Diferencijalna i citokemijska analiza krvnih stanica babice balavice (Parablennius sanguinolentus, Pallas 1814)

Jarak, Matea

Master's thesis / Diplomski rad

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:007603

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Jarak

Diferencijalna i citokemijska analiza krvnih stanica babice balavice (*Parablennius sanguinolentus* Pallas, 1814)

Diplomski rad

Zagreb, 2013. godina

Ovaj diplomski rad, izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Domagoja Đikića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

Zahvale

Puno hvala tehničarki Mariji Potočić, stručnoj suradnici dr. sc. Anici Horvat- Knežević, docentici doc. dr. sc. Vesni Benković, profesorici prof. dr. sc. Nadi Oršolić i administratorici Sanji Škalec na pomoći i velikoj potpori koju su mi pružali od prvog dana. Hvala mentoru doc. dr. sc. Domagoju Đikiću na pruženoj samostalnosti od samog početka izrade ovog rada, te na svom znanju koje je podijelio sa mnom. Hvala roditeljima na strpljenju; dočekali ste kraj! Hvala kolegama na podršci.

Hvala Špeli na ogromnoj pomoći, bez tebe nikad ne bih uspjela!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek
Diplomski rad

Diferencijalna i citokemijska analiza krvnih stanica babice balavice (*Parablennius sanguinolentus* Pallas, 1814)

Matea Jarak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb

Rad opisuje hematološku analizu pune krvi babice balavice *Parablennius sanguinolentus*. Utvrđena je brojnost eritrocita, trombocita, limfocita, neutrofila, monocita i bazofila. Morfološka i kvantitativna analiza krvnih stanica provedena je bojanjem May-Grünwald Giemsom. Diferencijalnim citokemijskim tehnikama napravljena je citološka karakterizacija različitih tipova stanica. Glikokonjugati i polisaharidi dokazani su tehnikama *alcian blue* (AB) i *periodic acid Schiff* (PAS). Stanični lipidi dokazani su tehnikom *sudan black B* (SBB). Enzimatsko-citokemijskim tehnikama dokazala se aktivnost alfa-naftil acetat esteraza (ANAE), alfa-naftil butirat esteraza (ANBE) te alkalne fosfataze (ALP). Brojnost i udio leukocita, eritrocita i morfologija stanica slični su ostalim vrstama iz reda Perciformes. Pozitivnu reakciju na bojanje ABom imaju jezgre svih stanica. PASom se boje limfociti, monociti, neutrofili i trombociti. SBBom se boje limfociti, neutrofili i monociti. Aktivnost ANAE nije pokazao niti jedan tip stanice. Aktivnost ANBE pokazuju limfociti, neutrofili i monociti. APFB je pokazala aktivnost kod neutrofila i monocita.

(53 stranice, 22 slika, 9 tablica, 45 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: *Parablennius*, hematologija, krvne stanice, citokemija
Voditelj: Dr. sc. Domagoj Đikić, doc.
Ocjenitelji: Dr. sc. Domagoj Đikić, doc.
Prof. dr. sc. Sven Jelaska
Dr.sc. Petar Kružić, doc.
Zamjena: Prof. dr. sc. Nada Oršolić
Rad prihvaćen: 6.9.2013.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Differential and Cytochemical Analysis of Blood Cells in Rusty Blenny (*Parablennius sanguinolentus* Pallas, 1814)

Matea Jarak

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

This thesis presents results attained from peripheral blood of the fish *Parablennius sanguinolentus*. It contains erythrocyte, thrombocyte, limphocyte, monocyte, neutrophile and basophile counts. The May-Grünwald Giemsa stain was used in morphological and quantitative blood cell analysis. Cytological characterization of all blood cell types used differential cytochemical stains. The alcian blue (AB) dye and the periodic acid Schiff method (PAS) stained glycoconjugates and polysacharides. The sudan black B (SBB) dye stained cell lipids. Activities of alpha-naphthyl acetate esterase (ANAE), alpha-naphthyl butyrate esterase (ANBE) and alkaline phosphatase (ALP) were proved using enzyme-cytochemical reactions. Leukocyte and erithrocyte count, percentage and cell morphology are similar to other fish species from order Perciformes. AB stained nuclei of all cells. PAS stained lymphocytes, monocytes, neutrophils and thrombocytes. SBB stained lymphocytes, neutrophils and monocytes. ANAE did not show reaction in any type of cell. ANBE stained lymphocytes, neutrophils and monocytes. APFB showed reactions in neutrophiles and monocytes.

(53 pages, 22 figures, 9 tables, 45 references, original in: Croatian)

Key words: *Parablennius*, hematology, blood cells, cytochemistry
Supervisor: Dr. Domagoj Đikić, Asst. Prof.
Reviewers: Dr. sc. Domagoj Đikić, doc.
Prof. dr. sc. Sven Jelaska
Dr. sc. Petar Kružić, doc.
Replacement: prof. dr. sc. Nada Oršolić

Thesis accepted: 6.9.2013.

Popis kratica:

AB alcijansko modrilo, engl. *alcian blue*

APFB alkalna fosfataza fast blue engl. *alkaline phosphatase*

ANAE alfa-naftil acetat esteraza, engl. *α-naphthyl acetate esterase*

ANA alfa-naftil acetat

ANBE alfa-naftil butirat esteraza, engl. *α-naphthyl butyrate esterase*

ANB alfa-naftil butirat

dH2O destilirana voda

DKS diferencijalna krvna slika

EG etilen glikol

EGME etilen glikol monometil eter

MGG May-Grünwald Giemsa

PAS metoda Schiffove baze i perjodne kiseline, engl. *periodic acid Schiff*

SB sudansko crnilo, engl. *sudan black B*

Contents

1. UVOD 8
1.1 GRAĐA I FUNKCIJA IMUNOLOŠKOG SUSTAVA KOD RIBA 10
1.1.1. Organi urođene imunosti 10
1.1.2. Imunost kod riba 12
1.2. IZGLED, GRAĐA, ULOGA I RAZVOJ KRVNIH STANICA KOD RIBA 15
1.2.1 ERITROCITI 15
1.2.2. LEUKOCITI 16
2.CILJEVI ISTRAŽIVANJA 22
3. MATERIJALI I METODE 23
3.1. UZORCI 23
3.2. ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA KRVNIH STANICA 23
3.3. BOJANJE MAY-GRÜNWALD GIEMSOM (MGG) 23
3.4. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE KRVNIH STANICA 24
3.5. RAČUNALNA OBRADA PODATAKA 24
3.6 CITOKEMIJSKE ANALIZE 24
3.6.1. ALCIJANSKO MODRILO pH 3,1 24
3.6.2. ALCIJANSKO MODRILO Ph 2,5 25
3.6.3. ALFA-NAFTIL ACETAT ESTERAZA (ANAE) 25
3.6.4. ALFA-NAFTIL BUTIRAT ESTERAZA (ANBE) 26
3.6.5. ALKALNA FOSFATAZA FAST BLUE (APFB) 27
3.6.6. METODA SCHIFFOVE BAZE I PERJODNE KISELINE (PAS) 28
3.6.7. SUDANSKO CRNILO B (SBB) 29
4. REZULTATI 30
4.1. MGG DIFERENCIJALNO BOJANJE I BROJNOST STANICA 30
4.1.1. ERITROCITI 30
4.1.2. TROMBOCITI 31
4.1.3. LIMFOCITI 32
4.1.4. BAZOFILI 33
4.1.5. NEUTROFILI 34
4.1.6. MONOCITI 35
4.2 MJERENJE VELIČINE ERITROCITA I NJIHOVIH JEZGRI 37
4.3. CITOKEMIJSKE ANALIZE KRVNIH STANICA 38
4.3.1. PAS + AB pH 2,5 38

4.3.2. S.B.B 39
4.3.3. ANAE 40
4.3.4. ANBE 41
4.3.5. APFB 42
4.3.6. AB pH 3,1 43
5. DISKUSIJA 44
6. ZAKLJUČAK 49
7. LITERATURA 50

1. UVOD

Ribe su najveća skupina kralješnjaka sa više od 25 000 vrsta koje zauzimaju većinu vodenih staništa. Direktni i indirektni biološki učinci okolišnih onečišćivača su usko vezani za zdravstveno stanje riba koje zauzimaju različite trofičke niše i zato se ribe smatraju idealnim bioindikatorima u monitoringu vodenih ekosustava (Tigano i sur., 2008). Zbog te činjenice, monitoring zdravlja riba daje uvid u stanje vodenih ekosustava (Bols i sur., 2001). Studije na krvnim parametrima se izvode zbog determinacije sistematskih odnosa između vrsta ili zbog korelacije funkcije krvnih stanica u imunosnom odgovoru (Pavlidis i sur., 2007). Hematologija je područje koje se bavi tim pokazateljima, a analiza krvnih stanica dokazano je brz i osjetljiv pokazatelj onečišćenja koji se koristi u biomonitoringu, posebice u kralješnjaka. Hematološki parametri i biokemija krvi kralješnjaka su općeprihvačeni biomarkeri. Biomarkeri su ksenobiotima inducirane varijacije u staničnim ili biokemijskim komponentama ili procesima, strukturama ili funkcijama koje su mjerljive u biološkom sustavu ili uzorku, odnosno biokemijski, fiziološki ili histološki indikatora promijene homeostaze fizioloških sustava u organizmu (Bols i sur., 2001). U hematološke analize spadaju pretrage kojima se mjere različiti parametri poput brojnosti eritrocita, trombocita i leukocita, diferencijalna krvna slika (DKS), koncentracija hemoglobina te vrijednost hematokrita. Diferencijalna krvna slika koristi za određivanje relativnog broja, odnosno udjela svakog tipa krvnih stanica u perifernoj krvi (Dugdale, 2011). Usporedbom tih udjela može se vrlo dobro povezati različite vrste organizama koji pripadaju istim porodicama. Ribe su zbog života u vodi kao mediju izrazito podložne onečišćenju okoliša. Različiti stresori iz okoliša mogu negativno utjecati na organizam, pa tako i na strukturu i brojnost krvnih stanica. Da bi bilo moguće provoditi analize normalnih i oštećenih stanica, treba primarno dobro raspoznavati normalne stanice, njihov oblik, brojnost i ulogu. Vrlo je malo provedenih studija koje uspoređuju vrijednosti hemoglobina i ostalih krvnih konstituenata među vrstama iste porodice (Mavares i Pérez, 1984). Takve studije bi mogle biti zanimljive jer se na takonomskoj razini mogu naći brojni primjeri adaptivne radijacije, te je zbog bliske srodnosti moguće napraviti genetsku usporedbu među vrstama (Mavardes i Perez, 1984). Međutim, informacije o normalnim morfološkim i fiziološkim karakteristikama krvi različitih vrsta riba je malo (Smith i sur., 1952). Stoga je neophodno napraviti temeljne analize hematoloških parametara u ribljih vrsta koji bi bili modelni bioindikatorski organizmi u istraživanju onečišćenja mora. Potreban je razvoj novih tehnika i sofisticiranih testova za detekciju genotoksičnosti u slatkim vodama i moru, koje će biti bitan izvor informacija za biomonitorig okoliša (Tigano i sur., 2008).

Vrsta *Parablennius sanguinolentus* Pallas, 1814 (babica balavica, slingura) spada u rod *Parablennius*, porodicu Blenniidae, red Perciformes te razred Actinopterygii (Slika 1). Vrlo je česta u Mediteranu, te je također raširena i po Crnom moru i istočnom Atlantiku- od Biskajskog zaljeva do Maroka. U Jadranu je jedna od većih babica i može doseći duljinu od 20 cm, iako je najčešće duga oko 12,5 cm. Vrsta je algivorna, no u nedostatku će pojesti i neke školjkaše poput priljepaka, pužiće ili mnogočetinaše. Ovoj skupini nedostaje plivaći mjehur, te je to razlog njihovog zadržavanja na dnu. Bentoska je vrsta, živi uz obalu, u plitkom moru na dubinama od 0,5-10 metara, pretežito na kamenu obraslom algama izloženih suncu. Tijelo joj je visoko, bočno spljošteno i izduženo, naprijed trbušasto te prekriveno slojem sluzi i bez ljuski. Glava je okruglasta a usta su mala sa mnogo oštrih zubića koje služe za struganje algi sa površine. Pipci iznad visoko na glavi postavljenih očnih duplji koji su prisutni kod svih vrsta roda *Parablennius* su kratki i resasti. Boje mogu varirati; od maslinasto zelene do svijetlo žute s tamnim mrljama. Istančano svojstvo na njihovom tijelu je veća tamna mrlja na leđnoj peraji koja je cijelom dužinom približno iste visine. Trbušne peraje su reducirane i nalaze se na grlu. Repna peraja je zaobljena. Sezona parenja traje od svibnja do srpnja. Ženke polažu ikru ispod kamenja ili u prazne ljušture školjaka, te ih nakon toga čuva mužjak. Čak i izvan perioda mrijesta, kod ove vrste partneri ostaju u paru.Vrsta je česta, brojna te nije ugrožena (Jardas, 1996). Često živi u vodama u naseljima, te može živjeti u vrlo opterećenim vodama. Njene biološke karakteristike i činjenica da je česta u obalnom području čine ju potencijalnim bioindikatorskim organizmom (Tigano i sur., 2009). Također, blenidna vrsta *Zoarces viviparous* se kroz nekoliko studija (Jacobsson i sur., 1986, Schladot i sur., 1997, Lyons i sur., 2004) pokazala kao pouzdani bioindikator zagađenja morskih sustava.



Slika 1. *Parablennius sanguinolentus* (fishbase.org , slikao Roberto Pillon)

1.1 GRAĐA I FUNKCIJA IMUNOLOŠKOG SUSTAVA KOD RIBA

1.1.1. Organi urođene imunosti

Ribe su posebno važna skupina iz perspektive urođene imunosti i ekotoksikologije. Primarno zbog nesavršenosti njihove urođene imunosti; vrijeme aktivacije urođene imunosti kod riba je duže nego kod sisavaca (Bols i sur, 2001). Uzorkovanje komponenti urođenog imunološkog sustava je jednostavnije i manje invazivno od ostalih sustava jer su periferna krv i koža potencijalna mjesta uzorkovanja (Bols i sur., 2001). Nadalje, učinci na imunološki sustav riba mogu poslužiti kao upozorenje na potencijalne učinke na ljudsko zdravlje i zdravlje ekosustava jer su ekotoksikanti najčešće prvo otpušteni u vodene sustave, te kroz njih dolaze do ljudi i ostalih kopnenih životinja (Bols i sur, 2001). Na kraju, razumijevanje učinka toksikanata na imunosni sustav riba je i od ekonomskog značaja. Za ribarstvo je bitno zdravlje ciljanih vrsta, no i zdravlje ostalih riba koje se nalaze u hranidbenoj mreži uzgajanih vrsta, ili vrsta koje se okupljaju oko ribogojilišta i uklanjaju višak hrane, i otpad koji tamo nastaje (Bols i sur, 2001).

Ribe nemaju limfne čvorove niti koštanu srž te umjesto tih velikih limfoidnih organa njihovu funkciju vrše timus, bubrezi, slezena i limfatička tkiva vezana za crijeva (Zapata, 1996).

