

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Mr. sc. Slavica Čolak, dr. vet. med.

**BIOKEMIJSKI PROFIL HEMOLIMFE TRIJU VRSTA
DEKAPODNIH RAKOVA**

Disertacija

Zagreb, 2011

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

Mr. sc. Slavica Čolak, dr. vet. med.

Biokemijski profil hemolimfe triju vrsta dekapodnih rakova

Disertacija

Voditelj: Dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovec

Institut „Ruđer Bošković“

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Tomislav Treer

Agronomski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu

Zagreb, 2011.

Sveučilište u Zagrebu

Agronomski fakultet

Zavod za ribarstvo, pčelarstvo i specijalnu zoologiju

Pristupnica: Mr. sc. Slavica Čolak, dr. vet. med.

Ocjena doktorskog rada, naslova: „Biokemijski profil hemolimfe triju vrsta dekapodnih rakova prihvaćena jena ...sjednici Fakultetskog vijeća.

Disertacija je obranjena.....2011. godine pred stručnim povjerenstvom u sastavu:

Predsjednik Povjerenstva:

Članovi Povjerenstva:

Dr. sc.....

Agronomski fakultet, Zagreb

Doc. dr. sc. Marina Piria

Agronomski fakultet, Zagreb

Dr. sc. Tomislav Šmuc

Institut „Ruđer Bošković“

Prof. dr. sc. Ivica Aničić

Agronomski fakultet, Zagreb

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za ihtiopatologiju-biološke materijale, Institut
„Ruđer Bošković“ pod voditeljstvom Dr. sc. Rozelindre Čož-Rakovac

ZAHVALA

Zahvaljujem se svima koji su svojim zalaganjem i nesebičnošću pripomogli pri izradi ove disertacije.

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Rozelindri Čoz-Rakovac na pruženoj pomoći i savjetima tijekom pisanja rada. Prof. dr. sc. Tomislavu Treeru i prof. dr. sc. Ivici Aničiću hvala na toploj podršci, na svim savjetima i sugestijama.

Veliko hvala dr. sc. Ivančici Strunjak-Perović, dr. sc. Nataliji Topić Popović, dr. sc. Margiti Jadan, dr. vet. med. Josipu Barišiću na pomoći pri praktičnom dijelu laboratorijskih analiza. Dr. sc. Tomislavu Šmucu zahvaljujem na pomoći pri obradi podataka korištenjem matematičkih metoda strojnog učenja i dr. sc. Bjanki Ljubić na pomoći kod obrade uzoraka hemolimfe na biokemijskom analizatoru. Dr. sc. Ivani Boćini zahvaljujem na pomoći kod očitavanja histoloških preparata.

Dragim prijateljima Damiru i Doris Velemiru, Korneliji Stipčević, Aleju Kovačeviću, Nenadu Grozdaniću, Zlatku Vrdoljaku, Branimiru Baždariću i Vici Katačiću hvala na nesebičnoj pomoći pri sakupljanja uzoraka.

Ovim putem zahvaljujem mr. sc. M. Lovrinovu i dr. sc. Lavu Bavčeviću na pruženom strpljenju i savjetima tijekom mog rada i napredovanja.

Posebnu zahvalnost dugujem svojoj obitelji koja mi je životna podrška.

.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

Disertacija

BIOKEMIJSKI PROFIL HEMOLIMFE TRIJU VRSTA DEKAPODNIH RAKOVA

Slavica Čolak, dr. vet. med.

Kratki sažetak

Kod tri tržišno važne vrste dekapodnih rakova – jastoga *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787.), velike rakovice *Maja squinado* (Herbst, 1788) i grmalja *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775) provedeno je opširno istraživanje biokemijskih parametara hemolimfe (metaboliti, enzimi i minerali) sa svrhom utvrđivanja i standardizacije biokemijskih profila hemolimfe unutar pojedine vrste, kao i utvrđivanja razlika među njima. Obradili su se sljedeći parametri hemolimfe: TP, CHOL, TRIG, GLU, BUN, CREA, ALP, CK, AST, GGT, LDH, Ca, Mg, Cu, Zn. U sve 3 vrste rakova razine pojedinih biokemijskih parametara su se razlikovale. Rakovice se značajno razlikuju od jastoga ($P < 0.05$) u razini LDH, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Mg, Cu i Zn., dok se od grmalja razlikuju ($P < 0.05$) u razini LDH, CK, TP, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Cu i Zn. Jastog se značajno razlikuje od grmalja ($P < 0.05$) u CREA, TP, GGT, CHOL, TRIG, BUN; AST, GLU i Cu. Matematičkom metodom dubinske analize podataka koja koriste algoritme iz područja strojnog učenja uspješno se razdvojilo tri vrste rakova, točnost algoritma slučajnih šuma je 89,63 % i algoritma stabla odlučivanja 86,31 %.

Ova doktorska disertacija sadrži: 130 stranica, 64 slike, 50 tablice, 242 literaturna navoda,

Izvorni jezik: hrvatski

Ključne riječi: rak, *Maja squinado*, *Palinurus elephas*, *Eriphia verrucosa*, hemolimfa, biokemija

Voditeljica: Dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac

Suvoditelj: Prof. dr. sc. Tomislav Treer

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada: Doc. dr. sc. Marina Piria
Dr. sc. Tomislav Šmuc
Prof. dr. sc. Ivica Aničić

Disertacija je prihvaćena: _____

Disertacije je obranjena

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

PhD thesis

HEMOLYMPH BIOCHEMISTRY PROFILE OF THREE DECAPOD CRUSTACEANS

Slavica Čolak, DVM

Abstract

The study thoroughly examines the hemolymph biochemistry profiles of the three commercially important decapod crustaceans: spiny lobster *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787.), spider crab *Maja squinado* (Herbst, 1788) and warty crab *Eriphia verrucosa* (Forsk., 1775). The aim of the study is to examine and standardize the hemolymph biochemistry profile in each species and detect the differences between them as well. The following parameters have been examined: TP, CHOL, TRIG, GLU, BUN, CREA, ALP, CK, AST, GGT, LDH, Ca, Mg, Cu, Zn. The levels of the biochemical parameters differed between the 3 species. *Maja squinado* significantly differed from *Palinurus elephas* ($P < 0.05$) in the levels of LDH, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Mg, Cu i Zn., and from *Eriphia verrucosa* ($P < 0.05$) in the levels of LDH, CK, TP, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Cu i Zn. *Palinurus elephas* significantly differed from *Eriphia verrucosa* ($P < 0.05$) in the levels of CREA, TP, GGT, CHOL, TRIG, BUN; AST, GLU i Cu. The three crustaceans were successfully distinguished using the mathematical data mining method which uses the algorithms from machine learning methods. The accuracy of the random forest algorithm is 89,63 % and from the decision trees algorithm is 86,31 %.

This paper consists of: 130 pages, 64 figures, 50 tables, 242 references,
Original language: Croatian

Keywords: crustacean, *Maja squinado*, *Palinurus elephas*, *Eriphia verrucosa*
haemolymph, biochemistry

Supervisor: Dr. sc. Rozelindra Čož-Rakovac
Prof. dr. sc. Tomislav Treer

Reviewers: Doc. dr. sc. Marina Piria
Dr. sc. Tomislav Šmuc
Prof. dr. sc. Ivica Aničić

Thesis accepted: _____
Thesis defended:

Kazalo

ZAHVALA	V
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	VI
BASIC DOCUMENTATION CARD	VII
KAZALO	VIII
1. UVOD	1
2. HIPOTEZA I CILJ ISTRAŽIVANJA	4
3. LITERATURNI PREGLED	5
3.1. SISTEMATIKA I BIOLOGIJA ISTRAŽIVANIH DESETERONOŽNIH RAKOVA	5
3.1.1. Biologija velike rakovice	5
3.1.2. Biologija jastoga	6
3.1.3. Biologija grmalja	8
3.2. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA ORGANSKIH SUSTAVA DESETERONOŽNIH RAKOVA	9
3.2.1. Probavni sustav	11
3.2.1.1. Prednje crijevo	11
3.2.1.2. Srednje i stražnje crijevo.....	13
3.2.2. Optjecajni sustav	14
3.2.2.1. Hemolimfa	17
3.2.2.2. Obrambeni mehanizam	19
3.2.2.3. Biokemijski parametri hemolimfe	21
3.2.2.3.1. Metaboliti.....	21
3.2.2.3.2. Enzimi	24
3.2.2.3.3. Elektroliti	25
3.2.3. Reproduktivni sustav	26
3.2.3.1. Sjemenici, spermiji i spermatofori.....	27
3.2.3.2. Jajnici, jajne stanice i vitelogeneza	28
3.2.4. Dišni sustav	29
3.2.5. Osmotska regulacija.....	30
3.2.5.1. Ekskrecijski organi.....	31
3.2.6. Endokrini sustav.....	33
3.2.7. Građa integumenta i presvlačenje.....	35
3.2.7.1. Presvlačenje ili ekdisis	35

3.2.8. Bolesti	37
3.2.8.1. Bakterijske bolesti.....	37
3.2.8.2. Virusne bolesti	38
3.2.8.3. Gljivične bolesti	39
3.2.8.4. Parazitarne bolesti	40
4. MATERIJALI I METODE	41
4.1. ISTRAŽIVANI RAKOVI I KREIRANJE EKSPERIMENTA	41
4.2. METODA ULOVA.....	42
4.3. BIOMETRIJSKA MJERENJA UZORAKA RAKOVA.....	44
4.4. ODREĐIVANJE STADIJA PRESVLAČENJA	45
4.5. ODREĐIVANJE SPOLA	46
4.6. OBRADA UZORAKA HEMOLIMFE I BIOKEMIJSKE ANALIZE HEMOLIMFE	49
4.7. HISTOLOŠKE ANALIZE	50
4.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	51
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA	53
5.1. BIOMETRIJSKA MJERENJA ISTRAŽIVANIH VRSTA RAKOVA	53
5.1.1. Biometrijska mjerenja rakovice <i>Maja squinado</i>	53
5.1.2. Biometrijska mjerenja jastoga <i>Palinurus elephas</i>	54
5.1.3. Biometrijska mjerenja grmalja <i>Eriphia verrucosa</i>	55
5.2. BIOKEMIJSKA MJERENJA ISTRAŽIVANIH VRSTA RAKOVA.....	56
5.2.1. Biokemijska mjerenja rakovice <i>Maja squinado</i>	56
5.2.2. Biokemijska mjerenja jastoga <i>Palinurus elephas</i>	61
5.2.3. Biokemijska mjerenja grmalja <i>Eriphia verrucosa</i>	67
5.3. USPOREDBE IZMEĐU VRSTA RAKOVA U BIOKEMIJAMA HEMOLIMFE	73
5.4. DUBINSKE ANALIZE BIOKEMIJSKIH PARAMETARA	84
5.5. HISTOLOŠKE ANALIZE.....	91
5.5.1. Histološke analize rakovice <i>Maja squinado</i>	91
5.5.2. Histološke analize jastoga <i>Palinurus elephas</i>	95
5.5.3. Histološke analize grmalja <i>Eriphia verrucosa</i>	99
6. RASPRAVA	103
7. ZAKLJUČCI.....	117
8. CITIRANA LITERATURA	118
9. ŽIVOTOPIS	X
10. POPIS OBJAVLJENIH RADOVA	XI

1. UVOD

Analize krvi u humanoj medicini, kao i kod viših kralježnjaka (sisavci, ptice) vrlo su važne metode utvrđivanja fizioloških i patoloških stanja organizma. Nasuprot tome, određivanje ovih parametara u krvi nižih kralježnjaka, a posebno u tekućinama optjecajnog sustava beskralježnjaka, još je najčešće u početnim fazama istraživanja. Hemolimfa dekapodnih rakova, kao njihova osnovna strukturna i funkcionalna jedinica, podložna je fiziološkim promjenama koje je moguće sagledati kroz biokemijske pokazatelje na ekstracelularnoj razini. Ove promjene su inducirane biotskim (vrsta, dob, spol, fiziološko stanje organizma) i abiotskim (kakvoća vode, temperatura) čimbenicima.

Istraživanja hemolimfe rakova su malobrojna i do sada obavljena isključivo na vrstama koje ne obitavaju u Jadranskom moru. Njima je utvrđeno da se pojedini biokemijski parametri hemolimfe mijenjaju obzirom na fiziološke procese kroz koje organizmi prolaze tijekom različitih razvojnih faza, kao što su razvoj gonada i proces presvlačenja, ujedno ukazujući i na promjene okoliša u kojem rakovi borave (Dove i sur., 2005; Travis, 1955 b). Neka od dosadašnjih istraživanja koja su obavljena na rakovima odnosila su se na određivanje dobi utvrđivanjem sadržaja lipofuscina u centralnom živčanom sustavu, što je potom pomoglo u procjeni reproduktabilnosti rakova (Maxwell i sur., 2009). Marco i suradnici (1998) istraživali su neuropeptidne hormone koji reguliraju mnoge fiziološke procese kao što su reprodukcija, metabolizam glukoze i pigmentacija. Velazquez (2003) razlaže povezanost reproduktabilnosti i promjene uvjeta okoliša. Hormonalne promjene u hemolimfi kao indikatori onečišćenja okoliša ili promjena parametara okoliša, kao što su zatopljavanje ustanovljene su i time je potvrđena mogućnost korištenja rakova kao biomarkera antropogenetskih kemijskih onečišćenja (Lorenzon, 2005). Antropogena onečišćenja nerijetko se akumuliraju u moru iz kojeg se velik broj vrsta lovi za prehranu ljudi. Procjenjuje se da više od 2 milijarde ljudi ovisi o proteinima iz mora (Bowen i Depledge, 2006). To naglašava važnost provođenja istraživanja sa svrhom proširenja znanja vezanih za biologiju, fiziologiju i standardizaciju biokemijskih profila hemolimfe rakova kao bioloških senzora. Histologija pojedinih organa (jetre, mišića, škrge, gonada) omogućuje povezivanje biokemijskih parametara s morfološkim i funkcionalnim stanjem tkiva.

Dosadašnja istraživanja provedena na biokemijskim parametrima i njihovoj standardizaciji pokazala su da postoje varijacije u vrijednostima metabolita, hormona, enzima, ali isto tako i elektrolita krvi riba ovisno o biotskim i abiotskim faktorima, npr. utjecaju sezone, temperature okoliša, ishrane i vrste (Čož-Rakovac i sur., 2002; Adams, 1990; Čož-Rakovec i sur., 2005; McDonald, 1992; Čož-Rakovec i sur., 2009; Čož-Rakovec i sur., 2008 b; Čož-Rakovec i sur., 2008 a; Topić Popović i sur., 2008). Kod tri vrste uzgajanih jadranskih riba – lubina (*Dicentrarchus labrax*), komarče (*Sparus aurata*) i cipla (*Mugil spp.*) jasno se pokazalo da sezona i način ishrane kod svake vrste daju specifične rezultate u biokemiji njihove krvi (Čož-Rakovac i sur., 2009). Malo je biokemijskih i histoloških istraživanja tkiva na vrstama *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787), *Maja squinado* (Herbst, 1788) i *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775) (Dulčić i sur., 1995; Gamulin, 1995; Slavica i sur., 1998).

Rakovi u gladovanju ne mijenjaju vanjski izgled ni težinu jer izgubljeno tkivo nadomještaju vodom. Mogući pokazatelji hranidbenog stanja su težina hepatopankreasa ili mišićnog tkiva ekstremiteta, ali to podrazumijeva ubijanje ili ozljeđivanje životinje. Idealna metoda procjene hranidbenog statusa, zdravstvenog stanja, stadija presvlačenja i razine stresa mogla bi biti pretraga hemolimfe kao nedestruktivna metoda i osjetljivija od onih metoda koje se oslanjaju na fiziološke promjene organa (Dall, 1974 b; Floreto i sur., 2000; Jussila i sur., 2001; Chang, 2005). Ovakva istraživanja dodatno značenje dobivaju kod životinja interesantnih u uzgoju, ulovu ili preradi, kao što su tri komercijalno važne vrste dekapodnih rakova – jastog *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787.), velika rakovica *Maja squinado* (Herbst, 1788) i grmalj *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775). Kod ovih vrsta ne postoje opširna istraživanja biokemijskih parametara hemolimfe (metaboliti, enzimi i hormoni). Stoga ih je važno provesti sa svrhom utvrđivanja i standardizacije biokemijskih profila hemolimfe unutar pojedine vrste, kao i utvrđivanja razlika među njima. Time će se stvoriti nova znanja o specifičnosti vrsta obzirom na strukturu i funkciju hepatopankreasa, funkciju ekskretornih organa, strukturu proteina i energetske metabolizam. Uz to, dopunit će se znanja vezana za biologiju i fiziologiju ovih vrsta, što će pomoći pri budućoj mogućnosti uzgoja rakova od mriješta do konzumne veličine.

U Kanadi, SAD-u i Australiji napravilo se mnogo da bi se omogućio uzgoj jastoga. Znanja koja se moraju steći da bi se moglo uzgajati rakove od mriješta do konzumne veličine multidisciplinarna su, ali ipak započinju sa osnovnim

poznavanjem biologije i fizioloških procesa kao što su ciklus presvlačenja, hranidba, bolesti, spolno ponašanje i genetika (Cobb i Phillips, 1980; Chittleborough, 1974). Budući da se jastog, zbog visoke cijene koja se za njega može postići na tržištu, sve intenzivnije iskorištava, potrebno je upoznati se sa svim čimbenicima koji nam mogu pomoći u monitoringu zdravstvenog stanja jastoga.

Prirodni resursi tržišno zanimljivih vrsta rakova najčešće su u prelovu ili u max. održivom lovu (Cetinić i sur., 1997; Philips, 2005). Razlog manjeg lova može biti bolest prirodne populacije, te su tako Shields i Behringer (2004) ustanovili virusnu infekciju u jastoga *Panulirus argus* kao mogući uzrok 45% smanjenog ulova. U istraživanju Gaffkemije, najpoznatije bolesti jastoga, Stewart i suradnici (1966 a) susreli su se sa problemom nedostatka fizioloških podataka i biokemijskih parametara koji bi služili kao osnova istraživanja.

U novije vrijeme znatna se pažnja posvećuje, uz klasičnu statistiku i matematičkoj obradi podataka s ciljem da omogući što objektivnije uočavanje specifičnosti kod pojedinih organizama, te istovremeno naglasi povezanost pojedinih podataka s njihovim uzrocima. Postupak “machine learning methods” su na podacima iz poljoprivrede razradili još 1995. godine McQueen i sur., dok su je Mastrotillo i sur. (1997) uspješno primijenili predviđajući udio riba male veličine tijela u rijekama. Prednost uporabe ove matematičke obrade podataka, u odnosu na klasičnu statističku obradu, zbog njezine sposobnosti neovisnog grupiranja podataka, u humanoj hematologiji pokazali su Poynton i sur. (2009). Među ovim metodama dobru procjenu rezultata pokazuje obrada pomoću algoritama („decision tree model“). Njezinu uspješnost u identificiranju preferencija prema staništima morskih trpova pokazali su Dzeroski i Drumm (2003). Ova metoda primijenjena u hematologiji riba, gdje su na ovaj način obrađeni biokemijski parametri, olakšala je njihovu standardizaciju (Čož-Rakovec i sur., 2008 a, b; 2009). Uz to je pokazala da se na ovaj način korektno klasificira 85,71 % uzoraka, te jasno na temelju svojih biokemijskih osobina identificiraju tri vrste morskih riba – lubin, komarča i cipal. Stoga će ta metoda biti primijenjena i u ovim istraživanjima.

2. HIPOTEZA I CILJ RADA

Pretpostavka je da su biokemijski profili hemolimfe pojedinih vrsta rakova, čija se staništa nalaze na različitim dubinama, te čiji se biološki ciklusi odvijaju u različito doba godine, međusobno različiti, kao i da ujedno odražavaju znatan utjecaj biotskih faktora (vrste, spola, dobi) na biokemijsku sliku.

Ovim istraživanjem očekuju se nove spoznaje u području:

- Fiziološkog raspona biokemijskih parametara hemolimfe triju vrsta rakova u međusvlačnom periodu
- Povezanost biokemijskih parametara s morfološkim i funkcionalnim stanjem tkiva
- Modeliranje biokemijskih profila vrsta

Ovi rezultati će poslužiti kao znanstveno utemeljena podloga za bolje i održivo gospodarenje i zaštitu ovih vrsta rakova.

3. LITERATURNI PREGLED

3.1. SISTEMATIKA I BIOLOGIJA ISTRAŽIVANIH DESETERONOŽNIH RAKOVA

3.1.1 BIOLOGIJA VELIKE RAKOVICE

Razred: Crustacea

Podrazred: Malacostraca

Red: Decapodi

Podred: Macrura reptantia

Sekcija: Brachyra (Latreille, 1803)

Porodica: Maiidae (Samouelle, 1819)

Vrsta: *Maja squinado* (Herbst, 1788)

Velika rakovica *Maja squinado* pripada porodici *Maiidae*, rakovica. Dugačka je prosječno 111 cm, može doseći i do 250 mm dužine i težinu do 1,5 kg. Životni ciklus traje 5-8 godina i podijeljen je na razdoblje rasta (2-3 godine) koje završava terminalnim presvlačenjem i razdoblje zrelosti tj. reprodukcije koje može trajati 6 godina (De Kergariou, 1984). Živi u Mediteranu, istočnom Atlantiku od Sjevernog mora do sjevera Afrike (Neumann, 1998). Boje je smeđerumene, a po nogama crveno izmrljana. Obitava po čitavom Jadranu. Živi na svakom dnu, ali se najviše zadržava na ljušturastom i koraljnom dnu (Štević 1968 b). Pokazuje sezonalnu i demografsku varijaciju u odnosu na dubinu, pa je ljeti u uzobalnom i plićem moru do 30 metara dubine, a tijekom zime se može naći u dubinama i do 120 metara (De Kergariou, 1984). Mladi primjerci zadržavaju se u plitkim zaštićenim područjima. Svejed je, iako se pretežno hrani algama. Mrijesti se u proljeće i u prvom dijelu ljeta, pri čemu ženka može imati tvrdi oklop. Ženka je odrasla jedinka pri dužini tijela min. 13 cm, a mužjak pri dužini tijela min. 13,3 cm (Sampedro i sur., 1999). Uglavnom se love u uzobalnom području. U mjesecu svibnju odrasle rakovice se vraćaju u plitka područja i često skupljaju u nakupine kojima je svrha zaštita od prirodnih neprijatelja u vrijeme presvlačenja (Štević, 1971). Jednako tako nakupine jedinki se pojavljuju i u studenom što se podudara sa povratkom odraslih rakovica u dublja područja (Sampedro i Gonzales-Gurriaran, 2004). Srednja lovna težina je oko 0,30 kilograma (Milišić, 2008).



Slika 1. Velika rakovica, *Maja squinado* (Herbst, 1788)

3.1.2. BIOLOGIJA JASTOGA

Razred: Crustacea

Podrazred: Malacostraca

Red: Decapodi

Podred: Macrura reptantia

Sekcija: Palinura

Porodica: Palinuridae

Vrsta: *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787)

Jastog, *Palinurus elephas* pripada porodici *Palinuridae*. Dugačak do 45 cm i težak 6-8 kg. Srednja lovna težina iznosi 0,60 kilograma (Milišić, 2008). Demerzalna je vrsta i gospodarski najvažniji rak u istočnom Jadranu (Cetinić i sur., 1997). Jastog živi i u istočnom dijelu Atlantskog oceana od Norveške do Mauritanije. U Sredozemnom moru je čest. Uz hlapa je najveći jadranski rak. Boje je crvenkastoljubičaste. Obitava uzduž čitave jadranske obale, uglavnom na hridinastim predjelima. Zalazi do 160 metara dubine, najviše mu odgovaraju položaji okrenuti prema jugu. Najbrojniji je između 30 i 80 metara. Najgušća naselja su viško, lastovsko i mljetsko podmorje.



Slika 2. Jastog, *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787)

Hrani se raznovrsnim bodljikašima, školjkašima, puževima, ribom te različitim uginulim organizmima. Hranidba ovisi o starosti odnosno veličini, te se tako sa veličinom povećava udio ribe u hrani (Goni i sur. 2001). Podatke o njegovoj biologiji, rasprostranjenosti i najpovoljnijim lovnim područjima na istočnoj obali Jadrana, o razdoblju lova, ribolovnim alatima i o zaštiti iznosi Grubišić (1954). Aktivni su uglavnom noću. Mrijesti se od jeseni pa tijekom cijele zime (Grubišić, 1982). Sparivanje jastoga obavlja se između mužjaka tvrdog oklopa i ženke tvrdog oklopa (Marin, 1986). Ženka je spolno zrela pri dužini tijela od min. 21cm, a mužjak pri dužini tijela od min. 22 cm za što im treba najmanje četiri godine života. Nedorasli primjerci presvlače se dva puta godišnje (u proljeće i jesen), dok se spolno zrela ženka presvlači samo jednom godišnje i to u proljeće (Slavica i sur., 2004). Ženka nosi pod zatkom grozdove jaja. Inkubacija traje 3-9 mjeseci i ovisna je o temperaturi. Ličinački period je dug, sa deset presvlačenja i može trajati 4-6 mjeseci kako navodi Jardas (1988), ili 64-148 dana kako navodi Kittaka (2000). Juvenilni jastozi *Panulirus cygnus* ne žive na istom području sa odraslim primjercima već u zaštićenim plitkim lagunama gdje provedu prve tri godine do 5 godina i zatim se pridružuju odraslim primjercima (Phillips i sur., 1977).

3.1.3. BIOLOGIJA GRMALJA

Razred: Crustacea

Podrazred: Malacostraca

Red: Decapodi

Podred: Macrura reptantia

Sekcija: Brachyura

Porodica: Xanthidae

Vrsta: *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775)

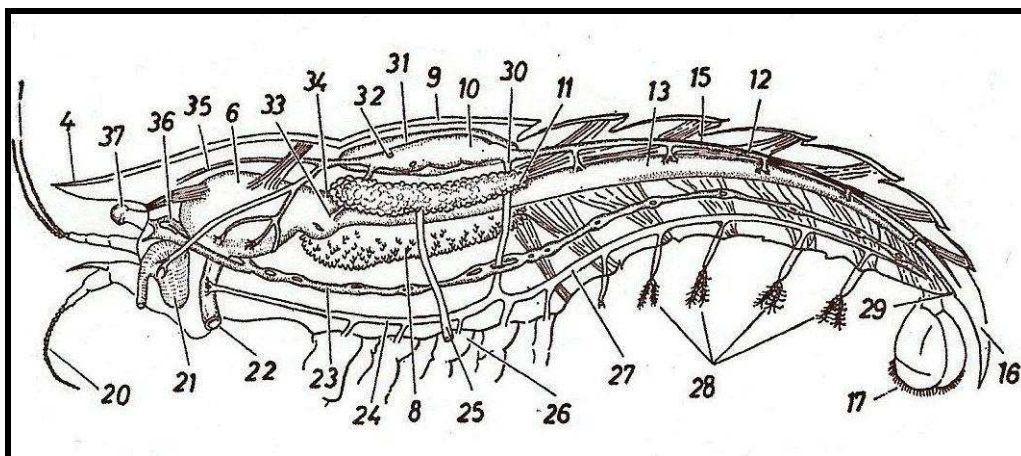
Grmalj, *Eriphia verrucosa* pripada porodici *Xanthidae*. Živi u Mediteranu te u istočnom Atlantiku od Biskajskog zaljeva do Mauretanijske. Boje je crvenkastosmeđe do zelenocrnkaste, sa žutim mrljama. Naraste u duljinu do 120 milimetara, a težine do 0,40 kilograma. Prosječni primjerak teži 0,05 kilogram (Milišić, 2008). Nalazimo ga rasprostranjenog po škrapljivim i grebenastim obalama u plitkom moru (Flores i Paula, 2001). Hrani se školjkama i puževima (Silva i sur., 2010). Rasprostranjen je po cijeloj obali Jadranskog mora. Mrijesti se u od lipnja do kraja kolovoza (Erkan i sur., 2008).



Slika 3. Grmalj, *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775)

3.2. ANATOMIJA I FIZIOLOGIJA ORGANSKIH SUSTAVA DESETERONOŽNIH RAKOVA

Vodeni biotop primarno je stanište rakova. Najveći broj rakova živi u moru, dok ostali nastanjuju vode na kopnu i kopno (Matoničkin i sur., 1999). Tijelo rakova izgrađeno je od prostomija sprijeda, različitog broja kolutića i telsona na kraju. Stalan broj kolutića imaju samo viši raci *Malacostraca*. Jednostavniji oblici viših rakova imaju 21 trupni kolutić, a ostalima je posljednji trupni kolutić reduciran u potpunosti, te ih je 20. Među kolutićima mogu se razlikovati glaveni kolutići (cefalomere), prsni kolutići (torakomere ili pereiomere) i zadčani kolutići (pleomere). Kod desetoronožaca granica između pereiona i pleona nalazi se iza 8. pereiomere. Dolazi i do duplikature kože, karapaksa koji se na leđnoj strani spoji sa pereionom. Postrani rubovi periomera su slobodni te kao škržni pokrovi, branhioستي, zatvaraju oko bokova tijela sa svake strane postranu škržnu šupljinu.



Slika 4. Opća anatomija (preuzeto iz Matoničkin i sur., 1999) 1. antenule, 4. rostrum, 6. žvačni želudac, 8. žlijezda srednjeg crijeva, 9. stijenka tijela, 10. srce, 11. jajnik, 12. stražnja aorta, 13. crijevo, 15. živčana vrpca pleona, 16. telson, 17. uropod, 20. antena, 21. zelena žlijezda, 22. usta, 23. živčana vrpca pereiona, 24. ventralna arterija pereiona, 25. jajovod, 26. treći pereipod, 27. ventralna arterija pleona, 28. pleopodi, 29. crijevni otvor, 30. sternalna arterija, 31. osrčje, 32. ostija, 33. arterije žlijezde srednjeg crijeva, 34. pilorički želudac, 35. očna arterija, 36. mozak, 37. oko

Dva su podreda desetoronožnih rakova, plivači (*Natantia*) i puzači (*Reptantia*). Puzači su, s obzirom na dužinu zatka ili repa razvrstani na dugorepce, srednjorepce i kratkorepce

(Treer i Tucak, 1991). Kod dugorepaca je zadak dugačak i krupan, te završava sa repnom lepezom. Manji mekani zadak imaju srednjorepci, a manji zavrnut poput male pločice ispod glavopršnjaka imaju kratkorepci.

Na glavi rakova najčešće se ističu dva para ticala ili antene koja služe kao osjetni organi, ali mogu koristiti i za kretanje i pridržavanje. Prva ticala služe za primanje opipnih i mirisnih podražaja. Druga ticala građena su najčešće kao rašljaste nožice i služe za veslanje. Noge na trupu su prsne noge ili pereopodi i zadčane noge ili pleopodi. Viši raci imaju 8 pari prsnih nogu, razvrstane u dva dijela. Kod deseteronožaca su tri para čeljusne noge, a pet pari nogu služi za hodanje. Viši raci imaju 6 pari zadčanih nogu koje su građene kao prave rašljaste noge. Kod mužjaka deseteronožaca prva su dva para izmijenjena u organ za parenje.

Tjelesna šupljina podijeljena je pregradama u nekoliko komorica. Postoji velika središnja šupljina, crijevni zaton, u kojem se nalazi probavilo, a sa svake strane su bočni zatoni u kojima su mišići. Gotovo svi mišići su poprečno-prugasti. Na leđnoj strani je perikardijalni zaton. Svi prostori obavijeni su epitelom i sadrže hemolimfu. Raci primaju kisik iz vode. Kod rakova s odebljalom kutikulom obično su epipoditi pereipoda povećani i na razne načine razvijeni u škrge.

Većina se rakova razvija preobražavanjem ličinke. Prvobitni oblik ličinke je nauplij. U viših rakova taj zametni nauplij napreduje u jajetu, pa se razvijaju novi kolutići i nastane ličinka zoeja. Ličinka nauplij ima oblik listonošca. Njezino tijelo nije kolutićavo i na njemu su tri para udova iz kojih se u tijeku preobrazbe razvijaju prednja i stražnja ticala te gornje čeljusti. Sprijeda ličinka ima nauplijevo oko, a na kraju tijela dvije vilične četine. Slijedeći kolutići budućeg raka nastaju na starijem naupliju, time mu se tijelo produljuje, pa postaje metanauplij.

Viši raci napuštaju jaja u stadiju naprednije ličinke zoeje koja već ima parne oči i začetke svih kolutića, samo na zadnjih 6 kolutića nema još nikakvih nogu. Na tijelu zoeje već je odijeljen glavopršnjak i maleni zadak. Da lakše lebdi zoeji su na glavopršnjaku izrasle velike bodlje. Zoeja ima neparno nauplijevo oko i velike parne sastavljene oči. U tijeku preobrazbe izrastu prsne noge, zadčane noge, pa se zoeja razvije u metazoeju i daljnjom preobrazbom u odraslu jedinku. Nametnički raci imaju nazadnu preobrazbu jer se najveći dio organa ličinke smanji, u nekim slučajevima i nestanu, pa je odrasla jedinka jednostavnije građe od ličinke.

Većina se rakova brine za svoje potomstvo, osim pučinskih rakova koji ispuštaju jaja u vodu. Deseteronožci čuvaju jaja na nogama pleopodija, neki ih sakrivaju na zaštićena mjesta, a kod nekih se leglo razvija u ležnom prostoru. S promjenom godišnjih doba mijenja se i oblik

nekih rakova, ljeti su veći, a zimi manji. Te promjene se očituju u duljini, obliku tijela i broju embrioniranih jaja u ležnom prostoru. Pri svakoj povoljnoj povišenoj temperaturi poveća se i broj jaja u ležnom prostoru. Ako se toplinski optimum prekorači tada se kao i pri sniženoj temperaturi vode broj jaja smanji.

3.2.1. PROBAVNI SUSTAV

Probavni sustav ima ulogu uzimanja hrane, mehaničkog usitnjavanja, kemijske i biokemijske razgradnje, stanične apsorpcije i uklanjanja ekskreta. Unatoč značajnim razlikama u građi probavnog sustava deseteronožaca, osnovne značajke na staničnoj razini, mehanizam apsorpcije i uskladištenja hranjivih tvari, su zajedničke (Ceccaldi, 1998 b).

Probavni trakt odraslih deseteronožaca podijeljen je na tri glavna dijela:

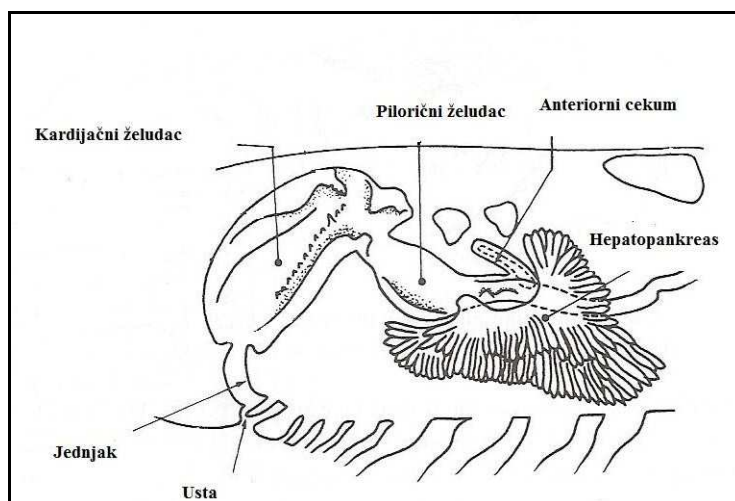
- Prednje crijevo (stomodeum) koje uključuje usta, jednjak i želudac
- Srednje crijevo (mesenteron) koje uključuje srednje crijevo, slijepo crijevo i probavnu žlijezdu (hepatopankreas)
- Stražnje crijevo (proktodeum) koje uključuje rektum i anus

3.2.1.1. Prednje crijevo

Probavilo rakova počinje ustima s donje strane glave i proteže se duž tijela do crijevnog otvora na telsonu. Gornje čeljusti su čvrste i služe za drobljenje i grizenje, a donje su slabije i služe za pridržavanje pri čemu se pomažu i sa prednjim parovima prsnih nogu. Kod deseteronožnih rakova jednjak je jako kratak, obložen cilindričnim epitelom. Taj dio probavila je ektodermalnog porijekla i iznutra je obavijen intimom koja se kao hitinska kutikula presvuče pri svakom presvlačenju. Tri vrste mišićnih vlakana obavijaju epitel i onemogućuju regurgutaciju hrane. U Palinura jednjak se nalazi gotovo vertikalno položen u odnosu na horizontalnu liniju koja prati dužinu tijela. U želudac ulazi nešto posteriornije. U Brachyura jednjak je povezan sa želucem u anteroventralnom dijelu (Forest i Vaupel Klein, 2006).

Želudac zauzima prostor prednjeg dijela glavopršnjaka. Prve opise želudaca deseteronožnih rakova dao je Mocquard (1883) koji su obuhvaćali opise više od šezdeset vrsta rakova, dalje su opisi prošireni u radovima Maynard i Dando (1974), Felgenhauer (1992), Dall i Moriarty (1983). Podijeljen je na dva dijela, prednji ili kardijačni (*pars cardiaca*), koji se preko otvora, kardije, otvara prema jednjaku i stražnji pilorički (*pars pylorica*) koji se

preko otvora, pilorusa, otvara prema srednjem crijevu. Prednje crijevo seže sve do kraja želuca. Prednji dio kardijačnog prostora ima tanku stijenku koja je fleksibilna i služi za prihvatanje neprobavljene hrane. Stražnji dio kardijačnog prostora zajedno sa dijelom piloričkog čini mišićno-hitinozno područje koje se naziva i želučani mlin ili *proventriculus*. Stijenka ovog dijela želuca ojačana je čvrstim kalcificiranim dijelovima kutikule koje čine ploče i osikule i pokreću se mišićima. Želučani mlin prvi je opisao Geoffroy (1709), Huxley (1880) uočava razliku između dijela koji služi za mljevenje tj. usitnjavanje i dijela koji filtrira, a to potvrđuje i Ngoc-Ho i Nguyen (1984) koji su proučavali veličine čestica hrane u raznim dijelovima želuca. Želučani mlin se sastoji od osikula koji se mogu usporediti sa zubima u kralježnjaka i služe kao dio za mljevenje hrane i dijela koji se nalazi u posteriornom dijelu kardijačnog prostora i nastavlja se u pilorični prostor, a sastoji se od sustava utora i zalistaka sa dodatnim čvorićima, bodljama i kontrolira veličinu čestica koja će se propustiti u srednje crijevo tj. ima ulogu filtracije. Osikule su najčešće parne, podijeljene su u sedam kategorija na osnovu njihove lokacije, inervirane su iz stomatogastričnog ganglija sa 23-30 živaca. U *Palinura* ventralno kardijačne osikule su reducirane, inervirane sa 12 živaca porijeklom iz stomatogastičnog ganglija (Moulins i Vedel, 1977). U *Brachyura* osikule su u potpunosti razvijene (Barker i Gibson, 1978).



Slika 5. Shematski prikaz prednjeg i srednjeg crijeva u deseteronožaca (preuzeto iz Ceccaldi, 1989).

Hrana ulazi u želudac i kreće se dorzalnim dijelom kardijačnog prostora, slijedi želučani mlin gdje se usitnjava i ulazi u pilorični prostor gdje se nastavlja usitnjavati pomoću lateralnih osikula i vraća se u prednji kardijačni prostor da bi se ponovno usitnila u želučanom mlinu. Samo najfinije čestice hrane u koloidnom stanju ili sitnije ulaze u srednje crijevo gdje se odvija biokemijska probava hrane pomoću enzima koji se proizvode u stanicama hepatopankreasnih tubula. Grube čestice i neprobavljene tvari usmjeravaju se u stražnje crijevo. U želučanom mlinu hrana se miješa sa probavnim sokom koji je smeđe boje. U probavnom soku nalaze se enzimi: proteaza, tripsin, himotripsin, karboksipeptidaza, deoksiribonukleaza, ribonukleaza, fosfataza, celulaza, hitinaza, amilaza, β glukanaza, manaza, maltaza, izomaltaza, esteraza, hemicelulaza i lihenaza (Kooiman, 1964; Takahashi i sur., 1964; Brockerhoff i sur., 1967; Wojtowicz i Brockerhoff, 1972). Sadržaj žvačnog želuca je kiseo (pH oko 5,1). Djelovanjem enzima bjelančevine, ugljikohidrati i masti razgrade se na svoje sastavne dijelove. Hrana iz stražnjeg dijela žvačnog želuca dopiye u slijepe mješnice srednjeg crijeva i tu se hrana potpuno razgradi i resorbira. Cijelo prednje crijevo ektodermalnog je porijekla i mijenja se tijekom presvlačenja.

3.2.1.2 Srednje i stražnje crijevo

Srednje crijevo se sastoji od žlijezda srednjeg crijeva (hepatopankreas), srednjeg crijeva i anteriorno položenog cekuma. Oblaže ih jednoslojni cilindrični epitel koji je obavijen uzdužnim i prstenastim mišićnim slojem. Hepatopankreas je parni žljezdani organ koji zauzima velik dio volumena glavopršnjaka i položen je lateralno od želuca. Svaka lateralna strana sastavljena je od dva ili više režnjeva, sa probavnim sustavom je spojena preko glavnog kanala ili preko prednje komorice u koju se otvaraju brojni kanali. Glavni kanal se grana na sekundarne, tercijalne i tako do krajnjeg slijepog kanala. Promjer kanala se grananjem smanjuje. Svaki kanal je građen od epitela sa probavnom ulogom, bazalne membrane, kontraktilnih stanica i tunike proprie (Verri i sur., 2001). Kanali su obavijeni mišićnim slojem koji osigurava kretanje tekućine kroz kanale. Sadržaj kanala prazni se u želudac gdje se odvija probava. Boja hepatopankreasa može biti crvena, smeđa, zelena, žuta, plava ili kestenjasta i ovisi o količini i vrsti pohranjene hranjive tvari (Gibson i Barker, 1979). Težina hepatopankreasa iznosi 2-6 % ukupne tjelesne težine pri čemu njegova težina ovisi o količini pohranjenih hranjivih tvari i stupnju presvlačenja (Martin, 1973). Uloga hepatopankreasa je raznovrsna: apsorpcija hranjivih tvari, sekrecija enzima, osmoregulacija, detoksikacija, pohrana hranjivih tvari (Vonk, 1960; Yonge, 1924; Chen i sur., 1974; Ahearn i sur., 2004).

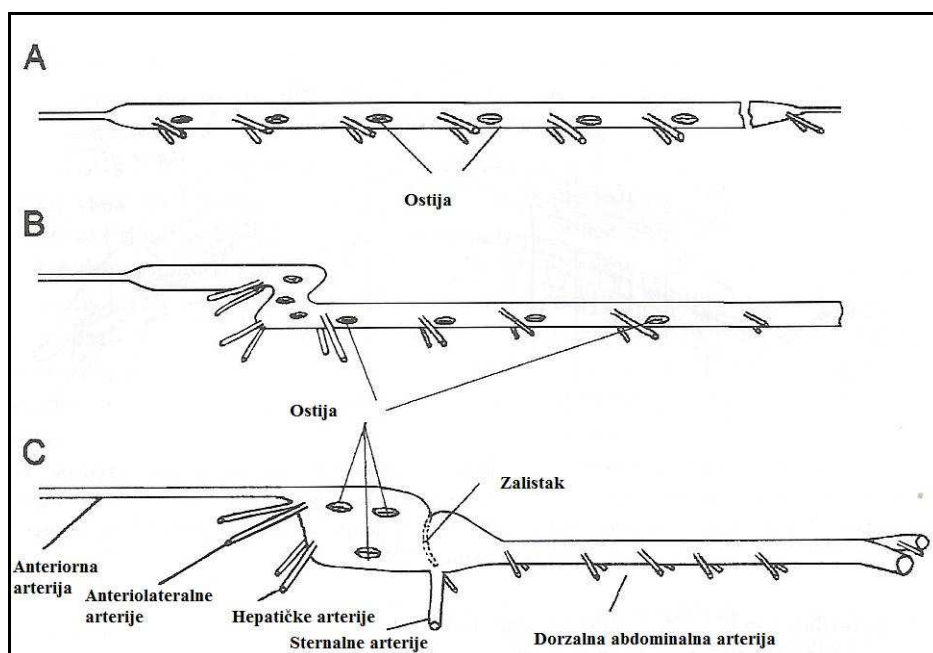
Jacobs (1928) je klasificirao stanice hepatopankreasa na osnovu histologije i to na E, R, F i B. E ili embrionalne stanice nalaze se na krajevima kanalića. Mitotičkom diobom od ovih stanica nastaju R ili resorptivne i F ili vlaknate stanice i B ili mjehuraste stanice koje nastaju od F stanice. Al- Mohanno i Nott opisali su i male M stanice 1985 godine. R stanice su najbrojnije, imaju granule koje mogu sadržavati kalcij, fosfor, magnezij, olovo (Hopkin i Nott, 1979), americij i ostale radionuklide (Paquet, 1991) što ukazuje da bi te stanice mogle imati ulogu u detoksikaciji. Osim toga u zrelih R stanicama nalazimo lipide, glikogen, bakar, cink i sumpor. F stanice sintetiziraju probavne enzime koji se nalaze u staničnim granulama i prazne se u lumen kanala. U hepatopankreasu se pohranjuju rezerve za razne organe, pa tako nalazimo lipide, pigmente i metale koji su nužni u tijeku presvlačenja (Drach, 1939). Lipidi su glavni izvor energije, mjesto pohrane je hepatopankreas. U gladovanju se događa pad lipoproteina, zatim proteina. U hepatopankreasu se nakuplja i glikogen (kojeg prije presvlačenja ima više), masti, kao i mineralne tvari (kalcijev fosfat i magnezij fosfat). Kalcosferiti tj. nakupine kalcij fosfata u hepatopankreasu najbrojnije su u krajnjem prijesvlačnom periodu i predstavljaju rezervu za brzu kalcifikaciju oklopa (Travis, 1955 a). Ogura (1959) utvrđuje da se bakar pohranjuje u stanicama sa lipidnim zalihama, a željezo u vakuolama stanica sa malo pohranjenih rezervi. Količina bakra, cinka, magnezija i kalcija jako varira ovisno o stupnju presvlačenja (Al- Mohanno i Nott, 1985). U hepatopankreasu se nalaze i slobodne amino kiseline koje se mobiliziraju u procesu prilagodbe na promijenjeni salinitet (Richard i Ceccaldi, 1975). Količina karotenoida kao što su zeksantin, beta karoteni i astaksantin povećana je u vrijeme spolnog sazrijevanja tj. formiranja jaja (Vincent, 1988 b). Srednje crijevo posjeduje sluzne žlijezde koje svojim sadržajem obavijaju feces i formiraju peritrofičnu membranu. Osim toga srednje crijevo ima važnu ulogu u absorpciji vode koja se odvija neposredno nakon odbacivanja oklopa (Mykles, 1980).

