

# Makrofagni centri kao histokemijski pokazatelji stresa

---

**Kovačević, Lucija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2010**

*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://urn.nsk.hr/um:nbn:hr:217:051095>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-25**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO – MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**SEMINARSKI RAD**  
**MAKROFAGNI CENTRI KAO HISTOKEMIJSKI POKAZATELJI**  
**STRESA**

---

MACROPHAGE CENTERS AS HISTOCHEMICAL INDICATORS OF  
STRESS

Lucija Kovačević  
Preddiplomski studij molekularne biologije (Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin  
Zagreb, 2010.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	2
2. NOMENKLATURA.....	4
3. MORFOLOGIJA.....	5
4. PIGMENTI.....	7
4.1. MELANINI.....	8
4.2. LIPOFUSCINI.....	9
4.3. HEMOSIDERIN.....	10
5. FUNKCIJE.....	11
5.1. „ODLAGALIŠTA METABOLI KOG OTPADA“.....	11
5.2. METABOLIZAM ŽELJEZA.....	11
5.3. IMUNOLOŠKI PROCESI .....	12
6. MAKROFAGNI CENTRI I STRES.....	13
6.1. ONE IŠ ENJE OKOLIŠA I STRES.....	13
6.2. MAKROFAGNI CENTRI KAO BIOMARKERI.....	13
7. ZAKLJU AK.....	14
8. SAŽETAK.....	15
9. SUMMARY.....	15
10. LITERATURA.....	15

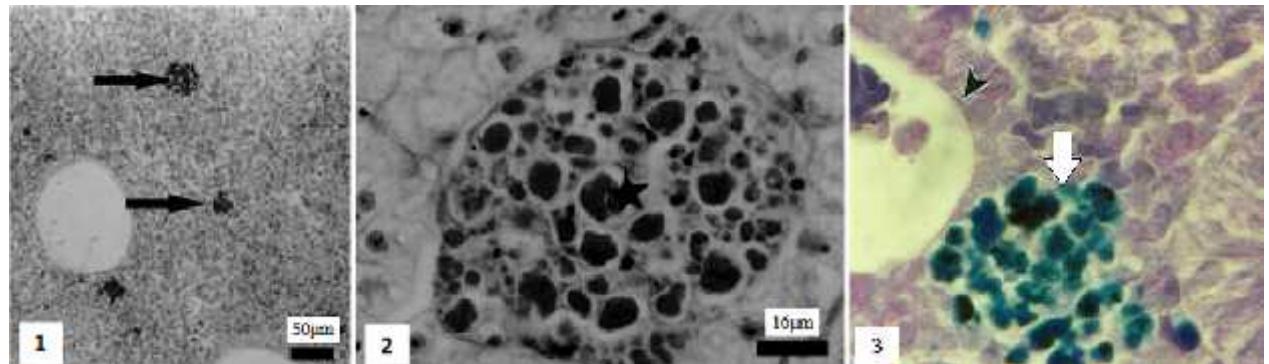
## 1. UVOD

Vodeni ekosustavi predstavljaju važan dio okoliša u kojem živimo te spadaju u najosjetljivije ekosustave na koje ovjekova djelatnost ima najveći negativni utjecaj. Razlog tome leži u injenici da sve kemikalije koje ovjek na bilo koji način otpusti u okoliš u konačnici završe u vodi. Stoga se upravo prema zdravlju vodenih ekosustava najbolje može zaključiti o razini one iščekivanja cijelog okoliša. Osim što ovjek, kao i svako drugo živo生物, ne može živjeti bez vode, 70% ljudske populacije živi u području jima 120 km od obale, a dvije milijarde ljudi ovisi o ribi kao glavnem izvoru hrane (<http://www.globaloceans.org/>). Time se zatvara krug kojim ovjek napoljku u sebe unosi sve štetne kemikalije koje je uveo u okoliš.

Tijekom mnogo godina koristili su se različiti kemikaljski standardizirani testovi za određivanje, kontrolu i regulaciju kvalitete vode. U novije vrijeme istraživači i otkrivaju kako biološki kriterij može nadopunjavati kemijske standarde, da bi se utvrdio status izvora, rijeka, jezera, estuarija i mora. Indikatori stresa na staništu noj i tkivnoj razini takođe se koriste da bi se procjenio u inak zagađivač. Histopatološke karakteristike specifičnih organa odražavaju zdravstveno stanje organizma i predstavljaju skup endogenih i egzogenih utjecaja na organizam kroz dulji vremenski period (Rabbitto i sur., 2005).