Bubrezi su retinoperitonealni organi koji se spušta dorzalno u tjelesnu šupljinu. Sastoje se od dva različita, ali i strukturno slična dijela: anteriornog (cefalični bubreg) koji sadrži pretežito hematopoetsko tkivo (nema tipične bubrežne aktivnosti) te posteriornog koji većinom sadrži bubrežno tkivo. Obje regije pokazuju hematopoetski kapacitet ali je on veći u cefaličnom bubregu čija je renalna funkcija nestala (Zapata, 1979). Iako se čini da se neke nakupine limfocita nalaze u određenim dijelovima bubrega kod teleosta, generalno, limfopoetične stanice se nalaze raspoređene po cijeloj stromi i sinusoidalnim krvnim žilama, s tim da i te stanice i žile imaju fagocitni kapacitet (Zapata, 1979). Posteriorni dio također sadrži i limfohematopoetsko tkivo. Sinusoidalne stanice, među koje spadaju i endotelne stanice, formiraju barijeru između hematopoetskog tkiva i same krvi koja dolazi iz portalne vene. Tamo se mogu naći makrofazi, pogotovo melano-makrofazi, limfociti te plazma stanice. Anteriorni dio bubrega također sadrži granulocite i stanice urođene citotoksičnosti, ekvivalent stanicama ubojicama kod sisavaca. Kapacitet bubrega da se u njima zadržavaju i diferenciraju prekursori krvnih stanica, podržava teoriju bubrega kao ekvivalenta koštane moždine kod viših kralješnjaka (Zapata, 1979).

Slezena je organ tamno crvene do crne boje locirana ventralno i kaudalno od želuca. Crvena pulpa, koja čini većinu organa, građena je od mreže retikularnih stanica koje podržavaju sinusoide ispunjenu krvlju, koja sadrži različite populacije makrofaga i limfocita. Bijela pulpa je često lošije razvijena ali se može podijeliti na dva dijela: centar za melano-makrofage i elipsoide. Centri melano-makrofaga su agregati gusto pakiranih makrofaga koji sadrže heterogene inkluzije pigmenata, od kojih je najčešći melanin, zatim hemosiderin i lipofuscin (Agius, 1980). Centri za melanomakrofage imaju veliku mogućnost dugog zadržavanja antigena, često u obliku imunokompleksa, zbog čega ih se uspoređuje sa germinativnim centrima kod viših kralješnjaka. U elipsoidama kod riba je zapaženo zadržavanje imunokompleksa koje napadaju bogate populacije makrofaga.

Teleostima nedostaju limfoidna tkiva poput Peyerovih ploča kod sisavaca, no kod vrsta poput šarana na mjestu lamine propie i epitela stražnjeg crijeva postoje nakupine leukocita. Limfatička tkiva su mjesta gdje se antigeni iz crijeva prenose preko mukoznog tkiva, te se tamo aktivnošću makrofaga uništavaju. Takav tip odgovora spada pod urođenu imunost riba i opisana je u idućem poglavlju.

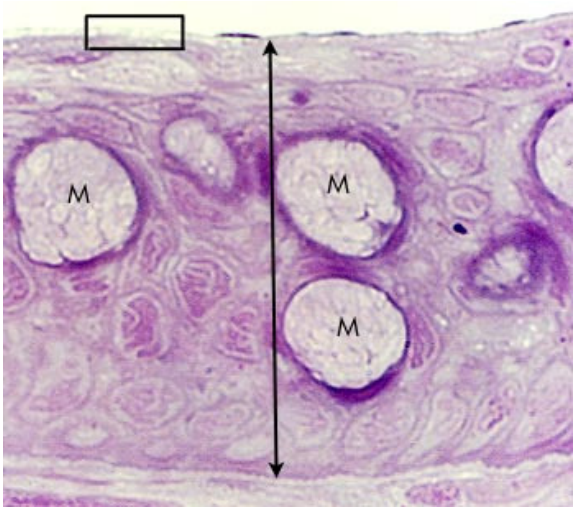
Ribe pokazuju veliku raznolikost hematoloških profila. Kod relativno bliskih vrsta zapažene su razlike u sastavu krvnih stanica. Krvne stanice riba su manje diferencirane nego one kod sisavaca, te ih je zbog toga teže razlikovati među vrstama. Kako ribe nemaju koštanu srž i limfne čvorove morale su razviti jedinstvene hemtopoetske organe. Umjesto glavnih limfoidnih organa, teleosti koriste timus, bubreg, slezenu i limfoidna tkiva vezana za probavni sustav (Zapata, 1979). Čak se i u embrionalnoj hematopoezi razlikuju od ostalih kralješnjaka. U većini odraslih koštunjača prozonefros (anteriorni bubreg) glavni je hematopoetski organ. Kod riba nalazimo ove krvne stanice: eritrocite, trombocite, limfocite, monocite neutrofile/heterofile, bazofile i eozinofile, iako neki autori tvrde da kod nekih vrsta eozinofili ili bazofili uopće ne postoje (Pavlidis i sur, 2007).

1.1.2. Imunost kod riba

Urođena tj. nespecifična imunost je skup obrambenih mehanizama koji brane organizam od infekcije, neovisno o prijašnjoj izloženosti pojedinim mikroorganizmima (Bols i sur., 2001). Ona čini obranu od brojnih bakterija, gljivica, virusa i drugih parazitskih ili potencijalno parazitskih oblika života. Predstavlja brzu, prvu i glavnu crtu lokalne i sistemske obrane. Lokalna se obrana obavlja pretežito na mjestu ulaska antigena, tj. na površini organizma (koži i sluznicama). Pritom nije riječ samo o mehaničkoj probojnosti kože za antigene nego i o neprestanom uklanjanju istih fizičkim i kemijskim antimikrobnim djelovanjem. Sistemska se nespecifična imunost ponajprije obavlja fagocitozom i različitim nespecifičnim tvarima u izvanstaničnoj tekućini. Tek ako antigen prodre kroz nespecifičnu zaštitu, javlja se specifična imunost. Specifična imunost se evolucijski javlja tek kod kralješnjaka. Specifična (stečena) imunost ne djeluje neovisno o nespecifičnoj imunosti, već se naprotiv one nadopunjuju i djeluju zajedno, te tim djelovanjem postižu puno djelotvorniju ukupnu obranu. Nespecifična se imunost dijeli na fizičke zapreke, humoralnu i staničnu imunost.

Prvotne barijere patogenima predstavljaju epitelne površine, koža i sluznice. Osnovni mehanizam fizičke otpornosti na patogene temelji se na kontinuitetu kože i sluznice koje prekrivaju površine tijela. Na njihovu se površinu cijelo vrijeme izlučuje sluz iz mukoznih stanica (Slika 2). Takva barijera je i fizička i kemijska, i ne dozvoljava vezanje niti prodor gljivica, bakterija, virusa i različitih parazita u organizam. Sluz je savršeno riješenje za obranu organizma koji se nalazi u vodenom sustavu, gdje patogeni imaju veliku mogućnost širenja.

Iako ribe nemaju razvijeni „centar“ za akumuliranje limfoidnih stanica, one se zajedno s makrofazima mogu naći u koži i u stijenkama crijeva. Imunološki sustav u crijevima riba je difuzan; kod svih vrsta riba crijevo se može podijeliti na dva dijela, stražnje i prednje. Stražnje crijevo (20-25% ukupnog crijeva) sadrži epitelne stanice sa puno višim endocitotičkim kapacitetom, te su vakuole puno veće. Pretpostavlja se da je taj dio crijeva adaptiran za apsorpciju probavljenih molekula (Ellis, 2001). Enterocite u tom dijelu mogu prenositi antigene iz lumena crijeva do limfoidnih stanica i makrofaga u mukoznom tkivu. Proučavajući te dijelove crijeva kod šarana zamijećeno je da su intraepitelni makrofazi puno veći u drugom dijelu crijeva nego u prvom (Rombout i sur., 1989). Sluz riba sama po sebi sadrži mnoge tvari koje služe u obrani protiv patogena. Neke od njih su lektini, pentraksini, lizozimi, proteini komplementa, antibakterijski peptidi i IgM.



Slika 2. Presjek kože ribe, M- stanice koje stvaraju sluz, slika preuzeta Horne, M.M. and Sims, D.E. Preliminary ultra structural studies of the surface mucus of Atlantic salmon. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 98-2: 85, 1998.

Humoralna imunost je dio imunološkog sustava koji se bazira na makromolekulama koje se nalaze u ekstracelularnoj tekućini, poput antitijela, komplemenata, proteina i određenih antimikrobnih peptida. Transferin je spoj koji djeluje kao inhibitor rasta. Keliranjem slobodnog željeza onemogućuje razvoj bakterija. Tijekom akutne faze upale, ovaj protein se dovodi na mjesto upale da bi uklonio slobodno željezo sa ozljeđenog mjesta (Langston i sur., 1998). Njegova uloga kod riba je i aktivacija makrofaga. Interferon je također inhibitor rasta koji induciranjem ekspresije Mx i ostalih antiviralnih proteina, sudjeluje u obrani organizma od virusnih oboljenja. Inhibitore proteaza nalazimo u serumu riba i ostalim tjelesnim tekućinama. Primarna uloga ovih tvari je održavanje homeostaze u serumu riba, no također sudjeluju u akutnoj fazi upale te u borbi protiv patogena koji izlučuju proteolitičke enzime (Hjelmeland, 1983). Različiti litički enzimi, funkcionirali oni pojedinačno ili u kaskadama imaju veliku važnost u obrani od patogena, pogotovo od bakterija. Tu spadaju hidrolaze poput lizozima i hitinaze, katepsina, litičkog puta sustava komplementa i ostali bakteriolitički/hematolitički enzimi koje nalazimo u tjelesnim tekućinama i tkivima kod riba. Lizozim (muramidaza) je kationski mukolitički enzim male molekularne mase koji uspiješno razlaže mukopeptide u ovojnici bakterija. Djelovanje lizozima je baktericidno, hidrolizirajući β-[1,4] glikozidne veze peptidoglikana u staničnim stjenkama bakterija dolazi do lize (Grinde, 1989). Iako se prvotno povezivao sa Gram pozitivnim bakterijama, njegov litički učinak djeluje i na Gram negativne bakterije.Također djeluje kao opsonin i aktivira sustav komplementa i fagocite. Nalazimo ga u mukozi,

limfoidnim tkivima, plazmi i ostalim tjelesnim tekućinama kod većine vrsta riba. Bakalar i još pojedine vrste morskih riba pokazaju vrlo malo ili nikakvu aktivnost lizozima u tkivima i tjelesnim tekućinama. Iste te vrste istovremeno pokazuju visoku aktivnost hitinaze u plazmi i pojedinim organima. Hitinaza je hidrolaza za koju se smatra da je povezana sa obranom od bakterija i gljivica, no to još uvijek nije dokazano. Aglutinini i precipitini iz seruma ili mukoze su C-tip lektini i pentraksini. C-tip lektini pokazuju specifično vezanje za različite ugljikohidrate poput manoze, N-acetil glukozamina ili fukoze u prisustvu Ca iona. Interakcija između karbohidrat-vežućih proteina i karbohidrata dovodi do opsonizacije, fagocitoze i aktivacije sustava komplementa. Pentraksini (C-reaktivni proteini, CRP i serum amiloidni protein, SAP) su lektini, koji se nalaze u tjelesnim tekućinama kod beskralješnjaka i kralješnjaka. Povezani su sa akutnom fazom pri ozljedi ili infekciji u kojoj svoju ulogu u urođenom imunološkom odgovoru obavljaju kroz vezanje lektinskog tipa, aktivacijom puteva kompleksa i ulogom u prepoznavanju i uklanjanju apoptotičnih stanica (Steel, 1994). Po definiciji se CRP veže za fosforilkolinski ostatak bakterijskih staničnih stijenki u prisustvu Ca iona, dok SAP pokazuje visoki afinitet za fosforil-etanolamin i također je poznat da veže LPS od Gram negativnih bakterija. Neke vrste riba imaju ili CRP pentraksin (poput bakalara i kanalskog soma) ili SAP pentraksin (poput lososa, babice i iverka), dok neke (poput pastrve) imaju oba tipa poput viših kralješnjaka. Razina pentraksina kod riba je viša nego kod sisavaca (Steel, 1994).

Literatura koja opisuje granulocite riba je često zbunjujuća i kontradiktorna, posebice po pitanju nomenklature subpopulacija, koja se najčešće bazira na morfološkim opisima stanica sisavaca (Ainsworth, 1992). Stanična imunost riba se bazira na radu granulocita koji su opisani u poglavlju 1.2.

Ribe također imaju i nespecifične citotoksične stanice (NCS) koje su funkcionalno slične stanicama ubojicama kod sisavaca (NK stanice). One ubijaju određene tipove ksenogenih stanica, uključujući i velik broj patogenih protozoa, bez potrebe za prethodnim izlaganjem. Za razliku od NK stanica kod sisavaca, riblje NCS su mali agranulirani limfociti i pokazuju visoki kapacitet za recikliranje litičkih funkcija. Na površini NCS-a otkriven je marker mAb (5C6) za koji se smatra da ima važnu ulogu kao antigen u prepoznavanju ciljnih stanica, te potiče aktivaciju i formaciju stanica (Evans i Jaso-Friedmann, 1992).

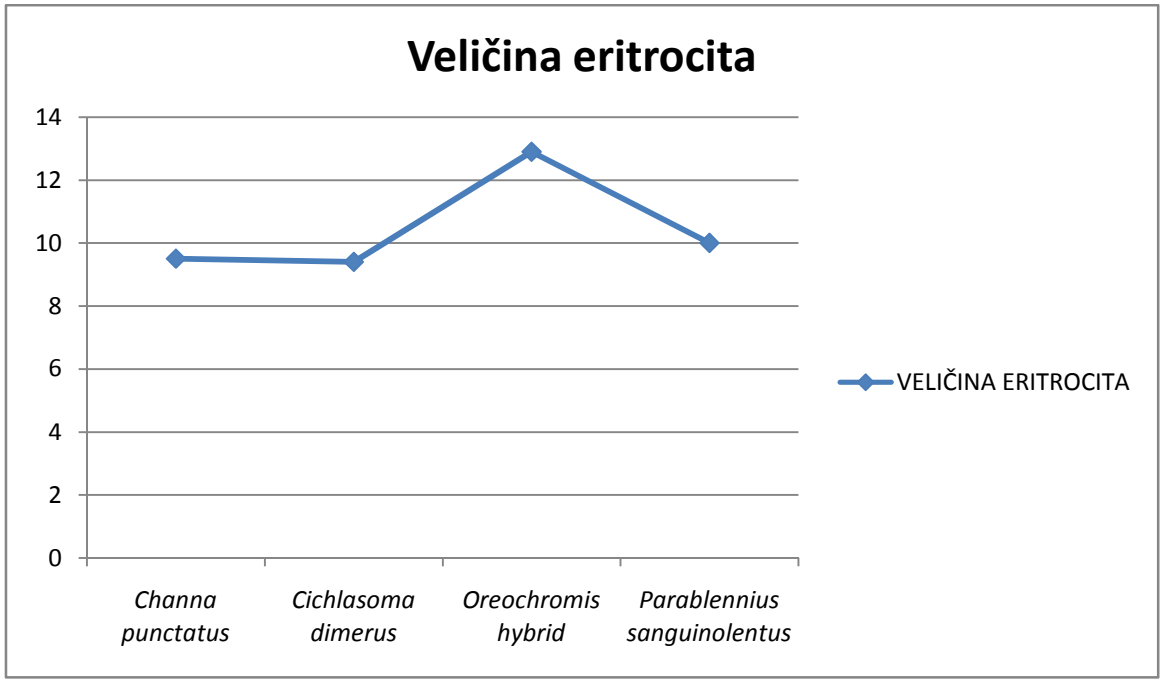
1.2. IZGLED, GRAĐA, ULOGA I RAZVOJ KRVNIH STANICA KOD RIBA

Tablica 1. Referentne vrijednosti za pojedine tipove stanica, broj eritrocita (RBC) i leukocita (WBC). Preuzeto iz Vázquez i Guerrero (2007).

