

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tajda GREDAR

**OPTIMIZACIJA GOJENJA KRVNIH CELIC
NEOTENIČNIH DVOŽIVK ZA CITOGENETSKE
ANALIZE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MOLEKULSKE IN FUNKCIONALNE BIOLOGIJE

Tajda GREDAR

**OPTIMIZACIJA GOJENJA KRVNIH CELIC NEOTENIČNIH
DVOŽIVK ZA CITOGENETSKE ANALIZE**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij – 2. stopnja

**BLOOD CELL CULTIVATION OF NEOTENIC AMPHIBIANS AND
ITS OPTIMIZATION FOR CYTOGENETIC ANALYSES**

M. SC. THESIS
Master Study Programmes

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek univerzitetnega študija 2. bolonjske stopnje Molekulska in funkcionalna biologija na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za študij 1. in 2. stopnje oziroma Senata oddelka z dne 20. 2. 2015 je bila za mentorico imenovana doc. dr. Lilijana Bizjak Mali, za recenzentko pa doc. dr. Nada Žnidaršič.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

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

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

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko 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.

Tajda Gredar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)

ŠD Du2
DK 592:597.92(043.2)=163.6
KG bela podvrsta močerila/aksolotel/citogentika/krvne celice
AV GREDAR, Tajda, diplomirana biologinja (UN)
SA BIZJAK MALI, Liliiana (mentorica)/ŽNIDARŠIČ, Nada (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakultete, Študij Molekulske in funkcionalne biologije
LI 2016
IN OPTIMIZACIJA GOJENJA KRVNIH CELIC NEOTENIČNIH DVOŽIVK ZA CITOGENETSKE ANALIZE
TD Magistrsko delo (Magistrski študij – 2. stopnja)
OP XII, 72 str., 10 pregl., 22 sl., 115 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI V raziskavi smo preizkusili in delno optimizirali nedestruktivno metodo kultivacije krvnih celic za citogenetske analize dveh neoteničnih dvoživk (bele podvrste močerila – *Proteus anguinus anguinus* in aksolotla – *Ambystoma mexicanum*). Vzgojili smo primarno celično kulturo krvnih celic obeh obravnavanih vrst dvoživk. Limfocite smo s fitohemaglutininom (PHA-M) spodbudili k celični delitvi in jih nato z antimitotikom ustavili v metafazi, da smo lahko vizualizirali kromosome. Ugotovili smo, da so za pridobitev citogenetskega materiala obravnavanih vrst potrebne mnogo višje koncentracije in daljša inkubacija z mitogenom in antimitotikom, kakor se uporablajo v humani citogenetiki. S testom proliferacije z BrdU smo testirali različne koncentracije PHA-M v celični kulturi krvnih celic in izmed teh je bila najustreznejša koncentracija PHA-M 3–6% (vol/vol) z inkubacijo 4 dni. Za antimitotik je bila najustreznejša koncentracija 3 µg/ml z inkubacijo za 24 ali 48 ur, ki smo ga dodali med 3. in 6. dnem kultivacije. Gojitev celic je uspešno potekala pri temperaturi 25 °C, ki je bistveno višja od temperature v jamskem okolju, kar kaže na večjo temperaturno toleranco celic in tkiv močerila, kot se je doslej predvidevalo. Opisali smo tudi morfologijo in variabilnost posameznih tipov krvnih celic ter analizirali njihove deleže. V krvi obeh neoteničnih dvoživk so tudi predstopnje eritrocitov ali eritroblastov, kar kaže na to, da dozorevanje eritrocitov poteka v krvi. Njihov delež je višji v krvi močerila. Pri močerilu nismo zasledili brezjedrnih eritrocitov, ki se v manjšem deležu pojavljajo pri aksolotlu. Opazili smo, da so v celični kulturi prisotne tudi eritroidne celice z izrastki. Nizko razmerje med nevtrofilci in limfociti kaže, da obravnavani osebki niso bili izpostavljeni stresu.

KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD)

DN Du2
DC 592:597.92(043.2)=163.6
CX proteus/axolotl/cytogenetics/blood cells
AU GREDAR, Tajda
AA BIZJAK MALI, Lilijana (supervisor)/ŽNIDARŠIČ, Nada (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Master Study Programmes in Molecular and Functional Biology
PY 2016
TI BLOOD CELL CULTIVATION OF NEOTENIC AMPHIBIANS AND ITS OPTIMIZATION FOR CYTOGENETIC ANALYSES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programme)
NO XII, 72 p., 10 tab., 22 fig., 115 ref.
LA sl
AL sl/en
AB The aim of our work was to optimize non-destructive method for obtaining the material for cytogenetics analyses in two neotenic amphibians (proteus – *Proteus anguinus anguinus* and axolotl – *Ambystoma mexicanum*). We successfully cultivated primary cell culture of both species. Mitotic cell divisions in lymphocytes were induced by phytohemagglutinin (PHA-M) and metaphase figures were visualized after treatment with antimitotic. We established that higher concentrations and periods of incubations with mitogen and antimitotic in comparison with human cytogenetics are necessary. With BrdU cell proliferation assay we tested several concentrations of PHA-M in the cell culture and among them the most adequate concentration of PHA-M was 3–6% (vol/vol) with 4 days of incubation. Visualization of chromosomes was successful when we added antimitotic to the cell culture between 3rd and 6th day of cultivation. Adequate concentration of antimitotic was 3 µg/ml with 24 or 48 h of incubation. Cell culture was cultivated at 25 °C, which is much higher as the cave temperature. The data show us that cells and tissues of proteus are more temperature tolerant as we presumed. We also described morphology and variability of blood cells and analyzed their differential counts. In the blood of both neotenic species immature erythrocytes are present, which shows that cells mature in the blood and their differential count is higher in proteus. We didn't observe enucleated erythrocytes on proteus blood smear. Few enucleated erythrocytes were present in axolotl's blood. We observed some erythroid cells with spines. Low ratio between neutrophils and lymphocytes shows, that the specimens were not stressed.

KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA (KDI)	III
KEY WORDS DOCUMENTATION (KWD).....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....	XII
1 UVOD.....	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 NAMEN DELA	2
1.3 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
2 PREGLED OBJAV.....	3
2.1 CELIČNE KULTURE	3
2.1.1 Splošno o gojenju celičnih kultur	3
2.1.2 Gojenje krvnih celic dvoživk za citogenetske analize	3
2.1.2.1 Spodbujanje celičnih delitev limfocitov	3
2.1.2.2 Testi proliferacije limfocitov.....	5
2.1.2.3 Antimitotiki	5
2.1.2.4 Vizualizacija kromosomov.....	6
2.2 CITOGENETSKE ANALIZE.....	6
2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KRVNIH CELIC VRETENČARJEV	7
2.3.1 Krvne celice dvoživk	8
2.3.2 Pomen poznavanja morfologije, deležev krvnih celic in ostalih hematoloških parametrov pri dvoživkah	9
3 MATERIAL IN METODE.....	11
3.1 POSKUSNE ŽIVALI.....	11
3.2 ODVZEM KRVI	11
3.3 PRIPRAVA PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC	12
3.3.1 Priprava gojišča in gojenje celic.....	13
3.3.2 Hemocitometrija	13

3.3.3	Test viabilnosti	14
3.3.4	Svetlobna mikroskopija	14
3.3.5	Spremljanje proliferacije s testom z BrdU	14
3.3.6	Inkubacija z antimitotiki in vizualizacija kromosomov	16
3.3.6.1	Antimitotiki	16
3.3.6.2	Hipotonija in fiksacija celic.....	18
3.3.6.3	Priprava preparatov in vizualizacija kromosomov	18
3.4	MORFOLOŠKE ANALIZE KRVNEGA RAZMAZA.....	19
3.4.1	Priprava krvnega razmaza	19
3.4.2	Barvanje krvnega razmaza.....	20
3.4.2.1	Quick Giemsa	20
3.4.2.2	Giemsa s Sörensonovim fosfatnim pufom.....	20
3.4.3	Merjenje velikosti krvnih celic	20
3.4.4	Izračun deležev posameznih tipov krvnih celic	22
4	REZULTATI.....	23
4.1	VZPOSTAVITEV PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC	23
4.2	<i>IN VITRO</i> STIMULACIJA LIMFOCITOV Z MITOGENOM	23
4.3	USTAVLJANJE CELIČNIH DELITEV Z ANTIMITOTIKI IN VIZUALIZACIJA KROMOSOMOV	26
4.4	MORFOLOGIJA KRVNIH CELIC	29
4.4.1	Morfologija krvnih celic aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>).....	29
4.4.1.1	Morfološke značilnosti krvnih celic aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>).....	29
4.4.1.2	Velikosti krvnih celic aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	34
4.4.2	Morfologija krvnih celic bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>)....	36
4.4.2.1	Morfološke značilnosti krvnih celic bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>).....	36
4.4.2.2	Eritroidne celice v celični kulturi krvnih celic	41
4.4.2.3	Velikosti krvnih celic bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>)	43
4.5	DELEŽ CITOPLAZME KRVNIH CELIC.....	45
4.6	DELEŽI RAZLIČNIH TIPOV KRVNIH CELIC NA KRVNIH RAZMAZH	46
5	RAZPRAVA.....	48
5.1	PRIPRAVA PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC	49
5.1.1	Vzpostavitev primarne celične kulture	49

5.1.2	<i>In vitro</i> stimulacija limfocitov z mitogenom.....	50
5.1.3	Ustavljanje celičnih delitev z antimitotikom in vizualizacija kromosomov..	51
5.2	MORFOLOGIJA KRVNIH CELIC	52
6	SKLEPI	60
7	POVZETEK.....	61
8	VIRI.....	63

KAZALO PREGLEDNIC

str.

Pregl. 1:	Prikaz uporabljenih koncentracij antimitotikov in časov inkubacij v celični kulturi aksolotlovih (<i>Ambystoma mexicanum</i>) krvnih celic.....	17
Pregl. 2:	Prikaz uporabljenih koncentracij antimitotika in časov inkubacij v celični kulturi krvnih celic bele podvrste močerila (<i>P. a. anginus</i>).....	17
Pregl. 3:	Sestava Sörensenovega fosfatnega pufra (pH 6,8)	20
Pregl. 4:	Pregled kocentracij levkocitov in njihova viabilnost v celični kulturi, kjer je bil narejen test proliferacije z BrdU.....	24
Pregl. 5:	Pregled uspešnih tretiranj celične kulture aksolotlovih krvnih celic (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in krvnih celic bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anginus</i>) z antimitotiki.	27
Pregl. 6:	Velikosti krvnih celic in jeder iz krvnih razmazov aksolotlov (<i>Ambystoma mexicanum</i>) v μm . N = število celic, SD = standardna deviacija.....	35
Pregl. 7:	Velikosti krvnih celic in jeder iz krvnih razmazov bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anginus</i>) v μm . N = število celic, SD = standardna deviacija.	44
Pregl. 8:	Delež citoplazme krvnih celic v krvnih razmazov aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anginus</i>).	45
Pregl. 9:	Deleži posameznih tipov krvnih celic v krvnih razmazih aksolotlov (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anginus</i>).	46
Pregl. 10:	Diferencialni delež levkocitov na krvnih razmazih in razmerje deležev N/L aksolotlov (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anginus</i>).	47

KAZALO SLIK

	str.
Sl. 1: Tetramer PHA-L (L_4E_0) je sestavljen iz štirih identičnih podenot (oznake A-D) ...	4
Sl. 2: Molekulska struktura radioaktivno označenega timidina (a), timidina (b) in njegovega analoga BrdU (c)	5
Sl. 3: Shematski prikaz poskusov po odvzemu krvi.....	13
Sl. 4: Priprava krvnega razmaza.....	19
Sl. 5: Shematizirana celica z oznakami merjenjih velikosti.	21
Sl. 6: Test proliferacije krvnih celic ($t = 15$ min) v odvisnosti od koncentracije PHA-M. Krvne celice treh osebkov aksolotlov (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in treh osebkov bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>) so bile kultivirane v mikrotitrni plošči s 96 vdolbinicami. Test proliferacije z BrdU je bil narejen 4. dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4.....	25
Sl. 7: Test proliferacije krvnih celic aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>) in bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>) po dnevih. Vrednosti absorbanc lahko med seboj relativno primerjamo. Test proliferacije je bil narejen vsak dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4. Če je bila meritev absorbance testa proliferacije narejena 4. dan, pomeni, da spremljamo stopnjo celičnih delitev med 3. in 4. dnem kultivacije....	26
Sl. 8: Primer profaznega jedra s kromosomi ob jedru nedeleče celice (levo) in prometafazno jedro s kromosomi (desno) pri aksolotlu (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvano z barvilm Giemsa. Merilo = $10 \mu\text{m}$	27
Sl. 9: Metafazni kromosomi bele podvrste močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>) ob jedru nedeleče celice. Barvano z barvilm Giemsa. Merilo = $10 \mu\text{m}$	28
Sl. 10: Primer celic močerila (<i>P. anguinus anguinus</i>) v istem vidnem polju. Levo – DIC, desno - fluorescenčna mikroskopija z barvilm akridin oranž. Merilo = $20 \mu\text{m}$...28	28
Sl. 11: Morfološke značilnosti in variabilnost eritrocitov pri aksolotlu (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvanje z barvilm Giemsa. a) okrogel eritrocit, b) ovalen eritrocit, c) vretenast eritrocit, d) eritrocit v obliki kaplje, e) eritrocit z ekscentrično nameščenim jedrom, f) in g) »velik« eritrocit, h) eritrocit z dvemi jedri, i) eritrocit s tremi jedri, j) ovalen brezjedrni eritrocit, k) ovalen brezjedrni eritrocit z razpoko - artefakt, l) brezjedrni eritrocit v obliki kaplje. Merilo = $20 \mu\text{m}$	31

Sl. 12: Morfološke značilnosti in variabilnost eritroblastov pri aksolotlu (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a-d) eritroblasti v različnih zrelostnih stopnjah, e) eritroblast med celično delitvijo. Merilo = 20 μm .	32
Sl. 13: Morfološke značilnosti in variabilnost trombocitov pri aksolotlu (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a in b) trombociti v skupini, c) posamezen podolgovat trombocit, d) posamezen okrogel trombocit. Merilo = 20 μm .	32
Sl. 14: Morfološke značilnosti in variabilnost levkocitov pri aksolotlu (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a-c) velik limfocit, d) majhen limfocit, e-g) monociti različnih velikosti in z različnimi jedri, h) bazofilec s štirilobularnim jedrom, i) bazofilec z dvolobularnim jedrom, j) nevtrofilec z enolobularnim jedrom s konstrukcijo, k) nevtrofilec z dvolobularnim jedom, l) nevtrofilec s trilobularnim jedrom, m) nevtrofilec s štirilobularnim jedrom, n in o) nevtrofilec s hipersegmentiranim jedrom, p) eozinofilec z ovalnim jedrom, r) eozinofilec z ledvičastom jedrom, s) eozinofilec z dvolobularnim jedrom. Puščica = kromatinska nit. Merilo = 20 μm .	33
Sl. 15: Artefakti na krvnih razmazih aksolotla (<i>Ambystoma mexicanum</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a) prepognjena celica, b) ostanki razbite celice. Merilo = 20 μm .	34
Sl. 16: Morfološke značilnosti in variabilnost eritrocitov pri beli podvrsti močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a in b) ovalen eritrocit, c) okrogel eritrocit, d) eritrocit z dvemi jedri, e) »velik« eritrocit. Merilo = 20 μm .	38
Sl. 17: Morfološke značilnosti in variabilnost eritroblastov pri beli podvrsti močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a-e) različne razvojne stopnje eritroblastov. Merilo = 20 μm .	38
Sl. 18: Morfološke značilnosti in variabilnost trombocitov pri beli podvrsti močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a) trombociti v skupini, b) posamezen podolgovat trombocit, c) posamezen okrogel trombocit. Merilo = 20 μm .	39
Sl. 19: Morfološke značilnosti in variabilnost levkocitov pri beli podvrsti močerila (<i>Proteus a. anguinus</i>). Barvanje z barvilkom Giemsa. a) velik limfocit, b) majhen limfocit, c) nevtrofilec z enolobularnim jedrom, d) nevtrofilec z dvolobularnim jedom, e) nevtrofilec s trilobularnim jedrom, f) nevtrofilec s štirilobularnim jedrom, g in h) nevtrofilec s hipersegmentiranim jedrom, i) monocit, j) eozinofilec. Puščica = kromatinska nit. Merilo = 20 μm .	40

- Sl. 20: Artefakti na krvnih razmazih bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a) ostanki razbite celice, b) prepognjena celica. Merilo = 20 µm.....41
- Sl. 21: Eritroidne celice z izrastki v celični kulturi aksolotlovih krvnih celic (*Ambystoma mexicanum*). Celice razvijejo izrastke na enem ali dveh koncih celice. Nebarvana celična kultura v hemocitometru. Merilo = 20 µm.41
- Sl. 22: Eritroidne celice z izrastki v celični kulturi krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). Celice razvijejo izrastke na enem ali dveh koncih celice, izrastki imajo lahko zadebelitve. Nebarvana celična kultura v hemocitometru. Merilo = 20 µm.....42

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BrdU	5-bromo-2'-deoksiuridin
DIC	diferencialna interferenčna kontrastna mikroskopija
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPBS	Dulbecco-jev fosfatni pufer
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
EdU	5-etinil-2'deoksiuridin
FBS	serum ploda goveda
L	limfocit
MS-222	3-aminobenzoat metanosulfonat ali trikain metanosulfonat
N	nevtrofilec
PBS	fosfatni pufer z NaCl
PHA-M	fitohemaglutinin, M-oblika

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Citogenetske raziskave so preprosto in učinkovito orodje za raziskave kromosomov in opis kariotipa organizma. V humani medicini se za citogenetske analize uporablja primarno celično kulturo limfocitov. Gre za klasično in nedestruktivno metodo, ki so jo uporabili tudi na krvnih celicah drugih sesalcev in nekaterih dvoživk. Da lahko izvedemo citogenetske analize, je potrebno najprej spodbuditi celične delitve, za kar se uporablja fitohemaglutinin (PHA-M), nato pa je treba celične delitve ustaviti v metafazi. Seto in sodelavci (1964) so izvedli prve poskuse pridobivanja materiala za citogenetske analize neoteničnih dvoživk z nedestruktivno metodo, torej z vzpodbujanjem delitev limfocitov s PHA-M.

V našem delu smo preizkusili nedestruktivno metodo pridobitve materiala za citogenetske analize na beli podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*) ob pomoči modelne neotenične dvoživke aksolotla (*Ambystoma mexicanum*). Citogenetska analiza za opis kariotipa pa bila ključna tudi pri prepoznavanju spola močerila, saj pri njem ni izraženega spolnega dimorfizma. Samci in samice so prepoznавni le med paritvenim obdobjem. Samce takrat prepoznamo po zadebeljenem stoku ali kloaki, samice pa zaradi številnih zrelih jajčec v jajčnikih, ki prosevajo skozi tanko nepigmentirano trebušno steno. Podatek o spolu je ključen za študij populacijske dinamike, ugotavljanje razmerja spolov v naravnih populacijah, za raziskave evolucije spolnih kromosomov ter nenazadnje za uspešen program razmnoževanja močerila v ujetništvu.

Predvidevali smo, da so spolni kromosomi močerila heteromorfni (velik kromosom X in mali Y), kot je to značilno za njegovega najbližjega sorodnika nekturusa (*Necturus maculosus*) (Sessions, 1980). Nekturus ali blatni kužek živi v površinskih vodah severovzhodnega predela ZDA, skupaj z močerilom ga uvrščamo v družino močerilarjev (Proteidae). Obe vrsti sta neotenični in pri obeh je haploidno število kromosomov 19. Pred dokončno optimizacijo kultivacije močerilovih krvnih celic, se je z raziskavami pokazalo, da so spolni kromosomi močerila popolnoma drugačni od nekturovih. Pri močerilu spolni kromosomi niso heteromorfni, pač pa so pri samcu in samici popolnoma identični. S proganjem kromosomov se je razkril tudi zanimiv vzorec, ki je identičen vzorcu kromosoma Y pri nekturu. Predvideva se, da se je verjetno prišlo do tranzicije kromosoma Y na kromosom X (Sessions in sod., 2016), kar je možen vzrok za močerilovo specifično reproduktivno biologijo, kot je nizko preživetje potomcev (Juberthie in sod., 1996), razmerje spola v prid samicam, številni propadajoči jajčni folikli v dozorevajočih jajčnikih (Bizjak Mali in Bulog, 2011) in prisotnost jajčnih celic v testisih (Bizjak Mali in Bulog, 2015).

V nalogi smo tudi opisali morfologijo krvnih celic in analizirali deleže posameznih celic v krvi. Na ta način smo že zeleli nadgraditi znanje o normalni morfologiji krvnih celic, njihovi variabilnosti in deležih krvnih celic bele podvrste močerila, kar je pomembno za nadaljnje načrtovane hematološke študije. Hematološki parametri so pomembni kazalci fiziološkega stanja živali, z njimi lahko prepoznamo morebitne stresne situacije in okužbe, prav tako so pomembna osnova za raziskave slabo preučenih obrambnih odzivov močerila na okužbe. Spremljanje zdravstvenega stanja dvoživk, med njimi tudi močerila, pa je pomembno, saj se populacije dvoživk zmanjšujejo zaradi različnih bolezni in obremenjenosti okolja.

1.2 NAMEN DELA

Namen dela je vzgojiti primarno celično kulturo krvnih celic dveh neoteničnih dvoživk: bele podvrste močerila (*Proteus a. angulinus*) in modelnega organizma aksolotla (*Ambystoma mexicanum*) ter metodo optimizirati. S testom proliferacije želimo ugotoviti optimalno koncentracijo mitogena za spodbuditev celičnih delitev limfocitov. Z uporabo različnih koncentracij antimitotika in različnih časov inkubacije želimo ugotoviti, katera kombinacija je najbolj ugodna za uspešno vizualizacijo kromosomov.

Namen dela je tudi opisati morfologijo in variabilnost krvnih celic obeh vrst neoteničnih dvoživk.

1.3 DELOVNE HIPOTEZE

- I. Limfociti iz primarne celične kulture so ustrezni model za citogenetske analize pri aksolotlu in beli podvrsti močerila.
- II. Na osnovi literature predvidevamo, da je za vzpodbuditev delitve limfocitov neoteničnih dvoživk v celični kulturi potrebna višja koncentracije mitogena PHA-M, kot se uporablja v humani citogenetiki. Prav tako predvidevamo, da je pri neoteničnih dvoživkah potrebna višja koncentracija in daljša inkubacija z antimitotikom za zaustavitev celičnih delitev v metafazi celičnega cikla.

2 PREGLED OBJAV

2.1 CELIČNE KULTURE

2.1.1 Splošno o gojenju celičnih kultur

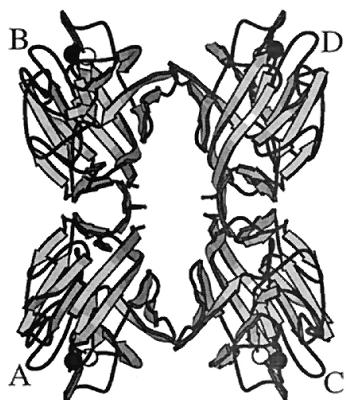
Dandanes je gojenje celičnih kultur pomembna tehnika v biologiji, saj z njihovo pomočjo pridobimo veliko znanja o osnovnih mehanizmih delovanja celic, genomiki, proteomiki, interakcijah z drugimi celicami in toksikologiji. Za gojenje celičnih kultur je potrebno znanje in oprema, saj celična kultura zahteva ustrezen okolje s primernim pH, temperaturo, ozmolarnostjo, hranili in drugimi parametri. Različne celične kulture imajo različne zahteve.

Celična kultura je lahko primarna ali sekundarna. Primarna celična kultura je tista, v kateri so celice, ki so bile izolirane iz organizma. Taka celična kultura še ni bila subkultivirana. Ko celično linijo subkultiviramo, postane celična linija ali sekundarna celična kultura. Subkultivacija, imenovana tudi pasaža, je prenos celic iz ene kultivacijske plošče v drugo, kar omogoča nadaljnje delitve celic. Celice so v gojišču lahko kot suspenzija ali pa so pritrjene na podlago (Freshney, 2010).

2.1.2 Gojenje krvnih celic dvoživk za citogenetske analize

2.1.2.1 Spodbujanje celičnih delitev limfocitov

Molekule, ki spodbujajo celične delitve, so imenovane mitogeni. Najbolj pogosto uporabljen mitogen v celičnih kulturah limfocitov sesalcev (Nowell, 1960; Sofuni in Yoshida, 1992) in dvoživk (Koniski in Cohen, 1992; Salvadori in Tournefier, 1996) je fitohemaglutinin oz. PHA. Fitohemaglutinin je glikoprotein in sodi med lektine, izoliran pa je iz navadnega fižola (*Phaseolus vulgaris*). V izolirani frakciji PHA se nahaja pet izolektinov (L_4E_0 , L_3E_1 , L_2E_2 , L_1E_3 , L_0E_4), ki so tetrameri. Podenota E deluje na eritrocite tako, da ti aglutinirajo, podenota L pa ima mitogeni učinek na limfocite (Hamelryck in sod., 1996).



Slika 1: Tetramer PHA-L (L₄E₀) je sestavljen iz štirih identičnih podenot (oznake A-D) (Hamelryck in sod., 1996: 20481).

Najprej so PHA uporabljali za ločevanje levkocitov od eritrocitov, saj PHA povzroči pospešeno posedanje eritrocitov zaradi njihove aglutinacije (Li in Osgood, 1949). Prvič je povišanje deleža mitoz človeških krvnih celic v prisotnosti PHA opazil Nowell (1960), ki je tudi ugotovil, da ne pride do delitev vseh krvnih celic, ampak se delijo samo limfociti.

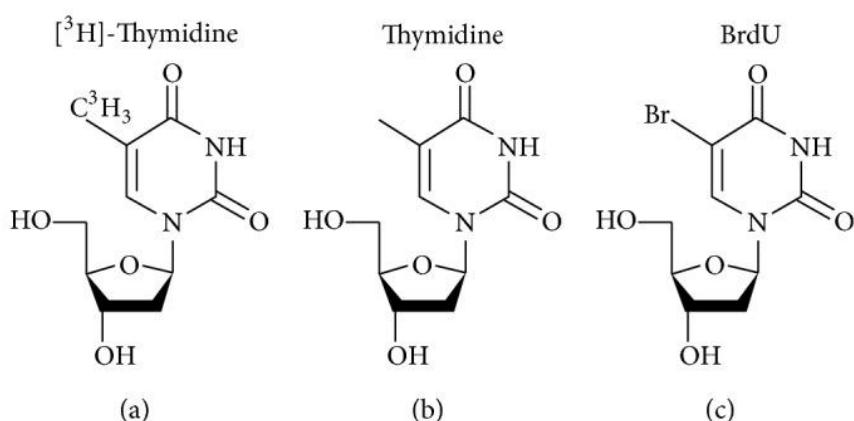
V prvih raziskavah na krvnih celicah pri dvoživkah so Seto in sodelavci (1964) preizkušali različne koncentracije PHA-M (M označuje, da gre za mukoprotein) v razponu od 0,9 do 6,0% (vol/vol). Ugotovili so, da je zadovoljivo število mitoz levkocitov v razponu od 3,0 do 6,0% PHA-M.

Že Koniski in Cohen (1992) sta opisala, da je pri aksolotlih stimulacija proliferacije limfocitov s PHA ali konkanavalinom A (Con A) močno inhibirana v prisotnosti serumata ploda goveda (angl. fetal bovine serum oz. FBS). V svojih poskusih z limfoidnimi celicami sta isto ugotovila tudi Salvadori in Tournafier (1996), zato sta za ugotavljanje odziva limfoidnih celic in splenocit uporabljala medij L-15 brez dodanega FBS. Vendar je veliko raziskovalcev v kulturah limfocitov dvoživk uporabilo FBS v kombinaciji s PHA, pa so kljub temu bili uspešni (Seto in sod., 1964; Griffin in sod., 1970; Schmid 1978; Kasahara in sod., 1998).

