

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nataša ŠOLAR

**PRIMERJAVA PIGMENTIRANOSTI JETER
HRANJENIH IN NEHRANJENIH OSEBKOV
MOČERILA (*Proteus anguinus*)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nataša ŠOLAR

**PRIMERJAVA PIGMENTIRANOSTI JETER HRANJENIH IN
NEHRANJENIH OSEBKOV MOČERILA (*Proteus anguinus*)**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF LIVER PIGMENTATION OF FED AND UNFED
SPECIMENTS OF *PROTEUS ANGUINUS***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2016

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Oddelka za biologijo je dne 23. 6. 2016 za mentorico diplomskega dela imenoval doc. dr. Lilijano Bizjak Mali in doc. dr. Nado Žnidaršič za recenzentko.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Rok KOSTANJŠEK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Nada ŽNIDARŠIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Lilijana BIZJAK MALI
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 20. 9. 2016

Podpisana izjavljam, da je diplomsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Nataša Šolar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn

DK UDK 597.92(043.2)

KG jetra/pigmentiranost/stradanje/*Proteus anguinus*

AV ŠOLAR, Nataša

SA BIZJAK MALI, Lilijana (mentor)/ŽNIDARŠIČ, Nada (recenzentka)

KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

LI 2016

IN PRIMERJAVA PIGMENTIRANOSTI JETER HRANJENIH IN NEHRANJENIH OSEBKOV MOČERILA (*PROTEUS ANGUINUS*)

TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)

OP VIII, 34 str., 2 tab., 8 sl., 42 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Analizo pigmentiranosti jeter bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) smo naredili na histoloških rezinah jeter hranjenih osebkov in osebkih, ki so bili brez hrane od enega do največ osemnajst mesecev. Za identifikacijo pigmentov v jetrih močerila smo uporabili histokemijsko barvanje po Perlsu za železo in Masson – Fontana za melanin. Histološke rezine jeter smo pregledali s svetlobnim mikroskopom, jih poslikali in na posnetkih histoloških rezin z računalniškim programom Image J analizirali delež površine pigmentnih skupkov (PS) in melanina. V pigmentnih skupkih so predvsem celice PC-S z železovimi pigmenti in melaninom, celice PC-M z melaninom so maloštevilne. Delež površine PS na posnetkih histoloških rezin je bil najvišji pri osebkih stradanih osemnajst mesecev, medtem ko med kontrolnimi osebki in osebki stradanimi krajše obdobje ni bilo razlik. Prav tako ni bilo razlik v deležu PS in melanina med različnimi regijami jeter istega osebka. Delež melanina v PS je bil zelo variabilen med osebki, in ni bilo očitnih razlik med različno dolgo stradanimi osebki, kot tudi ne med stradanimi in kontrolnimi osebki. Rezultati raziskave kažejo na to, da stradanje vodi v povečanje pigmentiranosti v jetrih močerila.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn

DC UDC 597.92(043.2)

CX liver/pigmentation/starvation/*Proteus anguinus*

AU ŠOLAR, Nataša

AA BIZJAK MALI, Lilijana (supervisor)/ŽNIDARŠIČ, Nada (reviewer)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology

PY 2016

TI COMPARISON OF LIVER PIGMENTATION OF FED AND UNFED SPECIMENTS
OF *PROTEUS ANGUINUS*

DT Graduation Thesis (University studies)

NO VIII, 34 p., 2 tab., 8 fig., 42 ref.

LA sl

AL sl/en

AB The analysis of the liver pigmentation of white subspecies of *Proteus* (*Proteus anguinus anguinus*) was done on histological sections of liver of fed specimens as well as specimens that were starved from one up to eighteen months, respectively. To identify the pigments in the liver we used the histochemical staining according to Perls for iron, and Masson – Fontana for melanin. The histological sections of liver were examined and imaged with the light microscope. We analyzed the proportion of the surface area of pigment clusters (PC) and melanin on the images of histological sections by the program Image J. The pigment clusters contained mainly PC-S cells with iron and melanin pigments, as well as individual PC-M cells with melanin. The proportion of PC surface area on images of histological slices was highest in specimens starved eighteen months, while there were no differences between the control specimens and specimens starved for shorter period. There were also no differences in the proportion of PC and melanin among different regions of the liver of the same specimen. The amount of melanin in the PC was highly variable between individuals, and there were no obvious differences between the various starved specimens, as well as between starved and control specimens. The results of our study indicate that starvation leads to increased pigmentation in the liver of *Proteus*.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATIONS	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
KAZALO TABEL	VII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	VIII
1 UVOD	1
1.1 CILJI IN NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 JETRA MOČERILA.....	3
2.2 PIGMENTNI SISTEM VRETENČARJEV	4
2.2.1 Pigmentne celice jeter dvoživk.....	4
2.2.2 Funkcionalni pomen ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema poikilotermov.....	6
2.3 PIGMENTI V JETRIH DVOŽIVK.....	6
2.3.1 Melanini in melanosomi.....	6
2.3.2 Železovi pigmenti in sidersomi.....	9
3 MATERIAL IN METODE	11
3.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI.....	11
3.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO.....	11
3.2.1 Fiksacija in priprava preparatov za svetlobno mikroskopijo.....	11
3.2.2 Barvanja.....	12
3.2.2.1 Histokemijsko barvanje po Perls-u za identifikacijo železa	12
3.2.2.2 Histokemijsko barvanje Masson – Fontana za identifikacijo melanina	13
3.3 MIKROSKOPIRANJE	14
3.3.1 Analiza fotografij	14
4 REZULTATI.....	16
4.1 MORFOLOGIJA PIGMENTNIH SKUPKOV V JETRIH MOČERILA.....	16
4.2 ANALIZA DELEŽA PIGMENTNIH CELIC IN MELANINA V JETRIH MOČERILA.....	20
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	23
5.1 RAZPRAVA	23
5.2 SKLEPI	27
6 POVZETEK.....	28
7 VIRI	30
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

Slika 1: Notranji ustroj močerila (<i>Proteus anguinus</i> Laurenti 1768).	3
Slika 2: Faze zoritve melanosoma v celici.....	8
Slika 3: Analiza fotografij v programu ImageJ.	15
Slika 4: Pigmentni skupki v jetrih bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>).	17
Slika 5: Skupek pigmentnih celic PC-S v jetrih bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>).	18
Slika 6: Primerjava pigmentiranosti jeter bele podvrste močerila (<i>P. a. anguinus</i>).	19
Slika 7: Primerjava deleža površine pigmentnih skupkov PS na posnetkih iz različnih regij jeter (anteriorna - modro, mediana - rdeče in posteriorna - oranžno) pri hranjenih in stradanih osebkih (<i>P. a. anguinus</i>).	21
Slika 8: Primerjava deleža površine melanina na posnetkih iz različnih regij jeter (anteriorna - modro, mediana - rdeče in posteriorna - oranžno) pri hranjenih in stradanih osebkih (<i>P. a. anguinus</i>).	22

KAZALO TABEL

Preglednica 1: Eksperimentalne živali.	11
Preglednica 2: Delež površine (%) pigmentnih skupkov (PS) in melanina na posnetkih histoloških rezin jeter hranjenih in stradanih osebkov (<i>Proteus anguinus</i>).....	20

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

DOPA – 3,4-dihidroksifenilalanin

EKPS – ekstraktaneusni pigmentni sistem

j – jedro

JA – jetra anteriorno

JM – jetra mediano

JP – jetra posteriorno

KC – Kupfferjeva celica

PC – pigmentna celica

PS – pigmentni skupek

ROS – reaktivne kisikove spojine

1 UVOD

Pigmentne celice v jetrih so značilnost poikilotermov in pripadajo ekstrakutaneusnemu pigmentnemu sistemu (EKPS). To so stacionarni makrofagi, ki vršijo podobno vlogo kot Kupfferjeve makrofagne celice v jetrih sesalcev, s to razliko, da celice EKPS sintetizirajo tudi melanin (Scalia in sod., 1988; Sichel, 1988; Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998; Zuasti in sod., 1998; Prelovšek in Bulog, 2003). Vloga Kupfferjevih celic v jetrih sesalcev je endocitoza različnih snovi iz krvi, prav tako so tudi vir koristnih mediatorjev, ki sodelujejo pri obrambnih mehanizmih gostitelja (McCuskey in McCuskey, 1990).

Tudi v jetrih močerila so skupki pigmentnih celic, v katerih sta zastopana predvsem dva tipa celic (Prelovšek, 2002; Prelovšek in Bulog, 2003): 1) celice PC-S, ki vključujejo hemosiderin in melanin, v njih poteka tudi sinteza melanina in 2) celice PC-M, v katerih poteka razgradnja melanosomov. Opisan je tudi tretji tip celic s številnimi praznimi vakuolami in šibko melanosintetsko aktivnostjo (celice PC-V), ki pa so bile le redko opažene (Prelovšek, 2002). V primerjavi z drugimi vrstami dvoživk, so ti skupki pri močerilu zelo obsežni in vsebujejo predvsem veliko hemosiderina (Prelovšek in sod., 2008).

Iz literature je znano, da na pigmentiranost v jetrih dvoživk vplivajo tudi številni stresni dejavniki: temperatura okolja, obdobje hibernacije, stopnja metabolne aktivnosti, nezadostna prehranjenost, hipoksični pogoji v okolju (Tanaka in sod., 1974; Corsaro in sod., 1990; Barni in sod., 1999; Frangioni in sod., 2000; Spornitz, 1972). Prav tako je poznano, da se s starostjo pigmentiranost povečuje (Andrew, 1969; Tanaka in sod., 1974; Christiansen in sod., 1996).

Za močerila je znano, da je dolgoživ (70 let), da ima upočasnen metabolizem in da je dobro prilagojen na skromne vire hrane (Bulog in sod., 2000; Hervant in sod., 2001; Bizjak Mali in sod., 2013). Poleg tega v jamskih vodah občasno prihaja tudi do hipoksičnih pogojev (Istenič, 1979, 1986; Huppopp, 1986). Vse omenjene posebnosti močerila in njegovega življenjskega okolja vplivajo na pigmentiranost v jetrih močerila (Prelovšek in sod., 2008):

- 1) pigmenti se v pigmentnih celicah kopičijo zaradi dolgoživosti,
- 2) daljša obdobja brez hranjenja, ki so v jamskem okolju naravno prisotna, privedejo do padca hematokrita in koncentracije hemoglobina v krvi (Hervant in sod., 2001); količina hemosiderina v jetrih se poveča zaradi fagocitozne vloge pigmentnih celic, ki v tem primeru fagocitirajo poškodovane in odmrle eritrocite,
- 3) do povečanja količine hemosiderina in melanina lahko prihaja tudi zaradi hipoksičnih pogojev, saj je znano, da pri dvoživkah izzovejo razgradnjo eritrocitov in s tem povečanja količina hemosiderina v jetrih, hipoksija pa tudi stimulira tirozinazno aktivnost (Frangioni in sod., 2000).