Završni dio probavila naziva se stražnje crijevo, duže je od srednjeg i ektodermalnog je porijekla. Obložen je jednoslojnim cilindričnim epitelom i hitinskom kutikulom iznutra i slojem prstenastih i uzdužnih mišića izvana. Sadržaj crijeva kreće se peristaltikom i antiperistaltikom.

3.2.2. OPTJECAJNI SUSTAV

Optjecajni sustav ima ulogu dostatne opskrbe svih tkiva kisikom i hranjivim tvarima, uklanjanje otpadnih produkata mijene tvari i dostave hormona. Sustav je otvoren i sastoji se od srca, pomoćnog srca, arterija, kapilara, sinusa i lakuna. Zbog složenosti optjecajnog

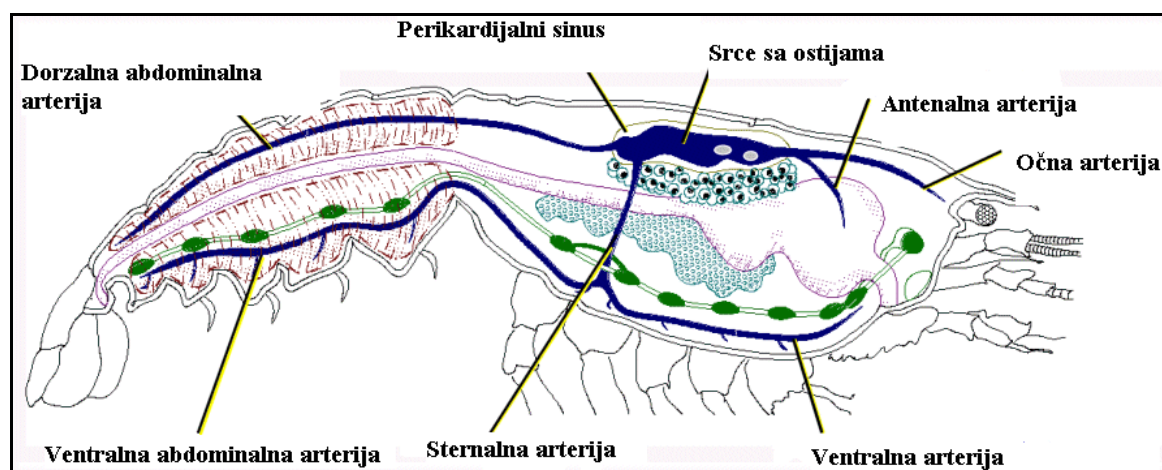
sustava u deseteronožaca i činjenice da je kod njih termin „otvoreni sustav“ ostao kao histološki termin, a ne govori o njegovoj funkcionalnosti Reiber i McGaw (2009) predlažu da se ovakav sustav nazove nepotpuno zatvoreni sustav. Nedostatak se nalazi u venoznom sustavu u kojem lakune ne posjeduju pravi endotel. Novija istraživanja navode da lakune morfološki slične kapilarama, a nedostatak endotela može se kompenzirati bazalnom laminom proprijom organa koje oplakuju (McGaw, 2005). Srce se proteže cijelom dužinom tijela i sastoji se od kardiomera od kojih svaka ima par ostija i par lateralnih arterija. Srce je svojom ulogom vezano za mjesto izmjene plinova te je i ojačano u tom području i nazivamo ga ventrikul, a u područjima bez mogućnosti izmjene plinova ostije i poneke arterije nedostaju (McMahon, 2001 a). Na mjestima kardiomera u stjenkama se nalaze poprečno prugasti mišići. Deseteronožni rakovi nastanjuju raznolika područja od dubokih mora, plitkih uzobalnih pojaseva, rijeka do kopnenih područja. Evolucijski su se prilagođavali zahtjevima okoliša i razvili prilagodbe vidljive u građi optjecajnog sustava. Srce se skratilo što je pratilo promjene u metamerama tj. spajanje somita (Wilkens, 1999).



Slika 6. Shematski prikaz razvoja optjecajnog sustava u deseteronožaca: A. prikaz optjecajnog sustava u stomatopoda, B. hipotetski prelazni oblik C. prikaz optjecajnog sustava u dekapoda (preuzeto iz Wilkens, 1999)

Srce se kod deseteronožnih rakova nalazi na leđnoj strani, predstavlja skraćeno tri kardiomere (Wilkens i sur., 1997 b) i ima tri para ostiola, dva para s leđne strane i jedan par s trbušne.

Ostiole imaju oblik leće i otvaraju se u paralelnom smjeru sa mišićnim vlaknima. Glavni je organ propulzije hemolimfe, u tome mu pomažu pomoćno srce i okolni mišići. Srce ima jednu komoru, građeno je od unutarnjeg poprečno prugastog mišićnog sloja i vanjske adventicije, pravi endotel ne postoji, iako se kod nekih rakova pojavljuje sloj vezivnog tkiva. Predstavlja 0,1-0,15 % ukupne težine (Maynard, 1960). Nalazi se u perikardijalnoj šupljini koja je obavijena vezivnim tkivom i posjeduje tri ligamenta koja ga povezuju sa srcem. Dijastolu srca omogućuju ligamenti svojim širenjem. Usmjerenje hemolimfe ostvareno je zaliscima. Zalisci mogu biti na početku arterija koje izlaze iz srca, unutar arterija ili unutar venoznih sinusa pa se prema tome označuju kao kardioarterijalni, arterijalni i venozni zalisci (Matonićkin i sur., 1999). Zalisci su polumjesečasti. Na kraju dijastole ostiole se otvaraju, kardioarterijalni zalisci se zatvore, skraćivanjem ligamenata miokard se raširi. Krv iz perikardijalnog sinusa ulazi u srce kroz ostiole. Nakon toga nastupa kontrakcija miokarda, ostiole se zatvaraju, intrakardijalni tlak raste, kardioarterijalni zalisci se otvaraju i srce se prazni. Putem arterija i kapilara krv dolazi do tkiva. Stijenka arterije građena je od intime, endotela i debelog kolagenog sloja. U žilama ne postoje mišićna vlakna, pa je elasticitet ovisan o intimi ili o površinskom sloju endotelne stanice. Pretpostavlja se da hemolimfa prelazi iz arterija i kapilara u intersticijske lakune, a onda u venske zatone tj. sternalni sinus odakle ulazi u ventrolateralne branhijske sinuse i u torakalne sinuse. Brahijski sinusi skupljaju deoksigeniranu krv, usmjeravaju je prema škrgama gdje se oksigenira i preko brahioperikardijalnih žila odlazi u perikardijalnu šupljinu. Sinusi su omeđeni jasno vidljivim membranama, a lakune ih nemaju.



Slika 7. Optjecajni sustav u dugorepaca

Rad srca je pod kontrolom srčanog gangliona sa devet živaca koji osiguravaju ritmično stezanje srca. Perikardijalni organ koji se nalazi u perkardijalnoj šupljini oslobađa neurohormone koji mogu utjecati na rad srca i nazivaju se CCAP (McMahon, 2001 a). Brzina kucanja srca je različita, kod manjih srce brže kuca u odnosu na velike, osim toga povećavaju se otkucaji srca povišenjem temperature i smanjenjem intenziteta svijetla. Smanjenjem količine kisika smanjuju se i otkucaji srca (McMahon i sur., 1997). *P. interruptus* ima 60 otkucaja u minuti i najviši izmjereni krvni tlak u rakova (Belman, 1975). Acetylcholin, dopamin, glutamati i adrenalin ubrzavaju rad srca većine rakova, izuzev kod *Daphnie* (Green, 1961), dok ga GABA usporava.

Hemolimfa iz srca izlazi u 5 anteriornih i dvije posteriorne arterije. Medijalna arterija ili očna vodi hemolimfu do mozga, očiju i antenula. Belmann je 1975 godine opisao pomoćno srce ili *cor frontale* kod *Panulirus interruptus*. Rad srca može biti pojačan pomoćnim srcima. Pomoćna srca povećavaju tlak samog srca koji nije dovoljan da bi se krv potisnula u sva područja tijela. Ona su često samo lokalna proširenja koja mogu smanjivati svoj obujam pomoću kontrakcija tjelesnih mišića. Takvi se mišići pričvršćuju na karapaksu, stijenci želuca ili prolaze uz krvne žile. Nedostatak zalistaka u pomoćnom srcu umanjuje mogućnost prave srčane funkcije. Steinacker (1978) je utvrdio da nema kordinacije između srca i pomoćnog srca. Dva para postranih arterija su anteriorne arterije i hepatičke arterije. Anteriorne arterije opskrbljuju hemolimfom mišiće, probavni sustav, hepatopankreas, ekskretorne organe i gonade. Hepatičke vode hemolimfu u hepatopankreas. Posteriorno, iz *bulbus arteriosus* izlaze parne sternalne arterije koje vode u pleopode i helipede i ventralna abdominalna arterija koja opskrbljuje abdominalnu muskulaturu i probavni sustav. Dorzalna abdominalna arterija proteže se do kraja telsona.

3.2.2.1. Hemolimfa

Hemolimfa je krv rakova. Sastoji se od plazme i hemocita. Mijenja sastav ovisno o fiziološkom stanju životinje, tijekom ciklusa presvlačenja i u odnosu na uvjete okoliša. Stoga je prosječne vrijednosti potrebno sagledavati u okviru ovih utjecaja (Maynard, 1960). Specifična težina hemolimfe raznih vrsta deseteronožnih rakova kreće se od 1,025-1,052, što je malo više od specifične težine morske vode. Plazmu čini voda, ioni, ugljikohidrati, lipidi i proteini. Hematokrit je mali i iznosi 1 % (Drach, 1939; George i Nichols, 1948). Volumen hemolimfe je promjenjiv i prosječno je 20 % od težine životinje. Anorganski dio sastoji se od Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i Cl^- . U hemolimfi morskih rakova ima manje magnezija nego u

hemolimfi drugih beskralježnjaka, isto tako raci imaju manje natrija od morskih kolutičavaca, mekušaca i bodljikaša. Respiratorni pigment rakova je hemocijanin, uvijek je slobodan u hemolimfi, nema ga u stanicama. Sinteza hemocijanina odvija se u hepatopankreasu (Taylor i Anstiss, 1999). U deseteronožaca su identificirana tri podtipa hemocijanina α , β , i γ (Burmester, 2004). Hemocijanin predstavlja 80-95 % ukupnih proteina u hemolimfi rakova (Djangmah, 1970). Količina ovisi o stupnju presvlačenja, hranidbenom statusu, stresu i zdravstvenom stanju (Boone i Schoffenich, 1979; Hagerman, 1983, 1986; Yoganandhan i sur., 2003). U sastavu hemocijanina kod hlapa ima 53,07 % C, 6,85 % H, 16,78 % N, 0,90 % S, i 0,187 % Cu (Matoničkin i sur., 1999). Postoji korelacija u količini Cu i Zn kod deseteronožaca (Martin i sur., 1977). Pretpostavlja se da je uloga cinka stabiliziranje kvaterne strukture hemocijanina. Hemocijanin je bezbojan, velike molekularne težine, vezan s kisikom je plave boje (Green, 1961). Od organskih spojeva u hemolimfi rakova ustanovljeni su šećeri, lipidi, neproteinski dušik i proteini u krvnoj plazmi.

Hemociti su stanice hemolimfe. Imaju niz fizioloških i patofizioloških uloga: zarastanje rana, koagulacija, fagocitoza, inkapsulacija, učvršćenja oklopa (Ravindranath, 1980; Hose i sur, 1987; Bauchau, 1981; Vacca i Fingerman, 1983). Broj stanica ovisan je o fiziološkom i zdravstvenom stanju životinje. Broj hemocita u *Carcinus maenas* povećava se za 100 % neposredno nakon presvlačenja (Maynard, 1960). Tijekom bolesti broj hemocita u hemolimfi može pasti za 43 % (Yoganandhan i sur., 2003). Klasifikacija se radi mnogo godina, ali zbog različitih kriterija korištenih kod determinacije teško je raditi komparacije vezane za izgled i funkciju (Martin i Graves, 1983; Hose i sur., 1990). Klasifikacija prema tinktorijelnim svojstvima stanica jako je osjetljiva i često je neprimjenjiva za sve vrste rakova (Martin i Graves, 1983). Martin i sur. 1987 godine napravili su klasifikaciju na kozici *Sicyonia ingentis* koja se oslanja na morfologiji stanica promatranih elektronskim i svjetlosnim mikroskopom, citokemiji i funkciji stanica kao što su fagocitoza, koagulacija i inkapsulacija i opisali su dvije kategorije, hijaline i granulirane hemocite. Hose i sur. 1990 godine proširili su istraživanje na tri vrste deseteronožnih rakova, *Homarus americanus*, *Panulirus interruptus* i *Loxorhynchus grandis*. Rezultati istraživanja potvrdili su da se hemociti deseteronožnih rakova pojavljuju u dva oblika, hijalini i granulirani. *Panulirus interruptus* ima najveći postotak hijalinih stanica (56 %), 10-12 % malih granulocita i 31 % velikih granulocita. Hijaline stanice su male, nukleoplazmatski omjer im je $> 0,35$. Hardy (1892) ih je opisao kao jako osjetljive na vanjske utjecaje, kao što je strano tijelo, pri čemu dolazi do dezintegracije stijenke i izlaska protoplazme. Nazvao ih je eksplozivnim stanicama i pretpostavio da sudjeluju u stvaranju koaguluma. Jezgra je centralno smještena. Ako se bojažu

sa tripanskim plavilom poplave prije same lize. Stanice posjeduju tanke citoplazmatske granule, tijekom lize stanice sadržaj izlazi u plazmu i uzrokuje koagulaciju. Koagulacijski protein (CP) je otopljen u hemolimfi i prelazi u fibrin aktivacijom koagulina u prisustvu Ca^{2+} iona. Transglutaminaze se nalaze u hemocitima (Florkin, 1960). Vacca i Fingerman 1983 godine ustanovili su da hijalini hemociti proizvode difenolne proteine koji su potrebni u bojanju oklopa, a granulociti proteine. Neposredno nakon presvlačenja (5-10 sati) broj hijalinih hemocita se poveća i stabilizira se nakon 24-48 sati, dok se broj granuliranih hemocita poveća prije presvlačenja.

Granulociti se dijele na male granulocite i velike granulocite. Nukleoplazmatski omjer im je $< 0,35$, ne bojaju se tripanskim plavilom. Ne mijenjaju se morfološki tijekom koagulacije. Granulociti posjeduju citoplazmatske granule koje su pozitivne na PPO i in vitro fagocitiraju bakterije i hife plijesni. PPO-profenoloksidaza je enzim uključen u mehanizam melanizacije i prepoznavanja stranih tijela (Soderhall, 1982). Mali granulociti zaduženi su za fagocitozu, dok su veliki granulociti zaduženi za inkapsulaciju (Hose i Martin, 1989). Mitoza je uočena u hijalnim stanicama i malim granulocitima što upućuje na postojanje dvije linije stanica (Martin i sur., 1987). Svi hemociti su PAS pozitivni što dokazuje da sadrže polisaharide, glukozu, glukozamine, maltozu, glukozu 6-fosfat (Matozzo i Marin, 2010; Dall, 1974 b).

Hematopoetsko tkivo nalazi se u dorzalnog ili dorzolateralnog dijelu želuca, bazi II maksilipeda i u očnoj arteriji (Johansson i sur., 2000; Ghiretti- Magaldi i sur. 1977).

3.2.2.2. Obrambeni mehanizam

Rakovi posjeduju prirodni imunitet, nemaju limfocite ni antitijela. Prirodni imunitet može biti stanični ili humoralni. Stanični obrambeni sustav oslanja se na aktivnost hemocita i uključuje fagocitozu, hemocitnu infiltraciju u oštećeno ili inficirano tkivo, koagulaciju i inkapsulaciju. Humoralni obrambeni sustav se oslanja na sekreciju stanica i staničnu dezintegraciju i djeluje sinergijski sa staničnim te djeluju aglutinacijski, litički, precipitirajuće i baktericidno. U nespecifičnom imunološkom odgovoru hemocita prepoznajemo i aktivnost fenoloksidaza i melanizaciju (Sinderman, 1971; Soderhall, 1999). Rakovi nemaju stečeni imunitet ni imunoglobuline, ali imaju proteine prepoznavanja (PRP) koji prepoznaju i reagiraju na strane molekule (Cerenius i sur., 1994).

Fagocitoza je temeljni i najvažniji oblik obrambene reakcije organizma na infekcije. Osniva se na sposobnosti stanica da mikroorganizme ili neku drugu stranu tvar prožderu i razgrade enzimima. Mehanizam fagocitoze u rakova jednak je onom u kralješnjaka. Lizosomi- granule

u citoplazmi fagocita sadrže antibakterijske tvari i hidrolitičke enzime (Sinderman, 1971). Infiltracija i nakupljanje hemocita u oštećenom ili inficiranom tkivu događa se sa svrhom zarastanja tkiva i fagocitoze stranog tijela (Ratcliffe i Rowley, 1979).

Inkapsulacija je čest oblik staničnog obrambenog sustava. Invadirani organizam se okruži sa malim i velikim granulocitima i stvara se fibrin. Koagulacija hemolimfe je složeni biokemijski proces u rakova sa tri različita načina formiranja koagulumata (Tait, 1911). Sprječava gubitak hemolimfe i služi u obrani od patogena koji su preveliki za fagocitozu. Tait dijeli koagulaciju hemolimfe rakova na tri tipa: A- aglutinacija stanica bez koagulacije plazme; B- aglutinacija stanica koju prati koagulacija plazme i C- istovremena aglutinacija i koagulacija plazme. Daljnja istraživanja upućuju da je mehanizam isti, razlika je u brzini oslobađanja stanične protoplazme i broju hemocita (Ghidalia i sur., 1981; Hose i sur., 1990). Za proces koagulacije potrebni su plazma i stanice (Durliat, 1985). Ključna sastavnica koagulacije je CP protein ili koagulacijski protein, nekad ga se nazivalo fibrinogen, fibrinogenu nalik (Durliat i Vranckx, 1976), koagulogen (Martin i sur., 1991). Po sastavu je lipoglikoprotein, polimerizacija CP proteina događa se pod utjecajem transglutaminaza. U rakova transglutaminaze iz hemocita i njihovo oslobađanje u cirkulaciju započinju niz reakcija sa CP-om (Martin i sur., 1991). Transglutaminaze su Ca^{2+} ovisni enzimi koji su sposobni stvarati ϵ - (γ -glutamil)-lizin veze i formirati agregaciju proteina i mogu spriječiti diferencijaciju stanica u hematopoetskom tkivu i njihovo otpuštanje u hemolimfu (Fuller i Doolittle, 1971b; Kopačak i sur., 1993; Xionghui i sur., 2008). Koagulaciju usporava niska temperatura (Dean i Vernberg, 1966). Promjene u vremenu potrebnom za koaguliranje može biti indikator stresa (Durliat i Vranckx, 1983; Jussila i sur. 2001). Hemolimfa rakova inficiranih virusom se ne grušava (Yoganandhan i sur., 2003), slično je nađeno kod infekcije bakterijama (Lightner i Lewis, 1975; Stewart i sur., 1969). Vrijeme koagulacije korelira sa količinom neurohormona u oklopu (octopamin) koji ubrzava koagulaciju i sprječava gubitak hemolimfe kod ozljeda (Battele i Kravitz, 1978).

Velik dio proPO nalazi se u granuliranim hemocitima, iako se u nekih vrsta rakova nalazi u plazmi u neaktivnom obliku, prelazi u fenoloksidazu PO pod utjecajem imunostimulansa (Hernandez-Lopez i sur., 2003). Imunostimulansi su supstance koje potiču imunološki sustav na obranu od infekta. Proizvodi su mikroorganizama kao što je β - 1,3-glukan, peptidoglikani i lipopolisaharidi. Izvor β - 1,3-glukana su stanične stijenke gljivica i pljesni, peptidoglikani se nalaze u stijenkama stanica Gram pozitivnih bakterija, a lipopolisaharidi u Gram negativnim bakterijama. PO enzim je okidač za reakcije koje vode inkapsulaciji, melanizaciji, aglutinaciji i degranulaciji (Sodenhall, 1999).

3.2.2.3 Biokemijski parametri hemolimfe

3.2.2.3.1. Metaboliti

Proteini krvne plazme

Krvna plazma sadrži smjesu od stotinu različitih proteina od kojih se najveći dio nalazi u tragovima. Oni su sastavni dio svake stanice. Stvaraju kontraktilne elemente i enzime koji oslobađaju energiju potrebnu za održavanje života. Nalaze se u krvi gdje imaju funkciju transporta lijekova, hormona, vitamina i elektrolita koji se vežu na proteine. Pojedini proteini imaju specifične uloge npr. enzimi, hormoni, inhibitori enzima, faktori koagulacije, hemocijanin i zaštitna funkcija. Utječu na koloidno-osmotski tlak i time na raspodjelu vode između vaskularnog i međustaničnog prostora (Štraus, 1988; Karlson, 1988)

Količina proteina plazme ovisi o stadiju presvlačenja i uhranjenosti (Stewart i Li, 1969; Dall, 1974 b; Hepper, 1977). Za vrijeme gladovanja količina proteina plazme pada. Prema Stewartu i Li-u (1969) najviša količina proteina je u međusvlačnom stadiju i u ranom predsvlačnom. Laxmilatha i Laxminarayana (2004) nisu našli promjene u kvalitivnom sastavu proteina plazme tijekom različitih faza presvlačenja, razlike su bile kvantitativne, ukupni proteini plazme rasli su od poslijesvlačnog stadija, tijekom međusvlačnog sa padom ukupne količine proteina neposredno prije presvlačenja. Razlike u kvalitativnom sastavu proteina nađen je u tijeku razvoja gonada, Glikoprotein hemolimfe u ženki VG može se naći u hemolimfi i njegova količina varira ovisno o stupnju zrelosti (Laxmilatha i Laxminarayana, 2004).

Ukupni proteini mogu biti povećani tijekom nekih bolesti. Kod infekcije *Penaeus indicus* sa virusom (WSSV sindrom) povećavaju se ukupni proteini i slobodne amino kiseline u hemolimfi, a smanjuju se u mišićima i hepatopankreasu (Yoganandhan i sur., 2003). Razlog tomu mogu biti povećane količine virusa u hemolimfi, što je i potvrđeno istraživanjima (Sahul Hameed i sur., 1998) ili sposobnost virusa da se ponaša kao proteaza i razgrađuje tkivo (Beckage, 1996).

Lipidi

Osim kao izvor energije lipidi su neophodni za rast, proces presvlačenja, razmnožavanje, sastavni su dio stanične membrane i steroidnih hormona (Cooper i Hausman, 2010). Trigliceridi su esteri trovalentnog alkohola glicerola i masnih kiselina (Murray i sur., 2011). Netopivi su u vodi. Lipidi krvne plazme ili seruma predstavljaju lipide u transportu u tkivo i iz tkiva. Na ovim lipidima se jače odražavaju promjene u metabolizmu i mobilizaciji lipida. Predstavljaju najvažniju grupu masnih supstanci sa gledišta energetske potreba organizma.

Deponirani trigliceridi predstavljaju rezervni materijal iz koga se oslobađa energija. Deponiranje masti u vidu trigliceirida se odigrava u svim tkivima, međutim hepatopankreas je u kvantitativnom smislu najvažniji depo masti. Deponiranje i mobilizacija masnog tkiva odigrava se stalno, bez obzira na gojno stanje životinja. U slučaju uzimanja velikih količina hranjivih materija dolazi do većeg deponiranja triglecirida, dok se u slučajevima gladovanja rezerve ugljikohidrata iscrpe i energetske potrebe se podmiruju povećanom mobilizacijom i oksidativnom razgradnjom triglicerida masnog tkiva. Zbog hidrofobnosti lipidi se u hemolimfi transportiraju u obliku vodotopljive molekule sastavljene od apoproteina i lipida gradeći lipoproteine. Dije se po gustoći na VLDH (very low density), LDH (low density), HDL (hight density) i VHDL (very high density). Lipoproteini su glavni oblik transporta lipida (Teshima i Kanazawa, 1980). Najčešće su to fosfolipidi (PL) ali mogu se naći i digliceridi (DG), trigliceridi i hidrokarboni (Yepiz-Plascecnia i sur., 2000). Kolesterol je izoprenoidni spoj koji spada u grupu sterola, a nastaje iz aktivirane octene kiseline. Kolesterol je esencijalan za rakove jer ga ne mogu sintetizirati (Rabid i sur., 1999) Bitan je za razvoj gonada (Wouters i sur., 2001), sastavni je dio hormona, te je primijećena njegova mobilizacija tijekom spolnog ciklusa (Harrison, 1990). Nalazi se u svim stanicama. Zajedno s fosfolipidima sudjeluje u izgradnji membrana. On je i ishodna sirovina za hormone u Y-organu (Mykles, 2010).

Glukoza

Glukoza je jednostavni šećer monosaharid, koji se nalazi u hrani, krvi i važan je izvor energije za organizam. Ona je završni produkt probave ugljikohidrata. Monosaharidi, fruktoza i galaktoza pretvaraju se u glukozu. Ona je jedini monosaharid prisutan u značajnoj količini u tjelesnoj tekućini. Oksidacijom glukoze proizvodi se energija za tjelesne stanice. Razina glukoze u hemolimfi ovisi o endogenim i egzogenim utjecajima kao što su: dnevni ritam (Kallen i sur., 1990), ciklus presvlačenja, rukovanje, zatočeništvo i izloženost zraku (Telford, 1968; Ridgway i sur., 2006; Hall i Ham, 1998; Durand i sur., 2000), hipoksija, temperatura (Ocampo i sur., 2003) i hranidba (Radford i sur., 2005). Kvantitativna kontrola razine glukoze u hemolimfi je kontrolirana hormonima, a najvažniji je CHH. Kod pada količine D-glukoze u hemolimfi iz sinusne žlijezde se oslobađaju CHH hormoni koji potiču hidrolizu glikogena. Glukoza koja nije potrebna za dobivanje energije sprema se u formi glikogena kao izvor potencijalne energije. Najveći dio glikogena spremljen je u hepatopankreasu i stanicama mišića. Kada se ove ili druge stanice zasite glikogenom, višak glukoze se pretvara u mast i sprema u masno tkivo. Glikogen je glavni izvor energije za proizvodnju hitina. Količina D-glukoze u hemolimfi je manja nego u kralježnjaka (Verri i sur., 2001).

Yoganandhan i sur. (2003) ustanovili su da su ukupni ugljikohidrati i glukoza bili povećani u hemolimfi tijekom WSSV sindroma kojeg uzrokuje virus, dok je u hepatopankreasu i mišićima količina pala. Povećanu količinu u hemolimfi objasnili su povećanim transportom glukoze iz hepatopankreasa i mišića.

Ureja, NH₃

Ureja je diamid karbonske kiseline koji je glavni metabolički produkt dušikovih tvari, a nalazi se u hemolimfi i izlučuje se u antenalnoj žlijezdi i šrgama. U metabolizmu se razgrađuje određena količina preteina, a dušik izlučuje kao mokraćevina putem urina. Metabolizmom aminokiselina nastaje amonijak, NH₃, odnosno NH₄⁺. Kako je amonijak već u niskim koncentracijama otrov, potrebna je pretvorba u druge spojeve. Konačno uklanjanje NH₃ provodi se sintezom mokraćevine. Ona je neotrovan spoj koji lako difundira kroz biološke membrane, pa se preko šrga može lako odstraniti. U okolnu vodu raci izlučuju amonijak i amino spojeve, u posve maloj količini mokraćevinu i mokraćnu kiselinu. Mokrać se stvara u vršnoj vrećici i u mokraćnoj cjevčici. Iako količinski u vodu izlučuju najviše amonijaka u mokraći ga ima vrlo malo. Razlog tomu je što se amonijak izlučuje putem šrga. Tijekom nekih bolesti primjećeno je povećanje amonijaka u hemolimfi kao posljedica zakazivanja ekskretornih organa (Yoganandhan i sur., 2003). Tijekom emerzije *Maje squinado* količina ureje u hemolimfi se povećala, sa maximumom nakon 48 sati (Durand i sur., 2000).

Kreatinin

Kreatin je po kemijskoj strukturi metilguanidoctena kiselina. Iz slobodnog kreatin-fosfata se u normalnim fiziološkim uvjetima odvaja fosforna kiselina, pa se dobije kreatinin u ireverzibilnoj neenzimskoj reakciji uz gubitak vode. Nastaje i kao spontani neenzimski proizvod pretvorbe kreatinin fosfata koji se nalazi u krvi, a izlučuje se preko bubrega. Stalna produkcija kreatinina je proporcionalna cjelokupnoj količini kreatina i fosfokreatina u organizmu i mišićnoj masi (Murray i sur., 2011). Dnevna količina izlučenog kreatinina nalazi se pod neznatnim utjecajem mišićnog rada ili volumena izlučenog urina. Laboratorijski nalaz može biti upotrijebljen kao mjera funkcije ekskretornih organa. Kreatinin se normalno proizvodi u ujednačenim količinama kao rezultat cijepanja fosfokreatina i izlučuje se u urin. To prvenstveno ovisi o glomerularnoj filtraciji. Razina kreatina u serumu rezultanta je njegova nastajanja, prelaska u mišiće i u kreatinin, te neapsorpcije u tubulima.

3.2.2.3.2. Enzimi

Alkalna fosfataza (ALKP)

Grupa enzima s optimumom aktivnosti u alkalnom području od Ph između 9,8-10,5. Magnezij ion je aktivator fosfataze, ali njegova prisutnost nije potrebna za optimalnu aktivnost koliko kao stabilizator enzima.

Nalazi se u jezgri i citoplazmi osteoblasta, a količina ovisi o stupnju razvoja i lokaciji stanice. Alkalna fosfataza je enzim lokaliziran u staničnoj membrani, katalizira hidrolizu fosfatnih estera na mjestima kalcifikacije. Pri povećanju koncentracije iona fosfata u području kalcifikacije produkt topljivosti soli kosti se premašuje, pa nastaje precipitacija u organskoj osnovi. Alkalna fosfataza se nalazi u organima i tkivima koji ne podliježu procesu kalcifikacije, te tu nema dovoljne količine organskih fosfata. Za vrijeme razgradnje glikogena u stanicama hrskavice nastaju organski fosfatni esteri koji bi mogli služiti kao supstrati za djelovanje alkalne fosfataze i kao izvor organskog fosfata.

Kreatin kinaza (CK)

Organski specifičan enzim koji katalizira prijenos fosfatne grupe iz fosfokreatina na ATP. Ima tri izoenzima: CK1 koji se primarno nalazi u mozgu, CK2 koji se nalazi u miokardu i CK3 nađeni u skeletornom mišićju i miokardu.

Transaminaza (AST)

Enzim koji katalizira proces provođenja amino grupe iz jedne molekule na drugu, odnosno proces provođenja aminokiseline u keto kiselinu transaminacijom. Tijekom ovog procesa amonijak se ne pojavljuje u slobodnom stanju. Koenzim za transaminaze je piridoksal fosfat koji služi kao funkcionalni intermedijalni spoj u procesu transaminacije. Proces je pod katalitičkim djelovanjem transaminaza koje se nalaze u srcu, mozgu, bubrezima, testisima i jetri. AST se koriste kao indikator oštećenja jetre i izlaska enzima u ekstracelularnu tekućinu.

Gama glutamil transpeptidaza (GGT)

Nalazi se staničnim membranama u većini tkiva ali djelomično visoki nivo je prisutan u jetri i bubrezima.

Laktat dehidrogenaza (LD, LDH)

Laktat-dehidrogenaza tetramerni je enzim koji se sastoji od dviju vrsta monomera: H (za srce) i M (za mišić). Katalizira interkonverziju laktata i piruvata. Rasprostranjen je u tkivu bubrega, jetre, skeletne muskulature i miokardu. Javlja se u većoj koncentraciji kada je tkivo oštećeno.

3.2.2.3.3. Elektroliti

Imaju važnu ulogu u održavanju ravnoteže i raspodjele vode, normalnog osmotskog tlaka, acidobazične ravnoteže i neuromuskularne podražljivosti.

Kalcij je kation u krvnoj plazmi. Fiziološki je aktivan samo kao ionizirani. Proteini krvne plazme vežu dio kalcija i pridonose boljoj topljivosti kalcijevih soli u plazmi. Nedifuzibilni kalcij vezan je na serumske albumine. Ima mnoge vitalne funkcije. Grušanje krvi, izgradnja egzoskeleta, podražljivost i kontrakcija mišića, prijenos podražaja u sinapsama i primarnim osjetnim stanicama, regulira propusnost u stijenci kapilara i staničnih membrana i aktivira neke enzime. Potrebe za kalcijem se razlikuju u rakova ovisno o okolišnim parametrima te tako Ca u moru ima 10 mmol/L i dostupan je kroz hranu, dok u slatkovodnim tokovima Ca ima do 3 mmol/L i hrana je važna za unos Ca. Količina kalcija u hemolimfi ovisi o okolišu, u morskih je rakova koncentracija Ca u hemolimfi malo veća od Ca u morskoj vodi, dok je kod slatkovodnih puno veća razlika. Sadržaj Ca u hemolimfi mijenja se i tijekom ciklusa presvlačenja (Greenaway, 1985). Tijekom gladovanja količina Ca se ne mijenja (Travis, 1955 b). Kalcij se može skladištiti kao granule kalcijevog fosfata koje se mogu naći u hepatopankreasu i kao kalcijev karbonat u gastrolitima i hemocelu (Greenaway, 1985). Kalcij se izlučuje kroz crijevo. Hormon β ecdysone mobilizira Ca iz oklopa na mjesta pohrane (Willig i Keller, 1973). Respiratorna ili metabolička acidoza mobiliziraju Ca iz egzoskeleta, te postoji mogućnost da rakovi obole od ekskretorne kalcinoze (Dove i sur., 2005).

Fosfor je kemijski element važan u ishrani. Sastavni je dio spojeva sa energetske bogatim vezovima (kreatin fosfat), pa je važan za očuvanje, oslobađanje i prijenos energije. U formi fosfata je komponenta egzoskeleta i uključen je u veliki dio metaboličkih procesa. U hemolimfi se pojavljuju kao H_2PO_4^- ili HPO_4^{2-} (Travis, 1955). Količina u hemolimfi mijenja se tijekom ciklusa presvlačenja, par dana prije presvlačenja količina raste i pada nakon presvlačenja. U gladovanju pada količina fosfora (Travis, 1955 b).

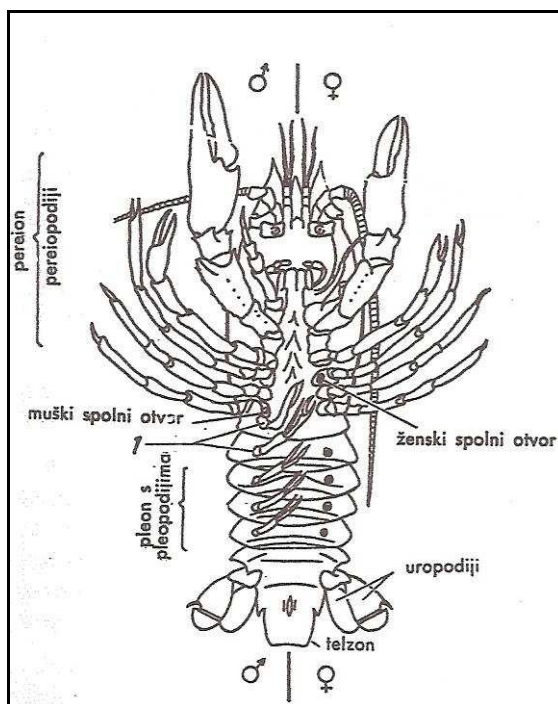
Klor je anion ekstracelularne tekućine, te sa Na održava ravnotežu tekućine, osmotski tlak i acidobazičnu ravnotežu. Promjena koncentracije klorida u serumu prate iste promjene natrija. Uklanjanje klorida iz cirkulacije odvija se u antenalnoj žlijezdi i škrgama.

Natrij je glavni kation ekstracelularne tekućine, prvenstveno intersticijskog prostora. O koncentraciji Na iona najviše ovisi ravnoteža tekućine i održavanje osmotskog tlaka. Najvećim djelom se izlučuje mokraćom. K^+ se nalazi u stanicama. Prolazom hemolimfe kroz vršnu vrećicu kalij prelazi u primarni urin. Izlučuje se u urin. Koncentracija K u stanicama niža je od ekstracelularne koncentracije. Unutarstanični prostor bogat je K^+ i Mg^{2+} .

Magnezij je sastavni mineral egzoskeleta (Travis, 1957). Djeluje kao anestetik, pogotovo na niskim temperaturama utječući na mogućnost prilagodbe rakova niskim temperaturama (Frederich i sur., 2000).

3.2.3. REPRODUKTIVNI SUSTAV

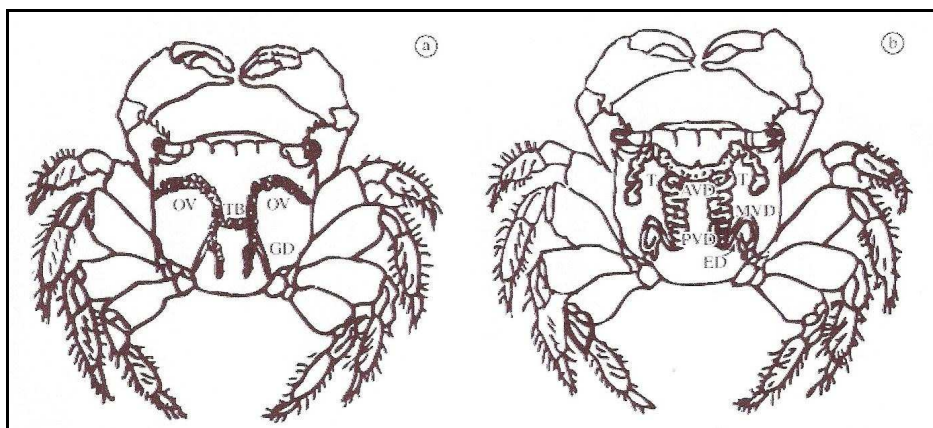
Spol deseteronožnih rakova je genetički određen, razvoj i funkcija gonada, pojava sekundarnih spolnih karakteristika je pod utjecajem hormona. Ako se Y-organ odstrani prije spolne zrelosti razvoj gonada se poremeti. Razvoj sjemenika i muških spolnih obilježja je pod kontrolom androgene žlijezde. U ženki postoji hormonalni odnos između jajnika i X-organa koji stvara hormone koji sprečavaju razvoj jaja. Svi deseteronošci su razdvojena spola. Plodila rakova su parni organi s parnim odvodnim cjevčicama, uz koje se vežu žlijezde. Žlijezde kod ženki izlučuju ljepilo za jaja, a kod mužjaka spermatofore. Nalaze se dorzalno u toraksu, između perikardijalnog sinusa i srednjeg crijeva.



Slika 8. Vanjske spolne razlike kod dugorepaca (preuzeto iz Matoničkina i sur., 1999)

3.2.3.1 Sjemenici, spermiji i spermatofori

Sjemenici leže dorzalno u posteriornoj trećini torakalne šupljine. Sjemenik deseteronožaca je oblika slova H, podijeljen je na tri područja: anteriorni, intermedijarni i posteriorni (Erkan i sur., 2009; Lima i Gesteira, 2008). Zreli sjemenik je obavijen vezivnim tkivom i sadrži brojne sjemene kanaliće u kojima se nalaze Sertolijeve stanice i različiti razvojni stadiji spermija. Prapolne stanice unutar sjemenika prolaze dva zriobena dijeljenja, nakon toga metamorfoziraju u spermije. Kad su unutar sjemenika okrugli su ili ovalni, u vodi mijenjaju oblik u onaj karakterističan za vrstu. Sertolijeve stanice nalaze se uz stijenku sjemenog kanalića. Imaju prehrambenu ulogu, resorbiraju višak citoplazme koji se stvara tijekom spermiogeneze, te stvaraju mukopolisaharidni omotač spermija. Zreli spermiji prolaskom kroz sjemenovode izlaze na spolnom otvoru ili gonoporama. Sjemenovod je paran i vodi do otvora na osnovi 5 pereipoda. Sjemenovode oblaže jednoslojni cilindrični epitel i vezivno tkivna ovojnica. Sjemenovod se može podijeliti na tri područja: proksimalni dio koji skuplja spermije iz sjemenika, žljezdani koji stvara želatinozni matriks i terminalni sa mišićnim sfinkterima koji služi za ejakulaciju sperme. U sjemenovodu se formira spermatofora.



Slika 9. Reproductivni sustav u *Armases rubripes*. a. Jajnici (OV) spojeni transverzalnim mostom (TB) i jajovodi (GD); b. Sjemenici (T) proksimalni sjemenovod (PVD), srednji sjemenovod (MVD) i distalni sjemenovod (DVD) i ejakulacijski kanal (ED) (pruzeto iz Garcia i Silva, 2006)

Spermiji deseteronožaca su nepokretni, bez bića. Takvi nepokretni oblici sjemena zovu se spermatosomi. Poseban oblik daju im različiti kruti nastavci. Razlikuju se po broju

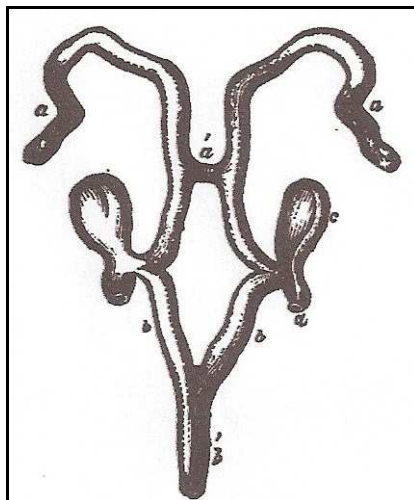
krutih nastavaka pa tako razlikujemo *unistellate* sa jednim krutim nastavkom i *multistellate* sa više krutih nastavaka (Felgenhauer, 1992). U mužjaka razlikujemo fiziološku zrelost kada je sposoban stvarati zrele spermije i funkcionalna zrelost kada je sposoban oploditi ženku. Morfološke vanjske spolne oznake su vidljive na 2 i 3 nozi koje su duže od ženki i po dužim kliještima.

3.2.3.2. Jajnici, jajne stanice i vitelogeneza

Jajnici su smješteni u dorzalnog dijelu torakalne šupljine, dorzalno od hepatopankreasa. Parni su organ čija veličina ovisi o starosti i veličini raka. Režnjevi jajnika građeni su od epitela koji stvara oogenetske vreće. Svaka vreća sadrži po jedno jaje. Jajnici se mijenjaju tijekom razvoja u veličini, boji i veličini oocita. Nezreli jajnici su bijele boje, mijenjaju se u narančastu i kad su zreli imaju ciglasto crvenu boju. Iz svake strane jajnika izlazi jedan jajovod. Prapolne stanice u stijenkama jajnika prolaze zriobeno dijeljenje, nakon čega bivaju okružene slojem malih stanica. Kada sloj folikularnih stanica pukne, jaja dopijaju u središnju šupljinu jajnika. Oocyte rastu zbog pohranjivanja lipida i proteina, a rast se odvija u dva stadija: primarna i sekundarna vitelogeneza. Jaja prolaze iz ovarija kroz jajovode i izlaze na spolnom otvoru koji se nalazi na 3 peripodu. Samo Dendrobranchiati oslobađaju jaja u vodu, dok ostali deseteronošci nose jaja na pleopodalnom području. Ženke *Majidae* imaju mogućnost prihvata spermatofora, te tako *Chionoecetes opilio* može prihvatiti 10-12 spermatofora različitih mužjaka (Saint-Marie i sur, 2000). Spermatofore spremaju u kopulatorne vreće ili *spermathecae*. U rakovice *Maja squinado* utvrđeno je da se oplodnja može dogoditi pet puta nakon samo jedne kopulacije (De Kergariou, 1984). Abdominalni pleopodi su razgranati u ženki i endopodi stvaraju mjesto za prihvata i nošenje jaja tijekom inkubacije. Peta noga u ženki završava malim kliještima i služi sa manipulaciju jajima i uređenje mjesta prihvata.

Ženka se smatra zreloom kada je sposobna proizvesti jaja. U rakova se proizvodnja FSP hormona smatra sekundarnom spolnom osobinom. Proizvodi ga hepatopankreas. Najveća količina FSB nalazi se tijekom vitelogeneze i resorpcije žumanjka iz jaja. Vitelogeneza se odvija u B, C i D₀ stadiju presvlačenja. U D₁ stadiju vitelogeneza je inhibirana jer presvlačenje ima prednost u odnosu na razvoj gonada (Subramoniam, 2000). Reprodukcijska kratkorepaca i dugorepaca odvija se tijekom dugog međusvlačnog stadija. Ekdisteroidi su uključeni u kontrolu reproduktivnog ciklusa, njihova količina raste sa razvojem oogonija (Arvy i sur.,

1954). Unutrašnja površina pleopoda andopodita i exopodita je prekrivena žlijezdama koje se nazivaju cementne žlijezde.



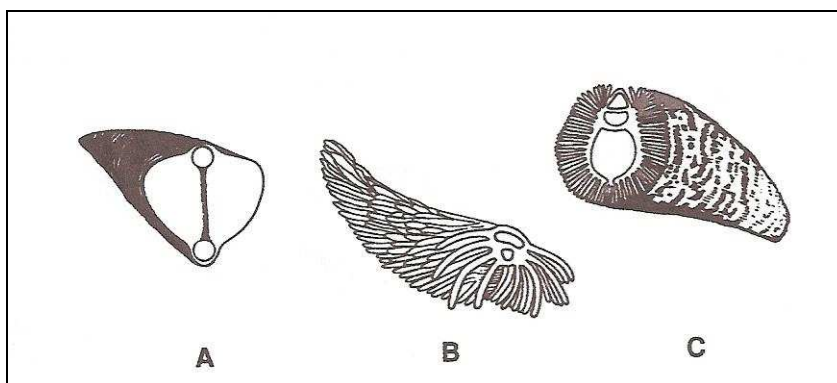
Slika 10. Spolni organi rakovice (Preuzeto iz Todd, 1836) a. i b jajnici; a'. transvezalni most; b'. posteriorni spoj; c. i d. kopulatorne vreće ili spermathecae

3.2.4. DIŠNI SUSTAV

Glavno mjesto izmjene plinova u rakova su škrge. Škrge rakova su selektivne barijere između vanjske okoline i organizma sa ulogom izmjene plinova, izlučivanja dušikovih spojeva, regulacije volumena tijela i održavanja kiselobazne ravnoteže. One su tanke ekstenzije kože čiji je unutarnji prostor ispunjen hemolimfom. Smještene su u parnim bočnim škržnim šupljinama koje su omeđene vanjskim zidom toraksa i branhioštitom. Osnovna građa podrazumijeva da svaki torakalno tjelesni privjesak može nositi škrge. Prema mjestu gdje su učvršćene razlikujemo pleurobranhije, artrobranhije i podobranhije. Pleurobranhije se nalaze umetnute u epimeralni zid, artrobranhije na artodijalnoj membrani između tjelesne stijenke i privjesaka i podobranhije na tjelesnim privjescima. Tako je najčešće 48 škrge na tri maksilipeda i pet pereopoda. Kod nekih vrsta rakova dogodila se redukcija broja škrge.