Za spodbujanje delitev limfocitov se lahko uporabi tudi druge mitogene. Tako so pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*) za stimulacijo limfocitov uspešno uporabili lipopolisaharide (LPS) in Con A (Salvadori in Tournefier, 1996), pri človeških limfocitih pa še mitogen, pridobljen iz navadne barvilnice (*Phytolacca americana*) (Sofuni in Yoshida, 1992).

2.1.2.2 Testi proliferacije limfocitov

Za proliferacijo celic je potrebna sinteza DNA, kar lahko spremljamo, če tem celicam v S-fazi celičnega cikla dodamo označene prekurzorje za DNA. Omenjeni prekurzorji so običajno pirimidinski deoksinukleotidi, njihovo vgrajevanje v DNA pa lahko kvantificiramo ali vizualiziramo. Najpogosteje uporabljene molekule za spremljanje proliferacije so BrdU (5-bromo-2'-deoksiuridin), EdU (5-eticil-2'-deoksiuridin) in [^3H]timidin. Metode so bile zelo koristne za študije celičnega cikla, podvojevanja DNA in proliferacije normalnih in patoloških celic v različnih pogojih (Salic in Mitchison, 2008).



Slika 2: Molekulska struktura radioaktivno označenega timidina (a), timidina (b) in njegovega analoga BrdU (c) (Cattan in sod., 2015: 2).

[^3H]timidin je radioaktiv, za njegovo detekcijo se uporablja avtoradiografija, ki je počasna metoda, zato se več uporablja metodi z analogom timidina. Molekula BrdU se med S-fazo celičnega cikla vgradi v sintetizirano DNA, nato pa se jo po delni denaturaciji dvoverižne DNA imunokemijsko zazna s protitelesi anti-BrdU. Uporaba analoga timidina EdU je novejša metoda, temelji pa na uporabi majhne fluorescenčne sonde, ki se veže na vgrajen EdU (Cavanagh in sod., 2011).

2.1.2.3 Antimitotiki

Antimitotiki so del klasičnega postopka priprave kariotipa. Najbolj pogosto uporabljen antimitotik je kolhicin, ki inhibira polimerizacijo mikrotubulov in tako prepreči nastanek delitvenega vretena. Posledica je, da metafazni kromosomi ostanejo razpršeni po citoplazmi celice. Kolhicin vpliva samo na mikrotubule, zato so se kromosomi sposobni še naprej kondenzirati in krajšati, kar oteži nadaljnje strukturne analize. Zaradi tega je treba najti optimalen čas in trajanje apliciranja kolhicina, pa tudi njegovo koncentracijo. Razen kolhicina se uporablja še sorodna molekula, to je kolcemid, imenovan tudi demekolcin, ki je manj toksičen za celice (Rieder in Palazzo, 1992).

Kolhicin so uporabljali že Seto in sodelavci (1964), ki so pionirji na področju gojenja krvnih celic neoteničnih dvoživk za citogenetske analize. Za uspešno inhibicijo mitoze v metafazi so uporabili 3–4 × večjo koncentracijo kolhicina, kakor se uporablja v celičnih kulturah sesalskih celic.

2.1.2.4 Vizualizacija kromosomov

Celično kulturo je potrebno tretirati s hipotonično raztopino KCl in nato jedra fiksirati. Uporablja se fiksativ, ki je zmes metanola in ocetne kisline v razmerju 3:1. Preparati se pregledajo z mikroskopom s faznim kontrastom, nato se pobarvajo in progajo. Najpogosteje se uporabi barvilo Giemsa pri C-proganju ali G-proganju kromosomov (Freed in Mezger-Freed, 1970; Bates, 2011). Možna je vizualizacija organizatorja jedrca (angl. Nucleolus organizer regions oz. NORs) z barvanjem Ag-NOR (Goodpasture in Bloom, 1975; Schmid, 1978).

Problem vizualizacije je pogosto slaba kvaliteta dobljenih kromosomov. Ti so pogosto preveč kondenzirani in se prekrivajo, kar preprečuje podrobno prepoznavo progavosti kromosomov. Za izboljšanje citogenetskih analiz celičnih kultur pri dvoživkah, pa tudi pri ostalih poikilotermnih organizmih, se celični kulturi doda molekula BrdU (Kasahara in sod., 1998). Molekula BrdU namreč podaljša kromosome in tako je resolucija mnogo boljša, na ta način je možno vizualizirati tudi manjše delecije in insercije (Louis in sod., 2004).

2.2 CITOGENETSKE ANALIZE

Cilj klasične citogenetike je priprava kariotipa organizma. Pripravi se preparate s kromosomi, ki se jih barva in proga. Analizira se število kromosomov in vzorce proganja. Za pripravo kariotipa organizma je potrebno pregledati več celic z metafaznimi kromosomi, priporoča se jih vsaj 20. Dovolj je, če je vzorec proganja analiziran pri 6 setih kromosomov, pri preostalih 14-ih pa se določi le število kromosomov. Če se med pregledovanjem opazi nepravilnosti v kromosomih, se pregleda večje število celic s kromosomi, da se ugotovi, ali gre res za nepravilnost ali le naključno spremembo v določeni celici (Bates, 2011).

Kariotip se pripravi tako, da se naredi zajeme slik celic z lepo razporejenimi metafaznimi kromosomi, ki so G-progani. Posamezni kromosomi se izrežejo in razporedijo po standardizirani metodi glede na velikost, lokacijo centromere in vzorec proganja. Pri pripravi kariotipa je pomembna tudi resolucija, ki nam pove, koliko posameznih prog lahko zaznamo na kromosому. Pri človeku se resolucijo določi tako, da se prešteje število prog na kromosому 10. Njihovo število lahko znaša od 12 do 41, kjer večje število preštetih prog pomeni boljšo resolucijo (Bates, 2011).

Poleg klasične metode citogenetike, to je kariotipizacije, so uveljavljene tudi molekularne metode, kot so fluorescenčna *in situ* hibridizacija oz. FISH (Trask, 1991), hibridizacija celotnih genomov pri primerjalni genomske hibridizaciji oz. CGH (Kallioniemi in sod., 1992) in večbarvna FISH s spektralno kariotipizacijo oz. SKY (Schröck in sod., 1996).

2.3 SPLOŠNE ZNAČILNOSTI KRVNIH CELIC VRETEŃCARJEV

Kri je poseben tip vezivnega tkiva, ki je sestavljeno iz celic, celičnih fragmentov in plazme, ki je tekoča izvencelična komponenta. Krvne celice so eritrociti ali rdeče krvne celice in levkociti ali bele krvne celice. Trombociti ali krvne ploščice so celični fragmenti (Ross in Pawlina, 2009).

Eritrociti sesalcev so brez jedra, medtem ko je jedro v eritrocitih prisotno pri drugih skupinah vretenčarjev (ptice, plazilci, dvoživke, ribe). Pri repatih dvoživkah je lahko določen delež eritrocitov tudi brez jedra. Eritrociti so ovalne oblike, jedro je lahko ovalno ali okroglo (Claver in Quaglia, 2009). Največje eritrocite v živalskem svetu ima dvoživka *Amphiuma tridactylum* v velikosti $70 \times 40 \mu\text{m}$ (Garrison, 1949). Glavna funkcija eritrocitov je prenos kisika, vendar so ugotovili, da pri ribah in ptičih eritrociti sodelujejo tudi pri imunskem odgovoru na antigen (Passantino in sod., 2007).

Levkocite razdelimo v dve glavni podskupini: granulociti (nevtrofilci, eozinofilci in bazofilci) in agranulociti (limfociti in monociti). Kljub temu, da imajo lahko vsi levkociti v citoplazmi granule, imajo samo granulociti opazne očitne granule po barvanju z barvilom Giemsa (Ross in Pawlina, 2011). Za nevtrofilce ne-sesalskih skupin vretenčarjev nekateri avtorji uporabljajo izraz heterofilci in določeni avtorji uporabljajo izraz nevtrofilec samo pri sesalcih (Montali, 1988; Canfield, 2006). Nevtrofilci so najpogosteji levkociti v krvi večine ptičev, medtem ko so najpogosteji levkociti pri večini plazilcev limfociti. Eozinofilci so prepoznavni po okroglih eozinofilnih granulah. Pri nekaterih skupinah ptic so granule eozinofilcev paličaste oblike. Zanimivo je, da eozinofilcev ne najdemo pri nekaterih vrstah kač in kuščarjev. Limfocite pri vretenčarjih delimo na limfocite B in T. Pri dvoživkah so limfociti najmanjši izmed levkocitov. Bazofilci so si pri vseh skupinah vretenčarjev med seboj podobni – prepoznavni so po vijoličnih granulah pri barvanju z barvilom Giemsa. Nekatere vrste rib nimajo bazofilcev v krvi. Monociti so podobni limfocitom, vendar so običajno večji in imajo večji delež citoplazme (Claver in Quaglia, 2009).

Azurofilci so monocitom podobni levkociti, ki vsebujejo azurofilne granule. Opisani so bili pri kačah, kuščarjih, krokodilih in nekaterih dvoživkah. Nekateri avtorji jih obravnavajo kot različico monocitov ali nevtrofilcev (Montali, 1988; Claver in Quaglia, 2009).

Vsi vretenčarji, razen sesalcev, imajo trombocite z jedrom. Njihova morfologija je pri ne-sesalskih skupinah vretenčarjev podobna, pri vseh vretenčarjih pa imajo enako funkcijo, to je koagulacija krvi (Claver in Quaglia, 2009).

Za pregledovanje krvnih celic na preparatih se uporablja posebna metoda, ki najbolje prikaže tipe krvnih celic – to je krvni razmaz. Ta metoda se razlikuje od preostalih metod za pripravo histoloških preparatov, saj preparata ni potrebno vklapljati in ga rezati na tanke rezine. Gre za enostavno metodo, kjer nanesemo kapljo krvi neposredno na objektno steklo in naredimo razmaz krvi tako, da na objektnem steklu dobimo samo eno plast celic. Krvni razmaz nato posušimo na zraku in ga ustrezno pobarvamo, običajno z barvilo Giemsa (Ross in Pawlina, 2011).

2.3.1 Krvne celice dvoživk

Najbolj opazna razlika med krvnimi celicami dvoživk in sesalcev je ta, da imajo eritrociti in trombociti dvoživk jedra in so večji od krvnih celic sesalcev. Osnovna funkcija eritrocitov dvoživk je enaka kot pri ostalih skupinah vretenčarjev, to je prenos kisika s hemoglobinom. Nekatere repate dvoživke imajo določen delež eritrocitov brez jedra (Scott, 1966; Allender in Fry, 2008), ki lahko pri nekaterih vrstah brezplučarjev (Plethodontidae), kot sta npr. kalifornijski kačasti močerad (*Batrachoseps attenuatus*) in *Batrachoseps major*, znaša tudi do 98% (Cohen, 1982). Nekateri avtorji eritrocite brez jedra imenujejo eritroplastidi (Jordan, 1932; Glomski in sod., 1997; Claver in Quaglia, 2009). Prisotnost jedra omogoča sintezo proteinov in prilagajanje metabolnih procesov (Boutilier in sod., 1992).

Med ličinkami in odraslimi osebki dvoživk so velike razlike v eritropoezi. Primarno mesto nastajanja eritrocitov pri ličinkah so jetra in ledvice, medtem ko so pri odraslih osebkih mesta eritropoeze predvsem vranica, pa tudi jetra in kostni mozeg (Maniatis in Ingram, 1971; Turner, 1988; Mrak, 2007). Pri žabi krempljičarki (*Xenopus laevis*) so Hadji-Azimi in sodelavci (1987) opisali razvoj eritrocitov, ki zajema naslednje stopnje: proeritroblast, eritroblast I, eritroblast II, mlad eritrocit I, mlad eritrocit II in zrel eritrocit. Nezreli eritrociti so manjši od zrelih eritrocitov in imajo polikromatofilno modrikasto citoplazmo, kromatin pa je manj kondenziran kakor pri zrelih eritrocitih. Nekateri avtorji nezrele eritrocite imenujejo retikulociti (Allender in Fry, 2008). Pri repatih dvoživkah eritrociti dozorijo v perifernem krvnem obtoku (Campbell, 2015).

Coates (1975) je opisal, da imajo larvalni stadiji dvoživk dve morfološko različni populaciji eritrocitov glede na to, v katerem organu nastanejo. Eritrociti, ki nastanejo v jetrih, imajo jedro nameščeno centralno, medtem ko imajo eritrociti, ki izvirajo iz ledvic, periferno nameščeno jedro. Ti dve morfološko različni populaciji eritrocitov imata tudi različen tip hemoglobina.

Za posamezne tipe levkocitov dvoživk se predpostavlja, da imajo podobno funkcijo kot levkociti pri sesalcih, čeprav to zmeraj ne drži. V splošnem velja, da je delež nevtrofilcev in monocitov povečan ob bakterijskih vnetjih, te celice so sposobne migracij in fagocitoze. Delež monocitov je povečan tudi ob glivnih okužbah, delež eozinofilcev pa ob prisotnosti parazitov (Campbell, 2015). Spremembe v beli krvni sliki pri virusnih okužbah so redko opisane, je pa opisan primer okužbe z *Ranavirus*-om, ki povzroča visoko smrtnost pri

naravnih populacijah dvoživk. Osebki običajno poginejo še preden so zaznane spremembe v hematoloških parametrih, so pa opazni vključki v citoplazmi in jedru eritrocitov (Green, 2001). Toksini v okolju imajo negativen vpliv na imunski sistem, saj negativno vplivajo na zmožnost proliferacije limfocitov (Christin in sod., 2003).

Granulopoeza pri dvoživkah je podobna kot pri ostalih vretenčarjih. Pri dvoživkah so mesta granulopoeze ledvice, jetra, vranica in kostni možeg (Curtis in sod., 1979; Allender in Fry, 2008), ki pa ga vodne repate dvoživke nimajo. Mesto diferenciacije limfocitov T je priželjc (Campbell, 2007). Pri odrasli žabi kremljičarki *Xenopus laevis* (Hadji-Azimi in sod., 1987) je znano, da je mesto nastajanja nevtrofilcev kostni možeg, bazofilci nastajajo v vranici, eozinofilci in monociti pa v jetrih. Opisali so tudi razvojne stopnje granulocitov pri žabi kremljičarki in razvojne stopnje celic poimenovali mieloblasti, promielociti, mielociti, metamielociti, paličasti granulociti (angl. band) in segmentirani granulociti ali segmentiranci (angl. segment).

Trombociti dvoživk so v spološnem celice z jedri, čeprav je opisanih nekaj vrst, ki imajo brezjedrne trombocite. Njihova funkcija je enaka funkciji trombocitov sesalcev in sodelujejo pri koagulaciji krvi (Campbell, 2015). Opisan je razvoj trombocitov kremljičarke (Hadji-Azimi in sod., 1987), ki zajema protromboblaste, tromboblaste, mlade trombocite in zrele trombocite. Turner (1988) je uporabil nekoliko drugačno poimenovanje razvojnih stopenj trombocitov in piše o tromboblastih, protrombocitih in nezrelih trombocitih. Tromboblasti imajo rahlo bazofilno citoplazmo, protrombociti pa vakuolizirano citoplazmo. Barva citoplazme nezrelih trombocitov se tekom dozorevanja spreminja od bazofilne do svetlo modre ali brezbarvne, kromatin pa med dozorevanjem postaja bolj kondenziran (Campbell, 2007).

Plazma je sestavljena iz vode, odpadnih snovi, hormonov, protiteles in drugih molekul (Arikan in Çiçek, 2014). Normalna barva plazme pri dvoživkah je različna med vrstami in je lahko svetlo rumena, modra, zelena ali celo oranžna (Campbell, 2007).

Poznavanje morfologije krvnih celic je nujno potrebno za ugotavljanje števila in deležev posameznih krvnih celic (recimo pri pripravi diferencialne bele krvne slike), kar je še posebej pomembno pri dvoživkah in ostalih ne-sesalskih skupinah vretenčarjev, za katere ni razvitalih avtomatskih testov (Allender in Fry, 2008).

2.3.2 Pomen poznavanja morfologije, deležev krvnih celic in ostalih hematoloških parametrov pri dvoživkah

Opisanih je več kot 4600 vrst dvoživk, ki naseljujejo tako vodna kot kopenska okolja, zato so njihove anatomske in fiziološke prilagoditve zelo raznolike, kar seveda vpliva tudi na morfologijo celic in hematološke parametre (koncentracija hemoglobina, diferencialna krvna slika, povprečni korpuskularni volumen, hematokrit, plazemski proteini). Nanje pa vpliva še veliko drugih notranjih in zunanjih dejavnikov. Hematološki podatki imajo veliko vrednost pri klinični oceni posameznega osebka, vendar je za to potrebno poznati

hematološke parametre zdrave populacije. Veliko osnovnih hematoloških parametrov, ki se uporabljajo pri sesalcih, je pomembnih tudi pri dvoživkah in ostalih vretenčarjih. Hematološki parametri so pri dvoživkah večinoma neraziskani ali celo popolnoma neznani, kar otežuje klinično oceno. Zaradi nekaterih podobnosti v krvnih celicah si deloma lahko pomagamo z raziskavami pri ptičih in plazilcih, predvsem pri razumevanju odziva na bolezenska stanja, vendar je zaradi pomanjkanja podatkov ocena kliničnega stanja velik izzik, še posebej v primerjavi s sesalci (Allender in Fry, 2008).

Hematologija je koristna pri odkrivanju bolezni, ki so povezane s krvnimi celicami, kot so anemija, levkopenija, levkocitoza, trombocitopenija in druge nepravilnosti v povezavi z njimi. Možno je tudi spremeljanje razvoja bolezni in morebitnega odziva na zdravljenje (Campbell, 2015).

Interpretacija podatkov o morfologiji in deležih krvnih celic, pa tudi morebitnih drugih hematoloških podatkov, je težavna, saj je potrebno obširno znanje o tem, kakšno je normalno stanje, kako se kažejo nepravilnosti in različna patološka stanja ter morebitni drugi vplivi (razvojna stopnja, starost, spol, reproduktivni status, hrana, temperatura, fotoperioda, letni čas). Laboratorijske referenčne vrednosti naj bi bile vrstno in metodološko specifične in naj bi bile osnovane na dovolj velikem vzorcu zdravih živali, to je vsaj 60 klinično zdravih osebkov (Allender in Fry, 2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Za odvzeme vzorcev krvi smo uporabili osebke aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) in bele podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Osebki so bili vzdrževani v Speleološkem laboratoriju na Katedri za zoologijo, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani. Vse živali so živele v akvarijih v stalnih in nadzorovanih razmerah.

Aksolotli, imenovani tudi mehiški prečnozobci, so bili za raziskovalne potrebe skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev leta 2006 uvoženi iz Združenih držav Amerike. V raziskavo so bili vključeni trije osebki z evidenčnimi oznakami A1 (samec, 69g), A3 (samec, 66 g) in A10 (samec, 94 g), njihova točna starost ni znana. V vsakem akvariju je bil en sam osebek. Akvariji so bili v hladilni omari na temperaturi 16 °C, z dnevno-nočnim ciklom 8 ur svetlobe, 16 ur teme ter opremljeni s filtrom in virom zraka iz zračne črpalke. Osebki so bili hraničeni z dvema ribjima briketoma 2 × tedensko.

Močerili so bili vzdrževani v speleobiološkem laboratoriju pri temperaturi 10 °C in stalni temi. Ob menjavi vode, hraničenju in preverjanju stanja živali je bila prižgana luč z rdečim spektrom vidne svetlobe. Akvariji so bili opremljeni s filtrom in virom zraka preko zračne črpalke. Osebki so bili hraničeni 1 × tedensko z desetimi živimi postranicami iz rodu *Gammarus* (Crustacea: Amphipoda). V času izvajanja raziskave so bili v speleobiološkem laboratoriju 3 osebki, vsak v svojem akvariju, z evidenčnimi oznakami Paa200 (spol ni znan, 23 g), Paa201 (samica, 33 g) in Paa202 (spol ni znan, 24g). Bili so izlovljeni junija 2015 v Planinski jami, Slovenija.

Močerili so avgusta 2015 zboleli za glivno okužbo. Kljub zdravljenju se do konca izvajanja poskusa niso popolnoma pozdravili.

3.2 ODVZEM KRVI

Poseg je moral biti varen in čim manj stresen za žival, zato smo za odvzem krvi uporabljali anestetik za vodne vretenčarje in dvoživke, to je etil 3-aminobenzoat metanosulfonat oz. MS-222 (Johnson, 1992; Cecala in sod., 2007; Ross L.G. in Ross B., 2008; Ramlochansingh in sod., 2014). Anestetik MS-222 (Sigma-Aldrich, ZDA) smo uporabljali kot 0,03 % vodno raztopino za močerile in kot 0,05% raztopino (wt/vol) za aksolotle (Fellers in sod., 1994), ki smo jo pripravili z deklorirano vodovodno vodo. Za uravnavanje pH raztopine smo uporabili natrijev bikarbonat (Sigma-Aldrich, ZDA) v končni koncentraciji 0,2% (wt/vol). V posodo z raztopljenim anestetikom in natrijevim bikarbonatom smo dali žival in počakali toliko časa (približno 10–15 min), da se ni več odzivala na dražljaje. Nato smo jo položili na omočeno papirnato brisačko, ki je ležala na banjici iz aluminijaste folije, in jo stehtali.

Odvzeli smo varen volumen krvi (SBV – angl. safe blood volume), ki smo ga izračunali po formuli (Heatley in Johnson, 2009):

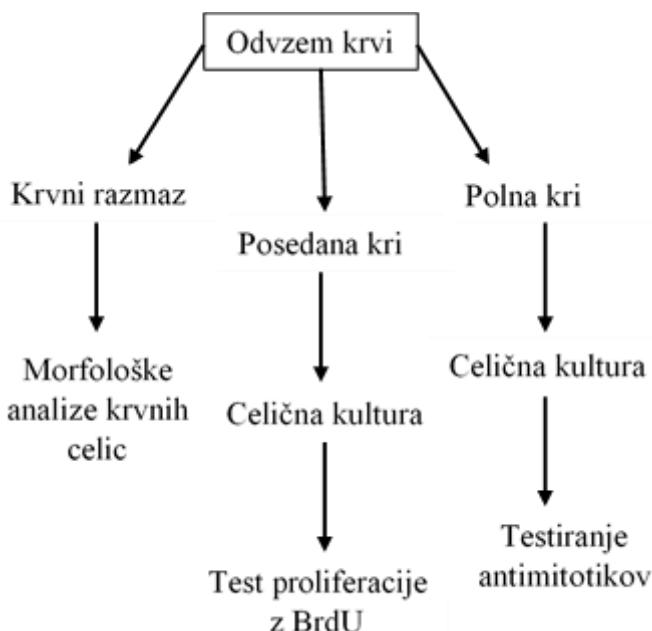
$$SBV [ml] = telesna\ masa [g] \times 0,1 \times 0,05 \quad \dots (1)$$

Telesno maso smo pomnožili s faktorjem 0,1 zato, ker pri vodnih dvoživkah predstavlja 10% telesne mase volumen krvi, iz organizma pa lahko varno odvzamemo 5% volumna krvi. Če so živali zdrave, se lahko varen volumen odvzema krvi podvoji (Heatley in Johnson, 2009).

Pred odvzemom krvi smo heparinizirali iglo in brizgo s sterilnim heparinom (Sigma-Aldrich, ZDA), ki smo ga pripravili v koncentraciji 1 mg/ml v 0,9% NaCl. Iglo in brizgo smo heparinizirali ob ognju, da smo zagotovili aseptičnost. Mesto vboda smo razkužili z razkužilom Bactin (Bayer, ZDA), ki ima tudi protibolečinsko delovanje. Kri smo odvzeli iz srčnega ventrikla. Takoj po odvzemu smo kri izbrizgali v heparinizirano fiolo in jo kasneje uporabili za celično kulturo (MiniCollect®, Greiner Bio-One, Avstrija). Le manjši del volumna krvi smo pustili v brizgi za pripravo krvnih razmazov. Žival smo čim hitreje prenesli v svežo hladno vodo in nato večkrat preverjali njeno stanje. Živali so se zbujale približno 20–30 min.

3.3 PRIPRAVA PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC

Z gojenjem primarne celične kulture krvnih celic smo želeli pridobiti material za citogenetske analize, za kar je potrebno vizualizirati kromosome celic v metafazi celičnega cikla. V celični kulturi smo za test proliferacije želeli imeti čim več levkocitov in čim manj eritrocitov, zato smo kri v hepariniziranih fiolah pustili posedati 2 h na 4 °C. Eritrociti so se večinoma posedli, zgornji sloj pa je bil obogaten z levkociti. Za test proliferacije smo torej uporabili zgornji sloj posedane krvi, saj bi eritrociti motili meritve absoranc pri testu proliferacije (Slika 3). Ker sta se sloja hitro začela mešati, smo zgornji sloj previdno prenesli v mikrocentrifugirko, kamor smo predhodno dodali 10 µl heparina, da smo preprečili nastajanje krvnih strdkov. Ves postopek od posedanja krvi naprej je potekal v brezprašni komori pod sterilnimi pogoji. Za poskuse inkubacije celične kulture z antimitotiki smo pa uporabljali polno kri, torej posedanje celic ni bilo potrebno. Shema poskusov je prikazana na Sliki 3.



Slika 3: Shematski prikaz poskusov po odvzemu krvi.

3.3.1 Priprava gojišča in gojenje celic

Ozmolarnost gojišča smo za dvoživke prilagodili tako, da smo medij Leibovitz L-15 (Gibco, Velika Britanija) redčili na 60% (vol/vol) z $0,6 \times$ DPBS (brez Ca in Mg), ki je bil pripravljen iz $10 \times$ založne raztopine (Gibco, Velika Britanija). Dodali smo 1% (vol/vol) antibiotika penicilin-streptomicin (Gibco, Velika Britanija). Tako pripravljeno gojišče smo zamrznili do naslednje uporabe.

Fitohemaglutinin (PHA-M, Gibco, ZDA) smo v medij dodali pred samim začetkom gojenja celic. Uporabili smo 3 različne koncentracije (vol/vol) PHA-M: 3%, 6% in 9%, za kontrolo pa PHA-M nismo dodali (brez PHA-M).

Količina odvzete krvi je bila omejena in zato, da smo v gojišču zagotovili dovolj veliko število celic, to je vsaj 10^4 celic/ml, smo te gojili v mikrotitrnih ploščah s 96 vdolbinicami (F-tip, Brand, Nemčija) v končnem volumnu 300 μl (gojišče, PHA-M in celice). Celice smo gojili v inkubatorju (Thermo Scientific, Heraterm) brez dodajanega CO₂ na stalni temperaturi 25 °C (Freed in Mezger-Freed, 1970).

