

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

„Kvalitativno i kvantitativno istraživanje makrofagnih
centara u jetri riba“

„Qualitative and quantitative research on
melanomacrophage centers in fish liver tissue“

Seminarski rad

Petra Pjevac

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Suvoditelj: mr. **sc. Gordana Gregorović**

Zagreb, 2009.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
2. MORFOLOGIJA MAKROFAGNIH CENTARA	3
3. PIGMENTI MAKROFAGNIH CENTARA	4
3.1. MELANIN	4
3.2. LIPOFUSCIN	5
3.3. HEMOSIDERIN	6
4. ULOGA MAKROFAGNIH CENTARA	7
4.1. MAKROFAGNI CENTRI KAO BIOINDIKATORI STRESA	7
4.2. MAKROFAGNI CENTRI I INFEKTIVNE BOLESTI	8
5. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ISTRAŽIVANJA MAKROFAGNIH CENTARA U JETRI RIBA	8
5.1. ZAŠTO ODABRATI TKIVO JETRE?	8
5.2. UZORKOVANJE TKIVA	10
5.3. PRIPREMA TKIVA ZA ANALIZU	11
5.4. ANALIZA TKIVA I OBRADA PODATAKA	12
6. LITERATURA	14
7. SAŽETAK	19
8. SUMMARY	19

1. UVOD

Tkiva heterotermnih životinja razlikuju se od tkiva homotermnih životinja, između ostalog i po distribuciji pigmentnih stanica unutar njih (Roberts, 1975). Makrofagni centri ili makrofagne nakupine su nakupine pigmentima bogatih stanica (makrofaga) u nekim tkivima heterotermnih kralješnjaka. Kod riba sistematske kategorije *Telostei* (prave koštunjače), obično ih nalazimo u srži hematopoetskih organa. Prvenstveno se pojavljuju unutar slezene i bubrega, no u nekim slučajevima nalazimo ih i u peri-portalnim područjima unutar jetre, u podsluznici crijeva te u timusu (Agius i Roberts, 2003). Povremeno se pojavljuju i unutar škrge, mozga i gonada (Macchi i sur., 1992). Sam pojam makrofagni centar prvi puta je bio upotrijebljen u svezi sa istraživanjem istih nakupina kod riba iz nadreda *Telostei* (Ellis, 1974; Roberts, 1975), no analogne strukture kasnije su pronađene i kod drugih, evolucijski starijih, redova riba, gdje se pak poglavito pojavljuju unutar tkiva jetre (Agius, 1980). Dok se kod većine pravih koštunjača radi o diskretnim, jasno odijeljenim centrima koji uz pigmente sadrže i leukocite, u salmonidnih vrsta (pastrvki) kao i u hrskavičnjača radi se o nasumično unutar tkiva razmještenim nakupinama tamnih pigmenata, unutar kojih je i velik udio melanina (Agius, 1985).

Nakupine ovog tipa uočene su i u ranijim histološkim i histopatološkim istraživanjima, no nitko ih nije precizno definirao do 1975. godine, kada Roberts opisuje makrofagne centre kao „Periodic acid Schiff“, „Schmorls“ i „Ziehl Neelsen“ pozitivna obojenja, obično žute do crne boje, koja predstavljaju nakupine pigmentnih stanica u hematopoetskim tkivima i tkivima koja su pod dugoročnim upalama. Danas neki istraživači koriste i termin makrofagna agregacija (nakupina) kao moderniju inačicu naziva za istu pojavu (Wolke, 1992).

Pokazalo se da brojnost i veličina makrofagnih centara u tkivima riba, između ostalog, raste s povećanjem onečišćenja i pritiska iz okoliša, te su makrofagni centri predloženi kao pouzdani biomarkeri za procjenu onečišćenja voda (Agius i Roberts, 2003).

2. MORFOLOGIJA MAKROFAGNIH CENTARA

Makrofagni centri obično su smješteni u neposrednoj blizini provodnih žila (Agius, 1979a). Pojedine makrofagne stanice unutar centra su gusto zbijene, a i povećane radi aktivne fagocitoze raznog heterogenog materijala – staničnih ostataka, melaninskih pigmenata, haemosiderinskih zrnaca i lipofukscinskih ostataka (Agius i Agbede, 1984) te lipidnih kapljica, nakupina bazičnih proteina i neutralnih mukopolisaharida (Herraez i Zapata, 1986).

Morfologija makrofagnih centara izuzetno je varijabilna i razlikuje se ovisno o vrsti (Roberts, 1975; Agius, 1980; 1985), organu (Agius, 1979b; Kranz i Peters, 1984), ali i o fiziološkom stanju pojedine jedinice unutar iste vrste – kao što su primjerice dob (Agius, 1979b; Agius i Roberts, 1981; Wolke i sur., 1985; Kranz i Gercken, 1987), gladovanje (Agius i Roberts, 1981; Agius, 1983; Agius i Agbede, 1984) i brojni drugi fiziološki čimbenici.

Pokazalo se, da su promjene broja i izgleda makrofagnih centara vezane uz promjene u okolišu u kojem istraživane jedinice obitavaju (Kranz i Gercken, 1987; Fournie i sur., 2001). Peters i Schwarzen (1985) istaknuli su da uz onečišćenje, i stres sam po sebi može uzrokovati promjene u tkivima, među koje spada i povećani broj makrofagnih centara.

