

"Karakterizacija hipodermalnih struktura obične hobotnice, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 metodama Raman spektroskopije i elektronske mikroskopije"

Lasić, Dorotea

Master's thesis / Diplomski rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Dubrovnik / Sveučilište u Dubrovniku**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:155:821403>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-25**



SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
UNIVERSITY OF DUBROVNIK

Repository / Repozitorij:

[Repository of the University of Dubrovnik](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

**SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA PRIMIJENJENU EKOLOGIJU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA**

Dorotea Lasić

**Karakterizacija hipodermalnih struktura obične hobotnice, *Octopus vulgaris*
Cuvier, 1797 metodama Raman spektroskopije i elektronske mikroskopije**

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2024.

**SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA PRIMIJENJENU EKOLOGIJU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA**

Dorotea Lasić

**Karakterizacija hipodermalnih struktura obične hobotnice, *Octopus vulgaris*
Cuvier, 1797 metodama Raman spektroskopije i elektronske mikroskopije**

DIPLOMSKI RAD

**Mentorica:
prof. dr. sc. Sanja Tomšić**

Dubrovnik, 2024.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomšić, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za primijenjenu ekologiju Sveučilišta u Dubrovniku.

SAŽETAK

Karakterizacija hipodermalnih struktura obične hobotnice, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 metodama Raman spektroskopije i elektronske mikroskopije

Obična hobotnica, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 je mekušac kojeg, kao i druge glavonošce, karakterizira visoka sposobnost mimikrije promjenom boje svoje kože. Za tu karakteristiku su odgovorne strukture u njenoj koži, to jest kromatofore, iridofore i leukofore. U ovom radu te strukture iz jedinki s hrvatske obale Jadranskog mora su promatrane i opisane koristeći Tem mikroskopiju te pigmenti unutar kromatofora su analizirani koristeći Raman spektroskopiju. Hipodermalne strukture su konzistentne s prijašnjim zabilješkama u literaturi oblikom i veličinom. Ovaj rad također opisuje Raman spektar ksantomatina analiziranog *in situ* u koži hobotnice.

Ključne riječi: *Octopus vulgaris*, kromatofore, iridofore, leukofore, Raman spektroskopija, TEM mikroskopija

ABSTRACT

Scanning Electron Microscopy and Raman Spectroscopy Characterization of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 hypodermal structures

Common octopus *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, is a mollusk that like other cephalopods, is known for the highly advanced camouflage abilities. This is due to the structures in its skin, namely chromatophores, iridophores and leucophores. In this paper, we present the results of TEM microscopy analysis performed on octopus samples collected on the South-eastern coast of Adriatic Sea. Observed structures are described while pigments found within the chromatophores are analyzed with Raman spectroscopy. The hypodermal structures are consistent with previous records in literature in shape and size. This paper also presents and describes Raman spectra of xanthommatin analyzed *in situ* in octopus skin samples.

Keywords: *Octopus vulgaris*, chromatophores, iridophores, leucophores, Raman spectroscopy, TEM microscopy

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karakteristike obične hobotnice	1
1.1.1. <i>Opće karakteristike obične hobotnice</i>	1
1.1.2. <i>Karakteristike kože obične hobotnice</i>	1
1.1.2.1. <i>Kromatofore</i>	2
1.1.2.2. <i>Iridofore</i>	3
1.1.2.3. <i>Leukofore</i>	3
1.2. Raman spektroskopija	3
1.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)	4
1.4. Ciljevi istraživanja	4
2. MATERIJAL I METODE	6
2.1. Uzorkovanje	6
2.2. Raman spektroskopija	6
2.3. TEM mikroskopija	7
3. REZULTATI	11
3.1. Morfometrijska obilježja uzoraka	11
3.2. Rezultati Raman spektroskopije	11
3.3. Rezultati TEM mikroskopije	15
4. RASPRAVA	27
4.1. TEM mikroskopija	27
4.2. Raman spektroskopija	28
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA	36

1. UVOD

1.1. Karakteristike obične hobotnice

1.1.1. Opće karakteristike obične hobotnice

Obična hobotnica, *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 je mekušac koji pripada razredu glavonožaca, odnosno Cephalopoda, u podrazredu Coleoidea, redu Octopoda, podredu Incirrata i porodici Octopodidae (Molluscabase, 2024). Karakteriziraju je mišićav, vrećast plašt do 40 cm duljine i osam krakova s po dva reda prijanjaljki koji mogu biti duljine do metar, a kod mužjaka je treći krak s desne strane preobražen u hektokotilus. Koža ima mrežasti izgled s četiri bijele točke, dvije između očiju i dvije na dorzalnoj strani (Sanchez i sur., 2015). Nemaju ljuske, peraje ni kućicu, a imaju lijevak bez poklopca koji izlazi iz plaštane šupljine i vrlo visoko razvijene oči (Matoničkin i sur., 1998).

Rasprostranjena je u neritičkoj zoni u svim oceanima i brojnim morima svijeta, u umjerenim, tropskim i suptropskim područjima. Obitava na bentosu i preferira stjenovite obale s procijepima i rupama gdje nalazi sklonište (Sanchez i sur., 2015). Svoj život započinje u obliku paraličinke, koja je morfološki vrlo slična odrasloj jedinci te radi nedostatka metamorfoze se ne smatra pravom ličinkom. Razlikuje se od odrasle jedinice po tome što je planktonski oblik, a na kraju paraličinačkog stadija tone na dno i prelazi u odrasli stadij. Dostiže spolnu zrelost s nešto manje od godinu dana starosti. Nakon mriješćenja ženka polaže oplođena jaja u nakupine koje nalikuju grozdovima. Ženka skrbi za položena jaja prozračujući ih vodom iz lijevka. Nakon izvaljivanja jaja, ženka ugiba (Von Boletzky i Villanueva, 2014).

1.1.2. Karakteristike kože obične hobotnice

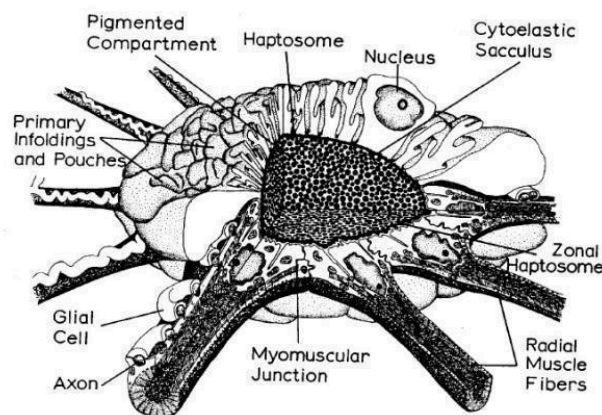
Koža glavonožaca, uključujući i hobotnice, pokriva vanjski dio cijelog tijela i nastavlja se na unutarnju površinu sifona i plaštane šupljine. Pokazuje visoku mjesnu specijalizaciju u obliku pipaka na krakovima.

Vanjski sloj kože je prozirna epiderma koja se sastoji od jednog sloja stupačastih epitelnih stanica i mjestimičnih sluznih žlijezda. Epiderma je debelom bazalnom laminom povezana na dermis (Anadón, 2019)..

Dermis se sastoji od vezivnog tkiva koje tvore brojna vlakna kolagena u različitim količinama izvanstanične tekućine. Kolagenska vlakna stvaraju snopove različitih orijentacija, a u dorzalnom dijelu prisutni su mišićni snopovi koji omogućuju promjenu oblika same površine kože, to jest brzom kontrakcijom i relaksacijom mogu stvarati izbočine i udubine na površini kože. U dermisu se nalaze kromatofore, iridofore i leukofore. Zahvaljujući tim stanicama koža ima sposobnost promjene boje u svrhu komunikacije među jedinkama, mimikrije i privlačenja plijena (Anadón, 2019).

1.1.2.1. Kromatofore

Kromatofore su složeni "organi" koji se sastoje od elastične vrećice koja sadrži po jednu stanicu punu pigmentnih granula okruženu radijalnim mišićnim vlaknima (Slika 1.) Ta vlakna su gusto pokrivena živčanim vlaknima koja se sastoje od glija stanica i omotanih živčanih stanica koja kontroliraju kontrakciju i relaksaciju kromatofora i omogućuju brzu promjenu boje. Kontrakcija radijalnog mišića širi pigmentnu vrećicu, a relaksacija je skuplja, što omogućuje brzu promjenu boje u koži hobotnice (Anadón, 2019).



Slika 1. Dijagram kromatofore glavonožaca (Izvor: Cloney i Florey, 1968)

Kromatofore mogu dati različite boje koži, od žute, narančaste, crvene, smeđe, do crne boje. Sve kromatofore su osnovnim sastavom iste, ali svjetlije kromatofore su podrijetlom mlađe i dublje u koži, a kako dozrijevaju i rastu bliže se samoj površini kože i postaju tamnije. Smatra se da pigment u kromatoforama spada u obitelj omokroma, koju čine česti pigmenti kod beskralježnjaka, odnosno točnije da je ksantomatin (Messenger, 2001).

1.1.2.2. Iridofore

Iridofore su strukture u drugom sloju ispod kromatofora u koži glavonožaca. To su naslage vrlo tankih stanica koje su sposobne reflektirati svjetlo različitih valnih duljina. Boja svjetlosti koje reflektiraju iridofore se razlikuje ovisno o kutu promatranja, odnosno reflektira se svjetlost plave boje pod pravim kutom, a pod tupim kutom svjetlost crvene boje. Uz kromatofore, iridofore sudjeluju u mimikriji kako bi se stvorila dosljedna slika koja nalikuje okruženju. Za razliku od kromatofora, iridofore reagiraju na podražaje puno sporije i zbog toga se smatra da se ne reguliraju živčanim putem, nego neurohormonima ili slabim električnim impulsom (Gilmore i sur., 2016).

1.1.2.3. Leukofore

Leukofore su stanice koje reflektiraju svjetlost. Za razliku od iridofora, reflektiraju puni spektar svjetlosti, odnosno bijelo svjetlo. Smatra se da su pomoćne strukture koje djeluju da učinak kromatofora i iridofora izgleda snažniji na bijeloj pozadini koju stvaraju. Zbog filtracije svjetlosti koju reflektiraju, također pripomažu u vjernom prikazu boja, naročito u većim dubinama (Gilmore i sur., 2016).

Za razliku od kromatofora, koje pružaju pigmentnu koloraciju, iridofore i leukofore proizvode strukturnu koloraciju. Pigmenti su molekule koje imaju boju, odnosno apsorbiraju svjetlost, a strukturnu koloraciju tvore materijali koji su bezbojni, ali uzrokuju refrakciju i raspršenje svjetlosti.

1.2. Raman spektroskopija

Raman spektroskopija je tehnika vibracijske spektroskopije koja se temelji na neelastičnom raspršivanju svjetla, to jest Raman raspršenju. Do Raman raspršenja dolazi kad se foton apsorbira u česticu i zatim odbija s promjenom u energiji. Ta promjena u energiji je karakteristična za svaku pojedinu česticu i zbog toga je korisno za analizu pojedinih supstanci. Raman raspršenje je neovisno o količini uzorka i zbog toga se često koristi i pri mikroskopskim količinama. Osim toga, ne oštećuje uzorak i spektroskopija je moguća i na vlažnim površinama. Zbog tih karakteristika, Raman spektroskopija ima široku primjenu, pa je korisna i u analizi molekularnog sastava u tkivima. (Mitsutake i sur, 2019).

Raman efekt je otkrio Sir Chandrasekhar Venkata Raman 1928. godine i za to otkriće je dobio Nobelovu nagradu. Delhaye i Dhamelincourt 1975. godine razvijaju Raman mikrospektrometre, odnosno kombiniraju svjetlosne mikroskope s Raman spektrometrima kako bi se omogućilo dobivanje molekularnog i kemijskog potpisa uz optičku sliku. Upotreba Raman spektroskopije za analizu bioloških pigmenata datira do rada Eulera i Hellstroma 1932. godine, a popularizirana je 80-tih. Pigmenti koji se najviše istražuju su karotenoidi i klorofili, najviše iz biljnih tkiva (Jehlička i sur., 2014).

1.3. Transmisijaska elektronska mikroskopija (TEM)

Transmisijaska elektronska mikroskopija, odnosno TEM, je vrsta mikroskopije koja se obavlja transmisijskim elektronskim mikroskopom. Za razliku od skenirajućeg elektronskog mikroskopa kod kojeg se elektroni odbijaju od površine uzorka, kod TEM mikroskopa elektroni prolaze kroz uzorak kako bi stvorili uvećanu sliku. TEM mikroskopi stvaraju detaljnu sliku i omogućuju vidljivost struktura i do molekularne razine. U biologiji se koriste kako bi se omogućila vidljivost i analiza stanica tako da se uzorci tkiva stabiliziraju i uklapaju u plastiku. Taj pristup je koristan za opisivanje morfologije stanica (Joy i sur., 2024). Prvi TEM elektronski mikroskop su konstruirali Ernst A. F. Ruska i Max Knoll 1931. godine. Marton 1934. godine prvi put koristi TEM mikroskopiju za biološka istraživanja, ali taj način nema širu primjenu do 1940-tih godina. U tom periodu biolozi diljem Europe i SAD-a počinju koristiti komercijalno dostupne TEM mikroskope i analiziraju makromolekule i viruse (Harris, 2015).

1.4. Ciljevi istraživanja

Ciljevi ovog istraživanja su:

- prikazati i opisati strukturu kože obične hobotnice iz Jadranskog mora pomoću slikovnog snimanja koristeći transmisijsku elektronsku mikroskopiju,
- definirati Raman spektar pigmenata u kromatoforima obične hobotnice iz Jadranskog mora.