3.3.2 Hemocitometrija

Hemocitometrija je metoda, s pomočjo katere ugotovimo, kakšna je koncentracija celic v celični kulturi in je torej kvantifikacijska metoda. Za hemocitometrijo smo uporabljali hemocitometer (Neubauer improved, Brand, Nemčija), ki ima dve komori, vsaka ima prostornino 10 μl . Pred uporabo smo hemocitometer in krovno steklo očistili s 70%

etanolom, nato pa krovno steklo položili na hemocitometer tako, da so bili vidni Newtonovi obroči (mavrične barve med krovnim steklom in hemocitometrom). Celice smo z nežnim pipetiranjem dobro premešali in v eno komoro hemocitometra prenesli 10 µl. Pazili smo, da komora ni bila napolnjena premalo ali preveč, saj bi to vplivalo na napako pri kvantifikaciji koncentracije celic. Celice smo prešteli pri 20 × povečavi z invertnim mikroskopom (Axio Observer, Zeiss) v štirih velikih kvadratih komore in dobili število celic (n). To število smo delili s 4, da smo dobili povprečno število celic na en velik kvadrat komore. Ker je prostornina enega kvadrata 0,1 mm³ (oz. 10⁻⁴ ml), smo povprečno število celic pomnožili z 10⁴. Formula je torej:

$$c \left[\frac{\text{število celic}}{\text{ml}} \right] = \frac{n}{4} \times 10^4 \quad \dots (2)$$

3.3.3 Test viabilnosti

Viabilnost celic v celični kulturi smo testirali s testom izključitve 0,4% tripanskega modrila (Sigma-Aldrich, ZDA). Na parafilmu smo zmešali 10 µl dobro premešanega vzorca celične kulture z 10 µl barvila tripan modro in 10 µl prenesli v komoro hemocitometra. Z invertnim mikroskopom smo pri 20 × povečavi ločili temno modre mrtve celice od neobarvanih živih celic. Viabilnost smo določili tako, da smo prešteli število živih celic ter število vseh celic in izračunali delež živih celic:

$$\text{delež živih celic [%]} = \frac{\text{število živih celic}}{\text{število vseh celic}} \times 100 \quad \dots (3)$$

3.3.4 Svetlobna mikroskopija

Celice iz celične kulture smo med gojenjem opazovali s svetlobnim mikroskopom (Axioskop, Zeiss; digitalna kamera Leica DFC290 H) v računalniškem programu LAS V 4.0 (Leica Application Suite). Celice smo opazovali tudi z diferencialnim interferenčnim kontrastom (DIC) (AxioImager Z1, Zeiss) in fluorescenčnimi barvili. Za vizualizacijo jedra celice smo uporabili barvili akridin oranž (Sigma, ZDA) in DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; Sigma, ZDA). S spremeljanjem celic iz celične kulture smo žeeli izvedeti več o stanju celic v kulturi, morebitni okužbi in vizualizirati morebitne mitotske vzorce.

3.3.5 Spremljanje proliferacije s testom z BrdU

Najprej smo žeeli ugotoviti, pri kateri koncentraciji PHA-M je največ celičnih delitev. Zato smo na celični kulturi levkocitov (zgornji sloj posedane krvi) uporabili tri koncentracije PHA-M: 3%, 6% in 9% (vol/vol) in kontrolo (brez PHA-M), proliferacijo celic pa smo spremljali z imunološkim kolorimetričnim testom (Cell proliferation ELISA kit, Roche, Nemčija). Kit je vseboval vse potrebne kemikalije za izvedbo testa in protokol, po katerem je bil test izведен. Test proliferacije temelji na dejstvu, da se med celično

delitvijo molekule BrdU vgradijo v nastajajočo DNA, potem pa na BrdU vežemo protitelo, ki ga preko reakcije s peroksidazo in substratom lahko kolorimetrično zaznamo. Glede na podatke iz literature smo se odločili, da bomo test proliferacije izvedli 4. dan gojenja celic. Najprej smo celični kulturi v mikrotitrni plošči dodali 30 µl BrdU za 24 h (to je bil 3. dan gojenja celic), nato pa smo 4. dan gojišče odstranili. Celice smo na dno mikrotitrne plošče fiksirali tako, da smo jih za 1 h dali v pečico na 60 °C. Sledila je permeabilizacija celic na sobni temperaturi za 30 min, nato pa smo dodali protitelo anti-BrdU-POD, ki se je vezalo na BrdU. Vezava protitelesa po protokolu lahko poteka na sobni temperaturi ali pa na 37 °C. Ker je na višji temperaturi vezava hitrejša, smo celice s protitelesom inkubirali v topli sobi na 37 °C za 30 min. Nevezana protitelesa smo sprali z 1 × PBS, ki je bil del kita, nato pa dodali substrat za peroksidazo, ki je vezana na protitelo. Reakcija med peroksidazo in substratom, to je tetrametil benzidin (TMB), tvori produkt, ki ga lahko kolorimetrično zaznamo. Reakcija je hitra in absorbanci produkta lahko merimo že v 5 min po dodatku substrata. Absorbanci smo merili s spektrofotometrom Cytation 3 (Biotek, ZDA) in pripadajočo programsko opremo Gen5 pri valovni dolžini 370 nm, opravili smo tudi meritve pri referenčni valovni dolžini 492 nm, da smo naredili popravke glede motenj. Najprej smo absorbanci merili 30 min v 5-minutnih intervalih. S tem smo želeli določiti optimalen čas merjenja absorbance za reakcijo, ki je bil pri 15 min.

Protokol predvideva tudi dve kontroli, to sta slepa kontrola (»*blank control*«) in kontrola ozadja (»*background control*«). Izvedli smo ju tako, kot predvideva protokol. V slepo kontrolo smo dodali gojišče, BrdU in protitelo, celic pa ne – z njim smo želeli preveriti, ali se BrdU in protitelo nespecifično vežeta na mikrotitrno ploščo ali molekule iz gojišča. V kontrolo ozadja pa smo dodali samo celice in protitelo in s tem preverili, ali se protitelo nespecifično veže na celice. Za kontrolo ozadja protokol predvideva, da izmerjena absorbanca z nizko vrednostjo (pod 0,100) pomeni, da se protitelo ne veže nespecifično na celice. Zelo pomembno je bilo, da smo v celični kulturi imeli čim manj eritrocitov, saj ti vplivajo na meritve absorbanc.

Test proliferacije smo pri obeh vrstah ponovili 3 ×, tako da smo uporabili celice vseh treh osebkov obeh vrst.

Ko smo določili ustrezno koncentracijo PHA-M v celični kulturi, smo želeli ugotoviti, kateri dan je največ celičnih proliferacij. Delali smo po enakem protokolu, razlika je bila le ta, da smo vse celice gojili v isti koncentraciji PHA-M (6%), nato pa test proliferacije izvedli 4., 5., 6. in 7. dan. Iz relativne primerjave absorbanc smo lahko ugotovili, kdaj je bilo celičnih delitev največ. Za tovrsten test proliferacije smo za vsako obravnavano vrsto uporabili le en osebek, to sta bila osebka A1 (aksolotl) in Paa200 (močeril).

Rezultate testov proliferacije smo obdelali v programu Microsoft Excel, MS Office 2013. Vrednostim absorbanc pri 370 nm smo odsteli absorbance pri 492 nm in vrednosti slepe kontrole. Podatke smo tudi grafično predstavili.

3.3.6 Inkubacija z antimitotiki in vizualizacija kromosomov

3.3.6.1 Antimitotiki

V tem primeru smo uporabili celično kulturo polne krvi, saj smo tako imeli večjo koncentracijo levkocitov v celični kulturi (med posedanjem krvi se namreč ne posedejo samo eritrociti, temveč tudi delež levkocitov). Uporabili smo enake pogoje kultivacije celic, kakor je opisano v poglavju 3.3.1, glede na rezultate testa proliferacije z BrdU pa smo se odločili, da uporabimo 6% (vol/vol) koncentracijo PHA-M.

Za ustavljanje celičnih delitev v metafazi smo uporabili pripravljeno raztopino kolcemida v koncentraciji 10 µg/ml (Sigma, Nemčija) in raztopino kolhicina (Sigma-Aldrich, Indija), ki smo jo pripravili sami. Založno raztopino kolhicina v koncentraciji 2 mg/ml smo pripravili tako, da smo zatehtali 1 mg kolhicina in ga raztopili v 0,5 mL 0,9% NaCl. Založno raztopino smo 100 × redčili z 0,9% NaCl in si na ta način pripravili delovno raztopini kolhicina.

Za ustavljanje delitev aksolotlovin celic smo preizkusili kolhicin in kolcemid, saj smo imeli dovolj krvi za kultivacijo. Zaradi omejene količine krvi, ki smo jo lahko odvzeli močerilom, smo lahko preizkusili samo enega izmed antimitotikov, odločili smo se za kolhicin. V Preglednici 1 in 2 je prikazano, katere končne koncentracije kolhicina oz. kolcemida smo preizkusili in časovni okvir inkubacije. V kontrolo nismo dodali antimitotikov. Kultivirali smo 10 µl polne krvi.

Inkubacijo z antimitotiki smo preizkusili pri celičnih kulturah dveh osebkov aksolotla (A1 in A10) in pri celičnih kulturah dveh osebkov bele podvrste močerila (Paa200 in Paa201).

Preglednica 1: Prikaz uporabljenih koncentracij antimitotikov in časov inkubacij v celični kulturi aksolotlovih (*Ambystoma mexicanum*) krvnih celic.

Antimitotik	Končna koncentracija antimitotika v celični kulturi [µg/ml]	Dan dodajanja antimitotika	Trajanje inkubacije [h]
Kolhycin	0	/	/
	0,4	4.	24
	1,6	4.	24
	3	4.	24
	3	4.	48
	0,4	5.	24
	1,6	5.	24
	3	5.	24
	3	5.	48
Kolcemid	0	/	/
	0,4	4.	24
	1,6	4.	24
	3	4.	24
	3	4.	48
	0,4	5.	24
	1,6	5.	24
	3	5.	24
	3	5.	48

Preglednica 2: Prikaz uporabljenih koncentracij antimitotika in časov inkubacij v celični kulturi krvnih celic bele podvrste močerila (*P. a. anguinus*).

Antimitotik	Končna koncentracija antimitotika v celični kulturi [µg/ml]	Dan dodajanja antimitotika	Trajanje inkubacije [h]
Kolhycin	0	/	/
	0,4	3.	24
	1,6	3.	24
	3	3.	24
	3	3.	48
	0,4	4.	24
	1,6	4.	24
	3	4.	24
	3	4.	48
	3	6.	48

3.3.6.2 Hipotonija in fiksacija celic

S hipotonijo sprostimo vsebino celic, jedra pa ostanejo intaktna. Za hipotonijo celičnih kultur dvoživk se uporablja hipotonična raztopina KCl v koncentraciji 0,0075 M, uporabi se lahko tudi 0,05 M raztopina KCl (Freed in Mezger-Freed, 1970).

Celice smo obdelali s hipotonično raztopino (0,0075 M KCl), ki smo ga pripravili tako, da smo zatehtali 0,56 g KCl (Sigma-Aldrich, Nemčija) in ga raztopili v 100 ml bdestilirane vode.

Celično kulturo iz mikrotitrne plošče smo prenesli v mikrocentrifugirko in centrifugirali pri 1100 rpm (100 g) 7 min. Odstranili smo supernatant in pelet resuspendirali v 2-3 kapljicah hipotonične raztopine. Mikrocentrifugirke smo do vrha napolnili s hipotonično raztopino in jih inkubirali 25 min. Postopek centrifugiranja in dodajanja hipotonične raztopine smo še 2 × ponovili, le s to razliko, da smo naenkrat dodali 1,5 ml hipotonične raztopine in suspenzije nismo inkubirali. Ker smo kultivirali polno kri, smo lahko postopek hipotonije zaradi prisotnih eritrocitov vizualno spremljali. Tako bi morebitno neuspešno hipotonijo lahko zaznali.

Fiksativ je bil zmes metanola (Merck, Nemčija) in ocetne kisline (Sigma-Aldrich, Nemčija) v razmerju 3:1 in je bil vedno sveže pripravljen (Freed in Mezger-Freed, 1970). Fiksacija je bila postopna. Po zadnjem dodajanju hipotonične raztopine smo najprej vanjo dodali le kapljico fiksativa. Sledilo je centrifugiranje in odstranjevanje supernatanta, nato pa smo pelet resuspendirali v 1,5 ml fiksativa. Zadnji korak smo še 1 × ponovili.

Tako fiksirana jedra so bila pripravljena za pripravo preparatov, lahko pa smo jih shranili na -20 °C in preprate pripravili kasneje. V tem primeru smo pred njihovo pripravo morali zamenjati fiksativ s svežim. Da smo zagotovili ustrezeno količino jeder na preparatu, smo v zadnjem koraku pelet resuspendirali le v 150-200 µl fiksativa. V primeru, da se na preparatu pojavijo kristali, je potrebno še 1 × zamenjati fiksativ (Freed in Mezger-Freed, 1970).

3.3.6.3 Priprava preparatov in vizualizacija kromosomov

Objektna stekla (Erie Scientific, ZDA) smo očistili s 70% etanolom in jih čez noč pustili v zaprti posodi z bdestilirano vodo na 4 °C. Na čisto, mrzlo in mokro objektno steklo, ki smo ga držali pod kotom, smo z višine ~20 cm kanili 15 µl dobro resuspendiranih jeder. S tem postopkom smo dosegli, da so se jedra lepo razporedila po objektnem steklu. Objektno steklo smo položili na termo ploščo, ki je bila predhodno ogreta na 38 °C. Ko so se preparati posušili, smo jih pregledali s svetlobnim mikroskopom. Če je bilo jeder na objektnem steklu malo, smo dodali še kapljico vzorca, vendar to običajno ni bilo potrebno, saj smo dovolj veliko število jeder dosegli s tem, da smo jih resuspendirali v majhni količini fiksativa.

Za lažje pregledovanje preparatov in iskanje kromosomov smo preparate pobarvali. Uporabili smo enako barvanje Giemsa s Sörensonovim fosfatnim pufom, kot smo ga uporabili za barvanje krvnih razmazov (glej poglavje 3.3.2.2).

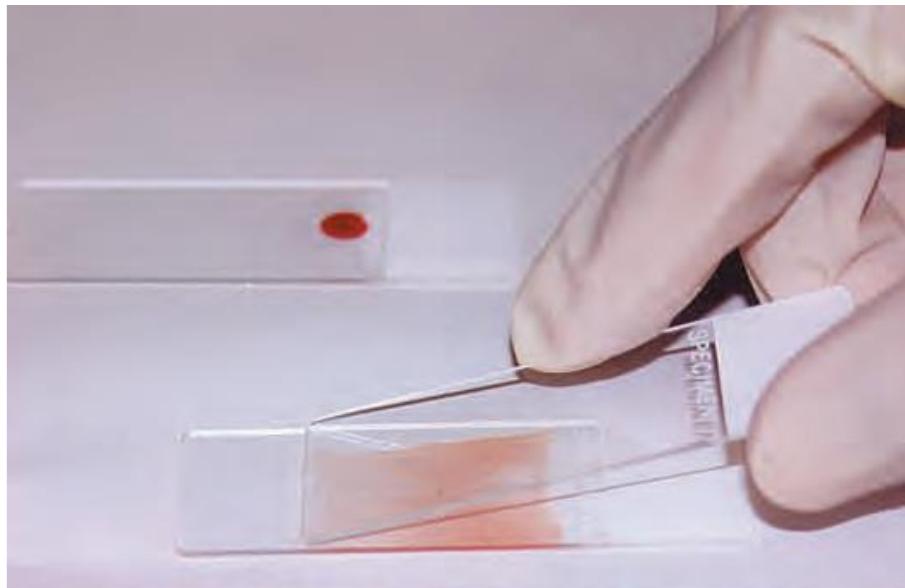
3.4 MORFOLOŠKE ANALIZE KRVNEGA RAZMAZA

Za morfološke analize krvnih celic smo pripravili krvne razmaze, ki smo jih naredili takoj po odvzemu krvi. Narejeni so bili krvni razmazi vseh osebkov, katerim je bila odvzeta kri.

3.4.1 Priprava krvnega razmaza

Takoj po odvzemu krvi smo naredili krvne razmaze tako, da smo manjšo kapljo krvi nanesli na sredino ob desnem robu objektnega stekla. Nato smo drugo objektno steklo položili levo od kaplje pod kotom 30° in ga potegnili proti desni do kaplje krvi, da se je ta razporedila po robu objektnega stekla. Tega smo nato pod istim kotom hitro povlekli levo do konca levega roba objektnega stekla. Ob tem se nagib in pritisk nista smela spremeniti. Postopek je prikazan na Sliki 4.

Krvni razmaz smo posušili na zraku, nato pa ga za 1-2 min fiksirali v 100% metanolu in ga do barvanja shranili v hladilniku za nekaj dni ali tednov.



Slika 4: Priprava krvnega razmaza. Kapljo krvi nanesemo na objektno steklo in naredimo krvni razmaz z drugim objektnim stekлом pod kotom 30° (Ross in Pawlina, 2011: 271).

3.4.2 Barvanje krvnega razmaza

Za lažjo identifikacijo posameznih tipov krvnih celic smo krvne razmaze diferencialno pobarvali. Uporabili smo dve različici barvanja po Giemsi (Presnell in Schreibman, 1997), da smo lahko izbrali ustrezejše barvanje, ki nam omogoča lažjo identifikacijo različnih tipov celic. Različici barvanja se razlikujeta po tem, če barvilo Giemsa redčimo s pufrom, od tega je odvisen tudi čas barvanja.

3.4.2.1 Quick Giemsa

Na objektno steklo s krvnim razmazom smo s kapalko nanesli barvilo Giemsa, ki je že pripravljeno za uporabo (Sigma-Aldrich, ZDA). Nanesli smo ga tako, da je bil ves krvni razmaz prekrit z barvilom. Barvilo smo nanesli za 2–4 min, nato pa ga dobro sprali v stekleni banjici z destilirano vodo. Objektna stekla smo posušili na zraku.

3.4.2.2 Barvilo Giemsa s Sörensonovim fosfatnim pufrom

Najprej smo pripravili Sörensonov fosfatni pufer (pH 6,8). Njegova sestava je prikazana v Preglednici 3.

Preglednica 3: Sestava Sörensenovega fosfatnega pufra (pH 6,8) (Presnell in Schreibman, 1997: 473).

Dinatrijev hidrogenfosfat (Na_2HPO_4)	4,73 g
Kalijev fosfat (KH_2PO_4)	4,54 g
Destilirana voda	1 L

V 50 ml Sörensenovega fosfatnega pufra smo s kapalko dodali 2-3 ml barvila Giemsa in dobro premešali. Krvne razmaze smo barvali 10 min, nato pa jih hitro sprali z destilirano vodo, jih na hitro potopili v Sörensenov fosfatni pufer in posušili na zraku.

Na obarvane preparate smo nato nanesli pertex (Pertex®, Medite Medizitechnik, Nemčija) in jih prekrili s krovnim stekлом.

3.4.3 Merjenje velikosti krvnih celic

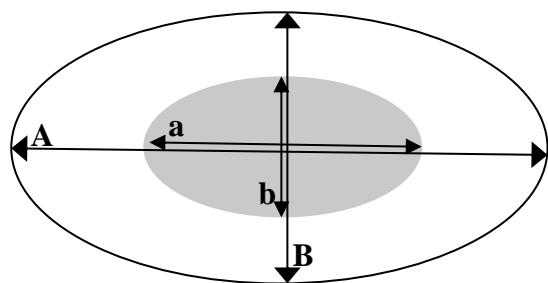
Za morfološke analize krvnih celic smo uporabili sveže pripravljene krvne razmaze dveh aksolotlov (osebka A1 in A3) in močerilov (osebka Paa200 in Paa201), iz arhiva krvnih razmazov skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev pa smo uporabili krvne razmaze aksolotla z oznako A2 in bele podvrste močerila z oznako Paa186. Krvni razmazi osebka Paa186 so bili pobarvani z barvilm Wright Giemsa.

Krvne razmaze smo pregledali s svetlobnim mikroskopom (Axioskop, Zeiss) in z digitalno kamero (Leica DFC290 H) ter računalniškim programom LAS V 4.0 (Leica Application

Suite) naredili posnetke. Za morfološke analize smo naredili posnetke celic pri $400 \times$ povečavi. Vsi posnetki so bili opremljeni z ustreznim merilom.

Morfološke analize smo opravili v programski opremi ImageJ 1.49, ki je prosto dostopna na spletni strani <http://imagej.nih.gov/ij>. Najprej smo kalibrirali merilo in sicer tako, da smo s funkcijo *Straight* pomerili merilo, ki je bilo že zajeto na posnetku, nato pa smo v meniju programa izbrali *Analyze*, nato *Set scale* in pod *Known distance* zapisali, koliko μm znaša merilo na posnetku. Vključili smo možnost *Global*, da je kalibracija veljala za vse posnetke.

Dolgo in kratko os vseh tipov krvnih celic smo pomerili s funkcijo *Straight*. Pomerili smo ju tako, da smo z ravno črto označili največjo dolžino celice, torej dolgo os, kot kratko os pa smo označili tisto, ki je bila približno pravokotna na dolgo os. Na enak način smo izmerili kratko in dolgo os jedra. Shematizirana celica s kratko in dolgo osjo je predstavljena na Sliki 4.



Slika 5: Shematizirana celica z oznakami merjenih velikosti. A-dolga os celice, B-kratka os celice, a-dolga os jedra, b-kratka os jedra.

Tako izmerjene morfološke podatke smo statistično obdelali v programu Microsoft Excel, MS Office 2013. Izračunali smo povprečne vrednosti (aritmetično sredino) iz morfoloških podatkov izmerjenih celic vseh treh osebkov aksolotla in bele podvrste močerila, njihovo standardno deviacijo, minimum in maksimum. Za izračun deležev citoplazme smo najprej izračunali površino citoplazme (površini celice odštejemo površino jedra), nato smo dobljeno vrednost delili s površino celice in pomnožili s 100 (glej Formulo 4).

$$\text{delež citoplazme [\%]} = \frac{(\text{površina celice} - \text{površina jedra})}{\text{površina celice}} \times 100 \quad \dots (4)$$

3.4.4 Izračun deležev posameznih tipov krvnih celic

Za izračun deležev krvnih celic smo s svetlobnim mikroskopom naredili posnetke pri $100 \times$ povečavi in sicer tako, da smo naredili posnetke v cik-cak vzorcu, kjer so bile krvne celice nepoškodovane in enakomerno razporejene. Tako smo izključili subjektivnost pri zajemanju posnetkov, kar bi lahko vplivalo na rezultate. Kri smo osebkom odvzeli večkrat, vendar smo za izračun deležev posameznih krvnih celic uporabili samo krvne razmaze prvega odvzema krvi, saj bi lahko predhoden odvzem krvi vplival na vrednosti deležev.

Za vsak osebek smo naredili 60 fotografij iz 3 objektnih stekelc po 20 fotografij na objektno steklo. Zaradi slabih krvnih razmazov in nedoločljivih celic pri osebkih Paa200 in Paa201 smo naredili le 20 fotografij na osebek.

Na fotografijah krvnih razmazov smo prešeli posamezne tipe krvnih celic in izračunali deleže v programu Microsoft Excel, MS Office 2013. Izračunali smo tudi deleže posameznih tipov levkocitov.

Izračunali smo še razmerje med deležem nevtrofilcev (N) in deležem limfocitov (L), ki je pokazatelj stresa pri vretenčarjih. Razmerje N/L okoli 1 nam pove, da je osebek izpostavljen stresu (okužba, neustrezne razmere v ujetništvu) (Gross in Siegel, 1983; Davis in Maerz, 2008, 2009, 2010; Vallejo in sod., 2015).

4 REZULTATI

4.1 VZPOSTAVITEV PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC

Uspešno smo vzpostavili primarno celično kulturo aksolotlovih (*Ambystoma mexicanum*) krvnih celic in krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*).

Kultivirali smo polno kri in tudi zgornji sloj posedane krvi, ki je obogaten z levkociti, saj se eritrociti posedejo. Pri kultivaciji zgornjega sloja krvi, ki je bila namenjena testu proliferacije z BrdU, so bili v celični kulturi večinoma prisotni levkociti z nekaj eritrociti, kakor je bilo pričakovano, koncentracija krvnih celic je bila do $1,5 \times 10^4$ celic/ml pri beli podvrsti močerila in do $7,8 \times 10^4$ celic/ml pri aksolotlu. Pri kultivaciji polne krvi je koncentracija celic pri beli podvrsti močerila dosegala do 9×10^5 celic/ml, pri aksolotlu pa do 4×10^6 celic/ml. Pri kultivaciji polne krvi so v kulturi pričakovano prevladovali eritrociti.

Spremljali smo viabilnost celic v celični kulturi in sicer s testom izključitve z 0,4% tripanskim modrilom. Pri kultivaciji polne krvi je bila viabilnost celic veliko boljša v primerjavi s celično kulturo zgornjega sloja krvi. Celično kulturo aksolotlovih krvnih celic (polna kri, medij z 10% FBS) smo spremljali do 14 dni, ko je delež viabilnih celic znašal 97,7-98,2%. Viabilnost zgornjega sloja posedane krvi aksolotla je bila po 4. dneh kultivacije 77,5-100%. Viabilnost je kljub enakemu postopku od poskusa do poskusa močno variirala.

Celično kulturo polne krvi bele podvrste močerila smo najdlje spremljali 8 dni, ko je delež viabilnih celic v mediju brez FBS znašal 83,1%, v mediju z 10% FBS pa 93,5%. Pri kultivaciji zgornjega sloja posedane krvi je bila viabilnost 4. dan kultivacije slabša, saj je delež viabilnih celic med poskusmi znašal 50-97%.

Zaradi nizkih koncentracij celic in nižjih viabilnosti pri kultivaciji zgornjega sloja krvi pri obeh vrstah lahko zaključimo, da je bila uspešna vzpostavitev primarne celične kulture le v primeru kultivacije polne krvi.

4.2 IN VITRO STIMULACIJA LIMFOCITOVOV Z MITOGENOM

Z mitogenom PHA-M smo spodbudili celične delitve in nato smo z imunološkim kolorimetričnim testom proliferacije želeli ugotoviti, pri kateri koncentraciji mitogena je največ celičnih delitev. Med krvnimi celicami se limfociti odzovejo na prisotnost PHA-M s celičnimi delitvami, zato smo kri posedali 2 h na 4 °C. Eritrociti so se večinoma posedli, limfociti pa so se nahajali v zgornjem sloju posedane krvi. Celično kulturo smo večkrat spremljali s hemocitometrijo, da smo preverili koncentracijo celic (eritrocite in levkocite smo prešteli posebej, saj smo jih med seboj zlahka ločili) in njihovo viabilnost. Uspešnost sedimentacije in koncentracija celic v celični kulturi je bila različna med osebki, koncentracija celic enega osebka (v različnih koncentracijah PHA-M) pa je bila enaka.

