

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Nina LAPANJA

**HEMOPOETSKA MESTA V LEDVICAH IN JETRIH  
MOČERILARJEV (Amphibia: Proteidae)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**HAEMOPOIETIC SITES IN THE KIDNEY AND LIVER OF  
PROTEIDAE (Amphibia: Proteidae)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2010

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratorijih na Katedri za zoologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Senat Biotehniške fakultete je za mentorja diplomskega dela imenoval prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico asist.dr. Lilijano Bizjak-Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Peter Trontelj  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Vera Ferlan-Marolt  
Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za patologijo

Član: prof. dr. Boris Bulog  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: asist. dr. Lilijana Bizjak-Mali  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: 6. 7. 2010

Diplomsko delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Nina Lapanja

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK 591.4:597.6(043.2)=163.6  
KG hemopoeza/jetra/ledvica/Proteidae/svetlobna mikroskopija  
AV LAPANJA, Nina  
SA BULOG, Boris (mentor)/BIZJAK-MALI, Lilijsana (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2010  
IN HEMOPOETSKA MESTA V LEDVICAH IN JETRIH MOČERILARJEV  
(AMPHIBIA: PROTEIDAE)  
TD Diplomsko delo  
OP XII, 103 str., 2 pregl., 64 sl., 76 vir.  
IJ sl  
JI sl/en

AI S svetlobnim mikroskopskim proučevanjem jetrnega in ledvičnega tkiva pri močerilarjih (Proteidae) smo lokalizirali in primerjali hemopoetska mesta v teh organih. Naredili smo podrobno morfološko analizo krvnih celic hemopoetskih mest. V ledvicah močerilarjev so hemopoetska mesta med ledvičnimi tubuli, korpuskuli in krvnimi žilami, v jetrih pa v subkapsularni plasti, intersticiju in perivaskularno. Tako v ledvicah, kot v jetrih so najštevilčnejše celice eozinofilni in heterofilni programulociti ter njihove zrele oblike. Pogoste so tudi limfocitne celice bodisi v skupkih ali posamično in prekurzorske celice. Med različnimi vrstami družine Proteidae so razlike v obsežnosti posameznih hemopoetskih mest v jetrih, kot tudi med posameznimi osebkami iste vrste. Perihepatična plast močerilarjev Proteidae je različno debela in prekinjena ter v primerjavi z ostalimi dvoživkami manj obsežna. Pri pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* je izrazito reducirana. Intersticijska hemopoetska mesta so značilnost jeter obeh podvrst močerila, čeprav so pri nepigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus anguinus* obsežnejša. Perivaskularna mesta v jetrih močerilarjev so prisotna, vendar so krvne celice pri pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* maloštevilne. Glede na prisotnost krvnih celic sklepamo, da so ledvica in jetra močerilarjev limfoidni in granulocitopoetski organ odločilnega pomena za nastanek eozinofilnih in heterofilnih granulocitov. V primerjavi z ledvicami je granulocitopoeza v jetrih manj obsežna.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 591.4:587.6(043.2)=163.6  
CX haemopoiesis/liver/kidney/Proteidae/light microscopy  
AU LAPANJA, Nina  
AA BULOG, Boris(supervisor)/BIZJAK-MALI, Liljana (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology  
PY 2010  
TI HAEMOPOIETIC SITES IN KIDNEY AND LIVER OF PROTEIDAE  
(AMPHIBIA: PROTEIDAE)  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO XII, 103 p., 2 tab., 64 fig., 76 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB At the light microscopic level, we localized and compared haemopoietic sites in the liver and kidney among species of the family Proteidae. A detail morphological analysis of blood cells included into homopoietic sites was also done. The haemopoietic sites in the observed kidneys are between renal tubules, renal corpuscles and blood vessels. In the liver they are in the perihepatic layer, interstitially and perivascularly dispersed. The most abundant blood cells in the both organs are heterophil and eosinophil progranulocytes and their mature granulocytes. The lymphocytes and precursor cells are frequent, too. The differences in the extensiveness of the hemopoietic sites in the liver among species of the family Proteidae are present, so as among the particular subjects of the same kind. The perihepatic layer vary in its thickness among species of Proteidae and it is less extensive in comparison with the other amphibians. The most reduced perihepatic layer is in the liver of *Proteus anguinus parkelj*. The evident interstitial haemopoietic sites typical for the liver of the both subspecies of *Proteus*; but they are less extensive in *Proteus anguinus parkelj*. Perivascular haemopoietic sites observed in the liver of Proteidae are reduced in *Proteus anguinus parkelj* and the blood cells are sparse. Regarding to the presence of blood cell types in the haemopoietic sites of kidney and liver of Proteidae we are concluding that both organs are lymphoid and granulocitopoietic, above all as the origin of heterophils and eosinophils. In comparison to the kidney, the liver has a minor contribution to granulocitogenesis.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 POVOD ZA RAZISKAVO IN NAMEN DELA .....	1
1.2 HEMOPOETSKA MESTA PRI MOČERILARJIH (PROTEIDAE) .....	2
1.3 JETRA DVOŽIVK KOT HEMOPOETSKI ORGAN .....	3
<b>1.3.1 Zgodovinski pregled in hemopoetska vloga jeter pri dvoživkah.....</b>	<b>3</b>
<b>1.3.2 Variabilnost hemopoetskih mest v jetrih dvoživk .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.3 Perihepatična plast .....</b>	<b>4</b>
1.4 PREOSTALA HEMOPOETSKA MESTA IN ORGANI PRI DVOŽIVKAH .....	6
<b>1.4.1 Evolucija krvotvornih organov in mest pri vretenčarjih.....</b>	<b>6</b>
<b>1.4.2 Krvotvorni organi pri dvoživkah .....</b>	<b>6</b>
1.5 NASTANEK KRVNIH CELIC PRI VREtenčarjih .....	11
<b>1.5.1 Hemopoeza in monofiletska teorija sesalcev .....</b>	<b>11</b>
<b>1.5.2 Hemopoetska zarodna celica dvoživk.....</b>	<b>12</b>
1.6 GRANULOCITOPOEZA PRI VREtenčarjih .....	14
<b>1.6.1 Granulocitopoeza pri sesalcih .....</b>	<b>14</b>
<b>1.6.2 Granulocitopoeza pri dvoživkah .....</b>	<b>15</b>
<b>2 MATERIAL IN METODE DELA.....</b>	<b>17</b>
2.1 ŽIVALI, UPORABLJENE PRI PREISKAVI.....	17
2.2 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV.....	17
<b>2.2.2 Histološka barvanja.....</b>	<b>18</b>
2.2.2.1 Barvanje hematoksilin-eozin .....	18
2.2.2.2 Srebrova impregnacija za retikulin .....	18
2.2.2.3 Barvanje hemopoetskih tkiv .....	19
2.3 POLTANKE REZINE .....	23
2.4 MIKROSKOPIRANJE .....	25
<b>3 REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
3.1 REZULTATI BARVANJA LEDVIC IN JETER MOČERILARJEV .....	24
3.2 LEDVICE MOČERILARJEV.....	26
<b>3.2.1 Krvne celice hemopoetskih mest v ledvicah močerila (<i>Proteus anguinus</i>) .....</b>	<b>26</b>
3.2.1.1 Progranulociti .....	26
3.2.1.2 Zreli heterofilni granulociti .....	27

3.2.1.3	Zreli eozinofilni granulociti.....	27
3.2.1.4	Prekurzorske celice.....	27
3.2.1.5	Limfociti .....	28
<b>3.2.2</b>	<b>Krvne celice v ledvicah pisanega nektura (<i>Necturus maculosus</i>) .....</b>	<b>36</b>
3.3	PODROČJA KRVNIH CELIC V JETRIH MOČERILARJEV (Proteidae) .....	41
<b>3.3.1</b>	<b>Perihepatično področje v jetrih močerila (<i>Proteus anguinus</i>) .....</b>	<b>41</b>
3.3.1.1	Tipi krvnih celic perihepatičnega tkiva .....	41
<b>3.3.2</b>	<b>Intersticijska mesta v jetrih obeh podvrst močerila.....</b>	<b>47</b>
3.3.2.1	Tipi krvnih celic v intersticiju .....	47
<b>3.3.3</b>	<b>Perivaskularna mesta v jetrih obeh podvrst močerila .....</b>	<b>58</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Perihepatično mesto v jetrih pisanega nektura (<i>Necturus maculosus</i>) .....</b>	<b>61</b>
3.3.4.1	Tipi krvnih celic perihepatične plasti .....	61
<b>3.3.5</b>	<b>Intersticijska mesta v jetrih pisanega nektura (<i>Necturus maculosus</i>) .....</b>	<b>66</b>
3.3.5.1	Tipi krvnih celic v intersticiju .....	66
<b>3.3.6</b>	<b>Perivaskularna mesta v jetrih pisanega nektura (<i>Necturus maculosus</i>) .....</b>	<b>76</b>
<b>4</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>77</b>
4.1	RAZPRAVA.....	77
<b>4.1.1</b>	<b>Diferencialno barvanje z barvili Romanowsky-Giemsa .....</b>	<b>77</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Krvne celice v ledvicah in jetrih močerilarjev .....</b>	<b>77</b>
4.1.2.1	Zreli eozinofilni granulociti.....	77
4.1.2.2	Zreli heterofilni granulociti .....	78
4.1.2.3	Bazofilni granulociti .....	80
4.1.2.4	Razvojne faze eozinofilnih in heterofilnih granulocitov .....	81
4.1.2.5	Prekurzorske celice.....	83
4.1.2.6	Eritroblasti .....	83
4.1.2.7	Limfociti .....	84
<b>4.1.3</b>	<b>Ledvice močerilarjev kot hemopoetski organ .....</b>	<b>85</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Jetra močerilarjev kot hemopoetski organ .....</b>	<b>87</b>
4.1.4.1	Perihepatično področje močerilarjev .....	87
4.1.4.2	Intersticijska in perivaskularna hemopoetska mesta v jetrih močerilarjev.....	89
4.2	SKLEPI.....	93
<b>5</b>	<b>POVZETEK .....</b>	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>VIRI .....</b>	<b>97</b>
	<b>ZAHVALA .....</b>	<b>103</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Pregl. 1: Obarvanje citoplazme in granul pri heterofilnih in eozinofilnih granulocitih v ledvicah močerilarjev (Proteidae) pri barvanju z modificiranim May-Grünwald (MG), azur-eozin (AE) in hematoksilin-eozin (HE) barvili..... 25

Pregl. 2: Obarvanje citoplazme in granul pri heterofilnih in eozinofilnih granulocitih v jetrih močerilarjev (Proteidae) pri barvanju z modificiranim May-Grünwald (MG), azur-eozin (AE) in hematoksilin-eozin (HE) barvili..... 25

## KAZALO SLIK

Sl. 1: Shema hemopoeze pri sesalcih .....	12
Sl. 2a-b: Mezotel in vezivna kapsula ledvic nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	29
Sl. 3: Ledvice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	29
Sl. 4: Hemopoetska mesta v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	30
Sl. 5: Retikularno ogrodje v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	30
Sl. 6a-b: Hemopoetski skupek v ledvicah močerila. ....	31
Sl. 7a-b: Zgodnji zrelostni fazi heterofilnih programulocitov (proHG) v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	31
Sl. 8a-b: Kasnejši heterofilni programulociti (proHG) v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	32
Sl. 9a-b: Zgodnji zrelostni stopnji eozinofilnih programulocitov (proEG) v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	32
Sl. 10: Kasnejši eozinofilni programulocit (proEG) v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	33
Sl. 11: Zreli heterofilni granulocit v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	33
Sl. 12: Zreli eozinofilni granulocit v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	34
Sl. 13: Prekurzorske celice v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	34
Sl. 14: Limfociti v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	35
Sl. 15: Deleča se celica v ledvicah pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	35
Sl. 16: Ledvice pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	37
Sl. 17: Retikularno ogrodje ledvic pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	37

Sl. 18: Hemopoetski skupki heterofilnih granulocitov v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	38
Sl. 19: Heterofilni programulocit v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	38
Sl. 20: Hemopoetski skupek eozinofilnih granulocitov v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	39
Sl. 21: Eozinofilni programulocit v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	39
Sl. 22: Prekurzorska celica v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	40
Sl. 23a-b: Deleči celici v ledvicah pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	40
Sl. 24: Perihepatično tkivo v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	43
Sl. 25a-b: Perihepatično tkivo v jetrih pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	43
Sl. 26: Retikularna vlakna (puščice) pod mezotelom (m) jeter nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	44
Sl. 27: Prekrvljenost perihepatičnega tkiva. Jetra nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	44
Sl. 28a-c: Krvne celice perihepatičnega tkiva v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	45
Sl. 29: Eozinofilni granulociti v perihepatičnem tkivu nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162. ....	46
Sl. 30: Intersticijsko mesto v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	49
Sl. 31: Retikularna vlakna v intersticiju nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	49
Sl. 32: Obsežnejše intersticijsko mesto (→) v jetrih pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). ....	50
Sl. 33: Intersticijska hemopoetska mesta v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162. ....	51
Sl. 34: Intersticijsko hemopoetsko mesto pod večjo povečavo v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162. ....	51
Sl. 35: Retikularna vlakna v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). ....	52

Sl. 36: Limfociti (→) intersticija v jetrih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162.....	52
Sl. 37a-b: Prekurzorske celice v intersticijskih hemopoetskih mestih nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162.....	53
Sl. 38a-b: Razvojni fazi eozinofilnih granulocitov v intersticijskih mestih jeter nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162.....	53
Sl. 39a-c: Progranulociti v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanke rezine.....	54
Sl. 40a-b: Zrela granulocita v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanki rezini.....	55
Sl. 41a-b: Granulociti v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). .....	55
Sl. 42: Prekurzorske celice v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). .....	56
Sl. 43a-b: Eritroidne celice v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). .....	56
Sl. 44: Eritroblast v sinusoidu jeter pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ).....	57
Sl. 45: Robni del jeter s perivaskularnimi mesti nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). .....	59
Sl. 46: Robni del jeter s perivaskularnimi mesti. Nepigmentirana podvrsta močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Inficiran osebek P162.....	60
Sl. 47: Robni del jeter s perivaskularnim mestom. Pigmentirana podvrsta močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). .....	60
Sl. 48: Perihepatična plast v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Inficiran osebek N31.....	63
Sl. 49: Obsežnejše mesto perihepatične plasti v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Inficiran osebek N31.....	63
Sl. 50: Deleča se celica (→) v perihepatičnem tkivu pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Inficiran osebek N31.....	64
Sl. 51: Heterofilni granulociti v perihepatičnem tkivu pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Povečan izsek slike 48.....	64

Sl. 52: Perihepatično tkivo v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Poltanka rezina.....	65
Sl. 53: Intersticijsko mesto v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Inficiran osebek N31.....	68
Sl. 54a-b: Intersticijska mesta (→) v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	69
Sl. 55: Heterofilni granulociti v intersticiju pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	70
Sl. 56a-c: Heterofilni programulociti v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	71
Sl. 57: Zrel heterofilni granulocit v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	72
Sl. 58: Različna tipa granulocitov v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Poltanka rezina.....	72
Sl. 59a-b: Zgodnji stopnji eozinofilnih programulocitov v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	73
Sl. 60: Eozinofilni programulocit v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Poltanka rezina.....	73
Sl. 61: Zrel eozinofilni granulocit v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	74
Sl. 62a-b: Deleče celice v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	74
Sl. 63: Prekurzorska celica v intersticiju jeter pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). ....	75
Sl. 64: Perivaskularno mesto v jetrih pisanega nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ).....	76

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

AE	azur-eozin barvanje
ci	cilije
e	endotel žile
E	eritrocit
EG	eozinofilni granulocit
HE	hematoksili-eozin barvanje
HM	hemopoetska mesta
hp	hepatocit
jl	jedrni lobul
J	jedro
kž	krvna žila
l	limfocit
lt	lumen ledvičnega tubula
m	mezotel
MG	May-Grünwald barvanje
oz.	oziroma
pregl.	preglednica
proEG	eozinofilni programulocit
proHG	heterofilni programulocit
pc	pigmentna celica
ps	pigmentni skupek
r	retikularna celica
s	sinusoid
sl.	slika
str.	stran
t	manjši ledvični tubuli
T	ledvični tubul
ve	vezivo
žv	žolčni vod

## 1 UVOD

### 1.1 POVOD ZA RAZISKAVO IN NAMEN DELA

Dosedanje raziskave, usmerjene v morfologijo jeter močerilarjev (Prelovšek, 1999; Lužnik, 2004; Novak 2004), so potrdile prisotnost intersticijskih hemopoetskih področij, ki jih opisujeta že Jordan (1932) in Dawson (1933). Glede prisotnosti perihepatične subkapsularne plasti v jetrih močerila pa so mnjenja med avtorji razhajajoča. Prelovšek (1999) in Jordan (1932) za nepigmentirano podvrsto močerila *Proteus anguinus anguinus* v perihepatični plasti jeter navajata le posamezne krvne celice in zanika obstoj perihepatične plasti granulocitopoetskega limfoidnega tkiva. Novak (2004) opisuje tanko in mestoma prekinjeno subkapsularno plast granulocitopoetskega tkiva pri pisanem nekturu *Necturus maculosus* in tudi močerilu *Proteus anguinus anguinus* Laur. Podobno kot Prelovšek (1999), za nepigmentirano podvrsto močerila tudi Lužnik (2004) zanika obstoj perihepatične subkapsularne plasti granulocitopoetskega tkiva pri pigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Pod mezotelom je opazila posamezne krvne celice. Tako kot Novak (2004) tudi Dawson (1933) pri nekturu opiše perihepatično plast, ki pa je bolj ali manj sklenjena.

Za razliko od ostalih repatih dvoživk v področji intersticija jeter močerila nastajajo eritrociti in trombociti, granulociti pa ne (Jordan, 1932). Nastanek granulocitov pri močerilu je vezan izključno na ledvica (mezonefros) (Jordan, 1932). Pri nekturu (*Necturus*) so granulocitopoetska mesta poleg jeter še mezonefros, perikard in manjši skupki v maščobnem telesu skeletogenega septuma repa, kot tudi vezivnega tkiva prebavnega trakta (Dawson, 1931).

Namen naše raziskave je lokalizirati in primerjati hemopoetska mesta v ledvicah in v jetrih pigmentirane (*Proteus anguinus parkelj*) in nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) ter pisanega nektura (*Necturus maculosus*), narediti natančnejšo morfološko analizo celic hemopoetskega tkiva v obeh organih in ugotoviti prisotnost granulocitopoetskih celic v jetrih močerilarjev. Preverili in dopolnili bomo tudi rezultate predhodnih raziskav jeter močerilarjev (Dawson, 1931; Jordan, 1932; Prelovšek, 1999; Lužnik, 2004; Novak, 2004).

Ker je perihepatično subkapsularno tkivo značilnost repatih dvoživk, od odraslih brezrepcev ga opisujejo le pri rodu *Xenopus* (Spornitz, 1975), pričakujemo, da ga imajo vsi trije predstavniki iz družine močerilarjev (Proteidae). Predvidevamo tudi, da so jetra močerila udeležena v granulocitopoezi in pričakujemo, da bomo to lahko potrdili z morfološko analizo hemopoetskega tkiva jeter. Glede na navedbe večine avtorjev, da so ledvice močerilarjev granulocitopoetski organ, pričakujemo, da bomo to potrdili tudi z morfološko analizo ledvic.

## 1.2 HEMOPOETSKA MESTA PRI MOČERILARJIH (PROTEIDAE)

Raziskava Jordana leta 1932 je bila ena prvih in še danes edino obširnejše morfološko delo krvnih celicah in hemopoetskem tkivu pri močerilu *Proteus anguinus*.

Primarna organa hemopoeze močerila *Proteus anguinus* sta vranica in ledvice (Jordan, 1932). Granulocitopoetsko tkivo mezonefrosa močerila, ki ga gradita subkapsularna in intertubularna stroma, je še posebej obsežno v globljih delih mezonefrosa med ekskretornimi deli tubulov (Jordan, 1932). V intertubularni stromi mezonefrosa močerila nastajajo eozinofilni in nevtrofilni granulociti, katerih diferenciacija se zaključi v krvožilju, medtem ko bazofilni granulociti nastajajo v subkapsularnem območju vranice (Jordan, 1932). Po navedbah Drzewina (1905, cit. po Jordan, 1932) in Dawsona (1931) je poleg tanke perihepatične plasti jeter tudi mezonefros pisanega nektura granulocitopoetsko tkivo. Vendar je med repatimi dvoživkami samo pri družini Proteidae mezonefros pomembno mesto granulocitopoeze (Barret, 1947; Foxon, 1964; Turner, 1988).

Vranica pri močerilu *P. anguinus* je limfocitopoetski organ (Jordan, 1932). V njej nastajajo hemocitoblasti in limfociti. Slednji vstopijo v krvne sinusoide in krvožilni sistem, kjer poteka proliferacija in diferenciacija v eritrocite in trombocite (Jordan, 1932). Vranica pri močerilu *P. anguinus* je tako limfocitopoetska (Jordan, 1932). Limfoidno vlogo in pomen začetka eritropoeze pripisuje vranici močerilarjev tudi Mrak (2007). V vranici močerila je ta raziskovalka opisala hemocitoblaste in ostale predstopnje eritrocitov, iz katerih je sklepala na začetek eritropoeze v vranici. Vendar v krvožilju hemocitoblastov, ki jih za močerila navaja Jordan (1932), Mrak ni našla. Prisotne so le poznejše predstopnje eritrocitov, s čimer se nakazuje dokončanje eritropoeze v krvožilju (Mrak, 2007). Kot že omenjeno, ima vranica močerilarjev tudi limfoidno vlogo. Gre za območja bele pulpe pri pisanim nekturam *Necturus maculosus*, ki so manj izrazita, kopičenje limfocitov pa je manj obsežno kot pri vranici pigmentirane in nepigmentirane podvrste močerila (Mrak, 2007).

Pri *Necturusu*, še enemu rodu družine Proteidae, je hemopoetska mesta podrobneje opisal Dawson (1931). Kot pri večini repatih dvoživk poteka tudi pri pisanim nekturam hemopoeza eritrocitov in trombocitov v vranici, v določeni sezoni ali v eksperimentalnih pogojih tudi v krvnem obtoku (Dawson, 1931). Limfogranulocitopoetsko tkivo je bolj difuzno razporejeno z izstopajočimi mesti v intersticialnih področjih posameznih organov. Največja mesta se nahajajo v intertubularnem vezivnem tkivu mezonefrosa. V jetrih so poleg bolj ali manj zvezne perihepatične plasti granulopoetskega/granulocitopoetskega tkiva tudi periportalna območja, ki so najbolj obsežna blizu hilusa. Zastopana so tudi področja intersticijskega hepatičnega limfoidnega tkiva.

### 1.3 JETRA DVOŽIVK KOT HEMOPOETSKI ORGAN

#### 1.3.1 Zgodovinski pregled in hemopoetska vloga jeter pri dvoživkah

Perihepatično plast v jetrih nekaterih dvoživk opisuje že Ebert (1867, cit. po Spornitz, 1975). Skupaj z intersticialnimi področji so po njegovem to mesta nastanka jetnih pigmentnih celic. Drzewina (1905, cit. po Spornitz, 1975) jim pripše granulocitopoetsko limfoidno vlogo. Granulocitopoetsko subkapsularno plast jeter navaja za rodove *Ambystoma*, *Triton*, *Salamandra* in *Proteus* (Drzewina, 1905, cit. po Slonimski, 1941). Nekaj let kasneje Dantchakoff in Seidlein (1922, cit. po Slonimski, 1941) pri mehiškem aksolotlu *Ambystoma mexicanum* opišeta perihepatično plast, ki se izkaže za značilni znak hemopoetskega sistema repatih dvoživk. Wituschinski (1928, cit. po Slonimski, 1941) predpostavlja, da perihepatična plast pri *Ambystoma mexicanum* ni samo limfo-granulocitopoetska temveč tudi eritropoetska, saj naj bi po odstranitvi vranice eritropoeza potekala v jetrih. Eritropoezo v jetrih in pri nekaterih dvoživkah v perihepatični plasti navaja tudi Storti (1932, cit. po Slonimski, 1941), kar pa odločno zanika Barrett (1936, cit. po Slonimski, 1941). Tudi Slonimski (1941) in Glomski s sodelavci (1997) zanikajo nastanek eritrocitov v jetrih repatih dvoživk. Tako so perihepatično tkivo kot tudi intersticialna mesta izključno limfogranulocitopoetski (Slonimski, 1941) in v subkapsularni plasti jeter pri rodovih *Triturus* (Salamandridae), *Amphiuma* (Amphiumidae) in *Necturus* (Proteidae) poteka izključno granulocitopoeza (Foxon, 1964) oziroma limfogranulocitopoeza (Jordan, 1932). Prav tako limfogranulo-citopoetsko vlogo subkapsularne plasti za repate dvoživke navaja Barrett (1936, cit. po Glomski in sod., 1997). Slednji limfogranulocitopoetska mesta v jetrih repatih dvoživk razdeli na tri področja (Barrett, 1936, cit. po Slonimski, 1941):

- na perihepatično področje, ki jetra obdaja v enotni ali prekinjeni plasti, in je pri različnih vrstah različno debelo,
- intersticialna mesta, ki se pojavljajo v večjem ali manjšem obsegu skupaj s pigmentnimi celicami,
- perivenozna mesta, ki so podaljšek perihepatične plasti in spremljajo dverno veno ter žolčevod, ki vstopata v jetra preko hilusa.

Pri repatih dvoživkah je tvorba granulocitov deljena glede na organe izvora. Jetra tvorijo eozinofilce in nevtrofilce, medtem ko je vranica glavni vir bazofilcev, ne pa tudi nevtrofilcev in eozinofilcev (Cowden in sod. 1964, cit. po Turner, 1988; Cowden, 1965, cit. po Turner, 1988; Hightower in Haar, 1975). Drugače je pri odraslih brezrepcih, kjer bazofilci nastajajo skupaj z nevtrofilci in eozinofilci v vranici (Kapa in sod., 1970, cit. po Turner, 1988). Pri eritropoezi imajo jetra ključni pomen po navedbi avtorjev (Turner, 1988) pri odrasli ameriški leopardovki *R. pipiens* in volovski žabi *R. catesbeiana*. Pri

slednji pa Abreu Manson in sodelavci (2009) v jetrih in vranici niso zasledili nobene hemopoetske aktivnosti. Ta je omejena zgolj na kostni mozeg in ledvice.

