

Utjecaj željeza na broj vrčastih stanica u tankom crijevu šarana *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Krpan, Luka

Master's thesis / Diplomski rad

2014

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:217:719090>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-15**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Luka Krpan

Utjecaj željeza na broj vrčastih stanica u tankom crijevu
šarana *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Diplomski rad

Zagreb, 2014.

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

Zahvaljujem se mentoru prof. dr. sc. Gordani Lacković-Venturin na pomoći i podršci prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala asistentici Romani Gračan i tehničarki Zrinki Benčini na uputama, savjetima i idejama.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na ljubavi i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno – matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj željeza na broj vrčastih stanica u tankom crijevu šarana *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Luka Krpan

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Iako je željezo esencijalni metal potreban za normalno funkcioniranje i opstanak životinjskog organizma, spada u skupinu teških metala koji zbog svojih svojstava bioakumulacije i postojanosti imaju i toksikološki učinak. U ovom istraživanju životinje su izložene najvećoj dopuštenoj koncentraciji željeza u vodi tijekom perioda od 14 i 105 dana. Laboratorijska analiza obuhvaćala je praćenje utjecaja dvovalentnog i trovalentnog željeza na broj vrčastih stanica u tankom crijevu šarana *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. Brojnost i razlika u sastavu sekreta vrčastih stanica u epitelu tankog crijeva dokazana je histokemijskom Alcijan-PAS metodom. Rezultati pokazuju da dugotrajna izloženost željezu utječe na povećanje broja AB pozitivnih vrčastih stanica koje izlučuju kiseli sekret, u kojem prevladavaju sijalomucini i sulfomucini. Upravo taj tip sekreta dodatno povećava viskoznost izlučenog mukusa čime se povećava zaštitna uloga sekreta u probavilu. Dobiveni rezultati ukazuju da dugotrajna izloženost maksimalno dopuštenoj koncentraciji željeza u vodi može dovesti do značajnih morfoloških i fizioloških promjena u tankom crijevu što upućuje na daljnja istraživanja ovih promjena i njihovih posljedica na organizam.

(55 stranica, 22 slike, 6 tablica, 14 priloga, 81 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: šaran, tanko crijevo, vrčaste stanice, željezo, Alcijan-PAS reakcija

Voditelj: Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.

Ocjenitelji: Dr. sc. Gordana Lacković-Venturin, red. prof.
Dr. sc. Zoran Tadić, doc.
Dr. sc. Sven Jelaska, izv. prof.

Rad prihvaćen: 12. ožujka 2014.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation Thesis

Influence of iron on the number of goblet cells in the small intestine of carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758

Luka Krpan

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Although iron is an essential metal needed for normal functioning and survival of the animal organism, it is a part of a heavy metal group of elements which have properties of bioaccumulation and persistency and have a toxic effect. In this research the animals were subjected to the highest allowed concentration of iron in the water for a period of 14 and 105 days. The laboratory analysis was comprised of monitoring the influence of bivalent and trivalent iron on the number of goblet cells in the small intestine of carp *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758. The number and the difference in the composition of the goblet cell mucus in the epithelium of the small intestine was proved with a histochemical Alcian-PAS method. The results show that long-term exposure to iron influences the increase of AB positive goblet cells that secrete acid mucus, in which sialomucins and sulfomucins prevail. It is that type of mucins that additionally enhances the viscosity of the secreted mucus which enhances its protective role in the intestine. The results show that long-term exposure to the maximal allowed concentration of iron in water can lead to significant morphological and physiological changes in the small intestine which suggest further studies of these changes and their consequences should be made.

(55 pages, 22 figures, 6 tables, 14 insets, 81 references, original in: croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: carp, small intestine, goblet cells, iron, Alcian-PAS reaction

Supervisor: Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.

Reviewers: Dr. Gordana Lacković-Venturin, Prof.
Dr. Zoran Tadić, Asst. Prof.
Dr. Sven Jelaska, Assoc. Prof.

Thesis accepted: March 12, 2014.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD | |
| 1.1. Biologija i rasprostranjenost šarana..... | 1 |
| 1.2. Građa probavnog sustava..... | 3 |
| 1.2.1. Funkcija i građa probavnog epitela..... | 5 |
| 1.2.2. Vršaste stanice i vrste sekreta..... | 10 |
| 1.3. Fizikalna i kemijska svojstva željeza..... | 12 |
| 1.3.1. Željezov(II)-klorid i željezov(III)-klorid..... | 14 |
| 1.4. Uloga željeza u organizmu..... | 14 |
| 1.5. Apsorpcija željeza..... | 15 |
| 1.6. Biomagnifikacija..... | 17 |
| 1.7. Cilj i svrha rada..... | 19 |
| 2. MATERIJALI I METODE | |
| 2.1. Materijal..... | 21 |
| 2.2. Tretiranje i žrtvovanje životinja..... | 22 |
| 2.3. Izrada histoloških preparata..... | 22 |
| 2.4. Histokemijsko bojanje vrčastih stanica..... | 23 |
| 2.4.1. Bojanje hemalun-eozinom | 24 |
| 2.4.2. Alcijansko modrilo..... | 25 |
| 2.4.3. Perjodna kiselina – Schiffov reagens..... | 26 |
| 2.4.4. Alcijan – PAS bojanje..... | 28 |
| 2.5. Morfometrijska mjerenja i statistička obrada podataka..... | 29 |
| 3. REZULTATI | |
| 3.1. Morfometrijsko mjerenje PAS+ i AB+ pozitivnih stanica u epitelu tankog crijeva..... | 32 |
| 3.1.1. Kontrolna skupina šarana..... | 32 |
| 3.1.2. Šarani tretirani željeznim(II)-kloridom..... | 33 |
| 3.1.3. Šarani tretirani željeznim(III)-kloridom..... | 35 |
| 3.2. Rezultati statističkih testova..... | 38 |

| | |
|--------------------|----|
| 4. RASPRAVA..... | 40 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 43 |
| 6. LITERATURA..... | 44 |
| 7. PRILOZI..... | 51 |
| 8. Životopis | |

1. UVOD

1.1. RASPROSTRANJENOST I BIOLOGIJA ŠARANA

Šaran (*Cyprinus carpio* L.) je jedna od najstarije pripitomljenih ribljih vrsta radi konzumacije. Uzgoj šarana u Kini pojavljuje se u 5. stoljeću, no pripitomljavanje je počelo puno prije. Europske vrste šarana potekle su od divljeg šarana iz rijeke Dunav; najraniji pokušaji pripitomljavanja datiraju iz doba Rimskog Carstva i širenja kršćanstva u Europi, odakle su pripitomljene vrste uvedene i na druge kontinente. Vrsta šaran se dijeli na dvije podvrste, *Cyprinus carpio carpio* iz Europe i *Cyprinus carpio haematopterus* iz Azije; azijske populacije šarana se mogu dalje podijeliti na one u centralnoj Aziji i one u istočnoj/jugoistočnoj Aziji (Slika 1).



Slika 1. Raspored populacija divljih šarana u Euroaziji (Preuzeto iz Flajšhans i Hulata 2006).

Šaran je prirodno rasprostranjen samo u nekoliko europskih zemalja, većinom onih u kojima postoji naplavni sustav rijeke Dunav. Međutim, današnja pojava divljih populacija šarana Dunavskog sliva je upitna i vjerojatno ograničena na samo nekoliko naplavnih područja. Populacije su ugrožene zbog antropogenog utjecaja i odbjeglih jedinki iz uzgoja. Nekoliko divljih populacija je nedavno uočeno u Turskoj, i iako ovo nisu prirodne populacije, one predstavljaju važan izvor divljih šarana. Divlje

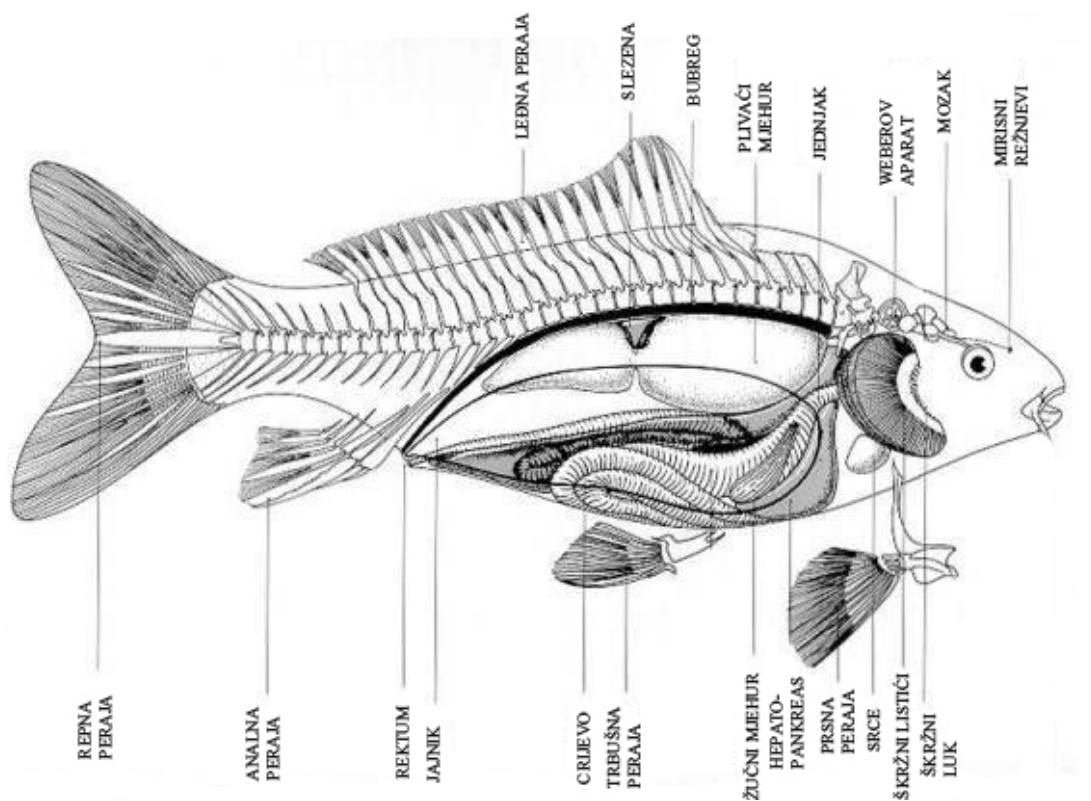
populacije je također moguće naći u centralnoj Aziji, npr. u Uzbekistanu, gdje graniče s europskim populacijama (Flajšhans i Hulata 2006).

Šaran obitava u srednjim i donjim tokovima rijeka i plitkih ograničenih voda. Najbolji rast postiže se pri temperaturi vode od 23-30 °C. Podnosi salinitet do 5‰, raspon pH vrijednosti od 6.5 do 9.0, a može preživjeti i niske koncentracije kisika (0.3-0.5 mg L⁻¹) i prezasićenost. Šarani su svejedi, s velikom tendencijom prema prehrani bentoskim organizmima, kao što su vodeni kukci, ličinke kukaca, mekušci i zooplankton. Konzumacija zooplanktona dominira u barama s velikom količinom jedinki šarana ili planktona. Uz to, šaran konzumira stabljike, lišće i sjemenke vodenog i kopnenog bilja, te trule biljne ostatke. Tipične šaranske bare u Europi su plitke, eutrofne s muljevitim dnom i gustom vodenom vegetacijom na rubovima. Jedinke mogu doseći od 0.6 do 1.0 kg tjelesne mase unutar jedne sezone u suptropskoj/tropskoj polikulturi. Rast u umjerenj klimi je sporiji, a riba doseže 1.5 kg tjelesne mase nakon 3 sezone (Flajšhans i Hulata 2006).

U Europi, ženke spolno sazrijevaju nakon 11 000 – 12 000 stupanj-dana u umjerenim i suptropskim klimatskim zonama; mužjaci sazrijevaju 25-35% ranije. Period sazrijevanja azijskih vrsta je malo kraći. Parenje europske populacije šarana započinje kad temperatura vode dosegne 17-18 °C. Ženke ispuštaju 100 do 230 grama jajašaca po 1 kg tjelesne mase. Jajašca se polažu na podvodno vodeno bilje i nakon kontakta sa vodom postaju ljepljiva i nabubre 3 do 4 puta. Embrionalni razvoj traje 60 do 70 stupanj-dana (Flajšhans i Hulata 2006).

1.2. GRAĐA PROBAVNOG SUSTAVA ŠARANA

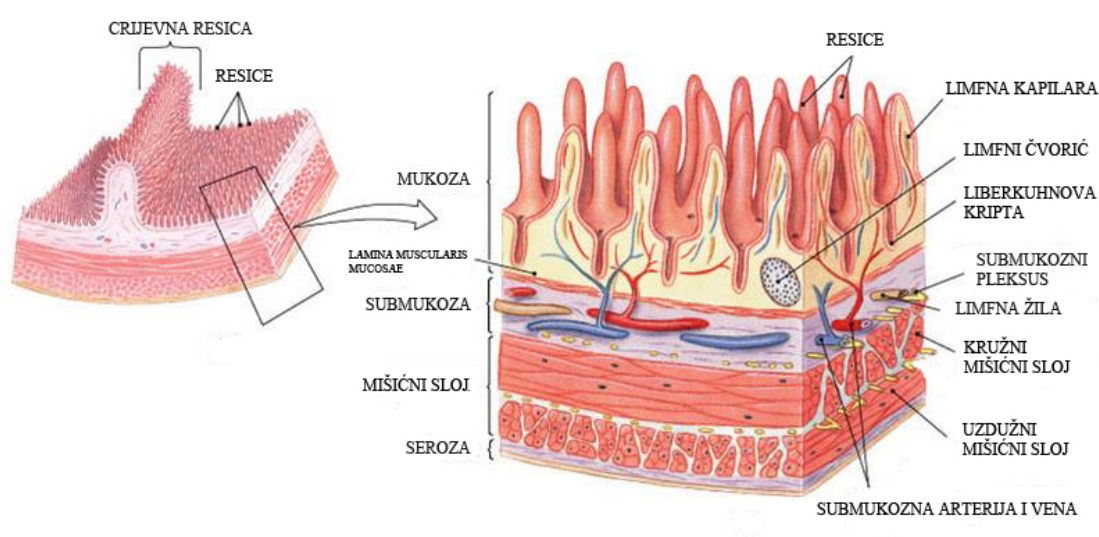
Kralješnjaci dijele mnoge strukturalne i funkcionalne karakteristike u probavnom sustavu (Stevens i Hume 1995). Varijacije u probavnom traktu između vrsta rezultat su adaptacija na prehranu ili na okoliš. Iako svi kralješnjaci imaju probavnu cijev i probavne žlijezde, određeni dijelovi se razlikuju među vrstama. Probavni sustav kralješnjaka može se podijeliti u prednji dio probavne cijevi koji se sastoji od usne šupljine, ždrijela, jednjaka i želuca, srednji dio u kojem se nalazi tanko crijevo te stražnji dio cijevi u kojem je debelo crijevo i rektum (Stevens i Hume 1998) (Slika 2). Srednji dio cijevi (tanko crijevo) sastoji se od duodenuma, jejunuma i ileuma. Morfološki gledano, probavni trakt se znatno razlikuje s obzirom na različiti tip prehrane.



Slika 2. Unutrašnja građa vrste *Cyprinus carpio* L. (Preuzeto sa: <http://www.koiquest.co.uk>)

Probavni trakt je u biti mišićavo crijevo obloženo mukoznom membranom. Raspored glavnih mišićnih komponenti ostaje relativno konstantan kroz sami trakt, dok mukoza pokazuje neke varijacije u različitim dijelovima trakta.

Probavni trakt sadrži četiri različita funkcionalna sloja: mukoza (sluznica), submukoza (podsluznica), mišićni sloj (muscularis) i adventitia ili seroza (Barbara i Heath 2000) (Slika 3).



Slika 3. Građa stijenke tankog crijeva (Preuzeto sa: <http://www.austince.edu>)

Mukoza se sastoji od 3 osnovna dijela pokrovnog epitela (*lamina epithelialis*), vezivnog tkiva (*lamina propria*) i tankog mišićnog sloja (*lamina muscularis mucosae*). Na četiri mjesta u probavnom traktu, mukoza naglo prelazi iz jednog oblika u drugi: kod želučano-crijevnog spoja, spoja želuca i dvanaesnika, kod ileokaekalnog spoja i rekto-analnog spoja (Barbara i Heath 2000).

