

# Makrofagni centri u jetri riba-histološki biomarkeri stresa

---

Krasić, Jure

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:044758>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

MAKROFAGNI CENTRI U JETRI RIBA-HISTOLOŠKI  
BIOMARKERI STRESA

MACROPHAGE CENTERS IN FISH LIVER-  
HISTOLOGICAL  
BIOMARKERS OF STRESS

Jure Krasić

SEMINARSKI RAD

Preddiplomski studij molekularne biologije  
(Undergraduate study of molecular biology)  
Mentor: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin

Zagreb, 2013.

# Sadržaj

1. Uvod	3
2. Filogenija	4
3. Morfologija	5
4. Pigmenti	7
5. Funkcija	11
6. Melano-makrofagni centri i infektivne bolesti	12
7. Melano-makrofagni centri kao indikatori okolišnog stresa	14
8. Popis literature	15
9. Sažetak	17
10. Summary	18

# 1. Uvod

Od početka ljudske civilizacije čovjek i njegov život su vezani uz rijeke. Čovjekov napredak u stopu prati njegov utjecaj na okoliš, tj. zagađenje prirode oko njega. To se ponajviše očituje u vodama u koje čese, kroz stoljeća, najveći dio otpada bacati. Ribe su najpogodniji organizmi na kojima se očituje onečišćenje te ih smatramo biomarkerima. Kako obitavaju u zagađenoj vodi i zbog visoke pozicije u hranidbenom lancu, u njima dolazi do nakupljanja štetnih tvari, pogotovo jetri, koja je glavni metabolički organ.

Makrofazi su stanice koje nastaju diferencijacijom monocita u koštanoj srži. Sudjeluju u specifičnom i nespecifičnom putu obrane organizma kralježnjaka. Njihova funkcija je fagocitoza staničnih ostataka i patogena, bilo kao stacionarne ili pokretne stanice. Potiču limfocite i druge imunosne stanice da odgovore na patogeni utjecaj, kreću se ameboidnim kretanjem, imaju sposobnost prolaska kroz tkiva i identificiraju se specifičnom ekspresijom određenih proteina (što se može dokazati imunohistokemijskim bojanjem).

Melano-makrofagni centri su nakupine pigmentiranih stanica u tkivima heterotermnih vertebrata. Pojavljuju se kao dio strome hematopoetskog tkiva u bubregu, slezeni i jetri riba koštunjača, gmazova i vodozemaca. Kao odgovor na kroničnu upalu, oštećenja se mogu pojaviti i na drugim mjestima u tijelu. Zbog njihove funkcije u imunom odgovoru i njihove strukture pretpostavlja se da su melano-makrofagni centri prekursori zametnih limfnih čvorića kod viših vertebrata. Oni su također centri gdje se fagocitirane tvari kataboliziraju, mobiliziraju ili odlažu (Heidemarie i Kranz, 1989).

Melano-makrofagni centri sadrže različite pigmente, uključujući i melanine, a raspon i broj pigmenata se povećava sa starošću jedinke i kaheksijom. Kod heterotermnih vertebrata pigmentirane stanice su pretežito dermalne, ali se pojavljuju i u peritoneumu, u blizini limfnih i krvnih žila, stromi hematopoteskog tkiva i unutar zarastajućih rana.

## 2. Filogenija

Iako se termin melano-makrofagni centar prvo primjenjivao samo u odnosu na specifične strukture kod pravih koštunjača (Ellis, 1974; Roberts, 1975), analogne strukture su opisane i kod hrskavičnjača i primitivnih koštunjača, pretežito u jetri.

Kod koštunjača stvaraju diskretne centre unutar kojih se nalaze i leukociti, dok u salmonida i hrskavičnjača nisu diskretni, imaju visok udio tamnih pigmenata i nasumično su raspoređeni u tkivu (Ellis 1974; Roberts, 1975).

Pretpostavlja se, na strukturalnoj i funkcionalnoj razini, da melano-makrofagni centri mogu predstavljati primitivne analoge zametnih limfnih čvorova ptica i sisavaca (Ferguson, 1976; Ellis, 1980).

Slične pigmentirane makrofagne strukture su nađene i kod vodozemaca i gmazova (Scalia 1988).