	Referentni interval
RBC ($x10^6 \mu L^{-1}$)	1,68 – 4,27
WBC($x10^3 \mu L^{-1}$)	6,64 – 18,59
Limfociti ($x10^3 \mu L^{-1}$)	2,55 – 7,14
Monociti ($x10^3 \mu L^{-1}$)	1,19 – 3,34
Neutrofili ($x10^3 \mu L^{-1}$)	1,87 – 5,24
Eozinofili ($x10^3 \mu L^{-1}$)	1,02 – 2,85
Trombociti ($x10^3 \mu L^{-1}$)	17,2 – 48,15

1.2.1 ERITROCITI

Eritrociti su najbrojnije stanice, i čine najveći udio krvnih stanica u krvi. Glavna zadaća eritrocita kod riba je prijenos hemoglobina koji tkivima donosi kisik iz škrga. Normalni su eritrociti bikonkavne pločice . Oblik eritrocita se može mijenjati za njihova prolaska kroz kapilare jer sami eritrocit ima takvu građu koja podsjeća na vreću. Budući da je membrana eritrocita normalno prevelika u odnosu na sadržaj stanice, promjene staničnog oblika neće rastezati membranu. Zbog toga neće doći niti do pucanja stanice. Membrana eritrocita ima tipični asimetrični fosfolipidni dvosloj u kojem se nalaze glikolipidi, kolesterol, proteini i glikokonjugati (Guyton i Hall, 2006). Elipsoidnog su oblika, te se jezgra, inače vidljiva i u živim stanicama, MGG-om boja tamno ljubičasto. Jezgra je više-manje cilindričnog oblika i sadrži kondenzirani kromatin. Citoplazma je svjetlije ljubičasto obojana. Stanica nema nikakve inkluzije ili vakuole (Mahajan i Dheer, 1979). Zreli eritrociti imaju svjetlo ljubičastu citoplazmu dok se citoplazma nezrelih, retikulocita boja svjetlije. Retikulociti su većih dimenzija od zrelih eritrocita, dok su stari eritrociti najveći (Pavlidis i sur., 2007). Malassez (1872) je zamijetio da kod teleosta postoji korelacija između veličine i brojnosti eritrocita; što su stanice manje to je broj veći i obrnuto. Pelagičke ribe koje brzo plivaju imaju veći broj eritrocita i veću količinu hemoglobina od sedentarnih vrsta riba.



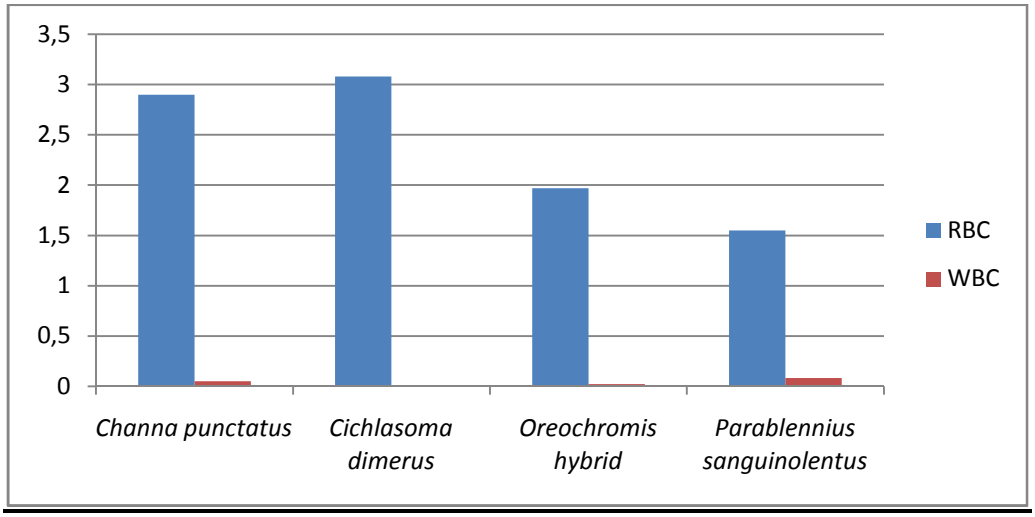
Slika 3. Grafički prikaz odnosa veličina eritrocita vrsta *Channa punctatus* (Mahajan i Dheer, 1979), *Cichlasoma dimerus* (Vázquez i Guerrero, 2007), *Oreochromis hybrid* (Hrubec i sur., 2000) i *Parablennius sanguinolentus.* Sve su vrijednosti izražene u µm.

1.2.2. LEUKOCITI

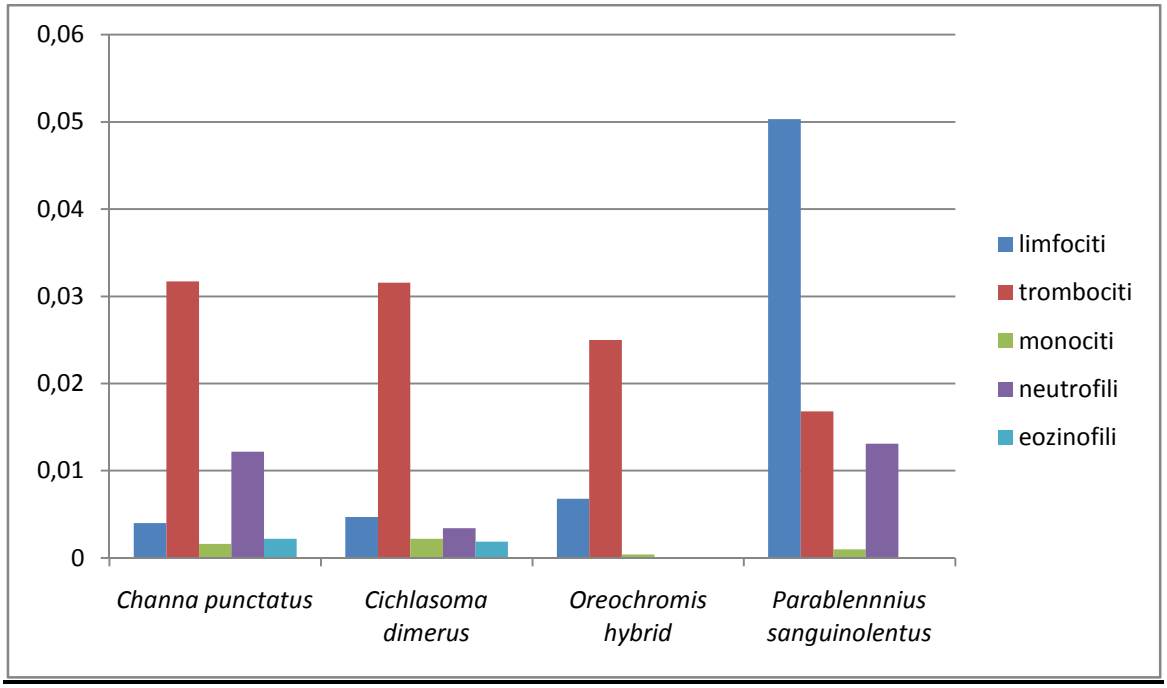
Leukociti su pokretne jedinice zaštitnog sustava u tijelu. Ribe kao i sisavci posjeduju leukocite koji se mogu klasificirati kao limfociti, monociti/makrofazi i granulociti, na temelju morfologije, ultrastrukture i citokemijskih analiza.

Glavni razlog nazočnosti leukocita u krvi je njihov prijenos iz limfatičnog tkiva u tjelesna područja kojima ustrebaju. Kad se otpuste iz koštane srži granulociti žive u krvi normalno 4 do 8 sati, te još 4 do 5 dana u tkivima. Pri teškoj tkivnoj infekciji ukupni se životni vijek često skraćuje na samo nekoliko sati. Granulociti brzo napreduju prema zaraženom području, obave svoju zadaću, no pritom i sami propadaju. Monociti se također kratko zadržavaju u krvi, 10 do 20 sati, prije nego što kroz kapilarnu membranu prođu u tkiva. Kad se nađu u tkivima, bubrenjem se znatno povećavaju i postaju tkivni makrofagi; u tom obliku mogu živjeti mjesecima, pa čak i godinama, sve dok ne propadnu obavljajući fagocitnu funkciju.

Identifikacija ribljih granulocita obavlja se preko sličnosti u morfologiji, ultrastrukturi i citokemijskim bojanjima sa granulocitima sisavaca. Kao i kod sisavaca definirane su 3 vrste granulocita i kod riba: eozinofili, neutrofili i bazofili, iako nisu uvijek sva tri tipa nađena kod pojedinih vrsta riba (Hine, 1992). Varijacije u morfologiji i citokemijskim bojanjima rade veliki problem u klasifikaciji tipova granulocita kod nekih vrsta riba. Riblji granulociti su pozitivni na fagocitozu i peroksidazu, kod nekih vrsta su čak i Sudan black B pozitivne. Funkcija neutrofila u organizmu su fagocitoza, kemotaksija i baktericidno djelovanje putem respiratornog praska. Zbog manjka tehnika za izolaciju stanica i staničnih markera, malo se zna o funkciji bazofila i eozinofila, ali se smatra da imaju funkciju u obrani od parazita.



Slika 4. Grafički prikaz odnosa ukupnog broja eritrocita (RBC) i leukocita (WBC) kod vrsta *Channa punctatus* (Mahajan i Dheer, 1979), *Cichlasoma dimerus* (Vázquez i Guerrero, 2007), *Oreochromis hybrid* (Hrubec i sur., 2000) i *Parablennius sanguinolentus*. Sve su vrijednosti izražene $x10^6 \mu L^{-1}$.



Slika 5. Grafički prikaz broja leukocita kod vrsta *Channa punctatus* (Mahajan i Dheer, 1979), *Cichlasoma dimerus* (Vázquez i Guerrero, 2007), *Oreochromis hybrid* (Hrubec i sur., 2000) i *Parablennius sanguinolentus*. Sve su vrijednosti izražene $x10^6 \mu L^{-1}$

1.2.2.1. AGRANULOCITI

1.2.2.1.1. TROMBOCITI

Normalni trombociti su ovalni sa elipsoidnom jezgrom. Citoplazme koja okružuje jezgru ima jako malo i slabo se boji. Oblik stanica većinom ovisi o obliku jezgre koja se boji tamno ljubičasto. No, u većini uzoraka trombociti su nepravilnog oblika zbog svoje uloge u zgrušavanju (Mahajan i Dheer, 1979). Kod različitih vrsta možemo naći i do četiri različita oblika trombocita: ovalne, okrugle, vretenaste i duguljaste. Također, mogu biti prisutne kao pojedine stanice i kao nakupine stanica (Pavlidis i sur., 2007).

1.2.2.1.2. LIMFOCITI

Limfociti su male, okrugle stanice. Ove bazofilne stanice imaju veliku i sferično pozicioniranu jezgru koja zauzima većinu stanice, te je okružena tankim prstenom citoplazme, koja se boja plavo nakon bojanja Giemsom. Jezgra je bogata heterokromatinom i boja se ljubičasto Giemsom (Vázquez i Guerrero, 2007).

Veliki limfociti variraju oblikom od okruglih do gotovo ameboidnih. Citoplazma se boja svjetlo, bazofilno, dok je jezgra obojana tamno ljubičasto, no svjetlije od jezgara trombocita i eritrocita.

Mali limfociti su vrlo slični okruglim trombocitima no njihova jezgra je puno veća, te se citoplazma jedva vidi u obliku tankog svjetlo plavog prstena oko jezgre. Jezgra je tamno ljubičaste boje kao kod trombocita.

Najvažniji kriteriji po kojima se mogu razlikovati okrugli trombociti od malih limfocita su: i) citoplazma ima manji volumen te se boja svjetlo plavo bazofilnom bojom, ii) jezgra limfocita varira oblikom, iii) malih limfocita je svega 2-5% ukupnog broja leukocita u perifernoj krvi, dok trombocita može biti i do 50%, te iv) mali limfociti su stabilne stanice i ne mijenjaju morfologiju i uzorak distribucije kada se pripravljaju uzorci (Mahajan i Dheer, 1979).

1.2.2.1.3. MONOCITI

Monociti su okrugle ili ovalne stanice koje karakterizira velika, acentrična, bubrežasta ili segmentirana jezgra. Krvni monociti su nezrele stanice koje imaju veoma malu moć uništavanja zaraznih agenasa. Makrofazi su velike agranulirane fagocitozne stanice koje se nalaze po svim tkivima u organizmu, te sazrijevaju iz monocita koji cirkuliraju krvlju. Monociti se razlikuju od ostalih agranulocita po tome što su puno veći. Citoplazma se slabo boja čak i nakon bojanja Giemsom ili peroksidazom, te je agranulirana. Jezgra se boja ljubičasto, svjetlije nego jezgre trombocita i eritrocita (Mahajdan i Dheer, 1979). Ove stanice su vrlo slične monocitima/makrofazima kod sisavaca utoliko što su pozitivne na nespecifične esteraze, kiselu fosfatazu, periodičnu kiselinu- Schiffov reagens i peroksidazu. Morfološki su slične po tome što i kod riba postoje pigmentni makrofazi (melano-makrofazi) koji se nalaze u agregatima u mnogim limfoidnim tkivima (Wolke, 1992). Pokusima su dokazane neke od funkcija ovih stanica poput fagocitoze, kemotaksije, baktericidnog djelovanja putem respiratornog praska, produkcija IL-1 te procesiranje i prezentacija antigena. Mnoge od tih studija pokazuju da ove stanice sadrže lektin, komplement i Fc receptore kao i antigene MHC-II skupine. U citoplazmi makrofaga se stvara velik broj lizosoma. Ovaj tip stanica nije brojan, te u nekim radovima autori navode da nisu našli niti jednu stanicu tog tipa, kao što je bio slučaj sa vrstom *Sarpa salpa* (Pavlidis i sur., 2007).

FAGOCITOZA MAKROFAGIMA: Nakon što ih imunološki sustav aktivira, makrofagi steknu mnogo veću moć fagocitoze od neutrofila, pa često mogu fagocitirati čak i 100 bakterija. Oni mogu proždirati i mnogo veće čestice, čak i čitave eritrocite ili parazite malarije, dok neutrofili ne mogu fagocitirati čestice koje su mnogo veće od bakterije. Osim

toga, nakon što su probavili česticu, makrofazi mogu izbaciti ostatne proizvode i često preživjeti još mnogo mjeseci (Guyton i Hall, 2006).

