Utjecaj in vitro stimulacije perifernih mononuklearnih stanica krvi konkavalinom A na morfometrijske karakteristike limfocita

Šokičić, Mira

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:170016

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

VETERINARSKI FAKULTET

Mira Šokičić

Utjecaj *in vitro* stimulacije perifernih mononuklearnih stanica krvi konkavalinom A na morfometrijske karakteristike limfocita

Diplomski rad

Zagreb, 2017

Zavod za patološku fiziologiju

Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Predstojnica: prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

Mentorice: prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas

izv. prof. dr. sc. Kristina Matković

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. **prof. dr. sc. Mirna Robić**
2. **izv. prof. dr. sc. Kristina Matković**
3. **prof. dr. sc. Nina Poljičak Milas**
4. **doc. dr. sc. Maja Belić (zamjena)**

ZAHVALA

Da nije moje obitelji, ne bi bilo ni mene, i zato im neizmjerno hvala. Hvala i na svakoj riječi potpore, utjehe i pohvale, pa i na trenutcima nerazumijevanja - znam da je ispred svega bila ljubav. Hvala mojim kolegama, koji su prerasli u prijatelje za cijeli život i bili najbolji suputnicina putu do diplome. Svaki sat nastave, svako spremanje ispita, kave u "Sedmici", fešte i izlasci, putovanja i tereni, svaki prolaz, pa i pokoji pad ispita, sve je s njima bilo ljepše. Srdačno se zahvaljujem i svojim divnim mentoricama, prof. dr. sc. Nini Poljičak Milas i izv. prof. dr. sc. Kristini Matković, za pruženu priliku i pomoć pri izradi ovog diplomskog rada.

POPIS PRILOGA

Slika 1. CD4+ i CD8+ T-limfociti

Slika 2. Limfociti u goveda

Slika 3. Plazma stanica

Slika 4. Citotoksični limfocit ubija tumorsku stanicu

Slika 5. Reaktivni limfociti

Slika 6. Atipični limfociti (*Big blue cells*)

Slika 7. Morfometrijska analiza limfocita

Slika 8. Limfociti prije inkubacije, MGG 100X objektiv

Slika 9. Limfociti nakon 48 sati inkubacije s konkavalinom A, MGG 100x objektiv

Tablica 1. Morfometrijski pokazatelji stanice limfocita i njihovih jezgara prije i nakon 48h inkubacije s konkavalinom A

SADRŽAJ

1. UVOD 5
2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA 6
2.1. Morfometrija 6
2.2. Konkavalin A 8
2.3. Funkcija limfocita 9
2.4. Biologija T-limfocita 13
2.5. Morfologija limfocita 15
3. MATERIJALI I METODE 19
3.1. Podrijetlo uzoraka 19
3.2. Izolacija mononuklearnih leukocita iz pune krvi goveda 20
3.3. Aktivacija mononuklearnih leukocita konkavalinom A 21
3.4. Morfometrijska analiza limfocita 22
3.5. Statistička obrada podataka 23
4. REZULTATI 24
5. RASPRAVA 27
6. ZAKLJUČCI 29
7. LITERATURA 30
8. SAŽETAK 36
9. SUMMARY 37
10. ŽIVOTOPIS 38

1. UVOD

Limfociti su stanice stečenog imunosnog sustava koje prepoznaju strani materijal (antigene) s visokim stupnjem specifičnosti. Razlikujemo dvije glavne populacije limfocita, B-limfocite, koji sazrijevaju u koštanoj srži, i T-limfocite, koji sazrijevaju u timusu. T-limfociti proizvode različite citokine koji imaju nekoliko presudnih uloga u urođenoj imunosnoj obrani. Oni izazivaju vrućicu koja ubrzava imunosni odgovor; potiču oslobađanje proteina akutne faze iz jetre, i što je još važnije, privlače neutrofile i monocite na mjesto napada mikroorganizama. Neki citokini proizvedeni od pomoćničkih T-limfocita potrebni su za diobu i diferencijaciju B-limfocita, kao i za same T-limfocite koji su vezali antigen, a neki jako povećavaju sposobnost fagocitoze makrofaga. Stoga, bez sudjelovanja pomoćničkih T-limfocita ne funkcionira ispravno ni humoralna niti stanična imunosna obrana (SJAASTAD i sur., 2102.).

Opća proliferativna sposobnost T-limfocita procjenjuje se *in vitro* stimulacijom biljnim mitogenima, fitohemaglutininom (PHA) i konkavalinom A (ConA). Nakon izlaganja mitogenima i stimulacije imunosnog sustava limfociti mogu postati veći, kao uvod u blastnu transformaciju, te imaju obilnu tamno modru i granuliranu citoplazmu (KAY, 1980.). Navedene promjene mogu dovesti do povećanja i/ili abnormalnosti stanice i jezgre, te promjene njihovog međusobnog odnosa, što se može kvantificirati morfometrijom.

Ovaj diplomski rad obradit će rezultate morfometrijskih mjerenja površine, opsega, dužine, širine, najmanjeg i najvećeg polumjera, konveksne površine ili zakrivljenosti te faktora zaokruženosti limfocita i jezgre te nukleo-citoplazmatskog omjera prije i nakon *in vitro* stimulacije perifernih mononuklearnih stanica krvi sa konkavalinom A s ciljem prosudbe značaja digitalne analize morfometrijskih pokazatelja u procjeni transformacije imunokompetentnih stanica.

2. PREGLED REZULTATA DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

2.1. Morfometrija

Morfometrija (morfos – oblik, metrija – mjerenje) se definira kao kvantitativni opis geometrijskih struktura u svim dimenzijama (BAAK, 1985.). Primjenjuje se na različitim poljima dijagnostike u kliničkim laboratorijima te omogućuje numeričku ocjenu i najsuptilnijih promjena nedostupnih vizualnom pregledu (OBERHOLZER i sur, 1991.; NAFE, 1991.; RUSSACK, 1994.). Numeričkom objektivizacijom opaženih struktura omogućuje se reproducibilnost metode, a od velikog značenja je što se može koristiti standardno obrađeni materijal (OBERHOLZER i sur., 1991.). Osim toga, rezultati mjerenja (primarni podaci) mogu se koristiti za izračun novih podataka (sekundarni podaci), a svi se mogu statistički obraditi (BAAK, 1985.; OBERHOLZER i sur., 1991.). Prednost joj je i u tome što je jeftina i tehnički jednostavna (BAAK, 1985.), a mogu se određivati različiti planimetrijski pokazatelji (VAN DIEST i BAAK., 1991.). Sistem za slikovnu analizu sastoji se od mikroskopa, monitora, kamere visoke rezolucije, računala te programa za prihvat i analizu slike. Uz pomoć video kamere, svjetlosni mikroskop pretvara sliku u analogni električni signal koji se potom u računalu digitalizira u elemente slike nazvane pikseli (BARTELS i THOMPSON, 1994.). Najčešće se koristi metoda interaktivne računalne analize slike.

Morfometrijske pokazatelje dijelimo na: 1. Jednostavne pokazatelje (površina, opseg, promjer, polumjer, najduža i najkraća os objekta); 2. Faktore oblika koji mjere (ne)pravilnosti objekta, a izražavaju se kao nejedinične vrijednosti: faktor zakruženosti objekta (CROCKER I sur., 1983.) koji mjeri stupanj zaokruženosti pojedinačnog objekta ($FF=4\pi$ x površina/opseg^2), ima vrijednost 1 za krug, <1 za elipse te <<1 za jako nepravilne oblike (nepravilni rubovi ili varijabilnost oblika); faktor izduženosti objekta (omjer dužine i širine); konveksna površina, definirana kao površina mnogokutnika opisanog na ispitivanom obliku tangentama na njegovim stranama (MURATA i sur., 2003.; NAMYSLOWSKI i sur., 2004.) te faktor sličan stupnju ispunjenosti, koji predstavlja omjer površine i konveksne površine; 3. Pokazatelje teksture: površina nakupine, broj elemenata *po nakupini, udaljenost između*

nakupina, itd.; 4. Dvofazne pokazatelje: nukleo-citoplazmatski omjer (N/C) i, nukleo-nukleolarni omjer (N/N).

Dosadašnja istraživanja ukazuju na potrebu određivanja morfometrijskih i morfofunkcionalnih pokazatelja krvnih stanica u rasvjetljavanju adaptivnih mehanizama, odnosno staničnih odgovora na stres (RENAUDEAU i sur., 2012.). Morfometrija, odnosno računalna analiza slike primjenjuje se za točno prepoznavanje i brojanje stanica na histološkim preparatima (MARKIEWIC i sur., 2006.), a humana medicina već prihvaća i koristi morfometriju u dijagnozi i prognozi malignih bolesti s obzirom da im omogućuje analizu promjena u cijeloj stanici, citoplazmi, jezgri i njezinim strukturama (DALTON, 1992.; RUSSACK, 1994.). Važna fiziološka značajka je volumen stanice. Na volumen stanice utječu osmolarnost, migracijski procesi, stanični rast i metabolička regulacija. Čak i kratkotrajne promjene volumena mogu uzrokovati prilično znatne promjene funkcije stanice, a velike promjene u volumenu mogu narušiti cjelovitost membrane i strukturu citoskeleta, stoga je važno detektirati morfološke promjene samih stanica i njezinih elemenata (WEHNER i sur., 2003.). BINS (1985.) je opisao da je abnormalna i smanjena funkcija bijelih krvnih stanica često posljedica modificirane morfologije stanica, te da je za njezinu procjenu vrlo korisna matematička analiza staničnih morfometrijskih pokazatelja. Opisano je već da leukociti u životinja i ljudi u stanjima fiziološke napregnutosti organizma u životinja i ljudi mijenjaju funkcionalna svojstva (COLDITZ, 2002.). Rezultati dosadašnjih morfometrijskih istraživanja limfocita kod pilića pokazali su morfološke karakteristike transformacije imunokompetentnih stanica prilikom cijepljenja protiv Marekove bolesti (KARDUM i sur., 2011.; KARDUM i sur., 2016.) pa su prema tome krvni parametri bitni pokazatelji fiziološkog, patološkog i nutritivnog stanja organizma, a njihove promjene mogu se koristiti i u procjeni metaboličkog statusa životinje (BABATUNDE i sur., 1992.).

