

# Analiza sadržaja DNA u celomocitima trpa *Holothuria tubulosa* protočnom citometrijom

---

Jeremić, Vanja

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:203827>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

VANJA JEREMIĆ

**Analiza sadržaja DNA u celomocitima trpa *Holothuria  
tubulosa* protočnom citometrijom**

ZAVRŠNI RAD

Rovinj, 2015.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI  
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

VANJA JEREMIĆ

**Analiza sadržaja DNA u celomocitima trpa *Holothuria  
tubulosa* protočnom citometrijom**

ZAVRŠNI RAD

JMBAG: 0303025657  
Status: redovan student  
Kolegij: Stanična i molekularna biologija  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafandžel  
Komentor: dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković

Rovinj, 2015.

## IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisana Vanja Jeremić, kandidatkinja za prvostupnicu (*baccalaurea*) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da niti jedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

U Puli, 14. 07. 2015.

Student: Vanja Jeremić

---

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za morską ekotoksikologiju Centra za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Maje Fafandel, predan je na ocjenu Sveučilišnom preddiplomskom studiju Znanost o moru Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli radi stjecanja zvanja prvostupnice (*baccalaurea*) znanosti o moru.

Voditelj Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanost o moru je za mentora završnog rada imenovao izv. prof. dr. sc. Maju Fafandel i za komentora dr. sc. Mirtu Smodlaka Tanković.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafandel  
Komentor: dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković

Povjerenstvo za ocjenjivanje i obranu:

Predsjednik: prof. dr. sc. Renato Batel  
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj  
Mentor: izv. prof. dr. sc. Maja Fafandel  
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj  
Komentor: dr. sc. Mirta Smodlaka Tanković  
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj  
Član: izv. prof. dr. sc. Nastjenska Supić  
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Datum i mjesto obrane završnog rada: 22. srpnja 2015. g., u 10:30 u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Rad je rezultat samostalnog istraživačkog rada.

Vanja Jeremić

---

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafandel na predloženoj temi i ukazanom povjerenju, te na savjetima i pomoći tijekom izrade završnog rada.

Od srca zahvaljujem dr. sc. Mirti Smodlaka Tanković na stručnoj pomoći, strpljenju i svim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Također zahvaljujem Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i laboratorijskoj opremi.

Iskreno zahvaljujem mojoj obitelji na strpljenju i podršci tijekom studiranja.

# SADRŽAJ

|   |    |
|---|----|
| 1. UVOD .....                                     | 1  |
| 1.1. <i>Holothuria tubulosa</i> Gmelin, 1791..... | 1  |
| 1.1.1. Celomociti .....                           | 2  |
| 1.1.1.1. Fagociti .....                           | 3  |
| 1.1.1.2. Sferulociti.....                         | 4  |
| 1.1.1.3. Vibratilne stanice .....                 | 7  |
| 1.1.1.4. Kristalne stanice.....                   | 7  |
| 1.1.1.5. Progenitorne stanice.....                | 8  |
| 1.2. Protočna citometrija.....                    | 8  |
| 1.3. Stanični ciklus.....                         | 9  |
| 2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA.....              | 12 |
| 3. MATERIJALI I METODE .....                      | 13 |
| 3.1. Kemikalije .....                             | 13 |
| 3.2. Odabir postaja i uzorkovanje .....           | 13 |
| 3.3. Priprema uzoraka i bojanje jezgri .....      | 14 |
| 3.4. Protočna citometrija.....                    | 15 |
| 3.5. Svjetlosna mikroskopija .....                | 15 |
| 4. REZULTATI.....                                 | 16 |
| 4.1. Celomociti .....                             | 16 |
| 4.2. Sadržaj DNA i stanični ciklus .....          | 18 |
| 4.2.1. Postaja 1 .....                            | 18 |
| 4.2.2. Postaja 2 .....                            | 20 |
| 4.2.3. Postaja 3 .....                            | 22 |
| 5. RASPRAVA.....                                  | 24 |
| 6. ZAKLJUČAK .....                                | 27 |
| 7. LITERATURA.....                                | 28 |

## 1. UVOD

Morski beskralješnjaci imaju važnu ulogu u održavanju homeostaza u morskom ekosustavu. Filtriraju morsku vodu ili probavljaju sediment, pa ako su izloženi okolišnim promjenama odgovaraju promjenom aktivnosti pojedinih organa. Upravo zbog toga koriste se kao bioindikatorski organizmi za praćenje stanja ekosustava i stupnja onečišćenja. Hemociti/celomociti čine prvi red obrane morskih beskralješnjaka koji su izloženi okolišnim promjenama, i kao takvi odgovaraju na stresne uvjete, te se koriste se za praćenje okolišnih uvjeta (Fafandel i sur., 2008).

### 1.1. *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1791

Običan trp *H. tubulosa*, (Slika 1) (koljeno Echinodermata, razred Holothuroidea, red Aspidochirotida, porodica Holothuriidae) je bentoski organizam na kojem su rađena brojna istraživanja u područjima genetike i fiziologije prvenstveno zbog njegove sposobnosti regeneracije unutrašnjih organa. Rasprostranjen je u Sredozemlju i istočnom dijelu Atlantskog oceana (Tortonese, 1965). Vrlo je česta vrsta i u Jadranskom moru te nastanjuje sve vrste podloga do 100 m dubine (Šimunović i sur., 2000). *H. tubulosa* je detritofag (hranu probavlja iz progutanog pijeska i mulja), hranjenjem i kretanjem stalno miješa gornje slojeve sedimenta, a fecesom obogaćuje okolni sediment organskom tvari, te na taj način bitno određuje procese u ekosustavu mora (Matoničkin i sur., 1981; Roberts i sur., 2003; Michio i sur., 2003; Coulon i sur., 1992).

*H. tubulosa* je krupna, crnosmeđa i bradavičasta životinja valjkastog oblika dugačka do 35 cm. Za razliku od ostalih bodljikaša koji imaju pentamernu simetriju trpovi su vanjštinom bilateralno simetrični. Na vršnom dijelu imaju štitasta ticala, dobro razvijene ambulakralne nožice i vodena pluća, a u koži mnogo vapnenih pločica različitog oblika (Matoničkin i sur., 1981). *H. tubulosa* nema Cuvierove cjevčice, a pri jakom podražaju izbacuje utrobu kroz analni otvor, te ju nakon toga regenerira (Riedl, 1983; Matoničkin i sur., 1981; Garcia-Arraras i Greenberg, 2001). Iako nema spolnog dimorfizma, spolovi su odvojeni i nema hermafroditizma. Oplodnja je vanjska (Riedl, 1983).



Tjelesnu šupljinu ili celom ispunjava celomska tekućina koja ima nekoliko funkcija: prenosi plinove, hranjive i otpadne tvari, te služi kao hidroskelet. Ta tekućina je po sastavu slična morskoj vodi i kruži organizmom zahvaljujući gibanju trepetljiki celotela (Matoničkin i sur., 1981). U celomskoj tekućini nalazi se više vrsta celomocita koji sudjeluju u transportu hranjivih tvari, kisika, ekskreciji te humoralnom i staničnom imunitetu. Humoralni imunitet je neutralizacija ili uklanjanje stranih tvari proizvodnjom ili lučenjem humoralnih faktora. Stanični imunitet je uklanjanje stranih tvari fagocitozom, staničnom inkapsulacijom, ili specifičnom staničnom citotoksičnošću. (Matoničkin i sur., 1981; Smith, 1981; Lawrence, 1987; Smiley, 1994; Cooper, 1976; Greenberg, 1989; Eliseikina i Magarlamov, 2002).



**Slika 1.** Običan trp *Holothuria tubulosa*

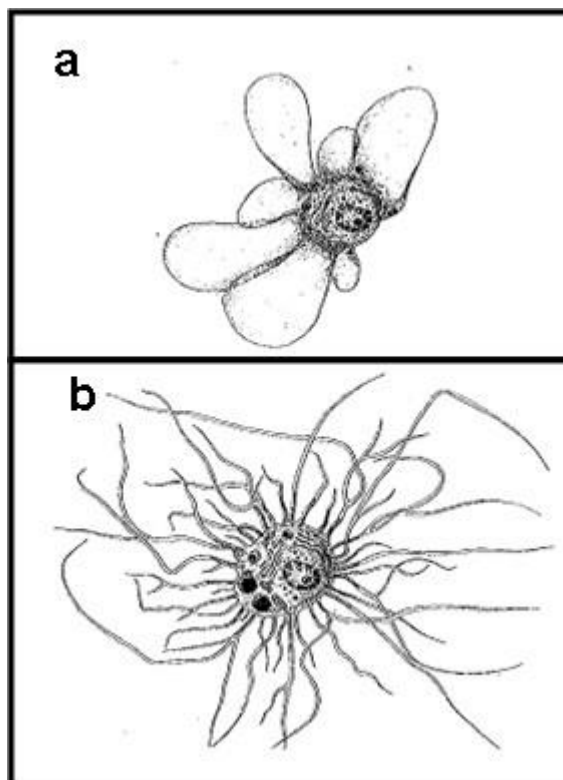
### **1.1.1. Celomociti**

*H. tubulosa* ima pet vrsta celomocita: fagocite (amebocite), sferulocite, vibratilne, kristalne i progenitorne stanice. Nema hemocita kao ni ostali trpovi iz reda Aspidochirotida. Pretpostavlja se da se kisik kroz celomsku tekućinu prenosi pomoću respiratornih pigmenata (Smith, 1981; Eliseikina i Magarlamov, 2002).

### 1.1.1.1. Fagociti

Fagociti (ili amebociti) imaju promjer od 3 do 40  $\mu\text{m}$ . Jezgra im je okrugla ili u obliku zrna graha s izraženom jezgričicom (Eliseikina i Magarlamov, 2002). U citoplazmi se nalaze brojne vezikule, a endoplazmatski retikulum i Golgijev aparat su veoma razvijeni što ukazuje na aktivnu sekreciju, vjerojatno vezanu za sekreciju lizosomalnih enzima (Fontaine i Lambert, 1977; Smith, 1981; Canicatti i sur., 1989a; Smiley, 1994; Eliseikina i Magarlamov, 2002). Fagociti imaju dva oblika, obzirom na izgled pseudopodija, petaloidan (laticast) i filopoidan (nitast; Slika 2). U nekim vrstama bodljikaša dokazan je prelazak fagocita iz petaloidnog oblika u filopoidan, a u nekim vrstama dokazan je i reverzibilan proces iako nikad ne dolazi do kompletne transformacije (Edds, 1980; Otto i sur., 1979). Dokazano je da petaloidni fagociti trpa *Holothuria leucospilota* stalno mijenjaju broj "latica", a do fagocitoze dolazi čim "latica" susretne stranu česticu na način da "latica" zarobi stranu česticu i započne je transportirati prema jezgri. Čim je strana čestica zarobljena počinje transformacija stanice iz petaloidnog u filopoidan oblik i na taj način stanica postane pokretljivija. Prelazak fagocita iz petaloidnog u filopoidan oblik je dakle proces induciran fagocitozom stranih čestica (Chia i Xing, 1996). U zdravim jedinkama filopoidni fagociti su rijetki, a njihov broj se povećava nakon ubrizgavanja stranog materijala (Eliseikina i Magarlamov, 2002).