Morfologija makrofagnih centara i prepoznavanje istih pod svjetlosnim mikroskopom opisana je mnogostruko (Agius, 1980; 1985; Herrez i Zapata, 1986). No s druge strane, o ultrastrukturi makrofagnih centara, koja je vrlo složena, malo se zna. Građeni su od jezgre okružene velikim brojem membranskih vezikula koje sadrže širok i raznolik spektar materijala. Vezikule često sadrže i granule pigmenta, što ukazuje na njihovu apsorpciju fagocitozom (Roberts, 1975), iako neki od njih mogu imati i drugačije podrijetlo (Agius i Roberts, 2003).

3. PIGMENTI MAKROFAGNIH CENTARA

Edelstein (1971) je kao melanine definirao sve žute, žuto-smeđe i crne organske tvari koje su policiklički polimeri visoke molekularne mase, netopive u većini otapala i otporne na gotovo sve tehnike razgradnje kiselinom ili lužinom. Ovakva definicija obuhvaća i melanine i lipofuscine.

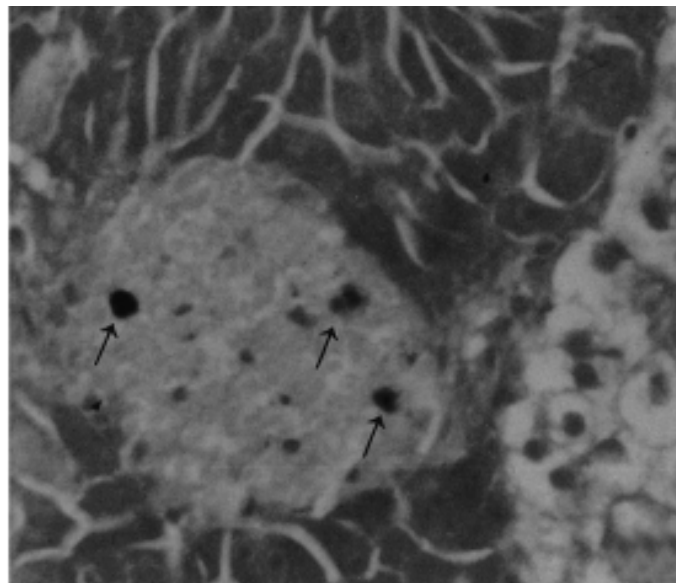
Iz dosadašnjih istraživanja jasno je da se u makrofagnim centrima pojavljuju bar tri pigmenta. Poznato je da je lipofuscin najzastupljeniji te da se melanin pojavljuje gotovo uvijek. Hemosiderin je najčešće prisutan, a udio mu raste u određenim situacijama kao što je primjerice hemolitička anemija (Agius i Roberts, 2003). Podrijetlo i biokemijska uloga pojedinih pigmenta još su poprilično nejasne i raznolike (Pearse, 1972; Wolke i sur., 1985).

3.1. Melanin

U riba, melanin proizvode melanociti unutar dermisa. Dugo se smatralo da makrofagnih centri, za razliku od melanocita, nemaju mogućnost sinteze melanina (Ellis, 1974). Smatralo se i da zbog velike strukturne sličnosti melaninskih granula unutar makrofagnih centara i integumentnog sloja, melanin u makrofagne centre dopijeva isključivo fagocitozom (Agius i

Agbede, 1984). Kasnije se pokazalo da i unutar makrofagnih centara postoji put sinteze melanina, melanogeneza, no ona se biokemijski razlikuje od sintetskog puta unutar melanocita. Glavne funkcionalne i strukturne razlike vezane su uz enzim dopa-oksidadu, koja se u makrofagnim centrima ponaša više kao peroksidaza, dok se u melanocitima ponaša isključivo kao tirozinaza (Zuasti i sur., 1989; 1990).

Melanini su kompleksni polimeri koji su u stanju apsorbirati slobodne radikale, katione i druge potencijalno štetne agense nastale razgradnjom fagocitiranog staničnog materijala (Sl. 1) (Zuasti i sur., 1989). Jedna od hipoteza je, da je uloga ovih polimera apsorpcija slobodnih radikala koji nastaju razgradnjom masnih kiselina iz fagocitiranih staničnih membrana, pri niskim temperaturama (Agius i Agbede, 1984). Druga hipoteza govori da melanin igra ulogu u proizvodnji bakteriocidnih tvari, posebice vodikovog peroksida. I prekursori melanina - kvinoni, imaju bitnu ulogu kao bakteriocidi, posebice kod heterotermnih životinja kod kojih je enzimska aktivnost povremeno slaba zbog izloženosti niskim temperaturama (Wolke i sur., 1985).



Slika 1. Granule melanina (strelice) unutar makrofagnog centra u parenhimu jetre. (H-E, 400x) (Passantino i sur., 2005)