2.2. Konkavalin A

Lektini su proteini ili glikoproteini, uglavnom biljnog podrijetla, koji vežu glukozu. Djelovanja su im različita, primjerice poticanje stanične diobe, aktivacija imunosnog sustava, aglutinacija eritrocita, poticanje proizvodnje citokina itd. Mnoge biljke sadrže visoke koncentracije lektina u sjemenkama, zbog čega su neke izuzetno otrovne.

Od lektina koji utječu na diobu bijelih krvnih stanica najpoznatiji su konkavalin A (*Concavalin A;* Con A) iz sjemenki biljke *Canavalia ensiformis*, te fitohemaglutinin (*Phytohaemagglutinin;* PHA) iz *Phaseolus spp.* koji potiču diobu T-limfocita. Osim mitogene uloge, konkavalin A inducira programiranu smrt stanice putem apoptoze u mitohondrijima i autofagije. Zabilježeno je da i aktivira stanični faktor aktiviranih T-limfocita (engl. *nuclear factor of activated T-cells*, NFAT), koji je bitan u razvoju i funkciji imunosnog sustava (GOLDSTEIN i PORETZ, 2012.).

Na poticanju diobe limfocita periferne krvi zasniva se čitav niz laboratorijskih testova. Najpoznatiji testovi koji se zasnivaju na diobi limfocita u uvjetima in vitro su test analize strukturnih aberacija kromosoma, test izmjene sestrinskih kromatida i mikronukleus test. Ovi testovi uključuju 48-, odnosno 72-satno kultiviranje krvi u kontroliranim uvjetima *in vitro*. Uzorci krvi nasađuju se u hranjivu podlogu, koja sadrži potrebne mikronutrijente neophodne za rast stanica, te različite druge specifične sastojke (ovisno o metodi). Postupci izrade preparata koji se mikroskopski analiziraju također su ovisni o metodi. Primjerice, ako je cilj proučiti strukturna oštećenja kromosoma, potrebno je dobiti što veći broj stanica u metafazi, pa se zadnja 2-3 sata u kulture dodaje inhibitor diobenog vretena (kolhicin). Po završetku kultiviranja stanica pristupa se izradi preparata, koja uključuje obradu hipotoničnom otopinom, fiksiranje taloga (3:1 metanol - ledena octena kiselina) te niz uzastopnih centrifugiranja i ispiranja taloga. Na kraju ostaje pročišćena suspenzija limfocita koja se nakapava na predmetna stakalca, a ona se nakon sušenja na zraku boje (najčešće Giemsa bojom). Dobiveni se preparati mikroskopski analiziraju. Gotovi preparati nakon sušenja mogu se obraditi i prema drugim specifičnim protokolima, primjerice obojiti fluorescentnim bojama, otopinom srebro-nitrata, podvrgnuti nekoj od tehnika pruganja kromosoma ili fluorescencijskoj in situ hibridizaciji (*Fluorescence In situ Hybridisation;* FISH), koja omogućuje otkrivanje vrlo specifičnih oštećenja na kromosomima (ANONIMUS, 2017.).

2.3. Funkcija limfocita

Kao i sve ostale stanice krvi, limfociti potječu od zajedničke matične stanice u koštanoj srži. Limfociti postepeno migriraju u organe imunosnog sustava, limfatične organe, u kojima se dalje umnažaju. Dvije su grupe limfatičnih organa, primarni limfatični organi, timus i koštana srž, u kojima limfociti sazrijevaju i postaju sposobni za borbu protiv antigena, i sekundarni limfatični organi, koji uključuju limfne čvorove, slezenu i limfatično tkivo sluznica različitih organa, u kojima se odvija većina stečenih imunosnih odgovora. Dva ključna obilježja stečenog imunosnog odgovora su specifičnost i pamćenje (SJAASTAD i sur., 2102.).

Sazijevanje limfocita, kao što je gore spomenuto, odvija se u timusu ili u koštanoj srži, koji su primarni limfatični organi u tijelu. Limfocite koji sazrijevaju u timusu nazivamo T-limfociti, dok one koji sazrijevaju u koštanoj srži nazivamo B-limfociti. U preživača, a vjerojatno i u ostalih domaćih životinja, u sazrijevanju B-limfocita sudjeluje limfatično tkivo u ileumu, Peyerove ploče (WOOD i QUIROZ-COCHA, 2010.). U krvnom razmasku ili histološkom preparatu, nije moguće razlikovati T-limfocite od B-limfocita, pa postoje brojne imunološke metode za njihovo razlikovanje. Sve metode temelje se na činjenici da T-limfociti i B-limfociti na svojoj površini eksprimiraju niz jedinstvenih molekula koje se mogu identificirati pomoću antiseruma. B-limfociti eksprimiraju imunoglobuline kao antigenske receptore (engl. *B-cel lreceptors*, BCR), koji se razlikuju od antigenskih receptora T-limfocita (engl. *T-cell receptors*, TCR). Ostale molekule karakteristične za T-limfocite su CD3, CD4 i CD8 (engl. *cluster of differentiation*, CD, odnosno diferencijacijski biljezi), a molekule karakteristične samo za B-limfocite su CD21 te Fc i C3b receptori (TAKAHAMA, 2006). Za svaki limfocit, sazrijevanje rezultira formiranjem receptora jedinstvene strukture umetnutim u staničnu membranu. Proces sazrijevanja je automatski i unaprijed programiran, pa nije ovisan o antigenu. Sposobnost limfocita da razlikuju jedan antigenski epitop od drugog stečena je i daje ekstremni stupanj specifičnosti imunosnom odgovoru (SUTER i sur., 2007.).

Nakon završetka procesa sazrijevanja u primarnim limfatičnim organima, limfociti postupno prelaze u krv i putuju do sekundarnih limfatičnih organa, limfnih čvorova, slezene i limfatičnog tkiva u sluznicama probavnog sustava, mokraćnog sustava i dišnih prohoda, te se tamo nastavlja dioba limfocita. Novonastale stanice kćerke uvijek imaju istu vrstu receptora

nastaničnim membranama i stoga pripadaju istom klonu kao i roditeljska stanica (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Stvaranje i sazrijevanje limfocita, te naknadna migracija zrelih limfocita u sekundarne limfatične organe, traje tijekom cijelog života, ali se nakon adolescencije svi limfociti stvaraju u sekundarnim limfatičnim organima. Također, limfociti neprekidno recirkuliraju između krvnih žila, intersticijske tekućine i limfnih čvorova, pa su česti susreti s antigenima. Limfocite koji još nisu bili izloženi svojem specifičnim antigenu (za koji su unaprijed programirani) nazivamo naivni (djevičanski) limfociti, a svoj specifični antigen najčešće susreću u sekundarnim limfatičnim organima (JAIN, 1993.)

Receptori za antigene na limfocitima kodirani su razmjerno malim brojem gena. Međutim, kako se ti geni mogu kombinirati na različite načine, mogu se formirati milijuni različitih antigenskih receptora. Stanična membrana svakog zrelog limfocita sadrži na tisuće kopija istovjetnih antigenskih receptora. Zreli limfocit i sve njegove stanice kćeri imaju istovjetne receptore. Limfociti sa istovjetnim receptorima, zajedno predstavljaju klon. Limfociti unutar klona potječu od jednog, ili od nekoliko limfocita. Tijelo sadrži milijune različitih klonova limfocita od kojih svaki ima svoj specifični receptor, pa limfocitni sustav može vezati i napasti gotovo sav strani materijal koji ulazi u organizam. Kada strani antigen uđe u tijelo, vrlo brzo susretne limfocite s receptorima koji mogu prepoznati taj antigen i vezati se za njegove epitope, što se događa u sekundarnim limfatičnim organima (DAY, 2010.).

Svaki limfocit genski je predodređen da reagira samo s jednim antigenskim epitopom. To nazivamo klonska selekcija zato što struktura antigena određuje koji će klon sudjelovati u imunosnoj reakciji. Imunosni sustav, putem vezanja specifičnog antigena, prepoznaje neki antigen kao strani (AGACE, 2006). Nakon vezanja za antigenski epitop, limfocit se aktivira. Aktivacija rezultira eksprimiranjem membranskih receptora što limfocitu omogućuje vezanje citokina, stvorenih tijekom imunosnog odgovora, koji signaliziraju proliferaciju. Slijedi brzo dijeljenje stanica i sve novostvorene stanice imaju receptore za vezanje antigena identične onima na roditeljskom limfocitu. Većina se stanica diferencira u aktivne plazma stanice, dok ostale postaju neaktivni, dugoživući, memorijski limfociti. Plazma stanice počinju lučiti protutijela koja se specifično vežu s antigenom, čime ga označavaju za uništenje (DE LIBERO i MORI, 2005.). Protutijela ne mogu ući u stanice i suzbiti mikrobe koji žive unutar

stanice. Napad na takve mikrobe posredovan je aktiviranim T-limfocitima, koji ne proizvode antitijela. T-limfociti osobito su važni za razaranje stanica inficiranih virusima i stanica raka. Kada antigen aktivira klon T-limfocita, tada se stanice unutar tog klona počinju brzo dijeliti. Većina stanica kćeri transformira se u izvršne, odnosno efektorne T-limfocite koji napadaju sve stanice s antigenom koji je izazvao aktivaciju. Takve T-limfocite nazivamo citotoksičnima (GODFREY i BERZINS, 2007).

