćelije i učestvuju u nespecifičnom ćelijskom odgovoru (Dezfuli i sar., 2000; Manera i sar., 2001), a treći da one predstavljaju odgovor u tkivu na bilo koji agens u spoljašnjoj sredini (fizički, hemijski ili biološki) i svrstavaju ih u bioindikatorne (Iger i Abraham, 1997). U našem slučaju je najverovatnija pretpostavka da ove ćelije učestvuju u imunom odgovoru, s obzirom na to da su nalažene u blizini parazita, vrlo često zajedno sa EG. Tom prilikom su

pojedini EG nalaženi degranulisani i to je znak da su otpuštali medijatorne inflamatorne supstance u blizini parazita, dok nakon degranulacije dolazi do inflamatorne reakcije koja je praćena vazodilatacijom (Reite i Evensen, 2006). Granule EG sadrže komponente koje se nalaze kod sisarskih mastocita: kiselu i alkalnu fosfatazu, arilsulfatazu i peroksidazu (Sire i Vernier, 1995), lizozime (Sveinbjornsson i sar., 1996) i piscidine (Silphaduang i Noga, 2001). Inače se ove ćelije i smatraju pandanom sisarskih mastocita kod riba, jer im je funkcija slična (Reite i Evensen, 2006).

Histološka slika distalnog dela creva iz ovog eksperimenta se u potpunosti poklapa sa opisom iz literature (Roberts, 1989; Takashima i Hibiya, 1995). Morfologija creva riba se ne menja čak ni u eksperimentima u kojima su ribe hranjene hranom u kojoj su se nalazili teški metali (Andreozzi i sar., 1994; Kruatrachue i sar., 2003), tako da nije bilo za očekivati da će nađene histološke promene biti značajne. Inače, promene na crevima variraju u zavisnosti od vrste riba i hrane koja je korišćena u eksperimentima. Kod porodice Salmonidae, kod koje svi članovi bitni za akvakulturu spadaju u karnivorne vrste, svaka zamena ribljeg brašna proteinima biljnog porekla, uzrokuje smanjenu stopu rasta i histološke promene na enterocitima, a najčešće enteritis u distalnom delu creva (Urán i sar., 2009b). Pri tome su studije pokazale, da je intenzitet enteritisa u zavisnosti od vrste riba koja je korišćena u eksperimentu, pa mu je tako podložniji atlantski losos od dužičaste pastrmke (Refstie i sar., 2000). Enteritis u crevima riba predstavlja skup različitih promena vidljivih na nivou svetlosne mikroskopije, koji su Baeverfjord i Krogdahl (1996) opisali i nazvali “neinfektivni subakutni enteritis”:

- 1) Skraćenje dužine crevnih nabora
- 2) Nestanak vakuola u supranuklearnom prostoru enterocita
- 3) Širenje *lamine propria* u crevnim naborima
- 4) Infiltracija *lamine propria* inflamatornim ćelijama

U istom radu oni opisuju i metodu za procenu stanja creva zahvaćenih

enteritisom, ali je u skorije vreme nova metoda za procenu predložena od strane Uran i sar. (2008) i zasniva se na polukvantitativnom ocenjivanju histologije distalnog dela creva.

Koristeći ovu i prethodne predložene metode i ocenjujući histologiju distalnog dela creva kod pripadnika familije Salmonidae koji su bitni za akvakulturu (najčešće atlantski losos i dužičasta pastrmka), dve grupe naučnika u Norveškoj i Holandiji već godinama prate efekte zamene proteina životinjskog porekla u hrani biljnim. Mnogo zaključaka je publikovano i utvrđeno je da intenzitet enteritis zavisi od procenta zamene proteina životinjskog porekla, tako da su kod dužičaste pastrmke promene na crevima uočene već kada se zameni samo 10% proteina životinjskog porekla (Krogdahl i sar., 2003), a sadržaj preko 30% je kritičan za život riba (Baeverfjord i Krogdahl, 1996). Utvrđeno je, da se sa povećanjem procenta sojinog brašna pojačava i intenzitet enteritisa (Krogdahl i sar., 2003; Urán i sar., 2009b). Eksperimenti koji su utvrđivali vreme pojavljivanja enteritisa su takođe postavljeni i rezultati govore, da se već posle dva (Baeverfjord i Krogdahl, 1996), odnosno tri dana (Urán i sar., 2009b) u crevima ovih vrsta mogu uočiti prvi znaci enteritisa i to smanjenje supranuklearnih vakuola i inflamacija. Ove promene su uočene kod riba hranjenih hranom sa višim nivoom sojinog brašna (20-33%), dok su kod riba hranjenih nižim sadržajem soje u hrani (10%) ove promene uočene tek nakon 7 dana (Urán i sar., 2009b). Postavljani su i ogledi koji su procenjivali intenzitet enteritisa u zavisnosti od porekla soje, pa je tako riba hranjena sa sojinim brašnom napravljenim od soje poreklom iz Evrope, Južne Amerike, Severne Amerike i Australije (Urán i sar., 2009a). Ovaj ogled je pokazao da i poreklo soje ima uticaj na intenzitet enteritisa kod atlantskog lososa.

Naravno, ukoliko se radi o nekoj drugoj vrsti, reakcija nije ista. Dok je trajanje enteritisa veoma dugo kod pastrmke i lososa i može da dovede do njihovog uginuća (Krogdahl i sar., 2003), kod šarana je reakcija kratkotrajna, a nakon reakcije sledi adaptacija i creva se vraćaju u normalno stanje, bez navedenih histoloških promena (Urán i sar., 2008). U ovoj studiji (20% proteina zamenjeno sojinim brašnom), promene na crevima su uočene nakon 7 dana, nastavljaju se i bivaju najizraženije nakon 21. i 28. dana, a kako se eksperiment nastavljao, creva

polako gube znake enteritisa i bivaju slična kontrolnoj grupi, u kojoj je osnovni izvor proteina u hrani za ribe riblje brašno. Svakako da šaran bolje trpi prisustvo antinutritivnih sastojaka u hrani u kojoj su proteini životinjskog porekla zamenjeni biljnim, samim tim što je omnivor, a i Francis i sar. (2001) tvrde da je ta granica karakteristična za vrstu. U našem eksperimentu je jasno, da se enteritis koji je karakterističan za porodicu Salmonidae i opisan od strane Baeverfjord i Krogdahl (1996), ne javlja. Međutim, primetno je da su na početku eksperimenta neki histološki parametri u skladu sa studijom Uran i sar. (2008), npr. debljina lamine propria-e crevnih nabora, koja je proširena u odnosu na ribe na kraju eksperimenta i to u svim grupama. Drugi simptomi karakteristični za neinfektivni subakutni enteritis (nestanak supranuklearnih vakuola i skraćenje crevnih nabora) nisu uočeni na presecima, dok je infiltracija leukocita bila primetna, ali ona ne mora biti rezultat enteritisa (Merrifield i sar., 2011). Iz rezultata se može videti da je I period u eksperimentu kritičan i da visina enterocita pokazuje blagi pad u odnosu na inicijalnu grupu. Ovo može biti posledica enteritisa, ali i adaptacije na novo stanište i/ili dodatnu hranu. U II periodu se enterociti izjednačavaju sa inicijalnom grupom, dok su tek u III periodu značajno viši od inicijalne grupe. Zanimljivo je da su morfometrijski parametri hepatocita, enterocita, kao i prirast riba pokazali istu proporciju između grupa (grupa ŽI niža u svim pomenutim parametrima od grupa hranjenih komercijalnih hranama) u toku prvog perioda, što govori o povezanosti prirasta sa suptilnim razlikama u enterocitima i hepatocitima.

Sa druge strane, upadljivo je odsustvo bilo kakve razlike u visini enterocita i visini supranuklearne zone između grupa u periodima II i III, kao i zbirnim podacima tokom celog trajanja eksperimenta. Ovaj histološki parametar je tradicionalno jedan od najboljih pokazatelja morfologije creva i korišćen je u nizu studija koje su se bavile ishranom riba. U eksperimentima sa ishranom riba se najčešće uzorkuje distalni deo creva, jer je njegova funkcija vezana za unošenje intaktnih proteina, dok je apsorpcija amino kiselina i lipida ograničena (Dabrowski, 1983; McLean i sar., 1999). Ovaj deo creva ima i ulogu u reapsorpciji endogenih digestivnih enzima, kao što je npr. taurin (Nordrum i sar., 2000).

Apsorpcija amino kiselina i lipida se skoro kompletno vrši u prednjem i srednjem crevu (Rombout i sar., 1985), mada su neki autori prijavili malu količinu amino kiselina koja se apsorbuje i u zadnjem crevu (Krogdahl i sar., 1999). Samim tim, distalni deo creva je veoma bitan kada su poremećaji u apsorpciji intaktnih proteina u pitanju. To je čest slučaj u eksperimentima i tada obično visina supranuklearne zone i enterocita može da ukaže na smanjen nivo lučenja digestivnih enzima (Ostaszewska i sar., 2005b; Ostaszewska i sar., 2008). Obično je to slučaj sa eksperimentima zamene ribljeg brašna proteinima biljnog porekla (Ostaszewska i sar., 2010; Marković i sar., 2012), ali može i da ukaže na povećanu aktivnost creva i bolje usvajanje proteina i u drugim eksperimentima, npr. dodavanjem lekovitih biljaka (Zakęs i sar., 2008) ili prebiotika (Dimitroglou i sar., 2010a; Dimitroglou i sar., 2010b) u hranu. Mehanizam delovanja je objašnjen u radu Bakke-McKellep i sar. (2000) koji su primetili smanjivanje aktivnosti intracelularne alkalne fosfataze oko jedara epitelnih ćelija distalnog dela creva. Ispostavilo se da je za smanjivanje odgovorna degeneracija Goldžijevog kompleksa kod riba hranjenih proizvodima od soje. Interesantno je i da se dešavalo da razlike između grupa nisu vidljive, kao što je slučaj u našem eksperimentu (Gridale-Helland i sar., 2002; Bonaldo i sar., 2006; Nogales Mérida i sar., 2010). S obzirom na to da je hrana u svim grupama bila adekvatna za šarana, to bi bio razlog zašto nije došlo do smanjivanja visine enterocita ili supranuklearne zone. Samim tim zaključujemo da se povećanje crevne površine kod riba u našem eksperimentu dešava povećanjem dužine crevnih nabora. Ovaj mehanizam povećavanja površine je zapravo veoma čest u životinjskom svetu i najčešće je ispitivan na domaćim životinjama. Tako je korelacija između telesne mase i dužine vilusa objavljena kod svinja (Li i sar., 1991), goveda (Brooks i sar., 1998), brojlera (Loh i sar., 2010) i ćurki (Ritz i sar., 1995). Povećanje dužine crevnih nabora predstavlja adaptaciju na različite tipove hrane kod riba (Refstie i sar., 1997).

Pored visine enterocita i supranuklearne zone, i broj mukoznih ćelija je vrlo važan za funkcionisanje creva i usvajanje nutrijenata. Obično se uvećan broj mukoznih ćelija smatra patologijom i praćen je istovremenim smanjivanjem dužine crevnih nabora (Ostaszewska i sar., 2011). Obe ove promene ukazuju na poremećaj

u strukturi mukoznog sloja i samim tim dovode do problema u intracelularnom varenju, a kao posledicu imaju metaboličke poremećaje (Ostaszewska i sar., 2010; Ostaszewska i sar., 2013). Broj mukoznih ćelija se povećava kod šarana (Urán i sar., 2008) i atlantskog lososa (van den Ingh i sar., 1991) hranjenih hranom u kojoj se nalazi punomasno sojino zrno. Slične promene se dešavaju i tokom gladovanja: povećanje broja mukoznih ćelija, skraćivanje crevnih nabora, smanjena apsorpciona površina, što sve zajedno uzrokuje nižu telesnu masu (Ferraris i Carey, 2000). U našem eksperimentu nije došlo do povećanja broja mukoznih ćelija ni u jednoj grupi, što govori o tome da nije dolazilo do poremećaja u mukoznom sloju niti u lučenju mukusa. Primetno je i da je broj mukoznih ćelija niži nego što je dobijeno u drugim eksperimentima sa šaranom (Ostaszewska i sar., 2010).

U oktobru mesecu, na kraju eksperimenta, je primećena deskvamacija epitela na distalnom delu crevnih nabora. Deskvamacija je prisutna u svim grupama jednako i nigde ne dolazi do odstupanja. Uzrok ovoj pojavi je najverovatnije reakcija na manjak hrane, s obzirom na to da u oktobru ribe polako ulaze u period mirovanja. Ova pojava je već ranije opisana u eksperimentima sa gladovanjem linjaka i reparabilna je (Ostaszewska i sar., 2006). Glover i sar., (2007) takođe nalaze istu ovu histopatološku promenu na ribama hranjenim hranom sa endosulfanom i konstatuju da ova promena nije ekstenzivna i da ne pravi smetnje varenju ribe, ali da može da doprinese gubljenju $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ -azne aktivnosti mukoze.

Pored mukoznih ćelija u distalnom crevu šarana su primećeni i mnogobrojni interepitelni makrofagi. IM su deo nespecifičnog imunog sistema, koji predstavlja prvu liniju odbrane kod riba i imaju ulogu u fagocitozi, kao i kod drugih kičmenjaka (Magnadóttir, 2006). Za razliku od sisara, u crevima riba ne postoje Pajerove ploče, koje imaju ulogu u imunološkom odgovoru protiv antigena koji dospevaju u organizam kroz gastrointestinalni trakt (Rombout i sar., 2011). Umesto Pajerovih ploča, limfnih čvorova i M-ćelija, u crevu riba postoje IM koji su razbacani duž creva. Broj IM varira duž digestivnog trakta riba tokom razvića (Romano i sar., 1998), a takođe varira i između različitih vrsta (Rombout i sar., 2011). Kod riba iz porodice Salmonidae IM nisu toliko česti kao u porodici

Cyprinidae. Ove ćelije se najčešće nalaze u drugom segmentu creva kod riba, i znatno su brojnije u tom delu, nego u ostala dva (Nachi i sar., 1998). Funkcija ovih ćelija se ogleda u fagocitozi antigena koji zajedno sa hranom dolaze do drugog segmenta creva šarana i to je potvrđeno u eksperimentima (Rombout i van den Berg, 1989). Rombout i Berg (1989) takođe smatraju da su IM ćelije slične sisarskim M-ćelijama. Rezultati dobijeni u našoj studiji pokazuju da broj IM u crevu zavisi od količine hrane koja je ribama data i da pre početka eksperimenta i na samom kraju eksperimenta broj opada, što je uporedivo sa ribama koje gladuju ili imaju poremećaje u ishrani (Baeverfjord i Krogdahl, 1996; Picchietti i sar., 2007). Međutim, pojava da ribe koje su hranjene peletiranom hranom imaju najmanji broj IM u svojim crevima verovatno ukazuje na to da je u ovoj hrani bilo najmanje makromolekula, jer se većina makromolekula usvoji u prvom segmentu creva kod šarana (Stroband i van der Veen, 1981), međutim kod druga dva tipa hrane (EH i ŽI) je varenje bilo manje efikasno ili je zbog velike količine hrane dolazilo do slabijeg usvajanja hrane, te je ova pojava uzrokovala povišen broj IM u crevima (Rombout i sar., 1985). Ovome u prilog idu i fizička svojstava pelete, odnosno povećane tvrdoće koju ima peleta ekstrudirane hrane, u poređenju sa peletom peletirane hrane (Sørensen, 2012) i tvrde opne semena ječma i pšenice. Takođe, i količina IM u mukoznom sloju može da potvrdi razlog najboljeg prirasta riba iz grupe PH u II periodu.

5.2. Uticaj kvaliteta životne sredine na histologiju škrge, jetre i bubrega

Za razliku od kopnenih organizama, svi vodeni organizmi, pa i ribe su u znatno većoj meri zavisni od vodene sredine koju nastanjuju (Marković, 2010). Sam ribnjački ekosistem je izuzetno kompleksan, s obzirom na veliki broj različitih činilaca koji utiču na kvalitet vodene sredine i povratnom spregom gde rast i razviće, kao i zdravlje riba zavisi od vodene sredine u kojoj žive. Pored zdravlja riba i proizvodnja, odnosno prirast takođe zavisi od hemijskih i fizičkih parametara vode (Billard, 1999). Praksa na ribnjacima je da se prate najbitniji parametri kvaliteta vode u jezeru (temperatura, koncentracija rastvorenog kiseonika, pH vrednost, elektroprovodljivost, tvrdoća voda), parametri koji su bitni za gajenje šarana (providnost, koncentracija fosfata i ortofosfata, potrošnja kalijum-

permanganata), kao i azotna jedinjenja, koja su toksična i u manjim koncentracijama menjaju homeostazu riba, dok u većim koncentracijama dovode i do uginuća (ukupni i amonijačni azot, nitrati).

Iako je u nekim studijama potvrđen uticaj nivoa proteina u hrani na kvalitet vode u ribnjačkim jezerima (Milstein i Svirsky, 1996; Bechara i sar., 2005; Sarà, 2007), to u ovoj studiji nije bio slučaj. Promena kvaliteta vode korišćenjem dodatne hrane se obično ogleda u povećanom nivou amonijaka u jezerima, koji nastaje oksidacijom organskih azotnih materija, pre svega aminokiselina (Azim i sar., 2002). Pored povišenog nivoa amonijaka, dolazi i do smanjivanja nivoa rastvorenog kiseonika u vodi (Das i sar., 2005). Istraživanja su pokazala da je 87.9% od ukupne količine azota u jezeru zapravo poreklom iz dodatne hrane (Gross i sar., 2000), a ta hrana može na indirektan način da utiče na zdravlje riba (Kaushik, 1995). Iako su u ovom istraživanju dve komercijalne hrane imale znatno viši nivo proteina u odnosu na žitarice (25.5 - 28.5% u odnosu na 11.3%), nisu zabeležene značajne razlike u kvalitetu vode između jezera. Neke razlike u istoj godini jesu postojale, ali se nisu ponovile i u sledećoj godini eksperimenta, tako da su najverovatnije u pitanju slučajne promene u odvojenim ekosistemima u toku godine i mogu da zavise od velikog broja faktora. Razlika u količini amonijaka između jezera nije postojala najverovatnije zato što je količina azota u vodi proporcionalna biomasi šarana (Lougheed i sar., 1998; Driver i sar., 2005), a u studiji su biomase riba po jezerima bile slične.

Šaran ima veoma široku ekološku valencu i može da toleriše neke ekstremne uslove u spoljašnjoj sredini (Billard, 1999). I pored toga, u poluintenzivnoj akvakulturi se često beleže značajni gubici ribe koji su na prosečnom nivou oko 20% tokom sezone gajenja (Horváth i sar., 2002). Vrednosti tokom druge sezone gajenja u našem eksperimentu su slične literaturnim podacima, ali je mortalitet u prvoj sezoni visok, mada ne i nekarakterističan za šaranska jezera. Nije čudno da gubici dostižu i 60% kada je u pitanju jednogodišnja šaranska mlađ. Pored niskog vodostaja i prisustva para kormorana koji mogu značajno da utiču na mortalitet (Opačak i sar., 2004; Žydelis i Kontautas, 2008), uzrokuju dodatni stres riba u jezeru (Kortan i sar., 2011) i ranjavaju ribe (Skorić i

sar., 2012), prva godina je karakteristična i po veoma visokim pH vrednostima. U laboratorijskim uslovima, kada vrednosti pH pređu 10.3, uzrokuju smanjenje rasta i povišen mortalitet, koji je nakon 17 dana eksperimenta iznosio 35%, u poređenju sa 8% kolika je smrtnost bila u kontroli (Korwin-Kossakowski, 1992). U drugim eksperimentima u kojima su šarani izlagani konstantno visokim nivoima pH u dužini od 21 dana konstatovane su histopatološke promene na oku, mozgu, koži, škragama i jetri (Ostaszewska i sar., 1999). Promene na škragama su obuhvatale izdizanje sekundarnog epitela, nekroze i dilataciju arterija i kapilara (Ostaszewska i sar., 1999). Međutim, rezultati drugih studija su kontradiktorni, jer je Heydarnejad (1999) objavio totalni mortalitet šarana na pH 9 već posle 14 dana, dok Lease i sar. (2003) na ugroženoj severnoameričkoj vrsti *Deltistes luxatus* (Cope, 1879) iz familije Catostomidae nisu uočili nikakve histološke promene na škragama niti mortalitet nakon 30 dana (pH = 10). Potrebno je, međutim, istaći da su fluktuacije u nivoima pH u ribnjaku vrlo velike na dnevnom nivou i da su oko podneva, kada je meren pH, na svom najvišem nivou (Dunn, 1967; Wurts i Durborow, 1992). Ovaj podatak implicira da ribe nisu trpele konstantan stres i život u vodi visokog alkaliniteta, već da su izmereni nivoi pH verovatno maksimalni. Mora se istaći i da je nivo pH meren u površinskom sloju vodenog stuba, gde je zbog niske koncentracije ugljen-dioksida prisutna visoka vrednost pH, dok u nižim slojevima vrednosti pH nisu toliko visoke. To je pravilnost koja je već opisana u literaturi (Moss, 1973). Pored visokih nivoa pH i vrednosti rastvorenog kiseonika, hemijske potrošnje kiseonika i nivoa amonijaka u vodi su povremeno bile izvan optimalnih vrednosti za gajenje šarana (Boyd, 1982).

