

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Ěma Plačko

UTJECAJ ŹELJEZA NA SADRŹAJ GLIKOGENA
U JETRI ŹARANA (*Cyprinus carpio* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2011.

Ovaj rad, izrađen u laboratoriju Zoologijskog zavoda, pod vodstvom prof. dr. sc. Gordane Lacković-Venturin, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem mojoj mentorici, prof. dr. sc. Gordani Lacković-Venturin, na pomoći, razumijevanju i fleksibilnosti prilikom izrade ovog diplomskog rada. Puno hvala asistentici, dr. sc. Gordani Gregorović, na svesrdnoj podršci, vrijednim savjetima, razumijevanju i satima utrošenim na pomoć pri izradi ovog rada. Hvala i gospođi Zrinki Benčini na pomoći pri izradi i bojenju preparata te moralnoj potpori i razgovorima zahvaljujući kojima je vrijeme brže i ugodnije prošlo. Hvala cijelom Zavodu na razumijevanju i vrijednom iskustvu koje sam stekla radeći u laboratoriju.

Posebno i najveće hvala želim uputiti svojoj voljenoj obitelji i prekrasnom dečku na razumijevanju i brizi tijekom studija i dugih noći koje sam provela učeći i pišući ovaj rad. Hvala na svesrdnoj podršci koja mi je omogućila da završim studij i postanem ono što sam željela.

Puno hvala Nini, Ani, Petri S., Petri Ž., Barbari, Mateji, Ingi, Ivanu, Hrvoju, Vedranu i Igoru što su obogatili moj život i učinili studentske dane zanimljivima. Veliko hvala i mojim odbojkašicama i odbojkašima, posebno Željani, na prekrasnim trenucima u dvorani i na pijesku. Hvala svim mojim prijateljima i prijateljicama, kolegama i kolegicama na zajedničkim izlascima, putovanjima, pustolovinama, treninzima i utakmicama, raspravama, smijehu, suzama i uspomenama koje smo zajedno stvorili.

Na kraju, hvala svima onima koje nisam poimence spomenula, a koji su na izravan ili neizravan način uljepšali moje studiranje i moj život.

Ema Plačko

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ ŽELJEZA NA SADRŽAJ GLIKOGENA U JETRI ŠARANA (*Cyprinus carpio* L.)

EMA PLAČKO

Rooseveltov trg 6
Zagreb

Jedan od većih problema današnjice je onečišćenje voda teškim metalima. Teški metali su opasni zbog svoje postojanosti, visoke toksičnosti i sklonosti akumuliranju u okolišu. Tako je i željezo, iako je esencijalni metal, potencijalni toksin ako se njegova količina u organizmu poveća. Povećana akumulacija željeza u tkivu utječe na različite metaboličke puteve uključujući i metabolizam ugljikohidrata. U ovom istraživanju praćen je utjecaj željeza na sadržaj glikogena kao i histomorfološke promjene u tkivu jetre šarana (*Cyprinus carpio* L.) tijekom dugotrajne izloženosti (105 dana) maksimalno dopuštenoj koncentraciji željeza (Fe^{2+} i Fe^{3+}) u vodi (1 mg/L). Sadržaj glikogena u tkivu jetre dokazan je histokemijskom PAS reakcijom, a zatim analiziran svjetlosnim mikroskopom (Nikon Eclipse E600) i računalnim programom za morfometrijsku analizu mikroskopskih slika (Lucia G 4.80). Rezultati pokazuju da se tijekom izloženosti željezu sadržaj glikogena smanjuje kao posljedica okolišnog stresa uzrokovanog onečišćenjem teškim metalom. Željezo je uzrokovalo i oštećenje stijenki krvnih žila te smanjenje veličine hepatocita. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da dugotrajna izloženost maksimalno dopuštenoj koncentraciji željeza u vodi može dovesti do značajnih histomorfoloških i biokemijskih promjena u jetri.

(48 stranica, 19 slika, 7 tablica, 49 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: šaran, *Cyprinus carpio* L., hepatopankreas, željezo, glikogen, histokemija, alcijan – PAS reakcija

Voditelj: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, izv.prof.

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, izv. prof.
Doc. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek
Doc. dr. sc. Zoran Tadić

Rad prihvaćen: 09.03.2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of biology

Graduation thesis

THE EFFECT OF IRON ON THE GLYCOGEN CONTENT IN THE CARP LIVER (*Cyprinus carpio* L.)

EMA PLAČKO

Rooseveltovo trg 6
Zagreb

One of today's major concerns is heavy metal pollution of water. Heavy metals are dangerous because of their persistency, high toxicity and tendency to accumulate in the environment. In this way, iron is also a potential toxin if its amount in the organism increases, even though it is one of the essential metals. Increased accumulation of iron in the organism affects a number of metabolic paths, including carbohydrate metabolism. Therefore, the aim of this research was to monitor the effect of iron (Fe^{2+} and Fe^{3+}) on the glycogen content in the carp liver (*Cyprinus carpio* L.) during long-term exposure (105 days) to maximum allowed waterborne iron concentration (1 mg/L). The glycogen content in the liver was visualized by histochemical PAS reaction and then analyzed by light microscopy (Nikon Eclipse E600) and a morphometrical computer program (Lucia G 4.80). The results show that during the exposure glycogen content decreases as a response to the environmental stress of heavy metal pollution. Iron also damages the blood vessel walls and affects the hepatocyte size. Regarding the given results it can be concluded that the maximum allowed waterborne iron concentration, through a longer period, can cause significant histomorphological and biochemical changes in the liver.

(48 pages, 19 figures, 7 tables, 49 references, original in: croatian)

Thesis deposited in Central biological library

Key words: carp, *Cyprinus carpio* L., hepatopancreas, iron, glycogen, histochemistry, alcian – PAS method

Supervisor: Prof. Gordana Lacković-Venturin, Assoc. Prof.

Reviewers: Gordana Lacković-Venturin, Ph.D., Assoc. Prof.
Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.
Zoran Tadić, Ph.D., Asst. Prof.

Thesis accepted: 09.03.2011

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Onečišćenje okoliša	1
1.2. Željezo – fizikalna i kemijska svojstva	3
1.3. Biološka uloga željeza	4
1.4. Metabolizam željeza	5
1.5. Toksičnost željeza	7
1.5.1. Željezo i oksidativni stres	7
1.5.1.1. Željezo i lipidna peroksidacija	10
1.5.1.2. Oštećenje proteina	12
1.5.1.3. Oštećenje DNA	13
1.6. Antioksidativna obrana	13
1.7. Jetra – glavni metabolički organ	15
1.7.1. Građa jetre	15
1.7.2. Funkcije jetre	17
1.7.3. Glikogen	18
1.8. Histokemijsko dokazivanje glikogena	21
1.9. Cilj i svrha rada	22
2. MATERIJAL I METODE	23
2.1. Materijal	23
2.2. Tretiranje i žrtvovanje životinja	24
2.3. Histokemijske metode	25
2.3.1. Priprema tkiva za histokemijske reakcije	25
2.3.2. Histokemijske reakcije	26
2.4. Analiza histoloških preparata	28
2.5. Statistička obrada podataka	28

3. REZULTATI	29
3.1. Histokemijske analize	29
3.1.1. Bojenje hemalaun eozinom (HE)	29
3.1.1.1. Kontrolna skupina šarana	29
3.1.1.2. Šarani tretirani željeznim(II) kloridom i željeznim(III) kloridom	30
3.1.2. Histokemijsko dokazivanje glikogena	31
3.1.2.1. Kontrolna skupina šarana	31
3.1.2.2. Šarani tretirani željeznim(II) kloridom	32
3.1.2.2.1. Morfometrijska mjerenja PAS pozitivnih površina	34
3.1.2.3. Šarani tretirani željeznim(III) kloridom.....	36
3.1.2.3.1. Morfometrijska mjerenja PAS pozitivnih površina.....	36
3.1.3. Histokemijsko dokazivanje mukopolisaharida u sastavu stijenki krvnih žila u tkivu hepatopankreasa.....	38
3.1.3.1. Morfometrijska mjerenja površina obojenih alcijanskim modrilom.....	39
4. RASPRAVA	40
5. ZAKLJUČAK	44
6. LITERATURA	45

1. UVOD

1.1. ONEČIŠĆENJE OKOLIŠA

Onečišćenje prirode i okoliša je svako unošenje štetnih tvari i energije, koje narušava prirodni sklad odnosno homeostazu. Izvori onečišćivača su različiti: prirodni (erupcije vulkana, poplave, potresi, požari i dr.) i antropogeni, prouzročeni djelatnošću čovjeka (industrija, poljoprivreda, izgaranje goriva, vozila, komunalne djelatnosti i dr.). Onečišćivačima nazivamo tvari koje se nalaze u vodi, zraku ili tlu i čine štetu živim bićima nekog ekosustava, njegovoj strukturi i funkciji.

Postoji više vrsta onečišćenja: biološko (npr. bakterijsko, virusno i gljivično onečišćenje), fizikalno (npr. toplinom, zamućenjem, radioaktivnošću) i kemijsko (anorganski i organski spojevi - npr. kiseline, lužine, soli, teški metali). S obzirom na izloženost onečišćivačima, razlikujemo akutnu (velika koncentracija onečišćivača u kratkom periodu) i kroničnu toksičnost (manja koncentracija onečišćivača kroz duže razdoblje) (Springer i Springer, 2008).

Mnogi organizmi, uključujući ribe, imaju svoje određene ekološke valencije. Ekološka valencija je raspon između ekološkog minimuma i maksimuma, u okviru kojeg je moguć život neke vrste. Ona je različita za svaki abiotički ili biotički čimbenik i za svaku vrstu. Reakcija organizma ili zajednice ekosustava na polutant može biti letalna, subletalna ili kumulativna. Prekoračenjem ekološkog maksimuma organizmi više nisu u stanju prilagoditi se te dolazi do oštećenja tkiva i organa, a naposljetku i do smrti (Bogut, 2006).

Onečišćenje voda je jedan od najvećih problema danas. Organizme koji se koriste za određivanje stupnja onečišćenja nazivamo biološkim indikatorima. Stupnjeve onečišćenja opažamo po promjenama u ponašanju, rastu i reprodukciji stanovnika određenog ekosustava. Vidljive promjene ekosustava znak su visokog stupnja onečišćenja, dok niži stupnjevi, koji još ne prekoračuju ekološki maksimum, mogu biti vidljivi samo na razini stanice i tkiva. Upravo u tom ranom dijagnostičiranju promjena u vodenom okolišu bitnu ulogu imaju histološke analize ciljnih organa, kao što su jetra, škrge i gonade riba (Dutta, 1996).

Jetra je glavni detoksikacijski organ. Onečišćivači se u jetri eliminiraju raznim metaboličkim putevima. Neki se prevode u inaktivne oblike vezivanjem u komplekse, ili se kemijski mijenjaju i prevode u manje toksične produkte koji se onda izlučuju iz organizma. Neki onečišćivači se mogu metabolizirati u još toksičnije spojeve te izazvati oštećenje organizma. Zbog svega navedenog, jetra je izvrstan model za proučavanje interakcija između njezine strukture i funkcije te raznih okolišnih čimbenika, kao što su onečišćivači, primjerice pesticidi, ugljikovodici ili teški metali poput željeza.

Željezo je za sve organizme, pa tako i za ribe, u malim količinama neophodno za normalno funkcioniranje organizma. Problem nastaje kad se povisi koncentracija željeza u vodi, što može biti opasno za akvatičke organizme. Iako slatke vode sjeverne hemisfere redovito sadrže nekoliko miligrama željeza po litri, fiziološki efekti dugotrajnog izlaganja mediju preopterećenom željezom u riba su još relativno neistraženi. Takav medij može napraviti štetu na razini stanice, uključujući oštećenje DNA i strukture membrana te tako poremetiti životno važne funkcije uključujući rast, preživljavanje i reprodukciju u riba (Britton, 1994.; Lesnefsky, 1994; Lappivaara i Marttinen, 2005).

Ovim će se istraživanjem dobiti podaci o utjecaju maksimalno dopuštene koncentracije željeza na sadržaj glikogena u tkivu jetre šarana. Glikogen je značajan izvor energije kad nema dovoljno hrane i u hipoksičnim uvjetima (Wendelaar-Bonga, 1997; Padmavathy i Ramanathan, 2010). Budući da se rezerve glikogena u jetri i mišićima koriste kao izvor energije u stresnom okolišu (kontaminacija teškim metalima ili drugim onečišćivačima), promjene u njegovom sadržaju mogu poslužiti kao indikator zdravstvenog stanja jedinke i populacije (Heath, 1995).

1.2. ŽELJEZO – FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA

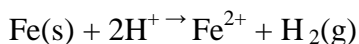
Željezo (lat. *ferrum*) je tehnički najvažniji metal. Zajedno s kobaltom i niklom čini trijadu željeza. U prirodi je vrlo rasprostranjen s dobro istraženim fizikalnim i kemijskim svojstvima (Tablica 1). U Zemljinoj kori maseni udio mu je oko 5%. Pojavljuje se u obliku oksidnih, karbonatnih, sulfidnih i silikatnih ruda. Za dobivanje željeza danas se isključivo upotrebljavaju oksidne i karbonatne rude. Redukcijom oksida željeza koksom, odnosno ugljik(II)-oksidom, koja se provodi u visokim pećima dobiva se sirovo željezo koje sadrži primjese ugljika, silicija, fosfora, mangana i sumpora.

Čisto željezo je sjajan, srebrnkast, mekan metal koji lako korodira. Tada se na površini stvara crveno-smeđi oksid. Elementarno željezo se javlja u tri enantiotropne modifikacije: α -, γ - i δ -željezo. Svaka od tih modifikacija je stabilna u odgovarajućem temperaturnom području, a odlikuje se i karakterističnom strukturom. Tako je α -željezo, koje kristalizira u prostorno centriranoj kocki, stabilno do 907°C i jedino je od navedenih modifikacija feromagnetično, iako to svojstvo gubi pri temperaturama višim od 768°C. U temperaturnom području između 907°C i 1400°C stabilno je γ -željezo sa strukturom plošno centrirane kocke. Iznad temperature od 1400°C, pa do tališta željeza, stabilno je δ -željezo koje opet kristalizira u prostorno centriranoj kocki.

Tablica 1. Fizikalna i kemijska svojstva željeza

ŽELJEZO (Fe)	
PRIJELAZNI ELEMENT: SKUPINA ŽELJEZA	
Elektronska konfiguracija	[Ar] 3d ⁶ 4s ²
Relativna atomska masa	55,845 ± 0,002
Elektronegativnost	1,83
Atomski radijus (pm)	124,1
Talište (°C)	1535
Vrelište (°C)	2750

Kao neplemeniti metal (metal s negativnim elektrodnim potencijalom) željezo se otapa u neoksidirajućim kiselinama:



Željezo u najvećem broju spojeva ima stupanj oksidacije +2 (fero) i +3 (feri).

Željezovi(II)-halogenidi su spojevi FeF_2 , FeCl_2 , FeBr_2 i FeI_2 koji su topljive soli.

Željezovi(III)-halogenidi su FeF_3 , FeCl_3 i FeBr_3 i vrlo su dobro topljivi u vodi s iznimkom FeF_3 .

Stabilnost im opada s porastom rednog broja halogenog elementa.

1.3. BIOLOŠKA ULOGA ŽELJEZA

Željezo je esencijalni metal koji ima brojne značajne uloge u staničnoj biokemiji i metabolizmu. U tijelu odraslog čovjeka mase 70 kg ima oko 5 g željeza, većinom vezanog u hemoglobinu u eritrocitima gdje sudjeluje u vezanju i prijenosu kisika. Manji dio pohranjen je u obliku feritina i hemosiderina u jetri, slezeni i koštanoj srži. Željezo je i sastavni dio mioglobina, citokroma koji osiguravaju procese staničnog disanja te brojnih enzima: katalaza, peroksidaza, dehidrogenaza, enzima koji sudjeluju u sintezi DNA i drugim enzimima. Željezo ima i vrlo važnu ulogu u imunom sustavu jer je neophodno za baktericidnu aktivnost makrofaga kao i za aktivnost mijeloperoksidaze u neutrofilima (Guyton, 2006). Željezo svoju raznolikost funkcija duguje sposobnosti brzog primanja i otpuštanja elektrona, tj. mogućnosti lakog prelaska iz jednog u drugo oksidacijsko stanje.