Glede na to, da so skromni viri hrane, v sicer stabilnem jamskem okolju, pogosto prisoten dejavnik, nas zanima vpliv stradanja, ki je eden od možnih dejavnikov stresa na pigmentiranost jeter močerila.

1.1 CILJI IN NALOGE

Namen naloge je ugotoviti ali prehranjenost vpliva na delež pigmentnih področij v jetrih močerila in ali se ob tem spremeni vsebnost melanina. Primerjali bomo vzorce jeter hranjenih in nehranjenih osebkov. Osebki bodo istega spola in podobnega velikostnega razreda. Obdobja brez hrane bodo en mesec, štiri mesece, štirinajst mesecev in osemnajst mesecev.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

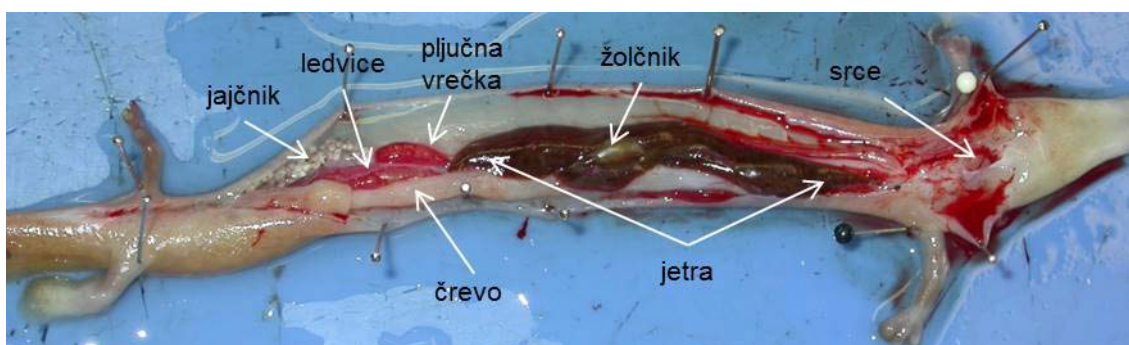
Glede na podatke iz literature pričakujemo, da bodo pigmentna področja v jetrih nehranjenih osebkov obsežnejša, več bo tudi melanina.

2 PREGLED OBJAV

2.1 JETRA MOČERILA

Jetra močerila so obsežna, saj zapolnjujejo velik del trebušne votline (Slika 1). Zgrajena so iz mase jetrnih celic ali hepatocitov, mreže krvnih kapilar ali sinusoidov med hepatociti in številnih skupkov pigmentnih celic (Prelovšek, 2002; Bizjak Mali, 2002; Bizjak Mali in sod., 2013). Hepatociti gradijo hepaticične plošče, ki so debeline dveh ali več celic, in ločujejo sosednje sinusoidne med seboj. Med endotelno steno sinusoida in hepatocitom je perisinusoidni ali Dissejev prostor.

Hepatociti močerila so mnogokotne oblike. V njihovi citoplazmi so številne maščobne kapljice in veliko glikogena, zato imajo jetra pomembno vlogo v energijsko varčni metabolni strategiji in toleranci na stradanje (Bizjak Mali, 2002; Bizjak Mali in sod., 2013). V jetrih močerila so tudi številne pigmentne celice, ki vključujejo železove pigmente, melanin in lipofuscin (Prelovšek, 2002).



Slika 1: Notranji ustroj močerila (*Proteus anguinus* Laurenti 1768). Foto L. Bizjak Mali, 2004.

Jetra pri dvoživkah imajo pomembno vlogo pri zalogi lipidov, saj imajo v primerjavi z drugimi vretenčarji bolj malo adipoznega tkiva. Lipidi so pomemben energetsko bogati material v hepatocitih ektotermnih živali, tako dvoživk kot rib in sauropsidnih plazilcev. Služijo namreč kot energetska rezerva med hibernacijo in stradanjem. So idealen rezervni material, saj sprostijo dvakrat več energije v primerjavi z ogljikovimi hidrati (Welsch in Storch, 1973, cit. po Bizjak Mali in sod., 2013; Allen, 1976, cit. po Bizjak Mali in sod., 2013; Hadley, 1985, cit. po Bizjak Mali in sod., 2013; Storch in sod., 1989, cit. po Bizjak Mali in sod., 2013; Osman in sod., 1991, cit. po Bizjak Mali in sod., 2013).

2.2 PIGMENTNI SISTEM VRETENČARJEV

Pigmentne celice, ki sintetizirajo melanin, najdemo v koži vseh vretenčarjev, kot tudi v pigmentnem epitelu mrežnice, v uveji in notranjem ušesu. Pri ptičih in sesalcih so melanociti v epidermisu, lasnih oz. peresnih foliklih in občasno v dermisu. Pri ostalih vretenčarjih so melanociti (melanofore) v dermisu kože, razen njih pa so zastopane tudi dermalne iridofore, ksantofore in eritrofore (Bagnara, 1998).

Melanocitiv koži vseh vretenčarskih razredov so homologni v tem, da imajo enako kemično sestavo pigmentov, podobno morfologijo in podobno hormonalno kontrolo, kot tudi embrionalni nastanek (Bagnara, 1998). Izvirajo iz celic nevrálnega grebena.

Pri ribah, dvoživkah in plazilcih pa najdemo melanosintetske celice tudi v notranjih organih kot so jetra, srce, ledvice, priželjc, gonade ter na krvnih žilah, v peritoneju in možganskih ovojnicah. Te celice uvrščajo v sklop kompleksnega, heterogenega, ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema, ki ima drugačen embrionalni izvor od pigmentnih celic v koži vretenčarjev (Sichel, 1988; Sichel in sod., 1997; Zuasti in sod., 1998). Izvirajo namreč iz hemopoetske zarodne linije.

2.2.1 Pigmentne celice jeter dvoživk

Pigmentne celice v jetrih dvoživk so običajno v skupkih in se nahajajo v različnih količinah v vezivnem tkivu portalnih kanalov, v Dissejevem prostoru in okoli sinusoidov. Te celice vsebujejo temnorjav pigment s histokemičnimi značilnostmi melanina, kot tudi železove pigmente v obliki hemosiderina in lipofuscin, ki je produkt endogenega materiala (Sichel in sod., 1997). Pri sesalcih se večje količine pigmentov v jetrih pojavljajo le patološko (Sichel in sod., 1997).

V literaturi avtorji opisujejo pigmentne celice v jetrih dvoživk in plazilcev kot rezidenčne makrofage, ki jih imenujejo tudi Kupfferjeve celice ali kot celice, ki izvirajo iz njih (Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998; Corsaro in sod., 2000). Sprva so pigmentne celice obravnavali kot Kupfferjeve celice, ki so sposobne fagocitirati melanin, nimajo pa melanosintetske sposobnosti (Andrew, 1969; Sichel in sod., 1997; Zuasti in sod., 1998). V 80 in 90 letih 20. stoletja so dokazali, da je obarvanost Kupfferjevih celic pri dvoživkah in

plazilcih odvisna predvsem od njihove sposobnosti za tvorbo melanosomov in sintezo melanina ter le delno od same fagocitoze melanosomov (Scalia in sod., 1988; Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998). Poimenovali so jih tudi melanosintetski centri. Melanosinteza je potrjena tudi za pigmentne celice v jetrih močerila (Prelovšek, 2002; Prelovšek in Bulog, 2003). Pigmentne celice v jetrih dvoživk so strukturno in funkcionalno zelo podobne Kupfferjevim celicam sesalcev razen v zmožnosti tvorbe melanosomov in sinteze melanina.

Omeniti velja nedoslednost v poimenovanju teh celic. Pigmentne celice jeter rib, dvoživk in plazilcev uvrščajo med makrofage in jih imenujejo pigmentne celice, tudi Kupfferjeve celice. Te celice namreč lahko sintetizirajo melanin in imajo hkrati nekatere lastnosti značilne za celice mononuklearnega fagocitnega sistema (imenovanega tudi histiocitni sistem), kamor spadajo makrofagi. Že leta 1959 je Gordon izvor pigmentnih celic v koži, ki sintetizirajo melanin, povezal z nevrlnim grebenom, medtem ko za Kupfferjeve celice dvoživk in plazilcev velja, da izhajajo iz hemopoetske zarodne celične linije. Sichel (1988) predlaga, da pigmentne celice dvoživk in plazilcev klasificiramo kot »extra cutaneous pigment cells from histiocytic origin« in da ime melanociti pri vretenčarjih na splošno zamenjamo z »melanin producing cell« (Sichel in sod., 1997).

Raziskava pigmentnih celic (PC) v jetrih močerila (*Proteus anguinus*) (Prelovšek in sod., 2008) je pokazala, da so le te strukturno zelo raznolike. Od treh različnih tipov PC so najštevilčnejše celice PC-S, katerih vključki so sidersomi, melanosomi, lipofuscinska telesa, vakuole, fagocitna telesa, gladek endoplazmatski retikulum, mitohondriji, Golgijev aparat in lizosomi. Najštevilčnejši so ravno sidersomi z elektronsko gostimi železovimi delci (imenovanim hemosiderin), ki dajejo po Perls-u pozitivno reakcijo. V citoplazmi so tudi premelanosomi v različnih fazah zorenja, potrjena je tudi tirozinazna aktivnost (Prelovšek, 2002; Prelovšek in Bulog, 2003). Melanosomi so ovalni, različnih velikosti in z različno elektronsko gostoto. Sestavljajo skupke obdane z enojno membrano, ki sobodisi manjši z le nekaj melanosomi ali pa večji s številnimi melanosomi. Posameznih melanosomov v citoplazmi ni. Lipofuscin in fagocitna telesa so le v nekaterih PC-S (Prelovšek in sod., 2008). Med pigmentnimi celicami pa so najmanj številne celice PC-M, v katerih poteka razgradnja melanosomov, znakov melanosinteze pa ni opaziti. Te celice so

podobne melanomakrofagom, ki so zastopani v preostalih visceralnih organih poikilotermov (Prelovšek, 2002).