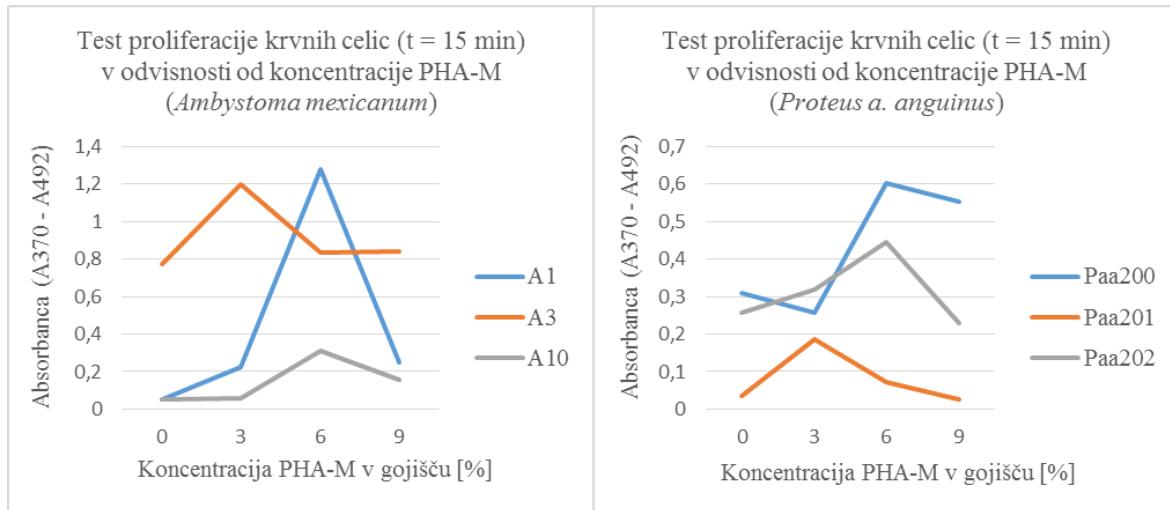
Test proliferacije z BrdU je bil narejen 4. dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4. Absorbanca testa proliferacije kaže na število celičnih delitev. Večja kot je absorbanca, več je bilo celičnih delitev. Za reakcijo testa proliferacije z BrdU smo najprej določili optimalen čas merjenja absorbance, to je pri 15. min. Pri aksolotlih lahko opazimo, da je pri dveh osebkih (A1 in A10) najbolj ugodna koncentracija PHA-M 6% (vol/vol), pri enem osebku (A3) pa 3% (Slika 6). Pri višji koncentraciji PHA-M opazimo padec signala. Popolnoma enako smo opazili pri beli podvrsti močerila. Za dva osebka (Paa200 in Paa202) je najbolj ugodna koncentracija PHA-M 6% (vol/vol), za en osebek (Paa201) pa 3%. Tudi v tem primeru opazimo padec signala pri 9% PHA-M, kar je lahko posledica napake v postopku (recimo združevanje celic v skupke in posledično slabša dostopnost protitelesa) ali pa ni bilo spodbujene proliferacije.

Pri beli podvrsti močerila opazimo, da so vrednosti absorbanc manjše kot pri aksolotlih (Slika 6). To je lahko zaradi razlik v odzivu na mitogen ali razlik v koncentraciji celic. Pri beli podvrsti močerila je bila koncentracija celic manjša, in sicer med $0,1$ do $1,5 \times 10^4$ levkocitov/ml (Preglednica 4). Pri celični kulturi aksolotlovih krvnih celic so njihove koncentracije znašale od $1,5 \times 10^4$ do $7,8 \times 10^4$ levkocitov/ml (Preglednica 4).

Preglednica 4: Pregled koncentracij levkocitov in njihova viabilnost v celični kulturi, kjer je bil narejen test proliferacije z BrdU.

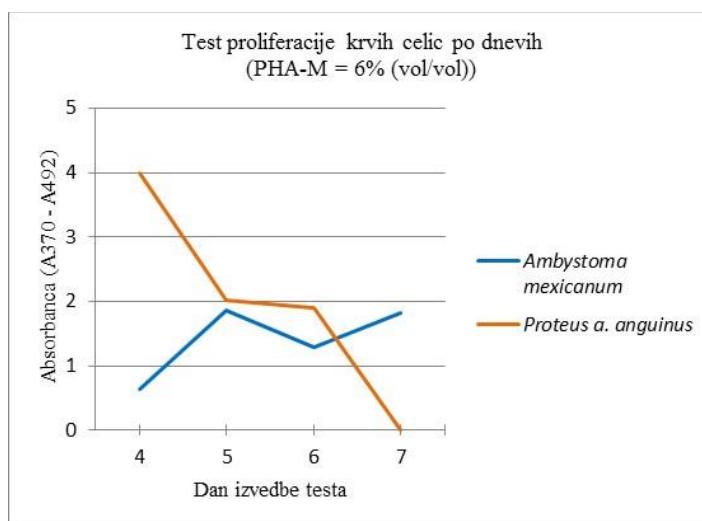
Osebek	Koncentracija levkocitov [št. levkocitov/ml]	Viabilnost celic [%]
A1	$7,8 \times 10^4$	82
A3	$1,5 \times 10^4$	75
A10	$4,8 \times 10^4$	96
Paa200	$0,5 \times 10^4$	50
Paa201	$0,1 \times 10^4$	50
Paa202	$1,5 \times 10^4$	97

S testom proliferacije z BrdU smo ugotovili, da je odziv limfocitov na PHA-M specifičen za posameznen osebek, vendar je pri obeh obravnavanih vrstah najbolj ugodna koncentracija PHA-M od 3% do 6% (vol/vol) (Slika 6). Glede na rezultate testa proliferacije smo se odločili, da za nadaljnje delo s krvnimi celicami obeh obravnavanih vrst uporabimo 6% koncentracijo PHA-M (vol/vol).



Slika 6: Test proliferacije krvnih celic ($t = 15$ min) v odvisnosti od koncentracije PHA-M. Krvne celice treh osebkov aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) in treh osebkov bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*) so bile kultivirane v mikrotitrni plošči s 96 vdolbinicami. Test proliferacije z BrdU je bil narejen 4. dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4.

S testom proliferacije z BrdU smo še želeli ugotoviti, kdaj je celičnih delitev največ. Krvne celice smo zato kultivirali do 7 dni pri koncentraciji PHA-M 6% (vol/vol) in relativno primerjali vrednosti absorbanc med posameznimi dnevi. Test proliferacije je bil narejen vsak dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4. Ugotovili smo, da je pri aksolotlu bilo največ delitev med 4. in 6. dnem kultivacije (meritev absorbance med 5. in 7. dnem) (Slika 7). Pri beli podvrsti močerila nas je presenetilo, da je bilo največ delitev že med 3. in 4. dnem kultivacije (meritev absorbance med 4. in 5. dnem) (Slika 7), vendar je razlog za tako zgodnje celične delitve limfocitov lahko glivična okužba, ki so jo takrat prebolevali močerili. Opazen je izrazit padec signala.



Slika 7: Test proliferacije krvnih celic aksolotla (*Ambystoma mexicanum*) in bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*) po dnevih. Vrednosti absorbanc lahko med seboj relativno primerjamo. Test proliferacije je bil narejen vsak dan, kakor je opisano v poglavju 3.2.4. Če je bila meritev absorbance testa proliferacije narejena 4. dan, pomeni, da spremljamo stopnjo celičnih delitev med 3. in 4. dnem kultivacije.

4.3 USTAVLJANJE CELIČNIH DELITEV Z ANTIMITOTIKI IN VIZUALIZACIJA KROMOSOMOV

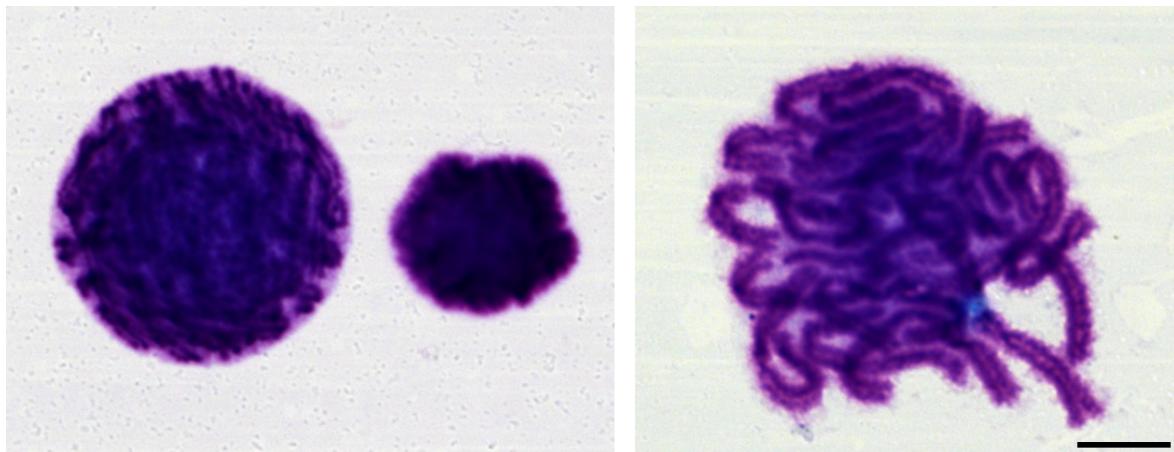
Preizkusili smo več različnih možnosti, kdaj, koliko in za kako dolgo dodati antimitotik, da bo vizualizacija kromosomov uspešna. Na celični kulturi aksolotlovin krvnih celic smo preizkusili dva antimitotika, to sta kolhicin in kolcemid, na celični kulturi bele podvrste močerila pa smo zaradi omejene količine vzorca preizkusi samo kolhicin. Kolcemid se od kolhicina razlikuje po tem, da je manj strupen za celice. Oba antimitotika preprečujejo nastajanje delitvenega vretena med celično delitvijo, zato ostanejo kromosomi v metafazi (Rieder in Palazzo, 1992).

Hipotonija celic iz celične kulture je bila uspešna, saj smo na preparatih dobili le jedra. Na preparatih je bilo zelo veliko interfaznih jeder. Za lažjo vizualizacijo smo preparate pobarvali z barvilom Giemsa s Sörensenovim fosfatnim pufrom (pH 6,8), kakor je to opisano v poglavju 3.2.3.2.

Zasledili smo profazna jedra, prometafazne in metafazne kromosome (Slika 8 in Slika 9). Najbolj smo bili uspešni pri osebku A10, kjer smo opazili vsega skupaj 2 profazni jedri oz. prometafazni jedri s kromosomi (Slika 8). Pri osebku A1 smo opazili 1 profazno jedro. Pri beli podvrsti močerila smo bili uspešni le v enem primeru, kjer smo pri osebku Paa201 opazili metafazne kromosome (Slika 9). Pri osebku Paa200 kromosomov nismo uspešno vizualizirali. V Preglednici 5 so podatki, s katerimi koncentracijami posameznega antimitotika smo bili uspešni pri vizualizaciji kromosomov. Najuspešnejši smo bili s koncentracijo 3 µg/ml, inkubacija je trajala 24 ali 48 ur.

Preglednica 5: Pregled uspešnih tretiranj celične kulture aksolotlovih krvnih celic (*Ambystoma mexicanum*) in krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*) z antimitotiki. Opažene so bile profaze, prometafazni in metafazni kromosomi.

Vrsta	Antimitotik	Koncentracija antimitotika v celični kulturi [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Dan dodanja antimitotika	Dolžina inkubacije [h]
<i>Ambystoma mexicanum</i>				
	Kolhicin	0,4	5.	24
	Kolcemid	3	4.	24
	Kolcemid	3	3.	48
<i>Proteus a. anguinus</i>				
	Kolhicin	3	6.	48

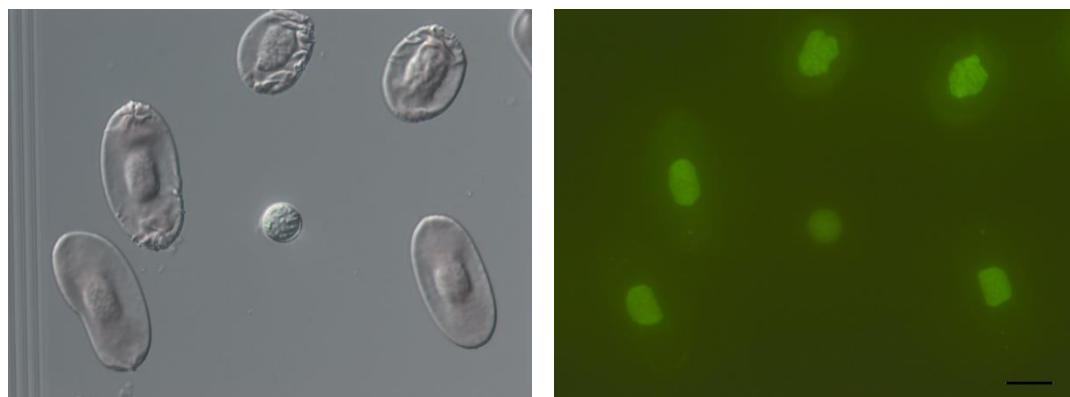


Slika 8: Primer profaznega jedra s kromosomi ob jedru nedeleče celice (levo) in prometafazno jedro s kromosomi (desno) pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*). Barvano z barvilom Giemsa. Merilo = 10 μm .



Slika 9: Metafazni kromosomi bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*) ob jedru nedeleče celice. Barvano z barvilkom Giemsa. Merilo = 10 µm.

Prisotnost morebitnih mitotskih figur smo pri beli podvrsti močerila preverjali tudi s fluorescenčnimi barvili, kot sta DAPI in akridin oranž. S slednjim smo uspešno vizualizirali jedra celic iz celičnih kultur (Slika 10), mitotskih figur nismo zasledili. Z barvilkom DAPI pa vizualizacija jader ni bila uspešna, saj membrana živih celic tega barvila ne prepušča.



Slika 10: Primer celic močerila (*P. anguinus anguinus*) v istem vidnem polju. Levo – DIC, desno – fluorescenčna mikroskopija z barvilkom akridin oranž. Merilo = 20 µm.

4.4 MORFOLOGIJA KRVNIH CELIC

Krvni razmazi so bili barvani z barvilom Giemsa na tri načine: Wright Giemsa, Quick Giemsa in Giemsa s Sörensonovim fosfatnim pufrom. Krvne razmaze najlepšeobarva Wright Giemsa, posamezne krvne celice se pri tem barvanju najlaže prepozna. Giemsa s Sörensonovim pufom prav tako daje zadovoljive rezultate. Celice so bile najslabše prepoznavne pri barvanju s Quick Giemso.

4.4.1 Morfologija krvnih celic aksolotla (*Ambystoma mexicanum*)

4.4.1.1 Morfološke značilnosti krvnih celic aksolotla (*Ambystoma mexicanum*)

Citoplazma eritrocitov je na krvnih razmazih z barvanjem po Giemsi eozinofilna, obarvana je roza ali rahlo vijolično in je homogena. Jedra so bazofilna in obarvana temno modro. So ovalne oblike, večinoma nameščena centralno, lahko pa so pomaknjena proti robu celic. Opazili smo, da je oblika eritrocitov različna (Slika 11). Tako smo največkrat zasledili ovalne, pa tudi okrogle, vretenaste eritrocite in eritrocite v obliki kaplje. Opazili smo več eritrocitov brez jedra, kar je bilo glede na literaturo pričakovano. Tudi te celice so lahko okrogle, ovalne ali v obliki kaplje. Občasno pa smo zasledili eritrocite z dvemi jedri. Na krvnih razmazih smo občasno opazili tudi eritrocite, ki so večji, imajo svetleje obarvano jedro in citoplazmo. Jedro teh celic je večje kot pri običajnih eritrocitih.

Eritroblasti so glede na stopnjo diferenciacije različno veliki, prav tako se spreminja velikost jedra (Slika 12). Njihova citoplazma se barva vijolično, večja jedra svetlo modro, manjša pa temno vijolično. Eritroblasti so okrogle celice z večinoma okroglim jedrom.

Na krvnih razmazih se trombociti nahajajo v skupinah kot strdki, lahko pa jih najdemo tudi posamično (Slika 13). Skupine trombocitov so različno velike. Oblika trombocitov v strdkih je odvisna od sosednjih celic. Trombociti, opaženi posamično, so podolgovati ali okrogli in imajo modra ali vijolična jedra. Citoplazma se barva svetlo vijolično in je neenakomerno razporejena okrog jedra. Okrogli trombociti so maloštevilni.

Limfociti so različnih velikosti - so majhni in veliki (Slika 14). Celica je bolj ali manj okrogla, vendar je citoplazma neenakomerno razporejena okrog jedra, kar daje videz izrastkov. Jedro se obarva modro ali vijolično in je okroglo, citoplazma pa se barva svetlo modro ali svetlo vijolično. Jedro zavzema skoraj celotno celico.

Monociti so običajno okrogle celice z ekscentrično nameščenim okroglim jedrom. Jedro in citoplazma se obarvata modro, le da je jedro obarvano temneje. So različnih velikosti (Slika 14).

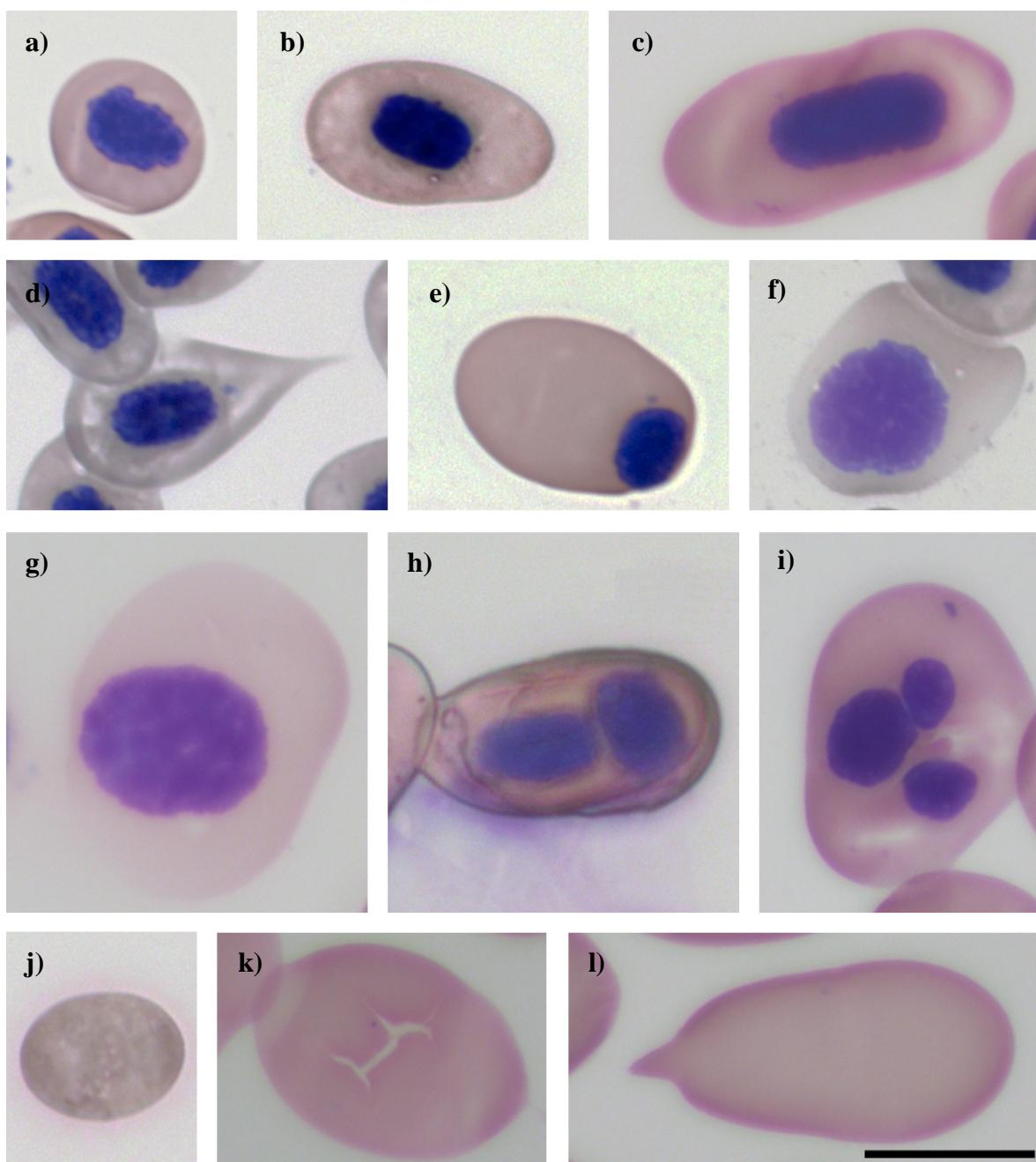
Nevtrofilci so okrogle celice s segmentiranim jedrom. Jedra se barvajo temno modro ali vijolično in imajo različno število segmentov – običajno je teh 2 do 4, če jih je 5 ali več, je jedro hipersegmentirano (Harvey, 2001). Segmente med sabo povezuje tanek kromatin, kar

je vidno kot nitka (Slika 14). Jedro je lahko tudi nesegmentirano. Citoplazma nevtrofilcev je obarvana svetlo modro in čeprav nevtrofilci glede na klasifikacijo sodijo med granulocite, nismo opazili granul v njihovi citoplazmi.

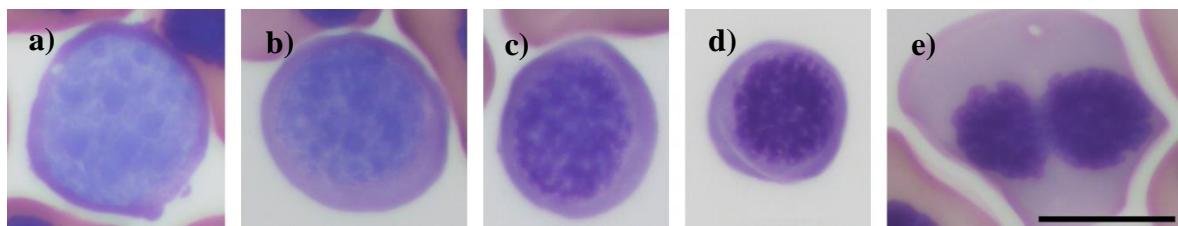
Bazofilci so ovalne celice s segmentiranim jedrom. Jedro je iz dveh ali štirih segmentov, obarvano je temno vijolično. Citoplazma je vijolična in vsebuje številne temno vijolične granule (Slika 14).

Eozinofilci imajo značilno granulirano roza citoplazmo in modro jedro (Slika 14). Celica je okrogla, jedra so pa različnih oblik. Velikokrat zasledimo ledvičasta jedra, lahko pa tudi ovalna. Granule so majhne in enakomerno razporejene po celotni citoplazmi.

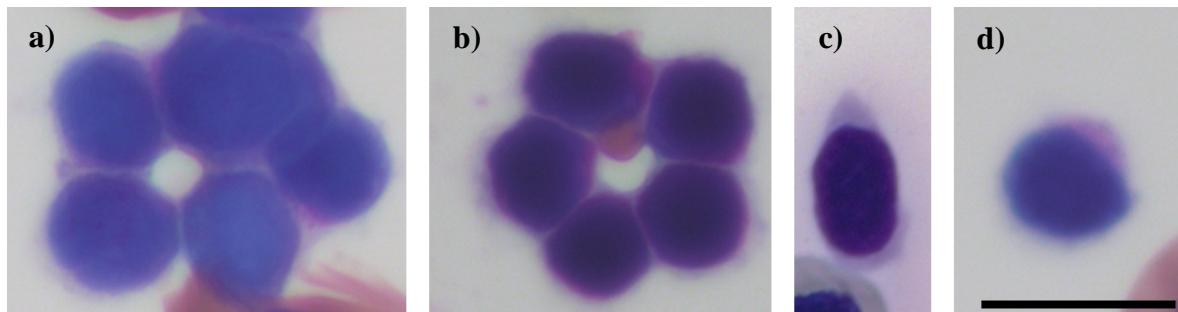
Na krvnih razmazih najdemo tudi artefakte (Slika 15). Če je tehnika krvnega razmaza nepravilna, jih opazimo veliko. Za realen opis morfologije celic izberemo tiste krvne razmaze, ki imajo artefaktov zelo malo. Pogosti artefakti, ki jih najdemo na krvnih razmazih, so razbite in poškodovane celice ter spremenjena morfologija celic in jeder.



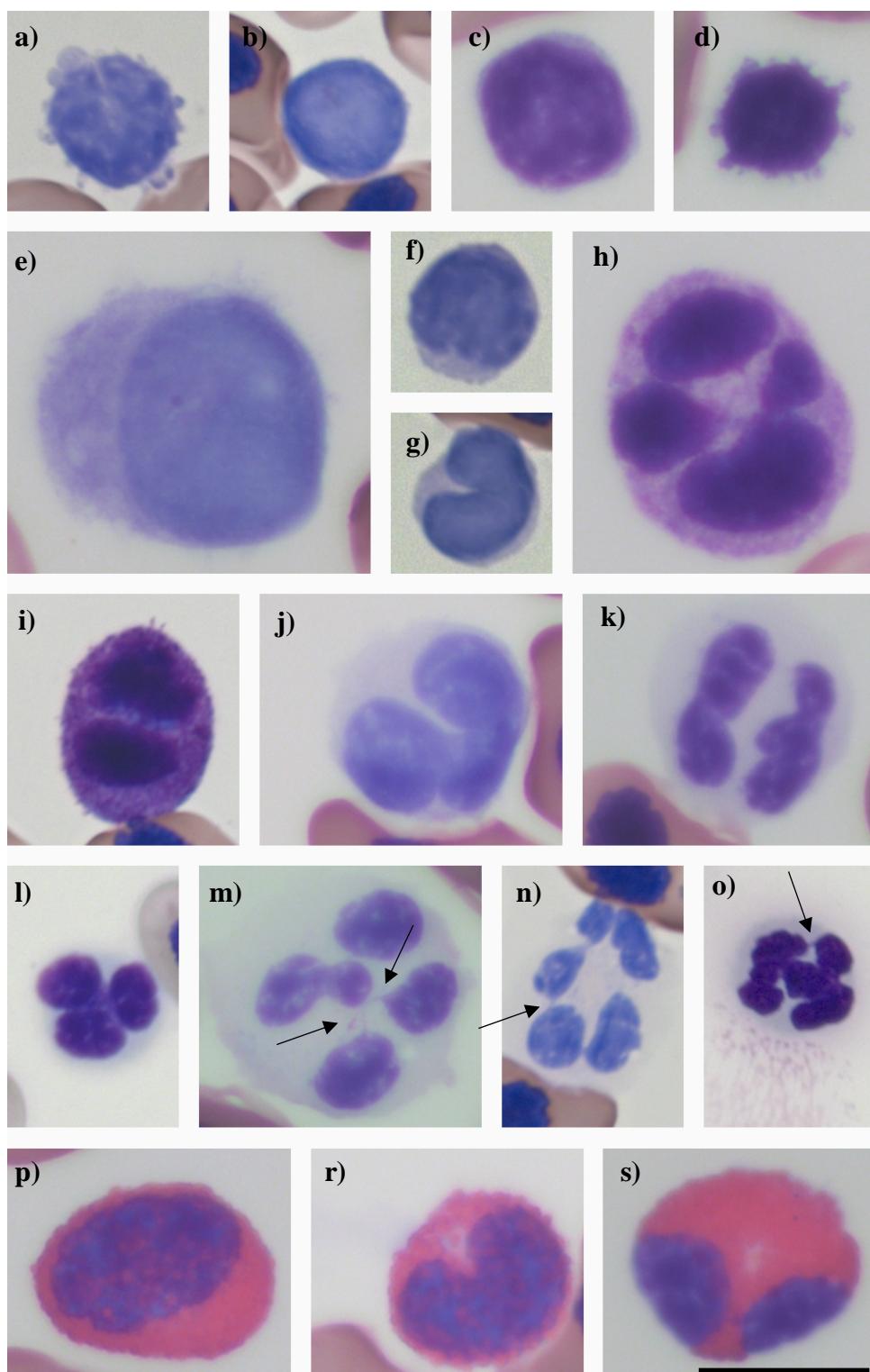
Slika 11: Morfološke značilnosti in variabilnost eritrocitov pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*). Barvanje z barvilom Giemsa. a) okrogel eritrocit, b) ovalen eritrocit, c) vretenast eritrocit, d) eritrocit v obliki kaplje, e) eritrocit z ekscentrično nameščenim jedrom, f) in g) »velik« eritrocit, h) eritrocit z dvemi jedri, i) eritrocit s tremi jedri, j) ovalen brezjedrni eritrocit, k) ovalen brezjedrni eritrocit z razpoko - artefakt, l) brezjedrni eritrocit v obliki kaplje. Merilo = 20 µm.