Organizam ne može sintetizirati željezo. Ono se prirodno nalazi u hrani, a potrebne dnevne količine moguće je osigurati pravilnom i raznolikom prehranom. Željezo se u hrani nalazi u dva oblika, a to su hem (organsko) i „non-hem“ (neorgansko) željezo. Fiziološki gubitak željeza je relativno malen, jer se željezo oslobođeno iz istrošenih eritrocita vraća u biosintezu novog hemoglobina. Dnevno se izluči 0,5-1 mg željeza i to uglavnom ljuštenjem epitela crijeva i kože,

a manjim dijelom urinom, znojenjem i putem žuči. Kada se ukaže potreba za željezom, npr. u doba rasta i razvoja, tijekom trudnoće ili kod gubitka menstrualne krvi u čovjeka, ono se troši iz zaliha. U vrijeme kad se zalihe ponovo pune, apsorpcija se pojača te organizam uz adekvatne prehrambene izvore nadomješta izgubljeno, tvoreći spremišne komplekse s proteinom feritinom.

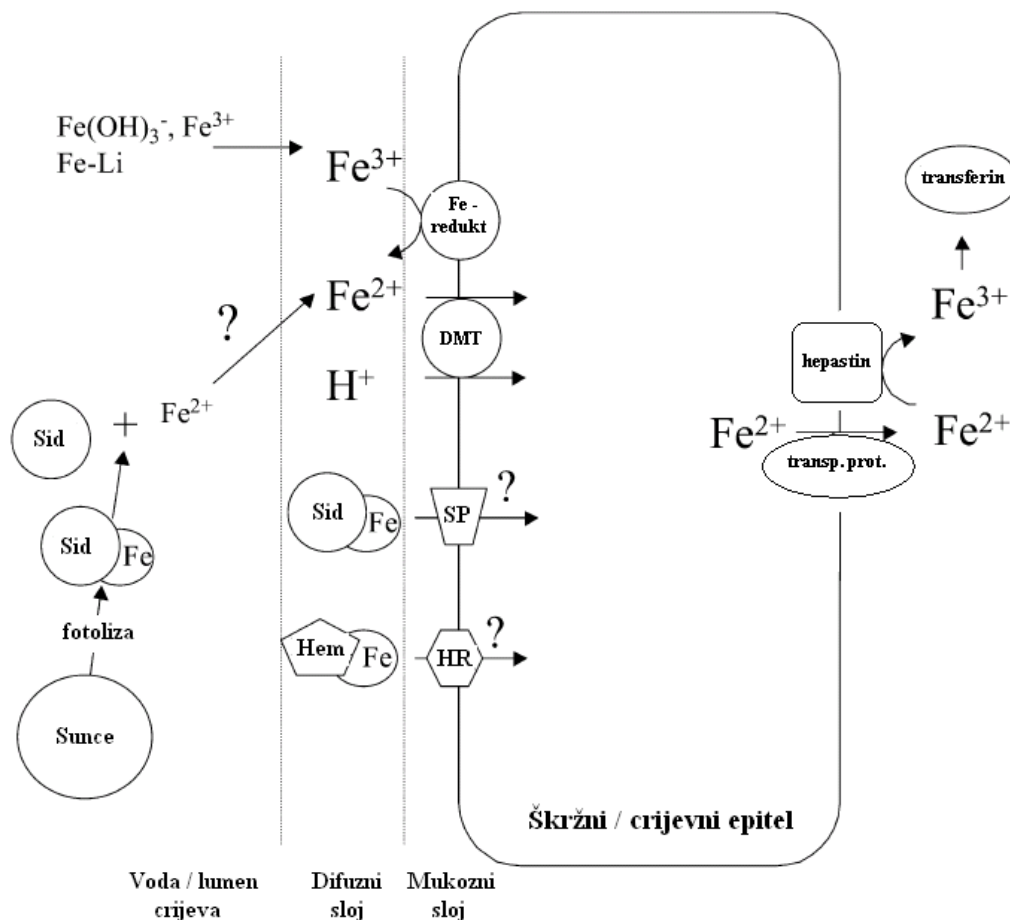
1.4. METABOLIZAM ŽELJEZA

Unutarstanična koncentracija željeza održava se regulacijom prometa – aktivnim unosom, izbacivanjem i mjenjanjem staničnog puferskog kapaciteta regulacijom razine sinteze spremišnih proteina. Količina željeza u organizmu većinom se održava reguliranjem apsorpcije u probavilu budući da nije poznat mehanizam ekskrecije na razini organizma.

Ribe su jedinstveni organizmi jer neke minerale (anorganske elemente) mogu apsorbirati ne samo iz hrane nego i kao čestice otopljene u njihovom vodenom okolišu. Kalcij (Ca), magnezij (Mg), natrij (Na), kalij (K), željezo (Fe), cink (Zn), bakar (Cu) i selen (Se) mogu se apsorbirati iz vode preko škrga da bi se zadovoljile nutritivne potrebe riba. Smatra se da je prehrana glavni izvor adekvatnih količina željeza u morskih riba (Bury i sur., 2001), dok je kod slatkovodnih riba jednako važan i transport preko škružnog epitela (Roeder i Roeder, 1966; Lappivaara i sur., 1999; Bury i Grosell, 2003). Ribama je potrebno između 30 i 170 mg željeza po kilogramu suhe mase, ovisno o vrsti (Watanabe i sur., 1997).

U sisavaca se željezo apsorbira u proksimalnom dijelu tankog crijeva, s time da se non-hem i hem željezo apsorbiraju u epitelne stanice sluznice na razne načine (Andrews, 2000). Proteini zaslužni za apsorpciju željeza i drugih dvovalentnih metala, dio su velike, evolucijski konzervativne obitelji proteina pod nazivom „solute carrier 11a“ (Slc 11a) koju, osim u sisavaca, nalazimo i u gljivama i biljkama, a postoje i molekularni dokazi da epitel riba nosi gene za

kodiranje proteina iz te obitelji (Dorschner i Phillips, 1999; Donovan i sur., 2002). Riječ je o $\text{Fe}^{2+}/\text{H}^+$ simporteru koji uz željezo može prenositi i Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} i Cd^{2+} te se zbog toga često naziva i divalentnim transporterom metala (eng. *divalent metal transporter* - DMT). Dokazano je da željezo apikalnu membranu, škrga ili crijeva, prolazi u fero obliku (Fe^{2+}) što se slaže s ranije navedenim molekularnim dokazima koji taj simporter svrstavaju u porodicu proteina Slc 11a povezanih s Fe^{2+} transportom (Dorschner i Phillips, 1999; Bury i sur., 2001). Simporter je vjerojatno povezan s reduktazom koja reducira Fe^{3+} ili organski kompleks u Fe^{2+} prije transporta. Pretpostavlja se da postoje i drugi mehanizmi transporta željeza, npr. receptori hema (RH) u crijevu (Andersen, 1997) ili sideroforne permeaze (SP) u škragama koje potpomažu ulazak željeza iz siderofora, sekundarnih metabolita bakterija ili fitoplanktona koji su sposobni vezati taj esencijalni metal (Winkleman, 2002), no oni su slabije istraženi (Slika 1).



Slika 1. Hipotetski unos željeza u pravih koštunjača (preuzeto iz Bury i Grosell, 2003).

Bazolateralni transport Fe^{2+} iz stanice epitela u krvotok zbiva se preko transportnog proteina u suradnji s heparinom, membranskom oksidazom koja sadrži bakar, koji oksidira fero oblik u feri (Fe^{3+}). Fe^{3+} se u krvi veže na transferin i u tom obliku se dalje transportira prema koštanoj srži i drugim tkivima gdje se upotrebljava za sintezu važnih spojeva (hemoglobina, mioglobina, raznih enzima) ili se pohranjuje u obliku feritina, proteina velikog 450 kDa koji može pohraniti do 4500 atoma željeza (Bury i Grosell, 2003). Najveće skladište željeza je jetra gdje se ono pohranjuje u hepatocitima i makrofazima, koji osim obrambene uloge sudjeluju i u održavanju homeostaze željeza.

1.5. TOKSIČNOST ŽELJEZA

Homeostaza željeza veoma je važna za zdravlje organizma. Manjak tog esencijalnog metala odražava se prvenstveno u smanjenoj eritropoezi i anemiji, dok se suvišak taloži u vitalnim organima i izaziva njihovo oštećenje. Mehanizam kojim višak željeza ispoljava svoje toksično djelovanje uključuje oksidativni stres. Stanična oštećenja može uzrokovati lipidna peroksidacija membrana organela što može dovesti do disfunkcije mitohondrija ili promjena u unutarstaničnoj koncentraciji Ca^{2+} i strukturi DNA, što u konačnici dovodi do smrti stanice (Britton i sur., 1994; Lesnefsky, 1994).

1.5.1. ŽELJEZO I OKSIDATIVNI STRES

Oksidativni stres je patološko stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala, što za posljedicu ima razne promjene vezane uz oštećenje stanica. Slobodni radikali su nestabilne čestice koje imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci i zbog toga i izrazito visok stupanj reaktivnosti. U stanici oduzimanjem elektrona može nastati kisikov, dušikov, ugljikov ili sumporov radikal, a biokemijski su najznačajnije ROS (eng. *reactive oxygen species*) i RNS molekule (eng. *reactive nitrogen species*) (Tablica 2). Mali broj slobodnih radikala u organizmu

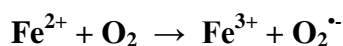
se neizbježno formira zbog „curenja“ u transportu elektrona. Oni su obično prirodni intermedijeri u nekom procesu i mogu imati vitalno važne uloge npr. u unutarstaničnom signaliziranju ili regulaciji redoks procesa, te se u konačnici prevedu u vodu. „Curenje elektrona“ se obično događa u mitohondrijskom lancu za prijenos elektrona, u peroksisomima, citokrom P450 sistemu ili tijekom bakterijske upale kada fagociti proizvode i otpuštaju slobodne radikale kako bi ubili patogene bakterije. Kozmičko zračenje, uzimanje droge ili drugih kemikalija, kao i smog također mogu dovesti do formiranja slobodnih radikala. Višak slobodnih radikala rezultira oštećenjem DNA, enzima i membrana te uzrokuje promjene u radu imunog sustava kao i u strukturi osnovnih makromolekula, što na kraju potiče procese starenja i mutageneze (Poli, 1993; Meneghini, 1997; Prousek, 2007).

Tablica 2. Reaktivni dušikovi i kisikovi radikali (ROS i RNS)

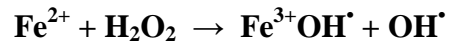
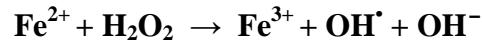
Radikali	Neradikali
Superoxid anion ($O_2^{\cdot-}$)	Vodikov peroksid (H_2O_2)
Hidroperoksil (HOO^{\cdot})	Lipidni peroksid (LOOH)
Peroksil (LOO^{\cdot})	Singletni kisik (1O_2)
Alkoksil (LO^{\cdot})	Ozon (O_3)
Hidroksil ($^{\cdot}OH$)	Hipoklorna kiselina (HOCl)
Dušikov monoksid ($^{\cdot}NO$) i dioksid ($^{\cdot}NO_2$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

Iako je željezo esencijalni metal, ono može djelovati kao katalizator u stvaranju slobodnih radikala i izazvati oksidativni stres te tako sudjelovati u oštećenju stanica. Željezo sudjeluje u stvaranju brojnih slobodnih radikala na više razina:

- Autooksidacijom $Fe^{2+}_{(aq)}$, oksihemoglobina ili željeznih kompleksa s citratom, ATP-om ili ADP-om nastaju superoksidni radikali:

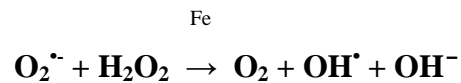


- U prisutnosti vodikovog peroksida, koji je normalni produkt metabolizma stanice, Fe^{2+} se oksidira pri čemu nastaju ferilni ($\text{Fe}^{3+}\text{OH}^\bullet$) i hidroksilni (OH^\bullet) radikali, vrlo jaki oksidansi koji reagiraju s velikim brojem različitih bioloških supstrata:

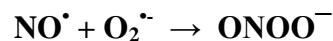


Reakcija u kojoj iz vodikovog peroksida i Fe^{2+} nastaju OH^\bullet radikali poznata je pod nazivom Fentonova reakcija.

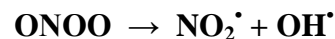
- Željezni ioni sudjeluju i u Haber Weissovoj reakciji u kojoj također nastaju hidroksilni radikali. Haber Weissova reakcija uključuje i superoksidni radikal:



- U stanici iz arginina pod djelovanjem enzima sintaze dušičnog oksida nastaje radikal dušični oksid (NO^\bullet), koji sa superoksidom stvara peroksinitrit prema reakciji:

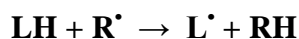


- Uz prisutnost Fe^{3+} dolazi do adicije protona pri čemu nastaje peroksinitrozna kiselina (ONOOH) koja oslobađa radikal dušikov dioksid (NO_2^\bullet) i hidroksilni radikal:

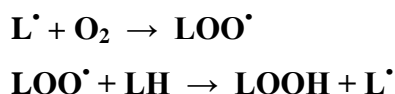


1.5.1.1. Željezo i lipidna peroksidacija

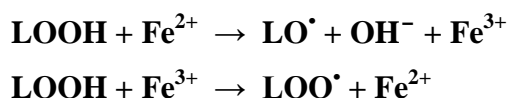
Nezasićene masne kiseline koje se nalaze u sastavu lipida biomembrana vrlo su osjetljive na oštećenja uzrokovana slobodnim radikalima (Britton i sur., 1994; Lesnefsky, 1994). Hidroksilni radikali mogu napadati membranske lipide i inicirati reakciju lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija je lančana reakcija, većinom katalizirana nekim prijelaznim metalom, koja počinje napadom radikala (R^\bullet) na alkilni vodik u blizini dvostruke veze nezasićene masne kiseline (LH) (Slika 2):



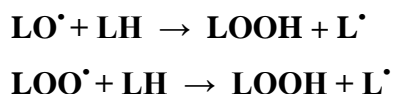
Nastali alkilni radikal (L^\bullet) se uz prisustvo kisika oksidira u peroksilni radikal (LOO^\bullet), koji dalje stupa u reakcije sa susjednim masnim kiselinama tvoreći lipidne hidroperoksidi ($LOOH$) i novi slobodni radikal:



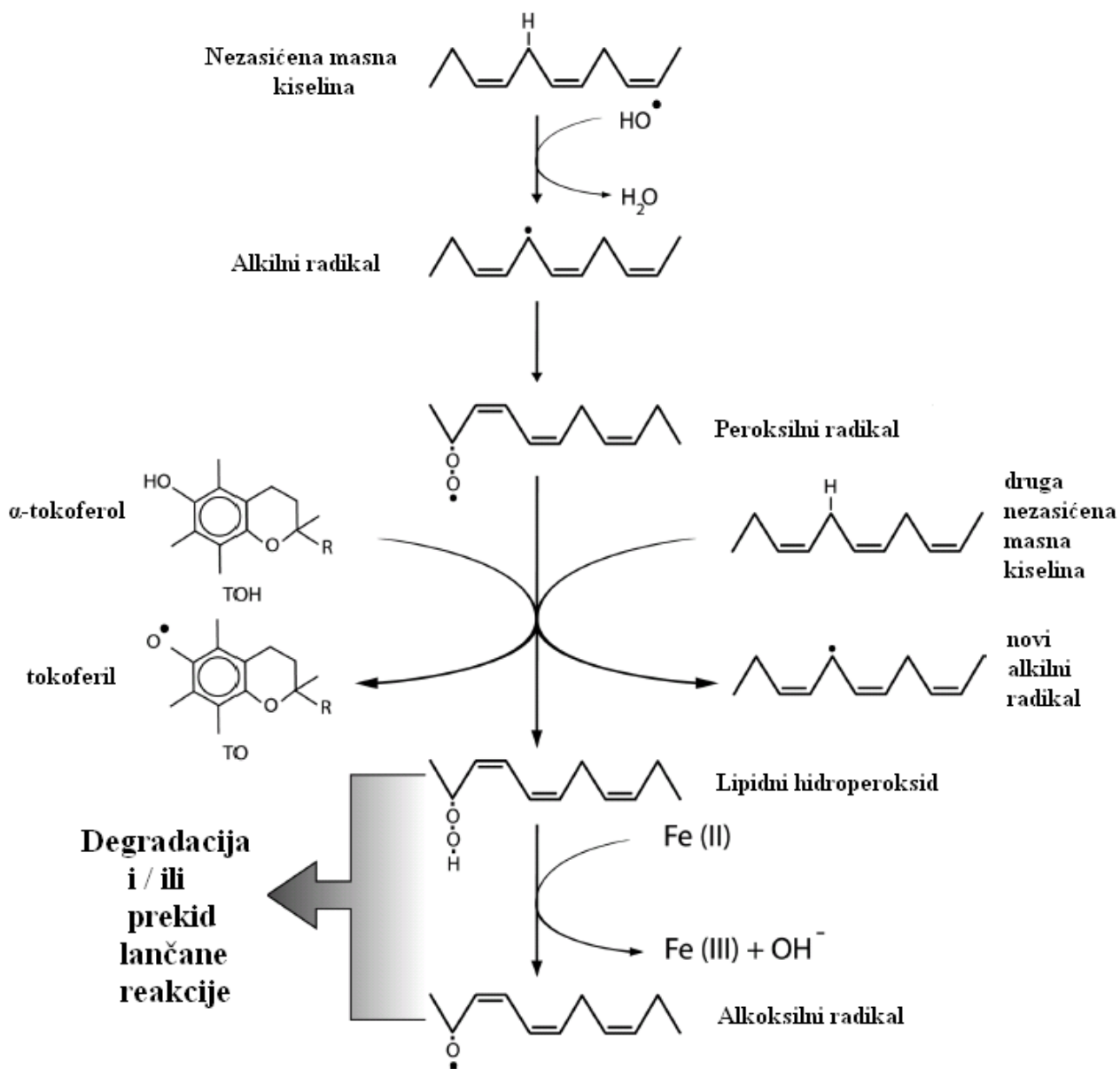
Proces lipidne peroksidacije uvelike je pod utjecajem željeznih iona. Nakon što je peroksidacija započela željezo može dalje poticati proces budući da lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} ionima. Reakcijom $LOOH$ s željeznim ionima nastaju alkoksilni (LO^\bullet) i peroksilni radikali:



Alkoksilni i peroksilni radikali mogu dalje inicirati tzv. lipidnu peroksidaciju ovisnu o lipidnom hidroperoksidu, što rezultira grananjem lančane reakcije:



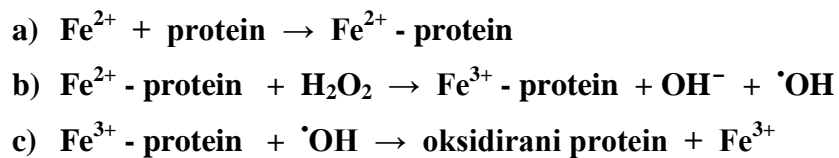
Reakcijom lipidne peroksidacije narušava se struktura, biofizičke značajke i konformacija masnih kiselina, čime se narušava i cjelovitost biološke membrane čije su one sastavni dio. Zbog toga se taj proces smatra jednim od glavnih uzroka staničnog oštećenja i njezine smrti.



Slika 2. Osnovni prikaz reakcija lipidne peroksidacije (preuzeto iz Hermes-Lima, 2004).

1.5.1.2. Oštećenje proteina

Kao i u slučaju lipidne peroksidacije, mnoga patološka stanja i bolesti nastaju i zbog oksidacije proteina. Više je mehanizama uslijed kojih može doći do oštećenja proteina: zračenje, reakcija s produktima lipidne peroksidacije i oksidacije ugljikohidrata ili reakcija s metalom poput željeza. Izgleda da je najveći dio oštećenja potpomognut vezanjem malih količina željeza ili bakra na strukturu proteina (Slika 3a). Nastali kompleks Fe^{2+} - protein u reakciji s vodikovim ili alkilnim peroksidom uzrokuje nastanak hidroksilnih radikala koji mogu oksidirati skoro sve vrste aminokiselina i inducirati oštećenje proteina (Slika 3b i 3c). Oksidacija proteina uglavnom podrazumijeva strukturnu promjenu par ili više aminokiselina u sastavu proteina što dovodi do promjene u funkciji proteina ili potpune inaktivacije enzima.



Slika 3. Mehanizam inaktivacije proteina

Pri normalnim fiziološkim uvjetima, oksidacija proteina sprečava se djelovanjem staničnog antioksidativnog sustava koji uklanja ili neutralizira nastale radikale. Ukoliko se taj sustav naruši, nastupa oksidacija proteina. Oksidirani proteini se ne mogu popraviti već se uklanjaju proteolitičkom razgradnjom, a neoštećene aminokiseline se koriste za izgradnju novih, funkcionalnih enzima.

1.5.1.3. Oštećenje DNA

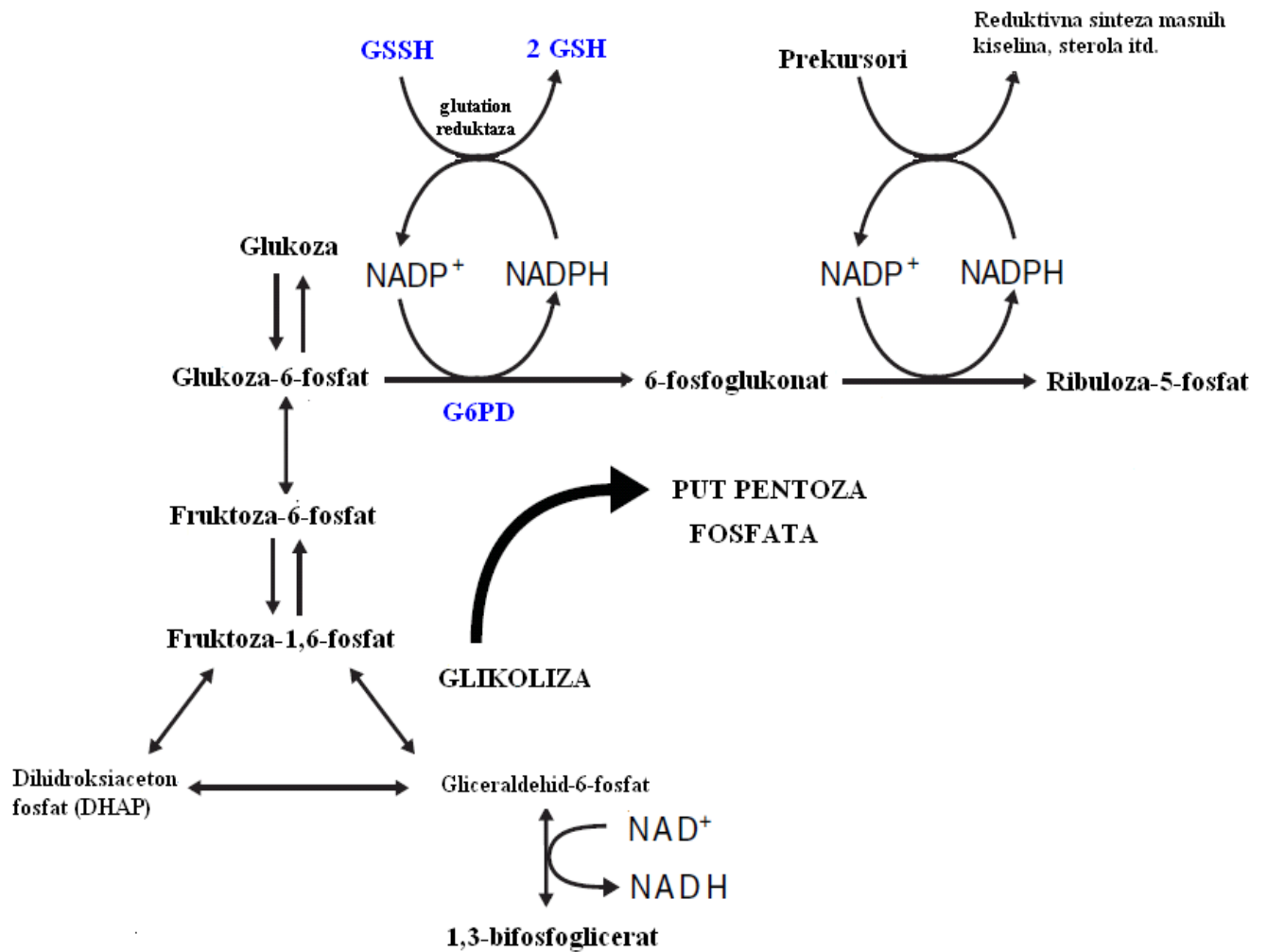
DNA je još jedna stanična komponenta koja je vrlo osjetljiva na hidroksilne radikale koji agresivno djeluju na njezine sastavnice: deoksiribozu i baze (Meneghini, 1997). U reakciji hidroksilnih radikala s deoksiribozom dolazi do oduzimanja atoma vodika jednom od pet ugljikovih atoma u prstenu, pri čemu nastaje ugljikov radikal. On dalje reagira s kisikom, pri čemu nastaje oksil radikal, što dovodi do pucanja veze i oslobađanja promijenjenog šećera i intaktne baze. Hidroksilni radikali još češće djeluje na same baze. Kod pirimidinskih baza OH[•] se adira na C5-C6 dvostruku vezu dok se kod purinskih baza adira na C4, C5 ili C8 ugljikov atom, pri čemu nastaju hidroksilirane baze. Radi stvaranja hidroksiliranih nukleotida mijenjaju se i odnosi između purinskih i pirimidinskih baza.

1.6. ANTIOKSIDATIVNA OBRANA

Kako bi se zaštitile od štetnog djelovanja slobodnih radikala, stanice su razvile antioksidativnu obranu koju čine različiti antioksidanti. Stanice se štite stvaranjem antioksidativnih enzima, ali i ne-enzimskim antioksidantima koji nastaju u stanici ili se u organizam unose hranom. Među antioksidativnim enzimima najvažniji su superoksid-dismutaza, katalaza, glutation-peroksidaza i glutation reduktaza. Ne-enzimski antioksidanti su molekule koje djeluju kao „hvatači“ (eng. *scavengers*) slobodnih radikala ili molekule koje zadržavaju željezo i bakar u neaktivnim oblicima.

Najvažniji ne-enzimski antioksidant u organizmu je glutation. To je tripeptid koji se sastoji od glutaminske kiseline, cisteina i glicina. U svom reduciranom, sulfhidrilnom obliku (GSH) ima ulogu glavnog „hvatača“ slobodnih radikala. Za redukciju disulfidnog oblika glutationa (GSSH) neophodan je NADPH. Put pentoza fosfata glavni je izvor NADPH koji nastaje u prvom koraku tog metaboličkog puta uz pomoć enzima glukoza-6-fosfat dehidrogenaze (G6PD). Istraživanja pokazuju da se protok tvari kroz put pentoza fosfata poveća tijekom pojačanog djelovanja

oksidativnog stresa. Time se povećava i aktivnost enzima G6PD i produkcija NADPH za obnovu glutaciona koji se pojačano troši u borbi protiv oksidativnog stresa (Ralser i sur., 2007) (Slika 4). Ovisno o potrebama stanice, konačni produkt puta pentoza fosfata, ribuloza-5-fosfat, može se reciklirati u glukozu-6-fosfat za održanje proizvodnje NADPH, prevesti u glikolizni put za dobivanje energije (ATP) ili iskoristiti za sintezu nukleotida i koenzima.



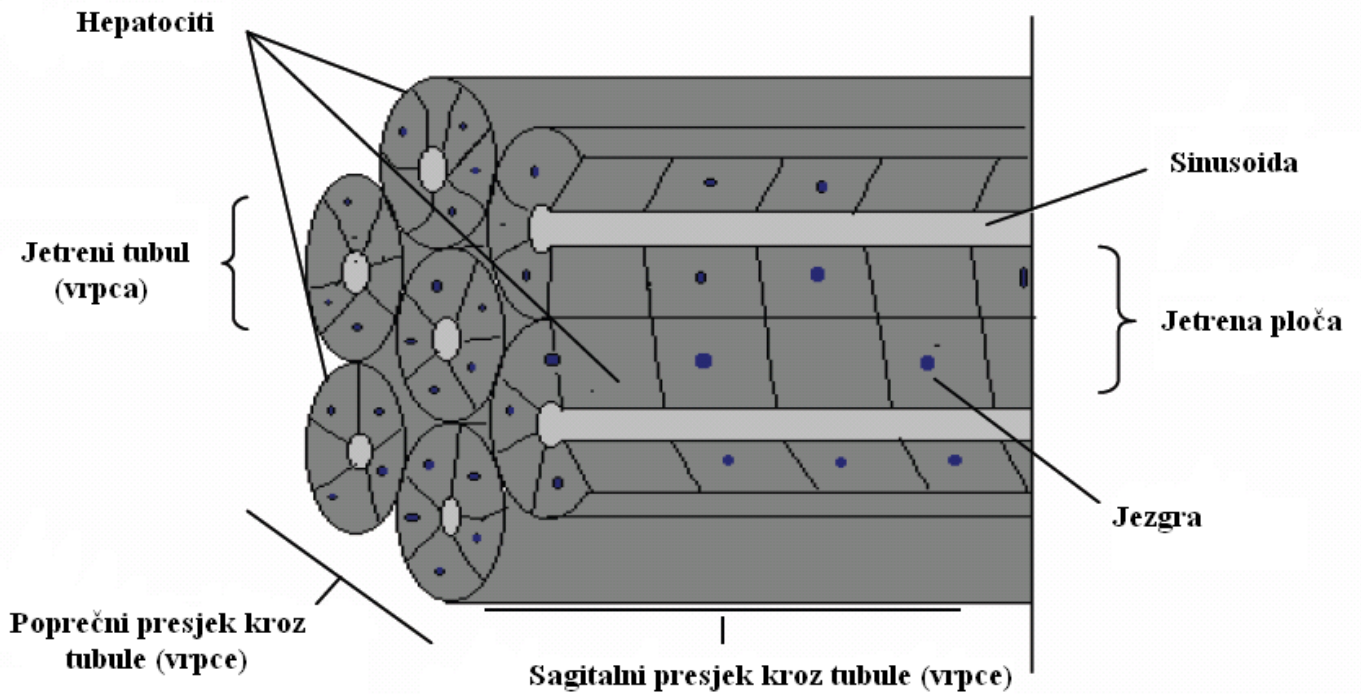
Slika 4. Pojednostavljeni prikaz povezanosti glikolize i puta pentoza fosfata te produkcije NADPH potrebnog za obnavljanje glutaciona (preuzeto iz Grant, 2008).

1.7. JETRA – GLAVNI METABOLIČKI ORGAN

Jetra je glavni metabolički organ u svih kralješnjaka, uključujući i ribe. U jetri se hranjive tvari apsorbirane u probavnoj cijevi, obrađuju i pohranjuju za uporabu u drugim dijelovima tijela. To je čini posrednikom između probavnog sustava i krvi. Ima egzokrinu funkciju (izlučivanje žuči) i endokrinu funkciju poput proizvodnje bjelančevina plazme. Jetra također neutralizira i uklanja otrovne tvari (Junqueira i Carneiro, 2005). Histopatologija jetre važan je alat u procjeni okolišnog stresa na divlje populacije riba.