### **1.3.2 Variabilnost hemopoetskih mest v jetrih dvoživk**

Pri krempljarki *Xenopus laevis* perihepatična plast v celoti prekriva jetra in je različno debela, le redkoma prekinjena (Spornitz, 1975). Spornitz (1975) za krempljarko opisuje tudi granulocitopoetsko tkivo ob večjih in manjših jetnih žilah. Vendar intersticialnih mest značilnih za močerila (Jordan, 1932) in druge repate dvoživke (Jordan in Spiedel, 1930, cit. po Spornitz, 1975; Barrett, 1936, cit. po Spornitz, 1975) pri *Xenopus laevis* ni.

Limfogranulocitopoetsko tkivo v jetrih italijanskega jamskega močerada *Hydromantes italicus* tvori široko, sklenjeno subkapsularno plast, ki v celoti prekriva organ. Pri bolj specializiranih vrstah družine Plethodontidae, kot so rodovi *Plethodon*, *Eurycea* in *Desmognathus*, je subkapsularna plast različno debela, nepovezana in močno reducirana (Barrett, 1947). Intersticialna in periportalna hemopoetska mesta v jetrih italijanskega jamskega močerada niso razvita, medtem ko so pri rodu *Plethodon* dobro razvita (Barrett, 1947).

Pri mehiškem aksolotlu *Ambystoma mexicanum* je limfogranulocitopoetsko perihepatično tkivo dokaj dobro razvito in v nepretrgani plasti obdaja jetra. Prav tako so razvita tudi različno velika limfogranulocitopoetska intersticielna polja v notranjosti jeter, medtem ko so perivaskularna mesta slabo razvita (Slonimski, 1941). Skoraj popolnoma pa prekriva jetra tudi perihepatična granulocitopoetska plast pri pupku *Notophthalmus viridescens*. Mesta so le redko prekinjena (Hightower in Haar, 1975; Goldblatt in sod., 1987).

### **1.3.3 Perihepatična plast**

Perihepatična plast je bila opisana pri 15. vrstah repatih dvoživk (Barrett, 1936, cit. po Spornitz, 1975) in je značilnost tako odraslih kot ličink (Chiakulas in Scheving, 1964), vendar se razvije postopoma v času življenja ličinke (Slonimski, 1941). Perihepatična plast repatih dvoživk je pri različnih vrstah različno debela, lahko je sklenjena ali pa prekinjena (Barrett, 1936, cit. po Slonimski, 1941). Chiakulas in Scheving (1964) perihepatično plast jeter pri repatih dvoživkah opisujeta kot neepitelno tkivo limfoidnega tipa z granulocitopoetsko funkcijo in ne pretirano ožiljenostjo. Subkapsularna plast jeter pa tudi je pri brezrepcih mesto eritropoeze in granulopoeze (Schermer, 1967, cit. po Glomski in sod., 1997; Turner, 1988). Pri brezrepcih jo navajajo za žabo krempljarko *Xenopus laevis* (Spornitz, 1975; Hadji- Azimi in sod., 1987, cit. po Glomski in sod., 1997 ), pri ličinkah brezrepe dvoživke *Alytes obstetricans* (Asvadourova, 1913, cit. po Spornitz, 1975) in odraslih osebkih nižinskega urha *Bombina bombina* (Spornitz, neobjavljeno, cit. po Spornitz, 1975), ki jih skupaj z navadno krempljarko uvrščajo v filogenetsko primitnejšo

skupino Opisthocoela. Pri krempljarki ima subkapsularna plast jeter vlogo eritropoeze (Hadji-Azimi in sod., 1987, cit. po Glomski in sod., 1997), Spornitz (1975) pa jo navaja kot granulocitopoetsko tkivo. Barrett (1947) meni, da je debela in neprekinjena granulocitopoetska subkapsularna plast jeter značilna za primitivne brezpljuče močerade in repate dvoživke na splošno.

## 1.4 PREOSTALA HEMOPOETSKA MESTA IN ORGANI PRI DVOŽIVKAH

Hemopoeza je pri nižjih vretenčarjih razpršena po številnih organih (Ishizeki in sod., 1984), tako tudi pri dvoživkah nobeno tkivo nima monopolja nad tvorbo krvnih celic. Mesta se razlikujejo glede na vrsto in razvojni stadij živali (Foxon, 1964; Turner, 1988).

### 1.4.1 Evolucija krvotvornih organov in mest pri vretenčarjih

Hemopoetska tkiva so najpogosteša v rahlem vezivnem tkivu vretenčarjev (Temkin in Mcmillan, 1986). Filogenetsko najprimitivnejša oblika hemopoetskega tkiva je difuzna razporeditev v steni črevesja glenavice (Goode in sod., 1966, cit. po Temkin in McMillan, 1986; Tanaka in sod. 1981, cit. po Temkin in McMillan, 1986). Tu nastajajo vsi tipi krvnih celic: eritrociti, granulociti in limfociti. Primitivna mesta nastanka krvnih celic v steni srednjega črevesa obloustk imenujejo tudi difuzno vranično tkivo (Tischendorf, 1985, cit. po Frank, 1988). Pri bolj naprednih vretenčarjih je hemopoetsko tkivo koncentrirano v različnih predelih črevesja, pojavi pa se tudi drugod po telesu (Good, 1966, cit. po Temkin in Mcmillan, 1986). Pri pljučaricah (Dipnoi) je hemopoetska aktivnost koncentrirana v bolj oddeljeni limfo-mieloidni vranici, ki še vedno leži znotraj želodčne stene (Jordan in Speidel, 1930, cit. po Frank, 1988). Ostala granulopoetska mesta so še v ledvicah in v črevesni sluznici (Jordan in Speidel, 1931, cit. po Frank, 1988).

Nadaljnja evolucija vranice od hrustančnic, sodobnih kostnic (Teleostea), pa do sesalcev vodi v samostojni organ, ločen od črevesja in obdan s svojo kapsulo (Temkin in McMillan, 1986; Frank, 1988), zmanjša pa se tudi njena velikost (Murata, 1965, cit. po Frank, 1988). Hrustančnice imajo veliko vranico glede na velikost telesa, v primerjavi z vranico sesalcev. Pri sodobnih kostnicah je vranica manjši organ glede na velikost telesa v primerjavi z vranico hrustančnic (Fänge in Nilsson, 1985, cit. po Mrak, 2007). Pri repatih dvoživkah se je ohranil kranialni del prednje vranice, pri brezrepcih pa kavdalni del (Jordan in Spiedel, 1930, cit. po Frank, 1988; Tanaka in sod., 1981, cit. po Frank, 1988). Frank (1988) kot možno posledico razvoja vranice kot samostojnega organa in zmanjševanja vraničnega tkiva ter s tem hemopoetskega tkiva navaja krajevno spremembo krvotvornih enot (Frank, 1988).

### 1.4.2 Krvotvorni organi pri dvoživkah

Krvna tkiva lahko delimo na dva tipa: na hemopoetsko tkivo in primarno limfoidno tkivo, kjer poteka tvorba različnih krvnih celic ter sekundarno limfoidno tkivo, ki shranjuje zrele levkocite odgovorne za odziv na različne patogene (Turner, 1988).

Pri ribah in dvoživkah ima en sam organ lahko hkrati hemopoetsko in limfoidno vlogo (Turner, 1988). Številni organi dvoživk, kot so vranica, jetra, ledvice in kostni mozeg, ki imajo granulopoetsko in eritropoetsko vlogo, so hkrati tudi limfoidna tkiva. Vranica

dvoživk je v primerjavi z ostalimi območji akumulacije limfocitov bolj kompleksna in je tako kot pri sesalcih sekundarni limfoidni organ (Hansen in Zapata, 1998; Manning in Horton, 1982, cit. po Turner, 1988; Vozelj, 2000). Limfociti krvožilja se v njej zbirajo, reagirajo z antigeni in tvorijo protitelesa stvarjajoče celice (Manning in Horton, 1982, cit. po Turner, 1988). Druga območja nastanka limfocitov, kot so ledvica, jetra in črevesje so preprostejša, vendar prav tako pomembna (Turner, 1988).

V jetrih dvoživk se limfoidne celice pojavijo v subkapsularni regiji ali v manjših globjih mestih, medtem ko se v ledvicah nahajajo v intertubularnih mestih (Turner, 1973, cit. po Turner, 1988). Domnevno naj bi počasen tok krvi v teh organih omogočil, da se limfociti razporedijo v skupke in reagirajo na antigen iz krvotoka. (Turner, 1973, cit. po Turner, 1973). Pri dvoživkah so akumulacije limfocitov in tudi možna mesta limfocitopoeze poleg jeter in ledvic še priželjc, vranica, GALT, kostni mozeg in limfomieloidni vozlički (Manning in Horton, 1982, cit. po Turner, 1988; Zapata in sod., cit. po Turner, 1988). Priželjc dvoživk je glavni primarni limfoidni organ in ima vodilno imunološko vlogo (Hightower in St. Pierre, 1971; Hightower, 1975, cit. po Hightower in Haar, 1975; Turner, 1988).

**Vranica** je primarni hemopoetski organ nižjih vretenčarjev (Tooze in Davies, 1968), ki se po obsegu v teku evolucije močno zmanjša (Murata, 1959, cit. po Frank, 1988) in razvije v samostojen organ (Frank, 1988). Pri vseh treh redovih dvoživk je vranica vodilni organ eritropoeze in mesto odstranjevanja odmrlih eritrocitov (Turner, 1988).

Pri repatih dvoživkah je vranica center eritropoeze, granulocitopoetski centri pa so različni (Foxon, 1964). Popolna ločitev granulocitopoeze in eritropoeze je značilna samo za repate dvoživke in se ne pojavi pri nobeni drugi vretenčarski skupini (Glomski in sod., 1997).

Prvič eritropoetsko vlogo vranice pri repatih dvoživkah opiseta Bizzozero in Torre (1883, cit. po Barrret, 1947). Vranica repatih dvoživk je limfoeritropoetska (Barrett, 1947), saj je vir limfocitov, hemoblastov in občasno zorenja eritroblastov (Barrett, 1947; Ohuye, 1932, cit. po Glomski in sod., 1997). Tooze in Davies (1967, 1968) opiseta v vranici pupka *Triturus cristatus* eritropoezo, Jordan in Spiedel (1924, 1930, cit. po Hightower in Haar, 1975) in Hightower in St. Pierre (1971) pri vodnem pupku *Notophthalmus viridescens* pa tudi limfo- in trombopoetsko funkcijo. Raziskave predstavnikov družin repatih dvoživk so pokazale, da je vranica edini organ eritropoeze in trombopoze, razen pri družini azijskih kopenskih močeradov Hynobiidae (Barrett, 1936, cit. po Glomski in sod., 1997). Druga mesta, kot so jetra in ledvice pri odraslih repatih dvoživkah, niso eritropoetska (Turner, 1988; Glomski in sod., 1997).

Tudi pri brezrepcih je vranica vodilni eritropoetski organ, vendar je za razliko od repatih dvoživk lahko tudi granulocitopoetska (Jordan, 1938, cit. po Glomski in sod., 1997). Pri zeleni žabi *R. esculenta*, ameriški leopardovki *R. pipiens* in drevesni žabi *Hyla arborea* poteka eritropoeza v vranici in v manjši meri v jetrih, med metamorfozo in pomladnim prebujanjem pa v kostnem mozgu (Foxon, 1964). Pri paglavcih poteka hemopoeza sprva v ledvicah, nato pa v vranici, in sicer predvsem eritropoeza (Foxon, 1964). Po metamorfozi postane vranica glavno mesto tvorbe krvnih celic in odstranitve starih, poškodovanih celic. Pri nekaterih brezrepcih, npr. pri ameriški leopardovki *R. pipiens* in volovski žabi *R. catesbeiana* se po metamorfozi in nekaj dni po hibernaciji eritropoeza pojavi v kostnem mozgu dolgih kosti, vendar je to obdobje kratkotrajno (Foxon, 1964). Pri zgodnjih paglavcih sekulje *R. temporaria* (Maximow, 1910, cit. po Foxon, 1964) ni vranične hemopoeze, temveč so ledvica center celotne hemopoeze. Pri starejših paglavcih se limfociti akumulirajo v krvnih sinusoidih jeter, kjer se diferencirajo v eritrocite in trombocite. Granularni in agranularni levkociti se še vedno tvorijo v ekstravaskularnih področjih ledvic. Po metamorfozi se celotna hemopoeza preseli v kostni možeg, ki ima pri tej vrsti tudi trajno vlogo hemopoeze (Maximov, 1910, cit. po Foxon, 1964).

**Ledvice** so hemopoetski organ pri večini dvoživk, bodisi v larvalnem obdobju kot tudi pri odraslih osebkih (Turner, 1988). Kljub temu, da so ledvice odraslih brezrepcev omenjene kot glavni limfopoetski in granulocitopoetski organ (Le Douarin, 1966, cit. po Meseguer in sod., 1985,) pa pri odrasli žabi debeloglavki *Rana ridibunda* niso opazili nobene hemopoetske aktivnosti (Meseguer in sod., 1985). Vendar pa so pri volovski žabi *Lithobates catesbeianus* ledvice poleg kostnega mozga eden izmed vodilnih hemopoetskih organov (Abreu Manso in sod., 2009). Tako kot pri družini Proteidae (Barrett, 1947; Foxon, 1964) so limfogranulocitopoetska mesta v mezonefrosu prisotna vendar slabo razvita tudi pri večini brezpljučih močeradov (Plethodontidae) (Barrett, 1947) in ledvicah vodnega pupka *Notophthalmus viridescens* (Rubens in sod., 1973, cit. po Hightower in Haar, 1975). Pri močeradu (Salamandridae) vrste *Hynobius retardatus* sta za granulocitopoezo odgovorni zgornji dve tretjini ledvic (Ouji, 1950, cit. po Foxon, 1964).

**Kostni možeg** se kot hemopoetski organ v evoluciji prvič pojavi prav pri dvoživkah (Turner, 1988; Abreu Manso in sod., 2009). Mieloidni (granulopoetski in eritropoetski) kostni možeg pa je značilnost zgolj brezrepcev (Glomski in sod., 1997). Zastopan je predvsem pri odraslih brezrepcih. Pri nekaterih vrstah, kot je *R. temporaria*, postane kostni možeg edini vir eritropoeze in trombopoeze (La Douarin, 1966, cit. po Hansen in Zapata, 1998), medtem ko pri drugih kot je *R. pipiens* (La Douarin, 1966, cit. po Hansen in Zapata, 1998) in volovska žaba *Lithobates catesbeianus* (Jordan in Spiedel, 1923, cit. po Abreu Manso in sod., 2009), kaže sezonska nihanja in je vranica še vedno aktivna. Pri kremljarki *Xenopus laevis* je kostni možeg slabo razvit (Turner, 1988), je granulocitopoetski, ne pa tudi eritropoetski (Tanaka, 1976, cit. po Glomski in sod., 1997; Turner, 1988). Od repatih

dvoživk imajo kostni mozeg le predstavniki družine brezpljučih močeradov (Plethodontidae) (Turner, 1988). Pojavlja se v vseh kosteh, ki so dovolj velike, da imajo medularno votlino. To je medenični obroč, vretenca, lobanja in dolge kosti (Glomski in sod., 1997). Pri tej družini repatih dvoživk poteka v kostnem mozgu limfogranulocitopoeza ne pa tudi eritropoeza (Schaefer, 1935, cit. po Foxon, 1964; Barret, 1936, cit. po Glomski s sod., 1997; Barret, 1947; Curtis s sod., 1997, cit. po Glomski s sod., 1997). Trombopoeza in eritropoeza sta omejeni na vranico, eozinofilci in nevtrofilci še naprej nastajajo tudi v jetrih (Turner, 1988). Nekateri avtorji so mnenja, da se je kostni mozeg v evoluciji pojavil, ker kosti nudijo zaščito občutljivim hemopoetskim zarodnim celicam pred ionizirajočimi žarki sonca (Cooper in sod., 1980, cit. po Glomski in sod., 1997; Zapata in sod., 1995, cit. po Glomski in sod., 1997). Vodni organizmi tega ne potrebujejo, ker je voda dovoljšni zaščitni faktor. Odsotnost kostnega mozga pri larvah vodnih brezrepcev potrjuje to domnevo (Glomski in sod., 1997).

Diferenciacija in proliferacija eritroblastov v velikem obsegu poteka pri dvoživkah v **periferni krvi**, tako v normalnih kot v eksperimentalnih pogojih (Barrett, 1947). Ta dva procesa za rdeče krvne celice v krvožilju repatih dvoživk in močerila navaja tudi Jordan (1932). Pri repatih dvoživkah je vranica mesto tvorbe hemocitoblastov (Jordan in Spiedel, 1924, 1930, cit. po Tooze in Davies, 1967), nadaljnja diferenciacija v eritrocite pa poteka v veliki meri v krvožilju, kot je to pri močerilu *Proteus anguinus* (Jordan, 1932), ali pa se hemocitoblasti popolnoma diferencirajo v rdeči pulpi vranice, kot je to pri pupku *Triturus viridescens* (Jordan in Spiedel, 1924, 1930, cit. po Tooze in Davies, 1967) in *Triturus cristatus* (Tooze in Davies, 1967, 1968). Vendar Grasso (1973) za pupka *Triturus cristatus* navaja, da je, neodvisno od vranice, obratno kot Jordan in Spiedel (1930, cit. po Grasso, 1973), ki pravita, da eritropoeza v krvožilju poteče po odstranitvi vranice. Prav tako Glomski in sodelavci (1997) kot značilnost dvoživk, predvsem repatih dvoživk, navajajo zorenje eritrocitov v krvožilju, medtem ko je proliferacija v krvožilju izvvana le z odstranitvijo vranice.

Kri je mesto delitve eritroidnih celic tudi pri anemični kremljarki *Xenopus laevis*, za razliko od neanemične živali, kjer eritroblastov v krvožilju niso našli (Chegini in sod., 1979). Vendar v tem primeru ne gre za produkcijo iz zarodnih celic v krvožilju, ampak najverjetneje iz kasnejših razvojnih stopenj, ki jih v krvotok sprostijo jetra in vranica (Chegini in sod., 1979). Nasprotno pa Abreu Manso in sodelavci (2009) navajajo, da so razvojne stopnje eritrocitov pri izvani anemiji krastače *Bufo ictericus* in žabe *Odontophrynus americanus* (Cianciarullo in sod., 2000, cit. po Abreu Manso in sod., 2009) le potrditev prisotnosti hemopoetskih progenitorskih celic v krvožilju, katere so dokazali tudi sami v krvožilju volovske žabe *Lithobates catesbeianus* (Abreu Manso in sod., 2009). Eritroblaste so našli tudi v krvožilju leopardje žabe *Rana pipiens*, žabe *Rana*

*mascareniensis*, kot tudi pri krastačah *Bufo bufo*, *Bufo regularis* in *Bufo viridis* (Glomski in sod., 1997).

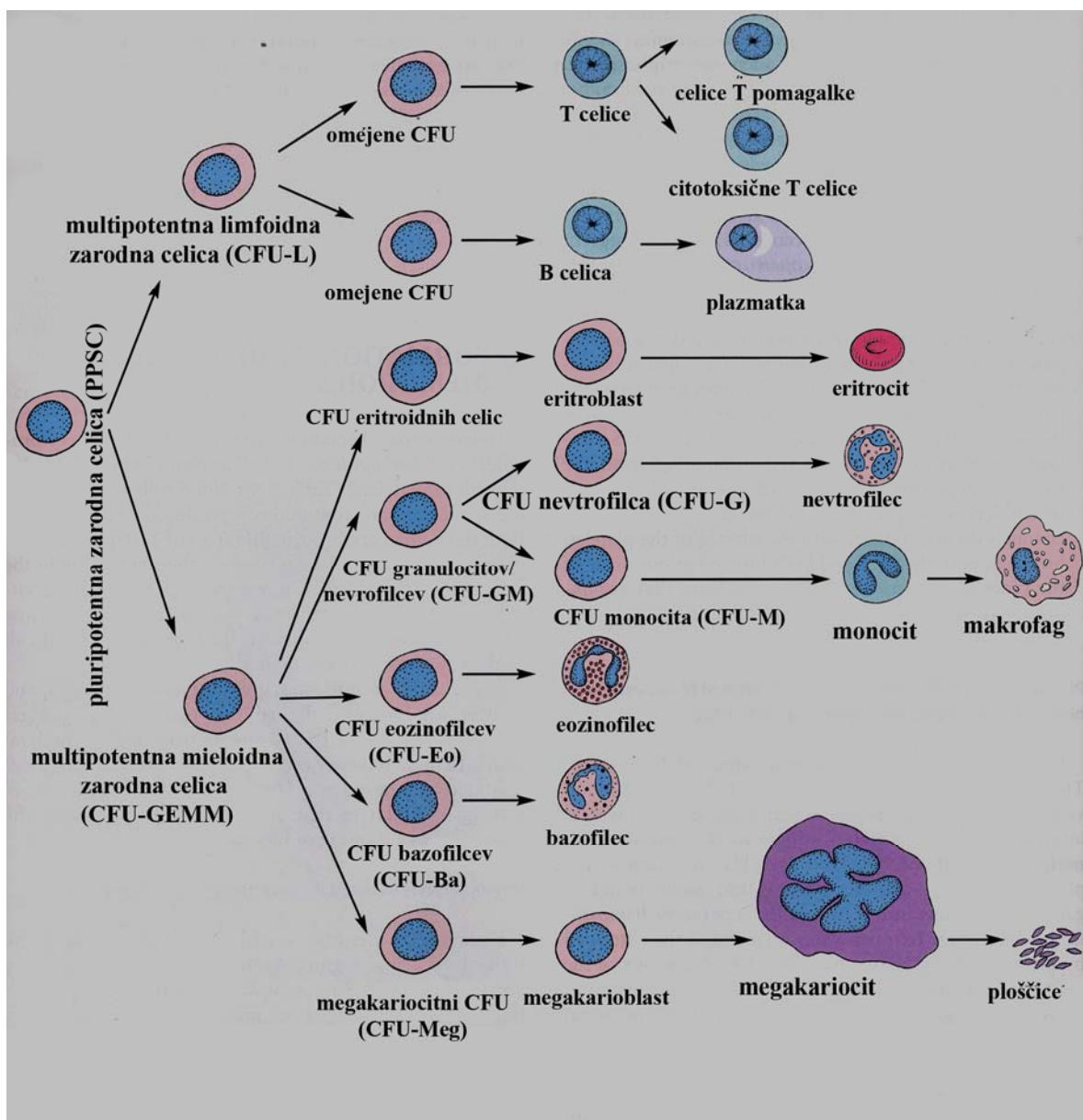
## 1.5 NASTANEK KRVNIH CELIC PRI VRETENČARJIH

### 1.5.1 Hemopoeza in monofiletska teorija sesalcev

Razvoj krvnih celic ali hemopoeza oz. hematopoeza je kompleksen proces, pri katerem iz ene same pluripotentne zarodne celice (angl. pluripotential stem cell – PPSC) nastanejo različne zrele krvne celice (sl.1) (Cross in Mercer, 1993). Pluripotentna zarodna celica je izraz, ki označuje hemopoetsko zarodno celico, iz katere se razvijejo ostale progenitorske zarodne celice. Na vrhu hemopoetske hierarhije pluripotentna zarodna celica (PPSC) s samoobnovitveno sposobnostjo, iz katere se razvijejo multiple kolonijo-tvorne enote (CFU-s; angl. multiple colony-forming units) (Ross s sod., 2003).

Potomci pluripotentne matične celice se diferencirajo v dve smeri, pri čemer nastaneta multipotentna limfoidna zarodna celica (CFU-L) in multipotentna mieloidna zarodna celica (CFU-GEMM) (sl. 1). Iz CFU-L se diferencirajo izhodiščne celice limfocitov, iz CFU-GEMM pa izhodiščne celice eritrocitov, trombocitov in različnih levkocitov (Vozelj, 2000; Ross in sod., 2003). Hemopoeza tako obsega eritropoezo, trombopoezo in levkopoezo (Ross s sod., 2003).

Ker vse krvne celice nastanejo iz ene skupne zarodne celice, govorimo o monofiletski teoriji hemopoeze (Ross in sod., 2003)



Slika 1: Shema hemopoeze pri sesalcih (Vir: Ross in sod., 2003: 232)

### 1.5.2 Hemopoetska zarodna celica dvoživk

Čeprav je hemopoeza pri sesalcih dobro znana, je pri nesesalčjih vretenčarjih slabo raziskana. Prav tako kot za sesalce tudi za dvoživke velja monofiletska teorija izvora krvnih celic (Jordan, 1932; Foxon, 1964). Pri dvoživkah je terminologija zarodnih celic manj enotna kot pri sesalcih. Izrazi, ki jih v literaturi navajajo za izvorne ali zarodne celice so: limfoidni hemoblast, limfoidne celice, prekurzorske celice in pluripotentne hemopoetske celice. Večinoma se v literaturi za dvoživke pojavlja poimenovanje po Jordanu in njegovih sodelavcih (1932, 1933, 1938 cit. po Foxon, 1964), ki temelji na teoriji o limfoidnem hemoblastu kot izvorni celici, za katero danes vemo, da ne drži.

Predniško oz. zarodno celico v hemopoetskih tkivih strunarjev Jordan (1932; 1933, 1938 cit. po Foxon, 1964) poimenuje limfoidni hemoblast. Ta se pojavi v dveh funkcionalno identičnih, a morfološko različnih oblikah oz. razvojnih stopnjah. To sta hemocitblast in limfocit. Hemocitblast je prva stopnja, je materinska celica, sposobna diferenciacije v katerokoli drugo krvno celico. Kasnejša stopnja (hčerinska celica), ki ima še vedno progenitorsko funkcijo za nekatere krvne celice, je limfocit. Majhni, tako imenovani odrasli limociti v krvi sesalcev so identični limfocitom v krvi dvoživk in so celice, ki so sposobne vzdrževati kapaciteto multipotentnosti materinske celice ali hemocitblasta. Eozinofilni granulociti se diferencirajo večinoma iz hemocitblastne faze limfoidnega hemoblasta, prav tako bazofilni granulociti. Eritrociti, trombociti in nevtrofilni granulociti pa se diferencirajo iz naslednje faze limfoidnega hemoblasta, to je limfocita (Jordan, 1932).

Hemocitblasti so zastopani v krvnem obtoku vse od obloustk do višjih rib. Pri dvoživkah pa je hemopoeza omejena predvsem na hemopoetske organe, tako da hemocitblastov v krvnem obtoku skorajda ne najdemo (Jordan, 1932). Pri višjih vretenčarjih je hemocitblast omejen zgolj na hemopoetske organe (Jordan, 1932). V krvožilju pa kot predstavniki nediferenciranih hemoblastov ostajajo limfociti (Jordan, 1932).