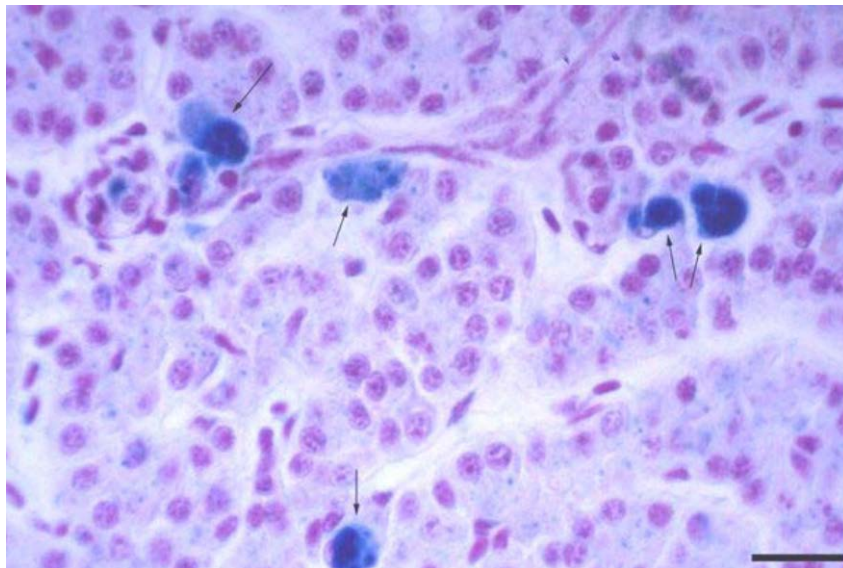
3.2. Lipofuscin

Lipofuscin nastaje oksidativnom polimerizacijom višestruko nezasićenih masnih kiselina. Poznato je, da se u riba akumulira kao posljedica deficitarne prehrane (Pickford, 1953). U marofagnim centrima riba on je po zastupljenosti dominantni pigment (Agius, 1979a,b). Lipofuscin se sintetizira u brojnih vrsta pa i u čovjeka, no ribe su zbog visokih

koncentracija nezasićenih masnih kiselina i niskih koncentracija vitamina E, posebno podložne aktivaciji ovog sintetskog puta. Povećana razina akumulacije lipofuscina uočena je u riba koje se nalaze u nekome patološkom stanju, od manjkave prehrane, preko bakterijskih infekcija do izloženosti toksičnom djelovanju metala (Agius i Roberts, 2003). Razine lipofuscina rastu i sa starošću tkiva (Agius, 1981).

3.3. Hemosiderin

Hemosiderin je smeđi, zrnati, slabo topivi pigment koji se sastoji od proteina i željezo(III) iona. U viših svitkovaca, željezo se u tijelu obično pohranjuje u obliku feritina i to ekstracelularno, no u slučaju prezasićenja željezom počinje intracelularno pohranjivanje u obliku hemosiderina (Agius, 1979a). Hemosiderin također nastaje i kao međuprodukt eritropoetskih puteva, tokom katabolizma hemoglobina. Stoga su dva moguća razloga za povišene razine hemosiderina – snažan katabolizam oštećenih eritrocita ili povišena količina željeza iz vanjskih izvora (koje se zatim nakuplja u makrofagnim centrima). Hemosiderin obično dolazi zajedno s lipofuscinskim granulama (Agius i Agbede, 1984). Pojava hemosiderina unutar makrofagnih centara jetre obično se veže uz patološka stanja (Sl. 2), budući da se u povoljnim uvjetima pohrana i obrada željeza odvija unutar bubrega i slezene, a ne unutar jetre (Leknes, 2007).



Slika 2. Tkivo jetre ohridske pastreve (*Salmo letnica* Kar). Makrofoagni centri (strelice), s visokom koncentracijom željeza, odnosno hemosiderina. (H-E + Perl; Bar = 20µm) (Leknes, 2004)

4. ULOGA MAKROFAGNIH CENTARA

Makrofagnim centrima pripisuju se brojne funkcije, kao na primjer pohrana fosfolipida, željeza (Agius, 1979b, 1981; Agius i Agbede, 1984) te otpornih patogena poput bakterijskih i parazitskih spora (Roberts, 1975). Smatraju se i mjestom procesiranja antigena u imunološkom odgovoru (Agius, 1985).

Mnoga istraživanja upućuju na to da je sveobuhvatna funkcija makrofagnih centara razgradnja, detoksifikacija i recikliranje endogenih i egzogenih tvari (Ferguson, 1976; Ellis, 1980; Herraez i Zapata, 1986). Ta činjenica objašnjava rast i povećanu brojnost makrofagnih centara u starijih jedinki (Agius, 1981; Brown i George, 1985), kao i u onih izloženih većoj razini stresa i zagađenja.

4.1. Makrofagni centri kao bioindikator stresa

Kako u drugih kralješnjaka, tako i u riba stres iz okoline povećava podložnost bolestima i dovodi do promjena u imunološkom sustavu. Smanjuje se udio limfocita, a povećava udio granulocita u krvotoku, no najuočljivija je povećana brojnost makrofagnih stanica i povišen nivo razgradnje eritrocita (Peters i Schwarzen, 1985). Unatoč tome što se veličina i brojnost makrofagnih centara mijenja i s mnogim fiziološkim promjenama, primjerice starenjem, u mnogim slučajevima brojnost, oblik i veličina makrofagnih centara mogu se povezati sa utjecajem različitih polutanata i toksikanata na jedinku, odnosno ekosustav te se mogu koristiti kao biomarkeri (Wolke i sur., 1995). Kroz zadnja desetljeća u brojnim su se istraživanjima i razne druge histološke i histopatološke promjene u tkivima riba pokušale koristiti kao biomarkeri onečišćenja i bioindikator stresa, no većina njih je pre specifična (izazvana samo jednim određenim tipom onečišćenja) i ne govori ništa o sveukupnoj kvaliteti ekosustava koji jedinke nastanjuju (Blazer i sur., 1987; Bucke i sur., 1992; Fabacher i Baumann, 1985; Stegeman, 1978). Mnogi autori su promjene brojnosti makrofagnih centara uslijed gladovanja (Agius i Roberts, 1981) i izlaganja različitim kemijskim agensima (Long i sur., 1995; Couillard i Hodson, 1996; Meinelt i sur., 1997) predložili kao osjetljive indikatore stresnih uvjeta u vodenom ekosistemu.

