

Hemociti pauka vrste *Geolycosa vultuosa* (C.L.Koch, 1838)

Kemfelja, Stjepan

Master's thesis / Diplomski rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:538915>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stjepan Kemfelja

**HEMOCITI PAUKA vrste *Geolycosa vultuosa*
(C.L. Koch, 1838)**

Diplomski rad

Zagreb, 2013.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Stjepan Kemfelja

HEMOCITI PAUKA vrste *Geolycosa vultuosa* (C.L. Koch, 1838)

Diplomski rad

Zagreb, 2013.

Ovaj rad izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju, pod vodstvom doc.dr.sc.Domagoja Đikića, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer ekologija.

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Domagoju Đikiću na predloženoj temi, pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Hemociti pauka vrste *Geolycosa vultuosa* (C.L.Koch, 1838)

Stjepan Kemfelja

Zavod za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6

Sažetak

Pauci, kao i ostali člankonošci, imaju otvoreni optjecajni sustav kroz koji teče njihova tjelesna tekućina – hemolimfa. Hemolimfa ima višestruku ulogu u kretanju, disanju i prehrani te zauzima otprilike 20% tjelesne mase pauka. U slučaju ozlijede dolazi do trenutnog gubitka hemolimfe ali i napada patogena što može rezultirati infekcijom. Imunološki sustav pauka lokaliziran je u hemocitima koji nastaju iz stanica stijenke miokarda u obliku prohemocita koji ulaze u hemolimfu i diferenciraju se u ostale tipove hemocita. Oni doprinose obrani od patogena fagocitozom, nodulacijom i enkapsulacijom invazivnih tijela. Cilj ovog rada je odrediti brojnost, pojedinačni udio i morfološka obilježja hemocita u hemolimfi pauka vrste *Geolycosa vultuosa*.

Ovim radom utvrđeno je da metoda bojanja May-Grünwald giemskom najbolje omogućuje uvid u morfološka obilježja (dimenzije pojedinih tipova hemocita i pripadajućih jezgri, prisutnost vakuola, organela i granula) hemocita, što je značajni doprinos ovoj vrlo slabo opisanoj fiziologiji pauka. Poznavanje gore navedenih odrednica omogućilo bi lakše prepoznavanje pojedinih tipova hemocita u pauka općenito te olakšalo daljnja istraživanja na području hematologije i imunološkog odgovora u pauka.

(36 stranica, 20 slika, 3 tablice, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u biblioteci Zavoda za animalnu fiziologiju, Rooseveltov trg 6, Zagreb

Ključne riječi: hemociti/ pauci vučjaci/ *Geolycosa vultuosa*

Mentor: Domagoj Đikić, prof.dr.sc

Ocjenjivači: Prof. dr. sc. Domagoj Đikić
Prof. dr. sc. Maria Špoljar
Prof. dr. sc. Božena Mitić

Rad prihvaćen: 11. rujna 2013

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of biology

Graduation Thesis

Hemocytes of spider species *Geolycosa vultuosa* (C.L.Koch, 1838)

Stjepan Kemfelja

Departement of animal physiology Rooseveltov trg 6

Abstract

Spiders, as all other arthropods, have an open circulatory system, and their body fluid, the hemolymph, freely moves between lymphatic vessels and the body cavities. The hemolymph can be considered as a multifunctional organ, central for locomotion, respiration and nutrition, and it amounts to approximately 20 % of a spider's body weight. Any injury includes not only immediate hemolymph loss but also pathogen attacks and subsequent infections. In spiders, the immune system is localized in hemocytes which are derived from the myocardium cells of the heart wall where they are produced as prohemocytes and from where they are released as different cell types into the hemolymph. They contribute to the defense against pathogens by phagocytosis, nodulation and encapsulation of invaders. The goal of this research is to consider the number and morphological characteristics of hemocytes of the spider species *Geolycosa vultuosa*. In this research the staining method May-Grünwald giemsa (MGG) was established as the best to describe morphological characteristics of hemocytes (cell size and their nuclei, presence of vacuoles, organelles and granules) which is a significant contribution to the field of spider physiology that still lacks research. Data provided in this research will enable easier recognition of hemocyte types in spiders in general and further easier research in the field of spider hematology and their immune response.

(36 pages, 20 figures, 3 tables, 33 references, original in Croatian)

Thesis deposited in the library of Departement of animal physiology

Keywords: hemocytes/ Lycosidae / *Geolycosa vultuosa*

Supervisor: Domagoj Đikić, prof.dr.sc.

Reviewers: Professor Domagoj Đikić
Professor Maria Špoljar
Professor Božena Mitić

Thesis accepted: 11. September 2013

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Značajke i klasifikacija pauka.....	1
1.2. Morfologija pauka	6
1.3. Životni ciklus pauka.....	9
1.4. Filogenija pauka.....	11
1.5. Porodica Lycosidae (pauci vučjaci).....	12
1.6. Pauk <i>Geolycosa vultuosa</i> (C. L. Koch, 1838)	13
1.7. Imunološki sustav pauka.....	15
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	17
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Uzorci.....	17
3.2. Bojanje May-Grünwald giemsom (MGG)	18
3.3. Bojanje Akridin-Oranžom (AO)	18
3.4. Morfološke karakteristike hemocita.....	18
4. REZULTATI.....	19
4.1. Mjerenje veličine i mase pauka.....	19
4.2. MGG diferencijalno bojanje i brojnost stanica.....	20
4.2.1. Granulociti	21
4.2.2. Plazmatociti.....	22
4.2.3. Cijanociti.....	23
4.2.4. Prohemociti	24
4.2.5. Leberidiociti	25
4.3. Akridin-Oranž diferencijalno bojanje	26
4.4. Mjerenje veličina hemocita i njihovih jezgri	27
5. RASPRAVA.....	28
6. ZAKLJUČAK.....	31
7. LITERATURA.....	32

1. UVOD

1.1. Značajke i klasifikacija pauka

Pauci su člankonošci (Arthropoda) koji su isključivi predatori i karnivori. Njihov plijen su uglavnom kukci ali i drugi člankonošci uključujući i same pauke. Neke vrste se hrane i manjim žabama, pticama pa čak i manjim sisavcima (tropske vrste).

Klasifikacijski pauci pripadaju razredu paučnjaka (Arachnida) u koje ubrajamo jedanaest redova od kojih su poznatiji:

1. Red: Scorpiones (štipavci)

Štipavci (slika 1.) su najstariji kopneni paučnjaci poznati još iz doba silura. Prednje tijelo, prosoma, nije posebno odijeljeno od stražnjeg tijela opistosome. U sredini glave imaju dva glavna oka a sa strane dvije hrpice od 2 do 5 bočnih očiju. Kliješta su na prednjem tijelu. Redovito su kratka i jaka. Čeljusne noge su velike i mnogo dulje od ostalih nogu.



Slika 1. Štipavac (Scorpiones)

2. Red: Pseudoscorpiones (lažištípavci)

Lažištípavci (slika 2.) su maleni paučnjaci (1-6mm). Slični su štípavcima ali bez stanjenog stražnjeg tijela i otrovne bodlje. Imaju otrovne žlijezde u štípalkama čeljusnih nožica i 1-3 para postranih očiju.



Slika 2. Lažištípavac (Pseudoscorpiones)

3. Red: Araneae (paući slika 3.)



Slika 3. Pauk (Araneae, Salticidae, *Marpissa muscosa*)

4. Red: Opiliones (lažipauci)

Lažipauci (slika 4.) imaju stražnje kolutićavo tijelo koje nije oštro odijeljeno od prednjeg tijela. Čitavo tijelo im je vrlo skraćeno, kao i unutrašnji organi. Veliki su prosječno 1cm. Na sredini prednjeg tijela imaju na humku par očiju, helicere su kliješta, a čeljusne noge su kratke i slične nozi.



Slika 4. Lažipauk (Opiliones)

5. Red: Acari (grinje)

Grinje (slika 5.) su malene često mikroskopski sitne životinje. Neke su nametnici. Zbog malena tijela nestalo je kolutićavosti, pa je prednje i stražnje tijelo sraslo, a mnogi su organi više ili manje smanjeni ili čak nestali. Tijelo je različitih oblika: okruglasto, pločasto, kuglasto, duguljasto ovisno o načinu života. Sprijeda ima ju 1-3 para jednostavnih očiju, ali su mnoge i bez njih. Malena i kratka kliješta imaju štikaljke ili kuke koje su preobražene u pomične bodlje za bušenje kože koje mogu gristi, bosti ili sisati.