Ribe se sve često koriste kao indikatori kvalitete okoliša. Ribe su odlični indikatori, jer postoje različite vrste riba koje ne reagiraju jednako na one iščekivanja. Kao rezultat toga, već prema samom broju različitih vrsta, kao i prema samoj količini riba može se izvesti zaključak o kvaliteti vode. Osim toga, ribe su organizmi koji su osjetljivi na različita zagađivača koja se ne mogu detektirati kemijskim testovima. Tkiva riba su osjetljivi indikatori zagađivača vode jer imaju i sposobnost bioakumulacije teških metala, kako u organskim tako i u anorganskim oblicima (Mela i sur., 2007). Izloženost kemijskim zagađivačima ima može potaknuti nastanak brojnih lezija i ozljeda na različitim organima riba, ali i jetra, slezena i bubrezi predstavljaju glavne ciljne organe. Ti organi su prikladni za različite histopatološke analize kojima se dokazuju oštećenja na tkivima i stanicama (Rabbitto i sur., 2005). Na primjer, lezije u jetri, uzrokovane izloženošću zagađivačima u okolišu takođe se mogu direktno povezati sa lokalnim oštećenjima vode. U novije vrijeme sve više pozornosti pridaje se tzv. melano makrofagnim centrima u organizmu ribe. Opisani su u ribama teleostima, makrofagni centri su zasebne nakupine blisko pakiranih pigmentiranih stanica. U ribama su pronađeni u dermisu, slezeni, jetri, bubrežima, u staništu u kojima se nakupinama uz krvne i limfne žile (Slika 1.).

Imaju različite funkcije, kao npr. recikliranje, pohranu i detoksifikaciju staničnog otpada i egzogenih tvari. Unutar makrofagnih centara pronađeni su i različiti pigmenti sa specifičnim ulogama kao npr. hemosiderin, lipofuscin i cerodi, te različiti melanini.



**Slika 1.** (1) Presjek bubrega u kojem su strelicama pokazani makrofagni centri. Bojano HE. (2) Makrofagni centar u jetri. Bojano Schifftovim reagensom. (3) Tamnoplavo obojani makrofazi makrofagnog centra smještenog uz venulu u bubregu. Crna strelica – venula. Bijela strelica – makrofagni centar. Bojano neutralnim crvenilom i eozinom te tretirano Schmorlovom otopinom. Fotografije preuzete iz Rabbitto i sur., 2005.

Za makrofagne centre je primjetno da, osim što su važni u specifičnom imunološkom odgovoru, mijenjaju svoja svojstva s obzirom na razlike okolišne uvjete te su se iz tog razloga počeli koristiti kao inikatori zdravlja organizma. U tu svrhu najčešće se gledaju promjene u njihovoј veličini i gustoći te količini i sadržaju različitih pigmenta. U ovome radu osvrnut će se na dosadašnje saznanje o morfologiji, sastavu i funkcijama makrofagnih centara, a prije svega na razloge njihova češćeg pojavljivanja kod organizama koji su pod stresom.

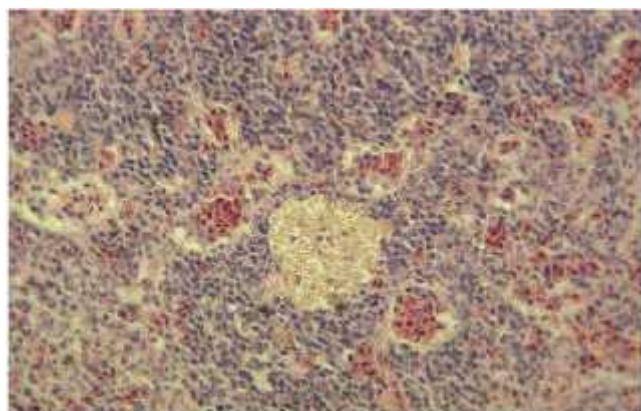
Cilj ovoga rada je predviđati potencijal makrofagnih centara kao budućih standardiziranih testova kojima se može procijeniti zdravstveno stanje organizma, a time razina zagrejanja vodenih ekosustava, te ukazati na moguće smetnje koje se mogu pojaviti prilikom njihova proučavanja, a koje su prvenstveno posljedica injenice da na makrofagne centre mogu utjecati i neki drugi faktori osim samoga stresa.

## **2. NOMENKLATURA**

Blumenthal je zaslužan za prve spoznaje vezane za melano makrofagne centre u ribama, kad je 1908. godine opisao velike vorove makrofaga koji sadrže hemocite i željezne spojeve u slezeni. 1923. godine Jolly je ponovno opisao te nakupine pigmentiranih makrofaga u riba i ponovio Blumenthalovo otkriće da je zelenkasto sme i pigment, koji su oni sadržavali, produkt raspada hemoglobina iz razgrađenih crvenih krvnih stanica (Agius i Roberts, 2003). Izraz melano makrofagni centri (melano macrophage center - MMC) originalno je predložio Roberts u radu Melanin-containing cells of the teleost fish and their relation to disease te ih definirao kao pozitivne na bojanje po Schiffu, Schmorlsu i Ziehl Neelsenu, opštito žute do crne u boji nakupine pigmentiranih stanica unutar hemopoetskih tkiva i tkiva sa kronišnim upalama u fazi sazrijevanja (Roberts, 1975). Ovaj termin je opštito prihvaten od strane ribljih patologa u Evropi i Aziji. U literaturi se mogu pronaći i nazivi „pigmentirani vorovi“ jer sadrže žute, smeđe ili crne pigmente, zatim „nakupine makrofaga“ ili „agregati makrofaga“ što je predloženo kao moderniji termin korišten primarno od strane istraživača u SAD-u. Originalni naziv se od strane većine znanstvenika ipak smatra boljim, jer je važno da se u samom nazivu takvih nakupina uoči različitost u odnosu na ostale nakupine makrofaga. Iz naziva se nedvosmisleno može zaključiti o nekim njihovim osobitostima, kao što je visok sadržaj pigmenata, sposobnost za melanogenezu i njihova uloga kao centara u kojima se odvijaju specifični metabolički procesi. Najvažnije što ih razlikuje od ostalih agregata makrofaga, bilo u ribama, vodozemcima ili gmazovima, je ne samo injenica da su to makrofazi ili da su u nakupinama (što se može dogoditi u mnogim slučajevima u raznim tkivima), već da u sebi uvijek sadrže brojne i specifične pigmente te da su odvojeni od okolnog tkiva u obliku centara sa posebnim metaboličkim funkcijama, koje ne možemo pronaći u ostalih nakupina makrofaga. U ovome radu koristiće se termin „makrofagni centri“ koji se može smatrati skraćenom verzijom originalnog termina melano makrofagni centri.