U deseteronožaca škrge su sastavljene od više ili manje plosnatih, listastih ili prstastih škržnih lamela pokrivenih kutikulom koja je selektivno propusna za ione i male organske molekule. Škržni luk ima lateralno smještenu aferentnu arteriju i medijalno smještenu eferentnu arteriju. Između arterija i oko njih smješteni su brojni nefrociti. Škržne lamele su građene od epitelnih, potpornih stanica i mreže stanica u koju su uklopljeni nefrociti. Na prednjoj strani škržne šupljine nalazi se veliki anteriorni otvor kroz koji skafognatit, egzopodit

druge maksile, izvlači vodu. Voda ulazi kroz dišne kanale na osnovi tjelesnih privjesaka. Moguć je i obrnuti tok vode u škržnoj šupljini. Postoji više tipova škrge: dendrobranhijatni, trihobranhijatni i filobranhijatni. Filobranhijalne škrge imaju svi kratkorepci. (Pequeux i sur., 2006). *Palinurus elephas* ima škrge trihobranhijatnog tipa (Lucu i sur., 2000).



Slika 11. Shematski prikaz tipova škrge. A. Filobranhije B. Trihobranhije C. Dendrobranhije (preuzeto iz McMahon i Wilkens, 1983)

3.2.5. OSMOTSKA REGULACIJA

Homeostaza koncentracije soli u tjelesnim tekućinama važna je za održavanje normalnih funkcija organizma. Čak i u rakova koji žive u moru i kod kojih je osmotski tlak hemolimfe jako sličan okolnom moru postoje mehanizmi regulacije volumena hemolimfe, pri čemu su proteini hemolimfe čimbenik koji zahtijeva transport vode. Osmoregulacija se odvija kroz metaboličke mehanizme koji podrazumijevaju enzimatski kontroliran transport iona i kontrolu permeabilnosti pojedinih tkiva na vodu. Za tu svrhu diferencirala su se tkiva: antenalna žlijezda, škrge, probavni epitel i kutikula. Utjecaj osmotskog šoka manifestira se najprije na epitelnim stanicama koje su u kontaktu sa vanjskim medijem, zatim u hemolimfi i konačno na staničnoj razini. Održavanje stabilnog osmotskog tlaka može se ostvariti promjenom volumena bez promjene u sastavu ili zadržavanjem volumena i promjenom sastava. Kod rakova ključno je zadržati volumen, te oni kontrolom sastava reguliraju osmotski tlak. Postoje vrste koje se uvijek nalaze u okruženju stalno visokog saliniteta i nazivamo ih stenohaline, među njima ima vrsta koje mogu podnijeti promjene kroz određeno vremensko razdoblje, pa ih nazivamo fiziološki euryhalini ili osmokonformeri. Ekološki euryhalini ili osmoregulatori nalaze se u okruženjima sa različitim razinama saliniteta. Svi rakovi posjeduju

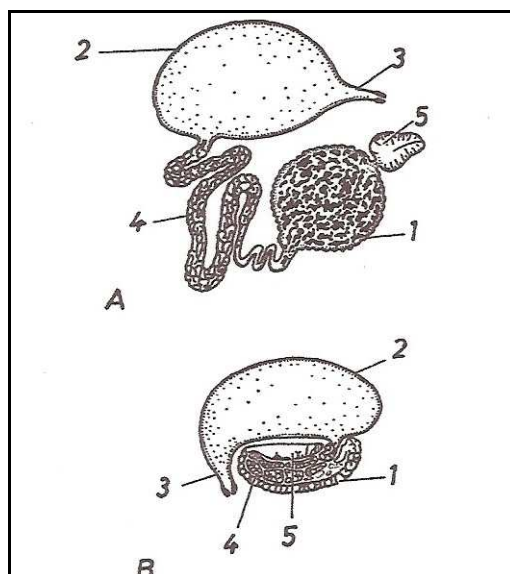
osmoregulacijske mehanizme koji funkcioniraju u određenim rasponima saliniteta. Kod *Maje squinado* mehanizam nije učinkovit kod pada saliniteta za 10-20% (Pequeux i sur., 2006).

Rakovi mogu razviti mehanizme prilagođavanja osmotski različitim okolišima na način da se permeabilnost membrane smanji, pojača se izlučivanje vode urinom i pojača se unos soli. Takve rakove nazivamo osmoregulatori. Osmokonformeri imaju slabije razvijene mehanizme koji se svode na smanjene osmotskog gradienta između hemolimfe i vanjskog medija te je hemolimfa u osmotskoj ravnoteži sa okolinom. Proteini hemolimfe zaduženi su za malu razliku u osmotskom tlaku. Glavni doprinos osmolarnosti u euryhalinih rakova imaju Na i Cl. Koncentracija pojedinih anorganskih iona u hemolimfi ovisi o temperaturi okoliša, veličini, spolu, stadiju presvlačenja i svi ti parametri utječu na sposobnost organizma da se prilagodi osmotskom tlaku okoline. Osim anorganskih iona u hemolimfi se nalaze proteini, amino kiseline, amonijak, glukoza i lipidi, čija koncentracija može varirati pod utjecajem okolišnih ili fizioloških parametara.

Izloženost onečišćenju i uzročnicima bolesti može smanjiti osmoregulativni kapacitet, pa se kapacitet osmoregulacije može koristiti kao bioindikator onečišćenja (Lignot i sur., 2000).

3.2.5.1 Ekskrecijski organi

Za ekskreciju rakovima služi par cjevastih organa. Zbog velike duljine cjevčice tih organa su smotane, a otvaraju se pri dnu stražnjeg par ticala, ticalne ili antenalne žlijezde, ili pri dnu stražnje donje čeljusti, donjočeljusne ili maksilarne žlijezde. U viših rakova ličinke imaju donjočeljusnu, a odraslima je jako razvijena ticalna žlijezda. Antenalna žlijezda na slijepom kraju ima vršnu vrećicu iz koje preko ljevkastog uređaja izlazi mnogostruko smotana mokraćna cjevčica koja može formirati labirint. Kod nekih se rakova cjevčica prije završetka proširi u mokraćni mjehur, iz kojeg vodi do otvora na površini tijela kraći mokraćovod. Kod deseteronožaca ticalna se žlijezda može jako povećati mnogobrojnim ograncima na vrećici i cjevčici. Antenalna arterija dovodi hemolimfu u vršnu vrećicu koja je mjesto stvaranja primarnog urina i zatim u mokraćnu cjevčicu. Primarni urin sadrži Na^+ i K^+ i pretpostavlja se da je to razlog višeg osmotskog tlaka primarnog urina u odnosu na hemolimfu (Riegel, 1970), dok finalni urin morskih rakova ima osmotski tlak vrlo sličan hemolimfi. Selektivna resorpcija bi se mogla odvijati u mokraćnoj cjevčici ili mjehuru. Iz nje izlučena mokraćna ima mnogo veću koncentraciju magnezija i sulfata i nižu koncentraciju kalija i kalcija.



Slika 12. Antenalna ili ticalna žlijezda (preuzeto iz Matoničkin-a i sur., 1999) 1. labirint, 2. mokraćni mjehurić, 3. cijev, 4. mokraćna cjevčica, 5. završna vrećica

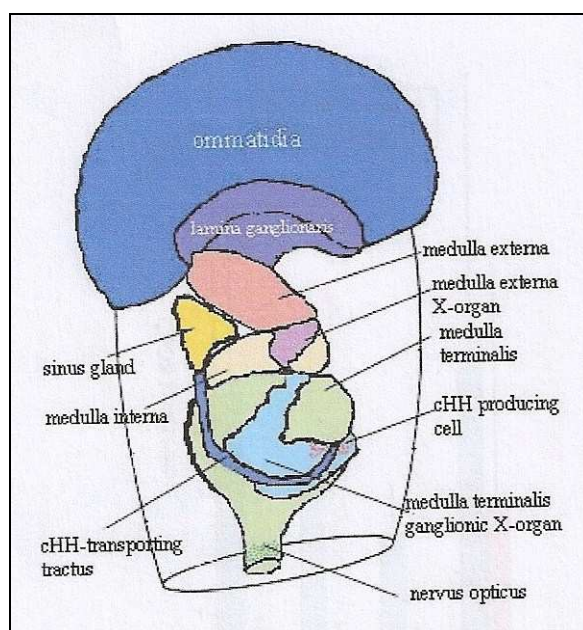
U okolnu vodu rakovi izlučuju amonijak, ureu, mokraćnu kiselinu. Ekskrecija ovisi o fiziološkom stanju, temperaturi, hrani i stresu. Iako količinski u vodu izlučuju najviše amonijaka u mokraći ga ima vrlo malo. Specijalizacija antenalne žlijezde je u resorpciji vode. Ionski sastav i ekskrecija dušikovih spojeva bolje je regulirana u škrgama. Glavni dušikov spoj je amonijak i on predstavlja 72% ukupnog dušika izlučenog u *Jasus edwardsii*. U urinu urea, amonijak i amino spojevi čine samo 21%. Ca se izlučuje crijevom, Mg antenalnom žlijezdom. Na, K, Cl škrgama (Cobb i Phillips, 1980).

Kod osmoregulatora *Eriocheir sinensis* anteriorne škrge služe za disanje, a posteriorne su odgovorne za osmoregulaciju (Torres i sur., 2007). Takva razlika nije primijećena kod svih rakova (Lucu i Towle, 2003). Količina ATP je veća u epitelnim stanicama rakova koji žive u razrijeđenom mediju. ATP se sintetizira u katabolizmu prolina. Prolin transportira NH_3 do mjesta ekskrecije i umjesto glukoze služi za prehranu stanica. U slučaju razrjeđenja prolin izlazi iz stanica i hemolimfom odlazi u škrge. Aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze je veća u tri posteriorna para škrge što upućuje da su posteriorne škrge glavno mjesto osmoregulacije, regulacije transporta iona i unosa Na (Pequeux i sur., 1988). Aktivnost Na^+/K^+ -ATP-aze u tkivu škrge nije se mijenjala u osmokonformeru *Palinurus elephas* i *Maja squinado* tijekom razrjeđenja (Lucu i sur., 2000). Permeabilnost škrge i rad antenalne žlijezde je pod kontrolom endokrinog sustava. Kateholamini prisutni u perikardijalnom organu, uglavnom dopamin i indolamin reguliraju transport vode i iona (Pequeux, 1995). Dopamin povećava unos Na, kao

i CHH hormon. CHH hormoni imaju utjecaj na ionsku ravnotežu i ravnotežu vode. Torakalni ganglion i perikardijalni organ sa biogenim aminima sudjeluju u neuroendokrinnoj kontroli osmoregulacije. Lovet i Watts (1995) navode da su poliamini (putrescin, spermidin, spermin) uključeni u regulaciju homeostaze djelujući izravno na Na^+/K^+ -ATP-aza enzim. Probavni epitel i kutikula imaju ulogu u homeostazi hemolimfe.

3.2.6. ENDOKRINI SUSTAV

Neuroendokrini sustav rakova bolje je razvijen od epitelijalnog endokrinog sustava. Razvio se iz neuralne cijevi i sastoji se od neuroendokrinih stanica koje izlučuju neurohormone koji se pohranjuju i oslobađaju u hemolimfu putem neurohemalnih organa. U deseteronožaca neuroendokrine stanice nalazimo u X-organu, cerebralnom, torakalnom i abdominalnom gangliju. Neurohemalni organi su smješteni u perikardijalnom organu i sinusnoj žlijezdi.

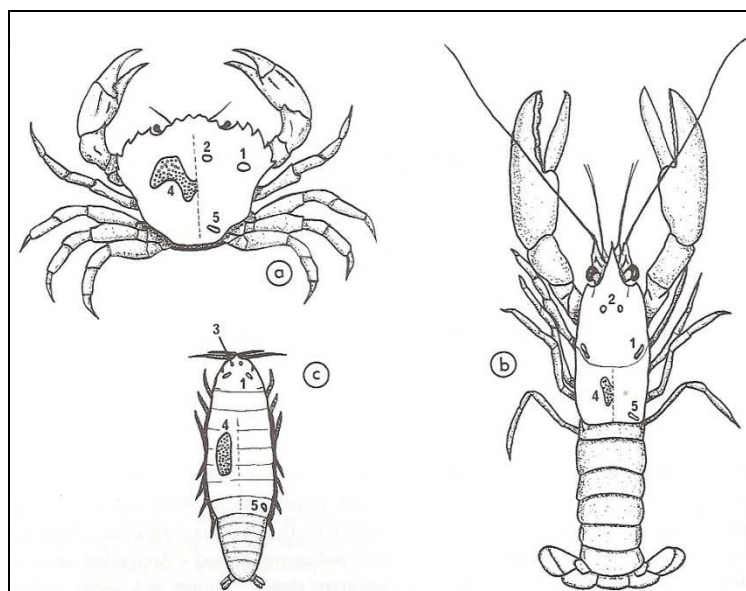


Slika 13. Neuroendokrini sustav rakova, X-organ (pruzeto iz Lorenzon-a, 2005)

X-organ je smješten u očnom dršku deseteronožaca i centralno je mjesto u regulaciji bioloških aktivnosti. Izlučuje niz neurohormona koje nazivamo CHH, MIH, VIH, MOIH. CHH je prvi otkriveni hormon (Abramowitz i sur., 1944) uključen u regulaciju razine glukoze u hemolimfi i metabolizam lipida (Santos i sur., 1997). Chang i sur. (1999) otkrili su snažno otpuštanje CHH iz endokrinih stanica crijeva prije samog presvlačenja pri čemu djeluje na

povećani unos vode u tkiva. Tijekom izlaganja zraku povećava se razina CHH hormona u hemolimfi što uzrokuje hiperglikemiju i hiperlaktemiju (Webster, 1996; Chang i sur., 1999). Spaning-Pierrot i sur. (2000) otkrili su da regulira unos vode i unos Na u škrgama. Razina CHH povećava se pri stresu i pri izloženosti teškim metalima (Lorenzo, 2005). Razina CHH hormona veća je ljeti u odnosu na zimu što rezultira smanjenim lokomotornim i metaboličkim procesima tijekom zime (Chung i Webster, 2005). MIH hormon inhibira presvlačenje, zadužen je za larvalni razvoj i razvoj gonada. Inhibira proizvodnju ekdisteroida. VIH hormon inhibira vitelogenezu. MOIH (mandibular organ-inhibiting hormone) hormon inhibira proizvodnju methyl farnesoata u mandibularnom organu. Zadužen za reprodukciju i razvoj, može uzrokovati heperglikemiju. Perikardijalni organ izlučuje kateholamine (dopamin i octopamin) koji pojačavaju unos Na i CCAP koji pojačava rad srca. Torakalni ganglion proizvodi dva osmoregulacijska hormona (Tullis i Kamemoto, 1974), a u malim količinama nalazi se i CHH (Chang i sur., 1999 a). Neuroregulatori kao što su serotonin, fenfluramin i fluoxetin uzrokuju povećanu razinu CHH u hemolimfi (Santos i sur., 2001).

Epitelijalni endokrini sastoji se od nakupina modificiranih epitelijalnih stanica koje proizvode hormone i oslobađaju ih u hemalne sinuse. U deseteronožaca endokrini organi su: Y-organ, androgena žlijezda, antenalna žlijezda, mandibularni organ i ovariji (Fingerman, 1992).



Slika 14. Endokrini organi u rakova (preuzeto iz Forest i Vaupel Klein-a, 2006). a. kratkorepci; b. dugorepci; c. jednakonošci. 1. Y-organ; 2. mandibularni organ; 3. antenalna žlijezda; 4. jajnici; 5. androgena žlijezda

Y-organ je parni organ koji leži u epidermisu posteriolateralno prema jednjaku, njegov rad regulira X-organ. Y-organ proizvodi: ecdysone (ϵ), 20- hydroxyecdysone (β), 2-deoxy-20 hydroxyecdysone, 25-deoxy-20-20-dihydroxyecdysone, 24-methyl-20-hydroxyecdysone, 25-deoxy-20 hydroxyecdysone, 25-deoxyecdysone, 3-dehydroecdysone. Ekdisteroidi su glavni pokretači ciklusa presvlačenja i smatra se da su uključeni u kontrolu ženskog reproduktivnog ciklusa (Subramoniam, 2000). Androgena žlijezda nalaze se u terminalnom ili subterminalnom dijelu sjemenovoda, odgovorna je za razvoj muških spolnih organa. U deseteronožaca nalazi se u posteriornom dijelu sjemenovoda (Erkan i sur., 2010). O samom razvoju androgene žlijezde ovisi diferencijacija spola u rakova, ako je ona razvijena, rak postaje mužjak. Zaustavi li se njezin razvoj, rak postaje ženka. Proizvodi AH hormon. Antenalna žlijezda regulira fiziološke procese tijekom presvlačenja, reprodukciju, hidromineralni metabolizam. Mandibularni organ proizvodi MF (methyl farnesoate) koji je uključen u metaboličke procese, regulaciju ciklusa presvlačenja, reprodukciju i razvoj. Funkcionira kao gonadotropin u oba spola i stimulira razvoj ovarija. Ovariji proizvode vitelogenin, zadužen za razvoj oocita.

3.2.7. GRADA INTEGUMENTA I PRESVLAČENJE

Stanični epiderm kože izlučuje hitinsku kutikulu koja obavija tijelo rakova. Egzoskelet je sastavljen od 4 osnovna dijela. Izvana je epikutikula, a ispod nje je protokutikula koju izgrađuje egzokutikula i endokutikula. Egzoskelet je čvrste hitinske građe, očvrstnut kalcijevim karbonatom (42%), magnezijevim karbonatom i kalcijevim fosfatom (Travis, 1957). Zbog čvrste građe egzoskeleta rakovi ne mogu rasti kontinuirano, pa je njihov rast vezan za presvlačenje ili ekdisis. Kod nekih rakova nakon nekoliko presvlačenja događa se terminalno presvlačenje iza kojeg više nema presvlačenja.

3.2.7.1 Presvlačenje ili ekdisis

Rast rakova odvija se skokovito i prati se kroz povećanje dužine glavopršnjaka (karapaksa) i povećanje težine. Razlike u hranidbi, temperaturi, svijetlosti, starosti, parametrima okoline, a moguće i genetici nose i razlike u učestalosti presvlačenja i brzini rasta. Deseteronožci sa starošću i odrađenim brojem presvlačenja imaju tendenciju produženja međusvlačnog perioda i sve manjeg dužinskog rasta. Hlap *Homarus americanus* presvlači se deset puta u prvoj godini života, 3-4 puta u drugoj i trećoj, 2 puta u trećoj i četvrtoj i nakon

toga 1 puta godišnje (Cobb i Philips, 1980). Presvlačenje uključuje sve fiziološke i morfološke promjene koje su potrebne da bi se presvlačenje uspješno odvijalo uključujući pripreme i oporavak od presvlačenja.

Možemo razlikovati predsvlačni, presvlačni, poslijesvlačni i međusvlačni period sa pet stadija (A-E) i mnogo podstadija (Drach, 1939; Aiken, 1973; Passano, 1960). Vremensko trajanje A i B perioda je 5 %, C 40-60 % i D 40-60 % ukupnog ciklusa. Vanjski pokazatelji, kao što su tvrdoća oklopa i promjena boje oklopa, koji bi nam mogli pomoći u određivanju perioda i stadija presvlačenja neprecizan je ali najjednostavniji način. Prijesvlačni stadij je dobro uočljiv u *Panulirus argus* po resorptivnoj liniji koja se pojavljuje dužinom bronhiostegita. Par sati prije presvlačenja nabubri intersegmentalna membrana koja dijeli glavopršnjak i abdomen. Prije samog presvlačenja težina naraste 10 % zbog količine resorbirane vode (Travis, 1954). U periodu A oklop je ujednačeno mekan izuzev gornje čeljusti i kliješta, zatim kroz periode B i C dolazi do postepenog otvrdnuća, pa tako na kraju C perioda i početkom D perioda potpuno očvrzne. Stadij C4 je međusvlačni period (Passano, 1960). Pred kraj perioda D dolazi do retrakcije epiderma i vidljivo je omekšavanje i potamnjenje ruba glavopršnjaka (Aiken, 1973).

U međusvlačnom i predsvlačnom periodu deseteronošci stvaraju zalihe (Spindler-Barth, 1976; Stewart i Li, 1969; Hepper, 1977). U međusvlačnom periodu dolazi do skladištenja dušika, magnezija, kalcija, fosfata i glikogena u hepatopankreasu. U predsvlačnom periodu primjećuje se rast razine serumskih proteina, bakra, magnezija i fosfata. Količina Ca raste, od 10-100 % i najvišu razinu dosegne neposredno prije presvlačenja. To se poklapa sa apsorpcijom vode koja nastupa prije presvlačenja. Resorpcija Ca počinje u D₀ i traje do D₄. Morski rakovi pohranjuju samo mali dio Ca iz oklopa, < 10 %, ostatak se izlučuje u predsvlačnom periodu putem crijeva (Travis, 1955 b). Zbog povećane količine Ca hemolimfa može postati mliječne boje u D stadiju (Drach, 1939). Promjene u metabolizmu bjelančevina, masti i ugljikohidrata uvjetovane ciklusom presvlačenja opisali su brojni istraživači (O'Connor i Gilbert, 1968; Travis, 1955 b; Waterman, 1960).

Neki rakovi resorbiraju minerale iz stare kutikule i stvaraju od njih zalihe da bi im kutikula što prije očvrsnula nakon presvlačenja. Za vrijeme otapanja stare kutikule mijenja se sastav krvi. Povećava se koncentracija šećera, masti, kalcija i bjelančevina, ali se ne povećava koncentracija hemocijanina. Koncentracija tih sastavnih dijelova hemolimfe postaje ponovno normalna na kraju presvlačenja. Pri kraju predsvlačnog perioda (D₄) kutikula puca, a mekano tijelo nabuja. Koriste se razni načini da se tijelo održi u maksimalnom obujmu dok nova kutikula ne očvrzne, pa tako rakovi uzimaju vodu apsorpcijom ili pijenjem (Dall i Smith,

1978). Tkiva rastu brzo, a nova kutikula očvrzne za vrijeme poslijesvlačnog perioda. Nakon presvlačenja oklopi rakova su mekani, teško hodaju i nesposobni su jesti. Hrana ne doprinosi kalcifikaciji u A stadiju. Količina uskladištenog Ca ovisi o dostupnosti Ca iz okoliša, za većinu rakova more je glavni izvor Ca. Kalcij se pohranjuje kao kalcosferit u hepatopankreasu (Greenaway, 1985) i u gastrolitima kao kalcijev karbonat. Najprije očvrzne gornja čeljust i kliješta. Za to se vrijeme mineralne zalihe brzo troše.

Presvlačenjem upravljaju neurohormoni. U rakova su otkrivene tri skupine hormonalnih struktura. Takozvani X -organ sinusno-žljezdano kompleksa. Nalazi se unutar očnog drška. Na antenalnom ili 2. maksilarnom kolutiću nalazi se Y organi koji potiču presvlačenje. Ako se Y organi odstrane ne dolazi do presvlačenja. Sekrecijom Y organa započinju promjene presvlačenja koje se ne mogu zaustaviti ni u slučaju da se Y organ odstrani. MIH hormon regulira duljinu perioda između dva presvlačenja. MIH hormon ili inhibirajući hormon je peptid kojeg proizvodi X-organ, transportira se aksonima do sinusno-žlijezde gdje se skladišti ili otpušta. Djeluje na Y-organ i inhibira otpuštanje MH hormona. Druga skupina hormona ubrzava pripremu za presvlačenje. Y-organ proizvodi ecdyson koji se pretvori u ecdysteron. Treći hormon kontrolira količinu vode i svoju djelatnost povećava za vrijeme presvlačenja. Spomenuta tri skupine hormona ne djeluju na presvlačenje izravno, nego preko hormona izlučenih iz Y-organa.

3.2.8. BOLESTI

S obzirom na uzročnika bolesti rakova dijelimo na bakterijske, virusne, parazitarne i gljivične. Podatci o bolestima rakova u divljini oskudni su i odnose se na snažne epizootije. Veći broj podataka o bolestima na divljoj populaciji odnosi se na vrste koje su tržišno zanimljive i na tržište dolaze žive. U novije vrijeme brojnija su izvješća iz uzgajališta i mrjestilišta rakova.

3.2.8.1. Bakterijske bolesti

Hlapovi iz roda *Homarus* jako su osjetljivi na bakteriju *Aerococcus viridans* koja uzrokuje bolest nazvanu Gaffkaemia ili bolest crvenih repova. *A. viridans* je gram pozitivna bakterija koja nije dio normalne bakterioflore hlapa. Uzročnik ulazi kroz oštećenja egzoskeleta. U ostalih vrsta rakova ova bakterija ne uzrokuje bolest. Bolesni rakovi su slabi, anoreksični, abdomen je crvene boje, hemolimfa je svijetlo roze ili crvene boje i ne gruš a se.

U hepatopankreasu, srcu i skeletnim mišićima bolesnih rakova pada količina glikogena. U hemolimfi se smanjuje broj hemocita, pada količina glukoze i laktatne kiseline (Stewart i sur., 1969).

Tijekom lova jastoga *Homarus americanus* koji se odvija ljeti i u jesen u Novoj Engleskoj do 10 % ulovljenih rakova su mekanog oklopa. Takvi rakovi drže se u zatočeništvu dok im ne očvrstne oklop. U uvjetima zatočeništva koje često prate stres, velika gustoća nasada i loša kvaliteta vode javlja se shell-disease bolest. Bolest je karakteristična po lezijama i erozijama na oklopu. Primarni uzrok je oštećenje oklopa koje se komplicira sa hranidbenim stresom i lošim uvjetima držanja. Lezije su pozitivne na gram negativne bakterije: *Vibrio*, *Pseudomonas* i *Aeromonas*. Bolesni rakovi imaju 35% manje lipida u hepatopankreasu i 40 % manje proteina u hemolimfi (Floreto i sur., 2000). Stewart i Cornick (1972) ustanovili su manjak glukoze u hlapa *Homarus americanus* kao posljedicu infekcije sa *A. viridans* tijekom gaffkemije.

Bakterije *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus* i *Vibrio anguillarum* su oportunističke bakterije koje uzrokuju bolest kod imunokompromitiranih jedinki. Ova grupa bakterija se često izolira kod zdravstvenih problema rakova i vjerojatno je uzročnik septikemija koje prate ozljede, stres i bolesti (Shields i sur., 2006).

3.2.8.2. Virusne bolesti

PaV1 virus inficira *Panulirus argus*-a i pretpostavlja se da je on uzrok pada ulova jastoga za 45 % od prijašnjih ulova na Karibima. Primarno napada mlade jastoge 20-55 mm dužine glavopršnjaka. Širi se kontaktom, hranom, suživotom (udaljenost manja od 1m). Kod *Panulirus argus*-a DNAvirus PaV1 uzrokuje hipertrofiju jezgre i u inficiranim hemocitima mogu se naći viralne inkluzije. Bolest zahvaća hijaline hemocite i male granulocite, dok se promjene ne nalaze u velikim granulocitima (Shields i Behringer, 2004). U bolesnih životinja hepatopankreas je imao manje R stanica što upućuje na smanjenje glikogenskih zaliha. Inficirani jastozi imaju manje hemocita i nižu razinu glukoze od neinficiranih jastoga (Li i sur., 2008). Razina fosfora i triglicerida je značajno manja u slabije inficiranih i značajno veća u jako inficiranih jastoga. Jednaki trend varijacija u razinama imaju AST, ALKP i proteini seruma. Simptomi bolesti su letargija, gubitak ravnoteže, tremori i mliječno kredasta hemolimfa koja ne koagulira (Johnson, 1983). Morfološki sličan virus prijavljen je u hemocitima *Callinectes sapidus* (Johnson, 1976).

Virusi su ekonomski bitni patogeni u uzgoju kozica. Nije neobično da virusi inficiraju hemocite. Među 13 utvrđenih, WSSU (white spot syndrome virus) je jedan od najbitnijih i izaziva velike gubitke (Yoganandhan i sur., 2003). Virus inficira samo male i velike granulocite. Razina glukoze, ALT i AST je značajno veća u hemolimfi, hepatopankreasu, škragama i mišićima *P. indicus* (Mohankumur i Ramasamy, 2006 a). U Americi i Aziji velike gubitke izazivaju i IHHNV (infections hypodermal and haemotopoetic necrosis virus), YHV (yellowhead virus) i TSV (taura syndrome virus) (Shields i sur., 2006).

3.2.8.3. Gljivične bolesti

U divljini, među odraslim rakovima nije uočena infekcija gljivicama. Najveći broj izvještaja o gljivičnim infekcijama opisuje slučajeve iz uzgoja. Razlog je vjerojatno uzgojni medij koji je najčešće visoke temperature, bogat hranjivim tvarima i obogaćen kisikom. Većinu gljivičnih bolesti u deseteronožaca uzrokuju gljivice iz razreda *Oomycetes*, *Phycomycetes* i *Denteromycetes*.

Miceliji gljivice roda *Lagenidium* nalaze se u unutrašnjim organima larvi *Homarus americanus*, *Penaeus setiferous* i *Cancer magister* ili inficiraju jaja kao u *Cancer sapidus* (Rodgers-Talbert, 1948). Primarno inficiraju embrije i larvalne stadije.

Miceliji gljivice roda *Haliphthoros* uzrokuje smrt poslarvalnih hlapova i jastoga. U recirkulacijskim sistemima *Haliphthorus milfordensis* uzrokuje velike gubitke kod *Homarus americanus* i *Homarus gammarus* (Fisher i sur., 1975). Gljivice se razvijaju ispod glavopršnjaka, u škržnoj šupljini i zglobovima tjelesnih privjesaka. Simptomi bolesti su letargija, gubitak apetita, smeđe nekrotične lezije po škragama. Melanizacija je crveno smeđe boje.

Gljivica iz roda *Fusarium* uzrokuje bolest koju nazivamo „black spot“ i javlja se u *Homarus americanus* (Lightner i Fontaine, 1975) ili „black gill disease“ u *Penaeus japonicus* (Egusa i Ueda, 1972). Hife i konidije *Fusarium solani* mogu se naći u škržnim lamelama i endokutikuli. Hemociti okružuju hife, inkapsuliraju ih i stvaraju melanin crne boje. Simptomi bolesti su crne lezije, uglavnom na abdominalnom području, telsonu i uropodima. Lezije su granulomatozne. (Shields i sur., 2006).

3.2.8.4. Parazitarne bolesti

Protozoarni paraziti brojni su na rakovima, pojedini izazivaju velike gubitke i utječu na preživljavanje rakova u uzgoju. Trepetljikaš *Anophryoides haemophila* uzrokuje bolest u *Homarus americanus*. Parazit ima predispoziciju prema tkivima bogatim kisikom kao što su škrge, vezivno tkivo i hepatopankreas. Inficirani rakovi imaju hemolimfu bijele mliječne boje koja se ne gruša. *Hematodinium perezii* je dinoflagelat koji živi u hemolimfi rakova i brzo proliferira. Mortalitet je velik i može biti do 75 %. Uzrokuje bolest kod *Cancer pagurus*, *Cancer*, *irroratus*, *Cancer borealis*, *Ovalipes ocellatus*, *Nephrops norvegicus*. Inficirani rakovi su letargični, narančaste boje, hemolimfa je mliječno bijele boje i ne gruša se, mišićje je atrofirano i vodenasto (Shields i sur., 2003).

Mikrosporidije su intracelularni paraziti. Truskavac *Ameson michaelis* uzrokuje lizu mišićja, te tkivo nalikuje pamuku i neprikladno je za hranu. Ameba *Paramoeba perniciosa* inficira živčano tkivo, vezivno tkivo i hemolimfu rakova, ventralna površina tijela poprima sivu boju (Couch, 1983). Rakovi su slabi i pokazuju znakove paralize dijelova tijela.

Vrpčar *Carcinonemertes regicides* i *Carcinonemertes carcinophila* (Nemertea) se hrane jajima brojnih vrsta rakova i utječu na fekunditet (Shields i Wood, 1993). Kukaš *Polymorphus botulis* (*Acanthocephala*) parazitira u stijenci crijeva, hepatopankreasu ili slobodan u hemocelu. Uzrokuje kastraciju, promjenu pigmentacije i promjene u ponašanju (Shields i sur., 2006).

4. MATERIJALI I METODE RADA

4.1. ISTRAŽIVANI RAKOVI I KREIRANJE EKSPERIMENTA

U istraživanje su bile uključene tri tržišno vrlo važne vrste rakova, jastog *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787.), velika rakovica *Maja squinado* (Herbst, 1788) i grmalj *Eriphia verrucosa* (Forsk., 1775). Velika rakovica je uzorkovana u Novigradskom moru 2.03. 2010 godine. Uzorkovano je 68 komada iz ulova. Nakon ulova držana je u vanjskim bazenima sa protokom svježeg mora čija je temperatura bila 11 °C. U bazenima su bile 24 h, nakon toga su transportirane do laboratorija. Transportirane su do laboratorija u termo izoliranim posudama, izložene zraku i pothlađene radi umanjivanja stresa i humanog ponašanja sa životinjama. Transport je trajao 4 h. Bile su 9 h izložene zraku.



Slika 15. Vanjski bazeni za držanje rakovica u Novigradu

Grmalj je uzorkovan na tri lokacije, Starigrad 9.06., Vrsi 13.09. i Ždrelac 2.10. 2010 godine. Uzorkovano je 76 komada. Temperatura mora bila je 20 °C. Nakon ulova transportirani su u

termo izoliranim posudama, izloženi zraku i pothlađeni radi umanjivanja stresa i humanog ponašanja sa životinjama. Bili su 9 h izloženi zraku.

Jastog je uzorkovan u Komiži, 24.07. i 30.08. 2010. Uzorkovano je 39 komada iz ulova. Nakon ulova jastozi su držani u bazenima sa dotokom svježeg mora. Prva grupa je transportirana u hladnjači izložena zraku i pothlađena do Zadra, smještena tri dana u bazenu na temperaturi 18 °C i zatim transportirana u termo izoliranim posudama, izložena zraku i pothlađena radi umanjivanja stresa i humanog ponašanja sa životinjama. Transport je trajao 4 h. Bili su 9 h izloženi zraku. Druga grupa je transportirana u hladnjači izložena zraku i pothlađena do Zadra, smještena tri dana u bazen na temp. 16 °C, zatim transportirana u termo izoliranim posudama, izložena zraku i pothlađena radi umanjivanja stresa i humanog ponašanja sa životinjama. Transport je trajao 4 h. Bili su 9 h izloženi zraku.

Rakovima je uzorkovana hemolimfa, nakon toga napravljena je biometrija, određen spol i stupanj presvlačenja. Uzorci tkiva: hepatopankreasa, probavnog sustava, škrge, srce i gonada 20 rakova uzorkovani su za histološke analize. Za biokemijsku analizu uzimali su se uzorci hemolimfe u epruvete s EDTA, odmah nakon toga centrifugirala se na StatSpin 12 000 g kroz 95 sekundi i potom se dobivena plazma spremila na -80 °C. Biokemijske analize hemolimfe obavljene su uz pomoć biokemijskog analizatora. Obradili su se sljedeći parametri hemolimfe: ukupni proteini (TP), kolesterol (CHOL), trigliceridi (TRIG), glukoza (GLU), urea (BUN), kreatinin (CREA), alanin aminotransferaza (ALP), kreatinin kinaza (CK), aspartat aminotransferaza (AST), gama glutamil transpeptidaza (GGT), laktat dehidrogenaza (LDH). Minerali u serumu analizirani su na atomskom apsorpcijskom spektrometru, AAnalyst 200, (Perkin Elmer instruments, SAD). Rakovici se uzimala hemolimfa iz ventralnog sinusa kroz zglobnu membranu na osnovi 5 pereipoda, grmalju iz perikardijalne šupljine, jastogu iz ventralne abdominalne arterije.

4.2. METODA ULOVA

Velika rakovica (*Maja Squinado*) ulovljena je u Novigradskom moru. Za ulov se koristila mreža rakovica (Cetinić i Swiniarski, 1985). Mreža rakovica je jednostruka mreža stajačica koja se smije koristiti u ribolovu na doček. Duljina mreže iznosi oko 45 metara odnosno 200-220 oka, a visina do 4,5 oka. Veličina jedne stranice oka popone iznosila je 160 mm. Mreža se spuštala navečer i dizala u jutarnjim satima. Rakovice su nakon ulova držane u bazenima sa stalnim protokom svježeg mora. Ribolov je obavljen u razdoblju dopuštenog lova od 1. prosinca do 1. lipnja.



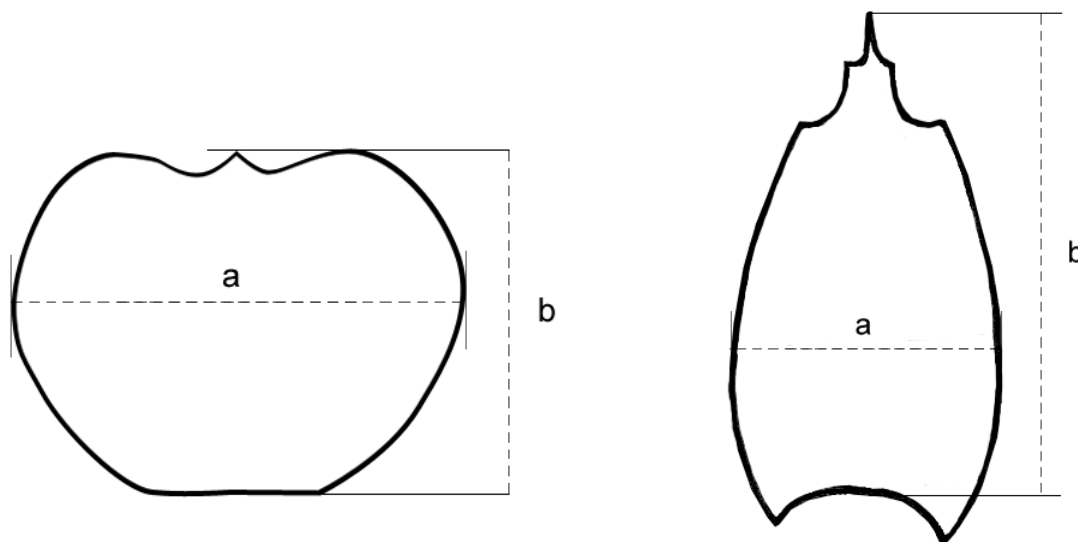
43

Grmalj (*Eriphia verrucosa*) ulovljen je u Starigradu, na otoku Pašmanu i u Vrsima kraj Zadra. Ulovljen je ručno u noćnom lovu. Pri lovu je korišteno svjetlo. Ribolov je obavljen u razdoblju dopuštenog lova.

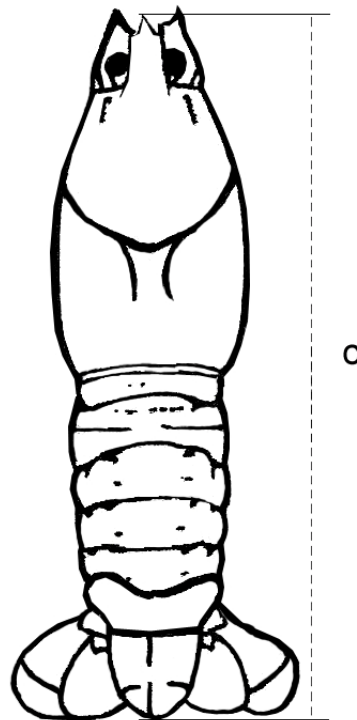
4.3. BIOMETRIJSKA MJERENJA UZORAKA RAKOVA

Tijekom istraživanja na svim rakovima obavljena su biometrijska mjerenja. Biometrijskim mjerenjima ribe obuhvatili smo sljedeće pokazatelje:

- Dužina glavopršnjaka mjerena je pomičnom mjerkom od dorzalno anteriorne točke, između rostuma, do posteriorne točke koja je bila dorzalno posteriorna sredina glavopršnjaka.
- Ukupna dužina je mjerena samo kod jastoga. Mjerena je metrom od dorzalno anteriorne točke, između rostruma, do posteriorne sredine telsona.
- Širina glavopršnjaka mjerena je na velikoj rakovici i grmalju. Mjerena je pomičnom mjerkom u najširem dijelu glavopršnjaka.
- Ukupna težina rakova mjerena je digitalnom vagom Mettler Toledo (0,01g).



Slika 18. Mjerenje dužine i širine glavopršnjaka. a. širina glavopršnjaka; b. dužina glavopršnjaka



Slika 19. Dužina dugorepaca. c. ukupna dužina tijela

4.4. ODREĐIVANJE STADIJA PRESVLAČENJA

Stadij presvlačenja određen je prema Drach-u, (1939), koji je ciklus podijelio na pet stadija A-E i više podstadija. Aiken (1973) je modificirao podjelu i prilagodio je jastozima. Stadij presvlačenja svakog pojedinog raka odredili smo prema tvrdoći oklopa (A-E) uzimajući u obzir promjene u tvrdoći oklopa glavopršnjaka (slika 20) navedene za svaki stadij i podstadij.

A₁- mekano tijelo, apsorpcija vode, promjena dimenzija tijela koja završava 4-8 h nakon presvlačenja

A₂ - oklop mekan, usta i vrhovi kliješta tvrdi, započinje mineralizacija

B - oklop fleksibilan

C₁ - oklop fleksibilan, započinje kretanje

C₂ - glavopršnjak postaje tvrd u posteriodorzalnom dijelu do rostruma

C₃ - branhialni dio glavopršnjaka mekan, sve ostalo tvrd

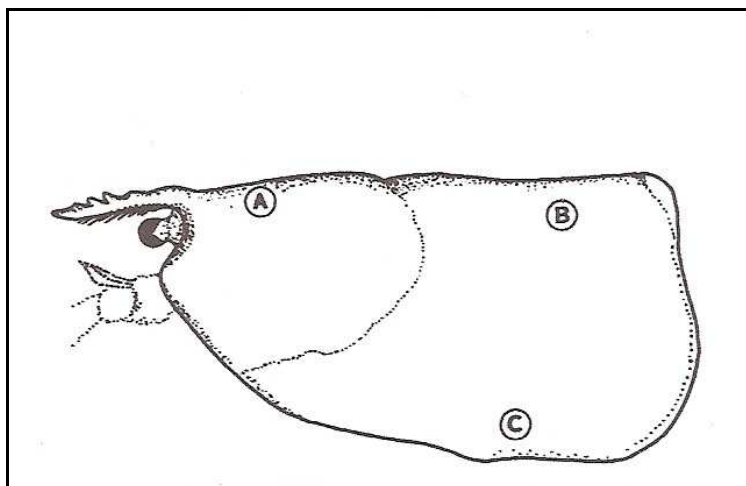
C₄ - svi dijelovi glavopršnjaka tvrdi, međusvlačni stadij

D₁ - pasivni predsvlačni stadij, retrakcija epiderma

D₂ - aktivno predsvlačni stadij

D₃ - resorpcija minerala iz egzoskeleta,

E - pasivna faza presvlačenja, apsorpcija vode, aktivna faza presvlačenja, puca torakalno-abdominalni membrana, skida se glavopršnjak



Slika 20. Korištenje tvrdoće glavopršnjaka u određivanju stadija presvlačenja. A. lagano udubljivanje pod prstima u području A- stadij B ili C₁. Ukoliko je područje A tvrdo ali se područje B može udubiti – stadij C₃. Ukoliko je područje A, B i C tvrdo- stadij C₄. (preuzeto iz Aiken, 1973)

4.5. ODREĐIVANJE SPOLA RAKOVA

Kod određivanja spola služili smo se vanjskim spolnim oznakama. Vanjske spolne oznake vidljive su kod mužjaka na osnovi petog pereipoda gdje se nalazi spolni otvor ili gonopora. Spolni otvor mužjaka kod grmalja i rakovice prekriven je repom (slike 22 i 26) dok je kod jastoga oblika male stope na osnovi petog pereipoda (slika 24). Vanjske spolne oznake vidljive su kod ženki na osnovi trećeg pereipoda. Spolni otvor ženke kod grmalja i rakovice prekriven je repom (slike 21, 23 i 25), dok je kod jastoga spolni otvor nezaštićen repom.



Slika 21. Vanjske spolne oznake ženke velike rakovice



Slika 22. Vanjske spolne oznake mužjaka velike rakovice



Slika 23. Vanjske spolne oznake ženke jastoga



Slika 24. Vanjske spolne oznake mužjaka jastoga



Slika 25. Vanjske spolne oznake ženke grmalja



Slika 26. Vanjske spolne oznake mužjaka grmalja

4.6 OBRADA UZORAKA HEMOLIMFE I BIOKEMIJSKE ANALIZE HEMOLIMFE

Po dolasku u laboratorij uzorkovana je hemolimfa za biokemijske analize. Za biokemijsku analizu uzimani su uzorci hemolimfe u epruvete s EDTA, centrifugirani su na StatSpin 12 000 g kroz 95 sekundi i potom je plazma pohranjena na -80°C do obrade na analizatoru. Plazma je analizirana na Zavodu za fiziologiju i radiologiju Veterinarskog fakulteta u Zagrebu. Vrijednosti biokemijskih parametara hemolimfe: ukupni proteini (TP), kolesterol (CHOL), trigliceridi (TRIG), glukoza (GLU), urea (BUN), kreatinin (CREA), alanin aminotransferaza (ALP), kreatinin kinaza (CK), aspartat aminotransferaza (AST), gama glutamil transpeptidaza (GGT), laktat dehidrogenaza (LDH), određivali su se kolorimetrijskom metodom uz pomoć biokemijskog analizatora SABA 18 (AMS, Italija) sa reagensima Dijagnostike d.o.o. (Sisak). Minerali u serumu analizirani su na atomskom apsorpcijskom spektrometru, AAnalyst 200, (Perkin Elmer instruments, SAD) u Bolnici za infektivne bolesti, Zagreb. Kalcij, magnezij i bakar su izraženi u mmol/L. Cink se izražava u $\mu\text{mol/L}$, ali kako su vrijednosti bakra kod rakovica, grmalja i jastoga bile puno više nego kod ljudi, preračunati su u mmol/L. Koristio se standardni panel za kralježnjake.