## 1.6 GRANULOCITOPOEZA PRI VRETENČARJIH

Glede na našo predpostavko, da so jetra močerila udeležena tudi v granulocitopoezi, smo naredili kratek pregled nastanka granulocitov pri vretenčarjih. Osredotočili smo se predvsem na dvoživke.

### 1.6.1 Granulocitopoeza pri sesalcih

Nediferenciranih zarodnih ali izvornih celic (angl. stem cell) ne moremo uvrstiti v nobeno določeno razvojno linijo le na osnovi njihove morfologije, saj imajo skupne značilnosti, kot so veliko evkromatsko jedro z jedrci in citoplazma s prostimi poliribosomi. Aktivnost tovrstnih celic se kaže v sintezi proteinov potrebnih pri celični delitvi. Z nadaljno diferenciacijo se velikost jedra manjša in postane bolj heterokromatsko, v citoplazmi pa se kopijo diferencijski produkti, kot so hemoglobin in granule (Cross in Mercer, 1993). Prva morfološko prepoznavna prekurzorska celica na svetlobnem mikroskopskem nivoju je proeritroblast pri eritropoezi in mieloblast pri granulocitopoezi (Ross s sod., 2003).

Granulocitopoeza pri sesalcih poteka v petih morfološko prepoznavnih stopnjah. Prva morfološko prepoznavna prekurzorska celica granulocitopoeze je mieloblast, sledi promielocit, oba sta skupna vsem trem linijam granulocitov. Sledijo mielocit in metamielocit, ki pa sta že diferencirana v posamezno linijo granulocitov, bodisi nevtrofilno, eozinofilno ali pa bazofilno. Razlikujejo se tudi po morfologiji (Ross in sod., 2003):

Mieloblast je celica z velikim, okroglim, evkromatskim jedrom in 3-5 jedrci. Razmerje med jedrnim in citoplazemskim volumnom je veliko. Citoplazme je malo, je agranularna in močno bazofilna. Velikokrat je kot neobarvani del opazno območje Golgija-evega aparata.

Promielocit je faza, kjer nastajajo azurofilne (primarne) granule. V nadaljnjih stopnjah razvoja se te granule ne sintetizirajo več, zato njihova številčnost pada. Jedra so okrogla in velika.

Mielocit je stopnja v razvoju granulocitov, v kateri poteka tvorba specifičnih (azurofilnih) granul. To so tudi zadnje stopnje prekurzorjev, ki so sposobni mitotične delitve. Jedro je bolj ali manj okroglo in bolj heterokromatsko. Z delitvami postaja jedro vse bolj razločno vgreznjeno.

Značilnost metamielocita je vgreznjeno oz. poglobljeno, ledvičasto oblikovano jedro. Naslednja stopnja med zrelo celico in metamielocito je pasasta celica (angl. band cell). Jedro take celice je raztegnjeno, skoraj enotne debeline, ki daje poseben podkvasti izgled. Ta vmesna stopnja je značilnost nevtrofilcev, ki je zelo redko ali skoraj nikoli prisotna kot

razvojna predstopnja eozinofilcev in bazofilcev. Slednjim dvem metamielocitnim stopnjam sledita zreli eozinofilec in zreli bazofilec. Zrela celica nevtrofilca z dvema do štirimi jedrnimi lobuli, ki sledi pasasti celici, je polimorfonuklearni nevtrofilec oz. segmentirani nevtrofilec.

Podobno kot pri sesalcih, kjer je nemogoče morfološko ločevanje med vsemi tremi prekurzorji granulocitov, dokler celica ne doseže mielocitne stopnje (Ross s sod., 2003), tudi pri nekaterih ribah, navajajo skupno promielocitno celico vsem trem tipom granulocitov: heterofilnim, acidofilnim in bazofilnim (Savage, 1983, cit. po Meseguer in sod., 1990; Zuasti in Ferrer, 1988, cit. po Meseguer in sod., 1990). Pri nekaterih drugih nižjih vretenčarjih, kot so brancin *Dicentrarchus labrax* (Meseguer s sod., 1990), paglavci žabe debeloglavke *Rana ridibunda* (Meseguer s sod., 1985), žaba vrste *Rana pipiens* (Cambell, 1970) in močerad vrste *Batrachoseps attenuatus* (Campbell, 1969) pa se že promielocitne prekurzorske celice posameznih linij granulocitov morfološko in ultrastruktурno med seboj razlikujejo.

### 1.6.2 Granulocitopoeza pri dvoživkah

Klasifikacija tako zrelih kot razvojnih stopenj granulocitopoeze pri nesesalcih je v primerjavi s sesalci med avtorji manj enotna. Uporabljena terminologija temelji predvsem na morfološki analizi teh celic. Ker določitev razvojnih stopenj granulocitov v literaturi temelji na ultrastrukturi, smo se omejili na izgled jedra in prisotnost nekaterih citoplazemskih organelov. V granulogenezo se nismo spuščali.

Pri kremljarki *Xenopus laevis* so zoritvene faze granulocitopoeze imenovane podobno, kot navajajo za sesalce, torej mieloblast, promielocit, mielocit, metamielocit, omenjajo pa tudi pasasto celico (angl.band cell) in segmentirane celice (Hadji-Azimi s sod., 1987, cit. po Allender in Fry, 2008). Podobno poimenovanje uporabljajo tudi drugi avtorji za dvoživke (Cambell, 1969; Campbell, 1970; Meseugger in sod., 1985; Frank, 1989a), vendar se izgled celic posameznih stopenj med različnimi vrstami razlikuje. Največja odstopanja so pri določitvi in tudi poimenovanju prve morfološko prepoznavne stopnje.

Meseugger in sodelavci (1985) so v intersticiju ledvic paglavca žabe debeloglavke *Rana ridibunda* celice z velikim, rahlo vgreznenim jedrom, z malo perifernega gostega kromatina in enim ali številnimi jedrci ter citoplazmo s prostimi ali skupinami ribosomov poimenovali blastne celice. Glede na to, da celice kažejo ultrastrukturne značilnosti nediferenciranih celic, predvidevajo, da so to celice, ki so sposobne diferenciacije v katerikoli granulocit. Mezonefros dvoživk omenjajo kot glavni vir pluripotentnih hemopoetskih zarodnih celic (Turpen, 1980, cit. po Meseguer in sod., 1985). Mieloblast paglavca zelene žabe *Rana esculenta* je prva faza v razvoju granulocitov. Je okrogla do

ovalna celica z velikim jedrom in veliko evkromatinata ter vidnim jedrcem. Elementi sekretornega sistema, kot so Golgijev aparat (GA) in grobi endoplazemski retikulum (GER), so redki. V citoplazmi so številni poliribosomi in posamezni mitohondriji (Frank, 1989a). Tudi Hightower in Haar (1975) omenjata mieloblast kot prvo celico v razvoju heterofilcev in eozinofilcev. Vendar ga označita kot primitivno zarodno celico, ki se diferencira v eozinofilce in nevtrofilce. Jedro mieloblasta je nepravilne oblike, pogosto vgreznjeno. Golgijevega aparata, endoplazemskega retikuluma in veziklov ni. Prav tako tudi Campbell (1970) pri ultrastrukturni analizi kostnega mozga žabe *Rana pipiens* identificira prekurzorje granulocitov. Agranularne celice s tipičnimi lastnostmi nediferencirane celice z ultrastrukturnimi lastnostmi, kot je veliko jedro z razpršenim kromatinom in citoplazmo z mnogimi ribosomi, so uvrstili med zarodne celice oziroma hemocitoblaste (Campbell, 1970).

Potek razvoja granulocitov pri dvoživkah je v veliki meri podoben splošni shemi razvoja značilni za vretenčarje. Splošne značilnosti granulocitnih celic smo povzeli po opisih na ultrastrukturnem nivoju v subkapsularni regiji jeter pri vrsti močerada *Batrachoseps attenuatus* (Campbell, 1969), kostnem mozgu pri žabi vrste *Rana pipiens* (Campbell, 1970), perihepatični subkapsularni plasti jeter pupka *Notophthalmus viridescens* in ledvicah paglavca žabe debeloglavke *Rana ridibunda* (Meseguer in sod., 1985).

V splošnem se velikost jedra z zorenjem manjša, količina heterokromatina veča, število in velikost jedrc pa manjša. Sama oblika jedra je pri dvoživkah v promielocitni fazi še ovalna do rahlo vgreznjena, v mielocitni fazi pa pri heterofilnih in eozinofilnih granulocitih že podolgovata in vgreznjena, lobulirana, lahko pa tudi grobo okrogla kot pri bazofilcih. Hightower in Haar (1975) kot glavno razliko v primerjavi s sesalčjimi nevtrofilnimi granulociti navajata vgrezanje jedra, ki se pri dvoživkah prične prej. Od organelov so v začetnejših fazah številčnejši ribosomi in mitohondriji, slabo razviti pa endoplazemski retikulum in Golgijev aparat. Kasneje sta slednja dva organela dobro razvita, kar mnogi avtorji navajajo kot posledico tvorbe granul. V zrelih granulocitnih celicah se v literaturi pojavljajo dve možnosti; nekateri navajajo, da sta Golgijev aparat in grobi endoplazemski retikulum tudi v zrelih stopnjah dobro razvita (Hightower in Haar, 1975; Frank, 1989a), spet pri drugih vrstah sta organela slabo razvita (Campbell, 1969; Campbell, 1970; Meseguer in sod., 1985). Kot pri sesalcih se tudi pri dvoživkah prve granule prično sintetizirati v promielocitni fazi. V mielocitni fazi se po navedbi Hightower in Haar (1975) in Frank (1989a) pojavi sekundarni tip granul. Drugi avtorji trdijo, da gre v teku razvoja le za različne zrelostne stopnje granul, ki vrh tvorbe dosežejo v mielocitni fazi (Campbell, 1969; Campbell, 1970). Nekateri celo navajajo več kot dva različna tipa granul (Meseguer in sod., 1985).

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

### 2.1 ŽIVALI, UPORABLJENE PRI PREISKAVI

Za histološko analizo hemopoetskega tkiva smo uporabili že fiksirana in pogosto tudi že vklopljena tkiva jeter in ledvic obeh podvrst močerila (*Proteus anguinus anguinus* in *Proteus anguinus parkelj*) ter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Deset osebkov nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) je bilo velikih med 24 in 28 cm. Večinoma osebkov je bilo samic, ujetih v Planinski jami (Planina, Slovenija), eden v Otovškem bregu (Otovec, Slovenija). Osebka pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*) sta bila oba samčka, dolga med 24 cm in 25 cm in ujeta v izviru Jelševnik v Beli Krajini. Vsi osebki pisanega nektura (*Necturus maculosus*) so bili iz Severne Karoline, ZDA (uvoznik Carolina Biological Supply). Med našimi osebki so bile tri samičke, za četrtega pa zapisa o spolu ni. Velikost osebkov je bila od 27 cm do 28 cm.

Vzorci tkiv za našo raziskavo so bili načrtno odvzeti osebkom iz predhodnih raziskav v sklopu skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete. Eden izmed osebkov nepigmentirane podvrste močerila (P162) in pisanega nektura (N31) sta bila zaradi slabega zdravstvenega stanja humano usmrčena v podaljšani narkozi (MS222). Močeril (P162) je bil inficiran s plesenijo rodu *Saprolegnia*, pisani nektur pa z nematodi.

Vse živali so bile predhodno vzdrževane v speleološkem laboratoriju Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi črpalkami in filtri, pri stalni temperaturi 10°C. Močerili so bili v stalni temi, nekturi pa v dnevno nočnem ciklu (8 ur svetlobe / 16 ur teme).

### 2.2 PRIPRAVA HISTOLOŠKIH PREPARATOV

#### 2.2.1 Fiksacija tkiva in priprava parafinskih rezin

Tkivo jeter in ledvic je bilo utrjeno v 10% pufranem formalinu (pH 7,0) ali Carnoyevem fiksativu. Jetra so bila vzorčena v anteriorinem, medianem in posteriorinem delu. V nekaj primerih so bila vzorčena cela jetra, ki smo jih razdelili na anteriorni in posteriorni del ter levo in desno polovico. V teh primerih smo jetra rezali vzdolžno in prečno.

Fiksirana tkiva smo spirali pod tekočo vodo, nato pa dehidrirali v naraščajoči alkoholni vrsti od 70%, 96% do 100% etanola. Zaradi večjih koščkov tkiva smo čas dehidracije podaljšali (2 krat po eno uro). Sledil je postopek bistrenja s ksilenom (2 krat po 1h) in prepojitev s paraplastom (dve menjavi: čez noč in za 6 ur).

Parafinske bloke smo rezali z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040. Vzorce smo rezali prečno in vzdolžno. Debelina rezin je bila 5-10 µm.

### **2.2.2 Histološka barvanja**

Preparate smo barvali z vodotopnimi barvili, zato je bilo potrebno z rezin odstraniti hidrofobni parafin in jih ponovno hidrirati. Pred barvanjem smo iz rezin s ksilenom najprej odstranili parafin (2 krat po 3 minute), jih nato prenesli v propanol (2 krat po 3 minute) ter hidrirali preko padajoče alkoholne vrste (96%, 70% alkohol; v vsakem 2 krat po 3 minute) do destilirane vode. Po končanem barvanju smo rezine, odvisno od uporabljenega barvila, sprali v pufrani vodi, destilirani vodi ali prenesli direktno v aceton. Sledila je dehidracija, ki se razlikuje glede na uporabljenno barvilo.

Za dehidracijo smo večkrat uporabljali absolutni etanol, n-butanol ali aceton. Dehidraciji in razbistritvi s ksilenom je sledilo pokrivanje s krovnim medijem Pertex in krovнимi stekelci.

Po barvanju z barvilm hematoksilin-eozin smo rezine sprali z destilirano vodo in nato dehidrirali v 70% alkoholu (2 krat po par sekund) in 96% alkoholu (2 krat po nekaj sekund, lahko tudi dlje), jih prenesli v propanol (2 krat po nekaj sekund, lahko tudi dlje) in zbirali v ksilenu (2 krat po nekaj sekund, lahko tudi dlje). Dehidraciji in razbistritvi je sledilo pokrivanje s Pertex in krovнимi stekelci.

#### **2.2.2.1 Barvanje s hematoksilin-eozinom**

Barvanje s hematoksilin– eozinom (H&E) je standardna tehnika histoloških barvanj. Jedra se obarvajo modro, citoplazma pa roza do rdečkasto. To je preprosta metoda, s katero pa ne moremo določiti kemijske sestave celice (Kiernan, 1990).

Uporabili smo Weigertov železov hematoksilin. To je raztopina pribitka železove soli in kisline, ponavadi je to hidroklorova kislina (Kiernan, 1990).

Hidrirane preparate smo prenesli v Weigertov železov hematoksilin za 1,5 minute in sprali v tekoči vodi. Jedra smo za nekaj minut diferencirali s solno kislim alkoholom in sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom za 3 minute, spiranje s 70% alkoholom, dehidracija, bistrenje v ksilenu in prekrivanje.

#### **2.2.2.2 Srebrova impregnacija za retikulin**

Metoda temelji na značilnosti aldehydnih skupin ogljikovodikov v retikulinu, da reducirajo in precipitirajo srebro. Tkivo se najprej oksidira, potem senzibilizira z železovim alumom,

tega pa nadomesti srebro. Temnorjavo reducirano srebro se nalaga na retikulinskih vlaknih. Formalin ga reducira v črno kovinsko srebro (Presnell in Schreibman, 1997). Kolagenska vlakna se pri srebrovi impregnaciji obarvajo rumeno do svetlo rjava (Ham in Cormack, 1979).

Objektna stekelca, ki smo jih kasneje barvali po tej metodi, smo pred rezanjem potopili v mešanico raztopine želatine in krom kalijevaga sulfata ( $KCr(SO_4)_2$ ) (Boyd, 1955, cit. po Presnell in Schreibman, 1997) in tako zagotovili, da so rezine po barvanju ostale na stekelcu.

Srebrovo raztopino smo pripravili po naslednjem postopku: 10% srebrovemu nitratu smo med stresanjem po kapljicah dodajali amoniak, dokler se precipitat ni raztopil. Nato smo dodali 3% natrijev hidroksid in precipitat raztopili še z nekaj kapljicami amoniaka. Raztopina je bila rahlo opalescentna. Na koncu smo dodali destilirano vodo.

Hidrirane tkivne rezine smo prenesli za 5 minut v sveže pripravljen kalijev permanganat, v katerega smo dodali 3% žveplovo kislino. Stekelca smo na hitro splaknili z vodo in jih obdelali z 1% oksalno kislino. Sledilo je 10 minutno prepajanja z 2,5% železovim alumom (raztopina železovega amonijevega sulfata) in splakovanje v destilirani vodi. Nato smo preparate za 5 sekund prenesli v srebrovo raztopino, jih na hitro splaknili v destilirani vodi in za 1 minuto prenesli v 10% formalin. Potem smo stekelca sprali v vodovodni vodi in nato v destilirani. Sledilo je 2 minutno prapajanja z 0,2% zlato kloridno raztopino in hitro spiranje z destilirano vodo ter 2 minutna obdelava s 5% natrijevim tiosulfatom. Nato smo stekelca dobro oprali v vodovodni vodi in jih splaknili z destilirano vodo. Sledilo je še barvanje jeder z barvilom Kernechtrot (5 minut), spiranje v destilirani vodi, dehidracija skozi naraščajočo vrsto alkoholov, bistrenje v ksilenu in prekrivanje stekelc.

#### 2.2.2.3 Barvanje hemopoetskih tkiv

Pri barvanju hemopoetskih tkiv, krvnih razmazov in razmazov tkiv se uporabljo nevtralna barvila. To so mešanica kationskega in anionskega barvila, med katera spadajo tudi barvila imenovana Romanowsky-Giemsa barvila. To so tradicionalna barvila za diferencialno barvanje krvnih celic. Kationska komponenta ima dva ali tri tiazinska barvila (metilen modro in njegovi oksidacijski produkti) in anionsko komponento, kot je eozin. V to skupino barvil sodijo tudi najpogosteje uporablja Giemsa barvila, Leishmanova in Wrightova barvila (Kiernan, 1990). V naših primerih smo uporabili različna postopka Giemsa barvanja in modificiran May-Grünwald.

Preizkusili smo različne načine Romanowsky-Giemsa barvanj zato, da bi dobili najboljši protokol za barvanje hemopoetskega tkiva pri obeh podvrstah močerila (*Proteus anguinus anguinus* in *Proteus anguinus parkelj*) in pisanem nekturu (*Necturus maculosus*).

#### 2.2.2.3.1 Giemsa barvanje po Presnelli in Schreibmanu

(Cramer in sod., 1973, cit. po Presnell in Schreibman, 1997)

Založna Giemsa raztopina:

2,25 g komercialnega Giemsa prahu  
125 ml absolutnega metanola  
125 ml glicerola

Giemsa prah je mešanica Azura II (mešanica metilen modrega in azura B) in njegovega eozinata (anionska komponenta je eozin) (Kiernan, 1990). Raztopino smo 5 do 10 minut stresali in jo pustili stati čez noč. Raztopina je stabilna mesece.

Delovna raztopina (naredili smo dve delovni raztopini z različnim pH):

- raztopina A: 5 ml Giemsa raztopine v 65 ml destilirane vode, pH 4,8 do 5,2,
- raztopina B: 4 kapljice Giemsa raztopine v 65 ml destilirane vode, pH 6,5 do 6,8.

Polovico hidriranih rezin smo prenesli v Giemsa delovno raztopino A za 2 uri, polovico rezin pa v delovno raztopino B do naslednjega dne. Preparate smo razbarvali z 0,5% ocetno kislino, jih prenesli v 96% etanol, bistrili v ksilenu in jih prekrili.

#### 2.2.2.3.2 Giemsa barvanje po Kiernanu (1990)

Priprava založnega barvila:

2 g Giemsa komercialnega prahu  
132 ml glicerola

Mešanico smo dobro premešali in jo v zaprti steklenici postavili za dve uri v pečico na 60° C. Nato smo dodali 132 ml absolutnega metanola, rahlo pomešali, ohladili in stresali. Tako pripravljena raztopina je obstojna do 5 let.

Založno barvilo Giemsa smo 50 krat redčili s pufrano vodo. Ta je pripravljena tako, da pufer izbranega pH 5-10 krat redčimo z destilirano vodo. Pripravili smo raztopine pri različnih pH in sicer pH 4.0, 5.2, 6.5, 6.9 in 7.1. pH pufrov, barvila in pufrane vode morajo biti enaki.

### Barvanje:

Hidrirane rezine smo prenesli za 15 do 30 minut v pufer izbranega pH. Ta je glede na željeni pH fosfatni ali acetatni. Rezine smo nato potopili v razredčeno raztopino Giemsa, segreto na 60° C. Barvali smo 45-60 minut v pečici na 60°C. V tem časovnem intervalu smo sproti preverjali intenzivnost barvanja. Preparate smo nato nekajkrat pomočili v pufrano vodo in diferencirali z 0,05% ocetno kislino, le če je bilo potrebno. Po diferenciaciji smo rezine sprali s pufrom, nato pa jih dehidrirali v absolutnem alkoholu (2 krat po nekaj sekund), bistrili v ksilenu in jih pokrili s Pertexom.

#### 2.2.2.3.3 Barvanje Giemsa-Sheehan (modificiran May-Grünwald)

Povzeto po:

(<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MGIEMSA.PDF>)

#### Priprava Wrightovega barvila:

Iz Wrightovega komercialnega prahu smo pripravili 0,15% raztopino z metanolom. Raztopino smo pretresli in pustili na sobni temperaturi dva do tri dni. Pred uporabo smo barvilo prefiltrirali.

#### Priprava Giemsa barvila:

Založno barvilo smo pripravili iz komercialnega prahu Giemsa, kot je že bilo opisano pri metodi pod točko (2.2.2.3.2 Giemsa barvanje po Kiernanu).

Raztopino za barvanje smo pripravili iz 50 ml fosfatnega pufra (pH od 6,5 do 6,9), 2,5 ml Giemsa založnega barvila in 2,5 ml metanola. Za večje količine barvila smo količine komponent ustrezno preračunali.

### Barvanje:

Po odstranitvi parafina v ksilenu smo rezine hidrirali v propanolu (2 krat po 3 minute) in metanolu (2 krat po 3 minute) ter jih prenesli v Wrightovo barvilo za 45-60 minut. Preverjali smo intenzivnost barvanja. Po pretečenem času smo raztopini barvila dodali približno enako količino destilirane vode, dokler se raztopina ni obarvala v metalen sijaj. Rezine smo v barvilu pustili še 45-60 minut in nato prestavili v raztopino Giemsa ter jih pustili čez noč.

Naslednji dan smo rezine diferencirali v okisani vodi, ki smo jo pripravili iz 0,5 ml ocetne kisline in 200 ml destilirane vode. Pred dehidracijo smo rezine sprali z destilirano vodo (2 krat po nekaj sekund), dehidrirali v 96% alkoholu (3 krat po nekaj sekund) in 2 krat po nekaj sekund v absolutnem alkoholu. Bistrili smo v ksilenu in preparate pokrili s Pertexom.

#### 2.2.2.3.4 Azur-eozin barvanje

(povzeto po Kiernan, 1990)

Azur – eozin je nevtralno barvilo, uporabno tudi pri splošnem barvanju kateregakoli tkiva (Kiernan, 1990).

Založne raztopine:

0,1 % založna raztopina barvila Azur A

0,1 % založna raztopina Eozina B.

Delovna raztopina:

100 ml destilirane vode

20 ml acetona

8 ml acetatnega pufra izbranega pH

16 ml založne raztopine azur A

16 ml založne raztopine azur B

Pripravili smo acetatni pufer različnih pH-jev in sicer: 4.0, 5.0, 5.5 in fosfatni pufer pH 6.7.

Po odstranitvi parafina in hidraciji smo rezine prenesli v delovno raztopino za 1,5-2 uri. Medtem smo preverjali obarvanost. Nato smo rezine dehidrirali v acetonu (2 krat 45-60 sekund), jih razbistrili v ksilenu (2 krat 3 minute) in jih pokrili s Pertexom.

#### 2.2.2.3.5 Metoda razbarvanja melanina

Zaradi boljše preglednosti hemopoetskih mest v jetrih smo melanin pigmentnih celic razbarvali z močnim oksidantom. Izbrane preparate jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*) in pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*) smo takoj po hidraciji obdelali z 10% vodikovim peroksidom v času 48 ur. Pred barvanjem smo jih spirali z destilirano vodo (2 krat po nekaj sekund), nato prestavili v delovno raztopino Azur- Eozin (njena priprava je opisana pod točko 2.2.2.3.4) ter v njej pustili čez noč.

### 2.3 POLTANKE REZINE

Pregledali smo že narejene poltanke rezine nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*), pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in pisanega nektura (*Necturus maculosus*), da bi podrobneje preučili morfologijo krvnih celic.

Koščki tkiva za presevno elektronsko mikroskopijo so bili fiksirani v fiksativu Karnovsky (mešanica 1,15% glutaraldehida in 0,5% paraformaldehida v 0,05 M kakodilatnem pufru s pH 7,4) prilagojene osmolarnosti 307 mOsmol/kg, in postfiksirani z 1% OsO<sub>4</sub> in vklopljeni v Spurr (ERL).

Poltanke rezine debelin 0,5 µm smo rezali s steklenimi noži in barvanli z barvilom Azur II Metylen blue, imenovano tudi barvanje po Richardsonu (Richardson, 1960), ali pa z 0,1% toluidin modrim v 2,5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Trump in sod., 1961). Barvanje je potekalo na termoplošči pri 96°C za nekaj minut.

Poskusno smo rezine barvali tudi z Giemsa-Sheenanovo modificirano May-Grünwald metodo. Rezine smo na vroči termoplošči pokapljali z Wright barvilom in jih pustili v barvu 15 minut. Preparate smo na plošči prekrili z petrijevko, da barvilo ni prehitro izhlapelo. Nato smo k barvu na rezinah dodali destilirano vodo in pustili nadaljnih 15 minut. Sledilo je barvanje z Giemsa barvilm (eno uro, na termoplošči). Po barvanju smo sprali z destilirano vodo. Barvili Wright in Giemsa sta bili pripravljeni po postopku opisanem v točki 2.2.2.3.3.