2.2.2 Funkcionalni pomen ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema poikilotermov

Med številne funkcije Kupfferjevih celic vretenčarjev spadajo fagocitoza virusov, bakterij, eritrocitov, endocitoza različnih delcev, pri sesalcih je znano, da sintetizirajo nekatere signalne molekule, sintetizirajo superoksidne anione, ki pomagajo pri razgradnji fagocitiranih bakterij, detoksificirajo potencialno toksične substance (Arias, 1994, cit. po Prelovšek, 2002).

Ekstrakutaneusni pigmentni sistem v jetrih rib, dvoživk in plazilcev ima prav tako zaščitno funkcijo. Melanin lahko veže proste superoksidne anione ter tako organizem ščiti pred lipoperoksidacijo in s tem pred poškodbo membran. Prav tako veže in akumulira številne strupene snovi, shranjuje številne ione in druge snovi. Igra pomembno vlogo pri ekskreciji, vzdrževanju homeostaze in detoksifikaciji. Melanin je pravzaprav alternativa encimom antioksidatnega sistema (Geremia in sod., 1989). Pomen železovih pigmentov je predvsem shranjevanje železa, ki mora biti po potrebi znova na razpolago (Iancu, 1992).

2.3 PIGMENTI V JETRIH DVOŽIVK

V pigmentnih celicah jeter dvoživk poteka sinteza melanina, prav tako pa se v njih skladiščijo železovi pigmenti (hemosiderin, feritin) in tudi lipofuscin (Prelovšek in sod., 2008). Količina prisotnih specifičnih pigmentov je različna med različnimi vrstami dvoživk. Pri belem močerilu (*Proteus anguinus anguinus*) pigmentne celice v jetrih vsebujejo predvsem hemosiderin in majhne količine melanina (Prelovšek in sod., 2008). Pigmentne celice v jetrih črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*) vsebujejo veliko melanina in hemosiderina, medtem ko se v jetrih nekturusa (*Necturus maculosus*), močerilovega najbližjega sorodnika, kopiči predvsem melanin.

2.3.1 Melanin in melanosomi

Melanini so biopolimeri, katerih struktura je lahko bodisi zelo enostavna ali pa precej kompleksna. Osnovno strukturno enoto navadno predstavljajo kovalentno povezani indoli. Melanini so zastopani pri ljudeh, sesalcih, ostalih vretenčarjih in nevretenčarjih (kot rjavo

črni evmelanini in rumeno rdeči feomelanini). Pojavljajo se tudi v rastlinah, glivah in bakterijah, imenovani kot alomelanini (Césarini, 1996; Riley, 1997).

Sinteza melanina poteka v specializiranih organelih, imenovanih melanosomi, ki vsebuje tirozinazo – ključni encim, ki oksidira brezbarvno aminokislino tirozin do obarvanih polimerov, poznanih pod imenom melanini. DOPA (3,4-dihidroksifenilalanin) je intermediarna sestavina, ki nastane tekom prve faze oksidacijske reakcije. Sinteza melanina poteka v celicah, ki vsebujejo tirozinazo in/ali DOPA ali tirozin (Ghadially, 1997).

Zoritev melanosomov v celici poteka v večih stopnjah (Slika 2):

- V zgodnji fazi organel ne vsebuje melanina, vključuje pa aktivno tirozinazo. Slednja se sintetizira v endoplazmatskem retikulumu in transportira v Golgijev aparat, kjer se pakira v majhne vezikle.
- Vezikli se povečajo in podaljšajo ter tvorijo ovalni organel ali premelanosom, v katerem nastanejo strukturni proteini, na katere se začne nalagati melanin.
- Z nalaganjem melanina nastaja delno melaniziran melanosom.
- Zadnja faza je zrel melanosom ali melaninsko zrno, ki je enotno elektronsko gosto in brez razvidne notranje strukture. Tirozinaza v zrelem melanosomu ni več prisotna (Ghadially, 1997).



Slika 2: Faze zoritve melanosoma v celici (vir: <http://www.euronet.nl/users/hnl/afb3.htm>).

Glede na vrsto organizma in mesto zastopanosti melanosomov, se melanosomi razlikujejo tudi v velikosti in obliki. Melanosomi v pigmentnih celicah v jetrih se razlikujejo od melanosomov v koži, in sicer po kemični sestavi, kot tudi v velikosti in obliki. V jetrih so daljši in širši ter v mnogih primerih skoraj sferični (Sichel in sod., 1997).

Razen v redkih primerih, se melanosomi pojavljajo kot posamezna telesa znotraj melanocitov in v keratinocitih. V melanofagih pa se pojavljajo tudi v skupkih znotraj enomembranskih teles (melanosomski kompleksi ali sestavljeni melanosomi), ki jih označujejo za lizosome zaradi prisotne kisle fosfataze (Ghadially, 1997).

2.3.2 Železovi pigmenti in sidersomi

Železo je esencialni element večine živih celic. Presežek železa tako prokariotske kot evkariotske celice skladiščijo in ga uporabijo, ko je to potrebno. Anorgansko železo je toksično, zato je železo v celicah vezano na proteine, kot sta feritin in hemosiderin. V obeh primerih je železo trivalentno (Iancu, 1992).

Sidersom je z enojno membrano obdano telo, ki vsebuje skupke elektronsko gostih delcev železa. Občasno jih najdemo v celicah retikuloendotelne sistema, mnogo več pa se jih pojavi v bolezenskem stanju zaradi povečanega vnosa železa. V tkivih se pojavijo tudi ob krvavitvah. Sidersom smatrajo za lizosomsko telo, saj vsebuje kislino fosfatazo. Zrel sidersom je rezidualno telo z neprebavljenimi ostanki železa, ki ostanejo po lizosomalni aktivnosti. Natančen nastanek sidersomov ni znan. Krvavitev, endocitoza in razkroj eritrocitov v heterolizosomih vodi k nastanku različnih lizosomskih ali rezidualnih teles, tudi sidersomov, ki nastanejo iz razgrajenega hemoglobina. V celici so prisotni posamezno ali v skupkih (Ghadially, 1997).

Feritin je protein, ki vsebuje železo in je topen v vodi. Glavna biološka kvaliteta feritinske molekule je izolirati anorgansko železo v netoksično, proteinsko vezano obliko, ki je dostopna za normalne fiziološke funkcije celice (Iancu, 1992; Ghadially, 1997; Loumourdis in sod., 2001). Feritin je pri sesalcih pogost v hemopoetskih celicah kostnega mozga in celicah retikuloendotelne sistema, predvsem v Kupfferjevih celicah v jetrih in makrofagih vranice ter lamini propriji črevesa (Iancu, 1992).

Feritin se lahko iz citoplazme prenese v sidersome, kjer se razgradi v hemosiderin.

Hemosiderin je zlato-rjav pigment bogat z železom, organska spojina nastala iz hemoglobina. Z barvanjem po Perls-u se obarva modro. Poleg železa vsebuje polisaharide, proteine in lipide (heterogena narava hemosiderina). Ni topen v vodi. Hemosiderin variira v sestavi glede na anatomske vir, stopnjo zrelosti pigmenta in tip železa, ki inducira njegov nastanek.

Železo je v njem prisotno v bolj stabilni in manj reaktivni obliki, in sicer kot železov hidroksidni oksid ($\text{FeO}(\text{OH}) \cdot n\text{H}_2\text{O}$).

Celice v katerih so številni sidersomi s hemosiderinom še vedno funkcionirajo normalno. Hemosiderin predstavlja biološko varovalni mehanizem pred kisikovimi prostimi radikali (Iancu, 1992; Ghadially, 1997).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 EKSPERIMENTALNE ŽIVALI

Za analizo smo uporabili vzorce jeter devetih osebkov bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), ki so del arhivske zbirke skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev Oddelka za biologijo. Osebkki so bili veliki od 22 cm do 27 cm. Vse so bile samice. Večina je bila ujetih v Planinski jami (Planina, Slovenija), eden v Kompoljski jami (Kompolje, Slovenija) in eden v Otovškem bregu (Otovec, Slovenija) (Preglednica 1).

Preglednica1: Eksperimentalne živali.

Evidenčna številka osebkka	Spol	Velikost (cm)	Čas stradanja (meseči)	Lokaliteta	Leto ulova
P129	♀	23,9	K	Planinska jama	1998
P130	♀	26,8	K	Planinska jama	1998
P132	♀	22,6	1	Planinska jama	1998
P137	♀	22,2	4	Planinska jama	1998
P147	♀	27,0	18	Planinska jama	1998
P152	♀	26,0	N	Kompoljska jama	2001
P158	♀	26,0	1	Otovški breg	2001
P176	♀	24,3	14	Planinska jama	2003
P177	♀	25,0	18	Planinska jama	2003

Legenda: K - osebkka, zadrževana v laboratoriju in hranjena en mesec, N - osebek iz narave

Živali so bile žrtvovane v različnih obdobjih stradanja (od enega meseca do osemnajstih mesecev) (Preglednica 1). Osebkki, ki so služili kot kontrola so bili hranjeni en mesec, enkrat tedensko s postranicami (Crustacea: Amphipoda). Živali so bile zadrževane v akvarijih speleobiološkega laboratorija Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete v stalni temi in pri temperaturi 10° C.

3.2 PRIPRAVA PREPARATOV ZA SVETLOBNO MIKROSKOPIJO

3.2.1 Fiksacija in priprava preparatov za svetlobno mikroskopijo

Vzorci jeter so bili pri večini osebkov iz anteriornega dela (JA), medianega dela (JM) ter posteriornega dela (JP), in fiksirani v 10 % formalinu (pH = 7,0). Sledila je dehidracija v

96 % etanolu (4 krat 1 h) in v absolutnem etanolu (4 krat 1 h) ter bistrenje v ksilenu (2 krat 1 h) in infiltracija v paraplastu (2 krat 2 h 30 min).

Celoten postopek je potekal v avtomatski histokineti na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Parafinske vzorce smo rezali z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040, debelina rezin je bila 5 – 8 μm .

3.2.2 Barvanja

Prisotnost posameznih kemijskih sestavin celice lahko kvalitativno ugotavljamo s pomočjo histokemijskih reakcij, ki nam omogočajo njihovo identifikacijo in lokalizacijo v histološkem preparatu. Osnova vseh histokemijskih reakcij je specifična vezava barvila na določeno kemijsko substanco v preparatu. Ta substanca je bodisi fiziološka sestavina celice ali pa nastane v prvem delu reakcije iz molekul, ki so v celici prisotne (Kiernan, 1990).