Slika 5. Grinja (Acari)

Red pauka podijeljen je u tri podreda:

1. Podred: Mesothelae (1 porodica)

Porodica Liphistiidae (85 vrsta)

2. Podred: Mygalomorphae (Orthognatha) (15 porodica)

Porodica Atypidae (45 vrsta)

Ctenizidae (120 vrsta)

Dipluridae (180 vrsta)

Theraphosidae (90 vrsta)

3. Podred: Araneomorphae (Labidognatha) (90 vrsta)

Porodica Dysderidae (560 vrsta)

Pholcidae (1000 vrsta)

Scytotidae (220 vrsta)

Amaurobiidae (750 vrsta)

Dictynidae (550 vrsta)

Eresidae (100 vrsta)

Clubionidae (560 vrsta)

Gnaphosidae (2100 vrsta)

Salticidae (5200 vrsta)

Thomisidae (2100 vrsta)

Lycosidae (2350 vrsta)

Pisauridae (340 vrsta)

Oxyopidae (420 vrsta)

Agelenidae (500 vrsta)

Araneidae (3000 vrsta)

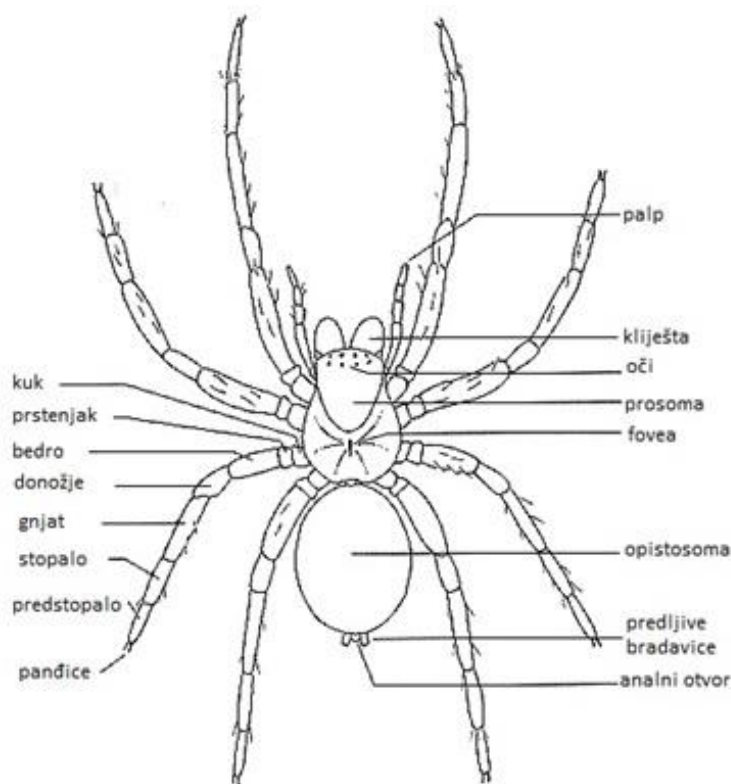
Linyphiidae (4300 vrsta)

Theridiidae (2300 vrsta)

Uloboridae (260 vrsta)

1.2. Morfologija pauka

Tijelo pauka (Slika 6.) podijeljeno je u dva dijela: prednji (prosoma) i stražnji (opistosoma). Oni su spojeni tankom stapkom (pedicel). Prosoma je oklopljena čvrstom hitinskom ljuskom. Opistosoma je meka i elastična što pauku omogućava probavu i skladištenje velikog volumena hrane i razvijanje velikog broja jajašaca.



Slika 6. Građa tijela pauka

Prosoma je sa gornje i donje strane zaštićena čvrstim pločama između kojih izlaze noge, palpi, kliješta i usni organ. Na gornjoj strani prosome nalazimo i oči

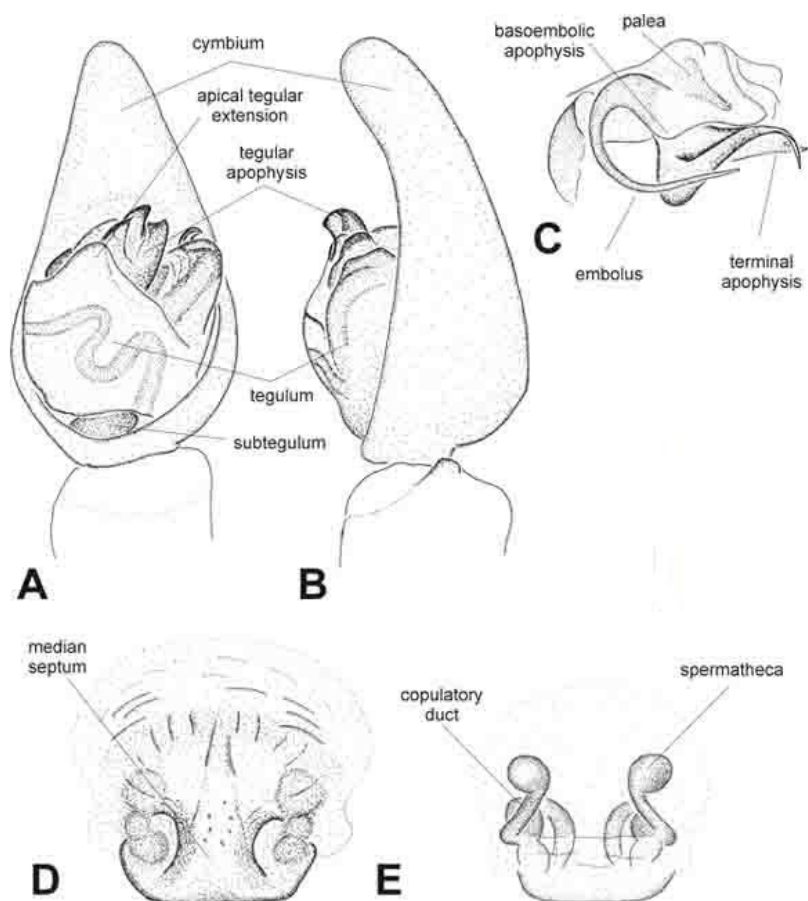
kojih može biti šest ili osam. Veličina i raspored očiju je vrlo važna determinacijska karakteristika. Iako oči pauka nazivamo „jednostavnima“ u odnosu na „složene“ oči kukaca one to u nekih skupina pauka nikako nisu. Pauci skakači (Salticidae) imaju oči većeg raspona kretanja od naših, složeno fokusiranje, binokularni vid, razlikuju boje i polarizirano svjetlo što ih čini najsloženijima u člankonožaca (Slika 7.).



Slika 7. Oči pauka skakača

Na sredini gornjeg dijela prosome nalazimo kratku tamnu crtu koju nazivamo fovea. Iz nje vanjski oklop ulazi u unutrašnjost i omogućava vezanje mišića snažnog podtlačnog želuca. Iz prednje strane prosome izlaze kliješta kojima pauci ugrizaju plijen i unose u njega otrov. Ujedno kliješta služe za gnječenje i usitnjavanje plijena. Kliješta se sastoje od bazalnog dijela i očnjaka koji ima u sebi šupljinu u koju se otvaraju otrovne žlijezde. Gotovo svi pauci imaju otrovne žlijezde osim nekoliko izuzetaka (npr. porodica Uloboridae). Odmah pored kliješta iz prosome izlaze i palpi. Palpi (Slika 8.) su kod odraslih mužjaka pauka modificirani u sekundarne spolne organe i mogu biti izrazito složeni i u principu su jedini kojima možemo sa dovoljnom preciznošću odrediti kojoj vrsti određeni mužjak pauka pripada (izuzev DNA analize). Iza palpa redom iz prosome izlazi

četiri para nogu za hodaње koje se sastoje od sedam članaka (coxa, trochanter, femur, patella, tibia, metatarsus i tarsus). Na vrhu svakog tarsusa nalaze se pandžice. Na nogama nalazimo i dlačice raznih veličina, struktura i funkcija.



Slika 8. A-♂palp (ventralno), B-♂palp (lateralno), C-tegulum, D-epigina, E-spermateke

Opistosoma je vrlo varijabilna u obliku, boji i veličini kod različitih vrsta pauka. Mužjaci uglavnom imaju manju opistosomu. Na gornjoj strani opistosome često nalazimo tamnu liniju ispod koje se nalazi srce pauka. Sa donje prednje strane opistosome nalazi se poprečna linija koju nazivamo epiginalni nabor. Kod odraslih ženki pauka taj nabor je više ili manje sklerotiziran i tvori strukturu koju

nazivamo epigina (epigyne). Epigina odraslih ženki jednako je važna struktura za determinaciju pauka kao i palp u mužjaka. Ispred epigina nalaze se otvor lepezastih uzdušnica. Na stražnjem dijelu opistosome nalazimo tri para predljivih bradavica. Svila koja nastaje u predljivim žlijezdama unutar opistosome izlazi kroz ove bradavice van i u nizu složenih fizičko-kemijskih procesa prelazi iz tekućeg u kruto stanje odnosno u paukovu svilu kakvu svi mi poznajemo. Složenost procesa stvaranja svile govori i činjenica da smo uspjeli umjetno proizvesti proteine od kojih se paukova svila sastoji ali nismo uspjeli odgonetnuti sve tajne predljivih bradavica da bi dobili paukovu svilu iz tih proteina. Dodatno neki pauci imaju uz predljive bradavice i predljiva polja (cribellum).