### 2.4 MIKROSKOPIRANJE

Histološke preparate in poltanke rezine smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON-Axioskop Zeiss in fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500. Fotografije smo uredili in opremili z grafičnim programom Adobe Photoshop CS.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 REZULTATI BARVANJA LEDVIC IN JETER MOČERILARJEV

S svetlobnim mikroskopom smo pregledali ledvice in jetra obeh podvrst močerila *Proteus anguinus anguinus* in *Proteus anguinus parkelj* ter pisanega nektura *Necturus maculosus*. Proučili smo morfologijo krvnih celic hemopoetskih mest omenjenih organov. Morfološka analiza krvnih celic v ledvicah je bila izhodišče za lažje prepoznavanje krvnih celic v jetrih, saj so ledvica pri družini Proteidae po navedbah avtorjev (Drzewina, 1903, cit. po Barret, 1947; Dawson, 1932, cit. po Barrett, 1947; Jordan, 1932; Foxon, 1964; Turner, 1988) vodilni granulocitopoetski organ.

Tkiva smo barvali z različnimi barvili tipa Romanowsky-Giemsa. Glede na barvilo so se nekatere celice, ki so morfološko ustrezale istemu tipu, razlikovale le v odtenkih obarvanja citoplazme in/ali granul.

Največja odstopanja v obarvanju citoplazme glede na tip barvila smo opazili pri granulocitih (pregl.1, pregl.2). Celice z velikimi, izrazitim, rdeče do oranžno-rjavimi granulami v citoplazmi smo poimenovali eozinofilni granulociti. Celice z majhnimi, velikokrat slabo opaznimi, vijoličnimi in rdečimi granulami smo poimenovali heterofilni granulociti. Opazili smo tudi odstopanja v intenzivnosti barve granul pri predstopnjah granulocitov ali progranulocitih. Granule zgodnjih eozinofilnih granulocitov se z modificiranim May-Grünwald barvajo svetleje kot granule odraslih eozinofilnih granulocitov.

Najboljše rezultate smo pri barvanju ledvic dosegli z modificiranim May-Grünwald barvilom pri pH med 6,5 in 6,9. Pri nepigmentirani in pigmentirani podvrsti močerila pa se je tkivo ledvic diferencialno obarvalo tudi z Azur-eozin barvilm pri pH med 5,0 in 5,5. Prav tako sta ti dve barvili zadovoljivo obarvali jetrno tkivo pigmentirane in nepigmentirane podvrste močerila. Pri pigmentirani podvrsti močerila je bilo barvanje z barvilm May-Grünwald manj uspešno. Pri jetrnem in ledvičnem tkivu pisanega nektura pa nobeno od uporabljenih barvil ni dalo optimalnih rezultatov. Najbolje se je pri njih izkazalo Azur-Eozin barvanje pri pH med 5,0 in 5,5 za jetrno tkivo in modificiran May-Grünwald za ledvično tkivo.

Modificirano May-Grunwald barvilo smo uporabili tudi na poltankih rezinah. Vendar želenega rezultata nismo dosegli.

Preglednica 1: Obarvanje citoplazme in granul pri heterofilnih in eozinofilnih granulocitih v ledvicah močerilarjev (Proteidae) pri barvanju z modificiranim May-Grünwald (MG), azur-eozin (AE) in hematoksilin-eozin (HE) barvili.

Celica	Barvanje	<i>Proteus anguinus anguinus</i>	<i>Proteus anguinus parkelj</i>	<i>Necturus maculosus</i>
Heterofilni granuloci	HE	Bledo roza citoplazma	Bledo roza citoplazma	Roza citoplazma
	AE	Citoplazma vijolično-roza s slabo razločljivimi rdečkastimi in vijoličnimi granulami	Vijolično-roza citoplazma s slabo razločljivimi rdečkastimi in vijoličnimi granulami	Neuspešno barvanje
	MG	Citoplazma vijolična s slabo vidnimi granulami	Citoplazma vijolična s slabo vidnimi granulami	Vijolična citoplazma
Eozinofilni granuloci	HE	Citoplazma z rdečimi, izrazitimimi granulami	Citoplazma z rdečimi, izrazitimimi granulami	Roza do rdeča citoplazma, granule niso očitne
	AE	Vijolična citoplazma z briljantno rdečimi granulami	Vijolična citoplazma z briljantno rdečimi granulami	Neuspešno barvanje
	MG	Modra citoplazma z oranžno-rjavimi granulami	Modra citoplazma z rjavo oranžnimi granulami	Purpurna citoplazma z majhnimi rdečimi granulami

Preglednica 2: Obarvanje citoplazme in granul pri heterofilnih in eozinofilnih granulocitih v jetrih močerilarjev (Proteidae) pri barvanju z modificiranim May-Grünwald (MG), azur-eozin (AE) in hematoksilin-eozin (HE) barvili.

Celica	Barvanje	<i>Proteus anguinus anguinus</i>	<i>Proteus anguinus parkelj</i>	<i>Necturus maculosus</i>
Heterofilni granuloci	HE	Bledo roza citoplazma	Bledo roza citoplazma	Bledo roza citoplazma
	AE	Svetlo vijolična citoplazma	Roza-vijolična citoplazma	Vijolična citoplazma z malo majhnih rdečih do vijoličnih granul
	MG	Celic je pri inficiranem osebk P162 zelo malo, zato ne moremo podati točne barve	Vijolična citoplazma Barvanje ni bilo najbolj uspešno.	Neuspešno barvanje
Eozinofilni granuloci	HE	Citoplazma je roza do rdeča, barva granul ne izstopa, Inficiran osebek ima citoplazmo z rdečimi, granulami.	Citoplazma z rdečimi, očitnimi granulami	Citoplazma z rdečimi granulami
	AE	Vijolična citoplazma z briljantno rdečimi granulami	Vijolična citoplazma z briljantno rdečimi granulami	Purpurna citoplazma z rdečimi granulami
	MG	Vijolična citoplazma z rjavo oranžnimi granulami	Rjavo oranžne granule. Barvanje ni bilo najbolj uspešno	Neuspešno barvanje

### 3.2 LEDVICE MOČERILARJEV

Ledvica močerilarjev prekriva mezotel iz sploščenih celic (sl. 2a). Pod mezotelom je vezivna kapsula, v kateri so posamezni granulociti. Mestoma so zastopane ciliarne celice, ki oblikujejo ciliarni del peritoneja (sl. 2b).

Pod vezivno kapsulo je parenhim, ki ga tvorijo ledvični tubuli, korpuskuli in večje ter manjše žile (sl. 3). Retikularne celice in retikularna vlakna oblikujejo omrežje, v katerem so hemopoetska mesta (sl. 4, sl. 5). Retikularne celice imajo svetla, nepravilno oblikovana jedra in malo citoplazme.

Hemopoetske skupke sestavljajo programulociti določenega tipa (sl. 6a). Skupina šteje dve ali več celic. Zreli granulociti so običajno posamični. Pogosto med eozinofilnim in heterofilnim skupkom programulocitov ni jasne meje (sl. 6b).

#### 3.2.1 Krvne celice hemopoetskih mest v ledvicah močerila (*Proteus anguinus*)

Najpogosteje zastopane celice v ledvicah obeh podvrst močerila so nedozoreni eozinofilni in heterofilni granulociti ali programulociti (sl. od 7a do 10). Številni so tudi skupki limfocitov ter prekurzorske celice (sl. 13, 14). Slednje se pojavljajo posamič, redkeje tudi v večjih skupinah. Zreli eozinofilni in heterofilni granulociti so najmanj številne krvne celice.

##### 3.2.1.1 Programulociti

Pri določanju predstopenj granulocitov smo upoštevali obliko in velikost jedra, razporeditev kromatina in videz citoplazme. Tako smo ločili heterofilne in eozinofilne programulocite.

##### Heterofilni programulociti

Zoritvene faze heterofilnih programulocitov (proHG) imajo različno veliko in oblikovano jedro, ki je bodisi v centru ali pa ob robu celice. Zgodnje stopnje imajo veliko, nepravilno okroglo jedro, ki zavzema večji del bazofilne citoplazme z vijoličnimi in rdečimi granulami (sl. 7a). V jedru so manjši kromatinski skupki. Z zorenjem programulocitov se jedro manjša in vgrezne ter kasneje izrazito ledvičasto oblikuje (sl. 7b). Barva citoplazme se spremeni iz rahlo bazofilne v vijolično-roza v primeru azur-eozin barvanja, ali v temno vijolično v primeru barvanja z modificiranim May-Grünwald barvilm. Citoplazma je videti luknjičasta, s številnimi drobnimi, vijoličnimi in rdečkastimi granulami (sl. 7b). Na nekaterih prerezih granule niso vidne.

Z nadaljnjo zoritvijo se vgreznina jedra poglobi in sega globoko v notranjost ter daje jedru podkvasto obliko (sl. 8a). V nekaterih primerih se sosednja konca močno vgreznenega

jedra zblizata in oblikujeta jedro v obliki kolača (sl. 8b), ki zavzema skoraj celotno citoplazmo.

### **Eozinofilni programulociti**

Eozinofilni programulociti (proEG) imajo v zgodnejših zoritvenih stopnjah ovalna do okrogla jedra (sl. 9a). Kromatin je v manjših skupkih, vmes so vidna svetlejša področja evkromatina. Citoplazma je bazofilna z maloštevilnimi eozinofilnimi granulami. V primerjavi s kasnejšimi fazami se granule obarvajo svetlejše.

Z zoritvijo se jedro proEG preoblikuje v ledvičasto (sl. 9b) do rahlo vgrezljeno jedro, ki je pomaknjeno proti robu citoplazme. Kromatin je rahel in v manjših temnejših skupkih (sl. 9b). Še zmeraj so vidna svetlejša mesta. Citoplazma je obsežnejša in z večjim številom velikih, okroglastih eozinofilnih granul. Z zorenjem celice se jedro pomika vedno bolj ob rob celice in vgreza. Jedro zrelejših zoritvenih faz je pogosto podaljšano in podkvasto (sl. 10). Citoplazmo v celoti zapolnjujejo eozinofilne granule.

#### **3.2.1.2 Zreli heterofilni granulociti**

Zrel heterofilni granulocit je okrogla celica z lobuliranim jedrom, pomaknjениm ob rob citoplazme (sl. 11). Lobuli so med seboj povezani s tanjšim ali debelejšim jedrnim pasom. Jedro je zaradi obsežnosti heterokromatina temnejše. V bazofilni citoplazmi so številne drobne, rdeče in vijolične granule (sl. 11).

#### **3.2.1.3 Zreli eozinofilni granulociti**

Drugi tip odraslih granulocitov so eozinofilni granulociti. Jedro je lobulirano in pomaknjeno na rob citoplazme (sl. 12). Število lobulov je različno. Bazofilno citoplazmo v celoti zapolnjujejo velike, okroglaste, svetlejše in temnejše eozinofilne granule.

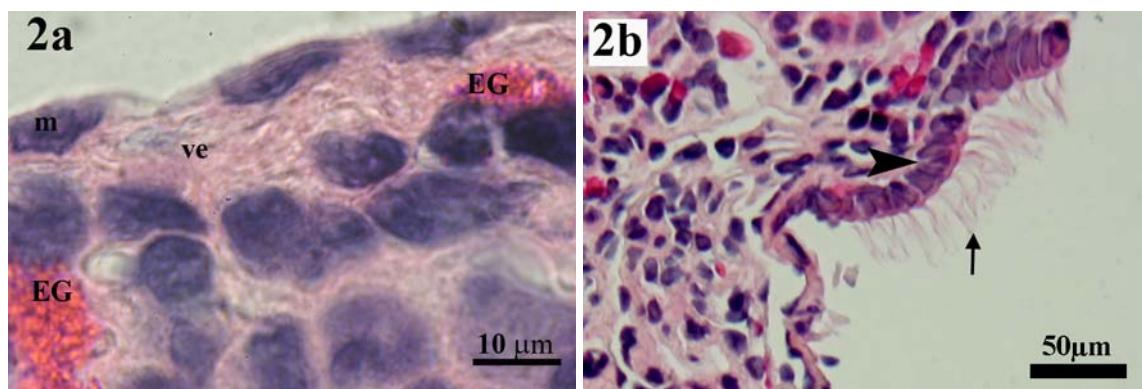
#### **3.2.1.4 Prekurzorske celice**

V hemopoetskih mestih smo zasledili tudi posamezne velike agranulirane celice. Poredkoma so v večjih skupinah (sl. 13). Poimenovali smo jih prekurzorske celice. So različno velike, jedro je veliko, okroglo ali ovalno in zavzema večji del citoplazme. Nameščeno je simetrično ali nekoliko acentrično. Kromatin je rahel, raztresen in razporejen v manjše skupke, ki dajejo jedru mrežast izgled. Tako je jedro leptokromatskega izgleda. Citoplazma prekurzorskih celic se razlikuje glede obsežnosti in tudi glede intenzivnosti bazofilije. Manj bazofilna citoplazma je videti rahlejša in vakuolizirana.

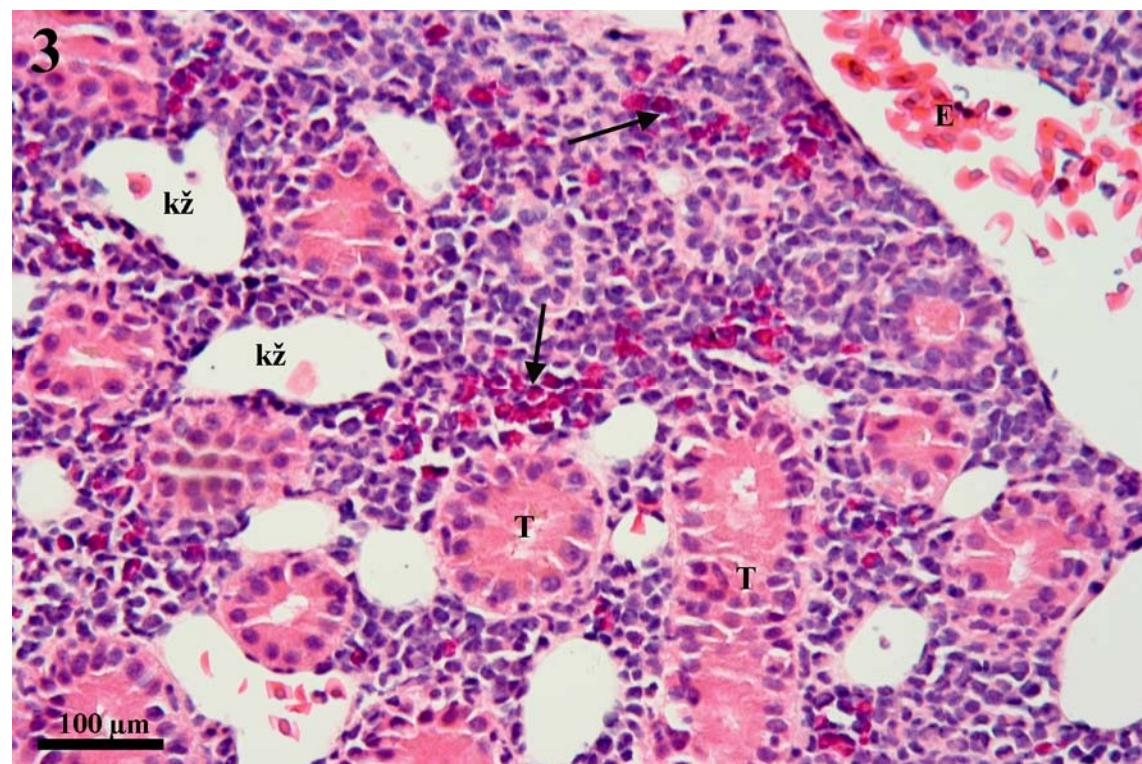
### 3.2.1.5 Limfociti

Dokaj pogost tip agranulocitnih celic v vezivu parenhima so limfociti, običajno združeni v skupke. So različnih velikosti, vendar večjih odstopanj ni. So okroglaste celice s svetlo bazofilno citoplazmo, ki v tankem sloju obdaja jedro (sl. 14). Velikokrat citoplazma ni vidna. Jedro leži centralno in se zaradi velikih kromatinskih skupkovobarva temno.

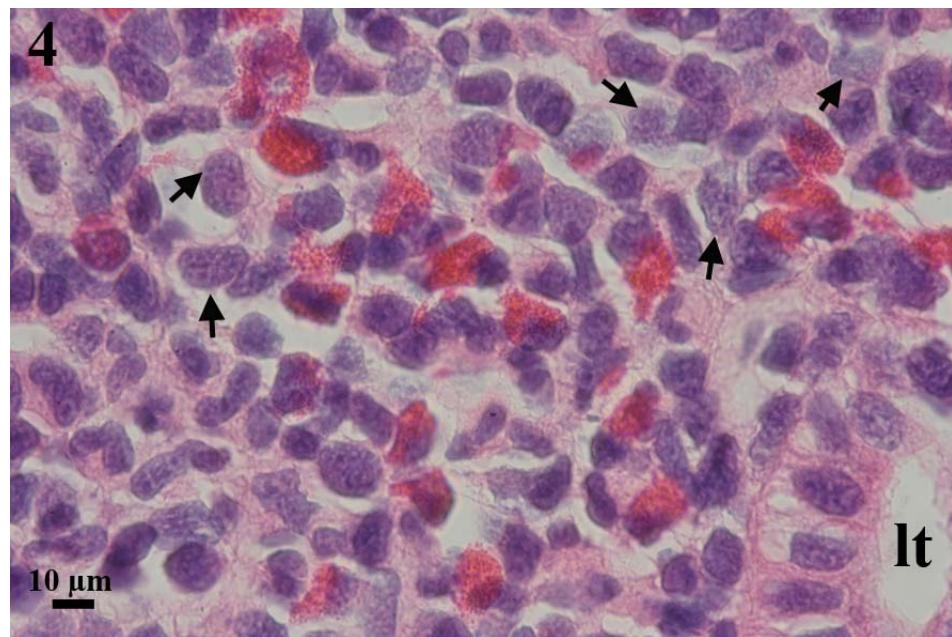
V hemopoetskih mestih ledvic smo opazili tudi celice v različnih stopnjah delitve (sl. 15).



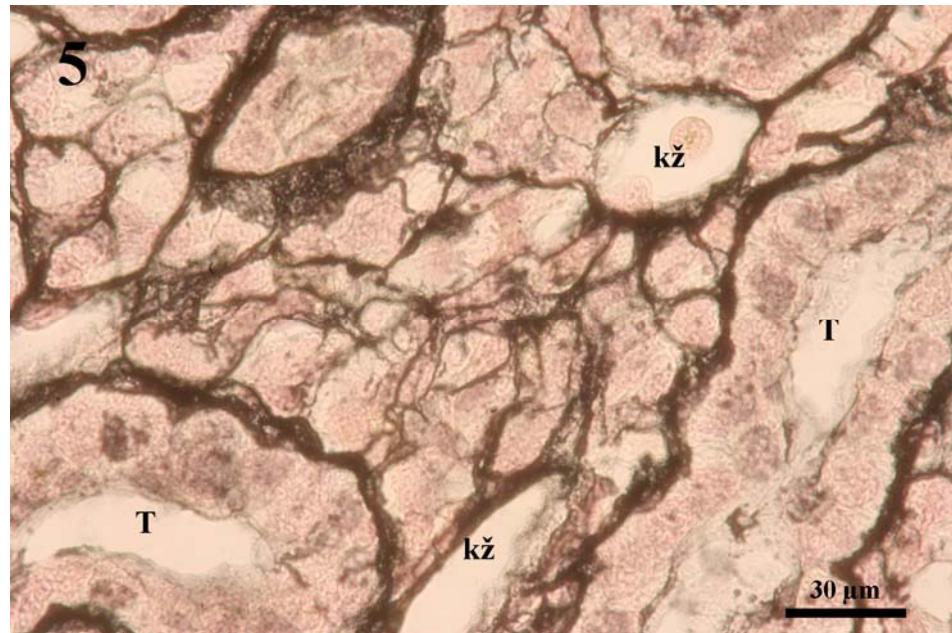
Slika 2a-b: Mezotel in vezivna kapsula ledvic nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. (a) Parenhim ledvic obdaja kapsula iz veziva (ve) in ploščate mezotelne celice peritoneja (m). V kapsuli so posamezni eozinofilni granulociti (EG). (b) Posamezne ciliarne celice (glava puščice) se ponekod združujejo in s svojimi cilijami (→) oblikujejo ciliarni del peritoneja.



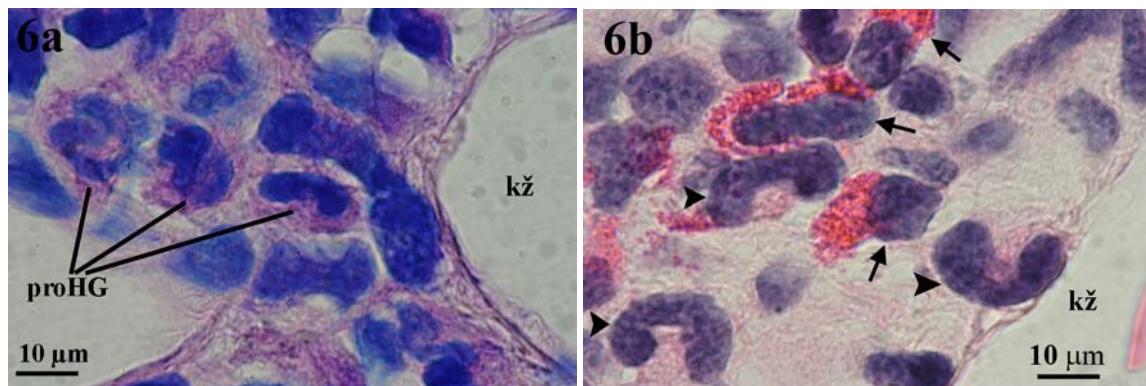
Slika 3: Ledvice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. V vezivu med krvnimi žilami (kž) in ledvičnimi tubuli (T) so hemopoetska mesta (puščici). Med krvnimi celicami izstopajo rdeče obarvane granule eozinofilnih granulocitov. E, eritrociti.



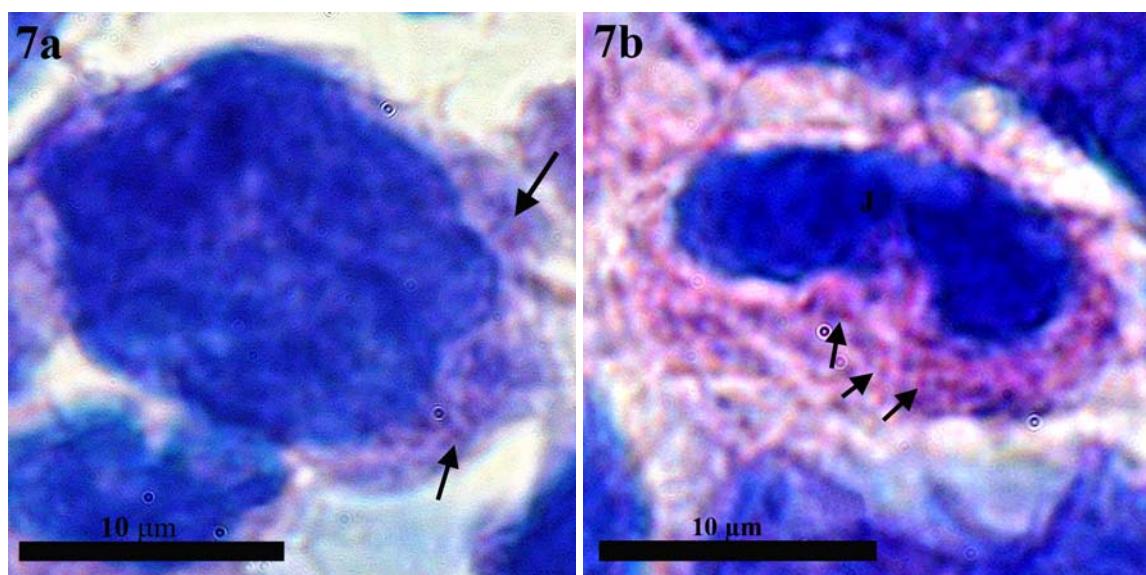
Slika 4: Hemopoetska mesta v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Retikularne celice veziva (→) sooblikujejo mrežo, v kateri so krvne celice. Celice z rdečimi granulami v citoplazmi in različno oblikovanim jedrom so eozinofilni granulociti v različnih razvojnih fazah. Lt, lumen tubula.



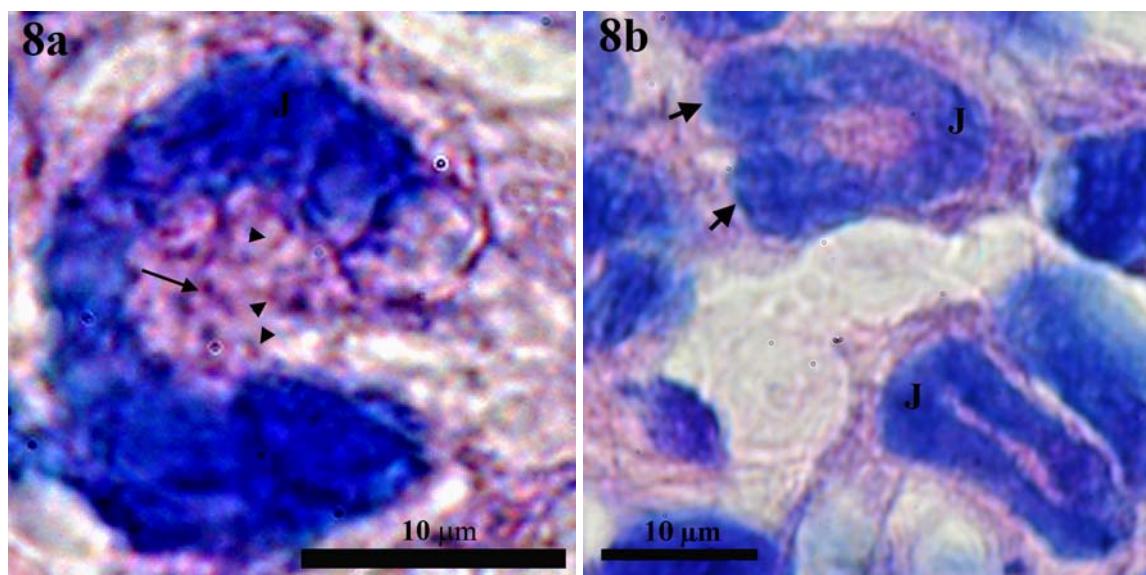
Slika 5: Retikularno ogrodje v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkeli*). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikularna vlakna so obarvana temno rjavo in tvorijo intertubularno mrežo. Vlakna so tudi okoli krvnih žil (kž) in tubulov (T).