Razlike u kvalitetu vode između godina su veoma velike i očigledne i posledica su različitih izvora vode, s obzirom na to da je za eksperiment u prvoj godini korišćena voda iz obližnjeg potoka i dva bunara od 6 m dubine, dok je druge godine korišćena voda sa dubine od 120 m iz arteskog bunara. Pored toga, zapremina vode u jezerima je tokom prve godine značajno manja od druge godine. Ove razlike u kvalitetu vode su indirektnim uticajima uzrokovale promene na vitalnim organima. Vrednosti elektroprovodljivosti su u obe godine bile iznad vrednosti karakterističnih za slatku vodu (Billard, 1999). Elektroprovodljivost

predstavlja meru količine rastvorenih elektrolita u vodi i u direktnoj je korelaciji sa ukupnim rastvorenim materijama u vodi (Hayashi, 2004) i salinitetom (Wilcox, 1948). Dok su se vrednosti u prvoj godini u proseku kretale oko 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, vrednosti iz druge godine eksperimenta su bile dvostruko više, i ove vrednosti su karakteristične za podzemne vode (Hu i sar., 2005). Ukoliko merimo salinitet preko elektroprovodljivosti, vrednost u drugoj godini bi bila 1.06 PSU i te vrednosti odgovaraju oligohalnim vodama (Battaglia, 1959). Šaran je stenohalina vrsta, ali niske vrednosti soli i suspendovanih materija, slične vrednostima koje su prisutne u toku prve godine gajenja, ova riba jako dobro podnosi i čak pokazuje povećanje prirasta u nekim eksperimentima (Garg i Bhatnagar, 1996). Više vrednosti (slične vrednostima iz druge godine eksperimenta) imaju uticaj na metabolizam šarana, uzrokujući fiziološke promene (Boeck i sar., 1996) i redukciju rasta (Altinok i Grizzle, 2001). Iako ove visoke vrednosti elektroprovodljivosti uzrokuju poremećaje u održavanju homeostaze, nije konstatovan mortalitet, a u nekim zemljama se šaran tradicionalno i gaji u vodi sa ovako visokim nivoima elektroprovodljivosti (Chughtai i Mahmood, 2012). Visok salinitet ima uticaj na škrge, i to posebno na hloridne ćelije, koje masovno proliferišu tokom povećanja saliniteta u vodi (Perry, 1997) i menjaju izoformu enzima Na^+/K^+ - ATP-aze koja se nalazi u hloridnim ćelijama (Richards i sar., 2003). Na ovaj način se reguliše jonska ravnoteža kod ribe, a ove ćelije predstavljaju najznačajniji faktor u adaptaciji riba na promene koncentracija rastvorenih soli u vodi (Evans i sar., 2005). Pored hloridnih ćelija u nekim eksperimentima je pokazano da i epitelne ćelije imaju višu stopu proliferacije kod riba koje žive u vodi sa višim nivoima elektroprovodljivosti, ali one nisu bile statistički značajne (Nero i sar., 2006). Pored tolerancije u nivou saliniteta, šaran predstavlja vrstu koja je veoma otporna na nizak nivo rastvorenog kiseonika u vodi. Poznato je da različite vrste riba imaju različitu toleranciju na nivo rastvorenog kiseonika u vodi (Ostrand i Wilde, 2001), što je slučaj i sa ribama iz dve familije koje su najznačajnije za akvakulturu: familija Cyprinidae ima mnogo veću toleranciju u odnosu na familiju Salmonidae (Svobodová i sar., 1993). U familiji Cyprinidae riba karaš može da preživi danima u anoksičnim uslovima (Nilsson, 1990), dok u laboratorijskim uslovima šaran može da preživi nedelju dana u vodi sa 0.5 mg/L rastvorenog kiseonika (Zhou i sar., 2000). U literaturi se

često navodi vrednost od 5 mg/L kao donja granica optimalnih vrednosti rastvorenog kiseonika u šaranskom ribnjaku (Boyd, 1982; Billard, 1999; Marković, 2010). Međutim, u našem eksperimentu su prosečne vrednosti rastvorenog kiseonika tokom cele druge sezone bile niže od 5 mg/L. Druga sezona pokazuje značajno niže vrednosti rastvorenog kiseonika od prve, osim apsolutne minimalne vrednosti od 0.7 mg/L koja je bila niža tokom prve godine istraživanja. Ovako niske vrednosti rastvorenog kiseonika u kombinaciji sa izuzetno visokim temperaturama zabeleženim tokom meseca jula mogu da budu letalne i da dovedu do masovnog uginuća ribe, ali su se ovakvi uslovi održavali samo jedan dan i nakon toga su se vraćali u optimalne granice, pa pretpostavljamo da nisu imali značajnog efekta na mortalitet. Prolongiran život u uslovima hipoksije dovodi do proliferacije respiratornog epitela u škragama (Schaack i Chapman, 2003; Timmerman i Chapman, 2004) i do povećanja broja crvenih krvnih zrnaca i uopšte vrednosti hematokrita u krvi riba (Soldatov, 1996; Chapman i Renshaw, 2009). Ova činjenica može da ukaže na uzrok višeg nivoa cirkulatornih promena na škragama u toku druge godine studije. Naime, pored povećanja broja crvenih krvnih zrnaca, adaptacija kod riba na nizak nivo kiseonika u vodi je i povećan protok krvi u škragama (Booth, 1979). Povećan protok krvi, u kombinaciji sa niskim nivoom kiseonika u vodi, dovodi do ruptуре pomoćnih ćelija u sekundarnim lamelama (tzv. pilar ćelija) i stvaranja aneurizmi u lamelama (Martinez i sar., 2004). Aneurizme spadaju u teže promene na škragama, ali su reparabilne, samo je potrebno duže vremena za oporavak riba (Poleksić i Mitrović-Tutundžić, 1994).

Hipoksija u ribnjaku je posledica trošenja kiseonika od strane bakterija za oksidaciju organskih materija koje postoje u ribnjaku (Svobodová i sar., 1993). Najveći deo organskih supstanci koje se nalaze u šaranskom ribnjaku potiče od dodatne hrane (Gross i sar., 2000). U našoj studiji su vrednosti utroška KMnO_4 visoke u poređenju sa otvorenim vodama, međutim u literaturi se navode maksimalne vrednosti za dobru produkciju gajenog šarana od 80-120 mg/L HPK (Marković, 2010). Na tom nivou su prosečne vrednosti i u našoj studiji. Interesantno je da su vrednosti utroška KMnO_4 bile niske tokom prvog (u drugoj godini eksperimenta) i prvog i drugog meseca (u prvoj godini eksperimenta), a

nakon toga, kada se započne sa dodavanjem veće količine hrane, ove vrednosti se održavaju na nivou od 71.9 mg/L (u prvoj godini) i 73.4 mg/L (u drugoj godini). Ove vrednosti se razlikuju i pokazuju pozitivnu korelaciju sa promenama na škragama. U literaturi je poznato da povišen nivo organskih supstanci uzrokuje histološke promene na organima riba (Schmidt i sar., 1999; Camargo i Martinez, 2007), međutim, ti uzroci su posredni, jer prisustvo veće količine organskih materija uvek uzrokuje snižene vrednosti kiseonika i povišene vrednosti azotnih jedinjenja. To je dokazano i u literaturi, jer su Vega i sar. (1998) objavili negativnu korelaciju između HPK i količine rastvorenog kiseonika, odnosno pozitivnu korelaciju između HPK i amonijaka u vodi.

Više autora je pokazalo pozitivnu korelaciju između visoke temperature i toksičnosti različitih molekula u vodenoj sredini, koja uključuju i amonijak (Svobodová i sar., 1993; Howe i sar., 1994; Randall i Tsui, 2002; Holmstrup i sar., 2010). Srednje vrednosti nejonizovanog amonijaka u našoj studiji u obe godine istraživanja su pokazale vrednosti od 0.11 mg/L. U literaturi možemo pronaći podatke da ove vrednosti, ili ne uzrokuju histopatološke promene u laboratorijskim uslovima (Frances i sar., 2000; Lease i sar., 2003), ili su promene blage (Benli i sar., 2008). Te blage promene su kod nilske tilapije (*Oreochromis niloticus* L., 1758) obuhvatale hiperemiju, hiperplaziju hloridnih ćelija i hidropičnu degeneraciju i to na manje od 20% uzoraka (Benli i sar., 2008). Problem sa toksičnošću amonijaka nastaje kada se nivo pH u vodi povisi. U vodama sa visokim nivoom pH, kao što je to slučaj u toku prve sezone gajenja, ribe imaju problema sa ekskrecijom amonijaka (Wright i sar., 1993; Wilkie i sar., 1994; Wilkie i Wood, 1995). S obzirom na to, da se ekskrecija amonijaka obavlja pasivnom difuzijom, niz gradijent koncentracije (Wilkie, 2002), čak i niski nivoi nejonizovanog amonijaka, pri visokim nivoima pH u vodi mogu da ugroze zdravlje riba, zbog nakupljanja amonijaka u krvnoj plazmi i nemogućnosti da ga riba izbacila iz organizma (Wang i sar., 2003). Već je navedena činjenica da histološke promene na škragama riba nisu prisutne čak i pri ekstremno visokim nivoima pH od 10, ukoliko amonijak nije prisutan u vodi (Lease i sar., 2003). Međutim, kada se u vodu doda amonijak, dolazi do pojave edema u škragama (Lease i sar., 2003). Ovaj eksperiment potvrđuje gore

navedenu diskusiju i rezultate korelacija u našem eksperimentu i ukazuje na činjenicu da je od svih parametara životne sredine, najveći uticaj na pojavu histopatoloških promena imao nivo pH vrednosti. Pozitivna korelacija između nivoa amonijaka i histopatoloških promena je takođe pokazana u literaturi (Lease i sar., 2003; Benli i sar., 2008; Spencer i sar., 2008), ali u našem slučaju ona nije konstatovana. U našoj studiji je pozitivna korelacija uspostavljena između histopatološkog indeksa sa jedne strane i nivoa pH, HPK i elektroprovodljivosti, sa druge strane. Iz ovih rezultata proizilazi da je simultano kretanje ovih faktora i njihov međusobni odnos verovatno doprineo povećanoj toksičnosti nejonizovanog amonijaka, što je pokazano i u literaturi (Randall i Tsui, 2002). Na toksičnost nejonizovane frakcije amonijaka pogotovo mogu da utiču ekstremno visoke vrednosti pH i temperature i niske vrednosti rastvorenog kiseonika u vodi (Svobodová i sar., 1993; Sollid i Nilsson, 2006) koje su bile karakteristične za prvu godinu istraživanja. Ovi ekstremni uslovi su uzrokovali histopatološke promene na škrigama i njihov oporavak je moguć (Karan i sar., 1998), ali je često spor, a razlog usporavanju je ponovno pogoršavanje ambijetalnih uslova (Nilsson, 2007). Treba napomenuti i da osim visokog pH, histopatološke promene nastaju pri nivoima pH koji su niži od neutralnih, pa su tako Miron i sar. (2008) objavili rad u kome je pokazan povišen nivo histoloških promena pri pH = 6 vrednosti.

Optimalne vrednosti ortofosfata u vodi, pokazane u literaturi, u zavisnosti od autora, su od 0.1 - 0.5 mg/L (Marković, 2010), 0.08 - 0.6 mg/L (Holmes, 1996). Trovalentni fosfatni anjon (PO_4^{3-}) ili ortofosfatni jon ima jako bitnu ulogu u produkciji planktona u ribnjačkim jezerima (Garg i Bhatnagar, 1996) Navedene vrednosti su poželjne upravo zbog toga, što povećavaju produktivnost šaranskog jezera i omogućuju više prirodne hrane (Bhakta i sar., 2006). Prosečne vrednosti ortofosfata su u istraživanju bile u navedenim granicama, s tim što su više vrednosti primećene tokom druge godine istraživanja. Prve godine su vrednosti bile i niže od optimalnih, ali je to čest slučaj u jezerima koja nisu fertilizovana u dovoljnoj meri (Bhakta i sar., 2004), ili u kojima još uvek nije formirana bentofauna. Fosfati i ortofosfati nisu toksični i ne predstavljaju opasnost po morfologiju unutrašnjih organa, kao npr. amonijak, ali je njihov nivo u hrani veoma

bitan za normalan razvoj ribe (Ogino i Takeda, 1976). Ukoliko nivo u hrani nije dovoljan, dolazi do poremećaja u funkcionisanju imunog sistema, problema u reprodukciji, slabijem rastu i pravilnom razvijanju kosti (Sugiura i sar., 2004).

Ostali izmereni parametri u ovoj studiji: nivo nitrata, ortofosfati i totalni fosfati, ukupni azot, tvrdoća i providnost vode su bili u optimalnim vrednostima u toku obe godine trajanja eksperimenta (Boyd, 1982; Svobodová i sar., 1993; Billard, 1999; Marković, 2010).

Cela dosadašnja diskusija se odnosila na uticaj kvaliteta životne sredine na histopatologiju škruga, koje su organ sa najdelikatnijom strukturom od svih ispitivanih (Evans i sar., 2005) i organ koji prvi reaguje na promene u životnoj sredini (Poleksić i Mitrović-Tutundžić, 1994; Fernandes i Mazon, 2003; Triebkorn i sar., 2004; Prieto i sar., 2006). To se i u ovoj studiji pokazalo kao tačno, s obzirom na veliki broj ustanovljenih korelacija između histopatološkog indeksa škruga i parametara kvaliteta vode. Sa ostalim organima to nije slučaj i od svih uspostavljenih korelacija, samo je još nivo pH vrednosti uticao na histopatološki indeks jetre. Vrednost ove korelacije je bila niska, ali je očigledno da uticaj postoji. U literaturi nema puno podataka o uticaju nivoa pH na jetru, a u jednoj od retkih studija Ostaszewska i sar. (1999) su uočili promene na krvnim sudovima šarana na pH 10.3, što je slučaj i u našoj studiji, dok osim promena u nivou glikogena, druge promene nisu uočene.

Da bi uspele da prežive u otežanim uslovima u životnoj sredini, ribe moraju da prilagode površinu škržnog aparata novonastalim uslovima (Fernandes i Mazon, 2003). Osnovni mehanizam promene i adaptacija škruga u slučaju niskog nivoa kiseonika u vodi se odvija na dva načina, koji su međusobno potpuno različiti, ali imaju isti cilj: povećavanje respiratorne površine i smanjivanje rastojanja između škržnog epitela i vode (Sollid i Nilsson, 2006). Samim tim dolazi do lakše i brže razmene gasova (Greco i sar., 1995). Mehanizam obuhvata i rast primarnih lamela kod nekih vrsta riba (Chapman i sar., 2000), kao i sužavanje i širenje pilar ćelija u sekundarnim lamelama (Sundin i Nilsson, 1998; Stensløkken i sar., 2006). Međutim, problem nastaje kada se u vodi, osim smanjene količine

kiseonika, nađu i neki toksični molekuli, npr. teški metali ili amonijak. Tada dolazi do suprotnog mehanizma, jer riba nastoji da se odbrani od štetnih materija tako što će smanjiti površinu škruga i povećati barijeru između krvi i vode (Sollid i Nilsson, 2006). Prvi način predstavlja pojavu hiperplazije na škrugama, čime se prostor između lamela popunjava tkivom i na taj način dolazi do smanjivanja površine škržnog epitela. To je slučaj u dodiru riba sa teškim metalima rastvorenim u vodi (Karan i sar., 1998; Cerqueira i Fernandes, 2002), teškim metalima u vidu nanopartikula (Smith i sar., 2007; Griffitt i sar., 2009), povišenom koncentracijom amonijaka (Thurston i sar., 1984; Erkmen i Kolankaya, 2000) i prisustvom toksičnih organskih materija (Khan, 1999; Noreña-Barroso i sar., 2004). Drugi način je povećanje rastojanja između krvi i vode i ostvaruje se odvajanjem respiratornog epitela i pojavom hipertrofije epitelnih (Takashima i Hibiya, 1995) ili hloridnih ćelija (Perry, 1998). Odvajanje respiratornog epitela odvija se pojavom edema u prostoru između sekundarnog epitela i pilar ćelija. U principu, najčešće promene na branhijalnom epitelu, koje su primećene u našem eksperimentu, predstavljaju generalni odgovor na većinu iritanata u tkivu škruga (Mallatt, 1985; Roberts, 1989), mada se za neke grupe toksikanata može primetiti određeni trend. Npr., hipertrofija epitelnih ćelija u našem eksperimentu nije uočena, a Mallatt (1985) navodi da je hipertrofija mnogo češća u eksperimentima sa teškim metalima, kojih nije bilo u našim ribnjacima. U istom radu se navodi, da su najčešće promene upravo odvajanje respiratornog epitela i hiperplazija epitela, što je slučaj i u našoj studiji. Ukoliko uporedimo stanje škruga sa studijama objavljenim na komercijalnim šaranskim ribnjacima, primetićemo više vrednosti histopatoloških indeksa na komercijalnim ribnjacima, veliki broj nekroza i težih promena na škrugama (Rašković i sar., 2010). Ovo je razumljivo, s obzirom na to da voda koja se koristi za napajanje komercijalnih ribnjaka nije uvek potpuno pogodna za gajenje, jer je moguće da se u njoj nađu i teški metali i različiti organski zagađivači, a češća je i pojava parazita i zaraznih bolesti (Jeremić i sar., 2005) nego na ribnjaku oglednog dobra (gde je realizovan ovaj eksperiment) na kojem se primenjuje dobra proizvođačka praksa. Ova činjenica objašnjava i relativno mali broj histoloških promena škržnog aparata za razliku od riba koje su uzorkovane na

komercijalnim ribnjacima (Poleksić i sar., 1999; Poleksić i sar., 2002; Rašković i sar., 2010).

Pored svih ovih promena na škragama je primećena i atrofija proksimalnih delova primarnih lamela, na onim mestima gde se odvajaju od škržnih lukova. Ovaj fenomen je poznat i već opisan kod riba i vezuje se za manjak kiseonika u bazi primarnih lamela. Laurent i Perry (1991) naglašavaju da atrofija nastaje zbog nemogućnosti da do njih dođe sveža voda sa visokim nivoom rastvorenog kiseonika u njoj. Ova promena je uočena kod većine škriga i nije tretirana kao histopatološka promena.

Za razliku od škriga, jetra je organ koji nije u direktnom kontaktu sa spoljašnjom sredinom, ali je veoma bitan kako u proceni zdravstvenog stanja ribe tako i kao bioindikator (Harper i Wolf, 2009). U vodi generalno nisu bili prisutni ksenobionti i stoga su promene na hepatocitima bile retke. Promene srednje težine, kao što je hidropska degeneracija, su takođe zabeležene samo u tragovima, kao i prisustvo makrofagnih centara. Makrofagni centri predstavljaju agregacije makrofaga, a funkcija im je fagocitoza ćelijskog debrisa i različitih patogena koji mogu da se nađu u jetri (Au, 2004). Pigmenti koji mogu da budu prisutni u makrofagnim centrima su različiti i mnogobrojni, ali je najčešći melanin i centri se tada označavaju kao melanomakrofagni centri (Agius i Roberts, 2003). Iako na količinu makrofagnih centara u jetri utiče starost ribe i uhranjenost (Schwindt i sar., 2006) i metabolizam gvožđa i hemoglobina (Agius i Roberts, 2003), ove strukture imaju ulogu i kao biomarkeri zagađenja u životnoj sredini (Broeg i sar., 1999; Marigómez i sar., 2006; Triebkorn i sar., 2008). Međutim, većina histopatoloških promena u jetri su spadale u cirkulatorne promene ili su zahvatale krvne sudove. Cirkulatorne promene u jetri su često nalažene u eksperimentima gde su ribe izlagane organskim zagađivačima (Schmidt i sar., 1999). Međutim, fibroze na portalnom i periportalnom prostoru su često nalažene kod riba u prirodnim populacijama (Rousseaux i sar., 1995; Koponen i sar., 2001; Poleksić i sar., 2010). Tako su Koponen i sar. (2001) zaključili da su portalne i periportalne promene u vezi sa sezonskim promenama u jezeru. U posmatranju jezera u Finskoj, primećeno je da frekvencija fibroza opada od proleća do zime. Slični rezultati su

primećeni i u našem eksperimentu, u svim jezerima podjednako, gde je u prva dva meseca (maj i juni) pojava fibroza na krvnim sudovima manja nego u drugim mesecima. EG se često primećuju u vezivnom tkivu ili u blizini krvnih sudova (Reite, 1998). To je slučaj i u našoj studiji, s tim što je najveći broj EG uočavan u portalnim i periportalnim fibrozama. Ovo je slučaj i sa studijom koju su radili Dezfuli i sar. (2002), pri čemu je povišen broj EG u fibroznom tkivu rezultat infestacije parazita na crevo ribe. Interesantno je da histopatološke promene na hepatocitima nisu uočene u velikoj meri, što ukazuje na odsustvo toksikanata i da su efekti na hepatocite, koji su navedeni u gornjem delu diskusije posledica ishrane, a ne prisustva toksičnih molekula, npr. amonijaka. U prilog tome idu i podaci iz literature koji govore da je morfologija hepatocita kod riba koje žive u zagađenim vodama potpuno izmenjena. Prvi znak promena na hepatocitima, koje mogu biti vidljive i na svetlosnom mikroskopu su gubitak glikogena (Wolf i Wolfe, 2005) i promena u morfologiji jedara (Bernet i sar., 1999; Abdel-Moneim i sar., 2008). Međutim, ribe koje žive u zagađenim područjima često gube kompartmentaciju karakterističnu za ćeliju i organele se pojavljuju razbacane po celoj ćeliji (Triebkorn i sar., 2007). Pored toga, karakteristično je i povećano prisustvo makrofaga, lizozoma i peroksizoma, dok granulisani endoplazmatični retikulum proliferiše i podleže degranulaciji, fragmentaciji i dilataciji (Gernhöfer i sar., 2001). Česta je i intenzivna pojava glatkog endoplazmatičnog retikuluma za koga je poznato da se u hepatocitima javlja tokom procesa detoksikacije (Grund i sar., 2010). Nijedan od ovih efekata nije primećen na ćelijama u našem istraživanju, već je primetno prisustvo vakuola sa rezervnim materijama (glikogen i/ili lipidi), koja najčešće zauzima zapreminu cele ćelije, kao što je već opisano u prethodnom delu diskusije.

Bubreg riba prima najveću količinu postbranhijalne krvi i stoga se očekuje da ovaj organ bude dobar pokazatelj promena u životnoj sredini (Ortiz i sar., 2003). Pored ove činjenice, slično kao i kod škrge, tkivo bubrega veoma brzo reaguje na promene u spoljašnjoj sredini i jako se uspešno adaptira (Wong i Woo, 2006). Histopatološke promene u bubrezima nisu pokazale korelaciju sa parametrima kvaliteta vode. Čak su i razlike između dve godine istraživanja bile

minorne i jedini parametar koji se razlikovao bio je proširenje kapilara u glomerulusu. Ova promena spada u promene na krvnim sudovima i u vezi je sa cirkulatornim promenama. Različiti tipovi toksikanata mogu da izazovu širenje kapilara, npr. neke vrste pesticida (Cengiz, 2006; Velmurugan i sar., 2007a; Velmurugan i sar., 2007b). Međutim, Takashima i Hibiya (1995) napominju da ovu leziju mogu da izazovu i bakterije i gljive, ukoliko su prisutne u vodi. S obzirom na to da je voda u toku prve godine eksperimenta uzimana iz potoka u koji su se izlivala kanalizacione vode iz uzvodno lociranog novoizgrađenog naselja, moguće je da je stalno prisustvo bakterija dovelo do češće pojave ove lezije u bubrezima, nego u toku druge godine, kada je za gajenje riba korišćena podzemna voda. Mada, mora se napomenuti da ribe u bubregu nisu imale kliničke znake masovne bakterijske ili fungalne infiltracije (McHugh i sar., 2011). Ova pojava se inače češće sreće kod riba koje su živele u blizini kanalizacionih voda (Silva i Martinez, 2007). Pored širenja kapilara u malpigijevom telašcu, u bubregu riba je generalno primetan veći broj promena. Slično kao i kod škrge i jetre, veliki broj histopatoloških promena je generalni odgovor na prisustvo toksikanata i/ili odstupanje od optimalnih uslova životne sredine. Međutim, nemoguće je povezati određeni stresor sa određenom histopatološkom promenom. Promene su uočavane i na glomerulusima i na tubulusima bubrega. Hidropska degeneracija epitelnih ćelija tubulusa i dilatacija Boumenove kapsule su dve najčešće promene i sa visokim indeksom spadaju u najfrekventnije lezije ukoliko posmatramo sva tkiva u ovoj studiji. Ove promene su najčešće konstatovane i u drugim studijama u kojima se prate ribe u zagađenim ekosistemima (Koponen i sar., 2001; Camargo i Martinez, 2007). Pored zagađenih ekosistema, iste promene su uočene i na tkivima riba izloženim povišenim nivoima amonijaka (Banerjee i Bhattacharya, 1994). Ostale uočene histopatološke alteracije u bubregu nisu imale značajno visoke indekse. Agregati makrofaga su normalni u ovom tkivu, s obzirom na njegovu hematopoetsku ulogu, ali su slično kao i kod jetre češći u starijim jedinkama i jedinkama koje su zahvaćene patogenima (Agius i Roberts, 2003), međutim oni mogu da budu i indikator hemijskog zagađenja (Meinelt i sar., 1997). Dijametar tubula takođe može imati status biomarkera, pošto je poznato da se menja kada je riba izložena stresoru (Iqbal i sar., 2004; Liney i sar., 2006). Promene na

intersticijalnom tkivu nisu uočene u većoj meri, iako je bubreg jedan od najbitnijih hematopoetskih organa kod riba (Evans i Claiborne, 2006). Iako je jedna od najčešćih pojava u eksperimentima prisustvo glomerulonefritisa, koji se karakteriše zadebljalom bazalnom membranom i potpunim odsustvom Boumenovog prostora (Sami i sar., 1992), ova patološka slika nije primećena ni u jednoj godini eksperimenta. Pored glomerulonefritisa, veoma je često i prisustvo hijalinskih kapljica u epitelnim ćelijama tubulusa (Wester i sar., 1985; Koponen i sar., 2001; Zaroogian i sar., 2001; Jiraungkoorskul i sar., 2003; Camargo i Martinez, 2007), a u nekim eksperimentima čak i kod kontrolnih riba (Schwaiger i sar., 1997). Međutim nijedna od ovih promena nije uočena u našoj studiji.