Za identifikacijo pigmentov v jetrih močerila smo uporabili dva histokemijska testa: barvanje po Perlsu za dokazovanje železa (Kiernan, 1990) in Masson-Fontana barvanje za dokazovanje melanina (Presnell in Schreibman, 1997). Pred barvanjem smo iz rezin s ksilenom najprej odstranili paraplast (2 krat po 3 minute), rezine smo nato prenesli v propanol (2 krat po 3 minute), ter jih rehidrirali preko padajoče etanolne vrste (96% in 70% etanol, v vsakem 2 krat po 3 minute) do destilirane vode. Po končanem histokemijskem barvanju smo vse rezine po klasični metodi dehidrirali v 70% in 96% etanolu (le nekaj sekund), jih prenesli v propanol (nekaj sekund), zbistrili v ksilenu (nekaj sekund, lahko tudi dalj časa) in prekrili s sintetičnim krovnim sredstvom (kanadski balzam Pertex) in krovnim steklom.

3.2.2.1 Histokemijsko barvanje po Perls-u za identifikacijo železa

Pri tej reakciji ferri ion, ki se nahaja v hemosiderinu, vežemo s kalijevim ferocianidom v netopno modro oborino (Kiernan, 1990).

Hidrirane rezine smo za 30-60 minut prenesli v Perls-ovo raztopino, sestavljeno iz enakih deležev 2% kalijevega ferocianida in 2% klorovodikove kisline, pripravljenih v destilirani vodi. Sledilo je spiranje z destilirano vodo in barvanje s Kernechtrotom (kontrastiranje jeder, 5 minut). Rezine smo nato po klasični metodi dehidrirali, zbistrili v ksilenu in prekrili.

Hemosiderin, ki vsebuje železo v feri (Fe^{3+}) obliki, se po tej reakciji obarva modro.

3.2.2.2 Histokemijsko barvanje Masson – Fontana za identifikacijo melanina

Osnova Masson-Fontana metode je značilnost nekaterih fenolnih substanc in derivatov tirozina, da reducirajo srebrove raztopine v kovinsko srebro (Presnell in Schreibman, 1997). Gre torej za pozitivno argentafino reakcijo, kar pomeni, da bo določena snov srebrovo raztopino reducirala v kovinsko srebro brez pomoči reducenta. Takšno lastnost ima tudi melanin, kar je osnova njegove identifikacije po tej metodi.

Hidrirane rezine smo naprej tretirali 10 minut z lugolno raztopino, nato spirali 3 minute pod tekočo vodo, razbarvali v 5% natrijevem tiosulfatu (2 minuti) ter ponovno spirali 4 minute pod tekočo vodo. Tako pripravljene rezine smo čez noč pustili v Fontana raztopini (v temnem prostoru na sobni temperaturi). Naslednji dan smo vzorce dobro sprali z destilirano vodo, jih 3 minute tretirali z 0,2% AuCl , sledilo je ponovno spiranje z destilirano vodo, tretiranje s 5% natrijevim tiosulfatom 2 minuti, spiranje in kontrastiranje s Kernechtrotom (5 minut). Rezine smo nato po klasični metodi dehidrirali, zbistrili v ksilenu in prekrili.

Fontana raztopino pripravimo po sledečem postopku: pripravimo 20 ml 10% raztopine srebrovega nitrata, ki ji po kapljicah dodajamo koncentrirano raztopino amonijaka, stalno mešamo, dokler ne ostane le nekaj delcev precipitata; dodamo 20 ml destilirane vode in pustimo stati čez noč.

Zaradi redukcije se na melaninskih granulah nalaga kovinsko srebro, zaradi česar se le te obarvajo črno.

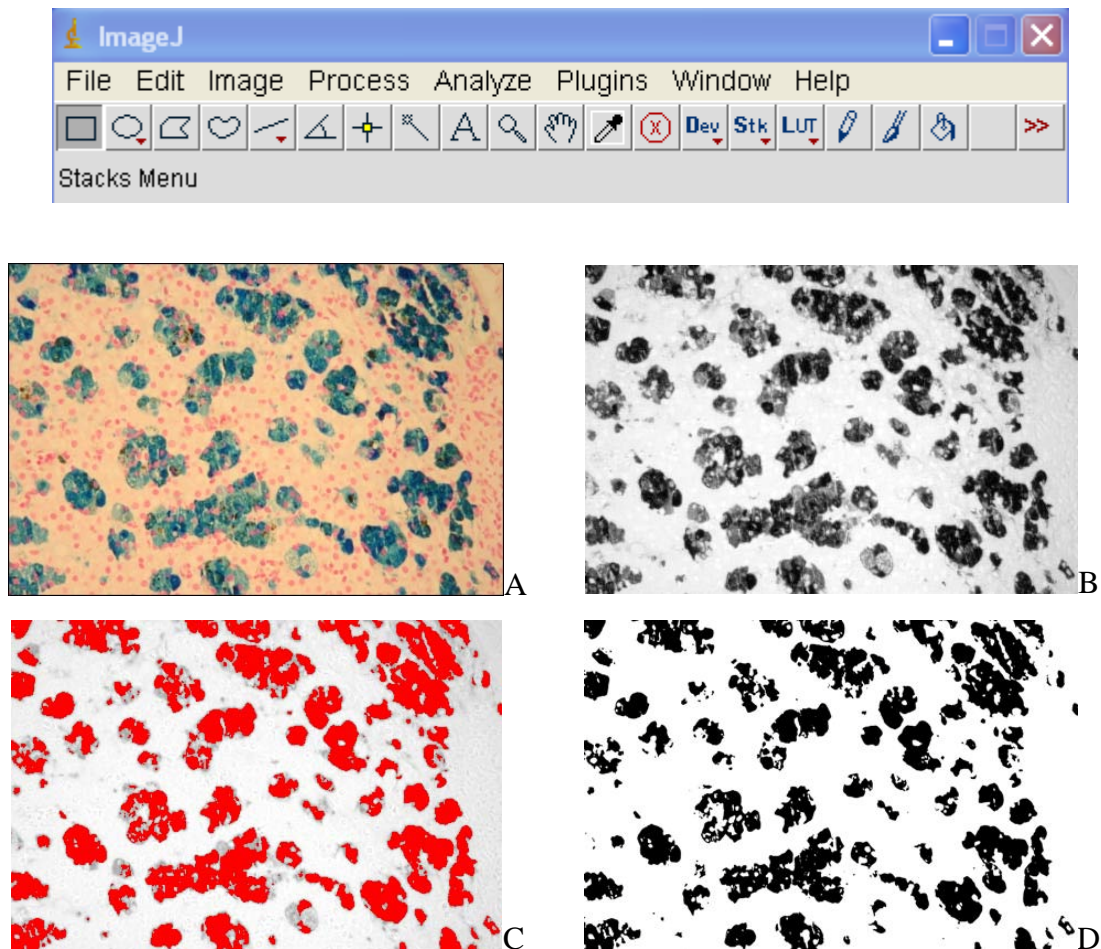
3.3 MIKROSKOPIRANJE

Histološke preparate smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON – Axioskop Zeiss in fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500.

3.3.1 Analiza fotografij

Histološke rezine smo slikali pri 100x povečavi. Za vsak osebek smo naredili 12 posnetkov na naključno izbranih mestih histoloških rezin, in sicer za vsako posamezno regijo jeter (anteriorno, mediano in posteriorno), torej skupno 36 slik na osebek. Z računalniškim programom Image J (Slika 3), ki je dosegljiv na internetni strani <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, smo na posnetkih histoloških rezin analizirali delež površine pigmentnih skupkov in melanina. V programu Image J smo barvne posnetke s funkcijo »split channels« pretvorili v črno bele pri treh različnih kanalih (rdeč, moder, zelen). Tako pridobljene slike smo primerjali z originalnimi posnetki in izbrali kanal pri katerem so bili pigmentni skupki videti identično originalnemu posnetku. V našem primeru je bil to rdeči kanal. S funkcijo »threshold« smo nato prilagodili mejno vrednost, ki je morala biti nato ista na vseh fotografijah jeter iste živali. Slikovne točke temnejše od določene mejne vrednosti je program seštel (»analyze particles«) in podal rezultat v obliki deleža površine slike, ki so jo predstavljali temnejši deli. Z nastavitvijo nižje mejne vrednosti smo analizirali melanin.

Podatke pridobljene s programom Image J, smo vstavili v MS Excel tabelo in izračunali povprečje deležev površin pigmentnih skupkov in melanina na slikah histoloških rezin jeter za posamezne osebkove in standardne odklone (SD).



Slice	Count	Total Area	Average Size	Area Fraction
P147_JM1_Per_100_00001.JPG (red).jpg	141	1568129.000	11121.482	24.9
P147_JM1_Per_100_00002.JPG (red).jpg	158	1613328.000	10210.937	25.6
P147_JM1_Per_100_00003.JPG (red).jpg	146	1376322.000	9426.863	21.9
P147_JM1_Per_100_00004.JPG (red).jpg	104	1265289.000	12166.240	20.1
P147_JM1_Per_100_00005.JPG (red).jpg	164	1669932.000	10182.512	26.5
P147_JM1_Per_100_00006.JPG (red).jpg	167	1261674.000	7554.934	20.1

Slika3: Analiza fotografij v programu ImageJ. A. Uvoz slike v program. B. Pretvorba slike v črnobelo (»split channels«). C. Nastavitev mejne vrednosti (»threshold«). D. Izračun deleža površine PS na posnetku histološke rezine (»analyze particles«).

