

# 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:051095>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



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 Kova evi  
Preddiplomski studij molekularne biologije (Undergraduate Study of Molecular Biology)  
Mentor: prof. dr. sc. Gordana Lackovi -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

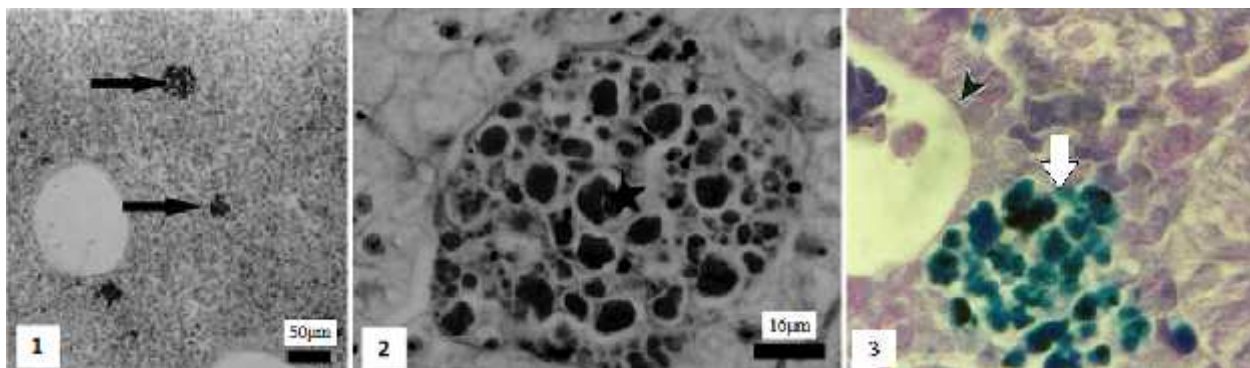
## 1. UVOD

Vodeni ekosustavi predstavljaju važan dio okoliša u kojem živimo te spadaju u najosjetljivije ekosustave na koje ovjekova djelatnost ima najveći i negativni utjecaj. Razlog tome leži u činjenici 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 onečišćenja cijelog okoliša. Osim što ovjek, kao i svako drugo živo biće, ne može živjeti bez vode, 70% ljudske populacije živi u području jima 120 km od obale, a dvije milijarde ljudi ovisi o ribi kao glavnom izvoru hrane (<http://www.globaloceans.org/>). Time se zatvara krug kojim ovjek naposljetku u sebe unosi sve štetne kemikalije koje je uveo u okoliš.

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

Ribe se već se koriste kao indikatori kvalitete okoliša. Ribe su odlični indikatori, jer postoje različite vrste riba koje ne reagiraju jednako na onečišćenje. 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 zagađivanja koja se ne mogu detektirati kemijskim testovima. Tkiva riba su osjetljivi indikatori zagađivanja vode jer imaju i sposobnost bioakumulacije teških metala, kako u organskim tako i u anorganskim oblicima (Mela i sur., 2007). Izloženost kemijskim zagađivačima može potaknuti nastanak brojnih lezija i ozljeda na različitim organima riba, ali jetra, slezena i bubrezi predstavljaju glavne ciljne organe. Ti organi su prikladni za različite histopatološke analize kojima se dokazuju oštećenja na tkivima i stanicama (Rabitto i sur., 2005). Na primjer, lezije u jetri, uzrokovane izloženosti zagađivačima u okolišu često se mogu direktno povezati sa lokalnim onečišćenjem vode. U novije vrijeme sve više pozornosti pridaje se tzv. melano makrofagnim centrima u organima riba. Opisani su u ribama teleostima, makrofagni centri su zasebne nakupine blisko pakiranih pigmentiranih stanica. U ribama su pronađeni u dermisu, slezeni, jetri, bubrezima, u staničnim nakupinama uz krvne i limfne žile (**Slika 1.**).

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



**Slika 1.** (1) Presjek bubrega u kojem su strelicama pokazani makrofagni centri. Bojano HE. (2) Makrofagni centar u jetri. Bojano Schiffovim 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 Rabitto i sur., 2005.