Promene koje su nalažene na svim organima u ovom eksperimentu su uglavnom bile blage i spadale su u reparabilne promene (Bernet i sar., 1999). Najteže promene koje mogu biti prisutne u ispitivanim tkivima su nekroze. Nekroze spadaju u ireverzibilne promene (Poleksić i Mitrović-Tutundžić, 1994), ali je njihova frekvencija pojavljivanja u ovoj studiji bila relativno niska, a i kada su uočene, uglavnom su bile lokalnog karaktera. Nekroze su obično prisutne u toksikološkim istraživanjima gde su u vodi prisutni teški metali (Karan i sar., 1998; Mazon i sar., 2002; Mishra i Mohanty, 2008), pesticidi (de Melo i sar., 2008; Boran i sar., 2010; Shiogiri i sar., 2012; Velisek i sar., 2012), organske otpadne materije (Arellano i sar., 2001; Mondon i sar., 2001; Costa i sar., 2009) ili mešovito zagađenje i aditivni efekti ovih ksenobionata. Nekroze se javljaju i u prisustvu bolesti riba, npr. kada su ribe zaražene koi herpes virusom (Body i sar., 2000; Perelberg i sar., 2003). Naravno, ukoliko su prisutne u velikoj meri, mogu dovesti do prestanka rada određenog organa. Međutim, veoma često u ekotoksikološkim istraživanjima, pa čak i u vodi koja je relativno dobrog kvaliteta, moguće je videti fokalne nekroze (Handy i sar., 2002; Aliko i sar., 2012). Nekroze na škragama u šaranskim komercijalnim ribnjacima su ekstenzivnije nego one nađene u našem eksperimentu (Poleksić i sar., 1999; Poleksić i sar., 2002; Rašković i sar., 2010).

Ukoliko se uporede nekroze na različitim organima u našem istraživanju, primetno je da je pojava nekroza u škragama i jetri retka (u oba organa primećena na oko 5% riba u istraživanju) za razliku od bubrega (procenat pojave nekroza oko

15%). I polukvantitativni scoring je pokazao sličan odnos jer su prosečne vrednosti indeksa nekroza u bubrezima 0.28, dok su vrednosti u jetri 0.05, a na škragama 0.04. U literaturi se obično navodi da su najosetljiviji organi riba škrge (Roberts, 1989; Hinton i Lauren, 1990; Poleksić i Mitrović-Tutundžić, 1994). Međutim, kao i u našem istraživanju, i u nekim drugim studijama bubreg pokazuje veći stepen alteracija i/ili nekroza od drugih organa. To je slučaj sa lambda-cihalotrinom (pesticid) kojim je u eksperimentu trovana vrsta ribe mrigal (*Cirrhinus cirrhosus* (Bloch, 1795), fam: Cyprinidae) (Velmurugan i sar., 2007a), sa potočnom pastrmkom izloženom vodama iz postrojenja za preradu kanalizacionog otpada (Bucher i Hofer, 1993), sa dve vrste kečiga (*Acipenser medirostris* Ayres, 1854 i *Acipenser transmontanus* Richardson, 1836) koje su izložene delovanju metil-žive preko hrane (Lee i sar., 2012) i sa ubrizgavanjem mikrocistina u šarana (Carbis i sar., 1996). Poslednja citirana referenca je posebno zanimljiva, s obzirom na to da su u jezerima iz našeg eksperimenta povremeno bili prisutni toksični sojevi organizama iz grupe Cyanobacteria (Cyanophyta), *Anabena spiroides* (Dulić i sar., 2010) koja luči mikrocistin, a Carbis i sar. (1996) su pokazali da mikrocistin izaziva nekroze bubrega, dok se nekroze u jetri i škragama ne dešavaju. Ovo baca sumnju na tradicionalnu, i već široko prihvaćenu činjenicu da su škrge najosetljiviji organ riba, ali zahteva dodatna i sistemska ispitivanja.

Pored patologija, u studiji je primećeno i prisustvo tubulusa i glomerulusa koji su u stadijumu regeneracije. Ovi regenerativni nefroni su prisutni na početku svake godine eksperimenta. Za razliku od nefrona kod sisara, nefroni riba mogu da se regenerišu tokom celog života, mada su češći kod mladih riba koje su zdrave i u dobroj kondiciji (Reimschuessel, 2001). Regenerativni nefroni su dobri biomarkeri hronične zagađenosti, jer je vreme potrebno za regeneraciju procenjeno na oko 9 nedelja (Salice i sar., 2001). Nefroni u regeneraciji su primećeni i u nekim toksikološkim eksperimentima, pri oporavku riba od delovanja gentamicina (Watanabe i sar., 2009), kao i u zagađenim otvorenim vodenim ekosistemima (Camargo i Martinez, 2007; Lukin i sar., 2011). Prisustvo regenerisanih nefrona tokom našeg eksperimenta je primećeno sa većom frekvencijom u toku prva dva meseca u obe godine istraživanja. Ova činjenica ukazuje na verovatni uticaj stresa

tokom transporta. Prisustvo malog broja regenerisanih tubula u kasnijim mesecima je još jedna potvrda da voda koja je korišćena u eksperimentima nije bila zagađena ksenobioticima.

Prisutnost ektopičnog tireoidnog tkiva u bubregu šarana i karaša je normalna pojava (Takashima i Hibiya, 1995). S obzirom na difuznu prirodu tireoidnog tkiva kod Teleostei, kod nekih vrsta je normalno naći ektopično tkivo ne samo u bubregu, već i u drugim tkivima poput gonada, srca, jetre, slezine ili mozga (Leatherland i Down, 2001; Geven i sar., 2007). Geven i sar. (2007) su ustanovili razliku u lokaciji i funkciji ovih ektopičnih tkiva kod različitih vrsta riba i pokazali da je centar lučenja tireotropnih hormona kod mozambičke tilapije (*Oreochromis mossambicus* Peters) u subfaringeanoj zoni (kao kod sisara), dok je kod šarana centar lučenja hormona baš u bubregu, gde se hormoni luče u 10 puta većoj količini nego u subfaringealnoj zoni. U našem eksperimentu nije bilo razlike u pogledu količine i lokalizacije tireoidnog tkiva između grupa, iako su preliminarna istraživanja pokazala da i izvor i količina hrane mogu imati efekat na lučenje tireoidnih hormona kod šarana (Geven, 2009).

5.3. Uticaj ishrane na sastav i količinu masnih kiselina u mišićima

Ukoliko posmatramo masnokiselinski sastav mišića šarana u našoj studiji, primetićemo da je visoki sadržaj sastojaka biljnog porekla u sve tri vrste korišćene riblje hrane uslovio dominaciju oleinske kiseline, koja spada u mononezasićene masne kiseline (MUFA). Ova činjenica odstupa od generalnog stava da masnokiselinski sastav hrane u najvećem delu određuje i masnokiselinski sastav mesa ribe (Steffens, 1997). Naime, i kod žitarica i kod komercijalne hrane sadržaj linolne kiseline značajno nadmašuje sadržaj oleinske kiseline. Međutim, dominacija oleinske kiseline u mesu šarana hranjenih hranom sa visokim sadržajem žitarica je konstatovana i u nekoliko drugih istraživanja (Kminkova i sar., 2001; Buchtová i sar., 2007; Vacha i sar., 2007). Eksperimenti sa inkorporacijom radioaktivno obeleženog Acetil-CoA, su pokazali da ova pojava nije posledica selektivne akumulacije oleinske kiseline, već aktivacije njene *de novo* sinteze usled ishrane hranom bogatom ugljenim hidratima, a siromašnom lipidima, naročito

linoleinskom kiselinom čije prisustvo blokira enzime za *de novo* sintezu oleinske kiseline (Farkas i sar., 1978; Csengeri, 1996; Henderson, 1996). Na ovaj način se može objasniti i izrazita dominacija oleinske kiseline u mesu šarana u ovom istraživanju, tim pre što je ona viša u grupi riba hranjenoj žitaricama, gde je udeo ugljenih hidrata u hrani najveći, a udeo linoleinske kiseline najmanji. Ovakvo objašnjenje potkrepljuje i činjenica da je u komercijalnim hranama sadržaj oleinske kiseline veći, a linolne manji nego kod žitarica, dok je sadržaj ovih masnih kiselina u mesu šarana iz grupa PH i EH suprotan.

Iako je masnokiselinski sastav žitarica i komercijalne hrane veoma sličan, bar kada je u pitanju sadržaj najzastupljenijih masnih kiselina, ipak postoje jasne i značajne razlike, pre svega u zastupljenosti ω -3 masnih kiselina i raznovrsnosti masnih kiselina u celini, koja je značajno veća kod grupa riba hranjenih komercijalnim hranama usled prisustva soje, ribljeg brašna i suvog kvasca. Otuda se mogu i očekivati razlike u masnokiselinskom sastavu mesa šarana koje su uočene. Tako, meso riba hranjenih peletiranom hranom ima statistički značajno viši sadržaj ω -6 i niži ω -3, dok se sadržaj oleinske kiseline ne razlikuje u odnosu na meso riba hranjenih ekstrudiranom hranom. Podjednaka količina oleinske kiseline je očekivana, i zbog jednakog sadržaja u hrani ove masne kiseline, ali i ugljenih hidrata za čiju koncentraciju je pokazano da stimuliše *de novo* sintezu ove kiseline. Međutim, razlozi statistički značajnih razlika u sadržaju ω -3 i ω -6 masnih kiselina nisu u toj meri jasni. Naime, veoma je malo istraživanja koja su se bavila efektima načina pripreme hrane na sadržaj masnih kiselina, a ni jedno do sada nije sprovedeno na šaranu. Zapravo, jedino slično istraživanje je sprovedeno na brancinu u Turskoj (Aslan i sar., 2009). Ishrana ekstrudiranom hranom u ovom istraživanju je dovela do povećanja odnosa ω -3/ ω -6 masnih kiselina u odnosu na ribe hranjene peletiranom hranom za oko 11% što je posledica blagog smanjenja sadržaja ω -6 i povećanja sadržaja ω -3 masnih kiselina, dok drugi efekti nisu uočeni.

Rezultati dobijeni na šaranu u ovoj studiji ukazuju na veće razlike. Glavna razlika je u sadržaju PUFA, a u slučaju mesa šarana ishrana ekstrudiranom hranom je dovela do 69% većeg sadržaja ω -3 i 53% manjeg sadržaja ω -6 masnih kiselina,

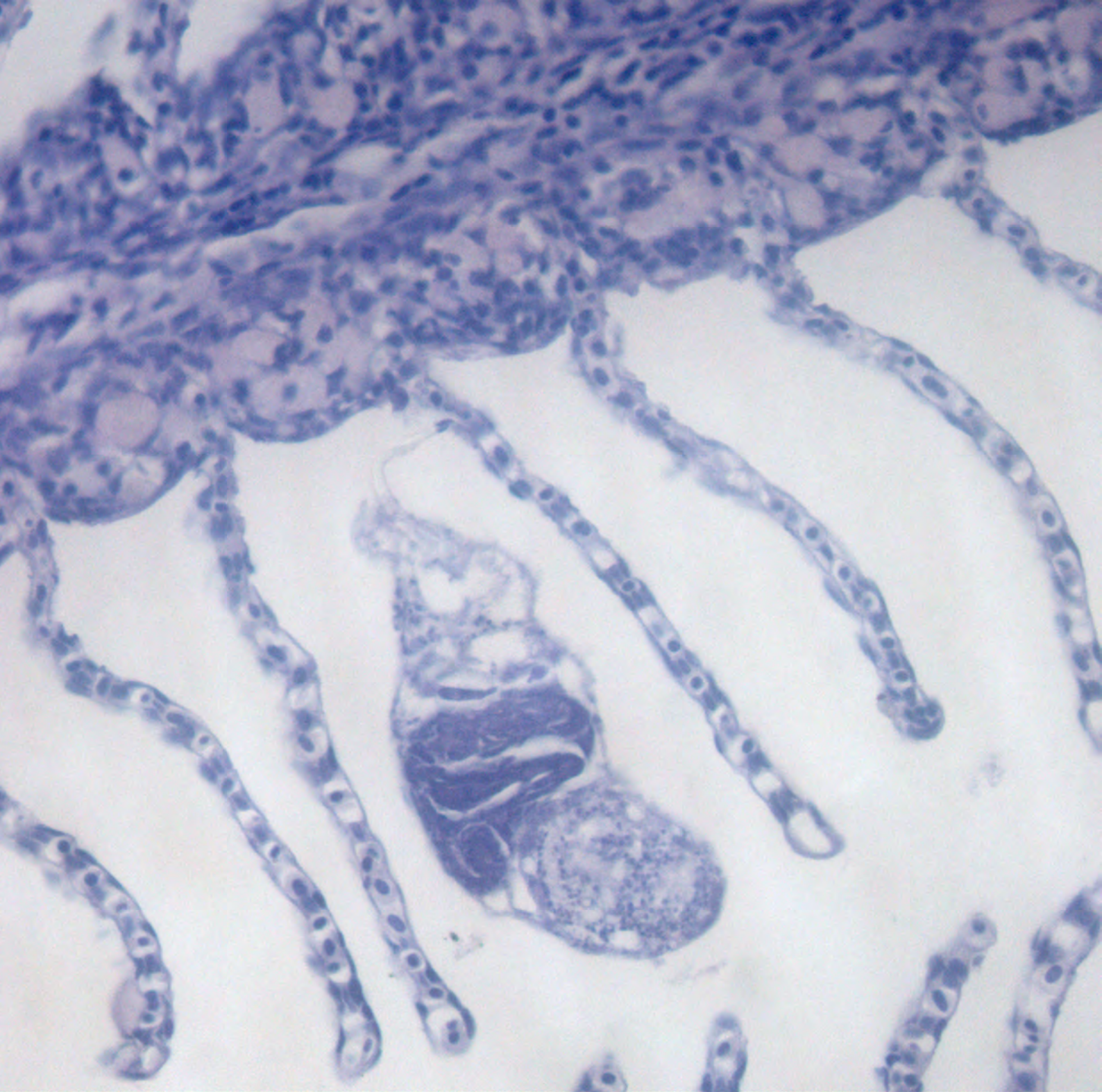
te je i njihov odnos 2.64 puta viši u odnosu na meso šarana hranjenih peletiranom hranom. Pri tome, viši sadržaj ω -3 masnih kiselina kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom nije posledica većeg sadržaja ALA, jer je ona manje zastupljena u odnosu na meso riba hranjenih peletiranom hranom, već značajno većim sadržajem DHA i EPA, kod riba hranjenih ekstrudiranom hranom, pri čemu je njihova zastupljenost značajno veća nego u samoj hrani. To znači da dolazi do akumulacije EPA i DHA u mesu šarana, za razliku od ALA, koju karakteriše suprotan trend. Poređenje sa rezultatima na brancinu je teško ostvarljivo jer, s jedne strane postoji značajna razlika u sastavu hrane i masnih kiselina u njoj, a s druge su putevi sinteze masnih kiselina kod ovih vrsta veoma različiti. U slučaju brancina u oba tipa hrane dominiraju riblje brašno i riblje ulje te je, s jedne strane sadržaj proteina i lipida daleko viši a ugljenih hidrata niži. Pored toga, odnos ω -3/ ω -6 je veći od 1, a među ω -3 ne dominira ALA, već DHA i EPA (Aslan i sar., 2009), dok su kod šarana dominantne žitarice i soja, a ALA među ω -3 masnim kiselinama. Pored toga šaran kao slatkovodna riba ima sposobnost sinteze dugolančanih ω -3 i ω -6 masnih kiselina iz ALA, odnosno LA, dok brancin, kao tipična morska riba nema tu sposobnost (Henderson, 1996).

Kako su, hemijski gledano, oba tipa hrane veoma slična, ribe genetički uniformne i gajene pod istim uslovima, uzroke uočenih razlika treba tražiti u specifičnom načinu obrade hrane. Iako uticaj procesa ekstrudiranja hrane na masnokiselinski sastav mesa ribe nije intenzivno izučavan, njegovi efekti u odnosu na ostale parametre uzgoja i kvaliteta ribljeg mesa su bolje izučeni (Hilton i sar., 1981; Deguara, 1997; Vergara i sar., 1999). Ovi radovi su pokazali da zbog viših temperatura koje se primenjuju prilikom proizvodnje ekstrudirane hrane dolazi do želatinizacije skroba, što ga čini značajno dostupnijim ribi (Hilton i sar., 1981; Hilton i Slinger, 1983), a to je slučaj i sa proteinima i lipidima, pošto su vrednosti efikasnosti iskorišćavanja ukupnih proteina i lipida viši kod riba koje se hrane ekstrudiranom nego peletiranom hranom (Deguara, 1997; Vergara i sar., 1999). U našem istraživanju je, kao i kod brancina uočeno da je sadržaj lipida u mesu viši kod riba hranjenih ekstrudiranom nego peletiranom hranom, što imajući u vidu da im je sadržaj u hrani praktično identičan, može biti posledica samo više efikasnosti

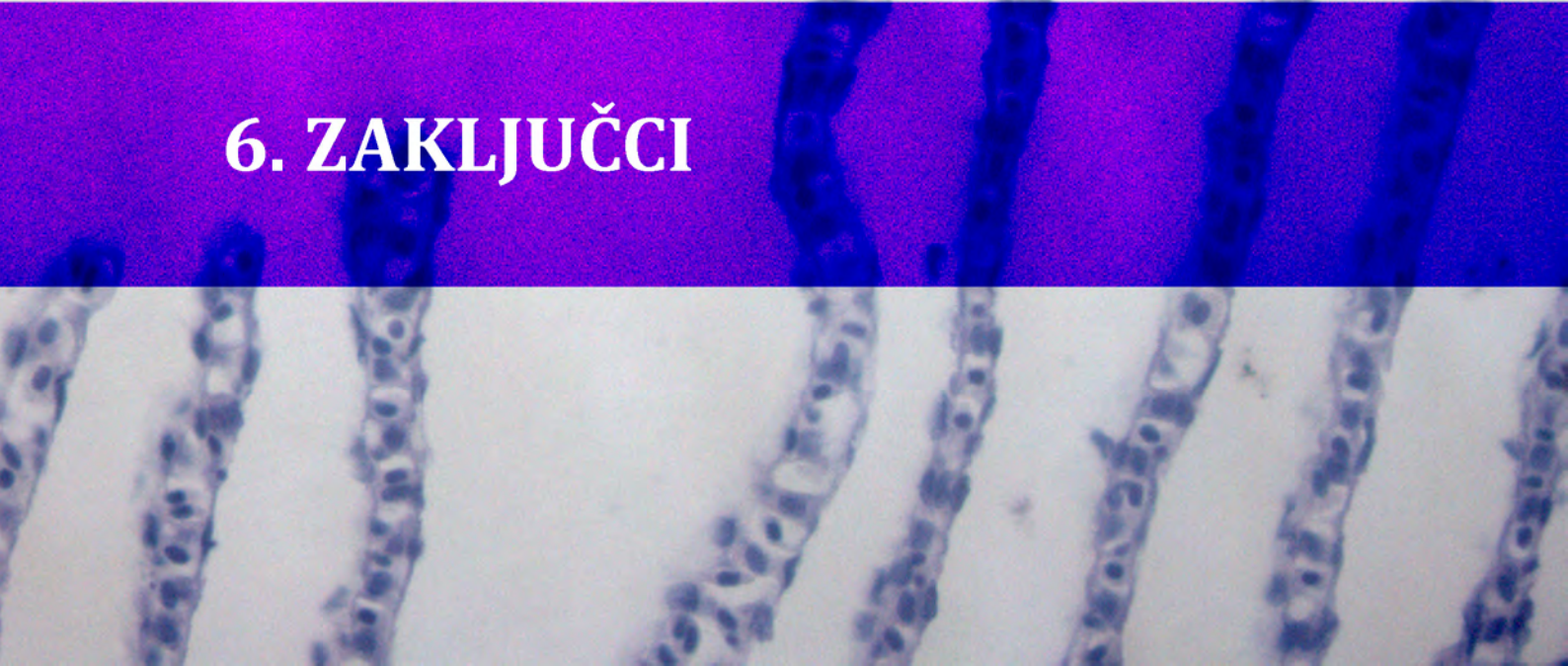
iskorišćavanja ukupnih lipida. Kako je sadržaj EPA i DHA u obe vrste hrane manji od 0.5%, možda je baš ova veća efikasnost u iskorišćavanju lipida iz hrane omogućila da se i ove slabo zastupljene vrste masnih kiselina efikasnije usvoje iz ekstrudirane, nego iz peletirane hrane, gde je zastupljenost EPA u mesu za 57% niža nego u hrani. Nasuprot tome, u mesu riba hranjenih ekstrudiranom hranom zastupljenost EPA i DHA je daleko viša nego u hrani, što ukazuje ili na akumulaciju u mišićima, ili na njihovu *de novo* sintezu. Šaran ima sposobnost *de novo* sinteze EPA i DHA iz ALA (Henderson, 1996), što skupa sa činjenicom da je zastupljenost ALA manja kod riba hranjenih ekstrudiranom u odnosu na peletiranu hranu ukazuje na mogućnost *de novo* sinteze EPA i DHA. Ovo je mogući mehanizam povećanja njihove količine, naročito ako se ima u vidu razlika u strukturi ugljenih hidrata između ova dva tipa hrane i njihovog značaja u regulaciji biosinteze masnih kiselina (Farkas i sar., 1978; Csengeri, 1996; Henderson, 1996).