1.2.2.2. GRANULOCITI

Primjerice, u šarana, *Cyprinus carpio,* sve tri vrste granulocita se mogu naći u krvi. Među njima, heterofili i bazofili kojih je najmanje i predstavljaju 1% od ukupnog broja leukocita. Imaju bubrežasti oblik jezgre i dvije vrste citoplazmatskih granula: male, peroksidaza negativne granule, i velike, peroksidaza pozitivne granule. Acidofilni granulociti su prilično brojni i predstavljaju 8% od ukupnog broja leukocita. Acidofilne granula su peroksidaza pozitivne i sadrže okrugle ili nepravilne granule heterogenog sadržaja. Nasuprot tome, bazofilni granulociti su peroksidaza negativni i sadrže okrugle granule. Kod salmonida, heterofilni granulociti prevladavaju, dok su acidofili i bazofili ili odsutni ili prisutni u vrlo malim brojevima. Kod iverka zlatopjega, *Pleuronectes platessa* i jegulje, samo je jedna vrsta granulocita, heterofil, bila opažena. Kod orade *Sparus auratus*, aktivnost kisele fosfataze se ocjenjuje/ koristi kao citokemijski marker kojim se razlikuju acidofili od heterofila (Zapata i sur,1996).

1.2.2.2.1.NEUTROFILI

Neutrofile se u literaturi često naziva i hetereofilima. To su velike i bazofilne stanice, često nepravilnog oblika. Neutrofili su zrele stanice koje mogu napasti i uništiti bakterije i viruse čak i u krvi koja cirkulira. Generalno su okrugli i njihova citoplazma sadrži fine granule. Oblik jezgre varira, od sferičnog do bubrežastog oblika. Jezgra je često segmentirana, te može biti podijeljenja u 2 ili 3 dijela, a često ima i oblik ljudskog bubrega (Vázquez i Guerrero, 2007). Boja se ljubičasto kao i jezgra eritrocita. Neutrofili su veće stanice, malo manje od monocita, no brojem su najčešći granulociti (Mahajdan i Dheer, 1979). Neutrofili su najvažniji leukociti jer pokazuju visoku osjetljivost na promjene u okolišu. Njihova karakterizacija i identifikacija je od velike važnosti za procjenu promjena u fiziološkom stanju riba (Mahajan i Dheer 1979a).

FAGOCITOZA NEUTROFILIMA: neutrofili koji uđu u tkivo već su zrele stanice koje mogu odmah početi fagocitirati. Kad se približi čestici koju mora fagocitirati, neutrofil se najprije pričvrsti uz nju, a zatim u svim smjerovima oko čestice pušta preudopodije koji se na suprotnoj strani čestice sastanu i spoje. Tako nastane zatvorena šupljina u kojoj se nalazi fagocitirana čestica. Šupljina se zatim izvrne u unutrašnjost citoplazmatskog prostora i odvoji se od vanjskog dijela stanične membrane te nastane fagocitni mjehurić (nazvan i fagosom)

koji slobodno lebdi unutar citoplazme. Neutrofil obično može fagocitirati 5-20 bakterija prije nego se inaktivira i propadne (Guyton i Hall, 2006).

1.2.2.2.2.. EOZINOFILI

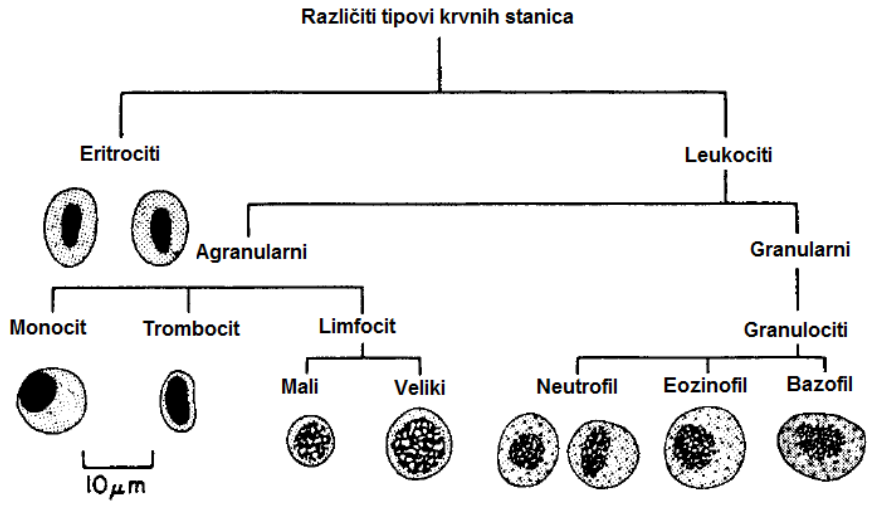
Eozinofili su tipično ameboidne stanice. Jezgra je nepravilnog oblika, nekad segmentirana, dok je citoplazma acidofilna i boja se ružičasto, te se acidofilne granule u citoplazmi jako dobro vide. Jezgra se boji ljubičasto te se u njoj i citoplazmi vide vakuole što nije slučaj kod niti jednog drugog granulocita (Mahajadan i Dheer, 1979). Eozinofili teleosta imaju velike okrugle granule, i citokemijske i funkcionalne studije indiciraju da kod nekih skupina, posebno ciprinida, ove stanice predstavljaju nediferenciranu eozinofil-bazofilnu liniju. Uloga u upali, citokemija enzima, funkcionalni i evolucijski razvoj još nisu do kraja razjašnjeni (Hine, 1992). Kod velikog broja vrsta nikad nisu zabilježeni eozinofili pa tako i Pavlidis (2007) u svom radu navodi da kod vrste *Dicentrarchus labrax* nisu našli taj tip stanica.

1.2.2.2.3. BAZOFILI

Bazofili u cirkulaciji su smješteni neposredno uz vanjsku stranu mnogih kapilara u tijelu. Ova vrsta stanica otpušta heparin, tvar koja može spriječiti zgrušavanje krvi i ubrzati uklanjanje čestica masti iz krvi. Bazofili imaju važnu ulogu u nekim oblicima alergijskih reakcija. Naime, vrsta protutijela koja uzrokuje alergijske reakcije, tj. protutijela IgE, pokazuju osobitu sklonost pričvršćivanju uz bazofile. Kad specifični antigen zatim reagira s protutijelom, bazofili pucaju, pri čemu se oslobađaju velike količine histamina, bradikinina, serotonina, heparine, anafilaksijske tvari spora djelovanja i brojnih lizosomnih enzima. Te tvari uzrokuju lokalne vaskularne i tkivne reakcije, koje su uzrok alergijskim manifestacijama.

Varijacije u broju cirkulirajućih bazofila su povezane sa hipersenzibilitetom, alergijskim reakcijama, endokrinopatijama i hematološkim promjenama (Gilbert i Omstein, 1975).

Metode za specifično bojanje bazofila u krvi se baziraju na mogućnosti vezanja kationskih boja na sulfatnu grupu heparina i na nukleinsku kiselinu. Jer su granule bazofila jako topljive u vodi, jako je bitno koja se boja koristi.



Slika 6. Dijagram različitih tipova stanica koje nalazimo u perifernoj krvi vrste *P. sanguinolentus* (preuzeto i prilagođeno iz Mahajan i Dheer, 1979)

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

S obzirom da je malo objavljenih radova o referentnoj hematologiji vrste *P. sanguinolentus*, odlučili smo se u potpunosti opisati normalnu krvnu sliku i diferencijalnu citokemiju krvnih stanica u ove vrste. Izmjerena je brojnost eritrocita, trombocita limfocita, neutrofila, bazofila i monocita, te su izraženi njihovi udjeli. Citokemijskom analizom su dokazani pojedini tipovi stanica, ovisno o bojanju koje smo koristili. Navedene postupke koristili smo kako bismo:

- ustanovili ukupni broj krvnih stanica, udjele eritrocita, trombocita, limfocita, bazofila, neutrofila i monocita u vrste *P. sanguinolentus*
- utvrdili morfološke karakteristike svih krvnih stanica u vrste *P. sanguinolentus*
- utvrdili dimenzije eritrocita u vrste *P. sanguinolentus*
- diferencijalnim citokemijskim tehnikama utvrdili boje li se pojedini tipovi stanica, te postoje li razlike u biokemijskim osobinama pojedinih stanica
- utvrdili mogu li se temeljem diferencijalnih bojanja razlikovati pojedini podtipovi leukocita
- utvrdili referentne podatke o karakteristikama krvnih stanica

3. MATERIJALI I METODE

3.1. UZORCI

U ovom radu analizirani su krvni razmazi svježe krvi ribe babice balavice (*Parablennius sanguinolentus*). Ribe su se sakupljale lovom na udicu u luci u mjestu Baška Voda (Hrvatska). Determinirane su do vrste uz pomoć ključa „Ihtiofauna Jadrana“ Jardas 1996. Ulovljene su 53 jedinke. Odmah nakon ulova uzimana im je krv špricama (igle promjera 0.14mm) iz repne vene. Kroz šprice je bio provučen heparin kako bi se spriječilo grušanje krvi. Za bojanje May- Grünwald Giemsom (MGG) i citokemijske analize odmah su napravljeni krvni razmazi i to po 10 stakalaca po jedinki. Ostavljeni su preko noći da se suše.

Obojani razmazi se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51) i fotografiraju pomoću integrirane Olympusove kamere DP70 i pripadajućeg programa DP Controller. Koristi se povećanje 100x sa imerzijom.

3.2. ODREĐIVANJE UKUPNOG BROJA KRVNIH STANICA

Za određivanje ukupnog broja krvnih stanica krv se razrijedila Natt-Herrickovom otopinom u eritrocitnom melanžeru (101, koncentracija 1:200) i malo promiješala. Nakon toga kapnula se jedna kap ispod pokrovnice na hemocitometru (Bürker-Türk komoricu) te se na svjetlosnom mikroskopu pri povećanju 600x prebrojao u 16 polja ukupan broj svih stanica, te ukupan broj eritrocita u istim tim poljima. Iz toga su dobivene vrijednosti: ukupna brojnost stanica u litri krvi, te udio eritrocita u krvi.

Ukupnu brojnost stanica i broj eritrocita u litri krvi smo izračunali po formuli;

$$\Sigma = (s : k) * V * c * 10^3$$

Gdje je: Σ ukupan broj stanica po litri; s broj stanica u 16 polja; k broj polja; V volumen polja; c razrjeđenje.

3.3. BOJANJE MAY-GRÜNWALD GIEMSOM (MGG)

Osušeni krvni razmazi drže se u otopini May-Grünwald (J.T. Baker, Nizozemska) 7 minuta, nakon čega se isperu destiliranom vodom (dH_2O) i drže u otopini Giemse 11 minuta. Otopina Giemse je napravljena od dva dijela dH_2O i jednog dijela Giemse (J.T. Baker, Nizozemska). Razmazi se dobro isperu u dH_2O da bi se riješili preostale boje koja nije obojala stanice, a smeta pri pregledavanju uzorka.

3.4. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE KRVNIH STANICA

Morfološke karakteristike smo pregledavali mikroskopirajući preparate obojane tehnikom MGG. Zbog velikih razlika u izgledu kod većine stanica ta se metoda pokazala najzahvalnijom. Slike su dobivene pomoću Olympusovog mikroskopa BX51 sa Olympusovom kamerom DP70 te pripadajućeg programa DP Controller. Koristilo se povećanje 100x s imerzijom.

3.5. RAČUNALNA OBRADA PODATAKA

Za izračunavanje udjela pojedinih krvnih stanica iz MGG razmaza ručno su se brojali eritrociti, trombociti, bazofili, eozinofili, limfociti, monociti i neutrofili na 1000 stanica. Koristili smo uređaj za brojanje različitih tipova stanica Differ.

3.6 CITOKEMIJSKE ANALIZE

Citokemijska bojanja su se vršila na razmazima krvi (najmanje triplikati). Od boja su se koristile: Alcijansko modrilo (AB) (različite pH vrijednosti), alfa-naftil acetat esteraza (ANAE), alfa-naftil butirat esteraza (ANBE), alkalna fosfataza (ALP), metoda Schiffove baze i perjodne kiseline (PAS), kombinacija PAS i AB i Sudansko crnilo (SBB). Sve boje su pripremljene i korištene po protokolima. Umjesto uranjanja u posude za bojanje histoloških preparata (engl. *Coplin jar*), razmazi su se nakapavali citokemijskim bojama. Razlog tome je bio mali broj stakalaca koji se bojao, a za svako stakalce je bilo potrebno oko 2,5 ml boje. Otopine koje su trebale biti određene pH vrijednosti pripremale su se pomoću magnetske miješalice (Yellow line) i pH metra (Schott Instrument).

3.6.1. ALCIJANSKO MODRILO pH 3,1

Boja alcijansko modrilo pripremala se po protokolu (Lowe 1998a).

Za pripremu otopine AB pH 3,1, 25ml potrebno je:

- 250mg alciana blue (AppliChem, Njemačka)
- 0,125ml 0,5% ledene octene kiseline (Kemika, Hrvatska)
- dH_2O.

AB se otopi u octenoj kiselini, te se doda dH_2O do 25ml. Po potrebi se podesi do potrebnog pH.

Na suhe razmaze se nakapa dH_2O i drži se par minuta da bi se polisaharidi u stanici napuhali. Voda se otrese te se nakapa boja na razmaze. Da bismo dobili što bolji rezultat, uzorci su se

bojali tri, pet,sedam i osam minuta. Sedam i osam minuta se pokazalo kao najbolje vrijeme za ovo bojanje. Uzorci se isperu dH_2O i ostave preko noći da se osuše.

3.6.2. ALCIJANSKO MODRILO Ph 2,5

Boja alcijansko modrilo pripremala se po protokolu (Lowe 1998a)

Za pripremu otopine AN pH 2,5, 10ml potrebno je:

- 100 mg alciana blue (AppliChem, Njemačka)
- 300 µl octene kiseline (Kemika, Hrvatska)
- dH_2O

AB se otopi u octenoj kiselini, te se doda dH_2O do 10 ml. Po potrebi se podesi do potrebnog pH.

Na suhe razmaze se nakapa dH_2O i drži se par minuta da bi se polisaharidi u stanici napuhali. Voda se otrese te se nakapa boja na razmaze. Uzorci se boje 5 minuta, isperu se u dH_2O , te se tretiraju dalje po protokolu za kombiniranu PAS+AB pH 2,5 tehniku.

3.6.3. ALFA-NAFTIL ACETAT ESTERAZA (ANAE)

Protokol (Sigma Aldrich, 2006) smo prilagodili prije korištenja. U takvom prilagođenom protokolu smo umjesto *fast blue RR salt* kapsula, koristili *fast blue RR salt* prah (Santa Cruz Biotechnology, Amerika).

Fiskativ citrat-aceton-metanol se uvijek svježe pripremao od:

- 18 ml razrijeđene citratne otopine od tri-natrij-citrat-2-hidrata (Kemika, Hrvatska)
- 27 ml acetona (T.T.T., Hrvatska)
- 5 ml metanola (T.T.T., Hrvatska)

Za razrijeđenu citratnu otopinu napravili smo prezasićenu otopinu natrijevog citrata dodavanjem tri-natrij-citrat-2-hidrata u 10 ml dH_2O sve dok se više nije mogao otopiti. Otopinu smo filtrirali, izmjerili joj obujam, te smo ulili 9 puta veća količina dH_2O kako bi dobili razrijeđenu otopinu natrijevog citrata sa pH 5,4. Takvu otopinu smo čuvali na sobnoj temperaturi, dobro zatvorenu.