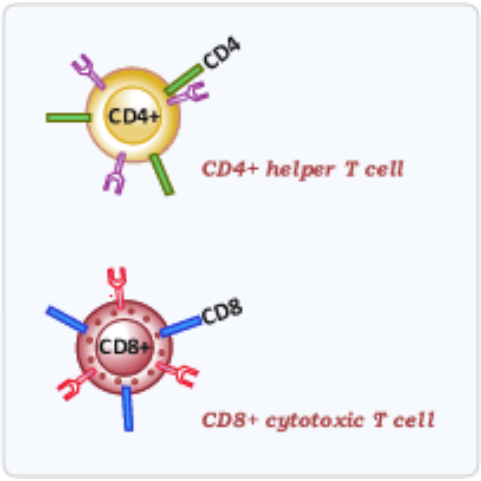
Povećanje broja stanica s identičnim receptorima nazivamo klonalnom ekspanzijom, koja osigurava da će broj aktiviranih limfocita držati korak s brojem mikroorganizama. Limfociti koji još nisu bili izloženi njihovom specifičnom antigenskom epitopu ostaju neaktivni. Kao što je spomenuto, takve stanice nazivamo djevičanskim limfocitima. Limfociti koji neprestano recirkuliraju tijelom prvenstveno su djevičanski lifmociti, sve dok ne susretnu svoj specifični antigen. Limfociti koji reagiraju na antigene vlastitog tijela, tijekom procesa sazrijevanja budu ubijeni i fagocitirani, čime se sprječava imunosna reakcija protiv vlastitih tkiva i organa, i promiče imunosna tolerancija prema vlastitim antigenima (SJAASTAD i sur., 2102.).

Funkcionalno se razlikuju djevičanski (naivni) i pamteći (memorijski) limfociti. Djevičanski su oni koji još nisu došli u dodir s antigenom za kojeg su preprogramirani, dok su pamteći oni koji su nakon dodira s antigenom i imunosnog odgovora zadržali sjećanje na taj događaj (DAY i SCHULTZ, 2013.). Vezanje limfocita na njegov specifični antigen potiče klonalnu ekspanziju. Odabrani klon B-limfocita diferencira u plazma stanice koje proizvode protutijela i dugoživuće memorijske limfocite. Protutijela ne mogu ući u stanice. Memorijski limfociti imaju potpuno iste antigenske receptore kao i ishodišni klon. Memorijski limfociti omogućuju veću produkciju protutijela kod ponovnog susreta s istim antigenom (SUTER i sur., 2007.). Ova proizvodnja protutijela nazvana je primarni odgovor. Odgoda uglavnom nastaje zbog vremena potrebnog da limfocit s odgovarajućim receptorom dođe u kontakt s antigenom. Limfociti također moraju proći razvojni stadij proliferacije (umnažanja) prije nego što može početi znatna proizvodnja protutijela. Zbog toga, ako je antigen dio određenog patogenog mikroorganizma, životinja može i uginuti prije nego se uspostavi učinkovit, stečeni imunosni odgovor. S druge strane, kada u tijelo uđe antigen s kojim se organizam već suočio, proizvodnja protutijela mijenja karakter, rezultirajući sekundarnim odgovorom. Tada su već, kao rezultat prijašnjeg napada, prisutni brojni memorijski limfociti koji prepoznaju antigen, te

će oni i njihovo potomstvo biti u stanju proizvesti veliku količinu protutijela, često u roku od par sati. Stoga će napad na antigen biti brži i snažniji. Slična razlika postoji također između primarnog i sekundarnog odgovora stečene stanične imunosti, za koji su odgovorni T-limfociti. Upravo se na razlici između primarnog i sekundarnog odgovora zasniva postupak vakcinacije (SJAASTAD, 2012.).

2.4. Biologija T-limfocita

Aktiviranje T-limfocita specifičnih za antigen osnova je pokretanja imunoloških mehanizama i nastanka stečene imunosti. T-limfociti razlikuju se međusobno prema eksprimiranim TCR-ovima i pridruženom kompleksu CD3. Većinu T-limfocita u organizmu dijelimo na dvije skupine: pomoćničke T-limfocite (Th) koji eksprimiraju molekulu CD4; te citotoksične T-limfocite (Tc) koji eksprimiraju molekulu CD8 (Slika 1.).



Slika 1. CD4+ i CD8+ T-limfociti – slika preuzeta s http://missinglink.ucsf.edu/lm/immunology_module/prologue/objectives/obj07.html

CD4+ T-limfocite zovemo pomoćnički limfociti, a osnovna im je funkcija pomaganje u stvaranju protutijela (humoralna imunost) ili citotoksičnosti (stanična imunost). Imaju također važnu ulogu u supresiji imunosnog odgovora (HORIUCHI i sur., 2007.).

Opisano je najmanje sedam podtipova CD4+ T-limfocita, od kojih su prva dva T1-pomoćnički (Th1) i T2-pomoćnički (Th2). Razlika među njima je funkcionalne prirode jer, ovisno o tome koje citokine proizvode, pomažu u različitim imunosnim procesima. Citokini su topljive proteinske molekule male molekulske mase (manje od 80 kDa). Posrednici su koji se vežu na specifični citokinski receptor eksprimiran na stanici koja ih je izlučila (autokrino djelovanje) ili nekoj drugoj susjednoj stanici (parakrino djelovanje) (IZCUE i POWRIE, 2008).

Th1-limfociti proizvode IL-2 i interferon gamma (IFN- γ). Interferon γ stimulira citotoksične limfocite u staničnom imunosnom odgovoru. Također može pomoći B-limfocitima koji će se diferencirati u plazma-stanice što proizvode IgG (citotoksični imunosni odgovor) (BONECCHI i sur., 1998).

Th2-limfociti proizvode IL-4, IL-5, IL-9 i IL-13 te pomažu B-limfocitima da se diferenciraju u plazma-stanice koje luče protutijela IgG, IgA i IgE u humoralnom imunosnom odgovoru (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Nedavno je opisan nov podtip CD4+ T-limfocita, Th17-limfociti koji luče citokine IL-17A, IL-17F, IL-21 i IL-22. Njihova se funkcija još istražuje, ali se čini da je djelovanje komplementarno Th1-limfocitima u posredovanju kod upale, autoimunosnih i tumorskih bolesti (BELL i sur., 1998).

Citotoksični limfociti mogu lučiti IFN- γ i faktor nekroze tumora alfa (TNF-α), koji se vežu na citokinske receptore ciljne stanice i tako uzrokuju njenu apoptozu. Nakon uništavanja ciljne stanice, citotoksični limfocit se odvoji od propale stanice i u potrazi je za novom metom (RAULET i VANCE, 2006.).

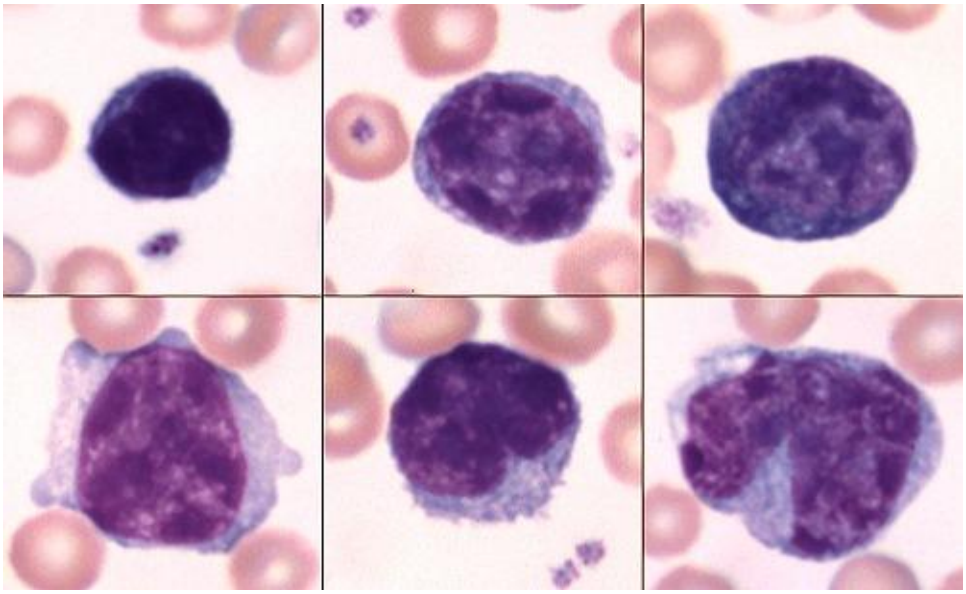
Kod većine životinjskih vrsta, T-limfociti koji eksprimiraju γδ-TCR s CD3 kompleksom primarno se nalaze u koži, ali ih kod preživača nalazimo u većim količinama i u krvi. γδ-TCR slabo su karakterizirane, ali se zna da se rano razvijaju u timusu te da imaju ulogu u ranom imunosnom odgovoru zbog svojstva prepoznavanja konzerviranih mikrobnih molekula (HEIN i DUDLER, 1997.).

Podskupovi γδ-TCR koje mogu proizvesti bilo IFN-γ ili IL-4 mogu biti važni u stvaranju citokinskog okruženja za naknadni razvoj CD4+ αβ+ T-stanični odgovor (CHOUAIB i sur., 1997.).