Vrednosti odnosa ω -3/ ω -6 su niže ukoliko se uporede sa drugim eksperimentima koji su rađeni na šaranu. Steffens i Wirth (2007) konstatuju vrednost odnosa ω -3/ ω -6 masnih kiselina od 0.8 - 2.4, u zavisnosti od toga da li su ribe hranjene dodatnom hranom ili ne. U drugim eksperimentima koji su rađeni na šaranskim ribnjacima u poluintenzivnom sistemu, ove vrednosti su još više (Mráz i Pickova, 2009). Međutim, kada se ova poređenja vrše, treba biti oprezan, s obzirom na to da količina lipida i masnih kiselina varira u zavisnosti od toga sa kog dela ribe je uzet uzorak (Katikou i sar., 2001). Pored toga, različite linije šarana pokazuju različite nivoe i odnose masnih kiselina u mesu (Mráz i Pickova, 2009). Tako su slični rezultati u odnosu ω -3/ ω -6 objavljeni u radu Mraz i sar. (2012), gde se taj nivo kretao oko 0.25, mada je u istom radu prikazan i procentualno viši nivo PUFA, u poređenju sa bilo kojom grupom u našem eksperimentu. Pored ove činjenice, treba obratiti pažnju na to da masne kiseline mogu da budu poreklom i iz prirodne hrane, jer organizmi koji čine zooplankton (Domaizon i sar., 2000), fitoplankton (Sushchik i sar., 2004) i zoobentos (Arts i sar., 2001) prirodno imaju visoke nivoe PUFA, a posebno je taj visoki nivo zabeležen u grupi zoobentosa i to kod vrste *Chironomus pulmosus* koja dominira u šaranskim ribnjacima (Bogut i sar., 2007; Živić i sar., 2011). U jezerima u kojima je naš eksperiment rađen, biomasa

planktona i bentosa je bila relativno niska, a i nije bilo razlike između jezera (Dulić i sar., 2010), tako da pretpostavljamo da je prirodna hrana ravnomerno uticala na sve grupe u eksperimentu.



6. ZAKLJUČCI



Histološke promene na gastrointestinalnom traktu riba su očevidno povezane sa korišćenom hranom u toku eksperimenta. Naime, primetno je da su različiti tipovi hrane usloveli različite dimenzije i metabolizam enterocita i hepatocita, kao i celog digestivnog trakta. Da bi se slikovitije objasnio odnos između forme i funkcije, na ovom mestu data je paralela sa arhitekturom i citiran je čuveni američki arhitekta Frenk Lojd Rajt koji je rekao:

“Form follows function - that has been misunderstood. Form and function should be one”,

u prevodu:

“Pogrešno je protumačeno da forma sledi funkciju. Forma i funkcija treba da budu jedno”.

Iako je princip da forma sledi funkciju preuzeta baš iz biologije, koju je prvi naveo Žan Batist Lamarck u svojoj knjizi “Philosophie Zoologique” (Lamarck, 1809), gore pomenuti arhitekta daje dopunjenu i kompletniju definiciju koja je primenjiva i na biologiju i koja objašnjava većinu morfoloških promena u organizmu riba tokom ovog eksperimenta. Promene se ogledaju u tome da se prilagođavanje dešava još na celularnom nivou i da zavisi od hrane koju su ribe iz eksperimenta konzumirale. Stoga se iz prikazanih rezultata može izvesti sledeći niz zaključaka:

- Funkcionalna anatomija jetre je pokazala razlike u histomorfometrijskim parametrima između komercijalnih hrana u odnosu na žitarice, a slični odnosi su bili prisutni i u prirastu riba.
- Primećena je značajna razlika u većini histomorfometrijskih parametara i histopatoloških promena u svim organima sa početka eksperimenta u odnosu na ostatak eksperimenta, a posebno u odnosu na period juni-oktobar (II i III period). Ovo potvrđuje posledice zimskog gladovanja i/ili transporta riba na histološko stanje ispitivanih organa.
- Razlika između histomorfometrijskih parametara u jetri i količini lipidnih kapljica u hepatocitima se menjala i po mesecima i po grupama. U svim mesecima je procenat lipidnih kapi u ćeliji opadao u smeru: PH > EH > ŽI,

dok je u svim grupama najviši procenat lipidnih kapi bio u junu i julu mesecu. Kako je vreme prolazilo i kako su temperatura i metabolizam riba opadali, procenat lipidnih kapi se smanjivao u ćelijama. U oktobru, na kraju sezone gajenja, lipidne kapi nisu više bile primetne u ćelijama.

- Histologija creva nije pokazala razlike kada su u pitanju histomorfometrijski parametri enterocita. Međutim, crevna površina se tokom eksperimenta povećavala na račun dužine crevnih nabora i ovo je jedini morfometrijski parametar u crevima koji se razlikovao između grupa.
- U crevima su uočeni neki znaci enteritisa, pogotovo u prva dva meseca eksperimenta, međutim, može se zaključiti da su sve tri hrane adekvatne za ishranu šarana.
- Kada je prirast u pitanju, znatno je niži kod riba hranjenih žitaricama u odnosu na druge dve grupe. Prirast generalno odražava količinu proteina u hrani i ukupni rezultati se poklapaju sa ovim nivoima. Međutim, prirast i njegovi parametri po periodima pokazuju određenu pravilnost: u I periodu grupa riba koja je hranjena žitaricama pokazuje niže nivoe prirasta, u II periodu ribe koje su hranjene ekstrudiranom hranom pokazuju bolji prirast od druge dve grupe, dok u III periodu najveći uticaj na prirast ima peletirana hrana.

Drugi deo ove disertacije se bavio kvalitetom vodene životne sredine, njenim uticajem na homeostazu riba i posledično promenama morfologije vitalnih organa koje se takođe dešavaju kao adaptacija na nove uslove životne sredine. Voda kao životna sredina za šarana, osim što predstavlja stanište, može da predstavlja i problem, jer neki njeni parametri, kao i različite supstance (ksenobiotici) koji se nalaze u vodi mogu biti toksični. Naravno, sve zavisi od količine (doze) ksenobionata. Čovek koga su često nazivali ocem toksikologije, poznati srednjovekovni lekar Paracelzus je napisao:

“Alle ding' sind gift, und nichts ohn' gift; allein die dosis macht, daß ein ding kein gift ist”,

u prevodu:

“Sve stvari su otrovne i ništa nije otrovno; jedina stvar koja određuje da li je nešto otrovno jeste doza”.

Tako su i parametri kvaliteta vode u našem istraživanju ostavljali efekte na ribe. Iako su neophodni za normalan život riba, ukoliko su prisutni u višim dozama dolazilo je do promena na organima:

- Razlike u parametrima kvaliteta vode između jezera su bile minorne. U prvoj godini su se razlikovali samo elektroprovodljivost i providnost, dok je u drugoj jedina razlika bila primetna u nivou pH vrednosti. Polukvantitativni histopatološki indeks je potvrdio prethodno pomenutu činjenicu i nije pokazao statistički značajne razlike između grupa. Ovo je bio slučaj u obe godine istraživanja.
- Razlika u parametrima kvaliteta vode između dve godine je bila očigledna. Voda iz arteskog bunara je pokazivala znatno lošije parametre, sa visokim nivoima amonijaka i rastvorenih soli, a niskom vrednošću količine rastvorenog kiseonika i tvrdoće vode. Međutim, ove razlike se nisu u značajnoj meri odrazile i na vrednosti polukvantitativnog histopatološkog indeksa, pa zaključujemo da su velike fluktuacije parametara kvaliteta vode u toku prve godine istraživanja imale presudan značaj u količini histopatoloških promena na organima. Po organima, razliku su pokazali histopatološki indeksi škrge i jetre, kao i ukupni histopatološki indeks sva tri ispitivana organa u eksperimentu. Sva tri indeksa su bila viša u toku prve godine istraživanja.
- Parametar kvaliteta vode koji je najviše doprineo promenama na organima riba u istraživanju je bila pH vrednost. To pokazuju korelacije sa histopatološkim indeksima organa.
- Škrge su se pokazale kao najbolji bioindikatorski organ. Najveći stepen korelacija između škrge i parametara kvaliteta vode je ustanovljen u odnosu na sve organe korišćene u istraživanju. Međutim, relativno mali broj težih histopatoloških promena je uočen na škragama. Većina ih je spadala u blage promene ili promena srednje težine, koje su reparabilne.

- Jetra se u ovoj studiji pokazala kao relativno dobar bioindikatorski organ. U jetri su dominirale cirkulatorne promene i promene na krvnim sudovima, pogotovo fibroze i kongestije sinusoida, čije vrednosti padaju u odnosu na I period eksperimenta, gde su najviše. Procentualno je veći broj promena i nekroza na pankreasnom tkivu, nego u jetrinom parenhimu i to je verovatna posledica intenziviranja hranjenja riba u ovom eksperimentu.
- Bubrege se u ovoj studiji nije pokazao kao dobar indikatorski organ. Odgovor na uticaje spoljašnjih faktora na bubrege je bio limitiran, a korelacije između parametara kvaliteta vode i histopatološkog indeksa na ovom organu nisu ustanovljene, za razliku od škriga i jetre. Međutim, najviši stepen nekroza i najveći broj promena kod svih organa u studiji je uočavan u bubregu. Ova činjenica pokazuje da je tokom trajanja eksperimenta, i to u obe godine studija, ovaj organ trpeo veoma jak negativni uticaj spoljašnje sredine. Bubrege nije organ koji je ekstenzivno izučavan u eksperimentima u oblasti akvakulture, kao što je slučaj sa škrigama i jetrom, pa je moguće da se promene u homeostazi ribe u ribnjacima najviše odražavaju na bubrege.
- Promene na organima su najverovatnije uticale i na vrednosti mortaliteta, čiji rezultati samo potvrđuju činjenicu da je u prvoj godini eksperimenta riba bila pod većim stresom, što se odrazilo na histološko stanje organa.
- Oba izvora vode su bila odgovarajući za gajenje šarana. Međutim, iako su prosečne vrednosti kvaliteta vode bile optimalne za gajenje riba tokom prve godine, povremene ekstremne vrednosti nekih faktora su uslovile histopatološke promene na organima.
- U eksperimentu je očevidan simultani uticaj više fizičkih i hemijskih parametara vode. Međutim, histološke promene pokazuju iste tkivne odgovore na različite stresore, tako da je nemoguće odrediti koji faktor je bio najznačajniji i uslovljavao najveći stepen promena. Međutim, kao što je već navedeno, neki trendovi su uočeni, kao što je indirektni uticaj nivoa pH u vodi.

Poznati francuski filozof iz XIX veka Žan Antelm Brija-Savaren je u svom delu "Fiziologija ukusa" (franc., *Physiologie du Goût*) napisao:

“Dis-moi ce que tu manges, je te dirai ce que tu es”,

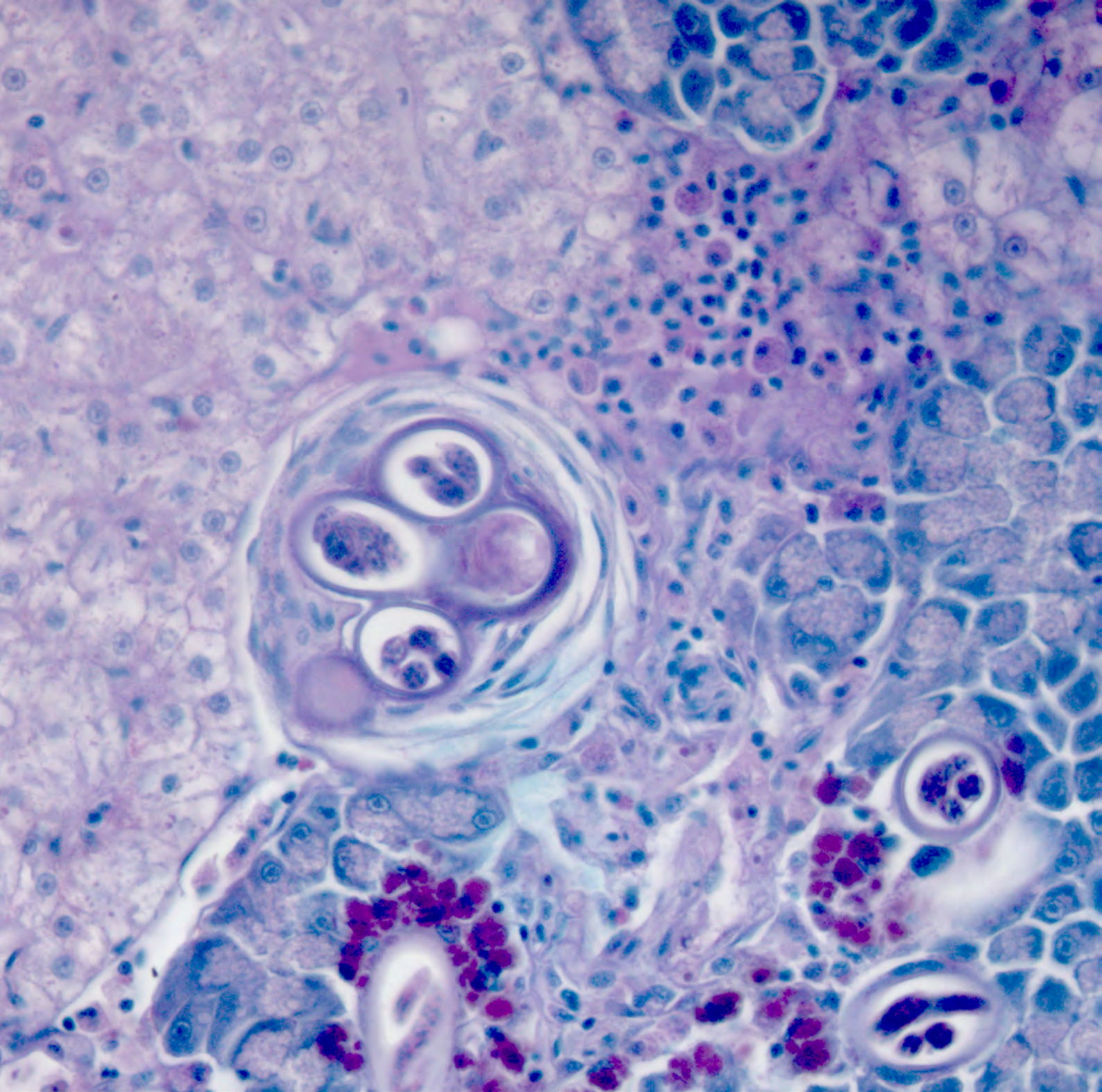
u prevodu:

“reci mi šta jedeš i reći ću ti ko si” (Brillat-Savarin, 1826).

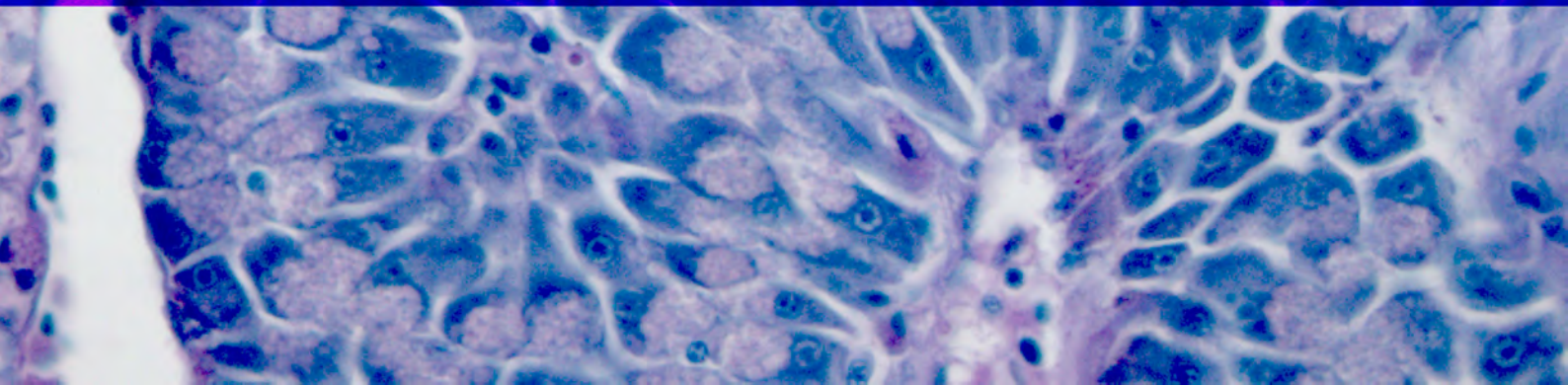
Ova rečenica veoma slikovito objašnjava odnose u količini i broju masnih kiselina u mišićnom tkivu riba iz različitih grupa u našem eksperimentu:

- RIBE hranjene komercijalnim hranama su pokazale znatno veći diverzitet masnih kiselina u mišićima u odnosu na ribe hranjene žitaricama, kao i ribe uzorkovane na početku eksperimenta.
- Utvrđena je statistički značajna razlika u količini masnih kiselina u mesu riba između grupa hranjenih različitom komercijalnom hranom. Vrednosti ω -3 masnih kiselina, koje su izuzetno značajne i imaju niz pozitivnih svojstava na zdravlje ljudi, su više u mišićnom tkivu riba hranjenih ekstrudiranom hranom. Takođe, odnos ω -3 i ω -6 masnih kiselina u mesu riba iz eksperimenta opada u sledećem nizu: EH > PH > ŽI, čineći tako meso riba iz grupe EH najpovoljnijim za ishranu ljudi.

Svi gore navedeni zaključci idu u prilog tome da histološke analize treba da budu integralan parametar u izučavanju zdravstvenog stanja riba u akvakulturi. Promene na histološkom nivou su nekada suptilne, pogotovo kada je reč o uticaju hrane na digestivne organe, pa se mora pribeći morfološkim i morfometrijskim metodama u proceni njihovog stanja. One mogu da budu važni indikatori ne samo zdravstvenog stanja riba, već i kvaliteta životne sredine, odnosno ribnjačkog jezera u kome se nalaze.



7. REFERENCE



- Abdel-Moneim A.M., Abou Shabana N.M., Khadre S.E.M., Abdel-Kader H.H. (2008) Physiological and histopathological effects in catfish (*Clarias lazera*) exposed to dyestuff and chemical wastewater. *International Journal of Zoological Research*, 4: 189-202.
- Acerete L., Balasch J.C., Espinosa E., Josa A., Tort L. (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237: 167-178.
- Agius C., Roberts R.J. (2003) Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26: 499-509.
- Al-Hussaini A.H. (1949) On the functional morphology of the alimentary tract of some fish in relation to differences in their feeding habits: cytology and physiology. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 90: 323-354.
- Aliko V., Qirjo M., Sula E., Berdica L. (2012) Early detection of pollution stress through evaluation of some metabolic and histopathological biomarkers in carp fish (*Cyprinus carpio* L.) from Shkodra Lake, Albania. BALWOIS, Ohrid, Macedonia, 28 May-2 June 2012.
- Altinok I., Grizzle J.M. (2001) Effects of brackish water on growth, feed conversion and energy absorption efficiency by juvenile euryhaline and freshwater stenohaline fishes. *Journal of Fish Biology*, 59: 1142-1152.
- Andreozzi G., Antonucci R., Affatato C., Gargiulo G., Battaglini P. (1994) Influence du cadmium sur l'intestin de *Carassius Auratus*. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 23: 102-111.
- Arellano J., Ortiz J., Luisa González de Canales M., Sarasquete C. (2001) Histopathological alterations and induction of cytochrome P-450 1A in the liver and gills of the gilthead seabream (*Sparus Aurata*) exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Histochemical Journal*, 33: 663-674.
- Arts M.T., Ackman R.G., Holub B.J. (2001) "Essential fatty acids" in aquatic ecosystems: a crucial link between diet and human health and evolution. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58: 122-137.
- Aslan S.S., Çoban B., Tekinay A., Gezgin T., Guven K.C. (2009) Effects of pellet and extruded feed on fatty acid composition of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) using HRGC-MS. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18: 112-116.
- Au D.W.T. (2004) The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 817-834.
- Azim M.E., Verdegem M.C.J., Khatoon H., Wahab M.A., van Dam A.A., Beveridge M.C.M. (2002) A comparison of fertilization, feeding and three periphyton substrates for increasing fish production in freshwater pond aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture*, 212: 227-243.
- Ba-Omar T.A., Victor R., Tobias D.B. (1998) Histology of the stomach of *Aphanius dispar* (Rüppell 1828), a cyprinodont fish, with emphasis on changes caused by stress from starvation. *Tropical Zoology*, 11: 11-17.
- Bachmann K., Cowden R.R. (1967) Specific DNA amounts and nuclear size in fish hepatocytes and erythrocytes. *Transactions of the American Microscopical Society*, 86: 463-471.
- Baevefjord G., Krogdahl A. (1996) Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *Journal of Fish Diseases*, 19: 375-387.
- Bairagi A., Ghosh K.S., Sen S.K., Ray A.K. (2002) Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10: 109-121.
- Bakke-McKellep A.M., Press C.M., Baevefjord G., Krogdahl Å., Landsverk T. (2000) Changes in immune and enzyme histochemical phenotypes of cells in the intestinal mucosa of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with soybean meal-induced enteritis. *Journal of Fish Diseases*, 23: 115-127.
- Ballestrazzi R., Lanari D., D'Agaro E. (1998) Performance, nutrient retention efficiency, total ammonia and reactive phosphorus excretion of growing European sea-bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) as affected by diet processing and feeding level. *Aquaculture*, 161: 55-65.
- Balon E.K. (1995) Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roman gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129: 3-48.
- Balon E.K. (2004) About the oldest domesticates among fishes. *Journal of Fish Biology*, 65: 1-27.
- Bancroft J.D., Stevens A. (1977) *Theory and practice of histological techniques*. Churchill Livingstone, Edinburgh; New York.