1.3. Životni ciklus pauka

Pauci se počinju razvijati iz oplođenog jajašca koje ženka polaže u svilenu vrećicu-kokon (slika 9.) zajedno sa ostalim jajašcima čiji broj može varirati od svega par do nekoliko tisuća. Jajašce se može početi razvijati nekoliko sati nakon izleganja ili može biti dormantno u slučaju zime. U periodu razvoja iz jajašca u predličinački stadij ženka može jajašca čuvati unutar posebne komore, nositi kokon sa sobom i okretati ga da bi se sva jajašca jednako razvijala ili ga potpuno napustiti. Predličinka prelazi u stadiji ličinke prvim presvlačenjem. U ovom stadiju ličinka se još uvijek nalazi unutar kokona koji ženka može povremeno otvarati i unositi hranu i vodu. Drugim presvlačenjem ličinka prelazi u stadij nimfe i potpuno je pokretni mali pauk. U ovom stadiju se prvi put javlja kanibalizam, najčešće ako ima veliki broj paučića u kokonu. Paučići izlaze iz kokona probijajući se sami ili im ženka otvori kokon. Izvan kokona paučići mogu ostati uz ženku još neko vrijeme kod nekih vrsta, raspršiti se ili ostati živjeti u zajednici (mali broj vrsta). Rasprostranjenje može biti jednostavno ako mladi pauci jednostavno odhodaju od legla ili bolje letenjem (ballooning). Letenje je najefikasnije u toplih sunčanih dana nakon hladnog razdoblja kada se zrak uzdiže. Paučići se penju na povišeno mjesto, uzdižu se na prednje noge i počinju

ispuštati svilenu nit ili niti koje stvaraju otpor zraku i funkcioniraju poput jedra. Ovisno o vrsti pauca prolaze još nekoliko presvlačenja (5-10) do stadija subadultnosti kada su im nepotpuno razvijeni spolni organi i zadnjim presvlačenjem prelaze u adultni stadij.



Slika 9. Otvoreni kokon s jajašcima

U razdoblju od stadija nimfe do smrti pauca se hrane. Da bi došli do hrane koriste različite tehnike od aktivnog lova plijena, čekanja u zasjedi do izgradnje lovnih mreža koje mogu biti raznih oblika. Sam proces hranjenja je uglavnom sličan za sve pauke. Nakon što su plijen ulovili, u njega unose otrov te ga oblažu probavnim enzimima i mrve kliještima. Kada je plijen djelomično probavljen pauk ga počinje polagano usisavati dok ne ostane samo neprobavljiva tvar. Neki pauci ubace probavne enzime kroz malu rupu u plijen te ga samo usisaju tako da nakon toga ostane samo cijela prazna ljuska.

U adultnom stadiju pauci se pare. Parenje pauka može biti jednostavno ili se sastojati od vrlo kompleksnih oblika ponašanja. U pauka je zabilježena i partenogeneza ali je izuzetno rijetka. Najčeće mužjak traži ženku koja ispušta feromone ili se glasa pomoću stridulacijskih organa. Neposredno prije parenja mužjak isprede malu mrežu na koju položi spermatozoide iz testisa koji se nalaze u opistosomi. Potom ih preuzme sa prije spomenutim pedipalpom kojim onda može oploditi ženku. Nakon oplodnje mužjak se uglavnom više ne pari dok se ženka može pariti nekoliko puta. Da ženka pojede mužjaka nakon parenje nije čest slučaj. Ženka polaže jajašca kada za nju budu povoljni uvjeti a jajašca se oplode pri prolazu od ovarija do genitalnog otvora.

Otrovnost je još jedna generalna karakteristika većine pauka. Otrov pauka po sastavu uglavnom čine organske molekule od jednostavnih peptida do smjese kompleksnih proteinskih molekula. Od oko 40 000 poznatih vrsta pauka njih oko 500 izaziva neugodne simptome kod čovjeka od toga na našem prostoru šest.

1.4. Filogenija pauka

Pauci su se razvili, kao i ostali paučnjaci, od vodenih člankonožaca u devonu negdje oko prije 400 milijuna godina. U procesu evolucije arheotip pauka stekao je nove karakteristike koje se mogu objasniti primarno kao adaptacija na terestrični način života. Te nove karakteristike su npr. preoralna probava, razvoj otrovnih žlijezda i podtlačnog želuca. Ostale promjene uključuju: sažimanje sedmog kolutića iz kojeg nastaje pedicel, razvoj hidrauličnog sustava nogu, direktni prijenos spermatozoida putem palpa, koncentracija ganglija u jedinstveni središnji živčani sustav, razvoj sustava za pređenje u svrhu lova plijena i generalno smanjivane veličine pauka i skraćivanje života jedinki dok im je istovremeno ponašanje postajalo sve složenije.

1.5. Porodica Lycosidae (pauci vučjaci)

Pauci vučjaci su lualice koji aktivno love plijen ili love iz zasjede. Najlakše ih je prepoznati po karakterističnom rasporedu očiju (slika 10.): četiri uniformna manja oka u donjem prednjem redu te dva velika medijalno smještena oka u gornjem redu (imaju još dva manja latelarno sještana oka u gornjem redu ili iza njega). Oni su kozmopoliti i ima ih oko 2350 vrsta. Manji vučjaci (4-10mm dužine tijela) lutaju slobodno između kamenja i razne vegetacije. Veći pripadnici ove porodice (10-20mm) kopaju jazbine. Neke vrste žive blizu voda i mogu čak hodati po površini. Pripadnici roda *Pirata* love kukce na površini pa čak i rone za punoglavcima i manjim ribama.



Slika 10. Oči pauka vučjaka

Najpoznatiji pauci vučjaci pripada rodu *Lycosa* odnosno *Hogna* te mogu dostići veličinu tijela i preko 30mm, ali nisu srodni sa tropskim „tarantulama“. Iako su dugo bili na glasu kao opasni pauci, strah od njihovog otrovnog ugriza se pokazao neopravdanim. Najvjerojatnije su ugrizi crne udovice (*Latrodectus tredecimguttatus*) bili pripisani ovim paucima. Vučjaci žive u jazbinama opredenim svilom u tlu. Neke vrste čak rade i poklopce slične onima

pauka iz porodice Ctenizidae. Noću vučjaci izlaze iz jazbina u potrazi za plijenom ali njihov način lova je više nalik čekanju iz zasjede nego aktivnom lovu.

Ženke vučjaka poznate su po brizi za potomstvo. Nakon što polože jaja u kokon, pričvrste ga svilom za predljive bradavice te ga nose sa sobom. Kada jajašca sazriju, ženka otvori kokon a mladi pauci se pričvrste oko njezine opistosome. Nakon otprilike tjedan dana paucim napuštaju ženku.

1.6. Pauk *Geolycosa vultuosa* (C. L. Koch, 1838)

Dužina tijela: ženke (slika 11.) od 13 do 24 mm, mužjaci 11 - 19 mm (Nentwig W. et al 2012.). Mladi su smeđe-sive do žute boje. Mužjaci su svjetliji i sa jače izraženim uzorcima bijelo-žute boje te dužih nogu. Ženke su tamnije, crno-smeđe boje sa narančasto-bijelim uzorcima. Tipična bijela, medijana pruga je slabo izražena. Umjesto tipične pruge na pauku dominiraju radijalne oznake na tamnijoj pozadini. Osim toga na prosomi se nalaze nepravilne lateralne crte. Kod mužjaka su radijalne oznake šire i obrasle gustim svijetlim dlakama.



Slika 11. Pauk *Geolycosa vultuosa*

Ovaj pauk kopa jazbine (slika 12.) dubine do 50cm koja je opredena svilom. Ulaz u jazbinu je jače opreden i uzdignut od zemlje oko 1cm tako da je jazbina zaštićena od prodora vode u slučaju jačih kiša.



Slika 12. Pauk u jazbini

Mladi i ženka rijetko napuštaju jazbinu i to samo u kada love plijen u neposrednoj blizini otvora. Plijen se sastoji uglavnom od skakavaca.

Adultni mužjaci traže ženke u jazbinama a snubljenje počinje na ulazu ženkine jazbine, kad mužjak počinje bubnjati i napinjati ženkinu paučinu na ulazu svojim prednjim nogama. Kopulacija se odvija u jazbini.

Ženka redovito izlazi iz jazbine sa kokonom da bi ga zagrijala na suncu, odnosno regulirala idealnu temperaturu jajašaca.