1.7.1. GRADA JETRE

Probavni sustav riba iz porodice *Cyprinidae*, kojoj pripada šaran, nema oblikovan želudac. On postoji tek kao proširenje prednjeg dijela crijeva i naziva se *bulbus intestinalis*. Jetra je organ pridružen probavnoj cijevi i, u ovom slučaju, prošarana je tračcima gušterače te je stoga nazivamo hepatopankreas. „Otočići“ gušterače, građeni od egzokrinog tkiva, nalaze se mjestimično duž toka portalne vene. Osnovna građevna jedinica jetre je jetrena stanica ili hepatocit. Hepatociti čine oko 80% stanične populacije jetre i obavljaju velik broj funkcija. Hepatociti su poligonalnog oblika, ali nemaju jasnu heksagonalnu građu kao u sisavaca. Posloženi su u razgranane tubule ili vrpce koje najčešće slijepo završavaju (Hinton i sur., 2001). Između susjednih sinusoida, hepatociti čine ploču, obično širine dvije stanice, nekad i više zbog grananja tubula. Jezgra je obično jedna, okrugla i smještena u sredini stanice (Slika 5). U citoplazmi često nalazimo velike količine glikogena i lipida koje variraju ovisno o prehrani i dijelu godine. Hepatociti riba sadrže manje organela u usporedbi s jetrom sisavaca.



Slika 5. Strukturna organizacija jetrenog parenhima u riba (preuzeto iz van Dyk i sur., 2007).

Itove stanice, koje služe za pohranu lipida i vitamina A, su različitih oblika, uglavnom izdužene i bogate ribosomima. U pravih koštunjača rijetko se opažaju Kupfferove stanice dok su makrofazi, tj. agregati koji se nazivaju melano-makrofagni centri, uobičajeni. Broj, veličina i sadržaj makrofaga veoma je varijabilan, a ovisi o vrsti, dobi i zdravstvenom stanju ribe. Obično su locirani u blizini jetrenih arterija, portalnih vena ili žučnih kanala. Služe kao skladište materijala za gradnju staničnih membrana i produkata razgradnje eritrocita. Također imaju ulogu u pohrani i recikliranju željeza te detoksikaciji endogenih i egzogenih supstanci.

Jetru krvlju snabdjevaju portalna vena, koja nosi vensku krv iz probavnog sustava, i jetrena arterija koja nosi arterijsku krv koja hrani hepatocite. One ulaze u jetru na mjestu koje se naziva *porta hepatitis* i zatim se granaju na manje žile. Iz tih manjih ogranaka krv ulazi u sinusoida koje su okružene hepatocitima. Sinusoida je kapilara nepravilne širine čiji je promjer u pravilu veći od

onog običnih kapilara. Lumen sinusoida oblaže fenestrirani, kontinuirani endotel bez bazalne lamine čime se omogućuje lak prijelaz metabolitima iz krvi u hepatocite. Perisinusoidalnim ili Disse-ovim prostorom nazivamo zonu brze intercelularne izmjene tvari koja leži između epitela sinusoida i hepatocita. U prometu tvari značajnu ulogu igraju i mikrovili jetrenih stanica koji povećavaju površinu za izmjenu. Krv se iz sinusoida slijeva u terminalnu ili centralnu venu koja naposljetku vodi u veću jetrenu venu. Uz jetrenu arteriju i portalnu venu, u jetri riba nalazimo i žučne kanale, ali uglavnom nisu združeni u portalnu trijadu s krvnim žilama kao u sisavaca.

1.7.2. FUNKCIJE JETRE

Iako jetra ima određenu sposobnost regeneracije njezino oštećenje može ozbiljno ugroziti mnoge životne funkcije, budući da taj organ ima brojne važne uloge u organizmu kao što su:

■ Metabolizam bjelančevina

Jetra sintetizira bjelančevine potrebne za vlastito funkcioniranje, ali isto tako proizvodi i razne proteine plazme koje izlučuje u krv: albumin, protrombin, fibrinogen i lipoproteine. Te se bjelančevine sintetiziraju na poliribosomima vezanim za hrapavu endoplazmatsku mrežicu. Hepatocit je i glavno mjesto pretvorbe aminokiselina kao i njihove deaminacije, a nastali dušik se u obliku amonijaka prenosi do škraga gdje se izlučuje uz minimalnu potrošnju energije.

■ Metabolizam ugljikohidrata

Jetra ima važnu ulogu u metabolizmu ugljikohidrata jer je sposobna iz ne-ugljikohidratnih prekursora (aminokiselina, laktata i glicerola) reakcijom glukoneogeneze sintetizirati glukozu, ali i mobilizirati je iz glikogena, skladišnog oblika tog važnog šećera. Zbog toga se smatra ključnim organom u regulaciji razine šećera u krvi.

■ Metabolizam masti

U hepatocitima se nalazi velik broj peroksisoma – organela koji sadrže enzime. Neke od njihovih uloga su i oksidacija suvišnih masnih kiselina kao i sudjelovanje u sintezi kolesterola i nekih lipida važnih za stvaranje mijelina. Hepatociti proizvode žuč koja je bitna za emulgiranje lipida u crijevu, čime se olakšava razgradnja lipazom i apsorpcija.

■ Detoksikacija

Jetra je glavni detoksikacijski organ u tijelu jer brojne toksične spojeve može neutralizirati reakcijama oksidacije, metilacije ili konjugacije. Ti procesi se odvijaju u glatkoj endoplazmatskoj mrežici, labilnom sustavu koji je difuzno raspoređen po citoplazmi i brzo reagira na molekule koje ulaze u hepatocit. Nakon što se kemijski promjene u manje toksične spojeve ili prevedu u inaktivni oblik, toksikanti se izlučuju iz organizma.

■ Skladišna funkcija jetre

Jetra je glavno mjesto za pohranjivanje vitamina, osobito vitamina A. U jetri se ugljikohidrati i lipidi pohranjuju u obliku glikogena i triglicerida. Sposobnost pohranjivanja metabolita je važna jer omogućuje opskrbu tijela energijom između obroka.

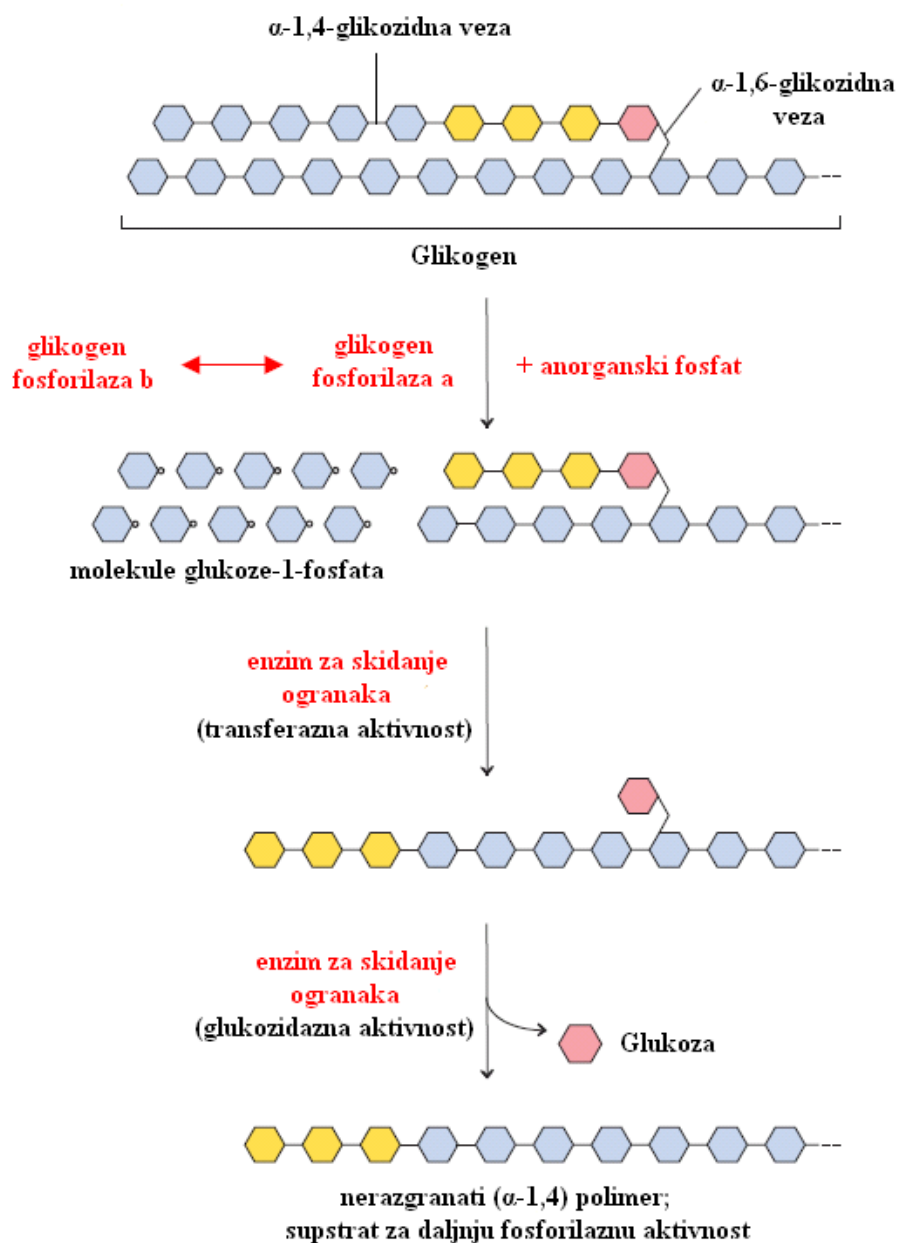
1.7.3. GLIKOGEN

Glikogen čini značajnu energetska zaliha u organizmu riba. Ustanovljen je u citoplazmi stanica gotovo svih ribljih tkiva. Riblji glikogen je polisaharid molekulske mase 10^6 do 10^8 , a nastaje procesom glikogeneze tj. povezivanjem velikog broja molekula glukoze. U šarana zalihe glikogena mogu iznositi i do 10% mase hepatopankreasa. Iako glikogen u riba nije tako značajan izvor energije u vrijeme gladovanja kao proteini i masti, važan je indikator stresa u okolišu (Nagai i Ikeda, 1971; Hugget i sur., 1992).

Glikogen je visoko razgranati polimer glukoze s većinom glukozilnim ostacima u α -1,4-glikozidnoj vezi. Na periferiji razgranate strukture dodaju se i uklanjaju glukozilni ostaci. Sintaza

glikogena počinje kovalentnim spajanjem glukoze na tirozinski ostatak proteina, glikokogenin. Dodavanjem molekula glukoze čestice mogu narasti i do 60 000 glukozilnih ostataka. Glukoza iz plazme ulazi u stanicu gdje se fosforilira pomoću enzima glukokinaze. Glukoza-6-fosfat (G-6-P) pretvara se u glukozu-1-fosfat (G-1-P) u reverzibilnoj reakciji kataliziranoj enzimom fosfoglukomutazom. Uridin difosfat glukoza (UDP-G) sintetizira se iz G-1-P i UTP. Glikogen se produžuje dodavanjem UDP-G pojedinačnih glukozilnih ostataka na postojeći polimer. Ova reakcija katalizirana je glikogen sintazom koja se stimulira inzulinom ili inhibira adrenalinom tj. glukagonom. Sinteza normalno razgranate strukture glikogena također treba djelovanje enzima za grananje koji premješta 1,4-vezani oligosaharid na položaj 1,6-veze. Pretvorbom glukoze u spojeve velike molekularne mase omogućuje se pohranjivanje velikih količina ugljikohidrata, bez značajnije promjene osmotskog tlaka unutar stanice.

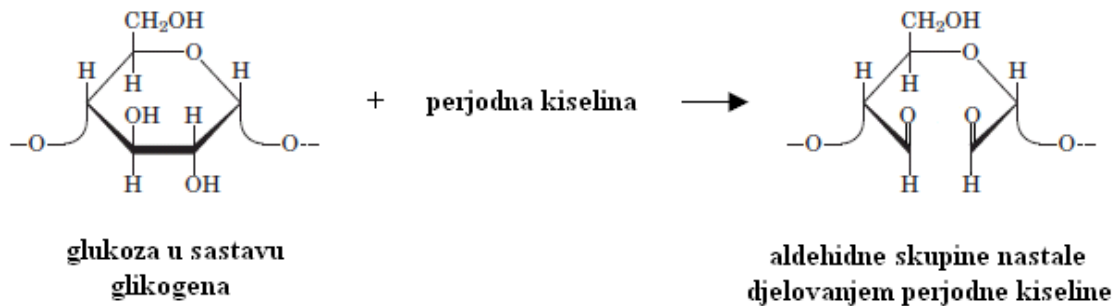
Razgradnja glikogena se naziva glikogenoliza. Glukoza se mobilizira iz glikogena pomoću kompleksne grupe enzimskih reakcija. Na glikogen direktno djeluje aktivni oblik fosforilaze, fosforilaza a, koja uz dodatak anorganskog fosfata (HPO_3^{2-}) uklanja pojedinačne glukozne jedinice i stvara G-1-P. G-1-P u mišiću može direktno ući u proces glikolize dok se u jetri mora dodatno „obraditi“ da bi se naposljetku hidrolizirao do glukoze i otpustio u krv. Enzim fosforilaza postoji i u svom inaktiviranom defosforiliranom obliku. Inaktivna fosforilaza b se aktivira pomoću fosforilaze b kinaze. Na glikogen također djeluje enzim za skidanje ogranaka koji svojom transferaznom i glukozidaznom aktivnošću daje jedan glukozilni ostatak za svaku uklonjenu točku grananja (Slika 6). Metabolizam glikogena regulira se preko dva ključna enzima: glikogen fosforilaze i glikogen sintaze. Adrenalin i glukagon povišuju šećer u krvi putem ovog kaskadnog sustava aktiviranjem fosforilaze i istodobnom inaktivacijom glikogen sintaze (Devlin, 2002; Harrison, 2007).



Slika 6. Razgradnja glikogena (glikogenoliza) (preuzeto iz Nelson i Cox, 2004).

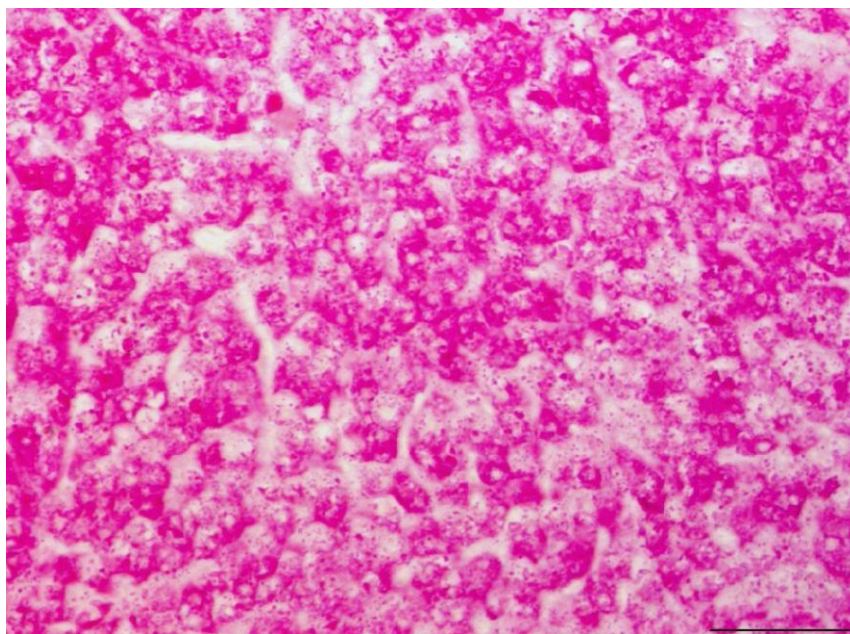
1.8. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE GLIKOGENA

Histokemijski, glikogen se dokazuje pomoću PAS reakcije. PAS (eng. *periodic acid-Schiff*) ili perjordna kiselina-Schiff reakcija je metoda kojom se u tkivu prikazuju ugljikohidrati i spojevi koji u svom sastavu imaju 1,2-glikolne skupine i/ili α -amino šećere (polisaharidi, mukopolisaharidi, glikoproteini) (Batistić, 1994). Reakcija se zasniva na oksidacijskom djelovanju perjordne kiseline (HIO_4) na 1,2-glikolne skupine glukoze pri čemu nastaju aldehidne skupine (Slika 7).



Slika 7. Prikaz nastanka aldehidnih skupina.

Aldehidne skupine zatim reagiraju sa Schiffovim reagensom pri čemu nastaje spoj karakterističnog ljubičastog obojenja. Tvari koje se oboje tom reakcijom, kao što je npr. glikogen, nazivamo PAS-pozitivnima (Slika 8).