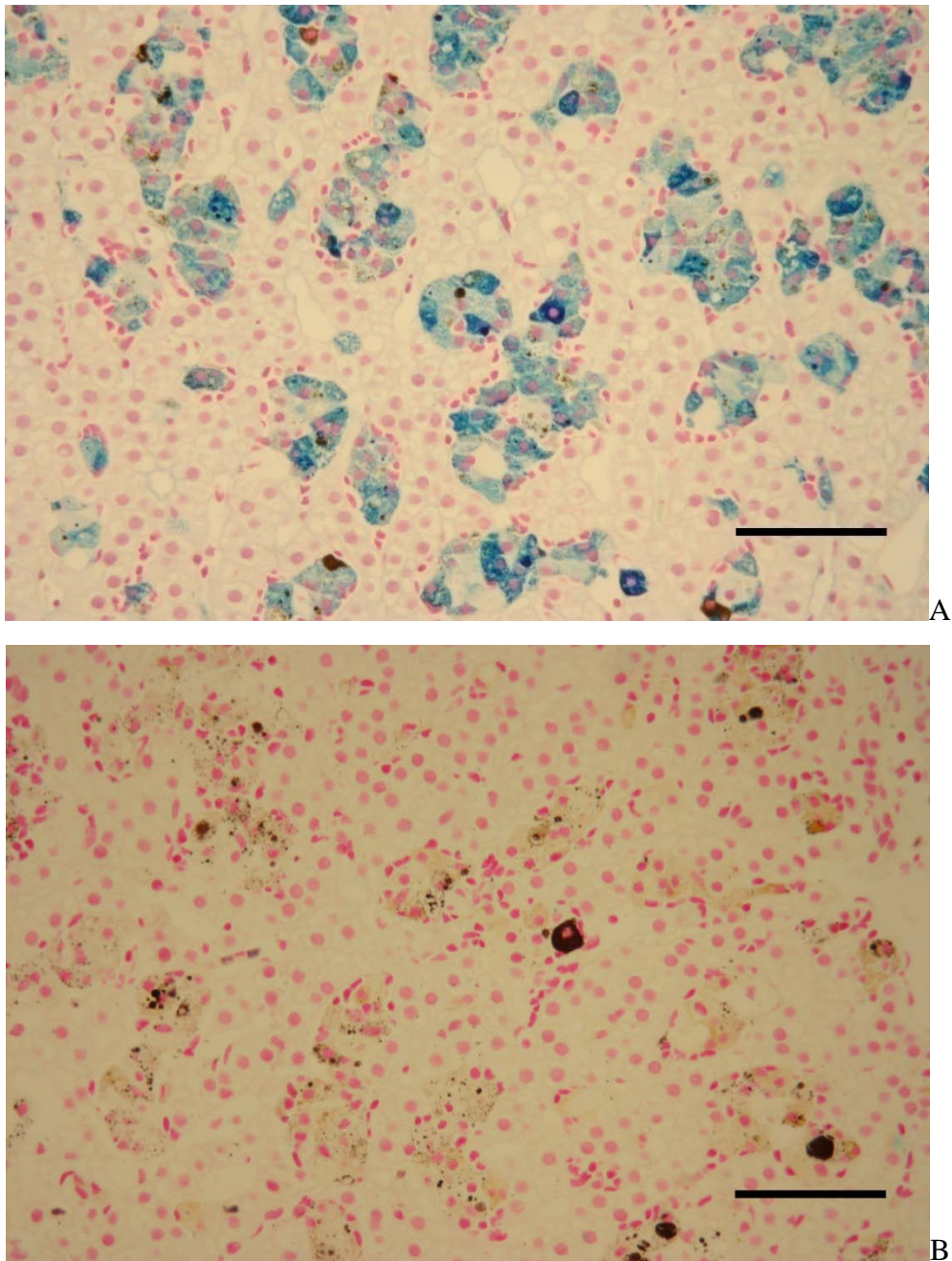
4 REZULTATI

4.1 MORFOLOGIJA PIGMENTNIH SKUPKOV V JETRIH MOČERILA

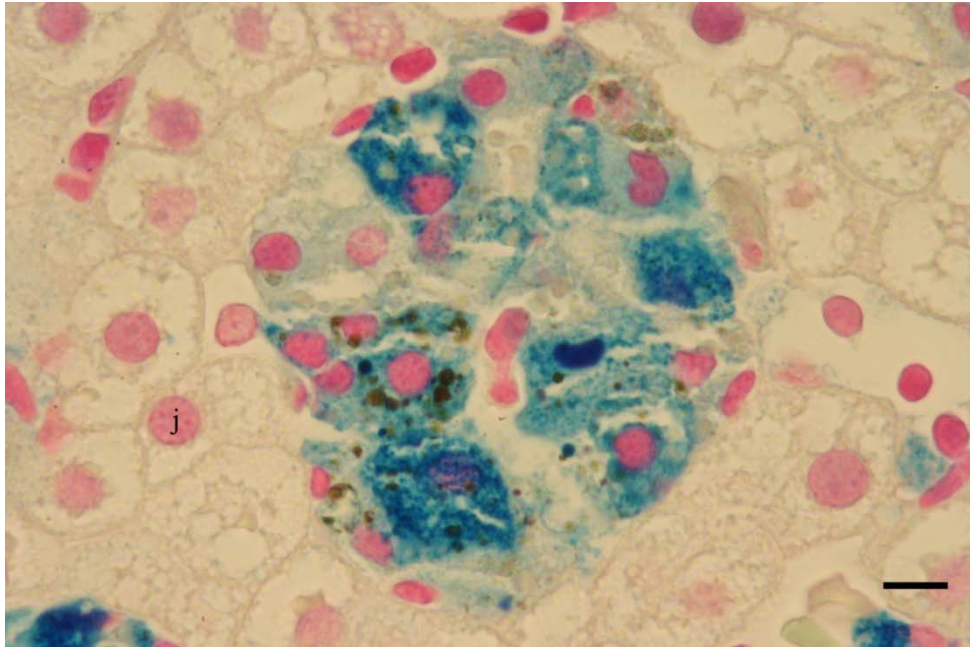
Pigmentni skupki v jetrih močerila so enakomerno porazdeljeni skozi jetrni parenhim (Slika 4A). V pigmentnem skupku so predvsem celice PC-S, ki se s histokemijskem barvanjem za železo (barvanje po Perlsu) obarvajo modro (Slika 4A, 5). V njihovi citoplazmi je tudi melanin, ki smo ga potrdili s histokemijskim barvanjem Masson-Fontana, melanin se obarva črno-rjavo (Slika 4B).

V pigmentnem skupku so tudi posamezne rjavo-črno obarvane celice PC-M (Slika 4B). Z Masson-Fontana barvanjem smo potrdili prisotnost melanina. Barvanje po Perlsu je bilo negativno. Celice PC-M so za razliko od PC-S maloštevilne (Slika 4B).

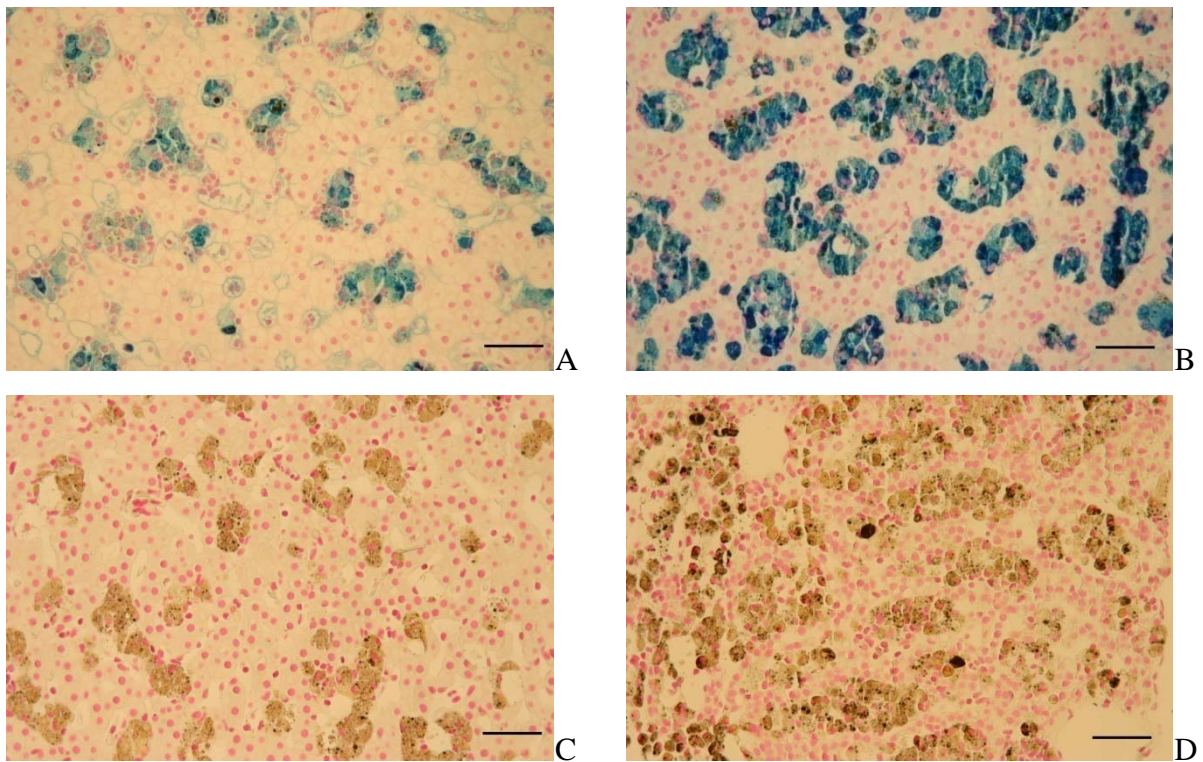
Na histoloških preparatih smo opazili očitne razlike v pigmentiranosti jeter med hranjenimi in nehranjenimi osebki (Slika 6). V jetrih osebkov stradanih daljše obdobje so področja s pigmentnimi skupki obsežnejša v primerjavi z ostalimi (Slika 6B), več je tudi melanina (Slika 6D).



Slika 4: Pigmentni skupki v jetrih bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). A. Barvanje po Perlsu za železo (modro obarvanje). B. Barvanje po Masson-Fontana za melanin (rjavo-črno obarvanje). Jedra PC in hepatocitov se obarvajo rožnato. Merilo 100 µm.



Slika 5: Skupek pigmentnih celic PC-S v jetrih bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). Hemosiderin je obarvan modro, viden je tudi melanin, ki je rjavo do črne barve. j – jedro hepatocita. Barvanje po Perlsu. Merilo 10 μ m.



Slika 6: Primerjava pigmentiranosti jeter bele podvrste močerila (*P. a. anguinus*). A, C. Osebek stradan 1 mesec. B, D. Osebek stradan 18 mesecev. A, B. Barvanje po Perlsu za železo. C, D. Barvanje po Masson-Fontana za melanin. Merilo 100 μ m.

4.2 ANALIZA DELEŽA PIGMENTNIH CELIC IN MELANINA V JETRIH MOČERILA

S pomočjo grafičnega programa Image J smo na posnetkih histoloških rezin jeter hranjenih in stradanih osebkov močerila analizirali delež površine pigmentnih skupkov (PS) in melanina. Stradani osebki so bili brez hrane različno dolgo, in sicer en mesec, štiri mesece, štirinajst in osemnajst mesecev. Histološke rezine so bile barvane s histokemijskim barvanjem Perls za železo in Masson - Fontana za melanin.

V preglednici 2 so prikazani povprečni deleži površine PS in melanina na posnetkih histoloških rezin jeter osebkov močerila.