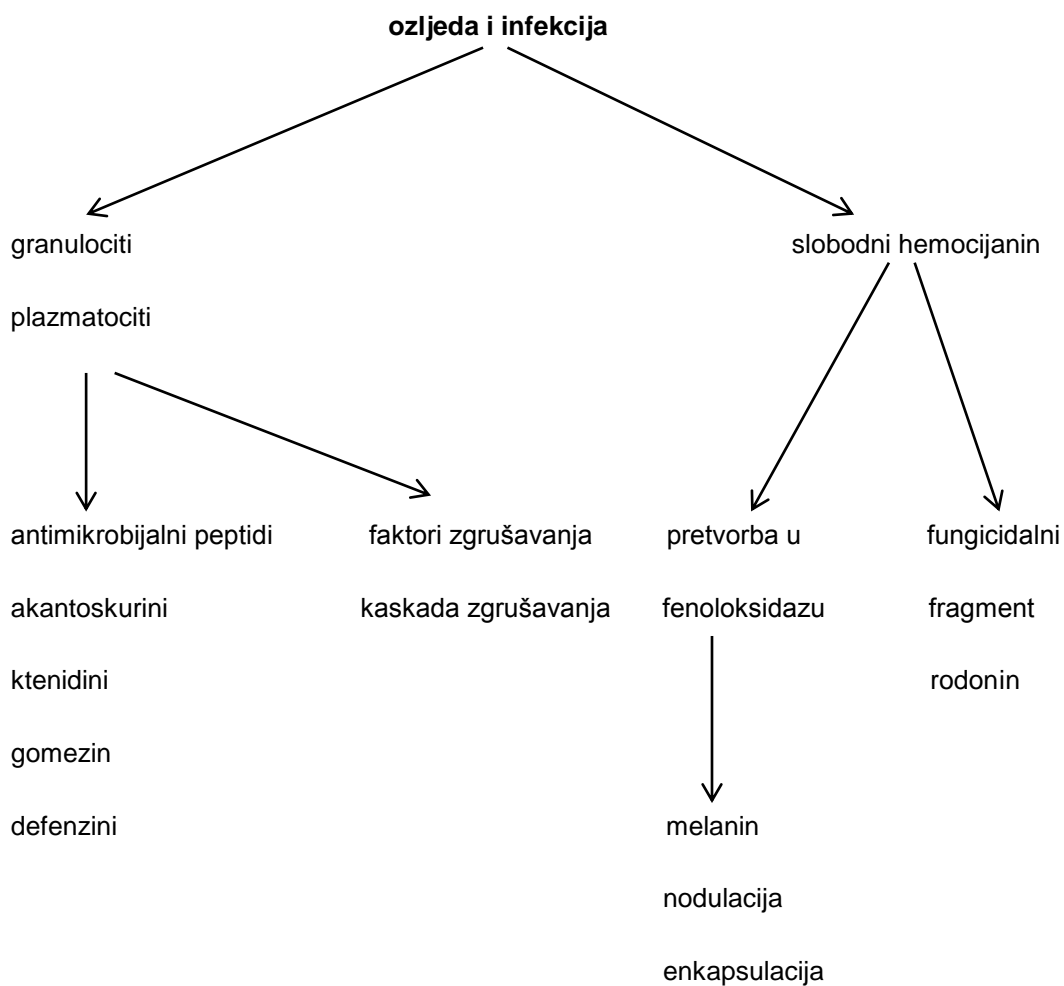
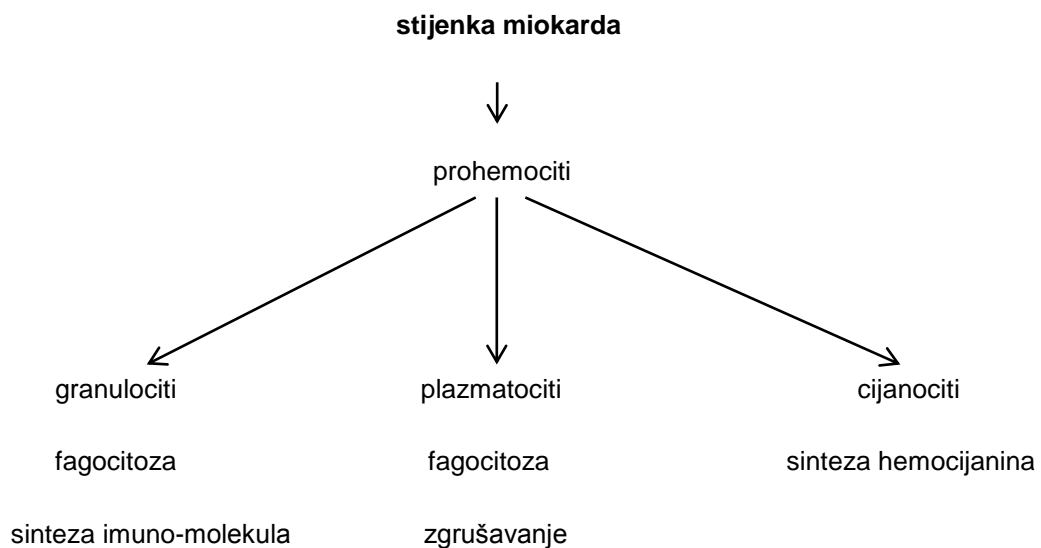
Ova vrsta teži stvaranju kolonija za razliku od sestrinske vrste *Lycosa singoriensis*.

Ugriz ovog pauka može uzrokovati lokalni dermatitis i rijetko kratkotrajnu paralizu mišića.

Geolycosa vultuosa rasprostranjena je na području istočne europe od Ukrajine do Mađarske.

1.7. Imunološki sustav pauka

Pauci kao i ostali člankonošci, imaju otvoreni optjecajni sustav kroz koji teče njihova tjelesna tekućina – hemolimfa. Hemolimfa ima višestruku ulogu u kretanju, disanju i prehrani te zauzima otprilike 20% tjelesne mase pauka. U slučaju ozlijede dolazi do trenutnog gubitka hemolimfe ali i napada patogena što može rezultirati infekcijom. Stoga pauci moraju reagirati dvojako da bi spriječili gubitak hemolimfe i obranili se od infekcije. Ove dvije funkcije obavlja nespecifični imunološki sustav koji obuhvaća nekoliko sustava kao što su koagulacija hemolimfe i stvaranje raznih obrambenih supstanci (slika 13.).



Slika 13. Dijagram imunološkog sustava pauka

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Do sada su morfološke odrednice hemocita u pauka kao i njihove uloge u imunološkom sustavu slabo istražene, stoga je važno utvrditi slijedeće:

- brojnost i udjele pojedinih tipova hemocita
- referentna morfološka obilježja hemocita vrste *Geolycosa vultuosa*
- mogu li se temeljem diferencijalnih bojanja razlikovati pojedini tipovi hemocita te izabrati najbolju metodu bojanja

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci

U istraživanju su se koristile odrasle jedinke pauka *Geolycosa vultuosa* ulovljenih na visoravni kod mjesta Jasensko kod Sinja u periodu 15.8.2004-30.8.2004.g. gdje je pronađena velika kolonija pauka ove vrste. Broj rabljenih životinja je minimalan (10 odraslih jedinki) tj. minimalno potreban da se dobiju prihvatljivi rezultati, a da se ne ugrozi opstanak ove kolonije. Pauci su dovezeni živi u laboratorij PMF-a Zavoda za Animalnu fiziologiju gdje im je prije usmrćivanja izmjerena dužina tijela i masa a nakon toga su iskrvarene te je hemolimfa iskorištena za pravljenje razmaza. Za bojanje May- Grünwald Giemson i (MGG) i citokemijske analize odnosno akridin-oranžom odmah su napravljeni krvni razmazi i to po 1 stakalace po jedinki za svaki tip bojanja (ukupno 20).

Obojani razmazi, bojani MGG-om, se pregledavaju pod svjetlosnim mikroskopom (Olympus BX51) i fotografiraju pomoću integrirane Olympusove kamere DP70 i pripadajućeg programa DP Controller. Koristi se povećanje 100x sa imerzijom odnosno razmazi bojani akridin oranžom pregledavaju se pod fluorescencijskim mikroskopom sa integriranom kamerom. Za izračunavanje udjela

pojedinih hematocita iz MGG razmaza ručno su se brojali granulociti, plazmatociti, cijanociti i prohemociti na ukupno 1000 stanica po razmazu.

3.2. Bojanje May-Grünwald giemsom (MGG)

Osušeni krvni razmazi drže se u otopini May-Grünwald (J.T. Baker, Nizozemska) 7 minuta, nakon čega se isperu destiliranom vodom (dH₂O) i drže u otopini Giemse 11 minuta. Otopina Giemse je napravljena od dva dijela dH₂O i jednog dijela Giemse (J.T. Baker, Nizozemska). Razmazi se dobro isperu u dH₂O da bi se riješili preostale boje koja nije obojala stanice, a smeta pri pregledavanju uzorka.

3.3. Bojanje Akridin-Oranžom (AO)

Osušeni krvni razmazi fiksiraju se metanolom te se suše 10 minuta, nakon čega se drže u otopinu akridin-oranža (0.01%) 2 minute. Razmazi se dobro isperu u dH₂O da bi se riješili preostale boje koja nije obojala stanice, a smeta pri pregledavanju uzorka.

3.4. Morfološke karakteristike hemocita

Morfološke karakteristike smo pregledavali mikroskopirajući preparate obojane tehnikom MGG. Slike su dobivene pomoću Olympusvog mikroskopa BX51 sa Olympusovom kamerom DP70 te pripadajućeg programa DP Controller. Koristilo se povećanje 100x s imerzijom.