2. MATERIJAL I METODE

2.1. Uzorkovanje

Ova studija predstavlja randomizirano kontrolirano istraživanje hipodermalnih strukturnih komponenti obične hobotnice. Studija je provedena na uzorcima odraslih jedinka hobotnice koje su ulovljene vršom u prosincu 2022. kod otoka Čiova i otočića Drvenika Velikog. Označene su (A,B,C,D) za jednostavno rukovanje u daljnjim ispitivanjima strukturnih i sastavnih svojstava materijala na mikroskopskoj razini. Na dane ulova prema Roperu i Vossu (1983) izmjerene su duljina plašta (ML), duljina glave (HL), duljina krakova (ArL) i ukupna duljina (TL) mjerilom točnosti 1 mm i te je izvagana mokra masa vagom točnosti 1g. Uzeti su uzorci kožnog tkiva s različitih dijelova tijela, to jest po dva s područja plašta, po jedan s oko očnog područja i po dva s područja krakova, površine oko 1 cm². Pohranjeni su u hladnjaku, odmah nakon obavljenih morfometrijskih mjerenja na temperaturi od -20°C. Uzorci su redom označeni brojevima od 1 do 20.



Slika 2. Obična hobotnica *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797, jedinka A

2.2. Raman spektroskopija

Četiri odleđena uzorka su uobičajeno pripremljena za mikroskopiranje na predmetnom stakalcu. Pod svjetlosnim mikroskopom su identificirana područja s visokom koncentracijom pigmenta, odnosno vidljive kromatofore. Korišten je Renishaw inVia Raman Microscope s valnim duljinama 785 nm i 532 nm. Ove valne duljine su odabrane jer su davale najbolje rezultate s obzirom na pozadinske smetnje i osjetljivost uzorka. Analizirani su uzorci netom nakon odmrzavanja i nakon sušenja, bez dodatnog tretmana.



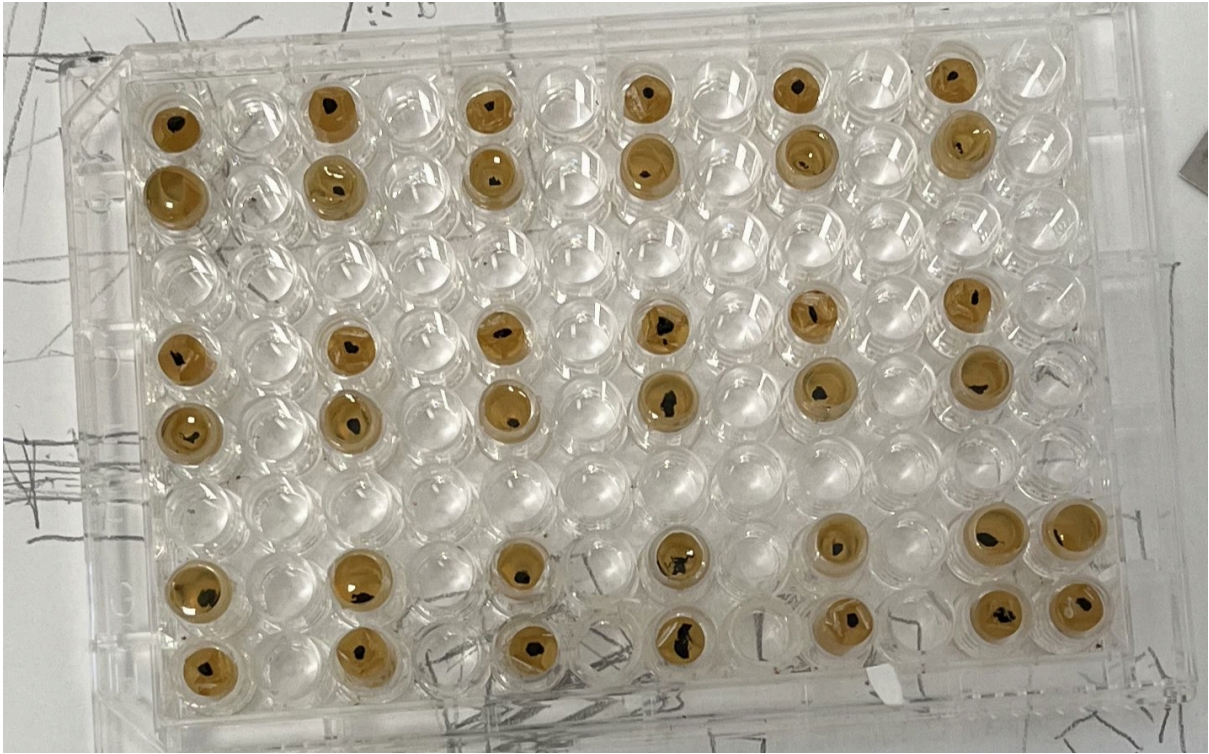
Slika 3. Raman mikroskop.

Analizirane su do tri nasumično odabrane kromatofore na pojedinom uzorku, do tri puta. Nakon svakog obavljenog spektra uzorak je pregledan kako bi se osiguralo da nije došlo do izgaranja.

Obrada i analiza spektara je obavljena u različitim verzijama programa OriginPro. Rezultati su normalizirani i izgladeni. Odrađeno je poravnanje prema baznoj crti. Napravljen je prosjek rezultata uzoraka iz svake jedinice.

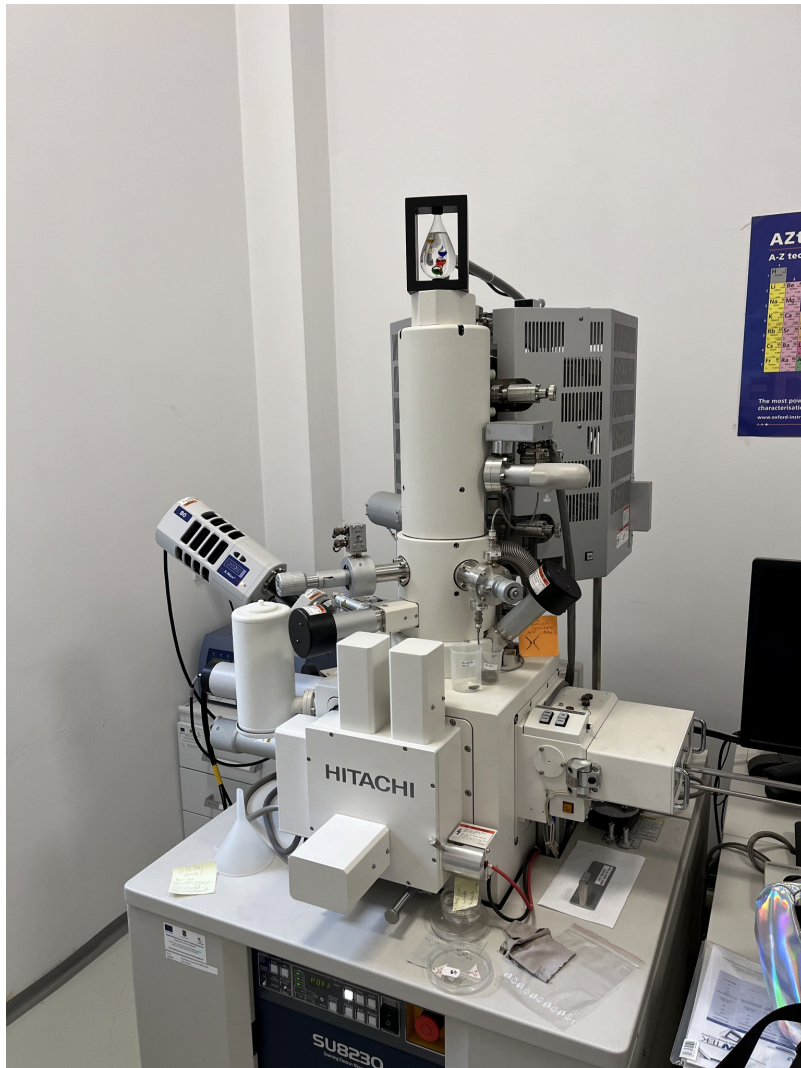
2.3. TEM mikroskopija

Uzorci su pripremljeni za TEM nizom tretmana kako bi se omogućilo rezanje dovoljno tankog uzorka da bi elektronski snop mogao proći kroz uzorak, te stabilizacija tkiva kako bi moglo podnijeti mikroskopiju. Tijekom prvog dijela postupka uzorci su čuvani u hladnjaku na temperaturi od 4°C. Od odleđenih uzoraka su odrezani uzorci površine oko 1 mm². Prefiksacija je obavljena u 2.7 %-tnoj otopini Glutaraldehida u 0.1 M PBS tijekom dva sata. Nakon toga su prebačeni u epruvete 0.15M PBS na miješalici na 30 minuta. Nakon toga su fiksirani u 0.5ml 0.2 %-tne otopine osmijske kiseline na miješalici tijekom 1.5h, nakon čega se osmijska kiselina ispiru PBS-om 30 minuta. Uzorci se dehidriraju u otopini acetona u periodima od po 10 minuta, s rasponom otopine od 30 % do 100 % s postupnim povećanjem, s tim da je prelazak iz 70 % u 80 % trajao 15 minuta, a nakon tog razdoblja obavljanje postupka se provodi na sobnoj temperaturi. Uzorci su uklopljeni u zamjenu za Epon 812 postepeno. Po sat vremena su proveli u mješavini smole i acetona u omjeru 1:2, zatim 1:1, a zatim 2:1, prije nego što su konačno prebačeni u samu tekuću smolu. Polimerizacija se provodi tijekom 48 sati na temperaturi od 60 °C. U tom razdoblju se smola skruti i uzorak postaje stabilan, odnosno stvara se čvrsta "čahura" iz koje se uzorak sprema za analizu (Slika 4). Ultramikrotomom na staklenom nožu su rezane sekcije čahure debljine 90 nm. Rezultirajuće sekcije su pregledane pod svjetlosnim mikroskopom kako bi se uzorak dalje odrezao i kako bi se odredio dio uzorka na kojemu je jasno vidljiva površina kože s kromatoforama.



Slika 4. Uzorci pripremljeni za TEM analizu.

Vrh čahure je smanjen na površinu 0.1 mm^2 . Ultramikrotomom i dijamantnim nožem su rezane sekcije koje su postavljene na mrežicu. Mikroskopija je obavljena Hitachi SU82300 elektronskim mikroskopom (Slika 5) pri različitim uvećanjima.



Slika 5. Elektronski mikroskop.

3. REZULTATI

3.1. Morfometrijska obilježja uzoraka

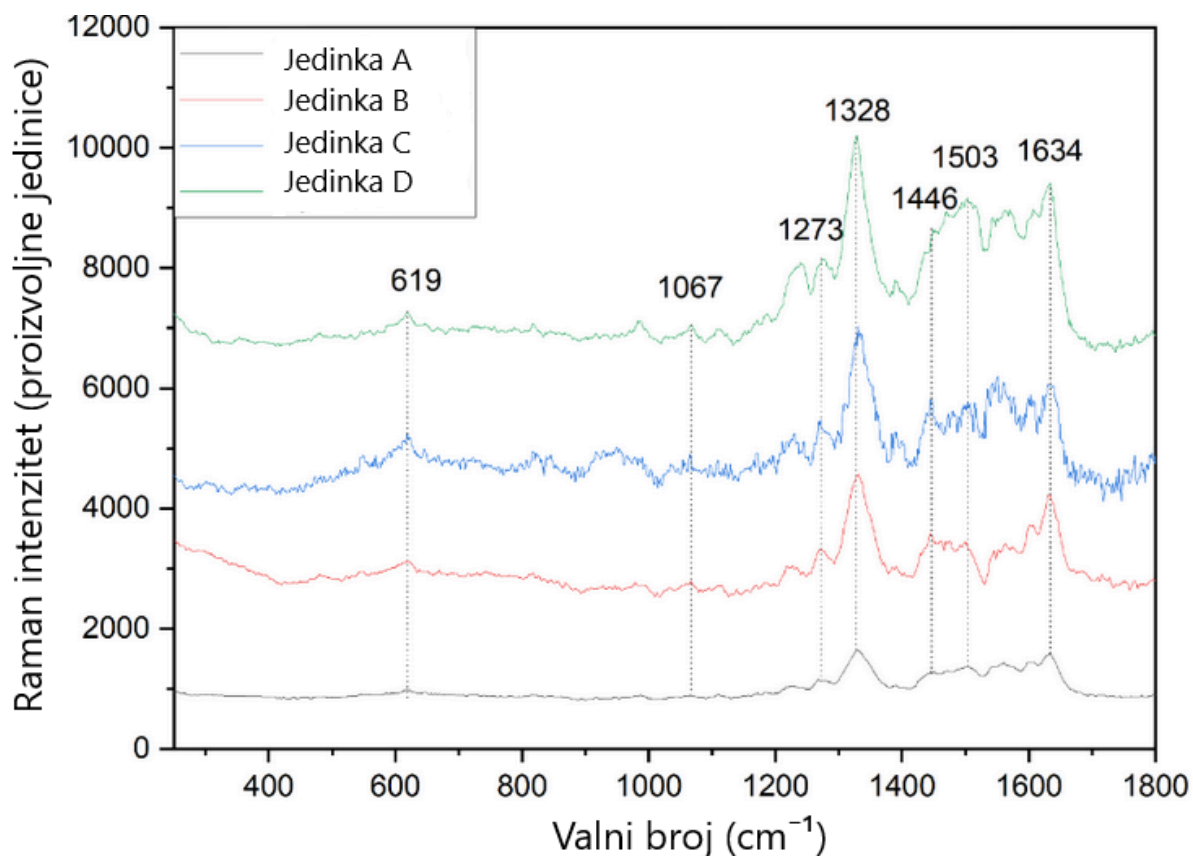
U tablici 1. su prikazana morfometrijska obilježja uzorkovanih jedinka hobotnice. Srednja vrijednost tjelesne mase analiziranih jedinki iznosila je 835 g, a srednja vrijednost ukupne duljine iznosila je 66,2 cm. Prosječna duljina plašta iznosila je 45,2 cm, prosječna duljina glave 4,55 cm, a prosječna duljina krakova 50,35 cm. Odnos mase i duljine kod hobotnice A je 12,12 g/cm, kod hobotnice B 13,22 g/cm, kod hobotnice C 12,73 g/cm, a kod hobotnice C 12,32 g/cm. Prosječni odnos mase i duljine je 12,6 g/cm.