Prije pokusa trebalo je napraviti 50 ml razrijeđenog Trizma pufer. Prezasićena otopina dobivena je otapanjem otprilike 1 žlice Trizma Base-a (Sigma, Njemačka) u 10 ml dH_2O sve dok se nije moglo više otopiti. Otopina je profiltrirana u tikvicu (50ml) te joj se izmjerio volumen i dodalo se jos devet takvih volumena dH_2O. Čuva se na sobnoj temperaturi dobro zatvoreno.

Uzorke smo fiksirali pripremljenim fiksativom minutu, isprali dH_2O i sušili 20-30 minuta. U međuvremenu smo pripremili svježu otopinu α-naftil acetata (ANA):

- 2 mg ANA (AppliChem, Njemačka)
- 200 µl etilen glikol monometil etera (EGME, Mreck, Njemačka).

ANA se otopi u EGMEu i mora se odmah iskoristiti.

Za 6 uzorka otopljeno je 50 mg *fast blue RR* soli u 50 ml Trizma pufera. Unutra smo ulili 2ml otopine ANA, promiješali i odmah nakapali na osušene fiksirane uzorke. Uzorci su se zaštitili od svjetla i inkubirali 30 minuta. Nakon toga isprali su se dH_2O i ostavili sušiti preko noći.

3.6.4. ALFA-NAFTIL BUTIRAT ESTERAZA (ANBE)

Prema Stroberovom protokolu (2001), za pripremu 50 ml puferiziranog formalin-aceton fiksativa pH 6,6 trebalo je:

- 15 ml dH_2O
- 10 mg bezvodnog natrijevog-hidrogen fosfata, Na_2HPO_4 (Kemika, Hrvatska)
- 50 mg kalijevog dihidrogen fosfata, KH_2PO_4
- 22,5 ml acetona
- 12,5 ml formalina

U vodi se otopio natrijev hidrogen fosfat i kalijev dihidrogen fosfat. Toj otopini se doda aceton i formalin te se pH namjesti na 6,6. Fiksativ se čuva na ledu na 4°C dobro zatvoren.

Prema protokolu unaprijed je pripremljeno 100 ml fosfatnog pufera pri pH 6,3 (A), 2,5 ml pararozanilin-HCla (B) i 2,5 ml 4%-tne otopine natrijevog nitrata (C).

(A)Za pripremu 50 ml fosfatnog pufera pH 6,3 trebalo je:

- 100 ml dH_2O
- 12,5 ml 0,15M bezvodnog natrijevog-hidrogen fosfata, Na_2HPO_4 (473,5 mg Na_2HPO_4 (Kemika, Hrvatska) otopljenog u 50 ml dH_2O)
- 37,5 ml 0,15M kalijevog dihidrogen fosfata, KH_2PO_4 (1020 mg KH_2PO_4 otopljenog u 50 ml dH_2O)

Otopine Na_2HPO_4 i KH_2PO_4 se pomješaju u omjeru 1:3 te se dobivenoj otopini podesi pH na 6,3.

(B)Za pripemu 2,5 ml pararozanilina-HCl potrebno je:

- 2 ml dH_2O
- 0,5 ml koncentrirane HCl
- 0,1 g pararozanilin basea (Sigma, Njemačka)

HCl se umiješala u vodu nakon čega se dodao i pod toplom vodom otopio pararozanilin.

(C) Za 4 %-tnu otopine natrijevog nitrata ($NaNO_2$) trebalo je:

- 10 ml dH_2O
- 400 mg $NaNO_2$ (Gram-Mol, Hrvatska)

Uzorci su bili fiksirani ohlađenim fiskativom 30 sekundi. Bez ispiranja vodom ostavljeni su sušiti se 20ak minuta. Za pripremu inkubacijske otopine trebalo je svježe umiješati:

a) 50 µl pararozanilina obogaćenog nitratnim skupinama (engl. *hexazotied pararosanilin*) dobivenog miješanjem:

- 25 µl 4 %-tnog $NaNO_2$ (C)
- 25 µl pararozanilin-HCl (B)

b) 50 µl otopine α-naftil butirata (ANB) dobivene otapanjem:

- 10 µl EGME
- 50 µl ANB

c) 9,5 ml pripremljenog fosfatnog pufera pH 6,3

Prvo su se umiješale otopine ANB i pararozanilina obogaćenog nitratnim skupinama, zatim je dodan fosfatni pufer, otopina se filtrirala i nakapala na dva uzorka. Nakon 5 minuta uzorci su se isprali destiliranom vodom i ostavili sušiti.

3.6.5. ALKALNA FOSFATAZA FAST BLUE (APFB)

Ovo je prilagođeni protokol (Lowe 1998b) gdje se umjesto *fast red TR salt* koristio *fast blue RR salt*.

Za pripremu 100 ml puferske otopine 0,2M Tris HCl u tikvici (150ml) trebalo je:

- 2,42 g Trisma base (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 0,1M HCl
- dH_2O

U 40 ml dH_2O otopljena je Trisma te je dodavan HCl dok nije postignut pH 8,3. Na kraju se ulila dH_2O do 100 ml. Otopina Tris-HCl može stajati na sobnoj temperaturi.

Za pripremu 100 ml naftol AS-BI matične otopine trebalo je:

- 5 mg naftol AS-BI fosfata (AppliChem, Njemačka)
- 2 ml N,N-dimetilformamida (Gram-Mol, Hrvatska)

- 2 ml dH_2O
- natrijevog karbonata, Na_2CO_3 (Kemika, Hrvatska)
- 36 ml pripremljeni Tris-HCl pufer
- 60 ml dH_2O

U N,N-dimetilformamidu otopio se naftol AS-BI fosfat, dodana je dH_2O i natrijevim karbonatom pH je podešen na 8,0. Zatim je dodan Tris-HCl pufer i dH_2O. Otopina može stajati u hladnjaku.

Inkubirajuća otopina (za 10 uzoraka) svježe je napravljena od 25 ml matične otopine naftol AS-BI i 25 mg *fast blue RR* soli, promješana, filtrirana i odmah nanešena na suhe, nefiksirane razmaze. Vremena inkubacije su 8, 10, 13 i 15 minuta, te se vrijeme od 13 minuta pokazalo kao najbolje, jer su se stanice držane dulje vremena smežurale.

3.6.6. METODA SCHIFFOVE BAZE I PERJODNE KISELINE (PAS)

Za pripremu Schiffova reagensa (Lowe 1998c) bilo je potrebno:

- 200 ml kipuće destilirane vode
- 1 g bazičnog fuksina (AppliChem, Njemačka).
- 2 g kalijevog disulfita (AppliChem, Njemačka)
- 2 ml koncentrirane klorovodične kiseline (HCl)
- Žlica (cca 1 g) aktivnog ugljena (Kemika, Hrvatska).

U kipućoj vodi otopio se bazični fuksin. Kada se otopina ohladila na 50 °C umiješao se kalijev disulfit i ohladilo na sobnu temperaturu. Zatim se ulila klorovodična kiselina i ostavljeno je da stoji u mraku preko noći. Idući dan dodan je aktivni ugljen, smjesa se protresla i filtrirala. Dobivena otopina prozirne je boje i čuvala se na 4 °C dobro zatvorena.

Za provjeru kvalitete Schiffova reagensa u 10 ml 35 % formalina (Alkaloid, Makedonija) doda se par kapi reagensa. Ukoliko dođe do ružičasto – ljubičastog obojenja, reagens je dobar.

Krvni razmazi nisu bili fiksirani. Na njih se nakapala dH_2O i držala dvije minute. Ova tehnika se koristila u kombinaciji sa bojom alcian blue.Višak vode se izlio te se tretiralo 5 minuta sa bojom alcian blue pH 2,5. Stakalca se ispralo vodom i odmah se tretiralo 10 minuta sa 1 %-tnom perjodnom kiselinom (Merck, Njemačka). Ponovno se ispralo vodom i tretiralo Schiffovim reagensom u vremenskim intervalima 10, 13, 15 i 20 minuta. Najbolje vrijeme je 20 minuta. Na kraju su se razmazi isprali destiliranom vodom par minuta i ostavili sušiti.

3.6.7. SUDANSKO CRNILO B (SBB)

Po prilagođenom protokolu (WebPath 2012) koristili smo više metoda fiksacija te smo otopinu sudanskog crnila B (SBB) čuvali dobro zatvorenu na sobnoj temperaturi umjesto na 60 °C.

Za pripremu otopine SBB potrebno je:

- 20 ml etilen glikola (AppliChem, Njemačka)
- 140 mg SBBa (Sigma-Aldrich, Njemačka)

Dodali smo SBB u etilen glikol, te smo ga stalno miješajući držali 3 min u kupelji na 95 °C. Otopina se vruća filtrirala i čim se ohladila na sobnu temperaturu, filtrirala se drugi put.

Koristili su se nefiksirani uzorci, uzorci fiksirani 10 %-tnim formalinom pH 7,4 (Alkaloid, Makedonija) dvije minute, uzorci fiksirani dvije minute mješavinom 96 %-tnog etanola (Badel, Hrvatska) i 5 %-tne octene kiseline u omjerima 3:1, uzorci fiksirani ohlađenim formalinom i acetonom 30 sekundi (kao u ANBE) i uzorci fiksirani jednu minutu puferiziranom otopinom citrata, acetona i metanola (kao u ANAE). Za negativnu kontrolu uzorci su tretirani acetonom (T.T.T., Hrvatska) tri minute kako bi se degradirale masti.

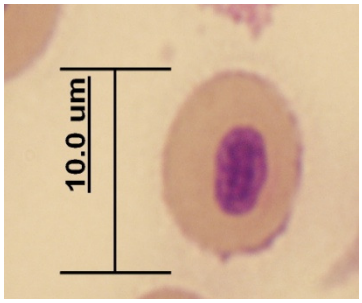
Ocijeđeni preparati uronili su se u etilen glikol (EG) pet minuta, kratko su osušeni i ponovno vraćeni na pet minuta u EG. Nakon toga uzorci su ocijeđeni, nakapani otopinom SBBa i inkubirani 7 minuta. Zatim su se istresli od viška boje i nakapali 85%-tnim etilen glikolom na 3 minute. Stakalca su se isprala destiliranom vodom i sušila par sati.

4. REZULTATI

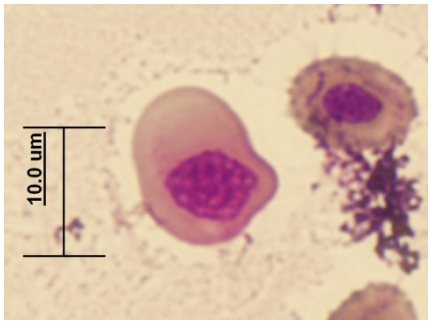
4.1. MGG DIFERENCIJALNO BOJANJE I BROJNOST STANICA

4.1.1. ERITROCITI

Eritrociti kod vrste *P. sanguinolentus* su eliptičnog oblika sa centralno smještenom jezgrom. Jezgra je građena od kompaktnog kromatina. Na razmazima su zamijećeni različiti stadiji eritropoeze, te smo tako zabilježili mlade, zrele i stare eritrocite koji se razlikuju svojim oblikom, i obojanošću nakon tretmana MGG tehnikom. Na fotografijama se najbolje vide razlike; stari eritrociti su veći te su drukčije obojani od zrelih te njihova jezgra nije kompaktna i ovalna kao kod zrelih eritrocita (Slika 7. i 8.). Broj eritrocita u litri krvi prikazan je u Tablici 2.



Slika 7. Zreli eritrocit vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnihom MGG.



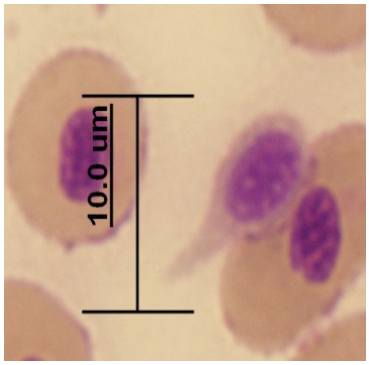
Slika 8. Stari eritrocit vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnikom MGG.

Tablica 2. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za eritrocite.

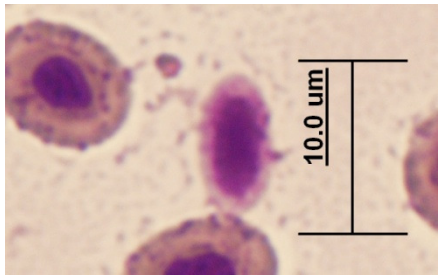
	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
ERITROCITI $x10^{12}$ st/L	1,551058459	0,679021135	1,5675832	0,277523	3,440928

4.1.2. TROMBOCITI

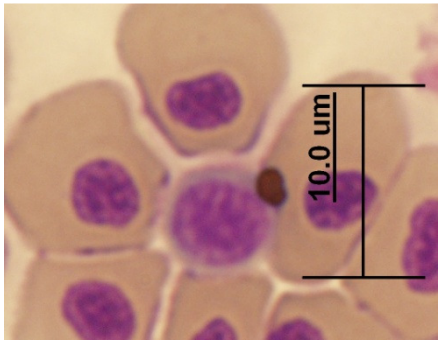
Kod babice balavice zamijećeni su različiti oblici trombocita. Jezgre i citoplazme su im jednakih obojenja, no razlikuju se oblikom. Razlikujemo okrugle, ovalne i vretenaste trombocite (Slika 9.,10. i 11.). Ponekad dolaze u nakupinama. Ukupni broj trombocita u litri krvi prikazan je u Tablici 3.



Slika 9. Vretenasti trombocit vrste *P. sanguinolentus* , bojano tehnikom MGG.



Slika 10. Ovalni trombocit vrste *P. sanguinolentus,* bojano tehnikom MGG.



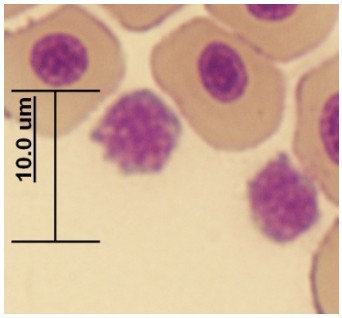
Slika 11. Okrugli trombocit vrste *P. sanguinolentus,* bojano tehnikom MGG.

Tablica 3. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za trombocite.

	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
TROMBOCITI $x10^{12}$ st/L	0,016856211	0,011695403	0,0146622	0	0,0609331

4.1.3. LIMFOCITI

Limfociti su vrlo česte stanice u krvi babice balavice. Jezgra je tipično centralno pozicionirana, ljubičasta te zauzima velik dio stanice, dok se citoplazma vidi kao tanki plavi prsten oko jezgre. Postoje mali i veliki limfociti (Slika 12.). U Tablici 4. su prikazane brojčane vrijednosti.



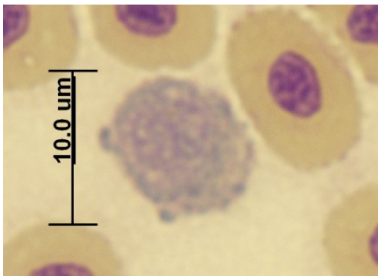
Slika 12. Limfocit vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnikom MGG.

