

**MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE
ERITROCITA KOD
Carassius auratus gibelio (Bloch, 1783.) IZ
VODE KONTAMINIRANE TERBUFOSOM**

Hasković Edhem¹, Glamuzina Branko², Suljević Damir¹, Ivanc
Aleksandar³, Dulčić Jakov⁴

1. Prirodno-matematički fakultet, Sarajevo, BiH
2. Sveučilište u Dubrovniku, Odjel za Akvakulturu
3. Prirodno-matematički fakultet, Banjaluka, BiH
4. Institut za oceanografiju i ribarstvo, Split

- Suvremena, intenzivna poljoprivredna proizvodnja praćena je širokom upotrebom raznih kemijskih sredstava za zaštitu bilja. Jednu vrstu takvih sredstava čine i **organofosforni insekticidi** kao sredstvo za uništavanje štetočina u ratarstvu i voćarstvu
- Poznato je da su postojana organska onečišćavala (**POO**) toksični organski spojevi najčešće sintetskog podrijetla otporni na fotolitičku, biološku i kemijsku razgradnju (Rumenjak, 1993)

- Uz toksičnost i postojanost dodatni problem predstavlja njihova akumulacija u živim organizmima u masnom tkivu (tzv. **zakašnjela toksičnost**) i što se nepromijenjeni lako prenose na udaljena područja na kojima nikada nisu korišteni
- Sredinom prošlog stoljeća masovno su se proizvodili i koristili, pa su velike količine ispuštene u okoliš, a radi svoje postojanosti predstavljaju dugoročno opterećenje za sve komponente okoliša u svim zemljama svijeta

- U tu svrhu odavno su razvijeni laboratorijski akvatični ekosistemi i postali su obavezni za dobivanje prve realne slike o ponašanju **14C** označene aktivne tvari u okolišu, kao i određivanja isparljivosti, razgradnje (tlo, voda, zrak, usjev), **faktor biokoncentracije (BCF)** i brojna druga istraživanja prije izdavanja dozvole za promet
- Danas je poznato preko 10 korelacija koje predviđaju odnos Nernstovog koeficijenta raspodjele ($\log P_{ow}$) i koncentracije u nekom elementu okoliša, na pr. **faktora biokoncentracije u ribama**:
predviđanje $\log BCF = 0,56 \log K_{ow} + 0,124$.

- Neka istraživanja govore da ostaci jedan mjesec nakon primjene **¹⁴C-DDT** u akvatičnom laboratorijskom ekosistemu iznose: 52% ostataka u puževima, 58% u ličinkama komaraca i **54% u ribama** bio je DDE (Metclaf,1971.)

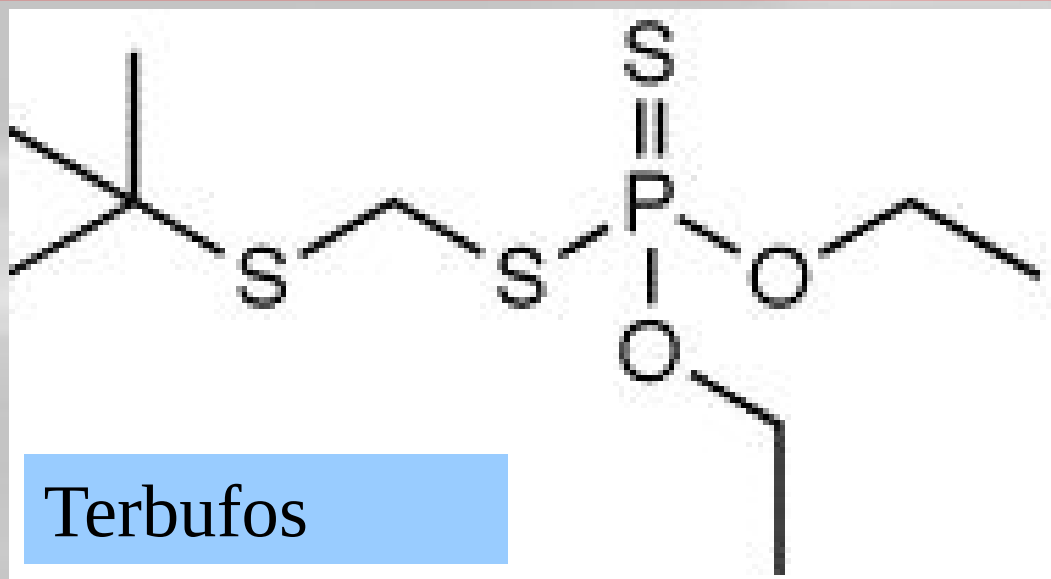
- Zapanjuje velika brzina nakupljanja problematičnih klororganskih pesticida u svim organizmima, što se ostvaruje brzim lipoidnim transportom uz vrlo spori metabolizam
- Na pr. 1 ppm DDT u vodi: već nakon 5 minuta u jetri i slezeni **atlantske pastrve** ima 1,53 ppm, a poslije jednog sata 31 ppm (Haque, 1975)
- Već nakon 15 sekundi ulazi u alge i dostiže maksimalnu koncentraciju, dok je dieldrinu potrebno 6 sati, iako je 200 puta topljiviji od DDT (Wheeler, 1970)