- Banerjee S., Bhattacharya S. (1994) Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, mercury, and ammonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29: 265-275.
- Barrows F.T., Gaylord T.G., Sealey W.M., Porter L., Smith C.E. (2008) The effect of vitamin premix in extruded plant-based and fish meal based diets on growth efficiency and health of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 283: 148-155.
- Bartels H., Potter I.C. (2004) Cellular composition and ultrastructure of the gill epithelium of larval and adult lampreys: Implications for osmoregulation in fresh and seawater. *Journal of Experimental Biology*, 207: 3447-3462.
- Battaglia B. (1959) The Venice system for the classification of marine waters according to salinity. *Archives of Oceanography and Limnology*, 11: 346-347.
- Bechara J.A., Roux J.P., Ruiz Díaz F.J., Flores Quintana C.I., Longoni de Meabe C.A. (2005) The effect of dietary protein level on pond water quality and feed utilization efficiency of pacú *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). *Aquaculture Research*, 36: 546-553.
- Bekefi E., Varadi L. (2007) Multifunctional pond fish farms in Hungary. *Aquaculture International*, 15: 227-233.
- Benli A.Ç.K., Köksal G., Özkul A. (2008) Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): Effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 72: 1355-1358.
- Bernet D., Schmidt H., Meier W., Burkhardt-Holm P., Wahli T. (1999) Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *Journal of Fish Diseases*, 22: 25-34.
- Bhakta J.N., Sarkar D., Jana S., Jana B.B. (2004) Optimizing fertilizer dose for rearing stage production of carps under polyculture. *Aquaculture*, 239: 125-139.
- Bhakta J.N., Bandyopadhyay P.K., Jana B.B. (2006) Effect of different doses of mixed fertilizer on some biogeochemical cycling bacterial population in carp culture pond. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6: 165-171.
- Bielek E., Viehberger G. (1983) New aspects on the 'rodlet cell' in teleosts. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 15: 681-694.
- Bielek E. (2002) Rodlet cells in teleosts: new ultrastructural observations on the distribution of the cores in trout (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta* L.). *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 34: 271-278.
- Billard R. (1999) *Carp: biology and culture*. Springer-Verlag, Berlin.
- Body A., Lieffrig F., Charlier G., Collard A. (2000) Isolation of virus-like particles from koi (*Cyprinus carpio*) suffering gill necrosis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 20: 87-88.
- Boeck G., Nilsson G., Vlaeminck A., Blust R. (1996) Central monoaminergic responses to salinity and temperature rises in common carp. *Journal of Experimental Biology*, 199: 1605-1611.
- Boglino A., Gisbert E., Darias M.J., Estévez A., Andree K.B., Sarasquete C., Ortiz-Delgado J.B. (2012) Isolipidic diets differing in their essential fatty acid profiles affect the deposition of unsaturated neutral lipids in the intestine, liver and vascular system of Senegalese sole larvae and early juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 162: 59-70.
- Bogut I., Horváth L., Adámek Z., Katavić I. (2006) Ribogojstvo. Poljoprivredni fakultet, Osijek, Osijek.
- Bogut I., Has-Schön E., Adámek Z., Rajković V., Galović D. (2007) *Chironomus plumosus* larvae - a suitable nutrient for freshwater farmed fish. *Poljoprivreda*, 13: 159-162.
- Bolla S., Nicolaisen O., Amin A. (2011) Liver alterations induced by long term feeding on commercial diets in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) females. *Histological and biochemical aspects*. *Aquaculture*, 312: 117-125.
- Bonaldo A., Roem A., Pecchini A., Grilli E., Gatta P. (2006) Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology of Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. *Aquaculture*, 261: 580-586.
- Booth J.H. (1979) The effects of oxygen supply, epinephrine, and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. *The Journal of Experimental Biology*, 83: 31-39.
- Booth M.A., Allan G.L., Warner-Smith R. (2000) Effects of grinding, steam conditioning and extrusion of a practical diet on digestibility and weight gain of silver perch, *Bidyanus bidyanus*. *Aquaculture*, 182: 287-299.
- Boran H., Altinok I., Capkin E. (2010) Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue and Cell*, 42: 158-164.

- Boyd C.E. (1982) Water quality management of pond fish culture. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Braunbeck T. (1994) Detection of environmentally relevant concentrations of toxic organic compounds using histological and cytological parameters: substance-specificity in the reaction of rainbow trout liver? U: Muller R., Lloyd R., Sublethal and chronic toxic effects of pollutants on freshwater fish. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, 15-29.
- Braunbeck T., Appelbaum S. (1999) Ultrastructural alterations in the liver and intestine of carp *Cyprinus carpio* induced orally by ultra-low doses of endosulfan. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36: 183-200.
- Braunbeck T.A., Teh S.J., Lester S.M., Hinton D.E. (1992) Ultrastructural alterations in liver of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine. *Toxicologic Pathology*, 20: 179-196.
- Bridges C.R., Berenbrink M., Müller R., Waser W. (1998) Physiology and biochemistry of the pseudobranch: an unanswered question? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119: 67-77.
- Brillat-Savarin J.A. (1826) *Physiologie du goût*. Lacour, A., Paris.
- Broeg K., Zander S., Diamant A., Körting W., Krüner G., Paperna I., Westernhagen H.v. (1999) The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring. *Helgoland Marine Research*, 53: 171-194.
- Brooks H.W., Hall G.A., Wagstaff A.J., Michell A.R. (1998) Detrimental effects on villus form during conventional oral rehydration therapy for diarrhoea in calves; alleviation by a nutrient oral rehydration solution containing glutamine. *Veterinary Journal*, 155: 263-274.
- Bucher F., Hofer R. (1993) The effects of treated domestic sewage on three organs (gills, kidney, liver) of brown trout (*Salmo trutta*). *Water Research*, 27: 255-261.
- Buchtová H., Svobodová Z., Křížek M., Vácha F., Kocour M., Velíšek J. (2007) Fatty acid composition in intramuscular lipids of experimental scaly crossbreds in 3-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 76: 73-81.
- Buentello J.A., Gatlin III D.M., Neill W.H. (2000) Effects of water temperature and dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 182: 339-352.
- Burel C., Boujard T., Tulli F., Kaushik S.J. (2000) Digestibility of extruded peas, extruded lupin, and rapeseed meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture*, 188: 285-298.
- Caballero M.J., López-Calero G., Socorro J., Roo F.J., Izquierdo M.S., Fernández A.J. (1999) Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179: 277-290.
- Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjørsvik E., Montero D., Socorro J., Fernández A.J., Rosenlund G. (2003) Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. *Aquaculture*, 225: 325-340.
- Caballero M.J., Izquierdo M.S., Kjørsvik E., Fernández A.J., Rosenlund G. (2004) Histological alterations in the liver of sea bream, *Sparus aurata* L., caused by short- or long-term feeding with vegetable oils. Recovery of normal morphology after feeding fish oil as the sole lipid source. *Journal of Fish Diseases*, 27: 531-541.
- Camargo M.M.P., Martinez C.B.R. (2007) Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5: 327-336.
- Carbis C.R., Rawlin G.T., Mitchell G.F., Anderson J.W., McCauley I. (1996) The histopathology of carp, *Cyprinus carpio* L., exposed to microcystins by gavage, immersion and intraperitoneal administration. *Journal of Fish Diseases*, 19: 199-207.
- Caruso G., Maricchiolo G., Micale V., Genovese L., Caruso R., Denaro M.G. (2010) Physiological responses to starvation in the European eel (*Anguilla anguilla*): effects on haematological, biochemical, non-specific immune parameters and skin structures. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 71-83.
- Case S.E., Hamann D.D., Schwartz S.J. (1992) Effect of starch gelatinization on physical properties of extruded wheat- and corn-based products. *American Association of Cereal Chemists*, St. Paul, MN, ETATS-UNIS.
- Castro-González M.I., Méndez-Armenta M. (2008) Heavy metals: Implications associated to fish consumption. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26: 263-271.

- Cengiz E.I. (2006) Gill and kidney histopathology in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after acute exposure to deltamethrin. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 200-204.
- Cerqueira C.C.C., Fernandes M.N. (2002) Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52: 83-91.
- Chapman C.A., Renshaw G.M.C. (2009) Hematological responses of the grey carpet shark (*Chiloscyllium punctatum*) and the epaulette shark (*Hemiscyllium ocellatum*) to anoxia and re-oxygenation. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, 311A: 422-438.
- Chapman L.G., Galis F., Shinn J. (2000) Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid. *Ecology Letters*, 3: 387-393.
- Chatchavalvanich K., Marcos R., Poonpirom J., Thongpan A., Rocha E. (2006) Histology of the digestive tract of the freshwater stingray *Himantura signifer* Compagno and Roberts, 1982 (Elasmobranchii, Dasyatidae). *Anatomy and Embryology*, 211: 507-518.
- Chughtai M.I., Mahmood K. (2012) Semi-intensive carp culture in saline water-logged area: a multi-location study in Shorkot (District Jhang), Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 44: 1065-1072.
- Claiborne J.B., Edwards S.L., Morrison-Shetlar A.I. (2002) Acid-base regulation in fishes: cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 302-319.
- Coimbra A.M., Figueiredo-Fernandes A., Reis-Henriques M.A. (2007) Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), liver morphology, CYP1A activity and thyroid hormones after endosulfan dietary exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 89: 230-236.
- Costa-Pierce B.A. (2003) Use of ecosystems science in ecological aquaculture. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada*, 103: 32-40.
- Costa P.M., Diniz M.S., Caeiro S., Lobo J., Martins M., Ferreira A.M., Caetano M., Vale C., DelValls T.Á., Costa M.H. (2009) Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*, 92: 202-212.
- Couch J.A. (1993) Light and electron microscopic comparisons of normal hepatocytes and neoplastic hepatocytes of well-differentiated hepatocellular carcinomas in a teleost fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 16: 1-14.
- Craig S., Helfrich L.A. (2002) Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. *Virginia Cooperative Extension*, 420: 1-4.
- Csengeri I. (1996) Dietary effects on fatty acid metabolism of common carp. *Archiv für Tierernaehrung*, 49: 73-92.
- Čelechovská O., Svobodová Z., Žlábek V., Macharáčková B. (2007) Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 76: 93-100.
- Ćirić M., Subakov-Simić G., Dulić Z., Bjelanović K., Čičovački S., Marković Z. (2013) Effect of supplemental feed type on water quality, plankton and benthos availability and carp (*Cyprinus carpio* L.) growth in semi-intensive monoculture ponds. *Aquaculture Research* (in press).
- Da Costa O.T.F., Pedretti A.C.E., Schmitz A., Perry S.F., Fernandes M.N. (2007) Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. *Journal of Microscopy*, 225: 1-9.
- Dabrowski K. (1983) Digestion of protein and amino acid absorption in stomachless fish, common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 74: 409-415.
- Dallinger R., Prosi F., Segner H., Back H. (1987) Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia*, 73: 91-98.
- Darnerud P.O., Atuma S., Aune M., Bjerselius R., Glynn A., Grawé K.P., Becker W. (2006) Dietary intake estimations of organohalogen contaminants (dioxins, PCB, PBDE and chlorinated pesticides, e.g. DDT) based on Swedish market basket data. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 1597-1606.
- Das P.C., Ayyappan S., Jena J. (2005) Comparative changes in water quality and role of pond soil after application of different levels of organic and inorganic inputs. *Aquaculture Research*, 36: 785-798.

- de Melo G.C., Donatti L., Mendes Rudniki C.A., Fanta E. (2008) Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600®. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71: 821-829.
- Degani G., Viola S., Yehuda Y. (1997) Apparent digestibility coefficient of protein sources for carp, *Cyprinus carpio* L. *Aquaculture Research*, 28: 23-28.
- Deguara S. (1997) Evaluation of different pressed and extruded fish meal based diets on the growth of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *Cahiers Options Mediterraneennes*, 22: 123-139.
- Dezfuli B.S., Simoni E., Rossi R., Manera M. (2000) Rodlet cells and other inflammatory cells of *Phoxinus phoxinus* infected with *Raphidascaris acus* (Nematoda). *Diseases of Aquatic Organisms*, 43: 61-69.
- Dezfuli B.S., Giari L., Simoni E., Bosi G., Manera M. (2002) Histopathology, immunohistochemistry and ultrastructure of the intestine of *Leuciscus cephalus* (L.) naturally infected with *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala). *Journal of Fish Diseases*, 25: 7-14.
- Dimitroglou A., Davies S.J., Sweetman J., Divanach P., Chatzifotis S. (2010a) Dietary supplementation of mannan oligosaccharide on white sea bream (*Diplodus sargus* L.) larvae: effects on development, gut morphology and salinity tolerance. *Aquaculture Research*, 41: 245-251.
- Dimitroglou A., Merrifield D.L., Spring P., Sweetman J., Moate R., Davies S.J. (2010b) Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300: 182-188.
- Domaizon I., Desvillettes C., Debroas D., Bourdier G. (2000) Influence of zooplankton and phytoplankton on the fatty acid composition of digesta and tissue lipids of silver carp: mesocosm experiment. *Journal of Fish Biology*, 57: 417-432.
- Driver P.D., Closs G.P., Koen T. (2005) The effects of size and density of carp (*Cyprinus carpio* L.) on water quality in an experimental pond. *Archiv für Hydrobiologie*, 163: 117-131.
- Duan C. (1998) Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *Journal of Nutrition*, 128: 306-314.
- Dulić Z., Poleksić V., Rašković B., Lakić N., Marković Z., Živić I., Stanković M. (2009) Assessment of the water quality of aquatic resources using biological methods. *Desalination and Water Treatment*, 11: 264-274.
- Dulić Z., Subakov-Simić G., Ćirić M., Relić R., Lakić N., Stanković M., Marković Z. (2010) Water quality in semi-intensive carp production system using three different feeds. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16: 266-274.
- Dulić Z., Stanković M., Rašković B., Spasić M., Ćirić M., Grubišić M., Marković Z. (2011) Role and significance of zooplankton in semi-intensive carp production. V International Conference "Aquaculture & Fishery", Belgrade, Serbia, 1-3 June 2011.
- Dunn I.G. (1967) Diurnal fluctuations of physicochemical conditions in a shallow tropical pond. *Limnology and Oceanography*, 12: 151-154.
- Edwards E.A., Twomey K. (1982) Habitat suitability index models: common carp. U.S. Fish and Wildlife Service
- Engelsma M.Y., Hougee S., Nap D., Hofenk M., Rombout J.H.W.M., van Muiswinkel W.B., Lidy Verburg-van Kemenade B.M. (2003) Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 15: 397-410.
- Erkmen B., Kolankaya D. (2000) Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kızılırmak river, Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 64: 418-425.
- Evans D.H., Piermarini P.M., Choe K.P. (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.
- Evans D.H., Claiborne J.B. (2006) *The physiology of fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Fajmonová E., Zelenka J., Komprda T., Kladroba D., Šarmanová I. (2003) Effect of sex, growth intensity and heat treatment on fatty acid composition of common carp (*Cyprinus carpio*) filets. *Czech Journal of Animal Science*, 48: 85-92.
- Fanta E., Rios F.S., Romao S., Vianna A.C.C., Freiburger S. (2003) Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of organophosphorus in water and food. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 119-130.

- FAO (2007) Regional review on aquaculture development. 5. Central and eastern European region - 2005. Rome.
- FAO (2010) FishStat Plus. <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstat/en>.
- Farkas T., Csengeri I., Majoros F., Oláh J. (1978) Metabolism of fatty acids in fish. II. Biosynthesis of fatty acids in relation to diet in the carp, *Cyprinus carpio* Linnaeus 1758. *Aquaculture*, 14: 57-65.
- Feldlitz M., Milstein A. (2000) Effect of density on survival and growth of cyprinid fish fry. *Aquaculture International*, 7: 399-411.
- Ferguson H.W. (1989) Systemic Pathology of Fish : A text and atlas of comparative tissue responses in diseases of teleosts. Iowa State University Press, Ames.
- Fernandes M.N., Mazon A.F. (2003) Environmental pollution and fish gill morphology. U: Val L., Kapoor B.G., Fish Adaptations. Science Publishers, Enfield, 203-231.
- Fernández-Delgado C. (1990) Life history patterns of the common carp, *Cyprinus carpio*, in the estuary of the Guadalquivir river in south-west Spain. *Hydrobiologia*, 206: 19-28.
- Ferraris R.P., Carey H.V. (2000) Intestinal transport during fasting and malnutrition. *Annual Review of Nutrition*, 20: 195-219.
- Fishelson L., Becker K. (1999) Rodlet cells in the head and trunk kidney of the domestic carp (*Cyprinus carpio*): Enigmatic gland cells or coccidian parasites? *Naturwissenschaften*, 86: 400-403.
- Fishelson L., Becker K. (2001) Development and aging of the liver and pancreas in the domestic carp, *Cyprinus carpio*: from embryogenesis to 15-year-old fish. *Environmental Biology of Fishes*, 61: 85-97.
- Fontagné S., Geurden I., Escaffre A.-M., Bergot P. (1998) Histological changes induced by dietary phospholipids in intestine and liver of common carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae. *Aquaculture*, 161: 213-223.
- Foster G.D., Moon T.W. (1991) Hypometabolism with fasting in the yellow perch (*Perca flavescens*): a study of enzymes, hepatocyte metabolism, and tissue size. *Physiological Zoology*, 64: 17.
- Fotis G., Kamarianos A., Karamanlis X., Kilikidis S., Sioutas A. (1994) The influence of environmental and other stress factors on the appearance of carp erythrodermatitis on the common carp. *Deltion tis Ellinikis Ktiniatrikis Etaireias*, 45: 150-154.
- Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A., Engle V.D., Blazer V.S. (2001) Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 105-116.
- Frances J., Nowak B.F., Allan G.L. (2000) Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). *Aquaculture*, 183: 95-103.
- Francis G., Makkar H.P.S., Becker K. (2001) Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. *Aquaculture*, 199: 197-227.
- García-Berthou E. (2001) Size- and depth-dependent variation in habitat and diet of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquatic Sciences*, 63: 466-476.
- Garg S.K., Bhatnagar A. (1996) Effect of varying doses of organic and inorganic fertilizers on plankton production and fish biomass in brackish water fish ponds. *Aquaculture Research*, 27: 157-166.
- Gatlin D.M., Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl Å., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., J Souza E., Stone D., Wilson R., Wurtele E. (2007) Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds: a review. *Aquaculture Research*, 38: 551-579.
- Genten F., Terwinghe E., Danguy A. (2009) Atlas of fish histology. Science Publishers, Enfield.
- Geri G., Poli B.M., Gualtieri M., Lupi P., Parisi G. (1995) Body traits and chemical composition of muscle in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) as influenced by age and rearing environment. *Aquaculture*, 129: 329-333.
- Gernhöfer M., Pawert M., Schramm M., Müller E., Triebkorn R. (2001) Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 8: 241-260.
- Geven E.J.W., Nguyen N.-K., van den Boogaart M., Spanings F.A.T., Flik G., Klaren P.H.M. (2007) Comparative thyroidology: thyroid gland location and iodothyronine dynamics in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters) and common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Experimental Biology*, 210: 4005-4015.

- Geven E.J.W. (2009): Thyroid physiology in fish, Radboud University Nijmegen. Ph.D. thesis, pp 208.
- Gisbert E., Doroshov S.I. (2003) Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). *Aquatic Living Resources*, 16: 77-89.
- Glover C.N., Petri D., Tollefsen K.-E., Jørum N., Handy R.D., Berntssen M.H.G. (2007) Assessing the sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan exposure using tissue biochemistry and histology. *Aquatic Toxicology*, 84: 346-355.
- Gomes L.C., Roubach R., Araujo-Lima C.A.R.M., Chippari-Gomes A.R., Lopes N.P., Urbinati E.C. (2003) Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 34: 76-84.
- Goolish E.M., Adelman I.R. (1984) Effects of ration size and temperature on the growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*, 36: 27-35.
- Greco A.M., Gilmour K.M., Fenwick J.C., Perry S.F. (1995) The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Experimental Biology*, 198: 2557-2567.
- Green B.S., McCornick M.I. (1999) Influence of larval feeding history on the body condition of *Amphiprion melanopus*. *Journal of Fish Biology*, 55: 1273-1289.
- Greenfield B.K., Teh S.J., Ross J.R.M., Hunt J., Zhang G.H., Davis J.A., Ichikawa G., Crane D., Hung S.S.O., Deng D.F., Teh F.-C., Green P.G. (2008) Contaminant concentrations and histopathological effects in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55: 270-281.
- Griffitt R.J., Hyndman K., Denslow N.D., Barber D.S. (2009) Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. *Toxicological Sciences*, 107: 404-415.
- Grisdale-Helland B., Helland S., Baevefjord G., Berge G. (2002) Full-fat soybean meal in diets for Atlantic halibut: growth, metabolism and intestinal histology. *Aquaculture Nutrition*, 8: 265-270.
- Grizzle J.M., Rogers W.A. (1976) Anatomy and histology of the channel catfish. Auburn University: Agricultural Experiment Station, Auburn.
- Gross A., Boyd C.E., Wood C.W. (2000) Nitrogen transformations and balance in channel catfish ponds. *Aquacultural Engineering*, 24: 1-14.
- Grund S., Keiter S., Bottcher M., Seitz N., Wurm K., Manz W., Hollert H., T B. (2010) Assessment of fish health status in the Upper Danube River by investigation of ultrastructural alterations in the liver of barbel *Barbus barbus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 88: 235-248.
- Hammerman M.R. (2000) Recapitulation of phylogeny by ontogeny in nephrology. *Kidney International*, 57: 742-755.
- Handy R.D., Runnalls T., Russell P.M. (2002) Histopathologic biomarkers in three spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*, from several rivers in Southern England that meet the freshwater fisheries directive. *Ecotoxicology*, 11: 467-479.
- Hardy R.W. (2010) Utilization of plant proteins in fish diets: effects of global demand and supplies of fishmeal. *Aquaculture Research*, 41: 770-776.
- Harper C., Wolf J.C. (2009) Morphologic effects of the stress response in fish. *ILAR Journal*, 50: 387-396.
- Hartvich P., Flajšhans M., Nýdl V., Vondra T., Pavlíček T. (2003) Growth testing of two breeds of common carp, *Cyprinus carpio* L. (Hungarian mirror and Třeboň scaly carp), in ponds with low and high stocking density. *Aquaculture Research*, 34: 1015-1021.
- Has-Schön E., Bogut I., Strelec I. (2006) Heavy metal profile in five fish species included in human diet, domiciled in the end flow of River Neretva (Croatia). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50: 545-551.
- Hayashi M. (2004) Temperature-electrical conductivity relation of water for environmental monitoring and geophysical data inversion. *Environmental Monitoring and Assessment*, 96: 119-128.
- He S., Mayden R.L., Wang X., Wang W., Tang K.L., Chen W.-J., Chen Y. (2008) Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal protein-coding gene: Further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 818-829.