Za makrofagne centre je primjećeno da, osim što su važni u specifičnom imunološkom odgovoru, mijenjaju svoja svojstva s obzirom na različite okolišne uvjete te su se iz tog razloga poželjno koristiti kao inikatori zdravlja organizma. U tu svrhu najčešće se gledaju promjene u njihovoj veličini i gustoći te količini i sadržaju različitih pigmenta. U ovom radu osvrnuti su 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.

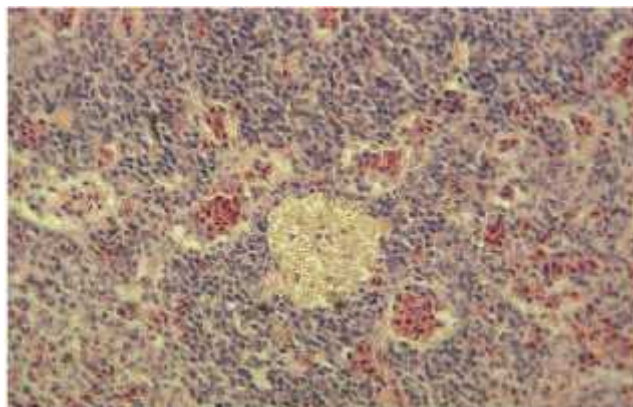
Cilj ovog rada je predložiti potencijal makrofagnih centara kao budućih standardiziranih testova kojima se može procijeniti zdravstveno stanje organizma, a time razina zagađenja vodenih ekosustava, te ukazati na moguće smetnje koje se mogu pojaviti prilikom njihovog proučavanja, a koje su prvenstveno posljedica činjenice 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 smeđi 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, općenito žute do crne u boji nakupine pigmentiranih stanica unutar hemopoetskih tkiva i tkiva sa kroničnim upalama u fazi sazrijevanja (Roberts, 1975). Ovaj termin je općenito prihvaćen od strane ribljih patologa u Europi 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 pigmenta, 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 činjenica 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 ostalim nakupinama makrofaga. U ovom radu koristit će 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 plosnate endotelne stanice okružene omotačem od makrofaga koji su vezani na membranu od vezivnog tkiva. U radu u kojem se proučavala ultrastruktura slezene iverka *Scophthalmus maximus* L., pokazano je da makrofagni centri imaju definiranu kapsulu sastavljenu od stanica i nestanica 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 različitim fiziološkim uvjetima unutar iste vrste ili ovisno o okolišnim uvjetima.



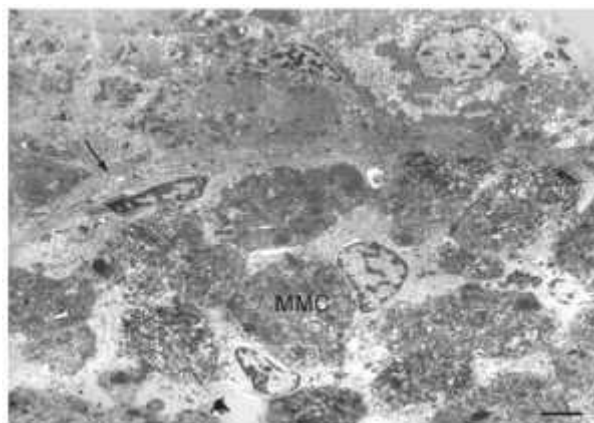
**Slika 2.** Na prerezu kroz normalnu slezenu ribe lista vide se karakteristične blijedo obojene stanice makrofagnih centara. Bojano HE. Povećanje 60x. Preuzeto iz: Agius i Roberts, 2003.

Iako se izgled ribljih makrofagnih centara pod svjetlosnim mikroskopom neprestano ispostavlja 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 različitim stupnjima degeneracije ispunjene gustim osmiofilnim<sup>2</sup> ostacima koji se pod elektronskim mikroskopom vide kao amorfna heterogena gusta tjelešca (**Slika 3.**).