### 3. MORFOLOGIJA

Makrofagni centri u tkivu obično izgledaju kao vorovi koji oko sebe imaju kapsulu argilofilnog<sup>1</sup> karaktera. Nalaze se nasumično raspoređeni po parenhimu organa, ali ih se često može vidjeti i u blizini žila ili uz elipsoidne strukture koje možemo pronaći u slezeni. Elipsoidne strukture su specijalizirane arteriole ili kapilare koje sadrže plavkaste endotelne stanice okružene omotačem od makrofaga koji su vezani na membranu od vezivnog tkiva. U radu u kojem se proučava ultrastruktura slezene iverke *Scophthalmus maximus* L., pokazano je da makrofagni centri imaju definiranu kapsulu sastavljenu od staničnih i nestaničnih dijelova, koji ih odvajaju od elemenata kojima su okruženi, po čemu se lako razlikuju od ostalih makrofagnih nakupina i elipsoidnih struktura (Agius i Roberts, 2003). Morfološki izgled makrofagnih centara (**Slika 2.**) može varirati ovisno o vrsti organizma, organu u kojem se nalazi, pri čemu različitim fiziološkim uvjetima unutar iste vrste ili ovisno o okolišnim uvjetima.



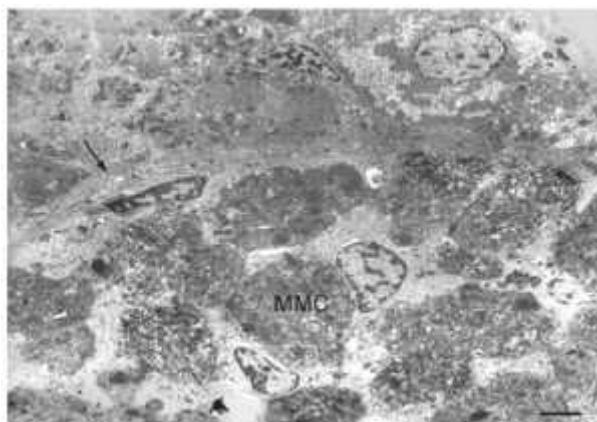
**Slika 2.** Na prerezu kroz normalnu slezenu ribu vide se karakteristične bijedo obojene stanice makrofagnih centara. Bojano HE. Povećanje 60x. Preuzeto iz: Agius i Roberts, 2003.

Iako se izgled ribljih makrofagnih centara pod svjetlosnim mikroskopom neprestano ispodjetka opisuje u literaturi, manje se zna o njihovoj finoj strukturi. Ultrastrukturno takvi centri su vrlo kompleksni. Sama unutrašnjost centara sastoji se od stanica sa izraženim jezgrama i velikim brojem vakuola vezanih na membrane koje u sebi sadrže različite materijale. Stanice su u različitom stupnju degeneracije ispunjene gustim osmiofilnim<sup>2</sup> ostacima koji se pod elektronskim mikroskopom vide kao amorfna heterogena gusta tjelesca (**Slika 3.**).

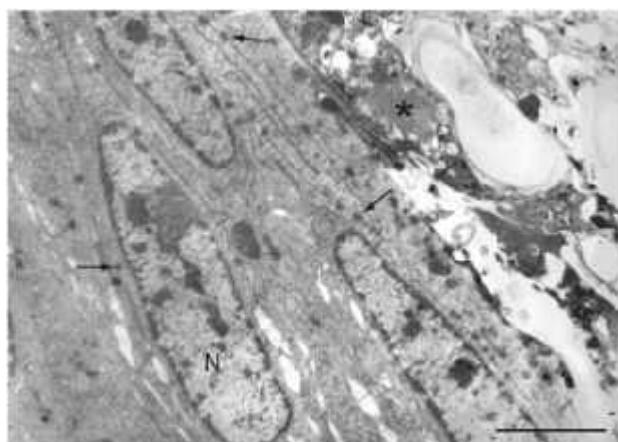
<sup>1</sup> Argilosilne stanice – stanice koje vežu srebrove soli, ali precipitiraju srebro samo u prisutstvu reducirajućeg agensa.