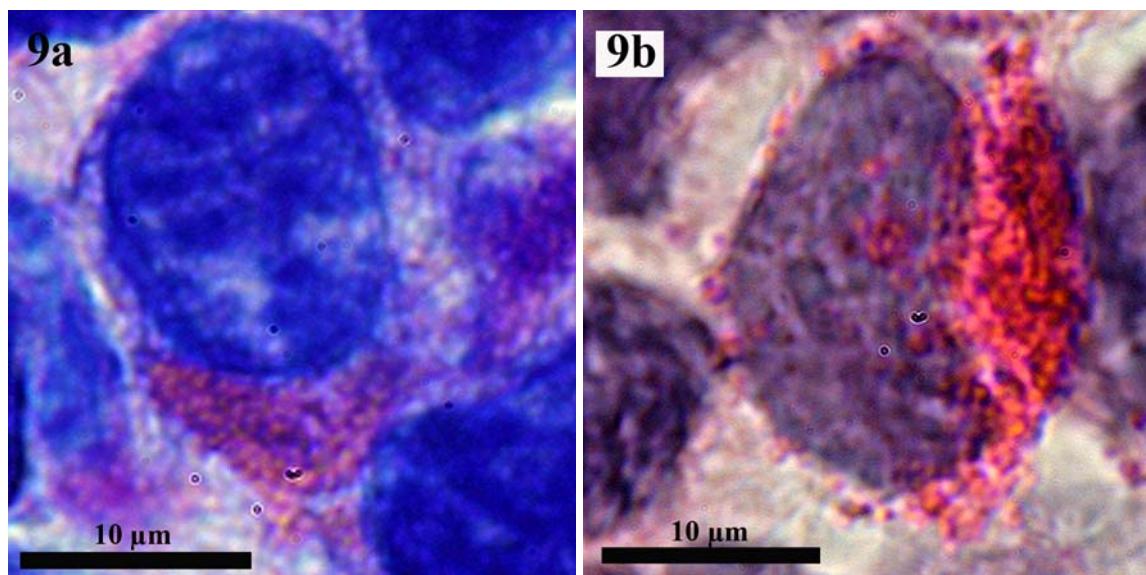
Slika 6a-b: Hemopoetski skupek v ledvicah močerila. (a) Pigmentirana podvrsta močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Azur-eozin barvanje. Heterofilni programulociti (proHG) se med seboj razlikujejo po vgreznjenosti jedra. (b) Nepigmentirana podvrsta močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Razvojne stopnje eozinofilnih granulocitov (→) se od predstopenj heterofilnih granulocitov (glava puščice) ločijo po velikih, eozinofilnih granulah v citoplazmi. kž, krvna žila.



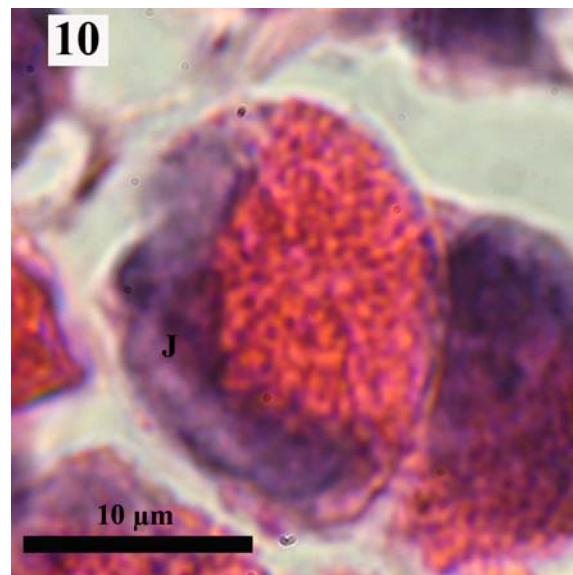
Slika 7a-b: Zgodnji zrelostni fazi heterofilnih programulocitov (proHG) v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). (a) Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. (b) Azur-eozin barvanje. (a) Zgodnji proHG z velikim jedrom nepravilne oblike, ki zavzema velik del celičnega volumna. Citoplazme je malo, je bledo vijolična z drobnimi, rdečkastimi in vijoličnimi granulami (→). (b) proHG s podolgovatim, ledvičasto oblikovanim jedrom, pomaknjenim ob rob citoplazme. V vijolično - roza, luknjičasti citoplazmi so številne drobne, rdečaste in vijolične granule (→).



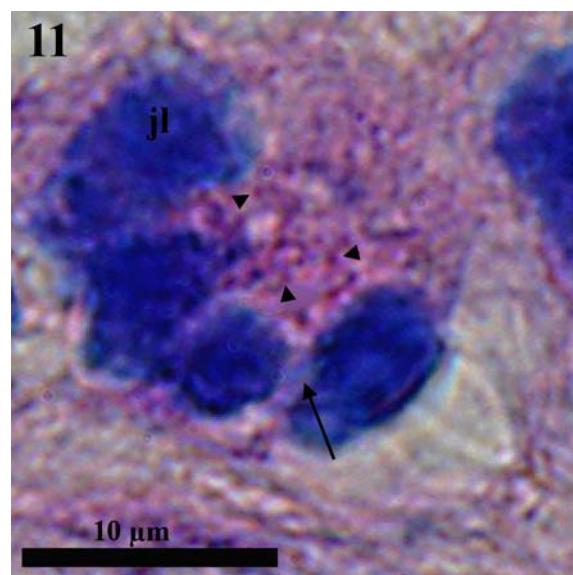
Slika 8a-b: Kasnejši heterofilni programulociti (proHG) v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Azur-eozin barvanje. (a) proH z globoko vgreznjenim, podkvastim jedrom (J) in vijolično citoplazmo z drobnimi, vijoličnimi (→) in rdečkastimi (◀) granulami. (b) Na sliki sta proHG s kolačastim izgledom jedra (J). Puščici označujeta sosednja zbližana konca vgreznenega jedra.



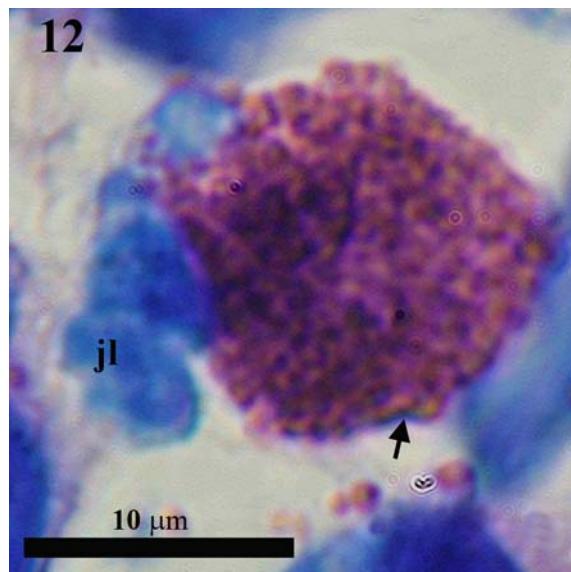
Slika 9a-b: Zgodnji zrelostni stopnji eozinofilnih programulocitov (proEG) v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). (a) Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. (b) Hematoksilin-eozin barvanje. (a) Jedro je veliko, ovalno, acentrično, mestoma evkromatsko in zavzema velik del citoplazme. V citoplazmi so oranžne, okroglaste granule, ki ne prekrivajo celotne citoplazme. Citoplazma je bazofilna. (b) Jedro je ledvičasto in acentralno nameščeno. Citoplazmo zapoljujejo eozinofilne granule.



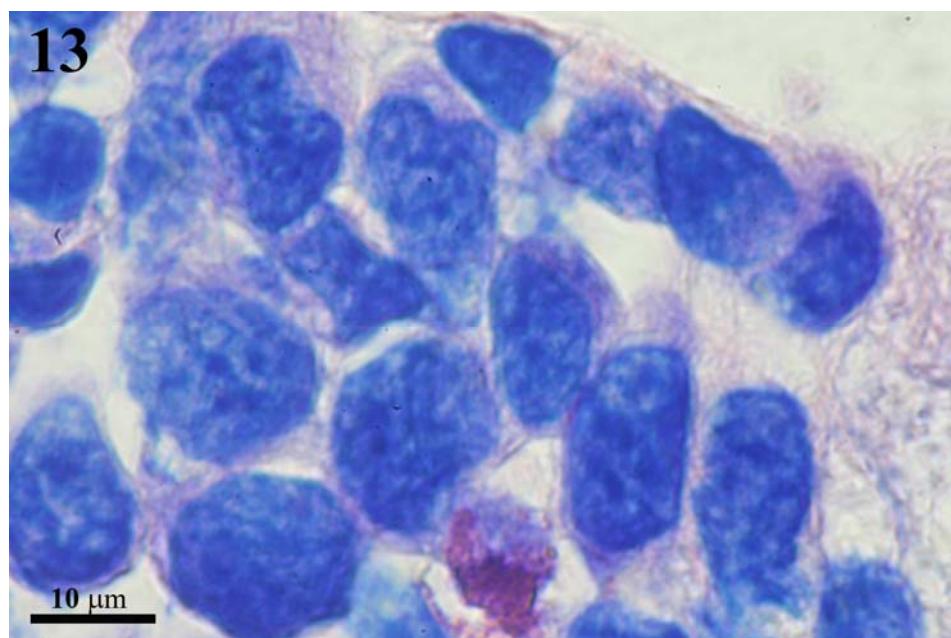
Slika 10: Kasnejši eozinofilni programulocit (proEG) v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Jedro je acentrično in manjše kot pri zgodnejših proEG (sl. 9a-b). Citoplazmo zapolnjujejo rdeče granule.



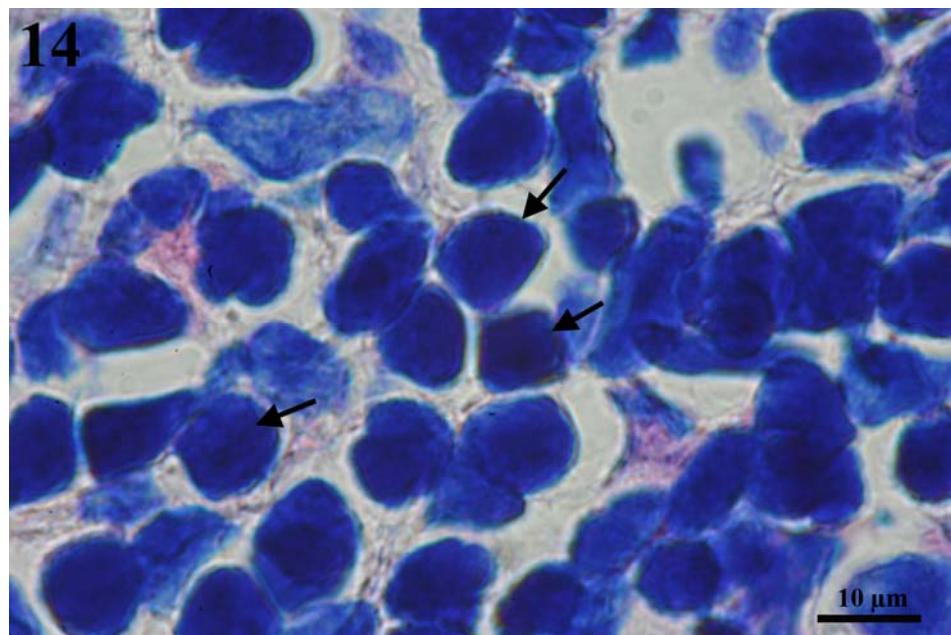
Slika 11: Zreli heterofilni granulocit v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Azur-eozin barvanje. Jedro je lobulirano (jl). Citoplazma je roza - vijolična, vakuolizirana ter s številnimi, drobnimi rdečkastimi (◀) in vijoličnimi granulami.



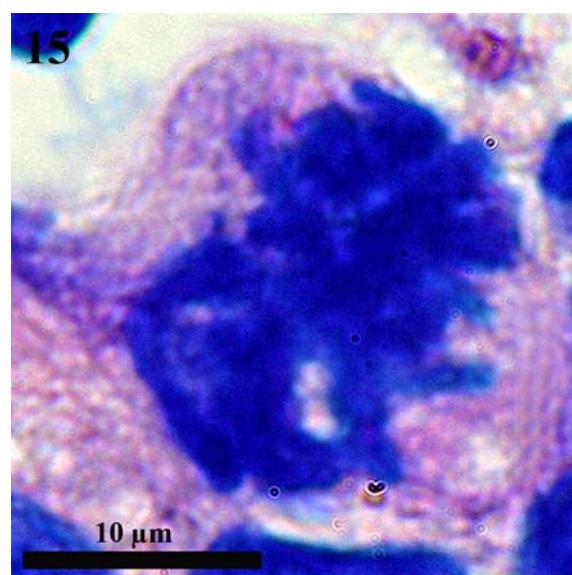
Slika 12: Zreli eozinofilni granulocit v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Jedro je acentrično in deljeno v štiri jedrne lobule (jl). Citoplazmo popolnoma zapolnjujejo rjavo-oranžne granule. Citoplazma je modra (→).



Slika 13: Prekurzorske celice v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Jedra so velika, leptokromatska in zavzemajo večji del celice.



Slika 14: Limfociti v ledvicah nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Azurozinsko barvanje. Običajno so v skupkih. Jedra so okrogla in heterokromatska. Citoplazme je malo.



Slika 15: Deleča se celica v ledvicah pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkeli*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom.

### 3.2.2 Krvne celice v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*)

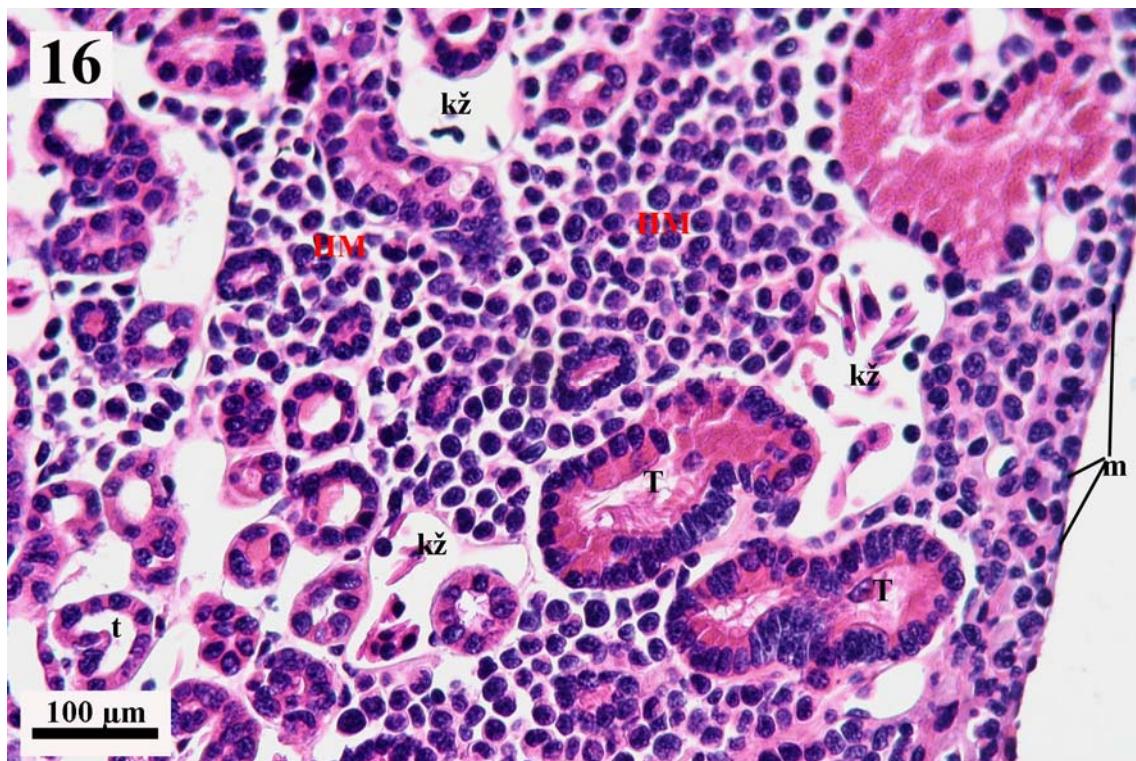
Ledvice pisanega nektura imajo podobno zgradbo kot ledvice močerila. Obdaja jih vezivna kapsula, nad katero so ploščate mezotelne celice (sl. 16). Pod kapsulo je parenhim, ki ga tvorijo večji in manjši tubuli, krvne žile in renalni korpuskuli. Med tubuli in žilami so v mreži retikularnega veziva hemopoetska mesta (sl. 16). Mrežo oblikujejo retikularne celice in retikularna vlakna (sl. 17).

Najpogostejše celice hemopoetskih mest so heterofilni granulociti z vijolično citoplazmo in, odvisno od stopnje zrelosti, z okroglimi do ovalnimi jedri, ki so različno globoko vgreznjena ali lobulirana (sl. 18). V citoplazmi so drobne granule. Med njimi so celice z vakuolizirano citoplazmo in vgreznjenimi, ledvičasto oblikovanimi jedri. Najverjetnejše so heterofilni programulociti (sl. 19).

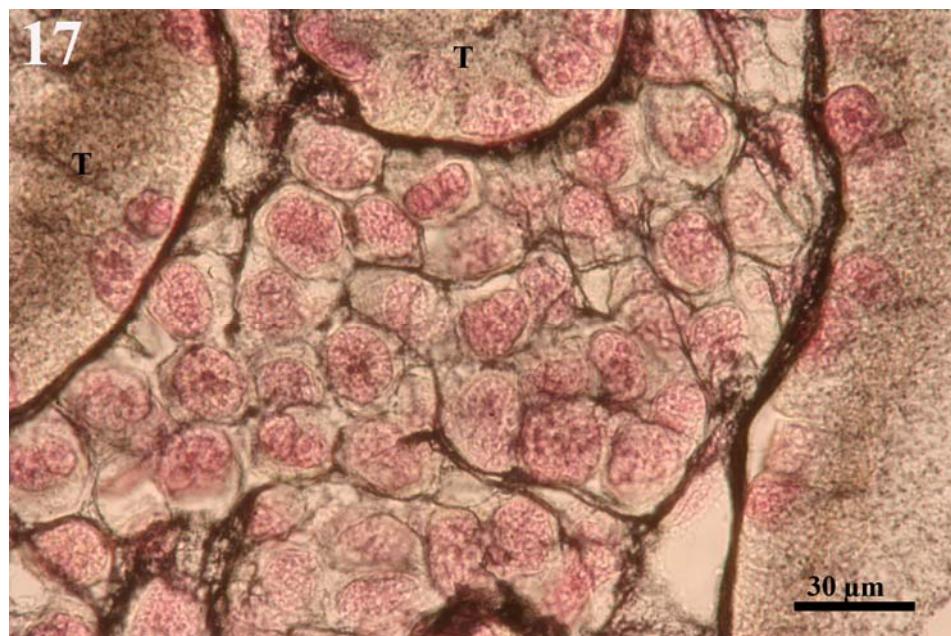
Eozinofilni granulociti so manjštevilni in oblikujejo manj obsežne skupke (sl. 20). Citoplazma jeobarvana purpurno. Jedra so, tako kot pri heterofilnih granulocitih, različnih oblik glede na razvojno stopnjo. Celice z vgreznjenim jedrom, eozinofilnimi granulami in purpurno obarvano citoplazmo smo poimenovali eozinofilni programulociti (sl. 21). Eozinofilne granule so v primerjavi z granulami eozinofilnih granulocitov močerila manjše.

V hemopoetskih mestih so pogoste tudi agranularne celice z velikim, okroglim jedrom in večjo ali manjšo količino citoplazme (sl. 22). Citoplazma je svetla in bledo bazofilna. To so prekurzorske celice. Heterokromatin je v manjših skupkih in mrežasto razporejen.

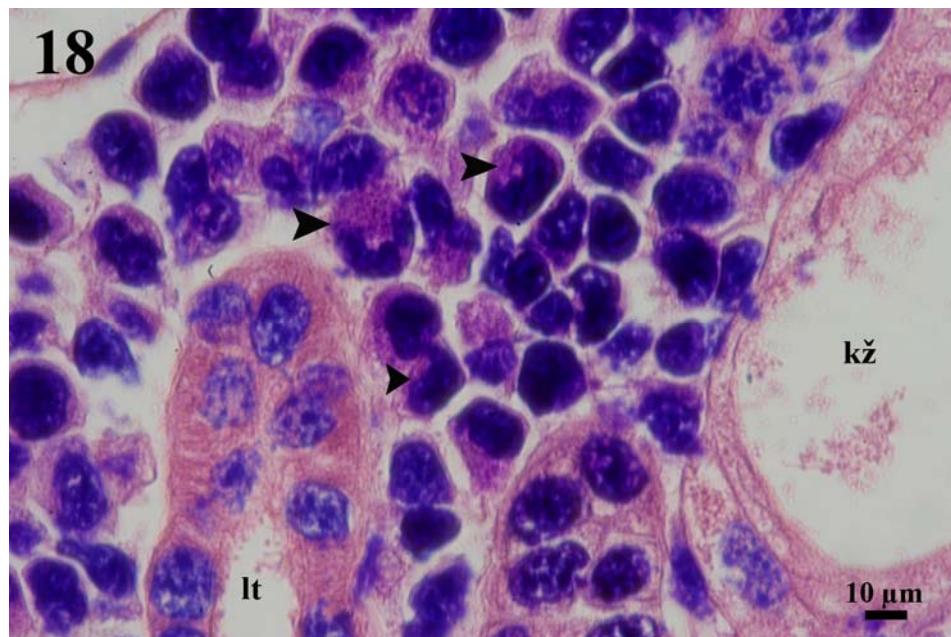
Med celicami hemopoetskih mest smo opazili tudi posamezne pigmentne celice. Veliko celic hemopoetskih mest smo opazili v stopnji celičnih delitev (sl. 23a-b).



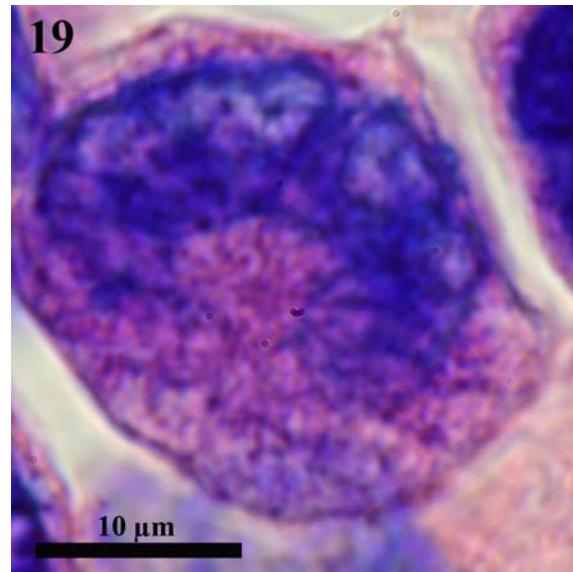
Slika 16: Ledvice pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Ledvice prekrivajo mezotelne celice (m). Parenhim tvorijo večji (T) in manjši (t) ledvični tubuli, krvne žile (kž) in hemopoetska mesta (HM).



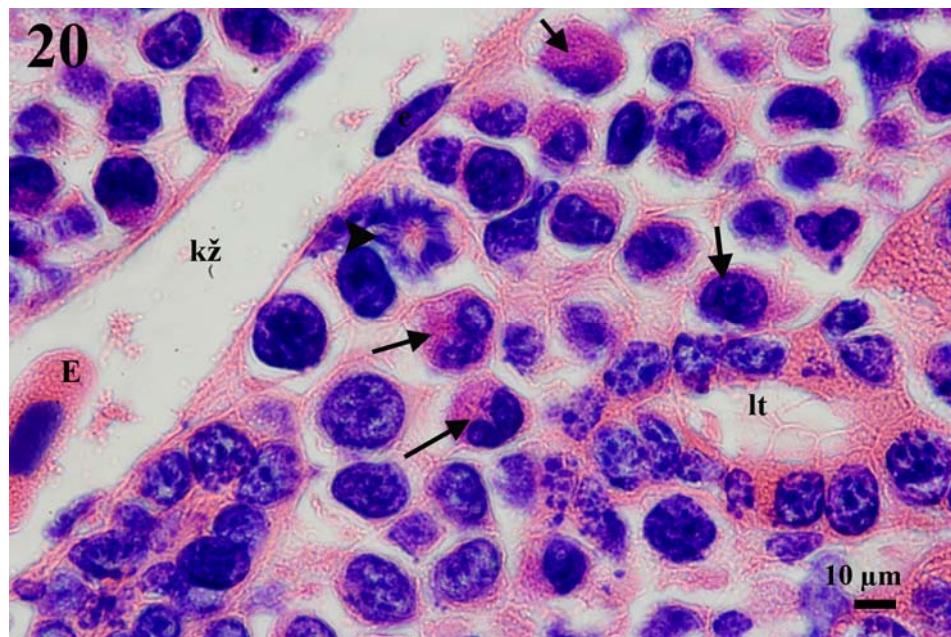
Slika 17: Retikularno ogrodje ledvic pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikularna vlakna so obarvana temno rjavo. Tvorijo intertubularno mrežo, nahajajo pa se tudi v vezivu ob tubulih (T).



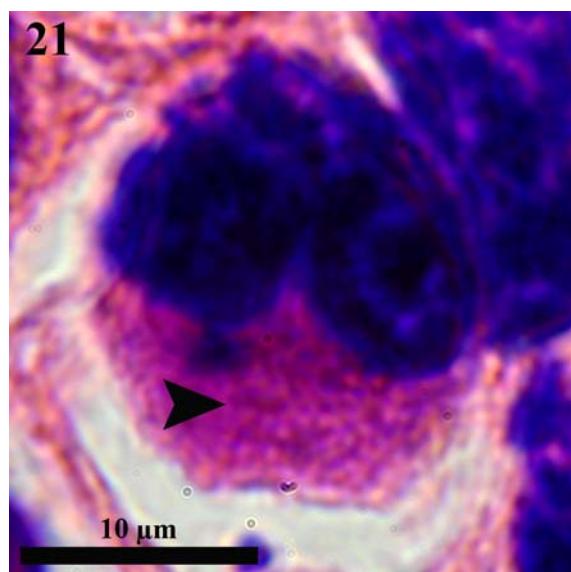
Slika 18: Hemopoetski skupki heterofilnih granulocitov v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Heterofilni granulociti z vijolično citoplazmo imajo ekscentrično lobulirano, deljeno jedro ali pa je jedro bolj okroglo (►). kž-krvna žila, lt-lumen ledvičnega tubula.



