

# Človeška ribica pod drobnogledom

Tajda Gredar in Lilijana Bizjak Mali

Bilo je konec januarja, ko se je svet zaradi nepredvidenega srečnega dogodka v Postojnski jami (samička je pričela z odlaganjem jajčec) začel zanimati za človeško ribico oziroma močerila (*Proteus anguinus*). Po štirih mesecih razvoja zarodkov pa smo priča tudi prvemu izleganju ličink. Da je močeril zelo zanimiva in skrivnostna jamska žival, zelo dobro vemo raziskovalci, ki se ukvarjamo s preučevanjem njegove specifične biologije. V tokratnem prispevku želimo razkriti novejša raziskave, v katerih smo pod drobnogled vzeli močerilove krvne celice in kromosome.

## Določanje spola in kultivacija krvnih celic

Ugotavljanje spola po zunanjih morfoloških znakih je pri močerilu zelo negotovo, saj ni izraženega spolnega dimorfizma. Samci in samice so prepoznavni le med paritvenim obdobjem, in sicer samci po zadebeljenem

stoku ali kloaki ter samice zaradi številnih zrelih jajčec v jajčnikih, ki presevajajo skozi tanko trebušno steno. Podatek o spolu je ključen za študij populacijske dinamike, ugotavljanje razmerja spolov v naravnih populacijah, raziskave evolucije spolnih kromosomov ter ne nazadnje za uspešen program razmnoževanja močerila v ujetništvu. V iskanju nedestruktivne metode določanja spola smo se odločili za citogenetski pristop in vizualizacijo njegovih kromosomov. Predvidevali smo, da so spolni kromosomi močerila heteromorfni (velik kromosom X in mali Y), kot je to značilno za njegovega najbližjega sorodnika nekturusa (Sessions, 1980). Nekturus ali blatni kužek živi v površinskih vodah severovzhodnega predela Združenih držav Amerike, skupaj z močerilom ga uvrščamo v družino močerilarjev (*Proteidae*). Poleg neoteničnosti

*Človeška ribica ali močeril (Proteus anguinus) je endemit podzemnih voda vzdolž Dinarskega krasa. Je pomembna krovna vrsta ter naša neprecenljiva naravna in kulturna dediščina. Foto: D. Dalessi (Speleološki laboratorij Oddelka za biologijo na Biotehniški fakulteti Univerze v Ljubljani).*



in fizioloških značilnosti je obema skupno haploidno število 19 kromosomov, pa tudi ostale citogenetske značilnosti. Še predno smo kultivacijo močerilovih krvnih celic uspešno optimizirali, se je 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 enak vzorcu kromosoma Y pri nekturu. Predvidevamo, da se je dogodila tranzicija kromosoma Y na kromosom X (Sessions in sod., 2016), kar se kaže tudi v močerilovi specifični reproduktivni biologiji, kot so nizko preživetje potomcev (Juberthie in sod., 1996), razmerje spola v prid samicam, zastopanost jajčnih celic v testisih (Bizjak Mali in Bulog, 2015), številni propadajoči jajčni folikli v dozorevajočih jajčnikih (Bizjak Mali in Bulog, 2011) in ne nazadnje hermafrodizem, kot se je pokazalo pri nedavnem preučevanju morfologije gonad močerila (Bizjak Mali, članek v pripravi).

Za citogenetske raziskave, to je študij kromosomov, je potreben ustrezen material, ki zagotovi dovolj delečih se celic z vidnimi kromosomi. Pri dvoživkah za citogenetske raziskave najpogosteje uporabljajo notranje organe, kot so črevesje, testisi in kostni mozeg. Močeril je zakonsko zavarovana vrsta, saj je zaradi svojih specifičnih prilagoditev na jamsko okolje izredno ranljiva vrsta, potencialno jo ogroža vsakovrstno onesnaženje njenega življenjskega prostora. Material za citogenetske raziskave smo želeli pridobiti z metodo, ki ne zahteva žrtvovanja živali ter je zanjo čim manj stresna. Odločili smo se za povzetje metode iz človeške citogenetike, kjer iz odvzete krvi vzgojijo primarno celično kulturo krvnih celic.

Standardni postopek odvzema krvi pri dvoživkah je odvzem krvi iz srčnega ventrikla, medtem ko je žival uspavana. Kot anestetik pri vodnih vretenčarjih uporabljajo trikain matansulfonat ali MS-222 (Ross in Ross,

2008). Iz srčnega ventrikla dvoživk se odvzame varna količina krvi, ki je odvisna od telesne teže živali. Pri močerilu smo odvzeli majhen vzorec krvi (do 100 mikrolitrov), saj nismo želeli tvegati. Poseg so vsi osebkii uspešno prestali in hitro okrevali. Srce pri močerilu je vidno skozi tanko kožo, ki ostaja neobarvana, saj v njej ni veliko pigmentnih celic ali melanofor. Slednje nam je olajšalo odvzem krvi iz ventrikla.

