

NAUČNI RAD – Original Paper

DIFERENCIJALNA KRVNA SLIKA LINJAKA *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) U UVJETIMA TERMIČKOG STRESA

DIFFERENTIAL BLOOD COUNT OF TENCH *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758) IN CONDITIONS OF THERMAL STRESS

Hasković E., Mehinović Lejla, Suljević D., Hasković D., Hajdarević Edina, Glamuzina B.

Abstract – Defining the physiological feature provides an understanding of functional adaptation of species to its ecological niche as well as the various forms of stress factors. This paper gives an overview of changes in certain forms of leukocytes (WBC differential) under the influence of thermal stress (increased temperature). In our experiment, we used 46 specimens of tench (*Tinca tinca*) fished in the Jablanica Lake reservoir. Specimens had previously been adapted in specially prepared tanks for 20 days. The control group of animals (16) was exposed to constant water temperature of 10 °C, while in the treated groups (30), the water temperature was gradually risen to 28 °C and, as such, held for 30 minutes. All specimens were aged 2+ and 3+.

It was found that the thermal regime change causes adaptive response of tench specimens by increasing the number of neutrophils and pseudoeosinophils but reduction in the number of lymphocytes. Observed were statistically significant differences in the number of segmented granulocytes, pseudoeosinophils and lymphocytes between the control and the experimental group. However, a significantly higher number of segmented granulocytes and pseudoeosinophils was at the experimental group, while in the control group a number of lymphocytes was significantly higher compared with the

Dr. sc. Edhem Hasković, biolog, redovni profesor (ehaskovic@yahoo.com); Mehinović Lejla, biolog; dr. sc. Damir Suljević, docent; MA. Denis Hasković, biolog: Odsjek za biologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Sarajevu; dr. sc. Edina Hajdarević, biolog, docent: Prirodno-matematički fakultet Univerzitet u Tuzli; dr. sc. Branko Glamuzina, biolog, redoviti profesor, Sveučilište u Dubrovniku

Hasković Edhem, PhD, Biologist, Professor, ehaskovic@yahoo.com; Mehinović Lejla, Biologist; Suljević Damir, PhD, Biologist, Associate Professor; Hasković Denis, MA, Biologist: Department of Biology, Faculty of Science, University of Sarajevo; Hajdarević Edina, PhD, Biologist, Assistant Professor: Faculty of Science, University of Tuzla; Glamuzina Branko, PhD, Professor, University of Dubrovnik, Croatia

experimental group. Neither form of leukocytes showed any significant difference between males and females of the experimental group. It is interesting to note that among individuals from both the control and experimental group, eosinophils and monocytes were rarely noticed, while basophils were not found at all.

Key words: thermal stress, tench, *Tinca tinca*, pseudoeosinophils

Sažetak – Promjene hematoloških parametara su među prvim pokazateljima učinka stresa na životinjski organizam. Stoga je osnovni cilj ovog rada utvrditi utjecaj termičkog stresa (povećane temperature) na diferencijalnu krvnu sliku (DKS), odnosno na promjenu procentualnog odnosa pojedinih formi leukocita. U eksperimentu je korišteno 46 jedinki linjaka (*Tinca tinca*) iz hidroakumulacije Jablaničko jezero. Jedinke su prethodno adaptirane 20 dana u namjenski pripremljenim akvarijima, kontrolna grupa jedinki (16) izložena je konstantno temperaturi vode 10 °C, dok je kod tretirane grupe riba (30) temperatura vode postupno povećana na 28 °C i kao takva održavala se 30 minuta. Sve jedinke su bile starosne dobi 2+ i 3+. Ustanovljeno je da promjena termičkog režima izaziva adaptabilni odgovor jedinki linjaka kroz povećanje broja neutrofila i pseudoeozinofila a smanjenje broja limfocita. Između kontrolne i eksperimentalne grupe zabilježene su statistički signifikantne razlike u broju segmentiranih granulocita, pseudoeozinofila i limfocita, pri čemu je signifikantno veći broj segmentiranih i pseudoeozinofila kod eksperimentalne grupe. Kod kontrolne grupe jedinki registrirani broj limfocita statistički je signifikantno veći u odnosu na eksperimentalnu grupu. Niti jedna forma leukocita nije pokazala signifikantnu razliku između mužjaka i ženki eksperimentalne grupe. Kod jedinki kontrolne, ali i eksperimentalne grupe, rijetko je registriran eozinofil i monocit, dok bazofili nisu uopće utvrđeni.