Fagociti vrlo efikasno prepoznaju strane čestice (bakterije, naročito Gram-pozitivne bakterije, ostatke stanica, strane stanice i ostale čestice) u celomskoj tekućini i uklanjaju ih (Smith, 1981; Johnson, 1969a; Johnson i Chapman, 1970). Smatra se da su analogni makrofagima kod kralješnjaka (Fontaine i Lambert, 1973; Ratcliffe i Millar, 1988). Dokazano je da lizosomalni enzimi celomocita trpa *Holothuria polii* razgrađuju razne vrste biološkog materijala, kao što su bakterije, ostaci stanica i ostalo (Canicatti, 1988; Canicatti i Miglietta, 1989; Canicatti i Roch, 1989; Canicatti, 1990; Canicatti i Tschopp, 1990; Canicatti i Götz, 1991; Canicatti i Seymour, 1991; Sammarco i Canicatti, 1991). Nerazgradive čestice budu fagocitirane i izbačene iz tijela na način da fagociti (s nerazgradivim česticama) izlaze iz celomske tekućine preko vodenih pluća i vodožilnog sustava (Bayne, 1990; Brown, 1967). Istraživanje provedeno protočnom citometrijom na vrsti *H. leucospilota* dokazalo je da fagociti uspješno uklanjaju strani materijal – npr., u istraživanju u kojem su korištena fluorescentna zrnca lateksa, 0,5 milijuna fagocita je u 2 sata fagocitiralo 3,08 milijuna zrnaca (Chia i Xing, 1996).



**Slika 2.** Shematski prikaz fagocita trpa *Holothuria leucospilota*: a) petaloidan fagocit, b) filopoidan fagocit (Preuzeto iz Chia i Xing, 1996).

Fagociti također sudjeluju u inkapsulaciji. Ako je strano tijelo veće od samog fagocita, fagociti se zajedno sa sferulocitima okupe oko stranog tijela te ga na taj način zarobe. Tako nastaju takozvana "smeđa tijela" (Hetzl, 1965; Canicatti i sur., 1989b; Canicatti i Quaglia, 1991; Bayne, 1990; Isaeva i Korenbaum, 1990). Pokusi s transplantatima su pokazali da u nekih vrsta bodljikaša fagociti, sferulociti i progenitorne stanice sudjeluju u odbacivanju transplantata i odgovorni su za uništavanje stranog tkiva (Hildemann i Dix, 1972; Karp i Hildemann, 1976), odnosno da su fagociti jedine stanice odgovorne za odbacivanje transplantata (Bertheussen, 1979). Također se vjeruje da filopoidni fagociti (Slika 3A) igraju važnu ulogu u stvaranju ugrušaka nakon ozljeda, na način da se fagociti trpa spajaju pomoću pseudopodija i na taj način stvaraju ugrušak (Edds, 1977; Canicatti i Farina-Lipari, 1990).

### 1.1.1.2. Sferulociti

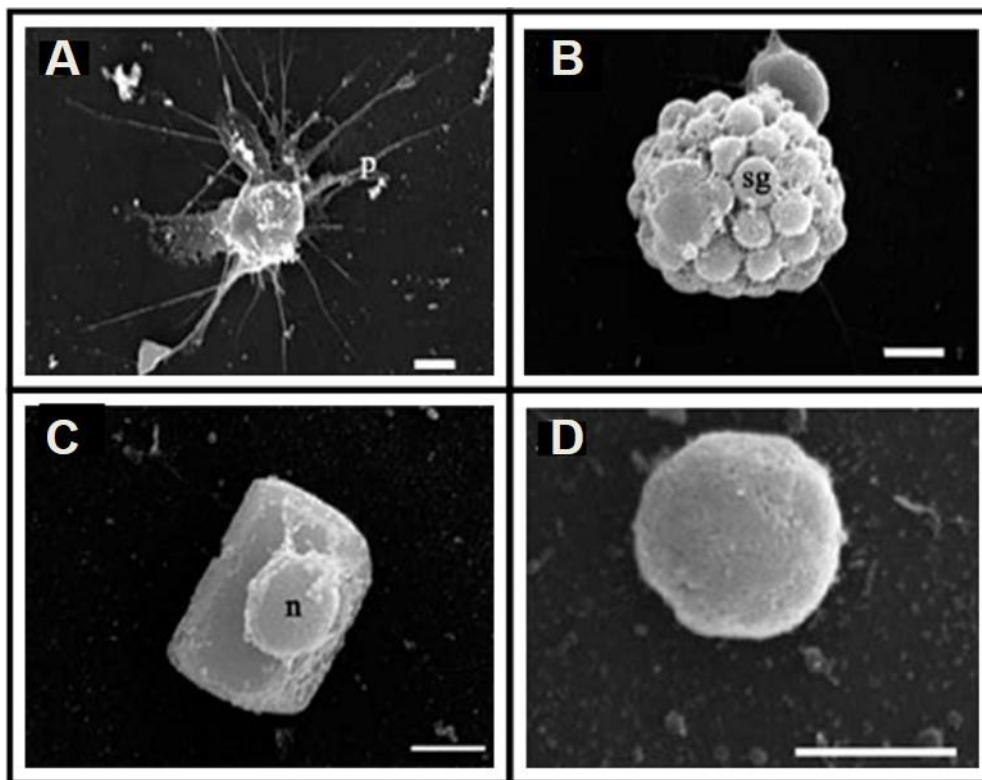
Sferulociti su okrugle ili jajaste stanice promjera od 8 do 20  $\mu\text{m}$ . Citoplazma sferulocita je ispunjena granulama (Slika 3B) promjera od 2 do 5  $\mu\text{m}$  koje prikrivaju nepravilnu jezgru (Chia i Xing, 1996; Smith, 1981; Smiley, 1994). Kod nekih vrsta trpova

granule su čvrsto pripijene uz staničnu membranu pa stanica izgleda kao morula (Fontaine i Hall, 1981; Chia i Xing, 1996). Histokemijskom analizom dokazano je da granule sadrže mukopolisaharide, proteine i lipide (Fontaine i Lambert, 1977; Canicatti i sur., 1989a; Eliseikina i Magarlamov, 2002). Smatra se da su sferulociti analogni mastocitima kod kralješnjaka (Fontaine i Lambert, 1973; Ratcliffe i Millar, 1988). Postoje različite podjele sferulocita ovisno o boji, o morfološkim i strukturalnim karakteristikama granula te o njihovoj poziciji unutar stanice. Crveni sferulociti su nađeni kod ježinaca, a bezbojni, zeleni i žuti sferulociti pronađeni su kod stapčara i trpova (Endean, 1966; Smith, 1981). Sferulociti kod vrste *H. leucospilota* su zelene boje (Chia i Xing, 1996). Na osnovu ultrastrukturnih karakteristika granula, sferulociti se mogu podijeliti na tri grupe: sferulociti tipa I, sferulociti tipa II i sferulociti tipa III (Canicatti i sur., 1989a). Granule sferulocita tipa I su homogeno raspoređene unutar citoplazme, granule sferulocita tipa II su raspoređene u gusto nabijenu nakupinu okruženu rjeđom ovojnicom, a granule sferulocita tipa III su bezbojne i nepravilnog oblika. U različitim vrstama sferulocita različit je sastav granula i hidrolitička aktivnost enzima unutar granula: sferulociti tipa I imaju izraženu aktivnost peroksidaza, u sferulocitima tipa II nepoznata je enzimatska aktivnost, a sferulociti tipa III imaju veoma izraženu aktivnost kiselih fosfataza. Kod sferulocita tipa III potvrđena je prisutnost melanina koji se povezuje sa staničnom obranom (D'Ancona i Canicatti, 1989; Chia i Xing, 1996).

Dokazano je ameboidno kretanje sferulocita što bi moglo biti povezano s pinocitozom (Fontaine i Lambert, 1977; Chia i Xing, 1996). Primijećeno je i puknuće stanične membrane, najčešće uslijed fiksacije uzorka u laboratoriju, te izlazak granula iz stanice, a potvrđena je i spontana desferulizacija, što bi moglo biti povezano sa zacjeljivanjem ozljeda trpa (Smith, 1981; Chia i Xing, 1996). Dokazano je da sferulociti kod ozljeda veoma brzo pucaju i dešava se desferulizacija, te nastaje kolagen za fibrilarno tkivo na ozlijeđenom mjestu (Coffaro i Hinegardner, 1977). Moguće je da sferulociti otpuštaju humoralne obrambene faktore kao što su lizini, aglutinini i antioksidacijski enzimi (Dolmatova i sur., 2004). U vrste *Eupentacta quinquesemita* dokazana je bitna uloga sferulocita u izgradnji izvanstaničnog matriksa za vrijeme regeneracije nakon izbacivanja utrobe (Byrne, 1986).

Kao što je i prije navedeno sferulociti sudjeluju u inkapsulaciji i stvaranju smeđih tijela zajedno s fagocitima. Smeđa boja dolazi upravo od melanina, pigmenta koji se nalazi u granulama sferulocita (Hetzl, 1965; Canicatti i sur., 1989b; Canicatti i Quaglia, 1991; Smith, 1981).

U vrste *H. polii* dokazana je desferulizacija granula sferulocita u smeđim tijelima i otpuštanje enzima, te je na taj način probavni učinak veoma sličan fagocitozi (Canicatti i sur., 1989b).



**Slika 3.** Celomociti trpa *Apostichopus japonicus* skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM): **A** – filopoidan fagocit, **B** – sferulocit, **C** – kristalna stanica, **D** – progenitorna stanica. Oznake: p – pseudopodij; sg – sekrecijska granula; n – jezgra. Mjerilo: 2 µm (Preuzeto iz Xing i sur., 2008).

U vrste trpa *Pentacta pygmaea* primijećena je promjena boje celomske tekućine, iz žute u crvenu, nakon što se dva dana za redom organizmu izoliralo po 0,2 do 0,3 ml celomske tekućine. Promjena boje se dešava zbog ispuštanja crvenog pigmenta (ehinokroma) iz sferulocita zbog stresa od ozljede i gubitka celomske tekućine (Smith, 1983). Isti taj pigment igra važnu ulogu u imobilizaciji mikroorganizama prilikom ozljeda jer djeluje kao dezinficijens (Johnson i Chapman, 1970).

### 1.1.1.3. Vibratilne stanice

Vibratilne stanice su male okrugle stanice s dugim bičem. Promjer stanice je otprilike 5 do 10  $\mu\text{m}$ , a bič, kojim se pokreću, može biti dug 20 do 50  $\mu\text{m}$  (Chia i Xing, 1996; Johnson, 1969b; Bertheussen i Seljelid, 1978). Moguće je da vibratilne stanice svojim kretanjem pomažu cirkulaciji celomske tekućine (Smith, 1981). Vibratilne stanice su po strukturi i veličini veoma slične nezrelim fagocitima (amebocitima), samo što imaju dugi bič (Eliseikina i Magarlamov, 2002).

*In vitro* je dokazano izlučivanje mukoidne tvari iz vibratilnih stanica koja se veoma brzo nakon izlučivanja pretvara u gel. U slučaju ozljeda na ozlijeđenom mjestu te stanice sudjeluju u stvaranju ugrušaka upravo zbog zgrušavanja celomske tekućine. Pretpostavlja se da su vibratilne stanice analogne trombocitima kod kralješnjaka (Johnson, 1969b; Bertheussen i Seljelid, 1978).