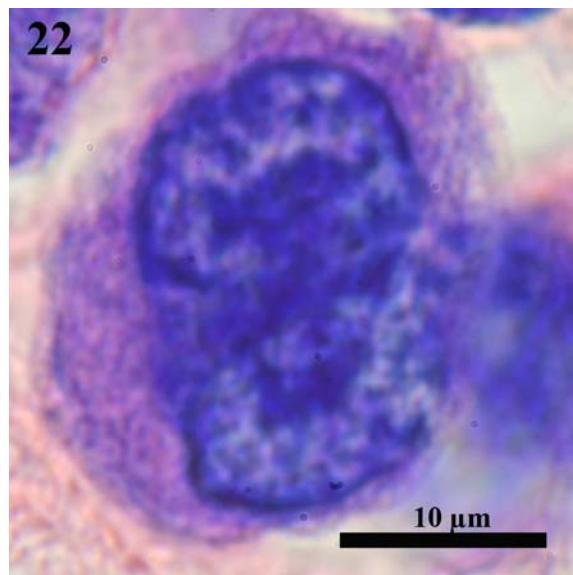
Slika 19: Heterofilni programulocit v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Vgrevnjeno jedro je pomaknjeno ob rob citoplazme. V vijolično obarvani citoplazmi so slabo vidne granule.



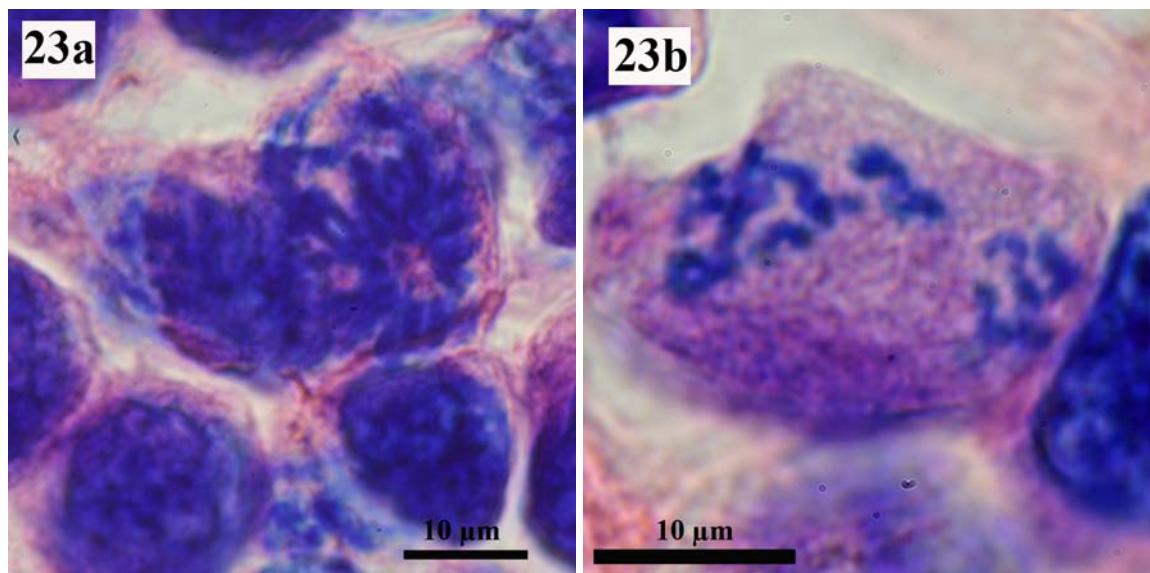
Slika 20: Hemopoetski skupek eozinofilnih granulocitov v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Eozinofilni granulociti s pururno obarvano citoplazmo in lobuliranimi, segmentiranimi ekscentričnimi jedri ali okroglimi jedri (→). Ostale krvne celice imajo drugače obarvano citoplazmo in obliko jedra. kž-krvna žila, e-endotel žile, E- eritrocit, lt-lumen tubula, ►deleča celica.



Slika 21: Eozinofilni programulocit v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Jedro je vgrezljeno in acentrično. V pururno obarvani citoplazmi so vidne drobne, eozinofilne granule (►).



Slika 22: Prekurzorska celica v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Jedro je veliko, ovalno in zavzema večji del celičnega volumna. Kromatin je mrežasto razporejen. Citoplazma je svetlo vijolična.



Slika 23a-b: Deleči celici v ledvicah pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom.

### 3.3 MESTA KRVNIH CELIC V JETRIH MOČERILARJEV (Proteidae)

V jetrih vseh treh predstavnikov močerilarjev (Proteidae) smo našli tri različna mesta večje koncentracije krvnih celic. Razdelili smo jih na:

- perihepatično mesto, kjer so krvne celice so v vezivu subkapsularne plasti jeter,
- intersticijska mesta s področji krvnih celic med hepatociti, so bogata tudi s pigmentnimi celicami
- perivaskularna področja ob večjih žilah in/ali žolčnih vodih.

#### 3.3.1 Perihepatično mesto v jetrih močerila (*Proteus anguinus*)

Pod ploščatimi mezotelnimi celicami visceralnega peritoneja je različno debela vezivna kapsula jeter. Tik pod njo je pri obeh podvrstah močerila različno debelo perihepatično mesto iz manjših skupkov krvnih celic (sl. 24, 25a). Pri pigmentirani podvrsti močerila je perihepatično mesto večinoma prekinjeno, krvne celice pa so pogosteje posamične (sl. 25b). Vezivo razmejuje perihepatično mesto od hepatičnih plošč, sinusoidov in pigmentnih skupkov (sl. 24). Pogosto je težko opredeliti, ali so skupki krvnih celic del perihepatične plasti, ali pripadajo intersticijskim mestom, kajti obsežna intersticijska mesta velikokrat segajo do same kapsule jeter ali do mezotela.

V perihepatični plasti je retikularno vezivo in maloštevilne manjše žile (sl. 26 in 27). Bistvenih razlik razporeditve perihepatičnih mest med anteriornim, medianim in posteriornim delom jeter nismo opazili. Pri pigmentirani podvrsti močerila so perihepatična mesta veliko manj obsežna, vidna le kot zadebelitve pod kapsulo ali mezotelom, tako da ne moremo govoriti o plasteh.

##### 3.3.1.1 Tipi krvnih celic perihepatičnega tkiva

Med nepigmentirano in pigmentirano podvrsto močerila ni večjih razlik v sestavi krvnih celic perihepatičnega tkiva.

Najštevilčnejše krvne celice perihepatičnega tkiva obeh podvrst močerila so heterofilni in eozinofilni granulociti in progranulociti (sl. 28a-c). Manj pogoste so prekurzorske celice in limfociti (sl. 28a in 28c).

**Zreli heterofilni granulociti** imajo jedro deljeno v več lobulov in pomaknjeno ob rob citoplazme (sl. 28a, 28b). Število lobulov in njihova velikost je različna. Heterokromatin je razporejen ob jedrni membrani ter v skupkih v notranjosti jedra. V citoplazmi so drobne, slabo vidne granule (sl. 28a).

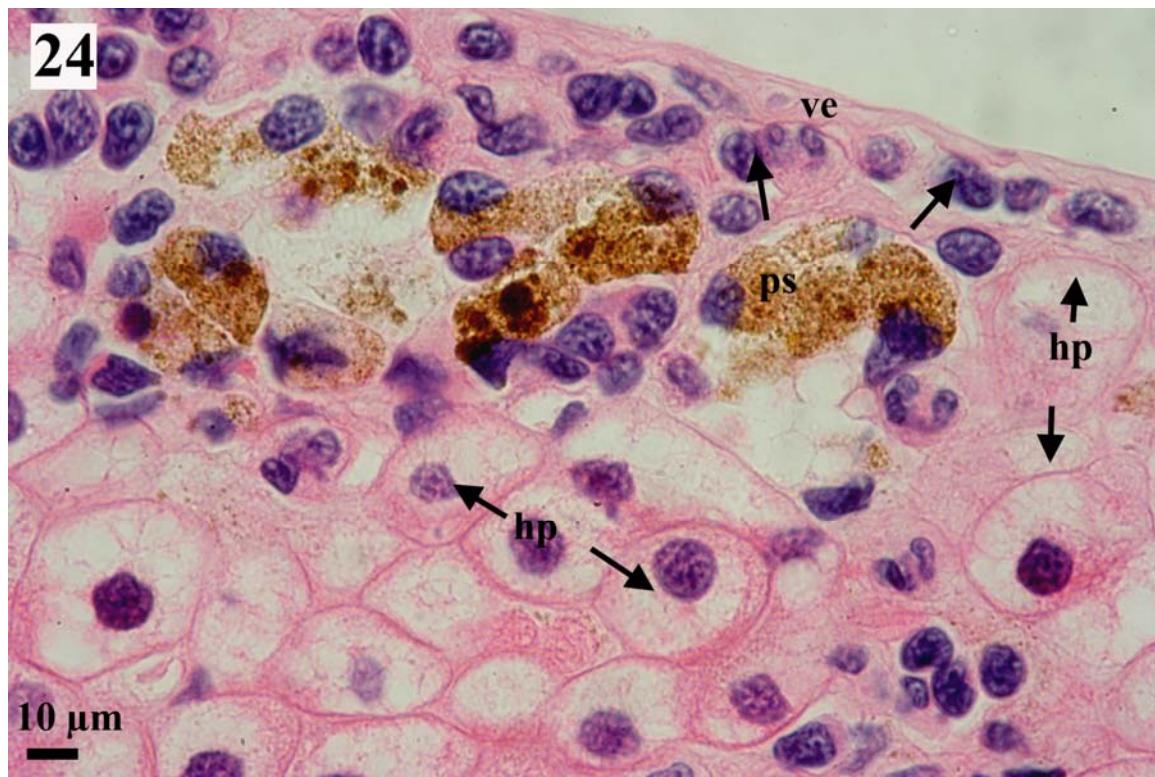
Tudi pri **zrelih eozinofilnih granulocitih** so jedra lobulirana, le da je običajno viden le eden izmed lobulov (sl. 28b). V citoplazmi so jasno vidne granule. Obsežnost citoplazme, granul ter oblika jedra je različna pri različnih razvojnih stopenj eozinofilnih granulocitov.

**Progranulocitne celice** imajo veliko, vgreznjeno jedro, ki zavzema večji del citoplazme (sl. 28c). Citoplazme je malo, ponekod so vidne granule. Kromatin v jedru je svetlejše obarvan, v notranjosti so temnejši skupki.

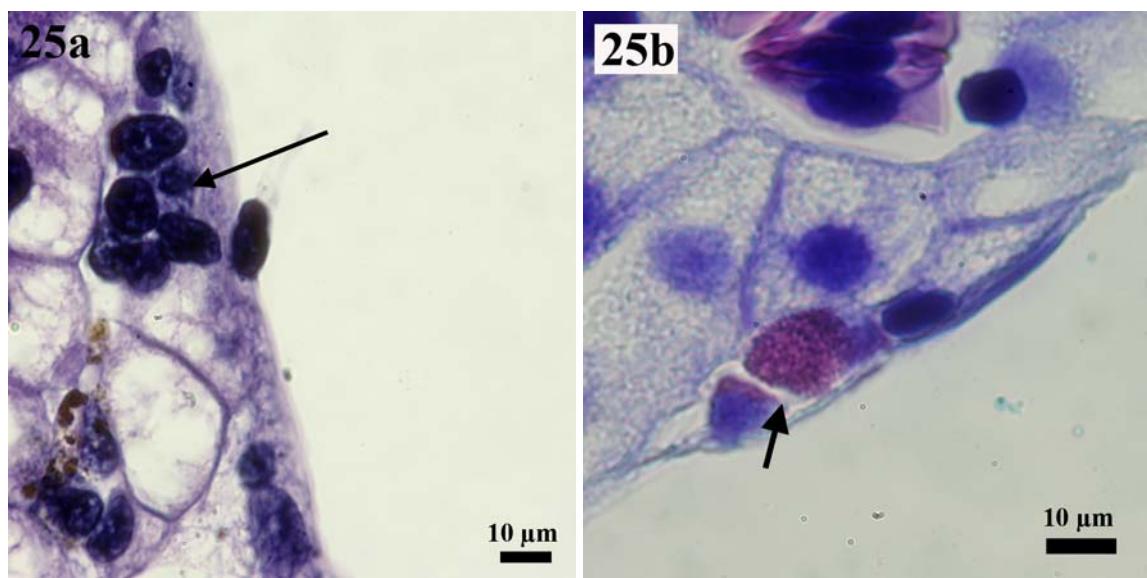
**Prekurzorske celice** imajo veliko, ovalno in evkromatsko jedro. Temnejšega kromatina je malo (sl. 28c).

Jedro **limfocita** je izrazito temno, z velikimi temnimi skupki kromatina, citoplazme je malo (sl. 28a, 28c). V perihepatičnem področju so le posamezni limfociti.

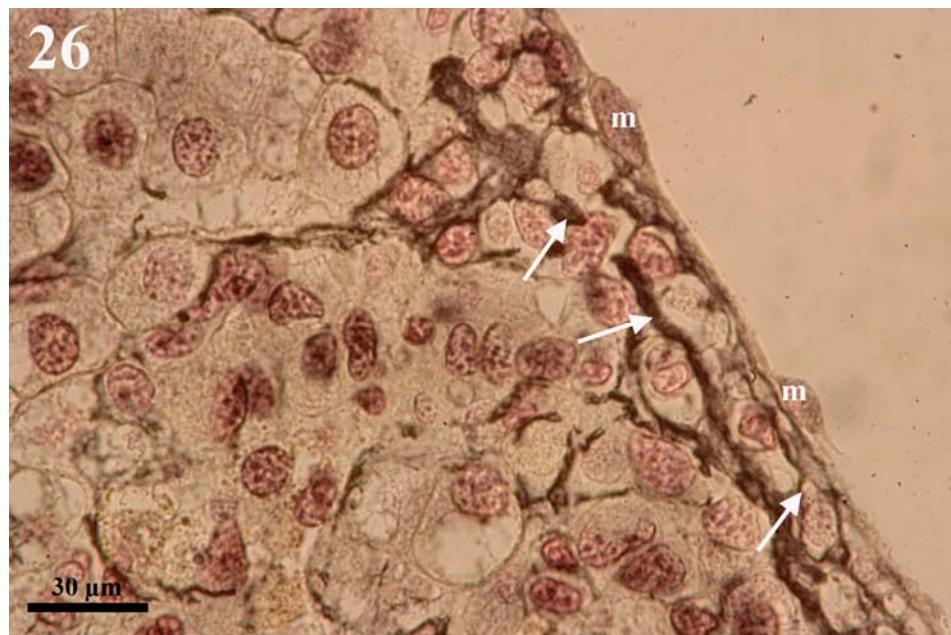
Pri inficiranem osebku nepigmentirane podvrste močerila (P162) so bili eozinofilni granulociti perihepatične plasti številčnejši kot pri drugih osebkih. Mestoma oblikujejo tudi večje skupine. Granule se s hematoksilin-eozin barvanjem in drugimi diferencialnimi barvili obarvajo v različnih odtenkih rdeče do rjavo-rdeče, najpogosteje živo rdeče (sl. 29).



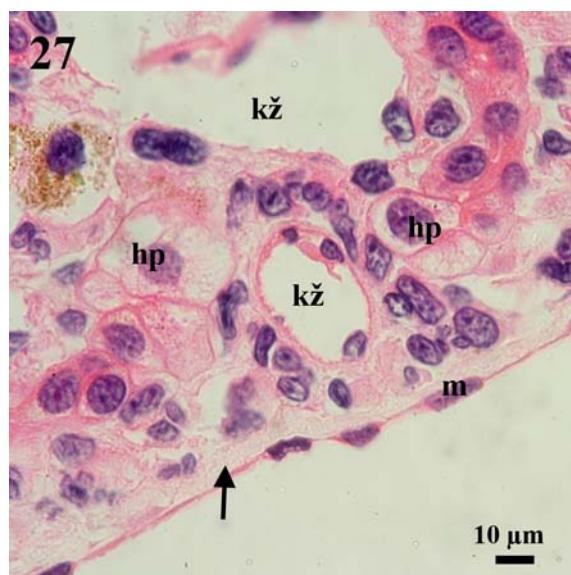
Slika 24: Perihepatično tkivo v jetrih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Pod vezivno kapsulo (ve) so krvne celice (→). hp- hepatociti, ps- pigmentni skupki



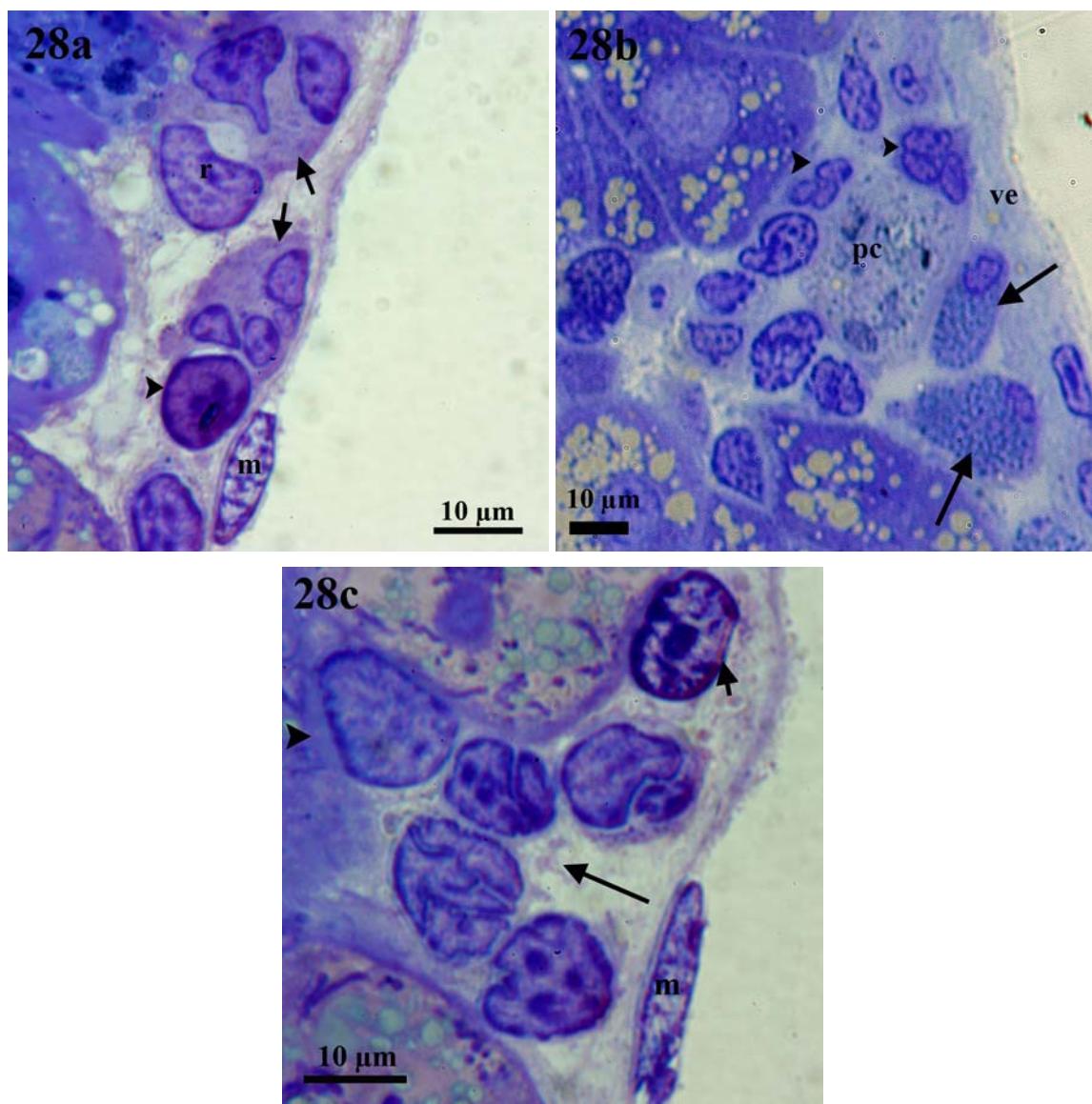
Slika 25a-b: Perihepatično tkivo v jetrih pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkeli*). Hematoksilin-eozin barvanje. (a) Pod vezivno kapsulo je majhna skupina krvnih celic (→), najverjetneje limfocitov. (b) Velikokrat so pod mezotelom in tanko vezivno kapsulo le posamezne krvne celice. (→) eozinofilna granulocita.



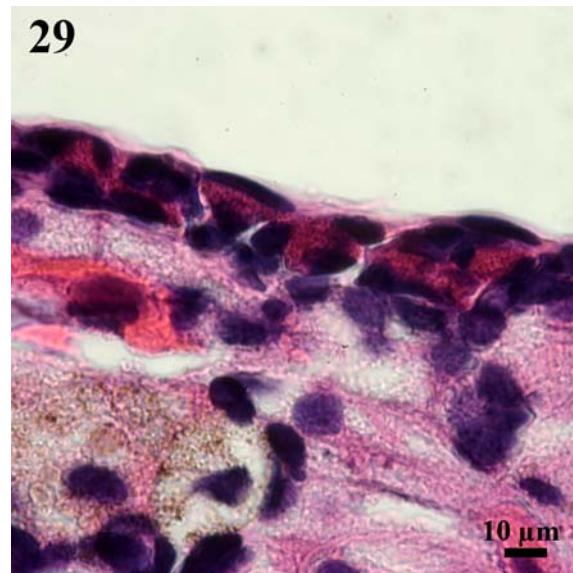
Slika 26: Retikularna vlakna (→) pod mezotelom (m) jeter nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Srebrova impregnacija za retikulin.



Slika 27: Prekrvljenost perihepatičnega tkiva. Jetra nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. V perihepatičnem tkivu so tudi manjše žile (kž). m - jedra mezotelnih celic, (→) vezivna kapsula, hp-hepatociti.



Slika 28a-c: Krvne celice perihepatičnega tkiva v jetrih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanke rezine. Barvanje po Richardsonu. (a) Zrela heterofilna granulocita (→) in limfocit (►). Jedro je lobulirano, v citoplazmi so drobno zrnate granule. Jedro limfocita je temno, s temnimi skupki kromatina. Citoplazme je malo. Na sliki je vidna tudi retikularna celica z odstavki citoplazme (r). m-jedro mezotelne celice, r-retikularna celica. (b) Pod vezivno kapsulo (ve), ob pigmentni celici (pc) so številne krvne celice. Celice z največjimi granulami so zreli eozinofilni granulociti (→). Na prerezu so vidni le posamezni lobuli jedra. Celice z lobuliranim jedrom so zreli heterofilni granulociti (►). Ostale celice so najverjetneje progranulociti. (c) Skupina progranulocitov (→) z velikimi, vgreznenimi jedri. Citoplazme je malo, ponekod so vidne granule. Celici zraven sta prekurzorska (►) in limfocitna celica (krajša →). Jedro prekurzorske celice je ovalno in evkromatsko. Jedro limfocita je temno, z velikimi temnimi skupki kromatina.



Slika 29: Eozinofilni granulociti v perihepatičnem tkivu nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Hematoksilin-eozin. V citoplazmi so rdeče granule.

### 3.3.2 Intersticijska mesta v jetrih obeh podvrst močerila

Intersticijska mesta so med hepatičnimi ploščami in običajno mejijo na sinusoid (sl. 30) z retikularnnimi vlakni, pigmentnimi celicami, ki so lahko posamične ali v skupku in z okolnimi pripadajočimi krvnimi celicami (sl. 30 in 31). Intersticijska mesta v jetrih obeh podvrst močerila so obsežnejša od perihepatičnega tkiva in so morfološko podobna hemopoetskim mestom v ledvicah (sl. 4). Pri nepigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so obsežnejša kot pri pigmentirani podvrsti (*Proteus anguinus parkelj*). Mesta z veliko krvnih celic so pri slednjem redka (sl. 32).

Tudi med osebki nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) smo opazili razlike v obsežnosti intersticijskih mest in številčnosti določenih tipov krvnih celic. Intersticijska mesta so zelo obsežna pri inficiranem osebku nepigmentirane podvrste močerila (P162) (sl. 33). Med gručo limfocitov in prekurzorskih celic so skupki eozinofilnih granulocitov (sl. 34). Skupki limfoidnih celic so pogosto med sosednjimi hepatociti ali pa v sinusoidu, kamor se raztezajo tudi retikularna vlakna (sl. 35). Heterofilni granulociti so le redko zastopani. Pri ostalih osebkih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so intersticijska mesta omejena na okolico pigmentnih celic. Limfocitov in prekurzorskih celic je manj kot pri inficiranem osebku. Veliko je granulocitnih celic z lobuliranim jedrom (sl. 30).

#### 3.3.2.1 Tipi krvnih celic v intersticiju

Na klasičnih parafinskih rezinah smo v intersticijskih mestih prepoznali limfocite, prekurzorske celice ter eozinofilne in heterofilne granulocite. Eozinofilni granulociti se z diferencialnimi barvili pri nekaterih osebkih niso obarvali različno od heterofilnih granulocitov. Vzrok temu je lahko v postopku priprave tkiva. Zato smo natančnejšo morfološko preiskavo naredili na poltankih rezinah.

**Limfociti** imajo temno obarvano jedro ter malo citoplazme, ki je svetla in bazofilna (sl. 36). Celice z večjimi, podolgovatimi jedri in razporeditvijo kromatina mrežastega videza so **prekurzorske celice** (sl. 37a-b). Običajno se združujejo v skupke. Citoplazme je malo in je svetlo bazofilna. Na veliko prerezih ni vidna, ker poteka v tankem sloju okoli jedra.

Eozinofilni granulociti znotraj intersticijskih mest so posamični ali v skupkih dveh ali več celic. Pogosto so posamični. Prepoznali smo eozinofilne programulocite in zrele eozinofilne granulocite. **Eozinofilni programulociti** imajo v zgodnjih stopnjah veliko, okroglo do ovalno in svetlejše jedro ter malo granul v citoplazmi (sl. 38a). Kasneje se jedro vgrezne in pomakne na periferijo (sl. 38b). Z zorenjem se število granul povečuje.

Tudi na poltankih rezinah smo v skupkih intersticija določili heterofilne in eozinofilne granulocite in njune predstopnje. Jedro programulocita v začetni stopnji zajema večji del citoplazme. Oblike jedra so različne. Največkrat je to okroglasto, podolgovato in tudi rahlo vgrezljeno (sl. 39a-b). Citoplazme je malo in jo zapolnjujejo granule. Slednje so dveh tipov, celice z večjimi granulami in celice z manjšimi granulami (sl. 39a-b). V notranjosti je kromatin razporejen v majhne, svetlejše in temnejše skupke. Nekatere izmed njih so morda jedrca. Velikokrat granule v citoplazmi niso vidne, kar je lahko odvisno od prereza. Z zorenjem se oblika jedra spreminja iz okroglaste v ledvičasto. Citoplazmo eozinofilnih programulocitov v kasnejših stopnjah zapolnjujejo granule, ki imajo veliko svetlejših in manjših granul ter le maloštevilne večje granule (sl. 39c).