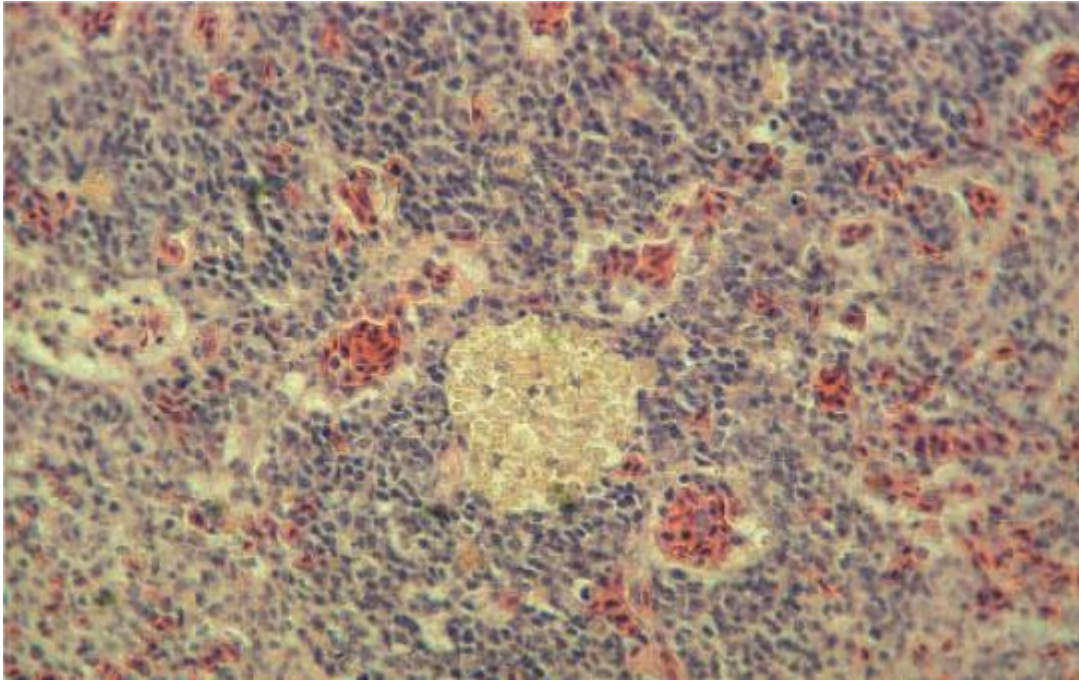
### 3. Morfologija

Melano-makrofagni centri su nodularni, sa osjetljivom argirofilnom kapsulom, i pretežito se nalaze blizu vaskularnih kanala. Makrofazi su usko pakirani da bi formirali velike agregate i povećaju se nakon aktivne fagocitoze heterogenog materijala (Agius, 1979).

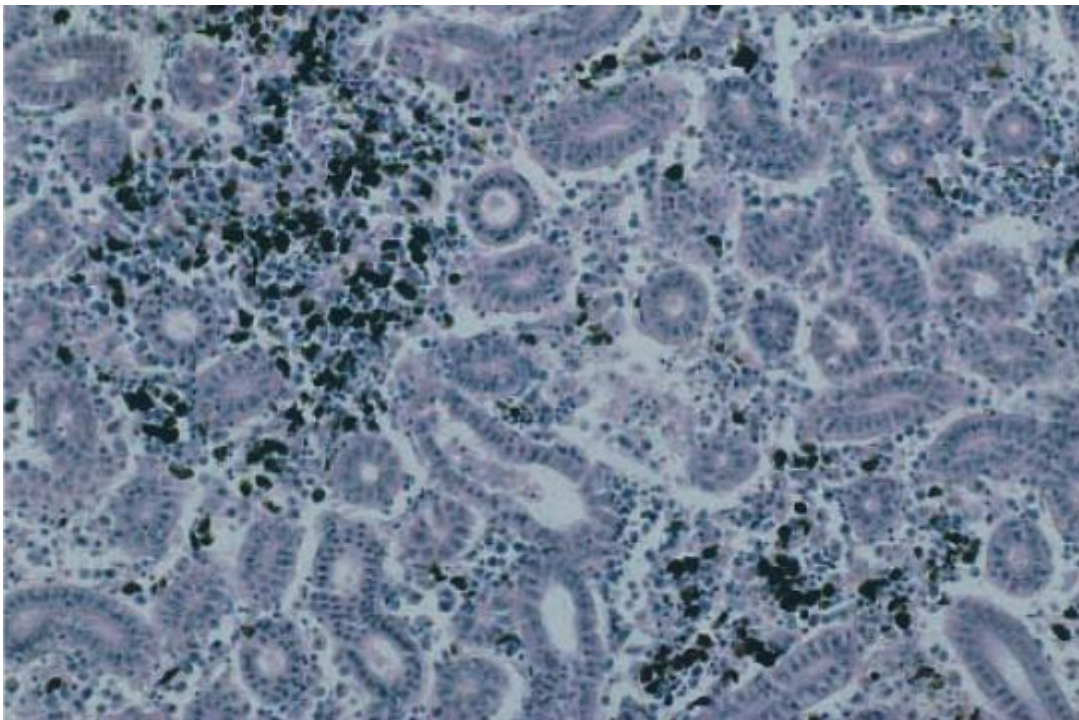
Izgled melano-makrofagnih centara varira u odnosu na vrstu i organ unutar kojeg se nalazi, ali i unutar iste vrste se razlikuju u odnosu na dob, metabolizam željeza i hemoglobina, raspad tkiva, stanje gladovanja, patološka i upalna stanja i imunološke procese (Agius i Agbede, 1984).