### 1.1.1.4. Kristalne stanice

Kristalne stanice su prepoznatljive po karakterističnom romboidnom obliku. Dužina im je 4 do 5  $\mu\text{m}$ , a širina 7 do 8  $\mu\text{m}$ . Stanica je ispunjena sferičnom ili pravokutnom inkluzijom (Slika 3C), srpasta jezgra je smještena na samoj periferiji stanice, a citoplazme ima veoma malo (Chia i Xing, 1996; Eliseikina i Magarlamov, 2002). Neki autori smatraju da je ta inkluzija kristal, koji se pod utjecajem manjeg osmotskog stresa, razgradi (Endean, 1958, 1966; Smiley, 1994). Potrebno je naglasiti da se u celomskoj tekućini mogu naći i veoma slični celomociti s velikom centralnom vakuolom koja ne reagira na histokemijske boje i u kojoj se ponekad nalazi mali kristal. Primijećeno je da se ti celomociti pretvaraju u kristalne stanice u okolnostima kod kojih dolazi do povećanja osmotskog tlaka u mediju (Eliseikina i Magarlamov, 2002). Smatra se da kristalne stanice sudjeluju u osmoregulaciji upravo zbog reverzibilne kristalizacije (Chia i Xing, 1996; Eliseikina i Magarlamov, 2002). U vrste *H. leucospilota* taj centralni dio stanice je zelene boje (Chia i Xing, 1996).

### **1.1.1.5. Progenitorne stanice**

Progenitorne stanice su male okrugle ili jajaste stanice, promjera 6 do 8  $\mu\text{m}$ , koje imaju veliku jezgru i veoma malo citoplazme (Slika 3D). Jezgra ima izraženu jezgricu, a u citoplazmi dominira endoplazmatski retikulum (Fontaine i Lambert, 1977; Canicatti i sur., 1989a; Eliseikina i Magarlamov, 2002). Progenitorne stanice su nađene samo u stapčarima i trpovima (Smith, 1981). Pretpostavlja se, no nikad za to nije nađen dokaz, da su ove stanice prekursor ostalim celomocitima, kao fagocitima i sferulocitima (Fontaine i Lambert, 1977; Eliseikina i Magarlamov, 2002). Progenitorne stanice strukturalno i funkcionalno odgovaraju limfocitima kod kralješnjaka jer obje vrste stanica mogu proizvesti molekule slične antitijelima (Fontaine i Lambert, 1973; Ratcliffe i Millar, 1988). Kao što je već prije navedeno, progenitorne stanice sudjeluju, zajedno s fagocitima i sferulocitima, u odbacivanju transplantata i odgovorne su za uništavanje stranog tkiva (Hildemann i Dix, 1972; Karp i Hildemann, 1976).

## **1.2. Protočna citometrija**

Protočna citometrija je tehnologija kojom se istovremeno mjere, a potom analiziraju mnoge fizikalne karakteristike pojedinih čestica, obično stanica, dok prolaze u suspenziji kroz snop svjetlosti (najčešće laser s valnom duljinom od 488 nm). Protočni citometar je kombinacija optike (lasera), mehaničkog sustava koji omogućuje protok čestica i elektroničkog računala. Uzorak može biti obojan prije analize protočnim citometrom. Najčešće se koristi fluorescentna boja koja se u stanici može vezati na membranske, citoplazmatske ili jezgrene dijelove. Mehanički sustav inducira protok čestica (stanica ili jezgara) što omogućuje analizu velikog broja čestica u vrlo kratkom razdoblju. Laser pomoću fotomultiplikatora stvara koherentno svjetlo koje pobuđuje fluorescenciju čestica obojanih fluorescentnom bojom. Tijekom prolaska čestice kroz svjetlo emitira se signal u vidljivom dijelu spektra (najčešće fluorescencija) koji optički filtri usmjeravaju prema odgovarajućem kanalu. Protočni citometar bilježi kako čestica odbija (raspršuje) upadnu lasersku zraku svjetlosti i kako fluorescira (emitira fluorescenciju). Dobiveni signali se pretvaraju u elektronički signal koje potom računalo obradi. Na računalu se dobiveni signali mogu prikazati u različitim kombinacijama na osnovu kojih se određuju brojni parametri, a budući

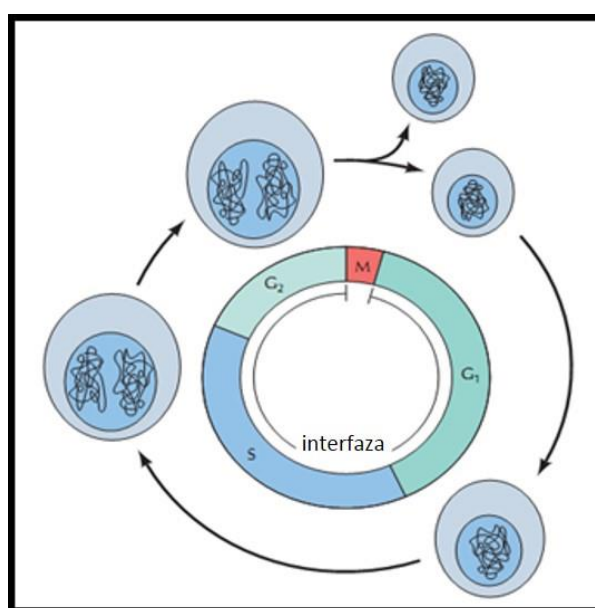
da se čestice analiziraju pojedinačno rezultat je mnoštvo podataka koje je moguće grupirati u populacije ovisno o razlikama u mjernim parametrima.

Kalibracija mjernog aparata obavlja se pomoću standarda. U slučaju detekcije sadržaja DNA koriste se standardizirane kuglice, npr. DNA - Check Fluorospheres ili eritrociti pastirve. Kalibracijom se provjerava točnost i linearnost mjernog aparata, a optimalna rezolucija se postiže sporim protokom uzoraka. Kalibracijom se također osigurava i stalni položaj diploidnog maksimuma, stalna srednja vrijednost intenziteta fluorescencije i koeficijent varijacije (CV) kod fluorescencije unutar očekivanog raspona, te se tako postiže kontrola kvalitete analize DNA (Shapiro, 2005; Cossarizza i sur., 2005).

### 1.3. Stanični ciklus

Sve se eukariotske stanice razmnožavaju staničnom diobom na način da se roditeljska stanica dijeli te nastaju dvije stanice kćeri. Novonastale stanice dalje i same rastu i dijele se, te na taj način omogućuju nastajanje velikog broja stanica koje sve proizlaze od jedne roditeljske stanice.

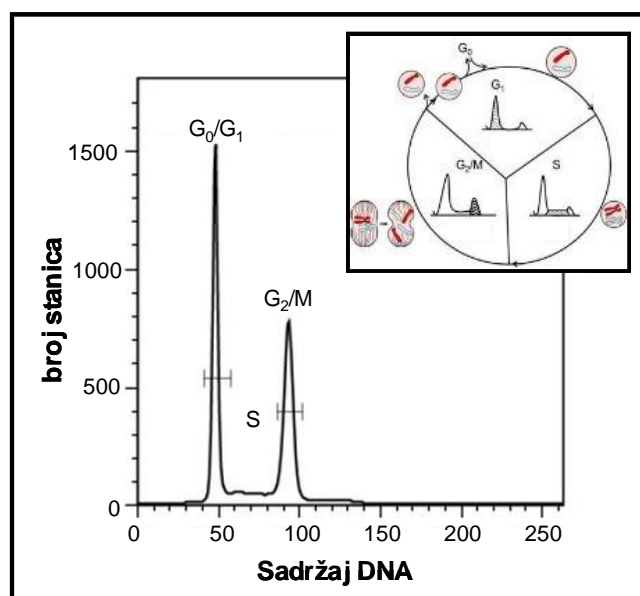
Stanični ciklus većine stanica sastoji se od četiri procesa koji su međusobno povezani: staničnog rasta, replikacije DNA, raspodjele udvostručenih kromosoma stanicama kćerima i podjele stanica (Slika 4).



Slika 4. Stanični ciklus eukariota (Preuzeto iz Cooper i Hausman, 2010).



Stanični ciklus čine dva osnovna dijela: mitoza i interfaza. Mitoza (razdoblje staničnog ciklusa u kojem se odvajaju kromosomi stanica kćeri) i citokineza (dioba stanice) traju otprilike jedan sat, a ostalih 95% staničnog ciklusa zauzima interfaza (razdoblje između dvije mitoze). Tijekom interfaze se odvijaju stanični rast i replikacija DNA koji prethode diobi, kromosomi su dekondezirani i raspoređeni po cijeloj jezgri, te jezgra tada morfološki izgleda jednolično. Interfaza je podijeljena u tri faze: G<sub>1</sub> - faza u kojoj je stanica metabolički aktivna i neprestano raste, ali bez replikacije DNA, S - faza (sinteza) u kojoj se odvija replikacija DNA i G<sub>2</sub> - faza u kojoj se nastavlja stanični rast i sinteza proteina potrebnih za pripremu mitoze. Nakon G<sub>2</sub> faze započinje mitoza (M faza). Faza mirovanja naziva se G<sub>0</sub> faza u kojoj se stanice ne dijele, a imaju isti sadržaj DNA kao i stanice u G<sub>1</sub> fazi. Stanice u G<sub>0</sub> fazi su metabolički aktivne, ali ne proliferiraju sve dok ih na to ne potaknu odgovarajući izvanstanični signali.

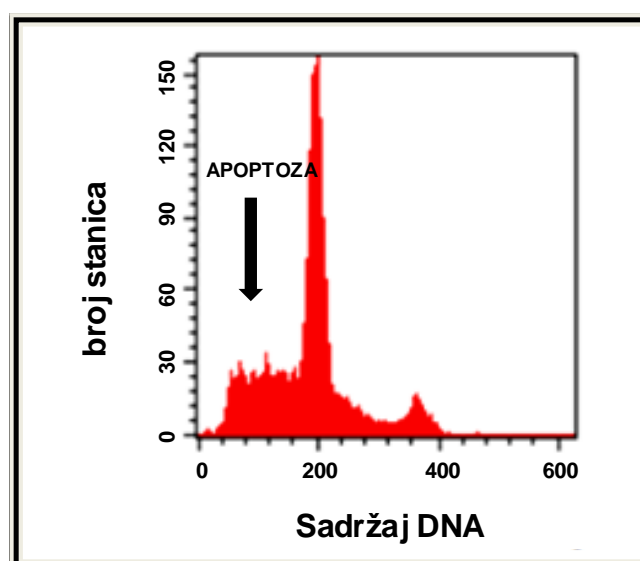


**Slika 5.** Histogramski prikaz sadržaja DNA određenog protočnom citometrijom nakon bojanja DNA fluorescentnom bojom. U okviru: histogrami sadržaja DNA za pojedine faze staničnog ciklusa.

Stanice u različitim stadijima staničnog ciklusa mogu se raspoznati prema njihovom sadržaju DNA, pa se analiza staničnog ciklusa zasniva upravo na identifikaciji broja stanica u različitim fazama. Životinjske stanice u G<sub>1</sub> fazi sadržavaju dvije kopije svakog kromosoma, tj. diploidne su i njihov se sadržaj DNA označuje kao  $2n$  (gdje  $n$  označuje haploidni sadržaj DNA genoma). U S fazi, za vrijeme replikacije, sadržaj DNA povećava se sa  $2n$  na  $4n$ , tako da je u toj fazi sadržaj DNA između  $2n$  i  $4n$ . U G<sub>2</sub> fazi i M fazi sadržaj DNA ostaje na  $4n$ . Tek se nakon citokineze ponovno vraća na  $2n$ .