Tablica 1. Morfometrijska obilježje hobotnica iz ovog istraživanja. Označene su ukupna duljina (TL), duljina plašta (ML), duljina krakova (ArL), duljina glave (HeadL) i masa (m).

	Hobotnica A	Hobotnica B	Hobotnica C	Hobotnica D
TL (cm)	74,5	75,3	58,2	56,8
ML (cm)	10,6	12,4	11,8	10,4
ArL (cm)	59,0	58,2	42,5	41,7
HeadL (cm)	4,9	4,7	3,9	4,7
m (g)	903	996	741	700

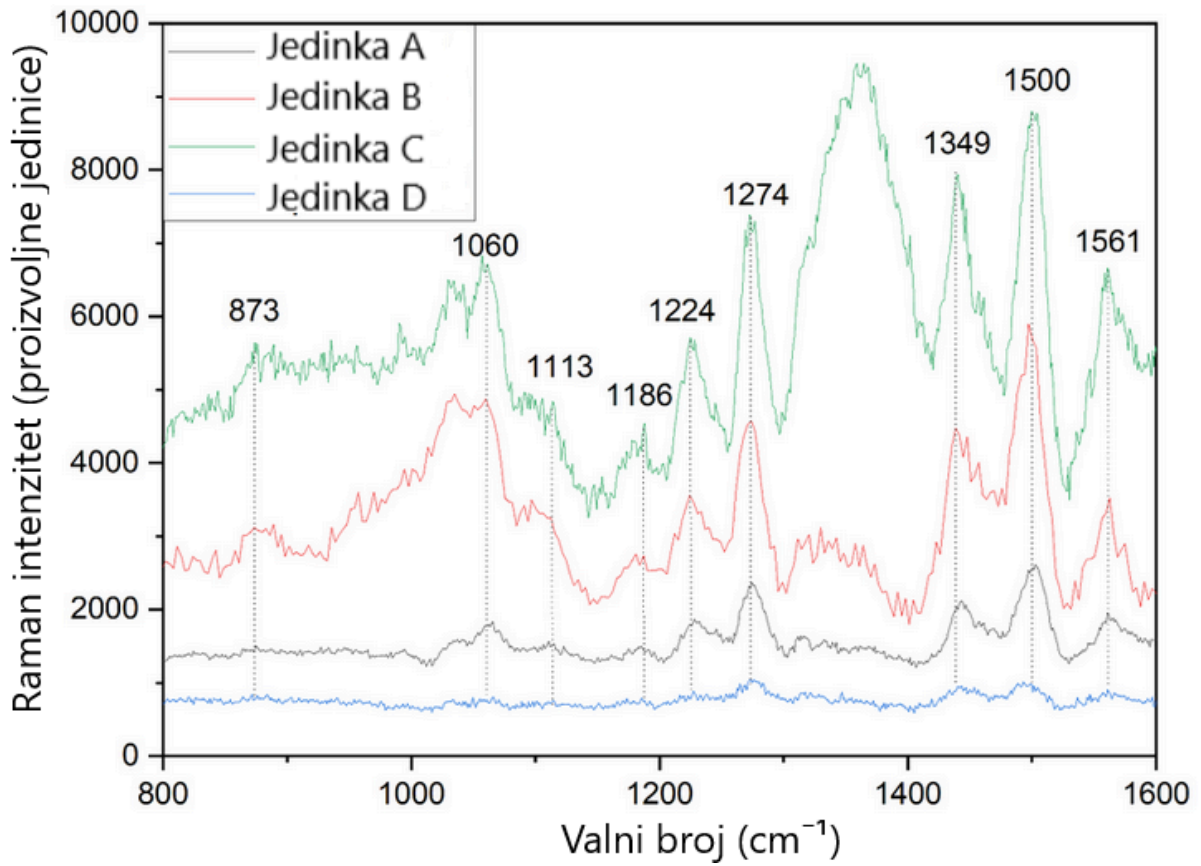
3.2. Rezultati Raman spektroskopije

Pri većoj jačini lasera se dobivaju jasniji rezultati ali dolazi do izgaranja tkiva, te su jasni rezultati postignuti pri jačini oko 1-5 %, ali uz visok stupanj pozadinskih smetnji. Biološko tkivo fluorescira pri osvjetljenju lasera, ali same kromatofore ne. Srednji spektar je dobiven od analize kože iz različitih dijelova tijela od pojedine jedinke hobotnice (Slika 8). Analiza je obavljena kod svakog uzorka na uvećanjima od 5x, 20x, 50x i 100x. Uzorci su bili vlažni ili suhi.



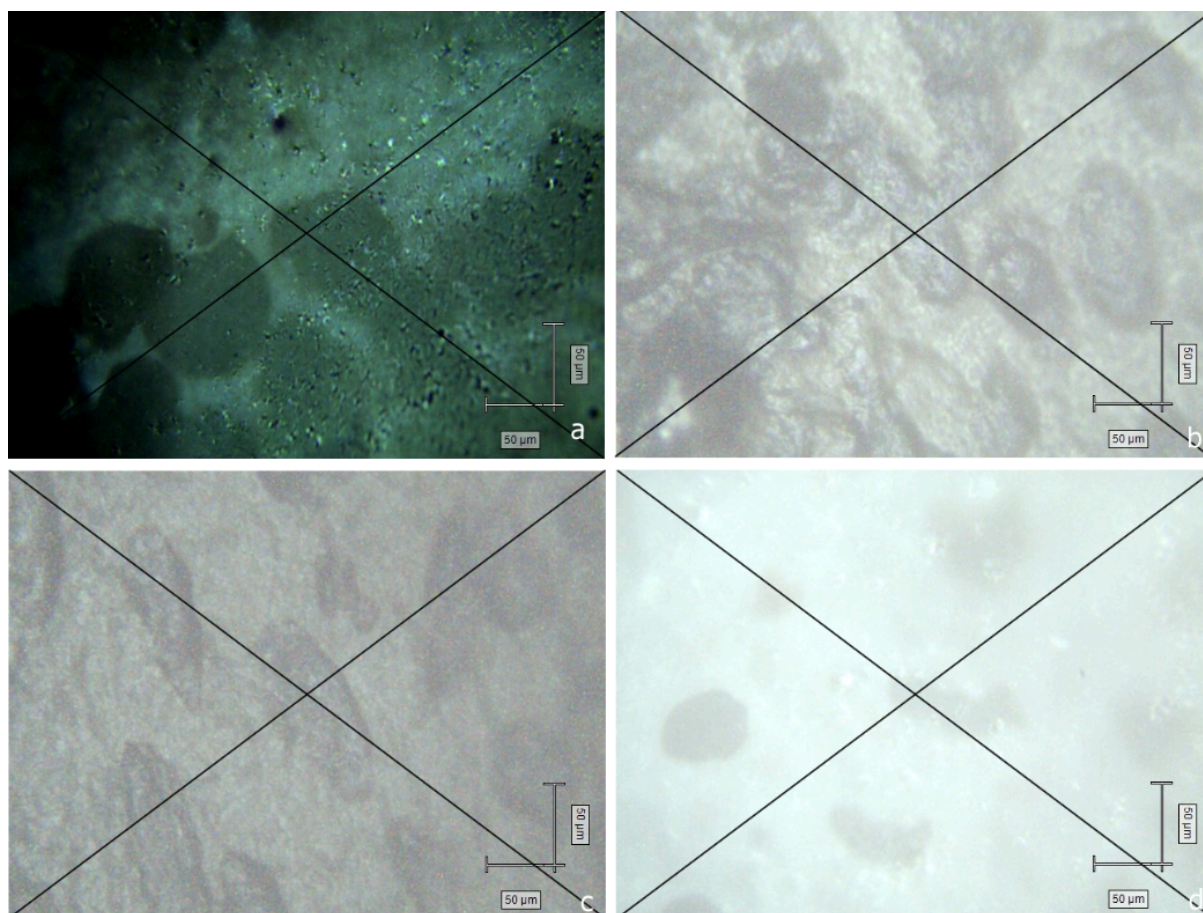
Slika 6. Srednji prikaz Raman spektra pri laseru valne duljine 532 nm.

Pri laseru valne duljine 532 nm, odnosno zelenom laseru, kod svih jedinki je uočen najviši vrh na valnom broju 1328 cm^{-1} . Manji vrhovi se pokazuju na valnim brojevima 1446 cm^{-1} , 1503 cm^{-1} i 1634 cm^{-1} . Dodatni vrhovi se pokazuju na valnim brojevima 619 cm^{-1} , 1067 cm^{-1} i 1273 cm^{-1} .



Slika 7. Srednji prikaz Raman spektra pri laseru valne duljine 785 nm.

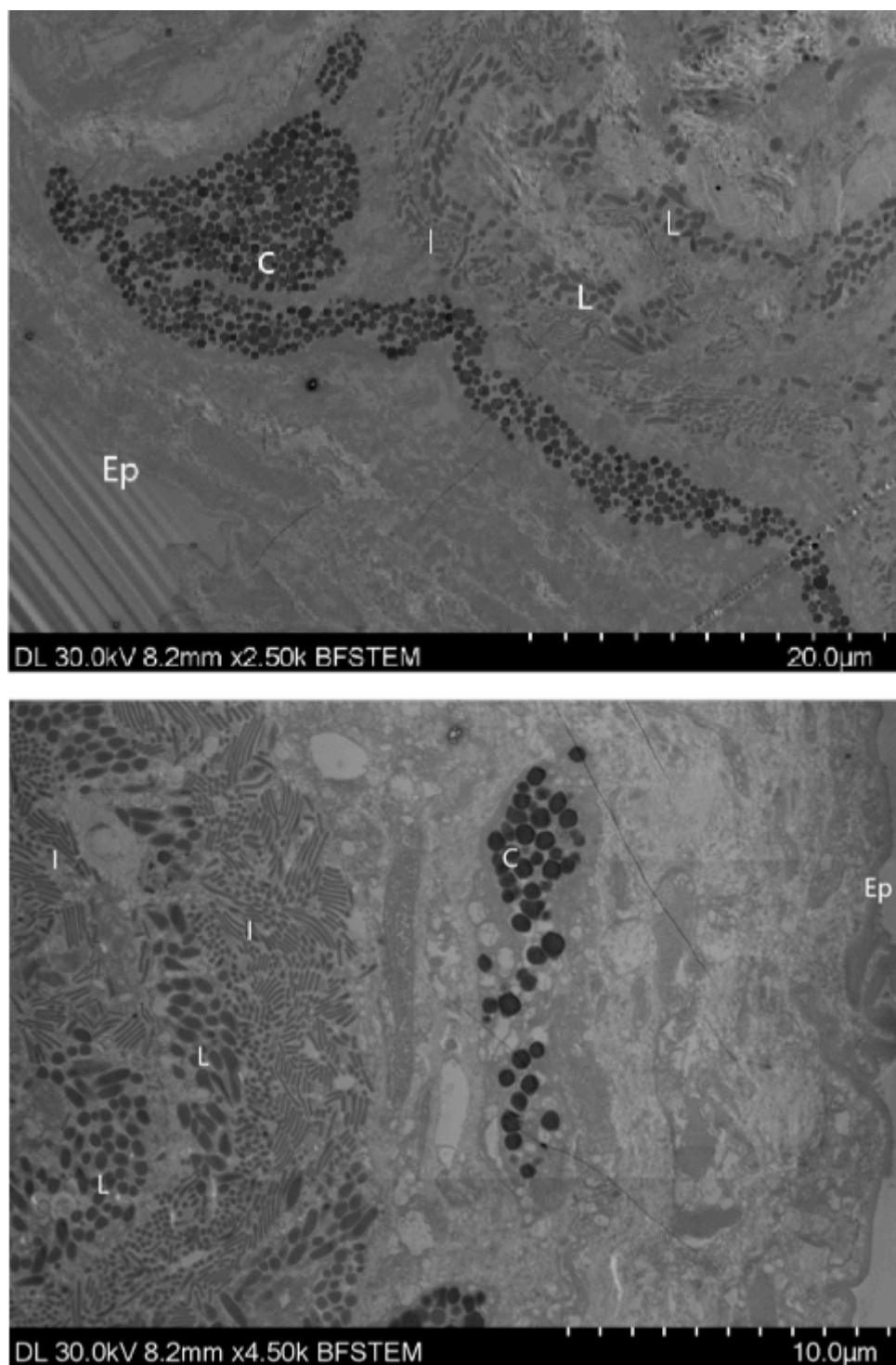
Pri laseru valne duljine 785 nm, odnosno gotovo infracrvenom laseru, najviši vrhovi su na valnim brojevima 1274 cm^{-1} , 1349 cm^{-1} , i 1500 cm^{-1} . Drugi vrhovi se nalaze na valnim brojevima 873 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1113 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} i 1561 cm^{-1} .