Ultrastrukturalno melano-makrofagni centri su vrlo kompleksni. Imaju indentirane jezgričice i veliki broj membranski vezanih vakuola koje sadrže razne minerale. Granule s pigmentom su često sadržane u grupama u tim vakuolama, što implicira fagocitozu (Roberts, 1975).

Melano-makrofagni centri imaju kapsulu sastavljenu od celularnih i acelularnih elemenata, što ih odvaja od okružujućih limfoidnih elemenata. Centri su sami sastavljeni od stanica u različitim stadijima degeneracije (Slika 1 i 2) (Ferguson, 1976).



Slika 1. – Histološki preparat jetre s blijedo obojanim melano-makrofagnim centrom (H&E, x60)



Slika 2. – Melano-makrofagne stanice u hematopoetskom tkivububrega (H&E, x75)

## 4. Pigmenti

Iz prikupljenih podataka očito je da melano-makrofagni centri nose različite vrste pigmenata, često i u istim stanicama. Histokemijskim metodama je potvrđena prisutnost tri vrste pigmenata u melano-makrofagnim centrima hematopoetskih tkiva: melanin, lipogeni pigmenti lipofuscin i ceroid, te hematogeni pigment hemosiderin. Porijeklo i uloga pigmenata nisu poznate. Kod makrofaga je lipofuscin najprisutniji pigment, melanin je često, ali ne i uvijek, drugi najprisutniji. Hemosiderin može biti prisutan u velikim količinama u uvjetima hemolitičke anemije (Pearse, 1972; Wolke i sur., 1985).

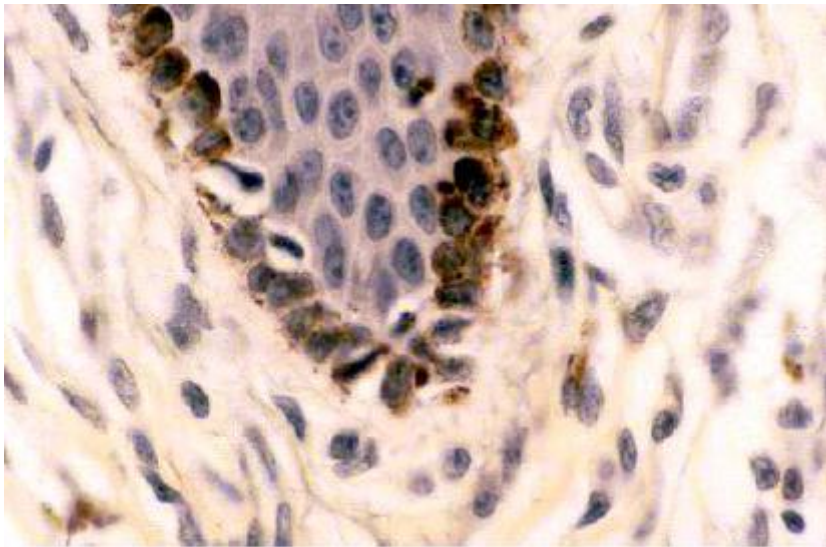
### 4.1 Melanin

Edelstein (1971) je definirao melanine da uključuju sve biološke žute, žuto-smeđe i crne organske supstance koje su policiklički polimeri velike molekularne mase.