- Henderson R.J. (1996) Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archiv für Tierernaehrung*, 49: 5-22.
- Heydarnejad M.S. (1999) Histopathological changes in juvenile carp *Cyprinus carpio* (L.) continuously exposed to alkaline levels of pH, from hatching. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36: 245-249.
- Hidalgo M.C., Urea E., Sanz A. (1999) Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture*, 170: 267-283.
- Hilton J.W., Cho C.Y., Slinger S.J. (1981) Effect of extrusion processing and steam pelleting diets on pellet durability, pellet water absorption, and the physiological response of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Aquaculture*, 25: 185-194.
- Hilton J.W., Slinger S.J. (1983) Effect of wheat bran replacement of wheat middlings in extrusion processed (floating) diets on the growth of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 35: 201-210.
- Hinojosa-Garro D., Zambrano L. (2004) Interactions of common carp (*Cyprinus carpio*) with benthic crayfish decapods in shallow ponds. *Hydrobiologia*, 515: 115-122.
- Hinton D.E., Pool C.R. (1976) Ultrastructure of the liver in channel catfish *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Fish Biology*, 8: 209-219.
- Hinton D.E., Lantz R.C., Hampton J.A., McCuskey P.R., McCuskey R.S. (1987) Normal versus abnormal structure: considerations in morphologic responses of teleosts to pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 71: 139-146.
- Hinton D.E., Lauren D.J. (1990) Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes. U: Adams R., Lloyd R., Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 51-66.
- Hinton D.E., Couch J.A. (1998) Architectural pattern, tissue and cellular morphology in livers of fishes: Relationship to experimentally-induced neoplastic responses. U: Braunbeck T., Hinton D.E., Streit B., Fish Ecotoxicology. Birkhäuser, Basel, 141-164.
- Hinton D.E., Segner H., Braunbeck T. (2001) Toxic responses of the liver. U: Schlenk D., Benson W.H., Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Taylor & Francis, London, 248-298.
- Hodson P.V., Hilton J.W. (1983) The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Ecological Bulletins*, 35: 335-340.
- Holmes S. (1996) South African water quality guidelines. Department of Water Affairs and Forestry, Pretoria.
- Holmstrup M., Bindesbøl A.-M., Oostingh G.J., Duschl A., Scheil V., Köhler H.-R., Loureiro S., Soares A.M.V.M., Ferreira A.L.G., Kienle C., Gerhardt A., Laskowski R., Kramarz P.E., Bayley M., Svendsen C., Spurgeon D.J. (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Science of the Total Environment*, 408: 3746-3762.
- Hong L., Fujita T., Wada T., Amano H., Hiramatsu N., Zhang X., Todo T., Hara A. (2009) Choriogenin and vitellogenin in red lip mullet (*Chelon haematocheilus*): purification, characterization, and evaluation as potential biomarkers for detecting estrogenic activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 149: 9-17.
- Horváth L., Tamás G., Seagreave C. (2002) Carp and pond fish culture. Blackwell Science, Oxford, England.
- Howe G.E., Marking L.L., Bills T.D., Rach J.J., Mayer F.L. (1994) Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 51-66.
- Hu K., Huang Y., Li H., Li B., Chen D., White R.E. (2005) Spatial variability of shallow groundwater level, electrical conductivity and nitrate concentration, and risk assessment of nitrate contamination in North China Plain. *Environment International*, 31: 896-903.
- Hughes G.M., Perry S.F. (1976) Morphometric study of trout gills: a light-microscopic method suitable for the evaluation of pollutant action. *Journal of Experimental Biology*, 64: 447-460.
- Hugla J.L., Thomé J.P. (1999) Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monoxygenases, and reproductive success in the barbel. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42: 265-273.
- Humason G.L. (1979) Animal tissue techniques. W. H. Freeman, San Francisco.

- Ibarz A., Blasco J., Gallardo M.A., Fernández-Borràs J. (2010) Energy reserves and metabolic status affect the acclimation of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) to cold. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 155: 319-326.
- Ichinose K., Tochihara M., Wada T., Suguiura N., Yusa Y. (2002) Influence of common carp on apple snail in a rice field evaluated by a predator - prey logistic model. *International Journal of Pest Management*, 48: 133-138.
- Iger Y., Abraham M. (1997) Rodlet cells in the epidermis of fish exposed to stressors. *Tissue and Cell*, 29: 431-438.
- Iqbal F., Qureshi I.Z., Ali M. (2004) Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio*, following nitrate exposure. *Journal of Research*, 15: 411-418.
- IUCN (2008) IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.redlist.org/>.
- Iversen M., Finstad B., Nilssen K.J. (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, 168: 387-394.
- Jeremić S., Ćirković M., Jakić-Dimić D., Radosavljević V. (2005) Bolesti riba na šaranskim ribnjacima i realno sprovođenje mera zdravstvene zaštite. *Veterinarski Glasnik*, 59: 59-69.
- Jiraungkoorskul W., Upatham E.S., Kruatrachue M., Sahaphong S., Vichasri-Grams S., Pokethitiyook P. (2003) Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environmental Toxicology*, 18: 260-267.
- Jobling M. (2003) The thermal growth coefficient (TGC) model of fish growth: a cautionary note. *Aquaculture Research*, 34: 581-584.
- Johnston I.A. (1975) Anaerobic metabolism in the carp (*Carassius carassius* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 51: 235-241.
- Johnstone I.A., Bernard L.M. (1983) Utilization of the ethanol pathway in carp following exposure to anoxia. *Journal of Experimental Biology*, 104: 73-78.
- Junqueira L.C., Carneiro J. (2001) *Osnovi histologije*. Data Status, Beograd.
- Kalezić M. (2001) *Osnovi morfologije kičmenjaka*. Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
- Kamaszewski M., Napora-Rutkowski Ł., Ostaszewska T. (2010) Effect of feeding on digestive enzyme activity and morphological changes in the liver and pancreas of pike-perch (*Sander lucioperca*). *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 62: 225-236.
- Karan V., Vitorović S., Tutundžić V., Poleksić V. (1998) Functional enzymes activity and gill histology of carp after copper sulfate exposure and recovery. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 40: 49-55.
- Katikou P., Hughes S.I., Robb D.H.F. (2001) Lipid distribution within Atlantic salmon (*Salmo salar*) filets. *Aquaculture*, 202: 89-99.
- Kaushik S.J. (1995) Nutrient requirements, supply and utilization in the context of carp culture. *Aquaculture*, 129: 225-241.
- Kaushik S.J. (1998) Nutritional bioenergetics and estimation of waste production in non-salmonids. *Aquatic Living Resources*, 11: 211-217.
- Kelley D.S. (2001) Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. *Nutrition*, 17: 669-673.
- Kestemont P. (1995) Different systems of carp production and their impacts on the environment. *Aquaculture*, 129: 347-372.
- Khan R.A. (1999) Length-mass relationship, histopathology, and parasitism in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living near a PCB-contaminated naval facility in Newfoundland. *Canadian Journal of Zoology*, 77: 381-388.
- Kheyyali D., Shimeno S., Takeda M. (1989) Effect of dietary carbohydrate and lipid levels on hepatopancreatic enzymes and body composition in carp. *Proceedings of third international symposium on feeding and nutrition in fish*, Toba, Japan, 28 August-1 September 1989.
- Kirpitchenkov V.S. (1999) *Genetics and breeding of common carp*. INRA Editions, Paris.
- Kleinow K.M., Melancon M.J., Lech J.J. (1987) Biotransformation and induction: implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. *Environmental Health Perspectives*, 71: 105-119.
- Kminkova M., Winterova R., Kucera J. (2001) Fatty acids in lipids of carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *Czech Journal of Food Sciences*, 19: 177-181.

- Kocour M., Linhart O., Gela D. (2003) Results of comparative growing test of all-female and bisexual population in two-year-old common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture International*, 11: 369-378.
- Kohlmann K., Gross R., Murakaeva A., Kersten P. (2003) Genetic variability and structure of common carp (*Cyprinus carpio*) populations throughout the distribution range inferred from allozyme, microsatellite and mitochondrial DNA markers. *Aquatic Living Resources*, 16: 421-431.
- Kohlmann K., Kersten P., Flajšhans M. (2005) Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (*Cyprinus carpio* L.) populations. *Aquaculture*, 247: 253-266.
- Kolkovski S. (2001) Digestive enzymes in fish larvae and juveniles—implications and applications to formulated diets. *Aquaculture*, 200: 181-201.
- Koponen K., Myers M.S., Ritola O., Huuskonen S.E., Lindström-Seppä P. (2001) Histopathology of feral fish from a PCB-contaminated freshwater lake. *Ambio*, 30: 122-126.
- Kortan J., Adámek Z. (2011) Behavioural response of carp (*Cyprinus carpio*, L.) pond stock upon occurrence of hunting great cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis*) flocks. *Aquaculture International*, 19: 121-129.
- Kortan J., Blahova J., Kruzikova K., Adamek Z. (2011) Stress responses of carp pond fish stock upon hunting activities of the great cormorant (*Phalacrocorax carbo sinensis* L.). *Aquaculture Research*, 42: 322-330.
- Korwin-Kossakowski M. (1992) Growth and survival of carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae in alkaline water. *Journal of Fish Biology*, 40: 981-982.
- Korwin-Kossakowski M. (2008) The influence of temperature during the embryonic period on larval growth and development in carp, *Cyprinus Carpio* L., and Grass Carp, *Ctenopharyngodon Idella* (Val.): theoretical and practical aspects. *Archives of Polish Fisheries*, 16: 231-314.
- Kramer C.R., Potter H. (2002) Ultrastructural observations on rodlet-cell development in the head kidney of the southern platyfish, *Xiphophorus maculatus* (Teleostei: Poeciliidae). *Canadian Journal of Zoology*, 80: 1422-1436.
- Krause W.J. (2000) Brunner's glands: A structural, histochemical and pathological profile. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 35: 255-367.
- Kris-Etherton P.M., Harris W.S., Appel L.J. (2002) Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, 106: 2747-2757.
- Krogdahl Å., Nordrum S., Sørensen M., Brudeseth L., Røsjø C. (1999) Effects of diet composition on apparent nutrient absorption along the intestinal tract and of subsequent fasting on mucosal disaccharidase activities and plasma nutrient concentration in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Aquaculture Nutrition*, 5: 121-133.
- Krogdahl Å., Bakke-McKellep A., Baeverfjord G. (2003) Effects of graded levels of standard soybean meal on intestinal structure, mucosal enzyme activities, and pancreatic response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 9: 361-371.
- Krøvel A.V., Søfteland L., Torstensen B.E., Olsvik P.A. (2010) Endosulfan in vitro toxicity in Atlantic salmon hepatocytes obtained from fish fed either fish oil or vegetable oil. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 151: 175-186.
- Kruatrachue M., Rangsayatorn N., Pokethitiyook P., Upatham E.S., Singhakaew S. (2003) Histopathological changes in the gastrointestinal tract of fish, *Puntius gonionotus*, fed on dietary cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 71: 0561-0569.
- Kuz'mina V., Glatman L., Drabkin V., Gelman A. (2003) Amylolytic activity in fish intestinal mucosa: temperature effects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 134: 529-534.
- Lagler K.F., Bardach J.E., Miller R.R. (1977) *Ichthyology*. John Wiley & Sons, New York.
- Lamarck J.B. (1809) *Philosophie zoologique*. Dentu et L'Auteur, Paris.
- Laurent P. (1984) Gill internal morphology. U: Hoar W.S., Randall D.J., Fish physiology. Academic Press, New York, 285-323.
- Laurent P., Perry S.F. (1991) Environmental effects on fish gill morphology. *Physiological Zoology*, 64: 4-25.

- Lázaro R., Herrera A., Ariño A., Conchello M.P., Bayarri S. (1996) Organochlorine pesticide residues in total diet samples from Aragón (Northeastern Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2742-2747.
- Lease H.M., Hansen J.A., Bergman H.L., Meyer J.S. (2003) Structural changes in gills of Lost River suckers exposed to elevated pH and ammonia concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 134: 491-500.
- Leatherland, Down (2001) Tumours and related lesions of the endocrine system of bony and cartilaginous fishes. *Fish and Fisheries*, 2: 59-77.
- Lee J.-W., Kim J.-W., De Riu N., Moniello G., Hung S.S.O. (2012) Histopathological alterations of juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) exposed to graded levels of dietary methylmercury. *Aquatic Toxicology*, 109: 90-99.
- Leino R.L. (2001) Phylogenetic differences in tissue distribution of rodlet cells. First International Rodlet Cell Workshop, Ferrara, Italy, 14-16 June 2001.
- Li D.F., Nelssen J.L., Reddy P.G., Blecha F., Klemm R., Goodband R.D. (1991) Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 69: 4062-4069.
- Liney K.E., Hagger J.A., Tyler C.R., Depledge M.H., Galloway T.S., Jobling S. (2006) Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives*, 114: 81-89.
- Loh T.C., Thanh N.T., Foo H.L., Hair-Bejo M., Azhar B.K. (2010) Feeding of different levels of metabolite combinations produced by *Lactobacillus plantarum* on growth performance, fecal microflora, volatile fatty acids and villi height in broilers. *Animal Science Journal*, 81: 205-214.
- Lorenzen K. (1996) A simple von Bertalanffy model for density-dependent growth in extensive aquaculture, with an application to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 142: 191-205.
- Lougheed V.L., Crosbie B., Chow-Fraser P. (1998) Predictions on the effect of common carp (*Cyprinus carpio*) exclusion on water quality, zooplankton, and submergent macrophytes in a Great Lakes wetland. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55: 1189-1197.
- Lovell R.T. (1991) Nutrition of aquaculture species. *Journal of Animal Science*, 69: 4193-4200.
- Lukin A., Sharova J., Belicheva L., Camus L. (2011) Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74: 355-365.
- Luquet P., Bergot F., Hannequart G., Guichaux A. (1976) Évaluation de divers traitements technologiques des céréales VII. — Utilisation de maïs pressé, floconné, expansé et extrudé dans l'alimentation de la truite arc-en-ciel. *Annales de Zootechnie*, 25: 63-69.
- Madureira T.V., Rocha M.J., Cruzeiro C., Rodrigues I., Monteiro R.A.F., Rocha E. (2012) The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 34-45.
- Magnadóttir B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 137-151.
- Maina J.N. (2002) Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. *Journal of Anatomy*, 201: 281-304.
- Makol A., Torrecillas S., Fernández-Vaquero A., Robaina L., Montero D., Caballero M.J., Tort L., Izquierdo M. (2009) Effect of conjugated linoleic acid on dietary lipids utilization, liver morphology and selected immune parameters in sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 154: 179-187.
- Mallatt J. (1985) Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42: 630-648.
- Mallekh R., Lagardère J.P. (2002) Effect of temperature and dissolved oxygen concentration on the metabolic rate of the turbot and the relationship between metabolic scope and feeding demand. *Journal of Fish Biology*, 60: 1105-1115.
- Mancera J.M., McCormick S.D. (1998) Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 121: 43-48.

- Mandrioli L., Sirri R., Gatta P.P., Morandi F., Sarli G., Parma L., Fontanillas R., Bonaldo A. (2012) Histomorphologic hepatic features and growth performances of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*) fed isogenetic practical diets with variable protein/lipid levels. *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 628-632.
- Manera M., Simoni E., Dezfuli B.S. (2001) The effect of dexamethasone on the occurrence and ultrastructure of rodlet cells in goldfish. *Journal of Fish Biology*, 59: 1239-1248.
- Manera M., Visciano P., Losito P., Ianieri A. (2003) Farmed fish pathology: quality aspects. *Veterinary Research Communications*, 27: 695-698.
- Manera M., Dezfuli B.S. (2004) Rodlet cells in teleosts: a new insight into their nature and functions. *Journal of Fish Biology*, 65: 597-619.
- Marchand M.J., van Dyk J.C., Pieterse G.M., Barnhoorn I.E.J., Bornman M.S. (2009) Histopathological alterations in the liver of the sharp-toothed catfish *Clarias gariepinus* from polluted aquatic systems in South Africa. *Environmental Toxicology*, 24: 133-147.
- Marigómez I., Soto M., Cancio I., Orbea A., Garmendia L., Cajarville M.P. (2006) Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill (Monitoring Campaign 2003). *Marine Pollution Bulletin*, 53: 287-304.
- Marković Z., Mitrović-Tutundžić V. (2003) Gajenje riba. Zadužbina Andrejević, Beograd.
- Marković Z. (2010) Šaran: gajenje u ribnjacima i kaveznim sistemima. Prof. dr Zoran Marković, Beograd.
- Marković Z., Stanković M., Dulić Z., Rašković B., Spasić M., Poleksić V. (2010) Upgrading Serbian carp aquaculture. *Aquaculture 2010, global conference: farming the waters for people and food*, Phuket, Thailand, 22-25 September 2010.
- Marković Z., Poleksić V., Lakić N., Živić I., Dulić Z., Stanković M., Spasić M., Rašković B., Sørensen M. (2012) Evaluation of growth and histology of liver and intestine in juvenile carp (*Cyprinus carpio*, L.) fed extruded diets with or without fish meal. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 12: 301-308.
- Marshall W.S. (2002) Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 264-283.
- Martinez C.B.R., Nagae M.Y., Zaia C.T.B.V., Zaia D.A.M. (2004) Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Brazilian Journal of Biology*, 64: 797-807.
- Mazon A.F., Cerqueira C.C.C., Fernandes M.N. (2002) Gill cellular changes induced by copper exposure in the South American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environmental Research*, 88: 52-63.
- Mazurkiewicz J. (2009) Utilization of domestic plant components in diets for common carp *Cyprinus carpio* L. *Archives of Polish Fisheries*, 17: 5-39.
- Mazurkiewicz J., Przybył A., Czyżak-Runowska G., Łyczyński A. (2011) Cold-pressed rapeseed cake as a component of the diet of common carp (*Cyprinus carpio* L.): effects on growth, nutrient utilization, body composition and meat quality. *Aquaculture Nutrition*, 17: 387-394.
- McCarthy D. (1975) Fish furunculosis caused by *Aeromonas salmonicida* var. *achromogenes*. *Journal of Wildlife Diseases*, 11: 489-493.
- McFadzen I.R.B., Coombs S.H., Halliday N.C. (1997) Histological indices of the nutritional condition of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum) larvae off the north coast of Spain. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 212: 239-258.
- McHugh K.J., Smit N.J., Van Vuren J.H.J., Van Dyk J.C., Bervoets L., Covaci A., Wepener V. (2011) A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus* from a DDT-affected area. *Physics and Chemistry of the Earth*, 36: 895-904.
- McLean E., Rønsholdt B., Sten C., Najamuddin (1999) Gastrointestinal delivery of peptide and protein drugs to aquacultured teleosts. *Aquaculture*, 177: 231-247.
- Meinelt T., Krüger R., Pietrock M., Osten R., Steinberg C. (1997) Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues. *Environmental Science and Pollution Research*, 4: 32-36.
- Menke A.L., Spitsbergen J.M., Wolterbeek A.P.M., Woutersen R.A. (2011) Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology*, 39: 759-775.
- Merrifield D.L., Harper G.M., Mustafa S., Carnevali O., Picchiatti S., Davies S.J. (2011) Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research*, 344: 135-146.

- Miller S.A., Crowl T.A. (2006) Effects of common carp (*Cyprinus carpio*) on macrophytes and invertebrate communities in a shallow lake. *Freshwater Biology*, 51: 85-94.
- Milstein A., Svirsky F. (1996) Effect of fish species combinations on water chemistry and plankton composition in earthen fish ponds. *Aquaculture Research*, 27: 79-90.
- Miron D.S., Moraes B., Becker A.G., Crestani M., Spanevello R., Loro V.L., Baldisserotto B. (2008) Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture*, 277: 192-196.
- Mishra A.K., Mohanty B. (2008) Acute toxicity impacts of hexavalent chromium on behavior and histopathology of gill, kidney and liver of the freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 26: 136-141.
- Mondon J.A., Duda S., Nowak B.F. (2001) Histological, growth and 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity responses of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* to contaminated marine sediment and diet. *Aquatic Toxicology*, 54: 231-247.
- Monteiro S.M., Rocha E., Mancera J.M., Fontaínhas-Fernandes A., Sousa M. (2009) A stereological study of copper toxicity in gills of *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 213-223.
- Moron S.E., Fernandes M.N. (1996) Pavement cell ultrastructural differences on *Hoplias malabaricus*, gill epithelia. *Journal of Fish Biology*, 49: 357-362.
- Moss B. (1973) The influence of environmental factors on the distribution of freshwater algae: an experimental study: II. The role of pH and the carbon dioxide-bicarbonate system. *Journal of Ecology*, 61: 157-177.
- Mráz J., Pickova J. (2009) Differences between lipid content and composition of different parts of fillets from crossbred farmed carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 615-623.
- Mráz J., Schlechtriem C., Olohan L.A., Fang Y., Cossins A.R., Zlabek V., Samuelsen T., Pickova J. (2010) Sesamin as a potential modulator of fatty acid composition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture Research*, 41: 851-861.
- Mráz J., Máchová J., Kozák P., Pickova J. (2012) Lipid content and composition in common carp - optimization of n-3 fatty acids in different pond production systems. *Journal of Applied Ichthyology*, 28: 238-244.
- Nachi A.M., Hernandez-Blazquez F.J., Barbieri R.L., Leite R.G., Ferri S., Phan M.T. (1998) Intestinal histology of a detritivorous (iliophagous) fish *Prochilodus scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae). *Annales des Sciences Naturelles - Zoologie et Biologie Animale*, 19: 81-88.
- Naylor R.L., Goldberg R.J., Primavera J.H., Kautsky N., Beveridge M.C.M., Clay J., Folke C., Lubchenco J., Mooney H., Troell M. (2000) Effect of aquaculture on world fish supplies. *Nature*, 405: 1017-1024.
- Nero V., Farwell A., Lee L.E.J., Van Meer T., MacKinnon M.D., Dixon D.G. (2006) The effects of salinity on naphthenic acid toxicity to yellow perch: Gill and liver histopathology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65: 252-264.
- Nettleton J.A., Katz R. (2005) n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: A review. *Journal of the American Dietetic Association*, 105: 428-440.
- Nilsson G.E. (1990) Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in chromaffin tissue, and liver glycogen. *Journal of Experimental Biology*, 150: 295-320.
- Nilsson G.E. (2007) Gill remodeling in fish - a new fashion or an ancient secret? *Journal of Experimental Biology*, 210: 2403-2409.
- Nogales Mérida S., Tomás-Vidal A., Martínez-Llorens S., Jover Cerdá M. (2010) Sunflower meal as a partial substitute in juvenile sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) diets: Amino acid retention, gut and liver histology. *Aquaculture*, 298: 275-281.
- Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M., Overvad K., Olsen A., Tjønneland A., Clavel F., Boutron-Ruault M.-C., Kesse E., Boeing H., Bergmann M.M., Nieters A., Linseisen J., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Tountas Y., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Engeset D., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., González C., Navarro C., Quirós J.R., Sanchez M.-J., Berglund G., Mattisson I., Hallmans G., Palmqvist R., Day N.E., Khaw K.-T., Key T.J., San Joaquin M., Hémon B., Saracci R., Kaaks R., Riboli E. (2005) Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European prospective

- investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97: 906-916.
- Nordrum S., Krogdahl Å., Røsjø C., Olli J.J., Holm H. (2000) Effects of methionine, cysteine and medium chain triglycerides on nutrient digestibility, absorption of amino acids along the intestinal tract and nutrient retention in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) under pair-feeding regime. *Aquaculture*, 186: 341-360.
- Noreña-Barroso E., Simá-Álvarez R., Gold-Bouchot G., Zapata-Pérez O. (2004) Persistent organic pollutants and histological lesions in Mayan catfish *Ariopsis assimilis* from the Bay of Chetumal, Mexico. *Marine Pollution Bulletin*, 48: 263-269.
- NRC (1993) Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes. National Academy Press, Washington.
- O'Connell C.P. (1976) Histological criteria for diagnosing the starving condition in early post yolk sac larvae of the northern anchovy, *Engraulis mordax* Girard. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 25: 285-312.
- Ogino C., Takeda H. (1976) Mineral requirements in fish-III Calcium and phosphorus requirements in carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 42: 793-799.
- Olsen R.E., Myklebust R., Kaino T., Ringø E. (1999) Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. *Fish Physiology and Biochemistry*, 21: 35-44.
- Olsen R.E., Myklebust R., Ringø E., Mayhew T.M. (2000) The influences of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22: 207-216.
- Olson K.R. (2002) Vascular anatomy of the fish gill. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 214-231.
- Opačak A., Florijančić T., Horvat D., Ozimec S., Bodakoš D. (2004) Diet spectrum of great cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis* L.) at the Donji Miholjac carp fishponds in eastern Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, 50: 173-178.
- Opuszyński K., Lirski A., Myszkowski L., Wolnicki J. (1989) Upper lethal and rearing temperatures for juvenile common carp, *Cyprinus carpio* L., and silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* (Valenciennes). *Aquaculture Research*, 20: 287-294.
- Ortiz J.B., de Canales M.L.G., Sarasquete C. (2003) Histopathological changes induced by lindane (γ -HCH) in various organs of fishes. *Scientia Marina*, 67: 53-61.
- Ostaszewska T., Korwin-Kossakowski M., Czarnogórski M., Resiak G. (1999) Histopathological changes in juvenile carp *Cyprinus carpio* (L.) continuously exposed to alkaline levels of pH, from hatching. *Archives of Polish Fisheries*, 7: 329-342.
- Ostaszewska T., Sawosz E. (2004) Influence of dietary fatty acids and fat level on morphological changes in the liver of nase (*Chondrostoma nasus* L.). *Journal of Animal and Feed Sciences*, 13: 63-66.
- Ostaszewska T., Boruta A., Olejniczak M. (2005a) The effect of dietary lipid level and composition on growth, survival, and development of the digestive system of larval sneep, *Chondrostoma nasus* (L.). *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 35: 79-86.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Palacios M.E., Olejniczak M., Wieczorek M. (2005b) Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture*, 245: 273-286.
- Ostaszewska T., Korwin-Kossakowski M., Wolnicki J. (2006) Morphological changes of digestive structures in starved tench *Tinca tinca* (L.) juveniles. *Aquaculture International*, 14: 113-126.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Hliwa P., Gomółka P., Kwasek K. (2008) Nutritional regulation of intestine morphology in larval cyprinid fish, silver bream (*Vimba vimba*). *Aquaculture Research*, 39: 1268-1278.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Kamaszewski M., Grochowski P., Verri T., Rzepkowska M., Wolnicki J. (2010) The effect of plant protein-based diet supplemented with dipeptide or free amino acids on digestive tract morphology and PepT1 and PepT2 expressions in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 157: 158-169.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Kwasek K., Verri T., Kamaszewski M., Sliwinski J., Napora-Rutkowski L. (2011) Effects of various diet formulations (experimental and commercial) on the

- morphology of the liver and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles. *Aquaculture Research*, 42: 1796-1806.
- Ostaszewska T., Dabrowski K., Kamaszewski M., Kwasek K., Grodzik M., Bierla J. (2013) The effect of dipeptide, Lys-Gly, supplemented diets on digestive tract histology in juvenile yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture Nutrition*, 19: 100-109.
- Ostrand K.G., Wilde G.R. (2001) Temperature, dissolved oxygen, and salinity tolerances of five prairie stream fishes and their role in explaining fish assemblage patterns. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130: 742-749.
- Oyugi D.O., Cucherousset J., Baker D.J., Britton J.R. (2012) Effects of temperature on the foraging and growth rate of juvenile common carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Thermal Biology*, 37: 89-94.
- Perelberg A., Smirnov M., Hutoran M., Diamant A., Bejerano Y., Kotler M. (2003) Epidemiological description of a new viral disease afflicting cultured *Cyprinus carpio* in Israel. *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh*, 55: 5-12.
- Peres H., Oliva-Teles A. (1999) Influence of temperature on protein utilization in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, 170: 337-348.
- Perry S.F. (1997) The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annual Review of Physiology*, 59: 325-347.
- Perry S.F. (1998) Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119: 9-16.
- Picchietti S., Mazzini M., Taddei A.R., Renna R., Fausto A.M., Mulero V., Carnevali O., Cresci A., Abelli L. (2007) Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: Immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish & Shellfish Immunology*, 22: 57-67.
- Pinto L., Chandrasena N., Pera J., Hawkins P., Eccles D., Sim R. (2005) Managing invasive carp (*Cyprinus carpio* L.) for habitat enhancement at Botany Wetlands, Australia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 15: 447-462.
- Piper R.G., McElwain I.B., Orme L.E., McCraren J.P., Fowler L.G., Leonard J.R. (1986) Fish hatchery management. United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington.
- Polak-Juszczak L. (2012) Bioaccumulation of mercury in the trophic chain of flatfish from the Baltic Sea. *Chemosphere*, 89: 585-591.
- Poleksić V. (1991) Promene na škrgamma riba kao posledica zagađenja vode. *Journal of Agricultural Sciences*, 36: 27-52.
- Poleksić V., Mitrović-Tutundžić V. (1994) Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of pollution. U: Muller R., Lloyd R., Sublethal and chronic toxic effects of pollutants on freshwater fish. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, 339-352.
- Poleksić V., Vlahović M., Mitrović-Tutundžić V., Marković Z. (1999) Effects of environmental conditions on gill morphology of carp from the 'Dubica' farm during the 1998 rearing season. *Acta Biologica Iugoslavica - serija E: Ichthyologia*, 31: 43-52.
- Poleksić V., Dulić-Stojanović Z., Marković Z. (2002) Gill structure of carp fingerlings from Baranda fish farm. *Acta Biologica Iugoslavica - serija E: Ichthyologia*, 34: 11-22.
- Poleksić V., Bogojević J., Marković Z., Dulić-Stojanović Z. (2003) Zoologija za studente Odseka za Stočarstvo Poljoprivrednog fakulteta. Poljoprivredni fakultet, Beograd.
- Poleksić V., Lenhardt M., Jarić I., Djordjević D., Gačić Z., Cvijanović G., Rašković B. (2010) Liver, gills, and skin histopathology and heavy metal content of the Danube sterlet (*Acipenser Ruthenus* Linnaeus, 1758). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29: 515-521.
- Pollock M.S., Clarke L.M.J., Dubé M.G. (2007) The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environmental Reviews*, 15: 1-14.
- Power D., Melo J., Santos C.R.A. (2000) The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. *Journal of Fish Biology*, 56: 374-387.
- Prieto A.I., Jos Á., Pichardo S., Moreno I., Cameán A.M. (2006) Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). *Aquatic Toxicology*, 77: 314-321.
- Przybył A., Mazurkiewicz J. (2004) Nutritive value of cereals in feeds for common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Czech Journal of Animal Science*, 49: 307-314.

- Rahman M., Kadowaki S., Balcombe S., Wahab M. (2010) Common carp (*Cyprinus carpio* L.) alters its feeding niche in response to changing food resources: direct observations in simulated ponds. *Ecological Research*, 25: 303-309.
- Rajeshkumar S., Munuswamy N. (2011) Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattuppalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere*, 83: 415-421.
- Randall D.J., Tsui T.K.N. (2002) Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45: 17-23.
- Rani K.V., Sehgal N., Goswami S.V., Prakash O. (2010) Relative potencies of natural estrogens on vitellogenin and choriogenin levels in the Indian freshwater spotted snakehead, *Channa punctata*: in vivo and in vitro studies. *Fish Physiology and Biochemistry*, 36: 587-595.
- Rasband W.S. (2011) ImageJ. Bethesda, Maryland. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- Rašković B., Poleksić V., Živić I., Spasić M. (2010) Histology of carp (*Cyprinus carpio*, L.) gills and pond water quality in semiintensive production. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16: 253-262.
- Refstie S., Helland S.J., Storebakken T. (1997) Adaptation to soybean meal in diets for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 153: 263-272.
- Refstie S., Korsøen Ø.J., Storebakken T., Baeverfjord G., Lein I., Roem A.J. (2000) Differing nutritional responses to dietary soybean meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 190: 49-63.
- Reimschuessel R. (2001) A fish model of renal regeneration and development. *ILAR Journal*, 42: 387-396.
- Reite O.B. (1998) Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: a review focusing on staining properties and functional responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 8: 489-513.
- Reite O.B., Evensen Ø. (2006) Inflammatory cells of teleostean fish: A review focusing on mast cells/eosinophilic granule cells and rodlet cells. *Fish & Shellfish Immunology*, 20: 192-208.
- Richards J.G., Semple J.W., Bystriansky J.S., Schulte P.M. (2003) Na⁺/K⁺-ATPase α -isoform switching in gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during salinity transfer. *Journal of Experimental Biology*, 206: 4475-4486.
- Rios F.S., Kalinin A.L., Fernandes M.N., Rantin F.T. (2004) Changes in gut gross morphology of traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after refeeding. *Brazilian Journal of Biology*, 64: 683-689.
- Rios F.S., Donatti L., Fernandes M.N., Kalinin A.L., Rantin F.T. (2007) Liver histopathology and accumulation of melano-macrophage centres in *Hoplias malabaricus* after long-term food deprivation and re-feeding. *Journal of Fish Biology*, 71: 1393-1406.
- Ritz C.W., Hulet R.M., Self B.B., Denbow D.M. (1995) Growth and intestinal morphology of male turkeys as influenced by dietary supplementation of amylase and xylanase. *Poultry Science*, 74: 1329-1334.
- Roberts R.J. (1989) *Fish pathology*. Baillière Tindall, London.
- Rocha E., Monteiro R.A., Pereira C.A. (1994) The liver of the brown trout, *Salmo trutta fario*: a light and electron microscope study. *Journal of Anatomy*, 185: 241-249.
- Rocha E., Monteiro R.A., Pereira C.A. (1996) The pale-grey interhepatocytic cells of brown trout (*Salmo trutta*) are a subpopulation of liver resident macrophages or do they establish a different cellular type? *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, 28: 357-368.
- Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. (1997) Liver of the brown trout, *Salmo trutta* (Teleostei, Salmonidae): A stereological study at light and electron microscopic levels. *The Anatomical Record*, 247: 317-328.
- Romano N., Picchiatti S., Taverne-Thiele J.J., Taverne N., Abelli L., Mastrolia L., Verburg-van Kemenade B.M.L., Rombout J.H.W.M. (1998) Distribution of macrophages during fish development: an immunohistochemical study in carp (*Cyprinus carpio*, L.). *Anatomy and Embryology*, 198: 31-41.
- Rombout J.H.W.M., Lamers C.H.J., Helfrich M.H., Dekker A., Taverne-Thiele J.J. (1985) Uptake and transport of intact macromolecules in the intestinal epithelium of carp (*Cyprinus carpio* L.) and the possible immunological implications. *Cell and Tissue Research*, 239: 519-530.
- Rombout J.H.W.M., van den Berg A.A. (1989) Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *Journal of Fish Biology*, 35: 13-22.

- Rombout J.H.W.M., Abelli L., Picchiatti S., Scapigliati G., Kiron V. (2011) Teleost intestinal immunology. *Fish & Shellfish Immunology*, 31: 616-626.
- Rousseaux C.G., Branchaud A., Spear P.A. (1995) Evaluation of liver histopathology and erod activity in St. Lawrence lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*) in comparison with a reference population. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14: 843-849.
- Runge G., Steinhart H., Schwarz E.J., Kirchgeßner M. (1987) Influence of different fats with varying additions of α -tocopheryl acetate on the fatty acid composition of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Lipid / Fett*, 89: 389-393.
- Saboia-Moraes S.M.T., Hernandez-Blazquez F.J., Mota D.L., Bittencourt A.M. (1996) Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. *Journal of Fish Biology*, 49: 545-548.
- Salice C.J., Rokous J.S., Kane A.S., Reimschuessel R. (2001) New nephron development in goldfish (*Carassius auratus*) kidneys following repeated gentamicin-Induced nephrotoxicosis. *Comparative Medicine*, 51: 56-59.
- Sami S., Fischer-Scherl T., Hoffmann R.W., Pfeil-Putzien C. (1992) Immune complex-mediated glomerulonephritis associated with bacterial kidney disease in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Pathology*, 29: 169-174.
- Sarà G. (2007) A meta-analysis on the ecological effects of aquaculture on the water column: Dissolved nutrients. *Marine Environmental Research*, 63: 390-408.
- Sargent J., Bell G., McEvoy L., Tocher D., Estevez A. (1999) Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, 177: 191-199.
- Sargent J.R., McEvoy L.A., Bell J.G. (1997) Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*, 155: 117-127.
- Schaack S., Chapman L.J. (2003) Interdemic variation in the African cyprinid *Barbus neumayeri*: correlations among hypoxia, morphology, and feeding performance. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 430-440.
- Schechter A., Cramer P., Boggess K., Stanley J., Olson J.R. (1997) Levels of dioxins, dibenzofurans, PCB and DDE congeners in pooled food samples collected in 1995 at supermarkets across the United States. *Chemosphere*, 34: 1437-1447.
- Schmidt-Posthaus H., Bernet D., Wahli T., Burkhardt-Holm P. (2001) Morphological organ alterations and infectious diseases in brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to polluted river water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 44: 161-170.
- Schmidt H., Bernet D., Wahli T., Meier W., Burkhardt-Holm P. (1999) Active biomonitoring with brown trout and rainbow trout in diluted sewage plant effluents. *Journal of Fish Biology*, 54: 585-596.
- Schroers V., van der Marel M., Neuhaus H., Steinhagen D. (2009) Changes of intestinal mucus glycoproteins after peroral application of *Aeromonas hydrophila* to common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 288: 184-189.
- Schwaiger J., Wanke R., Adam S., Pawert M., Honnen W., Triebkorn R. (1997) The use of histopathological indicators to evaluate contaminant-related stress in fish. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6: 75-86.
- Schwindt A.R., Truelove N., Schreck C.B., Fournie J.W., Landers D.H., Kent M.L. (2006) Quantitative evaluation of macrophage aggregates in brook trout *Salvelinus fontinalis* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 68: 101-113.
- Segner H., Juario J.V. (1986) Histological observations on the rearing of milkfish, *Chanos chanos*, fry using different diets. *Journal of Applied Ichthyology*, 2: 162-172.
- Segner H., Braunbeck T. (1988) Hepatocellular adaptation to extreme nutritional conditions in ide, *Leuciscus idus melanotus* L. (Cyprinidae). A morphofunctional analysis. *Fish Physiology and Biochemistry*, 5: 79-97.
- Segner H., Sundh H., Buchmann K., Douxfils J., Sundell K.S., Mathieu C., Ruane N., Jutfelt F., Toften H., Vaughan L. (2012) Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 85-105.
- Shimeno S., Shikata T., Hosokawa H., Masumoto T., Kheyyali D. (1997) Metabolic response to feeding rates in common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture*, 151: 371-377.

- Shiogiri N.S., Paulino M.G., Carraschi S.P., Baraldi F.G., da Cruz C., Fernandes M.N. (2012) Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 388-396.
- Silphaduang U., Noga E.J. (2001) Antimicrobials: Peptide antibiotics in mast cells of fish. *Nature*, 414: 268-269.
- Silva A.G., Martinez C.B.R. (2007) Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 185-192.
- Simopoulos A.P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54: 438-463.
- Simopoulos A.P. (2002) The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56: 365-379.
- Sire M.-F., Vernier J.-M. (1995) Partial characterization of eosinophilic granule cells (EGCs) and identification of mast cells of the intestinal lamina propria in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biochemical and cytochemical study. Biology of the Cell*, 85: 35-41.
- Skorić S., Rašković B., Poleksić V., Gačić Z., Lenhardt M. (2012) Scoring of the extent and intensity of carp (*Cyprinus carpio*) skin changes made by cormorants (*Phalacrocorax carbo sinensis*): relationship between morphometric and histological indices. *Aquaculture International*, 20: 525-535.
- Smith C.J., Shaw B.J., Handy R.D. (2007) Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology*, 82: 94-109.
- Soldatov A.A. (1996) The effect of hypoxia on red blood cells of flounder: a morphologic and autoradiographic study. *Journal of Fish Biology*, 48: 321-328.
- Sollid J., Nilsson G.E. (2006) Plasticity of respiratory structures — Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, 154: 241-251.
- Sørensen M. (2012) A review of the effects of ingredient composition and processing conditions on the physical qualities of extruded high-energy fish feed as measured by prevailing methods. *Aquaculture Nutrition*, 18: 233-248.
- Souza V.L., Lunardi L.O., Vasques L.H., Casaletti L., Nakaghi L.S.O., Urbinati E.C. (2001) Morphometric alterations in hepatocytes and ultrastructural distribution of liver glycogen in pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) during food restriction and refeeding. *Journal of Morphological Sciences*, 18: 15-20.
- Speare D.J. (2000) Liver diseases of tropical fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 9: 174-178.
- Speilberg L., Evensen Ø., Nafstad P. (1994) Liver of juvenile atlantic salmon, *Salmo salar* L.: A light, transmission, and scanning electron microscopic study, with special reference to the sinusoid. *The Anatomical Record*, 240: 291-307.
- Spencer P., Pollock R., Dubé M. (2008) Effects of un-ionized ammonia on histological, endocrine, and whole organism endpoints in slimy sculpin (*Cottus cognatus*). *Aquatic Toxicology*, 90: 300-309.
- Spisni E., Tugnoli M., Ponticelli A., Mordenti T., Tomasi V. (1998) Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. *Journal of Fish Diseases*, 21: 177-184.
- Steffens W. (1997) Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture*, 151: 97-119.
- Steffens W., Wirth M. (2005) Freshwater fish - an important source of n-3 polyunsaturated fatty acids: a review. *Archives of Polish Fisheries*, 13: 5-16.
- Steffens W., Wirth M. (2007) Influence of nutrition on the lipid quality of pond fish: common carp (*Cyprinus carpio*) and tench (*Tinca tinca*). *Aquaculture International*, 15: 313-319.
- Stensløkken K.-O., Sundin L., Nilsson G.E. (2006) Endothelin receptors in teleost fishes: cardiovascular effects and branchial distribution. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290: 852-860.
- Stone D.A.J. (2003) Dietary carbohydrate utilization by fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 337-369.
- Storch V., Juario J.V. (1983) The effect of starvation and subsequent feeding on the hepatocytes of *Chanos chanos* (Forsskal) fingerlings and fry. *Journal of Fish Biology*, 23: 95-103.

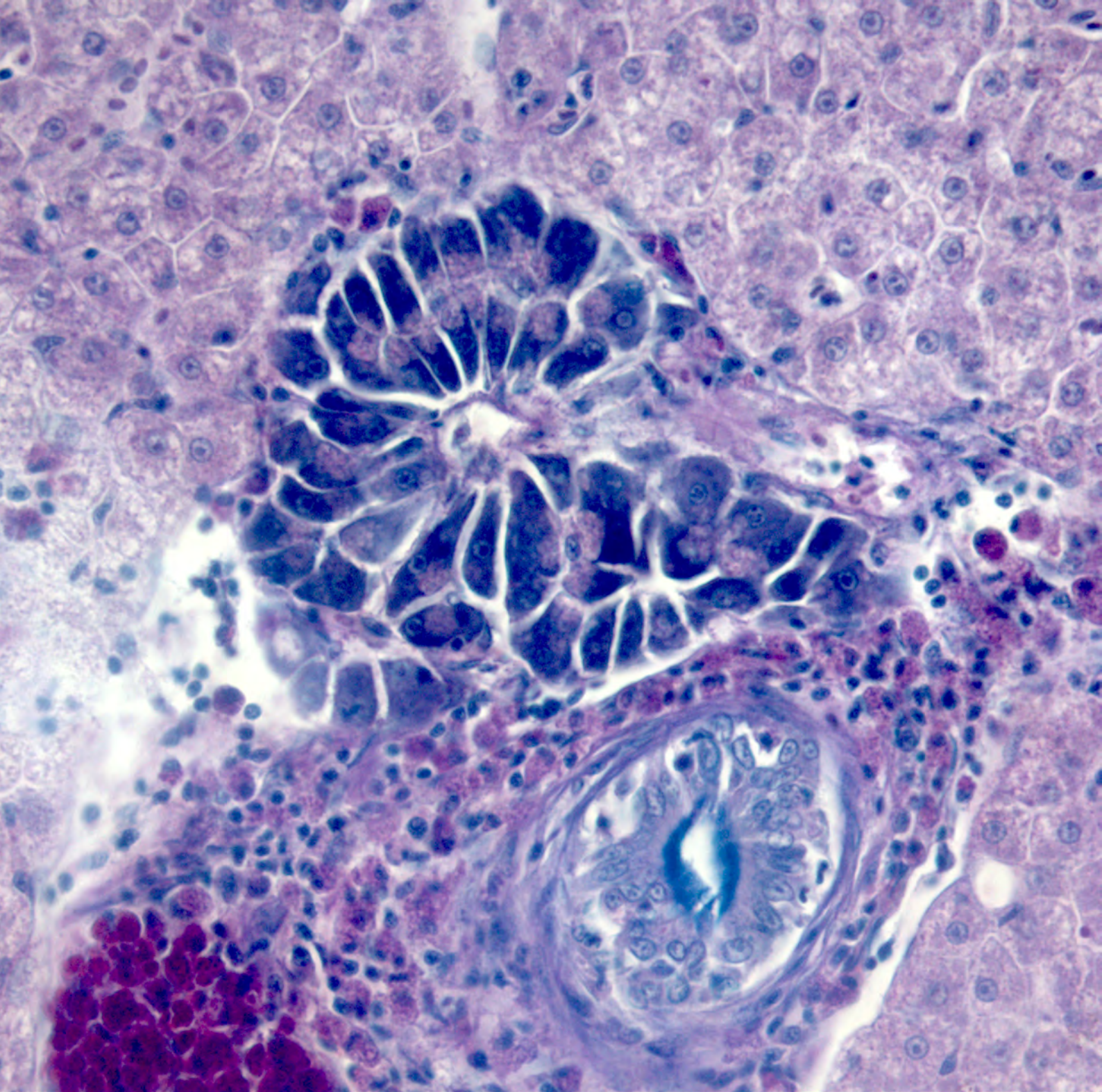
- Storch V., Stählin W., Juario J.V. (1983) Effect of different diets on the ultrastructure of hepatocytes of *Chanos chanos* fry (Chanidae: Teleostei): an electron microscopic and morphometric analysis. *Marine Biology*, 74: 101-104.
- Stroband H.W.J., van der Veen F.H. (1981) Localization of protein absorption during transport of food in the intestine of the grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). *Journal of Experimental Zoology*, 218: 149-156.
- Strüssmann C.A., Takashima F. (1990) Hepatocyte nuclear size and nutritional condition of larval pejerrey, *Odontesthes bonariensis* (Cuvier et Valenciennes). *Journal of Fish Biology*, 36: 59-65.
- Sugimura T. (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis*, 21: 387-395.
- Sugiura S.H., Hardy R.W., Roberts R.J. (2004) The pathology of phosphorus deficiency in fish - a review. *Journal of Fish Diseases*, 27: 255-265.
- Sun P., Tsai S.-S. (2009) Intersex tilapia (*Oreochromis* spp.) from a contaminated river in Taiwan: a case study. *Toxins*, 1: 14-24.
- Sundin L., Nilsson G.E. (1998) Endothelin redistributes blood flow through the lamellae of rainbow trout gills. *Journal of Comparative Physiology B*, 168: 619-623.
- Sundin L., Nilsson S. (2002) Branchial innervation. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 232-248.
- Sushchik N.N., Gladyshev M.I., Makhutova O.N., Kalachova G.S., Kravchuk E.S., Ivanova E.A. (2004) Associating particulate essential fatty acids of the ω 3 family with phytoplankton species composition in a Siberian reservoir. *Freshwater Biology*, 49: 1206-1219.
- Sveinbjornsson B., Olsen R., Paulsen S. (1996) Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 19: 349-355.
- Svobodová Z., Lloyd R., Máchová J., Vykusová B. (1993) Water quality and fish health. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Svobodová Z., Kroupová H., Modrá H., Flajšhans M., Randák T., Savina L.V., Gela D. (2008) Haematological profile of common carp spawners of various breeds. *Journal of Applied Ichthyology*, 24: 55-59.
- Sýkora M., Valenta M. (1978) Lipidy rybníčních ryb čeledi Cyprinidae. *Živočišná Výroba*, 23: 811-824.
- Tacon A.G.J. (1992) Nutritional fish pathology: morphological signs of nutrient deficiency and toxicity in farmed fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Tacon A.G.J. (1995) Application of nutrient requirement data under practical conditions: special problems of intensive and semi-intensive fish farming systems. *Journal of Applied Ichthyology*, 11: 205-214.
- Tacon A.G.J., De Silva S.S. (1997) Feed preparation and feed management strategies within semi-intensive fish farming systems in the tropics. *Aquaculture*, 151: 379-404.
- Tacon A.G.J., Metian M. (2008) Global overview on the use of fish meal and fish oil in industrially compounded aquafeeds: Trends and future prospects. *Aquaculture*, 285: 146-158.
- Takahashi M., Fukutake M., Isoi T., Fukuda K., Sato H., Yazawa K., Sugimura T., Wakabayashi K. (1997) Suppression of azoxymethane-induced rat colon carcinoma development by a fish oil component, docosahexaenoic acid (DHA). *Carcinogenesis*, 18: 1337-1342.
- Takashima F., Hibiya T. (1995) An atlas of fish histology: normal and pathological features. Kodansha, Tokyo.
- Takeuchi T., Watanabe T., Satoh S., Martino R.C., Ida T., Yaguchi M. (1989) Suitable levels of protein and digestible energy in practical carp diets. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55: 521-527.
- Takeuchi T., Jeong K.-S., Watanabe T. (1990) Availability of extruded carbohydrate ingredients to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and Carp *Cyprinus carpio*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 56: 1839-1845.
- Takeuchi T., Satoh S., Kiron V. (2002) Common carp, *Cyprinus carpio*. U: Webster C.D., Lim C., Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. CABI Publishing, Oxon, 245-261.
- Theilacker G.H. (1986) Starvation-induced mortality of young sea-caught jack mackerel, *Trachurus symmetricus*, determined with histological and morphological methods. *Fishery Bulletin*, 84: 1-17.
- Thomas M., van der Poel A.F.B. (1996) Physical quality of pelleted animal feed 1. Criteria for pellet quality. *Animal Feed Science and Technology*, 61: 89-112.