Za vizualizacijo kromosomov je treba spodbuditi celične delitve krvnih celic z mitogenom, nato pa celično delitev v metafazi ustaviti z antimittotikom. Celičnih delitev niso sposobne vse krvne celice, temveč lahko z mitogenom k delitvam spodbudimo samo limfocite. V ta namen uporabljajo mitogen, imenovan fitohemaglutinin ali PHA-M, ki je izoliran iz navadnega fižola. Prve celične delitve limfocitov v celični kulturi pri močerilu nastopijo četrty dan, njihovo število pa se v naslednjih treh do štirih dnevih poveča. Celični cikel je pri njem izredno počasen. Za primerjavo lahko povemo, da se človeški limfociti v zadovoljivem številu delijo že tretji dan kultivacije. Citogenetsko analizo uporabljajo pri rutinskih postopkih ugotavljanja napak na kromosomih človeškega zarodka.

Kot antimittotik, torej molekulo, ki zavstavlja celične delitve, uporabljajo alkaloid kolhicin in njegovo biosintezno predstopnjo kolcemid, ker preprečujeta nastanek mikrotubulov in tako onemogočita nastanek niti delitvenega vretena, posledično se celični cikel zaustavi v metafazi, ko so kromosomi najbolj kondenzirani in s tem tudi najlepše vidni.

Metodo gojenja krvnih celic močerila smo uspešno optimizirali in ugotovili, da so v primerjavi s človeško citogenetiko potrebne mnogo višje koncentracije PHA-M in kolhicina, prav tako je izpostavitve omenjenim kemikalijam bistveno daljša. Tako je bila potrebna kar 48-urna izpostavitve kolhicinu, v človeški citogenetika je potrebna le 30- do 90-minutna izpostavitve. Pokazali smo, da



*Kromosomi močerila (Proteus anguinus) v metafazi celičnega cikla, ki smo jih pridobili z metodo, povzeto po človeški citogenetiki. Barvano z Giemso. Merilo = 10 mikrometrov.*  
Foto: Tajda Gredar.

lahko pridobimo material za citogenetske študije z varno metodo, ki ne zahteva žrtvovanja živali. Presenetljivo je tudi, da je gojitev celic uspešno potekala pri temperaturi 25 stopinj Celzija, ki je bistveno višja od temperature v jamskem okolju. To je zanimivo, saj naši rezultati potrjujejo večjo temperaturno toleranco močerila, kot se je doslej predvidevalo. Podatek je tudi izrednega pomena za vzpostavitev optimalnih umetnih razmer za uspešnejšo vzgojo in razmnoževanje močerila v ujetništvu.

### **Morfologija krvnih celic**

Kri in krvne celice so občutljiv kazalec onesnaženja v vodnih okoljih (Barni in sod., 2007). Kronična izpostavljenost onesnažilom v okolju privede do sprememb v morfologiji in deležu krvnih celic, do pojava mikrojedr in padca proliferacije celic, do oslabitve imunskega sistema in posledično do zvišane dovzetnosti za okužbo s paraziti. Preučili smo morfologijo krvnih celic močerila in analizirali deleže posameznih tipov celic v krvi. Narejena je pomembna osnova za načrtovane hematološke študije. Hematološki parametri so pomembni kazalci fiziološkega stanja živali, z njimi lahko prepoznamo mo-

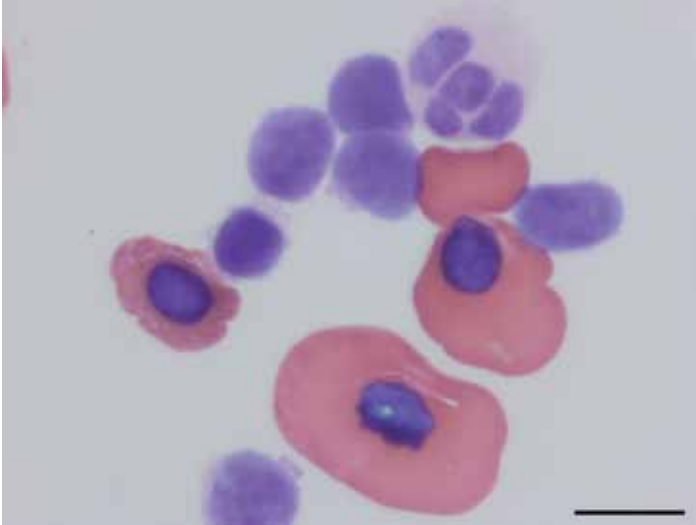
rebitne stresne položaje in okužbe, prav tako so pomembna podlaga za raziskave slabo preučenih obrambnih odzivov močerila na okužbe.