2.5. Morfologija limfocita

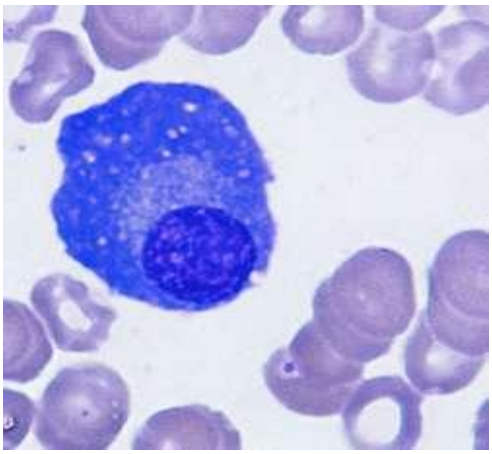
Limfociti su heterogena skupina stanica s obzirom na morfologiju i funkciju. Morfološki se klasificiraju kao mali i veliki limfociti (SJAASTAD i sur., 2102.). Limfociti imaju veliki omjer jezgre i citoplazme te variraju u veličini. Najveći omjer jezgre i citoplazme nalazimo kod malih limfocita (HARVEY, 2001.)

Mali limfociti promjera su 6 - 9 μm, imaju veliku okruglu jezgru sa zgusnutim kromatinom koju okružuje vrlo mala količina citoplazme s nekoliko organela. Veliki limfociti promjera su 12 – 15 μm, s više citoplazme u kojoj se nalazi veći broj organela i jezgra s manje zgusnutim kromatinom. Velike limfocite koji su u diobi aktivirani antigenom nazivamo limfoblastima (Slika 2.).



Slika 2. Limfociti u goveda – slika preuzeta s http://www.eclinpath.com/hematology/morphologic-features/white-blood-cells/normal-leukocytes/bvlycomp/

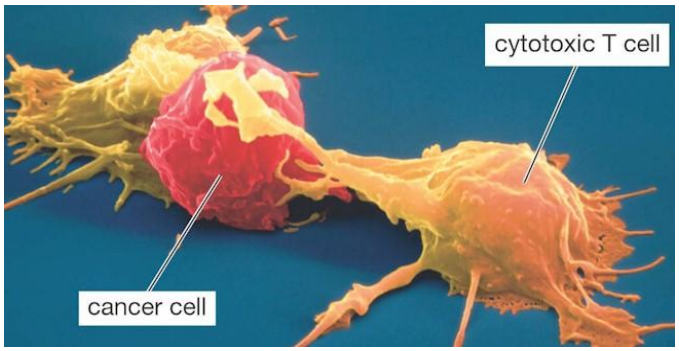
Plazma-stanice završni su stadij razvoja B-limfocita i one izlučuju veliku koncentraciju imunoglobulina. Ovalnog su oblika s ekscentrično smještenom okruglom jezgrom, u kojoj je kromatin raspoređen poput žbica na kotačima. Citoplazma im je puna organela koji sintetiziraju bjelančevine (Golgijev aparat i endoplazmatski retikulum), a te sintetizirane imunoglobuline možemo dokazati imunohistokemijskim postupcima (Slika 3.)



Slika 3. Plazma stanica – slika preuzeta s http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/plasma+cell

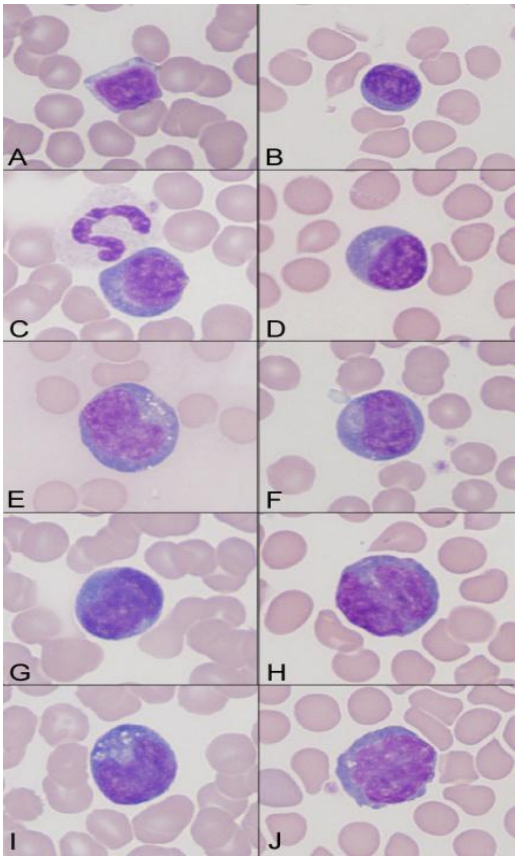
Citoplazma mirujućih (nestimuliranih) limfocita svijetloplave je boje, s okruglom jezgrom koja može biti i ovalna do uvučena. Nuklearni kromatin varira od gusto obojenog do mrljastog obojenja jezgre sa glatkim kromatinom. Limfociti u zdravih preživača mogu imati prstenaste nakupine kromatina u jezgri koje mogu biti zamijenjene sa jezgricama. Posljedično tome, valja biti oprezan pri donošenju dijagnoze limfoidne neoplazije kod teladi temeljene na nalazu niskog broja limfoblasta u krvi. Većina limfocita u krvi domaćih životinja su male do srednje veličine, ali mogu biti prisutni i veliki limfociti. Kod preživača su često veće stanice s više citoplazme u odnosu na druge životinjske vrste, pa ih je nekad teško razlikovati od monocita. U tom slučaju, ako nismo sigurni je li stanica limfocit ili monocit, klasificiramo ju kao limfocit, jer su oni obično brojniji u krvi preživača od monocita (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Nizak postotak limfocita u krvi ima crvene ili purpurne granule u citoplazmi. Takve stanice generalno su veličinom srednje do velike s više citoplazme i nižim omjerom jezgre i citoplazme od malih limfocita. Takvi, granulirani limfociti, predstavljaju citotoksične limfocite ili stanice prirodne ubojice (NK1) (Slika 4.).



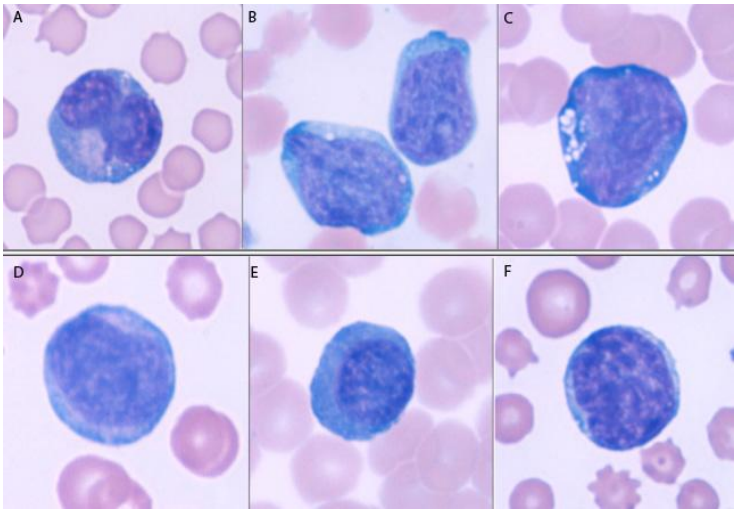
Slika 4. Citotoksičan limfocit ubija tumorsku stanicu – slika preuzeta s https://www.howitworksdaily.com/watch-a-white-blood-cell-attack-a-cancer-cell/

Postoje i reaktivni limfociti, čija je jezgra zavojita i koji nalikuju monocitima, osim što je njihova citoplazma bazofilnija nego citoplazma monocita (Slika 5.). Takvi limfociti proliferiraju kao odgovor na antigensku stimulaciju te im se povećava veličina. Većina ih ostaje u perifernom limfoidnom tkivu, ali nekolicina ulazi u cirkulaciju (RAULET i VANCE, 2006.).



Slika 5. Reaktivni limfociti – slika preuzeta s http://www.eclinpath.com/hematology/morphologic-features/white-blood-cells/reactive/

Reaktivne limfocite nekad je teško razlikovati od neoplastičnih, pa se za takve limfocite koristi naziv atipični limfociti (engl. *big blue cells*) (Slika 6.). Neki reaktivni limfociti su plazmacitoidni te sadrže ružičaste ili plavičaste inkluzije (Russellova tijela) u citoplazmi, koje su sastavljene od imunoglobulina koji sadrži dilatirani endoplazmatski retikulum (HARVEY, 2001.).



Slika 6. Big blue cells – slika preuzeta s http://www.eclinpath.com/hematology/morphologic-features/white-blood-cells/reactive/bigbluecells-2/

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Podrijetlo uzoraka

Istraživanje je provedeno na obojenim arhiviranim razmazima učinjenim iz uzoraka izdvojenih leukocita prije i poslije *in vitro* stimulacije konkavalinom A. Uzorci potječu iz pokusa obavljenog u svrhu izrade doktorske disertacije dr. sc. Mislava Đidare „Učinak lanenog sjemena na sadržaj masnih kiselina mlijeka, antioksidativni status i imunost mliječnih krava“, a nisu iskorišteni niti prikazani u tekstu disertacije niti tijekom postupka obrane disertacije.