4. REZULTATI

4.1. Mjerenje veličine i mase pauka

Dužina pauka mjerena je pomičnim mjerilom od početka prosome do kraja opistosome, ne uključujući predljive bradavice. Masa pauka mjerena je laboratorijskom vagom (Tablica 1.). Od deset jedinki osam najvećih su odrasle ženke stare 1-2 godine (točnu starost nije moguće odrediti jer one mogu biti starije od jedne godine) te dva odrasla mužjaka starosti oko 1 godinu (mužjaci ugibaju nakon parenja).

Tablica 1. Rezultati mjerenja mase i veličine pauka *G. vultuosa*

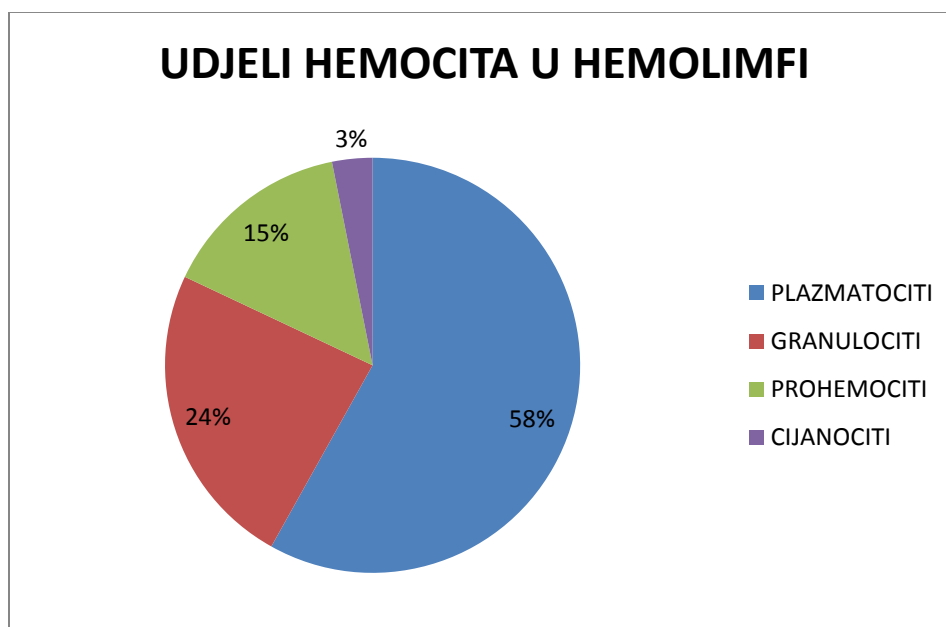
Uzorak	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dužina tijela(mm)	20	22	26	17	24	19	15	24	20	22
Masa(g)	1,4	1,6	2,0	0,8	1,7	1,5	0,6	1,8	1,5	1,6

4.2. MGG diferencijalno bojanje i brojnost stanica

Rezultati mjerenja brojnosti i udjela pojedinih tipova hemocita u hemolimfi pauka vrste *G.vultuosa* prikazani su u tablici 2. odnosno slikom 14. Brojnost i udio leberidiocita nije bilo moguće odrediti zbog nedovoljno velikog broja stanica.

Tablica 2. Brojnost pojedinih tipova hemocita

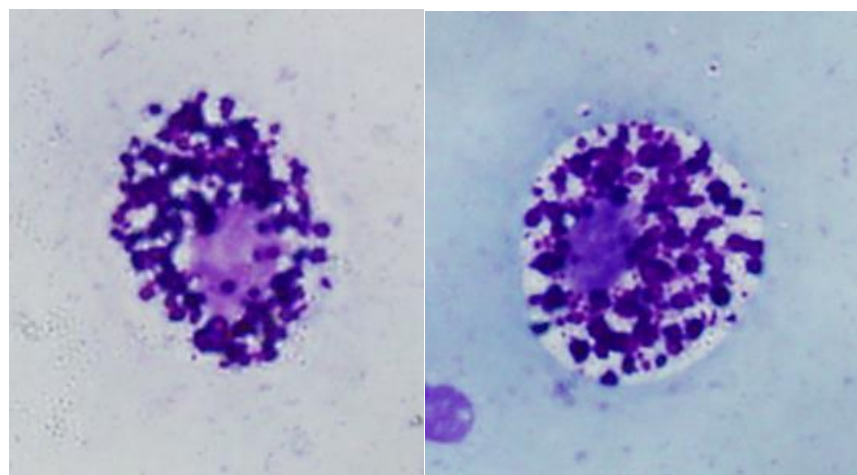
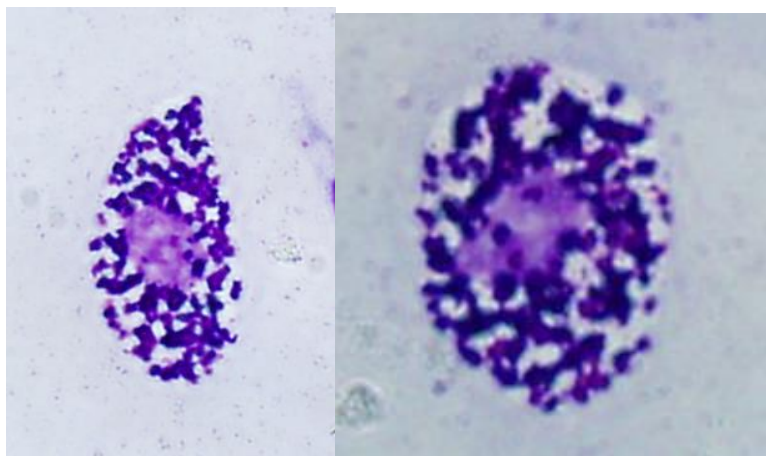
TIP HEMOCITA	SREDNJA VRIJEDNOST	MEDIJAN	MINIMUM	MAKSIMUM
Granulocita/1000st.	239	228,5	96	401
Plazmatocita/1000st.	581,1	576,5	411	722
Cijanocita/1000st.	31,4	30	15	47
Prohemocita/1000st.	148,5	143,5	111	180



Slika 14. Dijagram udjela pojedinih tipova hemocita u hemolimfi pauka *G. vultuosa*

4.2.1. Granulociti

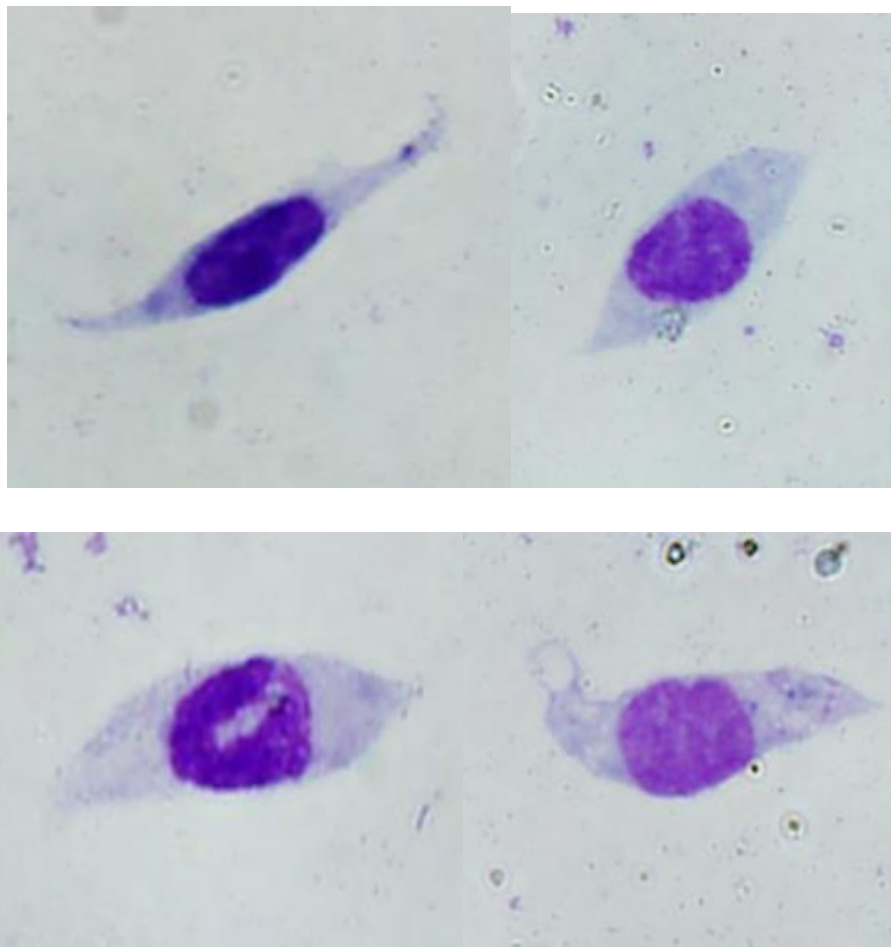
Granulociti (slika 15.) kod vrste *G.vultuosa* su uglavnom kružnog ili eliptičnog oblika s centralno ili malo lateralno pomaknutom jezgrom. Jezgra je kompaktna. Na razmazima se jasno vide karakteristične granule.