Slika 8. Ljubičaste depozicije glikogena u jetri šarana (*Cyprinus carpio* L.). PAS. Bar = 50 μ m.

1.9. CILJ I SVRHA RADA

Ovaj rad dio je istraživanja u kojima se prati utjecaj maksimalno dopuštene koncentracije željeza u vodi tijekom dugotrajne izloženosti na tkivo jetre šarana (*Cyprinus carpio* L.). Iako je željezo esencijalan metal, ono može biti toksično ukoliko dođe do povećane akumulacije u organizmu. Rezultati dugotrajne izloženosti šarana maksimalno dopuštenoj koncentraciji željeza u vodi pokazali su da dolazi do značajnog akumuliranja tog metala u jetri (Gregorović, 2009). Istraživanja pokazuju da akumulacija teških metala u tkivu utječe na različite metaboličke puteve pa tako i na metabolizam ugljikohidrata. Dokazano je da izloženost teškim metalima dovodi do smanjenja ili povećanja sadržaja glikogena u jetri riba (Wolf i Wolfe, 2005) pa se sadržaj glikogena koristi kao jedan od indikatora stresnog okoliša. Podataka o izloženosti riba željezu ima vrlo malo, a podaci o utjecaju željeza na sadržaj glikogena u riba također izostaju budući da se donedavno smatralo da je hrana glavni izvor željeza za ribe i da ga one ne mogu apsorbirati iz vode. Stoga je cilj ovog rada utvrditi utjecaj maksimalno dozvoljene koncentracije željeza u vodi (1 mg/L) na sadržaj glikogena, veličinu hepatocita i stijenke krvnih žila u tkivu jetre šarana (*Cyprinus carpio* L.) tijekom dugotrajne izloženosti.

2. MATERIYAL I METODE

2.1. MATERIJAL

Kao test organizmi u ovom istraživanju izabrane su ribe vrste šaran (*Cyprinus carpio* L.) (Slika 9). Ova riba sporih rijeka i stajačica obraslih biljem česta je vrsta u našim rijekama i od komercijalnog je značaja.

U radu su korišteni šarani dužine oko 15 centimetara, uzgojeni u ribnjaku u Novom Marofu. Tijekom istraživanja šarani su držani u akvarijima s vodovodnom, aeriranom vodom (60 L; $t=19^{\circ}\text{C}$) i konstantnom koncentracijom željeza od 1 mg/L ($\text{pH}=7$). Voda u akvarijima svakodnevno se mijenjala pri čemu je dodavana odgovarajuća količina soli željeza. Tijekom pokusa šarani su hranjeni jednom dnevno gotovom hranom (Tetramin, Melle, Njemačka) sastava: proteini 40%, ulje 9%, vlakna 2%, sirovi pepeo 10%, udio vode 6%. Udio vitamina po kilogramu hrane iznosio je: vitamin A 17316 IU, vitamin D3 1082 IU, vitamin E 103 mg i L-askorbil-2-polifosfat 137 mg.



Slika 9. Šaran (*Cyprinus carpio* L.)

2.2. TRETIRANJE I ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA

Šarani su podijeljeni u tri skupine. Jedna skupina šarana bila je kontrolna (N=20), dok su druge dvije skupine odvojeno tretirane s dvovalentnim (FeCl_2) (N=150) odnosno trovalentnim željezom (FeCl_3) (N=150) u koncentraciji od 1 mg/L tijekom tri mjeseca (105 dana). Uzorci tkiva jetre kontrolnih i tretiranih životinja uzimani su neposredno nakon žrtvovanja životinja, koja su vršena presijecanjem leđne moždine neposredno iza glave. Žrtvovanja su provedena svaki drugi dan tijekom prva dva tjedna tretiranja, a zatim u intervalima od tjedan dana (Tablica 3). Kontrolne životinje žrtvovane su na početku (N=4) i na kraju pokusa (N=4).

Tablica 3. Dani tretiranja i žrtvovanja životinja

DAN	• TRETIRANJE • ŽRTVOVANJE	DAN	• TRETIRANJE • ŽRTVOVANJE	DAN	• TRETIRANJE • ŽRTVOVANJE
1	•	36	•	71	•
2	••	37	•	72	•
3	•	38	•	73	•
4	••	39	•	74	•
5	•	40	•	75	•
6	••	41	•	76	•
7	•	42	••	77	••
8	••	43	•	78	•
9	•	44	•	79	•
10	••	45	•	80	•
11	•	46	•	81	•
12	••	47	•	82	•
13	•	48	•	83	•
14	••	49	••	84	••
15	•	50	•	85	•
16	•	51	•	86	•
17	•	52	•	87	•
18	•	53	•	88	•
19	•	54	•	89	•
20	•	55	•	90	•
21	••	56	••	91	••

22	•	57	•	92	•
23	•	58	•	93	•
24	•	59	•	94	•
25	•	60	•	95	•
26	•	61	•	96	•
27	•	62	•	97	•
28	••	63	••	98	••
39	•	64	•	99	•
30	•	65	•	100	•
31	•	66	•	101	•
32	•	67	•	102	•
33	•	68	•	103	•
34	•	69	•	104	•
35	••	70	••	105	••

2.3. HISTOKEMIJSKE METODE

2.3.1. PRIPREMA TKIVA ZA HISTOKEMIJSKE REAKCIJE

Odmah nakon žrtvovanja životinja, uzimani su komadići tkiva jetre veličine oko 0,5 cm³. Komadići tkiva fiksirani su u 10 %-tnom neutralnom formalinu 24 sata, a zatim isprani u destiliranoj vodi. Poslije fiksacije tkivo je dehidrirano prenošenjem komadića tkiva u sve koncentriranije mješavine etanola i vode. Tkivo je prvo držano u 70%-tnom alkoholu (2 dana), zatim u 96%-tnom alkoholu (60 min) i na kraju u 100%-tnom alkoholu (2 x 60 min). Nakon dehidriranja tkivo je stavljeno u kloroform preko noći. Slijedeći dan tkivo je uklapano u rastaljeni paraplast. Uklapanje se vrši u termostatu na temperaturi od 60°C držanjem tkiva u:

1. smjesi kloroforma i paraplasta (1:1) – 30-60 min
2. paraplastu I – 60 min
3. paraplastu II – 60 min

Nakon toga tkivo se uklapa u čisti paraplast pomoću papirnate lađice kao kalupa. Dobiveni blokovi hlade se do drugog dana, a zatim obrađuju i lijepe na drvene daščice te označavaju protokolskim brojem. Uklopljeni materijal rezan je pomoću mikrotoma na rezove debljine 6 µm. Dobiveni rezovi stavljeni su na površinu vodene kupelji temperature 60°C da se izravnavaju, nakon čega su stavljeni na predmetna stakalca prethodno namazana mješavinom glicerola i bjelanjka.

2.3.2. HISTOKEMIJSKE REAKCIJE

Tkivo nakon uklapanja i rezanja ima malo prirodnog kontrasta te su strukture tkiva i stanica slabo vidljive pod svjetlosnim mikroskopom. Zbog toga se preparati boje. Zadaća bojila je da tkivu daje kontrast kao i da naglasi određenu tvar koja se proučava. U svrhe ovog istraživanja korištena su dvije vrste bojenja:

■ Bojenje hemalaun-eozinom (HE)

Bojenje hemalaun-eozinom standardno je, rutinsko bojenje. HE bojenjem se jezgre u stanici oboje plavoljubičasto, a citoplazma, eritrociti ili vezivno tkivo ružičasto do crveno.

- Postupak:
1. deparafiniranje rezova u ksilolu – 2 x 15 min
 2. rehidriranje tkiva: a) provlačenje kroz seriju alkohola od veće prema manjoj koncentraciji (od apsolutnog alkohola do 70%-og alkohola)
b) destilirana voda – 2 x 5min
 3. bojenje rezova u hemalaunu (po Mayeru) – 10 min
 4. ispiranje rezova u tekućoj vodi – 2 x 5 min
 5. bojenje u eozinu – 5 min
 6. ispiranje u destiliranoj vodi – 2 x 5 min
 7. dehidriranje tkiva (provlačenje kroz seriju alkohola od manje prema većoj koncentraciji, od 70%-og alkohola do apsolutnog)
 8. držanje u ksilolu - 2 x 10 min
 9. uklapanje u „Canada“ balzam

■ Alcijan – PAS reakcija

PAS reakcija, osnovna je reakcija kojom se u ovom istraživanju dokazuje glikogen. Koristi se u kombinaciji s alcijanskim modrilom. Alcijansko modriilo je selektivno bojilo za mucin, specifično za kisele mukopolisaharide i kompleks sulfatnih mukopolisaharida. Nalazimo ih u osnovnoj tvari vezivnog tkiva, hrskavice, u mastocitima, mukoznim žlijezdama crijeva i dišnog sustava. Navedeni spojevi boje se plavo do plavo-zeleno zahvaljujući reakciji s bakrom u molekuli te bazične boje.

- Postupak:
1. deparafiniranje rezova u ksilolu – 2 x 15 min
 2. rehidriranje tkiva
 3. bojenje u alcijanskom modrilu (1% alcian blue u 0,1M HCl) – 60 min
 4. ispiranje rezova u destiliranoj vodi
 5. oksidacija u 0,5% -tnoj vodenoj otopini perjodne kiseline – 15 min
 6. ispiranje u destiliranoj vodi – 2 x 5 min
 7. inkubacija u Schiffovom reagensu – 15 min
 8. držanje rezova u 0,5%-tnoj vodenoj otopini natrijevog metilsulfita ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) – 3 x 5 min
 9. ispiranje u tekućoj vodi – 2 x 10 min
 10. dehidriranje tkiva
 11. uklapanje u „Canada“ balzam

2.4. ANALIZA HISTOLOŠKIH PREPARATA

Histološki preparati obojeni HE i PAS-alcijan reakcijom analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Nikon Eclipse E600). Mikroskopske slike histoloških preparata snimljene su digitalnom kamerom (Nikon Eclipse E600), a zatim obrađene računalnim programom za morfometrijsku analizu mikroskopskih slika (Lucia G 4.80). Morfometrijski je mjereno udio ljubičasto obojenih površina koje predstavljaju PAS pozitivnu reakciju na glikogen u tkivu jetre. PAS pozitivne površine mjerene su na 5 nasumično odabranih svijetlo obojenih polja i 5 nasumično odabranih tamnih polja veličine $71623,6 \mu\text{m}^2$ u tkivu jetre 8 kontrolnih jedinki te po 5 jedinki tretiranih s FeCl_2 i FeCl_3 21., 35., 49., 63., 77., 91. i 105. dana izlaganja.

2.5. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Dobiveni podaci statistički su obrađeni pomoću programskog paketa Microsoft Excel i STATISTICA 8.0 (Stat Soft Inc., SAD). Rezultati su izraženi kao aritmetičke sredine \pm standardne devijacije (S.D.). Rezultati izmjerenih PAS pozitivnih površina analizirani su pomoću testa analize varijance (ANOVA) i Duncan testa uz razinu značajnosti od 5% ($p < 0,05$). Rezultati izmjerenih površina hepatocita kao i površina pozitivne reakcije s alcijanskim modrilom analizirani su pomoću t-testa također uz razinu značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

3. REZULTATI

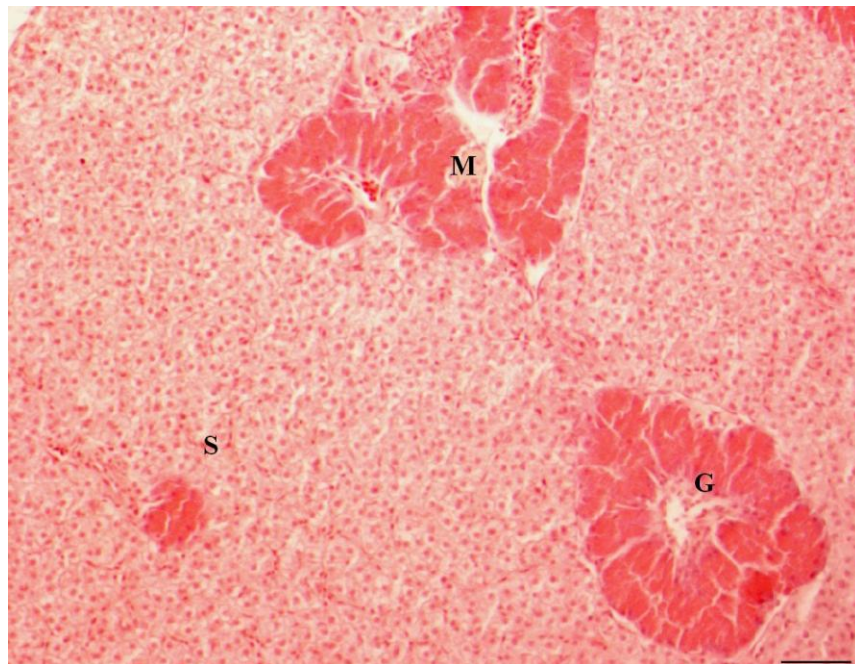
3.1. HISTOKEMIJSKE ANALIZE

3.1.1. BOJENJE HEMALAUN EOZINOM (HE)

Na preparatima obojenima hemalaun eozinom (HE) proučavana je građa jetre kontrolnih šarana i onih tretiranih željezom.

3.1.1.1. Kontrolna skupina šarana

Jetra netretiranih šarana građena je po principu hepatopankreasa, odnosno duž toka portalne vene mjestimično se nalaze „otočići“ egzokrinog tkiva gušterače (Slika 10).



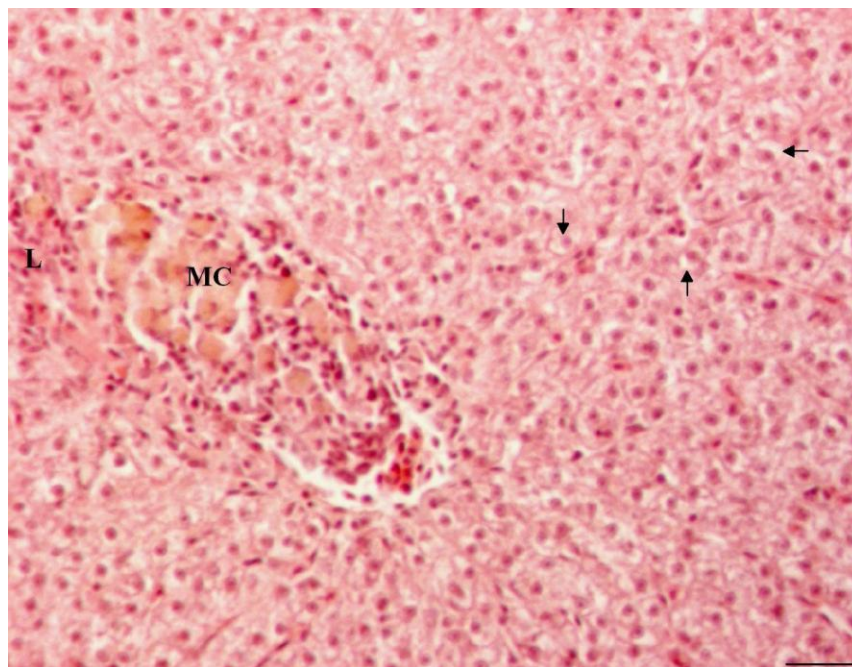
Slika 10. Jetra kontrolne skupine šarana prošarana „otočićima“ gušterače (G). Između hepatocita grupiranih u razgranjene vrpce (tubule) nalaze se sinusoide (S). U „otočiću“ gušterače nazire se žučkasto obojeni makrofag (M). HE. Bar = 50 μ m.

Tkivo jetre je u svojoj osnovnoj građi slično jetri sisavaca, iako postoje neke karakteristike po kojima se razlikuju. U šarana se ne opaža lobularna građa parenhima koja je u sisavaca, ovisno o vrsti, manje-više dobro izražena. Jetreni parenhim šarana, kao i u sisavaca, građen je od

poligonalnih hepatocita s okruglom jezgrom, homogeno obojenom citoplazmom i dobro izraženom membranom. U šarana hepatociti ne čine pločaste strukture kao u sisavaca, već su grupirane u razgranjene tubule ili vrpce. Između tubula nalaze se sinusoidi u kojima se mjestimično vide eritrociti s jezgrom. U tkivu jetre kao i u „otočićima“ gušterače mjestimično se vide pojedinačni makrofazi.