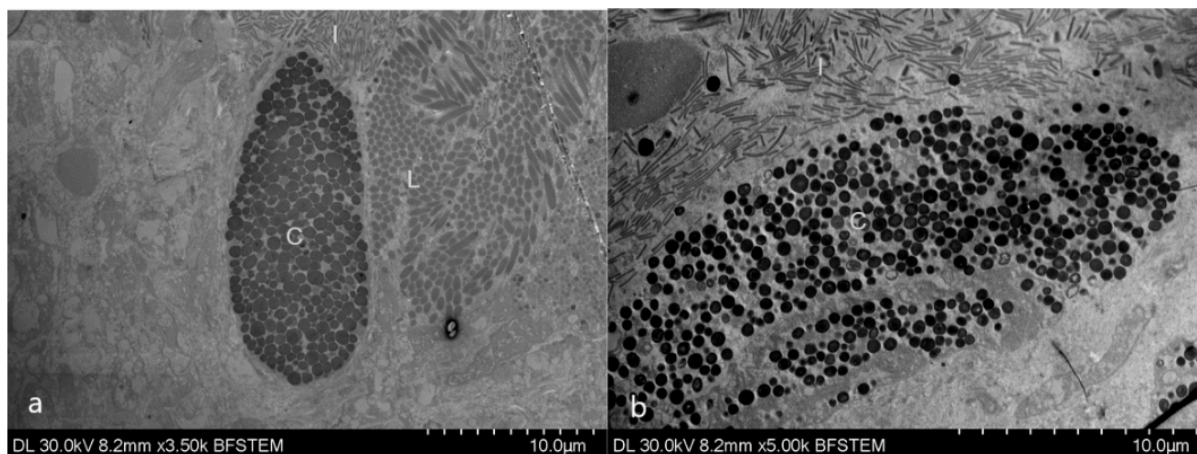
Slika 8. Primjer analiziranih područja iz različitih uzoraka pod svjetlosnim mikroskopom pri uvećanju od 20x. Presjek dijagonala na svakoj pojedinoj slici prikazuje sredinu, odnosno mjesto koje je analizirano. (a) Vlažni uzorak broj 3 uzet iz jedinke hobotnice A. (b) Suhi uzorak broj 7 uzet iz jedinke hobotnice B. (c) Suhi uzorak broj 11 iz jedinke hobotnice C. (d) Suhi uzorak broj 17 iz jedinke hobotnice D.

3.3. Rezultati TEM mikroskopije

Na slikama 9 i 10 su vidljivi različiti oblici kromatofora u koži i njihov položaj u odnosu na druge strukture. Na slici 9 je također vidljiv položaj u odnosu na površinski sloj epitelnih stanica. Na toj slici kromatofore imaju nepravilan izduljen oblik, a na slici 10 ovalan oblik. Izmjerena vrijednost duljine kromatofore na slici 9 gore je $>40 \mu\text{m}$, a dolje je cca. $12 \mu\text{m}$. Na slici 10 zabilježene vrijednosti duljina prikazanih kromatofora bile su jednake i iznosile su 20 nm . Na slikama 9 i 10 su također vidljive skupine iridofora i leukofora.

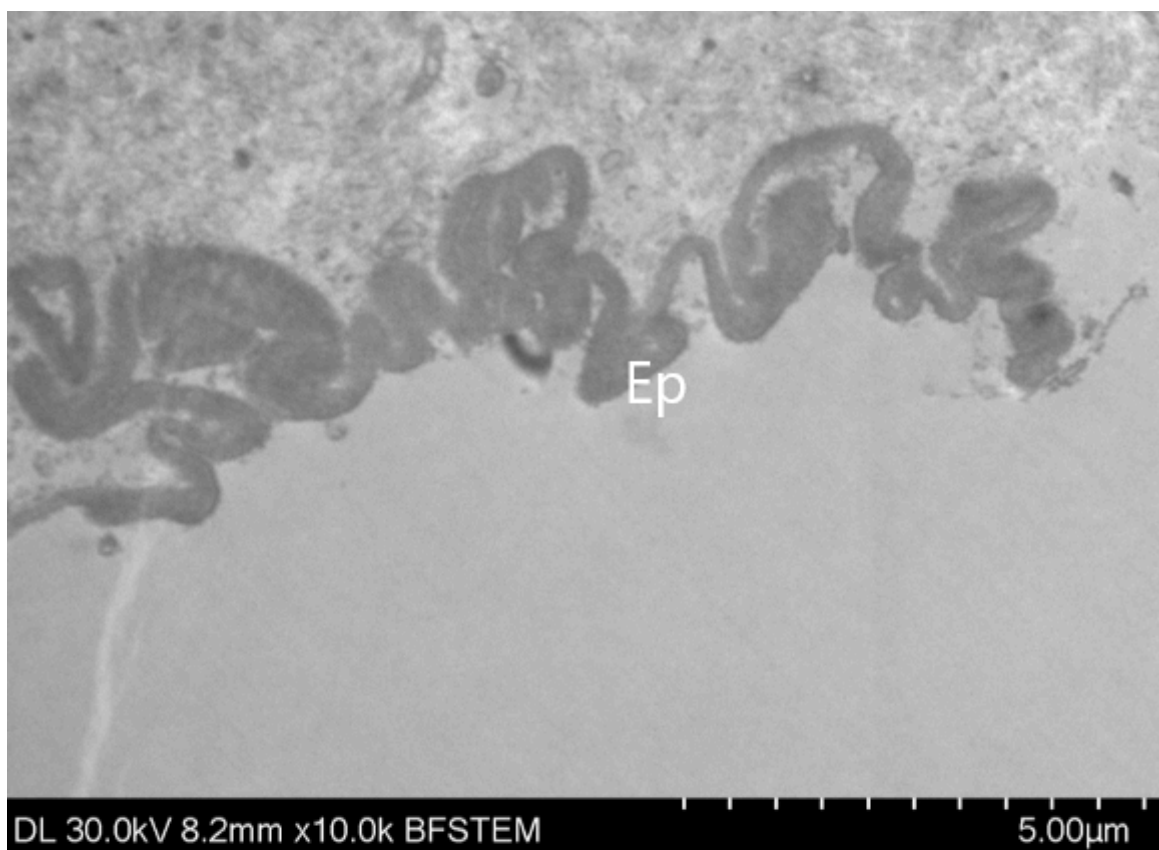


Slika 9. Prikaz kože hobotnice pod transmisijskim elektronskim mikroskopom pri uvećanju od 2500x (gore) i 4500x (dolje). Na slici su vidljive površinske kromatofore (C) , iridofore (I) i leukofore (L) te je označen epitelni sloj (Ep).



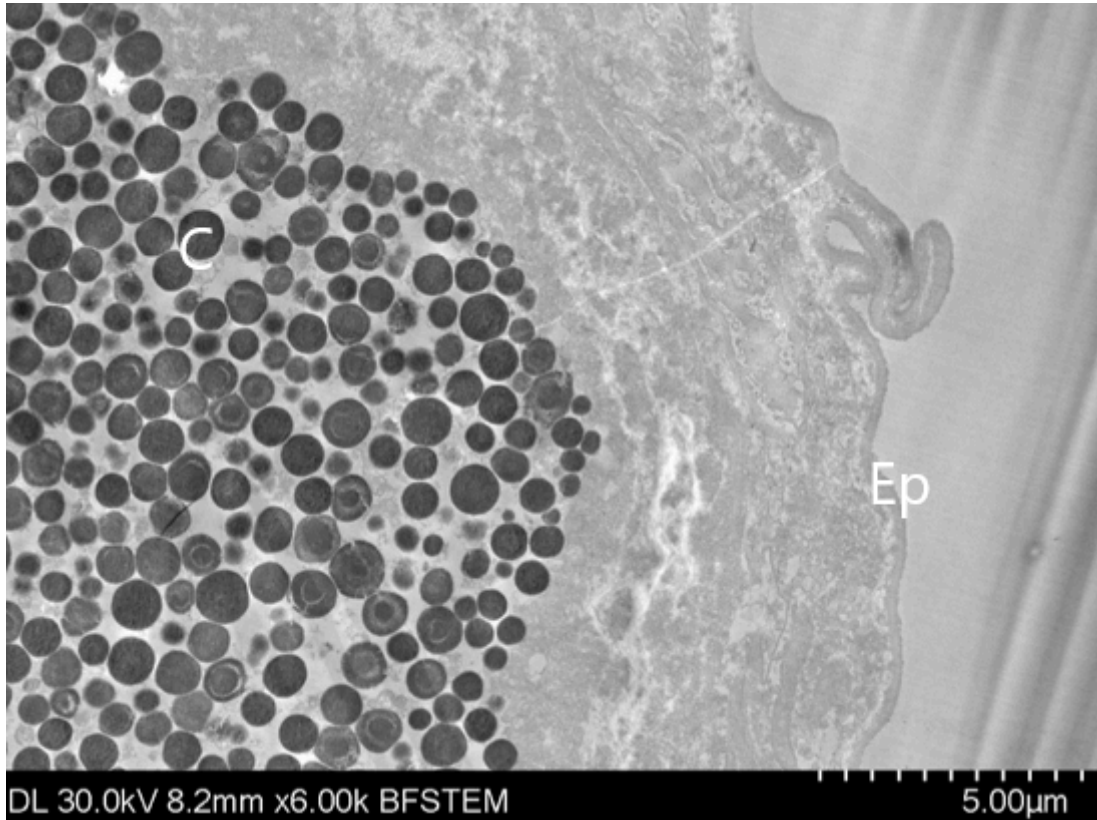
Slika 10. Kromatofore kod hobotnice pri uvećanju od 3500x (a) i 5000x (b) s označenim kromatoforama (C), iridoforama (I) i leukoforama (L).

Na slici 11 je prikazan površinski sloj kože. Vidljiva su vlakna kolagena koja tvore dermis. Nisu vidljive pojedinačne stanice epitela. Površina kože na slici 11 gore je naborana, a dolje glatka.



Slika 11. Epitel hobotnice (ep) pri uvećanju od 10000x (gore) i 11000x (dolje). Označen je površinski sloj (Ep) i kolagenska vlakna (col).

Na slici 12 prikazan je dio kromatofore u odnosu na površinski sloj epitela. Vidljivo je da se kromatofora nalazi u najbližem dijelu 5-6 μm ispod površine. Rub kromatofore prati površinu kože.

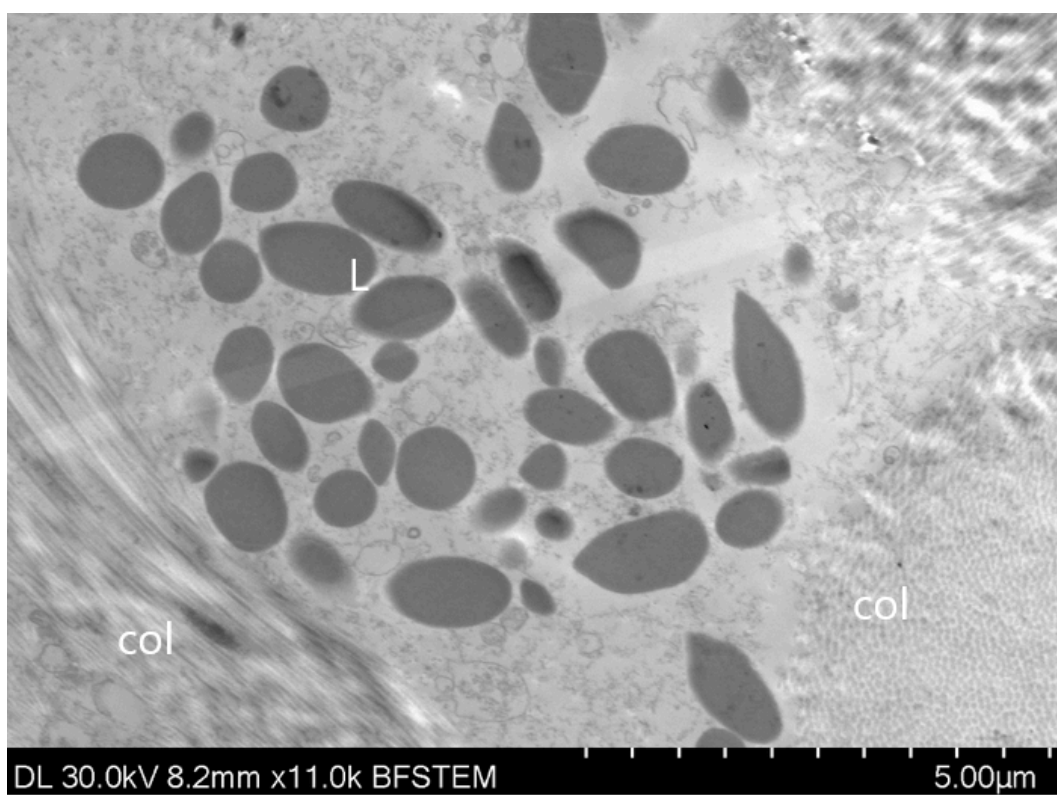


Slika 12. Kromatofora (C) cca. 5 μm ispod površine kože (Ep) pri uvećanju 6000x.

Slike 13 i 14 prikazuju različite skupine leukofora. Ove stanice su ovalnog oblika i nakupine mogu biti različitih veličina.