- Thurston R.V., Russo R.C., Luedtke R.J., Smith C.E., Meyn E.L., Chakoumakos C., Wang K.C., Brown C.J.D. (1984) Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 113: 56-73.
- Timmerman C.M., Chapman L.J. (2004) Hypoxia and interdemec variation in *Poecilia latipinna*. *Journal of Fish Biology*, 65: 635-650.
- Tocher D.R. (2003) Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11: 107-184.
- Triebskorn R., Casper H., Heyd A., Eikemper R., Köhler H.R., Schwaiger J. (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68: 151-166.
- Triebskorn R., Casper H., Scheil V., Schwaiger J. (2007) Ultrastructural effects of pharmaceuticals (carbamazepine, clofibrac acid, metoprolol, diclofenac) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387: 1405-1416.
- Triebskorn R., Telcean I., Casper H., Farkas A., Sandu C., Stan G., Colărescu O., Dori T., Köhler H.-R. (2008) Monitoring pollution in River Mureş, Romania, part II: Metal accumulation and histopathology in fish. *Environmental Monitoring and Assessment*, 141: 177-188.
- Urán P., Goncalves A., Tavernethiele J., Schrama J., Verreth J., Rombout J. (2008) Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, 25: 751-760.
- Urán P.A., Schrama J.W., Jaafari S., Baardsen G., Rombout J.H.W.M., Koppe W., Verreth J.A.J. (2009a) Variation in commercial sources of soybean meal influences the severity of enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 15: 492-499.
- Urán P.A., Schrama J.W., Rombout J.H.W.M., Taverne-Thiele J.J., Obach A., Koppe W., Verreth J.A.J. (2009b) Time-related changes of the intestinal morphology of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., at two different soybean meal inclusion levels. *Journal of Fish Diseases*, 32: 733-744.
- Urbánek M., Hartvich P., Vácha F., Rost M. (2010) Investigation of fat content in market common carp (*Cyprinus carpio*) flesh during the growing season. *Aquaculture Nutrition*, 16: 511-519.
- Vacha F., Vejsada P., Huda J., Hartvich P. (2007) Influence of supplemental cereal feeding on the content and structure of fatty acids during long-lasting storage of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture International*, 15: 321-329.
- van den Ingh T.S.G.A.M., Krogdahl Å., Olli J.J., Hendriks H.G.C.J.M., Koninkx J.G.J.F. (1991) Effects of soybean-containing diets on the proximal and distal intestine in Atlantic salmon (*Salmo salar*): a morphological study. *Aquaculture*, 94: 297-305.
- van der Oost R., Beyer J., Vermeulen N.P.E. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149.
- Vandeputte M. (2003) Selective breeding of quantitative traits in the common carp (*Cyprinus carpio*): a review. *Aquatic Living Resources*, 16: 399-407.
- Vandeputte M., Kocour M., Mauger S., Rodina M., Launay A., Gela D., Dupont-Nivet M., Hulak M., Linhart O. (2008) Genetic variation for growth at one and two summers of age in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): Heritability estimates and response to selection. *Aquaculture*, 277: 7-13.
- Vandewalle P., Parmentier E., Chardon M. (2000) The branchial basket in teleost feeding. *Cybiurn*, 24: 319-342.
- Vega M., Pardo R., Barrado E., Debán L. (1998) Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research*, 32: 3581-3592.
- Velisek J., Stara A., Machova J., Dvorak P., Zuskova E., Prokes M., Svobodova Z. (2012) Effect of terbutryn at environmental concentrations on early life stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 102: 102-108.
- Velmurugan B., Selvanayagam M., Cengiz E.I., Unlu E. (2007a) Histopathology of lambda-cyhalothrin on tissues (gill, kidney, liver and intestine) of *Cirrhinus mrigala*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24: 286-291.

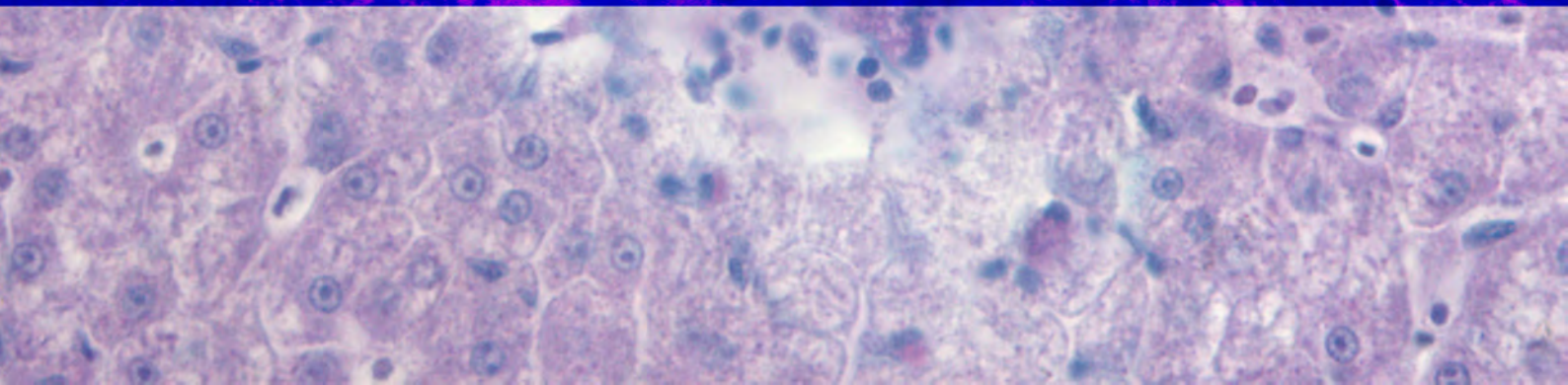
- Velmurugan B., Selvanayagam M., Cengiz E.I., Unlu E. (2007b) The effects of fenvalerate on different tissues of freshwater fish *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 42: 157-163.
- Venou B., Alexis M.N., Fountoulaki E., Nengas I., Apostolopoulou M., Castritsi-Cathariou I. (2003) Effect of extrusion of wheat and corn on gilthead sea bream (*Sparus aurata*) growth, nutrient utilization efficiency, rates of gastric evacuation and digestive enzyme activities. *Aquaculture*, 225: 207-223.
- Vergara J.M., López-Calero G., Robaina L., Caballero M.J., Montero D., Izquierdo M.S., Aksnes A. (1999) Growth, feed utilization and body lipid content of gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed increasing lipid levels and fish meals of different quality. *Aquaculture*, 179: 35-44.
- Viola S., Mokady S., Behar D., Cogan U. (1988) Effects of polyunsaturated fatty acids in feeds of tilapia and carp: 1. Body composition and fatty acid profiles at different environmental temperatures. *Aquaculture*, 75: 127-137.
- Wang Y.S., Gonzalez R.J., Patrick M.L., Grosell M., Zhang C., Feng Q., Du J., Walsh P.J., Wood C.M. (2003) Unusual physiology of scale-less carp, *Gymnocypris przewalskii*, in Lake Qinghai: a high altitude alkaline saline lake. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134: 409-421.
- Watanabe N., Kato M., Suzuki N., Inoue C., Fedorova S., Hashimoto H., Maruyama S., Matsuo S., Wakamatsu Y. (2009) Kidney regeneration through nephron neogenesis in medaka. *Development, Growth and Differentiation*, 51: 135-143.
- Watanabe T., Takeuchi T., Satoh S., Wang K.-W., Ida T., Yaguchi M., Nakada M., Amano T., Yoshijima S., Aoe H. (1987) Development of practical carp diets for reduction of total nitrogen loading on water environment. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53: 2217-2225.
- Watanabe Y. (1985) Histological changes in the liver and intestine of freshwater goby larvae during short-term starvation. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51: 707-709.
- Wathes D.C., Abayasekara D.R.E., Aitken R.J. (2007) Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 77: 190-201.
- Weibel E.R., Kistler G.S., Scherle W.F. (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology*, 30: 23-38.
- Weibel E.R., Stäubli W., Gnägi H.R., Hess F.A. (1969) Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell: I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *Journal of Cell Biology*, 42: 68-91.
- Wester P.W., Canton J.H., Bisschop A. (1985) Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term β -hexachlorocyclohexane exposure. *Aquatic Toxicology*, 6: 271-296.
- Wester P.W., Canton J.H. (1986) Histopathological study of *Oryzias latipes* (medaka) after long-term β -hexachlorocyclohexane exposure. *Aquatic Toxicology*, 9: 21-45.
- Wester P.W., Roghair C.J. (1994) Monitoring of sublethal chronic effects in fish: the pathomorphological approach. U: Muller R., Lloyd R., Sublethal and chronic toxic effects of pollutants on freshwater fish. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, 7-14.
- Wickins J.F., Lee D.O.C. (2002) Crustacean farming, ranching and culture. Blackwell Science, Oxford.
- Wiklund T., Dalsgaard I. (1998) Occurrence and significance of atypical *Aeromonas salmonicida* in non-salmonid and salmonid fish species: a review. *Diseases of Aquatic Organisms*, 32: 49-69.
- Wilcox L.V. (1948) The quality of water for irrigation use. *Technical Bulletin*, 962: 1-40.
- Wilkie M.P., Wright P.A., Iwama G.K., Wood C.M. (1994) The physiological adaptations of the Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) following transfer from well water to the highly alkaline waters of Pyramid Lake, Nevada (pH 9.4). *Physiological Zoology*, 67: 355-380.
- Wilkie M.P., Wood C.M. (1995) Recovery from high pH exposure in the rainbow trout: white muscle ammonia storage, ammonia washout, and the restoration of blood chemistry. *Physiological Zoology*, 68: 379-401.
- Wilkie M.P. (2002) Ammonia excretion and urea handling by fish gills: present understanding and future research challenges. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 284-301.
- Wilson J.M., Randall D.J., Donowitz M., Vogl A.W., Ip A.K. (2000) Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *Journal of Experimental Biology*, 203: 2297-2310.

- Wilson J.M., Laurent P. (2002) Fish gill morphology: inside out. *Journal of Experimental Zoology*, 293: 192-213.
- Wilson J.M., Morgan J.D., Vogl A.W., Randall D.J. (2002) Branchial mitochondria-rich cells in the dogfish *Squalus acanthias*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 132: 365-374.
- Wold P.A., Hoehne-Reitan K., Cahu C.L., Infante J.Z., Rainuzzo J., Kjorsvik E. (2009) Comparison of dietary phospholipids and neutral lipids: effects on gut, liver and pancreas histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 15: 73-84.
- Wolf J.C., Wolfe M.J. (2005) A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology*, 33: 75-85.
- Wong M.K.S., Woo N.Y.S. (2006) Rapid changes in renal morphometrics in silver sea bream *Sparus sarba* on exposure to different salinities. *Journal of Fish Biology*, 69: 770-782.
- Wood C.M. (2001) Toxic responses of the gill. U: Schlenk D., Benson W.H., Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. Taylor & Francis, London, 1-101.
- Wright P.A., Iwama G.K., Wood C.M. (1993) Ammonia and urea excretion in Lahontan cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki henshawi*) adapted to the highly alkaline Pyramid Lake (pH 9.4). *Journal of Experimental Biology*, 175: 153-172.
- Wurts W.A., Durborow R.M. (1992) Interactions of pH, carbon dioxide, alkalinity and hardness in fish ponds. SRAC Publication, 464: 1-4.
- Xie S., Zhu X., Cui Y., Wootton R.J., Lei W., Yang Y. (2001) Compensatory growth in the gibel carp following feed deprivation: temporal patterns in growth, nutrient deposition, feed intake and body composition. *Journal of Fish Biology*, 58: 999-1009.
- Yamamoto T., Goto T., Kine Y., Endo Y., Kitaoka Y., Sugita T., Furuita H., Iwashita Y., Suzuki N. (2008) Effect of an alcohol extract from a defatted soybean meal supplemented with a casein-based semi-purified diet on the biliary bile status and intestinal conditions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 39: 986-994.
- Yang N., Matsuda M., Kawano M., Wakimoto T. (2006) PCBs and organochlorine pesticides (OCPs) in edible fish and shellfish from China. *Chemosphere*, 63: 1342-1352.
- Yao Y., Lin J., Yang P., Chen Q., Chu X., Gao C., Hu J. (2012) Fine structure, enzyme histochemistry, and immunohistochemistry of liver in zebrafish. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295: 567-576.
- Yilmaz E., Genc E. (2006) Effects of alternative dietary lipid sources (soy-acid oil and yellow grease) on growth and hepatic lipidosis of common carp (*Cyprinus carpio*) fingerling: a preliminary study. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 6: 37-42.
- Zakęś Z., Kowalska A., Demska-Zakęś K., Jeney G., Jeney Z. (2008) Effect of two medicinal herbs (*Astragalus radix* and *Lonicera japonica*) on the growth performance and body composition of juvenile pikeperch [*Sander lucioperca* (L.)]. *Aquaculture Research*, 39: 1149-1160.
- Zambrano L., Scheffer M., Martínez-Ramos M. (2001) Catastrophic response of lakes to benthivorous fish introduction. *Oikos*, 94: 344-350.
- Zambrano L., Martínez-Meyer E., Menezes N., Peterson A.T. (2006) Invasive potential of common carp (*Cyprinus carpio*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in American freshwater systems. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63: 1903-1910.
- Zaroogian G., Gardner G., Borsay Horowitz D., Gutjahr-Gobell R., Haebler R., Mills L. (2001) Effect of 17 β -estradiol, *o,p'*-DDT, octylphenol and *p,p'*-DDE on gonadal development and liver and kidney pathology in juvenile male summer flounder (*Paralichthys dentatus*). *Aquatic Toxicology*, 54: 101-112.
- Zhang X., Xie P., Li D., Shi Z. (2007) Hematological and plasma biochemical responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystins with the possible mechanisms of anemia. *Toxicol*, 49: 1150-1157.
- Zhou B.S., Wu R.S.S., Randall D.J., Lam P.K.S., Ip Y.K., Chew S.F. (2000) Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *Journal of Fish Biology*, 57: 1160-1171.
- Zhu X., Cui Y., Ali M., Wootton R.J. (2001) Comparison of compensatory growth responses of juvenile three-spined stickleback and minnow following similar food deprivation protocols. *Journal of Fish Biology*, 58: 1149-1165.
- Zimmerli S., Bernet D., Burkhardt-Holm P., Schmidt-Posthaus H., Vonlanthen P., Wahli T., Segner H. (2007) Assessment of fish health status in four Swiss rivers showing a decline of brown trout catches. *Aquatic Sciences*, 69: 11-25.

- Zrnčić S., Oraić D., Čaleta M., Mihaljević Ž., Zanella D., Bilandžić N. (2013) Biomonitoring of heavy metals in fish from the Danube River. *Environmental Monitoring and Assessment*, 185: 1189-1198.
- Živić I., Trbović D., Živić M., Bjelanović K., Stanković M., Vukojević D., Marković Z. (2011) *Chironomus plumosus* (Diptera, Insecta) larvae as a source of essential fatty acids in feed of carp fry. V International Conference "Aquaculture & Fishery", Belgrade, Serbia, 1-3 June 2011.
- Žydelis R., Kontautas A. (2008) Piscivorous birds as top predators and fishery competitors in the lagoon ecosystem. *Hydrobiologia*, 611: 45-54.



PRILOZI



BIOGRAFIJA KANDIDATA

Božidar (Slobodan) Rašković je rođen 29.05.1979. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu „Jelena Četković“ i VI beogradsku gimnaziju. Diplomirao je na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, smer: Biologija, 2005. godine, sa prosečnom ocenom u toku studija od 9.06. Nakon završetka studija upisuje doktorske studije, smer: Biologija ćelija i tkiva. Prve dve godine doktorskih studija provodi kao stipendista doktorand Ministarstva za nauku Republike Srbije. Potom se zapošljava na Poljoprivrednom fakultetu, Univerzitet u Beogradu, prvo kao saradnik u nastavi, da bi kasnije bio izabran u zvanje asistenta. Na Poljoprivrednom fakultetu je odgovoran za držanje vežbi iz predmeta: Zoologija, Zaštita životne sredine i Gajenje puževa i glista. Oblast njegovih interesovanja je pored histologije riba i toksikologija riba, akvakultura i gajenje riba, kao i selekcija šarana.

Tokom trajanja doktorskih studija tri puta je boravio je u inostranstvu na usavršavanju: na Biološkom fakultetu, Univerzitet u Insbruku (Austrija), preko stipendije WUS Austrija, u Institutu NOFIMA, Univerzitet prirodnih nauka u Osu (Norveška), preko FP7 projekta „ROSA“ i u RECETOX Institutu, Masarikov Univerzitet u Brnu (Republika Češka) preko programa razmene Erasmus Mundus. Bio je učesnik na 3 projekta Ministarstva nauke Republike Srbije, jednom međunarodnom FP7 projektu i dva bilateralna projekta: sa Kraljevinom Norveškom i Republikom Portugal.

Do sada je u saradnji sa drugim autorima objavio četrdeset i tri bibliografske jedinice: jedan rad u vrhunskom časopisu međunarodnog značaja (M₂₁), pet radova u međunarodnim časopisima (M₂₃), pet radova u vodećim časopisima nacionalnog značaja (M₂₄ i M₅₁), dva rada u časopisima nacionalnog značaja (M₅₂), deset saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u celini (M₃₃), dvanaest saopštenja sa međunarodnih skupova štampanih u izvodu (M₃₄), tri saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u celini (M₆₃) i pet saopštenja sa skupova nacionalnog značaja štampanih u izvodu (M₆₄).

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani: **Božidar S. Rašković**

broj upisa: **BO 060200**

Izjavljujem

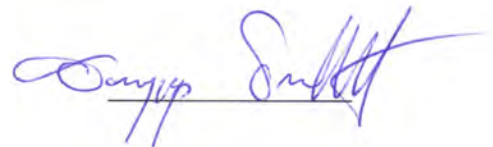
da je doktorska disertacija pod naslovom:

Histološka građa jetre, creva, škrge i bubrega šarana (*Cyprinus carpio* L., 1758) gajenog u poluintenzivnom sistemu: efekti različitih tipova dodate hrane

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.04.2013.



Prilog 2.

**Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije
doktorskog rada**

Ime i prezime autora: **Božidar Rašković**

Broj upisa: **BO 060200**

Studijski program: **Biologija ćelija i tkiva**

Naslov rada: **Histološka građa jetre, creva, škrge i bubrega šarana
(*Cyprinus carpio* L., 1758) gajenog u poluintenzivnom
sistemu: efekti različitih tipova dodate hrane**

Mentori: **Dr Vesna Koko**, redovni profesor
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Vesna Poleksić, redovni profesor
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

Potpisan: **Božidar S. Rašković**

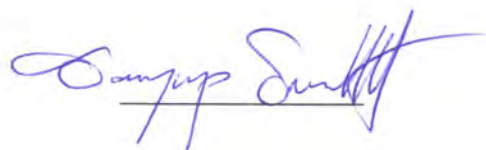
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.04.2013.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Histološka građa jetre, creva, škrge i bubrega šarana (*Cyprinus carpio* L., 1758) gajenog u poluintenzivnom sistemu: efekti različitih tipova dodate hrane

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo - nekomercijalno - bez prerade
4. Autorstvo - nekomercijalno - deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo - bez prerade
6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

U Beogradu, 22.04.2013.