Eksperimentalno se stanični sadržaj DNA može odrediti tako da se stanice inkubiraju s fluorescentnom bojom koja ima visoki afinitet vezanja na DNA molekulu, a potom se protočnom citometrijom analizira intenzitet fluorescencije te se na taj način određuje udio jezgri u fazama G1, S i G2/M staničnog ciklusa (Slika 5). Tako se količina DNA koristi kao marker stanične zrelosti u staničnom ciklusu jer može ukazati na proliferacijski status analiziranih čestica (Cooper i Hausman, 2010). Uslijed različitih vanjskih i unutrašnjih čimbenika može doći do oštećenja stanice s posljedicama koje bi mogle biti kobne ukoliko bi se stanica nastavila dijeliti. Promjenom staničnog ciklusa, zastojem ili zaustavljanjem proliferacije, sprječavaju se takve negativne posljedice. Razni genotoksični agensi iz okoliša dovode do oštećenja DNA (kromosomske aberacije, izmjena sestrinskih kromatida, nastajanje mikronukleusa, jednolančani i dvolančani lomovi i umrežavanja DNA), te uslijed toga dolazi do zastoja u proliferaciji (zaustavljanja G1 faze, "G1-arrest" i odgode G2 faze, "G2-delay"). Ako mehanizmi popravka DNA ne uspiju sanirati nastalu štetu dolazi do apoptoze, odnosno programirane stanične smrti kod koje dolazi do letalnih morfoloških promjena. Tijekom apoptoze, molekula DNA je fragmentirana, jezgra se raspada u male komadiće, te se u konačnici i sama stanica raspadne u komadiće okružene membranom (Slika 6) (Cooper i Hausman, 2010; Cossarizza i sur., 2005).

Dokazano je da izlaganje dagnje *Mytilus galloprovincialis* raznim okolišnim agensima dovodi do promjena u staničnom ciklusu hemocita - potvrđene su razlike u integritetu DNA između jedinki ( $CV > 8$ ), aneuploidija i apoptoza (Bihari i sur., 2003).



**Slika 6.** Histogramski prikaz sadržaja DNA određenog protočnom citometrijom kod stanica kod kojih je nastupila apoptoza.

## 2. CILJ I HIPOTEZA ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi

a) dijele li se celomociti trpa u celomskoj šupljini,

b) može li analiza staničnog ciklusa celomocita trpa protočnom citometrijom ukazati na pritisak antropogenih aktivnosti u okolišu u kojem je trp boravio tj. je li trp dobar bioindikatorski organizam za utvrđivanje prisutnosti genotoksičnih agensa u moru.

U skladu s time postavljena je hipoteza da će antropogeni pritisak na postajama gdje su sakupljeni trpovi utjecati na stanični ciklus i integritet DNA.

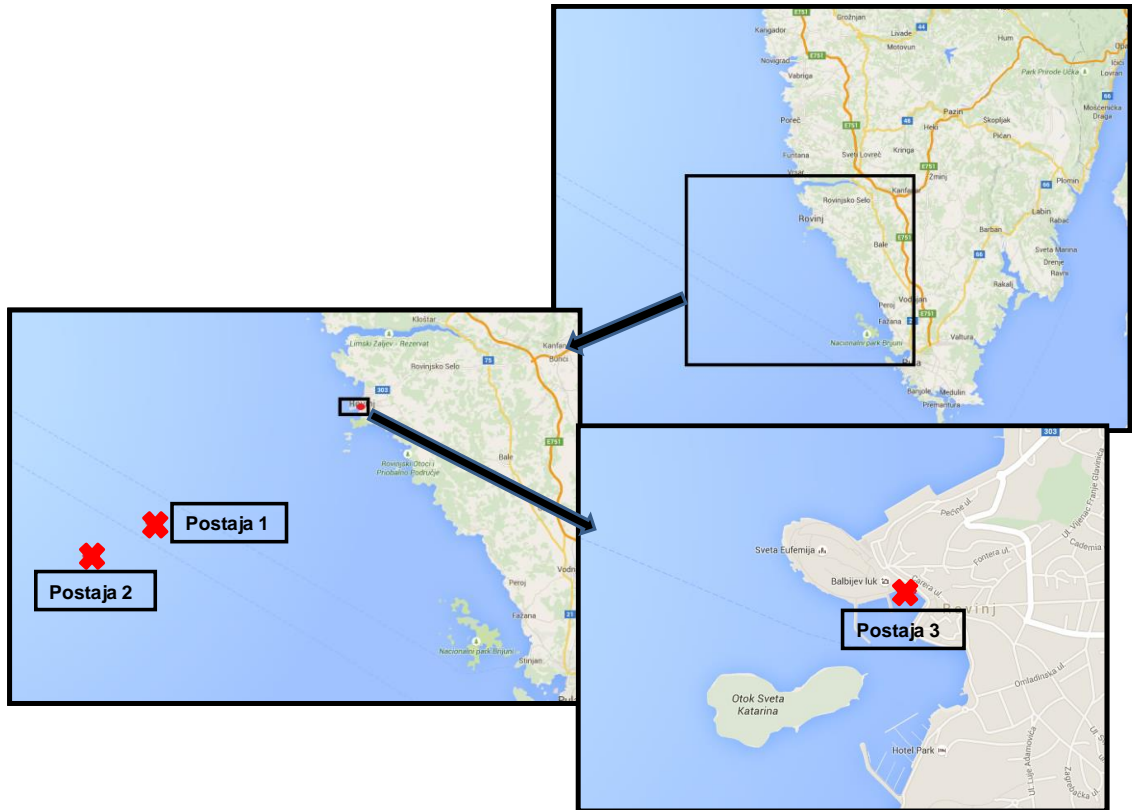
### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije

U radu su korištene slijedeće kemikalije: DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, PARTEC, Njemačka), Giemsa otopina za mikroskopiju u hematologiji i mikrobiologiji (1 L  $\approx$  0,99 kg, Giemsa solution, Kemika, Zagreb).

#### 3.2. Odabir postaja i uzorkovanje

Trpovi su prikupljeni na tri postaje s različitim antropogenim pritiskom u okolici Rovinja, s dubina od 1 do 40 m (Slika 7). Postaja broj 1 (P1) je u kontrolnom području u otvorenim vodama gdje se pretpostavlja da je antropogeni pritisak minimalan. Na toj postaji, s dubina od 30 do 35 m, roniaci su prikupili 7 jedinki. Postaja broj 2 (P2) je podmorje ispod plutajućeg gorućeg broda *UND Adriyatik*. Teretni brod *UND Adriyatik* se 6. veljače 2008. g. zapalio 13 nautičkih milja zapadno od Rovinja. Obzirom da je u tom razdoblju godine vodeni stupac izmiješan, pretpostavka je da su produkti gorenja dospjeli do dna. U podmorju ispod linije kojom je zapaljeni brod plutao nošen strujama, u kratkom vremenskom razdoblju nakon incidenta, prikupljeno je 19 trpova s dubina od 35 do 40 m. Postaja broj 1 (P1) nalazila se izvan područja plutanja zapaljenog broda a uzorci su sakupljeni istovremeno kada i na P2. Postaja broj 3 (P3) je u rovinjskoj luci gdje je grabilom prikupljeno 8 jedinki s dubine od 1 m u ožujku 2013. Prikupljeni trpovi su preneseni u laboratorij te im je odmah izolirana celomska tekućina, a organizmi su potom vraćeni u more.



Slika 7. Karta s označenim postajama.

### 3.3. Priprema uzoraka i bojanje jezgri

Celomska tekućina izolirana je špricom iz tjelesne šupljine lateralno, 3 do 5 cm od analnog otvora. 500  $\mu$ l celomske tekućine je odmah nakon izolacije stavljeno u epruvete s 400  $\mu$ l natrij-citrata (VACUETTE<sup>®</sup>, Greiner Bio-One GmbH, Njemačka), da bi se spriječila koagulacija.

Uzorak (500  $\mu$ l) je nakon dodavanja 1 ml otopine DAPI (PARTEC, Njemačka), inkubiran na sobnoj temperaturi 5 minuta, te kasnije profiltriran kroz filter (30  $\mu$ m) i analiziran protočnim citometrom.

Za pripremu mikroskopskih preparata, u izoliranu celomsku tekućinu jedinki s postaje 3 dodano je 50  $\mu$ l Giemsa otopine (Kemika) te inkubirano na sobnoj temperaturi 15 minuta.

### **3.4. Protočna citometrija**

Za analizu celomocita korišten je PAS III protočni citometar (PARTEC, Njemačka), uz korištenje standardnih uvjeta (PARTEC, Njemačka) za detekciju DAPI signala (FL6), nakon pobude živinom lampom (100 W), uz brzinu protoka 200 - 400 stanica u sekundi. Instrument je baždaren po uputama proizvođača korištenjem standarda eritrocita pastreve obojenih DAPI bojom.

Za određivanje staničnog ciklusa trpa analizirane su 34 jedinke i to minimalno 20 000 stanica po jedinki. Napon fotomultiplikatora je podešen da se histogram 2C maksimuma održi na konstantnoj vrijednosti fluorescencije. Rezultati su prikazani kao histogram broja jezgri u svakom od 264 kanala (linearno amplificirana fluorescencija = gdje je broj kanala proporcionalan intenzitetu fluorescencije). Analiziran je položaj maksimuma koji se odnose na pojedine faze staničnog ciklusa, postotak stanica u svakom pojedinom maksimumu i koeficijent varijacije svakog pojedinog maksimuma korištenjem komercijalnog programa FloMax® - Software for Cytometry, Version 2.4 (PARTEC, Njemačka).