Dok su neki autori izvješćivali o porastu brojnosti makrofagnih centara s pojačanim onečišćenjem (Kranz i Peters, 1984) drugi su dobivali upravo oprečne rezultate (Kranz, 1989). U konačnici se nizom istraživanja (Fournie i sur., 2001) uspio uspostaviti sustav za vrednovanje i usporedbu dobivenih rezultata prilikom istraživanja makrofagnih centara u tkivima slezene, bubrega i jetre te iste korelirati sa stupnjem onečišćenja vodenog ekosustava.

4.2. Makrofagni centri i infektivne bolesti

Status makrofagnih centara predložen je i kao mogući indikator zdravstvenog stanja populacija riba (Wolke i sur., 1985), jer se pojavljuju i u tkivima koja su dugoročno podložna infekcijama ili su pretrpjela ozbiljnija oštećenja uslijed infektivnih bolesti, bilo bakterijskih, virusnih ili parazitskih (Agius i Roberts, 2003). I u slučaju gljivičnih infekcija dolazi do povećanog stvaranja makrofagnih centara, posebice u hematopoetskim dijelovima tkiva bubrega (Carmichael, 1966).

5. KVALITATIVNA I KVANTITATIVNA ISTRAŽIVANJA MAKROFAGNIH CENTARA U JETRI RIBA

Iako su makrofagni centri učestaliji i često bolje uočljivi u slezeni i bubregu riba, pojavljuju se i u tkivu jetre brojnih vrsta posebice u hrskavičnjača i riba iz porodice pastrvki (Agius i Roberts, 2003). Jetra je jedan od glavnih organa u kojem se odvija metabolizam kemijskih tvari, stoga je jetra dobar izbor tkiva za histološka istraživanja, a makrofagni centri koji se razvijaju u tkivu jetre validni bioindikator onečišćenja i stresa (Agius i Roberts, 2003).

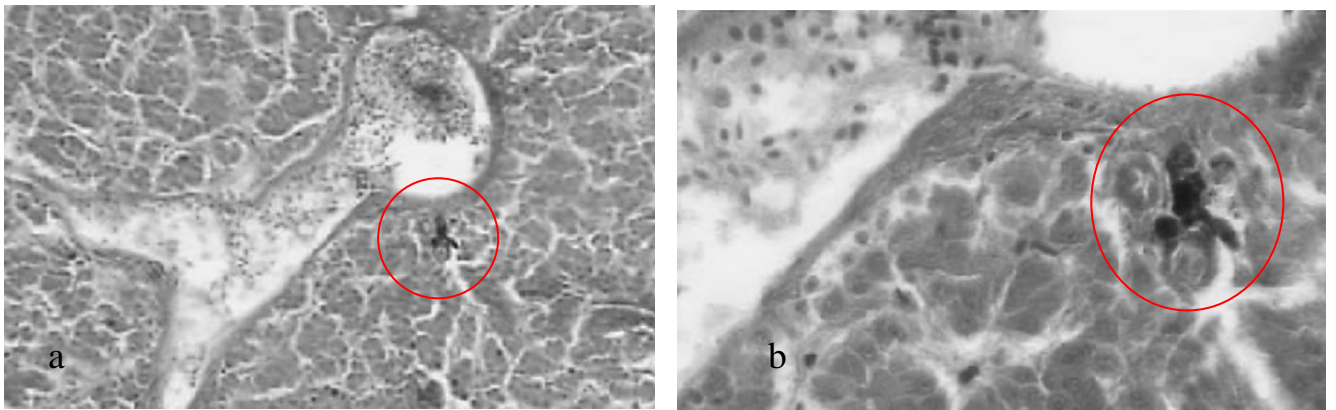
5.1. Zašto odabrati tkivo jetre?

Jetru možemo slobodno nazvati središtem najvećeg broja anaboličkih i kataboličkih funkcija u većine riba (Peters i sur., 1987). Unatoč svoje složene fiziološke funkcije, morfologija jetre u riba je relativno jednostavna. Radi se o parenhimu građenom od dva reda jetrenih stanica – hepatocita, odvojenih od idućih redova sinusoidima kapilarama, koje su obložene endotelom. (Datta Munshi, 1996; books.google.hr). Pod utjecajem različitih oblika stresa kojima je jedinka izložena, dolazi i do različitih promjena u građi jetre: od pojava tumora i nekroza do promjena u količini pohranjenih masti. No, mnoge od tih promjena dešavaju se i prirodno, primjerice starenjem organizma (Peters i sur., 1987) ili u doba mrijesta (Jordanova i sur., 2005). Unatoč ovim poteškoćama, uz pažljivi rad i dobro poznavanje ekologije vrste koju istražujemo, prema stupnju i broju tipova degeneracije koji se pojavljuju kao i površini zahvaćenog tkiva može se saznati izuzetno mnogo o ukupnom zdravstvenom stanju jedinke.

Jedna od mogućih degenerativnih promjena je i povećan broj te promijenjen oblik i boja makrofagnih centara u jetri (Agius i Roberts, 2003). Iako broj i veličina makrofagnih

centara rastu s povećanom životnom dobi i u potpuno zdravih jedinki, onečišćenje ubrzava taj proces (Agius, 1979b).