<sup>2</sup> Osmiofili no – ono što se boja osmium tetroksidom, odnosno na sebe veže osmium tetroksid.

Histokemijski testovi pokazali su male koli ine lipida i bazi nih proteina te mnogo neutralnih mukopolidsaharida. Granule pigmenata esto se nalaze u grupama takvih vakuola, što sugerira na fagocitozu. Tijekom ultrastrukturnih prou avanja makrofagnih centara u morskog grge a *Dicentrarchus labrax* L., i komar e *Sparus aurata* L. došlo se do zaklju ka da su u biti sli ni onima u iverka i drugih prethodno prou avanih vrsta (Agius i Roberts, 2003). Kapsula, koja je u nekim slu ajevima dobro vidljiva, može predstavljati na in izolacije makrofagnih centara od okolnih tkiva (**Slika 3.**). Posebno je dobro razvijena u ve ih centara i sastoji se od sloja plosnatih stanica. Te stanice ultrastrukturno sli e fibroblastima, a me usobno su povezane dezmosomima (**Slika 4.**).



**Slika 3.** Makrofagni centar (na slici MMC) koji sadrži amorfna heterogena gusta tjelešca i jezgre stanica. Strelica – kapsula. Bojano HE; crno bijela fotografija. Skala – 3.0  $\mu\text{m}$ . Preuzeto iz: Ribeiro i sur., 2006.



**Slika 4.** Detalj kapsule makrofagnog centra sa stanicama koje sli e fibroblastima me usobno povezanimi dezmosomima (strelice). Jezgra (na slici N). Amorfni materijal unutar makrofagnog centra (zvjezdica). Bojano HE; crno bijela fotografija. Skala – 1.0  $\mu\text{m}$ . Preuzeto iz Ribeiro i sur., 2006.

#### **4. PIGMENTI**

Iz dosada objavljenih podataka jasno je da makrofazi koji se nalaze u makrofagnim centrima u sebi nose razliite tipove pigmenata, esto unutar iste stanice. Koriste i histokemijske tehnike dokazana je prisutnost najmanje etiri tipa pigmenata u makrofazima hemopoetskih tkiva, a to su: melanin, lipogeni pigmenti lipofuscin i ceroid i hematogeni pigment hemosiderin (dokazan prisutstvom feri iona). Iznosi se da je lipofuscin obično najzastupljeniji pigment. Melanin je esto, ali ne i uvijek, u najvećem postotku odmah iza lipofuscina te se time smatra drugom većom pigmentnom komponentom. Hemosiderina može biti u zamjetnim količinama pod određenim uvjetima kao što je hemolitička anemija.

Porijeklo i priroda ovih pigmenata je očito različita. Tako je vrlo vjerojatno da njihova biokemijska funkcija i konačna sudbina u stanici variraju. Hemosiderin je očito povezan s pohranom i recikliranjem željeza, za lipofuscin i ceroid se smatra da u najvećem postotku nastaju peroksidacijom stanica i organeli, dok melanin vjerojatno sudjeluje u obrambenim mehanizmima domaćina (Roberts, 1975). Najvažnije nedavno otvoreno je na to da se, nasuprot klasičnim dogmi, melanosomalna melanogeneza može događati *in situ* u makrofazima unutar makrofagnih centara.

#### **4.1. MELANINI**

Edelstein je 1971. godine definirao melanine kao grupu organskih tvari žute, žuto-smeđe ili crne boje koje nalazimo u biološkim tkivima (Agius i Roberts 2003). To su policiklični polimeri visoke molekularne mase, netopljivi u vodi i otporni na sve tehnike razgradnje osim one pomoću jakih kiselina i baza. Takva definicija uključuje klasične melanine kao i lipofuscine.

Normalno se melanin proizvodi pomoću melanocita koji su embriološki nastali iz stanica neuralnog grebena koje su zadržane unutar okruglog do ovalnog melanosoma. U riba, takva melanogeneza odvija se u dermisu, a pigmentne stanice koje proizvode melanin nazvaju se melanociti. Dugo se smatralo da makrofazi nisu sposobni sintetizirati melaninske pigmente kao melanociti. U počecima istraživanja makrofagnih centara uočeno je da su melaninske granule unutar njih zaštićene slijedećim onima u integumentima i to je navelo na zaključak da je melanin u centrima vjerojatno jednostavno unešen fagocitozom melanosoma u kojima se normalno nalazi melanin (Agius i Agbede, 1984). Doduše, nedavno je otkriveno da to nije nužno tako. U istraživanjima makrofagnih centara u brancinima, zatim nekim drugim morskim vrstama riba i ekvivalentnih struktura u žaba pokazano je da njihovi izolirani makrofazi zaista mogu stvarati melanin *in situ* (Zuasti i sur., 1989). Biokemijski put ovakve melanogeneze se doduše razlikuje u odnosu na klasičnu melanogenezu u melanocitima, posebno u odnosu na prirodu enzima dopa-oksidaze i ja su svojstva sličnija peroksidazi nego tirozinazi.