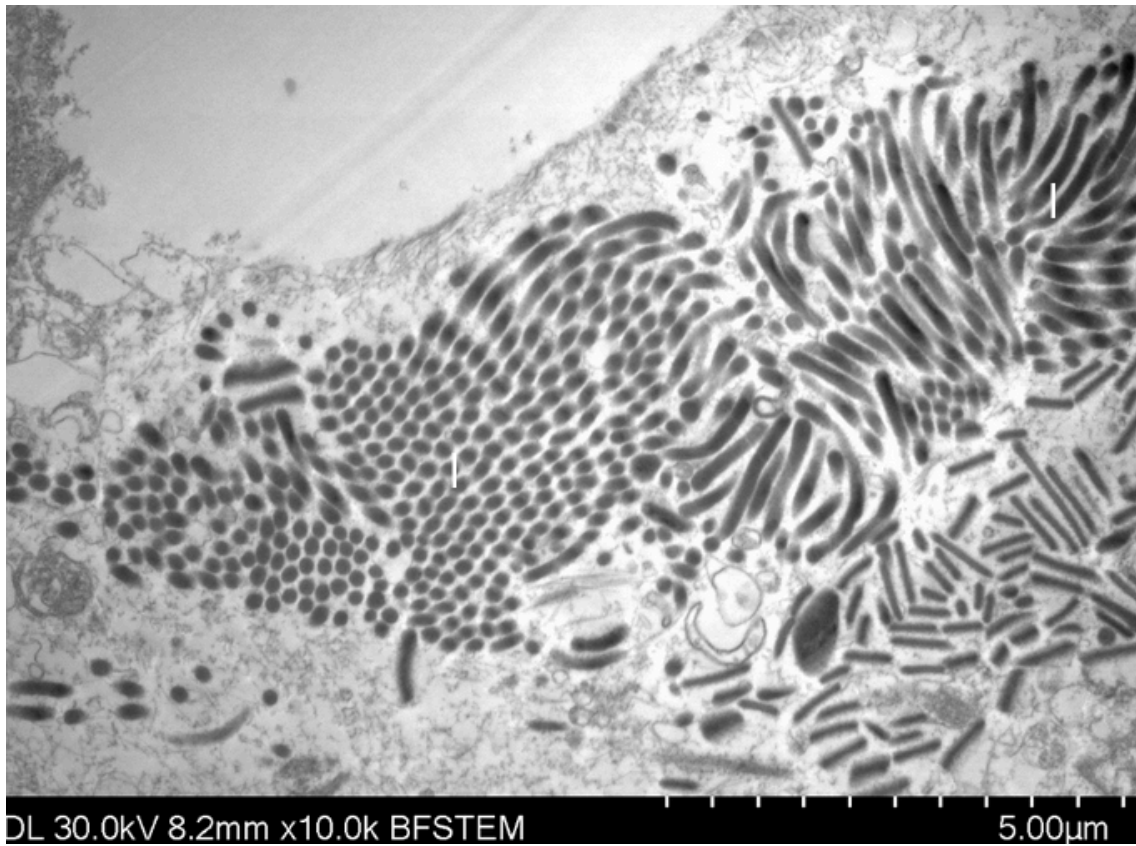


Slika 13. Sloj leukofora (L) pri uvećanju od 3000x

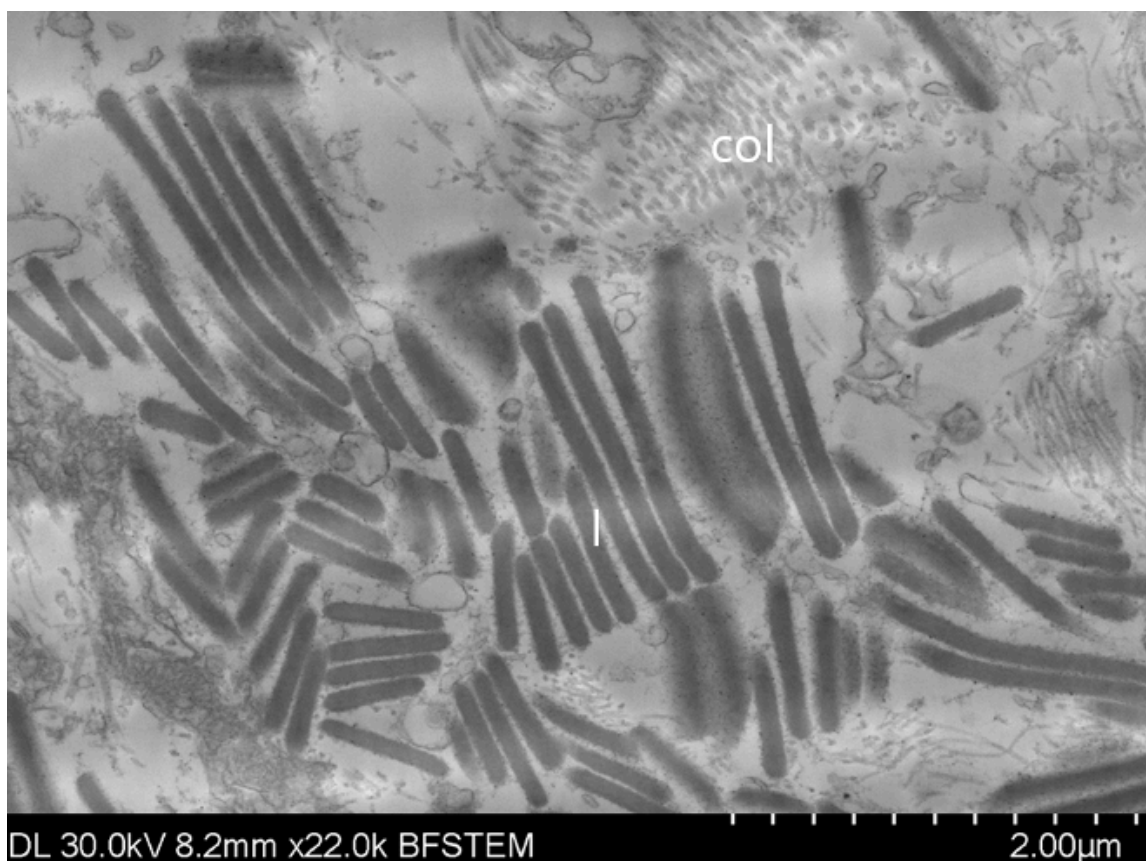


Slika 14. Skupina leukofora (L) pod uvećanjem 11000x s vidljivim vlaknima kolagena (col) u različitim orijentacijama

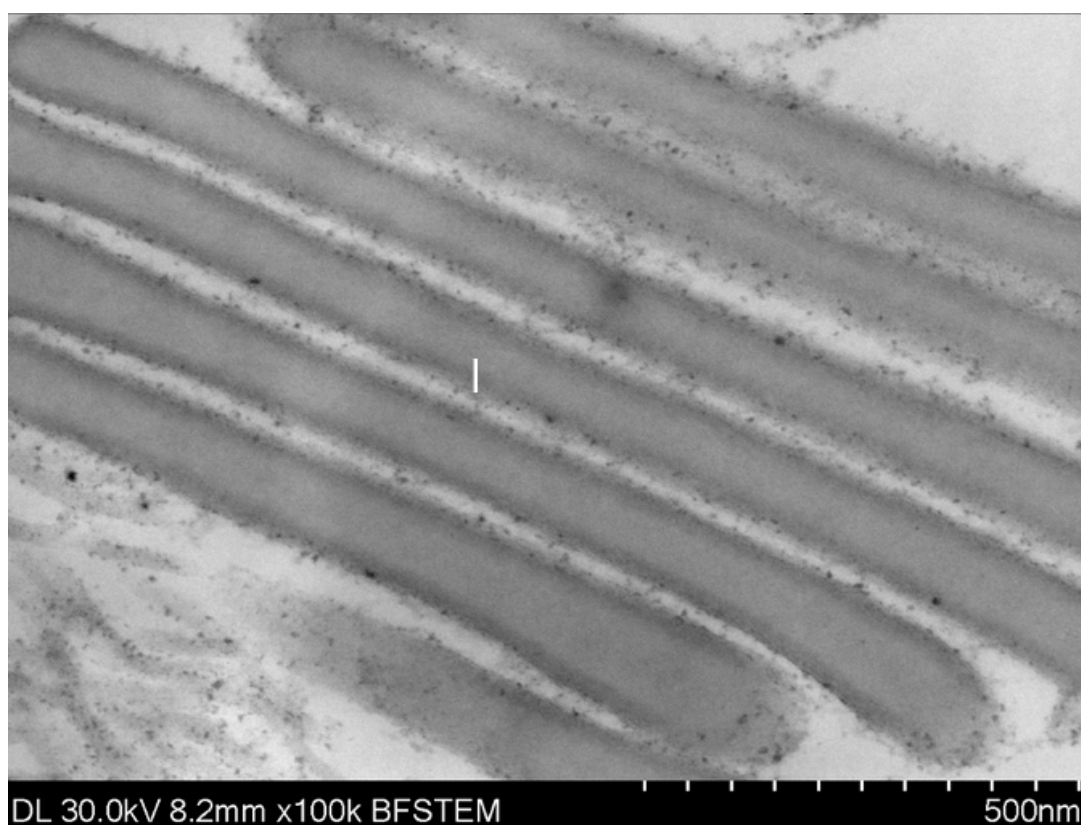
Slike 15, 16 i 17 prikazuju iridofore. Iridofore su štapićastog oblika i tvore skupine pravilno naslaganih pločica u dermisu.



Slika 15. Sloj iridofora (I) pod uvećanjem 10000x

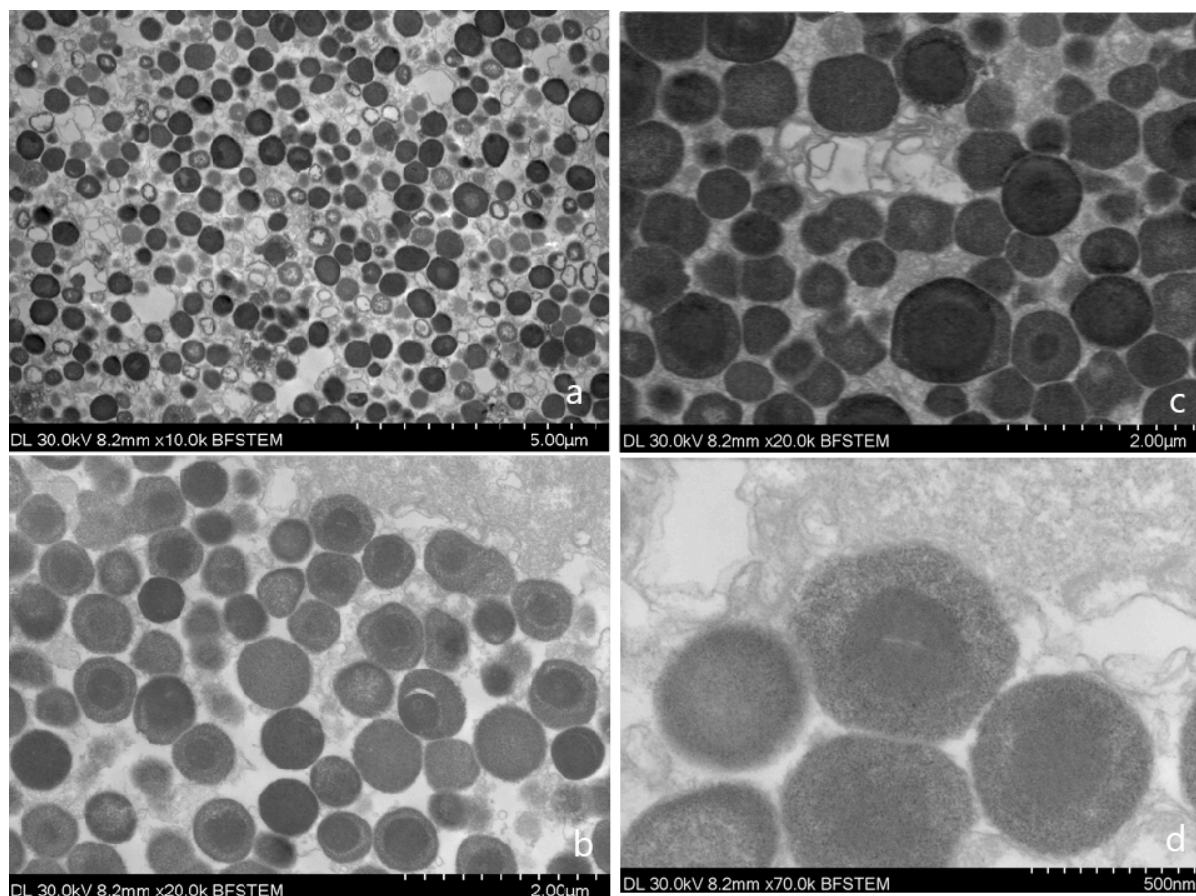


Slika 16. Sloj iridofora (I) s vidljivim vlaknima kolagena (col) pri uvećanju od 22000x