Makrofazi se općenito, prvo slobodno gibaju sinusoidnim kapilarama kroz parenhim. S vremenom količina akumuliranih tvari unutar pojedine stanice raste, čime raste i veličina stanica, koje se zatim agregiraju i tvore makrofagne centre. Kada dosegnu određenu veličinu, fiksiraju se na jednom mjestu i inkapsuliraju (Passantino i sur., 2005) (Sl. 3). Često se odabiru kao indikatori i kao predmet istraživanja jer je ove nešto veće, tamnije obojene nakupine stanica, koje se nalaze u sinusoidnim kapilarama, nakon odgovarajućeg histokemijskog tretmana, relativno lako raspoznati u homogenom tkivu jetre. Također se mogu površinski kvantificirati, a odabirom raznih načina bojanja moguće je u njima odrediti i približne omjere pojedinih tvari (Peters i sur., 1987).



Slika 3. Makrofagni centar u parenhimu jetre u neposrednoj blizini sinusoidne kapilare. (H-E, a)100x; b) 400x) (Passantino i sur., 2005)

Moguće je mjeriti i aktivnost nekih enzima unutar makrofagnih centara i prema tome odrediti kakav je i koliki utjecaj onečišćenja. Ovo se vrši posebnim metodama, koje nazivamo enzimatska histokemija. Enzimi koji djeluju unutar makrofagnih centara obično sudjeluju u degradaciji i detoksifikaciji tvari (Broeg, 2003). Dobar primjer su kisele fosfataze. Njihova aktivnost je različita u mužjaka i ženki iste vrste, a značajno ovisi i o temperaturi na kojoj djeluju. Jasno je da zbog godišnje varijacije temperatura, i njihova aktivnost varira (bar u hladnokrvnih kralješnjaka). No, zabilježeno je da onečišćenje, primjerice metali poput bakra i žive, kao i organoklorni spojevi mijenjaju aktivnost neovisno o temperaturnoj stabilnosti (Broeg, 2003).

Konstantno se radi na unapređivanju i standardiziranju metoda i tehnika rada, kako bi se uspjelo što bolje povezati ukupno stanje ekosustava s promjenama koje uočavamo na tkivu

jetre. Makrofagni centri su već desetljećima predmet istraživanja, posebice jer posjeduju više raznih karakteristika pogodnih za istraživanja te time omogućuje različite pristupe radu.

5.2. Uzorkovanje tkiva

Istraživanja utjecaja metala, organskih tvari ili toksina na makrofagne centre u jetri riba provode se najčešće u laboratorijskim uvjetima. Nakon odabira vrste na kojoj se radi, u kontroliranim uvjetima se postavi pokus - jedinke se izlažu utjecaju istraživane tvari u raznim koncentracijama i raznim vremenskim intervalima. Uz jedinke izložene istraživanoj tvari postoji i kontrolna skupina. Prije početka istraživanja potrebno je isplanirati tok pokusa: koliko jedinki će se žrtvovati, u kojim vremenskim intervalima, koje koncentracije će se istraživati i kroz koji vremenski period.

Pri istraživanju makrofagih centara u jetri riba kao bioindikatora stresa ili ukupnog stanja ekosustava u kojem jedinke obitavaju uzorkovanje je nešto kompliciranije. Obično se u istom vodenom sustavu odabire nekoliko lokacija uzorkovanja, za koje se pretpostavlja da je opterećenje toksinima i otpadnim tvarima različito te se na svakoj od danih lokacija uz uzorkovanje ribe, odnosno tkiva, određuju i drugi parametri – osnovni fizikalno kemijski parametri (zasićenje kisikom, alkalinitet, koncentracije fosfata, nitrata i drugih hranjivih soli), mikrobiološka analiza vode, određivanje koncentracije određenih metala i organskih onečišćivača. Svako odstupanje od normalnih vrijednosti, otkriveno analizom vode, može se smatrati stresnim faktorom za jedinke koje nastanjuju istraživano područje. Podatke prikupljene prilikom analize vode uspoređuje se s podacima o brojnosti, veličini, obliku i sastavu pigmenata makrofagnih centara. Iz dobivenih korelacija moguće je zaključiti da li i ako da, u kojoj mjeri, stres utječe na promjene u makrofagnim centrima. Obično veličina uzorka po postaji varira od 4 do 10 jedinki.

Kako bi se izbjegle dodatne promjene na tkivu, žrtvovanje jedinki treba izvesti što brže, uz minimalno dodatno uznemiravanje jedinki. U laboratorijskim uvjetima to je relativno jednostavno. Prilikom terenskog uzorkovanja, najčešće se odabire lov agregatom za elektroribolov, kao najmanje invazivna metoda uzorkovanja. U što kraćem vremenskom roku nakon ulova, izvrši se žrtvovanje životinja i uzorkovanje tkiva, ponekad uz prethodnu blagu kemijsku aesteziiju, primjerice klorbutanolom (Leknes, 2004).

U većem broju terenskih istraživanja zaključci se ne donose na osnovu analize jednog tipa tkiva, već na osnovu analize više tipova tkiva. Promatraju se slezena, bubrezi, škrge, gonade, jetra, mozak, epitel crijeva te mišićno tkivo u raznim kombinacijama (Agius i Roberts, 2003).

5.3. Priprema tkiva za analizu

Najraširenija tehnika pri izradi histoloških preparata je takozvana parafinska tehnika. Postupak fiksacije i način tretiranja tkiva prilikom izrade histoloških i histokemijskih preparata je relativno dobro standardiziran i u većini istraživanja slijede se standardni protokoli, odabrani unaprijed sukladno s ciljem istraživanja.