Organofosforni spojevi

- **Upotreba organofosfornih spojeva:**
 - pesticidi**
 - insekticidi, herbicidi, fungicidi, akaricidi, nematocidi
 - lijekovi (metrifonat, ekotiofat ...)
 - živčani bojni otrovi (sarin, soman, tabun, VX ...)
 - Toksični učinci – posljedica inhibicije kolinesteraza**
 - acetilkolinesteraza
 - serumske kolinesteraze

- **Organo-fosforni kemijski spojevi,** diizopropilfluorofosfat kao pesticid, mogu ireverzibilno inhibirati enzime tako što se svojom **fosforilnom skupinom** tijesno vežu za **acil grupu** enzima i time onemogućavaju vezu enzima s acetilkolinom.
- **Smanjenje aktivnosti ChE za više od 30% mogu potencirati:** organofosfatni esteri koji se koriste kao pesticidi u obliku alkilfosfata (Del Prado Lu, 2007)

- Brojne kemijski aktivne supstance mogu remetiti procese na staničnoj membrani
- U takva jedinjenja spadaju i organofosfatni pesticidi među kojim **terbufos** ima posebno izraženo dejstvo na aktivnost kolinesteraze eritrocita
- Različiti su putevi njegovog dospijanja u organizam, bilo vodom ili hranom



Terbufos

Acetilkolinesteraza

- Funkcija AChE u eritrocitima nije potpuno poznata, premda se može naći podatak kako ona sudjeluje u izmjeni iona između eritrocita i spoljašnje sredine (Rumenjak 1993).
- Omogućuje jednovremeno sazrijevanje eritrocita, obnavljanje istrošenih eritrocita, njihovo otpuštanje u periferiju.
- Pesticidi smanjuju aktivnost eritrocitne kolinesteraze i tako utiču na **smanjenje broja** ali i **funkcije** eritrocita (Del Prado Lu, 2007.)
- Mehanizam otrovanja organofosfornim spojevima temelji se na kovalentnom **vezanju** organofosfata za **aktivno mjesto** acetilkolinesteraze
- Ovo vezanje ima za posljedicu inhibiciju enzima, što dovodi do nakupljanja enzima na sinapsama ili remećenju ionske razmjene eritrocita s okolišem

Kolinesteraze čine dva srodna enzima:

- Jedan je acetilkolin-acetilhidrolaza (acetilkolinhidrolaza, prava kolinesteraza, **kolinesteraza I**, i specifična kolinesteraza)
- Prava kolinesteraza se nalazi u **eritrocitima**, plućima slezeni, u sivoj moždanoj tvari, u simpatičkim ganglijima, ali se ne nalazi u plazmi

- Drugi njemu srodan enzim je acilkolin-acilhidrolaza (pseudokolinesteraza, nespecifična kolinesteraza, benzoilkolinestraza, **kolinesteraza II**, S tip kolinestraza, plazma kolinesteraza)
- Može se naći u jetri, pankreasu, slezeni, mukozni crijeva, bijeloj moždanoj tvari, srčanom mišiću i u plazmi