Melanini su kompleksni polimeri koji mogu upijati i neutralizirati slobodne radikale, katione i druge potencijalno toksične tvari koje nastaju raspadom fagocitiranog staničnog materijala (Zuasti i sur., 1989). Postoji hipoteza o tome da je važna uloga tih polimera u makrofazima neutralizacija slobodnih radikala koji se otpuštaju pri katabolizmu masnih kiselina unešenih u stanice fagocitozom membrana pri niskim temperaturama (Agius i Agbede, 1984). Takođe je moguće da je melanin važan u proizvodnji baktericidnih spojeva, posebno vodikova peroksidu i da njihovi kinonski prekursori takođe mogu biti baktericidni i time od velike važnosti kod heterotermnih organizmima kojima je enzimska aktivnost znatno smanjena pri niskim temperaturama (Wolke, 1985).

## 4.2. LIPOFUSCINI

Lipofuscini ili ceroidi nastaju oksidativnom polimerizacijom polinezasi enih masnih kiselina. Ovi pigmenti mogu se akumulirati u ribama kao rezultat poreme aja u prehrani ili loše prehrane (Agius i Roberts, 2003). Pove anod odlaganje lipofuscina tijekom kaheksije<sup>3</sup> je primje eno i u organima drugih životinjskih vrsta uklju uju i i ovjeka. ini se da formacija lipofuscinskih pigmenata uklju uje peroksidaciju polinezasi enih lipida dobivenih od otpadnih substani nih membrana. Ribe, sa visokim udjelom nezasi enih masnih kiselina i relativno niskim razinama E vitamina u tkivu, posebno su sklone stvaranju lipofuscina. Odlaganje lipofuscina tako er je primje eno u riba koje pokazuju neko od mnoštva mogu ih patoloških stanja uklju uju i nedostatke u prehrani, bakterijske i virusne bolesti i poreme aje uzrokovane toksi nim materijalima.

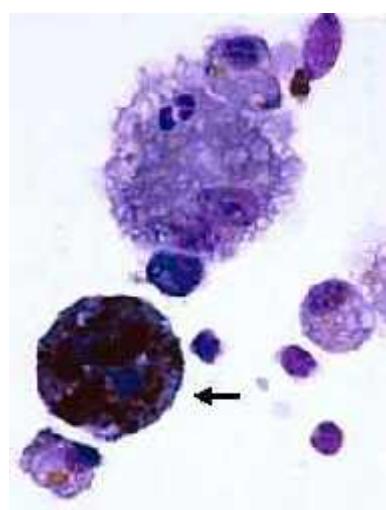
Lipofuscini i ceroidni pigmenti su uzastupni produkti istog oksidativnog procesa i teško je odrediti to nu granicu izme u ta dva produkta degradacije. Zbog toga je potrebno primjeniti niz histokemijskih tehnika da bi ih se moglo identificirati i razlikovati. Lipofuscin se još i naziva pigment „nosi i poderi“ jer se akumulira sa godinama i uništenjem tkiva (Agius i Roberts, 2003). To je najzastupljeniji pigment makrofagnih centara mnogih vrsta riba i široko je rasprostranjen u ovjeka, ptica, gmazova i vodozemaca (Agius i Agbede, 1984). Primje eno je da su glavni izvor lipofuscinskih granula otpadne stani ne komponente. Raspadaju i mitohondriji su kroz proces mitohonsrijske lipidne peroksidacije tako er posebno zastupljeni elementi. Mnoge strukture nalik na mitohondrije uo ene su unutar makrofaga u centrima, s tim da su varirali od prividno netaknutih mitohondrija pa do onih u visokom stupnju degeneracije koji su kasnije sli ili lipofuscinskim granulama.

<sup>3</sup> Kaheksija (cachexia) – Fizi ko stanje uzrokovano razli itim bolestima tijekom kojih dolazi do gubitka tjelesne težine i miši ne mase, anoreksije, iscrpljenosti, stresa te op enitog slabljenja tjelesnog statusa.

#### 4.3. HEMOSIDERIN

Hemosiderin je sme i, granularni, pretežno netopljiv pigment koji sadrži proteinsku željeznu komponentu (**Slika 5.**) U viših životinja, željezo je obično pohranjeno u tijelu u obliku feritina. Kada cijelo tijelo ili pojedinačni organ postane zasjenjen feritinom, željezo se nastavlja pohranjivati intracelularno, ali u formi hemosiderina. Hemosiderin je sastavljen od željeznog iona i proteinske komponente, nastaje katabolizmom hemoglobina iz raspadajućih eritrocita i prema tome je intermedijarni metaboliti produkt koji se pojavljuje tijekom recikliranja komponenti eritropoeze.