Submukoza je sloj rahlog kolagenog tkiva koje podupire mukoza i sadrži veliki broj krvnih i limfnih žila, te živaca (Barbara i Heath 2000). Mišićni sloj sluznice je sastavljen od glatkih mišića koji su raspoređeni u dva osnovna sloja: unutrašnji kružni sloj i vanjski uzdužni sloj. U želucu postoji i unutarnji kosi mišićni sloj, dok se u

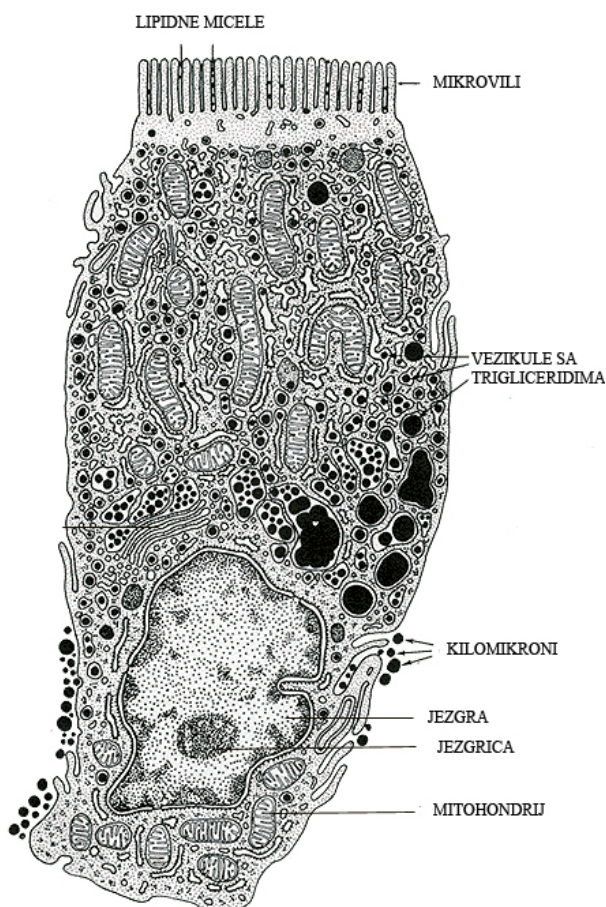
ostalim dijelovima trakta ne pojavljuje. Djelovanje ova dva sloja pod određenim kutevima, osnova je peristaltičkih kontrakcija (Barbara i Heath 2000).

Adventitia je vanjski sloj podupirućeg rahlog tkiva koje sadrži glavne krvne žile i živce; kod pretilih osoba sadrži velike količine adipoznog tkiva. U abdominalnoj šupljini (peritonealnoj šupljini) adventitia se naziva seroza (visceralni peritoneum) i popločena je jednostavnim pločastim epitelom (mezothelium). U ostalim dijelovima tijela adventitia se spaja s retroperitonealnim tkivom (Barbara i Heath 2000).

1.2.1. FUNKCIJA I GRAĐA PROBAVNOG EPITELA

Glavna funkcija epitelnog tkiva u tankom crijevu je apsorpcija. Ova funkcija je unaprijeđena prisustvom prstolikih struktura nazvanih crijevne resice koje povećavaju apsorpcijsku površinu, te su prikrivene jednoslojnim cilindričnim epitelom sa mikrovilima. Mikroresice upijaju nutrijente i tekućine iz sadržaja crijeva. Crijevni epitel također sadrži i brojne vrčaste stanice (eng. naziv *Goblet cells*). Ove stanice luče mukus koji štiti površinski sloj od korozivnih sekreta koji ulaze u tanko crijevo preko želuca, za vrijeme probave (Eroschenko 2008). Probavni sokovi šarana su sposobni za probavu raznih vrsta proteina i ugljikohidrata, stoga je jasno da šaran može probaviti različite vrste hrane bez obzira na nedostatak želuca. Enzimska aktivnost probavnih sokova šarana, vrlo je slična onoj probavnih sokova kod sisavaca. Izlučevine gušterače šarana, kao i one kod sisavaca, sadrže enzime koji utječu na razlaganje proteina i škroba do određene razine. Crijevne izlučevine šarana djeluju na djelomično hidrolizirane proteine, peptonskog tipa, dok je utjecaj na native proteine ili škrob ograničen. Kod šarana izlučevine gušterače imaju veću aktivnost maltaze, nego što je to kod crijevnih izlučevina, dok je kod sisavaca ta razina aktivnosti obrnuta (Bondi i Spandorf 1953). Mukozni sloj probavnog trakta ima nekoliko funkcija kao što su lubrikacija, probava, apsorpcija i zaštita gastrointestinalnog trakta od toksina i patogena (Laux i sur. 2005; Bansil i Turner 2006; Rose i Voynow 2006).

Enterociti ili apsorpcijske stanice crijeva (Slika 4), su jednoslojne epitelne stanice cilindričnog oblika u tankom, debelom i slijepom crijevu. Glikoproteinski omotač na površini stanica osim zaštite od probavnih procesa, sadrži i mnoge enzime potrebne za krajnju probavu hrane. Apsorpcija nutrijenata u unutrašnjost stanice odvija se uz pomoć difuzije, osmoze i aktivnog transporta. Enterociti apsorbiraju aminokiseline, glukozu i masne kiseline – krajnje produkte razgradnje proteina, ugljikohidrata i masti. Aminokiseline, voda, razni ioni i glukozu, transportiraju se preko enterocita u krvne kapilare, koje se nalaze u lamini proprijji, i odlaze u jetru putem portalne vene. Većina dugolančanih masnih kiselina i monoglicerida ne ulazi u kapilare, već ulazi u sitne limfne žile koje se također nalaze u lamini proprijji u crijevnim resicama. Prisustvo glatkih mišićnih vlakana u resicama uzrokuje kontrakcije i pomiče sadržaj limfnih žila iz resica u veće limfne žile u submukozi i u mezenteriju (Eroschenko 2008).

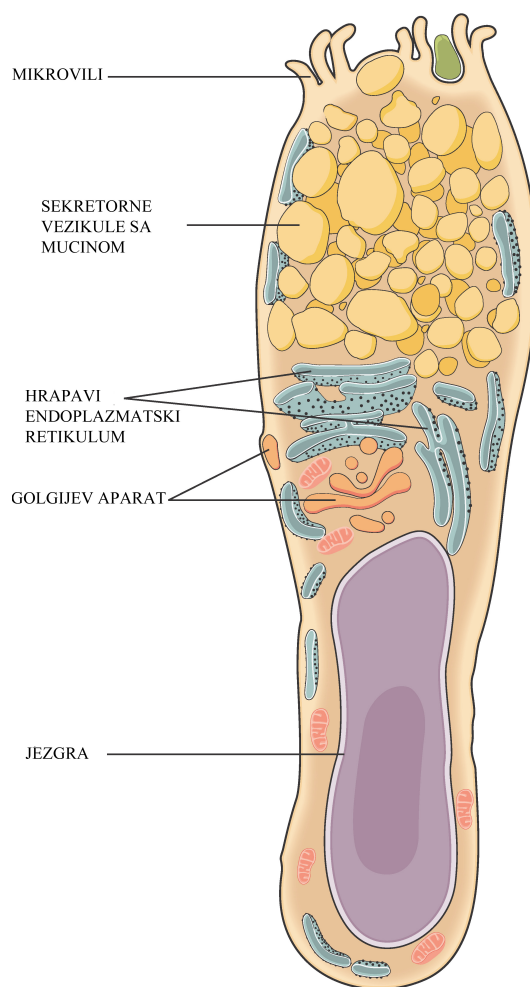


Slika 4. Shematski prikaz građe enterocita (Preuzeto sa: <http://svt.tice.ac-orleans-tours.fr>)

Glavne uloge enterocita (Ross i Pawlina 2003):

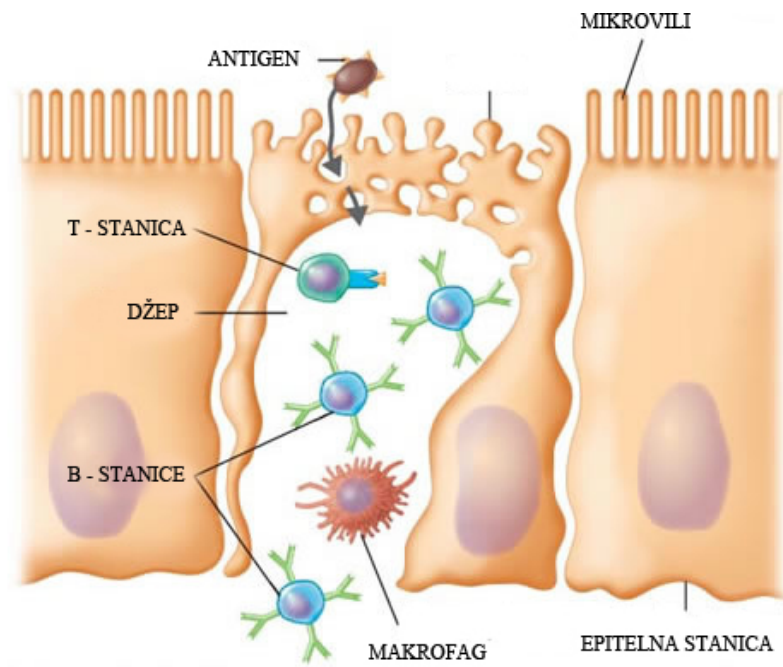
- Unos iona preko aktivnog transporta, uključujući natrij, kalcij, magnezij i željezo.
- Unos vode uz pomoć osmotskog gradijenta reguliranog Na⁺/K⁺ ATP-azom
- Unos šećera. Polisaharidi i disaharidi u glikoproteinskom omotaču razlažu se na manje molekule šećera, koje se zatim apsorbiraju. Glukoza prolazi apikalnu membranu uz pomoć natrij-glukoznog kotransportera. Kreće se kroz citosol i izlazi iz enterocita kroz bazolateralnu membranu uz pomoć GLUT2 proteina. Galaktoza koristi isti transportni sustav. Fruktosa prolazi apikalnu membranu enterocita uz pomoć GLUT5 proteina.
- Unos peptida i aminokiselina. Peptidaza u glikoproteinskom omotaču razlaže proteine na aminokiseline ili male peptide. Enteropeptidaza je odgovorna za aktivaciju tripsinogena u tripsin, koji aktivira ostale zimogene gušterače.
- Unos lipida. Lipidi se razgrađuju uz pomoć lipaze i žuči, te difuzijom prolaze u enterocite. Manji lipidi se transportiraju u crijevne kapilare, dok veće lipide Golgijev aparat i glatki endoplazmatski retikulum pretvaraju u kilomikrone (lipoproteini) i egzocitozom odlaze u limfne žile.
- Unos vitamina B12. Receptori se vežu na kompleks vitamina B12 i želučanog intrinzičnog faktora (GIF) i unose ga u stanicu.
- Resorpcija nekonjugiranih žučnih soli. Žuč koja je ispuštena, a nije se koristila u emulzifikaciji lipida, reapsorbira se u ileumu. Ovaj proces je poznat pod nazivom enterohepatička cirkulacija.
- Sekrecija imunoglobulina. IgA iz plazma stanica mukoze apsorbira se uz pomoć endocitoze na bazolateralnoj površini i ispušta se kao kompleks receptor-IgA u lumen crijeva.

Vrčaste stanice (Slika 5) sintetiziraju i izlučuju bioaktivne molekule kao što su sekretorni i mucini vezani za membrane, peptide, molekulu β (RELM β) i Fc- γ vezajući protein (Fc γ bp) (Dharmani i sur. 2009). Ove molekule se izlučuju na dva načina, konstitutivnom i bazalnom sekrecijom, odnosno kontinuiranom sekrecijom ovisnoj o citoskeletalnim pokretima sekretornih granula, te stimuliranom ili reguliranom sekrecijom koja uključuje egzocitozu granula kao odgovor na vanjski podražaj (Davis i Dickey 2008). U probavnom traktu, granule mucina se sintetiziraju i izlučuju uz pomoć specijaliziranih vrčastih stanica (Sharma i Schumacher 1995; Kierszenbaum 2002; Young i sur. 2006).



Slika 5. Shematski prikaz građe vrčaste stanice (Preuzeto sa: <http://en.wikipedia.org>)

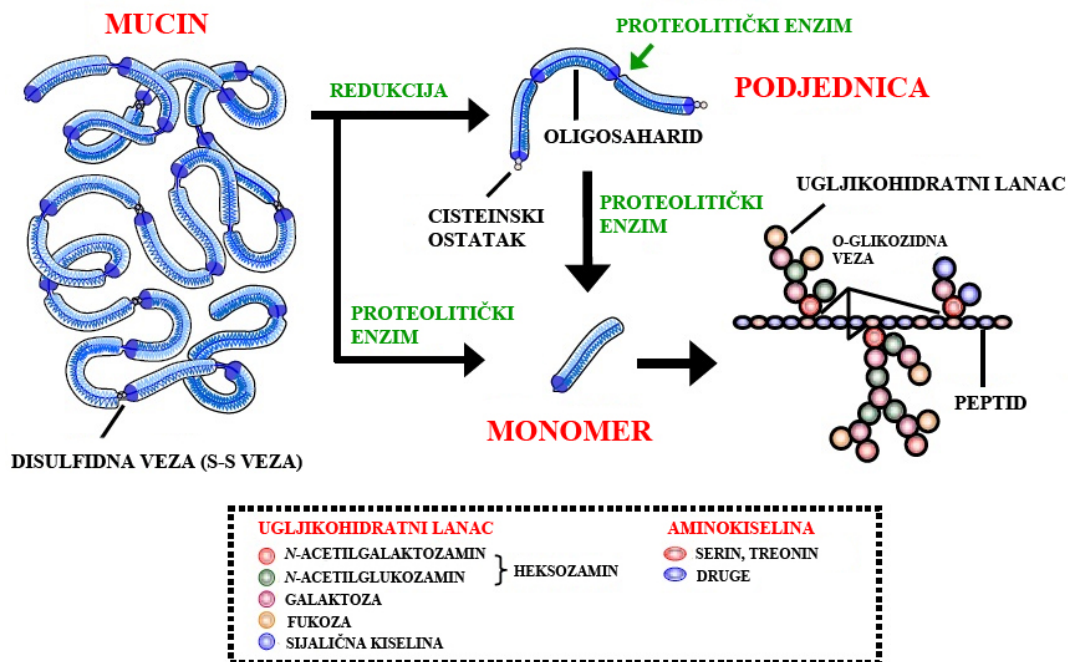
Vezivno tkivo sluznice i podsluznice sadrži brojne i velike nakupine velikih limfnih čvorića, pod nazivom Peyerove ploče. Iznad ovih limfnih ploča nalaze se specijalizirane epitelne stanice pod nazivom M stanice (Slika 6). Stanične membrane sadrže duboke invaginacije koje sadrže limfocite i makrofage. Limfni čvorići Peyerovih ploča sastoje se od brojnih B-limfocita, i ponekih T-limfocita, makrofaga i plazma stanica. M stanice kontinuirano skupljaju antigene iz crijevnog lumena, unose ih i prezentiraju limfocitima i makrofagima u lamini propriji. Antigeni koji dođu u kontakt s odgovarajućim limfocitom ili makrofagom, uzrokuju imunološki odgovor na ove molekule (Eroschenko 2008).



Slika 6. Shematski prikaz građe i funkcije M stanice (Preuzeto sa: <http://classes.midlandstech.edu>)

1.2.2. VRČASTE STANICE I VRSTE SEKRETA

Mukozna površina probavila je prekrivena viskozno-elastičnim i lubricirajućim slojem mukusa kojeg izlučuju uglavnom vrčaste stanice (Forstner i Forstner 1994). Iako mukus mijenja svoj sastav, glavni sastav funkcionalnih i fizičkih svojstava mukoznih sekreta su visoko glikozilirani proteini, mucini (Slika 7). Mukus ima brojne funkcije u probavnom traktu (Kierszenbaum 2002; Young i sur. 2006). U prednjem dijelu probavnog sustava, mukus podmazuje usnu šupljinu i površinu epitela jednjaka, te štiti unutrašnjost želuca od samoprobavljanja. U kaudalnom dijelu podmazuje prolaz fecesa. Osim lubrikacije, mukozni sloj također štiti stanice od mehaničkog oštećenja i sprječava bakterijsku invaziju (Montagne i sur. 2004; Pavelka i Roth 2010).



Slika 7. Sastav i građa mucina (Preuzeto sa: <http://www.intechopen.com>)

Mucini su glikoproteini velike molekularne mase (>200 kDa) s velikim brojem postranih ugljikohidratnih lanaca vezanih na proteinsku jezgru (Devine i McKenzie 1992; Hattrup i Gendler 2008). Klasificiraju se s obzirom na njihovu sposobnost da stvaraju gel, odnosno na one koje stvaraju gel (sekretorni) i one koje ne stvaraju gel (vezani za membranu) (Devine i McKenzie 1992). Uz to, mucini se također klasificiraju u neutralne ili kisele, ovisno o neto naboju molekule. Kiseli mucini su po svojem sastavu kiseli glikozaminglikani (mukopolisaharidi) te se dalje diferenciraju s obzirom na njihova histokemijska svojstva na one koji sadrže sulfate (sulfomucini) i mucine koji sadrže sijaličnu kiselinu (sijalomucine) (Filipe 1979). Sadrže proteinsku strukturu bogatu serinom i treoninom, koji su povezani na široki spektar postranih lanaca oligosaharida, koji čine više od 70% molekule (Hollingsworth i Swanson 2004; Andrianifahanana i sur. 2006). Do danas, pronađeno je 20 različitih gena za mucine, poput MUC1 do MUC20. Mucini koji formiraju gel kao što su MUC2, MUC5AC, MUC5B i MUC6 su lokalizirani na kromosomu 11 kao klaster. U tankom i debelom crijevu, MUC2 je glavni sekretorni mucin kojeg izlučuju vrčaste stanice, dok se mucini vezani za membrane vrčastih stanica i enterocita, MUC1, MUC3, MUC4, MUC13 i/ili MUC17 nalaze se u apikalnoj membrani (Hollingsworth i Swanson 2004; Andrianifahanana i sur. 2006; Gum i sur. 1989).