Ključne riječi: termički stres, linjak, *Tinca tinca*, pseudoeozinofili

Uvod

Negativni utjecaj različitih stresogenih faktora na ribe je nedvojbeno dokazan. Kao najčešće posljedice učinka stresa kod riba javljaju se metabolički i osmoregulacijski poremećaji (15). Posebno brz učinak ima termički stres (povećana temperatura vode), pri čemu se prve promjene ispoljavaju kroz hematološke parametre. Nagle temperaturne promjene su vjerovatno povezane s brzim blokiranjem enzima koji pomažu disanje. Dugotrajne i postupne promjene temperature vode kod riba izazivaju adaptibilnu prilagodbu (9). Povećanje temperature vode ima složen učinak na nervni i endokrini sistem te šteti generativnim procesima (14).

Identifikacija krvnih stanica riba kombinirana s drugim dijagnostičkim metodama upućuje na fiziološki status divljih populacija i ukazuje na uvjete koji su prouzročili stres kod riba, kao što su posljedice pogrešne manipulacije, bolesti, infekcije

parazitima, bioakumulacije polutanata (13). Ribe pokazuju veoma širok diverzitet hematoloških profila na što ukazuju različiti tipovi stanica i strukturna heterogenost čak i između srodnih vrsta. Do sada nije uspostavljena uniformna klasifikacija krvnih stanica. Krvne stanice riba su generalno manje diferencirane nego krvne stanice sisavaca, što ih čini znatno težim za međusobno razlikovanje (7, 21). Za mnoge riblje vrste ne postoje hematološke reference. Može se reći da je osnovni hematološki obrazac vertebrata sačuvan i kod riba uz, naravno, signifikantne razlike.

Pseudoeozinofilni granulociti predstavljaju granulocitnu formu u literaturi često označenu kao heterofili ili kao posebnu granulocitnu seriju u grupi neutrofilima (3). Ipak, statistički značajne razlike koje je zabilježio Đikić i sar. (2) daju za pravo da ih se izdvoji u zasebnu skupinu granulocita, koja je još kao takva zabilježena i kod šarana, *Cyprinus carpio*. To su veće okrugle stanice, ekscentrično okrugle do elipsaste jezgre. U citoplazmi su prisutne eozinofilne i bazofilne granulacije, čiji broj ovisi od stupnja sazrijevanja stanice. Kod nekih zrelih stanica, dominantna je eozinofilna, neutrofilna ili bazofilna granulacija, a broj granula raste za vrijeme sazrijevanja stanice. Važno je još jednom istaći istovremeno prisustvo granula koje se različito boje (18,19). Pod utjecajem stresa, bilježi se značajno povećanje broja pseudoeozinofila, pojava poznata kao neutrofilija (3). Ona je posljedica značajnog rasta broja upravo pseudoeozinofila, koji nisu diferencirani u posebnu skupinu. Pseudoeozinofilima se pripisuje funkcionalni značaj sličan neutrofilima, unatoč njihovim različitim morfološkim značajkama (17). Kapoor i sar. (10) navode da je riječ o funkcionalno heterogenim krvnim elementima, koji objedinjuju uloge svih granulocita, kompenzirajući na taj način nedostatak istih, čija je funkcionalna aktivnost osobito neophodna u stresnim uvjetima, kada broj pseudoeozinofila raste.

Cilj rada je ispitivanje utjecaja promjene temperature vode na diferencijalnu krvnu sliku linjaka.