Tablica 4. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za limfocite.

	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
LIMFOCITI $x10^{12}$ st/L	0,050381159	0,030579942	0,044	0,007265	0,1454046

4.1.4. BAZOFILI

Bazofili su stanice nepravilnog oblika, tamno ljubičaste jezgre i tamno ljubičastih granula u citoplazmi (Slika 13.). Vrlo su rijetki, pa su zato izostavljeni u svim analizama osim brojanja MGG obojanih stanica. Brojčane vrijednosti su prikazane u Tablici 5.



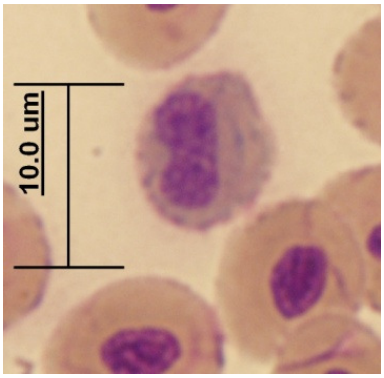
Slika 13. Bazofil vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnikom MGG.

Tablica 5. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za bazofile.

	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
BAZOFILI $x10^{12}$ st/L	0,000313078	0,000796128	0	0	0,004275

4.1.5. NEUTROFILI

Neutrofili su vrlo česti leukociti. Veliki su i bazofilni, te su često nepravilnog oblika. Jezgra može biti u obliku ljudskog bubrega ili segmentirana. Segementi jezgre brojem variraju od 2 do 4, te su često različitog oblika. Imaju svjetlu citoplazmu sa segmentiranom ljubičastom jezgrom. Citoplazma može biti i tamnije boje (Slika 14.). Brojčane vrijednosti su prikazane u Tablici 6.



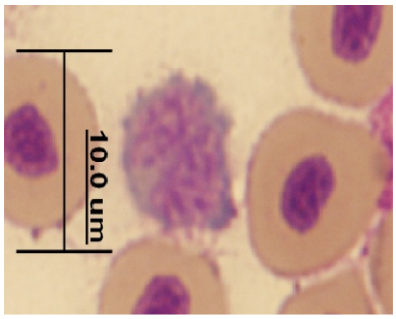
Slika 14. Neutrofil vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnikom MGG.

Tablica 6. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za neutrofile.

	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
NEUTROFILI $x10^{12}$ st/L	0,013121469	0,00902187	0,0119875	0	0,0429777

4.1.6. MONOCITI

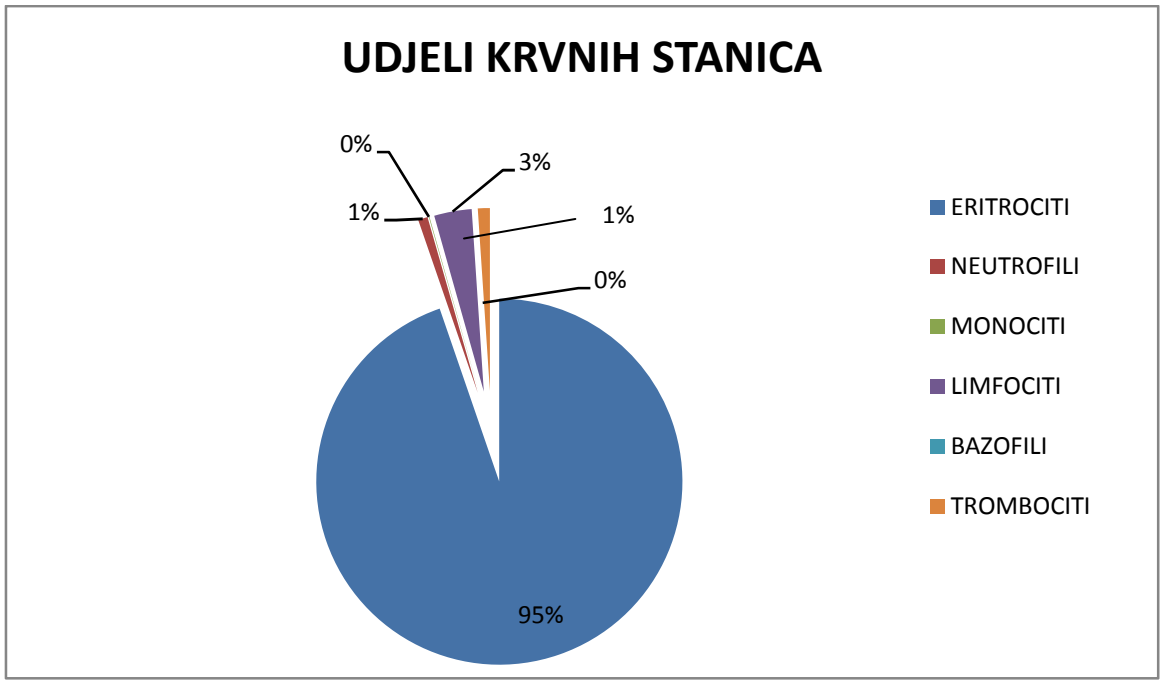
Monociti su stanice sferičnog oblika, sa perifernom, velikom, tamno ljubičastom jezgrom. Citoplazna je svjetlo plave boje. Rub stanice je nepravilan. Monociti su najveće krvne stanice te se po tome lako razlikuju od ostalih stanica (Slika 15.).Brojčane vrijednosti su prikazane u Tablici 7.



Slika 15. Monocit vrste *P. sanguinolentus* bojan tehnikom MGG.

Tablica 7. Rezultati brojanja krvnih stanica, prikazane vrijednosti za monocite

	SREDNJA VRIJEDNOST	STANDARDNA DEVIJACIJA	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
MONOCITI $x10^{12}$ st/L	0,000999045	0,001681797	0	0	0,0075561



Slika 16. Postotak udjela krvnih stnica kod vrste *P. sanguinolentus*. Vrijednosti su prikazane u postotcima.

4.2 MJERENJE VELIČINE ERITROCITA I NJIHOVIH JEZGRI

Kod babice balavice su primjećeni eritrociti različitih razvojnih stadija, mladi, zreli i stari eritrociti. Razlikuju se po veličini, obliku stanice i jezgre, te obojenju. Najveći udio su zauzimali zreli eritrociti te su se njihove veličinske vrijednosti izmjerile u programu Axio Vision SE64 Rel 4.8 (Carl-Zeiss Microimaging GmbH, Njemačka). Mjerile su se vrijednosti na 100 stanica te su rezultati prikazani u Tablici 8.

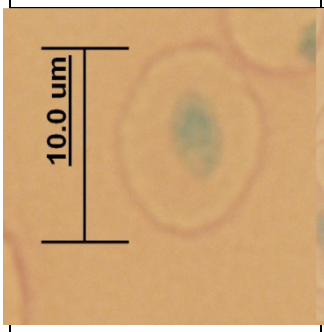
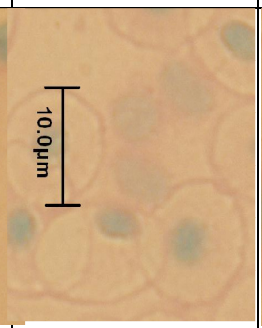
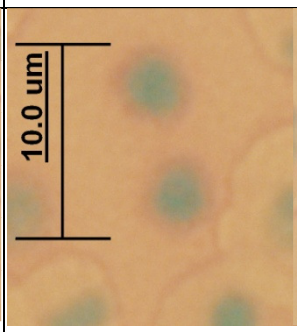
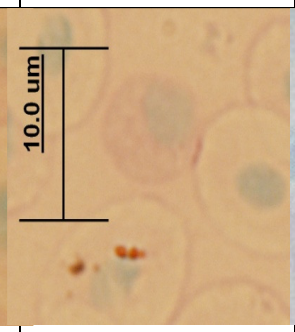
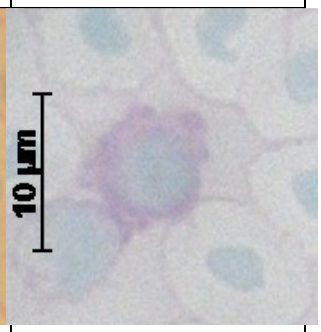
Tablica 8. Rezultati mjerenja dimenzija eritrocita i njihovih jezgara. Veličine su izražene u µm. SR.VR. označava srednju vrijednost, MIN minimum, MAX maksimum.

	ŠIRINA SR.VR. ± ST.DEV.	MIN	MAX	DULJINA SR.VR. ± ST.DEV.	MIN	MAX
STANICA µm	7,8489 ±0 ,6003	6,22	9,32	10,0028 ± 0,6957	8,34	11,72
JEZGRA µm	2,8262 ± 0,4893	1,84	4,26	4,048 ± 0,5340	2,64	5,49

4.3. CITOKEMIJSKE ANALIZE KRVNIH STANICA

4.3.1. PAS + AB pH 2,5

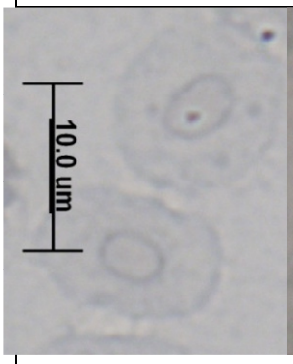
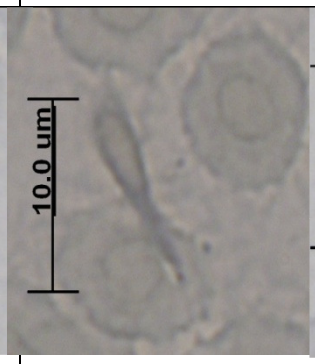
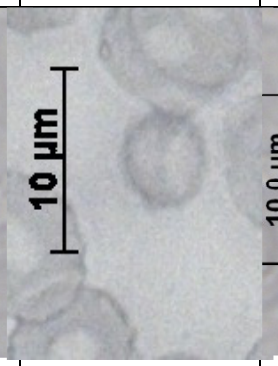
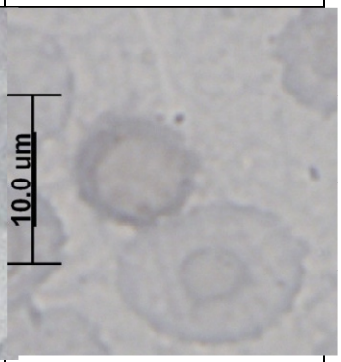
Bojanjem tehnikom PAS dokazujemo postojanje glikogena u citoplazmi stanica. Bojanjem tehnikom PAS+AB pH 2,5 dobili smo pozitivne reakcije na AB kod svih stanica (obojane jezgre), dok je bojanje PAS tehnikom dalo pozitivne rezultate kod svih tipova stanica osim eritrocita (Slika 17, Tablica 9.). Ovisno o pH alcijansko modrilo radi ionske veze s različitim grupama šećera. U kiselinama dolazi do ionizacije amino grupa boje. Tkiva sadržavaju anione poput fosfata nukleinskih kiselina, sulfata ugljikohidrata te karboksilata ugljikohidrata i proteina. Specifično boji heteropolisaharide poput mukopolisaharida na stanicama i sijaliniziranog glikokaliksa intenzivnom plavom bojom. PAS tehnika prvenstveno služi za dokazivanje glikogena, ali se pomoću nje može prikazati škrob, mucini, bazilarne membrane i amiloidna tjelešaca.

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 17.Rezultat bojanja tehnikom PAS+ab pH2,5. Sve krvne stanice imaju obojanu jezgru bojom AB. Pozitivnu reakciju na bojanje PAS tehnikom imaju trombociti b), limfociti c), neutrofili d) i monociti e).

4.3.2. S.B.B

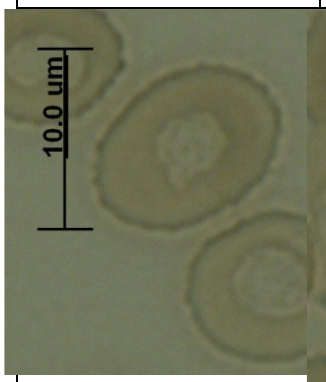
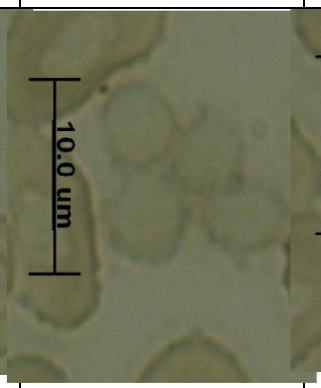
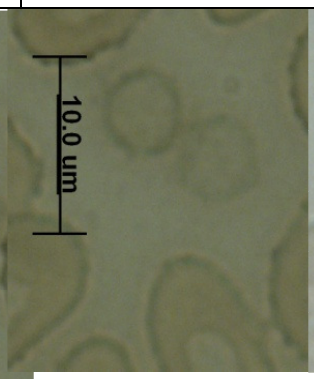
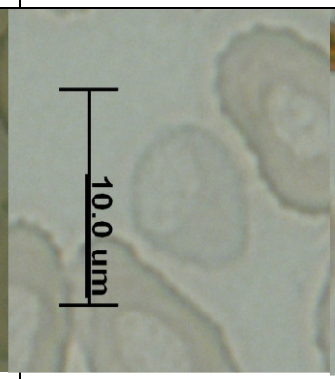
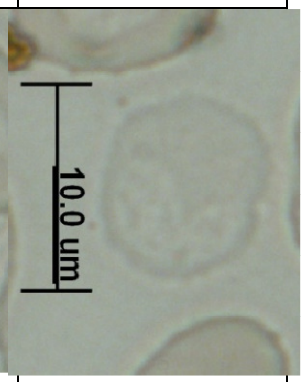
Boja sudansko crnilo B se koristi za dokazivanje nekristaliziranih staničnih lipida (Stains File, 2012). Iako smo koristili različite tehnike fiksacije, nefiksirani uzorci su dali najbolje rezultate. Pozitivne reakcije smo dobili kod limfocita, neutrofila i monocita kojima se bojala citoplazma (Slika 18, Tablica 9.). Eritrociti nisu pokazali nikakvu reakciju.

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 18. Rezultati bojanja tehnikom SB. Jezgre svih stanica su neobojane. Eritrociti a) ne pokazuju reakciju kao ni trombociti b), dok se kod limfocita c), neutrofila d) i monocita e) vide reakcije u citoplazmi kao tamnije obojano područje.