Slika 27. Uzimanje uzorka hemolimfe iz ventralne abdominalne arterije jastoga

4.7. HISTOLOŠKE ANALIZE

Histološka obrada tkiva hepatopankreasa, probavnog sustava, škrge, srca i gonada obavljena je prema Clark i sur. (1973). Uzorci tkiva fiksirani su u Davidsonovom fiksativu (Bell i Lightner, 1988), sastava navedenog pod točkom 1.. Omjer tkiva i dodanog fiksativa bio je 1:10. Fiksacija je trajala 24-72 h, nakon čega su uzorci tkiva prebačeni u 50 % etanol na neodređeno vrijeme. Tkivo je zatim dehidrirano u slijedu alkohola različitih koncentracija (70 %, 96 %, 96 %, 100 %, 100 %) i ksilolu, te prožimano u paraplustu pod tlakom (histokinet Leica TP1020). Za parafinsko uklapanje u blokove korišten je parafinski dispensor Tissue Tek Leica EG 1120. Rezovi su napravljeni mikrotomom RM2255.

Osušeni preparati bojani su hematoksilinom i eozinom po sljedećem postupku: 2 x 2 minute rehidriranje sa ksilenom, 1 x 2 minute apsolutni alkohol, 2 x 1 minuta apsolutni alkohol, 1 x 1 minuta voda iz slavine, Mayer-ov hemotoksilin (točka 2.) kroz 8 minuta, voda iz slavine 30 sekundi, kiseli alkohol (točka 3.) 30 sekundi, Young-ov eozin (točka 4.) 4 minute, voda iz slavine 1 minuta, dehidracija 3 x 10 uranjanja u slijedu alkohola (70 %, 96 %, 100 %) i 2 x 2 minute u ksilenu. Preparat je uklopljen u kanadski balzam i sušio se najmanje jedan sat na 37 °C.

1. Davidson fiksativ

Kiseli alkohol	110 ml
95% etanol	330 ml
Destilirana voda	335 ml
Formalin	220 ml

2. Mayer-ov hematoksilin

Hematoksilin	2 g
Natrijev jodid	0,4 g
Aluminij amonij sulfat	100 g
Limunska kiselina	2 g
Kloralni hidrat	100 g
Destilirana voda	2 L

3. Kiseli alkohol 0,5%

Hidroklorična kiselina	0,5 ml
Izopropanol	69,8 ml
Destilirana voda	29,7 ml

4. Young-ov eozin

Eozin	15 g
Eritrozin	5 g
Kalcij klorid	55 g
Destilirana voda	2 L

Zatim su se mikroskopski pregledali preparati koristeći svjetlosni mikroskop Olympus BX51 sa pratećim SW za automatsku obradu slike tipa analySIS-PRO.

4.8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Tijekom istraživanja provodila se statistička obrada prikupljenih podataka. Za sve prikupljene rezultate provela se deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, mjere disperzije) kao i analiza značajnosti razlika (t-testovi) i povezanosti (korelacije, faktorske analize) između mjerenih varijabli. Sve statističke analize obavile su se pomoću programskih paketa Statsoft Statistika 7 i Microsoft Office.

Pored klasičnih statističkih metoda u analizi i interpretaciji ovisnosti mjerenih parametara o vrsti rakova, u ovom radu su korištene i metode dubinske analize podataka (data mining) koje često koriste algoritme iz područja strojnog učenja. Ovim pristupom dobivaju se modeli koji koriste podatke na efikasniji način od standardnih statističkih metoda. Pristup modeliranju podataka preko strojnog učenja omogućava, u nekim slučajevima istovremeno korištenje podataka sa prediktivnog aspekta, ali i modele podataka koji omogućavaju jednostavniju interpretaciju sa stanovišta varijabli od interesa za istraživani fenomen. U smislu dubinske analize podataka (engleski naziv je - data mining), možemo stoga razlikovati deskriptivne i prediktivne modele.

Deskriptivni ili opisni modeli podataka dobiveni su korištenjem programskog paketa WEKA (Witten i Frank, 1999), poznatog paketa programa za dubinsku analizu podataka iz kojeg je korištena implementacija programa C4.5 (Quinlan, 1992) za izgradnju stabla odlučivanja. Također je za vizualizaciju više-dimenzijskih podataka korišten programski paket R (R Development Core Team, 2007) koji doslovce sadrži stotine (možda i tisuće) algoritama i tehnika za obradu podataka. U sklopu paketa R, korištena je i implementacija algoritma slučajnih šuma (Breimen, 2001; Liaw i Wiener, 2002) (en. Random Forest), za određivanje važnosti varijabli odnosno transformiranje u niže-dimenzijski prostor radi vizualizacije podataka.

Prediktivni značaj mjerenih parametra na mjerenom uzorku ocjenjivali smo korištenjem Experimenter okruženja WEKA paketa, koje omogućuje usporedbu većeg broja konkurentnih modela na istim podacima. Pri tom smo se koristili uobičajenim evaluacijskim pristupom za strojno učenje – unakrsnom validacijom (en cross-validation).

Algoritam stabla odlučivanja jedan je od najčešće korištenih algoritama u dubinskoj analizi podataka. Algoritam stabla odlučivanja rekurzivno dijeli skup podataka u čvorovima stabla, prema optimalnim uvjetima (vrijednost određene varijable), koje su naznačene na granama stabla ispod čvora. Optimalni uvjet za pojedini čvor stabla je onaj koji maksimalno smanjuje entropiju primjera (u smislu homogenosti klase primjera), u podskupovima koji nastaju “cijepanjem” primjera u konkretnom čvoru. Stablo se gradi od gore (kompletni skup primjera), prema nadolje, a čvorovi pri dnu, nakon kojih se stablo više ne grana, su čvorovi odluke (ili listovi stabla), u kojima je definirana klasa primjera koji zadovoljavaju uvjete na putu od prvog čvora prema konkretnom čvoru odluke. Čvorovi odluke nastaju ako su zadovoljeni predefinirani uvjete (od strane korisnika), o homogenosti čvora u smislu klasa primjera, maksimalnoj dozvoljenoj dubini stabla, ili nekom drugom, složenijem uvjetu.

Algoritam slučajnih šuma počiva na algoritmu stabla odlučivanja, no, umjesto izgradnje jednog stabla, izgrađuje cijeli niz stabala, koristeći pritom randomizaciju i u odabiru primjera i odabiru varijabli za gradnju modela. Odabir primjera predstavlja postupak pod nazivom “bootstrapping”, u kojem se zapravo iz postojećih podataka izdvaja određeni podskup. Na tako odabranim primjerima se gradi jedan model (stablo odlučivanja), ali se za gradnju pojedinog stabla koristi samo određeni, manji podskup, slučajno odabranih varijabli. Građenjem većeg broja stabala, te njihovim “glasanjem” u smislu klasificiranja nekog novog primjera (primjer koji nije korišten za izgradnju modela), stvara se znatno robustniji model u odnosu na model jednog stabla odlučivanja. No, pored prediktivne točnosti algoritam slučajnih šuma također omogućava niz drugih analiza ili modela i to preko statistika dobivenih usporedbom rezultata pojedinih stabala: (i) određivanje značaja pojedinih varijabli za stvaranje klasifikacijskog modela (odnosno razlikovanje klasa), (ii) prikaz odnosa (međusobne udaljenosti) primjera u niže-dimenzionalnom prostoru prikaza podataka, (iii) formiranje tzv. prototipova primjera pojedine klase primjera, (iv) parcijalne ovisnosti varijabli o klasama i slično.

U našim analizama koristili smo opciju određivanja značaja pojedinih varijabli za stvaranje klasifikacijskog modela, odnosno razlikovanje između klasa primjera.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. BIOMETRIJSKA MJERENJA ISTRAŽIVANIH VRSTA RAKOVA

5.1.1. Biometrijska mjerenja rakovice *Maja squinado*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija mjerenih biometrijskih obilježja za cijeli uzorak rakovica prikazani su u tablici 1, u tablici 1a izdvojene su vrijednosti za mužjake rakovice, u tablici 1b za ženke rakovica. Ulovljeno je ukupno 63 rakovice od čega 49 mužjaka i 14 ženki. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 2) utvrđeno je da nema spolnih razlika u vrijednostima mjerenih biometrijskih parametara rakovica. U tablici 3 prikazana je povezanost težine rakovica sa dužinom i širinom glavopršnjaka. Težina rakovice pokazuje visoku povezanost sa dužinom i težinom glavopršnjaka ($r = 0,93$; $r = 0,93$). Nismo ulovili nijednu ženku koja je nosila vanjska jaja.

Tablica 1. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja cijelog uzorka rakovica

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	63	12,46	9,80	15,20	1,18
Širina glavopršnjaka (cm)	63	10,51	8,20	13,10	1,09
Težina (gr)	63	569,53	277,17	1020,70	176,29

Tablica 1a. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja mužjaka rakovica

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	49	12,48	9,80	15,20	1,21
Širina glavopršnjaka (cm)	49	10,51	8,20	13,10	1,15
Težina (gr)	49	582,39	277,17	1020,70	185,11

Tablica 1b. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja ženki rakovica

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	14	12,39	10,20	13,80	1,13
Širina glavopršnjaka (cm)	14	10,50	8,80	12,20	0,95
Težina (gr)	14	524,51	300,86	738,00	132,98

Tablica 2. Prikaz testiranja spolnih razlika u biometriji rakovica

	M (m)	M (ž)	t	df	p	N (M)	N (Ž)
Dužina glavopršnjaka (cm)	12,48	12,39	0,23	61	0,82	49	14
Širina glavopršnjaka (cm)	10,51	10,50	0,02	61	0,98	49	14
Težina (gr)	582,39	524,51	1,08	61	0,28	49	14

Tablica 3. Prikaz korelacija između biometrijskih mjera za cijeli uzorak rakovica

	Dužina glavopršnjaka	Širina glavopršnjaka	Težina
Dužina glavopršnjaka (cm)	1,00	0,96	0,93
Širina glavopršnjaka (cm)	0,96	1,00	0,93
Težina (gr)	0,93	0,93	1,00

5.1.2. Biometrijska mjerenja jastoga *Palinurus elephas*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija mjerenih biometrijskih obilježja za cijeli uzorak jastoga prikazani su u tablici 4, u tablici 4 a izdvojene su vrijednosti za mužjake jastoga, u tablici 4 b za ženke jastoga. Ulovljeno je ukupno 39 jastoga od čega 9 mužjaka i 30 ženki. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 5) utvrđeno je da mužjaci imaju značajno duže glavopršnjake. U tablici 6 prikazana je povezanost težine jastoga sa ukupnom dužinom i dužinom glavopršnjaka. Težina jastoga pokazuje visoku povezanost sa ukupnom dužinom i dužinom glavopršnjaka ($r = 0,83$; $r = 0,77$). Nismo ulovili nijednu ženku koja je nosila vanjska jaja.

Tablica 4. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja cijelog uzorka jastoga

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Ukupna dužina (cm)	39	27,04	21,50	36,5	3,31
Dužina glavopršnjaka (cm)	39	11,32	9,30	13,2	1,17
Težina (gr)	39	517,09	308,00	1492,0	218,64

Tablica 4 a. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja mužjaka jastoga

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Ukupna dužina (cm)	9	29,38	24,90	36,50	3,08
Dužina glavopršnjaka (cm)	9	12,18	10,90	13,20	0,90
Težina (gr)	9	685,79	481,00	1492,00	315,93

Tablica 4 b. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja ženki jastoga

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Ukupna dužina (cm)	30	26,33	21,50	32,10	3,09
Dužina glavopršnjaka (cm)	30	11,06	9,30	13,20	1,13
Težina (gr)	30	466,48	308,00	888,00	153,69

Tablica 5. Prikaz testiranja spolnih razlika u biometriji jastoga

	Mm	MŽ	t	df	p	Nm	NŽ
Ukupna dužina (cm)	29,4	26,3	2,59	37	0,014	9	30
Dužina glavopršnjaka (cm)	12,2	11,1	2,72	37	0,010	9	30
Težina (gr)	685,8	466,5	2,88	37	0,007	9	30

Tablica 6. Prikaz korelacija između biometrijskih mjera za cijeli uzorak jastoga

	Ukupna dužina	Dužina glavopršnjaka	Težina
Ukupna dužina (cm)	1,00	0,86	0,83
Dužina glavopršnjaka (cm)	0,86	1,00	0,77
Težina (gr)	0,83	0,77	1,00

5.1.3. Biometrijska mjerenja grmalja *Eriphia verucosa*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija mjerenih biometrijskih obilježja za cijeli uzorak grmalja prikazani su u tablici 7, u tablici 7 a izdvojene su vrijednosti za mužjake grmalja, u tablici 7 b za ženke grmalja. Ulovljeno je ukupno 76 grmalja od čega 47 mužjaka i 29 ženki. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 8) utvrđeno je da mužjaci grmalja imaju značajno veću težinu od ženki grmalja. U tablici 9 prikazana je povezanost težine grmalja sa dužinom i širinom glavopršnjaka. Težina grmalja pokazuje visoku povezanost sa dužinom i širinom glavopršnjaka ($r = 0,87$; $r = 0,90$). Nismo ulovili nijednu ženku koja je nosila vanjska jaja.

Tablica 7. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja cijelog uzorka grmalja

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	76	5,23	3,90	7,20	0,80
Širina glavopršnjaka (cm)	76	6,29	5,00	8,20	0,82
Težina (gr)	76	103,12	37,13	296,00	48,28

Tablica 7 a. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja mužjaka grmalja

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	47	5,36	3,90	7,20	0,78
Širina glavopršnjaka (cm)	47	6,40	5,00	8,20	0,81
Težina (gr)	47	113,52	48,16	296,00	50,86

Tablica 7 b. Prikaz rezultata biometrijskog mjerenja ženki grmalja

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
Dužina glavopršnjaka (cm)	29	5,04	4,00	6,90	0,82
Širina glavopršnjaka (cm)	29	6,10	5,00	7,90	0,81
Težina (gr)	29	86,25	37,13	192,00	38,96

Tablica 8. Prikaz testiranja spolnih razlika u biometriji grmalja

		M m	M ž	t	df	p	Nm	Nž
Dužina	glavopršnjaka (cm)	5,4	5,04	1,69	74	0,09	47	29
Širina	glavopršnjaka (cm)	6,4	6,10	1,56	74	0,12	47	29

Težina (gr)	113,5	86,25	2,47	74	0,016	47	29
--------------------	--------------	--------------	------	----	-------	----	----

Tablica 9. Prikaz korelacija između biometrijskih mjera za cijeli uzorak grmalja

	Dužina glavopršnjaka	Širina glavopršnjaka	Težina
Dužina glavopršnjaka (cm)	1,00	0,89	0,87
Širina glavopršnjaka (cm)	0,89	1,00	0,90
Težina (gr)	0,87	0,90	1,00

5.2. BIOKEMIJSKA MJERENJA ISTRAŽIVANIH VRSTA RAKOVA

5.2.1. Biokemijska mjerenja rakovice *Maja squinado*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija biokemijskih parametara za cijeli uzorak rakovica prikazani su u tablici 10, u tablici 10 a izdvojene su vrijednosti za mužjake rakovice, u tablici 10 b za ženke rakovica. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 11) utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima rakovica. Statistički značajne razlike utvrđene su u razinama kalcija i magnezija. U tablici 12 prikazani su rezultati povezanosti biometrijskih vrijednosti i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka rakovica. CK i Zn su nisko negativno povezani s dužinom glavopršnjaka, širinom glavopršnjaka i težinom rakovica. U tablici 13 prikazani su rezultati povezanosti biokemija cijelog uzorka rakovica. Razina kolesterola je vrlo jako pozitivno povezana sa razinom triglicerida ($r = 0,91$) i jako pozitivno povezana sa razinom uree ($r = 0,79$). Razina triglicerida je jako pozitivno povezana sa razinom uree ($r = 0,79$). Razina Cu je umjereno pozitivno povezana sa razinom Zn ($r = 0,48$). S obzirom na brojne povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente. Koristio se Keiser-Gutmanov kriterij za određivanja broja faktora ($Eigen > 1$). U tablici 14 prikazan je rezultat provedene faktorske analize (metoda: glavne komponente) biokemijskih parametara rakovice.

U tablici 15 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 1. pri čemu 57 % varijabiliteta izdvojenih 5 parametara biokemija rakovica objašnjava zajednički faktor. Najveće faktorsko zasićenje imaju CHOL i TRIG. U tablici 16 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 2. LDH i CK imaju najveće faktorsko zasićenje na drugom faktoru. Izdvojenih 6 parametara biokemije dijele 37 % zajedničke varijance.

Tablica 10. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja cijelog uzorka rakovica. N – broj rakova; M – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
LDH U/L	57	36,89	6,00	107,00	22,88
CK U/L	60	307,50	28,00	773,00	238,78
TP g/L	61	47,74	11,00	81,00	11,75
CHOL mmol/L	61	0,84	0,30	1,42	0,31
TRIG mmol/L	61	0,23	0,07	0,40	0,09
BUN mmol/L	61	3,17	0,80	6,08	1,16
GLU mmol/L	61	2,92	1,10	5,18	0,82
Ca mmol/L	61	16,53	12,50	22,40	1,97
Mg mmol/L	61	96,21	37,60	188,00	32,95
Cu mmol/L	61	0,83	0,20	1,90	0,31
Zn µmol/L	61	13,70	5,70	31,50	4,33

Tablica 10 a. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja mužjaka rakovica

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
LDH U/L	44	35,93	6,00	107,00	23,50
CK U/L	46	291,07	32,00	773,00	236,11
TP g/L	47	47,51	11,00	81,00	12,58
CHOL mmol/L	47	0,81	0,30	1,28	0,30
TRIG mmol/L	47	0,22	0,10	0,36	0,08
BUN mmol/L	47	3,05	0,80	5,02	1,12
GLU mmol/L	47	2,95	1,10	5,18	0,88
Ca mmol/L	48	16,79	13,80	22,40	1,92
Mg mmol/L	48	91,61	37,60	188,00	30,81
Cu mmol/L	48	0,81	0,37	1,90	0,29
Zn µmol/L	48	13,35	6,30	22,60	3,36

Tablica 10 b. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja ženki rakovica

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
LDH U/L	13	40,15	11,00	76,00	21,21
CK U/L	14	361,50	28,00	704,00	248,40
TP g/L	14	48,50	37,00	64,00	8,72
CHOL mmol/L	14	0,93	0,37	1,42	0,36
TRIG mmol/L	14	0,26	0,07	0,40	0,11
BUN mmol/L	14	3,56	1,67	6,08	1,25
GLU mmol/L	14	2,80	1,83	3,98	0,61

Ca mmol/L	13	15,57	12,50	18,80	1,91
Mg mmol/L	13	113,18	70,80	168,00	36,24
Cu mmol/L	13	0,89	0,20	1,54	0,37
Zn µmol/L	13	14,97	5,70	31,50	6,87

Tablica 11. Prikaz rezultata testiranja spolnih razlika u biokemiji rakovica (t-test). df – stupnjevi slobode; p – razina statističke značajnosti razlike između aritmetičkih sredina

	M (m)	M (ž)	t	df	p	Nm	Nž
LDH U/L	35,93	40,15	-0,58	55	0,564	44	13
CK U/L	291,07	361,50	-0,97	58	0,338	46	14
TP g/L	47,51	48,50	-0,27	59	0,785	47	14
CHOL mmol/L	0,81	0,93	-1,18	59	0,243	47	14
TRIG mmol/L	0,22	0,26	-1,59	59	0,117	47	14
BUN mmol/L	3,05	3,56	-1,46	59	0,150	47	14
GLU mmol/L	2,95	2,80	0,61	59	0,547	47	14
Ca mmol/L	16,79	15,57	2,04	59	0,046	48	13
Mg mmol/L	91,61	113,18	-2,16	59	0,035	48	13
Cu mmol/L	0,81	0,89	-0,84	59	0,403	48	13
Zn µmol/L	13,35	14,97	-1,20	59	0,234	48	13

Tablica 12. Prikaz rezultata povezanosti biometrija i biokemija cijelog uzorka rakovica

	Dužina glavopršnjaka	Širina glavopršnjaka	Težina
LDH U/L	0,14	0,17	0,14
CK U/L	-0,30	-0,31	-0,30
TP g/L	0,04	0,11	0,02
CHOL mmol/L	-0,08	-0,10	-0,14
TRIG mmol/L	-0,07	-0,07	-0,11
BUN mmol/L	-0,11	-0,12	-0,12
GLU mmol/L	-0,05	-0,01	-0,07
Ca mmol/L	-0,08	-0,07	-0,03
Mg mmol/L	-0,18	-0,18	-0,17
Cu mmol/L	-0,11	-0,06	-0,11
Zn µmol/L	-0,34	-0,27	-0,29

Tablica 13. Prikaz rezultata povezanosti biokemija cijelog uzorka rakovica

	LDH	CK	TP	CHOL	TRIG	BUN	GLU	Ca	Mg	Cu	Zn
	U/L	U/L	g/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	µmol/L
LDH	1,00	-0,59	-0,03	-0,16	-0,23	-0,01	-0,13	0,26	-0,16	-0,15	-0,12
U/L											
CK	-0,59	1,00	0,15	0,38	0,41	0,31	0,32	-0,36	0,34	0,26	0,31
U/L											
TP	-0,03	0,15	1,00	0,16	0,15	0,01	0,55	-0,06	0,00	-0,16	0,05
g/L											
CHOL	-0,16	0,38	0,16	1,00	0,91	0,79	0,32	-0,32	0,09	-0,09	0,05
mmol/L											
TRIG	-0,23	0,41	0,15	0,91	1,00	0,79	0,29	-0,38	0,17	-0,09	0,13
mmol/L											
BUN	-0,01	0,31	0,01	0,79	0,79	1,00	0,17	-0,29	0,14	0,01	0,12
mmol/L											
GLU	-0,13	0,32	0,55	0,32	0,29	0,17	1,00	-0,15	0,13	-0,05	0,05
mmol/L											
Ca	0,26	-0,36	-0,06	-0,32	-0,38	-0,29	-0,15	1,00	-0,24	-0,08	-0,04
mmol/L											
Mg	-0,16	0,34	0,00	0,09	0,17	0,14	0,13	-0,24	1,00	-0,06	0,10
mmol/L											
Cu	-0,15	0,26	-0,16	-0,09	-0,09	0,01	-0,05	-0,08	-0,06	1,00	0,48
mmol/L											
Zn	-0,12	0,31	0,05	0,05	0,13	0,12	0,05	-0,04	0,10	0,48	1,00
µmol/L											

Tablica 14. Prikaz rezultata provedene faktorske analize (metoda: glavne komponente) biokemijskih parametara rakovice

	Faktor 1	Faktor 2
LDH U/L	-0,19	-0,62
CK U/L	0,46	0,71
TP g/L	0,34	-0,10
CHOL mmol/L	0,91	0,02
TRIG mmol/L	0,92	0,10
BUN mmol/L	0,80	0,04
GLU mmol/L	0,50	0,06
Ca mmol/L	-0,45	-0,33
Mg mmol/L	0,24	0,30
Cu mmol/L	-0,23	0,71
Zn μ mol/L	-0,01	0,67
Expl.Var	3,25	2,06
Prp.Totl	0,30	0,19

Tablica 15. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 1:

	Faktor 1
TP g/L	0,31
CHOL mmol/L	0,94
TRIG mmol/L	0,94
BUN mmol/L	0,85
GLU mmol/L	0,49
Expl.Var	2,83
Prp.Totl	0,57

Tablica 16. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za drugi faktor:

	Faktor 2
LDH U/L	0,70
CK U/L	-0,85
Ca mmol/L	0,54
Mg mmol/L	-0,45
Cu mmol/L	-0,48
Zn μ mol/L	-0,53
Expl.Var	2,23
Prp.Totl	0,37

5.2.2. Biokemijska mjerenja jastoga *Palinurus elephas*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija biokemijskih parametara za cijeli uzorak jastoga prikazani su u tablici 17, u tablici 17 a izdvojene su vrijednosti za mužjake jastoga, u tablici 17 b za ženke jastoga. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 18) utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima jastoga. Značajno se razlikuju u razinama uree, kolesterol ima tendenciju da bude značajno različit. U tablici 19 prikazana su rezultati povezanosti biometrijskih vrijednosti i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka jastoga. Ukupna dužina jastoga umjereno je pozitivno povezana sa LDH, TP i BUN i umjereno negativno povezana sa CREA. Dužina glavopršnjaka jastoga je umjereno negativno povezana sa CREA. Težina jastoga je nisko pozitivno povezana sa TP, umjereno pozitivno povezana sa LDH, BUN i Zn, umjereno negativno povezana sa CREA. U tablici 20 prikazani su rezultati povezanosti biokemija cijelog uzorka jastoga. Razina Zn je vrlo visoko pozitivno povezana sa razinom TP, ALP i BUN, visoko pozitivno povezana sa razinom CHOL, TRIG, umjereno pozitivno povezana sa razinom GLU, Ca i Cu. S obzirom na brojne umjerene povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente. Koristio se Keiser-Gutmanov kriterij za određivanja broja faktora ($Eigen > 1$). U tablici 21 prikazan je rezultat provedene eksploratorne faktorske analize (metoda: glavne komponente) biokemijskih parametara jastoga. U tablici 22 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 1. pri čemu 73 % varijabiliteta izdvojenih 7 parametara biokemija jastoga objašnjava zajednički faktor. Najveće faktorsko zasićenje imaju TRIG, Zn, Cu, ALP, TP. U tablici 23 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 2. S drugim faktorom su povezane razine biokemijskih parametara Ca, GLU, BUN, TP i CREA. Faktor objašnjava 59 % varijabiliteta tih biokemijskih parametara.

Na trećem faktoru najveće faktorsko zasićenje imaju GGT, urea i glukoza. Na četvrtom faktoru najveće zasićenje (saturaciju) imaju magnezij, glukoza i urea. Treći i četvrti faktor imaju niske Eigen vrijednosti što znači da su vjerojatno u granicama statističke pogreške. Dakle, nije bilo potrebno detaljnije analizirati ta dva faktora.

S obzirom da je iz brojnih istraživanja poznato da su proteini vezani uz razine cinka i bakra, provedena je i dodatna konfirmatorna faktorska analiza samo s tim varijablama (tablica 24). Faktor je skoro ekvivalentan ukupnim proteinima u hemolimfi, pa se može tako i interpretirati. Isto je vidljivo i iz korelacija, razine cinka i bakra su visoko pozitivno povezane sa razinom ukupnih proteina.

Tablica 17. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja cijelog uzorka jastoga.

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$	26	192,69	10,33	744,13	239,06
LDH U/L	13	202,54	40,00	559,00	154,96
TP g/L	31	48,03	7,00	91,00	19,90
GGT U/L	19	2,88	1,61	11,68	2,20
ALP U/L	31	99,13	17,00	266,00	55,52
CHOL mmol/L	31	0,51	0,07	1,59	0,39
TRIG mmol/L	31	0,13	0,01	0,27	0,06
BUN mmol/L	23	0,73	0,35	1,77	0,33
AST U/L	7	122,14	30,00	385,00	128,13
GLU mmol/L	31	0,93	0,16	3,64	0,65
Ca mmol/L	16	27,62	23,60	31,20	2,58
Mg mmol/L	16	63,06	32,50	103,00	18,73
Cu mmol/L	16	1,43	0,16	3,12	1,04
Zn $\mu\text{mol/L}$	16	73,88	23,00	208,00	44,97

Tablica 17 a. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja mužjaka jastoga.

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$	4	27,25	15,06	55,25	18,87
LDH U/L	3	296,33	102,00	559,00	236,04
TP g/L	6	50,67	27,00	73,00	17,92
GGT U/L	3	3,17	2,99	3,34	0,17
ALP U/L	6	86,33	36,00	120,00	35,76
CHOL mmol/L	6	0,27	0,13	0,44	0,12
TRIG mmol/L	6	0,11	0,03	0,22	0,07
BUN mmol/L	5	1,04	0,52	1,77	0,48
AST U/L	2	111,00	41,00	181,00	98,99
GLU mmol/L	6	0,77	0,16	1,07	0,33
Ca mmol/L	2	26,90	23,60	30,20	4,67
Mg mmol/L	2	59,00	58,00	60,00	1,41
Cu mmol/L	2	0,66	0,32	1,00	0,48
Zn $\mu\text{mol/L}$	2	81,50	50,00	113,00	44,55

Tablica 17 b. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja ženki jastoga

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA μ mol/L	22	222,77	10,33	744,13	248,65
LDH U/L	10	174,40	40,00	399,00	125,79
TPg/L	25	47,40	7,00	91,00	20,64
GGT U/L	16	2,82	1,61	11,68	2,40
ALP U/L	25	102,20	17,00	266,00	59,46
CHOLmmol/L	25	0,57	0,07	1,59	0,41
TRIG mmol/L	25	0,13	0,01	0,27	0,06
BUN mmol/L	18	0,64	0,35	1,33	0,22
AST U/L	5	126,60	30,00	385,00	148,62
GLU mmol/L	25	0,97	0,21	3,64	0,71
Ca mmol/L	14	27,72	24,50	31,20	2,43
Mg mmol/L	14	63,64	32,50	103,00	20,04
Cu mmol/L	14	1,54	0,16	3,12	1,07
Zn jastozi μ mol/L	14	72,79	23,00	208,00	46,59

Tablica 18. Prikaz rezultata testiranja spolnih razlika u biokemiji jastoga (t-test).

	M (m)	M (ž)	t	df	p	Nm	Nž
CREA μ mol/L	27,24	222,77	-1,55	24	0,14	4	22
LDH U/L	296,33	174,40	1,22	11	0,25	3	10
TP g/L	50,67	47,40	0,36	29	0,72	6	25
GGT U/L	3,17	2,82	0,24	17	0,81	3	16
ALP U/L	86,33	102,20	-0,62	29	0,54	6	25
CHOL mmol/L	0,27	0,57	-1,80	29	0,08	6	25
TRIG mmol/L	0,11	0,13	-0,77	29	0,45	6	25
BUN mmol/L	1,04	0,64	2,70	21	0,01	5	18
AST U/L	111,00	126,60	-0,13	5	0,90	2	5
GLU mmol/L	0,77	0,97	-0,64	29	0,53	6	25
Ca mmol/L	26,90	27,72	-0,41	14	0,69	2	14
Mg mmol/L	59,00	63,64	-0,32	14	0,76	2	14
Cu mmol/L	0,66	1,54	-1,12	14	0,28	2	14
Zn μ mol/L	81,50	72,79	0,25	14	0,81	2	14

Tablica 19. Prikaz rezultata povezanosti biometrija i biokemija cijelog uzorka jastoga. Istaknute su korelacije (r) koje su statistički značajne na razini $p < 0,05$.

	Ukupna dužina	Dužina glavopršnjaka	Težina
CREA $\mu\text{mol/L}$	-0,63	-0,54	-0,50
LDH U/L	0,66	0,22	0,60
TP g/L	0,40	0,27	0,36
GGT U/L	-0,24	-0,18	-0,08
ALP U/L	0,34	0,27	0,19
CHOL mmol/L	-0,11	-0,03	0,03
TRIG mmol/L	0,26	0,16	0,17
BUN mmol/L	0,49	0,28	0,43
AST U/L	-0,14	-0,22	-0,27
GLU mmol/L	0,11	0,06	-0,07
Ca mmol/L	0,26	0,19	0,34
Mg mmol/L	-0,08	-0,05	-0,03
Cu mmol/L	0,21	0,20	0,34
Zn $\mu\text{mol/L}$	0,44	0,47	0,57

Tablica 20. Prikaz rezultata povezanosti biokemija cijelog uzorka jastoga (tablica a)

	CREA μmol/L	LDH U/L	TP g/L	GGT U/L	ALP U/L	CHOL mmol/L	TRIG mmol/L	Urea mmol/L	AST U/L	GLU mmol/L	Ca mmol/L	Mg mmol/L	Cu mmol/L	Zn μmol/L
CREA μmol/L	1,00	-0,28	-0,54	0,30	-0,48	0,02	-0,25	-0,26	0,29	-0,24	-0,54	0,07	-0,38	-0,60
LDH U/L	-0,28	1,00	-0,15	0,12	-0,12	-0,38	-0,03	0,47	0,90	-0,30	0,43	0,30	0,39	0,92
TP g/L	-0,54	-0,15	1,00	-0,14	0,55	0,47	0,65	0,51	0,47	0,51	0,58	0,31	0,61	0,91
GGT U/L	0,30	0,12	-0,14	1,00	-0,16	0,21	-0,10	0,50	0,21	0,39	0,21	0,39	0,21	0,95
ALP U/L	-0,48	-0,12	0,55	-0,16	1,00	0,51	0,59	0,69	0,64	0,12	0,17	1,00	-0,26	0,66
CHOL mmol/L	0,02	-0,38	0,47	0,21	0,51	1,00	0,69	0,00	0,64	0,21	0,31	-0,18	0,81	0,77
TRIG mmol/L	-0,25	-0,03	0,65	-0,10	0,59	0,69	1,00	0,51	0,12	0,39	0,61	-0,13	0,82	0,83
BUN mmol/L	-0,26	0,47	0,51	0,50	-0,10	0,00	0,51	1,00	0,17	0,12	0,75	0,27	0,37	0,95
AST U/L	0,29	0,90	0,47	0,21	-0,46	0,64	0,12	0,17	1,00	-0,26	0,52	1,00	0,13	0,65
GLU mmol/L	-0,24	-0,30	0,43	0,30	0,39	0,21	0,39	0,12	-0,26	1,00	0,52	-0,25	0,47	0,66
Ca mmol/L	-0,54	0,72	-0,29	0,58	0,31	0,61	0,75	0,52	1,00	0,13	0,65	-0,22	1,00	0,65
Mg mmol/L	0,07	-0,27	0,03	-0,23	-0,18	-0,13	0,27	-0,25	0,13	1,00	-0,22	-0,17	0,65	0,65
Cu mmol/L	-0,38	0,86	-0,05	0,77	0,81	0,82	0,37	0,47	0,65	-0,22	1,00	0,65	0,65	0,65
Zn μmol/L	-0,60	0,92	0,12	0,91	0,77	0,83	0,95	0,66	0,55	-0,17	0,65	1,00	0,65	0,65

Tablica 21. Prikaz rezultata provedene eksploatorne faktorske analize.

	Faktor 1	Faktor 2	Faktor 3	Faktor 4
CREA $\mu\text{mol/L}$	-0,04	<u>-0,83</u>	0,23	-0,15
TP g/L	0,59	<u>0,67</u>	0,05	0,16
GGT U/L	-0,00	-0,24	0,94	0,07
ALP U/L	0,67	0,40	-0,23	0,36
CHOL mmol/L	0,96	-0,14	0,12	0,11
TRIG mmol/L	0,83	0,35	0,08	-0,04
BUN mmol/L	0,20	<u>0,63</u>	0,68	-0,46
GLU mmol/L	0,23	<u>0,44</u>	0,39	0,55
Ca mmol/L	0,42	<u>0,80</u>	-0,02	-0,19
Mg mmol/L	-0,13	0,04	0,04	-0,83
Cu mmol/L	0,86	0,37	-0,01	0,14
Zn $\mu\text{mol/L}$	0,70	0,65	0,36	0,14
Objašnjena varijanca (eigen)	3,92	3,29	1,76	1,49
Proporcija objašnjene varijance	0,33	0,27	0,15	0,12

Tablica 22. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za prvi faktor

	Faktor 1
TP g/	-0,87
ALP U/L	-0,83
CHOL mmol/L	-0,77
TRIG mmol/L	-0,88
Ca mmol/L	-0,73
Cu mmol/L	-0,93
Zn $\mu\text{mol/L}$	-0,95
Eigen	5,10
Proporcija varijance	0,73

Tablica 23. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za drugi faktor

	Faktor 2
CREA $\mu\text{mol/L}$	0,67
TP g/L	-0,86
BUN mmol/L	-0,72
GLU mmol/L	-0,58
Ca mmol/L	-0,94
Expl.Var	2,93
Prp.Totl	0,59

Tablica 24. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize na izmjenjenim razinama proteina, bakra i cinka.

	Faktor
TP g/L	-0,99
Cu mmol/L	-0,89
Zn μ mol/L	-0,92
Expl.Var	2,62
Prp.Totl	0,87

5.2.3. Biokemijska mjerenja grmalja *Eriphia verucosa*

Srednje vrijednosti, raspon i standardna devijacija biokemijskih parametara za cijeli uzorak grmalja prikazani su u tablici 25, u tablici 25 a izdvojene su vrijednosti za mužjake grmalja, u tablici 25 b za ženke grmalja. Prilikom testiranja spolnih razlika (tablica 26) utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima grmalja. Značajno se razlikuju u razinama BUN i Zn. U tablici 27 prikazani su rezultati povezanosti biometrijskih vrijednosti i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka grmalja. Dužina glavopršnjaka grmalja umjereno je negativno povezana sa AST i nisko negativno povezana sa LDH i BUN. Širina glavopršnjaka grmalja umjereno je negativno povezana sa AST i nisko negativno povezana sa LDH, CK, BUN. Težina grmalja je nisko negativno povezana sa TRIG. U tablici 28 prikazani su rezultati povezanosti biokemija cijelog uzorka grmalja. Razina ALP je vrlo jako pozitivno povezana sa razinom Mg, jako pozitivno povezana sa AST i umjereno pozitivno povezana sa TP, GGT, TRIG i BUN. Razina AST je jako pozitivno povezana sa LDH i ALP, umjereno pozitivno povezana sa CREA, TP, GGT, CHOL. S obzirom na brojne umjerene povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente. Koristio se Keiser-Gutmanov kriterij za određivanja broja faktora ($Eigen > 1$). U tablici 29 prikazan je rezultat provedene faktorske analize (metoda: glavne komponente) biokemijskih parametara grmalja. U tablici 30 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 1. pri čemu 61 % varijabiliteta izdvojenih 6 parametara biokemija grmalja objašnjava zajednički faktor. Najveće faktorsko zasićenje imaju AST i TP. U tablici 31 prikazan je rezultat provedene konfirmatorne faktorske analize za faktor 2. Faktor objašnjava 41 % varijabiliteta izdvojenih 10 biokemijskih parametara. Najveće faktorsko zasićenje imaju ALP i GGT.

Tablica 25. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja cijelog uzorka grmalja.

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$	40	19,10	2,73	40,97	10,40
LDH U/L	55	203,29	23,00	494,00	144,71
CK U/L	32	15,85	5,47	34,70	7,63
TP g/L	68	60,54	34,00	98,00	20,80
GGT U/L	32	12,69	1,34	100,62	20,44
ALP U/L	18	61,21	4,05	320,32	83,99
CHOL mmol/L	68	0,28	0,10	0,82	0,13
TRIG mmol/L	68	0,08	0,03	0,50	0,06
BUN mmol/L	66	1,47	0,71	3,76	0,53
AST U/L	32	229,47	16,00	556,00	185,59
GLU mmol/L	67	1,73	0,06	7,40	1,43
Ca mmol/L	37	25,22	10,50	49,20	13,34
Mg mmol/L	39	91,59	29,00	425,00	80,65
Cu mmol/L	39	2,42	1,12	4,92	0,92
Zn $\mu\text{mol/L}$	39	58,54	12,00	120,00	26,66

Tablica 25 a. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja mužjaka grmalja

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$	31	19,03	2,73	36,11	9,78
LDH U/L	38	203,95	23,00	493,00	143,28
CK U/L	22	16,16	5,83	34,70	7,98
TP g/L	43	63,86	35,00	98,00	22,26
GGT U/L	18	8,53	1,34	44,22	10,99
ALP U/L	15	59,40	4,05	320,32	90,76
CHOL mmol/L	43	0,26	0,10	0,51	0,09
TRIG mmol/L	43	0,08	0,03	0,50	0,07
BUN mmol/L	41	1,58	0,71	3,76	0,56
AST U/L	24	228,83	16,00	556,00	189,38
GLU mmol/L	42	1,84	0,06	4,58	1,25
Ca mmol/L	19	21,13	12,80	49,20	11,66
Mg mmol/L	20	77,95	35,00	237,00	44,84
Cu mmol/L	20	2,37	1,16	4,04	0,84
Zn $\mu\text{mol/L}$	20	45,10	12,00	90,00	21,90

Tablica 25 b. Prikaz rezultata biokemijskih mjerenja ženki grmalja

	N	M	Minimum	Maksimum	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$	9	19,35	4,71	40,97	12,98
LDH U/L	17	201,82	34,00	494,00	152,32
CK U/L	10	15,18	5,47	26,04	7,17
TP g/L	25	54,84	34,00	92,00	16,96
GGT U/L	14	18,03	1,74	100,62	27,99
ALP U/L	3	70,26	16,70	100,13	46,48
CHOL mmol/L	25	0,32	0,10	0,82	0,17
TRIG mmol/L	25	0,08	0,03	0,24	0,04
BUN mmol/L	25	1,30	0,73	2,27	0,44
AST U/L	8	231,38	22,00	542,00	186,26
GLU mmol/L	25	1,56	0,25	7,40	1,72
Ca mmol/L	18	29,53	10,50	49,00	13,95
Mg mmol/L	19	105,95	29,00	425,00	105,75
Cu mmol/L	19	2,48	1,12	4,92	1,02
Zn $\mu\text{mol/L}$	19	72,68	40,00	120,00	24,12

Tablica 26. Prikaz rezultata testiranja spolnih razlika u biokemiji grmalja (t-test).

	M (m)	M (ž)	t	df	p	Nm	Nž
CREA $\mu\text{mol/L}$	19,03	19,35	-0,08	38	0,936	31	9
LDH U/L	203,95	201,82	0,05	53	0,960	38	17
CK U/L	16,16	15,18	0,33	30	0,742	22	10
TP g/L	63,86	54,84	1,75	66	0,085	43	25
GGT U/L	8,53	18,03	-1,32	30	0,197	18	14
ALP U/L	59,40	70,26	-0,20	16	0,845	15	3
CHOL mmol/L	0,26	0,32	-1,77	66	0,081	43	25
TRIG mmol/L	0,08	0,08	0,01	66	0,996	43	25
BUN mmol/L	1,58	1,30	2,11	64	0,039	41	25
AST U/L	228,83	231,38	-0,03	30	0,974	24	8
GLU mmol/L	1,84	1,56	0,76	65	0,450	42	25
Ca mmol/L	21,13	29,53	-1,99	35	0,054	19	18
Mg mmol/L	77,95	105,95	-1,09	37	0,284	20	19
Cu mmol/L	2,37	2,48	-0,36	37	0,720	20	19
Zn $\mu\text{mol/L}$	45,10	72,68	-3,74	37	0,001	20	19

Tablica 27. Prikaz rezultata povezanosti biometrija i biokemija cijelog uzorka grmalja
Istaknute su korelacije (r) koje su statistički značajne na razini $p < 0,05$.