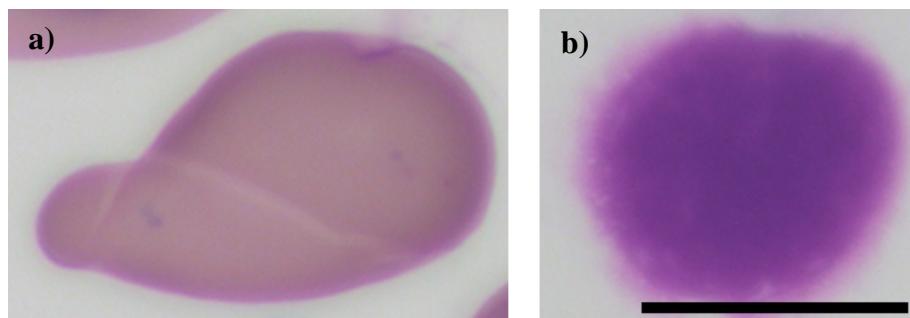
Slika 12: Morfološke značilnosti in variabilnost eritroblastov pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a-d) eritroblasti v različnih zrelostnih stopnjah, e) eritroblast med celično delitvijo. Merilo = 20 μm .



Slika 13: Morfološke značilnosti in variabilnost trombocitov pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a in b) trombociti v skupini, c) posamezen podolgovat trombocit, d) posamezen okrogel trombocit. Merilo = 20 μm .



Slika 14: Morfološke značilnosti in variabilnost levkocitov pri aksolotlu (*Ambystoma mexicanum*). Barvanje z barvilom Giemsa. a-c) velik limfocit, d) majhen limfocit, e-g) monociti različnih velikosti in z različnimi jedri, h) bazofilec s štirilobularnim jedrom, i) bazofilec z dvolobularnim jedrom, j) nevtrofilec z enolobularnim jedrom s konstrikcijo, k) nevtrofilec z dvolobularnim jedom, l) nevtrofilec z trilobularnim jedrom, m) nevtrofilec s štirilobularnim jedrom, n in o) nevtrofilec s hipersegmentiranim jedrom, p) eozinofilec z ovalnim jedrom, r) eozinofilec z ledvičastom jedrom, s) eozinofilec z dvolobularnim jedrom. Puščica = kromatinska nit. Merilo = 20 µm.



Slika 15: Artefakti na krvnih razmazih aksolotla (*Ambystoma mexicanum*). Barvanje z barvilom Giemsa. a) prepognjena celica, b) ostanki razbite celice. Merilo = 20 µm.

4.4.1.2 Velikosti krvnih celic aksolotla (*Ambystoma mexicanum*)

Med krvnimi celicami aksolotlov imajo največjo površino eritrociti, njihova povprečna površina je $563 \pm 88 \mu\text{m}^2$, vendar so eritrocitom po površini zelo blizu še eritrociti brez jedra s $559 \pm 217 \mu\text{m}^2$ in eritroblasti s $543 \pm 178 \mu\text{m}^2$. Najmanjše krvne celice so trombociti, njihova površina je le $165 \pm 48 \mu\text{m}^2$ (Preglednica 6).

Brezjedrni eritrociti se po izmerjenih vrednostih skoraj ne razlikujejo od eritrocitov, ki jedra imajo in torej pri njih ni zaznati zmanjšanja velikosti celice na račun odsotnosti jedra. Tudi eritroblasti so po površini, kratki in dolgi osi zelo blizu eritrocitom, so pa bolj okrogle celice. Od eritrocitov se razlikujejo po velikosti jedra, ki je pri eritroblastih večje, pa tudi bolj okroglo, kakor pri eritrocitih. Rezultati kažejo, da se med zorenjem eritroblastov spreminja predvsem velikost in oblika jedra, ki se z zoritvijo manjša (torej se DNA bolj kondenzira) in postaja bolj ovalno.

Razmerje med dolgo in kratko osjo nam pove, kašne oblike je celica. Vrednost 1 pomeni, da je celica okroglja, večje vrednosti pa kažejo na ovalno obliko. Glede na razmerje med dolgo in kratko osjo so skoraj okrogle oblike nevtrofilci, monociti in limfociti (Preglednica 6). Največje razmerje imajo ovalne celice, to so eritrociti (tako tisti z jedri, kakor tudi brezjedrni). Razmerje med dolgo in kratko osjo jeder kaže, da ta niso okrogla, saj pri nobeni celici ne zavzamejo vrednosti 1. Najbližje so jedra limfocitov in monocitov, medtem ko so jedra eritrocitov ovalna (vrednost 1,5).

Preglednica 6: Velikosti krvnih celic in jeder iz krvnih razmazov aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) v μm . N = število celic, SD = standardna deviacija.

Celični tip (N)	Celica				Jedro			
	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os
Eritrociti (300)								
Aritmetična sredina	563	31,3	22,0	1,43	122	14,5	9,6	1,52
SD	88	3,9	2,3	0,22	20	1,6	1,0	0,16
Min	316	20,6	2,9	0,54	77	8,9	7,7	1,12
Max	960	44,2	30,4	2,22	279	21,7	15	2,31
Eritrociti brez jedra (44)								
Aritmetična sredina	559	31,7	21,8	1,47				
SD	217	8,1	4,6	0,34				
Min	238	18,4	14,3	1,09				
Max	1073	56,0	34,0	2,97				
Eritroblasti (29)								
Aritmetična sredina	543	28,6	23,1	1,27	267	19,2	16,1	1,24
SD	178	3,9	4,5	0,16	81	3,2	2,9	0,18
Min	288	20,3	16,1	1,04	157	12,9	9,5	1,02
Max	1111	38,7	35,7	1,60	454	28,1	22,1	1,71
Trombociti (106)								
Aritmetična sredina	165	16,3	12,6	1,32	122	13,7	10,9	1,30
SD	48	3,1	1,9	0,23	34	2,4	1,7	0,23
Min	96	12,2	7,4	1,02	76	10,3	6,1	1,01
Max	383	34,5	18,4	2,28	258	25	16,4	2,38
Limfociti (64)								
Aritmetična sredina	329	21,6	19,6	1,15	246	18,3	16,6	1,14
SD	93	3,2	3,3	0,15	71	2,8	2,9	0,12
Min	161	13,8	12,6	1,02	107	11,8	10,3	1,03
Max	584	28,1	27,9	1,87	442	26,5	25,6	1,72
Monociti (12)								
Aritmetična sredina	407	22,5	21,3	1,10	293	20,1	17,4	1,18
SD	163	3,8	3,3	0,05	94	3,4	2,3	0,11
Min	290	19,2	18,1	1,04	196	16,4	14,4	1,01
Max	895	33,5	30,7	1,21	564	28,8	23,7	1,33
Nevtrofilci (61)								
Aritmetična sredina	532	26,2	24,5	1,09	267	21,7	17,6	1,40
SD	149	3,8	3,7	0,05	53	3,1	3,2	0,27
Min	228	17,3	16,1	1,01	146	14,5	8,6	1,00
Max	840	32,3	31,4	1,22	396	28,1	26,6	2,06

Se nadaljuje

Nadaljevanje Preglednice 6: Velikosti krvnih celic in jeder iz krvnih razmazov aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) v μm . N = število celic, SD = standardna deviacija.

Celični tip (N)	Celica				Jedro			
	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os
Bazofilci (11)								
Aritmetična sredina	544	28,9	22,6	1,25	294	22,5	17,1	1,44
SD	135	4,4	3,0	0,13	73	3,7	4,9	0,30
Min	396	22,8	18,9	1,01	206	16,4	10	1,11
Max	810	36,7	28,6	1,51	457	30,1	25,7	2,28
Eozinofilci (57)								
Aritmetična sredina	460	26,1	21,7	1,25	258	21,9	15,4	1,64
SD	143	3,7	4,2	0,22	89	4,1	3,3	0,28
Min	244	19,9	13,1	1,03	161	16,8	10,2	1,05
Max	949	41,3	29,7	2,04	658	42	27,5	2,46

4.4.2 Morfologija krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*)

4.4.2.1 Morfološke značilnosti krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*)

Eritrociti so večinoma ovalni, redki so tudi okrogle, drugačnih oblik (vretenastih, kapljičastih) pa nismo opazili. Prav tako nismo zasledili brezjedrnih eritrocitov. Pri barvanju z Giemso se citoplazma obarva roza, saj je eozinofilna, jedro pa je bazofilno in se obarva temno modro. Citoplazma je homogena, jedro leži centralno. Zasledili smo tudi eritrocit z dvemi jedri, vendar so ti izjemno redki. Na krvnih razmazih smo občasno opazili še eritrocite, ki so večji, le da sta jedro in citoplazma obarvana svetleje (Slika 16).

Opazili smo, da so eritroblasti dveh različnih tipov (Slika 17). Eni imajo valovit rob, drugi pa enotnega in so ovalni. Pri osebku Paa186 so vsi eritroblasti imeli valovit rob, pri osebku Paa200 so imeli gladek rob, pri osebku Paa201 pa sta bila prisotna oba tipa eritroblastov. Citoplazma se je barvala vijolično do roza, jedro vijolično do modro. Jedro je okroglo ali ovalno. Eritroblasti z valovitim robom so bili običajno manjši od eritroblastov z gladkim robom.

Trombociti se lahko nahajajo v skupinah kot strdki ali posamično (Slika 18). Skupine so različno velike, oblika trombocitov pa se prilagaja sosednjim celicam. Trombociti, ki se nahajajo posamično, so večinoma podolgovati, lahko pa tudi okrogle. Citoplazma se obarva svetlo vijolično, jedro pa temno modro. Pri posameznih trombocitih, ki so podolgovate oblike, je večji delež citoplazme na obeh koncih celice. Citoplazma vsebuje granule, ki pa so manj izrazite kot granule trombocitov pri aksolotlih. Okrogli trombociti so bili redko opaženi.

Na krvnih razmazih smo opazili majhne in velike limfocite (Slika 19). Celice in njihova jedra so okrogle. Jedro se barva temno modro, citoplazma, ki je neenakomerno razporejena okrog jedra, pa se obarva svetlo vijolično. Citoplazma je večinoma omejena na majhen pas okrog jedra. Limfocite lahko zamenjamo s trombociti, ki se nahajajo posamično in so okrogle oblike. Ločimo jih lahko glede na prisotnost granul v citoplazmi trombocitov.

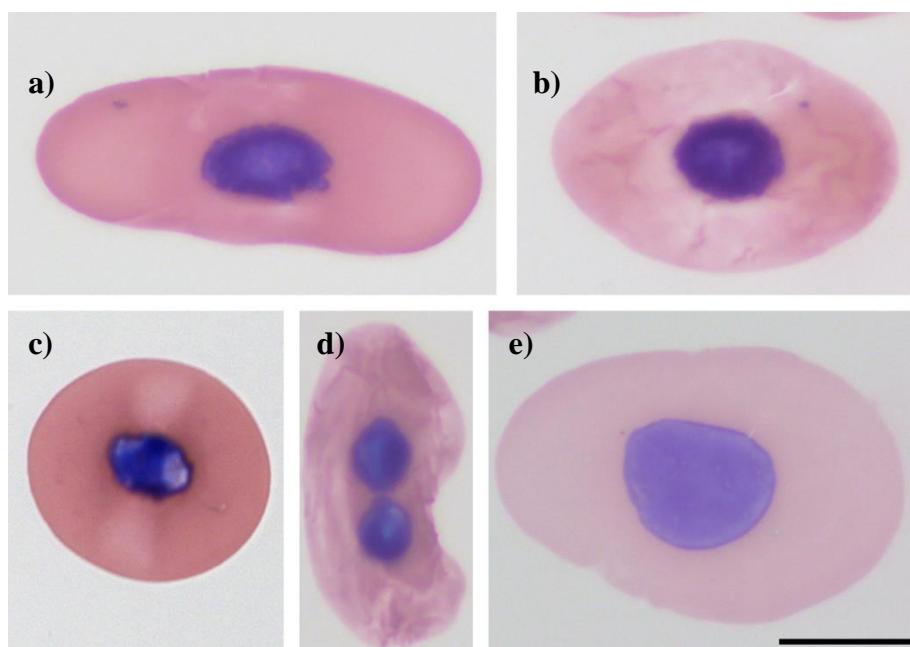
Monociti so na krvnih razmazih redki. So okrogle celice, ki imajo jedro pomaknjeno v en predel celice (ekscentrična lega) (Slika 19). Citoplazma je pri barvanju z barvilkom Giemsa svetlo modra ali vijolična, jedro je modro in temnejše od citoplazme. Velikost jedra je različna, verjetno glede na stopnjo zrelosti celice.

Nevtrofilci so okrogle celice s segmentiranim jedrom. Citoplazma se barva svetlo modro ali vijolično. Čeprav nevtrofilci po klasifikaciji spadajo med granulocite, pri barvanju z barvilkom Giemsa nismo opazili granul v njihovi citoplazmi. Jedra se barvajo temno modro ali vijolično in so različno segmentirana – večinoma imajo 2 do 4 segmente, jedra niso zmeraj enako velika. Zastopana so tudi hipersegmentirana jedra s 5 do 9 segmenti. Segmenti so med seboj povezani s tankim kromatinom, vidnim kot nitka. Nekatera jedra niso segmentirana (Slika 19).

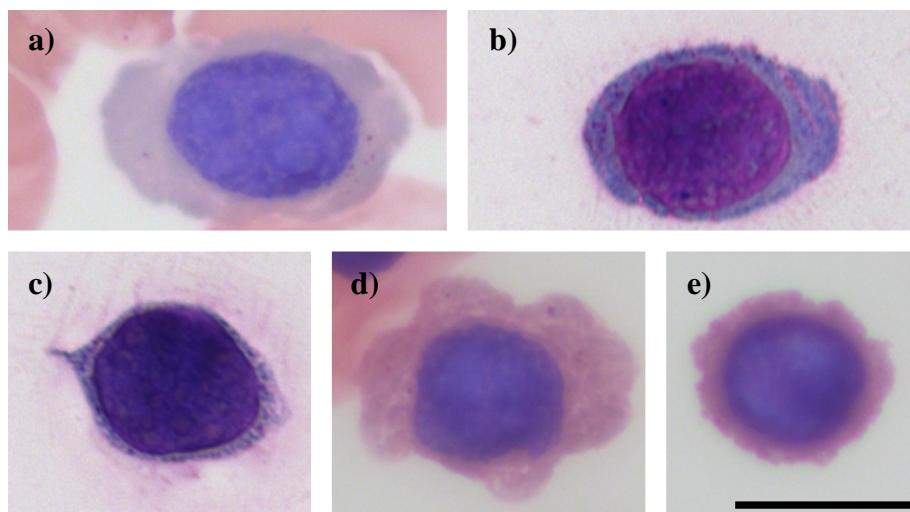
Bazofilcev pri beli podvrsti močerila nismo prepoznali in jih zato nismo opisali. Morda jih pri tej vrsti ni ali pa so zelo redki, je pa možno tudi, da jih nismo prepoznali.

Eozinofilci so granulirane okrogle celice. Granule so okrogle in so enakomerno razporejene po citoplazmi, obarvane so živo roza. Jedro se obarva modro, je iz dveh segmentov in je skrajno pomaknjeno na eno stran celice (Slika 19).

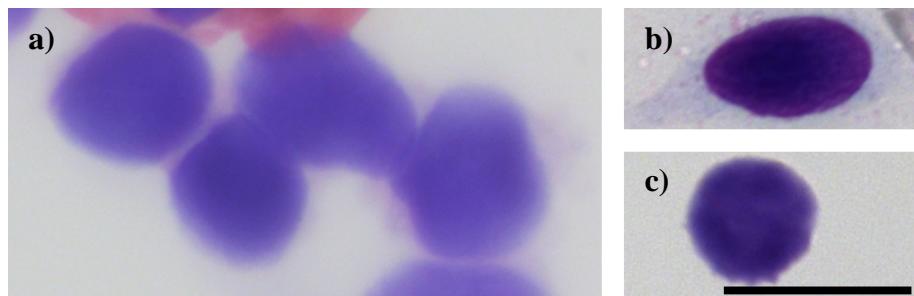
Na krvnih razmazih bele podvrste močerilov najdemo več artefaktov kot na krvnih razmazih aksolotlov. Krvne celice močerilov so veliko večje od krvnih celic aksolotlov in se zato prepogibajo (Slika 20). Veliko je poškodovanih ali popolnoma razbitih celic, kar je lahko posledica slabe priprave razmaza, k čemur najverjetneje pripomore velikost celic.



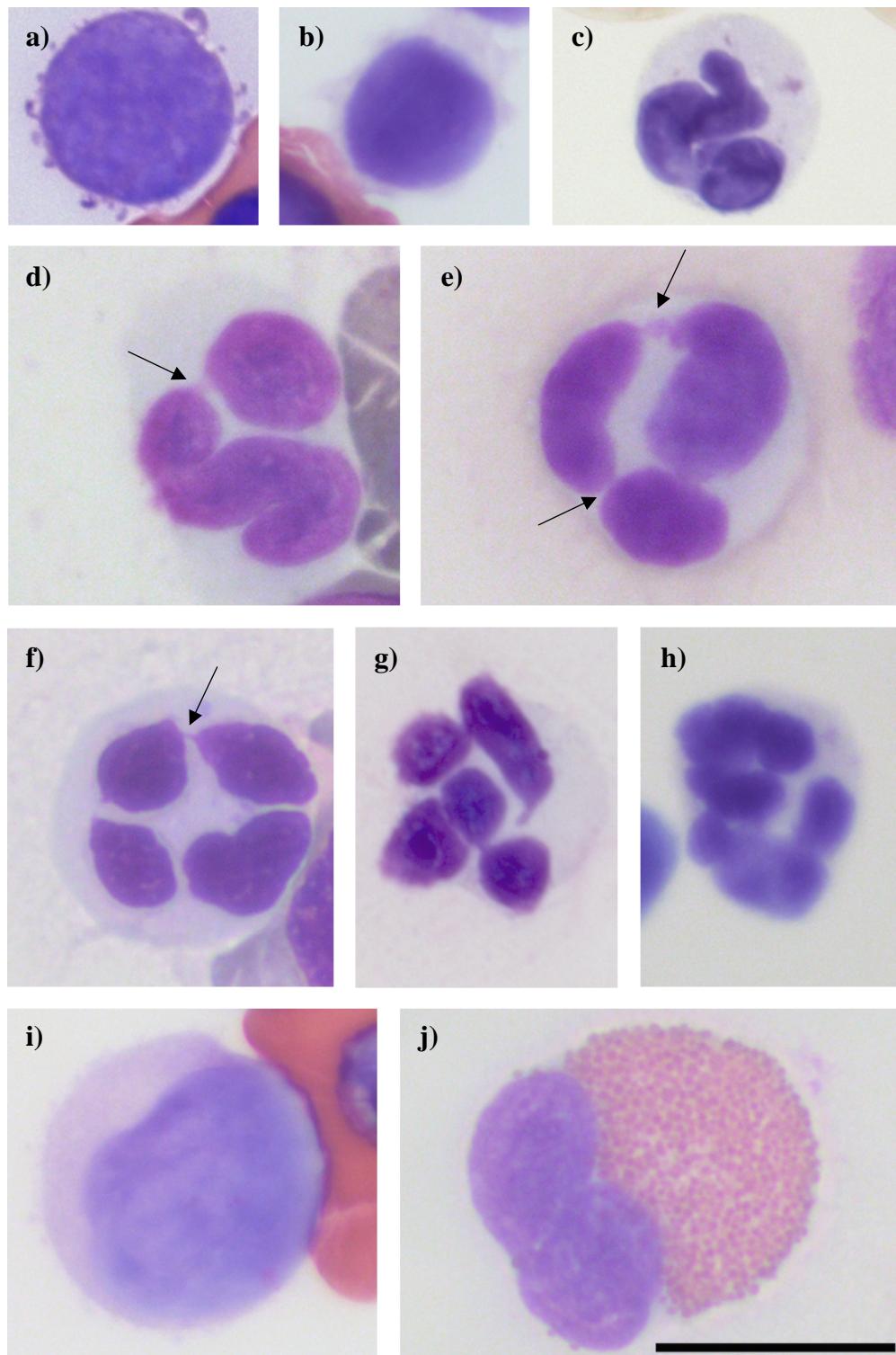
Slika 16: Morfološke značilnosti in variabilnost eritrocitov pri beli podvrsti močerila (*Proteus a. anguinus*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a in b) ovalen eritrocit, c) okrogel eritrocit, d) eritrocit z dvemi jedri, e) »velik« eritrocit. Merilo = 20 µm.



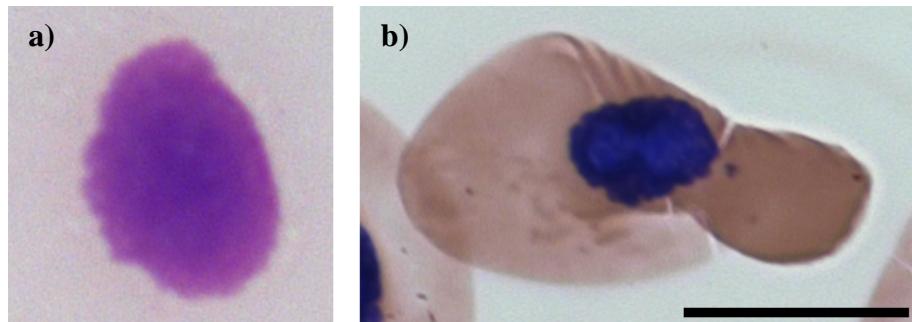
Slika 17: Morfološke značilnosti in variabilnost eritroblastov pri beli podvrsti močerila (*Proteus a. anguinus*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a-e različne razvojne stopnje eritroblastov. Merilo = 20 µm.



Slika 18: Morfološke značilnosti in variabilnost trombocitov pri beli podvrsti močerila (*Proteus a. anguinus*). Barvanje z barvilkom Giemsa. a) trombociti v skupini, b) posamezen podolgovat trombocit, c) posamezen okrogel trombocit. Merilo = 20 μm .



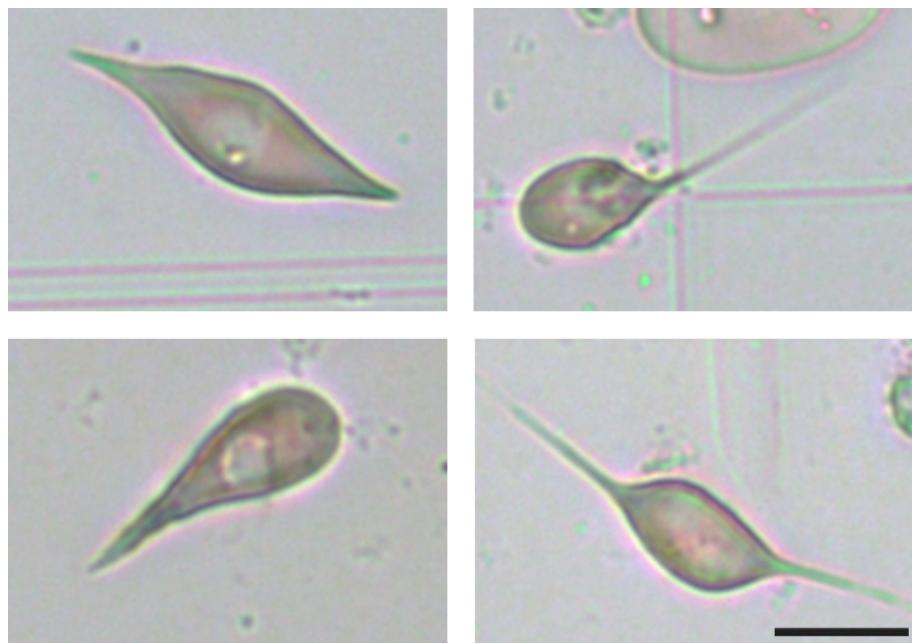
Slika 19: Morfološke značilnosti in variabilnost levkocitov pri beli podvrsti močerila (*Proteus a. anguinus*). Barvanje z barvilom Giemsa. a) velik limfocit, b) majhen limfocit, c) nevtrofilec z enolobularnim jedrom, d) nevtrofilec z dvolobularnim jedrom, e) nevtrofilec s trilobularnim jedrom, f) nevtrofilec s štirilobularnim jedrom, g in h) nevtrofilec s hipersegmentiranim jedrom, i) monocit, j) eozinofilec. Puščica = kromatinska nit. Merilo = 20 μm .



Slika 20: Artefakti na krvnih razmazih bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinans*). Barvanje z barvilom Giemsa. a) ostanki razbite celice, b) prepognjena celica. Merilo = 20 µm.

4.4.2.2 Eritroidne celice v celični kulturi krvnih celic

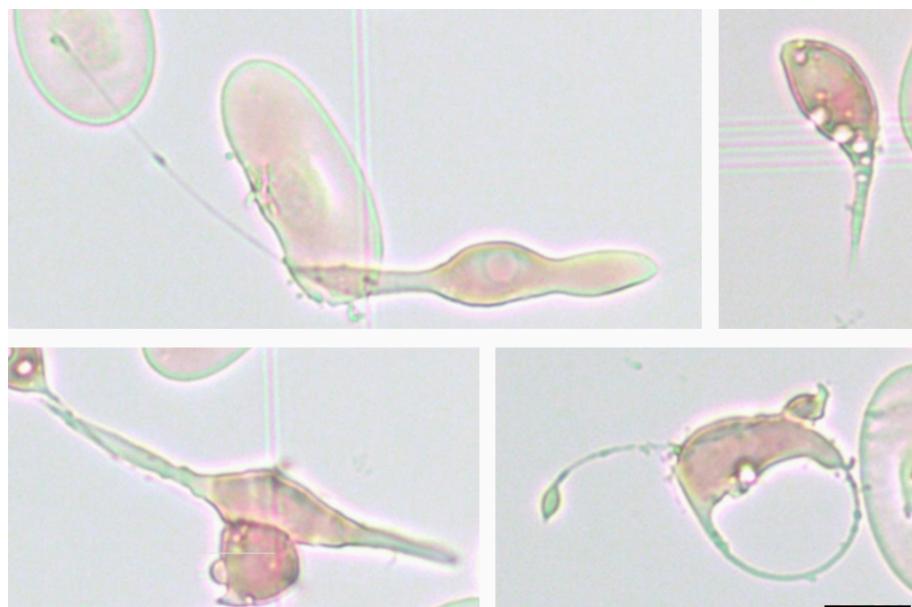
Med opazovanjem celic celične kulture v hemocitometru smo opazili, da ima manjši delež eritroidnih celic pri obeh obravnavanih vrstah izrastke (Slika 21, Slika 22). Gre za eritrocite ali pa eritroblaste, ki jih med opazovanjem s svetlobno mikroskopijo med sabo nismo mogli ločiti. Pri aksolotlu večinoma na enem polu nastanejo izrastki, ki imajo različno obliko in debelino. Eritroidne celice z izrastki lahko merijo do 80 µm v dolžino.



Slika 21: Eritroidne celice z izrastki v celični kulturi aksolotlovih krvnih celic (*Ambystoma mexicanum*). Celice razvijejo izrastke na enem ali dveh koncih celice. Nebarvana celična kultura v hemocitometru. Merilo = 20 µm.

Izrastki so pri močerilu lahko zelo tanki in dolgi, lahko imajo zadebelitve (Slika 22). Eritroidne celice z izrastki merijo do 80 μm v dolžino, posamezne pa celo do 330 μm . Opazili smo, da se izrastki pojavijo pri manjših eritrocitih, najverjetneje gre za eritroblaste, vendar ne moremo zagotovo trditi. Celice imajo izrastke že v celični kulturi, saj smo jih lahko opazovali že z invertnim mikroskopom, ko so celice še bile v celični kulturi v mikrotitrni plošči, med opazovanjem celic v hemocitometru pa so se izrastki še malo povečali.

Na pojavljanje izrastkov serum ploda goveda (FBS) ni imel vpliv. Izrastki so bili prisotni tako v mediju brez FBS, kakor v mediju z 10% FBS. Prav tako smo izrastke opazili tudi v celični kulturi, kjer smo dodali kolhicin (v končni koncentraciji 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$).