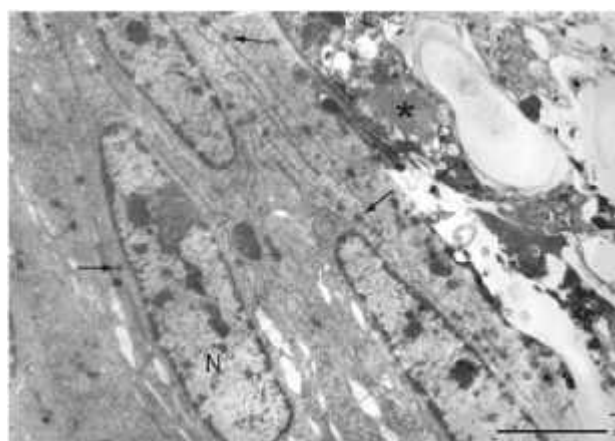
<sup>1</sup> Argilofilne stanice – stanice koje vežu srebrove soli, ali precipitiraju srebro samo u prisutstvu reducirajućeg agensa.

<sup>2</sup> Osmiofilno – ono što se boja osmium tetroksidom, odnosno na sebe veže osmium tetroksid.

Histokemijski testovi pokazali su male količine lipida i bazičnih proteina te mnogo neutralnih mukopolisaharida. Granule pigmentirane esto se nalaze u grupama takvih vakuola, što sugerira na fagocitozu. Tijekom ultrastrukturnih proučavanja makrofagnih centara u morskog grgeša *Dicentrarchus labrax* L., i komara *Sparus aurata* L. došlo se do zaključka da su u biti slični onima u iverka i drugih prethodno proučavanih vrsta (Agius i Roberts, 2003). Kapsula, koja je u nekim slučajevima dobro vidljiva, može predstavljati način izolacije makrofagnih centara od okolnih tkiva (**Slika 3.**). Posebno je dobro razvijena u većini centara i sastoji se od sloja plosnatih stanica. Te stanice ultrastrukturno slične fibroblastima, a međusobno su povezane desmosomima (**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 slične fibroblastima međusobno povezanimi desmosomima (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 različite 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). Inisi se da je lipofuscin obino najzastupljeniji pigment. Melanin je esto, ali ne i uvijek, u najve em postotku odmah iza lipofuscina te se time smatra drugom ve om pigmentnom komponentom. Hemosiderina može biti u zamjetnim koli inama pod odre enim uvjetima kao što je hemoliti ka anemija.

Porijeklo i priroda ovih pigmenata je o ito različita. Tako er je vrlo vjerojatno da njihova biokemijska funkcija i kona na sudbina u stanici variraju. Hemosiderin je o ito povezan s pohranom i recikliranjem željeza, za lipofuscin i ceroid se smatra da u najve em postotku nastaju peroksidacijom stanica i organela, dok melanin vjerojatno sudjeluje u obrambenim mehanizmima domatina (Roberts, 1975). Najvažnije nedavno otkr e upuje na to da se, nasuprot klasi noj dogmi, melanosomalna melanogeneza može doga ati *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 policikli i polimeri visoke molekularne mase, netopljivi u većini otapala i otporni na sve tehnike razgradnje osim one pomoću jakih kiselina i baza. Takva definicija uključuje klasu 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 nazivaju se melanociti. Dugo se smatralo da makrofazi nisu sposobni sintetizirati melaninske pigmente kao melanociti. U poslijednjim istraživanjima makrofagnih centara utvrđeno je da su melaninske granule unutar njih zaista prisutne i to je navelo na zaključak da je melanin u centrima vjerojatno jednostavno unesen 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-oksidge i 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 unesenih u stanicu fagocitozom membrana pri niskim temperaturama (Agius i Agbede, 1984). Također je moguće da je melanin važan u proizvodnji baktericidnih spojeva, posebno vodikova peroksida i da njihovi kinonski prekursori također 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 poremećaja u prehrani ili loše prehrane (Agius i Roberts, 2003). Povećano odlaganje lipofuscina tijekom kaheksije<sup>3</sup> je primjećeno i u organima drugih životinjskih vrsta uključujući i ptice. Čini se da formacija lipofuscinskih pigmenta uključuje peroksidaciju polinezasi enih lipida dobivenih od otpadnih substanci njihove membrana. Ribe, sa visokim udjelom nezasićenih masnih kiselina i relativno niskim razinama E vitamina u tkivu, posebno su sklone stvaranju lipofuscina. Odlaganje lipofuscina također je primjećeno u riba koje pokazuju neko od mnoštva mogućih patoloških stanja uključujući i nedostatke u prehrani, bakterijske i virusne bolesti i poremećaje uzrokovane toksičnim materijalima.