Za istraživanje su uzorkovane mliječne krave na farmi Blata, vlasnika Pave Buljanovića u mjestu Malinovac. Uzorkovano je ukupno 45 krava pasmine holštajn tijekom drugog graviditeta i rane laktacije koje su bile smještene u istim mikroklimatskim uvjetima. Sve su krave prošle prvu laktaciju, te su zasušene 40 dana prije početka istraživanja. Pokus je trajao od šestog tjedna suhostaja do 42. dana laktacije. Za izvođenje pokusa dobivene su sve potrebne dozvole (Uprava veterinarstva Ministarstva poljoprivrede i Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu, Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu). Kontrolna skupina krava (15 životinja), uz standardni voluminozni dio obroka, hranjena je smjesom u kojoj je izvor masti bila sojina sačma, dok je kravama pokusnih skupina (P1 – 15 životinja i P2 – 15 životinja) izvor masti u smjesi bilo laneno sjeme. Kravama P2 pokusne skupine anorganski selen u premiksu bio je zamijenjen novom formulacijom organskoga selena (B-Traxsim).

Kravama je krv izvađena iz repne vene (*v. coccygealis*) 10 dana prije teljenja, dan nakon teljenja, 21. dan, te 42. dan laktacije. Korištene su epruvete s podtlakom s heparinom kao antikoagulansom (BectonDickinson, Plymouth, Engleska, Ujedinjeno Kraljevstvo). Iz pune heparinizirane krvi limfociti su izdvojeni modificiranim postupkom gradijenta gustoće primjenom Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka).

3.2. Izolacija mononuklearnih leukocita iz pune krvi goveda

Limfociti su izdvojeni iz pune heparinizirane krvi, primjenom Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka), postupkom modificiranog gradijenta gustoće fikolom (DALGAARD i sur., 2010.).

Postupak izdvajanja limfocita iz pune krvi:

1) U epruvetu je dodano 2 ml pune krvi, te pomiješano s apirogenim fosfatnim puferom (PBS) u omjeru 1:1. U drugu epruvetu je dodano 4 ml fikola (Histopaque®-1077). Pomoću sterilnih Pasteurovih pipeta krv s PBS-om naslojena je na fikol uz samu stijenku epruvete, te potom centrifugirana na 800 x *g* kroz 30 minuta pri 20 °C (IEC Centra® MP4R, International Equipment Company, Nashville, SAD).

2) Nakon centrifugiranja pomoću sterilnih Pasteurovih pipeta pokupljen je leukocitni prsten sa supernatantom i dodan u novu epruvetu već napunjenu s 5 ml PBS-a, pazeći pritom da se ne pokupi fikol ispod samog leukocitnog prstena. Zatim je dokapano još par kapi PBS-a da se dosegne razina epruvete od 10 ml. Epruveta je žustro promućkana, te centrifugirana na 600 x *g* kroz 10 minuta pri 20 °C.

3) Nakon centrifugiranja jednim potezom izliven je supernatant iz epruvete, preostali dio stanica na dnu ispran je s 5 ml staničnog medija (RPMI 1640 s 2 mM L-glutamina, 10% fetalni teleći serum (FBS), 10 i.j. penicilina, 100 µg streptomicina), sve je žustro promućkano i centrifugirano na 600 x *g* kroz 10 minuta pri 20 °C.

4) Nakon odlijevanja supernatanta, stanice odnosno limfociti razrijeđeni su u 1 ml hranjivog medija Instituta Roswell Park Memorial (RPMI), te je dodano još par kapi staničnog medija do razine epruvete od 2 ml.

5) Limfociti su izbrojani u Neubauerovoj komorici, izračunata je koncentracija stanica u uzorcima koja je iznosila između 3,5 x 10^6 i 7,5 x 10^6 te je dodavanjem određenog volumena RPMI medija koncentracija u uzorcima međusobno izjednačena prema formuli $c_1xV_1= c_2xV_2$.

3.3. Aktivacija mononuklearnih leukocita konkavalinom A

Nakon brojenja stanica u Neubauerovoj komorici i izjednačavanja koncentracije leukocita u uzorcima dodavanjem određenog volumena RPMI medija, pipetirano je u dvije jažice po 250 µl od svakog uzorka. U prvu jažicu dodano je 41,6 µl konkavalina A (Con A), dok je druga jažica dopunjena s 41,6 µl RPMI-a radi izjednačavanja volumena. Stanice su potom inkubirane 48h, pri 37 ºC i 5% CO_2 (Water-Jacketed Incubator 3250, ThermoFisherScientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

Izrada razmaza mononuklearnih leukocita

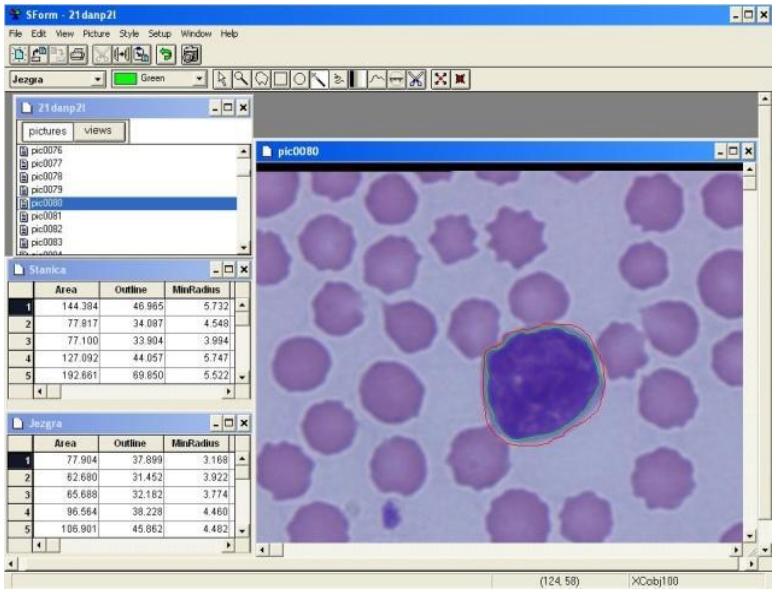
Iz uzoraka izoliranih mononuklearnih leukocita u RPMI hranjivom mediju učinjeni su razmazi istom tehnikom razvlačenja kao i za izradu krvnih razmaza. Nakon sušenja na zraku razmazi su obojani standardnom metodom po May-Grűnwald Giemsi.

Isti postupak izrade, sušenja i bojenja razmaza ponovljen je nakon inkubacije izoliranih mononuklearnih leukocita s konkavalinom A.

Odlukom Fakultetskog vijeća Veterinarskoga fakulteta u Zagrebu, a na prijedlog Povjerenstva za etiku u veterinarstvu Ur. broj: 251-61-01/139-15-2 od 15. srpnja 2015. godine dobivena je suglasnost o etičkoj prihvatljivosti za istraživanja uzoraka na koje se ne primjenjuje Zakon o zaštiti životinja (NN 135/2006, 37/2013) pod naslovom „Utjecaj *in vitro* stimulacije perifernih mononuklearnih stanica krvi konkavalinom A na morfometrijske karakteristike limfocita“ u okviru izrade diplomskoga rada.

3.4. Morfometrijska analiza limfocita

Morfometrija limfocita napravljena je na osobnom računalu s podržavajućim programom „SFORM“ (VAMSTEC, Zagreb). Sustav se sastoji od kamere visoke rezolucije u boji (Donpisha 3CCD) koja sliku pod imerzionim objektivom povećanja 100x iz svjetlosnog mikroskopa Olympus BX 41 digitalizira i prenosi u osobno računalo. Morfometrijska analiza limfocita provedena je na obojenim razmazima suspenzije izoliranih mononuklearnih leukocita u RPMI mediju. Razmazi koji su odabrani za morfometrijska mjerenja potjecali su od krava kontrolne skupine 21.dana laktacije. Ukupno je pretraženo 18 razmaza (devet prije inkubacije i devet nakon inkubacije s konkavalinom A), a po svakom razmazu je slikano i izmjereno najmanje dvadeset limfocita. Granice citoplazme i jezgre označavale su se interaktivno uz ručnu korekciju računalnim mišem te su određivani sljedeći morfometrijski pokazatelji stanica i njihovih jezgara: površina (μm^2), opseg (μm), konveksna površina (μm^2), najmanji i najveći polumjer, duljina i širina (μm), faktor pravilnosti (FF), te omjer jezgre i citoplazme (N/C) (Slika 7.).



Slika 7. Morfometrijska analiza limfocita

3.5. Statistička obrada podataka

Rezultati su analizirani u računalnom programu STATISTICA 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, SAD, 2013.). Kolmogorov-Smirnovim testom provjerena je normalnost raspodjele podataka. Za svaku kontinuiranu varijablu izračunat je medijan kao mjera centralne tendencije i vrijednost koja niz vrijednosti poredan po veličini dijeli na dva jednaka dijela, te gornji i donji kvartil kao mjeru disperzije ili stupnja varijabilnosti. Analiza razlika medijana mjerenih morfometrijskih pokazatelja limfocita prije i nakon aktivacije konkavalinom A učinjena je Kruskal-Wallis testom. Vrijednost p jednaka ili manja od 0,05 smatrala se statistički značajnom.