CILJ

Kao polazne cilje ovog rada postavljili smo:

- Proučavanje uticaja (Terbufosa) inhibitora acetilkolinesteraze na morfološke karakteristike eritrocita kod *Carassius auratus gibelio* (Bloch. 1783) - babuška.
- Mogući uticaj terbufosa na dijametar jezge

MATERIJAL I METODE



www.bohusfisk.se



Sl. 6. *Carassius auratus* gibellio-babuška

REZULTATI I DISKUSIJA

- U toku ovog istraživanja analizirali smo ukupno pedeset jedinki, koje su podjeljene u dvije grupe:
 - Grupa tretiranih riba i
 - Grupa kontrolnih riba.
- U grupi kontrolnih riba analizirano je dvadesetpet jedinki, u grupi tretiranih riba analizirano također dvadesetpet jedinki
- Sve jedinke su bile uzrasne kategorije 2+ i 3+
- Starost je određivana standardnom metodom preko otolita i krljušti
- Za svaku jedinku određena je ukupna masa tijela, totalna dužina i standardna dužina tijela.

Tabela 1. Morfometrijski parametri kontrolne grupe jedinki

N=25	Masa tijela (g)	Totalna dužina (cm)	Standardna dužina (cm)
$\bar{x}$	70,233	16,988	14,656
Sd	8,250	0,967	0,733
Min	57.00	15.00	13.40
Max	89.50	18.50	16.20
KV%	11.746	5.692	5.001

Tabela 2. Morfometrijski parametri eksperimentalne grupe jedinki

N=25	Masa tijela (g)	Totalna dužina (cm)	Standardna dužina (cm)
$\bar{x}$	56,69	16,01	13,62
Sd	11,29	1,12	1,25
Min	39	13,6	11,5
Max	83	17,7	15,8
KV%	19,91	6,99	9,17

Tabela 3. Statistička signifikantnost morfometrijskih parametara kontrolne i tretirane grupe jedinki

	Masa tijela (g)	Totalna dužina tijela (cm)	Standardna dužina tijela (cm)
Kontrolne $\bar{x}$	70,233	16,988	14,656
Tretirane $\bar{x}$	56.69	16.01	13.62
T test	0.0000	0.001	0.0004
	+	+	+

Statistička analiza pokazuje da se svi morfometrijski karakteri između kontrolne i eksperimentalne grupe signifikantno razlikuju.

Statistička evaluacija i rezultati mjerenja eritrocita kontrolne grupe riba

- Kod svake jedinke izvršeno je 100 mjerenja na osnovu kojih su se dobili rezultati za izračunavanje srednjih vrijednosti
- Mjerenja su vršena na Olympusovom mikroskopu BX 41 BF u Laboratoriji za biokemiju i fiziologiju Prirodno-matematičkog fakulteta u Sarajevu

Tabela 4. Eritrocitni parametri kontrolne grupe riba u μm

	Duža osa erc	Kraća osa erc	Površina erc	Debljina erc	Duža osa jezgre	Kraća osa jezgre	Površina jezgre
$\bar{x}$	13.73	7.82	84.13	2.36	6.12	2.96	14.02
Sd	1.60	0.29	10.82	0.34	0.50	0.22	1.51
Min	11.88	7.20	71.39	1.63	5.29	2.70	11.89
Max	16.29	8.73	102.77	2.98	6.85	3.61	16.57
KV%	11.66	3.65	12.86	14.35	8.11	7.50	10.81

- Ako dobivene rezultate kontrolne grupe *Carassius*-a uporedimo sa rezultatima istraživanja koja se mogu naći u dostupnim bazama podataka za neke druge Ciprinidne vrste (*Cyprinus carpio*, CLD 11, 9., CSD 7,4., CA 68,99., NLD 4,0., NSD 3,2., NA 9,90; *Carasius auratus auratus* CLD 12,5., CSD 8,5., CA 83,45., NLD 5,5., NSD 4,0., NA 17,28; Tinka tinka CLD 13,4., CSD 10,6., CA 111,41., NLD 3,2., NSD 2,6 i NA 6,60) onda možemo vidjeti da je dijametar eritrocita kod babuške nešto veći nego kod pomenutih ciprinidnih vrsta osim u odnosu na eritrocite Tinka tinka.
- Isti je slučaj i kod tretiranih jedinki (Gregory, 2003., <http://www.genomesize.com/cellsize/fish.htm>)