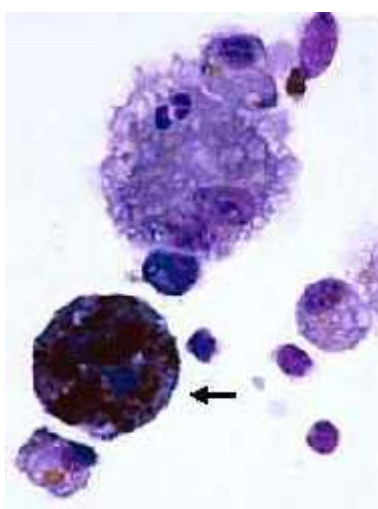
Lipofuscini i ceroidni pigmenti su uzastupni produkti istog oksidativnog procesa i teško je odrediti točnu granicu između ta dva produkta degradacije. Zbog toga je potrebno primijeniti niz histokemijskih tehnika da bi ih se moglo identificirati i razlikovati. Lipofuscin se još i naziva pigment „nosi 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 pticama, gmazova i vodozemaca (Agius i Agbede, 1984). Primjećeno je da su glavni izvor lipofuscinskih granula otpadne stanične komponente. Raspadajućim mitohondriji su kroz proces mitohondrijske lipidne peroksidacije također posebno zastupljeni elementi. Mnoge strukture nalik na mitohondrije uočene su unutar makrofaga u centrima, s tim da su varirali od prividno netaknutih mitohondrija pa do onih u visokom stupnju degeneracije koji su kasnije slični ili lipofuscinskim granulama.

<sup>3</sup> Kaheksija (cachexia) – Fizičko stanje uzrokovano različitim bolestima tijekom kojih dolazi do gubitka tjelesne težine i mišićne mase, anoreksije, iscrpljenosti, stresa te općenitog slabljenja tjelesnog statusa.

### 4.3. HEMOSIDERIN

Hemosiderin je smeđi, 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 pojedina ni organ postane zasićen 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 metabolički produkt koji se pojavljuje tijekom recikliranja komponenti eritropoeze.