4. REZULTATI

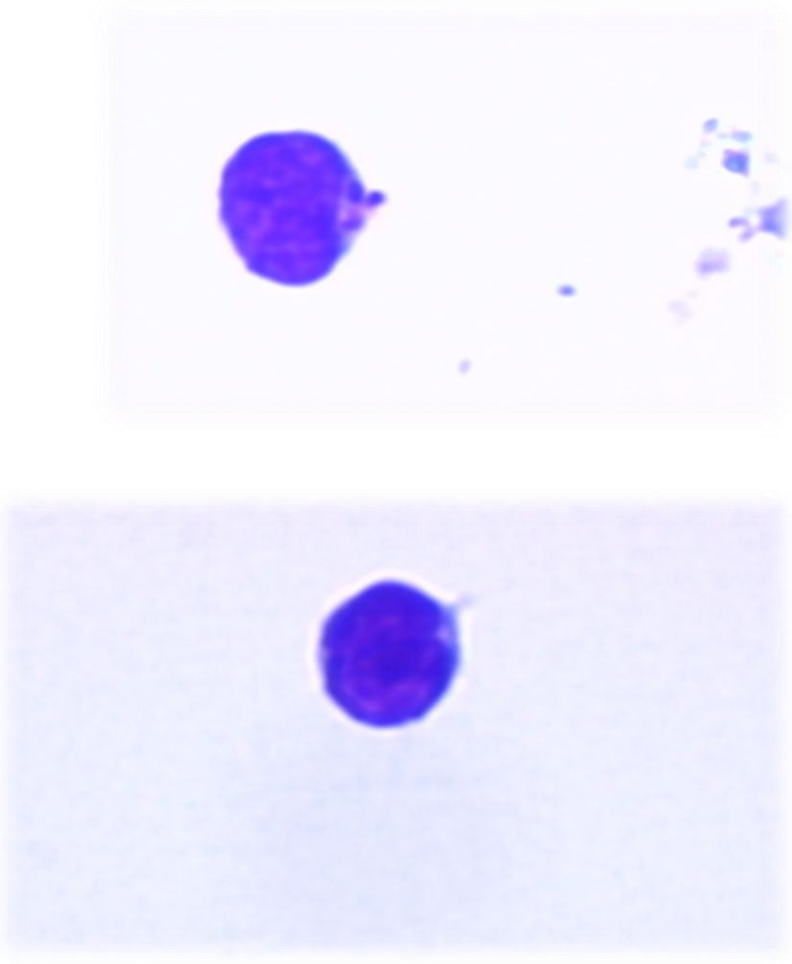
Tablica 1. Morfometrijski pokazatelji stanice limfocita i njihovih jezgara prije i nakon 48h inkubacije s konkavalinom A

Podaci su prikazani kao medijan te donji i gornji kvartil. Značajne razlike označene su kao * p< 0,05, **p<0,005

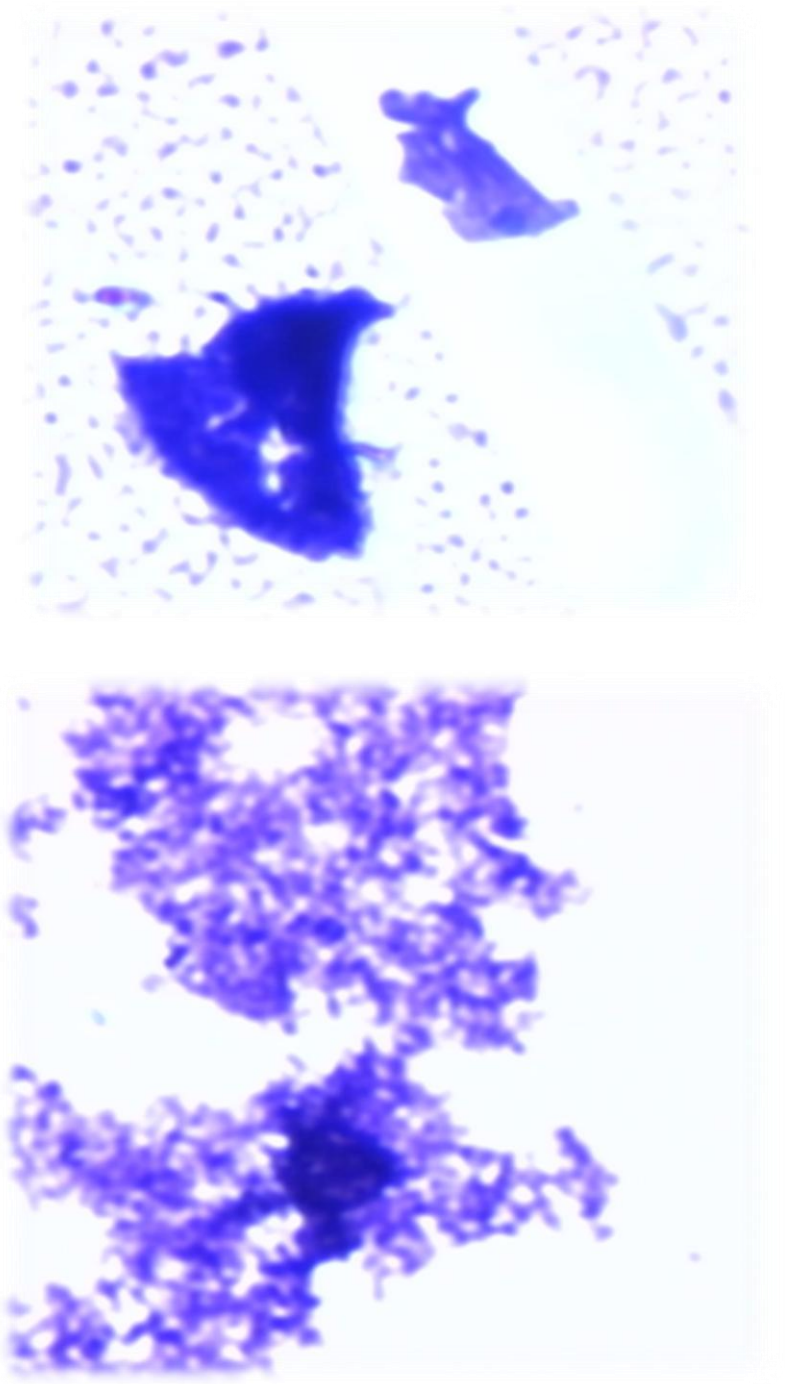
OBJEKT	POKAZATELJ	PRIJE INKUBACIJE	NAKON INKUBACIJE
STANICA N= 396	**Površina (μm^2)**	42,33 37,71-48,72	63,85* 29,75-114,31
	Opseg (µm)	25,77 23,60-27,93	32,58* 21,78-49,09
	Minimalni polumjer (µm)	3,08 3,05-3,37	3,04 2,27-4,03
	Maksimalni polumjer (µm)	4,38 4,05-4,88	5,62* 3,70-8,63
	Konveksna površina (μm^2)	44,01 38,46-51,49	71,09* 30,61-136,6
	Dužina (µm)	8,14 7,62-8,94	9,70 6,81-13,95
	Širina (µm)	7,02 6,86-7,67	9,16* 6,17-14,43
	Faktor pravilnosti (FF)	0,81 0,76-0,86	0,68 0,62-0,75**
JEZGRA N= 396	**Površina (μm^2)**	30,68 24,98-35,98	26,67 19,13-32,16
	Opseg (µm)	21,89 21,27-23,0	19,83 15,43-24,65
	Minimalni polumjer (µm)	2,29 2,04-2,75	1,67* 1,14-1,93
	Maksimalni polumjer (µm)	3,66 3,57-3,81	3,48 2,52-4,53
	Konveksna površina(μm^2)	32,02 26,36-36,89	28,80 20,61-35,15
	Dužina (µm)	6,80 6,14-7,29	6,25 4,52-8,11
	Širina (µm)	6,01 5,44-6,56	4,88* 3,61-5,89
	Faktor pravilnosti (FF)	0,81 0,80-0,85	0,63** 0,61-0,77
	Odnos jezgra/citoplazma	0,65 0,61-0,77	0,36** 0,27-0,43

Osnovne karakteristike limfocita i njihovih jezgara prije i nakon 48 sati inkubacije s mitogenom, konkavalinom A, prikazane su u tablici 1.

Iz tablice je vidljivo statistički značajno povećanje površine, opsega, maksimalnog polumjera, konveksne površine ($p<0,05$) te faktora pravilnosti na razini $p<0,005$, limfocita nakon inkubacije s mitogenom u usporedbi s istim pokazateljima stanice limfocita prije inkubacije. Vrijednosti minimalnog polumjera i dužine stanice bile su podjednake u limfocitima prije i nakon inkubacije. Za razliku od toga, vrijednosti površine, konveksne površine, opsega, maksimalnog polumjera i dužine jezgara limfocita ostale su na sličnim vrijednostima i nakon inkubacije s konkavalinom A. Vrijednosti minimalnog polumjera i širine jezgre bile su statistički značajno manje na razini $p<0,05$, a smanjenje vrijednosti faktora pravilnosti jezgre i N/C omjera doseglo je statističku značajnost na razini $p<0,005$.



Slika 8. Limfociti prije inkubacije, MGG 100X objektiv



Slika 9. Limfociti nakon 48 sati inkubacije s konkavalinom A, MGG 100x objektiv

5. RASPRAVA

Za morfometrijska mjerenja odabrani su razmazi suspenzije izoliranih leukocita iz uzoraka krvi krava kontrolne skupine 21.dana laktacije jer je određivanje relativne ekspresije interleukina 2 (IL-2) i čimbenika nekroze tumora alfa (TNF-α) lančanom reakcijom polimerazom u stvarnom vremenu (RT-PCR) pokazalo najveću ekspresiju ovih citokina upravo tog dana istraživanja.