Preglednica 2: Delež površine (%) pigmentnih skupkov (PS) in melanina na posnetkih histoloških rezin jeter hranjenih in stradanih osebkov (*Proteus anguinus*).

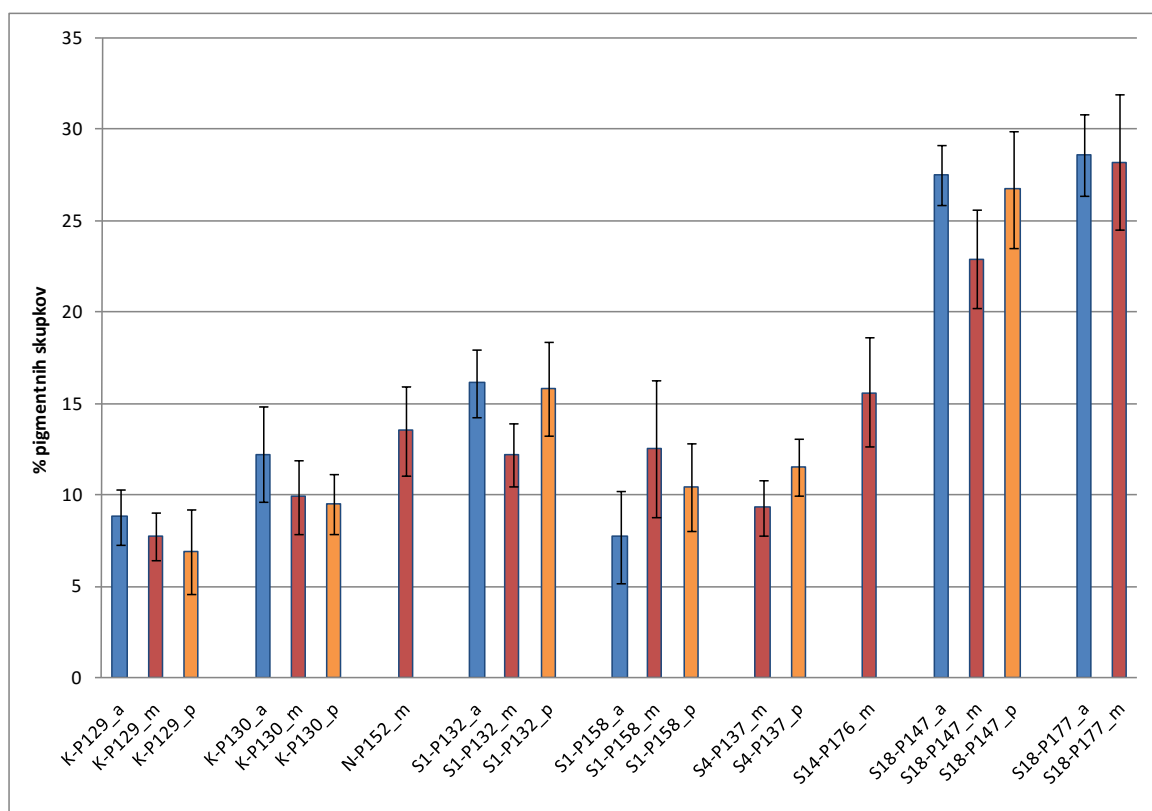
Evidenčna številka osebka	Čas stradanja (meseči)	Pigmentni skupki (%)	Melanin (%)
P129	K	7,8 ±1,72	0,75 ±0,20
P130	K	10,5 ±2,08	1,50 ±0,44
P152	N	13,5 ±2,43	0,30 ±0,07
P132	1	14,7 ±2,05	1,02 ±0,33
P158	1	10,2 ±2,88	1,20 ±0,33
P137	4	10,4 ±1,54	0,65 ±0,24
P176	14	15,6 ±2,98	0,40 ±0,09
P147	18	25,4 ±2,52	1,40 ±0,34
P177	18	28,4 ±2,97	3,10 ±1,15

Legenda: K - osebka, zadrževana v laboratoriju in hranjena en mesec; N- osebek iz narave; ± standardni odklon

Največ pigmentnih skupkov (PS) so imeli osebki stradani 18 mesecev, in sicer 28,4% in 25,4% celotne površine na posnetkih histoloških rezin. Bistveno manj PS od omenjenih osebkov je imel osebek stradan 14 mesecev, in sicer 15,6%. Pri kontrolnih osebkih, osebku iz narave in osebkih stradanih 1 in 4 mesece je bil delež PS v razponu od 7,8% do 14,7% (Preglednica 2).

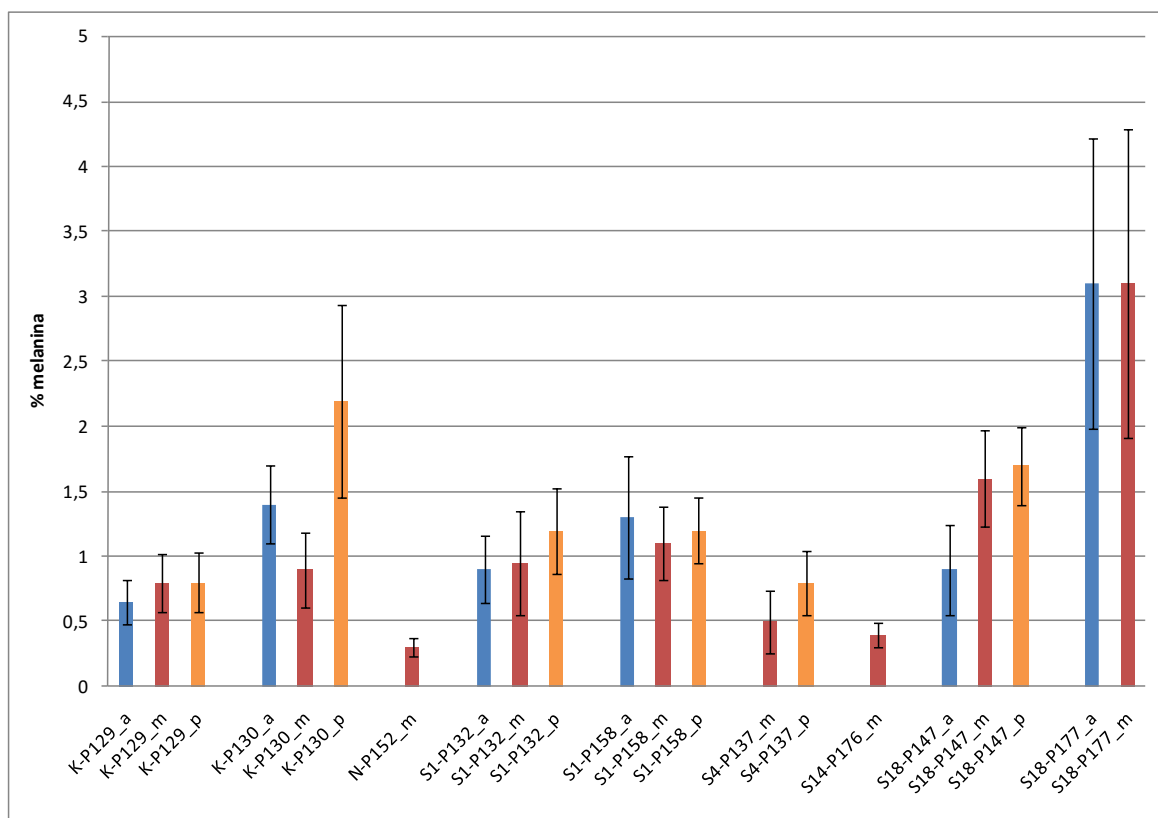
Največ melanina je imel osebek P177, stradan 18 mesecev, in sicer 3,10%. Precej manj melanina je imel osebek P147, prav tako stradan 18 mesecev, in sicer 1,40%. Pri osebku stradanem 14 mesecev je bil delež melanina 0,40% in pri osebku stradanem 4 mesece 0,65%. Pri osebkih stradanih 1 mesec je bilo melanina nekoliko več, in sicer 1,02% in 1,20%. Hranjeni osebki so imeli 0,30%, 0,75% in 1,50% melanina (Preglednica 2).

Primerjalni smo tudi delež površine pigmentnih skupkov in melanina na posnetkih histoloških rezin iz različnih regij jeter (anteriorna, mediana, posteriorna) istega osebk, vendar bistvenih razlik med različnimi regijami jeter nismo zasledili (Slika 7, 8).



Slika 7: Primerjava deleža površine pigmentnih skupkov PS na posnetkih iz različnih regij jeter (anteriorna - modro, mediana - rdeče in posteriorna - oranžno) pri hranjenih in stradanih osebkih (*P. a. anguinus*). \bar{x} : standardni odklon.

K - P129, P130: hranjeni osebki; N - 152: osebek iz narave, S1 - P132 in P158: en mesec strdana osebka; S4 - P137: štiri mesece strdana osebka; S14 - P176: štirinajst mesecev strdani osebka; S18 - P147 in P177: osemnajst mesec strdana osebka.



Slika 8: Primerjava deleža površine melanina na posnetkih iz različnih regij jeter (anteriorna - modro, mediana - rdeče in posteriorna - oranžno) pri hranjenih in stradanih osebkih (*P. a. anguinus*). \bar{I} : standardni odklon.

K - P129, P130: hranjeni osebki; N - 152: osebek iz narave, S1 - P132 in P158: en mesec stradana osebk; S4 - P137: štiri mesece stradan osebek; S14 - P176: štirinajst mesecev stradani osebek; S18 - P147 in P177: osemnajst mesec stradana osebk.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

Močeril ali človeška ribica (*Proteus anguinus*) je endemična dvoživka podzemeljskih voda Dinarskega Krasa. Na jamske pogoje, kjer prevladujejo skromni in nestalni viri hrane ter občasna hipoksija, je izredno dobro prilagojena. Močeril je dolgoživa dvoživka z upočasnjem metabolizmom in izredno toleranco na stradanje (Bulog in sod., 2000; Hervant in sod., 2001; Bizjak mali in sod., 2013). V literaturi navajajo, da lahko preživi brez hrane od 18 mesecev pa do 96 mesecev, brez vidnih znakov bolezni (Vandel, 1965; Hervant, 2001; Bizjak Mali, 2013). Bulog (2000) navaja, da po njihovih opazovanjih lahko preživi celo več kot 10 let brez hrane, le v steklenem akvariju s čisto vodo. Človeška ribica je znana tudi kot najbolj tolerantna dvoživka na anoksijo (Issartel in sod., 2009).