Slika 22: Eritroidne celice z izrastki v celični kulturi krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). Celice razvijejo izrastke na enem ali dveh koncih celice, izrastki imajo lahko zadebelitve. Nebarvana celična kultura v hemocitometru. Merilo = 20 μm .

4.4.2.3 Velikosti krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*)

Največje krvne celice bele podvrste močerila so eritrociti s kar $1248 \pm 243 \mu\text{m}^2$, so tudi najdaljše celice. Eritroblasti so precej manjše celice s $474 \pm 203 \mu\text{m}^2$, velikosti jeder eritroblastov in eritrocitov so pa skoraj enake. Eritrociti so v primerjavi z eritroblasti bolj ovalne celice, prav tako njihovo jedro, na kar kažejo razmerja med dolgo in kratko osjo (Preglednica 7). Med zoritvijo eritroblastov prihaja do povečevanja deleža citoplazme in spreminjaanja oblike celice, jedro se morfološko bistveno ne spremeni.

Limfocite je v splošnem težko ločiti od trombocitov, razen v primeru, ko so v citoplazmi reaktivnih trombocitov vidne granule (Campbell, 2015). Trombociti in limfociti bele podvrste močerila se med seboj lahko ločijo po velikosti – trombociti so namreč v povprečju manjši od limfocitov, vendar ta razlika ni vedno dovolj za identifikacijo. Trombociti so tudi najmanjše krvne celice bele podvrste močerila (Preglednica 7).

Razmerje med dolgo in kratko osjo nam pove, kakšne oblike je celica. Vrednosti blizu 1 kažejo na to, da je celica okrogle, višje vrednosti pa kažejo na ovalno obliko. Eritrociti so izrazito ovalni, saj imajo razmerje med dolgo in kratko osjo kar 1,86. Razmerje blizu vrednosti 1 imajo vsi levkociti, torej limfociti (1,17), monociti (1,07), nevtrofilci (1,12) in eozinofilci (1,11) (Preglednica 7).

Preglednica 7: Velikosti krvnih celic in jeder iz krvnih razmazov bele podrvste močerila (*Proteus a. anguinus*) v μm . N = število celic, SD = standardna deviacija.

Celični tip (N)	Celica				Jedro			
	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os	Površina [μm^2]	Dolga os [μm]	Kratka os [μm]	Razmerje dolga os: kratka os
Eritrociti (300)								
Aritmetična sredina	1248	52,7	28,7	1,86	218	18,7	13,6	1,37
SD	243	8,2	4,2	0,42	57	2,5	2,1	0,19
Min	509	22,5	14,8	1,07	115	13,7	8,4	1,01
Max	1753	80,0	41,5	3,37	451	28,0	19,5	2,78
Eritroblasti (29)								
Aritmetična sredina	474	27,1	21,7	1,27	224	17,5	14,9	1,20
SD	203	6,6	4,1	0,16	114	4,4	3,7	0,12
Min	186	17,0	12,6	1,01	92	10,8	8,1	1,01
Max	1300	48,0	38,1	1,89	633	31,9	27,3	1,65
Trombociti (106)								
Aritmetična sredina	220	18,8	14,6	1,31	174	16,1	12,9	1,29
SD	62	4,1	2,3	0,27	44	2,9	1,9	0,23
Min	60	9,5	7,7	1,01	41	7,7	6,7	1,01
Max	488	40,7	20,8	2,76	319	27,0	18,2	2,37
Limfociti (64)								
Aritmetična sredina	367	22,9	20,1	1,17	277	19,5	16,9	1,20
SD	104	3,7	3,1	0,13	72	3,0	2,4	0,13
Min	197	16,2	14,4	1,01	126	12,8	12,1	1,01
Max	719	36,0	30,8	1,74	473	28,7	24,1	1,79
Monociti (12)								
Aritmetična sredina	522	26,0	24,4	1,07	363	22,8	19,9	1,27
SD	133	3,4	3,0	0,04	84	2,4	3,0	0,10
Min	328	21,2	19,5	1,02	210	19,5	14,6	1,14
Max	837	33,1	31,5	1,15	554	27,6	25,6	1,47
Nevtrofilci (61)								
Aritmetična sredina	643	28,9	26,4	1,12	360	25,1	20,6	1,41
SD	221	4,8	4,3	0,08	92	3,8	3,6	0,22
Min	371	18,7	18,3	1,00	205	18,3	13,3	1,04
Max	1684	50,7	41,8	1,53	697	38,7	36,0	2,18
Eozinofilci (57)								
Povpreče	557	27,1	25,3	1,11	285	24,2	16,0	1,81
SD	202	5,1	4,7	0,05	76	4,0	2,7	0,37
Min	299	20,5	18,1	1,03	154	17,7	9,8	1,10
Max	1015	38,6	35,1	1,21	433	33,1	20,3	2,64

4.5 DELEŽ CITOPLAZME KRVNIH CELIC

Deleži citoplazme se med različnimi tipi krvnih celic močno razlikujejo. Če primerjamo vrednosti deležev citoplazme za isti tip krvnih celic med aksolotli in belo podvrsto močerila, opazimo le manjše razlike.

Največji delež citoplazme imajo eritrociti in sicer tako pri aksolotlu, kakor pri beli podvrsti močerila. Citoplazma eritrocitov aksolotla predstavlja 78% celice, pri beli podvrsti močerila pa je ta delež še malo večji, predstavlja skoraj 82% celice (Preglednica 8).

Delež citoplazme eritroblastov predstavlja približno polovico celice pri obeh obravnavanih vrstah. Velika standardna deviacija kaže, da se deleži citoplazme eritroblastov med seboj razlikujejo glede na stopnjo diferenciacije. Zgodnje stopnje eritroblastov imajo manjši delež citoplazme, nato pa se delež citoplazme med njihovo diferenciacijo povečuje.

Pri obeh obravnavanih vrstah imajo najmanjši delež citoplazme trombociti in limfociti, ta dva tipa celic pa naj bi se razlikovala glede na delež citoplazme. Tako naj bi imeli trombociti manjši delež citoplazme v primerjavi z limfociti (Campbell, 2015). V Preglednici 8 je razvidno, da v našem primeru to za trombocite in limfocite aksolotlov ne drži, pri beli podvrsti močerila pa omenjeno razliko lahko opazimo, vendar manjši delež citoplazme trombocitov ni zanesljiv znak za njihovo identifikacijo.

Zaradi razlik v oblikovanosti jedra nevtrofilcev deleži citoplazme teh celic precej variirajo. Nevtrofilci aksolotlov imajo v povprečju 47,7% citoplazme, nevtrofilci bele podvrste močerila pa nekoliko manj (42,1%).

Preglednica 8: Delež citoplazme krvnih celic v krvnih razmazov aksolotla (*Ambystoma mexicanum*) in bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*).

Celični tip	Delež citoplazme ± SD [%] (<i>Ambystoma mexicanum</i>)	Delež citoplazme ± SD [%] (<i>Proteus a. anguinus</i>)
Eritrociti	78,0 (± 3,6)	81,8 (± 6,2)
Eritroblasti	49,4 (± 11,5)	52,8 (± 10,3)
Trombociti	25,5 (± 6,7)	19,9 (± 7,0)
Limfociti	25,3 (± 6,0)	24,2 (± 6,4)
Monociti	26,8 (± 6,0)	29,6 (± 8,0)
Nevtrofilci	47,7 (± 10,1)	42,1 (± 9,6)
Bazofilci	45,5 (± 7,6)	/
Eozinofilci	42,8 (± 9,9)	46,4 (± 11,3)

4.6 DELEŽI RAZLIČNIH TIPOV KRVNIH CELIC NA KRVNIH RAZMAZIH

Pri vseh osebkih največji delež krvnih celic predstavljajo eritrociti (Preglednica 9). Ugotovili smo, da je ta delež pri aksolotlu v povprečju 97,42%, vrednosti deležev pri vseh treh osebkih so bile podobne. Pri beli podvrsti močerila ne moremo govoriti o povprečnem deležu krvnih celic, ker smo opazili velike razlike med osebki. Pri vseh osebkih bele podvrste močerila je delež eritrocitov manjši kakor pri aksolotlih. Še posebej izstopa osebek Paa186, ki ima delež eritrocitov le 69,31%. Eritrocitov brez jedra pri beli podvrsti močerila nismo opazili, pri aksolotlih pa je njihov delež v povprečju 0,12% z manjšimi odstopanjimi med posameznimi osebki.

Velik delež eritroblastov smo opazili pri beli podvrsti močerila, njihov delež v povprečju znaša 8,16%, opazne so razlike med posameznimi osebki (Preglednica 9). V primerjavi z belo podvrsto močerila imajo aksolotli majhen delež eritroblastov, njihov povprečni delež je 0,29%. Podobno je z deležem trombocitov, ki je pri beli podvrsti močerila bistveno višji, opazna so večja odstopanja med posameznimi osebki.

Povprečen delež levkocitov pri aksolotlih je 1,52%, pri beli podvrsti močerila pa 8,59%. Slednji je visok predvsem zaradi visokega deleža levkocitov osebka Paa186. Imajo pa vsi osebki bele podvrste močerila večji delež levkocitov kakor aksolotli.

Preglednica 9: Deleži posameznih tipov krvnih celic v krvnih razmazih aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) in bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*).

Celični tip	Delež celic pri osebkih (<i>Ambystoma mexicanum</i>)				Delež celic pri osebkih (<i>Proteus a. anguinus</i>)			
	A1	A2	A3	Aritmetična sredina	Paa186	Paa200	Paa201	Aritmetična sredina
Eritrociti (z jedrom)	96,67	98,40	96,37	97,42	69,31	93,07	83,61	78,51
Eritrociti brez jedra	0,17	0,09	0,12	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00
Eritroblasti	0,31	0,35	0,10	0,29	10,49	3,90	7,35	8,16
Trombociti	0,88	0,24	0,40	0,49	6,24	0,37	3,34	4,14
Lekkociti	1,94	0,9	2,24	1,52	13,05	2,66	5,19	8,59

Diferencialni deleži levkocitov močerila in aksolotla so predstavljeni v Preglednici 10. Limfociti so najpogosteji izmed levkocitov pri obeh obravnavanih vrstah, njihov diferencialni delež je pri beli podvrsti močerila večji in znaša 79,17%. Pri obeh vrstah je opazen tudi visok diferencialni delež nevtrofilcev, delež eozinofilcev se pa med njima razlikuje. Aksolotli imajo diferencialni delež eozinofilcev kar 17,63%, medtem ko je njihov diferencialni delež pri beli podvrsti močerila le 2,08%.

Na krvnih razmazih najdemo tudi monocite, medtem ko bazofilcev pri beli podvrsti močerila nismo prepoznali.

Razmerje med deležem nevtrofilcev in deležem limfocitov je pokazatelj stresa pri vretenčarjih (Gross in Siegel, 1983; Davis in Maerz, 2008, 2009, 2010; Vallejo in sod., 2015). Obravnavani osebki imajo zelo podobno razmerje – ta je pri aksolotlih 0,22, pri beli podvrsti močerila pa 0,20 (Preglednica 10).

Preglednica 10: Diferencialni delež levkocitov na krvnih razmazih in razmerje deležev N/L aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) in bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). V povprečju deležev levkocitov bele podvrste močerila nismo upoštevali osebka Paa186 zaradi njegovega velikega odstopanja od preostalih dveh osebkov. N-delež nevtrofilcev, L-delež limfocitov.

Celični tip	Povprečen delež posameznih tipov levkocitov [%]	
	<i>Amystoma mexicanum</i>	<i>Proteus a. anguinus</i>
Limfociti	62,89	79,17
Nevtrofilci	13,68	17,2
Eozinofilci	17,63	2,08
Monociti	1,84	2,78
Bazofilci	3,95	/
Razmerje N/L	0,22	0,20

5 RAZPRAVA

Dvoživke so za citogenetike zanimivi organizmi, ker se vrste med seboj glede na kariotip zelo razlikujejo. Število kromosomov pri brezrepih dvoživkah (Anura) variira med $2n = 14$ pri afriškem rodu *Arthroleptis* (Scheel, 1971) pa vse do $8n = 104$ pri Južnoameriški poliploidni vrsti *Ceratophrys ornata* (argetinska rožičarka) (Schmid in sod., 1985). Velike razlike so lahko že znotraj samega rodu, kakor je primer rodu *Rana*, kjer diploidno število kromosomov znaša od 22 do 64 (Bogart, 1991). Večina repatih dvoživk ima diploidno število kromosomov med 22 do 28 (Sessions, 2008). V naravi se pojavljajo tudi poliploidne dvoživke – najdemo triploide, tetraploide, pentaploide, heksaploide, oktaploide in celo dodekaploide (Schmid in sod., 2015). Pri dvoživkah sta prisotna oba sistema za spol – tako sistem ZZ/ZW (heterogametne samice) kot sistem XY/XX (heterogametni samci) (Schmid in sod., 1991). Prav tako močno variira velikost genoma. Majhen genom s 3,55 pg DNA v diploidnem jedru ima *Xenopus tropicalis* (Thiébaud in Fischberg, 1977), veliko večji genom v diploidnem jedru s 165 pg DNA ima blatni kužek (*Necturus maculosus*) (Olmo, 1974; Capriglione in sod., 1987). Raziskave s področja citogenetike so pomembno doprinesla k temu znanju.

Močeril in njegov najbližji sorodnik nekturus (*Necturus maculosus*) imata zelo podoben kariotip z enakim številom kromosomov ($2n = 38$). Nekturus ima heteromorfne spolne kromosome (velik kromosom X in majhen kromosom Y) (Sessions, 1980), in predvidevali smo, da je pri močerilu tudi tako, vendar najnovejša literatura navaja, da so spolni kromosomi močerila drugačni. Raziskava naših raziskovalcev kaže, da pri močerilu spolni kromosomi niso heteromofni, pač pa so pri samcih in samicah identični. Predvideva se, da je prišlo do tranzicije kromosoma Y na kromosom X (Sessions in sod., 2016). V našo raziskavo smo vključili tudi aksolotla (*Ambystoma mexicanum*), ki je modelni organizem, njegovo diploidno število kromosomov je 28 (Callan, 1966).

Za citogenetske analize potrebujemo ustrezni material, kar pomeni, da mora material vsebovati dovolj delečih se celic z vidnimi kromosomi. Pri dvoživkah se lahko dovolj ustreznegra materiala pridobi iz jeter in črevesa, testisov (Venu in Venkatachalaiah, 2013), kostnega mozga (Reynhout in Kimmel, 1969), epitela roženice ali iz tkiv repa (Wasserman in Bogart, 1968; Bogart in Wasserman, 1972). Uporabljali so tudi ličinke dvoživk (Callan, 1966). Za zaustavljanje celičnega cikla v metafazi se uporabi kolhicin, ki se ga vbizga v žival, v primeru vodnih dvoživk se ga lahko doda v vodo. V vseh omenjenih primerih pa gre za destruktivno metodo, kjer je potrebno žrtvovanje živali. Nedestruktivna metoda za pridobitev materiala za citogenetske analize je odvzem krvi in kultivacija limfocitov, ki jo je na dvoživkah prvi preizkusil Seto s sodelavci (1964).

Preizkusili smo nedestruktivno metodo pridobitve materiala za citogenetske analize, najprej na modelnem organizmu *Ambystoma mexicanum*, nato pa še na beli podvrsti močerila (*Proteus a. anguinus*). Za odvzem krvi smo uporabili anestetik MS-222 za vodne vretenčarje (Johnson, 1992; Cecala in sod., 2007; Ross L.G. in Ross B., 2008;

Ramlochansingh in sod., 2014) in iz srčnega ventrikla odvzeli varen volumen odvzema krvi (Heatley in Johnson, 2009). Poseg so vsi osebki uspešno prestali.

5.1 PRIPRAVA PRIMARNE CELIČNE KULTURE KRVNIH CELIC

5.1.1 Vzpostavitev primarne celične kulture

Za gojenje celic dvoživk in za možnost nadaljnjih citogenetskih analiz je potrebno prilaganje številnih parametrov, kot so ozmolarnost, temperatura, koncentracija mitogenov in antimitotikov, dolžina inkubacij. Za celične kulture dvoživk velja, da celice slabo rastejo pod temperaturo 22 °C in da je rast inhibirana pri 37 °C. Sekundarna celična kultura dvoživk se lahko prilagodi na temperaturo 37 °C, če začnemo celice gojiti na temperaturi 26 °C, nato pa z vsako pasažo povišamo temperaturo za 1 °C. V tem primeru se celice prilagodijo na okolje in v njem preživijo, vendar je celičnih delitev zelo malo. Študije kažejo, da je najvišja optimalna temperatura za večino primarnih in sekundarnih celičnih kultur dvoživk 26 °C (Rounds, 1973) in veliko raziskovalcev, ki se z njimi ukvarjajo, jih kultivira na 26 °C (Seto in sod., 1964; Salvadori in Tournefier, 1996; Kasahara, 1998; Zhu in sod., 2002). Uporabljajo se tudi različna komercialna gojišča, ki zahtevajo inkubacijo s 5% CO₂. Za gojenje celic aksolotla in bele podvrste močerila smo imeli na voljo le inkubator, kjer smo celice lahko gojili pri 25 °C in brez CO₂, to je tudi razlog, da smo uporabili gojišče Leibovitz (L-15), ki je bilo razvito tako, da lahko aminokisline in galaktoza uravnavajo fiziološki pH brez potrebe po CO₂ (Leibovitz, 1963).

Delež viabilnih celic v celični kulturi je bil visok, če smo kultivirali polno kri. V tem primeru je bil delež viabilnih celic aksolotlove krvi 98%, pri kultivaciji zgornjega sloja posedane krvi pa je viabilnost močno variirala, saj je znašala od 77,5 do 100%. Viabilnost celic v celični kulturi krvi bele podvrste močerila je bila v obeh primerih nekoliko slabša. Pri kultivaciji zgornjega sloja posedane krvi je znašala od 50 do 100%, kar je bilo med posameznimi poskusi zelo različno. Pri določanju deležev viabilnih celic zgornjega sloja krvi je zaradi nizkih koncentracij celic verjetno prišlo do napake zaradi uporabe hemocitometrične tehnike, ki je zanesljiva pri koncentraciji celic 1×10^6 celic/ml (Freshney, 2010: 339), v našem primeru pa je bila koncentracija celic 10^4 do 10^5 celic/ml.

Gojitev celic pri temperaturi 25 °C je bila uspešna, čeprav je bistveno višja od temperature v jamskem okolju, kar kaže na večjo temperaturno toleranco celic močerila, kot se je doslej predvidevalo. Pri nižji temperaturi gojenja krvnih celic močerila bi lahko dobili drugačne rezultate, kar bi bilo smiselno preveriti.

5.1.2 *In vitro* stimulacija limfocitov z mitogenom

Koncentracije mitogena fitohemaglutinin (PHA-M) močno vplivajo na mitotski indeks. Za zadovoljiv mitotski indeks limfocitov dvoživk so potrebne koncentracije PHA-M od 3% do 6% (vol/vol) (Seto in sod., 1964). Mitotske figure pri celičnih kulturah levkocitov dvoživk lahko zaznamo po 4-ih dneh inkubacije, njihovo število se poveča v naslednjih 3–4 dnevih (Rounds, 1973).

Z BrdU testom proliferacije, ki smo ga izvajali 4. dan gojenja celic, smo ugotovili, da je celičnih delitev največ pri 3% in 6% koncentraciji PHA-M, tako pri aksolotlu kot pri beli podvrsti močerila. V obeh primerih so se pri dveh osebkih od skupno treh, limfociti uspešno delili pri 6% koncentraciji PHA-M. Pri višji koncentraciji PHA-M (9%) smo opazili padec signala pri izmerjeni absorbanci, kar je lahko poslaedica agregacije celic ali pa celične delitve niso bile spodbujene. Da pa višje koncentracije PHA-M neugodno vplivajo na proliferacijo, so na primeru človeških limfocitov iz vranice in periferne krvi ugotovili že Stites in sodelavci (1972). Odziv na PHA-M je najverjetnejše odvisen tudi od posameznega osebka.

Z relativno primerjavo absorbanc med različnimi dnevi smo želeli ugotoviti, kateri dan kultivacije bo celičnih delitev največ. V našem primeru je bilo največ celičnih delitev pri aksolotlu med 4. in 6. dnem, pri beli podvrsti močerila pa med 3. in 4. dnem. Ugotovitev, da je največ celičnih delitev pri aksolotlu med 4. in 6. dnem, se sklada s podatki iz literature (Stites in sod., 1972; Salvadori in Tournefier, 1996), za močerila pa podatkov iz literature ni. Bili smo prvi, ki smo kultivirali kri bele podvrste močerila. Bila je opisana kultivacija krvi na njegovem najbližjem sorodniku blatenem kužku (*Necturus maculosus*), kjer je bilo ugotovljeno, da se delitve pri 3-6% PHA-M in temperaturi 26 °C začnejo v 4-ih dneh, kultivacija od 6 do 8 dni, vključno s tretmajem s kolhicingom, pa je najbolj optimalna. Glede na to, da je velikost genoma pri močerila malo več kot polovico manjša od genoma nektura (C-vrednost za močerila = 48,4 pg vs. 85 pg za nekturusa; Olmo, 1974), niti ni presenetljivo, da je za proliferacijo potreben kraši čas. Vendar pa smo pričakovali, da se bodo limfociti bele podvrste močerila vseeno delili kasneje v primerjavi z limfociti aksolotlov, saj je genom aksolotlov manjši (C vrednost = 30,4 pg; Licht in Lowcock, 1991). Limfociti bele podvrste močerila morda hitreje odreagirajo na PHA-M in sinteza DNA, ki jo v bistvu zaznamo s testom proliferacije z BrdU, poteče hitreje. Poudariti je treba, da so močerili v času izvajanja poskusov prebolevali okužbo, zato bi bilo smiselno poskus ponoviti z več zdravimi osebkami.

Fitohemaglutinin so najprej uporabljali kot molekulo za zlepljanje eritrocitov (Li in Osgood, 1949). Da pride do njihove aglutinacije, smo opazili pri kultivaciji polne krvi obeh obravnnavanih vrst.

5.1.3 Ustavljanje celičnih delitev z antimitotikom in vizualizacija kromosomov

Najbolj pogosto uporabljen antimitotik je kolhicin, uporablja se tudi njegova biosinteza predstopna kolcemid, oba pa inhibirata polimerizacijo mikrotubulov in tako preprečita nastanek delitvenega vretena, zaradi česar se mitoza ustavi v metafazi (Rieder in Palazzo, 1992). Pri celični kulturi krvnih celic aksolotla smo preizkusili kolhicin in kolcemid, saj smo imeli na voljo dovolj krvi (100-500 µl). Pri celični kulturi krvnih celic bele podvrste močerila pa smo zaradi omejene količine krvi (največ do 150 µl) preizkusili samo kolhicin. Zanj smo se odločili, ker so ga uporabljali že Seto in sodelavci (1964) pri kultivaciji krvnih celic nekturusa. V primerjavi s sesalčimi celičnimi kulturami je pri celičnih kulturah dvoživk potrebna kar 3-4 × višja koncentracija kolhicina (Seto in sod., 1964). Preizkusili smo koncentracije antimitotika med 0,4-3 µg/ml za 24 ali 48 ur, najbolj smo bili uspešni pri najvišji koncentraciji, razlike glede na čas inkubacije pa nismo opazili.

Pri celičnih kulturah aksolotlovin krvnih celic smo vizualizirali tri profazna jedra in kromosome, pri beli podvrsti močerila pa le eno metafazno jedro s kromosome. Nismo opazili, da bi določena koncentracija ali čas inkubacije s kolhicinom ali kolcemidom vplivala na uspešnost vizualizacije kromosomov. Možno je, da smo kromosome izgubili med postopkom hipotonije celic in fiksacije, čeprav je to manj verjetno, ker smo celične kulture pregledovali s svetlobnim mikroskopom in fluorescenčnimi barvili, ki se vežejo na DNA. Na ta način bi morebitne celične delitve lahko opazili, pa jih nismo. Odločili smo se, da med postopkom hipotonije in fiksacije celične kulture bele podvrste močerila centrifugiramo na višjih obratih (2200 rpm, prej 1100 rpm). V tem primeru je bila vizualizacija metafaznih kromosomov uspešna.

Poskuse gojenja krvnih celic bi bilo smiselno ponoviti in na ta način preveriti rezultate in metodo, vendar pri poskusih ostajajo iste omejitve, s katerimi smo se srečevali. Največja omejitev pri poskusih je volumen krvi, ki ga lahko pridobimo, kar je poglaviti razlog za omejujočo možnost nastavitev in ponovitve poskusov. Kljub temu bi po našem mnenju bilo gojenje krvnih celic bele podvrste močerila za citogenetske analize vseeno najboljša izbira za nedestruktivno pridobitev materiala za citogenetske analize.

Druga možnost nedestruktivne metode pridobitve materiala, pri kateri ni potrebe po žrtvovanju živali, je gojenje fibroblastov iz koščkov tkiv (angl. explants) repa. Uspešno smo že opravili preliminarne poskuse gojenja repnega tkiva, kjer smo v istih razmerah (temperatura, ozmolarnost) gojili koščke repnega tkiva velikosti 0,5 × 0,5 mm. Iz koščka tkiva so po 16-tih dneh pričele migrirati celice. Najverjetnejše je šlo za epitelne celice, med njimi pa so morda bili tudi fibroblasti. Lahko bi se izkazalo, da je ta metoda boljša v primerjavi z gojenjem krvnih celic in so fibroblasti oz. druge deleče se celice boljši material za citogenetske analize.

5.2 MORFOLOGIJA KRVNIH CELIC

V nalogi smo želeli opisati morfologijo krvnih celic obeh obravnavanih vrst in tako doprinesti k znanju o njuni hematologiji. Za morfološke analize krvnih celic je ključen kvalitetenv krvni razmaz. Pri odvzemu krvi smo uporabili brizgo, ki smo jo predhodno heparinizirali z litijevim heparinom, kot je priporočeno v literaturi (Wright, 2001). Litijev heparin je priporočen antikoagulant pri dvoživkah, ker ima majhen učinek na nivo elektrolitov v plazmi in zato ne povzroča hemolize. Objavljenih je več podatkov, da uporaba EDTA (etilendiamintetraocetna kislina) kot antikoagulanta povzroča lizo eritrocitov pri vsaj nekaterih vrstah dvoživk (Wright, 2001). Za pripravo krvnega razmaza je sicer najbolje, da se antikoagulantu izognemo, vendar je pri tem večja možnost tvorbe krvnih strdkov.

Na krvnih razmazih aksolotla in bele podvrste močerila smo prepoznali eritrocite, eritroblaste (predstopnje eritrocitov), trombocite, izmed levkocitov pa limfocite, monocite, nevtrofilce in eozinofilce. Pri aksolotlu smo uspešno prepoznali tudi bazofilce, medtem ko jih pri beli podvrsti močerila nismo prepoznali.

Morfologija eritrocitov je pri dvoživkah zelo variabilna. Velikost eritrocitov in predvsem njihovega jedra je v v korelacijsi z velikostjo genoma. Repate dvoživke imajo v primerjavi z brezrepici večje in bolj podolgovate eritrocite, njihovo število pa je manjše (Kuramoto, 1981). Malo je znanega glede variacij v morfologiji eritrocitov znotraj posamezne vrste. Raziskava Davis-a (2008) kaže, da je velikost eritrocitov pri vodni repati dvoživki *Ambystoma talpoideum* odvisna od velikosti živali. Osebki z večjo dolžino telesa so imeli krajše in bolj okrogle eritrocite. Za dvoživke je znano, da imajo ličinke večje in podolgovate eritrocite, odrasli osebki pa manjše in okrogle. Med metamorfozo pride do popolne zamenjave morfoloških tipov eritrocitov (Hollyfield, 1966; Benbassat, 1970), kar je povezano s spremembjo eritropoetskega organa. Pri ličinkah so mesto eritropoeze ledvice, pri odraslih osebkih pa vranica (Jordan, 1923; Turner, 1988). Pri obeh obravnavanih vrstah so prevladovali ovalni eritrociti, torej larvalni tip. To se sklada z dejstvom, da so aksolotli in bela podvrsta močerila neotenične dvoživke, pri katerih ne pride do metamorfoze.