Melanin proizvode melanociti izvedeni embriološki iz neuralnog grebena i sadržani u sferičnim melanosomima. Kod riba melanogeneza se odvija u koži i pigmentne melanin-generirajuće stanice su melanociti. Melanociti su nezreli melanofori koji proizvode melanin, ali su i sposobni sazrijeti u melanofore i prijeći u melanoforski sloj (Roberts, 1975).

Melanini su kompleksni polimeri koji mogu apsorbirati i neutralizirati slobodne radikale, katione i druge potencijalne toksične agense, nastale degradacijom fagocitiranog staničnog materijala. Hipoteza je da je bitna funkcija polimera, unutar makrofaga, neutralizacija slobodnih radikala, nastalih fagocitozom stanične membrane pri niskim temperaturama (Slika 3) (Zuasti i sur., 1898).





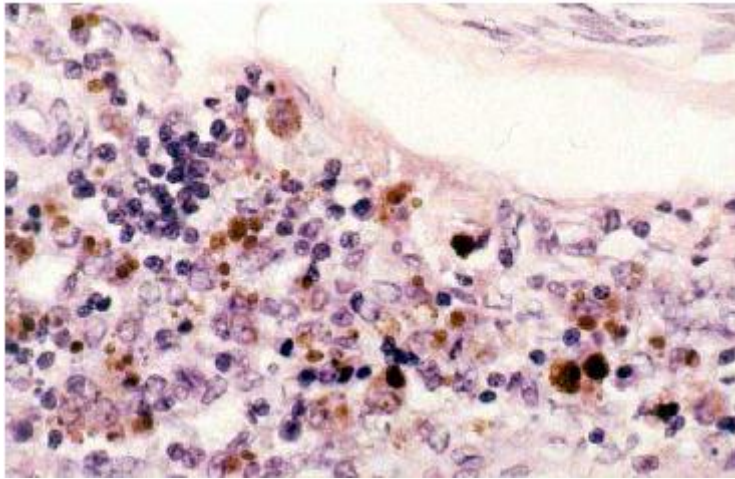
Slika 3. – Nakupine melanina u najdubljem dijelu kože (H & E, x200)

## 4.2 Lipofuscin

Lipofuscin, ili ceroid, je rezultat oksidativne polimerizacije nezasićenih masnih kiselina. Ovi pigmenti se mogu nakupljati u ribama kao rezultat nedostataka u prehrani. Povećano odlaganje lipofuscina u stanju kaheksije je primijećeno u organima drugih vrsta, uključujući i čovjeka. Stvaranje lipofuscinskih pigmenata uključuje preoksidaciju polinezasićenih masnih kiselina subcelularne membrane. Ribe su pogotovo sklone stvaranju lipofuscina zbog prirodnih visokih vrijednosti nezasićenih masnih kiselina i malih vrijednosti vitamina E. Nakupljanje lipofuscina i ceroida je zamijećeno kod riba s raznim patološkim stanjima, poput prehrambenih deficijencija, bakterijske i virusne bolesti i uznemirenja izazvanih toksičnim materijalom (Pickford, 1953).

Lipofuscini i ceroidi nastaju istim oksidativnim procesom, i teško je ustanoviti razliku između dva produkta. Zato su potrebne brojne histokemijske tehnike prepoznavanja i razlikovanja istih (Pearse, 1972).

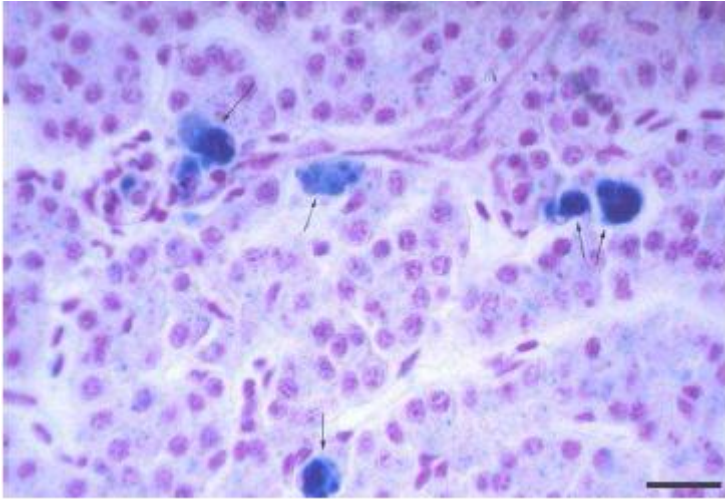
Lipofuscin je najrašireniji pigment kod melano-makrofagnih centara (Slika 4) (Agius, 1979).