Tako da postoje i dva moguća mehanizma kojima se mogu stvoriti većinski hemosiderina: pojedini katabolizam ošteneih eritrocita i/ili povremeno zadržavanje željeza od strane makrofagnih centara kao jedan od zaštitnih mehanizama. Hemosiderin se normalno može pronaći u bliskoj asocijaciji sa lipofuscinskim granulama (Agius i Agbede 1984). U teleosta je primjereno da je raspodjela hemosiderina većinom ograničena na makrofagne centre u slezeni. Mnoga istraživanja sugeriraju da u riba koje su zdrave ili bolesne samo centri u slezeni sudjeluju u metabolizmu hemosiderina (Agius i Agbede, 1984). Primjereno je znatno povremeno hemosiderina u makrofagnim centrima nakon hemolitičke anemije i nakon dugotrajnog izglađnjivanja. Količina hemosiderina u slezeni je uobičajeno mala pa je prema tome akumulacija ovog pigmenta u slezeni i/ili ostalim organizma poznata kao hemosideroza. Prema tome nedvojbeno upućuje na neke patološke procese (Wolke, 1985).



**Slika 5.** Mikrofotografija makrofaga koji u sebi sadrže pigment hemosiderin smeđe boje (strelica). Bojanje po Wrightu. Povećanje 500x. Preuzeto iz Veterinary Clinical Pathology Image Database (<http://www.medvet.umontreal.ca/clinpath/banq-im/menuE.htm>)

## **5. FUNKCIJE**

Makrofagni centri sudjeluju u normalnim fiziološkim procesima te prilikom obrane organizma od bilo kojeg uzroka oštećenja. Funkcija koje se pridaju makrofagnim centrima ima mnogo, kompleksne su i još nisu u potpunosti razriješene. Mogu se podijeliti u tri glavne skupine: (5.1.) unos, pohrana, razgradnja ili detoksifikacija egzogenih i endogenih tvari; (5.2.) metabolizam željeza; i (5.3.) odgovori na upale i imunološki odgovori uključujući i humoralni odgovor.

### **5.1. „ODLAGALIŠTA METABOLIČKOG OTPADA“**

U samim makrofagnim centrima makrofazi su gusto pakirani i tvore velike nakupine koje se povećavaju nakon aktivne nespecifične fagocitoze heterogenog materijala kao što su ostaci stanica, posebno eritrocita, melaninski pigmenti, hemosiderinske granule, ostaci lipofuscina, sitne lipidne kapljice, obične nakupine proteina i neutralni mukopolisaharidi. Prema tome smatra se da je jedna od glavnih funkcija makrofagnih centara kao „metaboličkih smetlišta“ odnosno odlagališta gdje se pohranjuju ostaci i dijelovi oštećenih stanica. Za otkrivati je da se struktura koja ima ovakvu funkciju povećava u veličini i broju kao riba stari i kako se razgradi u tkiva. Ovakve funkcije makrofaga su primjene u raznih vrsta riba kojima je peritonealno injektirana tinta, torium hidroksid ili torotrast, anionski i kationizirani feritin, serumski albumin goveda, patogeni mikroorganizmi i antigeni cjepiva (Agius i Roberts 2003). Sve injektirane tvari su inicijalno bile raspršene u krvotoku i tkivima. Zatim su maknute iz krvi koja cirkulira pomoću sinusoidnih makrofaga te naknadno pronađene samo u makrofaznim centrima.

### **5.2. METABOLIZAM ŽELJEZA**

U viših životinja željezo je iznimno važno jer u kompleksu s proteinima (hemoglobin) omogućava prijenos kisika do svih stanica u organizmu. Željezo se može pohranjivati intracelularno u obliku hemosiderina koji nastaje razgradnjom hemoglobina iz raspadajućih eritrocita. Na taj način omogućava je pohrana i recikliranje željeza što predstavlja jednu od normalnih fizioloških funkcija koje obavljaju makrofagni centri. U istraživanju u kojem su se proučavale funkcije makrofagnih centara inducirana je fagocitoza eritrocita u slezeni nakon čega je pokazano da se pohrana željeza u njima uvelike povećala (Agius i Agbede 1984).

U riba kojima je odstranjena slezena ulogu pohrane željeza preuzimaju makrofagni centri u bubrežima. To se slaže s injenicom da se osnovne razlike između makrofagnih centara u selzeni i bubrežima upravo odnose na prisutstvo hemosiderina (Herraez i Zapata 1986). Povećano zadržavanje željeza od strane makrofagnih centara može predstavljati jedan od zaštitnih mehanizama i upućuje na patološke procese.

### 5.3. IMUNOLOŠKI PROCESI

Smatra se da se u makrofaznim centrima odvijaju imunološki procesi povezani s procesiranjem antiga. Uloga makrofagnih centara u prepoznavanju antiga od strane imunološkog sustava pretpostavljena je nakon što se pokazalo da mali cirkulirajući limfociti migriraju u makrofagne centre. Prema tome bi makrofagni centri mogli biti lokaliteti u kojima se antigen interagira s imunološkim sustavom. Novija istraživanja potvrđuju pretpostavke povezanosti makrofagnih centara sa limfoidnim stanicama te dalje pretpostavljaju da su makrofazni centri glavna mesta dugotrajnog zadržavanja antiga (Agius i Roberts 2003).