Tabela 5. Eritrocitni parametri ispitivane grupe riba u μm

	Duža osa erc	Krača osa erc	Površina erc	Debljina erc	Duža osa jezgre	Krača osa jezgre	Površina jezgre
$\bar{x}$	13.81	8.07	88.39	2.11	5.80	2.78	12.75
Sd	1.52	0.34	12.76	0.53	0.49	0.16	1.55
Min	11.96	7.28	72.03	1.07	4.87	2.38	10.98
Max	17.25	8.72	114.30	3.10	6.97	3.06	16.82
KV%	11.00	4.22	14.43	25.26	8.50	5.80	12.15

Tabela 6. Statistička analiza signifikantnosti dobijenih rezultata kontrolne i eksperimentalne grupe

	Duža osa erc	Kraća osa erc	Površina erc	Debljina erc	Duža osa jedra	Kraća osa jedra	Površina jedra
Kontrolne	13.73	7.82	84.13	2.36	6.12	2.96	14.02
Testirane	13.81	8.07	88.39	2.11	5.80	2.78	12.75
T test	0.427	0.003	0.104	0.026	0.013	0.000	0.002
	-	+	-	+	+	+	+

- Na osnovu izloženog može se uočiti da trovanje preparatima posebice onim koji sadrže organofosfatna jedinjenja a koriste se kao insekticidi ima veoma negativne učinke na životinjski svijet.
- Intoksikacija organofosfatnim jedinjenjima izaziva pad aktivnosti kolinesteraze u serumu i u eritrocitima pa je ovaj enzimski test jako bitan za postavljanje dijagnoze trovanja

- Inhibicija kolinesterazne aktivnosti izražena je i pri minimalnim koncentracijama organofosfata tako da omogućuje brzu dijagnozu i terapiju.
- Aktivnost kolinesteraze može da se smanji za 40% pa i 80 % kada se javljaju neuromuskularni simptomi
- Negativno dejstvo inhibitora kolinesteraze ima odraz i na morfologiju eritrocita i njihove jezgre, posebice na njihovu produkciju i obnavljanje koje se remeti zbog negativnog dejstva organofosfatnih jedinjenja koja smanjuju koncentraciju kolinesteraze (Petroianu et al 2004).

ZAKLJUČCI

U ovom radu izneseni su rezultati istraživanja parametara kod *Carassius auratus gibelio* - babuške koja je bila u vodi kontaminiranoj terbufosom

Tokom istraživanja detaljno su proučeni svi parametri kod kontrolne i tretirane grupe riba

Nakon statističke obrade dobivenih podataka i analize rezultata mogu se izvesti sljedeći opći zaključci:

- Inhibitorna dejstva terbufosa na parametre eritrocita su prisutna u manjem ili većem stepenu, posmatrajući vrijednost za parametre duže i kraće ose eritrocita može se konstatovati da je inhibitorno dejstvo terbufosa bilo izraženije kod kraće ose eritrocita, dok je kod duže ose eritrocita dejstvo terbufosa neznatno
- Na osnovu vrijednosti duže i kraće ose jedra evidentne su statistički značajne razlike što ukazuje na veliki uticaj terbufosa na genetički materijal
- Između kontrolne i eksperimentalne grupe nema signifikantne razlike u dužoj osi eritrocita, dok je kraća osa signifikantno duža kod eksperimentalne grupe jedinki

- Površina eritrocita kod tretirane grupe je veća zbog promjene eritrocitnih dijametara, međutim razlika nije statistički značajna, dok je debljina eritrocita kod jedinki tretirane grupe manja i ta razlika je signifikantna
- Svi ispitivani parametri jezgre (duža osa, kraća osa i površina jezgre) su kod jedinki tretirane grupe manji i te razlike su statistički visoko signifikantne
- Te rezultate moguće je pripisati inhibitornom dejstvu terbufosa na aktivnost kolinesteraze što ima za posljedicu promjenu morfologije eritrocita ali i direktni učinak na genetički materijal riba