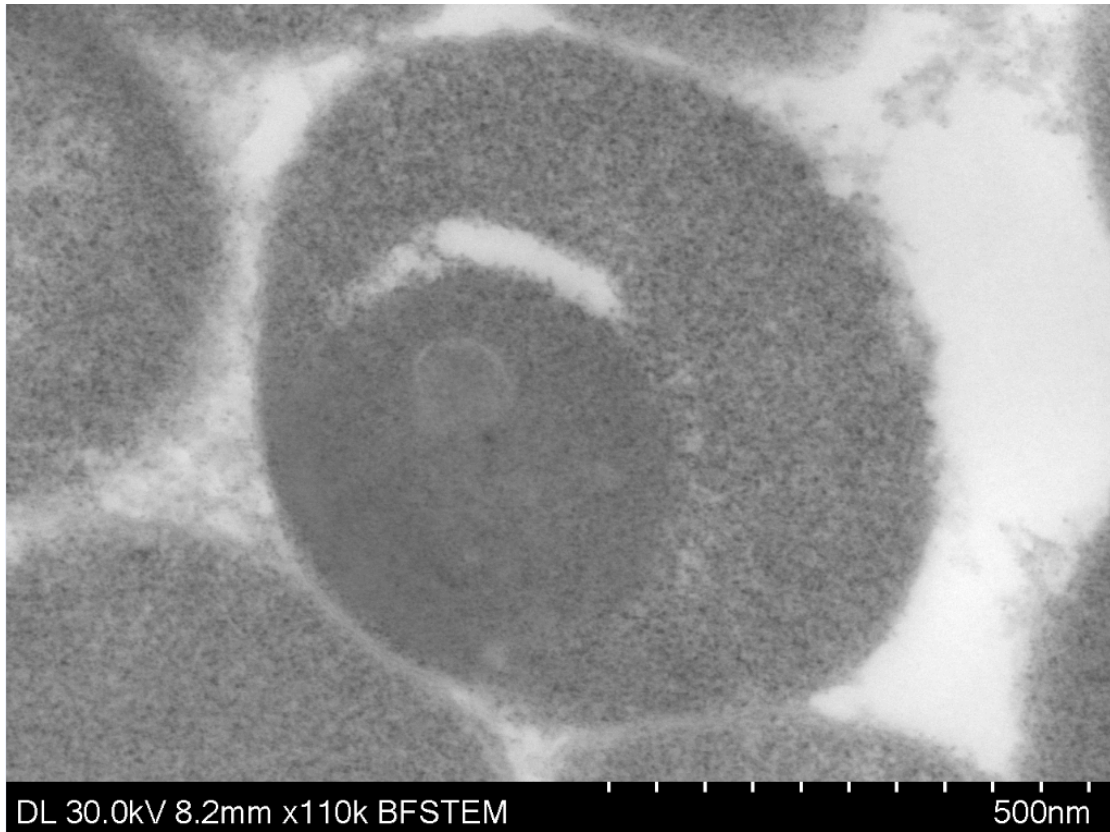


Slika 17. Skupina iridofora (I) pod uvećanjem od 100000x

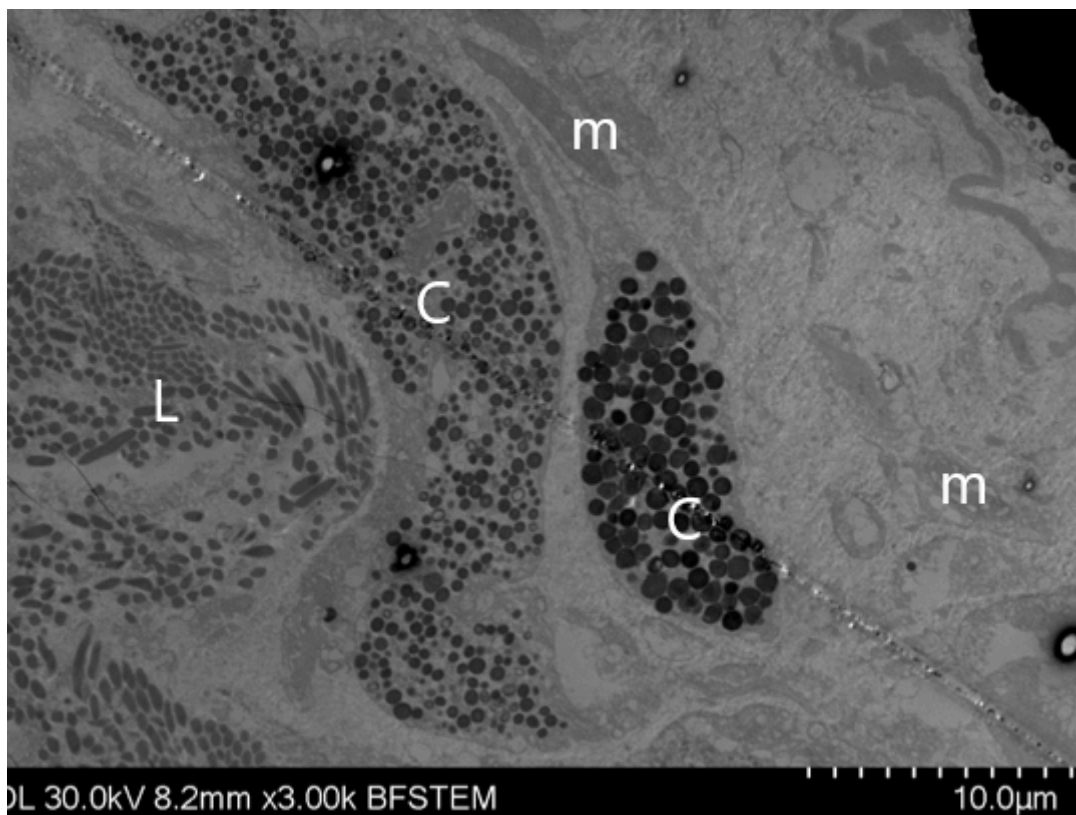
Slike 18 i 19 prikazuju pigmentne granule unutar kromatofore pri različitim uvećanjima. Granule su okruglog oblika i mogu se vidjeti različite gustoće. Sredina pigmentnih granula je gušća. Naizgled različite veličine granula su vjerojatno rezultat presjeka granula pri rezanju ultramikrotomom na različitim debljinama.



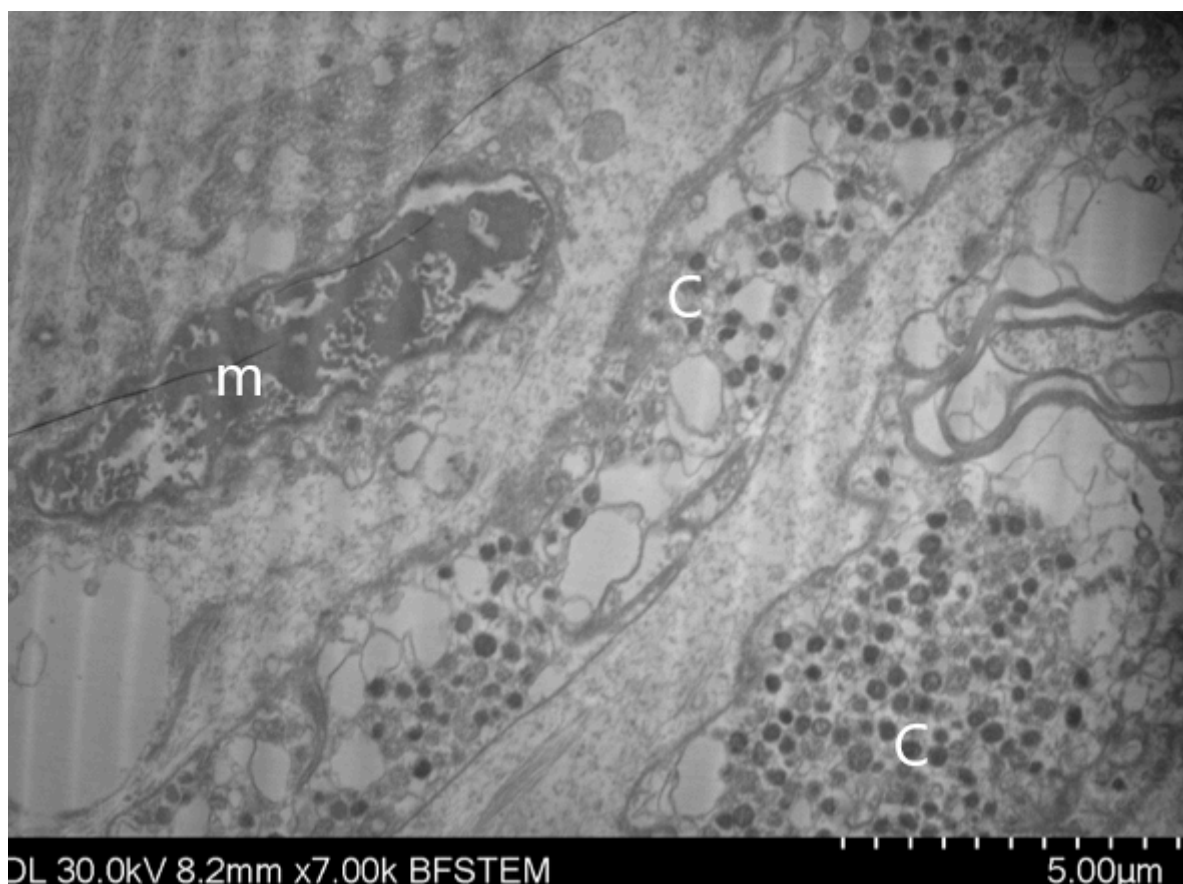
Slika 18. Pigmentne granule unutar kromatofore pri uvećanju od 10000x (gore) i 20000x (dolje)



Slika 19. Pigmentno zrnce unutar kromatofore pri uvećanju od 110000x



Slika 20. Dvije kromatofore (C) s vidljivim leukoforoma (L) i mišićnim vlaknima (m) pri povećanju 3000x



Slika 21. Dvije kromatofore (C) s vidljivim mišićnim vlaknom (m) pri uvećanju 7000x.

Kod uzoraka 1 i 2 kromatofore nisu uočene. Moguće je da je uzorak odrezan na mjestu bez kromatofora. Na svim ostalim uzorcima su uočene kromatofore na različitim dubinama u koži.

Kromatofore su uglavnom ovalnog oblika, ali mogu biti i okrugle i nepravilne. Vidljivi dio je elastična vrećica s pigmentnim granulama, a ostali dijelovi kromatofore su slabo vidljivi. Vrijednosti izmjerenih promjera kromatofora ovalnog oblika u ovom radu kretale su se od 5 do 30 μm . Izmjerene vrijednosti debljine membrana elastične vrećice kretale su se od 500 nm do 2 μm .

Kromatofore pridonose promjeni boje mehanizmom skupljanja i rastezanja elastične vrećice s pigmentnim granulama. U ovim uzorcima su uočene kromatofore u opuštenom stanju, kao i u skupljenom stanju. U skupljenom stanju pigmentne granule su gušće. Moguće je da su kromatofore nepravilnog oblika u raširenom stanju.

Površinske kromatofore se nalaze 5-10 μm ispod površine kože. Uočen je veliki raspon udaljenosti između kromatofora, od 1 μm prema više. S obzirom na veličinu uzorka, nemoguće je procijeniti maksimalnu udaljenost između kromatofora.

Pigmentna zrnca su okruglog ili ovalnog oblika i promjera oko 500 nm. Zrnca koja izgledaju manja od toga u slikama su presječena u užem dijelu. U pojedinim uzorcima uz elastičnu vrećicu uočena su mišićna vlakna.

Površinski sloj epitelnih stanica je debljine oko 500 nm. Pod TEM mikroskopom se vidi karakteristična naboranost površine kože hobotnice koja joj uz kromatofore služi za uspješniju mimikriju. Na različitim uzorcima je uočen glatki ili naborani površinski sloj.

Iridofore i leukofore su vidljive u skupinama u istom sloju, to jest skupine iridofora i skupine leukofora nisu vidljivo odvojene jedne od drugih. Mogu se nalaziti vrlo blizu kromatoforama, od 1 μm na više. Sloj iridofora i leukofora je izmjeren u pojedinim uzorcima debljine oko 20 μm . Redovito se nalazi ispod površinskih kromatofora. Iridofore su štapićastog oblika, gusto poredane jedne uz druge. Mogu tvoriti pravilne i nepravilne skupine. Duljine su oko 0.5-2 μm , a debljine oko 100 nm. Leukofore su izduljenog, nepravilnog oblika. Slične su veličine kao i iridofore. Tvore gust sloj uz iridofore.

4. RASPRAVA

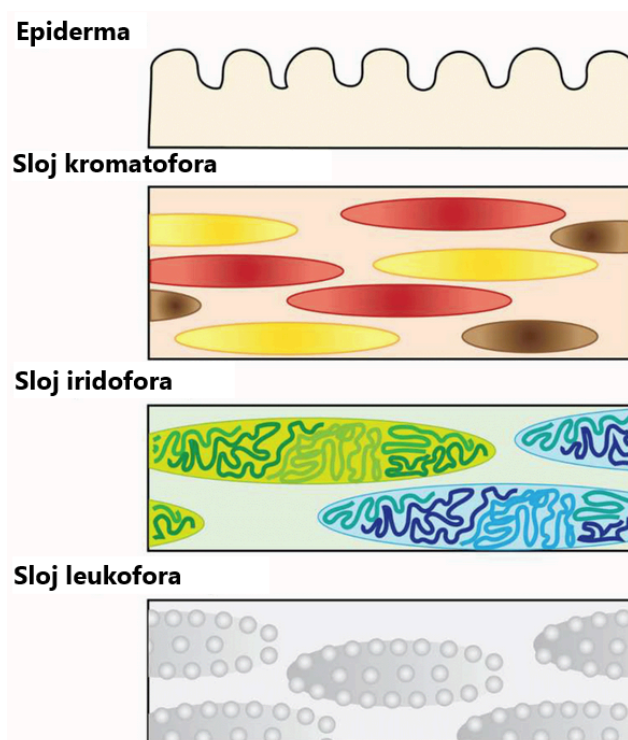
4.1. TEM mikroskopija

U koži obične hobotnice iz Jadranskog mora prisutni su organi koji su opisani kod glavonožaca u literaturi (slika 22). Kromatofore se razlikuju po veličini i obliku, ali to je očekivano zbog karakteristične funkcije promjene oblika. Iridofore i leukofore su oblika dosljednog s podacima drugih glavonožaca iz literature.

U literaturi su opisane duge i kratke iridofore. Duge iridofore su izmjerene duljine do 1200 μm , a kratke iridofore su izmjerene duljine u skupinama 25-50 μm , s individualnim pločicama duljine 1.7 μm . Za ove pločice se pretpostavlja da su od gvanina ili hitina (Cloney i Brocco, 1983). U ovom radu su uočene samo kratke iridofore, uz moguća odstupanja u mjerenju ovisno o kutu presjeka tkiva.

Leukofore su u literaturi navedene kao spljoštene, izduljene stanice duljine 20 μm , širine 12 μm i debljine 5 μm (Cloney i Brocco, 1983). To je dosljedno s podacima navedenim u ovom radu.

U literaturi je oblik i veličina kromatofora navedena kao varijabilna, ovisno o lokaciji na koži i stadiju kromatofora, to jest jesu li raširene ili skupljene. Također ovisi o boji, to jest starosti kromatofora (Cloney i Brocco, 1983). Rezultati u ovom radu vjerojatno ne pokrivaju cijeli raspon mogućnosti veličine i oblika kromatofora.