Materijal i metode

Jedinke linjaka, *Tinca tinca* lovljene su na području Jablaničkog jezera (Bosna i Hercegovina). Nakon ulova, ribe su stavljene u transportni kontejner s vodom koja je kontinuirano obogaćivana kisikom pomoću pumpe. U takvim uvjetima stalnog dotoka kisika, ribe su transportirane do laboratorija i prenesene u namjenske akvarije, zapremine 100 l. Adaptacija riba obavljala se u razdoblju od dvadeset dana, uz svakodnevni monitoring, koji je obuhvatao kontrolu kisika, amonijaka, izmjenu vode i zamjenu filtera.

Prilikom izvođenja eksperimenta, korištene su dvije grupe jedinki: kontrolna (16 jedinki) i eksperimentalna grupa (30 jedinki). Obje grupe su već bile razdvojene i adaptirane u posebnim akvarijima, što je onemogućilo izazivanje dodatne stresne reakcije za eksperimentalnu grupu jedinki. Za eksperimentalnu grupu prethodno je pripremljen namjenski akvarij, dodatno opremljen aeratorima (CHAMPIONCX-0098) i grijačima (PEAR AQUATICS Y 978). Nakon prilagodbe, za eksperimentalne ribe pristupilo se postupnom povećavanju temperature vode od 28 °C koja se konstantno održavala 30

minuta. Za to vrijeme, kontrolne ribe su držane na temperaturi vode od 10 °C. Svi pokusi sprovedeni su u skladu s nacionalnim propisima o dobrobiti životinja i postupanju sa životinjama tokom pokusa.

Za svaku jedinku određena je masa tijela pomoću vage s osjetljivošću od 0.01 g, dok su totalna dužina i standardna dužina tijela mjerene ihtimetrom. Određivanje spola vršeno je disekcijom jedinki i posmatranjem gonada pod lupom.

Uzimanje krvi za hematološke analize obavljeno je punktiranjem srca oštrom i širokom sterilnom iglom (1.0 do 1.2 mm), a prilikom uzimanja krvi izvršena je dezinfekcija mjesta uboda i primijenjena su sva pravila sterilnoga rada. Uzimanje krvi za analizu obavljeno je u prijedpodnevnim satima, jer hematološki status, kao i ostali fiziološki parametri, imaju jasno izraženu cirkadijalnu ritmiku (11). Krv iz igle sakupljana je u odgovarajuću parafiniranu posudu, da ne bi došlo do koagulacije, a potom je rađena dalja obrada materijala.

Prepoznavanje uobičenih elemenata u perifernoj krvi riba urađeno je na tankom, obojenom krvnom razmazu. Razmaz krvi rađen je po Pappenheimu, a predstavlja kombinaciju bojenja po May-Grünwaldu i Giemsi. Diferenciranje je izvršeno mikroskopskom metodom brojanja 100 elemenata po krvnom razmazu (6).

Rezultati

U tabeli 1 prikazani su rezultati mjerenja osnovnih morfometrijskih parametara (standardna dužina, totalna dužina i masa tijela) kontrolne grupe riba.

Tabela 1. Morfometrijske karakteristike kontrolne i eksperimentalne grupe linjaka, *Tinca tinca*

Table 1. Morphometric characteristics the control and experimental group tench, *Tinca tinca*

Kontrolna grupa	Standardna dužina (cm)	Totalna dužina (cm)	Masa (g)
Srednja vrijednost	15,94±2,02	18,56±2,27	68,02±26,33
Minimum	12,00	14,30	31,60
Maksimum	20,00	23,10	130,80
Koeficijent varijacije (%)	12,68	12,22	38,71
Eksperimentalna grupa	Standardna dužina (cm)	Totalna dužina (cm)	Masa (g)
Srednja vrijednost	16,96±1,50	20,21±1,64	80,61±21,70
Minimum	15,70	18,50	55,10
Maksimum	20,20	23,70	125,90
Koeficijent varijacije (%)	8,86	8,12	26,91

Usporedbom rezultata morfometrijskih osobina kontrolne i eksperimentalne grupe nisu uočena odstupanja tjelesnih dužina, dok je masa tijela varijabilniji parametar. Vrijednosti morfometrijskih karakteristika ukazuju da se radi o vrlo heterogenom uzorku, u kojem su zastupljene mlađe jedinke.