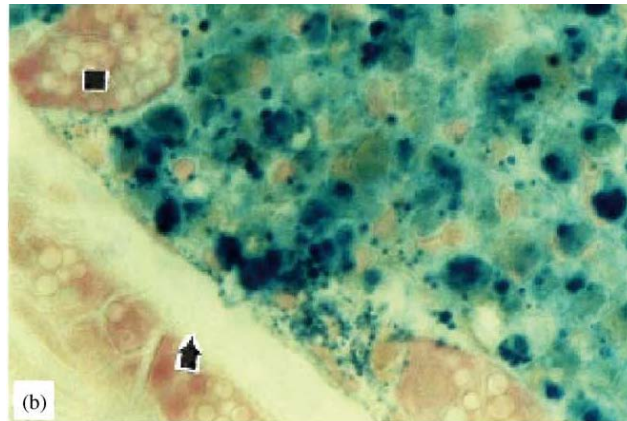
U pravilu se tkivo između 24 i 48 sati fiksira u već odabranom fiksativu (primjerice formaldehid, aceton, etanol i razni složeni fiksativi), te se zatim provodi kroz niz alkohola rastuće koncentracije sve do apsolutnog alkohola, u svrhu dehidriranja. U svakoj otopinu tkivo stoji 24 sata. Zatim se tkivo na 24 sata uvodi u otapalo koje se miješa s paraplastom. Najčešće se koristi kloroform u kojemu tkivo također stoji 24 sata (Heitzmann, 1883; www.archive.org). Idući korak je uklapanje u paraplast. Provođenjem kroz niz smjesa paraplasta i otapala (kloroforma) u kojima je koncentracija paraplasta sve veća, pri temperaturi od 50-60°C, sve do čistog paraplasta koji se zatim ohladi, dobije se blok s uklopljenim tkivom spremnim za rezanje na mikrotonu. Dobiveni rezovi deparafiniraju se u ksilolu te rehidriraju kroz niz otopina padajuće koncentracije alkohola sve do destilirane vode (Jordanova i sur., 2005).

Druga opcija pripreme preparata, često u upotrebi kod histokemijskih i imunohistokemijskih istraživanja je smrzavanje tkiva (istovremeno s dehidracijom) na -170°C te rezanje na kriostatu. Tehnika je brza, ali je i veća vjerojatnost narušavanja morfološke strukture tkiva zbog nastanka ledenih kristala. Zato se više koristi u enzimatskim, nego u morfološkim istraživanjima.

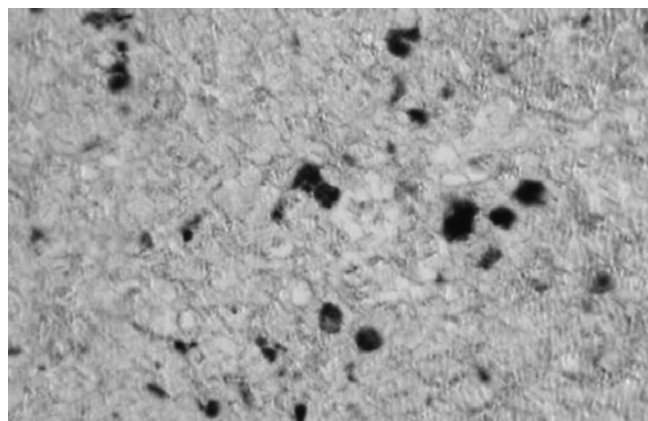
Idući korak, bojanje, pruža mnogo više opcija. Sve ovisi o tome što je cilj istraživanja: saznati nešto samo o brojnosti, obliku i veličini makrofagnih centara ili i nešto o sastavu pigmenata i kemijskih elemenata unutar njih. Najčešće korišteno bojanje u histološkim istraživanjima, pa i u istraživanjima makrofagnih centara u jetri riba je hemalaun-eozin bojanje (kombinacije jedne kisele i jedne bazične boje). Na preparatima se isto tako, raznim standardnim histokemijskim reakcijama mogu dokazivati pojedini pigmenti. To se vrlo često i radi, jer sastav pigmenata unutar makrofagnog centra govori izuzetno puno o zdravstvenom stanju jedinke. Za dokazivanje pigmenata postoji više načina bojanja i više dokaza te će ovdje biti navedeni samo poneki primjeri uz pripadajuće slike koje prikazuju rezultate bojanja.

Za dokazivanje hemosiderina, odnosno željeznih iona unutar ovog pigmenta, čija povišena koncentracija i pojava uopće u makrofagnim centrima jetre govori o slabijem zdravstvenom stanju jedinke, najčešće se koristi „Prussian blue stain“ – kiselu otopinu

ferocijanida (Sl. 4) . Za dokazivanje pigmentata iz skupine lipofuscina često je u uporabi „Schmorl stain method“ (Sl. 5). Ovo su, naravno, samo neke od mogućnosti bojanja prilikom dokazivanja najčešće istraživanih faktora unutar makrofagnih centara (Leknes, 2004; Passantino i sur., 2005).