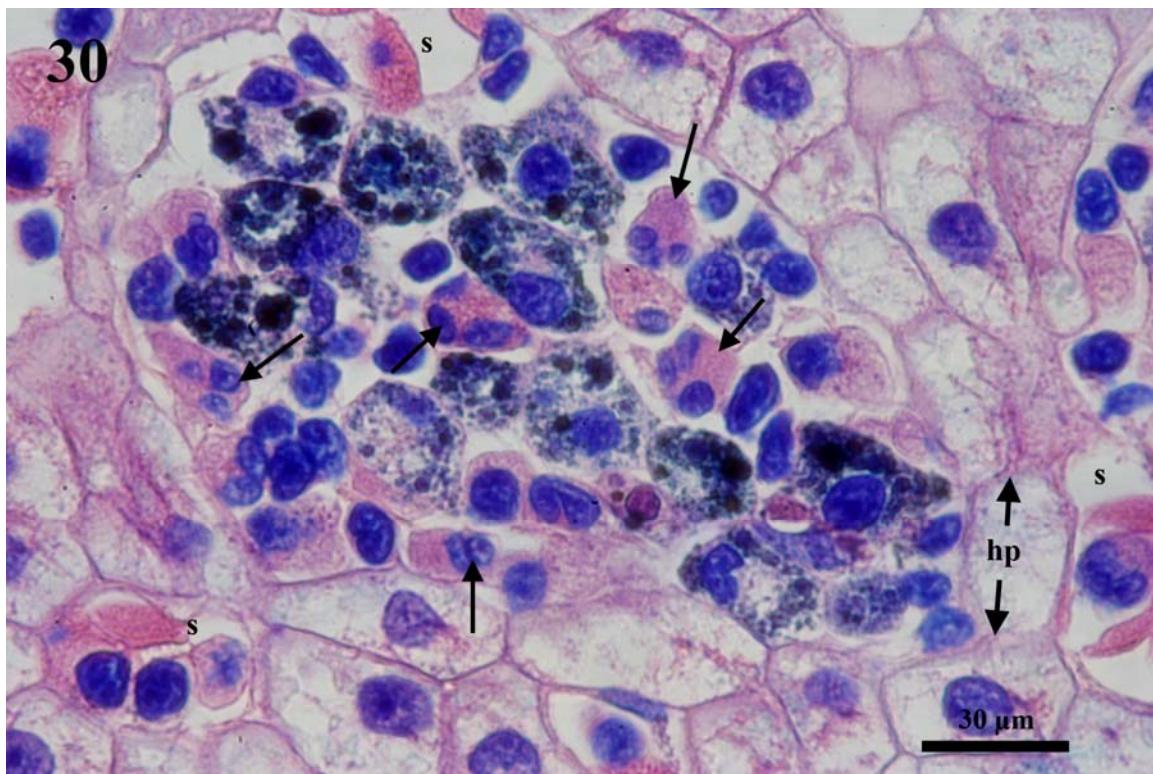
**Zreli heterofilni in eozinofilni granulociti** imajo acentrično in deljeno jedro (sl. 40a-b). Oba tipa granulocitov se razlikujeta po citoplazmi. Granule heterofilnih granulocitov so različnih oblik, od velikih okroglih do podolgovatih. So manjše od granul eozinofilnih granulocitov.

Intersticijska mesta pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anginus parkelj*) se od nepigmentirane (*Proteus anginus anginus*) razlikujejo le po obsežnosti. Razlik v sami sestavi krvnih celic ni. Pigmentirana podvrsta močerila ima manj obsežna intersticijska mesta z manj številnimi krvnimi celicami.

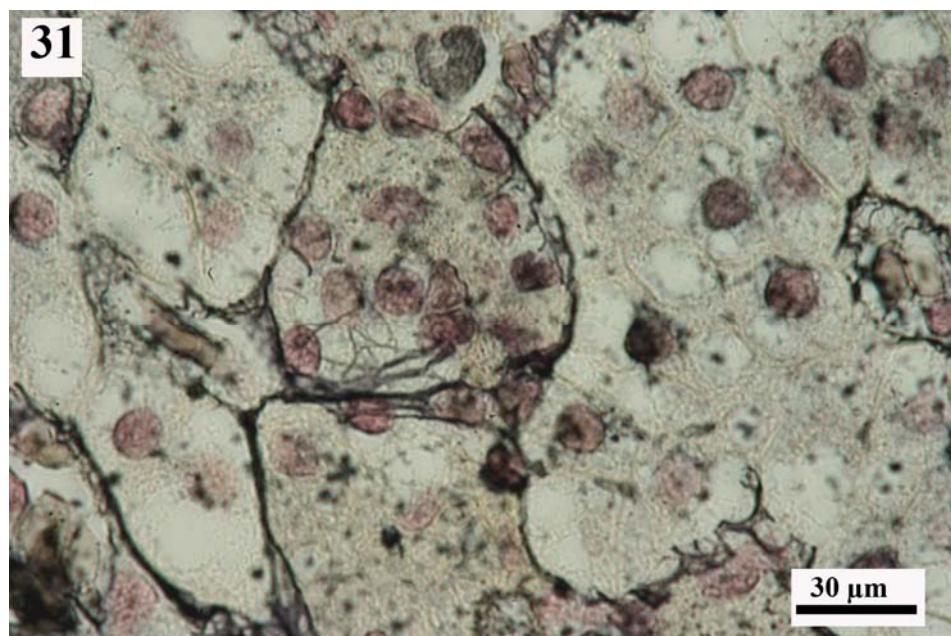
Pri obeh podvrstah močerila se najpogosteje pojavljajo **eozinofilni granulociti** in **heterofilni granulociti**. Zastopane so tudi posamezne razvojne stopnje, vendar v manjšem številu. Heterofilni granulociti so skoraj v vsakem intersticijskem mestu (sl. 41a). Eozinofilni granulociti običajno oblikujejo svoja intersticijska mesta in številčno prevladujejo, redko so posamičnimi (sl. 41b). Razen že naštetih celic so v intersticiju tudi prekurzorske celice in limfociti. Prekurzorske celice imajo svetla jedra z jedrci (sl. 42). Citoplazma je svetlo bazofilna.

Pri pigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anginus parkelj*) smo razen opisanih celic opazili tudi eritrocitom podobne celice. Vedno so se pojavljale v tesnem stiku s pigmentnimi celicami. Citoplazma je homogena in podobna eritrocitni, lahko pa vključuje številne drobne vakuole in druge vključke (sl. 43a-b).

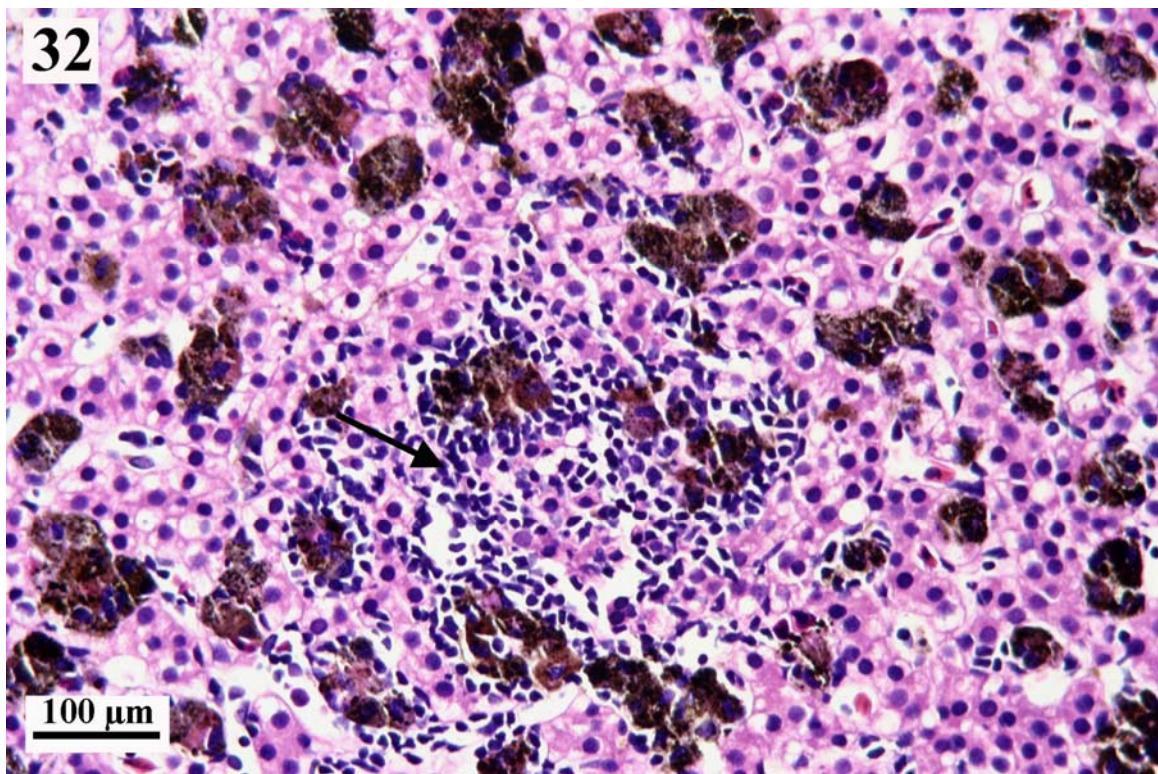
V sinusoidih jeter močerila so maloštevilni eritroblasti (sl. 44). Kromatin v jedru je rahel, jedra so svetlejša od jeder zrelih eritrocitov. Citoplazma je vijolično rdeča.



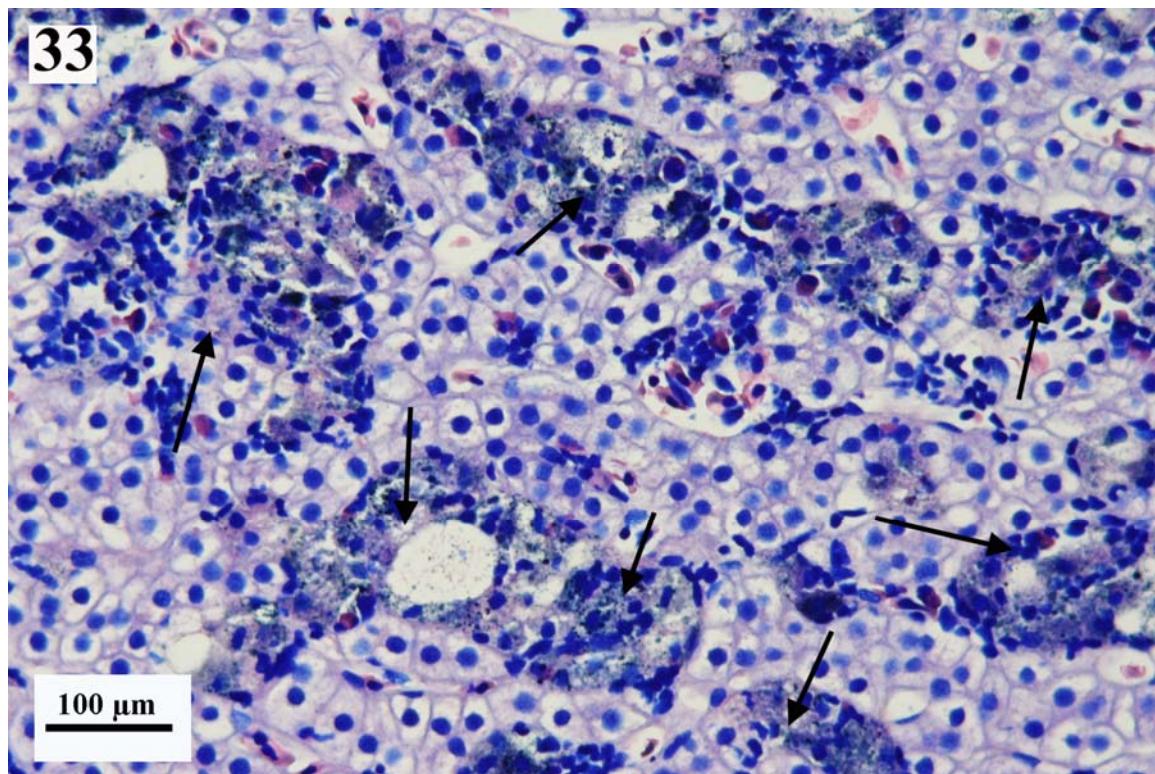
Slika 30: Intersticijsko mesto v jetrih nepigmentrane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Med pigmentnimi celicami so krvne celice. Puščice označujejo zrele granulocitne celice. hp-hepatociti, s-sinusoidi.



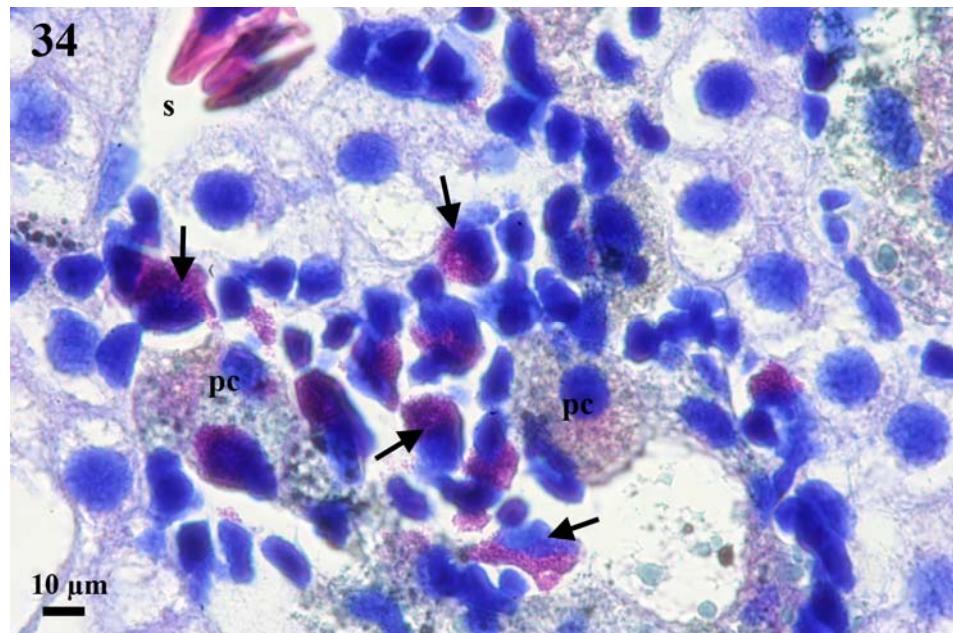
Slika 31: Retikularna vlakna v intersticiju nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Srebrova impregnacija za retikulin. Temno obarvana retikularna vlakna so okoli in v notranjosti intersticijskih mest.



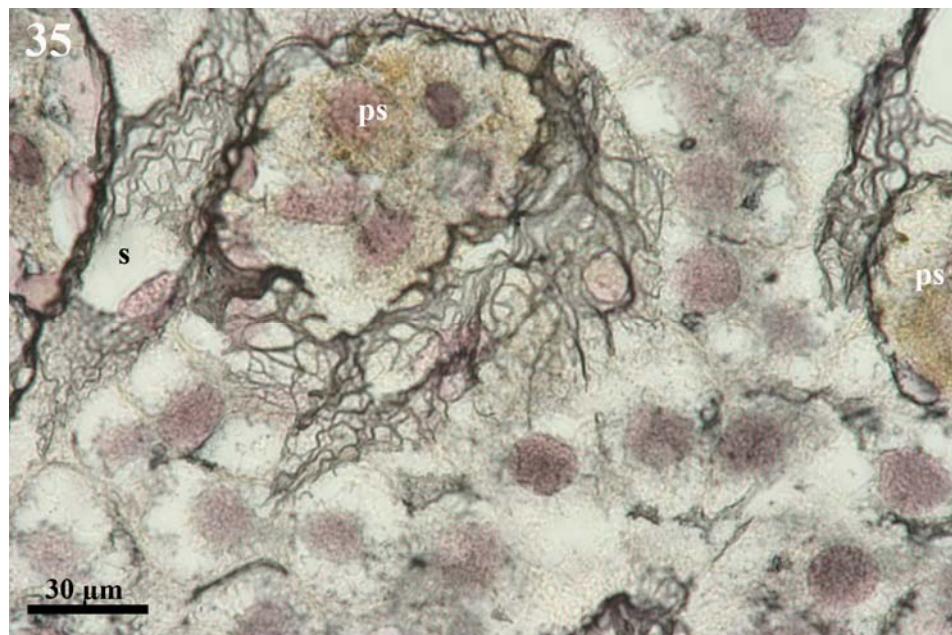
Slika 32: Obsežnejše intersticijsko mesto (→) v jetrih pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Hematoksilin-eozin barvanje.



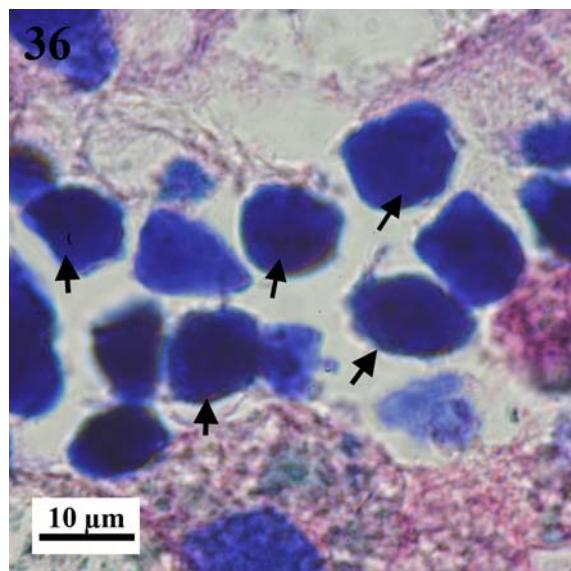
Slika 33: Intersticijska hemopoetska mesta v jetrih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Puščice označujejo pigmentne skupke in številčne krvne celice, ki skupaj tvorijo obsežna intersticijska mesta.



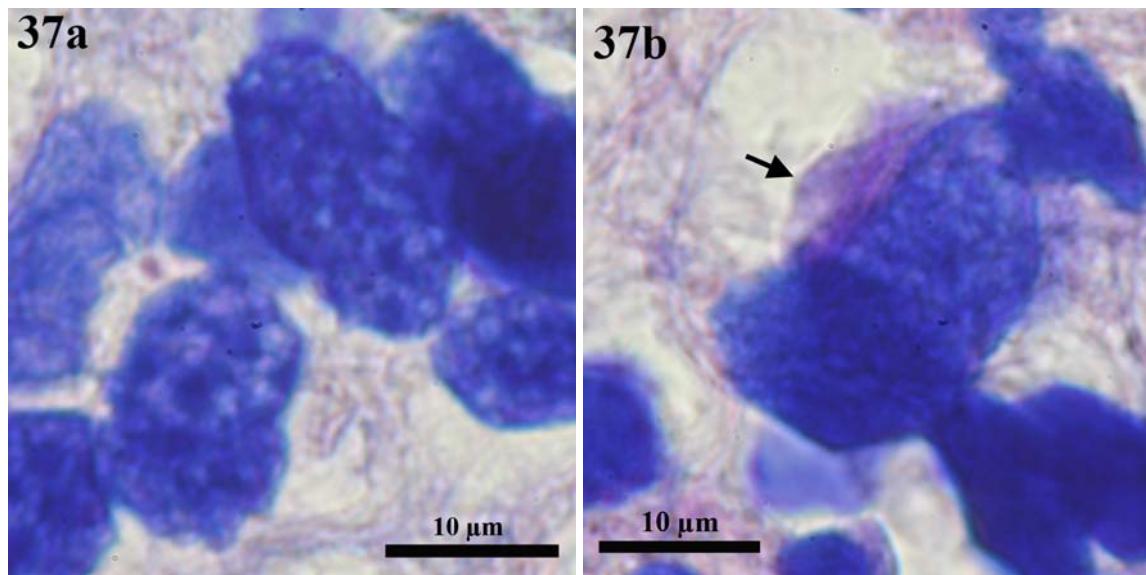
Slika 34: Intersticijsko hemopoetsko mesto pod večjo povečavo v jetrih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Azur-eozin barvanje. Številne limfoidne krvne celice in pigmentne celice (pc) tvorijo obsežnejše intersticijsko mesto. (→) eozinofilni granulociti.



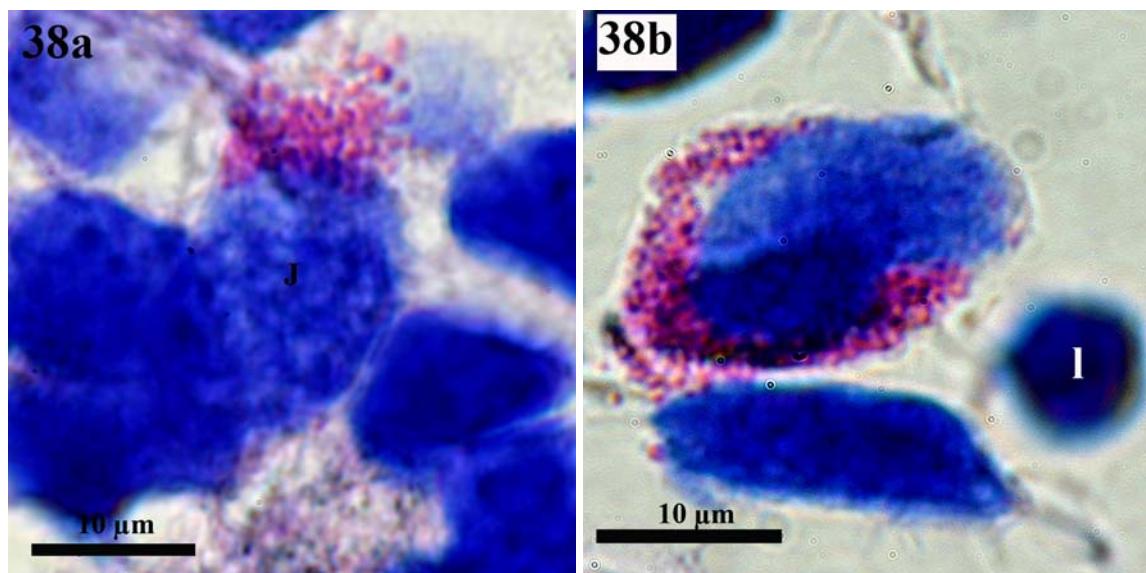
Slika 35: Retikularna vlakna v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Srebrova impregnacija za retikulin. Inficiran osebek P162. Retikularna vlakna so okoli pigmentnih skupkov (ps), raztezajo pa se tudi med hepatocite in okoli sinusoidov (s).



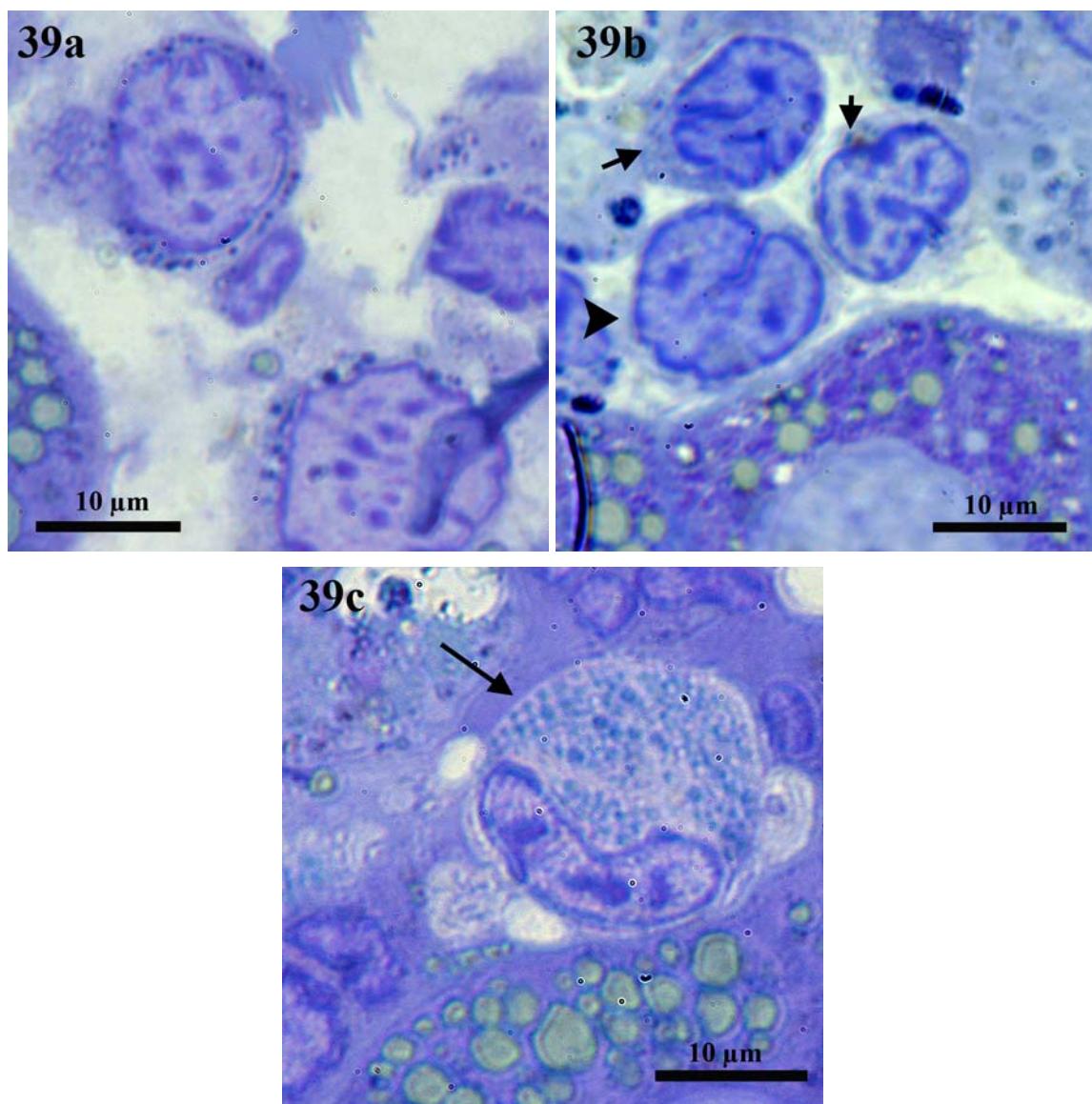
Slika 36: Limfociti (→) intersticija v jetrih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Azur-eozin barvanje. Temno obarvana jedra obdaja le tanka plast svetlo modre citoplazme.