Jetra močerila so pomemben presnovni in skladiščni organ (Bizjak Mali in sod., 2013). Posebnost jeter pa so obsežni skupki pigmentnih celic (PC), ki vključujejo železove pigmente in melanin (Prelovšek, 2002; Prelovšek in sod., 2008). PC v jetrih so stacionarni makrofagi, poznani tudi kot Kupfferjeve celice, ki so sposobne sinteze melanina (Scalia in sod., 1988; Sichel, 1988; Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998). Pripadajo ekstrakutaneusnemu pigmentnemu sistemu, ki ima pri ribah, dvoživkah in plazilcih pomembno zaščitno funkcijo (Sichel, 1988). Na stopnjo pigmentiranosti jeter pri dvoživkah in drugih poikilotermnih vretenčarjih vplivajo številni stresni faktorji (Tanaka in sod., 1974; Corsaro in sod., 1990; Barni in sod., 1999; Frangioni in sod., 2000), in sicer okoljski dejavniki (temperatura, letni časi, obdobje hibernacije), velikost in starost živali, stradanje, zdravstveno stanje živali, kot tudi izpostavljenost strupenim snovem v okolju (Couillard in sod., 1996; Loumbourdis in sod., 2002).

V diplomskem delu smo primerjali pigmentiranost jeter hranjenih in nehranjenih osebkov močerila, saj smo želeli ugotoviti, če stradanje vpliva na zastopanost pigmentnih celic in melanina.

S histokemijskim barvanjem smo potrdili zastopanost železovih pigmentov in melanina v pigmentnih celicah PC-S v jetrih močerila, kot tudi to, da so v pigmentnih skupkih zastopane predvsem celice PC-S, medtem ko so celice PC-M, ki vključujejo samo melanin

zastopane v manjšem številu. Histokemijsko barvanje pa nam je bilo tudi v pomoč pri analizi slik z grafičnim programom Image J za oceno deleža površine pigmentnih skupkov in melanina na posnetkih histoloških rezin jeter kontrolnih in stradanih osebkov. Z analizo slik jeter smo potrdili povišan delež pigmentnih skupkov (PS) pri osebkih stradanih najdlje časa (18 mesecev). Delež PS pri njih je bil bistveno višji (od 25,4% do 28,4%) v primerjavi s kontrolnimi osebki. Delež PS v jetrih osebkov stradanih krajše obdobje (1 in 4 mesece) ni bistveno odstopal od kontrolnih osebkov in od osebka iz narave. Delež površine melanina na posnetkih histoloških rezin stradanih osebkov je primerljiv s kontrolnimi osebki. Razen v primeru enega osebka stradanega 18 mesecev je delež višji (3,1% melanina) v primerjavi z ostalimi osebki, vendar kot je videti iz SD so meritve zelo odstopale. Variabilnost, ki smo jo zasledili v vzorcih je odraz majhnega vzorca in samega načina analize posnetkov histoloških rezin, saj je nastavitev mejnih vrednosti v programu (»threshold«) zelo subjektivna, kar je tudi velika pomankljivost metode pri analizi histoloških preparatov.

Rezultati sicer kažejo na to, da stradanje vodi v povečanje pigmentiranosti jeter močerila, kar se sklada z rezultati morfometrične analize, ki jo je naredila Pihler (2014) na jetrih močerila. Ugotovila je povišanje deleža pigmentnih celic in znižanje deleža hepatocitov v jetrih pri osebkih močerila izpostavljenih daljšemu obdobju stradanja. Povečanje pigmentiranih območij v jetrih opisujejo tudi pri drugih dvoživkah, zeleni žabi *Rana esculenta*, pupkih *Triturus a. apuanus* in *Triturus carnifex*, v času hibernacije (Barni in sod., 1999). Med hibernacijo se pri organizmih zniža metabolna aktivnost, saj so temperature nižje in je značilno pomanjkanje hrane. Tudi raziskave vsebnosti melanina v jetrih pri zeleni žabi (*Rana esculenta*) tekom različnih sezon leta so pokazale, da so jetra v zimskem času bolj pigmentirana, minimalna količina melanina pa je sovpadala z maksimalno temperaturo okolja (Corsaro in sod., 1990; Barni in sod., 2002).

Hervant in sod. (2001) so opravili raziskave fiziološkega odziva močerila na daljša obdobja brez hranjenja, ki so med drugim pokazale padec hematokrita in koncentracije hemoglobina v krvi. Ena izmed funkcij pigmentnih celic je tudi fagocitoza poškodovanih in odmrlih eritrocitov in posledično akumulacija železa v jetrih (Frangioni in sod., 2000). Daljša obdobja stradanja so torej lahko možen vzrok za povečanje železa (hemosiderina) v pigmentnih celicah jeter močerila in povečano količino pigmentnih skupkov. Povečano

nalaganje železa v jetrnih melanomakrofagih navajajo tudi za stradane in bolne ribe (Agius, 1979). Eden od bolnih močerilov v raziskavi, kasneje sicer izvzet, ker je bil samec (vsi ostali osebki v raziskavi so bile samice), je imel prav tako znatno povečano število pigmentnih celic.

Variabilnost tako v zastopanosti PS in predvsem melanina v jetrih preučevanih osebkov močerila pa bi lahko razložili tudi z različno starostjo živali, saj se s starostjo pigmenti v celicah kopičijo (Andrew, 1969; Tanaka in sod., 1974; Christiansen in sod., 1996). Vpliv imajo tudi občasna obdobja hipoksije, ki so običajen pojav v jamskem okolju človeške ribice (Istenič, 1979, 1986; Hervant in sod., 2001). Raziskave na jetrih pupkov (*Triturus carnifex*) izpostavljenih hipoksiji so potrdile sintezo melanina in kopičenje železa (Frangioni in sod., 2000). Hipoksija namreč vzpodbudi tirozinazno aktivnost, prav tako privede do odstranitve respiratornih koencimov in razpada eritrocitov, kar vodi v akumulacijo železa. Nenazadnje se pigmenti v jetrih kopičijo tudi zaradi onesnaženja podzemnih voda Dinarskega Krasa, saj skozi karbonatno podlago pronicajo onesnažila s kmetijskih površin (Bulog in sod., 2000). Povišanje vsebnosti pigmentov v jetrih (melanin, hemosiderin, feritin, lipofuscin) opisujejo pri žabi debeloglavki (*Rana ridibunda*) ob izpostavljenosti kadmiju (Loumbourdis in sod., 2002), kot tudi pri ribah, ki so bile izpostavljene toksičnim izpustom v vodi (Couillard in sod., 1996).

V pigmentnih celicah jeter poikilotermov, tudi pri močerilu, poteka tudi sinteza melanina (Prelovšek, 2002; Prelovšek in Bulog, 2003). Melanin je polimer, ki lahko absorbira in nevtralizira proste radikale, katione in druge potencialno toksične agense (Sichel in sod., 1988; Geremia in sod., 1989; Zuasti in sod., 1990; Frangioni in sod., 2000). Prav tako je filogenetsko najstarejši antioksidant (Geremia in sod., 1989). Oksidativni metabolizem celic je nenehen vir reaktivnih kisikov spojin (ROS), ki lahko poškodujejo celične komponente, in vodi v celično smrt. Za zaščito pred temi visoko reaktivnimi intermedii imajo živi organizmi obrambni sistem, in sicer tako encimatske (superoksidna dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza) kot neencimatske (glutation) antioksidante. Vseeno pa v določenih situacijah nivo ROS močno preraste odstranjevanje in tako pride do oksidativnega stresa. V tem oziru so poročali, da ima stradanje pri sesalcih škodljiv vpliv, saj poveča tvorbo ROS (Geremia in sod., 1989; Morales in sod., 2004).

Melanomakrofagni centri v jetrih dvoživk imajo tako zaščitno funkcijo, melanin v njih pa je alternativa encimom antioksidantnega sistema (Sichel in sod., 1987; Geremia in sod., 1989). Najverjetneje tudi pri močerilu vloga melanina ni zanemarljiva in ima pomembno zaščitno vlogo pred visoko reaktivnimi intermediati, ki nastajajo v oksidativnem metabolizmu celic.

V skladu z našimi predvidevanji so rezultati raziskave potrdili povečanje deleža PS v jetrih stradanih osebkov močerila. Variabilnost v zastopanosti melanina in tudi PS v jetrih proučevanih osebkov pa je lahko odraz dolgoživosti močerila in življenja v specifičnem jamskem okolju.

5.2 SKLEPI

- Z raziskavo smo še dodatno potrdili prejšnje objave, da so v jetrih močerila obsežni pigmentni skupki s hemosiderinom in melaninom.
- Prav tako lahko potrdimo, da pigmentne celice PC-S s hemosiderinom in melaninom prevladujejo, medtem ko so celice PC-M z melaninom maloštevilne.
- Največ PS imajo osebki stradani osemnajst mesecev. Pri osebkih stradanih krajše obdobje (1 in 4 mesece) je količina primerljiva s kontrolnimi osebki.
- Zastopanost melanina je pri različno dolgo stradanih osebkih primerljiva s kontrolnimi osebki. Večjih razlik med njimi ni zaslediti.
- Na posnetkih histoloških rezin smo primerjalni tudi deleže površin PS in melanina med različnimi regijami jeter (anteriorna, mediana, posteriorna) istega osebka, vendar bistvenih razlik med različnimi regijami jeter nismo zasledili.
- Rezultati raziskave kažejo na to, da se zastopanost pigmentnih skupkov v jetrih s stradanjem poveča.

6 POVZETEK

Močeril ali človeška ribica (*Proteus anguinus*) je jamska dvoživka, ki naseljuje podzemne vode Dinarskega Krasa. Na jamske pogoje je dobro prilagojen, predvsem na skromne vire hrane, kar je običajen pojav v njegovem življenjskem okolju. Poleg tega ima upočasnen metabolizem in je dolgoživ (70 let).

V jetrih močerila so obsežni skupki pigmentnih celic, ki vključujejo železove pigmente in melanin in v katerih poteka tudi sinteza melanina. Pigmenti v jetrih se kopičijo zaradi njegove dolgoživosti, kot tudi zaradi občasnih hipoksičnih pogojev, ki se pojavljajo v jamah in nenazadnje tudi zaradi občasnega stradanja. Zanimalo nas je, ali stradanje kot eden od možnih dejavnikov stresa v jamskem okolju vpliva na pigmentiranost jeter močerila.