3.1.1.2. Šarani tretirani željeznim(II) kloridom i željeznim(III) kloridom

U odnosu na kontrolu, u tkivu jetre tretiranih šarana s FeCl_2 i FeCl_3 uočavaju se nakupine limfocita, povećan broj pojedinačnih makrofaga te prisutnost makrofagnih centara. Promjene se vide i u dijelu hepatocita, u vidu manje ili veće vakuoliziranosti citoplazme (Slika 11).



Slika 11. Nakupine limfocita (L) i makrofagni centar (MC) u tkivu jetre šarana tretiranog s FeCl_2 . Tretirano tkivo obilježava udio hepatocita sa povećanom vakuolizacijom citoplazme (strelice). HE. Bar = 50 μm .

Morfometrijski su mjerene površine hepatocita. U Tablici 4 prikazane su srednje vrijednosti površina stanica kod kontrolne skupine te skupina tretiranih s FeCl_2 i FeCl_3 105. dana. Rezultati pokazuju značajno smanjenje površine stanica u tkivu jetre tretiranih šarana u odnosu na kontrolu. U skupini šarana tretiranih s FeCl_2 površina stanica je bila 21.98% manja u odnosu na

kontrolu. U skupini šarana tretiranih s FeCl₃ smanjenje površine stanica bilo je nešto manje i iznosilo je 17.15%.

Tablica 4. Srednje vrijednosti veličina stanica po skupinama.

(*) Statistički značajno u odnosu na kontrolu ; t-test; p<0,05.

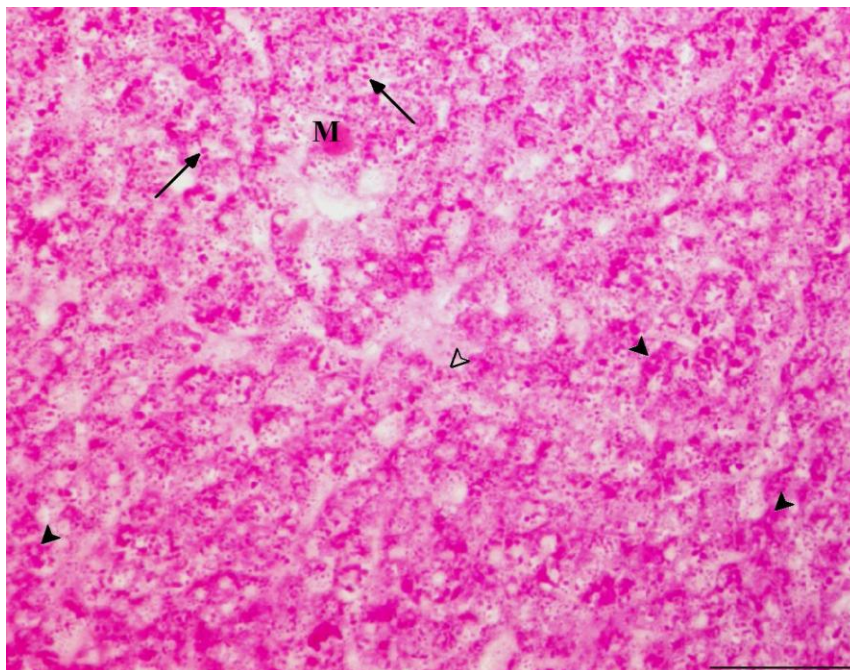
SKUPINA ŠARANA	POVRŠINA STANICA (μm ²) ± S.D.
K	765,02 ± 165,99
FeCl ₂	596,85 ± 133,23 *
FeCl ₃	633,83 ± 95,82 *

3.1.2. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE GLIKOGENA

Za histokemijsko dokazivanje glikogena u tkivu jetre korištena je PAS reakcija kojom se depozicije glikogena oboje karakterističnom ljubičastom bojom.

3.1.2.1. Kontrolna skupina šarana

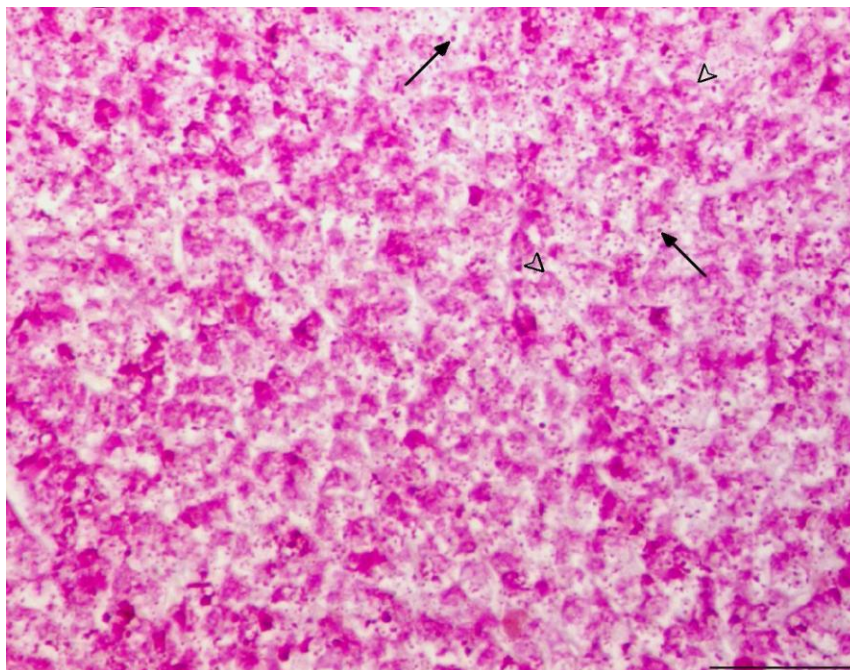
U većini hepatocita kontrolnih skupina šarana vidljiva je PAS pozitivna reakcija koja ukazuje na prisutnost glikogena. U stanicama koje su siromašnije glikogenom vidi se difuzno ljubičasto obojenje i pojedinačna ljubičasto obojena manja ili veća zrnca glikogena. U stanicama koje su bogatije glikogenom vidi se intenzivno obojenje koje ispunjava cijelu citoplazmu te se može naslutiti centralno smještena jezgra koja ne sadrži glikogen. Ponegdje u tkivu uočavaju se pojedinačni makrofazi koji su također PAS pozitivni (Slika 12).



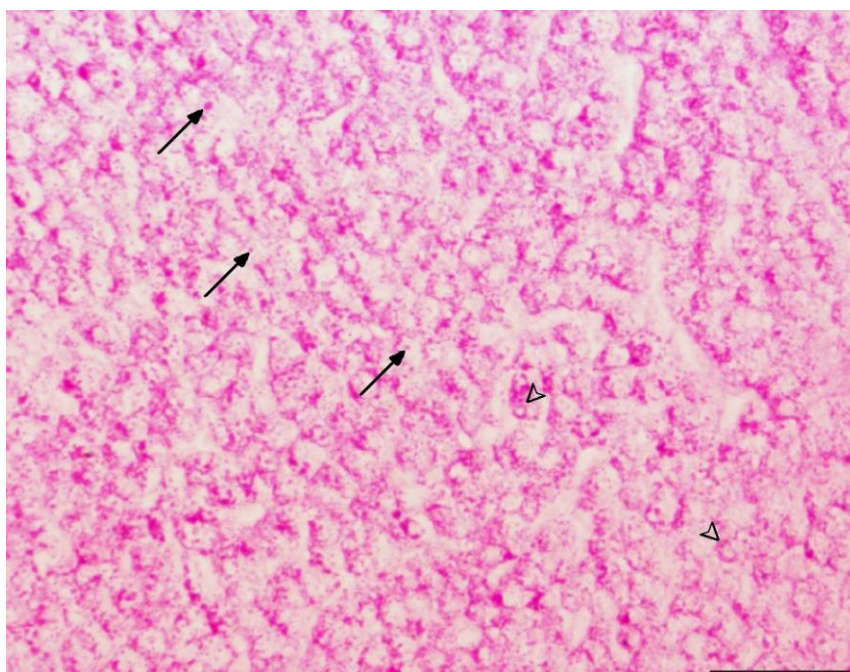
Slika 12. Jetra kontrolne skupine šarana. S obzirom na sadržaj glikogena razlikuju se stanice koje imaju manje ili više glikogena. U stanicama s manje glikogena prisutna je difuzna (kratka prazna strelica) i zrnata reakcija (dugačka strelica), a u stanicama s više glikogena intenzivno difuzno obojenje koje ispunjava cijelu citoplazmu (kratka crna strelica). Pojedinačni makrofazi (M) koji su prisutni u tkivu, također su PAS pozitivni. PAS. Bar = 50 μ m.

3.1.2.2. Šarani tretirani željeznim(II) kloridom

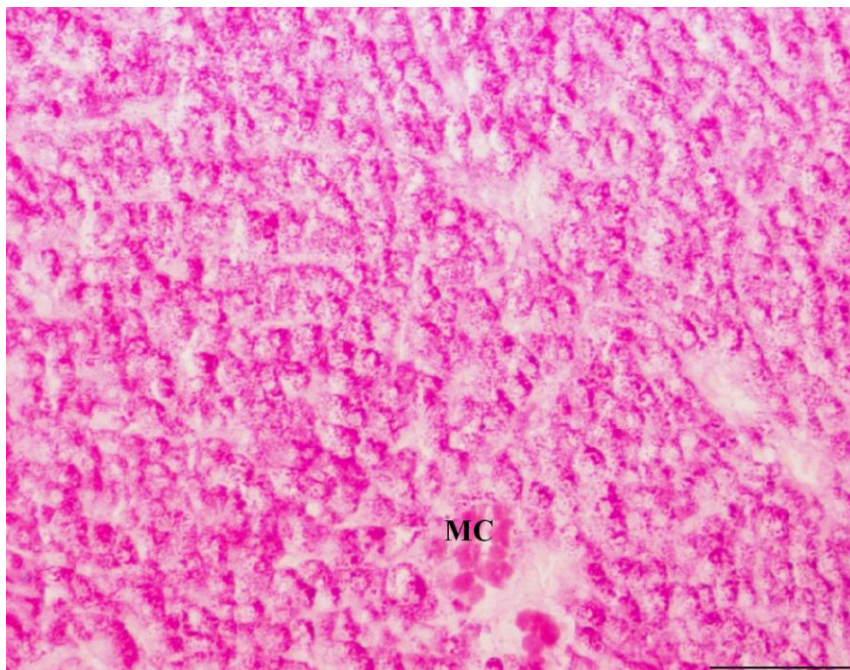
U šarana tretiranih s FeCl_2 21. dana tretiranja uočava se smanjenje PAS pozitivnih površina u usporedbi s kontrolom (Slika 13). U tkivu prevladavaju hepatocite s difuznim obojenjem i zrnima, odnosno stanice koje sadrže manje glikogena. Trend smanjenja PAS pozitivnih površina nastavlja se i daljnjim tretiranjem sve do 77.dana kada je u hepatocitima uočeno slabije difuzno obojenje i mnogo sitnih zrnaca glikogena (Slika 14). Daljnjim tretiranjem sadržaj glikogena počinje rasti, tako da je 91. dan u tkivu nađeno intenzivnije difuzno obojenje koje prekriva veći dio hepatocita. Porast PAS pozitivnih površina se nastavlja sve do kraja tretiranja (105. dan) kada se u hepatocitima uočava još intenzivnije difuzno obojenje. Iako je došlo do porasta u odnosu na 77. dan, u odnosu na kontrolu ipak ima manje glikogena. Sto i petog dana u tkivu su nađeni veći PAS pozitivni makrofagni centri (Slika 15).



Slika 13. Dvadeset i prvog dana tretiranja s FeCl_2 u tkivu ima manje glikogena u odnosu na kontrolu. Dominiraju hepatociti s difuznom (kratka prazna strelica) i zrnatom reakcijom (dugačka strelica). PAS. Bar = 50 μm .



Slika 14. Sedamdeset i sedmog dana tretiranja s FeCl_2 u tkivu ima znatno manje glikogena u odnosu na 21. dan tretiranja. U svim hepatocitima prisutno je slabije difuzno PAS pozitivno obojenje (kratka prazna strelica) i više sitnih zrnaca glikogena (dugačka strelica). Hepatocita s intenzivnim difuznim obojenjem koje ispunjava cijelu citoplazmu ima vrlo malo. PAS. Bar = 50 μm .



Slika 15. Sto i petog dana tretiranja s FeCl_2 u tkivu ima više PAS pozitivnog obojenja u odnosu na 77. dan, no manje u odnosu na kontrolu. Na slici se vidi PAS pozitivan makrofagni centar (MC). PAS. Bar = 50 μm .

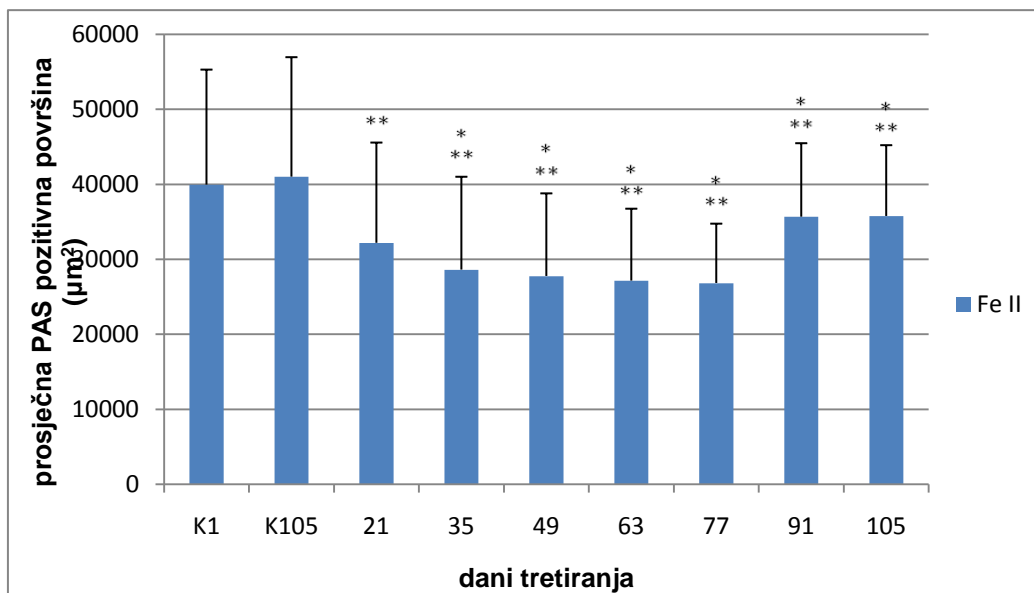
3.1.2.2.1 Morfometrijska mjerenja PAS pozitivnih površina

Morfometrijski su mjerene ljubičasto obojene, PAS pozitivne površine koje predstavljaju depozicije glikogena u jetri šarana tretiranih s FeCl_2 . Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 5 i na Slici 16. Kontrolne skupine životinja (K_1 i K_{105}), sadržavale su najviše glikogena u hepatocitima. Kod šarana iz skupine K_1 prosječna PAS pozitivna površina iznosila je 39926,51 μm^2 , a kod šarana iz skupine K_{105} 40988,26 μm^2 . Smanjenje PAS pozitivne površine uočava se 21. dan tretiranja kad ona iznosi 32165,87 μm^2 , što je 19,44% (7760,65 μm^2) manje od PAS pozitivne površine skupine K_1 . Daljnjim tretiranjem PAS pozitivna površina se smanjuje tako da 35. dana iznosi 28596,34 μm^2 , a 49. dana 27747,54 μm^2 . Smanjenje je uočeno i 63. dana kada površina iznosi 27127,89 μm^2 te 77. dana kada dostiže svoj minimum od 26811,42 μm^2 . Sedamdeset i sedmog dana pozitivna površina bila je prosječno 32,85% manja u usporedbi s površinom izmjenom kod kontrolne skupine K_1 . Nakon 77. dana pozitivna površina počinje rasti. Devedeset i prvog dana tretiranja ona iznosi 35651,30 μm^2 , 105. dana 35748,28 μm^2 što znači da se u konačnici PAS pozitivna površina smanjila za 10,46% (4178,24 μm^2) u usporedbi s

pozitivnom površinom kontrolne skupine K₁, odnosno za 12,78% (5239,98 μm²) u usporedbi s pozitivnom površinom kontrolne skupine K₁₀₅.