### **3.5. Svjetlosna mikroskopija**

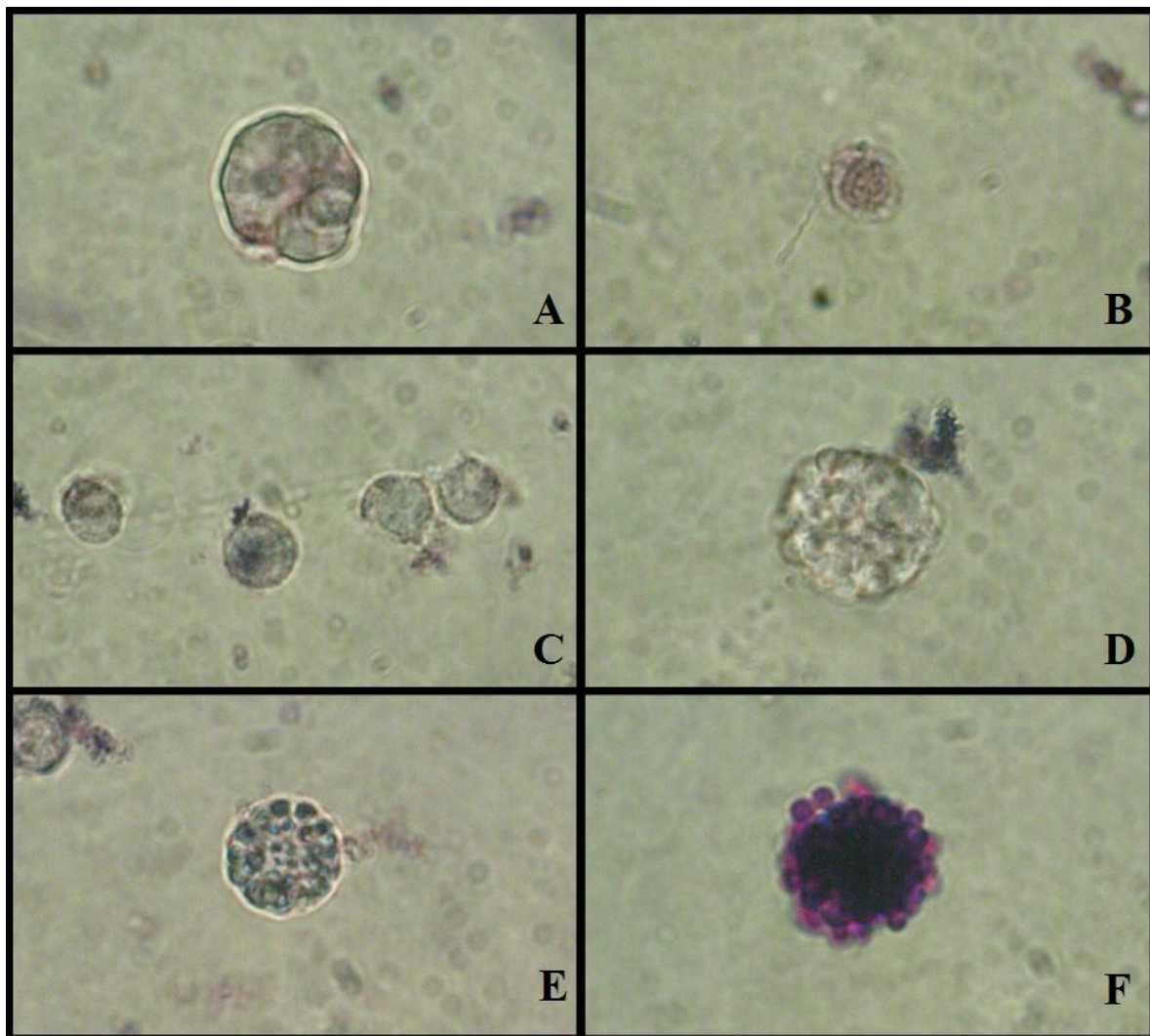
Uzorak celomske tekućine obojan Giemsa otopinom promatran je pod Olympus BX51 svjetlosnim mikroskopom uz povećanje od 400x.

Na mikroskop je postavljen fotoaparatus Olympus Camedia C4040 Zoom kojim su fotografirane stanice i pohranjene u računalo.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Celomociti

U celomskoj tekućini sakupljenih jedinki vrste *Holothuria tubulosa*, svjetlosnim je mikroskopom utvrđeno postojanje šest različitih vrsta stanica (Slika 8).



**Slika 8.** Celomociti trpa: **A** – petaloidan fagocit, **B** – vibratilna stanica, **C** – progenitorne stanice, **D** – bezbojni sferulocit, **E** – zeleni sferulocit, **F** – crveni sferulocit.

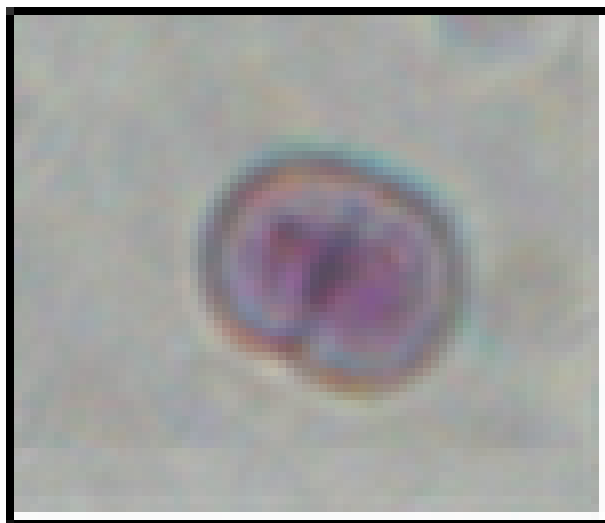
Prva vrsta stanice (Slika 8A) ima nepravilan oblik. Jasno je vidljiva jezgra, a stanična membrana na jednoj strani ima pseudopodije u obliku latica, odnosno petaloidan oblik, pa se pretpostavlja da se radi o stanici fagocita.

Druga vrsta stanica (Slika 8B) je veličinom manja od prve vrste stanica. Jezgra je jasno vidljiva, stanica je sferična i veoma je jasno uočljiv dugačak bič. Pretpostavlja se da je to vibratilna stanica

Treća vrsta stanica (Slika 8C) je veličinom najmanja. Te stanice su okruglog oblika, a njihov najveći dio zauzima jasno vidljiva jezgra. Na Slici 8C vide se četiri takve stanice i pretpostavlja se da su to progenitorne stanice.

Četvrta, peta i šesta vrsta stanica (Slika 8D, 8E, 8F) imaju veoma sličnu strukturu: ispunjene su granulama te podsjećaju na morulu. Jezgra im je skroz prekrivena granulama tako da nije uočljiva. Veličinom su slične prvoj vrsti stanica. Te tri posljednje vrste celomocita razlikuju se između sebe po boji granula. Jasno se razlikuju stanice s granulama koje možemo opisati kao prozirne ili bezbojne, stanice s granulama čija boja varira između plave i zelene, te stanice s granulama intenzivne crveno-ljubičaste boje. To su bezbojni sferulocit (Slika 8D), zeleni sferulocit (Slika 8E) i crveni sferulocit (Slika 8F).

Svjetlosnim mikroskopom je uočena i stanična dioba celomocita (Slika 9).



**Slika 9.** Stanična dioba celomocita.

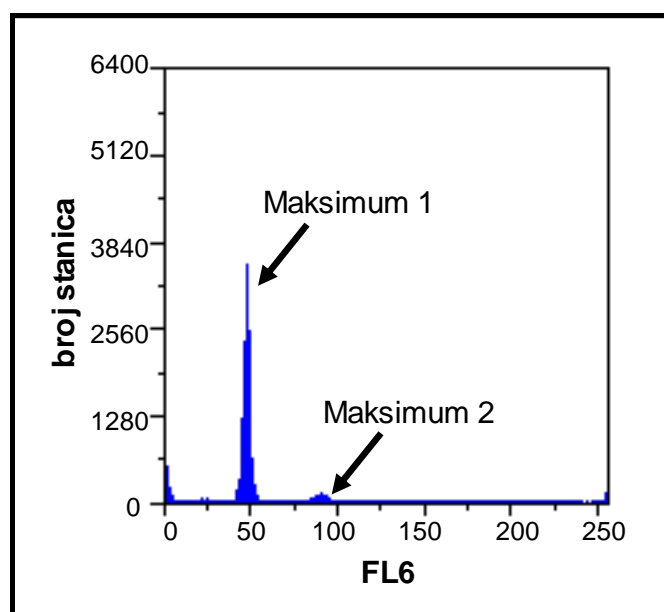


## 4.2. Sadržaj DNA i stanični ciklus

Rezultati uključuju sadržaj DNA i analizu staničnog ciklusa celomocita jedinki trpa *Holothuria tubulosa* protočnom citometrijom sakupljenih na tri postaje u okolici Rovinja. Dvije postaje su pod antropogenim utjecajem (rovinjska luka - P3 i podmorje ispod plutajućeg gorućeg broda- P2), te jedna postaja kao kontrolno područje (P1).

### 4.2.1. Postaja 1

Histogram fluorescencije DNA u jezgrama celomocita trpa prikazan je na Slici 10. Iz histograma su vidljiva dva maksimuma. Prvi maksimum ima poziciju kanala na 45,05, a drugi maksimum ima poziciju kanala na 87,93 srednje vrijednosti broja kanala.



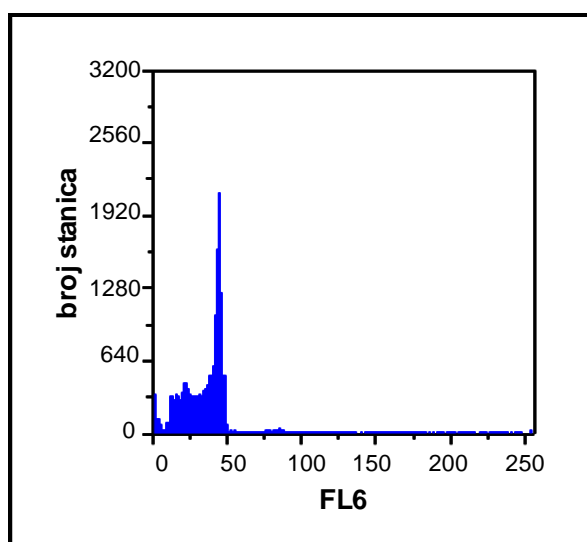
Slika 10. Raspodjela fluorescentnog signala jezgri celomocita trpa.

Kod jedinki kod kojih je potvrđen stanični ciklus, analizom histograma fluorescencije izračunat je udio pojedinih faza staničnog ciklusa trpa i prikazan u Tablici 1.

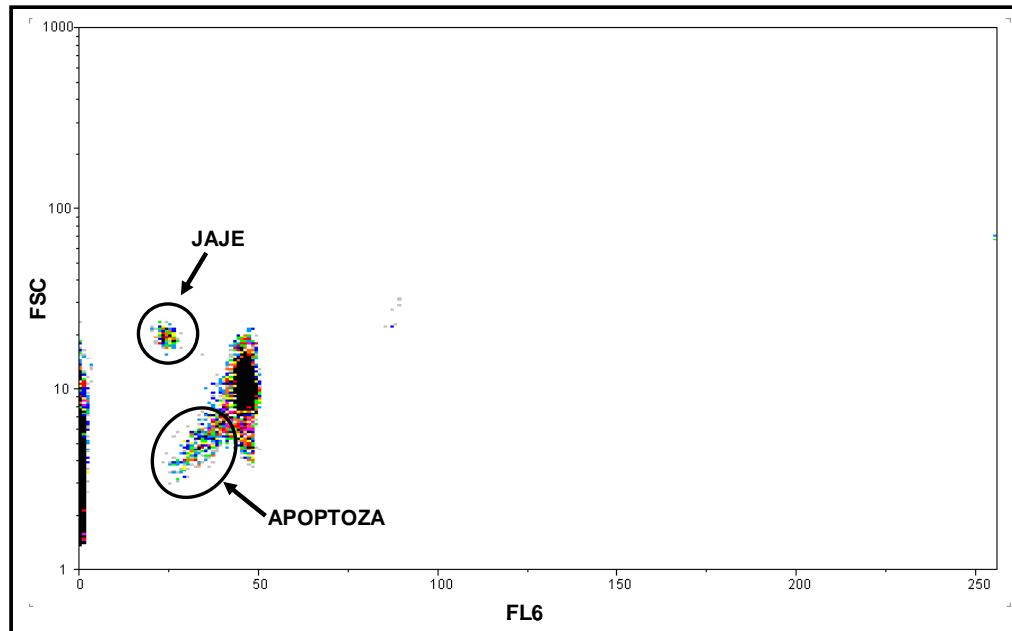
**Tablica 1.** Udio pojedinih faza staničnog ciklusa kod jedinki s postaje 1 (P1).