	Dužina glavopršnjaka	Širina glavopršnjaka	Težina
CREA $\mu\text{mol/L}$	-0,16	-0,22	-0,06
LDH U/L	-0,30	-0,37	-0,22
CK U/L	-0,26	-0,36	-0,29
TP g/L	-0,04	-0,05	0,14
GGT U/L	-0,16	-0,16	-0,18
ALP U/L	-0,38	-0,41	-0,39
CHOL mmol/L	-0,19	-0,21	-0,08
TRIG mmol/L	-0,15	-0,16	-0,24
BUN mmol/L	-0,31	-0,27	-0,22
AST U/L	-0,46	-0,45	-0,31
GLU mmol/L	-0,01	-0,16	-0,00
Ca mmol/L	0,05	0,03	-0,01
Mg mmol/L	-0,12	-0,13	-0,13
Cu mmol/L	0,15	0,11	0,12
Zn $\mu\text{mol/L}$	0,06	0,02	0,01

Tablica 28. Prikaz rezultata povezanosti biokemija cijelog uzorka grmlja

	CREA	LDH	CK	TP	GGT	ALP	CHOL	TRIG	BUN	AST	GLU	Ca	Mg	Cu	Zn
	µmol/L	U/L	U/L	g/L	U/L	U/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	U/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L	mmol/L
CREA	1,00	0,35	0,16	0,68	0,06	0,52	0,37	-0,18	0,26	0,57	0,71	0,46	-0,43	0,27	0,52
LDH	0,35	1,00	0,16	0,51	0,31	0,22	0,48	0,06	0,32	0,83	0,49	-0,11	-0,12	-0,19	-0,22
CK	0,16	0,16	1,00	0,40	0,58	0,62	0,44	0,24	0,01	0,21	0,19	0,31	-0,16	0,22	-0,13
TP	0,68	0,51	0,40	1,00	0,47	0,54	0,53	0,10	0,38	0,60	0,56	0,23	0,11	0,62	0,35
GGT	0,06	0,31	0,58	0,47	1,00	0,62	0,37	0,48	0,34	0,59	0,11	0,31	0,11	0,26	0,47
ALP	0,52	0,22	0,62	0,54	0,62	1,00	0,12	0,58	0,52	0,75	0,23	0,52	0,91	0,49	0,42
CHOL	0,37	0,48	0,44	0,53	0,37	0,12	1,00	0,07	0,17	0,47	0,42	0,18	0,33	0,58	0,29
TRIG	-0,18	0,06	0,24	0,10	0,48	0,58	0,07	1,00	0,60	0,01	0,01	0,11	0,34	0,49	0,09
BUN	0,26	0,32	0,01	0,38	0,34	0,52	0,17	0,60	1,00	0,31	0,23	-0,04	0,38	0,22	-0,24
AST	0,57	0,83	0,21	0,60	0,59	0,75	0,47	0,01	0,31	1,00	0,34	0,25	1,00	0,09	0,01
GLU	0,71	0,49	0,19	0,56	0,11	0,23	0,42	0,01	0,23	0,34	1,00	0,29	0,12	0,26	0,06
Ca	0,46	-0,11	0,31	0,23	0,31	0,52	0,18	0,11	-0,04	0,25	0,29	1,00	0,05	0,17	0,58
Mg	-0,43	-0,12	-0,16	0,11	0,11	0,91	0,33	0,34	0,38	-0,08	0,12	0,05	1,00	0,34	0,12
Cu	0,27	-0,19	0,22	0,62	0,26	0,49	0,58	0,49	0,22	0,09	0,26	0,17	0,34	1,00	0,27
Zn	0,52	-0,22	-0,13	0,35	0,47	0,42	0,29	0,09	-0,24	0,01	0,06	0,58	0,12	0,27	1,00

Tablica 29. Prikaz rezultata provedene eksploratorne faktorske analize

	Faktor 1	Faktor 2
CREA $\mu\text{mol/L}$	0,83	-0,03
LDH U/L	0,69	-0,08
CK U/L	0,36	0,33
TP g/L	0,74	0,34
GGT U/L	0,37	0,57
ALP U/L	0,37	0,86
CHOL mmol/L	0,55	0,28
TRIG mmol/L	-0,12	0,74
BUN mmol/L	0,19	0,50
AST U/L	0,77	0,16
GLU mmol/L	0,66	0,05
Ca mmol/L	0,34	0,30
Mg mmol/L	-0,24	0,74
Cu mmol/L	0,19	0,61
Zn $\mu\text{mol/L}$	0,23	0,31
Expl.Var	3,78	3,32
Prp.Totl	0,25	0,22

Tablica 30. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za prvu komponentu

	Faktor 1
CREA $\mu\text{mol/L}$	0,79
LDH U/L	0,79
TP g/L	0,84
CHOL mmol/L	0,68
AST U/L	0,82
GLU mmol/L	0,75
Expl.Var	3,65
Prp.Totl	0,61

Tablica 31. Prikaz rezultata provedene konfirmatorne faktorske analize za drugu komponentu

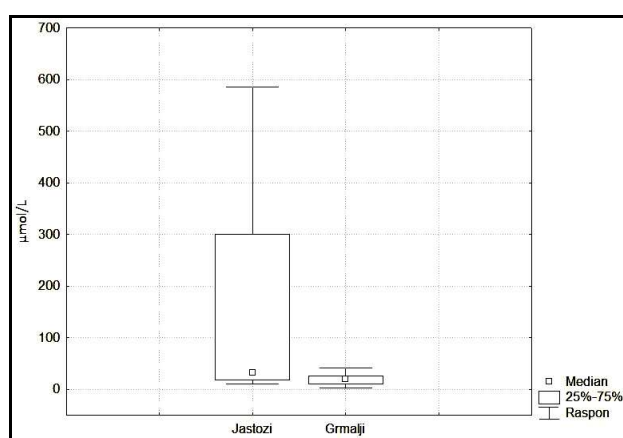
	Faktor 2
CK U/L	0,52
TP g/L	0,67
GGT U/L	0,75
ALP U/L	0,98
TRIG mmol/L	0,65
BUN mmol/L	0,53
Ca mmol/L	0,48
Mg mmol/L	0,54
Cu mmol/L	0,65
Zn μ mol/L	0,45
Expl.Var	4,10
Prp.Totl	0,41

5.3. USPOREDBE IZMEĐU VRSTA RAKOVA U BIOKEMIJAMA HEMOLIMFE

Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine kreatinina u hemolimfi jastoga i grmalja prikazane su na slici 28. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 32) nađena je značajna razlika u vrijednostima CREA jastoga i grmalja. Jastozi imaju višu razinu kreatinina od grmalja. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine LDH u hemolimfi jastoga i grmalja prikazane su na slici 29. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 33) nađena je značajna razlika u vrijednostima LDH jastoga i grmalja u odnosu na LDH rakovice, a između jastoga i grmalja nema razlike. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine CK u hemolimfi rakovice i grmalja prikazane su na slici 30. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 34) nađena je značajna razlika u vrijednostima CK rakovice i grmalja. Rakovice imaju višu razinu CK od grmalja. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine TP u hemolimfi rakovice jastoga i grmalja prikazane su na slici 31. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 35) nađena je značajna razlika u vrijednostima TP rakovice i grmalja, te jastoga i grmalja. Grmalji imaju višu razinu TP od jastoga i rakovica. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine GGT u hemolimfi jastoga i grmalja prikazane su na slici 32. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 36) nađena je značajna razlika u vrijednostima GGT jastoga i grmalja. Grmalji imaju višu razinu GGT od jastoga. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine ALP u hemolimfi jastoga i grmalja prikazane su na

slici 33. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 37) nije nađena značajna razlika u vrijednostima ALP jastoga i grmalja. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine CHOL u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 34. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 38) nađena je značajna razlika u vrijednostima CHOL između jastoga, rakovice i grmalja. Rakovice imaju najviši kolesterol, zatim jastozi, pa grmalji. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine TRIG u hemolimfi jastoga rakovice i grmalja prikazane su na slici 35. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 39) nađena je značajna razlika u vrijednostima TRIG između jastoga, rakovice i grmalja. Rakovice imaju najvišu razinu triglicerida, zatim jastozi, pa grmalji. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine BUN u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 36. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 40) nađena je značajna razlika u vrijednostima BUN između jastoga, rakovice i grmalja. Rakovice imaju najvišu razinu BUN, zatim grmalji, pa jastozi. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine AST u hemolimfi jastoga i grmalja prikazane su na slici 37. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 41) nije nađena je značajna razlika u vrijednostima AST između jastoga i grmalja. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine GLU u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 38. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 42) nađena je značajna razlika u vrijednostima GLU između jastoga, rakovice i grmalja. Najvišu razinu GLU ima rakovica, zatim grmalj, pa jastog. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine Ca u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 39. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 43) nađena je značajna razlika u vrijednostima Ca između rakovice u odnosu na jastoga i grmalja. Rakovica ima najmanju razinu Ca, zatim grmalj, pa jastog. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilnog raspršenja i raspona rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine Mg u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 40. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 44) nađena je značajna razlika u vrijednostima Mg između rakovice i jastoga. Rakovica ima višu razinu Mg u hemolimfi u odnosu na jastoge. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenja i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine Cu u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 41. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 45) nađena je značajna razlika u vrijednostima Cu između rakovice, jastoga i grmalja. Grmalji imaju najvišu razinu Cu u hemolimfi, zatim jastozi, pa rakovice. Srednje vrijednosti, poluinterkvartilno raspršenje i raspon rezultata (bez ekstrema) mjerenja razine Zn

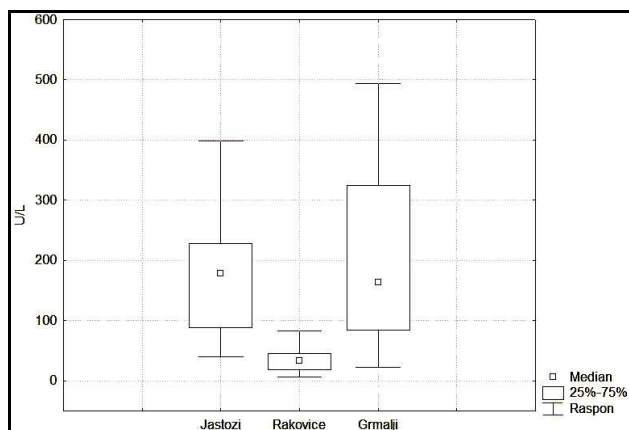
u hemolimfi jastoga, rakovice i grmalja prikazane su na slici 42. Testiranjem značajnosti razlika (tablica 46) nađena je značajna razlika u vrijednostima Zn između rakovice u odnosu na grmalja i jastoga. Rakovice imaju nižu razinu Zn u hemolimfi u odnosu na jastoge i grmalje. Na slici 43. vide se relativni odnosi biokemija rakovica, grmalja i jastoga izraženi u Z-vrijednostima. Rakovice imaju više razine kolesterola, triglicerida, uree i glukoze, a niže razine bakra, kalcija, cinka i LDH u odnosu na grmalje i jastoge koji se u tim parametrima biokemije međusobno manje razlikuju. Grmalji i jastozi se međusobno najviše razlikuju u razinama proteina, bakra i magnezija. U tablici 47 prikazana je deskriptivna statistika parametara biokemije rakovica, grmalja i jastoga.



Slika 28. Prikaz središnjih vrijednosti, poluinterkvartilnog raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine kreatinina u hemolimfi jastoga i grmalja.

Tablica 32 . Testiranje značajnosti razlika između jastoga i grmalja u razini kreatinina u hemolimfi

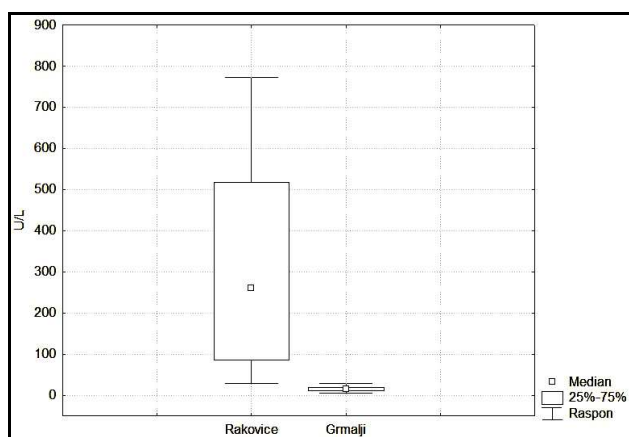
CREA $\mu\text{mol/L}$	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	192,69	19,10	4,60	64	0,001	26	40	239,06	10,397



Slika 29. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine LDH u hemolimfi tri vrste rakova.

Tablica 33. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini LDH u hemolimfi

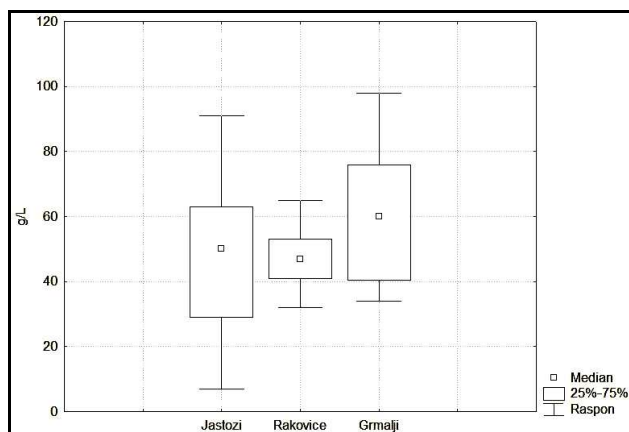
LDH U/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	202,54	203,29	-0,02	66	0,986	13	55	154,96	144,71
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	202,54	36,89	7,88	68	0,001	13	57	154,96	22,88
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	203,3	36,89	8,57	110	0,001	55	57	144,7	22,88



Slika 30. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine CK u hemolimfi rakovica i grmalja.

Tablica 34. Testiranje značajnosti razlika između grmalja i rakovica u razini CK u hemolimfi

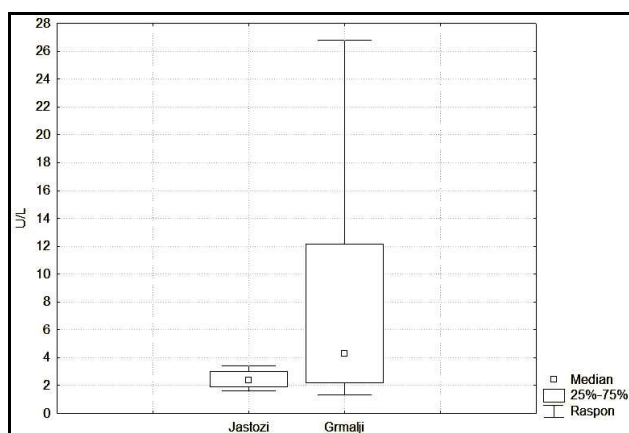
CK U/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	15,85	307,50	-6,89	90	0,001	32	60	7,63	238,78



Slika 31. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine ukupnih proteina u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 35. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini ukupnih proteina u hemolimfi

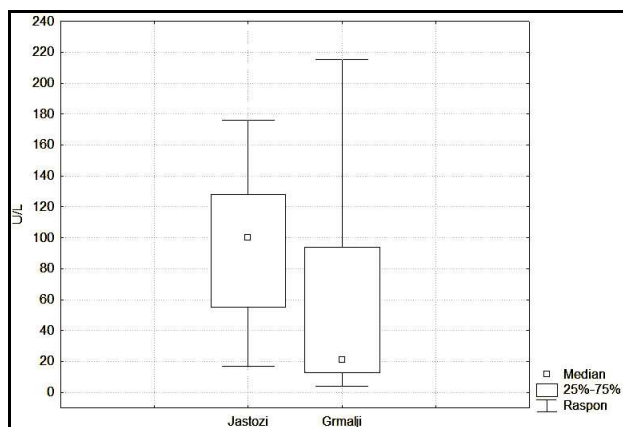
TP g/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	48,03	60,54	-2,81	97	0,006	31	68	19,90	20,80
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	48,03	47,74	0,09	90	0,929	31	61	19,90	11,75
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	60,54	47,74	4,24	127	0,001	68	61	20,80	11,75



Slika 32. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine GGT u hemolimfi jastoga i grmalja

Tablica 36. Testiranje značajnosti razlika između jastoga i grmalja u razini GGT u hemolimfi

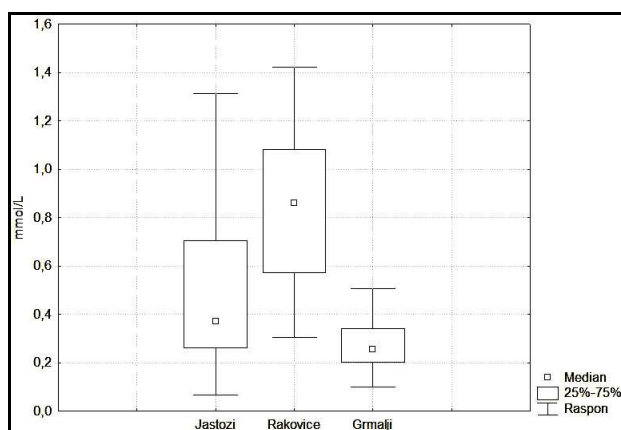
GGT U/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	2,877	12,69	-2,08	49	0,043	19	32	2,197	20,44



Slika 33. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine ALP-a u hemolimfi jastoga i grmalja

Tablica 37. Testiranje značajnosti razlika između jastoga i grmalja u razini ALP-a u hemolimfi

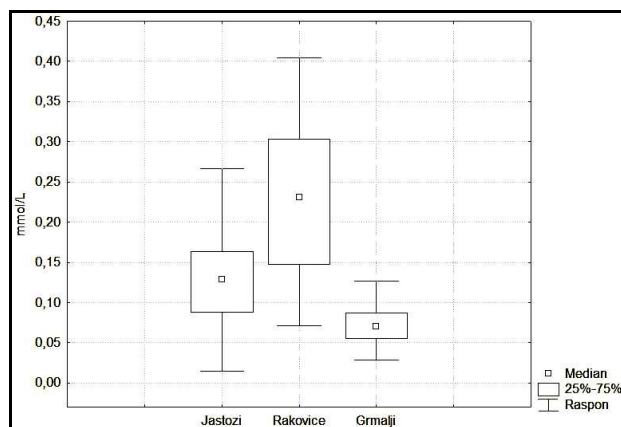
ALP U/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	99,13	61,21	1,90	47	0,063	31	18	55,52	83,99



Slika 34. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine kolesterola u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 38. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini kolesterola u hemolimfi

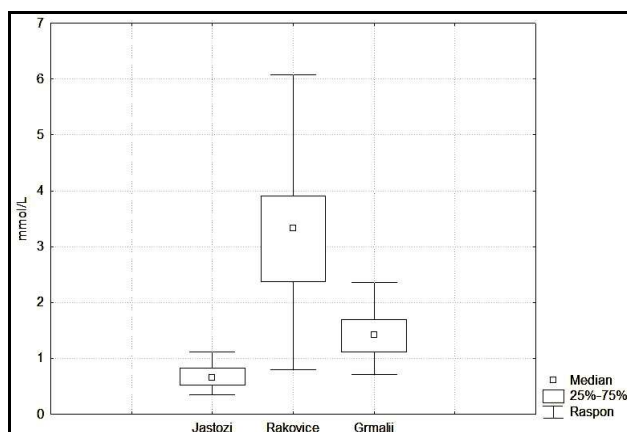
CHOL mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	0,51	0,28	4,37	97	0,001	31	68	0,387	0,13
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	0,51	0,84	-4,36	90	0,001	31	61	0,387	0,31
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	0,29	0,84	-13,4	127	0,001	68	61	0,129	0,31



Slika 35. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine triglicerida u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 39. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini triglicerida u hemolimfi

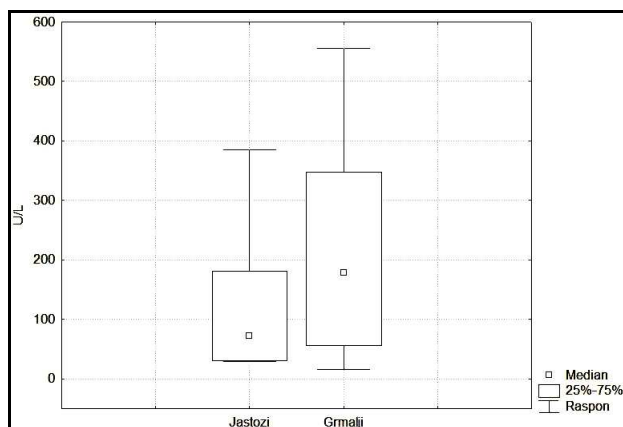
TRIG mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	0,13	0,08	3,67	97	0,001	31	68	0,06	0,06
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	0,13	0,23	-5,87	90	0,001	31	61	0,06	0,09
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	0,08	0,23	-11,4	127	0,001	68	61	0,06	0,09



Slika 36. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine uree u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 40. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini uree u hemolimfi

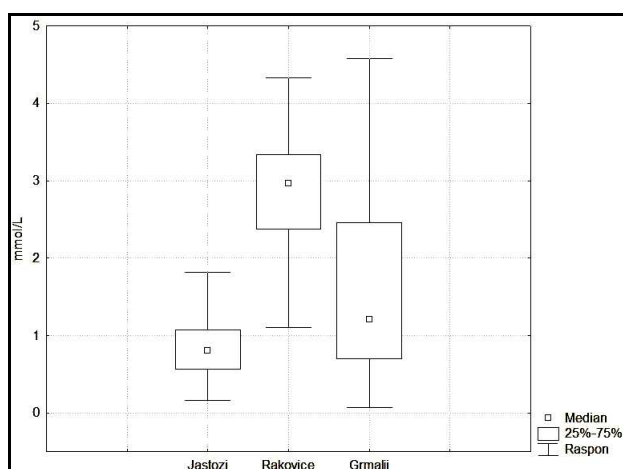
BUN mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	0,729	1,47	-6,27	87	0,001	23	66	0,33	0,53
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	0,729	3,17	-9,92	82	0,001	23	61	0,33	1,16
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	1,473	3,17	-10,7	125	0,001	66	61	0,53	1,16



Slika 37. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine AST-a u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 41. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini AST-a u hemolimfi

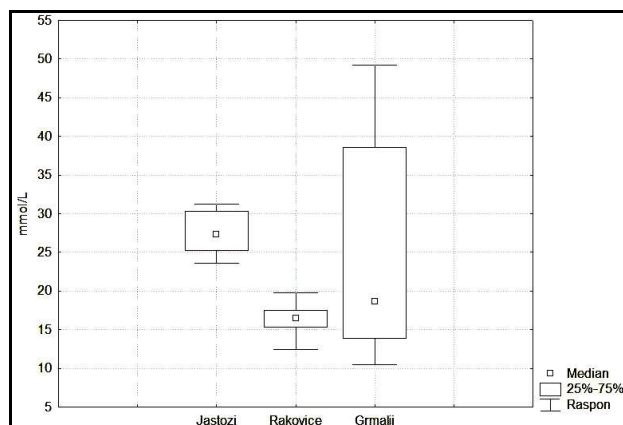
AST U/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	122,14	229,47	-1,449	37	0,155	7	32	128,13	185,59



Slika 38. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine glukoze u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 42. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini glukoze u hemolimfi

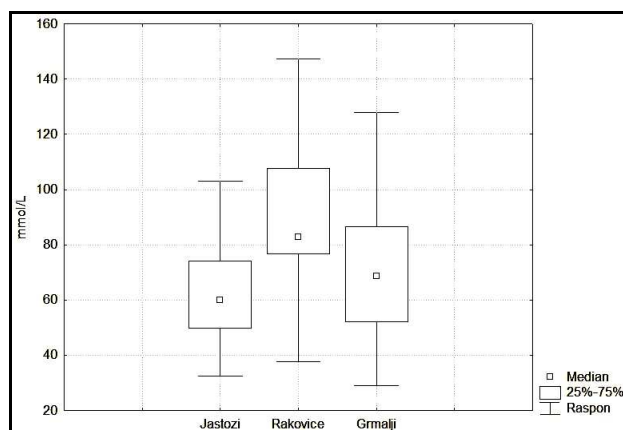
GLU mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	0,93	1,73	-3,0	96	0,004	31	67	0,65	1,43
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	0,93	2,92	-11,7	90	0,001	31	61	0,65	0,82
Grmalji (1) vs. rakovice (2)	1,73	2,92	-5,66	126	0,001	67	61	1,43	0,82



Slika 39. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine kalcija u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 43. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini kalcija u hemolimfi

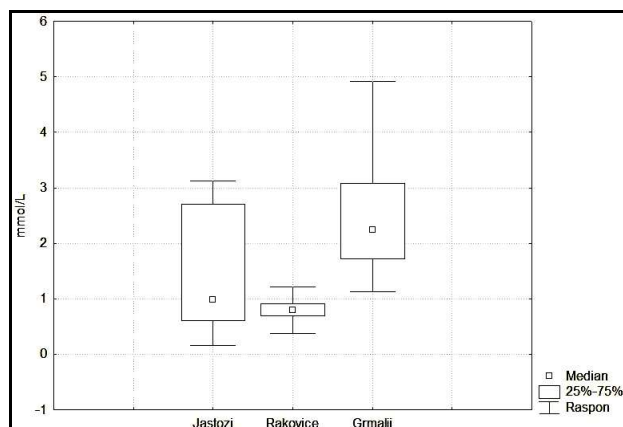
Ca mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	27,62	16,53	18,74	75	0,001	16	61	2,58	1,97
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	27,62	25,22	0,71	51	0,481	16	37	2,58	13,34
Rakovice (1) vs. grmalji (2)	16,53	25,22	-5,01	96	0,001	61	37	1,97	13,34



Slika 40. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršenja i raspona rezultata mjerenja razine magnezija u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 44. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini magnezija u hemolimfi

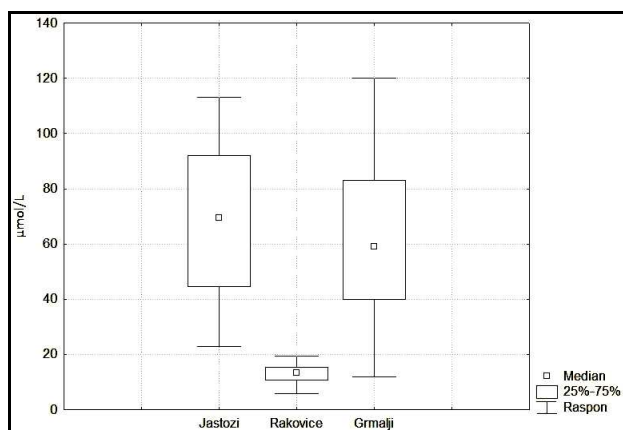
Mg mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	63,06	96,21	-3,85	75	0,001	16	61	18,73	32,95
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	63,06	91,59	-1,39	53	0,170	16	39	18,73	80,65
Rakovice (1) vs. grmalji (2)	96,21	91,59	0,40	98	0,691	61	39	32,95	80,65



Slika 41. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršen ja i raspona rezultata mjerenja razine bakra u hemolimfi tri vrste rakova rakova

Tablica 45. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini bakra u hemolimfi

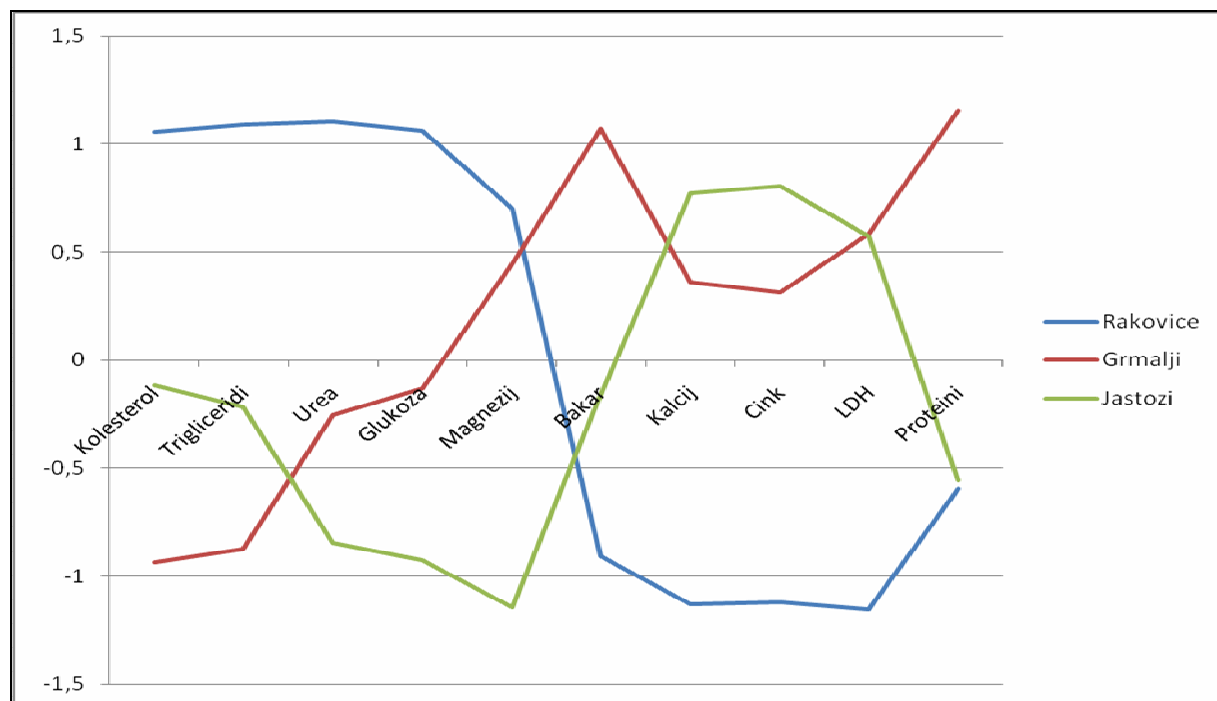
Cu mmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	1,43	0,83	3,93	75	0,001	16	61	1,04	0,31
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	1,43	2,42	-3,50	53	0,001	16	39	1,04	0,92
Rakovice (1) vs. grmalji (2)	0,83	2,42	-12,50	98	0,001	61	39	0,31	0,92



Slika 42. Prikaz središnjih vrijednosti, raspršen ja i raspona rezultata mjerenja razine cinka u hemolimfi tri vrste rakova

Tablica 46. Testiranje značajnosti razlika između tri vrste rakova u razini cinka u hemolimfi

Zn µmol/L	M1	M2	t	df	p	N1	N2	SD1	SD2
Jastozi (1) vs. rakovice (2)	73,88	13,70	10,46	75	0,001	16	61	44,97	4,33
Jastozi (1) vs. grmalji (2)	73,88	58,54	1,57	53	0,122	16	39	44,97	26,66
Rakovice (1) vs. grmalji (2)	13,70	58,54	-12,9	98	0,001	61	39	4,33	26,66



Slika 43. Relativni odnosi biokemija rakovica, grmalja i jastoga izraženi u Z-vrijednostima

Tablica 47. Deskriptivna statistika parametara biokemije rakovica, grmalja i jastoga.

	Rakovice			Grmalji			Jastozi		
	N	M	SD	N	M	SD	N	M	SD
CREA $\mu\text{mol/L}$				40	19,10	10,40	26	192,69	239,07
LDH U/L	57	36,89	22,88	55	203,29	144,71	13	202,54	154,96
CK U/L	60	307,50	238,78	32	15,85	7,63			
TP g/L	61	47,74	11,75	68	60,54	20,80	31	48,03	19,90
GGT U/L				32	12,69	20,44	19	2,88	2,20
ALP U/L				18	61,21	83,99	31	99,13	55,52
CHOL mmol/L	61	0,84	0,31	68	0,28	0,13	31	0,51	0,39
TRIG mmol/L	61	0,23	0,09	68	0,08	0,06	31	0,13	0,06
BUN mmol/L	61	3,17	1,16	66	1,47	0,53	23	0,73	0,33
AST U/L				32	229,47	185,59	7	122,14	128,13
GLU mmol/L	61	2,92	0,82	67	1,73	1,43	31	0,93	0,65
Ca mmol/L	61	16,53	1,97	37	25,22	13,34	16	27,62	2,58
Mg mmol/L	61	96,21	32,95	39	91,59	80,65	16	63,06	18,73
Cu mmol/L	61	0,83	0,31	39	2,42	0,92	16	1,43	1,04
Zn $\mu\text{mol/L}$	61	13,70	4,33	39	58,54	26,66	16	73,88	44,97

5.4. DUBINSKE ANALIZE BIOKEMIJSKIH PARAMETARA

U pripremi podataka eliminirane su varijable s više od 25 % nedostajućih (neizmjenjenih) vrijednosti. Tako su iz analize izbačene varijable CREA, GGT, CK, ALP, AST. S obzirom da određeni algoritmi za dubinsku analizu podataka nemaju ugrađenu podršku za rad sa nedostajućim vrijednostima, korištena je opcija algoritma slučajnih šuma za nadomještanje nedostajućih vrijednosti. Ovaj postupak bazira se na parcijalno izgrađenom modelu (šumi) i njime se iterativno (od varijabli s manjim brojem nedostajućih vrijednosti prema onima s većim brojem) aproksimiraju i nadomješćuju nedostajuće vrijednosti.

Iako je za izgradnju prediktivnih modela ponekad opravdano i poželjno izdvojiti primjerke koji drastično odstupaju od primjeraka svoje kategorije, u ovom slučaju to nije učinjeno zbog činjenice da se radi o relativno malom uzorku, ali i zato što se analizama pokazalo da oni ne utječu bitno na modele podataka.

Analiza mjerenja (korelacija mjerenja i vrste) prediktivnim modeliranjem

U traženju najboljeg prediktivnog modela koristili smo Experimenter okruženje WEKA paketa. Usporedili smo međusobno 6 klasifikacijskih algoritama različitih induktivnih karakteristika: (i) NB - Naivni Bayes, (ii) k-nn - metoda najbližih susjeda, (iii) Dtree - Stablo odlučivanja, (iv) LogReg- Logistička regresija, (v) RF - Slučajne šume, (vi) SVM - Metoda potpornih vektora, izgrađujući 30 puta po 10 randomiziranih modela (korištenje tzv. 10-struke unakrsne validacije).

Unakrsna validacija je postupak u kojem se podaci podijele slučajno u n ($n=10$ za 10-struku u.v.) odvojenih podskupova; potom se ponavlja postupak u kojem se izgradi model korištenjem $n-1$ dijelova, te testira na n -tom izdvojenom (tzv. testnom) dijelu. Ovaj postupak se ponavlja točno n puta, tako da svaki od n dijelova jednom bude u tzv. “testnoj” ulozi, a $n-1$ puta u skupu za izradu modela. Dobivenih n statistika (npr. Točnost) na testnim skupovima se usredniji i ta vrijednost predstavlja procjenu točnosti modela na “još neviđenim” podacima/mjerenjima.

U našim računalnim eksperimentima, za svaki od algoritama koristili smo 30 nezavisnih (randomiziranih) eksperimenata unakrsne validacije, kako bi se dobio dovoljan broj rezultata kojima se može odrediti statistički značaj međusobne razlike rezultata različitih algoritama. Sumarni rezultati usporedbe algoritama dani su u tablici 48. Najbolji rezultati dobiveni su slučajnih šuma (RF), (89.63% $\pm$ 7.19%), no i rezultat dobiven algoritmom stabla odlučivanja (86.31% $\pm$ 8.34%) zapravo nije statistički značajno lošiji.

Tablica 48. Usporedba točnosti pojedinih algoritama u izgradnji modela. Vrijednosti su dobivene 30-strukim ponavljanjem postupka 10-struke unakrsne validacije

Algoritam	Prosječna točnost modela (+std. Dev.)
NB	85.23(+8.28)
k-nn(5)	78.90(+6.57)
DTree	86.31(+8.34)
LogReg	85.15(+7.36)
RF	89.63(+7.19)
SVM (RBF)	83.00(+6.51)

Za procjenu vrijednosti dobivene točnosti klasifikacije dobiveni rezultat se može usporediti sa točnosti koju možemo dobiti potpuno slučajnim klasificiranjem (slučajno nagađanje) na istom skupu podataka. Za naš skup podataka najbolju točnost od strane slučajnog klasifikatora dobiti ćemo ako se svi primjerci klasificiraju kao primjerci većinske klase. Točnost ovakvog tzv. "neinformiranog" klasifikatora, bi u našem slučaju iznosila **42.5 %** (broj primjeraka u klasi Grmalji=68, ukupan broj primjera=160). Očito, naš najbolji klasifikacijski model ima znatno veću točnost (**89.63 %**), što pokazuje da je informacija dobivena mjerenjima ovih parametara značajna u smislu razlikovanja primjeraka različite vrste.

Procjena važnosti parametara za izgradnju klasifikacijskog modela

Korištenjem algoritma slučajnih šuma određena je i pojedinačna važnost parametara za izgradnju klasifikacijskog modela. Važnost pojedinog parametra za klasifikaciju primjeraka na osnovu podataka se određuje tako da se odredi prosječno smanjenje točnosti modela pojedinih stabala slučajne šume, ukoliko se ukloni pojedini parametar iz podataka koji se koriste u izgradnji modela. Tablica 49. sadrži rezultate ove analize.

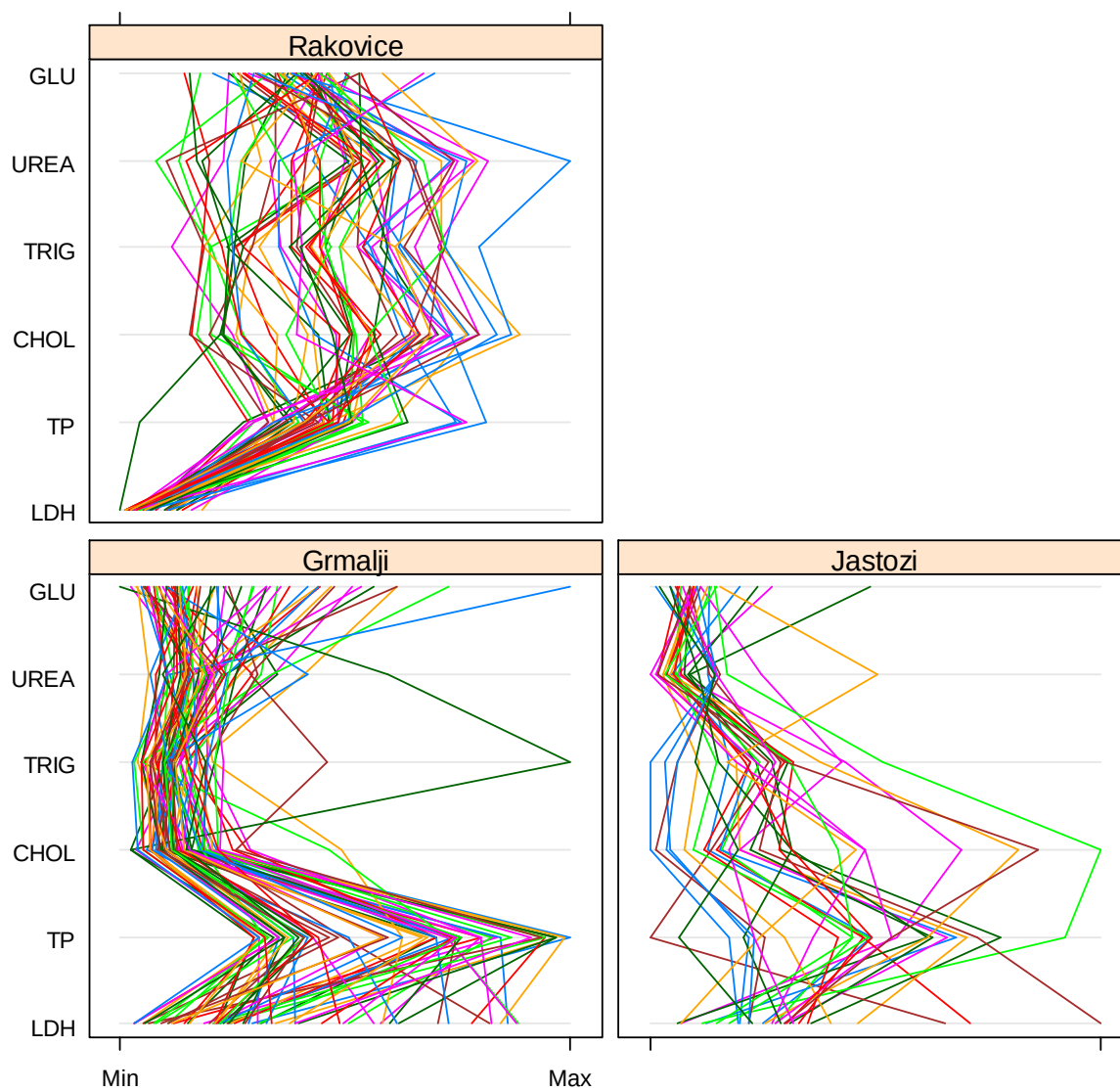
Tablica 49. Važnost pojedinih parametara za izgradnju modela korištenjem algoritma slučajnih šuma, izražena preko srednjeg smanjenja točnosti modela u slučaju da se u stablu ne koristi određena varijabla. U tablici su dane vrijednosti za pojedine vrste rakova. U izgradnji model (šume) korišteno je 500 stabala.

Srednje smanjenje točnosti klasifikacijskog modela				
Varijabla	Grmalji	Jastozi	Rakovice	Ukupno prosjek
TRIG	3.94	2.17	3.23	2.51
UREA	2.46	5.25	3.28	2.34
LDH	2.87	2.71	3.48	2.26
TP	2.78	4.79	2.42	2.25
GLU	1.05	3.35	3.18	2.04
CHOL	3.01	-1.11	2.53	1.99

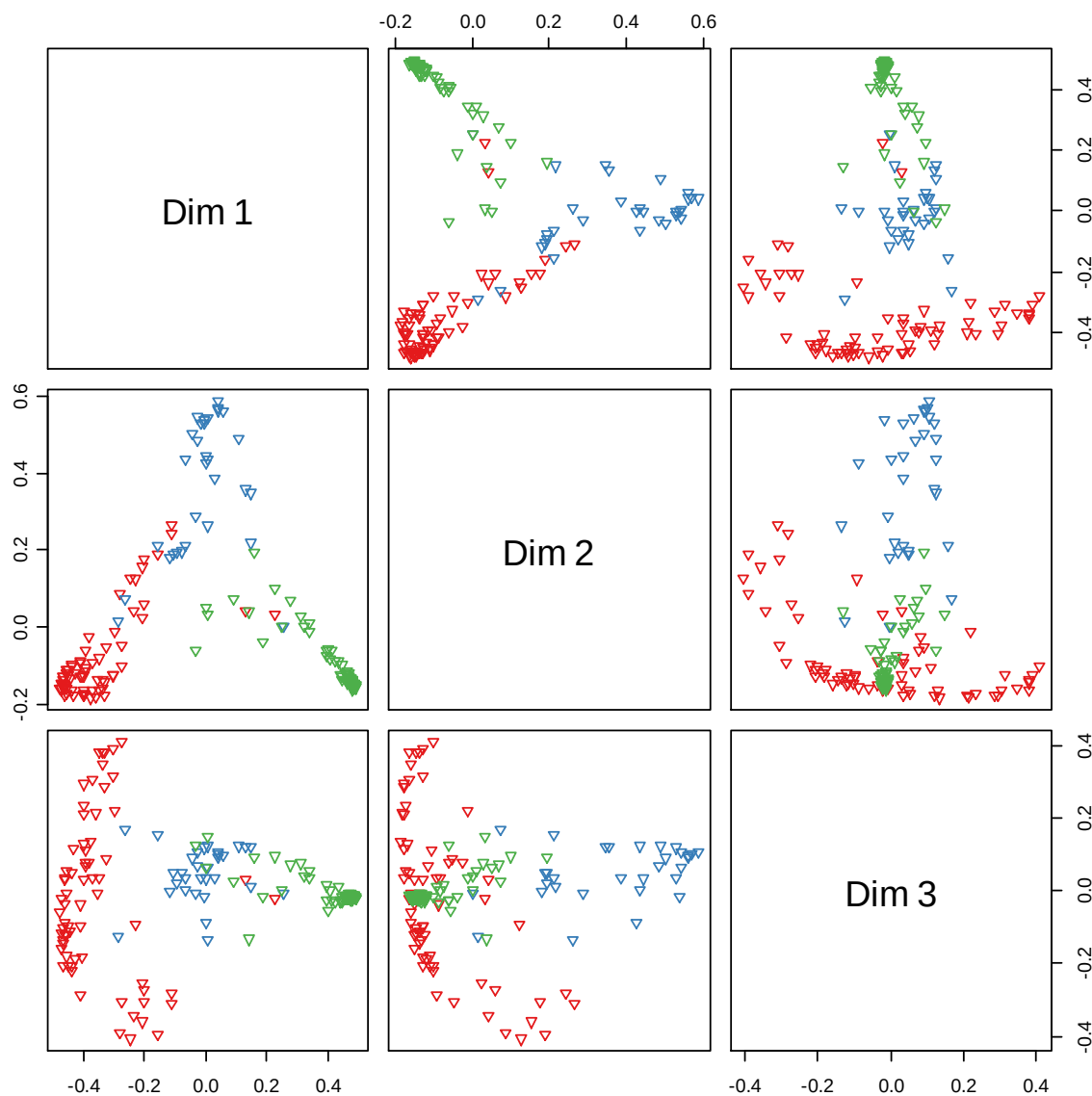
Na slici 44. su prikazani međusobni odnosi 6 mjerenih parametara za svaki od primjeraka u bazi podataka. Korišten je tzv. prikaz preko paralelnih koordinata u kojem su stvarne vrijednosti parametara normirane na interval (min, max), po svakoj pojedinoj varijabli. Uočljivo je bitno različito ponašanje nekih od parametara za određenu vrstu u odnosu na druge dvije (npr. LDH – Rakovice, naspram Grmalji/Jastozi, TRIG, CHOL – Grmalji, naspram Jastozi/Rakovice).

Na slici 45. prikazane su tri osnovne komponente (en principal components) rekonstruirane MDS (multidimensional scaling) opcijom u algoritmu slučajnih šuma. Ova transformacija podataka je tehnika kojom se ustvari preslikavaju udaljenosti između mjerenih primjeraka u visoko dimenzionalnom prostoru (n parametara) u nižedimenzionalne prostore (2, 3 dimenzije), kako bi se lakše uočile i interpretirale razlike između pojedinih kategorija uzoraka, ili pronašli primjerci koji značajno odstupaju. Uočljivo je da se primjerci sve tri vrste međusobno vrlo dobro razdvajaju u prikazu prve dvije osnovne komponente (Dim1 vs Dim2).

Slika 44. Prikaz međusobne ovisnosti mjerenih parametara za svaki od primjeraka tri vrste rakova, (en. parallel coordinates plot).



Slika 45. Prikaz mjerenih primjera u prostoru osnovnih komponenti (PCA – principal component analysis). Osnovne komponente predstavljaju osi na slici (Dim1,2,3).



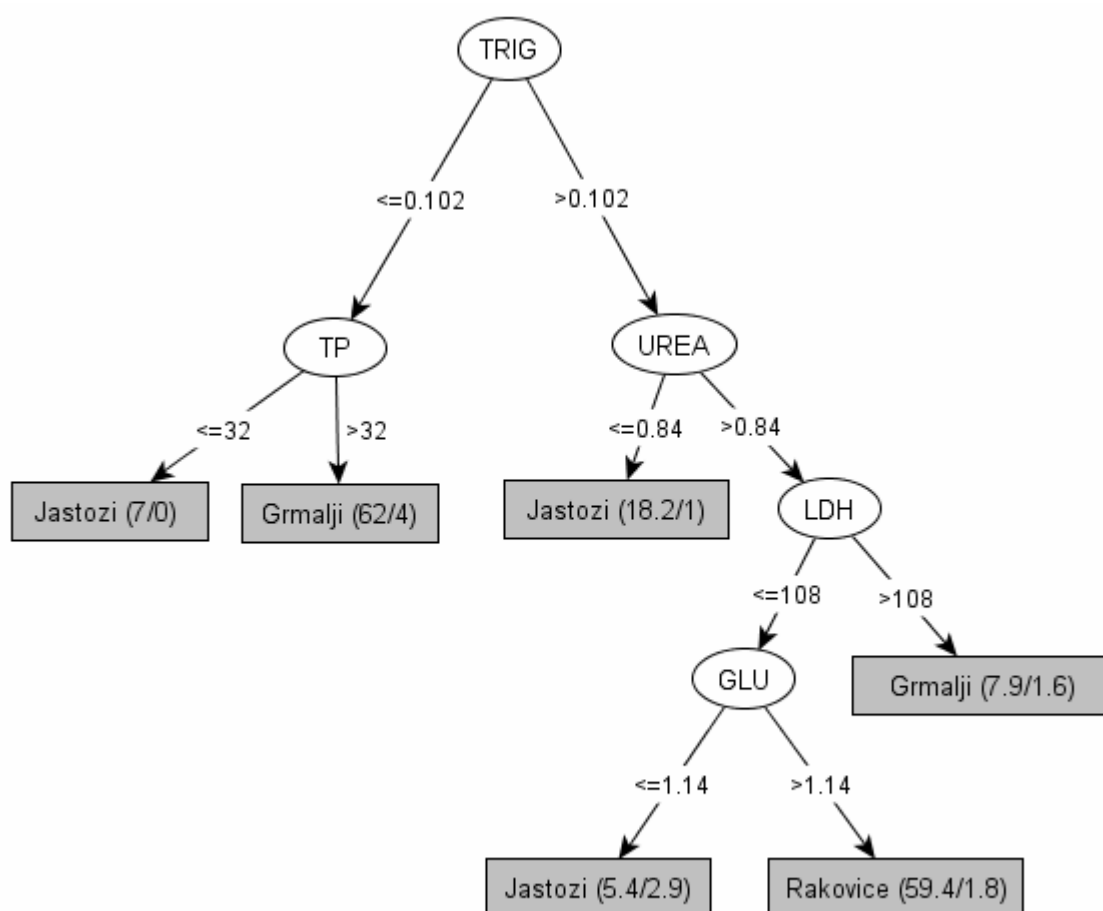
Razlikovanje primjeraka određene vrste korištenjem modela stabla odlučivanja

Stablo odlučivanja je jednostavna, kompaktna i interpretabilna reprezentacija modela podataka. Na slici 46 prikazano je stablo odlučivanja inducirano korištenjem kompletnog skupa podataka. Stablo odlučivanja istovremeno predstavlja i prediktivni model: može se koristiti kao algoritam u određivanju klase novih, nelabeliranih izmjerenih primjeraka, a kao prediktivni klasifikacijski model ima i određenu točnost.