Slika 22. Dijagram slojeva u koži glavonožaca (Izvor: Chatterjee, 2022.)

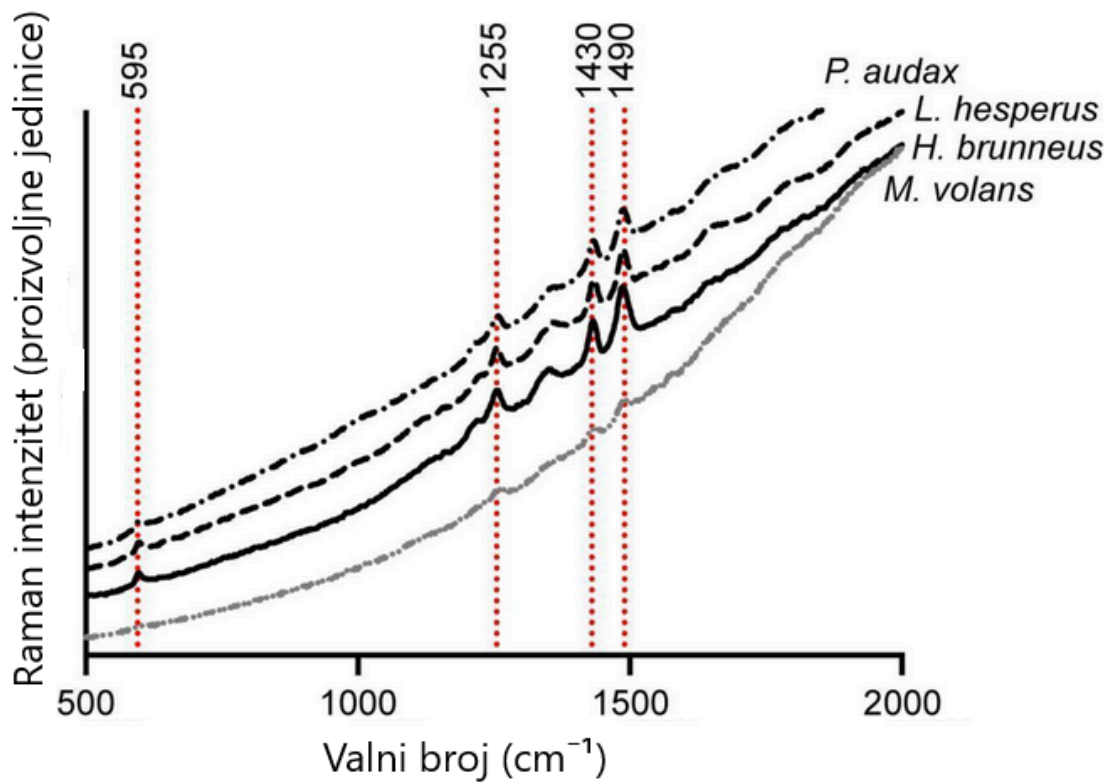
4.2. Raman spektroskopija

Rezultati raman spektroskopije su dosljedni pri pojedinoj valnoj duljini lasera, bez obzira na jedinku ili mjesto analize. Također su dosljedni rezultati pri vlažnim i pri suhim uzorcima.

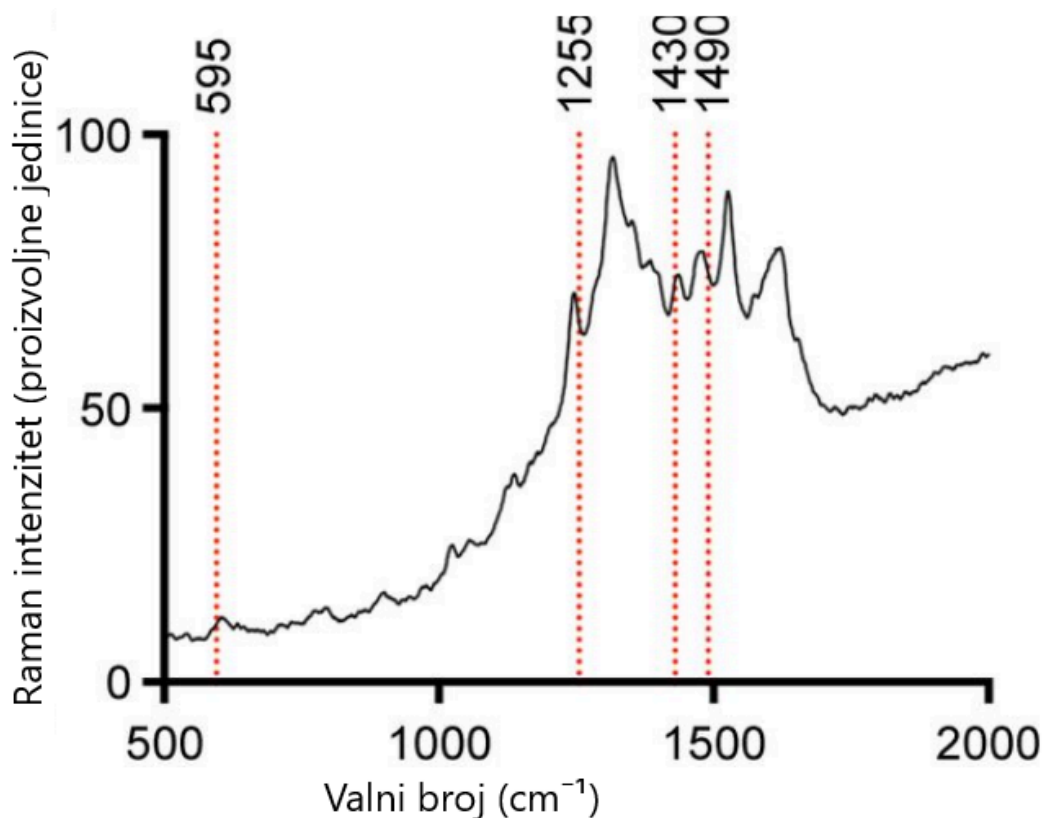
Omokromi su česti pigmenti kod beskralježnjaka, ali postoji vrlo malo zabilježenih Raman spektrara tih pigmenata. Hsiung i sur. (2017.) su proveli istraživanja na crvenim pjegama različitih vrsta pauka te na crnoj opni jaja pauka *Hyptiotes cavatus* s laserom valne duljine 532 nm (slika 23 i slika 24). Taj rad također priznaje da je točan karakterističan Raman spektar ovih pigmenata nepoznat.

Dobiveni spektri pokazuju vrhove na valnom broju 595 cm^{-1} , 1255 cm^{-1} , 1430 cm^{-1} i 1490 cm^{-1} . Ovi rezultati se ne podudaraju s rezultatima ovog rada analize laserom valne duljine 532 nm. Površina kože i sluz kod hobotnice su prozirne, što znači da dobro provode svjetlost, ali moguće je da je došlo do refrakcije koja je pomakla vrhove Raman spektra. Hsiung i sur. (2017) navode omatine i omine kao točne

pigmente odgovorne za boju kod njihovih uzoraka. Kod hobotnica se kao pigment navodi ksantomatin, za koji je moguće da također ima različit Raman spektar.



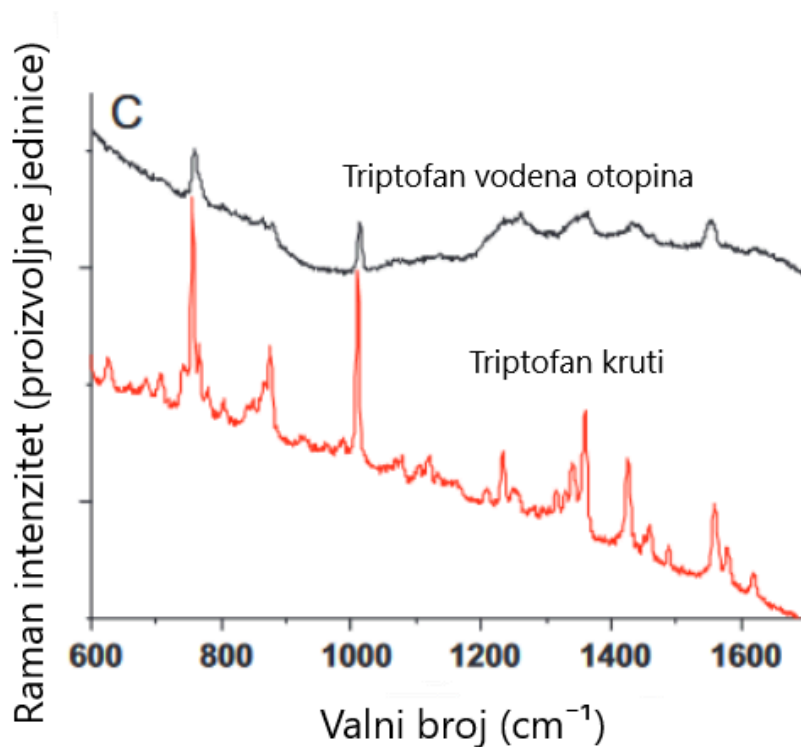
Slika 23. Raman spektar crvenih pjega iz kože pauka *Phidippus audax*, *Latrodectus hesperus*, *Habronattus brunneus* i *Maratus volans* (Izvor: Hsiung i sur., 2017)



Slika 24. Raman spektar omokroma iz jaja pauka *Hyptiotes cavatus* (Izvor: Hsiung i sur., 2017)

Kod životinja ksantomatin se proizvodi enzimatski putem oksidativne ciklizacije 3-hidroksikinurenina, koji je metabolit aminokiseline triptofana 3-hidroksikinurenin filtrira UV svjetlost i žuti je pigment (Williams i sur., 2019).

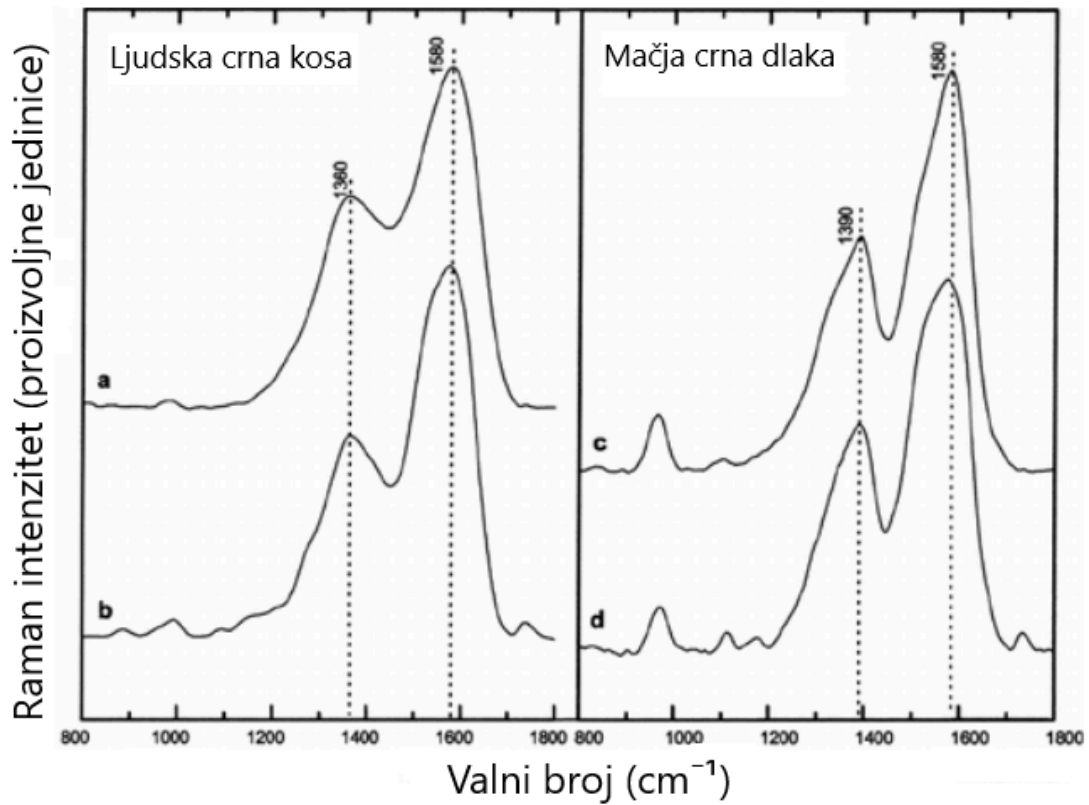
Triptofan pokazuje jake vrhove Raman spektra na valnim brojevima 756 cm^{-1} i 1010 cm^{-1} , uz nešto slabije vrhove na valnim brojevima 875 cm^{-1} , 1233 cm^{-1} , 1360 cm^{-1} , 1426 cm^{-1} i 1559 cm^{-1} u čvrstom stanju. U vodenoj otopini dolazi do vrhova na valnim brojevima 759 cm^{-1} i 1013 cm^{-1} (slika 25). Ovi vrhovi su slabiji od vrhova u čvrstom stanju. Ovi spektri se također razlikuju od Raman spektra u ovom radu.