Eritrociti močerila so med večjimi pri vretenčarjih, kar se ujema z velikostjo genoma, ki je kar 15-krat večji od človeškega. C-vrednost, to je količina DNA v haploidnem jedru, izražena v pikogramih, je pri močerilu 48,4 pikograma (Gregory, 2001), povprečna dolžina eritrocitov pa 53 mikrometrov. Pri človeku C-vrednost znaša samo 3 pikograme, eritrociti pa merijo le okrog 7 mikrometrov.

Tako kot pri večini vretenčarjev (izjema so sesalci) imajo močerilovi eritrociti in tudi trombociti jedro, ki omogoča sintezo beljakovin in prilagajanje metabolnih procesov. V krvi močerila so tudi številne predstopnje eritrocitov, kar kaže na to, da dozorevanje eritrocitov poteka v krvi. To je značilno tudi za ostale repate dvoživke, saj v dolgih kosteh nimajo kostnega mozga, kjer bi sicer predstopnje eritrocitov dozorevale.

### **Gojenje celic iz koščkov repnega tkiva**

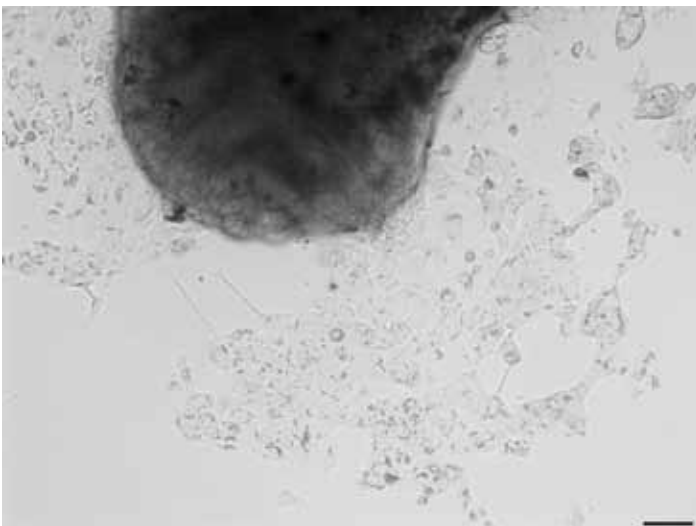
Uspešni smo bili tudi pri preliminarni kultivaciji majhnega koščka repnega tkiva mo-



*Krvni razmaz močerila (Proteus anguinus). Največje celice so eritrociti, njim podoben, a manjši in z neenakomernim robom je eritroblast (levo), ki je predstopnja eritrocita. Vidni so še limfociti (en majhen in pet velikih) ter nevtrofilec (skrajno zgoraj) z lobuliranim jedrom. Merilo = 20 mikrometrov. Foto: Tajda Gredar.*

čerila (angl. *explants*) velikosti 0,5 krat 0,5 milimetra. Že v prvem poskusu se je tkivo pritrdilo na podlago kultivacijske plošče in presenetljivo ohranilo viabilnost vse do 25 dni, kolikor smo ga spremljali. Po 16 dneh kultivacije so celice pričele migrirati, predvidevamo, da so potekale tudi celične delitve, kar moramo v nadaljevanju še potrditi. Glede na to, da je pri vsaki kultivaciji treba prilagajati številne parametre – temperaturo, ozmolarnost gojišča, koncentracije, dolžine inkubacij - ter da ni poznan vpliv sestavin

gojišča, antibiotikov in antimikotikov, ki so dodani gojišču, smo z izidom preliminarne kultivacije nadvse zadovoljni. Na ta način pridobljene celice predstavljajo nepogrešljivi material za 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.



*Posnetek migrirajočih celic iz koščka repnega tkiva (zgoraj) močerila (Proteus anguinus), narejen z invertnim mikroskopom. Merilo = 100 mikrometrov. Avtorica: Tajda Gredar.*



**Tajda Gredar** je absolventka molekulske in funkcionalne biologije na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti na Univerzi v Ljubljani. V okviru magistrske naloge pod mentorstvom doc. dr. Lilijane Bizjak Mali se je lotila zahtevne naloge optimizacije kulture krvnih celic človeške ribice. Srednjo zdravstveno šolo Murska Sobota je zaključila kot zlata maturantka, nato pa se je vpisala na študij biologije, ki ji je bil pisan na kožo. Da se je med študijem veliko naučila in pridobila veliko izkušenj, se je pokazalo tudi pri njenem delu v laboratoriju, tako za magistrsko nalogo, kot tudi pri prostovoljnem delu, ki ji je izziv. Rezultate svojega raziskovalnega dela je predstavila na 1. slovenskem posvetovanju mikroskopistov v Piranu leta 2015, prav tako je soavtorica objavljenega znanstvenega članka o glioblastomu pri zarodkih cebric.