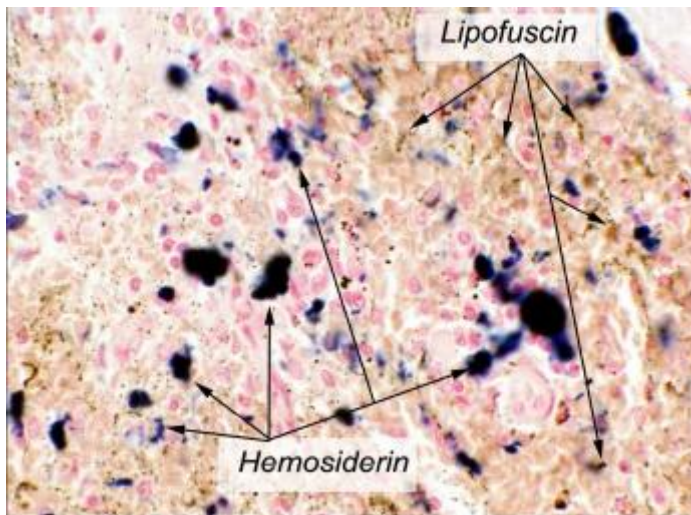
Slika 4. – Stanice makrofagas lipofuscinom unutar mjesta infekcije (H & E, x200)

### 4.3 Hemosiderin

Hemosiderin je smeđi, granularni, relativno netopivi pigment koji sadrži protein i željeznu komponentu. Kod viših životinja željezo senormalno skladišti u tijelu u obliku feritina. Kada se cijelo tijelo, ili određeni organ, prezasiti s feritinom, željezo se počne skladištiti u obliku hemosiderina. Dva su moguća mehanizma kojima može doći do povećanog udjela hemosiderin-željeza: povećani katabolizam oštećenih eritrocita i povećano zadržavanje željeza unutar melano-makrofagnih centara radi zaštite. Hemosiderin je uobičajeno u bliskoj asocijaciji s granulama lipofuscina. Kod riba koštunjača hemosiderin je ograničen na melano-makrofagne centre jetre. Koncentracija hemosiderina bitno raste nakon hemolitičke anemije i produljenog gladovanja. Koncentracija hemosiderina u jetri je mala, i njen porast ili akumulacija pigmenta u drugim organima se zove hemosideroza. To je indikator patoloških procesa(Slika 5 i 6) (Agius, 1979).



Slika 5. – Makrofazi s hemosiderinom (Prussian blue, x200)



Slika 6. – Nakupine lipofuscina i hemosiderina u stanicama jetre (Prussian blue, x75)

## 5. Funkcija

Uloge pripisane melano-makrofagnim centrima su brojne: skladištenje fosfolipida staničnog podrijetla i željeza nakon eritrofagocitoze, skladištenje rezistentnih patogena poput bakterijskih i parazitskih spora i procesiranje antigena u imunom odgovoru (Agius, 1979).

Brojne studije govore da je generalna funkcija centara uništenje, detoksikacija i recikliranje endogenih i egzogenih materijala. Iz toga proizlazi da je ključna funkcija melano-makrofagnih centara njihova uloga metaboličkih odlagališta za relokaciju ostataka raspadnutih i oštećenih stanica, pa čak i crvenih krvnih stanica. Strukture s takvom funkcijom rastu u broju i veličini kako organizam stari i tkiva degeneriraju (Ferguson, 1976; Ellis, 1980).

Melano-makrofagni centri također imaju ulogu u odgovoru ribe na infektivne agense (Ellis, 1976).

Pokazalo se da mali cirkulirajući limfociti migriraju u melano-makrofagne centre, to implicira da bi centri mogli biti mjesto interakcije zarobljenih antigena s imunostavom. To još više naglašava blisku suradnju melano-makrofagnih centara s limfoidnim stanicama.

## 6. Melano-makrofagni centri i infektivne bolesti

Status melano-makrofagnih centara bi mogao biti ogled zdravlja divljih populacija riba, jer se centri povećavaju u broju i veličini u upalnim procesima, oštećenjima tkiva i odgovorima na infekcije.