4.3.3. ANAE

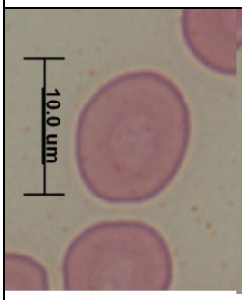
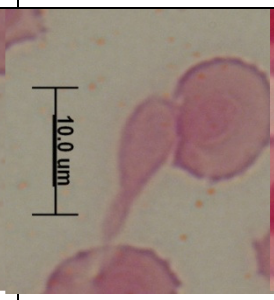
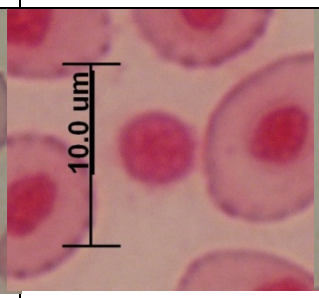
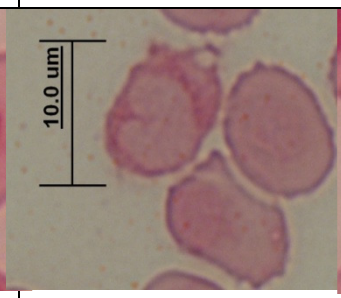
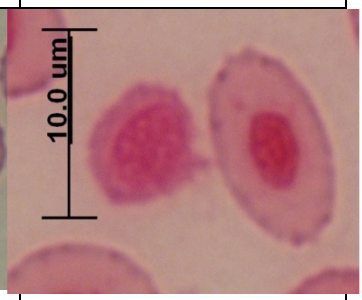
Pomoću aktivnost alfa-naftil acetat esteraze (ANAE) mogu se razlikovati stanice monocitnog i neutrofilnog porijekla. Esteraze hidroliziraju estersku vezi sintetskog supstrata α-naftil acetata pritom tvoreći α-naftol. Kovalentno se veže sa *fast blue RR* soli čime radi netopivi tamno plavo obojani talog. Bojanje tehnikom ANAE nije pokazalo nikakve rezultate. Svi tipovi stanica su ostali neobojani (Slika 19, Tablica 9.). Očekivane pozitivne reakcije kod monocita su izostale.

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 19. Rezultati reakcije ANAE. Kod niti jednog tipa stanice nije zabilježena pozitivna reakcija.

4.3.4. ANBE

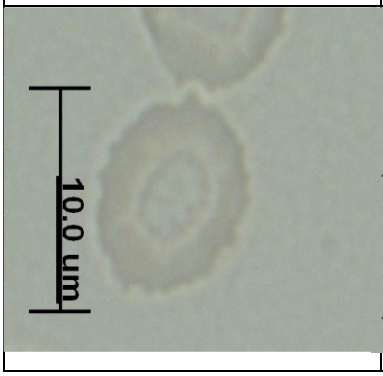
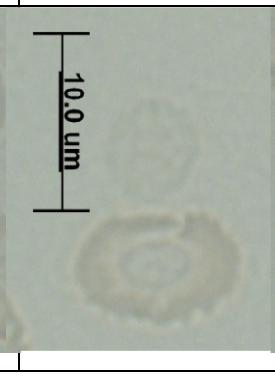
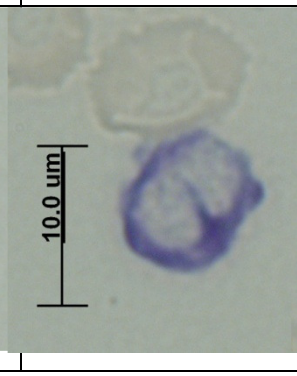
Alfa-nafil butirat esteraza (ANBE) nespecifičan je enzim koji hidrolizira alfa-naftil butirat u alfa-naftol. Nastali produkt vezan sa pararozanilonom daje crveno obojeni talog. Aktivnost ovog enzima pokazuju monociti. Bojanje ANBE tehnikom je bilo uspješno, te smo dobili očekivane rezultate. Pozitivne rezultate smo dobili kod monocita i limfocita (Slika 20, Tablica 9.).

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 20. Rezultati reakcije ANBE. Pozitivne reakcije smo dobili kod limfocita c), slabu reakciju kod neutrofila d) i monocita e). Eritrociti a) i trombociti b) nisu pokazali pozitivno obojenje.

4.3.5. APFB

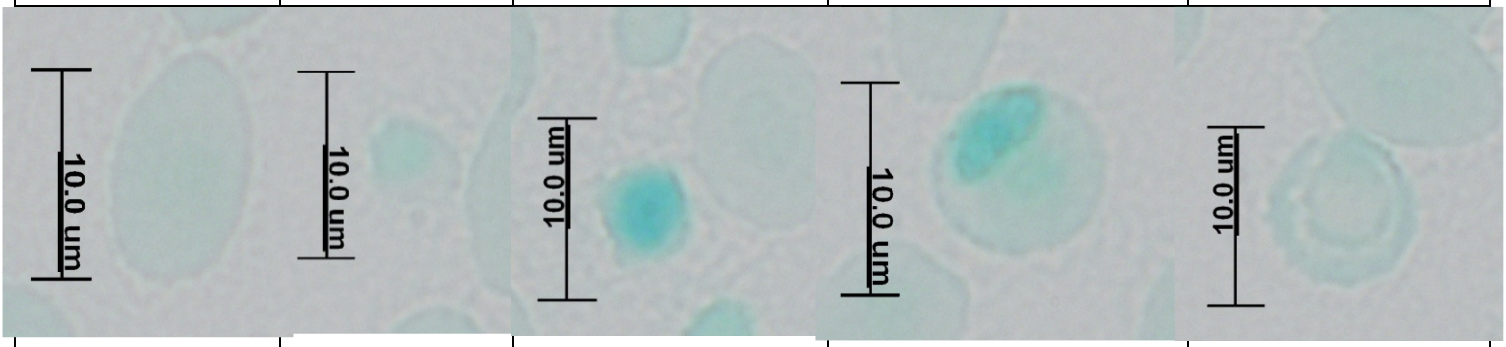
Supstrat alkalne fosfataze (ALP) je naftol AS-BI fosfat koji se hidrolizira na fosfat i aril naftolamid. Slično ANAEu, aril naftolamid tvori kovalentne veze sa *fast blue* soli čime nastaje plavi talog. Bojanje APFB tehnikom dalo je dijelom očekivane rezultate. Plavo obojana citoplazma kod neutrofila i monocita znak je da je bojanje uspijelo. Negativna reakcija zapažena je kod eritrocita, trombocita i limfocita, kod kojih je pak reakcija bila očekivana (Slika 21., Tablica 9.)

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				

Slika 21. Rezultat bojanja APFB tehnikom. Pozitivna reakcija je vidljiva kod neutrofila d) i monocita e), dok kod eritrocita a), trombocita b) i limfocita c) nema reakcije.

4.3.6. AB pH 3,1

Bojanje AB dalo je pozitivno, plavo obojenje. Pozitivna reakcija se vidi kod limfocita i neutrofila, dok je kod monocita jako slabo (Slika 22. Tablica 9.). Iako očekivano, izostalo je obojenje jezgre kod eritrocita i trombocita. Iako su jako rijedak tip krvnih stanica, prema literaturi (Gilbert i Omstein, 1975) bazofili se vrlo lijepo boje bojom alcian blue. Zbog svog kationskog svojstva, veže se na sulfatnu skupinu heparina, te boji granule bazofila. Zbog višeg afiniteta za sulfatne nego fosfatne skupine, alcian blue će jače bojati heparin nego nukleinsku kiselinu, te daljnjim snižavanjem pH stabilnost veze AB i nukleinkih kiselina pada, te se može vidjeti samo obojana mjesta koja sadrže heparin. Snižavanjem pH također se otapaju proteini u ostalim leukocitima, zbog čega bazofili dolaze još jače do izražaja (Gilbert i Omstein, 1975).

ERITROCIT	TROMBOCIT	LIMFOCIT	NEUTROFIL	MONOCIT
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 22. Rezultati bojanja AB. Kod limfocita c) i neutrofila d) je došlo do jake pozitivne reakcije, dok je kod monocita e) reakcija bila slaba. Kod eritrocita a) i trombocita b) je reakcija izostala.

Tablica 9. Rezultati svih citokemijskih analiza. + je pozitivan rezultat, - negativan, / znači da stanicu nismo pronašli

	ERITROCITI	TROMBOCITI	LIMFOCITI	NEUTROFILI	MONOCITI	BAZOFILI
AB	-	-	+	+	+	/
APFB	-	-	-	+	+	/
ANAE	-	-	-	-	-	/
ANBE	-	-	-	+	+	/
PAS+AB	+	+	+	+	+	/
SB	-	-	+	+	+	/

5. RASPRAVA

Ekotoksikologija je znanost koja proučava utjecaj okolišnih onečišćivaća na populacije i ekosustave (Bols i sur. 2001).

Toksikanti su toksične tvari koje ne potječu od biljaka i životinja, nego od ljudskih aktivnosti, dok toksini potječu od biljaka i životinja. Ukoliko zbog ljudske aktivnosti dolazi do proizvodnje toksina (npr. cvjetanje toksičnih algi), takve toksine nazivamo ekotoksikanti (Bols i sur., 2001). Ekotoksikanti su raznolika skupina tvari koje imaju dvije generalne karakteristike: unešeni su u okoliš, i potencijalno utječu na ekosustav pri relativno niskim koncentracijama (Bols i sur 2001). Štetni učinci toksikanata i toksina mogu dovesti do smanjenja biološke raznolikosti. Kao mlada znanost, ekotoksikologija je prekretnicu doživjela tek 1960-tih godina; započele su kemijske analize koje su se bazirale na mjerenjima koncentracije kemijskih tvari u okolišu. Ubrzo nakon toga razvila se i biološka analiza kod koje se naglasak prebacio sa mjerenja koncentracije kemijskih tvari u okolišu na mjerenje reakcija organizma na onečišćenje. Biološke analize su pogodnije jer daju informacije o djelovanju na biološku komponentu, kumulativnu informaciju o jednom duljem vremenskom razdoblju te odgovaraju proporcionalno biološki dostupnoj količini onečiščivaća. Laboratorijski testovi toksičnosti nekada nisu dovoljni; kod takvih se testova ne zna što bi se dogodilo u prirodnom okolišu promatranog organizma (predacija, manjak hrane i sl.), kratkotrajni su te je broj „uhodanih“ vrsta za testiranje vrlo malen. To je jedan od razloga zašto se u ekotoksikološkim testiranjima često traže novi organizmi koji bi svojim karakteristikama odgovarali njihovim potrebama. Različite razine biološkog sustava, od molekule do ekosustava, mogu se koristiti u takvim istraživanjima. Takve mjerljive karakteristike nazivamo biomarkerima koji nam služe kao indikatori biološkog stanja, među tim i zdravlja organizma. Prema definiciji Darwinovog fitnesa, biomarker je to relevantniji što ga se bolje može povezati sa smanjenjem vjerojatnosti preživljavanja i razmnožavanja organizma kojeg promatramo. Među takve biomarkere spadaju različite histološke, fiziološke, enzimatske i slične promjene, kao na primjer i poremećaji imunološkog sustava. Imajući informacije o referentnim vrijednostima pojedinih biomarkera u organizmu, možemo odrediti zdravstveni status promatranog organizma. No zato je potrebno izvršiti istraživanje kojim bismo dobili te referentne vrijednosti.

Jedna od karakteristika dobrog biomarkera je i poznavanje fiziologije proučavanog organizma, u što spada i diferencijalna krvna slika. Kao što je prije navedeno, krvna slika organizma je slika njegovog zdravstvenog statusa. Hematološki profili riblje populacije mogu

indicirati fiziološki status i zdravlje, te tako hematologija u kombinaciji sa ostalim rutinskim dijagnostičkim metodama može poslužiti u identifikaciji i procijeni stanja uzrokovanih stresom i bolešću (Pavlidis i sur., 2007). S tim da referentne vrijednosti za vrstu *P. sanguinolentus* ne postoje, u ovom radu se prvi put mogu naći vrijednosti za krvne stanice kod ove vrste.

Iz slike 4. se mogu isčitati vrijednosti pojedinih leukocita kod vrsta *Channa punctatus*, *Cichlasoma dimerus* i *Oreochromis hyrid*, te se mogu usporediti sa vrijednostima koje su dobivene za vrstu *Parablennius sanguinolentus.* Ako ih usporedimo sa Tablicom 1. u kojoj su navedene referentne vrijednosti (Vázquez i Guerrero, 2007), vidljivo je da vrijednosti gotovo svih vrsta spadaju u referentni raspon. Jedino odskakanje koje je i upečatljivo u grafu je broj limfocita kod *P. sanguinolentus*. Velika je mogućnost da je došlo greške u brojanju stanica te da su se neki okrugli trombociti, kojih ima najviše, pribrojali toj vrijednosti zbog velike sličnosti sa malim limfocitima. Iz istog razloga je broj trombocita manji nego kod ostalih vrsta. Brojnost monocita je slična kod svih vrsta, i prisutna je kod svih. Brojnost im spada u referentni raspon tako da se može zaključiti da su jedinke bile dobrog zdravstvenog stausa i da nije bilo upalnog procesa koji bi zahtjevao aktivaciju monocita. Eozinofili nisu bili nađeni kod vrste *P. sanguinolentus*. Postoje dva razloga tome: zbog toga što su vrlo rijetke stanice jednostavno nisu nađeni u uzorcima, ili ne postoje kod ove vrste. Da bi se dao zaključak koji je razlog točan, potrebna su daljnje testiranja. Kod tri vrste s čijim vrijednostima se uspoređivao rezultat imaju eozinofile. Također se može primjetiti da iako u poglavlju Rezultati postoji poglavlje sa bazofilima, ovdje nisu uključeni u tablicu. Razlog tome je taj što niti u jednom radu iz kojih su se uzimale vrijednosti, nije bilo zabilježenih vrijednosti za bazofile. Po prirodi su to jako rijetke stanice, i pogotovo ih je teško naći jer se njihove granule tope u bojama poput MGG (Pavlidis i sur., 2007). Neutrofila ima više nego što ih ima u referentnom rasponu. Razlog tome se možda nalazi u tome što su jedinke lovljene u vrijeme mrijesta, te je zbog iscrpljenosti oko privlačenja partnera, borbi i sličnog ponašanja koje ide uz reprodukciju, imunosni sustav reagirao, te su se neutrofili kao stanice imunološkog sustava otpuštale u većim količinama. Povećani broj cirkulirajućih neutrofila i monocita je rezultat nespecifičnog imunološkog odgovora, koji rezultira upalom (Pavlidis i sur., 2007). Leukokrit je obećavajući indikator fiziološkog statusa riba u prirodnom okolišu. Mnoge komponente urođene imunosti su evolucijski konzervirane, što znači da je osjetljivost mehanizama na pojedini onečišćivać slična kod različitih vrsta; na taj način možemo lakše predviditi utjecaj nekog toksikanta na okoliš (Bols i sur., 2001). Razlike u broju leukocita mogu biti uzrokovane

raznim faktorima bilo biotičkim (starost jedinke, sezona uzorkovanja, zrelost jedinke, prisutnost patogena) ili abiotičkim (temperatura, pH, koncentracija otopljenog kisika) (Pavlidis i sur., 2007).