Kada granule mucina egzocitozom izađu u lumen i pomiješaju se sa vodom, dolazi do stvaranja viskoznog, želatinoznog mukoznog sloja (Bansil i Turner 2006; Young i sur. 2006; Pavelka i Roth 2010). Rasprostranjenost različitih vrsta mucina histokemijski je utvrđena kod nekoliko sisavaca (Filipe 1979; Sheahan i Jervis 1976; Kotzé i Coetzee 1994) i ribljih vrsta (Tibbetts 1997; Cao i Wang 2009). Poznato je da broj i rasprostranjenost mucina može biti različita s obzirom na tip stanice, anatomsko područje, patološko stanje i vrstu (Scillitani i sur. 2007). No, i dalje postoji potreba za boljim razumijevanjem rasprostranjenosti mucina u normalnim tkivima, posebno tipova mucina u različitim tkivima (Hattrup i Gendler 2008).

RELMn molekula pripada porodici citokinskih molekula sastavljenih od malih, cisteinom bogatih proteina, a izlučuju je vrčaste stanice. Ona sadrži 12.5 kDa podjedinice koje tvore disulfidne dimerne jedinice. RELM β proizvode vrčaste stanice u crijevu, s povećanim gradijentom od anteriornog prema kaudalnom dijelu, te se izlučuju u lumen crijeva u obliku homodimera visoke koncentracije (Artis i sur.

2004). Pretpostavlja se da RELM β ima imunoregulatornu funkciju (Herbert i sur. 2009).

Fc-a vezujući protein (Fcgbp) je prisutan u mukoznim granulama vrčastih stanica (Kobayashi i sur. 2002). Fcgbp sadrži 13 vWF D domena i veže se na IgG antitijela putem Fc dijela na IgG-u. Nedavna analiza dva mukozna sloja debelog crijeva miša i čovjeka pokazala je da je N-terminalni dio Fcgbp-a kovalentno vezan na MUC2 mucin (Johansson i sur. 2009). Pretpostavlja se da kovalentna veza Fcgbp proteina na MUC2 doprinosi stabilizaciji mucinske mreže u unutaršnjem mukoznom sloju (Johansson i sur. 2009).

1.3. FIZIKALNA I KEMIJSKA SVOJSTVA ŽELJEZA

Željezo (lat. *ferrum*) (Tablica 1) je četvrti element po zastupljenosti u Zemljinoj kori (4,6 %) koji zajedno sa kobaltom i niklom čini trijadu željeza. Kao i drugi elementi grupe VIII, željezo postoji u oksidacijskom stanju od -2 do +6, iako je u stanju +2 i +3 najčešće. Stanje +2 je najstabilnije. Šesterovalentno željezo je ferat ion FeO_4^- - koji je postojan samo u lužnatom mediju, a u kiselom mediju se raspada na Fe^{3+} i kisik, uz nešto ozona (Opća enciklopedija 1977).

Željezo predstavlja jedan od najpoznatijih primjera alotropije kod metala. Pri atmosferskom tlaku postoje tri alotropna oblika željeza: α -željezo ili ferit, γ -željezo ili austenit i δ -željezo. Pri vrlo visokom tlaku javlja se i četvrti oblik pod imenom ϵ -željezo ili heksaferum. Svaki od ovih oblika je stabilan u odgovarajućem temperaturnom području.

Kada otopimo čisto željezo, a zatim ga dovoljno sporo hladimo, ono se počne skrućivati na temperaturi od 1538 °C i stvara volumno centriranu kubičnu kristalnu strukturu, koju nazivamo δ -željezo (δ -Fe), sve do temperature od 1392 °C. Ispod temperature od 1392 °C željezo počinje mijenjati kristalnu strukturu u plošno centriranu kubičnu kristalnu rešetku. Željezo s takvom kristalnom rešetkom naziva se γ -željezo ili austenit (γ -Fe). Austenit je postojan sve do 911 °C, kada ponovo mijenja

kristalnu strukturu. Na temperaturi od 911 °C nastaje ferit ili α -željezo (α -Fe). Do temperature od 768 °C ili Curieve temperature ova modifikacija željeza je nemagnetična (i nekad pogrešno nazvana β -željezo ili β -Fe). Ispod ove temperature α -Fe postaje magnetsko. Navedena pojava vezana je uz promjenu unutrašnje energije, električne vodljivosti itd. (Matković i Matković 2011).

Nestabilniji Fe^{2+} ion u vodenoj se otopini u prisustvu kisika lako oksidira u Fe^{3+} ion. Željezo se zbog svog negativnog standardnog elektrodnog potencijala Fe^{2+}/Fe , otapa u kiselinama uz razvijanje vodika. Ioni Fe^{2+} i Fe^{3+} imaju izraženu sposobnost stvaranja kompleksa koordinacijskog broja 6. Otopina iona Fe^{2+} je svijetlo zelene boje. Otopina iona Fe^{3+} je žute boje, osim bromida koji je crvene. Dimetil-glioksim oboji otopinu Fe^{2+} iona u crveno (Hrvatska enciklopedija 2009).

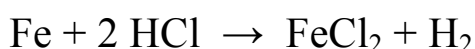
Tablica 1. Fizikalna i kemijska svojstva željeza

| ŽELJEZO (Fe) | |
|--|--|
| Atomski broj | 26 |
| Relativna atomska masa | 55,845±0,002 |
| Elektronegativnost | 1,83 |
| Gustoća pri 20 °C (g/cm ³) | 7,8 |
| Talište (°C) | 1536 |
| Vrelište (°C) | 2861 |
| Ionski radijus (nm) | 0,076 (+2); 0,064 (+3) |
| Van der Waals-ov radijus (nm) | 0,126 |
| Elektronska konfiguracija | [Ar] 3d ⁶ 4s ² |
| Energija prve ionizacije (kJ/mol) | 761 |
| Energija druge ionizacije ((kJ/mol) | 1556,5 |
| Energija treće ionizacije ((kJ/mol) | 2951 |

1.3.1. ŽELJEZOV(II)-KLORID I ŽELJEZOV(III)-KLORID

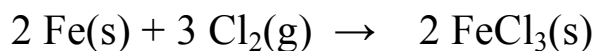
Željezovi(II)-halogenidi su spojevi FeF_2 , FeBr_2 , FeI_2 i FeCl_2 i soli su topljive u vodi. Željezovi(III)-halogenidi su FeBr_3 , FeF_3 i FeCl_3 i dobro su topljivi u vodi, osim željezo(III)-fluorida koji je neznatno topljiv.

Hidratni oblici FeCl_2 nastaju prilikom upotrebe klorovodične kiseline u obradi otpadnih tvari kod proizvodnje čelika. Takve otopine se nazivaju „potrošena kiselina“, pogotovo kada se klorovodična kiselina ne potroši u potpunosti:



Potrošena kiselina zahtjeva postupak obrade prije njezinog odlaganja (Egon Wildermuth i sur. 2005).

Anhidratni FeCl_3 moguće je pripremiti uz pomoć ovih elemenata (Tarr i sur. 1950):



1.4. ULOGA ŽELJEZA U ORGANIZMU

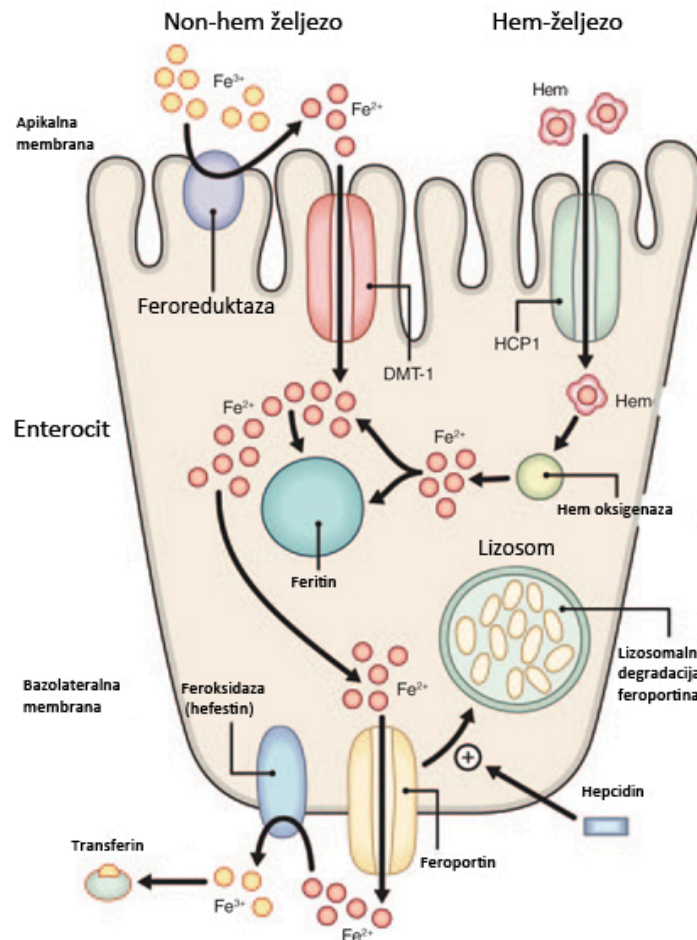
Iako željezo zauzima samo 0,008% tjelesne težine (oko 6 grama kod odraslog muškarca od 75 kg), ono je potrebno za opstanak životinjskog organizma. U kompleksu s proteinom hemoglobinom potrebno je zbog prijenosa kisika u krvi, te čini centralni atom hem grupe, metalnog kompleksa koji veže molekularni kisik. Uz hemoglobin, i drugi važni proteini sadrže hem grupu, uključujući mioglobin i citokrome koji su važni pri stvaranju energije. Drugi proteini poput onih potrebnih za sintezu DNA i diobu stanica, također sadrže željezo. Željezo se koristi prilikom stvaranja vezivnog tkiva u tijelu, nekih neurotransmitera u mozgu i u imunološkom sustavu (Casiday i Frey 2009).

Od ukupne količine željeza u krvi, oko 400 mg se nalazi u staničnim proteinima koji koriste željezo za spremanje kisika (mioglobin) ili se koristi za proizvodnju energije redoks reakcijama (citokromi). Relativno mala količina (3-4 mg) cirkulira u plazmi, vezana za transferin (Camaschella i Schrie 2011). Većina željeza u tijelu se skuplja i reciklira uz pomoć retikuloendotelnog sustava, koji je odgovoran za analizu dotrajalih crvenih stanica. Unatoč tome, ljudi gube malu ali postojanu količinu željeza putem znojenja, te ljuštenjem kože i epitela probavnog trakta. Ukupna količina gubitka željeza kod zdravih ljudi u razvijenom svijetu iznosi u prosjeku 1 mg dnevno za muškarce i 1,5-2 mg za žene s redovnim menstrualnim ciklusima (Conrad i Umbreit 2000).

1.5. APSORPCIJA ŽELJEZA

Kao i većina mineralnih nutrijenata, većina željeza dobivena iz hrane ili dodataka hrani apsorbira se u duodenumu uz pomoć enterocita (Slika 8). Ove stanice imaju posebne molekule koje im omogućavaju da unose željezo u tijelo. Kako bi se apsorbiralo, željezo mora biti u obliku hem proteina ili u Fe^{2+} obliku. Feroreduktaza reducira Fe^{3+} do Fe^{2+} (McKie i sur. 2001). Protein pod nazivom DMT1 (bivalentni transporter metala), koji transportira razne vrste bivalentnih metala u tijelo, transportira željezo preko membrane enterocita u stanicu.

Enterociti mogu pohraniti željezo u obliku feritina, što se događa prilikom vezanja Fe^{3+} na apoferitin (u ovom slučaju željezo izlazi iz tijela kada stanica umre i odlazi u feces) ili ga mogu unijeti u tijelo uz pomoć feroportina. Tijelo regulira količinu željeza uz pomoć ova dva mehanizma. Kao odgovor na nisku količinu željeza u tijelu, stanice proizvode više duodenalnog citokroma B (Dcytb), DMT1 i feroportina (Fleming i Bacon 2005).



Slika 8. Apsorpcija željeza preko enterocita u duodenumu (Preuzeto sa: <http://www.nature.com>)

Kod riba postoje dva potencijalna mjesta za unos metala, preko crijevnog epitela ili preko škrge (otopljeni metali u vodi). Fiziološki dokazi upućuju na to da željezo prelazi apikalnu membranu škrge i crijeva u Fe²⁺ obliku (Bury i sur., 2001). 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 škržnog epitela (Bury i Grosell 2003).

Količina željeza kod riba je u pravilu znatno niža u usporedbi sa ostalim kralješnjacima (Van Dijk i sur. 1975). Potrebe riba za željezom iznose 30-170 miligrama po kilogramu suhe mase (Watanabe i sur. 1997), a smanjene količine unesenog željeza kod vrste *Cyprinus carpio* L. mogu rezultirati hipokromičnom mikrocističnom anemijom (Sakamoto i Yone 1978).

1.6. BIOMAGNIFIKACIJA

Do biomagnifikacije dolazi kada koncentracija spojeva u organizmu kao što su DDT ili živa, prelazi koncentraciju tih spojeva u normalnoj prehrani organizama (Jorgensen i Fath 2008). Do povećanja koncentracije može doći zbog:

- stabilnosti spoja koji se ne može razgraditi okolišnim procesima;
- netopljivosti spoja što uzrokuje nisku ili nepostojeću unutrašnju razgradnju ili izlučivanje;
- koncentracija spoja se progresivno povećava kroz hranidbeni lanac.

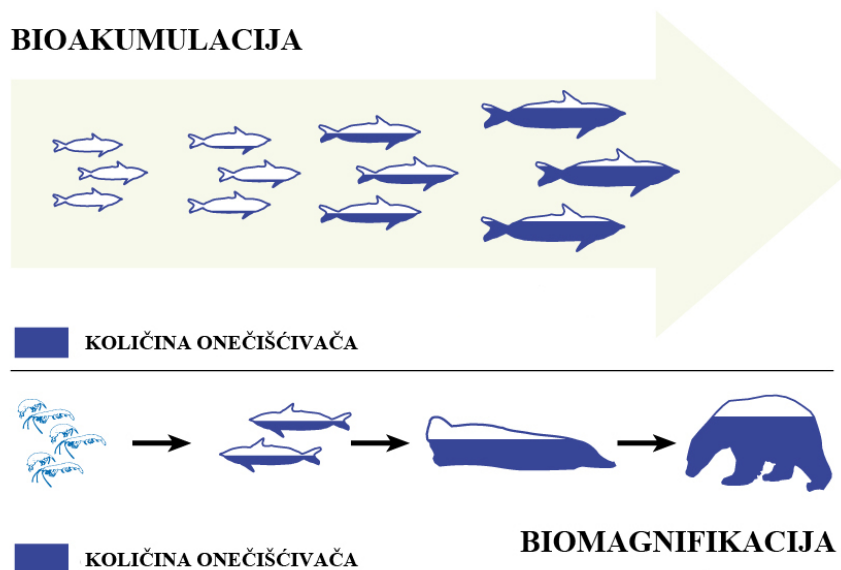
Iako se ponekad izraz biomagnifikacija i bioakumulacija spominju u istom kontekstu, postoji znatna razlika među njima, kao što je slučaj i sa biokoncentracijom:

- Bioakumulacija – događa se unutar trofičkog nivoa, i predstavlja povećanje koncentracije tvari u određenim tkivima organizma zbog apsorpcije putem hrane ili iz okoliša.
- Biokoncentracija – definirana je kao povećani unos iz vode, s obzirom na izlučivanje (Landrum i Fisher 1999).

Biokoncentracija i bioakumulacija se događaju unutar organizma, a biomagnifikacija se događa kroz trofičke nivoe (Slika 9). Biodilutacija je također proces koji se događa u svim trofičkim nivoima u vodenom okolišu; ona je suprotnost biomagnifikaciji, stoga zagađivač ima sve manju koncentraciju kako napreduje kroz hranidbeni lanac. Lipidi ili masni topivi spojevi se ne mogu razrijediti, razgraditi ili izlučiti putem urina, te se akumuliraju u masnim tkivima organizama koji nemaju enzime za razgradnju tih spojeva. Kada drugi organizam pojede kontaminiranu jedinku, masno tkivo se apsorbira u želucu te se zatim akumulira u masnom tkivu predatora. Kako na svakom nivou hranidbenog lanca postoji veliki gubitak energije, predator mora konzumirati mnogo plijena, uključujući i sve njihove lipofilne spojeve.

Iako je živa prisutna u moru u jako malim koncentracijama, nju alge apsorbiraju u obliku metil-žive. Efikasno se apsorbira, ali samo kod organizama sa sporom ekskrecijom (Croteau i Stewart 2005). Bioakumulacija i biokoncentracija rezultiraju

nakupljanjem u adipoznom tkivu svih trofičkih nivoa: zooplankton, mali nehton, veća riba i slično. Ovaj proces objašnjava zašto ribe predatori poput sabljarke ili morskih pasa, te ptica poput orlova, imaju veće koncentracije žive u svom tkivu nego što su mogli akumulirati samo direktnom izloženosti. Koncentracija žive kod haringe iznosi otprilike 0.01 ppm, a koncentracija kod morskog psa je veća od 1 ppm (EPA (U.S. Environmental Protection Agency) 1997).