Povećani broj melano-makrofagnih centara je induciran kod vrste *Carassius auratus* tako da su izazvana oštećenja eritrocita pomoću fenilhidrazina (Herraez i Zapata, 1986), a kod vrste *Gymnocephalus cernuus* prilikom izlaganja riba zagađenoj vodi rijeke Elbe (Kranz i Peters, 1984).

Makrofazi bubrega igraju bitnu ulogu kao mjesta intracelularne proliferacije bakterija u određenih kroničnih stanja, poput tuberkuloze (Chinabut, 1999) i bakterijske bolesti bubrega (Wolke, 1975).

Melano-makrofagni centri imaju veliku ulogu i u stanjima poput fibroze. Kod fibroze je prisutna hemolitička anemija i ako je stanje kronično jako velike količine hemosiderina mogu biti detektirane u centrima (Hjeltnes i Roberts, 1993).

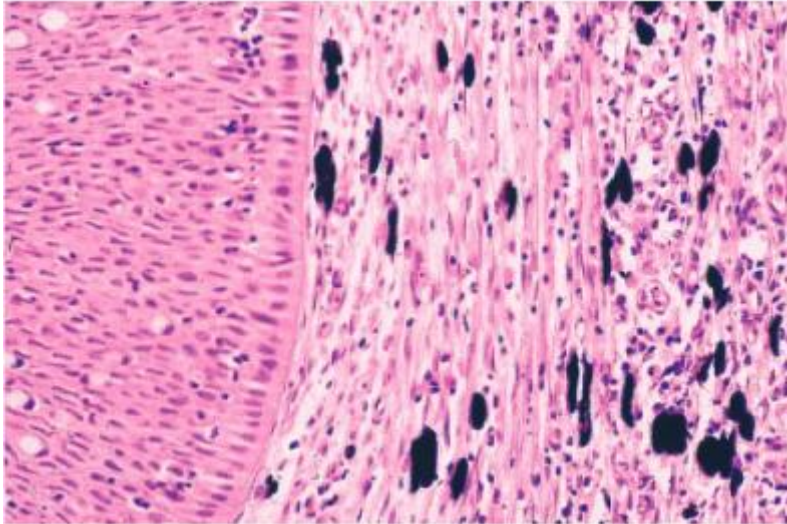
Uz bakterijske infekcije i mnoge virusne infekcije iniciraju zone akutne nekroze u hemopoetskim tkivima riba. To uključuje i melano-makrofagne centre, ali u nimalo većem postotku od ostalih hemopoetskih tkiva. U takvim slučajevima je uočljiva prisutnost melanina u makrofazima koji cirkuliraju krvlju (Roberts, 2001).

Nfati (2000) je pokazao da akutna viralna infekcija živaca nodavirusima ima mali efekt na melano-makrofagne centre, ali da kaheksija, zbog gladovanja, uzrokuje povećani broj centara, nakupljanje hemosiderina i pigmenata.

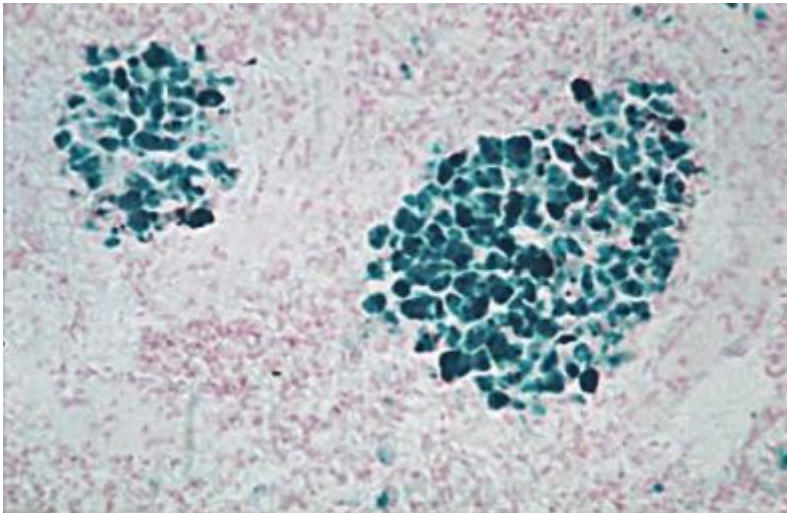
Nekroze melano-makrofagnih centara uz druga tkiva se događaju kod gljivičnih infekcija (Carmichael, 1966).