Tablica 5. Srednje vrijednosti ± S.D. PAS pozitivnih površina u jetri šarana ovisno o duljini tretiranja s FeCl₂.

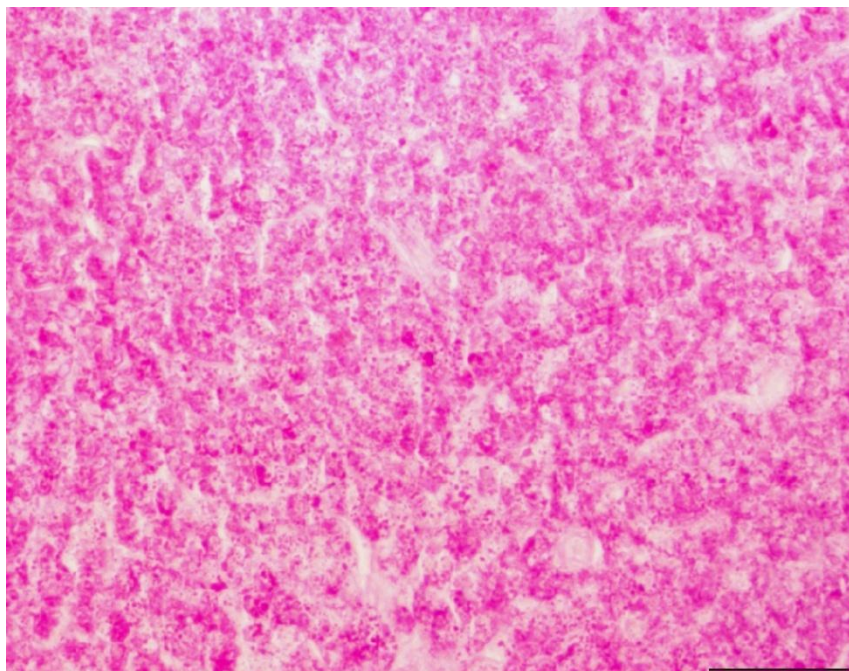
DANI TRETIRANJA	POVRŠINA PAS POZITIVNIH POVRŠINA (μm ²)
K ₁	39926,51 ± 15331,34
K ₁₀₅	40988,26 ± 15926,25
21	32165,87 ± 13364,85
35	28596,34 ± 12375,83
49	27747,54 ± 11009,86
63	27127,89 ± 9587,59
77	26811,42 ± 7909,12
91	35651,30 ± 9793,69
105	35748,28 ± 9435,54



Slika 16. Grafički prikaz srednjih vrijednosti PAS pozitivnih površina tijekom tretiranja s FeCl₂. (*) Statistički značajno u odnosu na kontrolu na početku tretiranja (K₁); (**) Statistički značajno u odnosu na kontrolu na kraju tretiranja (K₁₀₅); analiza varijance; post-hoc Duncan test; p<0,05.

3.1.2.3. Šarani tretirani željeznim(III) kloridom

U šarana tretiranih s FeCl_3 tijekom kvalitativne analize tkiva jetre nisu uočene značajnije promjene u sadržaju glikogena sve do kraja tretiranja kada je u hepatocitima uočeno neznatno slabije obojenje u odnosu na kontrolu (Slika 17).



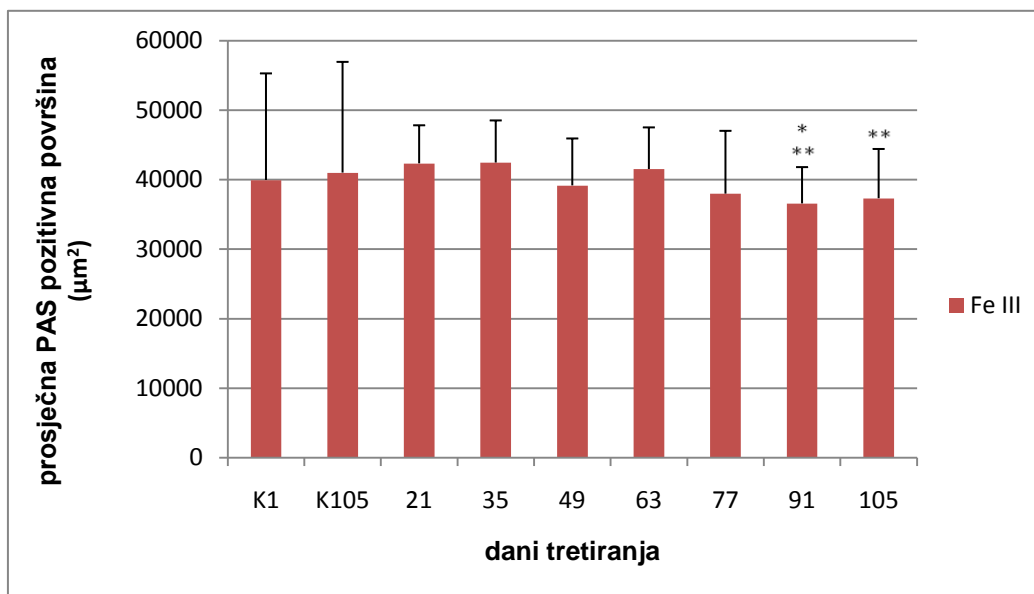
Slika 17. Sto i petog dan tretiranja s FeCl_3 u tkivu jetre ima neznatno manje PAS pozitivnih površina u odnosu na kontrolu. PAS. Bar = 50 μm .

3.1.2.3.1 Morfometrijska mjerenja PAS pozitivnih površina

U Tablici 6 i na Slici 18 prikazane su srednje vrijednosti izmjerenih PAS pozitivnih površina tijekom tretiranja s FeCl_3 . PAS pozitivne površine do 49. dana blago rastu, ali se ne razlikuju bitno od kontrolnih skupina. Četrdeset i devetog dana izmjerena je nešto manja pozitivna površina koja iznosi 39146,11 μm^2 . Šezdeset i trećeg dana vrijednost raste do 41500,91 μm^2 . Daljnjim tretiranjem PAS pozitivna površina se smanjuje tako da 77. dana iznosi 37962,64 μm^2 , a 91. dana 36558,27 μm^2 . Na kraju tretiranja, 105. dana, vrijednost PAS pozitivne površine je 6,58% (2626,86 μm^2) manja u odnosu na skupinu K_1 , odnosno 9% (3688,61 μm^2) manja u odnosu na skupinu K_{105} .

Tablica 6. Srednje vrijednosti \pm S.D. PAS pozitivnih površina u jetri šarana ovisno o duljini tretiranja s FeCl_3

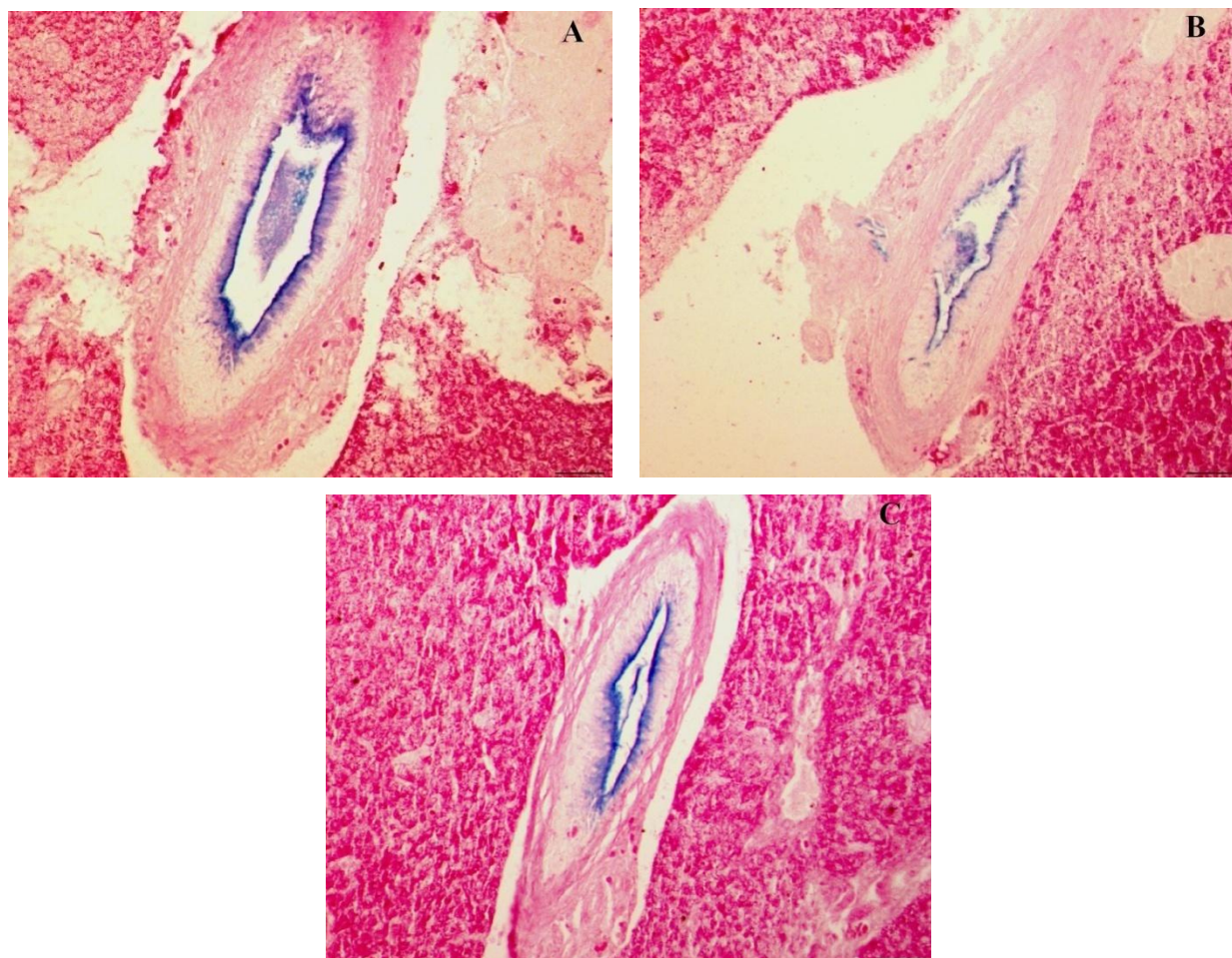
DANI TRETIRANJA	POVRŠINA PAS POZITIVNIH POVRŠINA (μm^2)
K ₁	39926,51 \pm 15331,34
K ₁₀₅	40988,26 \pm 15926,25
21	42317,58 \pm 5473,60
35	42433,91 \pm 6057,82
49	39146,11 \pm 6749,60
63	41500,91 \pm 5989,64
77	37962,64 \pm 9031,30
91	36558,27 \pm 5218,61
105	37299,66 \pm 7085,01



Slika 18. Grafički prikaz srednjih vrijednosti PAS pozitivnih površina tijekom tretiranja s FeCl_3 . (*) Statistički značajno u odnosu na kontrolu na početku tretiranja (K₁); (**) Statistički značajno u odnosu na kontrolu na kraju tretiranja (K₁₀₅); analiza varijance; post-hoc Duncan test; $p < 0,05$.

3.1.3. HISTOKEMIJSKO DOKAZIVANJE MUKOPOLISAHARIDA U SASTAVU STIJENKI KRVNIH ŽILA U TKIVU HEPATOPANKREASA

Za histokemijsko dokazivanje mukopolisaharida u stijenjkama krvnih žila jetre korišteno je bojenje alcijanskim modrilom. U kontrolnoj skupini šarana intenzivno difuzno obojena pozitivna reakcija nađena je u stijenci krvnih žila čineći tamnoplavi prsten neposredno uz lumen (Slika 19A). U šarana tretiranih s FeCl_2 prsten oko lumena većinom nije kontinuiran, nije toliko intenzivno obojen i debeo kao u kontrolnoj skupini (Slika 19B). U šarana tretiranih s FeCl_3 pozitivna reakcija je jača nego u odnosu na tretiranje s FeCl_2 iako se primjećuje da je manje intenzivna od one u kontrolnoj skupini (Slika 19C).



Slika 19. Mukopolisaharidi u stijenci krvne žile: A) kontrolne skupine šarana, B) skupine šarana tretiranih s FeCl_2 , C) skupine šarana tretiranih s FeCl_3 . Alcian + PAS. Bar = 50 μm .

3.1.3.1. Morfometrijska mjerenja površina obojenih alcijanskim modrilom

Rezultati morfometrijskih mjerenja plavo obojene površine u ukupnoj površini krvne žile u kontrolnim skupinama kao i skupinama tretiranim s FeCl_2 i FeCl_3 105. dana prikazani su u Tablici 7. Rezultati pokazuju da je udio pozitivne reakcije u stijenci krvne žile najveći u kontrolnoj skupini, nešto manji u skupini tretiranoj s FeCl_3 , a najmanji u skupini tretiranoj s FeCl_2 .

Tablica 7. Udio površine pozitivne reakcije u ukupnoj površini stijenke krvne žile po skupinama. (*) Statistički značajno u odnosu na kontrolu ; t-test; $p < 0,05$.

SKUPINE ŠARANA	UDIO POVRŠINE POZITIVNE REAKCIJE U UKUPNOJ POVRŠINI STIJENKE KRVNE ŽILE \pm S.D.
K	$7,15 \pm 0,96$
FeCl_2	$5,09 \pm 2,10$ *
FeCl_3	$5,87 \pm 2,42$

4. RASPRAVA

Željezo je esencijalan metal što znači da je neophodan za normalno funkcioniranje organizma zbog svojih brojnih uloga u staničnoj biokemiji i metabolizmu. Kod prekomjernog unosa ono se taloži prvenstveno u jetri gdje ispoljava svoje toksično djelovanje. Željezo je potencijalni toksin jer ima značajnu ulogu u stvaranju slobodnih radikala. Organizmi imaju razvijenu antioksidativnu obranu koja može neutralizirati normalne količine slobodnih radikala. No, kod povećane akumulacije željeza, a time i povećane proizvodnje slobodnih radikala, može doći do značajnih promjena u metabolizmu stanica što u konačnici može dovesti do oštećenja stanica i stanične smrti.

Mnoga laboratorijska istraživanja pokazala su da akumuliranje metala u tkivu ovisi o koncentraciji metala i trajanju izloženosti. Ovaj rad dio je istraživanja u kojem se pratio utjecaj maksimalno dopuštene koncentracije željeza u vodi (1mg/L), koja se smatra netoksičnom, tijekom dugotrajne izloženosti na tkivo jetre šarana. Pomoću histokemijskih i morfometrijskih metoda, pratio se utjecaj dvovalentnog i trovalentnog željeza na sadržaj glikogena u tkivu jetre šarana tijekom 105 dana.

Glikogen

Rezultati dugotrajne intoksikacije s FeCl_2 i FeCl_3 pokazali su da akumulirano željezo smanjuje sadržaj glikogena u jetri šarana. Slično mojim rezultatima, Carrquiriborde i suradnici (2003) opisuju smanjenje sadržaja glikogena u jetri šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom hranjenja hranom obogaćenom željezom. Istraživanja pokazuju da povećana akumulacija i drugih teških metala (bakar, kadmij, krom) dovodi do smanjenja glikogena u jetri riba (Ali i sur., 2003; Cicik i Engin, 2005; Vutukuru, 2005; Thirumavalavan, 2010). Do smanjenja zaliha glikogena vjerojatno dolazi zbog pojačane potrebe za glukozom u putu pentoza fosfata. Smatram da je ovakvo preusmjeravanje u metabolizmu ugljikohidrata nužno za borbu protiv oksidativnog stresa nastalog akumuliranim željezom. Slično smatraju i Grant (2008) i Ralser i suradnici (2007). Redukcijom glukoze u putu pentoza fosfata proizvodi se NADPH koji je potreban za obnovu antioksidativnog svojstva glutaciona, koji je u svom reduciranom obliku najvažniji ne-enzimski antioksidant u organizmu (Ralser i sur., 2007; Grant, 2008). Enzim koji katalizira prvu reakciju u putu pentoza fosfata, prilikom koje nastaje NADPH, je glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PD).