Slika 15. Granulociti-MGG

4.2.2. Plazmatociti

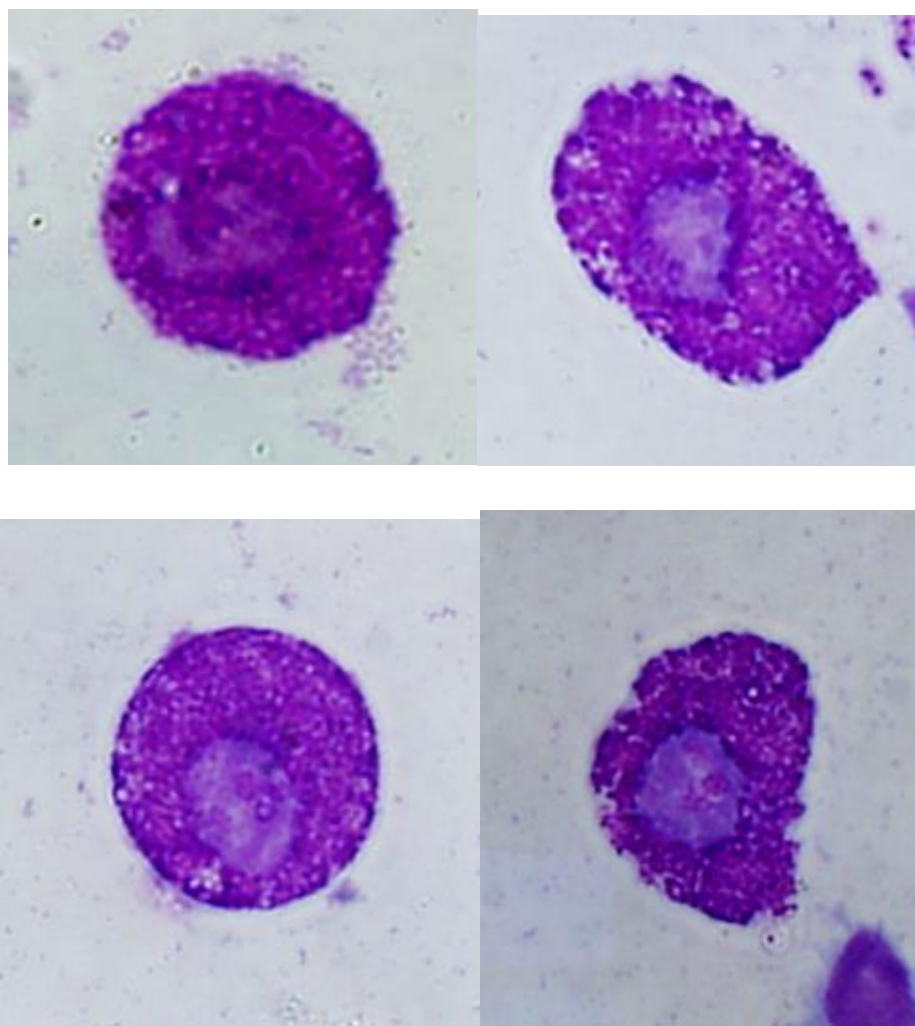
Plazmatociti (slika 16.) kod vrste *G. vultuosa* su uglavnom vretenastog oblika s centralno smještenom jezgrom ili malo pomaknutom lateralno. Jezgra je kompaktna. Citoplazma nije obojana.



Slika 16. Plazmatociti-MGG

4.2.3. Cijanociti

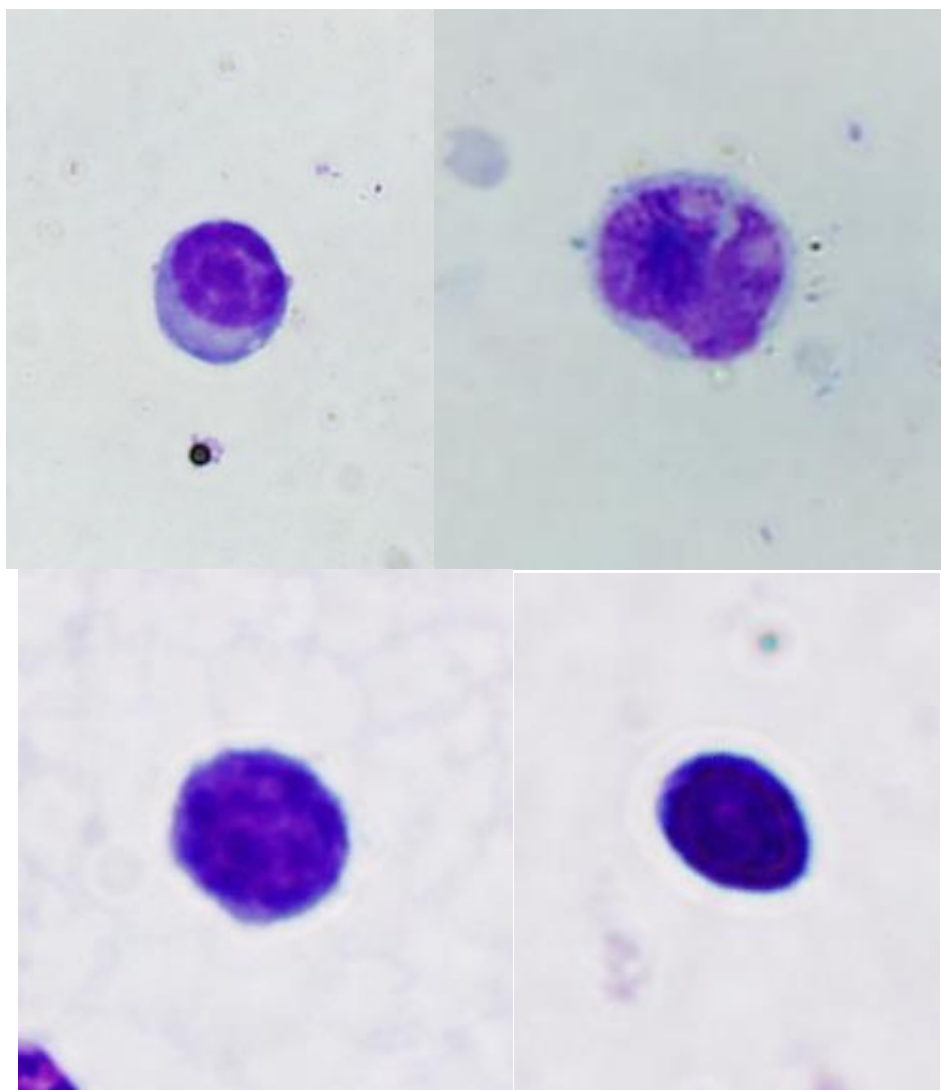
Cijanociti (slika 17.) kod vrste *G. vultuosa* su uglavnom kružnog ili eliptičnog oblika s centralno smještenom ili malo ekscentričnom jezgrom. Jezgra je kompaktna. Na razmazima se jasno vide obojani organeli karakteristični za cijanocite.



Slika 17. Cijanociti-MGG

4.2.4. Prohemociti

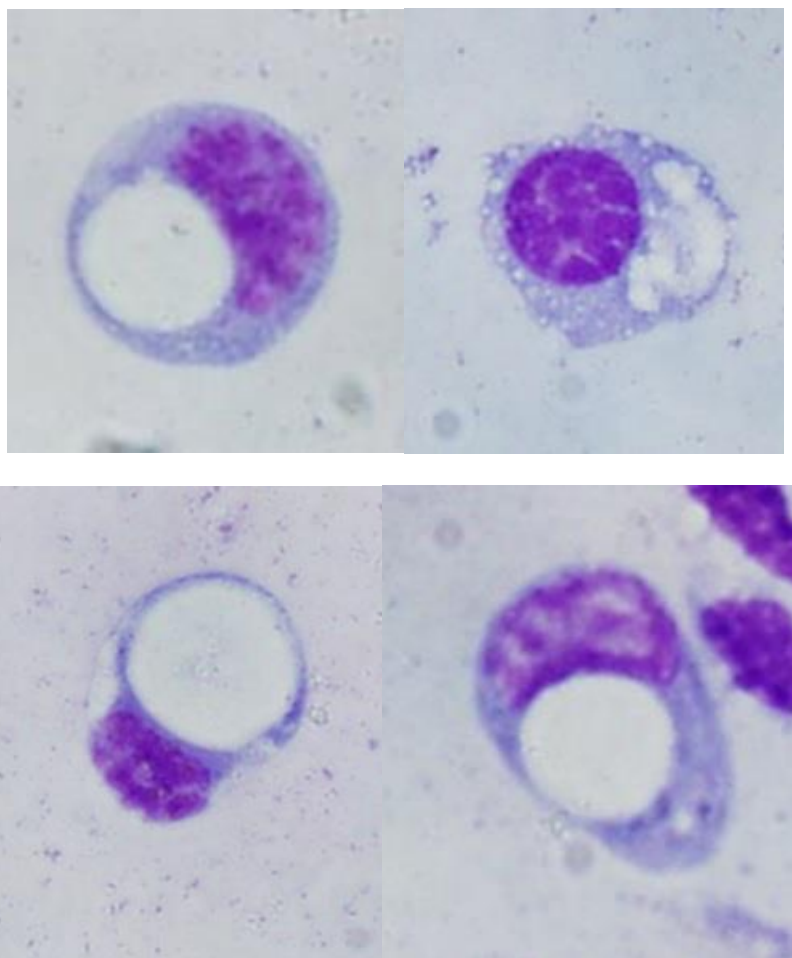
Prohemociti (slika 18.) kod vrste *G. vultuosa* su gotovo uvijek kružnog oblika gdje jezgra zauzima gotovo cijeli volumen stanice. Jezgra je kompaktna. Na razmazima su zamiječeni međustadiji diferencijacije prohemocita u ostale tipove hemocita.