Slika 4. Tkivo jetre obojeno „Prussian blue“ bojom, Nakupine željezovih iona vide se kao tamnija područja. (400x) (Leknes, 2004)



Slika 5. Tkivo jetre obojeno „Schmorl“ metodom, za vizualizaciju lipofukscinskih pigmentata, koji se uočavaju kao tamnije nakupine. (400x) (Passantino i sur., 2005)

5.4. Analiza tkiva i obrada podataka

Nakon što smo makrofagne centre, ili pojedine elemente unutar njih, vizualizirali, dobivene podatke treba obraditi. Rezultate valja kvantificirati, saznati kolika je brojnost makrofagnih centara, koliki udio u tkivu zauzimaju, koji pigmenti dominiraju unutar centara i slično. Obojeni i pripremljeni preparati se analiziraju pod svjetlosnim mikroskopom. Uobičajeno je analizirati više vidnih polja sa isto preparata, obično broj varira između 5 i 15. Također je uobičajeno od istog komada tkiva pregledati više pripremljenih preparata, broj se obično kreće od 5 do 10. Danas se za kvantifikaciju podataka koriste različiti kompjutorski

programi, koji nakon zadavanja uzorka, optički prepoznaju traženu „metu“ u odabranom vidnom polju, te izračunavaju zauzetu površinu (Jordanova i sur., 2005).

Nakon same kvantifikacije podataka slijedi statistička analiza. Sve dobivene podatke moramo urediti i usporediti kako bismo saznali da li je utjecaj tvari ili stanje ekosustava, uistinu značajno utjecalo na stanje tkiva, ili dobiveni rezultati mogu biti uzrokovani slučajnom pogreškom, jedinstvenom razlikom od jedinke do jedinke. Na ishod statističke obrade utječe koliko su pažljivo pripremljeni i precizno obrađeni uzorci. Na rezultate utječe i istraživačevo poznavanje biologije i ekologije same istraživane vrste, prema kojem je odredio vrijeme uzorkovanja. O vremenu uzorkovanja ovisiti će u kojem se dijelu životnog ciklusa uzorkovane jedinke nalaze (prethodno je napomenuto koliko ovaj faktor značajno utječe na brojnost makrofagnih centara).

Na kraju statističke obrade podataka dobivaju se konačni rezultati istraživanja. Podatci prema kojima zaključujemo o utjecaju istraživane pojave na pojavu i promjene makrofagnih centara u jetri ribe, odnosno na zdravstveno stanje jedinke koje se u tome reflektira. Sve greške učinjene u prethodnim koracima akumulirati će se u rezultatu i utjecati na točnost izvedenih zaključaka. Stoga je svaki korak istraživanja jednako bitan, treba biti pažljivo isplaniran i precizno proveden, da bi rezultati bili ispravni i validni.

6. LITERATURA

Agius C., Roberts R.J. (2003) Melano-macrophage centers and their role in fish pathology – A Review. *Journal of Fish Diseases* 26, 499–509.

Agius C. (1985) The melano-macrophage centres in fish: a review. *Fish Immunology* (ed. by M.J. Manning, M.F. Tatner), pp. 85–105. Academic Press, London.

Agius C., Agbede S.A. (1984) Electron microscopical studies on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. *Journal of Fish Biology* 24, 471–488.

Agius C. (1981) Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissue and age-related changes. *Developmental and Comparative Immunology* 5, 597–606.

Agius C., Roberts R.J. (1981) Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of Fish Biology* 19, 161–169.

Agius C. (1980) Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *Journal of Zoology*, London 191, 11–31.

Agius C. (1979a) Aspects of the melano-macrophage centres in fish. PhD Thesis, University of Stirling.

Agius C. (1979b) The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases* 2, 337–343.

Blazer V.S., Wolke R.E., Brown J., Powell C.A. (1987) Piscine macrophage aggregate parameters as health monitors: effects of age, sex, relative weight, season and site quality in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquatic Toxicology* 10, 199–215.

Broeg K. (2003) Acid phosphatase activity in liver macrophage aggregates as a marker for

pollution-induced immunomodulation of the non-specific immune response in fish. *Helgoland Marine Research* (2003) 57, 166–175.

Brown C.L., George C.J. (1985) Age-dependent accumulation of macrophage aggregation in the yellow perch, *Perca flavescens* (Mitchill). *Journal of Fish Diseases* 8, 135–138.

Bucke D., Vethaak A.D., Lang T. (1992) Quantitative assessment of melanomacrophage centres (MMC's) in dab, *Limanda limanda* along a pollution transect in the German Bight. *Marine Ecology Progress Series* 91, 193–196.

Carmichael J.W. (1966) Cerebral mycetoma in trout. *Sabouraudia* 6, 120–123.

Couillard C.M., Hodson P.V. (1996) Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-Kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1844–1854.

Datta Munshi J.S., Dutta M.H. (1996) Fish morphology: horizon of new research. pp. 78–80. A.A. Balkema Publishers, Brookfield.

Edelstein L.M. (1971) Melanin: a unique biopolymer. *Pathobiology Annual* (ed. by H.L. Ioachim), pp. 309–324. Appleton-Century-Crofts, New York.

Ellis A.E. (1980) Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice, *Pleuronectes platessa* (L.). *Journal of Fish Diseases* 3, 413–426.

Ellis A.E. (1974) Aspects of the lymphoid and reticulo-endothelial system in the plaice *Pleuronectes platessa* L. PhD Thesis, University of Aberdeen.

Fabacher P.L., Baumann P.C. (1985) Enlarged livers and hepatic microsomal mixed function oxidase components in tumor-bearing brown bullhead from a chemically contaminated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 4, 703–710.

Ferguson H.W. (1976) The reticulo-endothelial system of teleost fish with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). PhD Thesis, University of Stirling.

Fournie J.W., Summers J.K., Courtney L.A., Engle V.D., Blazer V.S. (2001) Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 105–116.

Heitzmann C. (1883) *Microscopical morphology of the animal body in health and disease*; New York; J.H. Vail, pp. 675–688.

Herraez M.P., Zapata A.G (1986). Structure and function of the melano-macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12, 117–126.