Slika 9. Shematski prikaz bioakumulacije i biomagnifikacije (Preuzeto sa: <http://mercurypolicy.scripts.mit.edu>)

Postoje dvije glavne grupe spojeva koje uzrokuju biomagnifikaciju. Obje su lipofilne i nisu jednostavne za razgradnju. Neispitani organski spojevi (DDT, heksaklorobenzen, PCB, toksafen, monometil-živa) ne razgrađuju se jednostavno jer organizmima nedostaje ranija izloženost tim spojevima, stoga nemaju razvijene specifične detoksifikacijske i ekskrecijske mehanizme. Metali se ne mogu razgraditi jer su elementi. Organizmi, posebno oni izloženi visokim koncentracijama metala, imaju mehanizme kojima mogu potisnuti i izlučiti metale. Problem nastaje kada se organizam izloži većim koncentracijama nego što je to uobičajeno, jer izlučivanje nije dovoljno brzo da bi se spriječilo oštećenje.

Glavni izvor povećane koncentracije Fe u vodenom okolišu je drenaža kiselih rudnika, proizvodnja minerala i čelika, te otjecanje iz industrijskih pogona (Förstner i Wittmann 1979; Cruywagen i sur. 1981). Drenažom kiselih rudnika oslobađaju se fero i feri-sulfati u vodeni okoliš (Ellis 1989). Često prisutan oblik željeza u podzemnim vodama je Fe^{2+} ion, u spojevima za koje se smatra da su jako toksični (Hem 1989). Dostupnost željeza u vodenim otopinama je pod utjecajem okolišnih uvjeta, posebno zbog promjene stupnja oksidacije i redukcije (Hem 1989), što prvenstveno ovisi o pH vrijednosti, redokos potencijalu i temperaturi (Wetzel 1983). Željezo se oksidira uz pomoć otopljenog kisika u feri oblik, u neutralnom do lagano kiselom pH okruženju, dok je fero oblik stabilan u ovim uvjetima (Förstner and Wittmann 1979). Željezo je prisutno u organskom otpadu i biljnim ostacima, te aktivnosti unutar biosfere mogu utjecati na pojavu željeza u vodi (Hem 1989).

1.7. CILJ I SVRHA RADA

Morfometrijska analiza distribucije mukoznih vrčastih stanica u probavnom sustavu šarana daje uvid u sastav mukoznih supstanci tankog crijeva, koji sudjeluje u prijenosu i apsorpciji željeza u organizmu, ali također i ima zaštitnu ulogu od patogenih organizama. Zbog svoje kompleksnosti i varijacija među vrstama, važno je utvrditi sastav mukusa kojeg izlučuju vrčaste stanice u epitelu probavila te utvrditi potencijalne promjene do kojih može doći uslijed izloženosti određenim onečišćivačima.

Stoga ovaj diplomski rad predstavlja preliminarno istraživanje u kojem smo usporedbom kontrolnih i eksperimentalnih skupina riba željeli istražiti utjecaj nižih i viših koncentracija željeza na vrčaste stanice probavnog sustava, te utvrditi da li u slučaju izloženosti višim koncentracijama željeza može doći do promjena u sastavu sekreta tih stanica, koje mogu dovesti do početnih oštećenja sluznice probavnog sustava. Znanje o rasprostranjenosti različitih tipova mucina može indirektno pružiti uvid o kvaliteti mukoznog gela i biofilma koji štiti unutrašnju površinu probavila od patogena (Deplancke i Gaskins 2001; Pearson i Brownlee 2005).

Nadalje, ovaj tip istraživanja daje vrijedne informacije koje mogu pomoći u određivanju dopuštene koncentracije metala u vodi, kako bi se osigurala zaštita i zdravlje riba i drugih vodenih organizama. Osim toga budući da je metabolizam željeza u riba sličan kao i u ostalih kralješnjaka (Donovan i sur. 2000; Ford 2001; Bury i Grosell 2003) dobiveni podaci mogu dati korisne informacije o potencijalnom utjecaju željeza na zdravlje ljudi (Morsey i Protasowicki 1990).

2. MATERIJALI I METODE

2.1. MATERIJAL

U ovom radu korišteni su šarani (Slika 10) ukupne dužine tijela oko 15 cm, uzgojeni u ribnjaku Topličica, Novi Marof. Istraživanja su provedena na šaranima dovezenim u laboratorij Zoologijskog zavoda Biološkog odsjeka PMF-a. Šarani su držani u akvarijima s vodovodnom, aeriranom vodom ($V= 60 \text{ L}$; $t=19 \text{ }^{\circ}\text{C}$) i stalnom koncentracijom željeza od 1 mg/L ($\text{pH}=7$) što je maksimalna dopuštena koncentracija za ovaj metal u vodi. Voda u akvarijima svakodnevno se mijenjala pri čemu je dodavana odgovarajuća količina soli željeza. Tijekom pokusa šarani su hranjeni jednom dnevno gotovom hranom koja nije sadržavala željezo sastava: proteini 40%, sirovi pepeo 10%, ulje 9%, udio vode 6% i vlakna 2% (Tetramin, Melle, Njemačka). 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 10. Vanjski izgled šarana (*Cyprinus carpio* L.) (Preuzeto sa: <http://www.changshengyuye.com>)

2.2. TRETIRANJE I ŽRTVOVANJE ŽIVOTINJA

Šarani su podijeljeni u tri skupine. Jedna skupina šarana je bila kontrolna, dok su druge dvije skupine odvojeno tretirane sa dvovalentnim (FeCl_2), odnosno trovalentnim željezom (FeCl_3) u koncentraciji od 1mg/L tijekom perioda od 105 dana. Unutar tretiranih skupina su bile po tri životinje, dok su kontrolnu skupinu predstavljale dvije životinje. Uzorci tkiva crijeva kontrolnih i tretiranih životinja uzimani su neposredno nakon žrtvovanja životinja. Žrtvovanja su provedena nakon 14. dana da bi se uočile potencijalne početne promjene i 105. dana od početka tretiranja kako bi se dobio uvid u stanje mukoznog sekreta nakon dugotrajne izloženosti.

2.3. IZRADA HISTOLOŠKIH PREPARATA

Uzorci tkiva početnog dijela crijeva (duodenuma) veličine $0,5 \text{ cm}^3$, uzimani su neposredno nakon žrtvovanja životinja. Uzorci tkiva fiksirani su u 10%-tnom neutralnom formalinu 24 sata, a zatim su isprani u destiliranoj vodi i prebačeni u 75 %-tni etanol. Nakon fiksacije uzorci tkiva su dehidrirani prenošenjem u sve veće koncentracije etanola (Tablica 2). Nakon dehidracije tkivo je stavljeno u kloroform preko noći, a sljedeći dan je tkivo uklapano u paraplant (Tablica 2). Dobiveni blokovi paraplanta hlade se do drugog dana, a zatim obrađuju i lijepe na drvene nosače. Uklopljeni materijal rezan je uz pomoć mikrotoma na rezove debljine $6 \mu\text{m}$. Rezovi su nakon toga stavljani na površinu vodene kupelji temperature 60°C kako bi se izravnali, nakon čega su stavljani na predmetna stakalca prethodno namazana mješavinom glicerola i bjelanjka.

Tablica 2. Postupak uklapanja tkiva u paraplant

| STADIJ | TRAJANJE |
|---|---------------|
| 1. DEHIDRACIJA TKIVA U ETILNOM ALKOHOLU | |
| 70% | 2 DANA |
| 80% | 60 MINUTA |
| 96% | 60 MINUTA |
| 100% | 2 X 60 MINUTA |
| 2. PROSVJETLJIVANJE | |
| KLOROFORM | PREKO NOĆI |
| KLOROFORM:PARAPLAST (1:1) | 30-60 MINUTA |
| 3. UKLAPANJE U OTOPLJENI PARAPLAST | |
| PARAPLAST I | 60 MINUTA |
| PARAPLAST II | 60 MINUTA |
| PARAPLAST III | |

2.4. HISTOKEMIJSKO BOJANJE VRČASTIH STANICA

Kako bi se bezbojni prerezi tkiva crijeva mogli promatrati svjetlosnim mikroskopom potrebno ih je obojati. Bojanje se vrši nakon što se ukloni paraplant i vrati voda, jer su histološke boje uglavnom vodene ili rijeđe alkoholne otopine (Tablica 3). U svrhu ovog istraživanja korištene su dvije vrste bojenja, hemalaun-eozin (HE) i alcijansko modrilo - perjodna kiselina+Schiffov reagens (Alcian-PAS).

Tablica 3. Deparafiniranje i rehidriranje uzoraka

| DEPARAFINIRANJE I REHIDRIRANJE | |
|---------------------------------------|---------------|
| SREDSTVO | VRIJEME |
| KSILOL | 2 X 15 MINUTA |
| ALKOHOL 100 % | 5 MINUTA |
| ALKOHOL 96 % | 5 MINUTA |
| ALKOHOL 80 % | 5 MINUTA |
| ALKOHOL 70 % | 5 MINUTA |
| DESTILIRANA VODA | 2 X 5 MINUTA |

2.4.1. BOJANJE HEMALAUN-EOZINOM

Bojanjem hemalaun-eozinom jezgre u stanici se oboje plavoljubičasto, a citoplazma, eritrociti ili vezivno tkivo ružičasto do crveno.

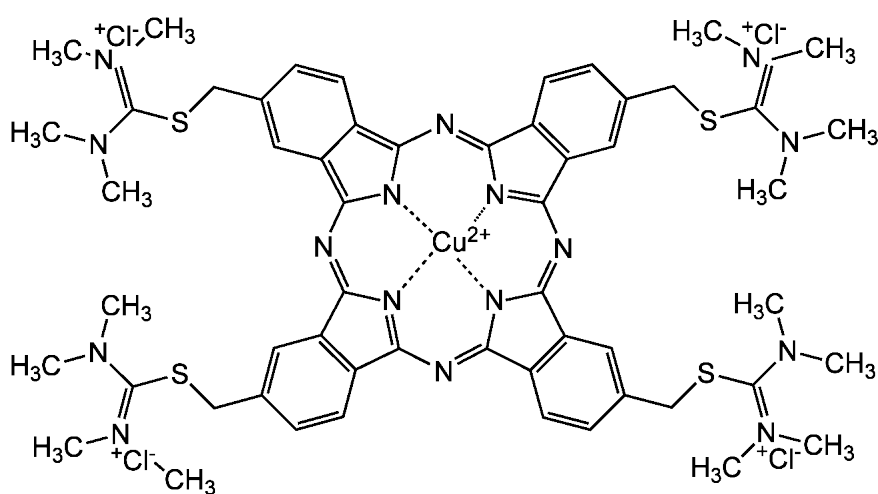
Postupak:

- deparafiniranje rezova u ksilolu – 2 x 15 min
- rehidriranje tkiva: a) provlačenje kroz seriju alkohola od veće prema manjoj konc.
b) destilirana voda – 2 x 5 min
- bojanje rezova u hemalaunu (po Mayeru) – 10 min
- ispiranje rezova u tekućoj vodi – 2 x 5 min
- bojanje u eozinu – 5 min
- ispiranje u destiliranoj vodi – 2 x 5 min
- dehidriranje tkiva (provlačenje kroz seriju alkohola od manje prema većoj konc.)
- držanje u ksilolu – 2 -10 min
- uklapanje u kanadski balzam

2.4.2. ALCIJANSKO MODRILO

Alcijansko modriLO (Slika 11) boji kisele glikoproteine u plavu boju, pa se vrčaste stanice koje sadržavaju plavo obojene kisele glikoproteine nazivaju AB-pozitivnim vrčastim stanicama.

Alcijansko modriLO se veže na karboksilnu grupu sijalične kiseline ili na šećere sa sulfatnom zamjenom. Alcijansko modriLO je pozitivno nabijena boja i veže se na kiselinsku grupu mukopolisaharida i boji ih plavo (Pearce 1968). Pri pH vrijednosti od 2.5, AB reagira sa sulfatiranim (sulfomucini) i karboksiliranim (sijalomucini) mukopolisaharidima. Međutim, pri pH 1 specifično reagira samo sa sulfatiranim mukopolisaharidima. Kombinirano bojenje AB sa PAS jasno odvaja kisele i neutralne mucine jedne od drugih (Bancroft i Stevens 1990): kiseli mucini su prikazani plavo, a neutralni i mješani (neutralni i kiseli) mucini ljubičasto.

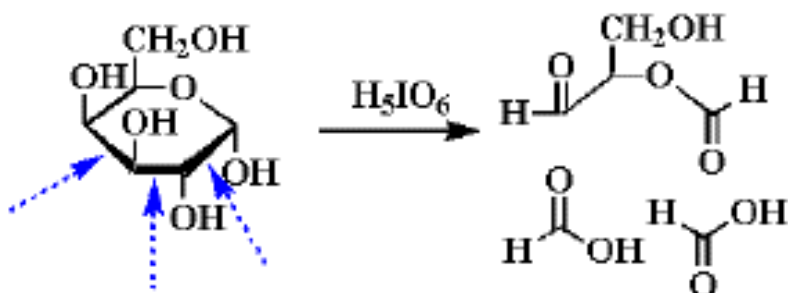


Slika 11. Strukturni izgled Alcian Blue 8GX (preuzeto sa: <http://www.biomol.de>)

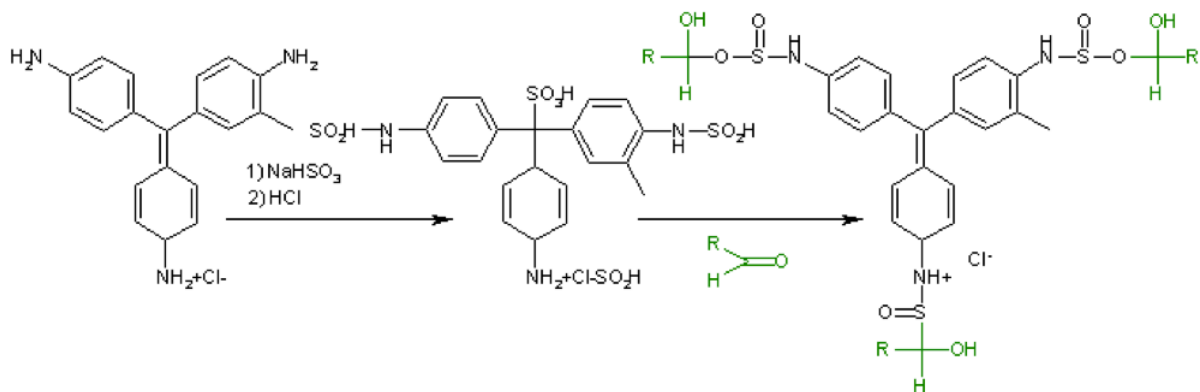
2.4.3. PERJODNA KISELINA – SCHIFFOV REAGENS

Histokemijska metoda koja se koristi za prikazivanje vrčastih stanica sastoji se od upotrebe perjodne kiseline i Schiffovog reagensa (PAS). PAS-reakcija boji neutralne glikoproteine, posebno glikogen u grimizno-crvenu boju, a vrčaste stanice koje sadržavaju mukozne supstance oboje se grimizno-crveno. Mukozne susptance koje nazivamo PAS pozitivnima uglavnom su neutralni glikoproteini i sastavni su dio sekreta vrčastih stanica.

Kombinacija perjodne kiseline i Schiffovog reagensa je osnovna histokemijska metoda za dokazivanje mukoznih supstanci (Hotchkiss 1984). Perjodna kiselina oksidira C-C veze u različitim strukturama (Slika 12), pretvarajući 1,2-glikol grupe (CGOG-CHOH) u dialedehide (CHO-CHO). Na kraju, te oksidirane aldehidne grupe se ne mogu više oksidirati perjodnom kiselinom što omogućava vezanje Schiffovog reagensa na molekule (Slika 13) i daje im crvenu boju (Pearce 1968). O-C veza na aldehidnim grupama se oksidira prilikom vezanja Schiffovog reagensa. Vezanje Schiffovog reagensa na aldehidne grupe stvara grimizno-crveno obojenje, koje se pojačava ispiranjem u tekućoj vodi.



Slika 12. Perjodna kiselina reže C-C veze 1,2-diola (Preuzeto sa: <http://www.cem.msu.edu>)



Slika 13. Vezanje aldehida na Schiffov reagens (Preuzeto sa: <http://www.nationmaster.com>)

Priprema perjordne kiseline:

- 0,5 grama u 100 ml destilirane H₂O

Priprema Schiffovog reagensa (po redoslijedu):

- 192 ml destilirane H₂O
- 8 ml koncentrirane HCl
- 5 g natrijevog metilsulfita (Na₂S₂O₅)
- 0,5 g bazičnog fuksina (pararosanilin)

Priprema SO₂ vode (300 ml):

- 18 ml 10 %-tne otopine natrijevog metilsulfita (Na₂S₂O₅)
- 15 ml HCl (1N HCl)
- 300 ml destilirane H₂O

2.4.4. ALCIJAN – PAS BOJANJE

Otopine:

1. Alcian Blue, pH 2.5
 - Alcian Blue 1g
 - 3%-tna octena kiselina 100 ml
2. 1%-tna Perjodna kiselina
3. Schiffov reagens

Postupak:

- bojanje sa Alcian Blue – 5 min
- ispiranje u destiliranoj vodi
- 1%-tna perjodna kiselina – 10 min
- ispiranje u destiliranoj vodi
- bojanje Schiffovim reagensom – 20 min
- ispiranje u tekućoj vodi – 10 min
- lagano bojanje u Gillovom Hematoksilinu
- ispiranje u 1%-tnom litij-karbonatu
- dehidracija i bistrenje

Nakon bojanja perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom, slijedi postupak dehidriranja (Tablica 4) i uklapanja u kanadski balzam.