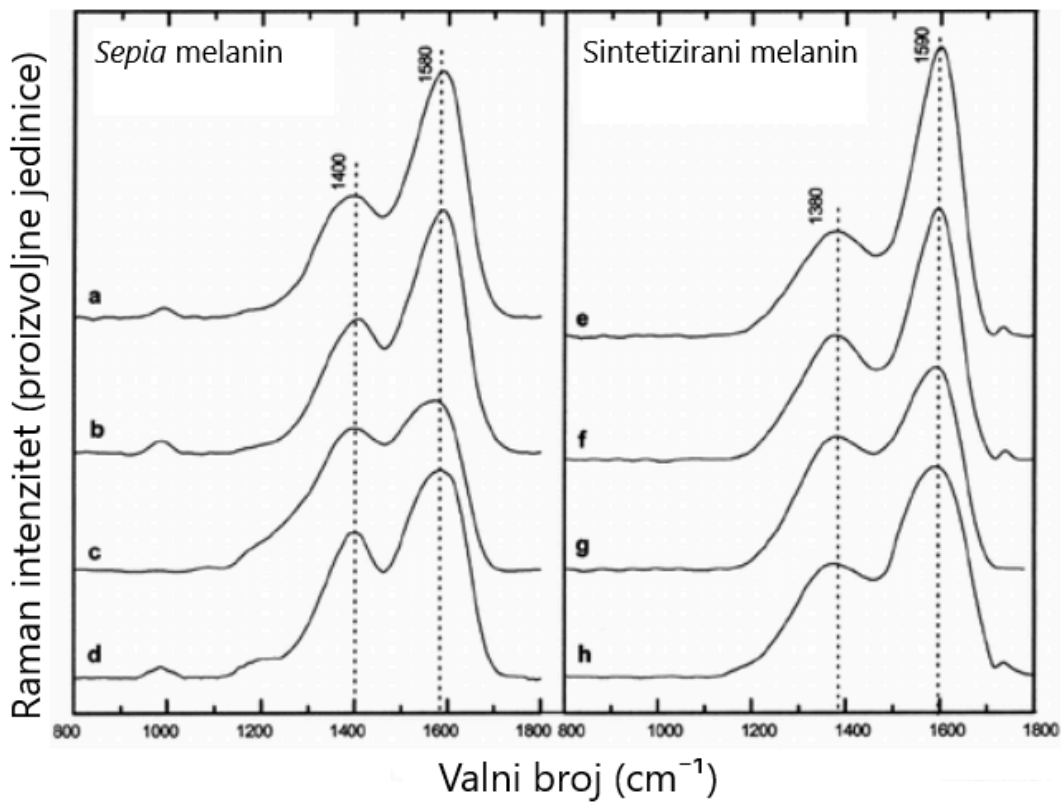
Slika 25. Raman spektar triptofana pod laserom valne duljine 785 nm (Izvor: Zhu i sur., 2011.)

Moguće je da je do slabijih vrhova u ovom radu također došlo zbog toga što je pigment u vodenoj otopini, zbog čega su vrhovi također i široki, slično tome što je prikazano u slici 25.

Neki autori smatraju da je moguće da za razliku od ostalih glavonožaca *Octopus vulgaris* u svojim kromatoforama sadržava melanin. Ne postoje jasni dokazi za ovo (Messenger, 2001). Melanin pokazuje dva široka vrha, bez obzira na valnu duljinu lasera. Viši vrh se nalazi između valnog broja 1570 cm^{-1} i 1590 cm^{-1} , a niži između 1360 cm^{-1} i 1400 cm^{-1} . Huang i sur. (2017) koriste melanin izoliran iz sipe, ali važno je napomenuti da taj uzorak nije izoliran iz kože, nego iz tintne vrećice.

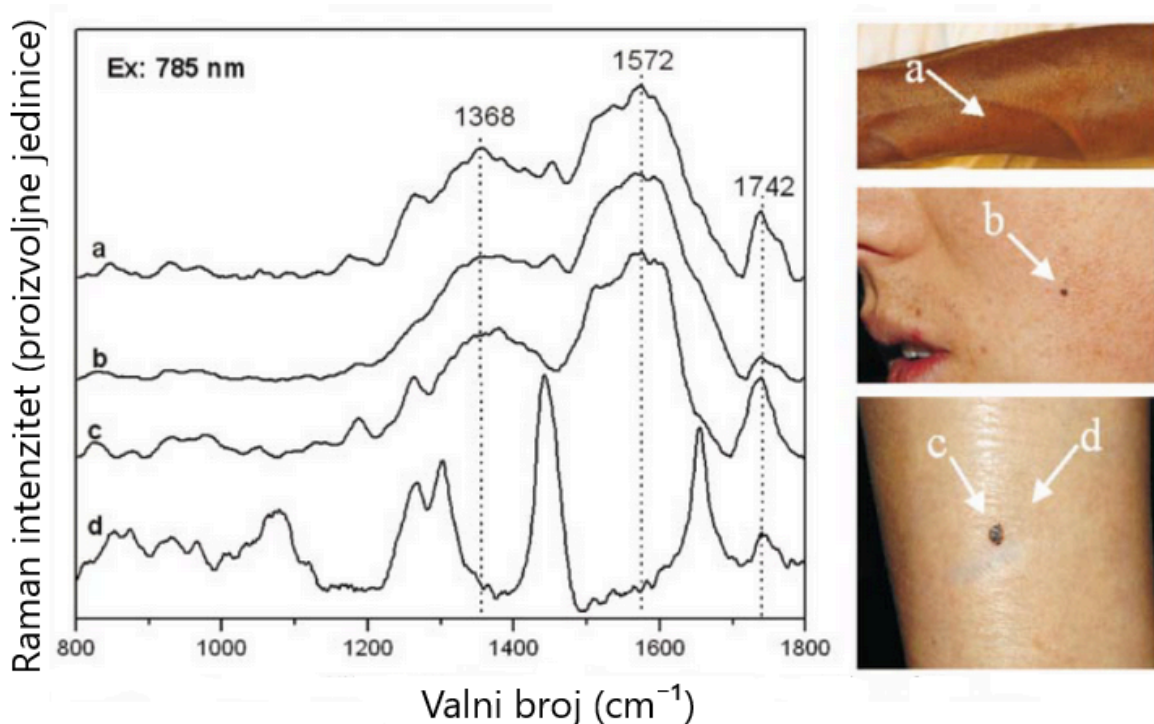


Slika 26. Raman spektri melanina izoliranog iz ljudske kose i mačje dlake. Linije a i c su rezultat lasera od 623.8 nm, a linije b i d 785 nm (Izvor: Huang i sur., 2004)



Slika 27. Raman spektar melanina iz sipe *Sepia officinalis* i sintetički dobivenog melanina. Linije a i e su dobivene laserom valne duljine 457.9 nm, b i f 514.5 nm, a c i g 623.8 nm (Izvor: Huang i sur., 2004)

Istraživanje ljudske kože *in vivo* prikazuje slične vrhove melanina kao i kod izoliranog melanina, uz šire vrhove i jači stupanj pozadinskog zračenja (slika 28). Najviši vrh je na valnom broju 1572 cm^{-1} , a manji vrhovi su na 1368 cm^{-1} i 1742 cm^{-1} . Zaključeno je da melanin dobro reagira na istraživanje *in situ* i moguće je koristiti tako dobivene rezultate.



Slika 28. Raman spektar melanina uzorkovanog *in vivo* uz prikazane fotografije izvora na desnoj strani. (a) Koža podlaktice dobrovoljca Afričkog podrijetla. (b) Benigni madež na licu. (c) Maligni melanom, uz (d) zdravu kožu koja ne sadrži melanin (Izvor: Huang i sur., 2004)

Metoda istraživanja melanina u ljudskoj koži u tom radu je slična metodi koja se koristi ovdje, to jest *in vivo*, s tim da Huang i sur. koriste žive dobrovoljne sudionike za razliku od odrezane kože. Zbog toga smatram da je ova metoda usporediva s našom metodom i može se sigurno zaključiti da uzorkovani pigment nije melanin.

Dubinska razlučivost lasera valne duljine 785 nm je 12 μm , a dubinska razlučivost lasera valne duljine 532 nm je 0.7 μm (spectroscopy online).

TEM slike dokazuju da se kromatofore uzorkovanih jedinki obične hobotnice nalaze od oko 5 μm ispod površine. Zaključuje se da laser valne duljine 785 nm uspješno dopire do kromatofora, a laser valne duljine 532 nm možda i ne. Smatram da su zbog toga rezultati lasera valne duljine 785 nm sigurniji.

5. ZAKLJUČAK

Koža hobotnice *Octopus vulgaris* iz Jadranskog mora ima sve karakteristike glavonožaca, uključujući kromatofore, iridofore i leukofore. Na TEM slikama vidljive su pločice koje tvore iridofore. Iridofore su konzistentnog oblika i pravilnog rasporeda. Leukofore su nepravilne stanice prekrivene leukosomima. Na TEM slikama imaju nepravilno ovalan oblik i lako su prepoznatljive, ali sami leukosomi nisu vidljivi.

Zbog različite dubinske razlučivosti različitih valnih duljina lasera koji se koriste u Raman spektroskopiji, sigurniji su rezultati lasera valne duljine 785 nm. Pretpostavlja se da je ksantomatin pigment u kromatoforama glavonožaca, uključujući i običnu hobotnicu. Jedini primjerak raman spektra ksantomatina je izoliran i analiziran *in vitro*. Taj uzorak je analiziran laserom valne duljine 532 nm i donosi različite rezultate od rezultata ovog rada pri istoj valnoj duljini. To dalje pridonosi zaključku da doneseni rezultati nisu sigurni.

Pri analizi uzoraka laserom valne duljine 785 nm, vrhovi se razlikuju od spektra iz literature, ali zbog dosljednosti rezultata i velike dubinske razlučivosti lasera smatram da su rezultati ispravni. Može se zaključiti da Raman spektar ksantomatina *in situ* pri analizi laserom valne duljine 785 nm su značajni vrhovi na valnim brojevima 1274 cm^{-1} , 1359 cm^{-1} i 1500 cm^{-1} , a manji vrhovi se nalaze na 873 cm^{-1} , 1060 cm^{-1} , 1113 cm^{-1} , 1186 cm^{-1} , 1224 cm^{-1} i 1561 cm^{-1} .

Zbog načina uzorkovanja, vrhovi na spektru su široki, odnosno vrijednosti su približne. Ipak, vrijednosti vrhova su dosljedne među različitim rezultatima i različitim mjestima uzorkovanja.

Potrebna su daljnja istraživanja o Raman spektru ksantomatina. Smatram da je ova metoda jedna od mogućih za dobivanje rezultata i daljnju analizu, odnosno da je moguće ksantomatin analizirati *in situ*. Moguće je da uz daljnje usavršavanje metode, kao na primjer rezanje uzorka, bi se mogli dobiti točniji i precizniji rezultati.

6. LITERATURA

Anadón, R. 2019. Functional Histology: The Tissues of Common Coleoid Cephalopods. *U: Gestal, C., Pascual, S., Guerra, Á., Fiorito, G., Vieites, J. (ur.) Handbook of Pathogens and Diseases in Cephalopods. Springer. Cham. 39-85.*

Chatterjee, A. 2022. At the Intersection of Natural Structural Coloration and Bioengineering. *Biomimetics* 7(2): 66.

Cloney, R. A., Brocco, S. L. 1983. Chromatophore Organs, Reflector Cells, Iridocytes and Leucophores in Cephalopods. *American Zoologist* 23(3): 581–592.

Gilmore, R., Crook, R., Krans, J. L. 2016. Cephalopod Camouflage: Cells and Organs of the Skin. *Nature Education* 9(2): 1.

Harris, J. R. 2015. Transmission electron microscopy in molecular structural biology: A historical survey. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 581: 3-18.

Hsiung, B. K., Justyn, N. M., Blackledge, T. A., Shawkey, M.D. 2017. Spiders have rich pigmentary and structural colour palettes. *J Exp Biol.* 220(11): 1975–1983.

Huang, Z., Lui, H., & Chen, X. K., Alajlan, A., McLean, D., Zeng, H. 2004. Raman spectroscopy of in vivo cutaneous melanin. *Journal of biomedical optics* 9: 1198-1205.

Jehlička J., Edwards H. G. M., Oren A. 2014. Raman Spectroscopy of Microbial Pigments. *Appl Environ Microbiol* 80(11): 3286–3295.

Messenger, J. B. 2001. Cephalopod chromatophores: neurobiology and natural history. *Biological Reviews*, 76(4), 473–528.

Sanchez, P., Villanueva, R., Patrizia, J., Guerra, A., Gonzalez, A. F., Sobrino, I., Balguerias, E., Pereira, J., Moreno, A., Allcock, A. L., Lefkaditou, E., Pierce, G. J., Iglesias, J., Piatkowski, U. 2015. *Octopus vulgaris. U: Jereb, P., Allcock, A. L.,*

Lefkaditou, E., Piatkowski, U., Hastie, L. C., Pierce, G. J. (ur.) Cephalopod biology and fisheries in Europe: II. Species Accounts. ICES Cooperative Research Report 325: 13-28.

Williams, T. L., Lopez, S. A., Deravi, L. F. 2019. A Sustainable Route To Synthesize the Xanthommatin Biochrome via an Electro-catalyzed Oxidation of Tryptophan Metabolites. ACS Sustainable Chemistry & Engineering 7(9): 8979-8985.

Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., Wan, X. 2011. Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 78(3): 1187-1195.

Izvori s mrežnih stranica

<https://www.spectroscopyonline.com/view/depth-resolution-raman-microscope-optical-limitations-and-sample-characteristics>. Datum pristupa 17. kolovoza 2024.

Joy, D. C., Bradbury, S., Ford, B. J. "Transmission electron microscope". 2024. Encyclopedia Britannica,, <https://www.britannica.com/technology/transmission-electron-microscope>. Datum pristupa 27. kolovoza 2024.

MolluscaBase ur. 2024. MolluscaBase. Octopus vulgaris Cuvier, 1797. <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=140605> Datum pristupa 31. siječanj 2024.

IZJAVA

S punom odgovornošću izjavljujem da sam diplomski rad izradila samostalno, služeći se navedenim izvorima podataka i uz stručno vodstvo mentorice prof. dr. sc. Sanje Tomšić.

Dorotea Lasić

Handwritten signature of Dorotea Lasić in black ink.