Meritve velikosti eritrocitov, pa tudi preostalih krvnih celic, so pomembne predvsem pri standardnih hematoloških raziskavah, primerjavi med vrstami (Atatür in sod., 1999), ugotavljanju prilagoditve na letni čas (Pagés in sod., 1992) in nadmorsko višino, saj imajo osebki z višjih nadmorskih višin manjše eritrocite, da je izmenjava kisika med celicami učinkovitejša (Ruiz in sod., 1983; Ruiz in sod., 1989). Prav tako lahko na podlagi velikosti eritrocitov in njihovega jedra sklepamo o velikosti genoma (Kuramoto, 1981; Gregory, 2001), so pa pomembne tudi pri določanju ploidnosti osebkov (Atatür in sod., 1999).

Večina eritrocitov dvoživk meri od 17 do 70 μm , njihovo jedro pa od 7 do 30 μm (Hartman in Lessler, 1964; Atatür in sod., 1999). Iz literature je znano, da eritrociti aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) v povprečju merijo $44,5 \times 25,4 \mu\text{m}$, njihovo jedro pa

$12,7 \times 8,5 \mu\text{m}$. Povprečna površina eritrocitov znaša $887,7 \mu\text{m}^2$, njihovih jeder pa $84,8 \mu\text{m}^2$ (Gulliver, 1875). Navedene podatke so uporabili v različnih raziskavah v povezavi z evolucijo in velikostjo genoma (Gregory, 2003; Wei in sod., 2015). V naši raziskavi smo izmerili povprečno velikost eritrocitov aksolotla, ki znaša $31,3 \times 22,0 \mu\text{m}$, povprečna velikost jeder pa je $14,5 \times 9,6 \mu\text{m}$. Njihova velikost je variabilna, izmerjene površine eritrocitov znašajo od 316 do $960 \mu\text{m}^2$, jeder pa od 77 do $279 \mu\text{m}^2$. Naši podatki so podobni podatkom iz literature, vendar se deloma od njih tudi razlikujejo. V naši raziskavi smo pregledali krvne razmaze samo treh osebkov, kar je eden od možnih razlogov za odstopanje podatkov, znanih iz literature. V literaturi nismo zasledili podatkov o velikosti eritrocitov brez jedra. Naši podatki kažejo, da ni razlik v velikosti med eritrociti z jedrom in tistimi brez jedra. Povprečna velikost eritrocitov brez jedra znaša $31,7 \times 21,8 \mu\text{m}$, njihova povprečna površina je $559 \mu\text{m}^2$.

Na krvnih razmazih bele podvrste močerila nismo opazili eritrocitov brez jeder. V diplomskem delu (Mrak, 2007) jih avtorica prav tako ni opazila. Jordan (1932) omenja, da je opazil nekaj brezjedrnih eritrocitov na krvnih razmazih močerila, omenja pa, da so produkt amitotske delitve.

Jordan (1932) je naredil obširno raziskavo krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*). Povprečne izmerjene velikosti eritrocitov štirih osebkov (od tega trije odrasli) znašajo $60 \times 35 \mu\text{m}$. Poudarjeno je, da se krvne celice odraslih osebkov ne razlikujejo od celic juvenilnih osebkov. V naši raziskavi smo pri treh odraslih osebkih izmerili povprečno velikost eritrocitov $52,7 \times 28,7 \mu\text{m}$, jeder pa $18,7 \times 13,6 \mu\text{m}$. Velikost eritrocitov je variabilna, njihova površina je znašala od 509 do $1753 \mu\text{m}^2$, jeder pa od 115 do $451 \mu\text{m}^2$. Eritrociti bele podvrste močerila so glede na zbrane podatke Glomski-ja in sodelavcev (1997) eni največjih med dvoživkami, nekoliko večji so le eritrociti predstavnikov rodu *Amphiuma* in *Necturus*. Blatni kužek ali *Necturus maculosus*, ki je najbližji sorodnik močerila, ima v primerjavi z močerilom večji genom (C-vrednost za *Proteus anguinus* = 48,4 pg; C-vrednost za *Necturus maculosus* = 82,5 pg (Olmo, 1974)), in večje eritrocite ($56,4 \times 38,1 \mu\text{m}$; $1119,6 \mu\text{m}^2$), kot tudi jedra eritrocitov ($30,2 \times 17,4 \mu\text{m}$; $273,1 \mu\text{m}^2$) (Hartman in Lessler, 1964). Velikost eritrocitov je namreč pri vseh skupinah vretenčarjev povezana z velikostjo genoma – ne glede na to, ali uporabljamо kot parameter velikosti kratko in dolgo os celice ali njenо površino (Gregory, 2001). Manjši eritrociti so učinkovitejši pri izmenjavi O_2 in CO_2 , prav tako so pri izmenjavi plinov učinkovitejši ovalni eritrociti v primerjavi z okroglimi z isto prostornino (Hartman in Lessler, 1964). Velikost eritrocitov tako povezujejo z metabolno aktivnostjo. Manjše število eritrocitov in hkrati njihova večja površina oz. velikost kažejo na nižji metabolizem. Pokazana je bila negativna korelacija med velikostjo in številom eritrocitov (Smith, 1925; Arikān in sod., 2010).

Pri analizi krvnih razmazov aksolotlov smo ob primerjavi z literaturo in raziskavami krvnih celic drugih dvoživk (npr. Turner, 1988; Hota in sod., 2013; Das in Mahapatra, 2014) ugotovili, da imajo aksolotli različne oblike eritrocitov. Opazili smo okrogle, ovalne, vretenaste eritrocite, eritrocite v obliki solze oz. kaplje in eritrocite z ekscentričnim

(periferno) jedrom. Prav tako smo opazili večje eritrocite, ki so imeli večje jedro in običajno rahlo roza obarvano citoplazmo. Podobne velike eritrocite so opisali Hota in sodelavci (2013) pri žabi vrste *Microhyla ornata*, opisali so tudi veliko variabilnost eritrocitov. Pri paglavcih omenjene vrste opisujejo tudi eritrocite v obliki kaplje, ki so imenovani tudi dakrociti, in predstavlajo kar 5-7% populacije eritrocitov.

Jedro eritrocitov ima velikokrat neraven rob (Campbell, 2015), kar smo na krvnih razmazih aksolotla opazili tudi mi. Nekatera jedra eritrocitov bele podvrste močerila imajo nepravilen, naguban rob, večina pa ima nenaguban rob.

Eritrociti v krvi aksolotla in močerila imajo največji delež citoplazme izmed krvnih celic, ki se na krvnih razmazih homogeno obarva. Turner (1988) je ugotovil, da je citoplazma eritrocitov brezrepnih dvoživk homogena, ultrastruktурno pa je pokazal, da so prisotni le redki celični organeli, medtem ko je citoplazma nezrelih eritrocitov repatih dvoživk nehomogena, ultrastrukturne analize pa kažejo na skupke granul in vakuolarnih teles. Tudi Tooze in Davies (1967) sta pokazala, da imajo zreli eritrociti pupka v citoplazmi le redke ribosome in mitohondrije.

Eritrociti so pričakovano najštevilčnejše celice v krvi. Pri aksolotlih je njihov delež kar 97,42% z majhnimi razlikami med osebki. Pri beli podvrsti močerila je delež eritrocitov manjši, giblje se med 69,31% in 93,07%. Med osebki so večje razlike v deležu eritrocitov zaradi različnega deleža levkocitov v krvi. Delež eritrocitov brez jedra pri aksolotlu znaša 0,12%, pri beli podvrsti močerila pa jih nismo zasledili.

Med kultivacijo krvnih celic smo opazili, da ima del eritroidnih celic (gre za eritrocite ali eritroblaste, ne moremo pa zagotovo določiti tipa celice) v celični kulturi drugačno obliko, kar smo opazili tako pri beli podvrsti močerila, kakor tudi pri aksolotlu. Eritroidne celice na enem ali dveh koncih dobijo izrastke različnih dolžin in oblik, na njih so lahko tudi zadebelitve. Izrastke smo opazili tudi takrat, ko smo celični kulturi dodali kolhicin. Take celice deloma spominjajo na fibroblaste, spominjajo pa tudi na membranske nanocevke (Rustom in sod., 2004; Davis in Sowinski, 2008; Lokar in sod., 2010), ki so pomembne pri medcelični komunikaciji, predvsem imunskih celic. Nanocevke so običajno tanki in dolgi izrastki, v našem primeru so pa izrastki debelejši.

Repati dvoživki, z izjemo predstavnikov družine brezpljučih močeradov (Plethodontidae), nimajo kostnega mozga, kjer bi dozorevali eritrociti, zato njihove predstopnje najdemo kar v krvnem obtoku (Turner, 1988). Poimenovanja predstopenj eritrocitov so različna, prav tako jih je med seboj morfološko težko ločiti, zato smo v naši raziskave za vse predstopnje eritrocitov uporabili skupen izraz eritroblasti. Tooze in Davis (1967) sta pri pupku *Triturus cristatus* opisala eritropoetske celice – bazofilne in polikromatske eritroblaste, naša opažanja se večinoma ujemajo z njunimi rezultati. Bazofilni eritroblasti imajo veliko ribosomov in veliko jedro, ki je pri beli podvrsti močerila večinoma ovalno, pri aksolotlu pa okroglo. Za polikromatofilne eritroblaste je značilno, da se delež citoplazme poveča, saj

se jedro močneje kondenzira. Z zorenjem se število ribosomov zmanjšuje, količina hemoglobina se povečuje.

Površina eritroblastov je variabilna pri obeh obravnavanih vrstah, kar je verjetno posledica različnih razvojnih stopenj celice (Jordan, 1932). Pri aksolotlu njihova površina znaša od 288 do 1111 μm^2 , pri beli podvrsti močerila pa od 186 do 1300 μm^2 . Variabilna je tudi površina njihovih jeder in s tem delež citoplazme, kar je zopet povezano z razvojno stopnjo celice.

Ugotovili smo, da imajo aksolotli v povprečju 0,29% eritroblastov v krvi, bela podvrsta močerila pa mnogo več in sicer v povprečju kar 8,16%. Povišan delež nezrelih eritrocitov oz. njihovih prekurzorjev kaže na povišano eritropoezo, kar je posledica anemije in je del kompenzacijске regeneracije. Vzroki za anemijo so številni, recimo hemoragije ali hemolize, vnetni procesi, hormonske nepravilnosti ali novotvorbe (Allender in Fry, 2008). Kaj je vzrok velikemu deležu eritroblastov pri beli podvrsti močerila ne moremo vedeti, možno je celo, da je to normalno stanje, nanje je lahko vplivala tudi okužba, ki so jo osebki prebolevali. Osebek Paa186 (delež eritroblastov je največji, kar 10,49%) je živel v izviru reke Krupe, ki je znano območje velike onesnaženosti s PCB-ji, in bi zato lahko šlo za vpliv PCB-ja, za katerega je znano, da se kopiči v tkivih močerilov (Pezdirc in sod., 2011). Prav tako je znano, da kemična onesnažila v vodi vplivajo na povišan delež nezrelih eritrocitov pri vrsti *Rana esculenta* (Barni in sod., 2007). Morebiten vpliv PCB-ja na visok delež eritroblastov v krvi in morebiten vpliv na druge krvne celice bi lahko raziskali in sicer tako, da bi preverili deleže krvnih celic drugih osebkov močerila iz istega območja.

Trombociti dvoživk so celice z jedri in so večinoma podolgovati, lahko pa tudi okrogli. Kadar se nahajajo v skupini kot strtek se njihova oblika prilagodi sosednjim celicam. Okrogli trombociti imajo okroglo jedro, njihova citoplazma je bolj bazofilna in najverjetneje gre za nezrele trombocite, ki so na krvnih razmazih redko opaženi (Allender in Fry, 2008). Pri obeh obravnavanih vrstah so trombociti najmanjše celice, saj v povprečju merijo le 165 μm^2 pri aksolotlu in 220 μm^2 pri beli podvrsti močerila. Njihovo jedro je močno kondenzirano, na kar kaže tudi podatek, da imajo njihova jedra najmanjšo površino med krvnimi celicami. Okrog jedra imajo malo citoplazme, njen delež v povprečju znaša le 25,5% pri aksolotlu in nekoliko manj, to je 19,9%, pri beli podvrsti močerila.

Deleži trombocitov na krvnih razmazih so lahko nezanesljivi in ne predstavljajo dejanskega stanja zaradi njihove tendence k združevanju in posledično neenake razporeditve po preparatu (Wright, 2001; Arikan in sod., 2010). To bi lahko bil vzrok za velika odstopanja med deleži trombocitov pri beli podvrsti močerila, kjer deleži znašajo od 0,37 do 6,24%. Pri aksolotlu se deleži trombocitov med seboj bistveno ne razlikujejo, v povprečju njihov delež znaša 0,49%.

V krvi dvoživk in drugih vretenčarjev so prisotni majhni in veliki limfociti (Campbell, 2015), kar smo pri obeh obravnavanih vrstah opazili tudi mi. Majhne limfocite lahko hitro zamenjamo s trombociti, nekateri avtorji pa navajajo, da je včasih težko ločiti med velikimi

limfociti in monociti (Allender in Fry, 2008), vendar mi tega problema, še posebej pri beli podvrsti močerila, nismo zaznali. Pri zdravih živalih je večina limfocitov majhnih, na stimulacijo z antigenom se pa odzivajo »reakтивni« limfociti, ki imajo več citoplazme in manj kondenziran kromatin (Allender in Fry, 2008). Po velikosti so med manjšimi krvnimi celicami, njihova velikost in velikost njihovega jedra sta variabilni, kar še posebej velja za limfocite bele podvrste močerila, kjer površina limfocitov znaša od 197 do $719 \mu\text{m}^2$. Za limfocite je značilno, da imajo zelo malo citoplazme (Wright, 2001; Davis in Durso, 2009; Barriga-Vallejo in sod., 2015), kar se sklada z našimi meritvami. Delež citoplazme limfocitov je zelo podoben deležu citoplazme trombocitov in pri aksolotlu v povprečju znaša 25,3%, pri beli podvrsti močerila pa le nekoliko manj, to je 24,2%. Trombociti in limfociti pri obeh obravnavanih vrstah so krvne celice z najmanjšim deležem citoplazme.

Limfociti so pri nekaterih dvoživkah najpogosteji izmed levkocitov (Arikan in sod., 2010). Ob okužbi z *Ranavirus*-om se namnožijo limfociti T s ko-receptorji CD8 (Morales in Robert, 2007). Delež limfocitov pa je ob določenih okužbah, recimo glivnih, lahko tudi zmanjšan (Peterson in sod., 2013). Kontaminacija krvnega vzorca z limfo vodi v napačno interpretacijo povečanega števila limfocitov (Allender in Fry, 2008), zato moramo biti previdni pri interpretaciji diferencialnih deležev. Ussing in Rosenkiled (1995) sta ugotovila, da je diferencialni delež limfocitov neoteničnih aksolotlov (*Ambystoma mexicanum*) 20%, po s tiroksinom inducirani metamorfozi pa 26%. Wright (2001) navaja, da je diferencialni delež limfocitov odraslih osebkov aksolotla 63%, kar se popolnoma sklada z našimi ugotovitvami. Pri beli podvrsti močerila je diferencialni delež limfocitov večji in znaša 79%.

Monociti dvoživk imajo okroglo, ledvičasto ali podkvasto oblikovano jedro. Pri dvoživkah je v krvi možno zaslediti tudi monocite s fagocitiranimi bakterijami in drugim materialom (Wright, 2001). V naši raziskavi smo pri obeh obravnavanih vrstah opazili monocite z okroglim jedrom, pri manjšem deležu tudi z rahlo vbočenim. Monociti imajo večji delež citoplazme od limfocitov (Claver in Quaglia, 2009), kar se je pokazalo tudi v naši raziskavi, vendar so razlike v deležu citoplazme majhne.

Delež monocitov je pri dvoživkah povišan ob kroničnih in glivnih okužbah. Njihov delež v krvi je majhen, včasih celo 0% (podatek za *Ambystoma mexicanum*) (Wright, 2001). V naši raziskavi smo pri aksolotlu ugotovili, da je diferencialni delež monocitov res majhen in znaša 1,84%, pri beli podvrsti močerila pa nekoliko več, to je 2,78%. Pri aksolotlu so monociti najmanj pogoste krvne celice.

Opazili smo, da je morfologija jader nevtrofilcev zelo variabilna, kar opisujejo številni raziskovalci (Allender in Fry, 2008). Pri nekaterih vrstah se v citoplazmi nevtrofilcev nahajajo majhne eozinofilne granule, nekatere vrste pa imajo celo velike in nepravilne granule. Nevtrofilce s temi granulami raziskovalci poimenujejo heterofilci (Campbell, 2015), vendar v naši raziskavi granul v citoplazmi nevtrofilcev nismo opazili. Jedro je segmentirano. Povečano segmentiranost jedra so opazili med hibernacijo žab, kar je najverjetnejše posledica staranja celic (Claver in Quaglia, 2009). Delež citoplazme je pri

nevtrofilcih variabilen, saj sta močno variabilna tako velikost celice, kakor tudi velikost jedra.

Delež nevtrofilcev je povišan ob bakterijskih (Wright, 2001) in glivnih okužbah (Peterson in sod., 2013), saj so prve fagocitozne celice, ki s proliferacijo odgovorijo na okužbe, vnetja in stres (Davis in sod., 2008). Diferencialni delež nevtrofilcev pri vrsti *Ambystoma mexicanum* je 22% (Ussing in Rosenkilde, 1995; Wright, 2001) in glede na te podatke je diferencialni delež nevtrofilcev v naši raziskavi nižji, saj znaša 13,68%. Pri beli podvrsti močerila je delež nevtrofilcev znašal 17,2%.

Bazofilci aksolotlov imajo v citoplazmi okrogle ali ovalne bazofilne granule (Wright, 2001), ki smo jih opazili v bazofilcih aksolotlov. Večina bazofilcev je imela dvolobularno jedro, opazili smo tudi bazofilce s štirilobularnim jedrom. Bazofilci so med levkociti med večjimi celicami s povprečjem površine $544 \mu\text{m}^2$. Jedro je veliko in zavzema več kot polovico celice. Na pregledanih krvnih razmazih bele podvrste močerila nismo zasledili ali prepoznali nobenega bazofilca. Na krvnih razmazih bele podvrste močerila jih je Mrakova (2007) prepoznala in opisala. Nismo prepričani, da so opisane celice res bazofilci, zato jih mi nismo opisali. Bazofilce bi bilo treba identificirati na druge načine (protitelesa, specifična encimska reakcija).

Bazofilci so lahko pri določenih vrstah dvoživk, recimo žabi kremljičarki (*Xenopus laevis*), najpogostejši izmed levkocitov (Hadji-Azimi in sod., 1987), pri drugih vrstah pa lahko predstavljajo zelo majhen delež (Claver in Quaglia, 2009). Povezani so z vnetnimi procesi (Campbell, 2015). Pri neoteničnih aksolotlih je diferencialni delež bazofilcev 4,9%, po metamorfozi pa le 0,1% (Ussing in Rosenkiled, 1995). V naši raziskavi je bil diferencialni delež bazofilcev v krvi aksolotla 3,95%, kar se sklada s podatki iz literature.

Jedra eozinofilcev dvoživk imajo običajno manj lobulov od jeder nevtrofilcev. V citoplazmi eozinofilcev smo opazili okrogle eozinofilne granule, kar se sklada z opažanji drugih raziskovalcev (Wright, 2001; Allender in Fry, 2008). Glede na velikost so eozinofilci pri beli podvrsti močerila variabilne celice, saj je njihova površina znašala od 299 do $1015 \mu\text{m}^2$. Jedro eozinofilcev je veliko in predstavlja več kot polovico celice. Eozinofilci naj bi bili enako veliki kakor nevtrofilci (Wright, 2001), vendar so na naših preparatih eozinofilci v povprečju manjši od nevtrofilcev.

Delež eozinofilcev v krvi se poveča ob okužbah s paraziti (Wright, 2001). Za rod *Ambystoma* je znano, da imajo v primerjavi z drugimi dvoživkami visok delež eozinofilcev, saj imajo v povprečju 32,1% eozinofilcev, druge repate dvoživke imajo povprečno 4,7% eozinofilcev, brezrepici pa 7,0% (Davis in Durso, 2009). Ussing in Rosenkiled (1995) sta ugotovila, da je delež eozinofilcev pri neoteničnih aksolotlih kar 52%, po metamorfozi se pa njihov delež zmanjša na 6,1%. Wright (2001) navaja, da je diferencialni delež eozinofilcev aksolotla 15%, kar je zelo blizu našim meritvam, kjer je diferencialni delež eozinofilcev znašal 17,63%. Bela podvrsta močerila ima v skladu z našimi pričakovanji manjši diferencialni delež eozinofilcev (2,78%).

Ob pregledovanju in analiziranju krvnih razmazov se zmeraj zastavlja vprašanje, ali gledamo dejansko stanje ali je prišlo do artefaktov. Možni artefakti, ki se pojavljajo na krvnih razmazih so mehanske poškodbe celic, luknjast izgled jedra, lobulacija, vakuolizacija, brstenje, agregacija celic.

Možen vzrok nastanka artefaktov je tudi uporaba antikoagulantov EDTA in natrijevega citrata (Wright, 2001). Na človeški krvi so ugotovili, da uporaba omenjenih antikoagulantov lahko vodi v morfološke spremembe krvnih celic, kot so lobulacija, vakuolizacija in degeneracija jeder, vakuolizacija in granulacija ali degranulacija citoplazme, povečanje velikosti levkocitov in nepravilna obarvanost celic. Obsežnost morfoloških sprememb je odvisna od tega, koliko časa je preteklo od odvzema krvi, torej stika z antikoagulantom, do priprave krvnega razmaza, zato je priporočena priprava krvnega razmaza takoj po odvzemuh krvi (Narasimha in sod., 2008). Za litijev heparin je znano, da poveča aggregacijo človeških trombocitov (Lombarts in de Kieviet, 1988), vendar je litijev heparin najboljša izbira antikoagulanta za dvoživke (Wright, 2001). O vplivu antikoagulantov na spremembe morfologije krvnih celic dvoživk nismo našli podatkov.

Dvoživke so izredno občutljive na onesnaževala v okolju in ravno na krvnih razmazih se lahko opazi njihov vpliv, saj lahko kri in krvne celice obravnavamo kot občutljiv indikator onesnaženja v vodnih okoljih (Barni in sod., 2007). Raziskava Barni-ja in sodelavcev (2007) na vrsti *Rana esculenta* je pokazala, da kronična izpostavljenost populacije s kemikalijami onesnaženemu okolju vpliva predvsem na povišan delež eozinofilcev in nezrelih eritrocitov ter na morfologijo eritrocitov. Povečane so mitotske delitve eritrocitov, pojavljajo se dvojedri eritrociti, eritrociti brez jedra, opažen je pojav mikrojeder. Prav tako prisotnost pesticidov v okolju negativno vpliva na zmožnost proliferacije limfocitov (Christin in sod., 2003). Raziskava Rohr-a in sodelavcev (2008) na vrstah *Rana palustris* in *R. clamitans* pa je pokazala, da je ob prisotnosti atrazina v vodi zmanjšan delež eozinofilcev v jetrih paglavcev. Onesnaževala, med njimi so pomembni tudi pesticidi, lahko torej oslabijo imunski sistem osebka in ga tako naredijo potencialno bolj dovetnega za okužbo s paraziti (Shutler in Marcogliese, 2011).

Poznavanje levkocitov in njihovih normalnih deležev v populaciji je pomembno, saj nam diferencialni deleži levkocitov lahko podajo oceno o imunskega statusu in zdravju določene populacije. Take raziskave so že uporabili za oceno zdravja populacije vrste *Ambystoma rivulare* iz Mehike (Barriga-Vallejo in sod., 2015), pa tudi na drugih vrstah dvoživk (Shutler in Marcogliese, 2011). Za ocenjevanje stresa vretenčarjev, med njimi tudi dvoživk, je uporabno razmerje med nevtrofilci in limfociti (razmerje N/L). Gre namreč za fiziološki učinek zvišane ravni stresnih hormonov na določene tipe levkocitov. Povišanje stresnih hormonov namreč poveča delež nevtrofilcev v krvi, hkrati pa zmanjša delež limfocitov, kar vodi v povišanje razmerja N/L (Gross in Siegel, 1983; Davis in Maerz, 2008, 2009, 2010, 2011; Barriga-Vallejo in sod., 2015). Iz raziskav krvnih celic dvoživk je znano, da ima večina populacij, ki ni pod stresom, razmerje N/L okoli 0,30. Ko so osebki podvrženi stresu, se razmerje N/L poveča za faktor 3, tako da imajo osebki, ki so pod stresom, razmerje N/L okoli 1 (Davis in Maerz, 2011; Barriga-Vallejo in sod., 2015). V

naši raziskavi smo ugotovili, da imata obe obravnavani vrsti majhno razmerje N/L (aksolotl 0,22, bela podvrsta močerila 0,20), kar kaže na to, da obravnavani osebki v laboratoriju niso bili izpostavljeni stresu.

Spremljanje zdravstvenega stanja populacij dvoživk, kamor sodi tudi močeril, je pomembno, saj se globalno gledano njihove populacijo zmanjšujejo zaradi bolezni in slabšanja stanja njihovih življenjskih prostorov, kar je predvsem posledica človekovega delovanja. Monitoring populacij in nepravilnosti v njihovem imunskejem sistemu, torej v levkocitih, nam lahko služi kot zgodnje opozorilo, da je populacija pod stresom in da moramo ukrepati. (Barriga-Vallejo in sod., 2015). Za ugotavljanje tovrstnih nepravilnosti moramo dobro poznati značilnosti zdrave populacije.

6 SKLEPI

Uspešno smo vzpostavili primarno celično kulturo aksolotlovih (*Ambystoma mexicanum*) krvnih celic in krvnih celic bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*).

Za neotenične dvoživke je potrebna bistveno višja koncentracija PHA-M, kot se uporablja v humani citogenetiki. Z BrdU testom proliferacije smo ugotovili, da je pri obeh obravnavanih vrstah dvoživk ustrezna koncentracija mitogena PHA-M od 3 do 6% (vol/vol), čeprav je višja koncentracija (6%) optimalnejša.

Potrebne so tudi višje koncentracije antimitotikov in daljša izpostavitev v primerjavi s humano citogenetiko. Za uspešno vizualizacijo kromosomov je treba dodati kolhicin oz. kolcemid celični kulturi med 3. in 6. dnem kultivacije za 24 ali 48 ur v koncentraciji 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Krvne celice oz. limfociti neoteničnih dvoživk so ustrezni model za pridobitev materiala za citogenetske in druge študije z varno metodo, ki ne zahteva žrtvovanja živali. Metodo gojenja krvnih celic obeh vrst neoteničnih dvoživk smo uspeli optimizirati do te mere, da smo vizualizirali vsaj nekaj jeder s kromosomi. Potrebna je nadaljna optimizacija, da bi bile celične delitve pogostejše in s tem vizualizacija kromosomov optimalnejša.

Gojitev celic je uspešno potekala pri temperaturi 25 °C, ki je bistveno višja od temperature v jamskem okolju, kar kaže na večjo temperaturno toleranco celic in tkiv močerila, kot se je doslej predvidevalo.