Tablica 4. Dehidriranje uzoraka

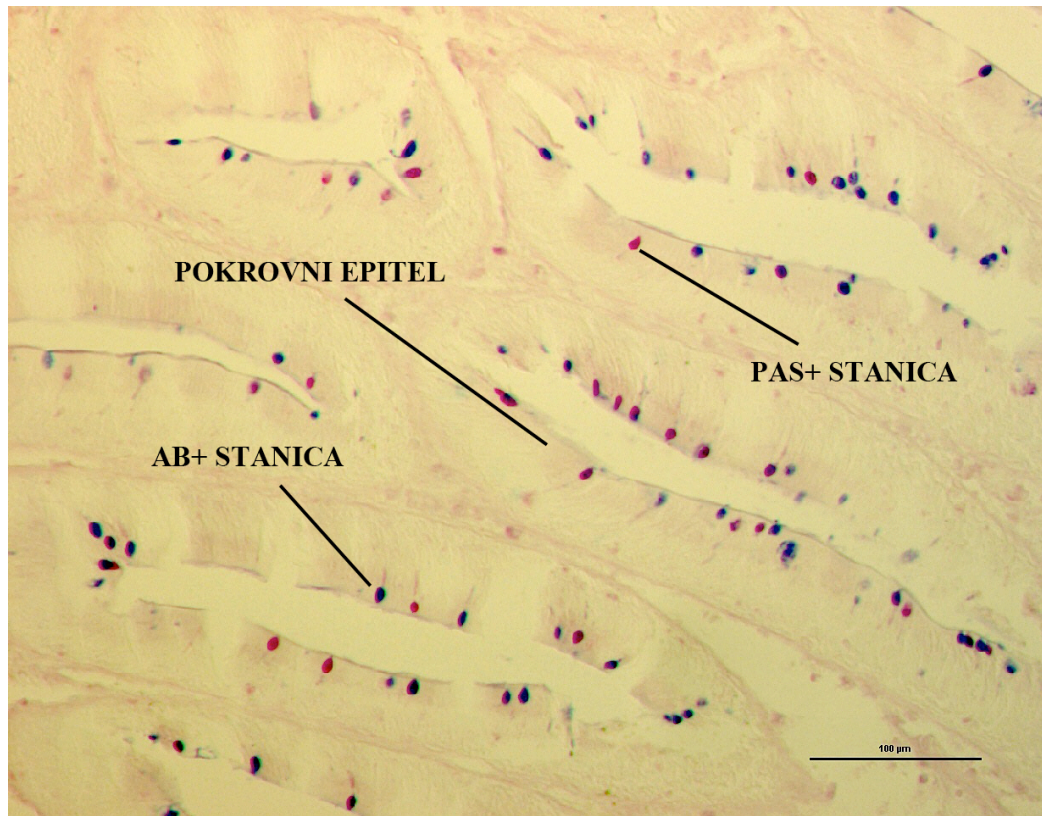
| DEHIDRIRANJE | |
|---------------------|----------------|
| SREDSTVO | VRIJEME |
| ALKOHOL 70 % | 5 MINUTA |
| ALKOHOL 80 % | 5 MINUTA |
| ALKOHOL 96 % | 2 X 5 MINUTA |
| ALKOHOL 100 % | 2 X 5 MINUTA |
| KSILOL | 2 X 5 MINUTA |

2.5. MORFOMETRIJSKA MJERENJA I STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Predmet istraživanja ovog rada su vrčaste stanice u epitelu tankog crijeva kontrolnih i pokusnih skupina šarana. Prerezi su prvo bojani hemalaun eozinom (Slika 16) kako bi se utvrdilo stanje tkiva i da li je pogodno za specifično histokemijsko bojanje. Radi prikazivanja vrčastih stanica korištena je Alcijan-PAS metoda. Kiseli glikoproteini (mucini) obojani su plavom bojom (boje se alcijanskim modrilom), a neutralni glikoproteini obojani su grimizno-crvenom bojom (boje se PAS-reakcijom).

Histološki preparati obojeni AB i PAS reakcijom analizirani su svjetlosnim mikroskopom (Nikon Eclipse E600). Mikroskopske slike histoloških preparata snimljene su digitalnom kamerom (Nikon DXM 1200), a zatim obrađene računalnim programom za morfometrijsku analizu mikroskopskih slika (Lucia G verzija 4.81).. Korištena kombinacija AB i PAS pozitivnih stanica omogućila je kvantifikaciju udjela sekretornih vrčastih stanica unutar epitela sluznice crijeva. Budući da se vrčaste stanice nalaze i u pokrovnom epitelu crijevnih resica i u epitelu tubulusnih

žlijezda mjerenja su provedena unutar oba područja. Izmjeren je broj grimizno-crveno obojanih stanica koje predstavljaju PAS pozitivnu reakciju i plavo obojanih stanica koje predstavljaju AB pozitivnu reakciju (Slika 14). Mjerenja su izvršena na način da je nasumično izabrano 20 površina na jednom prerezu, očitana je površina mjernog područja, te broj AB pozitivnih i PAS pozitivnih stanica na svakom od 20 mjernih područja (Prilozi 1 - 14).



Slika 14. Prikaz AB+ i PAS+ stanica nakon Alcijan-PAS bojanja (bar = 100 μm)

Ukupna površina pokrovnog epitela i epitela tubulusnih žlijezda na kojoj je brojanje izvršeno je provedena u mikrometrima (μm), (Tablica 5). Sve vrijednosti izmjerenih površina i AB i PAS pozitivnih stanica prikazane su kao prosječna vrijednost, standardna devijacija te minimumi i maksimumi vrijednosti (Tablica 5). Tip raspodjele podataka testiran je Kolmogorov-Smirnov testom. S obzirom da je raspodjela podataka slijedila normalnu distribuciju (Kolmogorov – Smirnov test $p > 0,05$) u statističkim analizama korišteni su parametrijski testovi. Promjene u udjelu broja AB i PAS pozitivnih stanica tijekom tretmana analizirane su pomoću

Pearsonove korelacije. Za potencijalne razlike u udjelu AB i PAS pozitivnih stanica između grupa životinja tretiranih dvovalentnim i trovalentnim željezom analizirane su pomoću parnog T-testa. Statistički značajne razlike između vrijednosti AB i PAS pozitivnih stanica dobivenih u kontrolnoj skupini naspram skupina koje su žrtvovane tijekom 14 i 105 dana tretmana također su testirane pomoću parnog T-testa (Dytham 2003). Sve statističke analize rađene su u programu SPSS 17.0 za Windows (SPSS Inc., SAD).

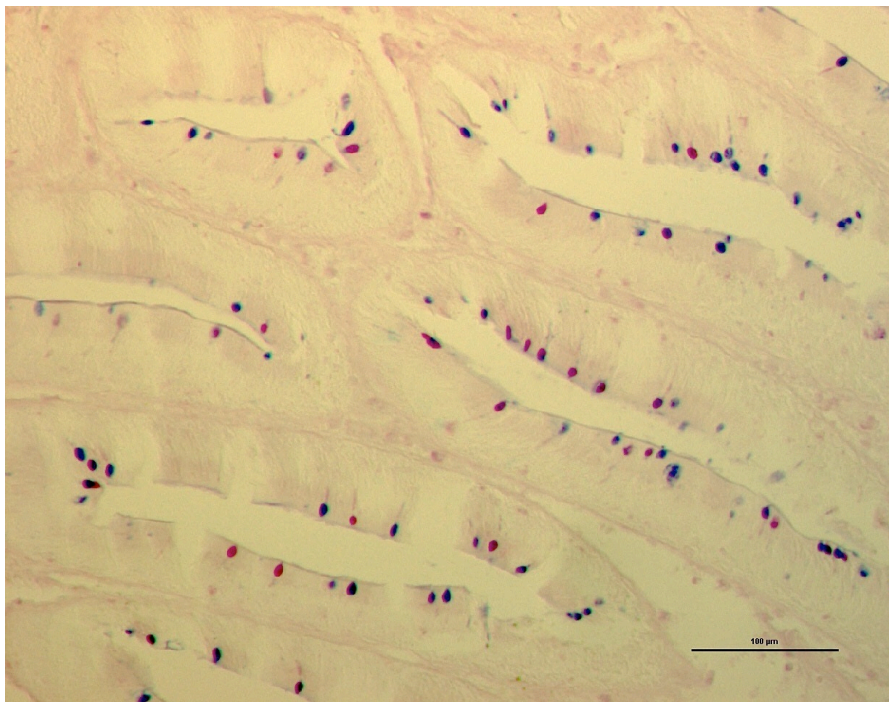
3. REZULTATI

3.1. MORFOMETRIJSKO MJERENJE AB+ I PAS+ STANICA U EPITELU TANKOG CRIJEVA

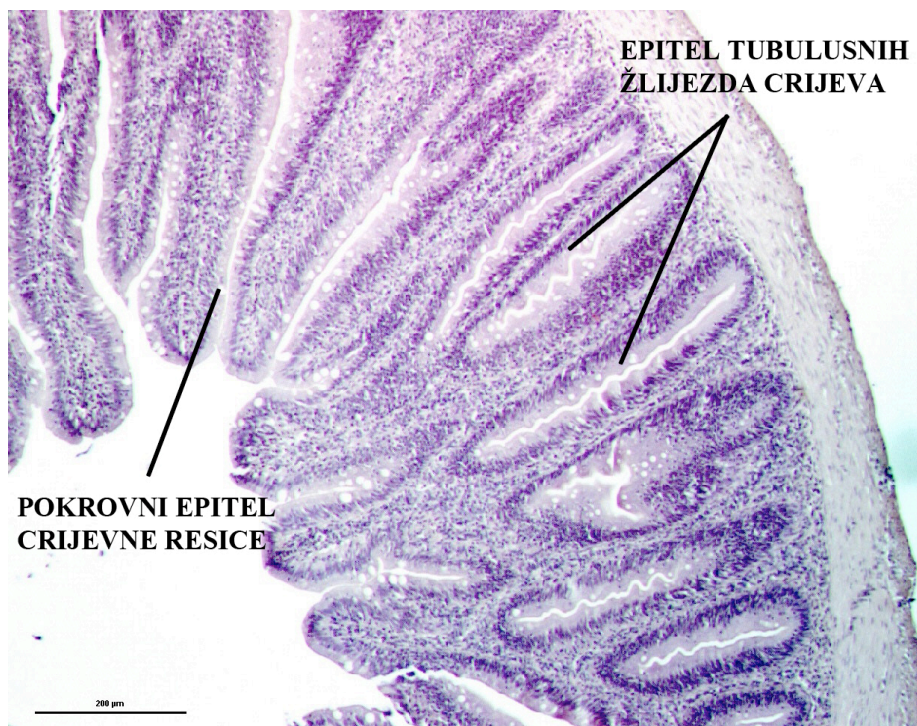
3.1.1. KONTROLNA SKUPINA ŠARANA

Kod kontrolne skupine šarana (Slika 15) uočljiva je prisutnost AB pozitivnih i PAS pozitivnih stanica u epitelu tankog crijeva šarana. Srednja vrijednost izbrojanih AB pozitivnih stanica za Kontrolu 1 iznosila je 20,5, dok je srednja vrijednost PAS pozitivnih stanica iznosila 6,6 (analizirana površina 82120,3 na^2).

Kod Kontrole 2 srednja vrijednost AB pozitivnih stanica iznosila je 25,6, dok je broj izbrojanih PAS pozitivnih stanica bio manji i iznosio je 13,0 (analizirana površina 117834,9 na^2) (Tablica 5).



Slika 15. Prikaz PAS+ i AB+ stanica nakon AB-PAS bojanja;
kontrolna skupina 1 (bar = 100 μm)

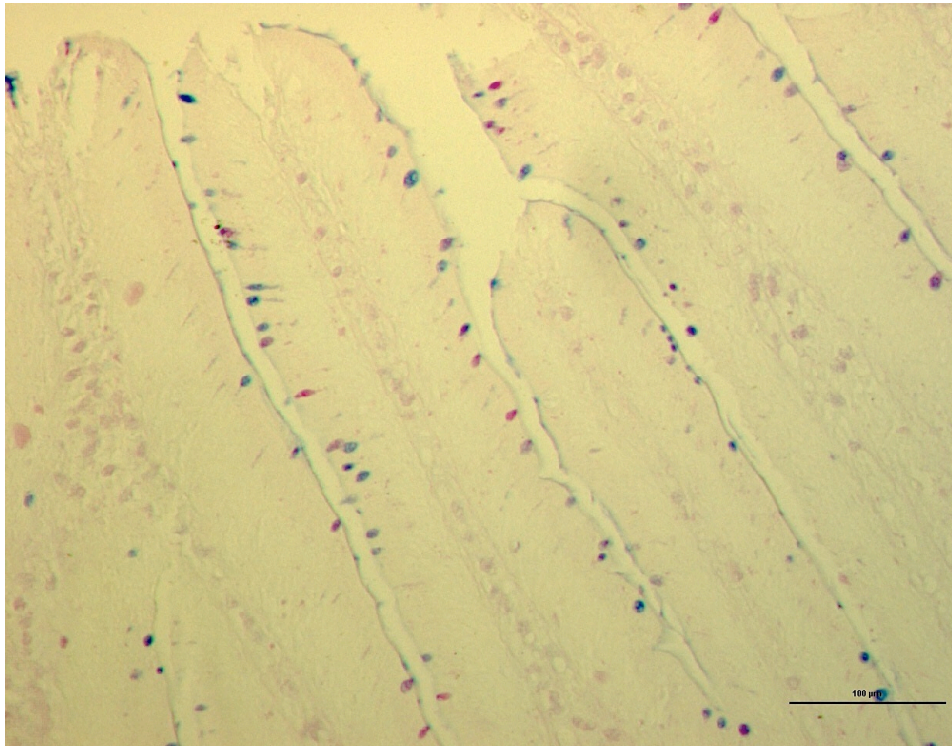


Slika 16. Prikaz crijevnog epitela nakon bojanja hemalaun eozinom (bar = 200 μm)

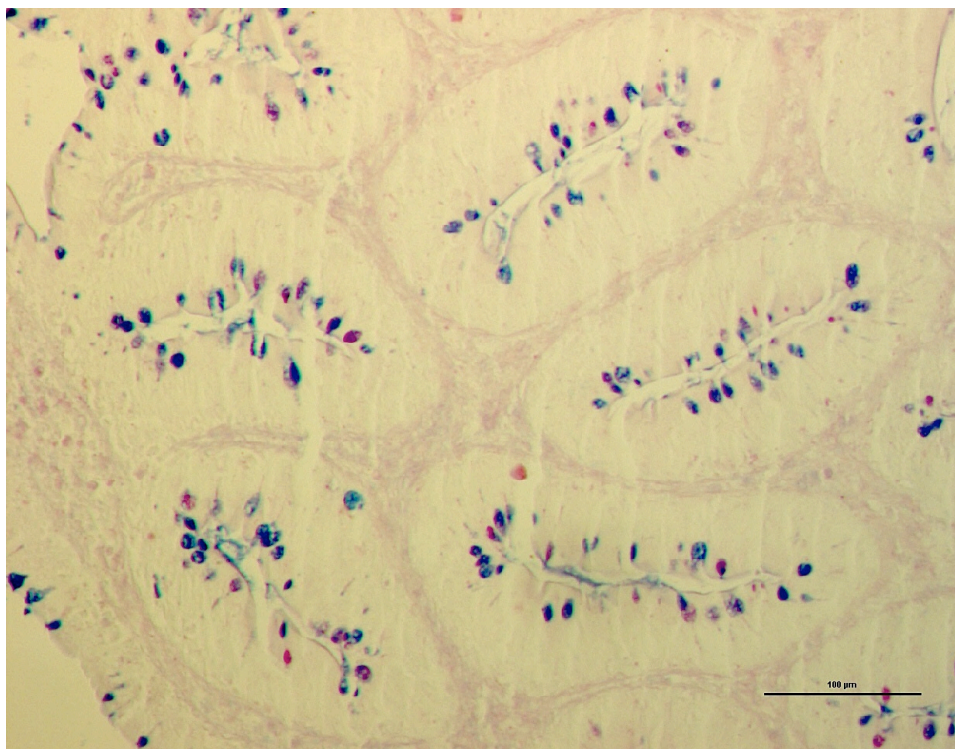
3.1.2. ŠARANI TRETIRANI ŽELJEZO(II)-KLORIDOM

Kod šarana tretiranih dvovalentnim (FeCl_2) željezom, 14. dana tretiranja (Slika 17) uočava se smanjenje broja AB pozitivnih stanica s obzirom na kontrolnu skupinu (21,6 stanica na prosječnoj površini od $141143,7 \mu\text{l}^2$). 105. dana tretiranja dvovalentnim željezom (Slika 18) uočava se porast broja AB pozitivnih stanica (24,3 na prosječnoj površini od $75644,0 \mu\text{l}^2$) s obzirom na kontrolnu skupinu šarana.