Slika 18. Prohemociti-MGG

4.2.5. Leberidiociti

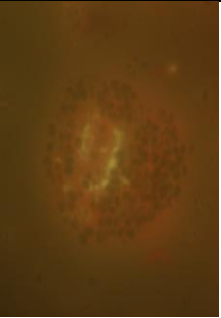
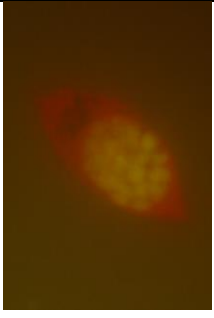



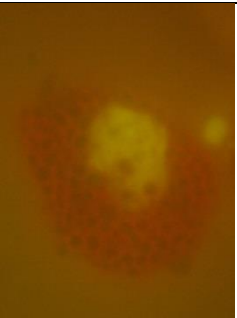
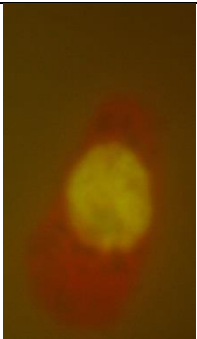

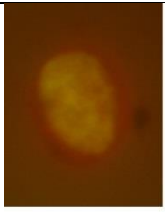

Leberidiociti (slika 19.) kod vrste *G. vultuosa* su gotovo uvijek kružnog ili ovalnog oblika gdje jezgra zauzima bočni položaj unutar stanice. Jezgra je kompaktna okrugla ili blago elongirana. Unutar stanice se nalazi velika, uglavnom kružnog oblika, vakuola karakteristična za ovaj tip stanice.



Slika 19. Leberidiociti-MGG

4.3. Akridin-Oranž diferencijalno bojanje

Na slici 20. (a-e) vidimo svih 5 tipova hemocita obojanih akridin-oranžom i karakterističnu reakciju fluorescencije jezgre(zeleno) i citoplazme (crveno) na ovo bojanje.

GRANULOCIT	PLAZMATOCIT	CIJANOCIT	PROHEMOCIT	LEBERIDIOCITI
				
				
a)	b)	c)	d)	e)

Slika 20. Hemociti - AO

4.4. Mjerenje veličina hemocita i njihovih jezgri

Mjerenje veličine pojedinih tipova hemocita rađeno je u programu Axio Vision SE64 Rel 4.8 (Carl-Zeiss Microimaging GmbH, Njemačka). Mjerile su se vrijednosti na 100 stanica za svaki tip stanice te su rezultati prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Rezultati mjerenja pojedinih tipova hemocita

ŠIRINA S.V.	MIN	MAX	DULJINA S.V.	MIN	MAX
----------------	-----	-----	-----------------	-----	-----

GRANULOCITI

STANICA(μm)	25,56	20,83	34,22	26,49	27,68	36,25
JEZGRA(μm)	11,99	5,84	13,31	14,72	6,57	15,76

PLAZMATOCITI

STANICA(μm)	11,79	6,32	20,87	25,37	19,45	35,21
JEZGRA(μm)	9,22	5,77	14,48	13,84	6,33	17,25

CIJANOCITI

STANICA(μm)	35,76	31,57	41,70	37,89	32,78	43,27
JEZGRA(μm)	10,82	5,47	13,89	12,91	5,67	16,78

PROHEMOCITI

STANICA(μm)	14,97	7,56	17,35	15,66	15,12	19,74
JEZGRA(μm)	11,76	5,77	14,48	13,84	6,33	17,25

5. RASPRAVA

Imunološki sustav pauka lokaliziran je u hemocitima koji nastaju iz stanica stijenke miokarda gdje nastaju u obliku prohemocita koji se ulaze u hemolimfu i diferenciraju se u ostale tipove hemocita (Seitz 1972). Oni doprinose obrani od patogena fagocitozom, nodulacijom i enkapsulacijom invazivnih tijela. Humoralna reakcija uključuje mehanizme koji induciraju proizvodnju melanina, kaskadu zgrušavanja i produkciju nekoliko tipova antimikrobijalnih peptida.

Imunološki sustav pauka je nespecifičan i osniva se na svojstvima hemolimfe. Prednost ovog sustava je brzi imunološki odgovor unutar minute do nekoliko sati što je u suprotnosti s imunološkim sustavom kralješnjaka koji reagira na specifične patogene što rezultira imunološkim pamćenjem kroz cijeli život jedinke. Zbog toga imunološki sustav kralješnjaka treba više vremena da reagira stvaranjem antitijela, uglavnom nekoliko sati do više dana i treba biti stvoren kroz ranu ontogenezu.

Seitz (1972) je opisao razvoj hemocita u stijenci miokarda na vrsti *Cupiennius salei* (Ctenidae) ali nije prepoznao njihovu imunološku funkciju već je smatrao da su oni samo vezani za procese presvlačenja i stvaranja hranidbenih tvari. Shermann (1973) je analizirao hemocite u vrste *Aphonopelma marxi* (Theraphosidae) i shvatio njihovu ulogu u kontekstu imunološkog odgovora i zgrušavanja. Također je revidirao zbunjujuću nomenklaturu hemocita (Shermann 1981) te je razlučio četiri zrela tipa hemocita (granulociti, plazmatociti i cijanociti) i jedan tip stanice prekursora (prohemociti) što je sukladno provedenom istraživanju. Leberidiociti se često spominju kao tip hemocita ali oni su vezani za proces presvlačenja (Shermann 1981) i odgovaraju hemocitima koje je opisao Seitz (1976). U ovom istraživanju je pronađeno svega nekoliko stanica ovog tipa (pauci nisu bili u stadiju presvlačenja) te na njima nije bilo moguće provesti statističku analizu.

Nakon ozlijede, hemociti migriraju do mjesta infekcije. Oni se direkto bore protiv patogena fagocitozom, formiranjem nodula oko bakterija (nodulacija) i formiranjem kapsula oko većih stranih tijela (enkapsulacija). Najvažnije, hemociti ispuštaju komponente koagulacijske kaskade kako bi inducirali zgrušavanje te antimikrobijalne peptide koji ubijaju mikroorganizme. Važnost fagocitoze je vjerojatno bila precijenjena ali jednako tako bitna za uklanjanje staničnog otpada te remodeliranja oštećenog tkiva (Fukuzawa et al. 2008). Dok je opća funkcija hemocita u pauka poznata, nejasno je koji je tip hemocita odgovoran za koji dio i u kojem stupnju su specijalizirani za određeni zadatak.

Granulociti su najvažniji tip hemocita. Oni su puni granula koje sadrže nekoliko tipova antimikrobijalnih peptida koji kad su izbačeni iz stanice (degranulacija) uništavaju patogene. Jezgra granulocita je manja od jezgre plazmatocita ali granulociti isto kao i plazmatociti mogu fagocitirati patogene (Fukuzawa et al. 2008). Granulociti variraju u oblicima te mogu biti nepravilni, trapezoidni, trokutasti, ovalni i vretenasti. Njihova veličina je otprilike 10 x 25 μ m što donekle odgovara dobivenim podacima istraživanja koji iznose srednju vrijednost od 26 μ m ujedno je utvrđen njihov udio u hemolimfi koji iznosi 24%.

Plazmatociti su najbrojniji tip hemocita i u njima nema granularnih inkluzija odnosno njihova citoplazma je agranularna ili fino granulirana. Jednako kao i granulociti variraju oblicima. Otprilike su iste veličine kao i granulociti (5-10 x 20-30 μ m) što odgovara vrijednosti ovog istraživanja od prosječno 12 x 25 μ m te udijelu u hemolimfi od 58%. Njihova funkcija je fagocitoza i sudjelovanje u zgrušavanju hemolimfe.