U tablici 50 dan je detaljni prikaz prediktivnih karakteristika induciranog modela. Kappa statistika jest mjera koja pokazuje koliko je konkretni model bolji od sasvim randomiziranog

pogađanja klase (vrijednosti blizu 0 su loši klasifikatori, vrijednosti kappa = 1 označava savršeni klasifikator). Preciznost i osjetljivost su uobičajene mjere koje pokazuju koliko dobro model prepoznaje razlike između primjeraka različitih klasa. Matrica konfuzije prikazuje kako model griješi – odnosno koliko primjeraka određene klase je krivo klasificirano pod neku drugu klasu primjera (ovdje vrsta rakova). Točnost modela dobivenog algoritmom stabla odlučivanja može se usporediti u Tablici 48, s algoritmima koji mogu inducirati znatno kompleksnije modele, a time postići i puno bolju točnost (RF, SVM). U ovom konkretnom slučaju prediktivna točnost modela stabla odlučivanja praktički je na istom nivou kao kod modela dobivenog npr. algoritmom slučajnih šuma. Prednost modela stabla odlučivanja jest njegova jednostavnost odnosno interpretabilnost.

Slika 46. Stablo odlučivanja dobiveno korištenjem mjerenih parametara za induciranje modela.



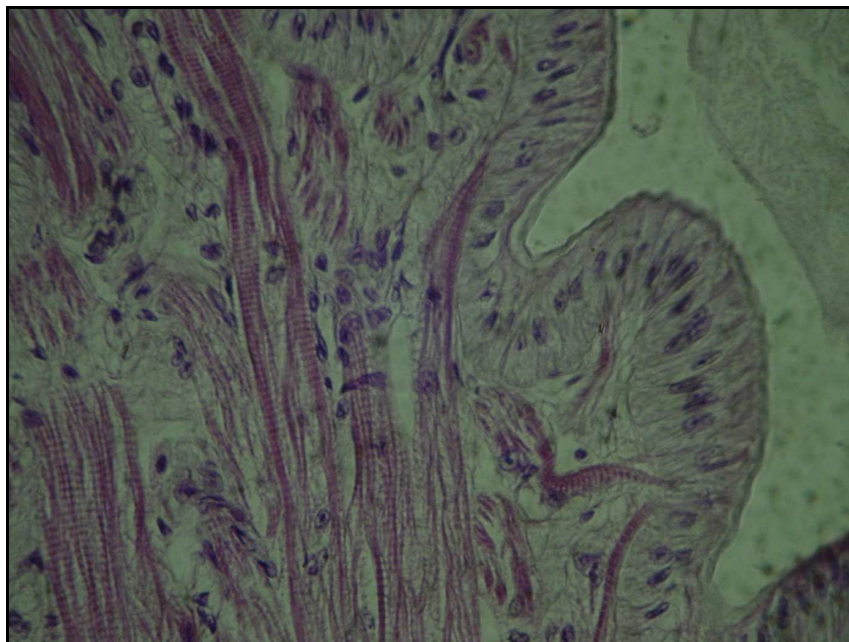
Tablica 50. Detaljni prikaz karakteristika modela podataka prikazanog na slici 46.

Točnost modela		86.8%	
Kappa statistika		0.79	
Preciznost (Precision)	Osjetljivost (Recall)	Vrsta (klasa)	
0.87	0.88	Grmalji	
0.92	0.74	Jastozi	
0.85	0.92	Rakovi	
Matrica konfuzije			
Grmalji	Jastozi	Rakovice	<- predviđeno modelom
60	1	7	Grmalji
5	23	3	Jastozi
4	1	56	Rakovice
<- Stvarna vrsta			

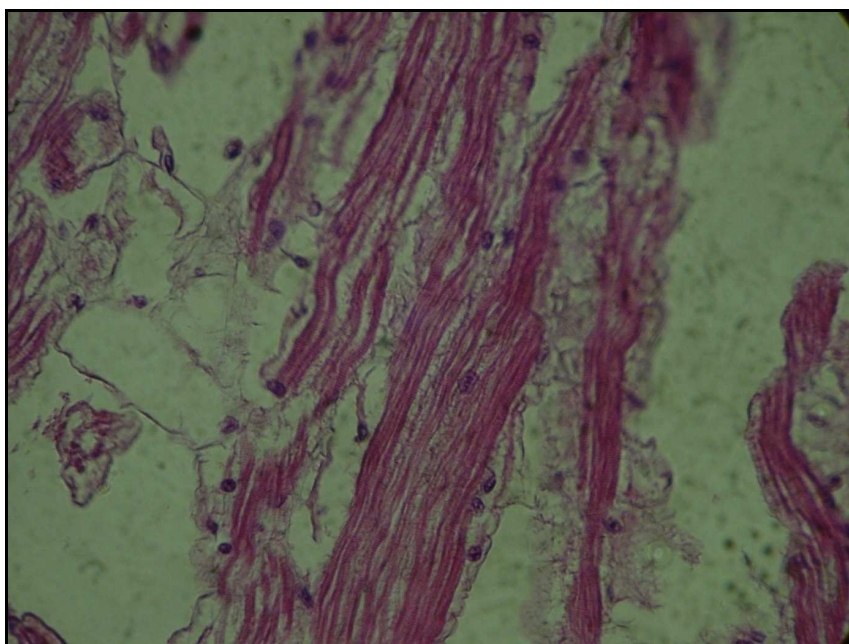
5.5. HISTOLOŠKE ANALIZE

5.5.1. Histološke analize rakovice *Maja squinado*

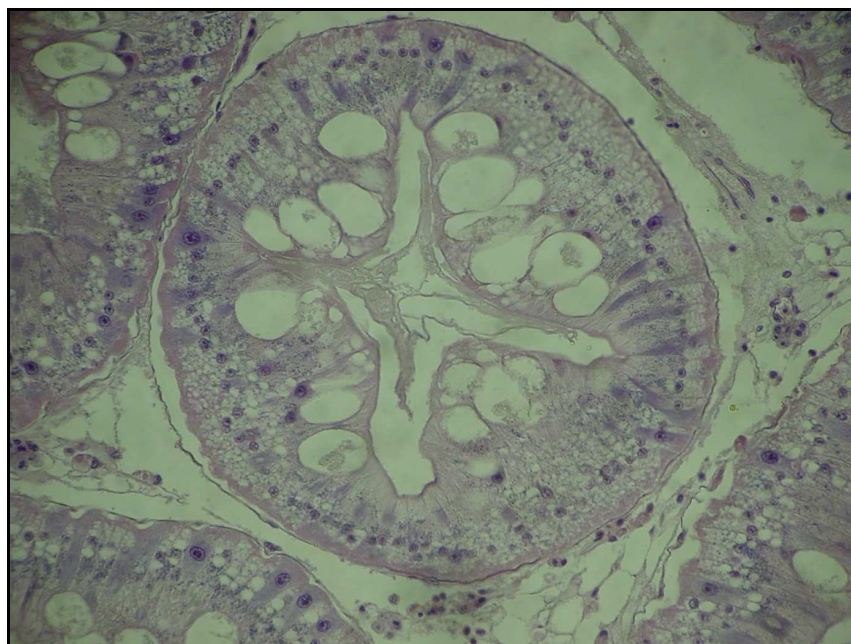
U prerezu stražnjeg crijeva rakovice (slika 47) vidi se da sluznicu stražnjeg crijeva čine nabori koji plitko zalaze u lumen crijeva. Nabore oblaže jednoslojan cilindričan epitel. Stanice epitela su dugačke sa jezgrom smještenom u sredini i sa svijetlom citoplazmom. Epitelne stanice na površini nabora prekrivene su kutikulom. Lamina propria je sloj gustog vezivnog tkiva koji zalazi u nabore. U većini nabora crijeva, unutar lamine proprie uočavaju se gusto raspoređena vlakna skeletnog mišićja. Skeletna mišićna vlakna postavljena su kružno, relativno su tanka i pokazuju izrazitu poprečnu prugavost. Ovo skeletno mišićje po svom razmještaju odgovara mišićnom sloju sluznice (*lamina muscularis mucosae*). U pojedinim naborima mišićna vlakna dopiru do samog vrha nabora. S vanjske strane sluznice uočava se sloj gustog vezivnog tkiva. U prerezu srca rakovice na slici 48 uočavaju se srčano mišićna vlakna sa izrazitom poprečnom prugavosti. Vlakna su uzdužno raspoređena i formiraju snopove. Snopovi su međusobno odjeljeni rahlim vezivnim tkivom. Hepatopankreas rakovice se sastoji od niza kanalića koja se u poprečnom prerezu prikazuju kao ovalne ili okrugle tvorbe (slika 49). Kanalić oblaže epitel koji leži na bazalnoj membrani. Epitelne stanice su visoke, cilindrične, jezgra se nalazi u donjoj trećini stanice. Površinu epitelnih stanica oblažu mikrovili u vidu četkaste prevlake. Kod pojedinih cilindričnih stanica u gornjoj trećini stanice nalazi se proširena vakuola ispunjena rijetkim sadržajem. U većini stanica uočavaju se u citoplazmi brojne masne kapljice. Na prerezu škrga rakovice uočavamo vanjski epitelni sloj koji leži na bazalnoj membrani. U središnjem dijelu sa rahlim vezivnim tkivom uočavaju se krvne žile sa stanicama hemolimfe. Vanjski epitelni sloj izlučuje kutikulu na površinu škržne lamele (slika 50). Na prerezu kroz muške gonade rakovice uočavaju se poprečno prerezani kanalići širokog lumena. U lumenu se ne nalaze zreli spermatosomi. Stanice sjemenskog epitela leže na bazalnoj membrani. Stanice su velike sa jezgrom, između stanica sjemenskog epitela uočavaju se potporne Sertolijeve stanice (slika 51). Na prerezu kroz ženske gonade uočavaju se brojne previtelogene i vitelogene oocite (slika 52).



Slika 47. Stražnje crijevo rakovice *Maja squinado*. Povećanje 20 x



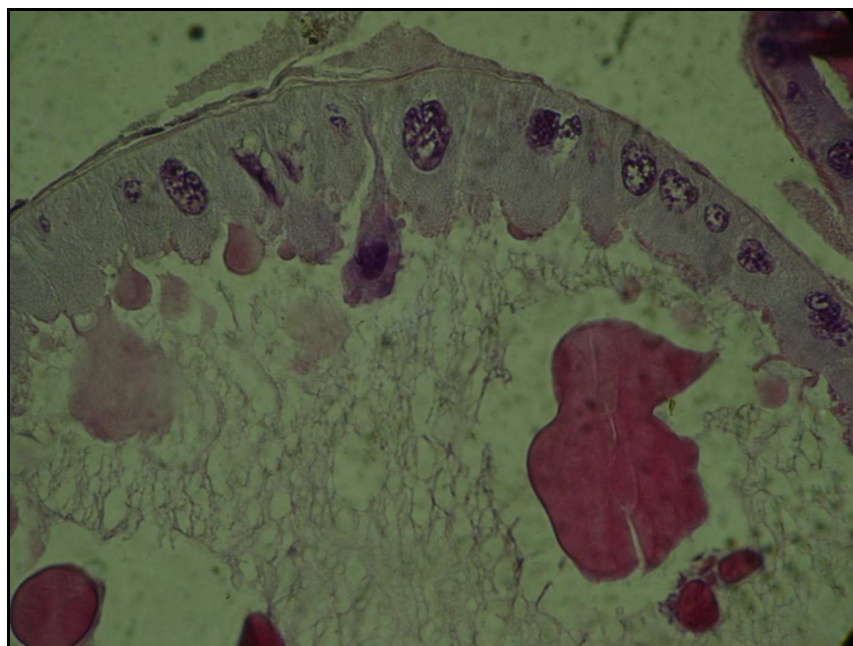
Slika 48. Srčani mišić rakovice *Maja squinado*. Povećanje 40 x



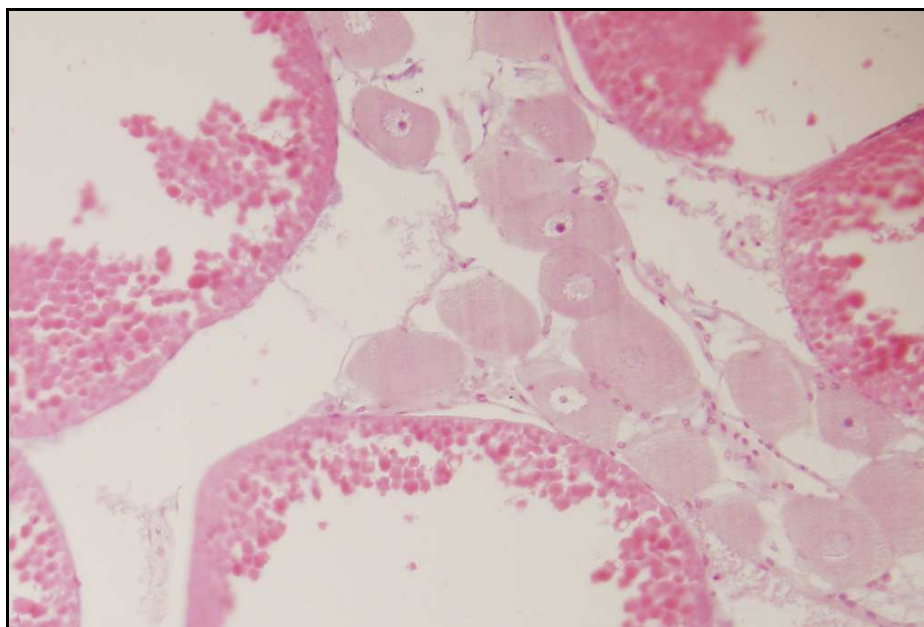
Slika 49. Hepatopankreas rakovice *Maja squinado*. Povećanje 20 x.



Slika 50. Škrge rakovice *Maja squinado*. Povećanje 20 x



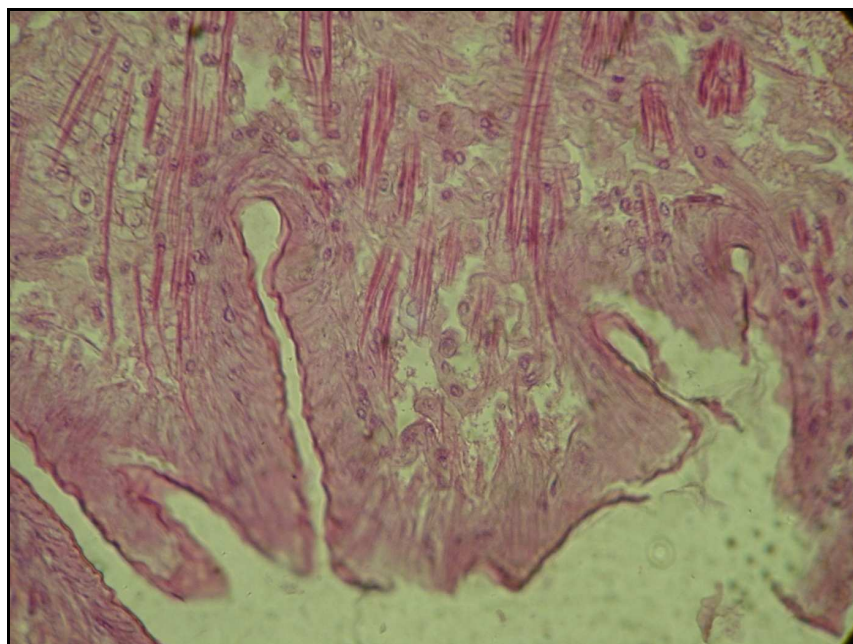
Slika 51. Muške gonade rakovice *Maja squinado*. Povećanje 40 x.



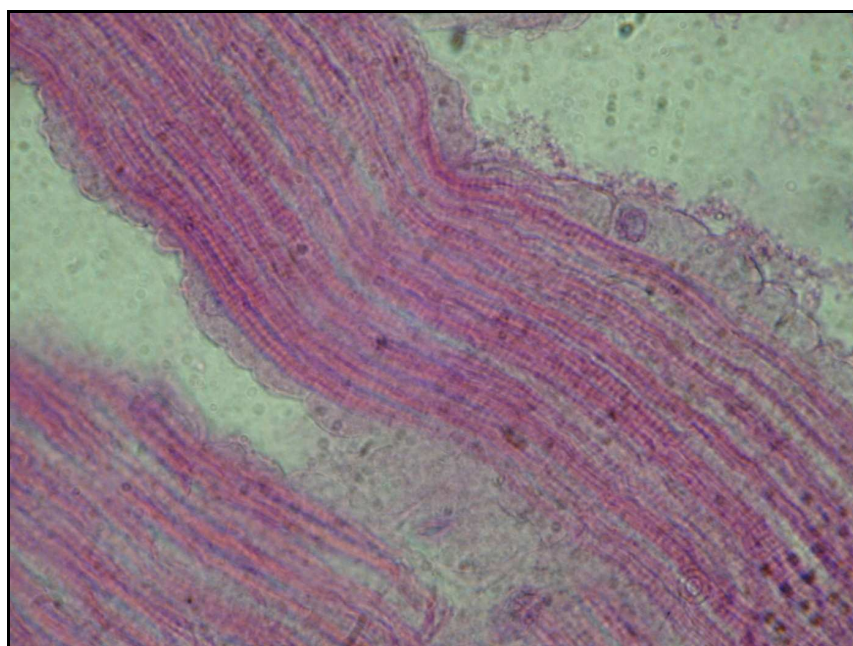
Slika 52. Ženske gonade rakovice *Maja squinado*. Povećanje 40 x.

5.5.2. Histološke analize jastoga *Palinurus elephas*

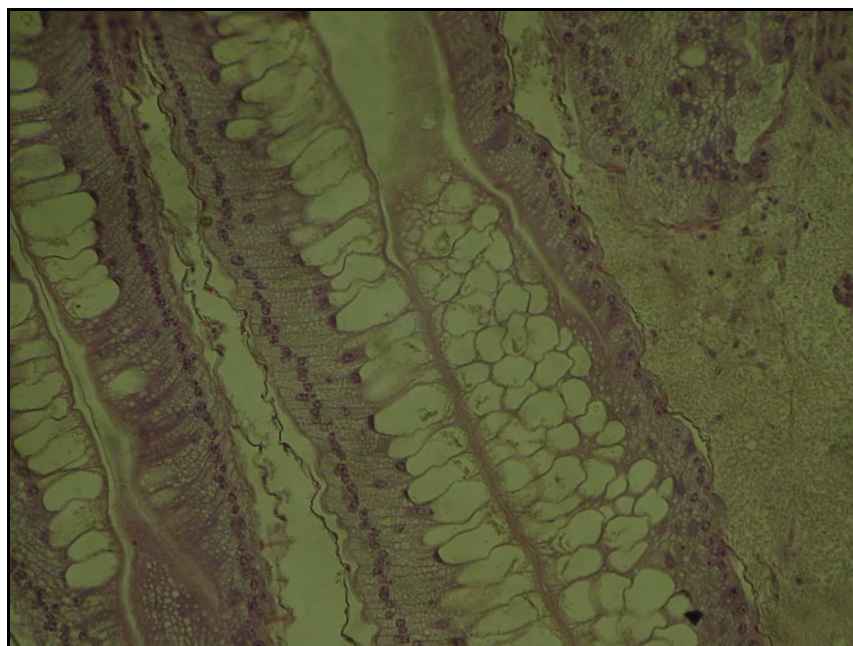
U prerezu stražnjeg crijeva jastoga (slika 53) vidi se da sluznicu stražnjeg crijeva čine plitki nabori. Nabore oblaže jednoslojan cilindričan epitel. Stanice epitela su dugačke sa jezgrom u donjoj trećini stanice. Na površini sluznice uočava se sloj kutikule. Sluznica leži na tankom sloju mišićnih vlakana koji odjeljuju sluznicu od podležeg vanjskog sloja rahlog vezivnog tkiva. Ispod sluznice je širok sloj lamine proprije građen od rahlog vezivnog tkiva. U lamini propriji nalaze se brojna, nepravilno raspoređena skeletno mišićna vlakna koja pokazuju izrazitu poprečnu prugavost. Ovo skeletno mišićje po svom razmještau odgovara mišićnom sloju sluznice (*lamina muscularis mucosae*). U prerezu srca jastoga uočavaju se poprečno prugasta vlakna, uzdužno raspoređena (slika 54). Vlakna se slažu u snopove, međusobno odjeljeni rahlim vezivnim tkivom. Hepatopankreas jastoga sastoji se od niza kanalića. Kanaliće oblaže epitel koji leži na bazalnoj membrani. U donjoj polovici epitela stanice su uske, cilindrične sa jezgrom pri bazi. Citoplazma je ispunjena brojnim masnim kapljicama. U gornjoj polovici smještene su u jednom nizu stanice sa velikom mjehurastom jezgrom u bazalnom dijelu stanice. Mjestimično se u vakuolama uočava rijedak sadržaj. Površinu epitelnih stanica oblažu mikrovili u vidu četkaste prevlake (slika 55). Na prerezu škrga jastoga uočavamo vanjski epitelni sloj koji leži na bazalnoj membrani. U središnjem dijelu sa rahlim vezivnim tkivom uočavaju se krvne žile sa stanicama hemolimfe. Vanjski epitelni sloj izlučuje kutikulu na površinu škržne lamele (slika 56). Na prerezu kroz muške gonade jastoga uočavaju se poprečno prerezani kanalići širokog lumena. U lumenu se ne nalaze zreli spermatosomi. Stanice sjemenskog epitela leže na bazalnoj membrani. Stanice su velike sa jezgrom, između stanica sjemenskog epitela uočavaju se potporne Sertolijeve stanice (slika 57). Na prerezu kroz ženske gonade uočavaju se brojne previtelogene i vitelogene oocite (slika 58).



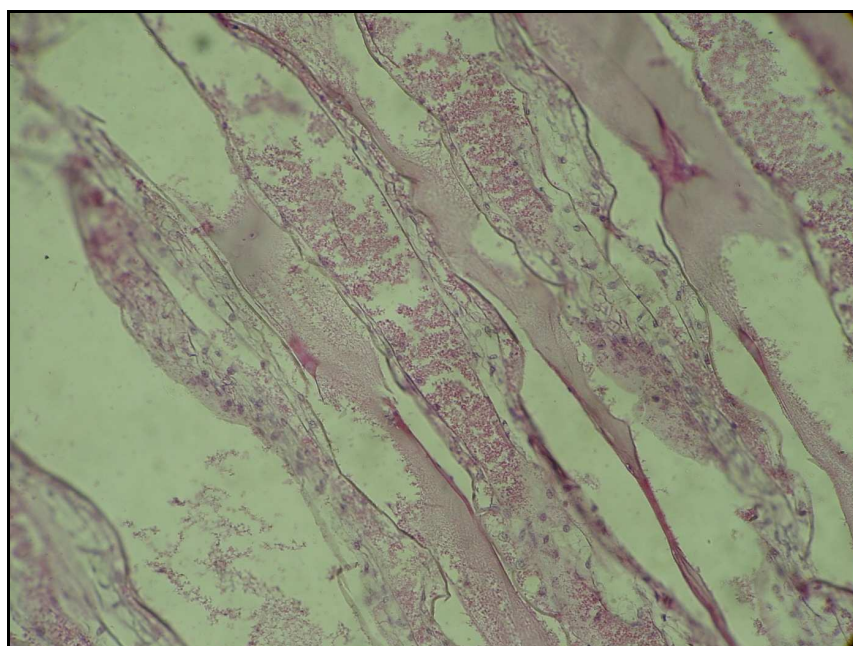
Slika 53. Stražnje crijevo jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 40 x.



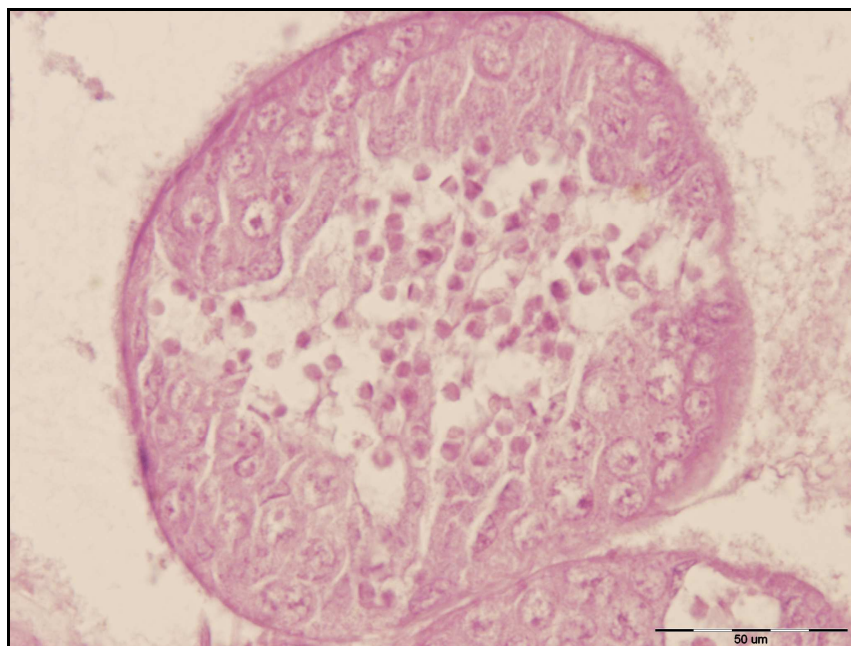
Slika 54. Srčani mišić jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 100 x.



Slika 55. Hepatopankreas jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 20 x.



Slika 56. Škrge jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 20 x.



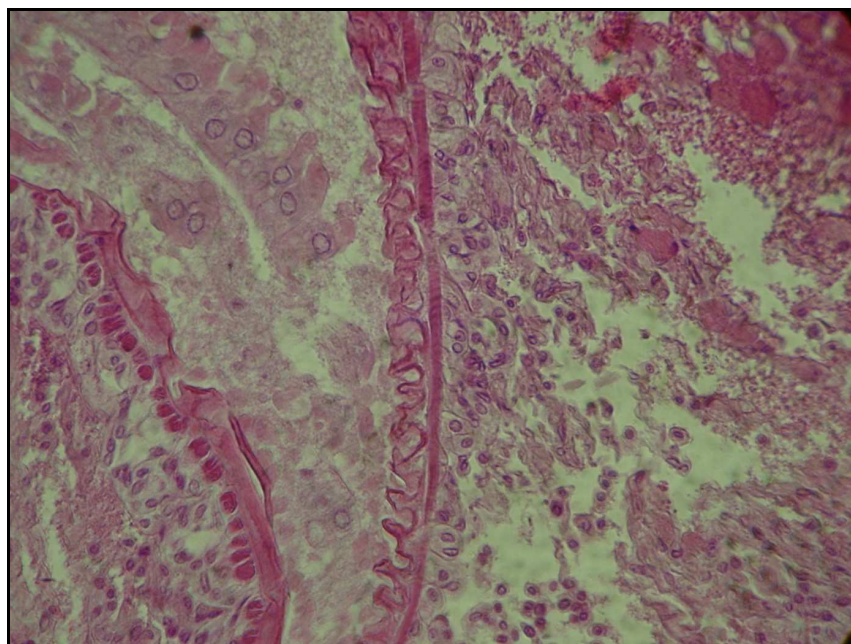
Slika 57. Muške gonade jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 80 x.



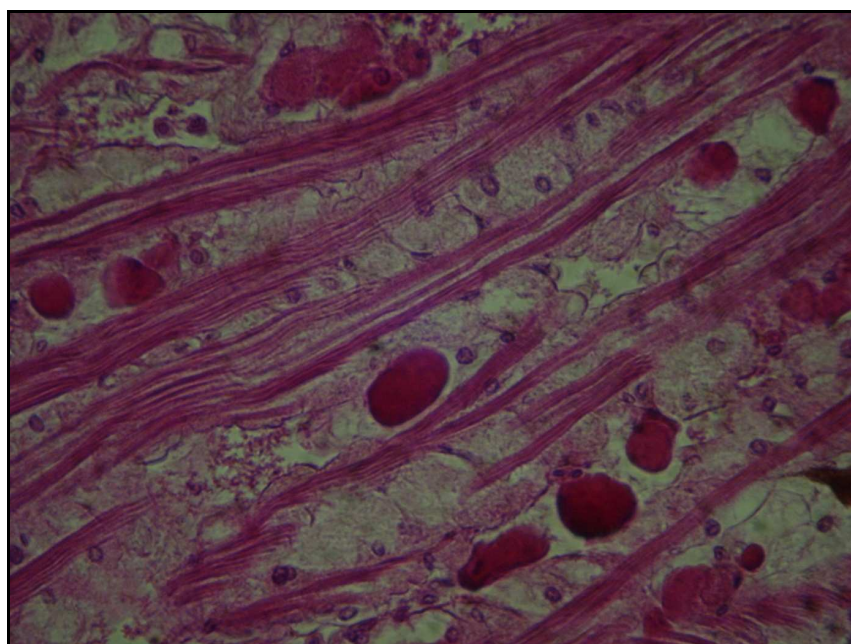
Slika 58. Ženske gonade jastoga *Palinurus elephas*. Povećanje 40 x.

5.5.3. Histološke analize grmalja *Eriphia verrucosa*

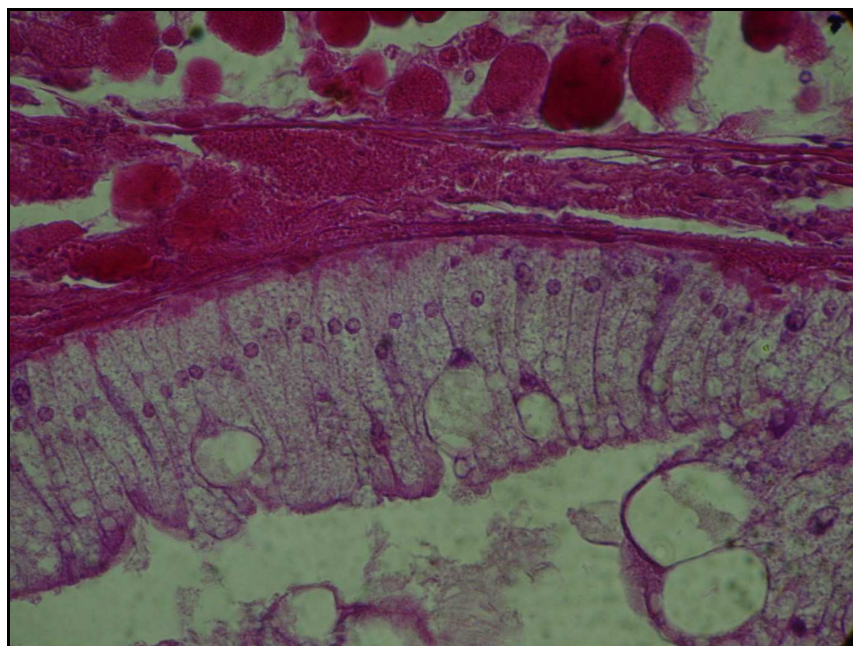
U prerezu stražnjeg crijeva grmalja (slika 59) vidi se da sluznicu oblaže jednoslojan kubični epitel, stanice su niske sa velikom jezgrom. Na površini sluznice uočava se sloj kutikule. Ispod sluznice je sloj lamine proprije građene od rahlog vezivnog tkiva. U lamini propriji uočava se uski sloj kratkih mišićnih vlakana koja su poprečno prugasta. U prerezu srca uočavaju se srčana mišićna vlakna koja pokazuju izrazitu poprečnu prugavost. Vlakna čine snopove koji su tanki, sa manjim brojem vlakana. Mišićni snopovi odjeljeni su vezivnim tkivom. Između stanica vezivnog tkiva mjestimično se uočavaju velike okrugle tvorbe koje se na preparatima bojanim H-E bojaju izrazito crveno (slika 60). Hepatopankreas grmalja sastoji se od niza kanalića. Kanaliće oblaže epitel koji leži na bazalnoj membrani. Između kanalića je vezivno tkivo sa okruglim tvorbama koje se tehnikom bojanja H-E bojaju izrazito crveno (slika 61). Lumen kanalića oblažu stanice koje su visoke, cilindrične sa jezgrom u donjoj polovici. U citoplazmi se uočavaju masne kapljice. Mjestimično se između cilindričnih stanica uočavaju velike okrugle stanice sa jezgrom pri bazi i velikom mjehurastom vakuolom ispunjenom rijetkim sadržajem. Površinu epitelnih stanica oblažu mikrovili u vidu četkaste prevlake. Škržne lamele pravilno su paralelno raspoređene, sa širokim međuprostorima. Svaku lamelu obavija vanjski epitelni sloj koji leži na bazalnoj membrani, u središnjem dijelu su krvne žile ispunjene hemolimfom (slika 62). Na prerezu kroz muške gonade grmalja uočavaju se poprečno prerezani kanalići širokog lumena (slika 63). U lumenu se ne nalaze zreli spermatosomi. Stanice sjemenskog epitela leže na bazalnoj membrani. Stanice su velike sa jezgrom. Ženske gonade obavijene su tankom mišićnom ovojnicom. Na prerezu kroz ženske gonade uočavaju se brojne previtelogene i vitelogene oocite (slika 64).



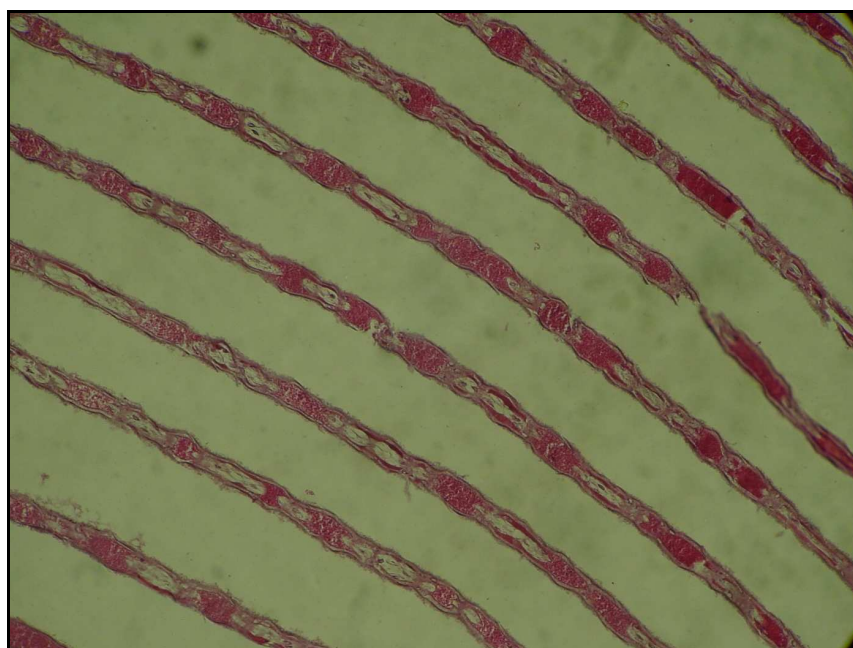
Slika 59. Stražnje crijevo grmlja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 40 x.



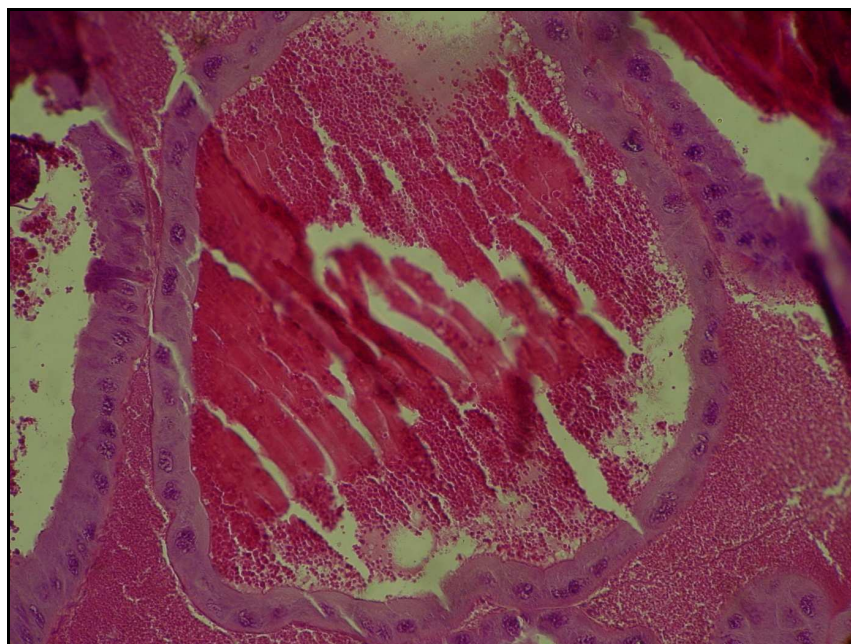
Slika 60. Srčani mišić grmalja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 40 x.



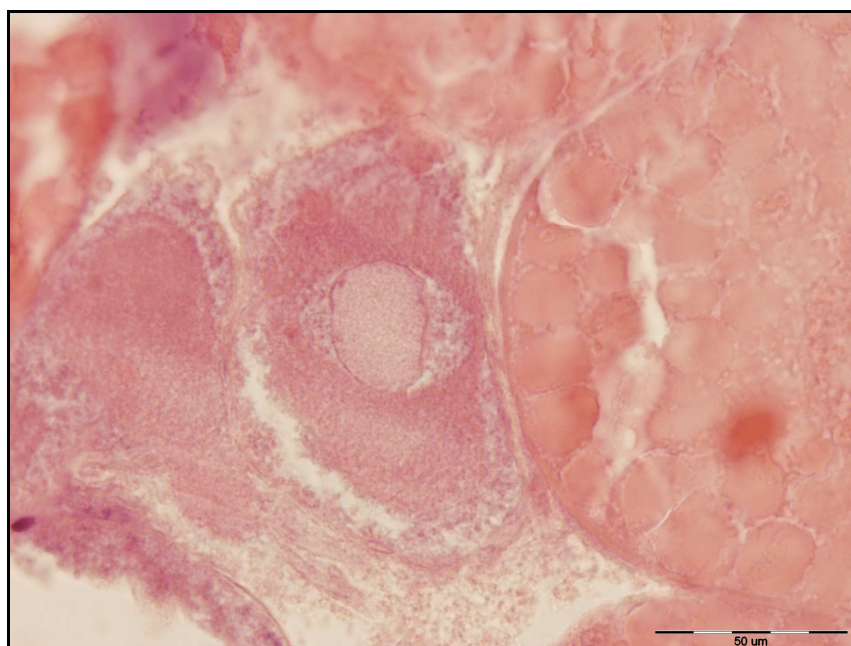
Slika 61. Hepatopankreas grmalja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 40 x.



Slika 62. Škrge grmalja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 20 x.



Slika 63. Muške gonade grmalja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 20 x.



Slika 64. Ženske gonade grmalja *Eriphia verrucosa*. Povećanje 80 x.

6. RASPRAVA

Deseteronožni rakovi nastanjuju raznolika područja od dubokih mora, plitkih uzobalnih pojaseva, rijeka do kopnenih područja. Evolucijski su se prilagođavali zahtjevima okoliša i razvili prilagodbe. Fiziološke prilagodbe funkcija organskih sustava, inducirane promjenom čimbenika okoliša, sagledavaju se kroz biokemijske promjene na ekstracelularnoj razini. Na biokemijski profil hemolimfe može utjecati uzrast, stadij presvlačenja, hrana, sezona, spolni ciklus, zdravstveno stanje jedinke i uvjeti okoliša, ali isto tako i način života (Maynard, 1960; Kallen i sur., 1990). Obzirom da je veliki broj čimbenika koji mogu utjecati na biokemijski profil istraživanih jedinki u našem istraživanju pokušali smo utjecaje ujednačiti odabirom zdravih odraslih jedinki u međusvlačnom stadiju presvlačenja, istovjetnim uvjetima držanja istraživanih jedinki prije samog uzorkovanja, te načinom uzorkovanja i skladištenja hemolimfe.

Velika rakovica *Maja squinado*, (Herbst, 1788), jastog *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787) grmalj, *Eriphia verucosa* (Forsk., 1775) bili su iz ulova. Nakon ulova transportirani su do laboratorija u termo izoliranim posudama pri čemu su bili izloženi zraku i pothlađeni. Svi istraživani rakovi bili su izloženi nizu stresora kao što su: pothlađenost, manipulacija, zatočeništvo i izloženost zraku. Stres u rakova uzrokuje pojačano izlučivanje CHH hormona koji ima multifunkcionalnu ulogu u metabolizmu rakova, te tako utječe na biokemijski profil hemolimfe. Predhodna istraživanja (Santos i sur., 1997; Speed i sur., 2001; Zou i sur., 1996; Morris i Oliver, 1999; Santos i Keller, 1993 a; Chang i sur., 1998) ukazuju na ulogu CHH hormona na regulaciju razine glukoze u hemolimfi, metabolizam lipida, ionsku ravnotežu i ravnotežu vode. Mnogi rakovi posjeduju morfološke i fiziološke osobine koje im omogućuju da prežive u periodima niskih plima odnosno izloženosti zraku. Uglavnom je to mogućnost koju imaju vrste u zoni plime i oseke dok vrste iz sublitoralnih zona imaju slabo razvijene (Spicer i sur. 1990), pa je tako Chang (2005) proučavajući utjecaje raznih stresora došao do spoznaje da manipulacija i izloženost zraku imaju za posljedicu najvišu razinu CHH hormona u *Homarus americanus*, što treba imati u vidu pri interpretaciji naših rezultata.

Rakovi korišteni u našem istraživanju imali su potpuno tvrdi oklop, bez znakova nadolazećeg presvlačenja, odnosno bili su u međusvlačnom periodu. Izostanak primjeraka sa mekanim oklopom vjerojatno je stoga što u vrijeme presvlačenja rakovi smanjuju svoje aktivnosti, ne hrane se i skrivaju se da bi se zaštitili od grabežljivaca. Jednako tako Telford (1968) u svom istraživanju navodi da nije pronašao A i B stadije presvlačenja zbog sezone

ulova koja se podudarala sa periodom kada se ne odvija presvlačenje, te pretpostavlja da bi drugi razlog mogao biti nemogućnost ulova rakova u periodu kada imaju meki oklop. Naime tada rakovi izbjegavaju izlaziti iz skloništa i ne jedu, što potvrđuju i istraživanja Cromarty-a i sur. (1991) i Travis-a (1955 a) koje je obavljeno na jastozima. Stadij presvlačenja odredili smo prema Drach-u, (1939), koji je ciklus podijelio na pet stadija A-E i više podstadija (opis stadija naveden je na str. 45). Aiken (1973) je modificirao podjelu i prilagodio je jastozima. Presvlačenje zahtjeva koordinaciju svih organa u organizmu raka. Brojni autori su proučavali utjecaj ciklusa presvlačenja na biokemijske parametre hemolimfe. Količina glukoze je varijabilni parametar hemolimfe, ovisi o razini stresa i po nekim autorima ne ovisi o ciklusu presvlačenja (Spindler-Barth, 1976), dok pojedini autori tvrde da je razina najveća u predsvlačnom i najniža u međusvlačnom periodu (Telford, 1968). Količina proteina plazme ovisi o stadiju presvlačenja i uhranjenosti, razina je veća prije presvlačenja, minimalna nakon i lagano raste (Stewart i Li, 1969; Hepper, 1977). Jednako tako razina hemocijanina je najmanja odmah nakon presvlačenja i raste tijekom C i D stadija (Hagerman, 1983; Cheng i sur. 2001; Cheng i sur. 2002). Razlog pada količine proteina nakon presvlačenja vjerojatno je unos veće količine vode odmah nakon presvlačenja (Dall, 1974 b). Promjene razine kalcija u serumu odraz su fizioloških promjena koje se događaju tijekom ciklusa presvlačenja (Castell i Covey, 1976). Razina kalcija u hemolimfi najveća je u prijesvlačnom periodu, tijekom poslijesvlačnog perioda raste, dok je razina kalcija u međusvlačnom periodu niska i stabilna (Meyran i sur., 1993). Ravnoteža kalcija u međusvlačnom periodu je negativna jer je oklop u potpunosti kalcificiran i aktivni unos kalcija zahtjeva potrošnju energije. U tom periodu kalcij se izlučuje putem škrge i ne kompenzira se reapsorpcijom (Greenaway, 1972). Iz svega navedenog proizlazi da međusvlačni period predstavlja stabilan period u kojem je završena mineralizacija oklopa i biokemijski parametri su stabilni. Osim toga izabrali smo ga za ovo istraživanje jer je to najduži period presvlačenja, jednostavno se determinira i dobro je zastupljen u ulovu.

Prema nekim autorima spol nema utjecaj na biokemijski profil rakova (Cheng i sur., 2011; 2001; Balasz i sur., 1974; Lynch i Krebb, 1973), dok prema drugim istraživanjima postoje razlike u biokemijskom profilu među spolovima (Lorenzon i sur., 2007). Kod određivanja spola služili smo se vanjskim spolnim oznakama. Vanjske spolne oznake nalaze se kod mužjaka na osnovi petog pereipoda gdje je smješten spolni otvor ili gonopora, dok se vanjske spolne oznake kod ženki nalaze na osnovi trećeg pereipoda. Od svih analiziranih ženki ni jedna nije imala vanjska jaja. Poznato je da su reprodukcija i metabolizam rakova ovisni o ciklusu presvlačenja, a sva tri koreliraju sa sezonom odnosno fotoperiodom i

temperaturom medija u kojem rakovi borave (Aiken, 1969 a). Reprodukcijska kratkorepaca i dugorepaca odvija se tijekom dugog međusvlačnog stadija (Subramoniam, 2000; Rice i Armitrage, 1974), stoga je bilo jako važno imati sve jedinke u istom reproduktivnom stadiju.