V krvi močerila in aksolotla so razen eritrocitov, zastopani še eritroblasti, kar kaže na to, da dozorevanje eritrocitov poteka v krvi, saj nimajo kostnega mozga. Njihov delež je pri močerilu višji. Vse krvne celice, razen manjšega dela eritrocitov pri aksolotlu, imajo jedro, prav tako izkazujejo določeno stopnjo variabilnosti v morfologiji (velikost in oblika celice in jedra).

Diferencialna bela krvna slika kaže, da imajo aksolotli visok delež limfocitov in eozinofilcev, najmanj pa bazofilcev in monocitov. Pri beli podvrsti močerila prevladujejo limfociti in nevtrofilci, malo je eozinofilcev in monocitov, bazofilcev pa ni ali pa jih je težavno prepoznati. Razmerje med nevtrofilci in limfociti je nizko, kar kaže na to, da živali niso bile izpostavljeni stresu.

7 POVZETEK

V naši raziskavi smo preizkusili nedestruktivno metodo kultivacije primarne celične kulture krvnih celic dveh neoteničnih dvoživk in metodo delno optimizirali tako, da je material ustrezен za nadaljnje citogenetske in druge (genetske, biokemijske, fiziološke, toksikološke) študije brez poseganja v naravne populacije, kar je še posebej pomembno za močerila, saj je ranljiva in potencialno ogrožena vrsta. Prav tako smo opisali morfologijo in deleže krvnih celic dveh neoteničnih dvoživk – bele podvrste močerila (*Proteus a. anguinus*) in aksolotla (*Ambystoma mexicanum*), ki je vretenčarski modelni organizem. S tem smo želeli nadgraditi znanje o morfologiji in variabilnosti krvnih celic omenjenih vrst.

Poznavanje morfologije in deležev krvnih celic je pomembno, saj nam to znanje lahko koristi pri oceni zdravstvenega stanja posameznega osebka ali populacije. Veliko osnovnih hematoloških parametrov, ki se uporablajo pri sesalcih, je pomembnih tudi pri dvoživkah in drugih vretenčarjih. Hematološki parametri so pri veliko vrstah dvoživk slabo raziskani ali celo popolnoma neznani, kar otežuje interpretacijo rezultatov. Morfologijo krvnih celic smo opisali iz krvnih razmazov, ki smo jih pripravili sami ali so bili del arhiva laboratorija. Izmerili smo dolgo in kratko os celice in jedra, njuno površino in izračunali razmerje med kratko in dolgo osjo. Iz izmerjenih površin smo izračunali delež citoplazme. Na krvnih razmazih smo prešteli posamezne tipe krvnih celic in izračunali njihove deleže. Najštevilčnejše celice pri obeh vrstah so eritrociti. Razen eritrocitov so prisotne še njihove razvojne stopnje, imenovane eritroblasti, katerih delež je bil višji v krvi močerilov (0,29% pri aksolotlu, 8,16% pri močerilu). Dozorevanje eritrocitov poteka v krvi. Izmed levkocitov so pri obeh vrstah najpogosteji limfociti. Aksolothi imajo visok delež eozinofilcev (17,63%) kar je značilno za njihov rod. Pri beli podvrsti močerila nismo uspeli prepoznati bazofilcev. Ugotovili smo, da pri obeh vrstah obstaja določena stopnja variabilnosti v morfologiji celice in jedra pri posameznem tipu krvnih celic. Preverili smo še, kakšno je razmerje med nevtrofilci in limfociti (razmerje N/L), ki je pokazatelj stresa pri vretenčarjih, in ugotovili, da so imeli obravnavani osebki nizko razmerje (0,22 pri aksolotlu in 0,20 pri močerilu), kar pomeni, da niso bili izpostavljeni stresu. Pri pregledovanju in analizi krvnih razmazov je potrebna previdnost, da dejansko gledamo realno stanje celic in ne artefaktov. Do teh lahko pride pri pripravi ali barvanju krvnega razmaza.

Cilj klasične citogenetike je priprava kariotipa organizma. Pripravi se preparate s kromosomi, ki se jih proga, nato pa se analizira število kromosomov in vzorce proganja. Za pripravo kariotipa organizma je treba pregledati več celic z metafaznimi kromosomi. V humani citogenetiki se za tovrstne analize uporabijo limfociti iz krvi. Da pa lahko kromosome sploh vizualiziramo, je potrebno limfocite spodbuditi k delitvam z mitogenom PHA-M, nato pa celične delitve ob pravem času ustaviti z antimitotikom (uporablja se kolhicin ali kolcemid, slednji je manj citotoksičen) in na ustrezni način vizualizirati kromosome. Z BrdU testom proliferacije smo ugotovili, da je najbolj optimalna koncentracija PHA-M (vol/vol) pri beli podvrsti močerila in aksolotlu 6%, čeprav smo proliferacijo zasledili tudi že pri 3% koncentraciji. Za zaustavitev celičnega cikla v

metafazi smo uporabili 3-4 × višje koncentracije antimitotika (0,4–3 µg/ml), kot se uporablajo v humani citogenetiki, in bili uspešni pri vizualizaciji kromosomov, ko smo celični kulturi dodali antimitotik med 3. in 6. dnem kultivacije za 24 ali 48 ur. Z metafaznimi kromosomi smo bili uspešnejši pri beli podvrsti močerila, medtem ko smo pri aksolotlu zasledili predvsem profazna in prometafazna jedra.

Med kultivacijo krvnih celic smo opazili, da ima del eritroidnih celic spremenjeno obliko tako, da imajo dolge izrastke na enem ali dveh koncih celice, izrastki lahko imajo tudi zadebelitve. V tej smeri bi bile potrebne natančnejše raziskave.

Metodo gojenja krvnih celic neoteničnih dvoživk smo uspeli optimizirati do te mere, da smo vizualizirali vsaj nekaj jeder s kromosomi. Krvne celice neoteničnih dvoživk oz. limfociti so torej ustrezni model za pridobitev materiala za citogenetske študije. Potrebna je še nadaljnja optimizacija, da bi bile celične delitve pogostejše in s tem vizualizacija kromosomov optimalnejša. Predlagamo tudi, da se optimizira metodo gojenja fibroblastov iz majhnega koščka repnega tkiva, ki smo jo že testirali in bi lahko bila alternativa kultivaciji limfocitov za pridobitev materiala za citogenetske in druge študije na nedestruktiven način.

Presenetljiv je tudi rezultat, da je gojitev celic uspešno potekala pri temperaturi 25 °C, ki je bistveno višja od temperature v jamskem okolju. To je zanimivo, saj naši rezultati potrjujejo večjo temperaturno toleranco celic in tkiv močerila, kot se je doslej predvidevalo.

8 VIRI

Allender M.C., Fry M.M. 2008. Amphibian hematology. Veterinary clinics of North America exotic animal practice, 11: 463–480

Arikan H., Alpagut-Keskin N., Çevik E., Erişmiş U.C. 2010. A study on the blood cells of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. (Anura: Bombinatoridae). Animal biology, 60: 61–68

Arikan H., Çiçek K. 2014. Haematology of amphibians and reptiles: a review. North-western journal of zoology, 10, 1: 190–209

Atatür M.K., Arikan H., Çevik I.E. 1999. Erythrocyte sizes of some anurans from Turkey. Turkish journal of zoology, 23, 2: 111–114

Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M., Fenoglio C. 2007. Evaluation of *Rana* snk *esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. Aquatic toxicology, 81: 45–54

Barriga-Vallejo C., Hernández-Gallegos O., Hunt von Herbing I., López-Moreno A.E., de Lourdes Ruiz-Gómez M., Granados-Gonzalez G., Garduño-Paz M.V., Méndez-Sánchez J.F., Banda-Leal J., Davis A.K. 2015. Assessing population health of the Toluca Axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from Mexico, using leukocyte profiles. Herpetological conservation and biology, 10, 2: 592–601.

Bates S.E. 2011. Classical cytogenetics: karyotyping techniques. Methods in molecular biology, 767: 177–190

Benbassat J. 1970. Erythroid cell development during natural amphibian metamorphosis. Developmental biology, 21: 557–583

Bizjak Mali L., Bulog B. 2011. Follicular ovarian atresia in the olm (*Proteus anguinus anguinus*). V: Societa Italiana Scienze Microscopiche, Proceedings of 10th Multinational Congress on Microscopy, Urbino, September 4–9, 2011: 295–296

Bizjak Mali L., Bulog B. 2015. The morphology of male gonads of the neotenic salamander (*Proteus anguinus*). FASEB Journal, 29: 1–10

Bogart J.P., Wasserman A.O. 1972. Diploid-polyploid cryptic species pairs: a possible clue to evolution by polyploidization in anuran amphibians. Cytogenetics, 11: 7–24

Bogart J.P. 1991. The influence of life history on karyotypic evolution in frogs. V: Amphibian cytogenetics and evolution. Green D.M., Sessions S.K. (eds.). San Diego, Academic Press: 233–258

- Boutilier R.G., Stiffler D.F., Toews D.P. 1992. Exchange of respiratory gases, ions, and water in amphibious and aquatic amphibians. V: Environmental physiology of amphibians. Feder M.E., Burggren W.W. (eds.). Chicago, University of Chicago Press: 81–124
- Callan H.G. 1966. Chromosomes and nucleoli of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Journal of cell science, 1,1: 85–108
- Campbell T.W. 2007. Hematology of amphibians. V: Avian and exotic animal hematology and cytology. Campbell T.W., Ellis C.K. (eds). Iowa, Blackwell: 83–93
- Campbell T.W. 2015. Peripheral blood of amphibians. V: Exotic animal hematology and cytology. Campbell T.W. (ed.). New York, John Wiley & Sons Inc: 89–94
- Canfield P.J. 2006. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. Australian veterinary journal, 76, 12: 793–800
- Capriglione T., Olmo E., Odierna B., Improta B., Morescalchi A. 1987. Cytoflurometric DNA base determination in vertebrate species with different genome sizes. Basic and Applied Histochemistry, 31: 119–126
- Cavanagh B.L., Walker T., Norazit A., Meedeniya A.C.B. 2011. Thymidine analogues of tracking DNA synthesis. Molecules, 16: 7980–7993
- Cattan A., Ayali A., Barnea A. 2015. The cell birth marker BrdU does not affect recruitment of subsequent cell divisions in the adult avian brain. BioMed research international, 2015: 1–11
- Cecala K.K., Price S.J., Dorcas M.E. 2007. A comparison of the effectiveness of recommended doses of MS-222 (tricaine methanesulfonate) and Orajel® (benzocaine) for amphibian anesthesia. Herpetological review, 38, 1: 63–66
- Christin M.S., Gendron A.D., Brousseau P., Ménard L., Marcogliese D.J., Cry D., Ruby S., Fournier M. 2003. Environmental toxicology and chemistry, 22, 5: 1127–1133
- Claver J.A., Quaglia A.I.E. 2009. Comparative morphology, development and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. Journal of exotic pet medicine, 18, 2: 87–97
- Cohen W.D. 1982. The cytomorphic system of anucleate non-mammalian erythrocytes. Protoplasma, 113: 23–32
- Curtis S.K., Cowden R.R., Nagel J.W. 1979. Ultrastructure of the bone marrow of the salamander *Plethodon glutinosus* (Caudata: Plethodontidae). Journal of morphology, 159, 2: 151–183

Das M., Mahapatra P.K. 2014. Hematology of wild caught Dubois's tree frog *Polypedates teraiensis*, Dubois, 1986 (Anura: Rhacophoridae). The scientific world journal, 2014: 1–7

Davis A.K., Maerz J.C. 2008. Comparison of hematological stress indicators in recently captured and captive paedomorphic mole salamanders, *Ambystoma talpoideum*. Copeia, 3: 613–617

Davis A.K., Durso A.M. 2009. White blood cell differentials of Northern cricket frogs (*Acris c. crepitans*) with a compilation of published values from other amphibians. Herpetologica, 65, 3: 260–267

Davis A.K., Maerz J.C. 2009. Effects of larval density on hematological stress indices in salamanders. Journal of experimental zoology 311A: 697–704

Davis A.K., Maerz J.C. 2010. Effects of exogenous corticosterone on circulating leukocytes of a salamander (*Ambystoma talpoideum*) with unusually abundant eosinophils. International journal of zoology, 2010: 1–8

Davis A.K., Maerz J.C. 2011. Assessing stress levels of captive-reared amphibians with hematological data: implications for conservation initiatives. Journal of herpetology, 45: 40–44

Davis A.K., Maney D.L., Maerz J.C. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional ecology, 22: 760–772

Davis M., Sowinski S. 2008. Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. Nature reviews, 9: 431–436

Fellers G.M., Drost C.A., Heyer W.R. 1994. Appendix 1: Handling live amphibians. V: Measuring and monitoring biological diversity: Standard methods for amphibians. Heyer W.R., Donnelly M.A., McDiarmid R.W., Hayek L.C., Foster M.S. (eds.). Washington, Smithsonian books: 275–276

Freed J.J., Mezger-Freed L. 1970. Culture methods for anuran cells. V: Methods in cell physiology. Prescott D.M. (ed.). New York, Academic press Inc.: 18–47

Freshney I. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. Hoboken, Wiley-Blackwell: 732 str.

Garrison S. 1949. Cell size in amphiuma. Bios, 20, 4: 237–243

Glomski C.A., Tamburlin J., Hard R., Chainani M. 1997. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. Histology and histopathology, 12: 147–170

- Goodpasture C., Bloom S.E. 1975. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, 53: 37–50
- Green D.E. 2001. Pathology of amphibia. V: *Amphibian medicine and captive husbandry*. Wright K., Whitaker B. (eds.). Malabar, Krieger publishing company: 401–438
- Gregory T.R. 2001. The bigger the C-value, the larger the cell: genome size and red blood cell size in vertebrates. *Blood cells, molecules and diseases*, 27, 5: 830–843
- Gregory T.R. 2003. Variation across amphibian species in the size of the nuclear genome supports a pluralistic, hierarchical approach to the C-value enigma. *Biological journal of the Linnean society*, 79: 329–339
- Griffin C.S., Scott D., Papworth D.G. 1970. The influence of DNA content and nuclear volume on the frequency of radiation-induced chromosome abberations in *Bufo* species. *Chromosoma*, 30, 2: 228–249
- Gross W.B., Siegel H.S. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian diseases*, 27, 4: 972–979
- Gulliver G. 1875. Observations on the sizes and shapes of the red corpuscles of the blood of vertebrates, with drawings of them to a uniform scale, and extended and revised tables of measurements. *Proceedings of the Zoological society of London*, 31: 474–495
- Hadji-Azimi I., Coosemans V., Canicatti C. 1987. Atlas of adult *Xenopus laevis laevis* hematology. *Developmental and comparative immunology*, 11: 807–874
- Hamelryck T.W., Dao-Thi M.H., Poortmans F., Chrispeels M.J., Wyns L., Loris R. 1996. The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *The journal of biological chemistry*, 271, 34: 20479–20485
- Hartman F.A., Lessler M.A. 1964. Erythrocyte measurements in fishes, amphibia, and reptiles. *Biological bulletin*, 126, 1: 83–88
- Harvey J.W. 2001. *Atlas of veterinary hematology: bone and marrow of domestic animals*. Philadelphia, W.B. Saunders: 228 str.
- Heatley J.J., Johnson M. 2009. Clinical technique: Amphibian hematology: A practitioner's guide. *Journal of exotic pet medicine*, 18, 1: 14–19
- Hollyfield J.G. 1966. Erythrocyte replacement at metamorphosis in the frog, *Rana pipiens*. *Journal of morphology*, 119, 1: 1–5

Hota J., Das M., Mahapatra P.K. 2013. Blood cell profile of the developing tadpoles and adults of the ornate frog, *Microhyla ornata* (Anura: Microhylidae). International journal of zoology, 2013: 1–14

Johnson H.J. 1992. Anaesthesia, analgesia and euthanasia in reptiles and amphibians. V: The care and use of amphibians, reptiles and fish in research. Schaeffer D.O., Kleinow K.M., Krulish L. (eds.). Bethesda, Scientist center for animal welfare: 49–52

Jordan H.E., Speidel C.C. 1923. Blood cell formation and distribution in relation to the mechanism of thyroid-accelerated metamorphosis in the larval frog. The journal of experimental medicine, 38, 5: 529–541

Jordan H.E. 1932. The histology of the blood and the blood-forming tissues of the urodele, *Proteus anguineus*. American journal of anatomy, 51, 1: 215–251

Juberthie C., Durand J., Dupuy M. 1996. La reproduction des protées (*Proteus anguinus*) bilan de 35 ans d'élevage dans les grottes-laboratoires de moulis et d'aulignac. Mémoires de Biospéologie, Tome XXIII: 53–56

Kallioniemi A., Kallioniemi O.P., Sudar D., Rutovitz D., Gray J.W., Waldman F., Pinkel D. 1992. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science, 258: 818–821

Kasahara S., Zampieri Silva A.P., Gruber S.L. 1998. Use of lymphocyte cultures for BrdU replication banding patterns in anuran species (Amphibia). Genetics and molecular biology, 21, 4: 471–476

Koniski A.D., Cohen N. 1992. Reproducible proliferative responses of salamander (*Ambystoma mexicanum*) lymphocytes cultured with mitogens in serum-free medium. Developmental and comparative immunology, 16: 441–451

Kuramoto M. 1981. Relationship between number, size and shape of red blood cells in amphibians. Comparative biochemistry and physiology, 69, 4: 771–775

Leibovitz A. 1963. The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. American journal of hygiene, 78: 173–180

Li J.G., OsGood E.E. 1949. A method for the rapid separation of leukocytes and nucleated erythrocytes from blood or marrow with a phytohemagglutinin from red beans (*Phaseolus vulgaris*). Blood, 4: 670–675

Licht L.E., Lowcock L.A. 1991. Genome size and metabolic rate in salamanders. Comparative Biochemistry and Physiology, 100B: 83–92

- Lokar M., Iglič A., Veranič P. 2010. Protruding membrane nanotubes: attachment of tubular protrusions to adjacent cells by several anchoring junctions. *Protoplasma*, 246, 1–4: 81–87
- Lombarts A.J., de Kieviet W. 1988. Recognition and prevention of pseudothrombocytopenia and concomitant pseudoleukocytosis. *American journal of clinical pathology*, 89, 5: 634–639
- Louis S., Benedek K., Mowat M., Klein G., Mai S. Elongated mouse chromosomes suitable for enhanced molecular cytogenetics. *Cytotechnology*, 44, 3: 143–149
- Maniatis G.M., Ingram V.M. 1971. Erythropoiesis during amphibian metamorphosis: site of maturation of erythrocytes in *Rana catesbeina*. *The journal of cell biology*, 49: 372–379
- Montali R.J. 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *Journal of comparative pathology*, 99, 1: 1–26
- Morales H.D., Robert J. 2007. Characterization of primary and memory CD8 T-cell responses against ranavirus (FV3) in *Xenopus laevis*. *Journal of virology*, 81, 5: 2240–2248
- Mrak P. 2007. Morfologija vranice močerilarjev (Amphibia: Proteidae). Diplomsko delo.. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo: 81 str.
- Narasimha A., Kumar H., Prasad C.S. 2008. Anticoagulant induced artefacts in peripheral blood smears. *Indian journal of hematology & blood transfusion*, 24, 2: 43–48
- Nowell P.C. 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer research*, 20: 462–466
- Olmo E. 1974. Further data on the genome size in urodeles. *Italian journal of zoology*, 41, 1: 29–33
- Pagés T., Peinado V.I., Viscor G. 1992. Seasonal changes in hematology and blood chemistry of the freshwater turtle *Mauremys caspica leprosa*. *Comparative biochemistry and physiology*, 103, 2: 275–278
- Passantino L., Massaro M.A., Jirillo F., Di Modungo D., Ribaud M.R., Di Modungo G., Passantino G.F., Jirillo E. 2007. Antigenically activated avian erythrocytes release cytokine-like factors: a conserved phylogenetic function discovered in fish. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 29: 141–152

- Peterson J.D., Steffen J.E., Reinert L.K., Cobine P.A., Appel A., Rollins-Smith L., Mendonca M.T. 2013. Host stress response is important for the pathogenesis of the deadly amphibian disease, chytridiomycosis, in *Litoria caerulea*. PLoS ONE, 8, 4: e62146. doi:10.1371/journal.pone.0062146: 7 str.
- Pezdirc M., Heath E., Bizjak Mali L., Bulog B. 2011. PCB accumulation and tissue distribution in cave salamander (*Proteus anguinus anguinus*, Amphibia, Urodela) in the polluted karstic hinterland of the Krupa River, Slovenia. Chemosphere, 84: 987–993
- Presnell J.K., Schreibman M.P. 1997. Humason's animal tissue techniques. 5th ed. Baltimore, The Johns Hopkins University Press: 572 str.
- Ramlochansingh C., Branoner F., Chagnaud B.P., Straka H. 2014. Efficiency of tricaine methanesulfonate (MS-222) as an anesthetic agent for blocking sensory-motor responses in *Xenopus laevis* tadpoles. PLoS ONE, 9, 7: 1–11
- Reynhout J.K., Kimmel D.L. 1969. Chromosome studies of the lethal hybrid *Rana pipiens* ♀ × *Rana catesbeiana* ♂. Developmental biology, 20, 6: 501–517
- Rieder C.L., Palazzo R.E. 1992. Colcemid and the mitotic cycle. Journal of cell science, 102: 387–395
- Rohr J.R., Schotthoefer A.M., Raffel T.R., Carrick H.J., Halstead N., Hoverman J.T., Johnson C.M., Johnson L.B., Lieske C., Piwoni M.D., Schoff P.K., Beasley V.R. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. Nature, 455: 1235–1239
- Ross L.G., Ross B. 2008. Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford, Blackwell publishing: 222 str.
- Ross M. H., Pawlina W. 2011. Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 6th ed. Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins: 974 str.
- Rounds D.E. 1973. Adult amphibian tissue and leukocytes. V: Tissue culture: methods and applications. Kruse P.F., Patterson M.K. (eds.). New York, Academic Press: 129–133
- Ruiz G., Rosenmann M., Veloso A. 1983. Respiratory and hematological adaptations to high altitude in *Telmatobius* frogs from the chilean andes. Comparative biochemistry and physiology, 76, 1: 109–113
- Ruiz G., Rosenmann M., Veloso A. 1989. Altitudinal distribution and blood values in the toad, *Bufo spinulosus* Wiegmann. Comparative biochemistry and physiology, 94, 4: 643–646

- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H.H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*, 303: 1007–1010
- Salic A., Mitchison T.J. 2008. A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 7: 2415–2420
- Salvadori F., Tournefier A. 1996. Acrivation by mitogens and superantigens of axolotl lymphocytes: functional characterization and ontogenic study. *Immunology*, 88: 586–592
- Scheel J.J. 1971. The seven-chromosome karyotype of African frog *Arthroleptis*, a probable derivative of the thirteen-chromosome karyotype of *Rana* (Ranidae, Anura). *Hereditas*, 67: 287–290
- Schmid M. 1978. Chromosome banding in amphibia. I. Constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in *Bufo* and *Hyla*. *Chromosoma*, 66: 361–388
- Schmid M., Haaf T., Schempp W. 1985. Chromosome bandinf in Amphibia. IX. The polyploid karyotypes of *Odontophryinus americanus* and *Ceratophrys ornata* (Anura, Leptodactylidae). *Chromosoma*, 91, 3–4: 172–184
- Schmid M., Nanda I., Steinlein C., Kausch K., Epplem J.T. & Haaf T. 1991. Sex-determining mechanisms and sex chromosomes in Amphibia. V: Amphibian cytogenetics and evolution. Green D.M., Sessions S.K. (eds.). San Diego, Academic Press: 393–430
- Schmid M., Evans B.J., Bogart J.P. 2015. Polyploidy in Amphibia. Cytogenetic and genome research, 145, 3–4: 315–330
- Schröck E., du Manoir S., Veldman T., Schoell B., Wienberg J., Ferguson-Smith M.A., Ning Y., Ledbetter D.H., Bar-Am I., Soenksen D., Garini Y., Ried T. 1996. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science*, 273: 494–497
- Shutler D., Marcogliese D.J. 2011. Leukocyte profiles of Northern Leopard Frogs, *Lithobates pipiens*, exposed to pesticides and hematozoa in agricultural wetlands. *Copeia*, 2: 301–307
- Sessions S.K. 1980. Evidence for a highly differentiated sex chromosome heteromorphism in the salamander *Necturus maculosus* (Rafinesque). *Chromosoma* 77: 157–168
- Sessions S.K. 2008. Evolutionary cytogenetics in salamanders. *Chromosome research*, 16: 183–201

Sessions S.K., Bizjak Mali L., Green D.M., Trifonov V., Ferguson-Schmitt M. 2016. Evidence for sex chromosome turnover in Proteid salamanders. *Cytogenetic and genome research*, 148, 4: 305–313

Seto T., Pomerat C.M., Kezer J. 1964. The chromosomes of *Necturus maculosus* as revealed in cultures of leukocytes. *The American naturalist*, 98, 899: 71–78

Smith H.M., 1925. Cell size and metabolic activity in Amphibia. *Biological bulletin*, 48, 5: 347–378

Sofuni T., Yoshida M.C. 1992. Combined use of several mitogens for mitotic stimulation to human lymphocytes. *Journal of radiation research*, 33, Supplement: 222–230

Stites D.P., Carr M.C., Fudenberg H.H. 1972. Development of cellular immunity in the human fetus: dichotomy of proliferative and cytotoxic responses of lymphoid cells to phytohemagglutinin. *Proceedings of the National academy of sciences of the United States of America*, 69, 9: 1440–1444

Thiébaud C.H., Fischberg M. 1977. DNA content in the genus *Xenopus*. *Chromosoma*, 59, 3: 253–258

Trask B.J. 1991. Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in genetics*, 7, 5: 149–154

Tooze J., Davies H.G. 1967. Light- and electron- microscope studies in the spleen of the *Triturus cristatus*: the fine structure of erythropoietic cells. *Journal of cell science*, 2: 617–640

Turner R.J. 1988. Amphibians. V: Vertebrate blood cells. Rawley A.F., Ratcliffe N.A. (eds.). Cambridge, Cambridge University Press: 129–209

Ussing A.P., Rosenkilde P. 1995. Effect of induced metamorphosis on the immune system of the axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *General and comparative endocrinology*, 97: 308–319

Vallejo C.B., Hernández-Gallegos O., Von Herbing I.H., López-Moreno A.E., De Lourdes Ruiz-Gómez M., Granados-Gonzales G., Garduño-Paz M.V., Méndez-Sánchez J.F., Banda-Leal J., Davis A.K. 2015. Assessing population health of the toluca axolotl *Ambystoma rivulare* (Taylor, 1940) from México, using leukocyte profiles. *Herpetological conservation and biology*, 10, 2: 592–601

Venu G., Venkatachalaiah G. 2013. Chromosomal homology of *Uraeotyphlus oxyurus* group of species (Amphibia, Gymnophiona, Ichthyophiidae). *Comparative cytogenetics*, 7, 1: 11–23

Wasserman A.O., Bogart J.P. 1968. Chromosomes of two species of spadefoot toads (genus *Scaphiopus*) and their hybrid. *Copeia*, 1968, 2: 303–306

Wei J., Li Y.Y., Wei L., Ding G.H., Fan X.L., Lin Z.H. 2015. Evolution of erythrocyte morphology in amphibians (Amphibia: Anura). *Zoologia*, 32, 5: 360–370

Wright K.M. 2001. Amphibian hematology. V: Amphibian medicine and captive husbandry. Wright K.M., Whitaker B.R. (eds.). Malabar, Krieger publishing company: 129–146

Zhu B., Feng Z., Qu A., Gao H., Zhang Y., Sun D., Song W., Saura A. 2002. The karyotype of the caudate amphibian *Andrias davidianus*. *Hereditas*, 136: 85–88