| Broj                             | G0/G1(%) | S (%) | G2/M (%) | CV % G1 |
|----------------------------------|----------|-------|----------|---------|
| 1.                               | 87,06    | 5,20  | 7,74     | 8,42    |
| 2.                               | apoptoza |       |          | 6,68    |
| 3.                               | 89,71    | 3,79  | 6,49     | 4,18    |
| 4.                               | 92,07    | 2,98  | 4,96     | 4,31    |
| 5.                               | 87,50    | 4,38  | 8,12     | 4,37    |
| 6.                               | 86,20    | 6,07  | 7,73     | 3,93    |
| 7.                               | 82,07    | 16,11 | 1,82     | 4,62    |
| <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b>    | 88,51    | 4,48  | 7,01     | 4,97    |
| <b>STANDARDNA<br/>DEVIJACIJA</b> | 2,38     | 1,20  | 1,30     | 1,70    |

Srednja vrijednost postotka stanica u G0/G1 fazi iznosi 88,51% ( $\pm 2,38$ ), u S fazi 4,48% ( $\pm 1,20$ ), u G2/M fazi 7,01% ( $\pm 1,30$ ), a srednja vrijednost CV G0/G1, koji služi kao indikator kvalitete histograma (Bihari i sur., 1999), je 4,97% ( $\pm 1,70$ ). U jednoj jedinki je potvrđen stanični ciklus, ali je postotak stanica u S fazi 16,11%, a onih u G2/M fazi samo 1,82%. U drugoj je pak uočen povećan broj stanica ispred maksimuma G0/G1 (Slika 11) koji bi mogli ukazivati na apoptotične fragmente.


**Slika 11.** Histogram fluorescencije jezgri celomocita kod kojih je nastupila apoptoza.

Dodatnom analizom raspodjele obojanih čestica obzirom na veličinu utvrđeni su apoptični fragmenti (Slika 12).



**Slika 12.** Raspodjela čestica obzirom na veličinu (FSC) i intenzitet fluorescentne boje (FL6) u uzorku celomocita s postaje P1. Na slici je označeno koji fragmenti ukazuju na apoptozu.

U istom uzorku utvrđena je i prisutnost spolnih stanica (jaja) na karakterističnom položaju haploidnog sadržaja DNA i jezgre veće od somatskih jezgara.

#### 4.2.2. Postaja 2

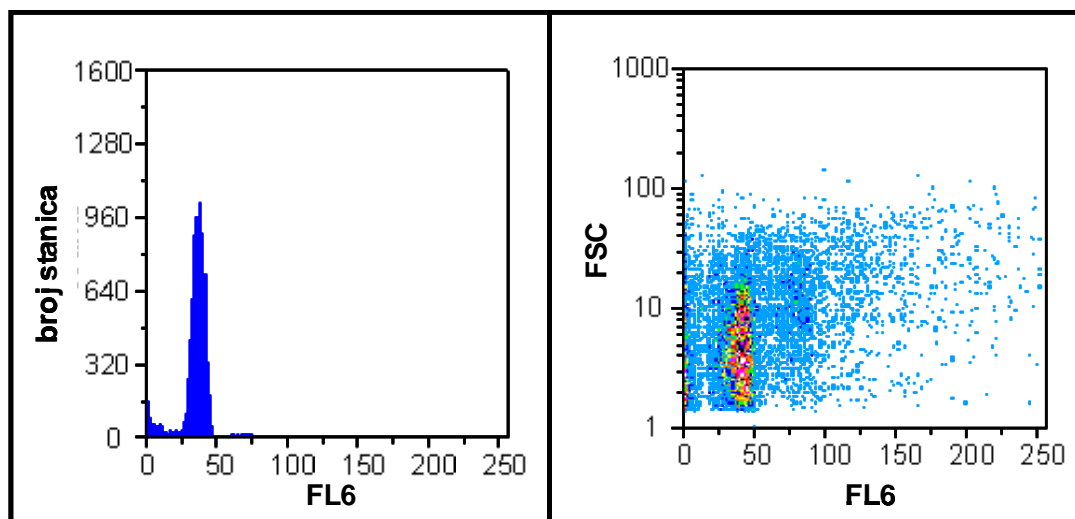
Na postaji 2, u 14 jedinki je utvrđen stanični ciklus, a analizom histograma fluorescencije izračunat je udio pojedinih faza staničnog ciklusa (Tablica 2).

**Tablica 2.** Udio pojedinih faza staničnog ciklusa kod jedinki s postaje 2 (P2).

| Broj                             | G0/G1(%)     | S (%) | G2/M (%) | CV % G1 |
|----------------------------------|--------------|-------|----------|---------|
| 1.                               | 87,51        | 3,08  | 9,41     | 5,47    |
| 2.                               | nema ciklusa |       |          | 9,66    |
| 3.                               | nema ciklusa |       |          | 12,00   |
| 4.                               | 90,51        | 3,00  | 6,49     | 6,61    |
| 5.                               | 88,50        | 4,45  | 7,05     | 5,13    |
| 6.                               | 93,68        | 2,17  | 4,15     | 5,96    |
| 7.                               | 92,51        | 2,46  | 5,04     | 6,53    |
| 8.                               | 82,17        | 10,03 | 7,80     | 4,75    |
| 9.                               | 83,68        | 4,31  | 12,02    | 4,86    |
| 10.                              | 94,62        | 1,95  | 3,43     | 8,47    |
| 11.                              | 86,54        | 5,87  | 7,60     | 6,71    |
| 12.                              | 90,06        | 4,35  | 5,59     | 7,10    |
| 13.                              | 94,21        | 2,52  | 3,27     | 8,30    |
| 14.                              | 93,89        | 3,27  | 2,84     | 5,89    |
| 15.                              | 88,62        | 3,83  | 7,55     | 5,36    |
| 16.                              | nema ciklusa |       |          | 6,07    |
| 17.                              | 82,36        | 7,31  | 10,34    | 6,89    |
| 18.                              | nema ciklusa |       |          | 9,32    |
| 19.                              | nema ciklusa |       |          | 16,00   |
| <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b>    | 89,20        | 4,19  | 6,61     | 6,29    |
| <b>STANDARDNA<br/>DEVIJACIJA</b> | 4,36         | 2,24  | 2,77     | 1,17    |

Srednja vrijednost postotaka stanica u G0/G1 fazi iznosi 89,20% ( $\pm 4,36$ ), u S fazi 4,19% ( $\pm 2,24$ ), a u G2/M fazi 6,61% ( $\pm 2,77$ ). Srednja vrijednost CV G0/G1 je 6,29% ( $\pm 1,17$ ).

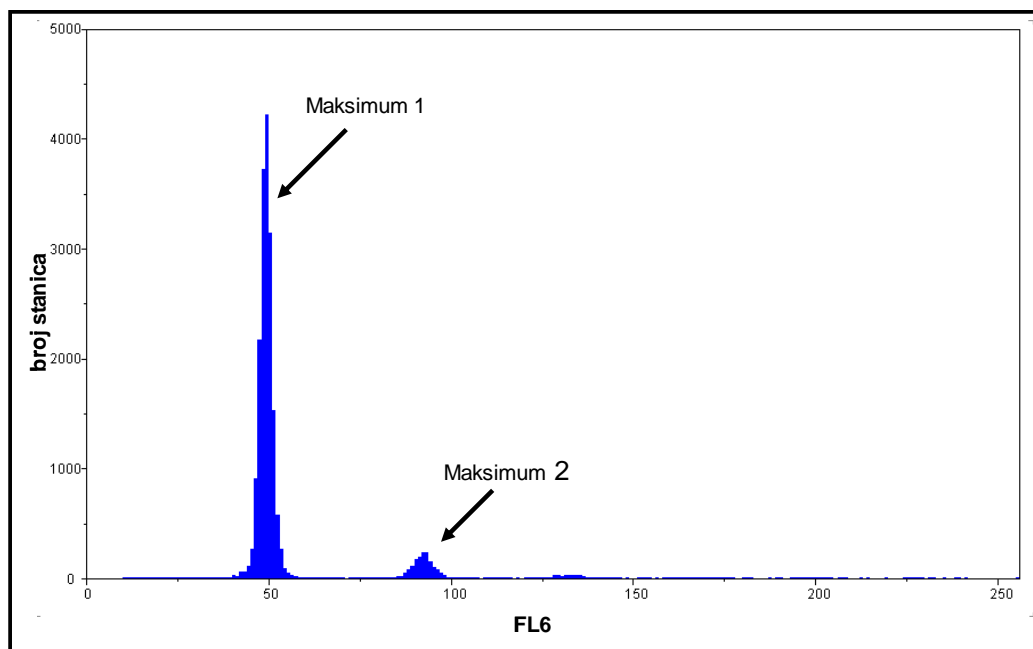
Od 19 analiziranih trpova, u 5 jedinki nije uočen stanični ciklus. Histogram fluorescencije kod tih jedinki prikazuje samo jedan maksimum (Slika 13A). Osim izostanka staničnog ciklusa utvrđena je i velika raspršenost fluorescencije (Slika 13B) maksimuma 1.



**Slika 13.** Histogram fluorescencije jezgri celomocita trpa kod kojih nema staničnog ciklusa i imaju samo jedan maksimum: **A** – broj obojanih jezgara obzirom na sadržaj DNA (FL6); **B** – raspodjela obojanih jezgri (FL6) obzirom na veličinu (FSC).

#### 4.2.3. Postaja 3

U svim uzorcima celomocita trpa sakupljenih u rovinjskoj luci utvrđen je stanični ciklus, a histogram fluorescencije DNA u jezgrama celomocita trpa prikazan je na Slici 14.



**Slika 14.** Histogram fluorescencije jezgri celomocita s utvrđenim staničnim ciklusom.

Analizom histograma fluorescencije izračunat je udio pojedinih faza staničnog ciklusa trpa i prikazan je u Tablici 3. Postotak stanica u G0/G1 fazi iznosi 91,07% ( $\pm 2,90$ ), u S fazi 1,70% ( $\pm 1,27$ ), u G2/M fazi 7,25% ( $\pm 1,03$ ), a CV G0/G1 je 4,67% ( $\pm 1,03$ ).

**Tablica 3.** Udio pojedinih faza staničnog ciklusa kod jedinki s postaje 3.

| Broj                             | G0/G1(%) | S (%) | G2/M (%) | CV % G1 |
|----------------------------------|----------|-------|----------|---------|
| 1.                               | 90,03    | 0,41  | 9,56     | 3,85    |
| 2.                               | 94,34    | 2,99  | 2,67     | 5,71    |
| 3.                               | 88,67    | 2,28  | 9,05     | 5,41    |
| 4.                               | 90,71    | 0,83  | 8,54     | 3,39    |
| 5.                               | 89,06    | 1,35  | 9,60     | 4,35    |
| 6.                               | 88,20    | 3,73  | 8,07     | 3,95    |
| 7.                               | 91,10    | 1,92  | 6,99     | 6,33    |
| 8.                               | 96,43    | 0,07  | 3,50     | 4,36    |
| <b>SREDNJA<br/>VRIJEDNOST</b>    | 91,07    | 1,70  | 7,25     | 4,67    |
| <b>STANDARDNA<br/>DEVIJACIJA</b> | 2,90     | 1,27  | 2,71     | 1,03    |

Rezultati pokazuju da tri jedinke imaju snižen postotak stanica u S fazi, a kod jedne od tih jedinki je i postotak stanica u G2/M fazi znatno snižen.