Mikroskopskim pregledom limfocita prije aktivacije uočena je velika plava jezgra s gustim naslagama kromatina te vrlo uzak, ponekada vrlo slabo razlučiv, prsten homogeno tamnije plave citoplazme (Slika 8.). No, obzirom na stresan postupak izolacije i boravak u mediju za održavanje, koji nije prirodan medij za limfocite, ovakvu morfologiju smatrali smo fiziološkom. Nadalje, usporedivši rezultate morfometrijskih mjerenja limfocita u ovom istraživanju, iz uzoraka izoliranih mononuklearnih leukocita u RPMI hranjivom mediju, i limfocita iz razmaza krvi iste skupine krava 21. dana pokusa, nađene su gotovo upola manje vrijednosti svih morfometrijskih pokazatelja limfocita, kako prije, tako i nakon aktivacije konkavalinom A. Takav nalaz potkrepljuje prijašnji zaključak da se stresan postupak izolacije i pohrana limfocita u hranjivom mediju odrazio na smanjenje stanica limfocita. Sličan nalaz smanjene površine stanice tijekom stresa uzrokovanog okolišnim čimbenicima utvrđen je za eritrocite (BUSLOVSKAYA i sur., 2013.). No, valja naglasiti kako je veličina limfocita, odnosno njihova dužina i širina u našem istraživanju, prije i nakon inkubacije konkavalinom A, bila u okviru vrijednosti navedenih za limfocite goveda (DAY i SCHULTZ, 2013.).

Izlaganje stanica imunosnog sustava antigenima dovodi do blastne transformacije odnosno plazmocitoidne diferencijacije što se očituje povećanjem i/ili abnormalnostima stanica i jezgara (SCHALM, 2010.). Imunosni odgovor zahtjeva brz i snažan stanični rast, te su stoga nakon izlaganja stanica antigenima znatno povećani metabolički procesi (MACIVER i sur., 2008.). Utvrđeno je da se razvoj imunosnog odgovora na cijepljenje, a time i pojačana aktivnost limfocita, očituje povećanjem vrijednosti morfoloških pokazatelja stanica i jezgara, a koja se očituje transformacijom limfatičnih stanica (KARDUM i sur., 2011.; KARDUM i sur., 2016.). Smatra se da je sinteza proteina u limfocitima regulirana dostupnošću sekvestrirane mRNA, inicijacijskih faktora i tRNA, te prisutnošću inhibitora inicijacije translacije (DEGEN i sur., 1983.).

U ovom istraživanju, nakon aktivacije limfocita konkavalinom A, stanice su morfološki poprimile veoma nepravilan oblik, jezgra i citoplazma postale su jako bazofilne i okružene obiljem bazofilnog materijala za kojeg pretpostavljamo da je produkt metaboličke aktivnosti i aktivacije limfocita (Slika 9.).

Mikroskopski nalaz u suglasju je s analizom morfometrijskih mjerenja limfocita. Nakon aktivacije konkavalinom A, utvrđen je značajan porast površine i opsega, kao i maksimalnog polumjera i širine stanica limfocita. Također je uočen značajan porast konveksne površine koji ukazuje na veliku nepravilnost oblika stanica, te je izmjerena vrlo niska vrijednost faktora oblika (FF) što je odlika veoma nepravilnih stanica. Za razliku od limfocita prije inkubacije koji su bili gotovo pravilno okrugli, limfociti nakon inkubacije su se, ne samo povećali, već su bili i jako nepravilna oblika. Sve to ukazuje na aktivne metaboličke procese u limfocitima nakon inkubacije s mitogenom, koji su dovelido povećanja obima citoplazme te njene izrazite bazofilije, vjerojatno uslijed povećanja broja ribosoma aktivno uključenih u sintezu proteina (JEDLICKA i PANNIERS, 1991.). Brz porast sinteze proteina smatra se fundamentalnim dijelom odgovora stanica na mitogene. DEGEN i sur. (1982.) ustanovili su čak šest puta veću sintezu ukupnih proteinau goveđim malim limfocitima nakon 24 sata inkubacije s konkavalinom A, te paralelno s tim sintezu proteina citoskeleta same stanice, koja je najvjerojatnije odgovorna za promjenu oblika i veličine citoplazme.

Ako govorimo o morfometrijskim pokazateljima jezgara limfocita prije i poslije inkubacije konkavalinom A, nisu izmjerene značajne promjene njihove površine ili opsega, međutim utvrđen je značajno smanjem minimalni polumjer i širina jezgre što upućuje na promjenu oblika, odnosno jezgre su bile više izdužene s izraženim uleknućem. Također, uočen je značajno manji N/C omjer, koji ukazuje na veliki udio citoplazme u stanici, dok je smanjena vrijednost faktora oblika (FF) pokazala da su jezgre nakon aktivacije bile prilično nepravilne.

6. ZAKLJUČCI

Nakon aktivacije limfocita s mitogenom konkavalinom A izmjereno je značajno povećanje površine, opsega, maksimalnog polumjera, konveksne površine te faktora pravilnosti stanica u usporedbi s istim pokazateljima stanice limfocita prije inkubacije.

Na jezgrama nakon aktivacije nisu izmjerene značajne promjene njihove površine ili opsega, međutim utvrđen je značajno smanjem minimalni polumjer i širina jezgre te značajno smanjen faktor pravilnosti što upućuje na veliku nepravilnost jezgre i promjenu oblika jezgre koja je poprimila grahorast izgled. Također je izmjeren značajno manji N/C omjer koji ukazuje na veliko povećanje udjela citoplazme u stanici.

Promjene morfoloških osobitosti limfocita i njihovih jezgara upućuju na povećanu metaboličku aktivnost pri tretiranju mitogenima.

Istraživanjem promjena (povećanje, smanjenje, nepravilnost) limfocita i procjenom njihovih morfoloških pokazatelja tijekom aktivacije mitogenom potvrđeno je da morfometrijska analiza može pružiti vrijedne podatke u procjeni transformacije imunokompetentnih stanica.

7. LITERATURA

AGACE, W. W. (2006): Tissue – tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. Nat.Rev.Immunol. 6, 682 – 692.

ANONIMUS (2017): http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori/odgovor244.htm

BAAK, J. P. A. (1985): The principles and advances of quantitative pathology. Anal. Quant. Cytol. Histol. 9, 89-95.

BABATUNDE, G. M., A. O. FAJIMI, A. O. OYEJIDE (1992): Rubber seed oil versus palm oil in broiler chicken diets. Effects on performance, nutrient digestibility, haematology and carcass characteristics. Anim. Feed. Sci. Tech. 35, 133-146.

BARTELS, P. H., D. THOMPSON (1994): The Video Photometer. In: Image Analysis. A Primer for Pathologists. RavenPress, Ltd., New York, pp. 29-57.

BINS, M. (1985): Morphometry of white blood cells. Pure Appl. Chem. 57, 599-601.

BELL, E.B.,S. M. SPARSHOT, C.BUNCE (1998):CD4+ T – cell memory, CD45R subsets and the persistence of antigen - a unifying concept. Immunol.Today 19, 60 – 64.

BONECCHI, R., G. BIANCHI, P. P., BORDIGNON (1998): Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J.Exp. Med. 187, 129 – 134 .

BUSLOVSKAYA, L. K., E. Y. BELYAEVA, A. Y. KOVTUNENKO (2013): Adaptive dynamics of blood cell parameters in hens upon change sin the lighting conditions. Global Veterinaria. 11, 441-445.

CHOUAIB S., C. ASSELIN-PATUREL, F. MAMI-CHOUAIB, A. CAIGNARD, J. Y. BLAY (1997): The host - tumor immune conflict: from immune suppression to resistance and destruction. Immunol. Today 18, 493 – 497.

COLDITZ, I. G. (2002): Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. Livest. Prod. Sci. 75, 257–268.

CROCKER, J., E. L. JONES, R. C. CURRAN (1983a): A comparative study of nuclear form factor, area and diameter in non-Hodgkin's lymphomas and reactive lymphnodes. J. Clin. Pathol. 36, 298-302.

CROCKER, J., E. L. JONES, R. C. CURRAN (1983b): The form factor of alpha-naphthyl acetate esterase-positive cells in non- Hodgkin's lymphomas and reactive lymphnodes. J. Clin. Pathol. 36, 303-306.

DALGAARD, T. S., L. R. NORUP, A. R. PEDERSEN, K. J. HANDBERG, P. H. JØRGENSEN, H. R. JUUL-MADSEN (2010): Flow cytometric assessment of chicken Tcell-mediated immune responses after Newcastle disease virus vaccination and challenge. Vaccine 28, 4506–4514.

DALTON, L. W. (1992): Computer-based image analysis of prostate cancer: comments with emphasis on use of commercially available system. Hum. Pathol. 23, 280-286.

DAY, M. (2010): Biology of lymphocytes and plasma cells. In Schalm's Veterinary Hematology. (6th. ed.). (Weiss, D. J., K. J. Wardrop, Eds), Blackwell Publishing, Iowa, pp. 358-366.

DAY, M., R. D. SCHULTZ (2013): Veterinarska imunologija. Načela i primjena.Medicinska naklada, Zagreb.

DEGEN, J. L., M. G. NEUBAUER, S. J. FRIEZNER DEGEN, C. E. SEYFRIED, D. R. MORRIS (1983.): Regulation of protein synthesis in mitogen-activated bovine lymphocytes. In The Journal of Biological Chemistry, 12153 – 12162.

DE LIBERO G., L.MORI (2005): Recognition of lipid antigens by T cells. Nat. Rev. Immunol 5, 485 – 496 .

GODFREY, D. I., S. P. BERZINS (2007): Control points in NKT – cell development. Nat. Rev. Immunol. 7, 505 – 518.

GOLDSTEIN, I. J., R. D. PORETZ (2012): Isolation, physicochemical characterization, and carbohydrate-binding specificity of lectins". InI. E. Liener, N. Sharon, I. J. Goldstein: The Lectins Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Elsevier. pp. 33–247.

HARVEY, J. W. (2001.): Atlas of veterinary hematology: blood and bone marrow of domestic animals. W. B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 65-75.

HEIN W.R., L. DUDLER (1997): γδ-TCRcells are prominent in normal bovine skin and express a diverse repertoire of antigen receptors. Immunology 92, 9158 – 9164.