Pigmentne celice v jetrih poikilotermov so stacionarni makrofagi, poznani kot Kufferjeve celice, ki pripadajo ekstrakutaneusnemu pigmentnemu sistemu, ki ima pri ribah, dvoživkah in plazilcih tudi pomembno zaščitno funkcijo, med drugim tudi pred prostimi radikali.

Melanini so biopolimeri. Njihova sinteza poteka v specializiranih organelih melanosomih, ki vsebujejo encim tirozinazo. Melanin je filogenetsko najstarejši antioksidant in je alternativa encimom antioksidantnega sistema, saj lahko absorbira in nevtralizira proste radikale, katione in druge potencialno toksične agense. V pigmentnih celicah jeter dvoživk so tudi železovi pigmenti v obliki hemosiderina, feritina, pogosto je zastopan tudi lipofuscin in drugi vključki. V jetrih sesalcev se ti pigmenti pojavljajo le patološko. Hemosiderin je zlato-rjav pigment bogat z železom, organska spojina nastala iz hemoglobina, ki se po Perls-u obarva modro. Pomen železovih pigmentov je predvsem shranjevanje železa, ki mora biti po potrebi znova na razpolago.

Za analizo pigmentnih področij v jetrih močerila smo uporabili dva histokemijska testa: 1) barvanje po Perls-u za identifikacijo železa in 2) Masson-Fontana metodo za identifikacijo melanina. Histološke preparate smo preiskali s svetlobnim mikroskopom in poslikali ter s programom Image J analizirali delež površine pigmentnih skupkov in melanina na posnetkih histoloških rezin jeter kontrolnih in stradanih osebkov. Osebkki močerila za raziskave so bili

različno dolgo stradani – od enega meseca do osemnajstih mesecev. Rezultati naših raziskav so pokazali, da se količina pigmentnih skupkov v jetrih med stradanjem poveča. Zastopanost melanina se bistveno ne spremeni.

Močeril se na daljše obdobje brez hrane odziva s padcem hematokrita in padcem koncentracije hemoglobina v krvi, kar vodi v kopičenje hemosiderina v jetrih, saj pigmentne celice vršijo fagocitozo poškodovanih in odmrlih eritrocitov.

V skladu z našimi predvidevanji so rezultati raziskave potrdili povečanje količine PS v jetrih stradanih osebkov močerila. Variabilnosti v zastopanosti melanina in tudi PS proučevanih osebkov pa je lahko odraz dolgoživosti močerila in življenja v specifičnem jamskem okolju.

7 VIRI

- Agius C. 1979. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases*, 2: 337-343
- Agius C., Roberts R. J. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*, 26: 499-509
- Andrew, W. 1969. The nature of pigment cells in the liver of *Ambystoma mexicanum* and their changes with age. *Journal of Cell Biology*, 43: 7
- Bagnara J. T. 1998. Comparative Anatomy and Physiology of Pigment Cells in Nonmammalian Tissues. V: The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. Nordlund, J. J., Boissy R. E., Hearing V. J., King R. A., Ortonne Jean-Paul (eds.), New York, Oxford; Oxford University Press: 9-40
- Barni S., Bertone V., Croce A. C., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *Journal of Anatomy*, 195: 19-25
- Barni S., Vaccarone R., Bertone V., Fraschini A., Bernini F., Fenoglio C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *Journal of Anatomy*, 200: 185-194
- Bizjak Mali L. 2002. Vpliv stradanja na ultrastrukturo hepatocitov močerila (*Proteus anguinus*, Amphibia, Urodela). Disertacija. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 232 str.
- Bizjak Mali L., Sepčič K., Bulog B. 2013. Long-term starvation in cave salamander effects on liver ultrastructure and energy reserve mobilization. *Journal of Morphology*, 274: 887-900
- Bulog B., Bizjak Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P. M., Aljančič G. 2000. Biology and functional morphology of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Acta Biologica Slovenica*, 43: 85-102
- Césarini J. P. 1996. Melanins and their possible roles through biological evolution. *Advances in Space Research*, 18, 12: 35-40
- Christiansen, J. L., Grzybowski, J. M., Kodama, R. M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). *Pigment Cell Research*, 9: 185-190

- Corsaro C., Scalia M., Sinatra F., Sichel G. 1990. Circannual rhythm of the melanin content in frog liver (*Rana esculenta* L.) *Pigment Cell Research*, 3: 120-122
- Corsaro C., Scalia M., Leotta N., Mondio F., Sichel G. 2000. Characterisation of Kupffer cells in some Amphibia. *Journal of Anatomy*, 196: 249-261
- Couillard C. M., and Hodson P. V. 1996. Pigmented macrophage aggregates: a toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 10: 1844-1854
- Frangioni G., Borgiolio G., Bianchi S., Pillozzi, S. 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. *Journal of Experimental Zoology*, 287: 120-127
- Geremia E., Corsaro C., Baratta D., Santoro C., Scalia M., Sichel G. 1989. Antioxidant enzymatic systems in pigmented tissue of Amphibia. *Pigment Cell Research*, 2: 208-212
- Ghadially F.N. 1997. *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, vol. 2. 4th ed. Boston, Butterworth Heinmann: 1424 str.
- Guida G., Maida I., Gallone A., Boffoli D., Cicero R. 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta* L. *In Vitro Cell Developmental Biology – Animal*, 34: 393-400
- Hervant F., Mathieu J., Durand J. 2001. Behavioural, physiological and metabolic responses to long-term starvation and refeeding in a blind cave-dwelling (*Proteus anguinus*) and a surface-dwelling (*Euproctus asper*) salamander. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 269-281
- Iancu T. C. 1992. Feritin and haemosiderin in pathological tissues. *Electron Microscopy Reviews*, 5: 209-229
- Issartel I., Hervant F., de Fraipont M., Clobert J., Voituron Y. 2009. High anoxia tolerance in the subterranean salamander *Proteus anguinus* without oxidative stress nor activation of antioxidant defenses during reoxygenation. *Journal of Comparative Physiology B*, 179: 543-551
- Istenič L. 1979. Pomanjkanje kisika v Putikovem jezeru Planinske jame (The oxygen deficit in Putic Lake of Planinska jama). *Acta Carsologica*, 8: 331-352

- Istenič L. 1986. Evidence of Hypoxic Conditions in the Habitat of the Cave Salamander *Proteus anguinus* in the Planinska Jama. In 9th Congress International Speleology, 1986, Barcelona: 110-112
- Kiernan J. A. 1990. Histological and histochemical methods: Theory and practice. 2nd ed. Michigan, Pergamon Press, 443 str.
- Loumbourdis N. S., Vogiatzis, A. K. 2002. Impact of cadmium on liver pigmentary system of the frog *Rana ridibunda*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 53: 52-58
- McCuskey R. S., McCuskey P. A. 1990. Fine structure and function of Kupffer cells. *Journal of electron microscopy technique*, 14: 237 - 246
- Morales A. E., Pérez-Jiménez A., Hidalgo M. C., Abellán E., Cardenete G. 2004. Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139: 153-161
- Onsman I. 2003. In Quest of Events Leading to Pigmentary Disorders in Several Mutants of the Budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). A Light and Electronmicroscopical Survey.
<http://www.euronet.nl/users/hnl/afb3.htm> (18. avg. 2016)
- Pihler N. 2014. Morfometrična analiza jeter močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 42 str.
- Prelovšek P. M. 2002. Histokemijska in ultrastrukturna analiza pigmentnih celic v jetrih močeila (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela). Magistrsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta: 258 str.
- Prelovšek P. M., Bulog B. 2003. Biogenesis of melanosomes in Kupffer cells of *Proteusanguinus* (Urodela, Amphibia). *Pigment Cell Research*, 16: 345-350
- Prelovšek P. M., Bizjak Mali L., Bulog B. 2008. Hepatic pigment cells of Proteidae (Amphibia, Urodela): A comparative histochemical and ultrastructural study. *Animal Biology*, 58: 245-256
- Presnell J. K., Schreibmann M. P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5th ed. Baltimore, London, The John Hopkins University Press, 572 str.
- Riley P. A. 1997. Melanin. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 29, 11: 1235-1239

- Scalia M., Geremia E., Corsaro C., Santoro C., Sciuto S., Sichel G. 1988. The Extracutaneous Pigmentary System: Evidence for the Melanosynthesis in Amphibia and Reptilia Liver. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 89B, 4: 715-717
- Sichel G., Corsaro C., Scalia M., Sciuto S., Geremia E. 1987. Relationship between melanin content and superoxidase dismutase (SOD) activity in the liver of various species of animals. *Cell Biochemistry and Function*, 5: 123-128
- Sichel G. 1988. Biosynthesis and function of melanins in hepatic pigmentary system. *Pigment Cell Research*, 1: 250-258
- Sichel G., Scalia M., Mondio F., Corsaro C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: An ultrastructural point of view. *Pigment Cell Research*, 10: 271-287
- Spornitz U. M. 1975. Studies on the Liver of *Xenopus laevis*: II. The ultrastructure of the Peritoneal Cover and Perihepatic Layer. *Journal of Anatomy Embryology*, 146: 265-277
- Tanaka Y., Noda K., Nomaguchi T., Yamagishi H. 1974. Hepatic melanosis and ageing in amphibian: A preliminary observation on two species of anura *Xenopus laevis* and *Rana nigromaulata*. *Experimental Gerontology*, 9: 263-268
- Zuasti A., Ferrer C., Aroca P., Solano F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). *Pigment Cell Research*, 3: 126-131
- Zuasti A., Jiménez-Cervantes C., García-Borrón J. C., Ferrer C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Archives of Histology and Cytology*, 61, 4: 305-316

ZAHVALA

Doc. dr. Lilijani Bizjak Mali za mentorstvo, nasvete in koristne pripombe pri pisanju diplomske naloge ter pripravljenost pomagati v vsakem trenutku.

Recenzentki doc. dr. Nadi Žnidaršič za hiter pregled naloge in konstruktivno kritiko ter prof. dr. Roku Kostanjšku za sodelovanje v komisiji.

Osebjem na Katedri za zoologijo, predvsem Katji Zdešar Kotnik in Luku Malenšku, za tehnično pomoč pri eksperimentalnem delu in dobro voljo.

Sodelavkama Nataši in Alenki, ki sta nesebično ponudili pomoč pri oblikovanju naloge, kljub obilici svojega dela.

Mami in atiju, ki sta mi omogočila študij in kljub pretečenim letom nista obupala nad mojim zaključkom.

Mojemu Janezu za spodbudne besede, moralno podporo v zaključnih tednih pisanja diplome in ker si verjel vame.

Hvala!