Iz slike 3. je vidljiv različit odnos između ukupnog broja eritrocita (RBC) i ukupnog broja leukocita (WBC) kod svih vrsta čije su vrijednosti uzete iz literature. Najveća je razlika u broju kod vrste *C. dimerus* kod koje je čak 252,8 puta više eritrocita nego ukupnih leukocita, dok je najmanja razlika kod vrste *P. sanguinolentus*, sa 19,10 puta više eritrocita nego leukocita. Kao što je rečeno u uvodu, Malassez (1872) je zamijetio da kod teleosta postoji korelacija između veličine i brojnosti eritrocita; što su stanice manje to je broj veći i obrnuto. Iz slike 16. je vidljivo da vrsta *C. dimerus* ima najmanje eritrocite te se može zaključiti da iz tog razloga ima najveći ukupni broj. Iz slike 3. je vidljivo da vrsta *C. dimerus* ima najveću brojnost eritrocita, dok vrsta *P. sanguinolentus* ima najmanje. Razlog tome je slaba aktivnost ove vrste. Sa porastom aktivnosti, tako i metabolizma, raste i brojnost eritrocita (Mavares i Pérez, 1984). Također ova vrsta je pridnena, te živi na nižim temperaturama. Vrste poput *Tilapia* i *Salmo* žive u toplijim vodama, te je broj njihovih eritrocita puno viši (Mavardes i Pérez, 1984), od vrste *P. sanguinolentus*. Vrste *C. punctatus*, *O. hybrid* i *C. dimerus* su slatkovodne vrste te zbog toga imaju veći broj eritrocita, zbog većeg afiniteta za kisikom. Neke morske vrste poput *Astroscopus sexaspinosus i A. ygraecum* (Filho i sur., 1992) žive na dnu i nisu jako aktivne, te imaju vrijednosti RBC (1,108 ± 0,325 i 0,766 $x10^6$ mm^{-3}) slične vrijednostima *vrste P. sanguinolentus*. Vrijednosti WBC i RBC također pripadaju u referentni interval.

Veličina eritrocita varira među vrstama teleosta. Neki autori (Lay i Baldwin, 1998) to objašnjavaju obrnutom relacijom između veličine eritrocita i aktivnosti organizma. Razlog tome je veća površina od volumena i manja udaljenost difuzije koja omogućava bržu oksigenaciju i deoksigenaciju hemoglobina kako raste volumen eritrocita (Lay i Baldwin, 1998). Iz slike 16. je vidljivo da najveće eritrocite ima vrsta *O. hybrid*. Uspoređujući taj rezltat sa rezultatom brojnosti eritrocita iz grafa 2., i Malassezovom (1872) teorijom, odnos broja i veličine eritrocita je očekivan. Nadalje slične vrijednosti za vrste *C. punctatus* i *C. dimerus* se mogu objasniti sličnim načinom života ovih dviju vrsta; obje su tropske (*C. punctatus* 22-28˚C , *C. dimerus* 23-27˚C) i bentopelagičke vrste (Fishbase 2013b, Fishbase 2013a). Vrsta *P. sanguinolentus* ima veće eritrocite od vrste *C. punctauts* i *C. dimerus*. Razlog tome je vjerojatno njen način života kao pridnene i slabo aktivne vrste. Zbog smanjene aktivnosti potrebni su joj veći eritrociti za lakšu oksigenaciju i deoksigenaciju hemoglobina.

Nasuprot, eritrociti *P. sanguinolentus* su manji od eritrocita *O. hybrid*. Razlog tome je možda taj što vrsta *O. hybrid* živi u iznimno toplim vodama (18-33˚C) u kojima je manja količina otopljenog kisika te je potrebno da ima veće eritrocite za bolje iskorištavanje kisika iz okoline (Fishbase, 2013c). *P. sanguinolentus* živi na dnu gdje su temperature puno niže (Jardas, 1996). Raznolikost hemoglobina i ostalih krvnih komponenti reflektiraju različite adaptacije kod riba na njihov okoliš (Mavares i Pérez, 1984).

Po nekim autorima poput Stegemana (1992), postoji nekoliko kriterija koje mora ispunjavati dobar biomarker:

1) analiza/mjerenje mora biti osjetljivo, pouzdano i što jednostavnije

2) prirodna razina/aktivnost biomarkera traba biti poznata kako bi se mogle razlučiti promjene izazvane toksikantom od normalnih/prirodnih varijabilnosti

3) treba dobro poznavati biologiju/fiziologiju proučavanog organizma kako se minimalizirali izvori prirodnih varijacija- „šum“ (rast i razvoj, reprodukcija, vrsta hrane)

4) trebali bi biti poznati svi vanjski i unutrašnji faktori koji utječu na vrijednosti biomarkera

5) ne zahtijeva žrtvovanje proučavanih jedinki.

Također, važni su i kriteriji za izbor vrsta poput: izbor između beskralješnjaka, kralješnjaka i/ili biljaka, osjetljivosti organizma na kemikalije, veličina areala kretanja vrsta, gustoća, spol, starost uzorkovanih jedinki, njihovo stanište i trofička razina, te sposobnost metaboliziranja. Važna je i veličina uzorka, sezonsko doba uzorkovanja te sam način uzorkovanja.

U ovom radu su se koristile metode DKS-a i citokemijske analize kao vrlo jednostavne metode, za koje je uzorkovanje moglo biti napravljeno izravno na terenu. Ako krenemo od pretpostavke da vrste unutar iste porodice mogu imati različite vrijednosti krvnih stanica (Mavares i Pérez, 1984), test proveden na krvnim stanicama proučavane vrste je vrlo pouzdan i osjetljiv. Jedinke koje su korištene u ovom radu pripadaju istoj populaciji, s tim da su sve ulovljene na istoj lokaciji, na uskom području (luka), te su lovljene u istoj sezoni i tretirane su na isti način. Zbog toga i činjenice da je ulovljeno 53 jedinke bi se moglo reći da je taj uzorak referentan. Rezultati dobiveni iz ove populacije mogu poslužiti kao referentni, te se mogu uspoređivati populacije koje žive na sličnim staništima. Ova vrsta je podobna za ekotoksikološka istraživanja zbog više razloga; vrsta je mala (oko 12,5, cm), a manji organizmi brže apsorbiraju toksikante zbog relativnog odnosa veće površine i manje težine

tijela. Nadalje, površina koja je prekrivena sluznicom je velika (probavilo, škrge…) te sama koža nema ljuske koje mogu poslužiti kao još jedan red fizičke barijere. Vrsta ima mali areal kretanja, i najčešće se zadržava čitavo vrijeme na istom mjestu blizu svog skrovišta (Jardas, 1996). Vrsta je široko rasprostranjena po Mediteranu, i njihovo stanište je vrlo lako dostupno. Njihova prehrana koja se bazira na algama ih čini još boljim kandidatima jer alge često zadržavaju toksikante iz okoliša, te preko njih oni ulaze u organizam ribe. Zbog slabe aktivnosti, ova vrsta ima i spori metabolizam. Sama metoda je vrlo jednostavna i nije invazivna. Uzorci se mogu dobiti iz krvi i kože, te nije potrebno žrtvovati ribu (Bols i sur, 2001).

Ovaj rad može pružiti dio informacija potrebnih za daljnja ekotoksikološka istraživanja na ovoj vrsti. Neke vrijednosti poput spola, dužine i težine tjela nisu uzimane, zbog velikog obima obrađenih podataka.

6. ZAKLJUČAK

- Vrsta *Parablennius sanguinolentus* ispunjava neke od kriterija potrebnih da bi mogla biti testni organizam u ekotoksikološkim testiranjima. Informacije iz ovog rada mogu dati podlogu za daljnja istraživanja na ovoj vrsti.
- Uzorci vrste *P. sanguinolentus* imaju vrijednosti eritrocita, trombocita, limfocita, neutrofila, bazofila i monocita unutar referentnog raspona
- Pozitivnu reakciju na bojanje ABom imaju jezgre svih stanica. PASom se boje limfociti, monociti, neutrofili i trombociti. SBBom se boje limfociti, neutrofili i monociti. Aktivnost ANAE nije pokazao niti jedan tip stanice. Aktivnost ANBE pokazuju limfociti, neutrofili i monociti. APFB je pokazala aktivnost kod neutrofila i monocita.

7. LITERATURA

1. Agius, C. (1980), Phylogenetic development of melano-macrophage centers in fish. J. Zool. Lond. 191: 11-31
2. Ainsworth, A.J. (1992), Fish granulocytes: morphology, distribution, and function, Annual Rev. Of Fish Diseases, 1:123-148
3. Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee., L.E.J. (2001), Ecotoxicology and innate immunity in fish, Developmental and Comparative Immunology, 25: 853-873
4. Charles G. Smith, William M. Lewis & Harold M. Kaplan (1952), A Comparative Morphologic and Physiologic Study of Fish Blood, The Progressive Fish-Culturist, 14:4, 169-172
5. Dugdale D.C. (2011): Blood differential, A.D.A.M. Medical Encyclopedia. http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003657.htm; pristupljeno 1.8.2013.
6. Ellis, A.E. (2001.). Innate host defence mechanism od fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol., 25:827-839
7. Evans, D.L., Jaso-Friedmann, L.(1992.). Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. Annu.Rev.Fish Dis.2, 109-121
8. Filho, D.W., Eble, G.J., Kassner, G., Caprario, F.X., Dafré, A.L., Ohira, M. (1992), Comparative hematology in marine fish, Comp. Biochem. Physiol., 102A, No.2: 311-321
9. Fishbase (2013a), http://www.fishbase.org/summary/46784, pristupljeno 28.8.2013.
10. Fishbase (2013b), http://www.fishbase.org/summary/Channa-punctata.html, pristupljeno 28.8. 2013.
11. Fishbase (2013c), http://www.fishbase.org/summary/Oreochromis-andersonii.html, pristupljeno 28.8.2013.
12. Gilbert, H.S. i Omstein, L. (1975), Basophil counting with a new staining method using alcian blue, Blood, 46: 279-286
13. Grinde, B.(1989.) Lyzozyme from raibow trout, Salmo gairdneri Richardson, as an antibacterial agent against fish patogens. J. Fish Dis., 12: 95-104
14. Guyton A.C., Hall J.E. (2006): Textbook of Medical Physiology. 11. izdanje. Elsevier Saunders
15. Hine, P.M. (1992.) The granulocytes of fish. Fish Shellfish Immunol, 2:79-98
16. Hjemeland, K. (1983.) Proteinase inhibitors in the muscle and serum of cod (Gadus Morhua). Isolation and characterization. Comp. Biochem. Physiol. B., 365-372

17. Horne, M.M. and Sims, D.E. (1998) Preliminary ultra structural studies of the surface mucus of Atlantic salmon. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 98-2: 85
18. Hrubec, T.C., Cardinale, J.L., Smith, S.A., 2000. Hematology and plasma chemistry reference intervals for cultured tilapia (*Oreochromis* hybrid). Vet. Clin. Pathol. 29 (1), 7–12.
19. Jacobsson, A.,Neuman,E.,Thoresson,G., (1986).The viviparous blenny as an Indicator of environmental effects of harmful substances. Ambio 15,236–238.
20. Jardas, I. (1996), Jadranska ihtiofauna, Školska knjiga Zagreb
21. Langston, A.L., Bricknell, I.R. Ellis, A.E.(1998.). Iron binding capacity of peripheral blood leucocyte lysates from Atlantic salmon (Salmo salar L.). In: Barnes, A.C., Davidson, G.A., Himney, M.P. McIntosh, D. Methodology in fish diseases research. Aberdeen: Fisheries Research Services, p. 111-116
22. Lowe (1998a): Alcian Blue, Histopathology, University of Nottingham. http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/alcblue.html; pristupljeno 17.8.2013.
23. Lowe (1998b): Alkaline Phosphatase, Histopathology, University of Nottingham. http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/alkphos.html; pristupljeno 17.8.2013.
24. Lowe (1998c): Periodic Acid, Schiffs, University of Nottingham. http://www.nottingham.ac.uk/pathology/protocols/pas.html; pristupljeno 17.8.2013.
25. Lyons,B.P.,Bignell,J.,Stentiford,G.D.,Feist,S.W. (2004) The viviparous blenny (Zoarces viviparus) as a bioindicator of contaminant exposure : application of biomarkers of apoptosis and DNA damage .Mar. Environ. Res. 58,757–761.
26. Magnadottie B., (2006.). Innate immunity of fish (overview). Fish Shellfish Immun, 20: 137-151
27. Mahajan, C.L. i Dheer, J.S. (1979), Cell types in the peripheral blood of an air-breathing fish *Channa punctatus,* J. Fish. Biol., 14: 481-487
28. Mahajan, C.L. i Dheer, J.S. (1979a), Seasonal variations in the blood constituents of an air-breathing fish *Channa punctatus,* J. Fish. Biol., 14: 413-417
29. Malassez, L. (1872.), De La numération das globules rouges du sang chez les mammifères, les oiseaux, et les poissons. C. R. Acad. Sci. 75: 1528-1531
30. Mavares, R.N. i Pérez, J.E., (1984). Blood adaptation to marine and freshwater environments in fish of the Family Sciaenidae (Perciformes), J. Fish. Biol., 25: 657-663

31. Pavlidis, M., Futter, W.C., Katharios, P., Divanach, P., (2007), Blood cell profile of six mediterranean mariculture fish species, J. Appl. Ichtyol., 23: 70-73
32. Rombout, J.H.W.M., Bot,H.E., Taverne- Thiele, J.J. (1989). Immunological importance of the second segment of carp.II. Characterization of mucosal leucocytes. J.Fish Biol., 35:167-178
33. Schladot, J.D., Backhaus,F., Ostapczuk,P., Emons,H., (1997). Eel-pout (*Zoarces viviparus*) as a marine bioindicator .Chemosphere, 34:2133–2142.
34. Sigma- Aldrich (2006): Naphthol AS-D Chloroacetate Esterase and α- Napthyl Acetate Esterase (Procedure No.90)
35. Smith, C.G., Lewis, W.M., Kaplan, H.M., (1952). A Comparative Morphologic and Physiologic Study of Fish Blood, The Progressive Fish-Culturist, 14:4, 169-172
36. Stains File (2012c): Lysochromes. http://stainsfile.info/StainsFile/theory/lysochrm.htm; pristupljeno 17.8.2013.
37. Steel., D.M., Whitehead,A.S. (1994.). The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. Immunol. Today, 15: 81-88
38. Stegeman, J.J., M. Brouwer, R.T. DiGiulio, L., Forlin, B.A. Fowler, B.M. Saunders and P.A. Van Veld (1992) Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. U: R.J. Hugett, R.A. Kimerle, P.H. Merle, Jr. and H.L.Bergman, eds., Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 237-339.
39. Strober W. (2001): Wright-Giemsa and nonspecific esterase staining of cells. Curr Protoc Immunol. App. 3C. doi: 10.1002/0471142735.ima03cs21
40. Tigano C. , Tomasello B., Pulvirenti V., Ferrito V., Copat C., Carpinteri G., Mollica E., Sciacca S., Renis M-., (2009) Assessment of environmental stress in *Parablennius sanguinolentus* (Pallas,1814) of the Sicilian Ionian coast, Ecotoxicology and Environmental Safety, 72:1278-1286
41. Vázquez, G.R., Guerrero, G.A. (2007), Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes), Tissue and Cell, 39: 151-160
42. WebPath (2012): Anatomy-Histology Tutorials http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/SUDANF.PDF, pristupljeno 17.8.2013.

43. Wolke, R.E., (1992.). Piscine macrophage aggregates: a review. Annu. Rev. Fish Dis., 2:28-91
44. Zapata, A.G. (1979), Ultrastructural study of the teleost fish kidney, Dev. Comp. Immunol., 3: 55-65
45. Zapata, A.G., Chibá, A., Varas, A., (1996), The fish immune system:Organism, pathogen, and environment, Academic Press, Inc.