Rezultati relativnih vrijednosti leukocita kontrolne i eksperimentalne grupe riba predstavljeni su u tabelama 2 i 3.

Tabela 2. Relativna vrijednost leukocita kontrolne grupe linjaka, *Tinca tinca* u procentima

Table 2. Relative value of leukocytes in control group of tench, *Tinca tinca* in percent

♂♀	Neutrofili		Pseud.	Eozin.	Bazofili	Monocit	Limfocit
	seg.	neseg.					
Srednja vrijednost	1,86	4,89	7,2	2	/	1	87,7
Standardna devijacija	0,69	2,05	3,01	0	/	0	3,26
Minimum	1	1	3	2	/	1	83
Maksimum	3	8	11	2	/	1	92
Koeficijent varijacije	37,16	41,47	41,8	/	/	/	3,71

Dobiveni rezultati krvnih elemenata kontrolnih riba ukazuju na vrlo malu zastupljenost eozinofila i monocita, kao i potpuno odsustvo bazofila. U krvi su zastupljene u visokom procentu limfociti (87,7), a zatim slijede pseudoeozinofili i neutrofili, s vrlo izraženim individualnim variranjima (37-41 %).

Tabela 3. Relativna vrijednost leukocita eksperimentalne grupe linjaka, *Tinca tinca* u procentima

Table 3. Relative value of leukocytes in experimental group of tench, *Tinca tinca* in percent

♂♀	Neutrofili		Pseud.	Eozin.	Bazofili	Monocit	Limfocit
	seg.	neseg.					
Srednja vrijednost	4,37	7,5	55,5	/	/	1	32,37
Standardna devijacija	2,67	3,93	6,37	/	/	0	6,58
Minimum	2	2	48	/	/	1	25
Maksimum	10	12	70	/	/	1	44
Koeficijent varijacije	61,01	52,37	11,48	/	/	/	20,35

Kod eksperimentalnih riba, jasno se uočava povećanje broja pseudoeozinofila koji sada čine dominantne periferne stanice, dok je broj limfocita vrlo nizak. Najveća variranja su konstatirana za neutrofile (52-61 %).

Tabela 4. Signifikantne razlike kontrolnih i eksperimentalnih riba u procentima

Table 4. Significant differences of control and experimental fish in percent

	Neutrofili		Pseudoe.	Eozin.	Bazof.	Monoc.	Limfociti
	seg.	neseg.					
Kontrolna grupa	1,86	4,89	7,2	2	0	1	87,7
Eksperimentalna grupa	4,37	7,5	55,5	0	0	1	32,37
T test	0,0164	0,0606	0,00.	/	/	/	0,00.
Sig.	p<0,05	p>0,05	p<0,05	/	/	/	p<0,05

Komparirajući obje ispitivane grupe, uočava se signifikantno smanjenje broja limfocita i povećanje broja pseudoeozinofila i segmentiranih neutrofila.

Tabela 5. Signifikantnost razlika leukocitnih formi između mužjaka i ženki linjaka, *Tinca tinca* eksperimentalne grupe

Table 5. Significant differences of leukocytes forms between male and female tench, *Tinca tinca* experimental group

	Neutrofili		Pseudo.	Eozin.	Bazof.	Monoc.	Limfoc.
	seg.	neseg.					
Srednja vrijednost ♂♂	4	7,75	55,25	0	0	0	33,75
Srednja vrijednost ♀♀	4,75	7,25	56,75	0	0	1	31
T test	0,3634	0,4364	0,3852	/	/	/	0,2987
Sig.	p>0,05			/	/	/	p>0,05

Komparirajući mužjake i ženke eksperimentalnih riba, ne uočavaju se statistički značajna odstupanja krvnih elemenata, što znači da je dejstvo termalnog stresa specijskog karaktera, bez spolnih razlika.