Stoga je razina aktivnosti ovog enzima važan indikator oksidativnog stresa u organizmu. Rezultati tretiranja šarana željezom tijekom 105 dana pokazali su značajno povišenje aktivnosti enzima G6PD. Tijekom tretiranja s dvovalentnim željezom aktivnost enzima povisila se čak 179%, a tijekom tretiranja s trovalentnim željezom 119% u odnosu na netretirane šarane (Gregorović, 2009). Ovi nalazi u skladu su s mojim rezultatima i potvrđuju da se sadržaj glikogena smanjuje radi proizvodnje NADPH odnosno pojačane antioksidativne obrane.

Moji rezultati također pokazuju da nakon 77. dana tretiranja s FeCl_2 dolazi do značajnog porasta sadržaja glikogena. Do porasta sadržaja glikogena vjerojatno dolazi zbog poremećaja u razgradnji glikogena. Nekoliko autora u svojim radovima potvrđuje ovu pretpostavku. Lappivaara i suradnici (1999) i Lappivaara i Marttinen (2005) u svojim istraživanjima primjećuju smanjenu ukupnu aktivnost enzima glikogen fosforilaze kao i zasebnu aktivnost enzima glikogen fosforilaze α . Aktivnost ovih enzima nužna je za razgradnju glikogena. Autori Peplow i Edmonds (2005) u svojem istraživanju o utjecaju otpadnih voda iz rudnika također primjećuju povećanje sadržaja glikogena u jetri riba. Akumulaciju glikogena pripisuju smanjenoj aktivnosti enzima za skidanje ogranaka u procesu razgradnje glikogena. Smanjena aktivnost tog enzima rezultira sintezom abnormalne, nerazgranate molekule glikogena slične amilopektinu. Zbog takve građe, molekula je manje topiva i razgradnja glikogena je smanjena. Uzrok smanjene aktivnosti enzima za skidanje ogranaka, vjerojatno je njegova oksidacija slobodnim radikalima koji su nastali povećanom akumulacijom željeza. U prilog toj pretpostavki govori i povećani sadržaj karbonila, markera oštećenja proteina, izmjerenog u sklopu istraživanja o ranije spomenutom utjecaju željeza na jetru šarana (Gregorović, 2009). Sadržaj karbonila kod tretiranja s FeCl_2 bio je čak za 63% veći u odnosu na kontrolu.

Tijekom tretiranja s FeCl_3 također dolazi do smanjenja sadržaja glikogena, no ono nije toliko jako izraženo kao tijekom tretiranja s FeCl_2 . Moja pretpostavka je bila da je razlog tome vjerojatno različita količina akumuliranog željeza u tkivu, što i potvrđuje morfometrijska analiza koja pokazuje da se prilikom tretiranja s FeCl_3 akumuliralo upola manje željeza u odnosu na tretiranje s FeCl_2 .

Morfološke promjene u tkivu hepatopankreasa

Histomorfološke promjene u tkivu mogu poslužiti kao pokazatelj općeg stanja jetre šarana te se smatraju dobrim i osjetljivim indikatorom okolišnog stresa. Hepatociti pod utjecajem različitih čimbenika mogu promijeniti svoj izgled i veličinu (Mumford i sur., 2010). Na primjer, hepatocit se prilikom adaptacije na stresni okoliš, kao što je akumulacija teškog metala, može povećati. Općenito, povećanje stanice znak je povećane rate metabolizma i pojačane sinteze spojeva koji će joj pomoći u neutralizaciji toksičnih spojeva i suviška slobodnih radikala. Takva promjena smatra se ranim, reverzibilnim pokazateljem stresa. Ukoliko stanica ne može neutralizirati stres, oštećenje dovodi do ireverzibilnih promjena. Jedan od ranih znakova takvog oštećenja je smanjenje stanica koje prethodi nekrozi i staničnoj smrti (Cobb i sur., 1996). Rezultati mojih morfometrijskih mjerenja su pokazali da su se površine hepatocita u tretiranih skupina šarana značajno smanjile u odnosu na kontrolu. Smanjenje je bilo izraženije u skupini tretiranoj s FeCl_2 , što je i logično budući da se u hepatocitima akumuliralo znatno više željeza. U tkivu hepatopankreasa šarana tretiranih s FeCl_2 također je uočeno znatno više makrofagnih centara i nakupina limfocita što je, kao i smanjenje veličine hepatocita, pokazatelj patološkog procesa.

Promjene su uočene i u stijenci krvnih žila u tkivu hepatopankreasa obojenom alcijanskim modrilom. Alcijansko modrilo reagira s mukopolisaharidima koje nalazimo u stijenama krvnih žila, neposredno uz lumen žile, u sloju koji se zove *tunica intima*. *Tunicu intimu* čini jedan sloj endotelnih stanica koje prekrivaju subendotelni sloj izgrađen od rahlog vezivnog tkiva. Reakcija s alcijanskim modrilom pokazuje oštećenje tog sloja u skupinama šarana tretiranih s dvovalentnim i s trovalentnim željezom. Ovom reakcijom je dokazano da pod utjecajem željeza dolazi do povećane proizvodnje slobodnih radikala koji oksidiraju sastavne dijelove *tunice intime* i izazivaju njihovo oštećenje na što ukazuje smanjenje površine i intenziteta pozitivne reakcije. Moja pretpostavka je da su slobodni radikali izazvali oštećenje membrana stanica u sloju *tunice intime*. Naime, jedan od poznatih negativih učinaka djelovanja slobodnih radikala je i lipidna peroksidacija. Ona podrazumijeva oksidaciju višestruko nezasićenih masnih kiselina koje se nalaze u sastavu lipida bioloških membrana. U kaskadi peroksidacijskih reakcija dolazi do razgradnje lipida. Osim s lipidima, slobodni radikali mogu reagirati i s membranskim

proteinima. Oksidacija lipida i membranskih proteina slobodnim radikalima narušava strukturu i fluidnost membrane.

Željezo je bitan čimbenik u inicijaciji i stimuliranju lipidne peroksidacije (Gutteridge, 1995). Nakon što je proces peroksidacije započeo željezo ga može dalje poticati i širiti budući da lipidni hidroperoksidi lako reagiraju s Fe^{2+} i Fe^{3+} ionima. Baker i suradnici (1997) su ustanovili da i male količine željeza dodane u hranu afričkog soma (*Clarias gariepinus*) tijekom 5 tjedana, uzrokuju pojačanu produkciju slobodnih radikala koji dovode do lipidne peroksidacije. U svom radu izmjerili su malu količinu nastalog malondialdehida (MDA), produkta lipidne peroksidacije, i značajno smanjenje razine antioksidativnog vitamina E u jetri ribe. Padmini i suradnici (2008) svojim istraživanjem također potvrđuju pretpostavku da oksidativni stres nastao akumulacijom teških metala dovodi do lipidne peroksidacije u riba. Njihovi rezultati pokazali su značajnu količinu produkata lipidne peroksidacije (konjugiranih diena, lipidnih hidroperoksida, lipidnih peroksida) kao i smanjene razine antioksidanta superoksid dismutaze (SOD) u jetri riba iz estuarija zagađenog teškim metalima. Nakon što se raspoloživi antioksidanti „potroše“, jedini preostali reducirajući agensi su tiolne grupe membranskih proteina. Oksidacijom tih proteina, kao i već opisanih lipida, narušava se cjelovitost biološke membrane što vodi do oštećenja stanica i stanične smrti (Cobb i sur., 1996).

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno na jetri šarana (*Cyprinus carpio* L.) tretiranih tijekom 105 dana s maksimalno dopuštenom koncentracijom (1 mg/L) dvovalentnog i trovalentnog željeza u vodi. Pratio se utjecaj na sadržaj glikogena u tkivu jetre, na veličinu hepatocita i na stijenke krvnih žila. Na temelju rezultata dobivenih pomoću histokemijskih i morfometrijskih analiza može se zaključiti sljedeće:

- Akumulirano željezo dovodi do smanjenja sadržaja glikogena u tkivu jetre šarana koje je jače izraženo u skupini tretiranoj s dvovalentnim željezom.
- Dugotrajno tretiranje s dvovalentnim i trovalentnim željezom dovodi do histopatoloških promjena u tkivu hepatopankreasa u vidu smanjenja hepatocita i oštećenja stijenki krvnih žila. Dvovalentno željezo izazvalo je značajnije promjene.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je i maksimalno dopuštena koncentracija željeza u vodi ipak dovoljno visoka jer uslijed dugotrajne izloženosti dovodi do značajnih histopatoloških i biokemijskih promjena u jetri, glavnom metaboličkom organu riba.

6. LITERATURA

- Ali A., Al-Ogaily S. M., Al-Asgah N. A., Gropp J. (2003): Effect of sublethal concentrations of copper on the growth performance of *Oreochromis niloticus*. *Journal of Applied Ichthyology* 19: 183-188
- Andersen Ø. (1997): Accumulation of waterborne iron and expression of ferritin and transferrin in early developmental stages of brown trout (*Salmo trutta*). *Fish Physiology and Biochemistry* 16: 223-231
- Andrews N. C. (2000): Iron metabolism : iron deficiency and iron overload. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 1: 75-98
- Baker R. T. M., Martin P., Davies S. J. (1997): Ingestion of sublethal levels of iron sulphate by African catfish affects growth and tissue lipid peroxidation. *Aquatic Toxicology* 40: 51-61
- Batistić B. (1994): Mikroskop i histološka tehnika. Medicinski fakultet, Sveučilište u Rijeci, Rijeka.
- Bogut I. (2006): Biologija riba – morfologija, anatomija i fiziologija, sistematika, ekologija riba. Poljoprivredni fakultet u Osijeku, Osijek.
- Britton R. S., Ramm G. A., Olynyk J., Singh R., O'Neill R., Bacon B. R. (1994): Pathophysiology of iron toxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 356: 239-253
- Bury N. R., Grosell M., Wood C. M., Hogstrand C., Wilson R. W., Rankin J. C., Busk M., Lecklin T., Jensen F. B. (2001): Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). *Journal of Experimental Biology* 204: 3779-3787
- Bury N. R., Grossel M. (2003): Iron aquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 135: 97-105
- Carrquiriborde P., Handy R. D., Davies S. J. (2004): Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *The Journal of Experimental Biology* 207: 75-86
- Cicik B., Engin K. (2005): The effect of cadmium on levels of glucose in serum and glycogen reserves in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* L. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 113-117
- Cobb J. P., Hotchkiss R. S., Karl I. E., Buchman T. G. (1996): Mechanisms of cell injury and death. *British Journal of Anaesthesia* 77: 3-10
- Devlin T. M. (2002): *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. Wiley-Liss, New York
- Donovan A., Brownlie A., Dorschener M., Zhou Y., Pratt S. J., Paw B. H., Thisse C., Thisse B., Zon L. I. (2002): The zebrafish mutant gene *chardonmay* (*cdy*) encodes divalent metal transporter 1 (DMT1). *Blood* 100: 4655-4659

Dorschner M. O., Phillips R. B. (1999): Comparative analysis of two Nramp loci from rainbow trout. *DNA and Cell Biology* 18: 573-583

Dutta H. M. (1996): A composite approach for evaluation of the effects of pesticides on fish. U Dutta H. M., Datta-Munshi J. S. (ur.): *Fish Morphology: Horizon of New Research*. Science Publishers Inc., New York.

Filipović I., Lipanović S. (1995): *Opća i anorganska kemija, 2. dio: Kemijski elementi, njihove elementarne tvari i spojevi*. Školska knjiga, Zagreb.

Grant C.M. (2008): Metabolic reconfiguration is a related response to oxidative stress. *Journal of Biology* 7: 1

Gregorović G. (2009): Utjecaj dvovalentnog i trovalentnog željeza na jetru šarana (*Cyprinus carpio* L.). Doktorska disertacija. Prirodoslovno matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Gutteridge J. M. C. (1995): Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41: 1819-1828

Guyton A. C., Hall J. E. (2006): *Medicinska fiziologija*. Medicinska zaklada, Zagreb.

Harrison T. R., Isselbacher K. J. (2007): *Principi interne medicine. Placebo*, Split.

Heath A. (1995): *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press Inc., Boca Raton.

Hermes-Lima M. (2004): Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. U Storey K.B.: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey.

Hinton D. E., Segner H., Braunbeck T. (2001): Toxic responses of the liver. U Schlenk D., Bensen W.H. (ur.): *Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts*. Taylor and Francis, London.

Hugget R. J., Kimerle R. A., Mehrie P. M., Bergman H. L. (1992): *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress*. Lewis Publishers, London.

Junqueira L. C., Carneiro J. (2005): *Osnove histologije, udžbenik i atlas*. Školska knjiga, Zagreb.

Lappivaara J., Kiviniemi A., Oikari A. (1999): Bioaccumulation and subchronic physiological effects of waterborne iron overload on whitefish exposed in humic and nonhumic water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37: 196-204

Lappivaara J., Marttinen S. (2005): Effects of waterborne iron overload and simulated winter conditions on acute physiological stress response of whitefish, *Coregonus lavaretus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 157-168

- Lesnefsky E. (1994): Tissue iron overload and mechanisms of iron-catalyzed oxidative injury. U Armstrong D.: Free Radicals in Diagnostic Medicine. Plenum Press, New York.
- Meneghini R. (1997): Iron homeostasis, oxidative stress and DNA damage. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 783-792
- Mumford S., Heidel J., Smith C., Morrison J., MacConnell B., Blazer V. (2010): Fish histology and histopathology manual, http://training.fws.gov/ec/resources/fish_histology/histology.html; pristupljeno 01. 02. 2011.
- Nagai M., Ikeda S. (1971): Carbohydrate metabolism in fish – I. effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 37: 404-409
- Nelson D. L. i Cox M. M. (2004): *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman & Worth Publishing, Boston.
- Padmavathy P., Ramanathan N. (2010): Quantitative changes of glycogen and lactate in muscle, blood and liver tissues of *Oreochromis mossambicus* under hypoxia and recovery. *Tamilnadu Journal of Veterinary and Animal Sciences* 6: 54-59
- Padmini E., Vijaya Geetha B., Usha Rani M. (2008): Liver oxidative stress of the grey mullet *Mugil cephalus* presents seasonal variations in Ennore estuary. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 41: 951-955
- Peplow D., Edmonds R. (2005): The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organization. *Ecological Engineering* 24: 101-119
- Poli G. (1993.): Liver damage due to free radicals. *British Medical Bulletin* 49: 604-620
- Prousek J. (2007): Fenton chemistry in biology and medicine. *Pure and Applied Chemistry* 79: 2325-2338
- Ralser M., Walmelink M.M., Kowald A., Gerisch B., Heeren G., Struys E.A., Klipp E., Jakobs C., Breitenbach M., Lehrach H., Krobitsch S. (2007): Dynamic rerouting of the carbohydrate flux is key to counteracting oxidative stress. *Journal of Biology* 6: 10
- Roeder M., Roeder R. H. (1966): Effect of iron on the growth rate of fish. *Journal of Nutrition* 90: 86-90
- Springer O., Springer D. (2008): *Otrovani modrozeleni planet – priručnik iz ekologije, ekotoksikologije i zaštite prirode i okoliša*. Meridijani, Samobor.
- Thirumavalavan R. (2010): Effect of copper on carbohydrate metabolism fresh water fish, *Catla catla*. *Asian Journal of Science and Technology* 5: 95-99

Van Dyk J.C., Pieterse G. M., van Huren J. H. (2003): Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66: 432-440

Vutukuru S. S. (2005): Acute effects of hexavalent chromium on survival, oxygen consumption, haematological parameters and some biochemical profiles of the indian major carp, *Labeo rohita*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2: 456-462

Watanabe T., Viswanath K., Satoh S. (1997): Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture* 151: 185-207

Wendelaar-Bonga S. E. (1997): The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77: 591-625

Winklemann E. (2002): Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions* 30: 691-696

Wolf J. C., Wolfe M. J. (2005): A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. *Toxicologic Pathology* 33: 75-85