Indeks kondicije kao hranidbeni status ne koristi se u procjeni uhranjenosti populacije rakova jer odnos dužine i težine tijela jedinki ne prikazuje stvarno stanje uhranjenosti (Dall, 1974 b). Rakovi u gladovanju ne mijenjaju vanjski izgled ni težinu jer izgubljeno tkivo nadomještaju vodom. Mogući pokazatelji hranidbenog stanja su težina hepatopankreasa ili mišićnog tkiva ekstremiteta. Razlog prividnom smanjenju proteina u hemolimfi tijekom gladovanja je povećanje volumena hemolimfe na račun metaboliziranog tkiva pri čemu se izgubljeno tkivo nadomješta vodom (Dall, 1974 b). Biometrijske mjere rakova iz ulova važne su u procjeni veličine populacije i mogućnostima njenog iskorištavanja.

Rakovica *Maja squinado*

U našem uzorku prevladavali su odrasli mužjaci prosječne dužine $12,48 \pm 1,21$ cm, dok su odrasle ženke bile prosječne dužine $12,39 \pm 1,13$ cm. Prosječna težina cijelog uzorka bila je $569,53 \pm 176,3$ g. Utvrđena je povezanost težine rakovice sa dužinom i širinom glavopršnjaka. Težina rakovice pokazuje visoku povezanost sa dužinom i težinom glavopršnjaka ($r = 0,93$; $r = 0,93$). Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da nema statistički značajnih razlika u biometrijskim vrijednostima rakovica. Naši nalazi podudaraju se sa nalazima LeFoll (1993) koji navodi da su u Bretanji odrasle ženke bile 80-170 mm dužine glavopršnjaka, mužjaci 85-200 mm dužine glavopršnjaka i Sampedro i sur., (1999) koji nalaze da su odrasle ženke bile dužine tijela min. 13 cm, a mužjaci dužine tijela min. 13,3 cm, te potvrđuju naš nalaz da nema razlike u dužini, širini glavopršnjaka i težini između mužjaka i ženki.

Biokemijska mjerenja rakovice obuhvatila su CHOL, TRIG, BUN, GLU, TP, Ca, Mg, Cu, Zn, LDH i CK. U uzorcima hemolimfe nisu bili mjerljivi AST, ALP i GGT. Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da postoje značajne razlike u razinama Ca i Mg, pri čemu mužjaci imaju značajno veću razinu kalcija i značajno manju razinu magnezija u hemolimfi. Analizom povezanosti biometrijskih i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka rakovica utvrđeno je da su CK i Zn nisko negativno povezani s dužinom glavopršnjaka, širinom glavopršnjaka i težinom rakovica. Analizom povezanosti biokemija cijelog uzorka rakovica utvrđeno je da je razina CHOL vrlo jako pozitivno povezana sa razinom TRIG ($r = 0,91$) i jako pozitivno povezana sa razinom BUN ($r = 0,79$). Razina triglicerida je jako pozitivno povezana sa razinom uree ($r = 0,79$). Razina Cu je umjereno pozitivno povezana sa

razinom Zn ($r = 0,48$). S obzirom na brojne slabe i umjerene povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente pri čemu su dobivena dva faktora. Faktor 1. predstavlja 57 % varijabiliteta izdvojenih 5 parametara biokemija rakovica. Najveće faktorsko zasićenje imaju CHOL, TRIG i BUN. Faktor 2. predstavlja 37 % zajedničkih varijabiliteta. LDH i CK imaju najveće faktorsko zasićenje na drugom faktoru.

Razina kolesterola u rakovica bila je $0,84 \pm 0,31$ mmol/L, triglicerida $0,23 \pm 0,09$ mmol/L. Uspoređujući naš nalaz sa rezultatima Lorenzon i sur. (2007) koji su proučavali utjecaj izloženost zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište vidljivo je da su razine kolesterola i triglicerida u našem istraživanju bile više. Kontrolna grupa jastoga imala je 72 mgL^{-1} kolesterola, što je bilo značajno manje od 1. grupe $212,7 \text{ mgL}^{-1}$ i 2. grupe 128 mgL^{-1} koja je držana na nižoj temperaturi. Mjerena je i razina triglicerida, kontrolna grupa imala je 13 mg/L što je bilo značajno manje od 1. grupe $217,2 \text{ mg/L}$ i 2. grupe $34,7 \text{ mg/L}$. U našem istraživanju nije bilo spolnih razlika u razinama kolesterola i triglicerida, dok su ženke jastoga u prije navedenom istraživanju imale veću razinu triglicerida. Razlog veće razine lipida izmjenjenog u hemolimfi rakovice može biti posljedica stresa odnosno povećane razine CHH hormonom koji osim što regulira razinu glukoze u hemolimfi utječe i na razinu lipida u hemolimfi.

U našem istraživanju razina uree bila je $3,17 \pm 1,16$ mmol/L. Durand i sur. 2000 godine istraživali su i izlučivanje amonijaka u vodu i razinu amonijaka u hemolimfi *Maje squinado* tijekom dva perioda, ljeti i zimi. Uzorci hemolimfe uzeti su 24 h prije i nakon izloženosti zraku. Amonijak u hemolimfi prije izloženosti je bio ovisan o sezoni, te je razina amonijaka u zimskom uzorkovanju bila $45,7 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$, što je značajno niže od razine amonijaka u ljetnom uzorkovanju $69,4 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$. Nije bilo razlike među spolovima. Amonijak čini 91 % izlučenog dušika, a urea i amini 6,7 % i 2,2 %. Neovisno o okolišu kojeg nastanjuju rakovi izlučuju dušične metaboličke produkte kao amonijak u okolinu putem škržnog epitela. Tijekom izloženosti zraku epitel škrge gubi mogućnost izlučivanja dušičnih metaboličkih produkata pa se oni akumuliraju u hemolimfi, što dovodi do zaključka da je dobivena viša vrijednost uree odraz izloženosti zraku.

Razina glukoze u hemolimfi rakovice bila je $2,92 \pm 0,82$ mmol/L. Raspon vrijednosti kretao se od min. 1,1 do max. 5,18 mmol/L. Prethodna istraživanja utvrdila su da je razina glukoze u rakova manja od razine u kralježnjaka, pa je tako vrijednost u kozica *Procambrarus clarkii* 0,9 mM; u *Orconectes limosus* 0,03-0,19 mM, dok je kod *Carcinus maenas* 0,1-0,3mM i hlapa *Homarus americanus* 1,1-1,4 mM (Verri i sur., 2001). Brojni autori proučavali su utjecaj izloženosti zraku tijekom transporta i posljedične hipoksije na njezinu razinu u

hemolimfi. Durand i sur., 2000 godine istraživali su razinu u hemolimfi *Maje squinado* težine 680 g tijekom izloženosti zraku u dva perioda, ljeti i zimi. Nije bilo značajnih razlika u razinama glukoze i laktata među spolovima, veličinama ni sezonama. Razina prije izloženosti zraku bila je $0,202 \text{ mmolL}^{-1}$. Hiperglikemija se javila unutar 12 h i iznosila je $2,09 \text{ mmolL}^{-1}$ u zimskom uzorkovanju i $1,72 \text{ mmolL}^{-1}$ u ljetnom uzorkovanju. Autor potvrđuje da se hiperglikemija javlja već nakon 3 h i dostiže max. unutar 12 h. U našem istraživanju rakovice su bile izložene zraku 9 h i razina glukoze iznosila je $2,92 \pm 0,82 \text{ mmol/L}$ što se podudara sa prije navedenim istraživanjem. Gore navedeni nalaz možemo obrazložiti utjecajem stresa, izazvanog izloženosti zraku i hipoksije, pri čemu raste razina glukoze. Veliki raspon vrijednosti glukoze u našem istraživanju podudara se sa rezultatima istraživanja Ridgway-a i sur. (2006) koji su pratili fiziološke, imunološke i patološke promjene na *Nephrops norvegicus* koji je iz komercijalnih razloga bio izložen zraku u različito dužinskim intervalima i tri režima temperature. Pratila se razina glukoze, L-laktata i CHH hormona. Razina glukoze se nije značajno promijenila na 10°C , na 15°C je značajno pala nakon 12 h, na 25°C je značajno pala već nakon 4 h. CHH hormon je rastao u sve tri grupe sa značajnijom razlikom na 25°C . U našem istraživanju razina glukoze u hemolimfi odraz je stresa i izloženosti zraku, te je ovisna o zalihama glikogena u hepatopankreasu i razini metabolizma. Ovakav složeni mehanizam prilagodbe izloženosti zraku dovodi do individualnih razlika u razinama glukoze u hemolimfi koja je utvrđena u našem istraživanju.

Ukupni proteini u hemolimfi rakovica u našem istraživanju iznosili su $47,74 \pm 11,75 \text{ g/L}$. Obzirom da 80-95 % ukupnih proteina čini hemocijanin (Djangmah, 1970) moguće je naš nalaz uspoređivati sa nalazom drugih autora koji navode vrijednosti hemocijanina u svojim istraživanjima, pa su tako Durand i sur. (2000) proveli istraživanje utjecaja izloženosti zraku na biokemijske parametre hemolimfe *Maje squinado* prosječne težine 680 g. i navode da je hemocijanina bilo $43,3 \pm 1,6 \text{ g/L}$ prije izloženosti zraku. Nešto veća razina proteina u našem istraživanju mogla bi biti posljedica pojačane sinteze hemocijanina stimulirane hipoksijom (Taylor i Anstiss, 1999).

U našem istraživanju razina kalcija bila je $16,53 \pm 1,97 \text{ mol/L}$. Kalcija u moru ima 10 mol/L , razina u hemolimfi je $1-2 \text{ mol/L}$ iznad medija u kojem rak živi. Ukupna količina kalcija u tijelu raka je linearno povezana sa veličinom raka, ali takvi podatci postoje za samo pojedine vrste rakova (Greenaway, 1985). Povećana količina kalcija u našem istraživanju može se objasniti istraživanjem Lorenzon-a i sur. (2007) koji su proučavali utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina kalcija. Kontrolna grupa imala $15,3 \text{ mmolL}^{-1}$. Rakovi transportirani na 6

°C imali su razinu kao kontrolna grupa, dok su na višim temperaturama (15 °C) razine kalcija bile značajno veće ($19,37 \text{ mmolL}^{-1}$). Kalcij je korelirao sa laktatima. Autori pretpostavljaju da je izvor Ca^{2+} oklop i da se on mobilizirao zajedno sa karbonatima kao odgovor na acidozu hemolimfe.

Magnezija je u našem istraživanju bilo $96,21 \pm 32,95 \text{ mmol/L}$. Poznato je da *Maja squinado* slabo regulira razinu Mg. Frederich i sur. 2000 godine ustanovili su da je razina bila $39,9 \text{ mmolL}^{-1}$ i lako se mijenjala izlaganjem rakovice mediju sa smanjenom razinom Mg. Povećana količina Mg u našem istraživanju nije posljedica izlaganju mediju sa povećanom razinom Mg, već je posljedica stresa i izloženosti zraku što potvrđuje i istraživanje Paterson-a i sur. (1997) koji su istraživali hemolimfu *Panulirus ornatus* ulovljenog i izloženog hipoksiji tijekom transporta, pri čemu je razina Ca, K i Mg rasla. U našem istraživanju jedinke su bile izložene hipoksiji koja stimulira porast hemocijanina koji je utjecao na povećanu razinu Cu $0,89 \text{ mmol/L} \pm 0,37$ i cinka $14,97 \pm 6,87 \text{ } \mu\text{mol/L}$. Oni su međusobno su umjereno pozitivno korelirali što potvrđuje istraživanje Martin-a i sur., (1977). U njihovim istraživanjima 93% Cu i 68% Zn u hemolimfi pripadala hemocijaninu, te je njihova razina bila u ovisnosti o razini hemocijanina u hemolimfi.

Utvdili smo da je razina LDH bila $36,89 \pm 22,88 \text{ U/L}$ i umjereno negativno je povezana sa razinom CK koja je iznosila $307,50 \pm 238,78 \text{ U/L}$. LDH katalizira interkonverziju laktata i piruvata. Koristi se kao indikator promjena na jetri od parenhimatoznih lezija, oštećenja jetre do masnih degeneracija. CK razina se povećava sa povećanom fizičkom aktivnosti, uslijed oštećenja i ishemija mišićnog tkiva. Obzirom da pregledom literature nismo našli podatke kojima bi mogli uspoređivati naše nalaze svi dobiveni podatci bit će dobra baza za daljnja istraživanja

Jastog *Palinurus elephas*

U našem istraživanju mužjaci su bili dugi 29,38 cm, ženke 26,33 cm. Prosječna težina cijelog uzorka bila je $517,09 \pm 218,64 \text{ g}$. Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da postoje razlike u biometrijskim vrijednostima jastoga. Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da mužjaci imaju značajno duže glavopršnjake. Osim toga potvrđena je povezanost težine jastoga sa ukupnom dužinom i dužinom glavopršnjaka. Težina jastoga pokazuje visoku povezanost sa dužinom i težinom glavopršnjaka ($r = 0,83$; $r = 0,77$). U istraživanju Slavice i sur., (2004) ženka jastoga je bila spolno zrela pri dužini tijela od min. 21 cm, a mužjak pri dužini tijela od min. 22 cm za što im trebalo najmanje četiri godine života, te možemo tvrditi da su naši primjerci stariji od četiri godine. Hunter-a i sur. (1996) su

istraživali *Palinurus elephas* i ustanovili da postoji spolna razlika u dužini glavopršnjaka pri čemu mušjaci imaju veću dužinu glavopršnjaka. Kada se usporede ženke i mušjaci istih dužina glavopršnjaka, ženke imaju veću ukupnu dužinu, ali mušjaci imaju veću težinu. Ovakav nalaz potvrđen je i u našem istraživanju. Uzrok tomu ne bi trebalo biti eventualno gladovanje jer ono ne mijenja vanjski izgled ni težinu, pretpostavlja da izgubljeno tkivo biva nadomješteno vodom. Gladovanjem se smanjuju abdominalni mišići i hepatopankreas (Dall, 1974 b). Razlika u dužini glavopršnjaka vjerojatno je odraz spolnog dvoličja.

Biokemijska mjerenja jastoga obuhvatila su CHOL, TRIG, BUN, CREA, GLU, TP, Ca, Mg, Cu, Zn, LDH, ALP, GGT, AST. U uzorcima hemolimfe nije bio mjerljiv CK. Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima jastoga. Značajne razlike su utvrđene u razinama uree pri čemu mušjaci imaju značajno veću razinu uree u hemolimfi, razina kolesterola ima tendenciju da bude značajno različita. Analizom povezanosti biometrijskih vrijednosti i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka jastoga utvrđeno je da je ukupna dužina jastoga umjereno pozitivno povezana sa LDH, TP i BUN i umjereno negativno povezana sa CREA. Dužina glavopršnjaka jastoga je umjereno negativno povezana sa CREA. Težina jastoga je nisko pozitivno povezana sa TP, umjereno pozitivno povezana sa LDH, BUN i Zn, umjereno negativno povezana sa CREA.

Analizom povezanosti biokemija cijelog uzorka jastoga utvrđeno je da je razina TP umjereno pozitivno povezana sa razinom ALP, AST, CHOL i TRIG, BUN, GLU u hemolimfi, jako pozitivno povezana sa razinom Ca, Cu i Zn. Razina Zn je umjereno pozitivno povezana sa GLU, Ca, Cu, jako pozitivno povezana sa CHOL, TRIG, vrlo jako povezana sa TP, ALP, BUN. Razina Cu je umjereno povezana sa Ca i Zn, jako povezana sa TP, ALP, CHOL, TRIG. S obzirom na brojne visoke i umjerene pozitivne povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente pri čemu su dobivena dva faktora. Faktor 1. predstavlja 73 % varijabiliteta izdvojenih 7 parametara biokemija jastoga. Najveće faktorsko zasićenje imaju Zn, Cu, CHOL i TRIG, TP i ALP. Faktor 2. predstavlja 59 % zajedničkih varijabiliteta. Ca, GLU, BUN i TP imaju najveće faktorsko zasićenje na drugom faktoru. S obzirom da je iz brojnih istraživanja poznato da su proteini vezani uz razine cinka i bakra, provedena je i dodatna konfirmatorna faktorska analiza samo s tim varijablama. Faktor je skoro ekvivalentan ukupnim proteinima u hemolimfi, pa se može tako i interpretirati. Isto je vidljivo i iz korelacija, razine cinka i bakra su visoko povezane sa razinom ukupnih proteina ($r = 0,92$; $r = 0,86$). Ovakav rezultat potvrđuje da postoji korelacija u količini Cu i Zn kod deseteronožaca (Martin i sur., 1977). Pretpostavlja se da je uloga cinka stabiliziranje kvaterne strukture hemocijanina.

Razina kolesterola jastoga bila je $0,51 \pm 0,39$ mmol/L, triglicerida $0,13 \pm 0,06$ mmol/L. Rezultate našeg istraživanja možemo usporediti sa istraživanjem Lorenzon-a i sur. (2007) koji su proučavali utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina kolesterola i triglicerida. Kontrolna grupa imala je 72 mgL^{-1} kolesterola što je bilo značajno manje od 1. grupe $212,7 \text{ mgL}^{-1}$ i 2. grupe 128 mgL^{-1} koja je bila na nižoj temperaturi. Mjerena je i razina triglicerida, kontrolna grupa imala je 13 mg/L što je bilo značajno manje od 1. grupe $217,2 \text{ mg/L}$ i 2. grupe $34,7 \text{ mg/L}$. U našem istraživanju nije bilo spolnih razlika u razinama kolesterola i triglicerida, iako je postojala tendencija da razina kolesterola u ženki bude veća ($p = 0,08$), dok su ženke *Homarus americanus* imale veću razinu triglicerida. Razina kolesterola i triglicerida u našem istraživanju bila je veća, razlog veće razine lipida u hemolimfi mogao bi biti povezan sa CHH hormonom koji osim što regulira razinu glukoze u hemolimfi utječe i na razinu lipida u hemolimfi. Mobilizacija lipida potrebna je za vrijeme stresa jer omogućava dostatnu količinu energije.

U našem istraživanju razina uree bila je $0,73 \pm 0,33$ mmol/L. Durand i sur. 2000 godine istraživali su izlučivanje amonijaka u vodu i razinu amonijaka u hemolimfi *Maje squinado*. Uzorci hemolimfe uzeti su 24 h prije izloženosti zraku i nakon izloženost zraku. Nakon povratka u vodu mjeren je izlučeni amonijak svaka 2 h kroz slijedećih 8 h. Istraživanje je napravljeno u dva perioda, ljeti i zimi. Amonijak je činio 91 % svog izlučenog dušika u vodu. Amonijak u hemolimfi prije izloženosti je bio ovisan o sezoni, te je razina amonijaka u zimskom uzorkovanju bila $45,7 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ što je značajno niže od razine amonijaka u ljetnom uzorkovanju $69,4 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$. Nije bilo razlike među spolovima. Amonijak čini 91 % izlučenog dušika, a urea i amini 6,7 % i 2,2 %. Neovisno o okolišu kojeg nastanjuju rakovi izlučuju dušične metaboličke produkte kao amonijak u okolinu putem škržnog epitela. Tijekom izloženosti zraku epitel škrge gubi mogućnost izlučivanja dušičnih metaboličkih produkata pa se oni akumuliraju u hemolimfi. Količina dušičnih metaboličkih produkata u hemolimfi u našem istraživanju odraz je izloženosti zraku.

Razina glukoze u hemolimfi jastoga bila je $0,93 \pm 0,65$ mmol/L. Raspon vrijednosti bio je od min. 0,16 do max. 3,64 mmol/L. Prethodna istraživanja utvrdila su da je razina glukoze u rakova manja od razine glukoze u kralježnjaka, pa je tako razina glukoze 0,9 mM u kozice *Procambrarus clarkii*, 0,03-0,19 mM u *Orconectes limosus*, u *Carcinus maenas* 0,1-0,3 mM, u hlapa *Homarus americanus* 1,1-1,4 mM (Verri i sur., 2001). Brojni autori proučavali su utjecaj izloženosti zraku tijekom transporta i posljedične hipoksije na razinu glukoze u hemolimfi. Spicer i sur. (1990) su simulirali transport *Nephrops norvegicus* koji se

primjenjuje u komercijalne svrhe. Formirane su dvije eksperimentalne grupe i jedna kontrolna. Razina D-glukoze bila je značajno veća u obe grupe unutar 12 h u odnosu na kontrolnu grupu. Kod škampa držanih na ledu promjene se nisu pojavile sve do 6 h kada je razina glukoze narasla sa 0,67 na 0,88 mmol L⁻¹ i dosegla je maksimum od 1,38 mmol L⁻¹ nakon 24 h. Lorenzon i sur. (2007) su proučavali utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina glukoze i vraćeni su u bazene. Kontrolna grupa imala je vrijednosti glukoze 0,67 mmol L⁻¹, što je bilo značajno manje od grupe 1. 2,04 mmol L⁻¹ (15 °C) i grupe 2. 0,85 mmol L⁻¹ (6 °C). Razina glukoze bila je značajno veća, značajnost je veća u grupi koja je bila na većoj temperaturi. Povećala se i razina laktata. Paterson i sur. (1997) istraživali su hemolimfu *Panulirus ornatus* ulovljenog i izloženog hipoksiji tijekom transporta. Razina glukoze je lagano narasla i zatim pala, razina laktata je rasla što je potvrdilo istraživanje Ocampo-a i sur. 2003 godine koji su proučavali utjecaj hipoksije na razinu glukoze i laktata u hemolimfi *Panulirus interruptus*. Laktati su značajno rasli tijekom hipoksije. Glukoza je značajno narasla samo u grupi držanoj na višoj temperaturi. Jastog u našem istraživanju bio je izložen zraku 9 h, te je razina glukoze odraz stresa i hipoksije, a ovisna je o vremenu izloženosti stresu i temperaturi okoliša. Ovakav složeni mehanizam prilagodbe izloženosti zraku dovodi do individualnih razlika u razinama glukoze u hemolimfi koja je utvrđena u našem istraživanju.

Ukupni proteini jastoga u hemolimfi bili su $48,03 \pm 19,9$ g/L sa rasponom vrijednosti od min. 7,0 do 91,00 g/L. Prema Lorenzon-u i sur. (2007) razina ukupnih proteina hemolimfe značajno je viša u *Homarus americanus* koji su izloženi zraku i povišenoj temperaturi tijekom transporta na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina proteina. Kontrolna grupa imala je 26 mgL⁻¹ što je bilo značajno manje od grupe sa višom temperaturom transporta, koja je imala 60 mgL⁻¹ nakon 12 h izloženosti zraku. Znajući da hemocijanin u hemolimfi rakova predstavlja 80-95 % ukupnih proteina (Djangmah, 1970) možemo naše rezultate uspoređivati sa nalazom Durand-a i sur. (2000) koji su istraživali utjecaj izloženosti zraku na biokemijske parametre hemolimfe *Maje squinado* prosječne težine 680 g. Prije provedenog istraživanja napravili su biokemiju hemolimfe i navode da je hemocijanina bilo $43,3 \pm 1,6$ g/L što približno odgovara i našem istraživanju. Nešto veća razina proteina u našem istraživanju mogla bi biti posljedica pojačane sinteze hemocijanina stimulirane hipoksijom (Taylor i Anstiss, 1999). Jastozi u našem istraživanju bili su izloženi zraku 9 h pa je pretpostavka da je razina ukupnih proteina odraz izloženosti zraku.

Razina Ca u hemolimfi jastoga bila je $27,62 \pm 2,58$ mmol/L, razina Mg $63,06 \pm 18,73$ mmol/L. Lucu i sur. 2000 utvrdili su razinu Ca u serumu 12,5 mmol/L i Mg 34,2 mmol/L u jastoga *Palinurus elephas*. Brojni autori bavili su se istraživanjem utjecaja izloženosti zraku na promjene u biokemiji hemolimfe, te su Peterson i sur. (1997) istraživali hemolimfu *Panulirus ornatus* ulovljenog i izloženog hipoksiji tijekom transporta i utvrdili da razina Ca, K i Mg raste. Lorenzon i sur. (2007) proučavali su utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina kalcija. Kontrolna grupa imala $15,3 \pm 1,5$ mmolL⁻¹. Grupa 2. koja je transportirana na 6 °C nije pokazala značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu, dok je grupa koja je transportirana na 15°C ($19,37$ mmolL⁻¹) imala značajno veću razinu. Kalcij je korelirao sa laktatima. Autori pretpostavljaju da je izvor Ca²⁺ oklop i da se on mobilizirao zajedno sa karbonatima kao odgovor na acidozu hemolimfe.

Razina Cu u hemolimfi jastoga bila je $1,43 \pm 1,04$ mmol/L, Zn $73,88 \pm 44,97$ μmol/L. Faktorskom analizom utvrđeno je da je razina Cu i Zn vezana za TP i da vjerojatno pripada hemocijaninu kao što su to ustanovili Martin i sur. 1977 godine.

Razina LDH bila je $202,54 \pm 154,96$ U/L. LDH katalizira interkonverziju laktata i piruvata. Koristi se kao indikator promjena na jetri od parenhimatoznih lezija, oštećenja jetre do masnih degeneracija. Obzirom da pregledom literature nismo našli podatke kojima bi mogli uspoređivati naše nalaze dobiveni podatci bit će dobra baza za daljnja istraživanja.

U našem istraživanju razina CREA bila je $192,69 \pm 239,06$ μmol/L. Kreatinin ukazuje na promjene tkiva bubrega i njegove funkcije. S obzirom na izloženost zraku i posljedični nemogućnost izlučivanja nusprodukata metabolizma za očekivati je da je kreatinin veći od razine u normalnim životnim uvjetima. Razina GGT u hemolimfi jastoga bila je $2,88 \pm 2,20$ U/L. Vrijednosti GGT koriste se u procjeni promjena u jetri odnosno hepatopankreasa. On ukazuje na promjene jetre kao što su neoplazije. Prethodna istraživanja nisu imali mjerljive razine CREA i GGT, te podatci dobiveni ovim istraživanjem predstavljaju osnovu za buduća istraživanja. U našem istraživanju razina ALP bila je $99,13 \pm 55,52$ U/L, AST $122,14 \pm 128,13$ U/L. Prethodna istraživanja na rakovima utvrdila su da su im razine visoke u hladnim mjesecima i niske u toplim mjesecima (Dove i sur., 2005). Razine ALP i AST su indikator oštećenja jetre u kralježnjaka, dok im uloga kod rakova nije još utvrđena.

Grmlj *Eriphia verrucosa*

U našem istraživanju mužjaci su bili dugi $5,36 \pm 0,78$ cm, ženke $5,04 \pm 0,82$ cm. Prosječna težina cijelog uzorka bila je $103,12 \pm 78,28$ g. Prilikom testiranja spolnih razlika

utvrđeno je da mužjaci grmalja imaju značajno veću težinu od ženki grmalja. Težina grmalja pokazuje visoku povezanost sa dužinom i težinom glavopršnjaka ($r = 0,87$; $r = 0,90$). Grmalji u našem istraživanju bili su teži od prosječne težine u ulovu koja iznosi 50 g kako navodi Milišić (2008). Rezultat testiranja spolnih razlika potvrđuje nalaz Ulas i Aydin (2011) koji su istraživali grmalja i ustanovili da mužjaci grmalja imaju značajno veći dužinsko težinski odnos od ženki grmalja. Navedena osobina vjerojatno je odraz spolnog dvoličja.

Biokemijska mjerenja grmalja obuhvatila su CHOL, TRIG, BUN, CREA, GLU, TP, Ca, Mg, Cu, Zn CK, LDH, ALP, GGT, AST. Prilikom testiranja spolnih razlika utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima grmalja. Značajno se razlikuju u razinama BUN i Zn pri čemu mužjaci imaju značajno veću razinu BUN u hemolimfi i značajno manju razinu Zn u hemolimfi. Analizom povezanosti biometrijskih vrijednosti i biokemijskih vrijednosti cijelog uzorka grmalja utvrđeno je da je dužina glavopršnjaka grmalja slabo negativno povezana sa LDH, AST i BUN. Širina glavopršnjaka grmalja je slabo negativno povezana LDH, CK, BUN, umjereno negativno povezana sa AST. Težina grmalja je slabo negativno povezana sa TRIG. Analizom povezanosti biokemijskih parametara cijelog uzorka utvrđene je da je razina ALP vrlo jako pozitivno povezana sa razinom Mg, jako pozitivno povezana sa AST i umjereno pozitivno povezana sa TP, GGT, TRIG i BUN. Razina AST je jako pozitivno povezana sa LDH i ALP, umjereno pozitivno povezana sa CREA, TP, GGT, CHOL. S obzirom na brojne umjereno pozitivne povezanosti među parametrima biokemija, provedena je faktorska analiza na glavne komponente pri čemu su dobivena dva faktora. Faktor 1. objašnjava 61 % varijabiliteta izdvojenih 6 parametara biokemija grmalja. Najveće faktorsko zasićenje imaju AST i TP. Faktor 2. Faktor objašnjava 41 % varijabiliteta izdvojenih 10 biokemijskih parametara. Najveće faktorsko zasićenje imaju ALP i GGT.

Razina kolesterola grmalja bila je $0,28 \pm 0,13$ mmol/L, triglicerida $0,08 \pm 0,06$ mmol/L. Rezultate našeg istraživanja možemo usporediti sa istraživanjem Lorenzon-a i sur. (2007) koji su proučavali utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina kolesterola i triglicerida. Kontrolna grupa imala je 72 ± 43 mgL⁻¹ kolesterola što je bilo značajno manje od 1. grupe ($212,7$ mgL⁻¹) i 2. grupe (128 mgL⁻¹). grupe i kontrolne grupe do 12 h nakon povratka u bazen. U drugoj grupi razina kolesterola ostala je unutar razine kontrolne grupe kroz cijeli pokus. Mjerena je i razina triglicerida, kontrolna grupa imala je 13 mg/L što je bilo značajno manje od 1. grupe $217,2$ mg/L i 2. grupe $34,7$ mg/L. Razina triglicerida se razlikovala između spolova, ženke su imale veću razinu triglicerida u hemolimfi. U našem istraživanju razina

kolesterola i triglicerida bila je veća, razlog veće razine lipida u hemolimfi mogao bi biti povezan sa CHH hormonom koji osim što regulira razinu glukoze u hemolimfi utječe i na razinu lipida u hemolimfi. Mobilizacija lipida za vrijeme stresa omogućava dostatnu količinu energije.

U našem istraživanju razina uree bila je $1,47 \pm 0,53$ mmol/L. Durand i sur. 2000 godine istraživali su izlučivanje amonijaka u vodu i razinu amonijaka u hemolimfi Maje squinado. Uzorci hemolimfe uzeti su 24 h prije izloženosti zraku i nakon izloženost zraku. Istraživanje je napravljeno u dva perioda, ljeti i zimi. Amonijak je činio 91 % svog izlučenog dušika u vodu. Amonijak u hemolimfi prije izloženosti je bio ovisan o sezoni, te je razina amonijaka u zimskom uzorkovanju bila $45,7 \pm 5,1$ $\mu\text{mol L}^{-1}$ što je značajno niže od razine amonijaka u ljetnom uzorkovanju $69,4 \pm 3,9$ $\mu\text{mol L}^{-1}$. Nije bilo razlike među spolovima. Amonijak čini 91 % izlučenog dušika a urea i amini 6,7 % i 2,2 %. Neovisno o okolišu kojeg nastanjuju rakovi izlučuju dušične metaboličke produkte kao amonijak u okolinu putem škržnog epitela. Tijekom izloženosti zraku epitel škrge gubi mogućnost izlučivanja dušičnih metaboličkih produkata, te se oni akumuliraju u hemolimfi. Količina dušičnih metaboličkih produkata u hemolimfi u našem istraživanju odraz je izloženosti zraku.

Razina glukoze u hemolimfi grmalja bila je $1,73 \pm 1,43$ mmol/L. Raspon vrijednosti bio je od min. 0,06 do max. 7,40 mmol/L. Prethodna istraživanja utvrdila su da je razina glukoze u rakova manja od razine glukoze u kralježnjaka, pa je tako razina glukoze 0,9 mM u kozice *Procambrarus clarkii*, 0,03-0,19 mM u *Orconectes limosus*, 0,1-0,3 mM u *Carcinus maenas*, 1,1-1,4 mM u hlapa *Homarus americanus* (Verri i sur., 2001). Brojni autori proučavali su utjecaj izloženosti zraku tijekom transporta i posljedične hipoksije na razinu glukoze u hemolimfi. Spicer i sur. (1990) su simulirali transport *Nephrops norvegicus* koji se primjenjuje u komercijalne svrhe. Formirane su dvije eksperimentalne grupe i jedna kontrolna. Prva grupa smještena je u kutije i prekrivena papirom natopljenim morskom vodom, a druga je smještena u kutije sa ledom. Razina D-glukoze bila je značajno veća u obe grupe unutar 12 h u odnosu na kontrolnu grupu. Kod škampa držanih na ledu promjene se nisu pojavile sve do 6 h kada je razina glukoze narasla sa 0,67 na 0,88 mmol L⁻¹ i dosegla je maksimum od 1,38 mmol L⁻¹ nakon 24 h. Nakon 48 h razina je pala na 0,41 mmol L⁻¹ što je značajno ispod kontrolne grupe. Webster (1996) je proučavao *Carcinus pagarus* tijekom emerzije i ustanovio značajni porast CHH hormona u hemolimfi nakon 15 minuta. Mjerio je razinu glukoze, laktata u *Cancer pagarus* tijekom izloženosti zraku i ustanovio je da se već unutar 30 minuta izloženosti zraku javlja hiperlaktemija, nešto kasnije hiperglikemija. Autor je ukazao na značajnost te pojave kod mehanizma endokrine i metaboličke prilagodbe

Carcinus pagarus čestim izloženosti zraku u zoni plime i oseke. Jednako tako grmalj živi u zoni plime i oseke, te je naviknut na česte izloženosti zraku i pretpostavka je da ima razvijenu prilagodbu na takve uvjete života. Ovakav složeni mehanizam prilagodbe izloženosti zraku dovodi do individualnih razlika u razinama glukoze u hemolimfi koja je utvrđena u našem istraživanju.

Ukupni proteini grmalja u hemolimfi bili su $60,54 \pm 20,80$ g/L sa rasponom vrijednosti od min. 34,0 do 98,00 g/L. Lorenzon i sur. (2007) proučavali su utjecaj izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište. Nakon transporta mjerena im je razina proteina. Kontrolna grupa imala je 26 mgL^{-1} što je bilo značajno manje od grupe sa višom temperaturom transporta, koja je imala 60 mgL^{-1} nakon 12 h izloženosti zraku. Durand i sur. (2000) istraživali su utjecaj izloženosti zraku na biokemijske parametre hemolimfe *Maje squinado* prosječne težine 680 g. Prije provedenog istraživanja napravili su biokemiju hemolimfe i navode da je hemocijanina bilo $43,3 \pm 1,6$ g/L. Promjene razine proteina u hemolimfi mogu biti odraz pojačane sinteza hemocijanina u deseteronožnih rakova izloženih hipoksiji (Taylor i Anstiss, 1999; Hagerman, 1986). U našem istraživanju grmalji su bili izloženi hipoksiji, pa smatramo da je to utjecalo na razinu ukupnih proteina.

Razina Ca u hemolimfi grmalja bila je $25,22 \pm 13,34$ mmol/L, Mg $91,69 \pm 80,65$ mmol/L. Lucu i sur. 2000 utvrdili su razinu Ca u serumu 12,5 mmol/L i Mg 34,2 mmol/L u *Palinurus elephas*. Istraživanjem Paterson i sur. (1997) ustanovljeno je da razina Ca, K i Mg raste usljed transpotra i hipoksije, dok je istraživanjem Lorenzon i sur. (2007) nađeno da pod utjecajem izloženosti zraku i temperature tijekom transporta *Homarus americanus* na tržište raste razina kalcija. Kontrolna grupa imala $15,3 \text{ mmolL}^{-1}$. Grupa 2. koja je transportirana na 6 °C nije pokazala značajne razlike u odnosu na kontrolnu grupu dok je grupa koja je transportirana na 15 °C ($19,37 \text{ mmolL}^{-1}$) imala značajno veću razinu i ostala je značajno veća sve do 3 h nakon vraćanja u bazen. Kalcij je korelirao sa laktatima. Autori pretpostavljaju da je izvor Ca^{2+} oklop i da se on mobilizirao zajedno sa karbonatima kao odgovor na acidozu hemolimfe.

Razina Cu bila je $2,42 \pm 0,92$ mmol/L, Zn $58,54 \pm 26,66$ $\mu\text{mol/L}$. Utvrđena je slaba pozitivna povezanost Zn i Cu što se ne podudara sa nalazom vrlo visoke pozitivne povezanosti koja je utvrđena u našem istraživanju kod jastoga, a ujedno potvrđuje nalaz Martin-a i sur. (1977).

Razina LDH bila je $203,29 \pm 144,71$ U/L, uloga mu je da katalizira interkonverziju laktata i piruvata. Koristi se kao indikator promjena na jetri od parenhimatoznih lezija, oštećenja jetre do masnih degeneracija. Obzirom da ne možemo uspoređivati sa prethodnim

istraživanjima rezultate je moguće koristiti kao osnovu za buduća istraživanja. CREA $19,10 \pm 10,40 \mu\text{mol/L}$, GGT $12,69 \pm 20,44 \text{ U/L}$, Kreatinin ukazuje na promjene tkiva bubrega i njegove funkcije. S obzirom na izloženost zraku i posljedičnu nemogućnost izlučivanja nusprodukata metabolizma za očekivati je da je kreatinin veći od razine u normalnim životnim uvjetima. Prethodna istraživanja nisu imali mjerljive CREA i GGT. Razine ALP i AST bile su ALP $61,21 \pm 83,99 \text{ U/L}$, AST $229,47 \pm 185,59 \text{ U/L}$, indikatori su oštećenja jetre u kralježnjaka, dok im uloga kod rakova nije još utvrđena. Prethodna istraživanja na rakovima utvrdila su da su im razine visoke u hladnim mjesecima i niske u toplim mjesecima (Dove i sur., 2005).

Usporedbe između tri vrsta rakova u biokemijama hemolimfe

Za sve prikupljene biokemijske parametre hemolimfe provela se deskriptivna statistika (srednje vrijednosti, mjere disperzije) i analiza značajnosti razlika (t-testovi) za pojedini parametar između tri vrste rakova. Rakovica se značajno razlikuje od jastoga u razini LDH, CHOL, TRIG, BUN, GLU, CA, Mg, Cu i Zn, dok se od grmalja razlikuje u razini LDH, CK, TP, CHOL, TRIG, BUN, GLU, Ca, Cu, Zn. Jastog se značajno razlikuje od grmalja u CREA, TP, GGT, CHOL, TRIG, BUN, AST, GLU, Cu. Postavljanjem rezultata u relativni odnos, odnosno izražavanjem u Z-vrijednostima dobili smo vizualizaciju razlika među vrstama. Rakovice imaju više razine kolesterola, triglicerida, uree i glukoze, a niže razine bakra, kalcija, cinka i LDH u odnosu na grmalje i jastoge koji se u tim parametrima biokemije međusobno manje razlikuju. Grmalji i jastozi se međusobno najviše razlikuju u razinama proteina, bakra i magnezija.

Ovakva univarijantna analiza u kojoj smo parametre analizirali pojedinačno nije dala mogućnost za pravilno znanstveno zaključivanje o hemolimfi koja se sastoji od brojnih varijabli. Pored klasičnih statističkih metoda u analizi i interpretaciji ovisnosti mjerenih parametara triju vrsta rakova, u ovom radu su korištene i metode dubinske analize podataka (data mining) koje često koriste algoritme iz područja strojnog učenja. Ovim pristupom dobivaju se modeli koji koriste podatke na efikasniji način od standardnih statističkih metoda. Sumarnim rezultatima usporedbe algoritama dobiveni su najbolji rezultati za algoritam slučajnih šuma (89,63%) i algoritam stabla odlučivanja (86,31%). Prednost stabla odlučivanja je jednostavnost odnosno interpretabilnost. Stablo odlučivanja je jednostavno, kompaktno i interpretabilna reprezentacija modela podataka, istovremeno predstavlja i prediktivni model: može se koristiti kao algoritam u određivanju klase novih, nelabeliranih izmjerenih primjeraka, a kao prediktivni klasifikacijski model ima i određenu točnost.

7. ZAKLJUČCI

1. Svi istraživani rakovi bili su zdrave odrasle jedinke u međusvlačnom stadiju određenom prema Drach-u, (1939), koji je ciklus podijelio na pet stadija A-E i više podstadija. Aiken (1973) je modificirao podjelu i prilagodio je jastozima. Histološka pretraga organa (crijeva, hepatopankreasa, srca, škrge, muških i ženskih gonada) svih triju vrsta dekapodnih rakova nije ukazivala na promjene, već su tkiva odgovarala njihovom fiziološkom statusu.
2. Mjereni biometrijski parametri: težina, dužina tijela, dužina glavopršnjaka, širina glavopršnjaka međusobno su pozitivno korelirali u sve tri vrste rakova.
3. Prilikom testiranja t-testom, utvrđeno je da nema spolnih razlika u mjerenim biometrijskim parametrima rakovica, dok se jastog spolno razlikovao u dužini glavopršnjaka, grmalj u težini.
4. Prilikom testiranja t-testom utvrđeno je da ima spolnih razlika u biokemijskim vrijednostima kod rakovica, kod kojih su signifikantne razlike ($P < 0,05$) utvrđene samo u razinama Ca i Mg. Kod jastoga utvrđene su razlike u razinama BUN ($P < 0,05$), dok je kod grmalja ova razlika utvrđena u razini Zn i BUN-a ($P < 0,05$).
5. Na osnovu biokemijskih parametara utvrdili smo da se tri vrste rakova međusobno razlikuju. Rakovice se značajno razlikuju od jastoga ($P < 0,05$) u razini LDH, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Mg, Cu i Zn., dok se od grmalja razlikuju ($P < 0,05$) u razini LDH, CK, TP, CHOL, TRIG, BUN; GLU, Ca, Cu i Zn. Jastog se značajno razlikuje od grmalja ($P < 0,05$) u CREA, TP, GGT, CHOL, TRIG, BUN; AST, GLU i Cu.
6. Faktorska analiza na glavne komponente pokazala je da se biokemijski parametri dijele na dvije grupe.
7. Modeliranje podataka algoritmima strojnog učenja izvojilo je 6 biokemijskih parametara (TRIG, BUN, LDH, TP, GLU i CHOL) kao najvažnije za određivanje klasifikacijskih modela visoke točnosti, što je isto tako u skladu sa rezultatima faktorske analize.
8. Matematičkom metodom dubinske analize podataka koja koriste algoritme iz područja strojnog učenja uspješno se razdvojilo tri vrste rakova, točnost algoritma slučajnih šuma je 89,63 % i algoritma stabla odlučivanja 86,31 %.