## 5. RASPRAVA

Analizom sadržaja DNA u celomocitima trpa *Holothuria tubulosa* sakupljenih na tri postaje s različitim antropogenim utjecajem pokušao se dokazati utjecaj antropogenog pritiska u okolišu na stanični ciklus i integritet DNA.

U celomocitima trpa s kontrolnog područja (P1) dokazan je stanični ciklus u 6 jedinki. Histogram fluorescencije DNA jezgara celomocita prikazuje dva maksimuma koji ukazuju na broj jezgri u G0/G1 fazi (maksimum 1) i G2/M fazi (maksimum 2). Omjer njihovih položaja teoretski bi trebao iznositi 2, što je omjer  $4n$  i  $2n$  populacija jezgara, što bi trebalo ukazivati na stanični ciklus. Srednja vrijednost tog omjera kod svih analiziranih trpova kod kojih je potvrđen stanični ciklus iznosi 1,94 ( $\pm 0,07$ ). Nadalje, postotak jezgara u S fazi ukazuje da se celomociti dijele unutar celomske šupljine, što je također uočeno pod svjetlosnim mikroskopom.

Kod jedne jedinke uočen je povećan broj stanica ispred maksimuma G0/G1, što ukazuje na manje fragmente DNA, te dokazuje apoptozu (Cossarizza i sur., 2005). Nadalje, kod jedne jedinke s istog područja, kod koje je postotak stanica u S fazi veći od postotka stanica u G2/M fazi, može se zaključiti da je došlo do intenzivne i nagle proliferacije celomocita.

Takvi rezultati i CV G0/G1 4,97% ( $\pm 1,70$ ) koji ukazuje na relativno visok integritet DNA prema Bihari i sur., 2003 i Bihari i sur., 1999 dovode do očekivanog zaključka da jedinke s kontrolnog područja nisu pod utjecajem nikakvih genotoksičnih agensa.

Obzirom na dokazane promjene staničnog ciklusa pod utjecajem zagađivala utvrđene u drugim beskralješnjacima (Bihari i sur., 2003), iz dobivenih rezultata se može vidjeti da rovinjska luka (P3) nije područje pod utjecajem genotoksičnih zagađivala jer nema promjena u staničnom ciklusu celomocita kao što su apoptoza, aneuploidija i razlika u integritetu DNA između jedinki (CV > 8) (Bihari i sur., 1999). U svim jedinkama s postaje 3 utvrđen je stanični ciklus. Ipak, kod tri jedinke kod kojih je veoma snižen postotak stanica u S fazi, ukazujući na zastoj pojedinih faza staničnog ciklusa i obzirom na visok integritet DNA koji služi kao indikator kvalitete histograma (CV G0/G1 iznosi 4,67% ( $\pm 1,03$ )) (Bihari i sur.,

1999), može se zaključiti da u tom području nema akutnih genotoksina već se radi o prirodnom fenomenu.

Nadalje, rezultati pregleda mikroskopskih preparata svjetlosnim mikroskopom dokazali su prisutnost petaloidnih fagocita dok filopoidni fagociti nisu uočeni što potvrđuje da u tim jedinkama nisu prisutne strane tvari (Hérouard, 1889; Théel, 1919; Kindred, 1924) te dodatno ukazuje da rovinjska luka nije pod stresnim okolišnim uvjetima (Eliseikina i Magarlamov, 2002). Među pronađenim stanicama koje su po veličini najmanje, jasno možemo razlikovati vibratilne stanice s izraženim bičem (Slika 8B) i progenitorne stanice kojima najveći dio stanice zauzima jezgra (Kindred, 1924; Jourdan, 1883; Fontaine i Lambert, 1977). Pronađene vrste stanica koje podsjećaju na morulu (Slika 8 D – F) su različite vrste sferulocita (Théel, 1921; Endean, 1958). Uočeni su bezbojni sferulociti, zeleni sferulociti i crveni sferulociti (Endean, 1966; Smith, 1981). Žuti sferulociti nisu pronađeni, kao ni kristalne stanice. Moguće je da kristalne stanice nisu uočene jer nije došlo do povećanja osmotskog tlaka budući da su organizmi cijelo vrijeme bili u prirodnom mediju (Eliseikina i Magarlamov, 2002; Chia i Xing, 1996).

Na postaji 2, kao što se i očekivalo, dokazane su promjene u staničnom ciklusu. Čak kod 5 jedinki nije pronađen stanični ciklus, odnosno uočen je nedostatak S faze, isto kao i drugi maksimum koji se odnosi na G2/M fazu. Kod tih 5 jedinki pronađen je samo jedan maksimum koji se odnosi na G0 fazu. To ukazuje na zaustavljanje G1 faze ("G1-arrest"), vjerojatno zbog oštećenja DNA, do kojeg je došlo uslijed izlaganja organizama zagađivalima ispuštenih s broda u plamenu (Bihari i sur., 2003; Bihari i sur., 1999). Kod četiri od tih jedinki koeficijent varijacije fluorescencije maksimuma 1 (CV G0/G1) je iznad 9, a kod dvije od tih čak iznad 12, što ukazuje na veoma niski integritet DNA posljedično oštećenju DNA (Bihari i sur., 2003; Debenest i sur., 2013). S istog tog područja, u dvije jedinke kod kojih je zabilježen stanični ciklus, uočeno je da je postotak jezgri u S fazi veći od onih u G2/M fazi. To bi moglo ukazivati na odgodu G2 faze ("G2-delay") (Bihari i sur., 1999) što potvrđuje sniženi integritet DNA. Do zaustavljanja raznih faza staničnog ciklusa dolazi iz razloga što je mehanizmima za popravak DNA potrebno određeno vrijeme da izvrše popravak (Bihari i sur., 1990). Ukoliko je broj oštećenja DNA velik, nastupa programirana stanična smrt (Mičić i sur., 2001).

Dobiveni rezultati poslužiti će kao osnova za daljnja istraživanja u području fiziologije, a budući da se može dokazati utjecaj zagađivala na stanični ciklus celomocita trpa, ovaj



organizam koji se hrani sedimentom u kojem se akumuliraju zagađivala, može se koristiti u ekotoksikološkim istraživanjima kao bioindikatorska vrsta.

## 6. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata i njihove analize moguće je zaključiti sljedeće:

- 1) Celomociti trpa *Holothuria tubulosa* dijele se u celomu.
- 2) Kod jedinki izloženim okolišnom pritisku dolazi do promjena u staničnom ciklusu, kao što su zaustavljanje G1 faze ("G1-arrest"), odgoda G2 faze ("G2-delay") i apoptoza.
- 3) Rovinjska luka nije područje pod utjecajem genotoksičnih zagađivala dok je požar na brodu *UND Adriyatik* imao utjecaja na faunu okolnog područja.
- 4) *Holothuria tubulosa* se može koristiti kao bioindikatorski organizam u procjeni onečišćenja mora, odnosno analizom celomocita protočnom citometrijom može se doći do korisnih informacija o stanju u morskom ekosustavu.

## 7. LITERATURA

- Bayne, C. J. (1990). Phagocytosis and non-self recognition in invertebrates. *Bioscience* 40: 723-731.
- Bertheussen, K. (1979). The cytotoxic reaction in allogeneic mixtures of echinoid phagocytes. *Experimental cell research* 120 (2): 373-381.
- Bertheussen, K., Seljelid, R. (1978). Echinoid phagocytes in vitro. *Experimental Cell Research* 111 (2): 401-412.
- Bihari, N., Batel, R., Zahn, R. K. (1990). DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene and 4-nitroquinoline-*N*-oxide. *Aquatic toxicology*, 18 (1): 13-22.
- Bihari, N., Batel, R., Zahn, R. K. (1999). Flow cytometry in marine environmental research. *Periodicum biologorum* 101 (2): 151-155.
- Bihari, N., Mičić, M., Batel, R., Zahn, R. K. (2003). Flow cytometric detection of DNA cell cycle alternations in hemocytes of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) off the Adriatic coast, Croatia. *Aquatic toxicology* 64 (2): 121-129.
- Brown, A. C. (1967). Elimination of foreign particles injected into the coelom of the holothurian, *Cucumaria stephensoni* D. John. *Zool. Africana* 3: 3-8.
- Byrne, M. (1986). The ultrastructure of the morula cells of *Eupentacta quinquesemita* (Echinodermata: Holothuroidea) and their role in the maintenance of the extracellular matrix. *Journal of Morphology* 188 (2): 179-189.
- Canicatti, C. (1988). Arylsulfatase in coelomocytes of *Holothuria polii*. *Experientia* 44: 1011-1013.
- Canicatti, C. (1990). Lysosomal enzyme pattern in *Holothuria polii* coelomocytes. *Journal of Invertebrate Pathology* 56 (1): 70-74.
- Canicatti C., D'Ancona, G., Farina-Lipari, E. (1989a). The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). I. Light and electron microscopy. *Italian Journal of Zoology* 56 (1): 29-36.
- Canicatti, C., D'Ancona, G., Farina-Lipari, E. (1989b). The *Holothuria polii* brown bodies. *Italian Journal of Zoology* 56 (4): 275-283.
- Canicatti, C., Farina-Lipari, E. (1990). Dynamic and morphological aspects of coelomocyte clotting in *Holothuria polii*. *Journal of Invertebrate Pathology* 56 (1): 63-69.
- Canicatti, C., Götz, P. (1991). DOPA oxidation by *Holothuria polii* coelomocyte lysate. *Journal of Invertebrate Pathology* 58 (3): 305-310.

- Canicatti, C., Miglietta, A. (1989). Arylsulphatase in echinoderm immunocompetent cells. *The Histochemical Journal* 21 (7): 419-424.
- Canicatti, C., Quaglia, A. (1991). Ultrastructure of *Holothuria polii* encapsulating body. *Journal of Zoology* 224 (3): 419-429.
- Canicatti, C., Roch, P. (1989). Studies on *Holothuria polii* (Echinodermata) antibacterial proteins. I. Evidence for and activity of a coelomocyte lysozyme. *Experientia* 45 (8): 756-759.
- Canicatti, C., Seymour, J. (1991). Evidence for phenoloxidase activity in *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) brown bodies and cells. *Parasitology Research* 77 (1): 50-53.
- Canicatti, C., Tschopp, J. (1990). Holozyme A: one of the serine proteases of *Holothuria polii* coelomocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 96 (4): 739-742.
- Chia, F. S., Xing, J. (1996). Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies* 35 (4): 231-254.
- Coffaro, K. A., Hinegardner, R. T. (1977). Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*. *Science* 197 (4311): 1389-1390.
- Cossarizza, A., Pinti, M., Troiano, L., Cooper, E. L. (2005). Flow cytometry as a tool for analyzing invertebrate cells. *Invertebr Surv J* 2: 32-40.
- Cooper, E. L. (1976). *Comparative immunology*. Englewood Cliffs.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E. (2010). *Stanica: molekularni pristup*. G. Lauc (Ed.). Medicinska naklada
- Coulon, P., Jangoux, M., Bulteel, P. (1992) Respiratory rate and assessment of secondary production in the holothuroid *Holothuria tubulosa* (Echinodermata) from Mediterranean seagrass beds. *Marine Ecology* 13 (1): 63-68.
- D'Ancona, G., Canicatti, C. (1989). The coelomocytes of *Holothuria polii* (Echinodermata). II. Cytochemical staining properties. *Basic and applied histochemistry* 34 (3): 209-218.
- Debenest, T., Gagne, F., Burgeot, T., Blaise, C., Pellerin, J. (2013). DNA integrity assessment in hemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) in the Saguenay Fjord (Quebec, Canada). *Environmental Science and Pollution Research International* 20 (2): 621-629.
- Dolmatova, L. S., Eliseikina, M. G., Romashina, V. V. (2004). Antioxidant enzymatic activity of coelomocytes of the Far East sea cucumber *Eupentacta fraudatrix*. *Journal of evolutionary biochemistry and physiology* 40 (2): 126-135.
- Edds, K. T. (1977). Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments. *The Journal of cell biology* 73 (2): 479-491.
- Edds, K. T. (1980). The formation and elongation of filopodia during transformation of sea urchin coelomocytes. *Cell motility* 1 (1): 131-140.