Kliničke studije su pokazale povezanost makrofagnih centara sa nizom visoko otpornih intracelularnih bakterija kao što su mikobakterije i renibakterije ili paraziti tipa *Myxobolus spp.* (Agius i Roberts 2003). Najdetaljniji rad na ovom području bavi se ulogom makrofagnih centara u razvoju imunološkog odgovora na bakterijske antigene. U istraživanju se pokazalo da se nakon intraperitonealne injekcije vakcinalnih elemenata bakterije *Aeromonas salmonicida* komponente lipopolisaharida rasprše u abdominalnim tkivima. No, 16 dana nakon izlaganja dijelovi bakterije predominantno su se nalazile u makrofaznim centrima slezene i bubrega (Press i sur., 1996). Ta pojava povezana je s kompleksom za hvatanje koji je dio imunološkog sustava i sa proizvodnjom velike količine antitijela. Zaključeno je da je zadržavanje antiga i nakon toga aktivacija makrofaga u makrofaznim centrima od životne važnosti da bi se postigla imunološka memorija.

## **6. MAKROFAGNI CENTRI I STRES**

### **6.1. ONE IŠ ENJE OKOLIŠA I STRES**

Kao i kod viših kralježnjaka, sam stres ukazuje na podležnost riba bolestima. Ribe koje nastanjuju zaga eni okoliš mogu reflektirati loše okolišne uvjete kroz promjene imunološkog sustava ili promjene u razli itim nespecifi nim obranama. Ovaj efekt popra en je promjenama u bijelim krvnim stanicama: broj limfocita opada dok se broj granulocita pove ava. Najistaknutiji efekti su porast gusto e makrofagnih stanica, redukcija broja hemoblasta i limfocita i pove ana razgradnja crvenih krvnih stanica. Provela su se brojna istraživanja tijekom prošlog desetlje a u svrhu pronalaženja histoloških indikatora kvalitete okoliša pomo u istraživanja fiziološkog stresa u riba. Iako okolišni zaga iva i mogu uzrokovati direktnu smrtnost riba, eš i su subletalni efekti. Razli iti fiziološki i patološki odgovori predloženi su kao inikatori kontaminacije okoliša. Visoka pojavnost epidermalnih tumora i tumora u jetri u osjetljivih vrsta povezani su sa prisutnoš u kroni nih karcinogena. Tako er postoje dokazi da se u riba iz zaga enih vodenih sustava aktiviraju brojni enzimi u jetri koji služe za metaboliziranje ksenobiotika. Problem kod ovakvih tipova odgovora na stres je što su izazvani relativno malim i ograni enim brojem spojeva. Zbog toga je potrebno prona i široko primjenjive i u inkovite sustave kojima bi se moglo pratiti zdravlje riba u odnosu na op enitu i nespecifi nu zaga enost okoliša. Wolke i drugi istaknuti znanstvenici koji se bave ovom problematikom su se uvjerljivo zalagali za korištenje makrofagnih centara kao biomarkera za mjerjenje efekata izloženosti kemikalijama u okolišu.

### **6.2. MAKROFAGNI CENTARI KAO BIOMARKERI**

Uklju enost makrofagnih centara u razli ite procese tijekom bolesti, promjene koje se javljaju pri izgladnjivanju ili izloženosti kemikalijama indicira da ovi centri mogu biti osjetljivi indikatori stresnih uvjeta u vodenom okolišu. Makrofagni centri pove avaju frekvenciju i veli inu u uvjetima okolišnog stresa i predloženi su kao pouzdani biomarkeri za kvalitetu vode na razini pojave deoksigenacije i zaga enja.

Pozitivne strane ovakvih vrsta histoloških analiza je to što su makrofagni centri strukture kojese mogu prona i u bilo kojoj ribljoj vrsti, lako su dostupni, te se mogu odmah mjeriti i biti statisti ki uspore eni koriste i informati ke programe za analizu slike.

Postoji i nekoliko svojstava makrofagnih centara koja ometaju njihovu upotrebu kao biomarkera, a na koje bi se trebala obratiti posebna pažnja. Ukoliko se radi o biomonitoringu okoliša, što uključuje uzimanje uzoraka (riba) iz prirodnog okoliša, tu prije svega spada faktor kretanja riba u okolišu i mijenjanja staništa. Da bi se izbjegli pogrešni rezultati potrebno je prije svega dobro proučiti ponašanje vrste ribe na kojoj se istraživanje radi i pri tome posebno obratiti pažnju na uzorce po kojima se ribe kreću u staništu. U tu svrhu ponekad se koriste tehnike prostorne analize da bi se istražili različiti scenariji gibanja riba. Također, takvo što može se premostiti ukoliko se bazira na to da se biomonitoring provodi npr. tijekom ljetnog perioda kad većina ribljih vrsta ne migrira. Kod pokusa koji se izvode u kontroliranim uvjetima (u akvarijima s točno određenom količinom inom i svojstvima vode te režimom prehrane) s prethodnom aklimatizacijom nasumično uzetih jedinki iz okoliša ovakvi problemi mogu se zanemariti. Također je potrebno obratiti pažnju prilikom samog uzimanja uzoraka jer ono na ribama često dovodi do stvaranja dodatnog stresa i utječe na konačne rezultate ispitivanja. Tijekom različitih istraživanja dobiveni rezultati upravljivali su i na različitu ulogu makrofagnih centara ovisno o tkivu u kojem se nalaze. Zaključeno je da se makrofagni centri u slezeni pojaveju prilikom opnenitijeg stresa za razliku od onih u jetri. Zbog toga bi trebalo obratiti pažnju na to koji se organ proučava i utvrditi u kojem se organu makrofagni centri pojaveju s obzirom na općenito one čiji je okoliš da bi se test standardizirao i mogao pouzdano primjenjivati na različite vrstama riba.