14. dana tretiranja dvovalentnim željezom dolazi do smanjenja broja PAS pozitivnih stanica (9,7 stanica na prosječnoj površini od $141143,7 \mu\text{l}^2$). 105. dana tretiranja sa FeCl_2 dolazi također do smanjenja broja PAS pozitivnih stanica (6,9 stanica na prosječnoj površini od $75644,0 \mu\text{l}^2$) s obzirom na kontrolu (Tablica 5).



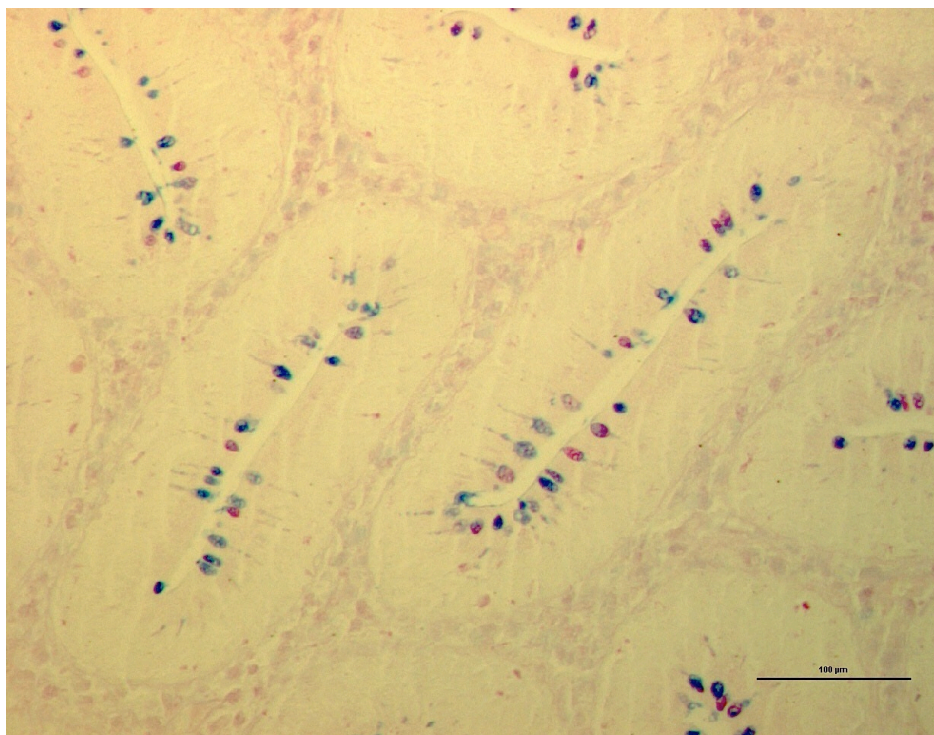
Slika 17. Prikaz PAS+ i AB+ stanica nakon tretiranja dvovalentnim željezom;
14. dan tretiranja (bar = 100 μm)



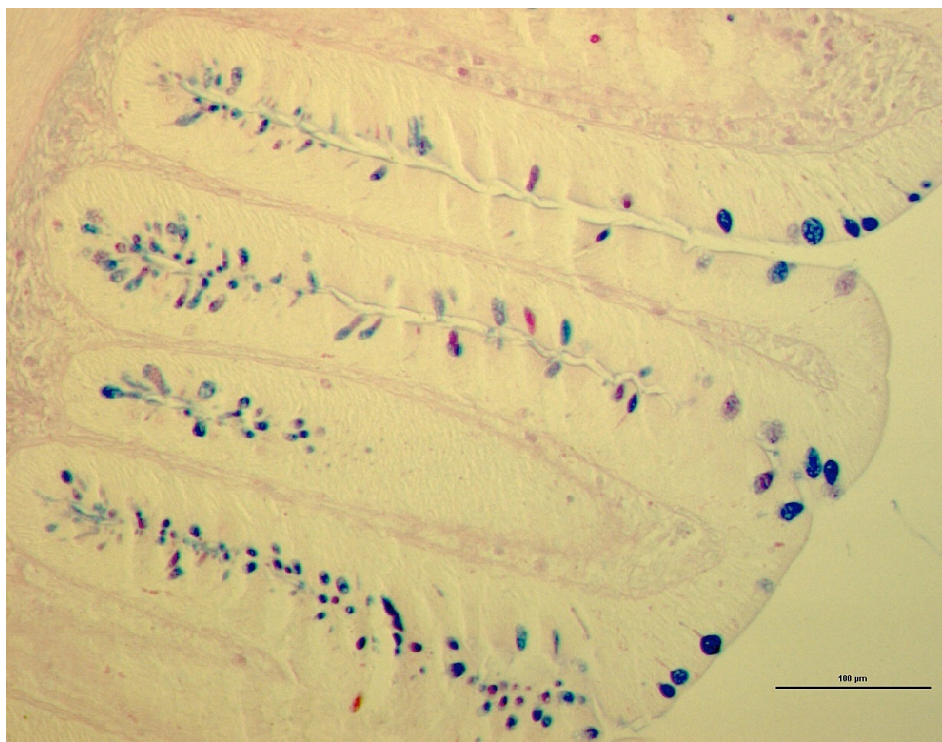
Slika 18. Prikaz PAS+ i AB+ stanica nakon tretiranja dvovalentnim željezom;
105. dan tretiranja (bar =100 μm)

3.1.3. ŠARANI TRETIRANI ŽELJEZO(III)-KLORIDOM

Kod šarana tretiranih trovalentnim (FeCl_3) željezom, 14. dana tretiranja (Slika 19) uočava se porast AB pozitivnih stanica (24,1 stanica na prosječnoj površini od $92315,7 \mu\text{m}^2$) s obzirom na kontrolnu skupinu šarana, dok 105. dana tretiranja (Slika 20) porast broja AB pozitivnih stanica također je prisutan (28,3 stanice na prosječnoj površini od $68910,1 \mu\text{m}^2$). Broj PAS pozitivnih stanica nakon 14. dana tretiranja smanjen je (8,1 stanica na prosječnoj površini od $92315,7 \mu\text{m}^2$) u odnosu na kontrolnu skupinu šarana. 105. dana tretiranja trovalentnim željezom dolazi do povećanja PAS pozitivnih (9,1 stanica na prosječnoj površini od $68910,1 \mu\text{m}^2$) u odnosu na kontrolu (Tablica 5).



Slika 19. Prikaz PAS+ i AB+ stanica nakon tretiranja trovalentnim željezom;
14. dan tretiranja (bar = 100 μm)



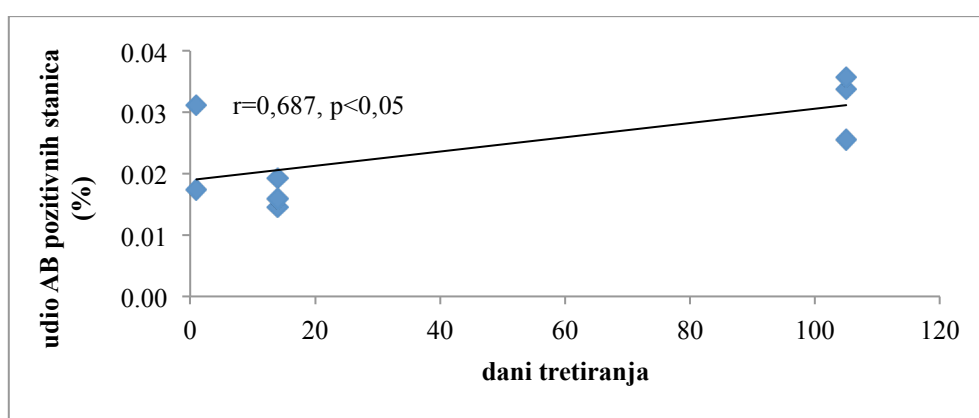
Slika 20. Prikaz PAS+ i AB+ stanica nakon tretiranja trovalentnim željezom;
105. dan tretiranja (bar = 100 μm)

Tablica 5. Prosječni udio AB i PAS pozitivnih stanica, s standardnom devijacijom te minimumima i maksimumima vrijednosti

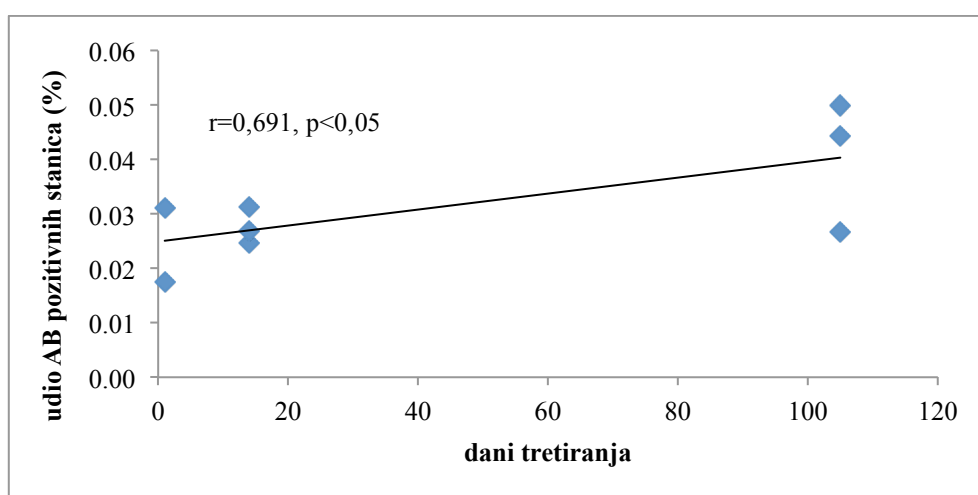
| | Željezo(II)-klorid | | Željezo(III)-klorid | | Kontrola |
|---|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|
| | 14 dan | 105 dan | 14 dan | 105 dan | |
| AB pozitivne stanice | | | | | |
| prosječna vrijednost ± standardna devijacija | 21,6 ± 8,0 | 24,3 ± 7,6 | 24,1 ± 4,9 | 28,3 ± 10,6 | 23,1 ± 3,6 |
| minimum - maksimum | 16,5 - 30,9 | 15,8 - 30,4 | 19,4 - 29,3 | 16,4 - 36,8 | 20,5 - 25,6 |
| PAS pozitivne stanice | | | | | |
| prosječna vrijednost ± standardna devijacija | 9,7 ± 3,5 | 6,9 ± 2,0 | 8,1 ± 5,6 | 9,2 ± 4,5 | 9,8 ± 4,5 |
| minimum - maksimum | 5,8 - 12,6 | 4,9 - 9,0 | 3,5 - 14,4 | 4,6 - 13,6 | 6,6 - 13,0 |
| Analizirana površina crijeva (µm ²) | | | | | |
| prosječna vrijednost ± standardna devijacija | 141143,7 ± 3654,5 | 75644,0 ± 14172,4 | 92315,7 ± 16544,7 | 68910,1 ± 6527,0 | 99977,6 ± 25254,1 |
| minimum - maksimum | 99510,9 - 167939,7 | 61927,0 - 90231,6 | 75599,1 - 108682,9 | 61473,0 - 73686,7 | 82120,3 - 117834,9 |

3.2. REZULTATI STATISTIČKIH TESTOVA

Kolmogorov-Smirnov test pokazao je da je distribucija podataka normalna ($p > 0,05$) stoga su u daljnjoj analizi podataka korišteni parametrijski testovi. Pearsonova korelacija pokazuje pozitivan porast udjela AB pozitivnih stanica s obzirom na dane tretiranja. Statistički značajan porast pozitivnih stanica vidljiv je za tretman dvovalentnim ($r=0,687$, $p=0,030$) (Slika 21) i trovalentnim željezom ($r=0,691$, $p=0,029$) (Slika 22).



Slika 21. Porast udjela AB pozitivnih stanica s danima tretiranja šarana dvovalentnim željezom uz rezultate Pearsonove korelacije.



Slika 22. Porast udjela AB pozitivnih stanica s danima tretiranja šarana trovalentnim željezom uz rezultate Pearsonove korelacije

Usporedbom životinja tretiranih dvovalentnim i trovalentnim željezom nije bilo statistički značajne razlike u udjelu brojnosti AB pozitivnih ($t=-2,438$, $p=0,059$) i PAS pozitivnih ($t=-0,877$, $p=0,421$) stanica.

Usporedbom postotka učestalosti AB pozitivnih stanica u odnosu na PAS pozitivne stanice na mjerenim površinama crijeva ustanovljen je statistički značajan veći udio AB pozitivnih stanica, koji je zabilježen i u tretmanu dvovalentnim ($t=5,046$, $p=0,001$) i u tretmanu trovalentnim željezom ($t=7,265$, $p<0,001$).

Usporedbom udjela vrčastih stanica kontrolne skupine i skupina tretiranih do 14. i 105. dana eksperimenta nije dobivena statistički značajna razlika.

Porast broja vrčastih stanica između analiziranih skupina nije utvrđen niti za AB pozitivne ni PAS pozitivne stanice. U Tablici 6 su prikazani rezultati parnog t-testa za sve analizirane skupine.

Tablica 6. Rezultati parnog t-testa za sve analizirane skupine.

| | AB pozitivne stanice | | PAS pozitivne stanice | |
|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 14 dan | 105 dan | 14 dan | 105 dan |
| <i>dvovalentno željezo</i> | | | | |
| kontrola | $t=-1,618$, $p=0,353$ | $t=0,489$, $p=0,710$ | $t=-1,027$, $p=0,492$ | $t=-1,070$, $p=0,478$ |
| 14 dan | | $t=3,41$, $p=0,076$ | | $t=-0,304$, $p=0,790$ |
| <i>trovalentno željezo</i> | | | | |
| kontrola | $t=-1,029$, $p=0,491$ | $t=-2,366$, $p=0,255$ | $t=-4,197$, $p=0,149$ | $t=6,397$, $p=0,099$ |
| 14 dan | | $t=1,728$, $p=0,226$ | | $t=-1,186$, $p=0,357$ |

4. RASPRAVA

Šaran je jedna od najstarije pripitomljenih ribljih vrsta koja se koristi u ljudskoj prehrani, a prirodno je rasprostranjen u nekoliko europskih zemalja. Međutim, divlje populacije šarana ugrožene su sve više zbog antropogenog utjecaja i odbjeglih jedinki iz uzgoja (Flajšhaus i Hulata 2006).

Vrčaste stanice su jednostavne žlijezdane epitelne stanice čija funkcija je izlučivanje gel formirajućih mucina, koji su glavni sastojak mukusa. One sintetiziraju i izlučuju bioaktivne molekule kao što su sekretorni mucini i mucini vezani za membrane, peptide, molekulu β (RELM β) i Fc- γ vezajući protein (Fcgbp) (Dharmani i sur. 2009). Ove molekule se izlučuju na dva načina, konstitutivnom i bazalnom sekrecijom, odnosno kontinuiranom sekrecijom ovisnoj o citoskeletalnim pokretima sekretornih granula, te stimuliranom ili reguliranom sekrecijom koja uključuje egzocitozu granula kao odgovor na vanjski podražaj (Davis i Dickey 2008).

Prisutnost teških metala u kontaminiranoj vodi jedan je od takvih vanjskih čimbenika koji utječe na vodene organizme i njihove organske sustave (Kojadinovic i sur. 2007; Adhikari i sur. 2010). Kada je voda kontaminirana ribe koje se nalaze na vrhu prehrambenog lanca bioakumuliraju većinu toksičnih supstanci iz vode. Upravo zato se u raznim studijama ribe koriste kako bi se procijenilo zdravlje čitavog ekosustava i stupanj njegove zagađenosti. Osim toga, riba čini značajan udio čovjekove prehrane, stoga su informacije o zdravlju i fitnessu komercijalnih vrsta bitne za uspješnu akvakulturu i za zdravlje čovjeka (Kojadinovic i sur. 2007).

Istraživanje o bioakumulaciji toksičnih metala iz zagađene vode u jezeru Umiam u Indiji pokazalo je da šarani selektivno apsorbiraju selen, cink i željezo iz vode pri čemu se u tkivima zadržavaju primarno cink i željezo (Nongbri i Syiem 2012). Studija utjecaja teških metala poput kobalta na vrčaste stanice vrste *Carassius auratus* L., upućuje na stimulaciju stvaranja novih vrčastih stanica te stimulaciju mucinogeneze u stanicama koje prirodno ne sadrže mucinogene granule (Vickers 1962). Također istraživanje utjecaja kobalta, kroma i žive na histopatologiju crijeva vrste *Clarias batrachus* L. ukazuje na povećanje broja vrčastih stanica pri izloženosti subletalnim koncentracijama ovih metala (Cd – 9 ppm, Cr – 12 ppm i Hg – 0.3 ppm) kroz period od 28 dana (Ara Begum S. i sur. 2010).

Željezo u otopinama najčešće dolazi u obliku Fe^{2+} i Fe^{3+} , s tim da je Fe^{3+} oblik nešto češći u površinskim vodama. Sama koncentracija i kemijsko ponašanje željeza su pod utjecajem pH, redoks potencijala, temperature i ostalih organskih sastavnica vode (Wetzel 1975). Moss (1988) je ustanovio da željezo može biti toksično čak i u umjerenim koncentracijama ($\pm 100 \mu\text{g/l}$) ako je u obliku Fe^{2+} pri niskim koncentracijama otopljenog kisika u vodi ili u obliku Fe^{3+} pri nešto nižem pH (pH 3-4). Stoga se osim mjerenja koncentracija željeza u vodi moraju mjeriti i abiotički faktori koji utječu na kemijski oblik i toksično ponašanje željeza. Usporedbom životinja tretiranih dvovalentnim i trovalentnim željezom u ovom radu nije zabilježena statistički značajna razlika u udjelu brojnosti AB pozitivnih i PAS pozitivnih stanica, iako je na preparatima bio vidljiv nešto veći utjecaj trovalentnog željeza na broj vrčastih stanica u odnosu na dvovalentno željezo.