- Eliseikina, M. G., Magarlamov, T. Y. (2002). Coelomocyte morphology in the holothurians *Apostichopus japonicus* (Aspidochirota: Stichopodidae) and *Cucumaria japonica* (Dendrochirota: Cucumariidae). *Russian Journal of Marine Biology* 28 (3): 197-202.
- Endean, R. (1958). The coelomocytes of *Holothuria leucospilota*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 3 (45): 47-60.
- Endean, R. (1966). The coelomocytes and coelomic fluids. *Physiology of echinodermata*: 301-328.
- Fafandel, M., Bihari, N., Smodlaka, M., Ravlić, S. (2008) Hemocytes/ coelomocytes DNA content in five marine invertebrates: cell cycles and genome sizes. *Biologia* 63 (5): 730-736.
- Fontaine, A. R., Hall, B. D. (1981). The haemocyte of the holothurian *Eupentacta quinquesemita*: ultrastructure and maturation. *Canadian Journal of Zoology* 59 (10): 1884-1891.
- Fontaine, A. R., Lambert, P. (1973). The fine structure of the haemocyte of the holothurian, *Cucumaria miniata* (Brandt). *Canadian Journal of Zoology* 51 (3): 323-332.
- Fontaine, A. R., Lambert, P. (1977). The fine structure of the leucocytes of the holothurian, *Cucumaria miniata*. *Canadian Journal of Zoology* 55 (9): 1530-1544.
- Garcia-Ararras, J. E., Greenberg, M. J. (2001). Visceral regeneration in holothurians. *Microscopy Research and Technique* 55 (6): 438-451.
- Greenberg, S. S. (1989). *Immunity and survival: Keys to Immune System Health*. Insight Books.
- Hérouard, E. (1889). Recherches sur les holothuries des côtes de France. *Arch. Zool. Exp. Gén.* 2 (7): 535-704.
- Hetzl, H. R. (1965). Studies on holothurian coelomocytes. II. The origin of coelomocytes and the formation of brown bodies. *Biological Bulletin* 128: 102-111.
- Hildemann, W. H., Dix, T. G. (1972). Transplantation reactions of tropical Australian echinoderms. *Transplantation* 14 (5), 624-633.
- Isaeva, V. V., Korenbaum, E. S. (1990). Defense functions of coelomocytes and immunity of echinoderms. *The Soviet Journal of Marine Biology* 15: 353-363.
- Johnson, P. T. (1969a). The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) III: In vitro reaction to bacteria. *Journal of invertebrate pathology* 13 (1): 42-62.
- Johnson, P. T. (1969b). The coelomic elements of sea urchins (*Strongylocentrotus*) I. The normal coelomocytes; their morphology and dynamics in hanging drops. *Journal of Invertebrate Pathology* 13 (1): 25-41.

- Johnson, P. T., Chapman, F. A. (1970). Infection with diatoms and other microorganisms in sea urchin spines (*Strongylocentrotus franciscanus*). *Journal of Invertebrate Pathology* 16 (2): 268-276.
- Jourdan, M. (1883). Recherches sur l'histologie des holothuries. *Ann. Mus. Hist. Natur. Marseille, Zool.* 1: no. 6.
- Karp, R. D., Hildemann, W. H. (1976). Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*. *Transplantation* 22 (5): 434-439.
- Kindred, J. E. (1924). The cellular elements in the perivisceral fluid of echinoderms. *The Biological Bulletin*, 46 (5): 228-251.
- Lawrence, J. M. (1987). A functional biology of echinoderms. The Johns Hopkins University Press.
- Matoničkin, I., Mrkša, N., Krulik, I., Primc, B. (1981). Beskralješnjaci: biologija viših avvertebrata. Školska knjiga.
- Michio, K., Kengo, K., Yasunori, K., Hitoshi, M., Takayuki, Y., Hideaki, Y., Hiroshi, S. (2003) Effects of deposit feeder *Stichopus japonicus* on algal bloom and organic matter contents of bottom sediments of the enclosed sea. *Marine Pollution Bulletin* 47 (1): 118-125.
- Mičić, M., Bihari, N., Labura, Ž., Müller, W. E., Batel, R. (2001). Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-*n*-butyltin chloride. *Aquatic toxicology*, 55 (1): 61-73.
- Otto, J. J., Kane, R. E., Bryan, J. (1979). Formation of filopodia in coelomocytes: localization of fascin, a 58,000 dalton actin cross-linking protein. *Cell* 17 (2): 285-293.
- Ratcliffe, N. A., Millar, D. A. (1988). Comparative aspects and possible phylogenetic affinities of vertebrate and invertebrate blood cells. In *Vertebrate blood cells*: 1-17. Cambridge University Press Cambridge..
- Riedl, R. (1983). *Fauna e flora del Mediterraneo*. Franco Muzzio Editore.
- Roberts, D., Gebruk, A., Levin, V., Manship, B.A.D. (2003) Feeding and digestive strategies in deposit-feeding holothurians. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 38: 257-310.
- Sammarco, S., Canicatti, C. (1991). Phenoloxidase and lipidic pigments in enriched *Holothuria polii* coelomocyte populations. *Echinoderm research*, 217-220.
- Shapiro, H. M. (2005). *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons.
- Smiley, S. (1994) *Holothuroidea. Microscopic anatomy of invertebrates* 14: 401-471.
- Smith, V. J. (1981). The echinoderms. *Invertebrate blood cells* 2: 513-562.

- Smith, A. C. (1983). Color change in sea cucumber coelomic fluid as a possible indicator of environmental stress. *Journal of Aquaculture and Aquatic Sciences* 3: 51-52.
- Šimunović, A., Piccinetti, C., Bartulović, M., Grubelić, I. (2000) Distribution and abundance of the species *Holothuria tubulosa* Gmelin, 1788 and *Holothuria forskali* Delle Chiaje, 1823 (Holothuria, Echinodermata) in the Adriatic Sea. *Acta Adriatica* 41 (2): 3-16.
- Théel, H. (1919). Om amoebocyteroch andra kroppar i. perivisceralhålan hos echinodermer. I. *Asterias rubens*. *Arkiv. Zool.*, Stockholm, 12: 1-38.
- Théel, H. (1921). On amebocytes and other coelomic corpuscles in the perivisceral cavity of echinoderms. III. Holothuroids. *Arkiv. Zoologi*. 13: 1-40.
- Tortonese, E. (1965). Echinodermata (Vol. 6). Calderini.
- Xing, K., Yang, H. S., Chen, M. Y. (2008). Morphological and ultrastructural characterization of the coelomocytes in *Apostichopus japonicus*. *Aquatic Biology* 2 (1): 85-92.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

## **Analiza sadržaja DNA u celomocitima trpa *Holothuria tubulosa* protočnom citometrijom**

VANJA JEREMIĆ

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

### **SAŽETAK**

U ovom radu su istraživani celomociti trpa *Holothuria tubulosa* protočnom citometrijom. Analizom sadržaja DNA ustanovljeno je da se celomociti trpa dijele u celomskoj šupljini. Normalan stanični ciklus je određen u jedinkama s referentne postaje. U pojedinim jedinkama s područja izloženih antropogenom utjecaju utvrđene su promjene staničnog ciklusa i to: zastoj G1 faze ("G1-arrest"), odgoda G2 faze ("G2-delay") i apoptoza. Analiza utvrđenih učinaka je pokazala da rovinjska luka nije područje pod utjecajem zagađivala dok je požar na brodu *UND Adriyatik* imao utjecaja na faunu okolnog podmorja. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju da se *H. tubulosa* može koristiti kao bioindikatorski organizam u procjeni onečišćenja mora, odnosno da je analiza celomocita protočnom citometrijom dobar pokazatelj stanja u morskom ekosustavu.

Rad je pohranjen u knjižnicama Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli i Instituta Ruđer Bošković u Rovinju. Izvornik je na hrvatskom jeziku (32 stranica, 14 slika, 3 tablice, 67 literaturnih navoda).

**Ključne riječi:** protočna citometrija, stanični ciklus, DNA sadržaj, celomociti, *Holothuria tubulosa*

**Mentor:** Izv. prof. dr.sc. Maja Fafanđel, viša znanstvena suradnica IRB

**Komentor:** Dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković, viši asistent, IRB

**Ocjenjivači:** Prof. dr. sc. Renato Batel, znanstveni savjetnik, IRB

Izv. prof. dr. sc. Maja Fafanđel, viša znanstvena suradnica, IRB

Dr.sc. Mirta Smodlaka Tanković, viši asistent, IRB

Izv. prof. dr. sc. Nastjenjka Supić, viša znanstvena suradnica, IRB

**Datum obrane:** 22. srpnja 2015.



# BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula

Bachelor thesis

University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

## **Flow cytometric analysis of DNA content in *Holothuria tubulosa* coelomocytes**

VANJA JEREMIĆ

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

### **ABSTRACT**

In this study, the coelomocytes of *Holothuria tubulosa* were analyzed by flow cytometry. The DNA content analyses identified coelomocytes proliferation in the coelom. The pattern of a normal cell cycle has been determined in individuals from the reference site. In some individuals from sites under anthropogenic influence cell cycle alteration were detected: "G1-arrest", "G2-delay" and apoptosis. Analysis of the extent of the effects revealed that the port of Rovinj is an area with no impact while the fire damage on the *UND Adriyatik* ship caused a negative consequences to the surrounding fauna. The results of this study suggest that *Holothuria tubulosa* could be a useful bioindicator for pollution monitoring, while flow cytometric analyses of *Holothuria* coelomocytes could provide information regarding the marine ecosystem status.

This thesis is deposited in the Library of Juraj Dobrila University of Pula and Ruđer Bošković Institute in Rovinj. Original in Croatian (32 pages, 14 figures, 3 tables, 67 references).

**Key words:** flow cytometry, cell cycle, DNA content, coelomocytes, *Holothuria tubulosa*

**Supervisor:** Maja Fafandel, PhD, IRB

**Cosupervisor:** Mirta Smodlaka Tanković, PhD, IRB

**Reviewers:** Prof. Renato Batel, IRB

Maja Fafandel, PhD, IRB

Mirta Smodlaka Tanković, PhD, IRB

Nastjenjka Supić, PhD, IRB

**Thesis defense:** 22.7.2015