Diskusija

Nakon deskriptivne analize posmatranih hematoloških parametara kontrolnih riba, jasno se uočava dominantnost limfocita u perifernoj krvi, dok su na drugom mjestu pseudoeozinofili, koji nisu tako brojni. Razlog tome vjerovatno leži u činjenici da su i neutrofilni granulociti zastupljeni u vrlo niskom postotku, a da bazofili nisu niti evidentirani. Samo sporadično su utvrđeni monociti. Nizak broj pseudoeozinofila može biti i posljedica utjecaja sezone kao i niskog postotka drugih formi krvnih stanica čiju ulogu mogu preuzeti pseudoeozinofili u različitim fiziološkim uvjetima. Slične rezultate navode Tavares-Dias i sar., (16) u svojim istraživanjima hematoloških parametara *Tilapie*, gdje u okviru diferencijalne krvne slike konstatuju limfocite kao dominantnu formu, zatim trombocite i vrlo niske monocite kao i eozinofile. Za razliku od kontrolne grupe, grupa riba u termičkom stresu bilježi izrazito visoke vrijednosti pseudoeozinofila, dok su na drugom mjestu limfociti. U svakom slučaju, termički stres očigledno utječe na povećanje broja pseudoeozinofila i neutrofila, uz istovremeno smanjenje broja limfocita. Sezonska istraživanja hematoloških parametara linjaka provedena od strane Guijarra i sar., (5) bilježe značajne razlike u broju bijelih i crvenih krvnih stanica, hematokritu i hemoglobinu tokom cijele godine kod spolno zrelih mužjaka i ženki ove vrste. Najniže vrijednosti ovih parametara su zabilježene tokom perioda jesen-zima, a najveće tokom ljeta, kad je visoka temperatura vode, što je sukladno dobijenim rezultatima u našim istraživanjima.

Također, i drugi autori (1) bilježe sezonske promjene u vrijednosti hematoloških i biohemijskih parametara kod linjaka, pri čemu ističu da to treba uzeti u obzir kad se ovi parametri koriste kod ocjene fiziološkog statusa ribljih jedinki.

Komparirajući dobivene vrijednosti pojedinih formi leukocita, evidentno je da ne postoje značajnije razlike kod kontrolne i eksperimentalne grupe u broju eozinofilnih i bazofilnih granulocita, kao i monocita. Kako u termičkom stresu nije došlo do bilo kakve promjene navedenih elemenata bijele loze, to nas navodi na konstataciju da su u krvi linjaka malo zastupljene navedene forme, i kao takve nemaju značajnu ulogu u mehanizmima adaptacije usljed stresa. Istraživanja na različitim vrstama riba (22) pokazuju da većina vrsta riba izloženih hipoksiji i visokim temperaturama koriste različite strategije za borbu protiv nepovoljnih uvjeta. Jedna od tih strategija je i promjena koncentracije hemoglobina i hematokrita te povećanje koncentracije glukoze i laktata u serumu. S druge strane, zanimljivo je da je u krvi linjaka vrlo mala zastupljenost obje forme neutrofilnih granulocita, međutim, tokom termičkog stresa, njihov broj se ipak povećava, ali to povećanje nije statistički značajno, osim za segmentirane neutrofile. Prema statističkom pokazatelju, u krvi linjaka preovladavaju dvije forme leukocita, i to pseudoeozinofili i limfociti.

Pri tome treba istaći da je koeficijent variranja kod eksperimentalne grupe (61,01 %) znatno veći u odnosu na isti kod kontrolne grupe jedinki (37,16 %), jer su individualna variranja u broju segmentiranih neutrofila u stresnoj reakciji znatno izražena. Broj nesegmentiranih neutrofilnih granulocita povećava se kod riba iz eksperimentalne grupe, i ovo povećanje je na samoj granici statističke značajnosti. Vrijednosti ovih stanica u krvi linjaka više variraju kod jedinki eksperimentalne grupe (52,37 %), dok je kod kontrolne grupe koeficijent variranja nešto niži (41,47 %).