Detekcija mukoznih stanica u kliničkim i toksikološkim istraživanjima se pokazala jako bitnom, posebice jer je potrebno utvrditi distribuciju i strukturu tih stanica u zdravom organizmu i organizmu koji je izložen određenim vanjskim utjecajima (McGuckin i Thornton 2000). Stoga su u ovom radu korištene histokemijske metode koje su omogućile razlikovanje vrčastih stanica koje sintetiziraju neutralne mucine i kisele mucine koji su po sastavu sulfomucini i sijalomucini. Iako se pokrovni epitel crijevnih resica i tubulusnih žlijezda sluznice sastoji u najvećoj mjeri od apsorpcijskih stanica, HE bojanje korišteno u ovom istraživanju pokazalo je da se vrčaste stanice nalaze raspršene po svim regijama ovog epitela. Histokemijska analiza, koja je omogućila razlikovanje kiselih i neutralnih sekreta u vrčastim stanicama, pokazala je statistički značajan porast AB pozitivnih vrčastih stanica ukoliko su životinje izložene većim koncentracijama dvovalentnog i trovalentnog željeza. Istovremeno s povećanjem AB pozitivnih stanica, primijećeno je smanjenje broja PAS pozitivnih stanica, iako taj rezultat nije bio statistički značajan. Rezultati dobiveni ovim radom pokazuju da je sastav vrčastih stanica i sekret koji one proizvode osjetljiv na veće količine željeza koje se nalaze u vodi i zatim apsorbiraju kroz probavilo. Iako je ovo istraživanje samo preliminarno, ukazuje da se prilikom dugotrajnije izloženosti većim koncentracijama željeza povećava broj mukoznih stanica koje izlučuju kiselu sekret, što vjerojatno uzrokuje i smanjuje broj vrčastih stanica koje sadržavaju neutralne mucine. Pretpostavlja se da je povećana produkcija mukoznog sekreta jedan od

znakova upalnog procesa u probavilu i da je dio nespecifičnog obrambenog mehanizma organizma koji je pod fiziološkim stresom (Valpotić i sur. 2009).

Neutralni mucini koji se proizvode u probavnom traktu se povezuju s apsorpcijom lako probavljivih molekula poput disaharida i kratkih lanaca masnih kiselina (Grau i sur. 1992). Prisutnost neutralnih i kiselih mucina dokazana je u crijevnom epitelu riba (Domeneghini i sur. 1998; Nachi i sur. 1998; Domeneghini i sur, 1999; Morrison i Wright, 1999). Studija od Ribelles i sur. (1995) ukazuje na direktnu povezanost kvalitete i sastava mukoznog sekreta s okolišnim čimbenicima. Primjerice, Božić i sur. (2001) su ustanovili da izgladnjivanje šarana dovodi do povećanja broja vrčastih stanica u probavnom sustavu. Ako se uzme u obzir da je jedna od funkcija mucina da reguliraju transfer proteina i iona te razlažu proteine moguće je da količina i sastav probavljenje hrane utječu i na sastav mukoznog sekreta. Pretpostavlja se da mukozni sekret u kojem prevladavaju sijalomucini i sulfomucini povećava viskoznost izlučenog sekreta, čime se povećava zaštitna uloga sekreta u probavilu (Tibbetts 1997; Suprasert i sur. 1987).

5. ZAKLJUČAK

Istraživanje je provedeno na uzorcima početnog dijela tankog crijeva šarana (*Cyprinus carpio* L.) koji su držani u akvarijskoj vodi u koju je dodana maksimalno dopuštena koncentracija (1 mg/L) FeCl_2 ili FeCl_3 . Na temelju rezultata morfometrijske analize vrčastih stanica u pokrovnom i žljezdanom epitelu probavila šarana kontrolne skupine i eksperimentalnih skupina tretiranih sa FeCl_2 ili FeCl_3 možemo zaključiti sljedeće:

- Tretiranjem vode s FeCl_2 dolazi do značajnog povećanja broja AB pozitivnih vrčastih stanica u tankom crijevu šarana;
- Tretiranjem vode s FeCl_3 također dolazi do značajnog porasta broja AB pozitivnih vrčastih stanica;
- Broj PAS pozitivnih vrčastih stanica nakon tretiranja sa FeCl_2 i FeCl_3 nije bio statistički značajno različit u odnosu na kontrolnu skupinu.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je tretiranje šarana sa FeCl_2 i FeCl_3 doprinijelo promjeni broja vrčastih stanica i sastavu mukusa na površini epitela crijevnih resica i epitela tubulusnih žlijezda crijeva. Pretpostavlja se da je povećana produkcija mukoznog sekreta jedan od znakova nespecifičnog obrambenog mehanizma organizma koji je pod fiziološkim stresom. Osim toga, vidljivo je da se značajnije promjene događaju u broju AB pozitivnih stanica koje izlučuju kiseli sekret u kojem prevladavaju sijalomucini i sulfomucini. Upravo taj tip sekreta dodatno povećava viskoznost izlučenog mukusa čime se povećava zaštitna uloga sekreta u probavilu.

6. LITERATURA

Adhikari S, Ghosh L, Giri BS i Ayyappan S. (2009): Distributions of metals in the food web of fishponds of Kolleru Lake, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1224-1248.

Andrews N.C. (1999): Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine* 341: 1986–1995.

Andrianifahanana M., Moniaux N., Batra S.K. (2006): Regulation of mucin expression: mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1765: 189–222.

Ara Begum S., Banu Q. i Hoque B. (2010): Histopathology of the intestine of *Clarias batrachus* L. under heavy metal stress. *Chittagong University Journal of Biological Science* 5: 45-53.

Artis D., Wang M.L., Keilbaugh S.A. i sur. (2004): RELMbeta/FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 101: 13596-13600.

Bansil R. i Turner B. (2006): Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11: 164-170.

Barton J.C. i Edwards C.Q. (2000): *Hemochromatosis: Genetics, Pathophysiology, Diagnosis and Treatment*. Cambridge University Press, Cambridge.

Bashisha Nongbri B. i Mayashree B. (2012): Syiem Analysis of heavy metal accumulation in water and fish (*Cyprinus carpio* L.) meat from Umiam Lake in Meghalaya, India. *International Multidisciplinary Research Journal* 2: 73-76.

Bondi A. i Spandorf A. (1954): The Action of the Digestive Enzymes of the Carp.
Bozic F., Srebocan E. i Kozaric Z. (2001): Starvation induced pathobiology in the gut of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 114: 134-138.

Brandhagen D.J., Fairbanks V.F., Batts K.P., Thibodeau S.N. (1999): Update on hereditary hemochromatosis and the HFE gene. *Mayo Clinic Proceedings* 74: 917–21. *British Journal of Nutrition*, Volume 8, Issue 03: 244-245.

Bury N., Grosell M. (2003): Iron acquisition by teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 135: 97–105.

Bury N.R., Grosell M., Wood C.M., Hogstrand C., Wilson R.W., Rankin J.C., Busk M., Lecklin T. i Jensen F.B. (2001): Intestinal iron uptake in the European flounder (*Platichthys flesus*). *The Journal of Experimental Biology* 204: 3779-3787.

Camaschella C., Schrier S.L. (2011): Regulation of iron balance. (Preuzeto sa: <http://www.uptodate.com/contents/regulation-of-iron-balance>)

Cao X. i Wang W. (2009): Histology and mucin histochemistry of the digestive tract of yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia Histologia Embryologia* 38: 254-261.

Casiday R., Frey R. (2009): Iron Use and Storage in the Body: Ferritin. Department of Chemistry, Washington University (Preuzeto sa: http://www.chemistry.wustl.edu/~edudev/LabTutorials/CourseTutorials/bb/Ferritin/151_T4_07_iron.pdf).

Conrad M.E., Umbreit J.N. (2000): Disorders of iron metabolism. *New England Journal of Medicine* 342: 1293–1294.

Croteau M., Luoma S.N. i Stewart A.R. (2005): Trophic transfer of metals along freshwater food webs: Evidence of cadmium biomagnification in nature. *Limnology and Oceanography*. 50: 1511-1519.

Cruywagen J.J., Heyns J.J.B., Raubenheimer H.G. i van Berge P.C. (1981): *Inleiding tot die Anorganiese en Fisiese Chemie*. Butter- worth and Co. Ltd., Durban.

Davis C.W., Dickey B.F. (2008): Regulated airway goblet cell mucin secretion. *Annual Review of Physiology* 70: 487–512.

Deplancke B. i Gaskins H. (2001): Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71: 1131S-1141S.

Devine P. i McKenzie F. (1992): Mucins: Structure, Function, and Associations with Malignancy. *BioEssays* 14: 619-625.

Dharmani P., Srivastava V., Kisson-Singh V. i sur. (2009): Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens. *Journal of Innate Immunity* 1: 123–135.

Donovan i sur. (2000): Positional cloning of zebrafish ferroportin identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* 403: 776–781.

Ellis K.V. (1989): *Surface Water Pollution and its Control*. The Macmillan Press Ltd., London.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency) (1997): Mercury Study Report to Congress. Vol. IV: An Assessment of Exposure to Mercury in the United States . EPA-452/R-97-006. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air Quality Planning and Standards and Office of Research and Development.

Eroschenko V.P. (2008): *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Filipe M. (1979): Mucins in the human gastrointestinal epithelium: A review. *Investigative Cell Pathology* 2: 195-216.

Flajšhans M. i Hulata G. (2006): Common carp - *Cyprinus carpio*. U: Genetic effects of domestication, culture and breeding of fish and shellfish, and their impacts on wild populations. (Preuzeto sa: <http://genipact.imr.no>)

Fleming R.E., Bacon B.R. (2005): Orchestration of iron homeostasis. *New England Journal of Medicine* 352: 1741–1744.

Ford M.J. (2001): Molecular evolution of transferrin: evidence for positive selection in salmonids. *Molecular Biology and Evolution* 18: 639-647.

Forstner J. i Forstner G. (1994): *Gastrointestinal Mucus*. U: Johnson L. (Ed.): *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3rd ed., Vol. 2). Raven Press Ltd., New York, str. 1255-1283.

Förstner U. i Wittmann G.T.W. (1979): *Metal Pollution in the Aquatic Environment*. Springer-Verlag, Berlin.

Gum J.R., Byrd J.C., Hicks J.W. i sur. (1989): Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *Journal of Biological Chemistry* 264: 6480-6487.

Hattrup C. i Gendler S. (2008): Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *The Annual Review of Physiology* 70: 431-57.

Hem I.D. (1989): *Study and Interpretation of the Chemical Characteristics of Natural Water* (3rd edn.) United States Geological Survey Water- Supply Paper 2254. United States Government Printing Office, Washington DC.

Herbert D.R., Yang J.Q., Hogan S.P. i sur. (2009): Intestinal epithelial cell secretion of RELM-beta protects against gastrointestinal worm infection. *Journal of Experimental Medicine* 206: 2947-2957.

Hollingsworth M.A., Swanson B.J. (2004): Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Review Cancer* 4: 45–60.

Hrvatska enciklopedija (LZMK) broj 11 (Tr-Ž) (2009). Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Zagreb.

Johansson M.E., Thomsson K.A., Hansson G.C. (2009): Proteomic analyses of the two mucus layers of the colon barrier reveal that their main component, the Muc2 mucin, is strongly bound to the Fcgbp protein. *Journal of Proteome Reserch* 8: 3549-3557.

Jorgensen S.E. i Fath B. (2008); *Encyclopedia of Ecology Volume 1*. Elsevier Science, Amsterdam.

Kierszenbaum A. (2002): *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. Mosby Inc., St. Louis.

- Kobayashi K., Ogata H., Morikawa M. i sur. (2005): Distribution and partial characterisation of IgG Fc binding protein in various mucin producing cells and body fluids. *An internal Journal of Gastroenterology and Hepatology* 51: 169–176.
- Kojadinovic J, Potier M, Corre ML, Cosson RP i Bustamante P. (2007): Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environmental Pollution* 146: 548–566.
- Kotzé S. i Coetzee H. (1994): A histochemical study of mucus glycoproteins or mucins in the intestinal tract of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 61: 177-181.
- Landrum P.F. i Fisher S.W. (1999): Influence of lipids on the bioaccumulation and trophic transfer of organic contaminants in aquatic organisms. U: Arts M.T. i Wainman B.C.: Lipids in fresh water ecosystems. Springer Verlag, New York.
- Laux D., Cohen P., Conway, T. (2005): Role of mucus layer in bacterial colonization of the intestine. U: Nataro J., Cohen P., Mobley H. i Weiser J.: Colonization of Mucosal Surfaces. ASM Press, Washington, str. 199-212.
- Matković T. i Matković P. (2011): Fizikalna metalurgija I. (Preuzeto sa: www.simet.unizg.hr)
- McKie A.T., Barrow D., Latunde-Dada G.O. i sur. (2001): An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science* 291: 1755–1759.
- Montagne L., Piel C. i Lallès J. (2004): Effect of diet on mucin kinetics and composition: Nutrition and health implications. *Nutrition Reviews* 62: 105-114.
- Morrison C. M. i Wright JR. J. R. (1999): A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *Journal of Fish Biology* 54: 597-606.
- Morsey M. i Protasowicki M. (1990): Cadmium bio-acumulation and its effect on some Hematological and histological aspects in carp *Cyprinus carpio* (L.) at selected temperature. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 20: 105-115.
- Mosby's Medical Dictionary (2009). Mosby, Maryland Heights.
- Moss B. (1988): Ecology of Fresh Waters: Man and Medium. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Nachi A. M., Hernandetblasquez F. J., Barbieri R. L., Leite R. G., Ferri S. i Phan M. T. (1998): Intestinal histology of a detritivorous (iliophagous) fish *Prochilodus scrofa* (Characiformes, Prochilodontidae). *Annales des Sciences Naturelles-Zoologie et Biologie Animale* 19: 81-88.
- Opća enciklopedija (1977), 3. izdanje. Jugoslavenski leksikografski zavod, Zagreb.
- Pavelka M. i Roth J. (2010): Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology (2nd ed.). Springer-Verlag, Wien.

Pearson J. i Brownlee I. (2005): Structure and Function of Mucosal Surfaces. U: Nataro J., Cohen P., Mobley H. i Weiser J., Colonization of Mucosal Surfaces. ASM Press, Washington, str. 3-16.

Petrinec Z., Nejedli S., Kuzir S. i Opacak A. (2005): Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and European catfish (*Silurus glanis* L.). Veterinarski. Arhiv., 75: 317-372.

Pietrangelo A. (2010): Hereditary Hemochromatosis: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. Gastroenterology 139: 393–408.

Ribelles A., Carrasco M. C., Rosety M. i Aldana M. (1995): A histochemical study of the biological effects of sodium dodecyl sulfate on the intestine of the gilthead seabream, *Sparus aurata* L. Ecotoxicology and Environmental Safety 32: 131-138.

Rose M. i Voynow J. (2006): Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and diseases. Physiological Reviews 80: 245-278.

Ross M.H. i Pawlina W. (2003): Histology: A Text and Atlas. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Sakamoto S. i Yone Y. (1978): Iron deficiency symptoms of carp. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 44: 1157-1160.

Scillitani G., Zizza S., Liquori G. i Ferri D. (2007): Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. Acta histochemica 109: 347-357.

Sharma R., Schumacher U., Ronaasen V. i Coates M. (1995): Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. An internal Journal of Gastroenterology and Hepatology 36: 209-214.

Sheahan D. i Jervis H. (1976): Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. American Journal of Anatomy 146: 103-132.

Stevens C. i Hume I. (1995): Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System (2nd ed.). Cambridge University Press, Cambridge.

Stevens C., i Hume I. (1998): Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiological Reviews 78: 393-427.

Suprasert A., Fujioka T. i Yamad K. (1987): The histochemistry of glycoconjugates in the colonic epithelium of the chicken. Histochemistry 86: 491-497.

Tarr B.R., Booth H.S., Albert D. (1950); Anhydrous Iron(III) Chloride. Inorganic Syntheses 3: 191–194.

The American Heritage Medical Dictionary (2004). Houghton Mifflin Company, Boston.

Tibbetts I. (1997): The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. Journal of Fish Biology 50: 809-820.

Tibbetts I. R. (1997): The distribution and function of mucous cells and their secretions in the alimentary tract of *Arrhamphus sclerolepis krefftii*. Journal of Fish Biology 50: 809-820.

Van Dijk J.P., Lagerwerf A.J., van Eijk H.G. i Leijnse, B. (1975): Iron metabolism in the tench (*Tinca tinca* L.). Studies by means of intravascular administration of ⁵⁹Fe(III) bound to plasma. Journal of Comparative Physiology 99: 321-330.

Vickers, T. (1962): A study of the intestinal epithelium of the goldfish *Carassius auratus*: Its normal structure, the dynamics of cell replacement, and the changes induced by salts of cobalt and manganese. Quarterly journal of microscopical science 103: 93-110 .