Jordanova M., Rebok K., Miteva N., Rocha E. (2005) Evaluating pigmented macrophages as biomarkers for fish health and environmental pollution: evidence of natural seasonal fluctuations in Ohrid trout (*Salmo letnica* Karaman). BALWOIS Conference 2006; A-042.

Kranz H., Gercken J. (1987) Effects of sublethal concentration of potassium dichromate on the occurrence of splenic melanomacrophage centres in juvenile plaice, *Pleuronectes platessa* L. *Journal of Fish Biology* 31, 75–80.

Kranz H., Peters N. (1984) Melano-macrophage centres in liver and spleen of ruffe (*Gymnocephalus cernuus*) from the Elbe Estuary. *Helgolander Meeresuntersuchungen* 37, 415–424.

Leknes L.I. (2007) Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). *Acta histochemica* 109, 164–168.

Leknes L.I. (2004) Melano-macrophage centres in the liver of platyfish, *Xiphophorus maculatus*, Poeciliidae: Teleostei. *Zoology* 107, 201–204.

Long E.R., MacDonald D.D., Smith S.L., Calder F.D. (1995) Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19, 81–97.

Macchi G.J., Romanol A., Christiansen H.E. (1992) Melanomacrophage centres in white mouth croaker *Micropogonias furneri*, as biological indicators of environmental changes. *Journal of Fish Biology* 40, 971–973.

Meinelt T.R., Kruger M., Pietrock M.M., Osten R., Steinberg C. (1997) Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues. *Environmental Science and Pollution Research* 4, 32–36.

Passantino L., Cianciotta A., Jirillo F., Carrassi M., Jirillo E., Passantino G.F. (2005) Lymphoreticular System in Fish: Erythrocyte-Mediated Immunomodulation of Macrophages Contributes to the Formation of Melanomacrophage Centers, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 27, 147-161.

Pearse A.G.E. (1972) *Histochemistry. Theoretical and Applied*, 3rd edn. Churchill-Livingstone, London.

Peters N., Köhler A., Kranz H. (1987) Liver pathology in fishes from the Lower Elbe as a consequence of pollution. *Diseases of Aquatic Organisms* 2, 87–97.

Peters G., Schwarzen R. (1985) Changes in haemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. *Diseases of Aquatic Organisms* 1, 1–10.

Pickford G.W. (1953) Fish endocrinology. A study of the hypophysectomized male killifish, *Fundulus heteroclitus* (L). *Bulletin of the Bingham Oceanographic Collection, Yale University* 14, 5–41.

Pulsford A.L., Ryan K.P., Nott J.A. (1992) Metals and melano- macrophages in flounder *Platichthys flesus* spleen and kidney. *Journal of the Marine Biological Association, U.K.* 72, 483–498.

Roberts R.J. (1975) Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease. In: *The Pathology of Fishes* (ed. by W.E. Ribelin, G. Migaki), pp. 399–428. University of Wisconsin Press, Madison, WI.

Stegeman J.J. (1978) Influence of environmental contamination on cytochrome P-450 mixed function oxygenases in fish; implication for recovery in the Wild Harbor marsh. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35, 668–674.

Wolke R.E., George C.J., Blazer V.S. (1995) Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health. In: *Parasitology and Pathology of the World Oceans* (ed. by W.J. Hargis). NOAA Technical Report, NMFS 25, 27–33. National Marine Fishery Service, Washington, DC.

Wolke R.E. (1992) Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 91–108.

Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickstein C., George C.J. (1985) Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 222–227.

Zuasti A., Ferrer C., Aroca P., Solano F. (1990) Distribution of extra cutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Teleostei). *Pigment Cell Research* 3, 115–119.

Zuasti A., Jara J.R., Ferrer C., Solano F. (1989) Occurrence of melanin granules and melano synthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research* 2, 93–99.

www.archive.org

books.google.hr

7. SAŽETAK

Makrofagni centri u jetri riba bitan su marker zdravstvenog stanja jedinke te se kao takvi mogu koristiti kao bioindikator stresa i djelovanja raznih egzogenih tvari na ribe. Zbog relativno jednostavne morfologije tkiva jetre, koja olakšava uočavanje ove vrste degenerativnih promjena tkiva pod svjetlosnim mikroskopom, popularna su tema istraživanja u histopatologiji.

Iako su postupci za kvantitativnu i kvalitativnu analizu već uhodani i standardizirani, istraživači su se kroz protekla dva desetljeća osvijestili značajnosti koraka uzorkovanja i poznavanja same biologije istraživane vrste, što oboje značajno utječe na brojnost makrofagnih centara u jetri ribe. U ovom radu pružen je uvid u strukturu i porijeklo makrofagnih centara, moguće uzroke njihovog nastanka i metodologiju rada koja se obično primjenjuje prilikom istraživanja istih.

8. SUMMARY

Melanomacrophage centers in the liver of fish are an important marker of health status of individuals and as such can be used as bioindicators of stress and the effects of various exogenous substances on fish. Because of the relatively simple morphology of liver tissue, which facilitates the observation of different types of degenerative changes in it, it is a popular topics of research in histopathology.

However, although the procedures for the quantitative and qualitative analysis, is both well known and standardized, the researchers through the last two decades, became more aware of the significance of the sampling step and knowledge about the biology and ecology of the species studied. This is because many natural factors significantly affects the abundance of melanomacrophage centers in the liver of fish. In this review, a brief overview to the structure and origin of melanomacrophage centers is presented, as well as the possible causes of their origin and methodology that is commonly used to explore them.