## 7. ZAKLJUČAK

Makrofagni centri su sastavni dijelovi organa velikog broja vrsta riba teleosta. Čini se da je njihova sposobnost proliferacije zapravo glavni odgovor na stres uzrokovan patogenima, parazitima, vrućinom, kemikalijama, izglađnjivanjem, raspadom tkiva i pojavom tumora. Makrofagni centri smatraju se pogodnim kao anatomske, histološke i citološke biomarkeri jer je utvrđeno da je promjena u broju, veličini i sastavu pigmenata u korelaciji sa zdravljem riba i zagačenjem okoliša. Njihov značaj leži u njihovoj sveprisutnosti, dostupnosti i jednostavnosti mjerjenja. Dosada je bilo samo nekoliko detaljnijih istraživanja kojima se kontrolirano pokušalo rekonstruirati događaje koji dovode do stvaranja makrofagnih centara ili u kojima se proučava kinetika njihovog nastanka prilikom izlaganja zagačivača za koje je poznato da su općenito prisutni u vodenim ekosustavima. U budućnosti bi se trebalo nastaviti sa takvim istraživanjima što bi omogućilo detaljniju procjenu razine uinkovitosti makrofagnih centara kao biomarkera ribljeg zdravlja i samog one čije je okoliš.

## **8. SAŽETAK**

Makrofagni centri, tako er poznati i kao melano makrofagni centri, su nakupine karakteristi nih pigmentiranih stanica unutar tkiva heterotermnih kralježnjaka. U riba se obično nalaze u stromi hemopoetskog tkiva slezene, jetre i bubrega gdje se pomoću različitih histokemijskih metoda proučava njihov izgled i sastav. Makrofagni centri obično sadrže različite pigmente uključujući i melanin. Broj različitih pigmenta i njihov volumen povećavaju se u starijih jedinki ili u prisutnosti različitih bolesti. Nedavna istraživanja sugeriraju da su to prvenstveno mjesto primarne melanogeneze nego li samo pohrane melanina. Makrofagni centri povećavaju frekvenciju i veličinu u uvjetima okolišnog stresa te time ukazuju na zdravstveno stanje jedinke i predloženi su kao pouzdani biomarkeri za kvalitetu vode.

## **9. SUMMARY**

Macrophage centers, also known as Melano-macrophage centres, are distinctive groupings of pigment-containing cells within the tissues of heterothermic vertebrates. In fish they are normally located in the stroma of the haemopoietic tissue of the spleen and the kidney and are studied using variety of histochemical methods. Melano-macrophage centres usually contain a variety of pigments, including melanins, and these increase in range and volume in older fish or in the presence of different diseases. Recent work suggests that they are a site of primary melanogenesis rather than mere storage. Melano-macrophage centres increase in size or frequency in conditions of environmental stress and have been suggested as reliable biomarkers for water quality.

## **10. LITERATURA**

- Agius C. i 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. i Roberts R.J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499–509.
- Herraeza M.P. i Zapata A.G. 1986. Structure and function of the melano - macrophage centres of the goldfish *Carassius auratus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 12, 117-126.
- Mela M. i sur. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 426–435.
- Press C., Evensen O., Reitan L.J. i Landsverk T. 1996. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon *Salmo salar* L., following different routes of administration. *Journal of Fish Diseases* 19, 215–224.
- Rabbitto I.S. i sur. 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 147–156.
- Ribeiro V. M. A. i sur. 2006. Ultrastructural changes in female hepatocytes during ovarian maturation of *Steindachnerina insculpta* (Pisces: Curimatidae). *Brazilian journal of biology* 66.
- 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.
- Zuasti A., Jara J.R., Ferrer C. i Solano F. 1989. Occurrence of melanin granules and melano synthesis in the kidney of *Sparus auratus*. *Pigment Cell Research* 2, 93–99.

Wolke R.E., Murchelano R.A., Dickstein C. i 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.

<http://www.globaloceans.org/>

(Global Forum on Oceans, Coasts and Islands)

<http://www.medvet.umontreal.ca/clinpath/banq-im/menuE.htm>

(Veterinary Clinical Pathology Image Database)