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

Wetzel R.G. (1975). Limnology. WB Saunders Company, Philadelphia.

Wetzel R.G. (1983): Limnology. Saunders College Publishing, New York.ž

Wildermuth E., Stark H., Friedrich G., Ebenhöch F.L., Kühborth B., Silver J., Rituper R. (2005): Iron Compounds. U: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Wiley-VCH, Wienheim.

Young B. i Heath J.W. (2000): Wheater's functional histology: A Text and Colour Atlas. Churchill Livingston, London.

Young B., Lowe J., Stevens A. i Heath, J. (2006): Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. Churchill Livingstone Elsevier, London.

<http://www.austincc.edu>

<http://www.biomol.de>

<http://www.cem.msu.edu>

<http://www.changshengyuye.com>

<http://classes.midlandstech.edu>

<http://www.intechopen.com>

<http://www.koiquest.co.uk>

<http://mercurypolicy.scripts.mit.edu>

<http://www.nationmaster.com>

<http://www.nature.com>

<http://svt.tice.ac-orleans-tours.fr>

7. PRILOZI

Prilog 1. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₂, uzorak broj 1

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 169429,6 | 11 | 4 |
| 2 | 137532,95 | 12 | 5 |
| 3 | 163067,45 | 27 | 6 |
| 4 | 148623,18 | 11 | 6 |
| 5 | 139756,35 | 15 | 5 |
| 6 | 112892,92 | 18 | 5 |
| 7 | 149754,06 | 18 | 7 |
| 8 | 151797,5 | 12 | 4 |
| 9 | 161954,66 | 11 | 4 |
| 10 | 114373,58 | 20 | 2 |
| 11 | 136305,34 | 12 | 4 |
| 12 | 182416,37 | 19 | 6 |
| 13 | 160634,66 | 18 | 6 |
| 14 | 173630,35 | 10 | 4 |
| 15 | 204074,33 | 31 | 11 |
| 16 | 154360,79 | 22 | 8 |
| 17 | 195895,72 | 16 | 6 |
| 18 | 186409,42 | 23 | 11 |
| 19 | 129137,72 | 16 | 6 |
| 20 | 147560,32 | 11 | 6 |

Prilog 2. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₂, uzorak broj 2

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 160978,17 | 22 | 7 |
| 2 | 185932,75 | 27 | 11 |
| 3 | 162969,99 | 31 | 10 |
| 4 | 195903,69 | 36 | 12 |
| 5 | 217600,48 | 37 | 11 |
| 6 | 185994,99 | 44 | 20 |
| 7 | 133860,97 | 29 | 9 |
| 8 | 155152,26 | 16 | 7 |
| 9 | 166276,99 | 28 | 11 |
| 10 | 170603,66 | 19 | 10 |
| 11 | 163761,7 | 18 | 7 |
| 12 | 176350,2 | 21 | 10 |
| 13 | 169338,18 | 18 | 8 |
| 14 | 165164,44 | 31 | 11 |
| 15 | 182848,41 | 65 | 11 |
| 16 | 155804,3 | 31 | 13 |
| 17 | 147754,03 | 34 | 11 |
| 18 | 177277,72 | 46 | 9 |
| 19 | 155943,25 | 30 | 11 |
| 20 | 129278,11 | 34 | 13 |

Prilog 3. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₂, uzorak broj 3

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 92600,31 | 19 | 11 |
| 2 | 109965,13 | 18 | 11 |
| 3 | 54283,85 | 14 | 14 |
| 4 | 85613,13 | 13 | 11 |
| 5 | 104437,15 | 21 | 13 |
| 6 | 86807,7 | 12 | 10 |
| 7 | 120399,22 | 23 | 16 |
| 8 | 59502,82 | 7 | 11 |
| 9 | 82385,74 | 16 | 8 |
| 10 | 123952,52 | 26 | 14 |
| 11 | 79491,97 | 17 | 11 |
| 12 | 112420,36 | 13 | 15 |
| 13 | 117778,04 | 17 | 8 |
| 14 | 75001,5 | 25 | 13 |
| 15 | 149383,53 | 14 | 17 |
| 16 | 154914,65 | 20 | 22 |
| 17 | 101964,55 | 20 | 7 |
| 18 | 100825,72 | 22 | 14 |
| 19 | 124792,71 | 15 | 17 |
| 20 | 53697,66 | 17 | 9 |

Prilog 4. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₂, uzorak broj 1

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 60981,79 | 28 | 5 |
| 2 | 86960,88 | 28 | 7 |
| 3 | 84083,51 | 27 | 8 |
| 4 | 56916,61 | 38 | 5 |
| 5 | 110563,14 | 34 | 11 |
| 6 | 96284,83 | 28 | 9 |
| 7 | 63691,51 | 22 | 4 |
| 8 | 101870,48 | 37 | 10 |
| 9 | 47458,78 | 22 | 7 |
| 10 | 70480,16 | 23 | 8 |
| 11 | 111962,02 | 31 | 10 |
| 12 | 108828,71 | 31 | 12 |
| 13 | 58072,82 | 22 | 10 |
| 14 | 58339,62 | 23 | 5 |
| 15 | 158835,34 | 52 | 21 |
| 16 | 84007,28 | 21 | 11 |
| 17 | 137556,83 | 45 | 14 |
| 18 | 65556,21 | 23 | 5 |
| 19 | 179455,05 | 37 | 13 |
| 20 | 62726,84 | 36 | 4 |

Prilog 5. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₂, uzorak broj 2

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 76161,33 | 14 | 5 |
| 2 | 74685,97 | 15 | 2 |
| 3 | 80612,47 | 16 | 3 |
| 4 | 74942,16 | 16 | 2 |
| 5 | 84588,64 | 28 | 4 |
| 6 | 53994,86 | 14 | 3 |
| 7 | 74101,24 | 13 | 9 |
| 8 | 105362,26 | 19 | 10 |
| 9 | 38351,92 | 16 | 2 |
| 10 | 60639,97 | 14 | 8 |
| 11 | 93406,26 | 15 | 18 |
| 12 | 43819,61 | 11 | 2 |
| 13 | 48330,09 | 17 | 4 |
| 14 | 37600,02 | 11 | 3 |
| 15 | 42138,97 | 12 | 3 |
| 16 | 44877,15 | 6 | 1 |
| 17 | 58414,64 | 13 | 7 |
| 18 | 60081,29 | 32 | 4 |
| 19 | 43316,4 | 18 | 5 |
| 20 | 43114,98 | 16 | 3 |

Prilog 6. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₂, uzorak broj 3

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 101087,69 | 30 | 8 |
| 2 | 41548,92 | 22 | 4 |
| 3 | 44302,79 | 19 | 7 |
| 4 | 87961,25 | 32 | 10 |
| 5 | 94513,49 | 27 | 9 |
| 6 | 136632,92 | 34 | 8 |
| 7 | 60873 | 30 | 6 |
| 8 | 50973,71 | 17 | 7 |
| 9 | 50869,99 | 18 | 8 |
| 10 | 68193,8 | 22 | 6 |
| 11 | 69313,58 | 25 | 8 |
| 12 | 113394,43 | 32 | 9 |
| 13 | 94826,13 | 35 | 5 |
| 14 | 104037,67 | 56 | 12 |
| 15 | 80300,08 | 23 | 7 |
| 16 | 89344,94 | 27 | 5 |
| 17 | 49519,59 | 14 | 8 |
| 18 | 54551,37 | 31 | 2 |
| 19 | 52687,4 | 28 | 6 |
| 20 | 50534,92 | 12 | 2 |

Prilog 7. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₃, uzorak broj 1

| Mjerna površina | Površina (μm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 117303,06 | 22 | 6 |
| 2 | 96620,38 | 22 | 9 |
| 3 | 61397,19 | 14 | 5 |
| 4 | 63591,16 | 16 | 7 |
| 5 | 66771,51 | 13 | 10 |
| 6 | 52060,93 | 17 | 9 |
| 7 | 66037,94 | 22 | 4 |
| 8 | 134112,81 | 25 | 6 |
| 9 | 93238,12 | 26 | 4 |
| 10 | 85528,71 | 14 | 5 |
| 11 | 124707,8 | 23 | 8 |
| 12 | 83487,19 | 15 | 8 |
| 13 | 97107,42 | 15 | 7 |
| 14 | 86029,01 | 16 | 4 |
| 15 | 91158,97 | 18 | 6 |
| 16 | 100814,38 | 27 | 3 |
| 17 | 80999,4 | 26 | 2 |
| 18 | 118537,18 | 27 | 11 |
| 19 | 117697,22 | 22 | 9 |
| 20 | 116099,09 | 8 | 5 |

Prilog 8. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₃, uzorak broj 2

| Mjerna površina | Površina (μm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 55593,48 | 50 | 0 |
| 2 | 65332,11 | 18 | 2 |
| 3 | 161795,69 | 28 | 4 |
| 4 | 53901,02 | 13 | 3 |
| 5 | 113301,8 | 25 | 5 |
| 6 | 85100,04 | 20 | 4 |
| 7 | 95790,08 | 26 | 5 |
| 8 | 40535,76 | 19 | 4 |
| 9 | 114174,08 | 26 | 2 |
| 10 | 66210,42 | 22 | 3 |
| 11 | 100550,47 | 35 | 7 |
| 12 | 63295,41 | 15 | 3 |
| 13 | 63241,86 | 13 | 1 |
| 14 | 69605,95 | 25 | 4 |
| 15 | 49856,59 | 27 | 5 |
| 16 | 81409,01 | 28 | 6 |
| 17 | 71384,28 | 31 | 3 |
| 18 | 64866,29 | 17 | 5 |
| 19 | 43311,1 | 17 | 2 |
| 20 | 52726,48 | 17 | 1 |

Prilog 9. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
14. dan, FeCl₃, uzorak broj 3

| Mjerna površina | Površina (μm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 145438,24 | 28 | 14 |
| 2 | 113540,62 | 30 | 13 |
| 3 | 61356,42 | 18 | 14 |
| 4 | 90170,18 | 27 | 11 |
| 5 | 114581,04 | 45 | 12 |
| 6 | 122269,71 | 49 | 32 |
| 7 | 164414,71 | 28 | 14 |
| 8 | 128499,91 | 28 | 15 |
| 9 | 106344,06 | 25 | 7 |
| 10 | 125282,41 | 19 | 17 |
| 11 | 119590,87 | 30 | 15 |
| 12 | 91106,63 | 36 | 20 |
| 13 | 59166,79 | 29 | 14 |
| 14 | 52180,1 | 25 | 11 |
| 15 | 70773,01 | 32 | 9 |
| 16 | 154370,92 | 34 | 16 |
| 17 | 76845,21 | 17 | 9 |
| 18 | 108157,61 | 29 | 17 |
| 19 | 130028,82 | 28 | 13 |
| 20 | 139539,97 | 28 | 14 |

Prilog 10. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₃, uzorak broj 1

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 54295,43 | 43 | 18 |
| 2 | 55201,96 | 37 | 11 |
| 3 | 45424,26 | 30 | 10 |
| 4 | 80845,02 | 47 | 11 |
| 5 | 42425,79 | 25 | 19 |
| 6 | 61296,84 | 38 | 12 |
| 7 | 49353,38 | 45 | 18 |
| 8 | 41584,14 | 18 | 8 |
| 9 | 122457,87 | 42 | 14 |
| 10 | 90462,79 | 32 | 10 |
| 11 | 68873,82 | 55 | 15 |
| 12 | 76008,63 | 29 | 7 |
| 13 | 80368,83 | 22 | 19 |
| 14 | 163273,45 | 46 | 18 |
| 15 | 96014,9 | 41 | 9 |
| 16 | 52034,88 | 52 | 2 |
| 17 | 59466,4 | 22 | 12 |
| 18 | 49537,2 | 34 | 11 |
| 19 | 86752,22 | 43 | 23 |
| 20 | 98055,69 | 34 | 24 |

Prilog 11. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₃, uzorak broj 2

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 79769,38 | 40 | 8 |
| 2 | 47571,67 | 36 | 11 |
| 3 | 92506,72 | 51 | 12 |
| 4 | 92830,44 | 52 | 8 |
| 5 | 60811 | 29 | 5 |
| 6 | 44335,59 | 27 | 10 |
| 7 | 61372,58 | 28 | 6 |
| 8 | 56184,97 | 18 | 6 |
| 9 | 57121,18 | 21 | 6 |
| 10 | 91969,26 | 29 | 14 |
| 11 | 86180,99 | 27 | 12 |
| 12 | 43187,83 | 24 | 7 |
| 13 | 72556,89 | 29 | 6 |
| 14 | 119321,17 | 56 | 23 |
| 15 | 69037,61 | 33 | 12 |
| 16 | 56317,89 | 30 | 7 |
| 17 | 66412,08 | 27 | 12 |
| 18 | 57701,57 | 14 | 6 |
| 19 | 94649,31 | 31 | 16 |
| 20 | 81574,49 | 32 | 4 |

Prilog 12. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
105. dan, FeCl₃, uzorak broj 3

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 38742,71 | 9 | 3 |
| 2 | 42449,43 | 12 | 2 |
| 3 | 62089,27 | 16 | 4 |
| 4 | 101169,47 | 21 | 4 |
| 5 | 45277,35 | 12 | 5 |
| 6 | 43581,75 | 14 | 3 |
| 7 | 120798,46 | 13 | 11 |
| 8 | 40913,05 | 23 | 3 |
| 9 | 82647,96 | 38 | 6 |
| 10 | 60098,17 | 17 | 2 |
| 11 | 36343,7 | 10 | 7 |
| 12 | 43159,61 | 12 | 6 |
| 13 | 66734,61 | 17 | 7 |
| 14 | 88113,71 | 18 | 3 |
| 15 | 72058,76 | 14 | 4 |
| 16 | 80491,62 | 11 | 4 |
| 17 | 58856,81 | 22 | 6 |
| 18 | 75040,1 | 15 | 7 |
| 19 | 38148,33 | 13 | 2 |
| 20 | 32745,78 | 20 | 3 |

Prilog 13. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
kontrolni uzorak broj 1

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 105496,62 | 10 | 15 |
| 2 | 109572,9 | 26 | 9 |
| 3 | 141100,71 | 29 | 11 |
| 4 | 165597,93 | 29 | 14 |
| 5 | 136285,31 | 25 | 14 |
| 6 | 135527,13 | 29 | 9 |
| 7 | 61445,68 | 7 | 10 |
| 8 | 122007,49 | 25 | 15 |
| 9 | 47953,29 | 13 | 4 |
| 10 | 116010,07 | 9 | 16 |
| 11 | 132949,13 | 10 | 18 |
| 12 | 182318,43 | 21 | 20 |
| 13 | 94717,57 | 9 | 10 |
| 14 | 63715,88 | 17 | 5 |
| 15 | 111932,35 | 39 | 20 |
| 16 | 64856,4 | 18 | 13 |
| 17 | 178745,6 | 22 | 21 |
| 18 | 87573,36 | 27 | 8 |
| 19 | 121152,34 | 21 | 13 |
| 20 | 177740,16 | 24 | 15 |

Prilog 14. Rezultati mjerenja AB+ i PAS+ stanica;
kontrolni uzorak broj 2

| Mjerna površina | Površina (µm ²) | AB+ | PAS+ |
|-----------------|-----------------------------|-----|------|
| 1 | 57734,86 | 20 | 6 |
| 2 | 126880,79 | 40 | 8 |
| 3 | 79403,68 | 23 | 4 |
| 4 | 76641,13 | 16 | 4 |
| 5 | 97525,23 | 28 | 11 |
| 6 | 126409,18 | 32 | 8 |
| 7 | 73593,93 | 27 | 9 |
| 8 | 144301,57 | 53 | 17 |
| 9 | 52024,02 | 20 | 4 |
| 10 | 62421,69 | 51 | 3 |
| 11 | 64074,1 | 17 | 3 |
| 12 | 65609,76 | 31 | 10 |
| 13 | 111110 | 21 | 6 |
| 14 | 71161,39 | 19 | 6 |
| 15 | 65830,72 | 16 | 3 |
| 16 | 38422,36 | 17 | 9 |
| 17 | 108923,99 | 25 | 3 |
| 18 | 96190,76 | 17 | 7 |
| 19 | 44218,84 | 18 | 4 |
| 20 | 79927,62 | 20 | 6 |

8. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Luka Krpan

Datum rođenja: 02.02.1983.

Mjesto rođenja: Zagreb, Hrvatska

Adresa: Medulićeva 24, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kontakt broj: 098 18 19 119

e-mail: lucanius@gmail.com

Formalno obrazovanje: • 1997.-2001.

V. gimnazija, prirodoslovno-matematička,
Klaićeva 1, Zagreb

Jezici:

• Engleski, aktivno u govorenju i pisanju

Vozačka dozvola:

• B kategorija

Radno iskustvo:

• 06.02.2013. – sad

Cognitor Savjetovanje d.o.o., Medulićeva 24, Zagreb
Direktor

• 25.04.2012. – 02.06.2013.

Hrvatski Airsoft Savez, Medulićeva 24, Zagreb
Dopredsjednik

• 27.08.2010. – sad

Airsoft Udruga Pravda, Babićev prilaz 5, Zagreb
Predsjednik

• 22.07.2009. – sad

Arturus Projekt d.o.o. Grčanska cesta 147d, Zagreb
Administrator