Također postoje i dva moguća mehanizma kojima se mogu stvoriti veće količine hemosiderina: pojačani katabolizam oštećenih eritrocita i/ili povećano 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 primjećeno 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). Primjećeno je znatno povećanje hemosiderina u makrofagnim centrima nakon hemolitičke anemije i nakon dugotrajnog izgladnjivanja. Količina hemosiderina u slezeni je uobičajeno mala pa je prema tome akumulacija ovog pigmenta u slezeni i/ili ostalim organima 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 uzročnika 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 METABOLITIKOG 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 „metabolitiki smetlišta“ odnosno odlagališta gdje se pohranjuju ostaci i dijelovi oštećenih stanica. Zanimljivo je da se struktura koja ima ovakvu funkciju povećava u veličini i broju kao riba starija i kako se razgrađuju tkiva. Ovakve funkcije makrofaga su primjerene u raznim vrstama 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 pronalazene samo u makrofagnim 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 raspada ih eritrocita. Na taj način omogućena 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 bubrezima. To se slaže s činjenicom da se osnovne razlike između u makrofagnih centara u slezeni i bubrezima 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 antigena. Uloga makrofagnih centara u prepoznavanju antigena od strane imunološkog sustava pretpostavljena je nakon što se pokazalo da mali cirkuliraju i limfociti migriraju u makrofagne centre. Prema tome bi makrofagni centri mogli biti lokaliteti u kojima uhvaćeni antigeni interagiraju s imunološkim sustavom. Novija istraživanja potvrđuju pretpostavke povezanosti makrofagnih centara sa limfoidnim stanicama te dalje pretpostavljaju da su makrofazni centri glavna mjesta dugotrajnog zadržavanja antigena (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 *Mycobolus 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. Nakon 16 dana nakon izlaganja dijelovi bakterije predominantno su se nalazile u makrofagnim centrima slezene i bubrega (Press i sur., 1996). Ta pojava povezana je s kompleksom za hvatanje koji je dio imunološkog sustava i s proizvodnjom velike količine antitijela. Zaključeno je da je zadržavanje antigena i nakon toga aktivacija makrofaga u makrofagnim 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. Riba koje nastanjuju zagađeni okoliš mogu reflektirati loše okolišne uvjete kroz promjene imunološkog sustava ili promjene u različitim nespecifičnim obranama. Ovaj efekt popraćen je promjenama u bijelim krvnim stanicama: broj limfocita opada dok se broj granulocita povećava. Najistaknutiji efekti su porast gustoće makrofagnih stanica, redukcija broja hemoblasta i limfocita i povećana razgradnja crvenih krvnih stanica. Provela su se brojna istraživanja tijekom prošlog desetljeća u svrhu pronalazjenja histoloških indikatora kvalitete okoliša pomoću istraživanja fiziološkog stresa u riba. Iako okolišni zagađivači mogu uzrokovati direktnu smrtnost riba, već i su subletalni efekti. Različiti fiziološki i patološki odgovori predloženi su kao indikatori kontaminacije okoliša. Visoka pojavnost epidermalnih tumora i tumora u jetri u osjetljivih vrsta povezani su sa prisutnošću u kroničnih karcinogena. Također postoje dokazi da se u riba iz zagađenih 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 ograničenim brojem spojeva. Zbog toga je potrebno pronaći široko primjenjive i u inkovite sustave kojima bi se moglo pratiti zdravlje riba u odnosu na općenitu i nespecifičnu zagađenost okoliša. Wolke i drugi istaknuti znanstvenici koji se bave ovom problematikom su se uvjerljivo zalagali za korištenje makrofagnih centara kao biomarkera za mjerenje efekata izloženosti kemikalijama u okolišu.

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

Uključnost makrofagnih centara u različite 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 povećavaju frekvenciju i veličinu u uvjetima okolišnog stresa i predloženi su kao pouzdani biomarkeri za kvalitetu vode na razini pojave deoksigenacije i zagađenja.

Pozitivne strane ovakvih vrsta histoloških analiza je to što su makrofagni centri strukture kojese mogu pronaći u bilo kojoj ribljoj vrsti, lako su dostupni, te se mogu odmah mjeriti i biti statistički uspoređeni koristeći informatičke 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 uzorke 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 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 upućivali su i na različitu ulogu makrofagnih centara ovisno o tkivu u kojem se nalaze. Zaključeno je da se makrofagni centri u slezeni pojavljuju prilikom općenitijeg 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 pojavljuju s obzirom na općenitost one išćenje okoliša da bi se test standardizirao i mogao pouzdano primjenjivati na različitim 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, vršnom, kemikalijama, izgladnjivanjem, raspadom tkiva i pojavom tumora. Makrofagni centri smatraju se pogodnima kao anatomski, histološki i citološki biomarkeri jer je utvrđeno da je promjena u broju, veličini i sastavu pigmenata u korelaciji sa zdravljem riba i zagađenjem okoliša. Njihov značaj leži u njihovoj sveprisutnosti, dostupnosti i jednostavnosti mjerenja. Dosada je bilo samo nekoliko detaljnih istraživanja kojima se kontrolirano pokušalo rekonstruirati događaje koji dovode do stvaranja makrofagnih centara ili u kojima se proučavala kinetika njihovog nastanka prilikom izlaganja zagađivača ima 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 u inkovitosti makrofagnih centara kao biomarkera ribljeg zdravlja i samog one išćenja okoliša.



## 8. SAŽETAK

Makrofagni centri, također poznati i kao melano makrofagni centri, su nakupine karakterističnih 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 mjesta 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 a 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 Zapataa 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)