HORIUCHI Y., Y. NAKAJIMA, Y. NARIAI, H. ASANUMA, M. KUWABARA, M. YUKAWA (2007): Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes – a flow cytometric study. Vet. Immunol. Immunopathol. 118, 179 – 185.

IZCUE A., F.POWRIE (2008): Special regulatory T - cell review: regulatory T cells and the intestinal tract – patrolling the frontier. Immunology 123, 6 – 10.

JAIN, N. (1993): Interpretation of leukocyte parameters. In: Essentials of Veterinary Hematology. Lea & Febiger. Philadelphia.

JEDLICKA, P., R. PANNIERS (1991): Mechanism of activation of protein synthesis initiation in mitogen-stimulated T-lymphocytes. J. Biol. Chem. 266, 15663-15669.

KARDUM, M., Ž. GOTTSTEIN, I. CIGLAR GROZDANIĆ, H. MAZIJA, N. POLJIČAK-MILAS (2016): The influence of HVT FC 126 given by means of nebulization compared to parenteral vaccination on chickens immunocompetent cell transformation. Vet. Arhiv 86, 711-725.

KARDUM, M., N. POLJIČAK- MILAS, Ž. GOTTSTEIN, S. MILINKOVIĆ- TUR., I. KARDUM-SKELIN, I. CIGLAR-GROZDANIĆ, H. MAZIJA (2011): Morfometrijske značajke limfocita pilića cijepljenih protiv Marekove bolesti sojem HVT FC 126 postupkom nebulizacije. Zbornik, 9. simpozij Peradarski dani 2011. s međunarodnim sudjelovanjem, 11.-14. svibnja, Šibenik, Hrvatska, str. 40-47.

KAY, J. E. (1980): Protein synthesis during activation of lymphocytes by mitogens. Biochem. Soc. Trans. 8, 288.

MACIVER, N. J., S. R. JACOBS, H. L. WIEMAN, J. A. WOFFORD, J. L. COLOFF, J. C. RATHMELL (2008): Glucose metabolism in lymhocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. J. Leukoc. Biol. 84, 949-957.

MARKIEWICZ, T., S. OSOWSKI, J. PATERA, W. KOZLOWSKI (2006): Image processing for accurate cell recognition and count on histologic slides. Anal. Quant. Cytol. Histol. 28, 281-291.

MURATA, S. I., K. MOCHIZUKI, T. NAKAZAWA, T. KONDO, N. NAKAMURA, H. YAMASHITA, Y. URATA, T. ASHIBARA, R. KATOH (2003): Morphological abstraction of thyroid tumor cell nuclei using morphometry with factor analysis. Microsc. Res. Tech. 61, 457-462.

NAFE, R. (1991): Planimetry in pathology - a method in its own right besides stereology in automatic image analysis. Exp. Pathol. 43, 239-246.

NAMYSLOWSKI, G., W. SCIERSKI, J. K. NOZYŃSKI, E. ZEMBALA-NOZYŃSKA (2004): Morphometric characteristics of cell nuclei of the precancerous lesions and laryngeal cancer. Med. Sci. Monit. 10, 241-245.

OBERHOLZER, M., H. CHRISTEN, R. ETTLIN, M. BUSER, M. OESTRECHER, R. GSCHWIND (1991): Some fundamental aspects of morphometry in clinical pathology, demonstated on simple, multipurpose analysis system. Anal. Quant. Cytol. Histol. 13, 316-320.

RENAUDEAU, D., A. COLLIN, S. YAHAV (2012): Adaptation to hot climate and strategies to alleviate heat stress in livestock production. Animal 6, 707-728.

RAULET, D. H., R. E. VANCE (2006):. Self – tolerance of natural killer cells .Nat.Rev. Immunol. 6, 520 – 531.

RUSSACK, V. (1994): Image cytometry: current applications and future trends. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. 31, 1-34.

SJAASTAD, O.V., O. SAND, K. HAVE (2012): Immunology. In: Physiology of Domestic Animals (2nd. ed.). Scandinavian Veterinary Press, pp. 334-354.

SUTER S.E., T. A. GOUTHRO,T. O'MALLEY,B. J HARTNETT, P. A. MCSWEENEY, P. F. MOORE, P. J. FELSBURG, M. E. HASKINS, P. S HENTHORN(2007): Marking of peripheral T-lymphocytes by retroviral transduction and transplantation of CD34+ cells in a canine x – linked severe combined immunodeficiency model . Vet. Immunol.Immunopathol. 117, 183 – 196.

TAKAHAMA, Y. (2006): Journey through the thymus: stromal guides for T – cell development and selection. Nat.Rev.Immunol. 6, 127 – 135 .

VAN DIEST, P. J., J. P. A. BAAK (1991): Morphometry. In: Bibbo M. Comprehensive cytopathology. W. B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 946-964.

WEHNER, F., H. OLSEN, H. TINEL, E. RINNE-SAFFRAN, R. K. Y. RINNE (2003): Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport and signal transduction. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148, 1-80.

WOOD, D., G. F. QUIROZ-ROCHA (2010): Normal Hematology of Cattle. In: Schalm's Veterinary Hematology. (Weiss, D. J., K. J. Wardrop, Eds.), Blackwell Publishing, Iowa, pp. 829-836.

8. SAŽETAK

UTJECAJ *IN VITRO* STIMULACIJE PERIFERNIH MONONUKLEARNIH STANICA KRVI KONKAVALINOM A NA MORFOMETRIJSKE ZNAČAJKE LIMFOCITA

Opća proliferativna sposobnost T-limfocita procjenjuje se *invitro* stimulacijom biljnim mitogenima, fitohemaglutininom (PHA) i konkavalinom A (ConA). Promjene nastale izlaganjem mitogenima i stimulacijom imunosnog sustava, mogu dovesti do povećanja i/ili abnormalnosti stanice i jezgre, te promjene njihovog međusobnog odnosa, što se može kvantificirati morfometrijom. Na ukupno 18 krvnih razmaza mjerene su morfometrijske karakteristike limfocita prije i nakon aktivacije konkavalinom A. Digitalna analiza krvnih stanica napravljena je na osobnom računalu s podržavajućim programom SFORM (VAMSTEC, Zagreb). Rezultati su pokazali značajno povećanje površine, opsega, maksimalnog polumjera, konveksne površine te faktora pravilnosti limfocita nakon inkubacije s mitogenom u usporedbi s istim pokazateljima stanice limfocita prije inkubacije. Vrijednosti minimalnog polumjera i dužine stanice bile su podjednake u limfocitima prije i nakon inkubacije. Kod mjerenja morfometrijskih pokazatelja jezgara, nisu izmjerene značajne promjene njihove površine ili opsega, međutim utvrđen je značajno smanjem minimalni polumjer i širina jezgre, značajno manji N/C omjer te smanjena vrijednost faktora oblika (FF). Dobiveni rezultati pokazali su da promjene na stanicama limfocita i njihovim jezgrama upućuju na metaboličku aktivnost pri tretiranju mitogenima te morfometrijska analiza može pružiti vrijedne podatke u procjeni transformacije imunokompetentnih stanica.

Ključne riječi: limfociti, morfometrija, konkavalin A, *in vitro* inkubacija

9. SUMMARY

THE INFLUENCE OF *IN VITRO* STIMULATION OF PERIPHERAL MONONUCLEAR BLOOD CELLS WITH CONCAVALINE A ON MORPHOMETRIC CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTES

General proliferative ability of T-cells estimates with in vitro stimulation with plant mitogens, phytohemaglutinin (PHA) and concavalin A (ConA). Changes caused by exposure to mitogens and stimulation of the immune system may lead to an increase and/or abnormality of the cell and nucleus, and a change in their mutual relationship, which can be quantified by morphometry. At the total of 18 blood smears the morphometric characteristics of the lymphocytes before and after activation with concavalin A were measured. The digital blood cell analysis was performed on a personal computer using the support program SFORM (VAMSTEC, Zagreb). The results showed a significant increase in surface, bandwidth, maximum radius, convex surface, and lymphocyte form factor after incubation with mitogen compared to the same lymphocyte cell pre-incubation ratios. The minimum radius and cell length values were consistent in lymphocytes before and after incubation. When measuring the morphometric parameters of the nuclei, no significant changes in their surface or extent were measured, however, there was significant reduction in the minimum radius and core width, significantly lower N / C ratio and reduced factor factor (FF). The obtained results showed that changes in lymphocyte cells and their nuclei indicate metabolic activity in the treatment of mitogens, and morphometric analysis can provide valuable data in estimating the transformation of immunocompetent cells.

Key words: lymphocytes, morphometry, concavalin A, *in vitro* incubation

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 10. lipnja 1992. godine u Zagrebu. Pohađala sam gimnaziju Jurja Barakovića u Zadru, opći smjer. Nakon srednje škole, 2010.godine upisujem Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom fakultetskog obrazovanja volontirala sam u Klinici za unutarnje bolesti, dvije godine bila demonstrator u Zavodu za patološku fiziologiju te pjevala u Akademskom zboru „Ab ovo“, s kojim sam dobila Posebnu rektorovu nagradu za umjetnička ostvarenja. Također sam bila članica IVSA-e (Internacional Veterinary Students Organization), u kojoj sam dvije godine bila na poziciji exchange officera i podpredsjednika. Preko IVSA-e provela sam 2 tjedna na veterinarskom kongresu održanom u Nizozemskoj 2013. godine, te bila na kraćim razmjenama studenata u Švedskoj i Srbiji. Nedavno sam završila A2 stupanj francuskog jezika u Školi za strane jezike Intellecta, a govorim i njemački i engleski jezik.