Analizirajući vrijednosti prikazane u tabeli 4, možemo konstatirati signifikantno povećanje broja pseudoeozinofilnih granulocita eksperimentalnih riba ($p < 0,05$). Za ovakvo povećanje u dostupnoj literaturi nema adekvatnog objašnjenja. Signifikantan rast broja pseudoeozinofila prati jednako statistički signifikantno smanjenje broja limfocita u termičkom stresu ($p < 0,05$).

Moguće je da je porast broja pseudoeozinofilnih oblika leukocita adaptacije linjaka na redukciju imunokompetencije koja je inducirana stresom, a ogleda se u smanjenju broja limfocita, odnosno limfocitopeniji. Pažljivom mikroskopskom analizom, da se uočiti postojanje forme pseudoeozinofila (heterofila) koje se razlikuju po vrsti granulacije ili po kombinaciji sva tri tipa granula (20). Očito da ove stanice preuzimaju ulogu neutrofila, bazofila i eozinofila, stvarajući jednu vrlo moćnu i značajnu stanicu, s potpuno novom ulogom, koja preuzima funkcije ostale tri, čineći je dominantom u perifernoj krvi. S obzirom da u uvjetima stresa imamo pojavu imunosupresije (22), preko inhibicije produkcije interleukina 3 koji aktivira limfocite i potiče ih na umnožavanje i diferencijaciju, smatramo da jedinke linjaka signifikantnim povećanjem broja pseudoeozinofila kao funkcionalno heterogenih krvnih elemenata, nastoje očuvati rezistenciju na bolesti, koja bi u suprotnom bila uveliko narušena. Ovu pojavu možemo

smatrati uspješnim oblikom fiziološke adaptacije, kako imuni sistem ne bi funkcionirao umanjenom učinkovitošću te organizam ne bi postao ranjiv na bolesti, usljed stresa.

Osim ovih promjena hematoloških parametara, u literaturi postoje podaci (12) da kod riba izloženih stresogenim faktorima, kao oblik adaptacije javlja se sposobnost redukcije metabolizma, kroz promjenu ponašanja, promjenu fizioloških procesa i metaboličkih procesa na staničnom nivou. Sve te promjene predstavljaju, u osnovi, adaptibilni odgovor organizma na dejstvo nepovoljnih okolinskih faktora. Također, Erika i sar. (4), navodi da su fiziološke adaptacije kod riba vrlo ograničene i da su specifična termička ograničenja determinirana fiziološkim ograničenjima cirkulatornog sistema, vjerovatno zbog srčanog kolapsa na visokim temperaturama.

Slične adaptibilne prilagodbe kod riba u termičkom stresu navode i drugi autori (8). Oni navode da kod riba raste stopa potrošnje kiseonika tokom oporavka od akutnog termičkog stresa, kao i da dolazi do povećanja koncentracije hemoglobina i stope srčanog rada. Zanimljivo je istaći da u ovom istraživanju, nisu zabilježene signifikantne razlike između pojedinih leukocitnih formi mužjaka i ženki eksperimentalne grupe, što govori o podjednakoj sposobnosti adaptacije na izmjene termičkog režima vode kod oba spola linjaka.

Zaključci

- Promjena uvjeta životne sredine, inducirana promjenom termičkog režima, bitno se manifestira na hematološki status linjaka
- U krvi linjaka su eozinofilni granulociti i monociti zastupljeni u vrlo malom broju, dok bazofilni granulociti nisu utvrđeni
- Najzastupljenije forme leukocita u krvi linjaka su pseudoeozinofili i limfociti
- Termički stres dovodi do značajnog povećanja neutrofilnih granulocita, pseudoeozinofila i pada broja limfocita
- Mehanizam adaptacije na stresore ogleda se u značajnom povećanju broja pseudoeozinofila kao dominantnih stanica leukocitne loze
- Nisu utvrđene statistički značajne razlike između spolova, ali povećane vrijednosti ukupnog broja leukocita ukazuju na ujednačene adaptacijske mehanizme kod oba spola.