Cijanociti predstavljaju najrjeđi tip hemocita u hemolimfi i odgovaraju oenocitima (Shermann 1981). Rijetki su u hemolimfi (<5% prema Millotu 1949) ali ih često nalazimo u srcu (Shermann 1973). Njihova citoplazma je gusta i sadrži puno ribosoma i proteinskih kristala koji su identificirani kao hemocijanin u slučaju vrste *Aponophelme marxi*. Oni su uglavnom kružnog ili elongiranog oblika te su

najveći od svih hemocita $20 \times 50\mu\text{m}$ (Shermann 1981) te je ovim istraživanjem utvrđena prosječna veličina $36\mu\text{m}$ te udio u hemolimfi od 3%. Cijanociti sintetiziraju hemocijanin koji ispuštaju u hemolimfu (Kemper 1983).

Prohemociti su male, uglavnom okrugle stanice sa velikom kompaktnom jezgrom i rijetkom, homogenom citoplazmom. Kao preteče stanice ostalih hemocita možemo ih smatrati matičnim stanicama (Shermann 1981) te ih uglavnom nalazimo u stijenci miokarda (Fukazawa et al.2008; Seitz 1972). Ovim istraživanjem utvrđena je prosječna veličina koja iznosi $15\mu\text{m}$ te udio u hemolimfi od 15%.

Usporedba metoda bojanja MGG-om odnosno AO-om pokazala je znatne prednosti MGG-a zbog toga što je jednostavnija, uzorci se mogu opetovano pregledavati (AO jako brzo gubi fluorescenciju pri pregledavanju), stanice i strukture unutar njih su jasno vidljive (AO – organeli i granule slabo vidljive) zbog čega je teže razlikovati cijanocite i granulocite.

6. ZAKLJUČAK

Utvrđena su morfološka obilježja hemocita koja su sukladna sa do sada istraživanim vrijednostima hemocita u pauka drugih porodica.

Utvrđeni su udjeli svih pojedinačnih tipova hemocita u hemolimfi koji su sukladni vrijednostima drugih istraživanih pauka.

Utvrđena je zadovoljavajuća tehnika bojanja (MGG) za razlikovanje pojedinih tipova hemocita u pauka.

Ovim radom su po prvi puta definirane referentne karakteristike hemocita pauka pripadnika porodice Lycosidae.

Podaci dobiveni ovim istraživanjem pridonijeti će spoznajama u hematologiji i imunologiji pauka.

Zbog nedostatka podataka o hemocitima u pauka općenito te njihovim specifičnim ulogama, prvenstveno u imunološkom sustavu, potrebno je dalje nastaviti istraživanja na tom području.

7. LITERATURA

Baumann T (2009) Immune defence of *Cupiennius salei*. PhD thesis, University of Bern

Baumann T, Kampf U, Schurch S, Schaller J, Lariader C, Nentwig W, Kuhn-Nentwig L (2010a) Ctenidins: antimicrobial glycine-rich peptides from the hemocytes of the spider *Cupiennius salei* *Cell Mol Life Sci* 67:2787–2798

Baumann T, Kuhn-Nentwig L, Lariader C, Nentwig W (2010b) Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. *Cell Mol Life Sci* 67:2643–2651

Burmester T (2002) Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp Physiol B* 172:95–107. doi:10.1007/s00360-001-0247-7

Burmester T (2013) Evolution and adaptation of hemocyanin within spiders. In: Nentwig W (ed) *Spider ecophysiology*. Springer, Heidelberg

Decker H, Rimke T (1998) *Tarantula* hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J Biol Chem* 273:25889–25892

Decker H, Tuczek F (2000) Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci* 25:392–397

Froy O, Gurewitz M (2003) Arthropod and mollusk defensins-evolution by exon-shuffling. *Trends Genet* 19:684–687

Fukuzawa AH, Vellutini BC, Lorenzini DM, Silva PI Jr, Mortara RA, da Silva JMC, Daffre S (2008) The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana* Dev Comp Immunol 32:716–725

Iwanaga S, Lee BL (2005) Recent advances in the innate immunity of invertebrate animals. J Biochem Mol Biol 38:128–50

Jaenicke E, Decker H (2004) Functional changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. Chembiochem 5:163–169. doi:10.1002/cbic.200300714

Kawabata S (2010) Immunocompetent molecules and their response network in horseshoe crabs. Adv Exp Med Biol 708:122–136

Kawabata S, Osaki T, Iwanaga S (2002) Innate immunity in the horseshoe crab. In: Ezekowitz RAB, Hoffmann JA (eds) Infectious disease: innate immunity. Humana, New York

Kemper B (1983) Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula *Euryplema californicum* Naturwissenschaften 70:255–256

Kropf C (2013) Hydraulic system of locomotion. In: Nentwig W (ed) Spider ecophysiology. Springer, Heidelberg (this volume) Kuhn-Nentwig L, Larić CR, Streitberger K, Chandru S, Baumann T, Kampfer U, Schaller J, Schurch S, Nentwig W (2011) Purification, cDNA structure and biological significance of a single insulin-like growth factor-binding domain protein (SIBD-1) identified in the hemocytes of the spider *Cupiennius salei*. Insect Biochem Mol Biol 41:891–901

Lorenzini DM, da Silva PI, Fogaca AC Jr, Bulet P, Daffre S (2003) Acanthoscurrin: a novel glycine-rich antimicrobial peptide constitutively expressed in the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. Dev Comp Immunol 27:781–791

Lorenzini DM, Da Silva PI Jr, Soares MB, Arruda P, Setubal J, Daffre S (2006) Discovery of immune-related genes expressed in hemocytes of the tarantula spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Dev Comp Immunol* 30:545–556

Mafra DG, Da Silva PI Jr, Galhardo CS, Nassar R, Daffre S, Sato MN, Borges MM (2012) The spider acylpolyamine mygalin is a potent modulator of innate immune responses. *Cell Immunol* 275:5–11

Matsuda Y, Osaki T, Hashii T, Koshihara T, Kawabata S (2007) A cysteine-rich protein from an arthropod stabilizes clotting mesh and immobilizes bacteria at injury sites. *J Biol Chem* 282:33545–33552

Millot J (1949) Appareil circulatoire. In: Grasse P (ed) *Traite de Zoologie*, vol VI. Masson, Paris, pp 639–646

Nagai T, Kawabata S (2000) A link between blood coagulation and prophenol oxidase activation in arthropod host defense. *J Biol Chem* 275:29264–29267

Nagai T, Osaki T, Kawabata S (2001) Functional conversion of hemocyanin to phenoloxidase by horseshoe crab antimicrobial peptides. *J Biol Chem* 276:27166–27170

Nentwig W (2012) The species referred to as *Eurypelma californicum* (Theraphosidae) in more than 100 publications is likely to be *Aphonopelma hentzi*. *J Arachnol* 40:128–130

Osaki T, Kawabata S (2004) Structure and function of coagulogen, a clottable protein in horseshoe crabs. *Cell Mol Life Sci* 61:1257–1265

Pereira LS, Silva PI Jr, Miranda MT, Almeida IC, Naoki H, Konno K, Daffre S (2007) Structural and biological characterization of one antibacterial acylpolyamine isolated from the hemocytes of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. *Biochem Biophys Res Commun* 352:953–959

Riciluca KCT, Sayegh RSR, Melo RL, Silva PI Jr (2012) Rondonin an antifungal peptide from spider (*Acanthoscurria rondoniae*) haemolymph. *Res Immunol* 2:66–71

Rodrigues EG, Dobroff AS, Cavarsan CF, Paschoalin T, Nimrichter L, Mortara RA, Santos EL, Fazio MA, Miranda A, Daffre S, Travassos LR (2008) Effective topical treatment of subcutaneous murine B16F10-Nex2 melanoma by the antimicrobial peptide gomesin. *Neoplasia* 10:61–68

Seitz KA (1972) Zur Histologie und Feinstruktur des Herzens und der Hamocyten von *Cupiennius salei* KEYS. (Araneae, Ctenidae). *Zool Jb Anat* 89:351–384

Seitz KA (1976) Zur Feinstruktur der Hautungshamocyten von *Cupiennius salei* KEYS (Araneae, Ctenidae). *Zool Jb Anat* 96:280–292

Sherman RG (1973) Ultrastructurally different hemocytes in a spider. *Can J Zool* 51:1155–1159

Sherman RG (1981) Chelicerates. In: Ratcliffe NA, Rowley AF (eds) *Invertebrate blood cells*, vol 2. Academic, London

Silva PI Jr, Daffre S, Bulet P (2000) Isolation and characterization of gomesin, an 18-residue cysteine-rich defense peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* hemocytes with sequence similarities to horseshoe crab antimicrobial peptides of the tachyplesin family. *J Biol Chem* 275:33464–33470

Soares T, Ferreira FRB, Gomes FS, Coelho LCBB, Torquato RJS, Napoleao TH, Cavalcanti MSM, Tanaka AS, Paiva PMG (2011) The first serine protease inhibitor from *Lasiadora* sp.(Araneae: Theraphosidae) hemocytes. *Prog Biochem* 46:2317–2321

Soderhall K, Cerenius L (1998) Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* 10:23–2