8. CITIRANA LITERATURA

1. Abramowitz, A., Hisaw, F., Papandrea, D. (1944) The occurrence of a diabetogenic factor in the eyestalk of crustaceans. *Biol. Bull.* 86: 1-4
2. Adams, S. M. (1990) Biological indicators of stress in fish. *American Fisheries Symposium* 8. 191 pp
3. Ahearn, G., Mandal, P. K., Mandal, A. (2004) Organelle-specific zink ATP-ases in Crustacean ER and Lysosomal membranes. *International Congres Series* 1275: 114-125
4. Aiken, D. E. (1969a) Photoperiod, endocrinology and crustacean molt cycle. *Science*, 164: 149-155
5. Aiken, D. E. (1973) Proecdysis, setal developments, and molt prediction in the American lobster (*Homarus americanus*), *J. Fish. Res. Bord Can.* 30: 1337-1344.
6. Al-Mohanna, S. Y., Nott, J. A. (1985) The accumulation of metals in the hepatopancreas of the shrimp *Penaeus semisulcatus* De Haan (Crustacea: Decapoda) during the molt cycle. *Conference on Marine enviroment and Pollution, Kuwait*, 195-207
7. Arvy, L., Echali er, G., Gabe, M. (1954) Modifications de la gonade de *Carcinus maenas* L. apres ablation bilaterale de l' orga Y. *C.R. Acad. Sci. Paris Ser. D.* 239: 1853-1855
8. Balazs, G. H., Olbrich, S. E., Tumbleson, M. E. (1974) Serum constituents of the Malasian prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and pink shrimp (*Peneus marginatus*). *Aquaculture* 3: 147-157
9. Barker, P. L., Gibson, R. (1978) Observation on the structure of the mouthparts, histology of the alimentary tract, and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* (Foskal) (Decapoda, Portunidae) *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 32: 177-196
10. Battelle, B. A., Kravitz, E. A. (1978) Targets of octaapamine action in the lobster: Cyclic nucleotide changes and physiological effects in hemolymph, heart and exoskeleton muscle. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 438-448
11. Bauchau, A. G. (1981) Crustaceans. U: Ratcliffe, N. A. Rowley, A. F. *Invertebrate Blood Cells*, New York, Academic Press, 386-420
12. Beckage, N. E. (1996) Interaction of viruses with invertebrate cells. U Soderhall, K., Iwanga, S., Vasta, G. R. *New direction in Invertebrata Immunology*, SOS Publication, NEW York 375-399
13. Bell, A., Lightner, D. V. (1988) A handbook of normal penaeid shrimp histology. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, La
14. Belman, B. W. (1975) Some aspects of the circulatory physiology of the spiny lobster *Panuliris interruptus*. *Mar. Biol.* 29: 295-30
15. Boone, W. R., Schoffenich, E. (1979) Haemocyanin synthesis during the hypo-osmotic stress in the shore crab *Carcinus maenas* (L.) *Comp. Biochem. Physiol.* 63 B: 207-214
16. Bowen, R. E., Depledge, M. H. (2006) Rapid Assasment of Marine Pollution (RAMP). *Marine Pollution Bulletin* 53: 631-639
17. Breiman, L. (2001) Random forests. *Machine Learning Journal*, 45:5-32
18. Bockerhoff, H., Stewart, J. E. Tacreiter, W. (1967) Digestion of triglycerides by lobster. *Can. J. Biochem.* 45: 421-422
19. Burmester, T. (2004) Evolutionary history and diversity of arthropod hemocyanins. *Micron*, 35: 121-122

20. Castell, J. D., Covey, J. F. (1976) Dietary Lipid Requirements of Adult Lobsters, *Homarus americanus* (M.E.) J. Nutr. 106:1159-1165
21. Clark G., Batholomew J. W., Coalson R. E., Mohr J. L., Nordquist R. E., Schneider H. (1973) Staining Procedures-3th edition (Ed. by G. Clark), The Williams & Wilkins Company, Baltimor USA, 418 pp
22. Ceccaldi, H. J. (1989) Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. Advances in tropical aquaculture 9: 243-259
23. Ceccaldi, H. J. (1998b) A sinopsis of morfology and physiology of digestive system studied in France. Rev. Fish. Sci., 6: 13-19
24. Cerenius, L., Liang, Z., Duvic, B., Keyser, P. Hellman, U., Palva, E. T., Iwanaga, S., Soderhall, K. (1994) A β -D-glukan in Crustacean blood. Structure and biological activity of a fungal recognition protein. J. Biol. Chem. 269: 29462-29467
25. Cetinić, P., Dulčić, J., Božanić. (1997) Ocjena lova jastoga, *Palinurus elephas* (Fabricius, 1787), vršama u srednjem Jadranu, Ribarstvo, 55, (1), 1-9
26. Cetinić, P., Swiniarski, J., (1985) Alati i tehnika ribolova, Logos, Split
27. Chang, E. S., Keller, R., Chang, S. A. (1998) Quantification of crustacean hyperglycemic hormone by ELISA in hemolymph of the lobster, *Homarus americanus*, following various stresses. Gen. Comp. Endocrinol. 111: 359-366
28. Chang, J. S., Dirksen, H., Webster, S. G. (1999) A remarkable, precisely timed release of hyperglycemic hormone from endocrine cells in the gut is associated with ecdysis in the crab *Carcinus maenas*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 13103-13107
29. Chang, E. S., Chang, S. A., Beltz, B. S., Kravitz, E. A. (1999a) Crustacean hyperglycemic hormone in the lobster nervous system: Localization and release from cells in the subesophageal ganglion and thoracic second roots. J. Comp. Neurol. 414: 50-56
30. Chang, E. S., Chang, S. A., Keller, R., Reddy, P. S., Snyder, M.J., Spees, J. L. (1999) Quantification of Stress in Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone, stress Proteins, and gene Expression. Amer. Zool. 39: 487-495
31. Chang, E. S. (2005) Stressed –Out Lobsters: Crustacean Hyperglycemic Hormone and Stress Proteins. Integr. Comp. Biol., 45: 43-50
32. Chen, C., Greenawalt, J. W., Lehninger, A. L. (1974) Biochemical and ultrastructural aspect of Ca^{2+} transport by mitochondria of the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Cell. Biol. 61: 301-315
33. Cheng, W., Liu, C. H., Cheng, C. H., Chen, J. C. (2001) Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of *Macrobrachium rosenbergii* in relation to size and molt stage. Aquaculture 198: 387-400
34. Cheng, W., Liu, C. H., Yan, D. F., Chen, J. C. (2002) Hemolymph oxyhemocyanin, protein, osmolality and electrolyte levels of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* in relation to size and molt stage. Aquaculture 211: 325-339
35. Chittlebrought, R. G. (1974) Western rock lobster reared to maturity. Australian Journal of Marine and Freshwater Research, 25: 211-225
36. Chung, J. S., Webster, S. G. (2005) Dynamics of *in Vivo* release of Molt-Inhibiting Hormone and Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Shore Crab, *Carcinus maenas*. Endocrinology, 146: 5545-5551
37. Cobb, S. J., Phillips, B. F., (1980) The Biology and Management of Lobsters, Vol 1., Academic Press, INC. New York
38. Couch, J. A. (1983) Diseases caused by protozoa, u: The Biology of the Crustacea, Provenzano, A. J., Academic Press, New York
39. Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010) Stanica: Molekularni pristup, Medicinska naklada, Zagreb

40. Cromarty, S. I., Cobb, J. S., Kass-Simon, G. (1991) Behavioral analysis of the escape response in the juvenile lobster *Homarus americanus* over the molt cycle. J.exp. Biol. 158: 565-581
41. Čož-Rakovac R, Šmuc T, Topić Popović N, Strunjak-Perović I, Hacmanjek M, Jadan M. (2008 a). Novel methods for assesing fish blood biochemical data. J. Appl. Ichthyol. 24 1; 77-80.
42. Čož-Rakovac R, Strunjak-Perović I, Hacmanjek M, Topić Popović N, Lipej Z, Šoštarić B. (2005). Blood chemistry and histology properties of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the North Adriatic Sea. Vet. Res. Commun.;29(8): 677-87.
43. Čož-Rakovac R, Teskeredžić E, Strunjak-Perović I. (2002) Aminotransferase responses of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum) to seawater challenge test in relation to temperature and salinity. Period Biolog.;104 (2): 211-5
44. Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Topić Popović N., Hacmanjek M., Smuc T., Jadan M., Lipej Z., Homen Z. (2008 b): Cage culture effects on mullet *Mugil spp.* liver histology and blood chemistry profile. J. Fish Biol. 72: 2557-2569
45. Čož-Rakovac, R., Topić Popović, N., Smuc, T., Strunjak-Perović, I., Jadan, M. (2009) Classification accuracy of algorithms for blood chemistry data for three aquaculture-affected marine fish species, Fish Physiology and Biochemistry. 35, 641-647
46. Dall, W. (1974b) Indices of nutritional state in western rock lobster *Panulirus longipes* (Milne-Edwards) J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 15: 97-125
47. Dall, W., Moriarty, J. W. (1983) Functional aspects of nutrition and digestion. u: Bliss, D. E. The biology of Crustacea, 5:215-261, Academic Press
48. Dall, W., Smith, D. M. (1978) Water uptake at ecdysis in the western rock lobster, J. Exsp. Mar. Biol. Ecol. 35: 165-176
49. Dean, J. M., Vernberg, F. J. (1966) Hypothermia and blood of crabs. Comp. Biochem. Physiol. 17:19-22
50. De Kergariou, G., (1984) L'araignee de mer, *Maia squinado* H., biologie et exploitation. La peche Maritime, Oct. 20th, 575-583.
51. Djangmah, J. S. (1970) The effect of feding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas, and on blood protein o *Crangon vulgaris* (Fabricius). Comp. Bichem. Physiol. 32: 709-731
52. Drach, P. (1939). Mue et cycle d'intermue chez les Crustaces Decapodes. Ann. Inst. Oceanogr. (Paris) (N.S.) 19: 103-391.
53. Dove, A. D., Sokolowski, M. S., Bartlett, S. L., Bowster, P. R. (2005) Spatio-temporal variation in serum chemistry of the lobster, *Homarus americanus* Milne Edwards. Journal of Fish Diseases 28: 663-675
54. Dulčić, J., Cetinić, P., Kraljević, M. (1995) Neki biološki parametri jastoga, *Palinurus elephas* Fabr., s područja otoka Palagruže. Morsko ribarstvo, 47: 1-4
55. Durand, F., Devillers, N., Lallier, F. H., Regnault, M. (2000) Nitrogen excretion and changes in blood components during emersion of the subtidal spider crab *Maia squinado* (L). Comp. Biochem. Phisiol. A 127:259-271
56. Durliat, M. (1985) Clotting processes in crustacea decapoda. Biol. Rev. 60: 473-498
57. Durliat, M., Vranckx, R. (1976) Coagulation in the crayfish *Astacus leptodactylus*: attempts to identify a fibrinogen – like factor in the hemolymph. Biol. Bull. 151: 467-477
58. Durliat, M., Vranckx, R. (1983) Analysis of clotting defects in diseased lobsters: I. Alteration in blood parameters. Comp. Biochem. Physiol. 76A:95-101

59. Dzeroski, S.; Drumm, D., 2003: Using regression trees to identify the habitat preference of the sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) on Rarotonga, Cook Islands. *Ecol. Modell.* 170, 219–226.
60. Egusa, S., Ueda, T. (1972) A *Fusarium* sp. associated with black gill disease of the Karuma prawn, *Penaeus japonicus* Bate. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 38:1253-1260
61. Erkan, M., Balkis, H., Kurun, A., Tunali, Y. (2008) Seasonal variation in the ovary and testis of *Eriphia verrucosa* (Foskal, 1775) (Crustacea:Decapoda) from Kuraburun, Sw Black Sea. *Pakistan Journal of Zoology* 40:217-221
62. Erkan, M., Tunali, Y., Balkis, H., Oliveria, E. (2009) Morphology of testis and vas deferens in the Xanthoid crab, *Eriphia verrucosa* (Foskal, 1775) (Decapoda, Crustacea) *J. Crustac. Biol.* 29: 458-465
63. Erkan, M., Tunali, Y., Ekin, S., Kara, S. (2010) Histology of the androgenic gland in *Eriphia verrucosa* (Foskal, 1775) (Decapoda, Brachyura). *Turk. J. Zool.* 34:79-84
64. Felgenhauer, B. E. (1992) Internal Anatomy of the Decapoda: An Overview, *Microscopic anatomy of Invertebrates*, 10: 45-75
65. Fingerman, M. (1992) Glands and secretion. U: Harrison, F. W., *Microscopic anatomy of invertebrata*, 10, Harrison, W., Humes, A.G. *Decapoda Crustacea* 345-394, John Wiley & Sons, New York
66. Fisher, W. S., Nilson, E. H., Shleser, R. A. (1975) Effect of the fungus *Haliphthoros milfordensis* on the juvenile stages of the American lobster *Homarus americanus*. *J. Invertebr. Pathol.* 26: 41-45
67. Flores, A. A. V., Paula, J. (2001) Intertidal distribution and species composition of brachyuran crabs at two rocky shores in central Portugal. *Hydrobiologia* 449:171-177
68. Floreto, E. A.T., Prince, D. L., Brown, P. B., Bayer, R. C. (2000) The biochemical profiles of shell-diseased American lobsters, *Homarus americanus* Milne Edwards. *Aquaculture* 188:247-262
69. Florkin, M. (1960). Blood chemistry. u: „The Physiology of Crustacea“ (T. H. Waterman) Vol.1, pp. 141-160. Academic press, New York
70. Forest, J., Vaupel Klein, J. C. (2006) The Crustacea, Treatise on Zoology- Anatomy, Taxonomy, Biology. Brill, Boston,
71. Frederich, M., DeWachter, B., Sartoris, F.J., Portner, H.O. (2000) Cold tolerance and the Regulation of Cardiac Performance and Hemolymph Distribution in *Maja squinado* (Crustacea:Decapoda)
72. Fuller, G. M., Doolittle, R. F. (1971) Studies of invertebrate fibrinogen. I Purification and characterization of fibrinogen from the spiny lobster. *Biochemistry*, 10: 1305-1311
73. Gamulin, T. (1995): Contribution a la connaissance de l'ecologie de la lagoste (*Palinurus elephas*) dans l'Adriatique. *Acta Adriatica.*, 7, 20 pp.
74. Garcia, T. M. and Silva, J. R. F. (2006) Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 49, no. 1, p. 339-345.
75. Geoffrey, E. (1709) Observations sur les ecrevisses de riviere. *Mem. Acad. Sci.*, 1708/9:309-314
76. George, C. J., Nichols, J. (1948) A study of the blood of some Crustacea. *J. Morfol.* 83: 425-443
77. Gibson, O., Barker, P. L. (1979) The decapod hepatopancreas. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 17: 285-346
78. Ghidalia, W., Vendrely, R., Montmory, C., Coirault, Y., Brouard, M. O. (1981) Coagulation in Decapod Crustacea. *J. Comp. Physiol.* 142: 473-478

79. Ghiretti-Magaldi, A., Milanesi, C., Tognon, G. (1977) Hemopoiesis in crustacea decapoda: origin and evolution of hemocytes and cyanocytes of *Carcinus maenas*. Cell Differ., 6:167-186
80. Green, J., (1961) A Biology of Crustacea, H. F. & Witerby LTD, London, 180 pp.
81. Greenaway, P. (1972) Calcium regulation in the freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes* (Lereboullet). I. Calcium balance in the intermolt animal. J. Exp. Biol. 57: 471-487
82. Greenaway, P. (1985) Calcium balance and moulting in the crustacea. Biol. Rev. 60:425-454
83. Grubišić, F. (1954): Jastog i hlap. Mala ribarska biblioteka, knjiga 1, Rijeka, 39 pp.
84. Grubišić, F. (1982): Ribe, rakovi i školjke Jadrana. LIBURNIJA-Naprijed, Rijeka-Zagreb, 239 pp.
85. Goni, R., Quetglas, A., Renones, O.(2001) Diet of the spiny lobster *Palinurus elephas* (Decapoda: Palinuridea) from the Columbretes Islands Marine Reserve (north-western Mediterranean) Journal of the Marine Biological Association of the UK, 81:2:347-348
86. Hagerman, L. (1983) Haemocyanin concentration of juvenile lobster (*Homarus gammarus*) in relation in molting cycle and feeding conditions. Mar. Biol. 77:11-17
87. Hagerman, L.(1986) Haemocyanin concentration in the shrimp *Crangon crangon* (L) after exposure to moderate hypoxia. Comp.Biochem. Physiol. 85A:721-724
88. Hall, M. R., Ham, E. H. (1998) The effect of Different Types of Stress on Blood Glucose in the Giant Tiger. Journal of the World Aquaculture Society. 29: 290-299
89. Hardy, B. A. (1892) The Blood-Corpuscles of the Crustacea, together with a suggestion as to the origin of the Crustacean fibrin ferment. J. Physiol. 13:165-190
90. Harrison, K. E. (1990) the role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic development of decapod crustaceans: a review. J. Shellfish Res. 9: 1-28
91. Hepper, B. T. (1977) Changes in blood serum protein levels during the moulting cycle of the lobster *Homarus gammarus* (L). J. Exsp. Mar. Biol. Ecol. 28, 293-296
92. Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galvan, T., Gomez-Jimenez, S., Portillo-Clark, G., Vargas-Albores, F (2003) In the spiny lobster (*Panulirus interruptus*) the prophenoloxidase is located in plasma not in haemocytes. Fish & Shellfish Immunology, 14:105-114
93. Hoppkin, S. P., Nott, J. A. (1979) Some observations on concentrically structured, intracellular granules in the hepatopancreas of the shore crab, *Carcinus maenas* (L.) J. Mar. Biol. Ass U.K. 59:867-877
94. Hose, J. E., Martin, G. G., Nguyen, V. A., Lucas, J., Rosestein, T. (1987) Cytochemical features of shrimp hemocytes. Biol. Bull. 173: 178-187
95. Hose, J. E., Martin, G. G., Gerard, A. S. (1990) A Decapod hemocyte Classification Scheme Integrating Morphology, Cytochemistry, and Function. Biol. Bull. 178:33-45
96. Hose, J. E, Martin, G. G. (1989) Defense function of granulocytes in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis* Burkenroad 1938. J. Invertebr. Path. 53: 335-346
97. Hunter, E., Scackley, S. E., Bennett, D. B. (1996) Recent studies on the crawfish *Palinurus elephas* in South wales and Cornwall. Journal of the Marine Biological Association. 76: 963-983
98. Huxley, Th. H. (1880) L'ecrevisse. Introduction a la Zoologie. 1-260
99. Jacobs, W. (1928) Untersuchungen uber die Cytologie der Sekretbildung in der Mitteldarmdruse von *Astacus leptodactylus*. Z. Zellforsch. Microsk. Anat. 8: 1-62
100. Jardas, I. (1988): Veliki rakovi Jadrana, Morsko ribarstvo, 2,52-56
101. Johnson, P. T. (1983) Diseases caused by viruses, rickettsiae, bacteria, and fungi. u: Provanzano, A. J. The biology of crustacea: pathology, Academic Press, New York, 1-78

102. Johnson, P. T. (1976) A herpeslike virus from the blue crab, *Callinectes sapidus*. J. Invertebr. Pathol. 27:419-420
103. Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyaalucksana, K. Soderhal, K. (2000) Crustacean haemocyte and haemato-poiesis. Aquaculture, 191:45-52
104. Jussila, J., McBride, S., Jago, J., Evans, L. H. (2001) Hemolymph clotting time as an indicator of stress in western rock lobster (*Panulirus cygnus* George) Aquaculture 199:185-193
105. Kallen, J. L., Abrahamse, S. L., Van Herp, F. (1990) Circadian Rhythmicity of the Crustacean Hyperglycemic Hormone (CHH) in the Hemolymph of the Crayfish. Biol. Bull. 179: 351-357
106. Karlson, P. (1988): Biokemija. Školska knjiga, Zagreb: 396 str.
107. Kittaka, J. (2000) Culture of larval spiny lobster, u: Phillips, B.F. Kittaka J., Spiny lobsters: Fisheries and culture, drugo izdanje, Fishing News Books, Blackwell Science, Gray Publishing, Kent, pp. 508-532
108. Kooiman, P. (1964) The occurrence of carbohydrases in digestive juice and in hepatopancreas of *Astacus fluviatilis* Fabr. And *Homarus vulgaris* M.- E. J. Cell. Comp. Physiol 63: 197-201
109. Kopačak, P., Hall, M., Soderhall, K. (1993) Characterization of the clotting protein, isolated from plasma of the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus*. Eur. J. Biochem. 213: 591-597
110. Laxmilatha, P. Laxminarayana, A. (2004) Haemolymph proteins of the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) II Moulting stages and ovarian development. Indian. J. Fish. 51:1-9
111. Le Foll, D. (1993) Biologie et exploitation de l'araignee de mer *Maja squinado* (Herbst) en manche ouest PhD thesis. Universite de Bretagne Occidentale.
112. Li, C., Shields, J. D., Ratzlaff, R. E., Butler, M. J. (2008) Pathology and hematology of the Caribbean spiny lobster experimentally infected with *Panulirus argus* virus 1 (PaV1). Virus Research, 132: 104-113
113. Liaw, A., Wiener, M. (2002). Classification and Regression by random Forest. R News 2(3), 18--22.
114. Lightner, D. V., Lewis, D. H. (1975) A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Mar. Fish. Rev.37: 25-28
115. Lightner, D. V., Fontaine, C. T. (1975) A mycosis of the American lobster, *Homarus americanus*, caused by *Fusarium* sp. J. Invertebr. Pathol. 25:239-245
116. Lignot, J. H., Spanings-Pierrot, S., Charmantier, G. (2000) Osmoregulatory capacity as a tool in monitoring the physiological condition and the effect of stress in crustaceans. Aquaculture 191: 209-245
117. Lima, A. V. P., Gesteira, T. C. V. (2008) Morphology of the Male Gonads of the Spiny Lobster *Panulirus laeviscauda* (Latreille, 1817). Braz. arch. biol. technol, 51:701-709
118. Lorenzon, S. (2005) Hyperglycemic stress response in Crustacea, Invertebrate Survival Journal, 2,2,132-141
119. Lorenzon, S., Giulianini, P. G., Martinis, M., Ferrero, E. A. (2007) Stress effect of different temperatures and air exposure during transport on physiological profiles in the American lobster *Homarus americanus*. Comp. Biochem. Physiol. A 147: 94-102
120. Lovett, D. L., Watts, S. A. (1995) Changes in polyamin levels in response to acclimation salinity in gills of the blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun. Comp. Biochem. Physiol. 110: 115-119
121. Lucu, Č., Towle, D. (2003) Na, K ATPase in gills of aquatic crustacean. Comp. Biochem. Physiol. 135A: 195-217.

122. Lucu, Č., Devescovi, M., Skaramuca, B., Kožul, V. (2000) Gill Na, K-ATPase in the spiny lobster *Palinurus elephas* and other marine osmoconformers. Adaptiveness of enzymes from osmoconformity to hyperregulation. J. Exp. Mar. Biol. and Ecol. 246: 163-178
123. Lynch, M. P., Webb, K. L. (1973) Variation in serum, constituents of the blue crab, *Callinectes sapidus*: Total serum protein. Comp. Biochem. Physiol. A: Physiology. 44: 1237-1249
124. Marco, H. G., Brandt, W., Gade, G. (1998). Elucidation of the aminoacid sequence of a crustacean hyperglycaemic hormone from the spiny lobster, *Jasus lalandii*. Biochemical and Biophysical Communications 248: 578-583.
125. Marin, J. (1986): Jastog (*Palinurus elephas*)- Biologija i iskorištavanje. Morsko ribarstvo 4, 143-147
126. Martin, J. L. M. (1973) Etude du metabolisme de l'eau et de l'azote dans l'hépatopancréas et l'ovaire de *Carcinus meanas* L.. J. Fish. Res. Bd Can., 30:41-44
127. Martin, J. L. M., Van Wormhoudt, A., Ceccaldi, H. J. (1977) Zink-Hemocyanin binding in the Hemolymph of *Carcinus Maenas* (Crustacea, Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 58A: 193-195
128. Martin, G. G., Graves, B. L. (1983) Fine structure and classification of shrimp hemocytes. J. Morphol. 185: 339-348)
129. Martin, G. G., Hose, J. E., Kim, J. J. (1987) Structure of hematopoietic nodules in the ridgeback prawn *Sicyonia ingentis*: light and electron microscopic observations. J. Morphol. 192:193-204
130. Martin, G. G., Hose, J. E., Omori, S., Chong, C., Hoodbhoy, T., McKrell, N. (1991) Localization and roles of coagulogen and transglutaminase in hemolymph coagulation in decapod crustaceans. Comp. Biochem. Physiol. 100B: 517-522
131. Matozzo, V., Marin, M. G. (2010) First cytochemical study of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). European Journal of Histochemistry 54: 44-49
132. Mastorillo, S., Lek, S., Dauba, F., Belaud, A. (1997) The use of artificial neural networks to predict the presence of small-bodied fish in a river. Freshw. Biol. 38, 237-246
133. Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. (1999) Beskralježnjaci: biologija viših avvertebrata, Školska knjiga
134. Maynard, D. M., Dando, M. R. (1974) The structure of the stomatogastric neuromuscular system in *Callinectes sapidus*, *Homarus americanus* and *Palinurus argus* (Crustacea, Decapoda). Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. 268: 161-220
135. Maynard, D. M. (1960) Circulation and heart function. u: Waterman, T.H. „The Physiology of Crustacea“ 161-226, Academic Press, New York
136. Maxwell, K. E., Matthews, T. R., Bertelsen, R. D., Derby, C. D. (2009). Using age to evaluate reproduction in Caribbean spiny lobster, *Panulirus argus*, in the Florida Keys and Dry Tortugas, United States. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 43: 139-149.
137. McMahon, B. R. (2001a) Control of cardio-vascular function and its evolution in Crustacea. J. Exp. Biol. 204: 923-932
138. McMahon, B. R., Wilkens, J. L., Smith, P. J. S. (1997) Invertebrate circulatory systems. U: Danzler, W.H. Handbook of Physiology, Section 13, Comparative physiology: 931-1008, American Physiological Society, Bethesda, Oxford, New York
139. McMahon, B. R., Wilkens, J. L. (1983) Ventilation, perfusion and oxygen uptake. u: Bliss, D. E., The Biology of Crustacea, Mantel, L. H., Internal anatomy and physiological regulation, 289-372, Academic Press, New York

140. McDonald, D. G. (1992): Chemical properties of blood. u: Fish Physiology (W.S. Hoar, D.J. Randall and A.P. Farrell, Eds.). Academic Press San Diego: 55-133)
141. McGaw, I. J. (2005) The decapod crustacean circulatory system: a case that is neither open nor closed. *Microscopy and Microanalysis*, 11:18-36
142. McQueen, R. J., Garner, S. R., Neveill-Manning, C. G., Whitten, I. H., (1995) Applying machine learning to agricultural data. *Comput. Electron. Agric.* 12, 275–293.
143. Meyran, J.C., Sellem, E., Graf, F. (1993) Variation in haemolymph ionized calcium concentrations in the crustacean *Orchestia cavimana* during a moult cycle. *Journal of Insect Physiology* 39: 413-417
144. Milišić, N. (2008), Jadranski rakovi desetonožci, Marjan tisak, Split
145. Mocquard, F. (1883). Recherches anatomiques sur l' estomac des Crustaces Podophthalmaires. *Annls. Sci. nat., (Zool.)* 16:1-311
146. Mohankumar, K., Ramasamy, P., (2006a) Activities of membrane bound phosphates, transaminases and mitochondrial enzymes in white spot syndrome virus infected tissues of *Fenneropenaeus indicus*. *Virus Res.* 118:130-135
147. Morris, S., Oliver, S. (1999) Circulatory, respiratory and metabolic response to emersion and low temperature of *Jasus edwardsii*. Simulation studies of commercial shipping methods. *Comp. Biochem. Physiol.* 122:299-308
148. Moulins, M., Vedl, J. P. (1977) Programmation centrale de l'activite motrice rythmique du tube digestif anterieur chez les Crustaces Decapodes. *J. Physiol.* 73: 471-510
149. Murray, R. K., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennely, P. J., Rodwell, V. W., Weil, P. A. (2011) Harperova ilustrirana biokemija. 28 izdanje, Medicinska naklada, Zagreb
150. Mykles, D. L. (1980) The mechanism of fluid absorption at ecdysis in the American lobster *Homarus americanus*. *J. exp. Biol.* 84: 89-101
151. Mykles, D. L. (2010) Ecdysteroid metabolism in crustaceans. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* Doi:10.1016/j.jsbmb.2010.09.001
152. Neumann, V. (1998) A review of the *Maja squinado* (Crustacea; Decapoda: Brahyura) species-complex with a key to the eastern Atlantic and Mediterranean species of the genus, *J. Nat. Hist.* 32: 1667-1684
153. Ngoc-Ho, Nguyen (1984) The functional anatomy of the foregut of *Porcellana platycheles* and a comparison with *Galathea squamifera* and *Upogebia deltaura* (Crustacea: Decapoda) *J. Zoo. Lond.* 203: 511-535
154. Ocampo, L., Patino, D., Ramirez, C. (2003) Effect of temperature on hemolymph lactate and glucose concentration in spiny lobster *Panulirus interruptus* during progressive hypoxia. *J. Exp. M. Biol. and Ecology* 296:71-77
155. O'Connor, J. D., Gilbert, L. I. (1968) Aspect of lipid metabolism in crustacean. *An. Zool.* 8, 529-539
156. Ogura, K. (1959) Midgut gland cells accumulating iron and copper in the crayfish, *Procambrus clarkii*. *Annot. Zool. Japon.* 32:133-142
157. Passano, L. M. (1960) Molting and its control. U: „Physiology of Crustacea“ (T. H. Waterman) Vol. 1, pp.473-536. Academic Press, New York
158. Paquet, F. (1991) Etude experimentale des biocinetiques de l' americium-241 chez homard *Homarus gammarus*. Analyse des mecanismes d'accumulation et de detoxication au niveau subcellulaire 1-402
159. Peterson, B. D., Stephen, G. G, Smith, R. (1997) Haemolymph chemistry of tropical rock lobster (*Panulirus ornatus*) brought onto a mother ship from a catching dinghy in Torres Strait. *Marine and Freshwater Research* 48. 835-838

160. Pequeux, A. (1995) Osmotic regulation in crustaceans. *J. Crus. Biol.* 15:1-60
161. Pequeux, A., Dandrifosse, G., Loret, S., Schoffeniels, E. (2006) Osmoregulation: Morfological, Physiological, Biochemical, Hormonal, and Developmental aspect. u: Forest, J., Vaupel Klein, J. C. *The Crustacea, Treatise on Zoology- Anatomy, Taxonomy, Biology.* Brill, Boston,
162. Pequeux, A., Gilles, R., Marshal, W. S. (1988) NaCl transport in gills and related structures. u: Greger, R. *Advances in comparative and enviromental physiology* 1:1-73
163. Phillips, B. F., Campbell, N. A., Rea, W. A. (1977) Laboratory growth of early juveniles of the western rock lobster, *Panulirus longipeds cygnes*. *Mar. Biol.* 39., 31-39
164. Phillips, B. F (2005) Lobsters: the search for knowledge continues (and why we need to know) *N. Z. J. Mar. Freshwa. Res.* 39:231-241
165. Poynton M. R., Choi B. M., Kim Y., M., Park I. S., Noh G., J., Hong S., O., Boo Y. K., Kang S. H. (2009): Machine Learning Methods Applied to Pharmacokinetic Modelling of Remifentanil in Healthy Volunteers: a Multi-method Comparison. *Journal of International Medical Research*, 37 (6): 1680-1691
166. Pravilnik o obavljanju gospodarskog ribolova, N.N. 083/2000
167. Quinlan, J. R. (1992) *C4.5: Programs for Machine Learning* (Morgan Kaufmann, San Mateo CA
168. Rabid, T., Tietz, A., Khayat, M., Boehm, E., Michelis, R., Libzens, E. (1999) Lipid accumulation in the ovaries of a marine shrimp *Penaeus semisulcatus*. *J. Exp. Biol.* 202: 1819-1829
169. Radford, C. A., Marsden, I. D., Davidson, W., Taylor, H. H. (2005) Haemolymph glucose concentration of juvenile rock lobsters, *Jasus edwardsii*, feeding on different carbohydrate diets. *Comp. Biochem. Physiol., A* 140: 241-249
170. Ratcliffe, N. A., Rowley, A. F. (1979) Role of hemocytes in defense against biological agents. U *Insect Hemocytes-Development Forms, Functions and Techniques.* Cambrige Univ. Press, Cambrige, 331-414
171. Ravindranath, M. H. (1980) Haemocytes in haemolymph coagulation of arthropods *Biol. Rev.* 55: 139-170
172. R Development Core Team (2007). *R: A language and environment for statistical computing.* R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
173. Reiber, C. L., McGaw, J. I. (2009) A Review of the „Open“ and „Closed“ Circulatory Systems: New Terminology for Complex Invertebrate Circulatory Systems in Light of Current Findings. *International Journal of Zoology*, 8
174. Rice, P. R., Armitrage, K. B. (1974) The influence of photoperiod on processes associated with molting and reproduction in the crayfish *Orconectes nais* (Faxon). *Comp. Biochem. Physiol. A* 47: 243-259
175. Richard, P., Ceccaldi, H. J. (1975) Variation des acides amines libres du muscle et de hepatopancreas de *Penaeus kerathurus* (Foskal) en fonction de la dessalure. *Proc. 9 th Europ. Mar. Biol. Symp.* 451-462
176. Ridgway, I. D., Taylor, A. C., Atkinson, R. J. A., Stentiford, G. D., Chang, E. S., Chang, S. A., Neil, D. M. (2006) Morbidity and mortality in Norway lobster, *Nephrops norvegicus*: physiological, immunological and pathological effects of aerial exposure. *J. Exp. M. Biol. and Ecology* 328: 251-264
177. Riegel, J. A. (1970) A new model of transepithelial fluid movement with detailed application to the fluid movement in the crayfish antennal gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 36:403-410

178. Rodgers-Talbert, R. (1948) The fungus *Lagenidium callinectes* Couch (1942) on eggs of the blue crab in Chesapeake Bay. Biol. Bull. (Woods Hole Mass.) 95:214-228
179. Saint-Marie, G., Sainte-Marie, B., Seigny, J-M. (2000) Ejaculate-storage patterns and the site of fertilization in female snow crabs (*Chionoecetes opilio*: Brachyura, Majidae). Can. J. Zool. 78:1902-1917
180. Sahul Hameed, A. S. Anilkumar, M., Raj, M. J. Kunthala jayaraman, M. L. (1998) Studies on the pathogenicity of systemic ectodermal and mesodermal baculovirus (SEMBV) and its detection in shrimps by immunological methods. Aquaculture 160:31-45
181. Sampedro, M. P., Gonzales-Gurriaran, E., Freire, J., Muino, R. (1999) Morphometry and Sexual Maturity in the Spider Crab *Maja squinado* (Decapoda: Majidae) Journal of Crustacean Biology, Vol. 19, 3, 578-592
182. Sampedro, M. P., Gonzales-Gurriaran, E. (2004) Aggregating behaviour of the spider crab *Maja squinado* in shallow waters. Journal of Crustacean Biology 24:168-177
183. Santos, E. A., Keller, R. (1993a) Effects of exposure to atmospheric air on blood glucose and lactate concentration in two crustacean species: a role of the crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) Comp. Biochem. Physiol. 106A: 343-347
184. Santos, E. A., Nery, I. E. M., Keller, R., Goncalves, A. A. (1997) Evidence for the involvement of the crustacean hyperglycemic hormone in the regulation of lipid metabolism. Physiol. Zool. 70:415-420
185. Santos, E. A., Keller, R., Rodriguez, E., Lopez, L. (2001) Effects of serotonin and fluoxetine on blood glucose regulation in two decapod species. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 34:75-80
186. Silva, A. C., Silva, I. C., Hawkins, S. J., Boaventura, D. M., Thompson, R. C. (2010) Cheliped morphological variation of the intertidal crab *Eriphia verrucosa* across shores of differing exposure to wave action. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 391: 84-91
187. Sinderman, C. (1971) Internal defenses of Crustacea. Fishery bulletin, 69: 455-489
188. Slavica, A., Janicki, Z., Mihelić, D., Gjurčević-Kantura, V., Bačić, G., (1998) Aquaculture in marine species of the Decapod crustaceans (Crustacea, Decapoda) 5th International veterinary Congress. Rovinj, 13-17. 10 1998. 343-348
189. Slavica, A., Janicki, Z., Konjević, D., Severin, K. (2004) Dinamika rasta nedoraslih jastoga (*Palinurus elephas*) u kontroliranim uvjetima. Meso, VI, 4
190. Shields, J. D., Scanlon, C., Volety, A. (2003) Aspects of the patho-physiology of blue crabs, *Callinectes sapidus*, infected with the parasitic dinoflagellate *Hematodinium perezii*. Bull. Mar. Sci. 72: 519-535
191. Shields, J. D., Behringer, D. C. (2004) A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. Dis. Aquat. Org. 59: 109-118
192. Shields, J. D., Stephens, F. J., Jones, B. (2006) Pathogens, Parasites and Other Symbionts. U: Lobster Biology, Management and Fisheries. Phillips, B. Blackwell Publishing
193. Shields, J. D., Wood, F. E. I. (1993) The impact of parasites on the reproduction and fecundity of the blue sand crab *Portunas pelagicus* from Moreton Bay, Australia, Mar. Ecol. Prog. Ser. 92: 159-170
194. Soderhall, K. (1982) Prophenoloxidase activating system and melanization- a recognition mechanism of arthropods? A review. Dev. Comp. Immunol 6:601-611

195. Soderhall, K. (1999) Invertebrate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 23:263-266
196. Spanings-Pierrot, C. D., Soye, F., Van Herp, M., Gompel, G., Skaret, E., Grousset, E., Charmantier, G. (2000) Involvement of crustacean hyperglycemic hormone in the control of gillion transport in the crab *Pachygrapsus marmoratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 119:340-350
197. Speed, S. R., Baldwin, J., Wong, R. J., Wells, R. M. G. (2001) Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster *Jasus edwardsii*, and responses to emersion during simulated live transport. *Comp. Biochem. Physiol. B* 128: 435-444
198. Spicer, J. I., Hill, A. D., Taylor, A.C., Strang, R. H. C. (1990) Effect of aeral exposure on concentrations of selected metabolites in blood of the Norwegian lobster *Nephrops norvegicus* (Crustacea: Nephropidae). *Marine Biology.* 105:129-135
199. Spindler-Barth, M. (1976) Changes in the chemical composition of the common shore crab, *Carcinus maenas*, during the molting cycle. *J. Comp. Physiol.* 105, 197-205
200. Steinacker, A. (1978) The anatomy of the decapod crustacean auxiliary heart. *Biol. Bull. Woods Hole*, 154: 497-507
201. Stewart, J. E., Cornick, J. W., Spears, D. I., McLeese, D.W. (1966a) Incidence of *Gaffkya homari* in natural lobster *Homarus americanus* populations of the Atlantic region of Canada. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 23: 1325-1330
202. Stewart, J. E., Li, M. F. (1969) A study of lobster (*Homarus americanus*) ecology using serum protein concentration as an index. *Can. J. Zool.* 47: 21-28
203. Stewart, J. E., Cornick, J. W., Foley, M. F., Li, M. F., Bishop, C. M. (1967) Muscle weight relationship to serum proteins, hemocytes and hepatopancreas in the lobster, *Homarus americanus*. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26: 2503-2510
204. Stewart, J. E., Arie, B., Zwicker, B., Dingle, J. R. (1969) Gaffkemia, a bacterial disease of the lobster, *Homarus americanus*: effect of the pathogen, *Gaffkya homari*, on the physiology of the host. *Can. J. Microbiol.* 15:925-932
205. Stewart, J. E., Cornick, J. W. (1972) Effects of *Gaffkya homari* on glucose, total carbohydrates, and lactic acid of the hemolymph of the lobster (*Homarus americanus*) *Can. J. Microbiol.* 18, 1511-1513
206. Subramoniam, T. (2000) Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comp. Biochem. Physiol. C* 125: 135-156
207. Števcic, Z., (1968b). L' araignee de mer et le substrat. Rapport de Commitee internationale de Mer Mediterranee, 19(2), 151-153
208. Števcic, Z., (1971) Laboratory observation on the aggregations of the spiny spider crab (*Maja squinado* Herbst). *Animal Behavior*, 19,1, 18-25
209. Štraus, B. (1988) Medicinska biokemija. Jugoslavenska medicinska naklada, JUMENA, Zagreb: 1058str
210. Tait, J. (1911) Types of Crustacean Blood Coagulation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom.* 9:191-198
211. Takahashi, T., Morishita, T., Tachino, S. (1964) Studies on the digestive enzymes of the spiny lobster, *Panulirus japonicus* (V. Siebold) *Rep. Fac. Fish. Prefec. Univ. Mie* 5: 127-135
212. Taylor, H. H., Anstiss, J. M. (1999) Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. *Marine and Freshwater Research* 50: 907-931
213. Telford, M. (1968) Changes in blood sugar composition during the molt cycle of the lobster *Homarus americanus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 26:917-926
214. Teshima, S., Kanazawa, A. (1980) Transport of Dietary Lipids and Role of Serum Lipoproteins in the Prawn. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* 46:51-55

215. Treer, T., Tucak, Z., (1991) Agrarna zoologija, Školska knjiga, Zagreb
216. Todd, R. B. (1836) The Cyclopaedia of Anatomy and Physiology, Vol. 1, Sherwood, Gilbert, and Piper, London
217. Topić Popović N., Srebočan E., Čož-Rakovac R., Hacmanjek M., Strunjak-Perović I., Jadan M. (2008): Blood biochemistry of captive Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* farmed in the Adriatic Sea. Journal of Applied Ichthyology 24: 614-616.
218. Torres, G., Charmantier-Daures, M., Chifflet, S., Anger, K. (2007) Effect of long-term exposure to different salinities on the location and activity of Na⁺-K⁺-ATPase in the gills of juvenile mitten crab, *Eriocheir sinensis*. Comp. Biochem. Physiol. A 147:460-465
219. Travis, D. F. (1954) The molting cycle of the spiny lobster *Palinurus argus* Latreille. I. Molting and growth in the laboratory-maintained individuals. Biol. Bull 107: 433-450
220. Travis, D. F. (1955 a) The molting cycle of the spiny lobster *Palinurus argus* Latreille. II. Pre-ecdysal histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol. Bull 108: 88-112
221. Travis, D. F. (1955 b) The molting cycle of the spiny lobster *Palinurus argus* Latreille. III. Physiological changes which occur in the blood and urine during the normal molting cycle. Biol. Bull. (Woods Hole, Mass) 109: 484-503
222. Travis, D. F. (1957) The molting cycle of the spiny lobster *Palinurus argus* Latreille. IV. Post-ecdysal histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integumental tissues. Biol. Bull 113: 451-479
223. Tullis, R. E., Kamemoto, F. I. (1974) Separation and biological effects of CNS factors affecting water balance in the decapod crustacean *Thalamita crenata* . Gen. Comp. Endocrinol. 23: 19-28
224. Ulas, A., Aydin, C. (2011) Length-Weight Relationships of *Eriphia verrucosa* Foskal (1775) from the Aegean Sea (Linnaeus, 1758). Journal of Animal and Veterinary Advances 10:1061-1062
225. Vacca, L. L., Fingerman, M. (1983) The roles of hemocytes in tanning during the molt cycle: A histochemical study of the fiddler crab, *Uca pugilator*. Biol. Bull. 165:759-777
226. Velazquez, A. V. (2003). Reproductive strategies of the spiny lobster *Panulirus interruptus* related to the marine environmental variability of central Baja California, Mexico: management implications. *Fisheries Research* 65, 123-135.
227. Verri, T., Mandal, A., Zilli, L., Bossa, D., Mandal, P.K., Ingrosso, L., Zonno, V., Villela, S., Ahearn, G. A., Storelli, C. (2001) D-Glucose transport in decapod crustacean hepatopancreas. Comp. Biochem. Physiol. 130A: 585-606
228. Vincent, M. L., Ramos, L., Oliva, M. (1988b) Variations qualitatives et quantitatives des pigments carotenoides dans l'ovaire et l'hépatopancreas de *Penaeus schmitti* au cours de la maturation ovarienne. Arch. Int. Physiol. Biochem. 96:1555-164
229. Vonk, H. J. (1960) Digestion and metabolism, u: Waterman, T. H. (1960) „The Physiology of Crustacea, Vol. 1. Academic Press, New York
230. Waterman, T. H. (1969) „The Physiology of Crustacea, Vol. 1. Academic Press, New York
231. Webster, S.G. (1996) Measurement of Crustacean hyperglycaemic Hormone levels in the edible crab *Cancer pagarus* during emersion stress. The Journal of Experimental Biology 199: 1579-1585

-
232. Willig, A., Keller, R. (1973) Molting hormone content, cuticle growth and gastrolith growth in the molt cycle of the crayfish *Orconectes limosus* J. Comp. Physiol. 86:377-388
233. Wilkens, J. L., Yazawa, T., Carvey, J. (1997b) Evolutionary derivation of the American lobster cardiovascular system: an hypothesis based on morphological and physiological evidence. Invert. Biol. 116:30-38
234. Wilkens, J. L. (1999) Evolution of the Cardiovascular System in Crustacea. Amer. Zool., 39: 199-214
235. Witten, I. H., Frank, E. (1999). Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann, San Francisco
236. Wojtowicz, M. B., Brockerhoff, H. (1972) Isolation and some properties of the digestive amylase of the American lobster (*Homarus americanus*) Comp. Biochem. Physiol. 42: 295-302
237. Wouters, R., Lavens, P., Nieto, J., Sorgeloos, P. (2001) Penaeid shrimp broodstock nutrition: an updated review on research and development, Aquaculture 202: 1-21
238. Xionghui, L., Soderhall, K., Soderhall, I. (2008) Transglutaminase activity in the hematopoietic tissue of a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*, importance in hemocyte homeostasis. BMC Immunology 9:58
239. Yepiz-Plascencia, G., Vargas-Albores, F., Higuera-Ciapara, I. (2000) Penaeid shrimp hemolymph lipoproteins. Aquaculture, 191:177-189
240. Yoganandhan, K., Thirupathi, S., Sahul Hameed, A. S. (2003) Biochemical, physiological and hematological changes in white spot syndrome virus-infected shrimp, *Penaeus indicus*. Aquaculture, 221:1-11
241. Yonge, C. M. (1924) Studies on the comparative physiology of digestion. II The mechanism of feeding, digestion, and assimilation in *Nephrops norvegicus*. Br. J. Exp. Biol. 1:343-390
242. Zou, E., Du, N., Lai, W. (1996) The effects of severe hypoxia on lactate and glucose concentration in the blood of the Chinese freshwater crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea: Decapoda). Comp. Biochem. Physiol. 114A: 105-109

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 14.veljače 1971. godine u Cassiar-u, B.C. Kanada. Osnovno i srednjoškolsko obrazovanje završila sam u Zadru. Godine 1990. upisala sam Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala sam 1998. godine.

Godine 1998. zaposlila sam se u tvrtki « Cenmar» d.d., Zadar u kojoj sam obnašala dužnost voditelja veterinarske službe na uzgajalištu riba.

Nakon rada u « Cenmar»-u d.d., prelazim raditi za « Sea Daniel», obrt za konzalting u kojoj obnašam dužnost stručnog nadzora i savjetovanja.

Poslijediplomski studij iz Ribarstva upisala sam 2000. godine na Agronomskom fakultetu, završila sam ga 2009. Godine.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

- Čolak S., Lovrinov M., Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Topić Popović N., Barišić J. (2010): Correlation between biometric measures of the host fish and the parasite *Ceratomyxa oestroides* (Risso, 1826). 11th biennial Mediterranean Symposium: Animal farming and environmental interactions in Mediterranean regions“. Book of abstracts. Zadar, October 27-29, 2010, pp 67.
- Strunjak-Perović I., Topić Popović N., Čož-Rakovac R., Jadan M., Čolak S. (2009): Frequency of erythrocytic nuclear abnormalities in shade fish *Argyrosomus regius*. Diseases of Fish and Shellfish, 14th EAFP International Conference, Prague, September 14-19, 2009, pp 436.
- Čož-Rakovac R., Strunjak-Perović I., Topić Popović N., Šmuc T., Jadan M., Galetović S., Čolak S., Lovrinov M., Milina A. (2009): Seasonal blood chemistry patterns of shade fish *Argyrosomus regius*. Diseases of Fish and Shellfish, 14th EAFP International Conference, Prague, September 14-19, 2009, pp 287.
- Čolak S., Čož-Rakovac R., Lovrinov M. (2009): Prevalence of the cymothoid isopod *Ceratomyxa oestroides* (Risso, 1826) in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). Diseases of Fish and Shellfish, 14th EAFP International conference, Prague September 14-19, 2009 / EAFP (ur.)Prague : HALAMA Publishing House, 2009, pp 372.
- Bavčević L., Čolak S., Luzzana U., Petrović S., Coutteau P., Burlini M., 2007. Spring Feeding Protocols in Cage Cultured Sea Bream, Krmiva 1. 2007.
- Luzzana U., Coutteau P., Bavčević L., Čolak S., Franzolini E., Di Giancamillo A., Domeneghini C., (2003) Nutritional solutions to winter syndrome in Gilthead Seabream: verification at a cage farm in Croatia., International Aquafeed (2003) 6, 3: 14-18.
- Luzzana U., Coutteau P., Bavčević L., Čolak S., Franzolini E., Di Giancamillo A., Domeneghini C., (2003) Winter feeding of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in farm conditions: a nutritional strategy to support growth rate while enhancing resistance to Winter Disease. In: Fish Farming in Mediterranean Europe: Quality for Developing Markets - Book of Abstracts of the International Aquaculture Conference - Verona, Italy, October 15-16, 2003: pp 62.
- Luzzana U., Franzolini E., Coutteau P., Bavčević L., Čolak S., Di Giancamillo A., Domeneghini C., (2003) Alimentazione invernale dell'orata (*Sparus aurata*) in condizioni di allevamento. Il Pesce 6/03: 59-65.