LITERATURA

1. De Pedro N, Guijarro AI, López-Patiño MA i sar. Daily and seasonal variations in hematological and biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture research*. 2005;36:1185-1196.

2. Đikić D, Lisičić D, Skaramuca D, i sar. Blood cellular components in wild caught *Murena helena* (Muraenidae). *Cybium*. 2011;35:149-156.
3. Ellis AE. Leucocytes of fish. *Journal of Fish Biology*. 1977;11: 453-491.
4. Erika J, Eliason EJ, Clarc TD, i sar. Differences in Thermal Tolerance Among Sockeye Salmon Populations. *Science*. 2011;332:109-112.
5. Guijarro AI, Lopez-Patiño MA, Pinillos ML, i sar. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. *Journal of Fish Biology*. 2003;62: 803-815.
6. Hasković E, Ivanc A. Praktikum Uporedne fiziologije životinja i čovjeka, Prirodno-matematički fakultet, Sarajevo. 2007.
7. Homątowska A, Wojtaszek J, Adamowicz A. Haematological indices and circulating blood picture in the Sunbleak, *Leucaspius delineates* (Heckel, 1843). *Zoologica Poloniae*. 2002;47:57-68.
8. Jayasundara N, Somero GN. Physiological plasticity of cardiorespiratory function in a eurythermal marine teleost, the longjaw mudsucker, *Gillichthys mirabilis*. *Journal of Experimental Biology*. 2013;216: 2111-2121.
9. Jezierska B, Witeska M. Metal toxicity to fish. University of Podlasie, Siedlce. 2001;51-68.
10. Kapoor BG, Bhavna K. *Ichthyology Handbook*. Narosa Publishing House. Springer-Verlag Berlin and Heidelberg GmbH & Co. K. 2004.
11. Pavlović V. *Hronobiologija*. Svjetlost. Sarajevo. 1985;77-80.
12. Richards JG. Metabolic Rate Suppression as a Mechanism for Surviving Environmental Challenge in Fish. *Aestivation, Progress in Molecular and Subcellular Biology*. 2010;49:113-139.
13. Roberts HE. *Fundamentals of Ornamentals Fish Health*. Blachwell Publishing. 2010;152-214.
14. Shatunovskij MI. Age physiology and issues concerned with the control of metabolic processes in fish. *Bibliography*. 1988;138-139.
15. Szabo S. Hans Selye and the development of stress concept: Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998;851:19-27.
16. Tavares-Dias M, Moraes FR. Características hematológicas de *Tilapia rendalli* Boulenger, 1896 (Osteichthyes: Cichlidae) capturada em “pesque-pague” de Franca, São Paulo, Brasil. *Bioscience Journal*. 2003;19(1):107-114.
17. Tavares-Dias M, Moraes FR. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto,. Villimpress. 2004;1:144.
18. Tavares-Dias M, Barcellos JFM. Peripheral blood cells of the armored catfish *Hoplosternum littorale* Hancock: a morphological and cytochemistry study. *Brazilian Journal of Morphologic Science* 2005; 22: 215-220.
19. Tavares-Dias M, Moraes FR. Morphological, cytochemical, and ultrastructural study of thrombocytes and leukocytes in neotropical fish, *Brycon orbignyanus*

- (Valenciennes, 1850) (Characidae, Byconinae), Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology. 2006b; 38: 209-215.
20. Tavares-Dias M, Affonso EG, Oliveira SR, i sar. Comparative study on hematological parameters of farmed matrinxa, *Brycon amazonicus* Spix and Agassiz, 1829 (Characidae: Bryconinae) with others Bryconinae species. Acta Amazonica. 2008;38:4-12.
 21. Thrall MA, Baker DC, Duane L E. (2004): Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincot Williams & Wilkins. 2004.
 22. Wendelaar BSE. The stress response in fish. Physiological. Reviews.1997;77:591-625.

Uredništvo primilo rukopis 20.09.2013.