**Dr. Lilijana Bizjak Mali** je docentka na Oddelku za biologijo na Biotehniški fakulteti na Univerzi v Ljubljani. Njeni področji sta funkcionalna morfologija vretenčarjev in razvojna biologija. Raziskovalno se ukvarja s preučevanjem bioloških prilagoditev močerila na jamsko okolje, osredotočena pa je tudi na naravovarstveno problematiko za ohranitev močerila v njegovem naravnem okolju. Njene raziskave so zadnjih nekaj let usmerjene v reproduktivno biologijo močerila, predvsem v preučevanje morfologije gonad in zoritev spolnih celic, v preučevanje spolnih kromosomov in določanje spola ter v razvoj nedestruktivne metode določanja spola. Da bo biologinja, je vedela že kot osnovnošolka, na študij biologije pa je prišla predvsem zaradi strasti do rastlin. Med študijem se je odločila za ekološko usmeritev, nato pa je diplomirala iz popolnoma morfološke teme pod mentorstvom prof. dr. Borisa Buloga. V skupini prof. dr. Buloga je tudi ostala kot stažist asistent in od takrat dalje se njena življenjska pot prepleta s preučevanjem skrivnostne jamske dvoživke, kar ji je v velik izziv in veselje.



**Slovarček:**

**C-vrednost.** Količina DNA v haploidnem genomu organizma, izražena v pikogramih.

**Citogenetika.** Študij kromosomov.

**Eritrociti.** Rdeče krvne celice.

**Levkociti.** Bele krvne celice.

**Mitogen.** Molekula, ki spodbudi celično delitev oziroma mitozo.

**Proliferacija celic.** Razmnoževanje celic s celičnimi delitvami.

**Trombociti.** Krvne ploščice, pomembne za strjevanje krvi.

**Viabilnost celic.** Delež živih celic.

**Literatura:**

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.

Bizjak Mali, L., Bulog, B., 2011: *Follicular ovarian atresia in the olm (Proteus anguinus anguinus)*. In: *Societa Italiana Scienze Microscopiche (Ed.), Proceedings of 10<sup>th</sup> Multinational Congress on Microscopy, 4-9-September, 2011, Urbino, Italy, 295-296.*

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

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.

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

Ross, L. G., Ross, B., 2008: *Anaesthetic and sedative techniques for aquatic animals. 3rd ed. Oxford: Blackwell publishing. 222 str.*

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., Bizjak Mali, L., Green, D.

M., Trifonov, V., Ferguson-Smith, M., 2016: *Evidence for Sex Chromosome Turnover in Proteid Salamanders. Cytogenetic and Genome Research, DOI: 10.1159/000446882 (v tisku).*

Zgodbe o močvirnicah – rod (genus) *Epipactis* (prvi del) • Botanika

## Zgodbe o močvirnicah – rod (genus) *Epipactis* (prvi del)

Matej Lipovšek

Raznolikost pri močvirnicah iz rodu *Epipactis* ni nenavadna. Odstopanja v morfoloških lastnostih nekaterih vrst so tako očitna, da ne moremo govoriti o močvirnici v ožjem pomenu vrste – sensu stricto (s. s.). To velja predvsem za mnoge neopredeljene močvirnice, ki so podobne širokolistni močvirnici (*Epipactis helleborine*). Takšno morfološko odstopajočo močvirnico uvrščamo v oblikovni krog izhodiščne širokolistne močvirnice (*Epipactis helleborine* s. s.) in jo opredelimo kot širokolistno močvirnico v širšem pomenu – sensu lato (s. l.), torej *Epipactis helleborine* s. l.

Morfološke raziskave teh močvirnic so pokazale, da posamezne taksone ne moremo označiti le kot variabilne ali kot podvrsto izhodiščne močvirnice. Poimenovanje nekaterih močvirnic iz oblikovnega kroga širokolistne močvirnice je zato olajšalo pregled v sistematiki, a ob tem so vendar ostali pomisleki o utemeljenosti poimenovanja. V botaničnih ključih različnih avtorjev ne vidimo dosledne hierarhične opredelitve. Nekatere močvirnice so označene kot svoja vrsta, te iste pa drugje kot podvrsta ali pa le z oznako *Epipactis helleborine* s. l. Helmut Presser, avtor knjige *Orchideen* (Presser, 2002), na primer sploh ne omenja močvir-