Kod mnogih vrsta, gdje hepatična periportalna hemopeza nije učestala, može se inducirati ukoliko je bubrežna i jetrena hemopeza kompromitirana. Kada do toga dođe, nastupa formiranje melano-makrofagnih centara u tkivima (Slika 7 i 8) (Roberts, 2001).





Slika 7. – Makrofazi koji sadrže melanin u koži čira koji zacjeljuje (H & E, x200)



Slika 8. – Nakupine hemosiderina u melano-makrofagnim centrima s kroničnom *Vibrio anguillarum* infekcijom (Prussian blue, x75)

## 7. Melano-makrofagni centri kao indikatori okolišnog stresa

Stres povećava rizik podlijevanja bolestima. Stres prate promjene u cirkulaciji bijelih krvnih stanica, padu broju limfocita i porastu broja granulocita, porast broja makrofaga, pad broja hemoblasta i ubrzanom raspadu crvenih krvnih stanica (Peters i Schwarzen, 1985).

Ribe koje obitavaju u zagađenom okolišu mogu ukazivati na pogoršane uvjete okoliša, kroz promijenjenu aktivnost imuno sustava i nespecifičnog sustava obrane. Promijene u veličini melano-makrofagnih centara se događaju fiziološki, kao rezultat starenja, ali se pokazalo da se povećavaju ili smanjuju u jetri i bubrezima s obzirom na zagađivače. To je dovelo do zagovaranja njihovog korištenja kao biomarkera zagađenja okoliša (Kelly-Reay i Weeks-Perkins, 1994).

Duže vrijeme se traže histološki indikatori kvalitete okoliša u procjeni fiziološkog stresa u riba. Iako polutanti mogu direktno uzrokovati smrt riba, sub-letalni efekti su mnogo češći. Određeni fiziološki i patološki odgovori su predloženi kao indikatori zagađenja okoliša. Povećan broj tumora kože i jetre je povezan s porastom broja kroničnih karcinogena. Također ima dokaza da zagađeni vodeni sustavi potiču lučenje jetrenih enzima za metaboliziranje ksenobiotika. Nedostatak ovih odgovora je da ih potiče ograničeni broj induktora, tako da se još traži sistem monitoringa s većim rasponom (Blazer i sur., 1987).

Predloženo je da zbog utjecaja melano-makrofagnih centara u raznim procesima bolesti, gladovanja i izloženosti kemikalijama, oni mogli biti korišteni kao senzitivni indikatori stresnih uvjeta u vodenim ekosustavima. Iako su dostupni i mjerljivi, i mogu se statistički uspoređivati (Agius, 1985; Wolkei sur., 1985, 1995; Blazeri sur., 1987; Pulsford i sur., 1992; Spazier i sur., 1992).

Potrebno je uzeti u obzir stupanj pogreške, zbog reakcije melano-makrofagnih centara na varijabilne parametre. Varijabilni parametri su: dob, spol, temperatura okoliša, gladovanje i veličina jedinke.

## 8. Popis literature

- Agius C., Roberts J.S, 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology *Journal of Fish Diseases* 26: 499–509.
- Agius C, 1985. The melano-macrophage centres in fish. *Fish Immunology* (ed. by M.J. Manning i M.F.Tatner): 85–105.
- 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 agerelated changes. *Developmental and Comparative Immunology* 5: 597–606.
- Agius C, 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *Journal of Zoology* 191: 11–31.
- Agius C, 1979. Aspects of the melano-macrophage centres in fish. PhD Thesis, University of Stirling.
- Ellis A.E, 1980. Antigen-trapping in the spleen and kidney of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Fish Diseases* 3: 413–426.
- Ellis AE, Munro ALS, Roberts RJ, 1976. Defense mechanisms in fish I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Fish Biology* 8: 67-78.
- Ellis A.E, 1974. Aspects of the lymphoid and reticulo-endothelial system in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). PhD Thesis, University of Aberdeen.
- Ferguson HW, 1976a. The relationship between ellipsoids and melano-macrophage centres in the spleen of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Journal of Comparative Pathology* 86: 377-380.
- Ferguson H.W, 1976b. The reticulo-endothelial system of teleost fish with special reference to the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). PhD Thesis, University of Stirling.
- Fiuza T., Silva P., Paula J., Tresvenzol L., Saboia-Morais S, 2009. The effect of crude ethanolextract and fractions of *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) Harley on the hepatopancreas of *Oreochromis niloticus* L. *Biological Research* 42: 153-162



- 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.
- 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.
- Kranz H., 1989. Changes in splenic melano-macrophage centres of dab (*Limanda limanda*) during and after infection with ulcer disease. *Diseases of Aquatic Organisms* 6: 167–173.
- 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.
- Mackmull G, Michaels NA, 1932. Absorption of colloidal carbon from the peritoneal cavity of the teleost, *Tautoglabrus adspersus*. *American Journal of Anatomy* 51: 3-47.
- Peters N., Kohler A., Kranz H., 1987. Liver pathology in fishes from the Lower Elbe as a consequence of pollution. *Diseases of aquatic organisms* 2: 87-97.
- Roberts R.J, 1975. Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease: *The Pathology of Fishes* (ed. By W.E. Ribelin i G. Migaki) : 399–428.
- Romao S., Donatti L., Freitas M., Teixeira J., Kusma J, 2006. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *Hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 441-448.
- Sealy RC, Felix CC, Hyde JS, Swartz HM (1980) Structure and reactivity of melanins: influence of free radicals and metal ions pp. 209-254. U: Pryor WA (ed) *Free Radicals in Biology IV*, Academic Press, New York
- Wolke E.R., Murchelano R. A., Dickstein D.C., George C.J, 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Environmental Contamination and Toxicology* 35: 222-227.
- 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.
- <http://education.vetmed.vt.edu/Curriculum/VM8054/Labs/Lab3/Lab3.htm>

## 9. Sažetak

Ribe, zbog svojeg položaja u hranidbenom lancu, bioakumuliraju u organizmu velike količine zagađivača iz okoliša, zato ih se uzima kao najpogodnije biološke indikatore vodenih ekosustava.

Melano-makrofagni centri su nakupine pigmentiranih stanica koje možemo naći kao dio strome hematopoetskog tkiva u slezeni, bubregu i jetri riba, gmazova i vodozemaca. Izgled melano-makrofagnih centara varira s obzirom na vrstu, i unutar vrste s obzirom na dob, veličinu, spol i fiziološko stanje jedinke, te temperaturu okoliša.

Melano-makrofagni centri sadrže tri osnovne vrste pigmenata: melanin, lipofuscin i hemosiderin. Porijeklo i biokemijska uloga tih pigmenata nisu još poznate.

Melano-makrofagni centri se smatraju filogenetskim prekursorima zametnih centara limfnih čvorova.

Uzima se da je primarna uloga melano-makrofagnih centara uništenje, detoksikacija i recikliranje endogenih i egzogenih materijala.

Melano-makrofagni centri se mogu uzeti kao indikatori zdravlja divljih populacija riba, jer se centri povećavaju u broju i veličini u upalnim procesima, oštećenjima tkiva i odgovorima na infekcije.

Melano-makrofagni centri bi mogli biti korišteni kao senzitivni indikatori stresnih uvjeta u vodenim ekosustavima, zbog svojeg sudjelovanja u raznim procesima bolesti, gladovanja i izloženosti kemikalijama. Potrebno je obraćati pozornost na varijabilne parametre poput dobi, spola i veličine jedinke.

## 10. Summary

Fish, because of their position in the food chain, bioaccumulate in the body large amounts of pollutants from the environment, because of that they are regarded as the most suitable biological indicators of aquatic ecosystems.

Melano-macrophage centers are clusters of pigmented cells that can be found as part of the stroma of hematopoietic tissue in the spleen, kidney and liver of fish, reptiles and amphibians. The appearance of melano-macrophage centers varies according to species, and within species with respect to age, size, sex and physiological state of an individual, and the ambient temperature.

Melano-macrophage centers include three basic types of pigments: melanin, lipofuscin and hemosiderin. Origin and biochemical role of these pigments are not yet known.

Melano-macrophage centers are considered phylogenetic precursors of embryonic centers of lymph nodes.

It is assumed that the primary role of melano-macrophage centers is destruction, detoxification and recycling of endogenous and exogenous materials.

Melano-macrophage centers can be taken as indicators of the health of wild fish populations, because the centers are increasing in number and size in inflammation, tissue damage and responses to infection.

Melano-macrophage centers could be used as sensitive indicators of stress conditions in aquatic ecosystems, due to their participation in the various processes of disease, starvation and exposure to chemicals. It is necessary to pay attention to the variable parameters such as age, sex and size of specimens.