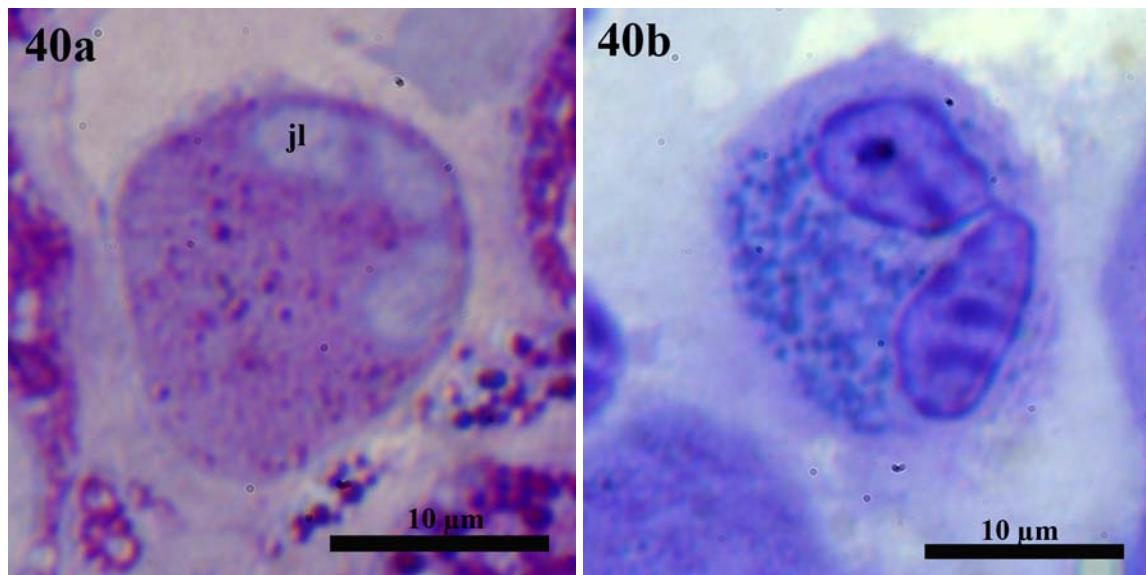
Slika 37a-b: Prekurzorske celice v intersticijskih hemopoetskih mestih nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Azur-eozin barvanje. (a) Jedro prekurzorske celice je veliko, z mrežastim izgledom. Citoplazme je malo in pogosto ni vidna. (b) Puščica označuje svetlo vijolično citoplazmo prekurzorske celice.



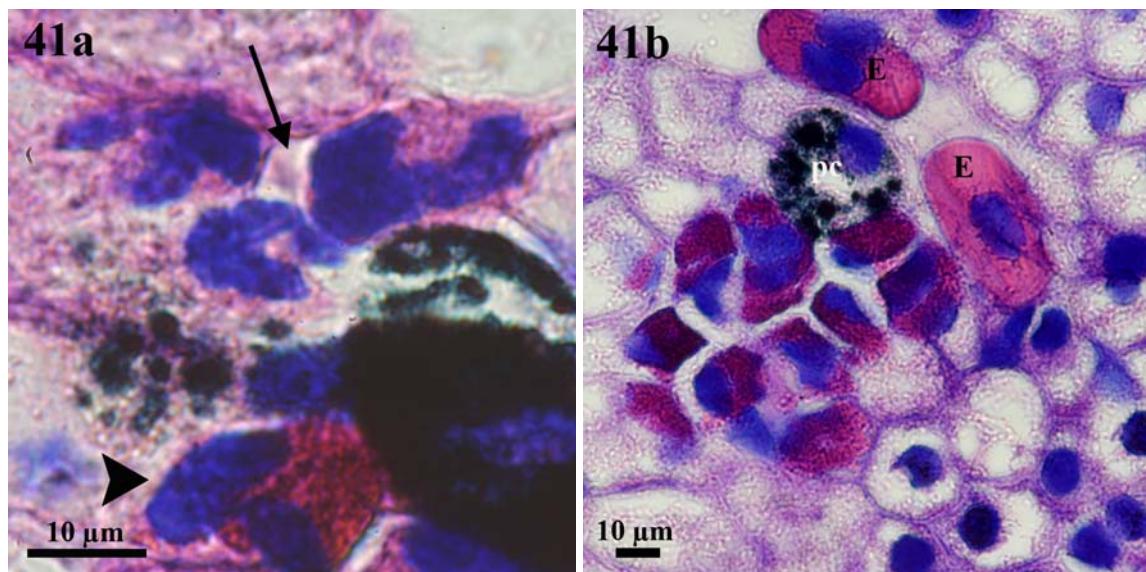
Slika 38a-b: Razvojni fazi eozinofilnih granulocitov v intersticijskih mestih jeter nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Azur-eozin barvanje. (a) Jedro (J) je veliko, ovalno in svetlo obarvano. Granul je v citoplazmi malo. (b) Jedro je rahlo vgreznjeno. Citoplazmo zapolnjujejo številne granule. l-limfocit.



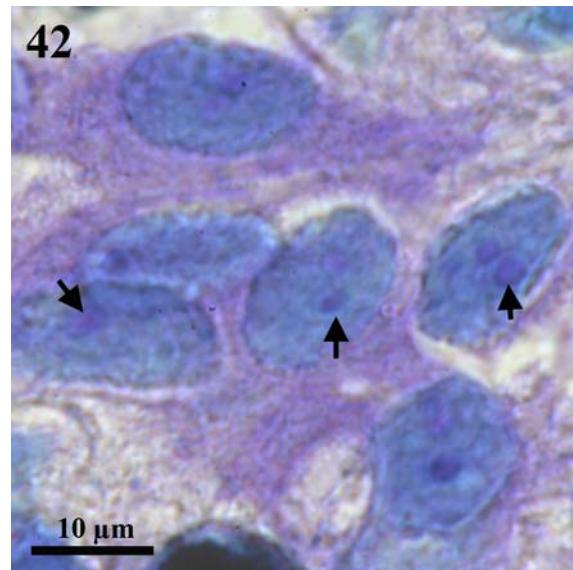
Slika 39a-c: Programulociti v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanke rezine. Barvanje po Richardsonu. (a) in (b) Programulocita z jedrom podobnim limfoidnim celicam. Temnejši kromatin je ob jedrni membrani in v manjših skupkih v notranjosti jedra. V citoplazmi so različno velike in intenzivno obarvane granule. (b) Jedro je mestoma rahlo vgreznjeno in zapolnjuje velik del celice. Kromatin je temnejši ob jedrni membrani in v skupkih v notranjosti jedra. V citoplazmi so pri nekaterih opazne zelo drobne granule (→) ali pa te niso vidne (glava puščice). (c) Eozinofilni programulocit. Jedro je veliko, ledvičasto oblikovano, heterokromatin je ob jedrni membrani in v skupkih v notranjosti jedra. Citoplazmo zapolnjujejo večje in manjše granule različnih intenzitet obarvanosti.



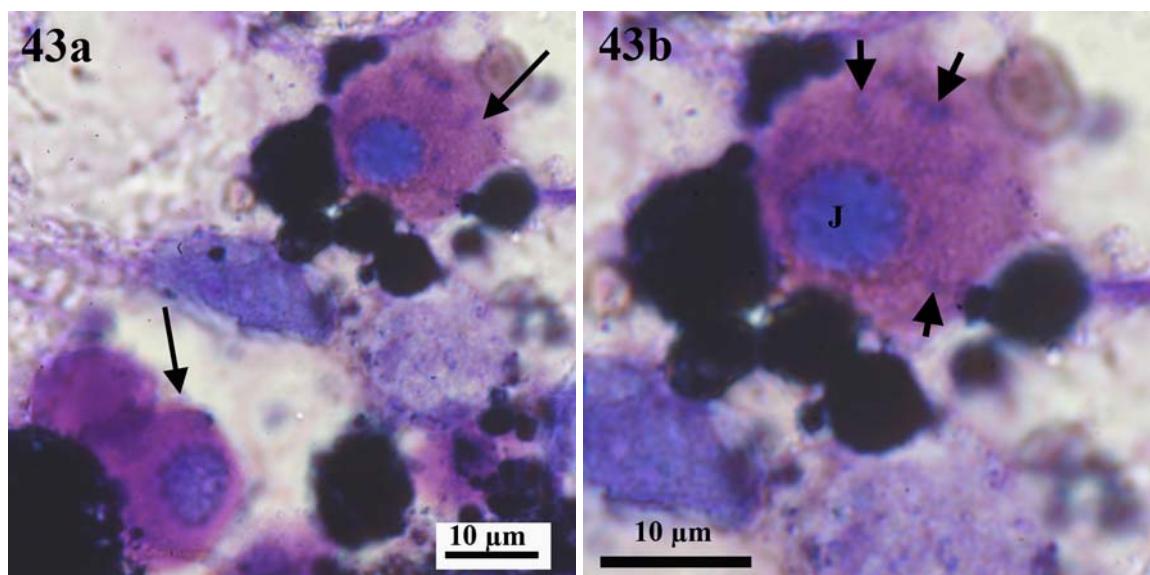
Slika 40a-b: Zrela granulocita v intersticiju jeter nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanki rezini. (a) Heterofilni granulocit. Jedro je deljeno v lobule (jl), citoplazmo zapolnjujejo drobne granule okroglih in podolgovatih oblik. Barvanje z modificiranim May-Grunwald barvilom. (b) Eozinofilni granulocit. Jedro je deljeno v dva lobula, s temnejšimi skupki kromatina. V citoplazmi prevladujejo večje granule, manjših je manj. Granule so dokaj homogeno obarvane. Barvanje po Richardsonu.



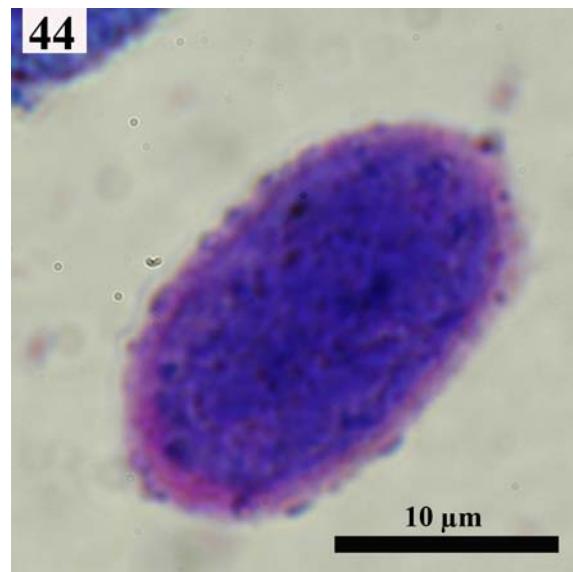
Slika 41a-b: Granulociti v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Azur-eozin barvanje. (a) Heterofilni granulociti (→). Jedra so podkvasta. ►zreli eozinofilni granulocit z jedrom deljenim v dva lobula. (b) Skupek eozinofilnih granulocitov ob pigmentni celici (pc). E-eritrocita v sinusoidu.



Slika 42: Prekurzorske celice v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*).  
Barvanje Azur-eozin. Skupina prekurzorskih celic s svetlo obarvanimi jedri in temnimi jedrci (→).  
Citoplazma je svetlo vijolična.



Slika 43a-b: Eritroidne celice v intersticiju jeter pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*).  
Azur-eozin barvanje. (a) Eritrocitom podobne celice (→) so ob pigmentnih skupkih. (b) V citoplazmi  
eritroidne celice so vidne številne vakuole in modro obarvani vključki (→).

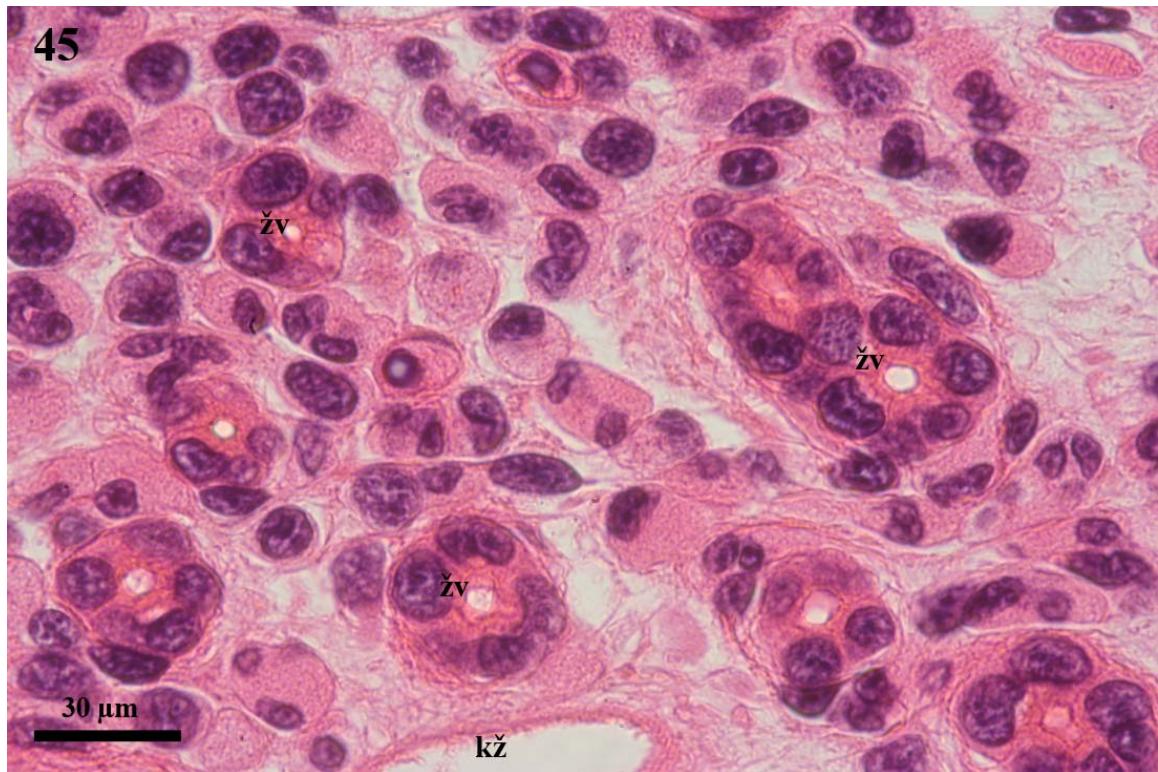


Slika 44: Eritroblast v sinusoidu jeter pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Azur-eozin barvanje. Jedro je veliko, ovalno, citoplazme je malo in je že rahlo eozinofilna.

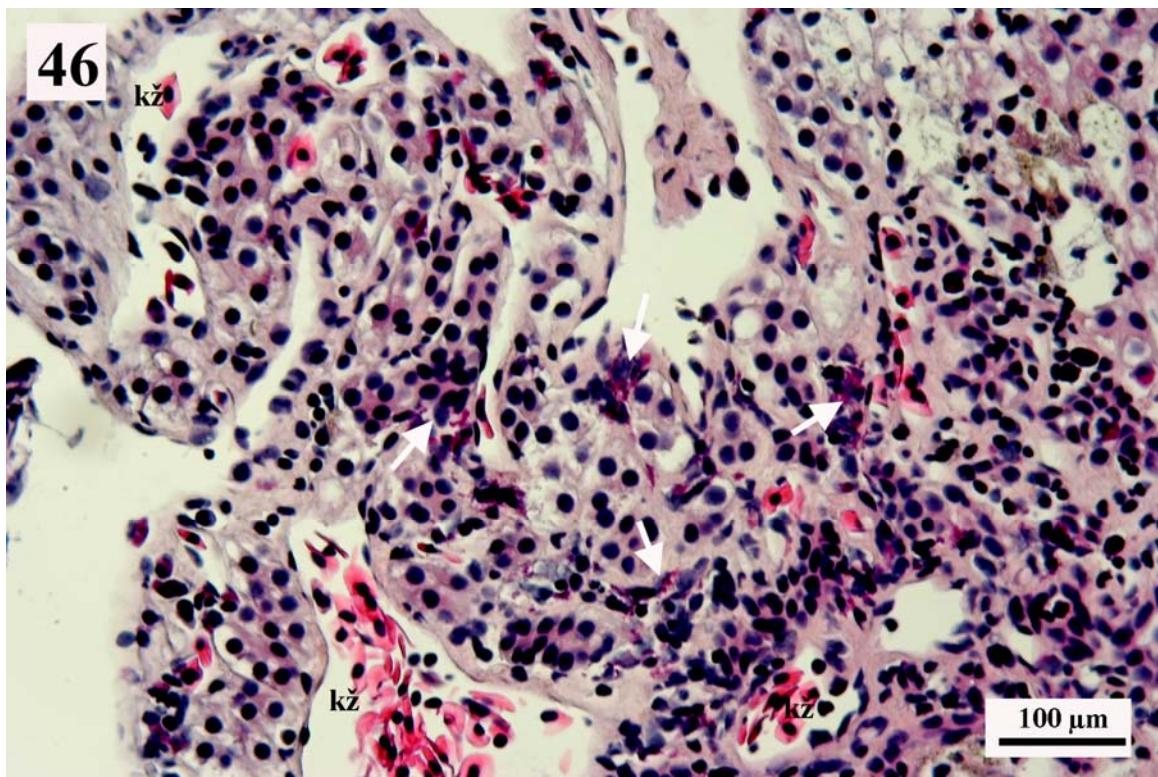
### 3.3.3 Perivaskularna mesta v jetrih obeh podvrst močerila

Pri nepigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so perivaskularna mesta obsežna. Celice so po videzu podobne tistim v intersticijskih mestih (sl. 45). Celice z deljenimi in različno oblikovanimi jedri so najverjetneje eozinofilni in heterofilni granulociti. Pri inficiranem osebku nepigmentirane podvrste močerila (P162) je večja koncentracija limfoidnih celic, kar je značilno tudi za intersticij istega osebka. Skupek limfoidnih celic se razporeja od roba jeter, kjer je večja koncentracija žil, proti notranjosti parenhima (sl. 46). Eozinofilni granulociti in limfoidne celice so tudi ob vezivu in v samem vezivu žil v notranjosti parenhima.

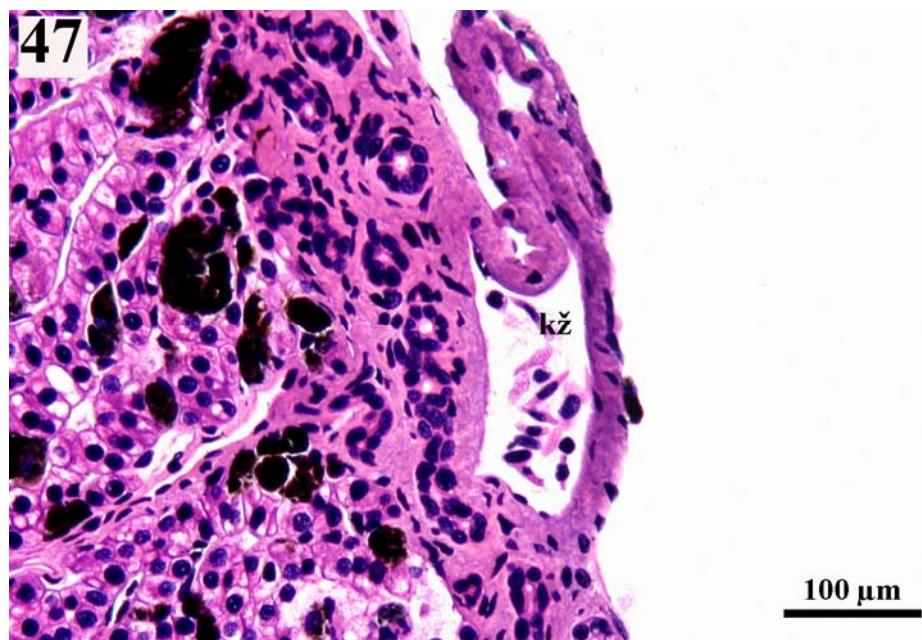
Pri pigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus parkelj*) perivaskularna mesta niso izrazita. Na območju vstopa večjih žil v jetra in v vezivu, ki se razrašča v notranjost parenhima, nismo opazili večjih akumulacij krvnih celic (sl. 47).



Slika 45: Robni del jeter s perivaskularnimi mesti nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Ob vezivu žolčnih vodov (žv) in krvnih žil (kž) je veliko krvnih celic.



Slika 46: Robni del jeter s perivaskularnimi mestami. Nepigmentirana podvrsta močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Inficiran osebek P162. Hematoksilin-eozin barvanje. Vidna so jedra (modra) limfoidnih celic in eozinofilni granulociti (bele puščice). kž, žila z eritrociti.



Slika 47: Robni del jeter s perivaskularnim mestom. Pigmentirana podvrsta močerila (*Proteus anguinus parkeli*). Hematoksilin-eozin barvanje. Ob žili (kž) in žolčnih vodih so le manjši skupki krvnih celic.

### 3.3.4 Perihepatično mesto v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*)

Pod mezotelom je različno debela vezivna kapsula. Tik pod njo je **perihepatična plast**(sl. 48), ki je ponekod prekinjena.

Med anteriornim in posteriornim delom jeter nismo opazili velikih odstopanj v obsežnosti perihepatičnega tkiva. So pa razlike v obsežnosti perihepatičnega mesta med posameznimi osebkami. Pri osebkah z endoparaziti in pri inficiranem osebku (N31) je perihepatično mesto obširno, debeline do 6 plasti celic, prav tako se razteza globlje v parenhim (sl. 49). Pri ostalih osebkah je perihepatično mesto tanjše, debeline do 2 plasti celic ali le iz posameznih celice.

Celice perihepatičnega mesta so v neposredni bližini sinusoidov in krvnih žil v jaternem parenhimu (sl. 48 in 49). V perihepatičnem tkivu so pogoste posamezne pigmentne celice, kot tudi skupki pigmentnih celic.

#### 3.3.4.1 Tipi krvnih celic perihepatične plasti

V perihepatičnem mestu jeter pisanega nektura so različni tipi krvnih celic, vse od nezrelih razvojnih stopenj do zrelih krvnih celic. Obsežna perihepatična mesta so podobna intertubularnim mestom v ledvicah pisanega nektura (sl. 18, 20), z razliko, da je v intertubularnih mestih ledvic veliko celic v stopnjah mitoze, medtem ko je mitotskih celic v perihepatičnem tkivu malo (sl. 50).

Zaradi slabšega barvanja jetrnega tkiva pisanega nektura z diferencialnimi barvili smo tipe krvnih celic določili na histoloških rezinah barvanih s hematoksilin-eozin barvilom in na poltankih rezinah.

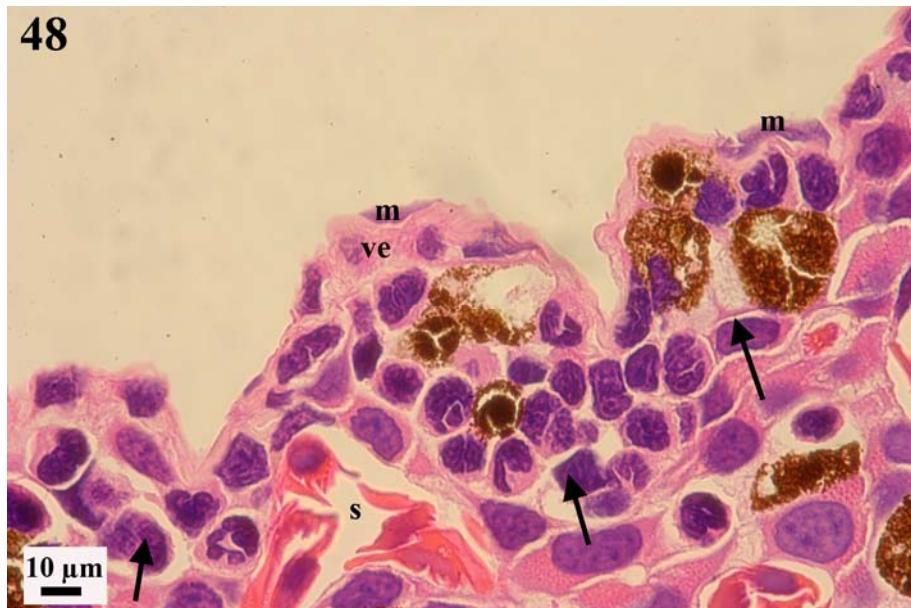
Na histoloških preparatih so najštevilčnejše celice heterofilni granulociti. Njihova jedra imajo »svaljkast« izgled, ki je najverjetneje posledica razporeditve kromatina. Jedra so bodisi ovalna ali različno globoko vgrezljena (sl. 51). Celice so različno velike, od 10 µm do 20 µm. Citoplazma je različno obsežna in se s hematoksilin-eozinskim barvanjem obarva roza do rdeče. Granule niso vidne.

Na poltankih rezinah smo uspeli določiti programulocitne celice. Celice z ovalnim, rahlo vgreznenim jedrom so zgodnejši **heterofilni programulociti** (sl. 52). Kromatin je v skupkih, ki so svetlejši od kromatina zrelejših heterofilnih programulocitov (sl. 52). V citoplazmi so drobne, komaj opazne granule.

Celice z različno vgreznenim, podkvastim jedrom so zrelejši **heterofilni programulociti** (sl. 52). V jedru je heterokromatin ob jedrni membrani in v skupkih znotraj jedra.

Citoplazmo zapolnjujejo drobne granule. Nekatere celice so lahko zreli heterofilni granulociti.

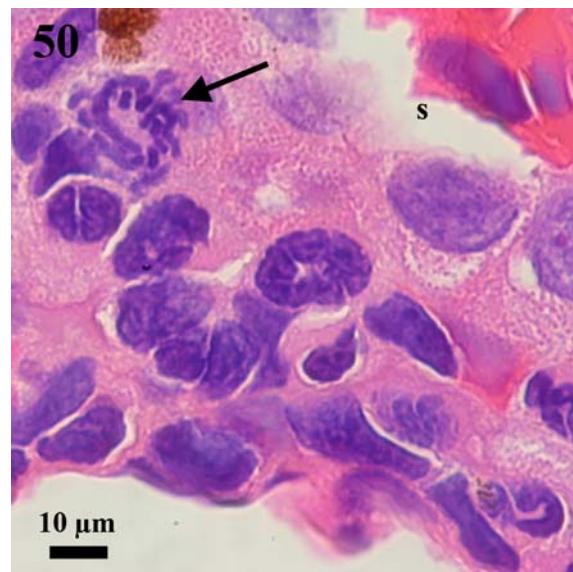
Eozinofilni granulociti v perihepatičnem tkivu jeter pisanega nektura so redki.



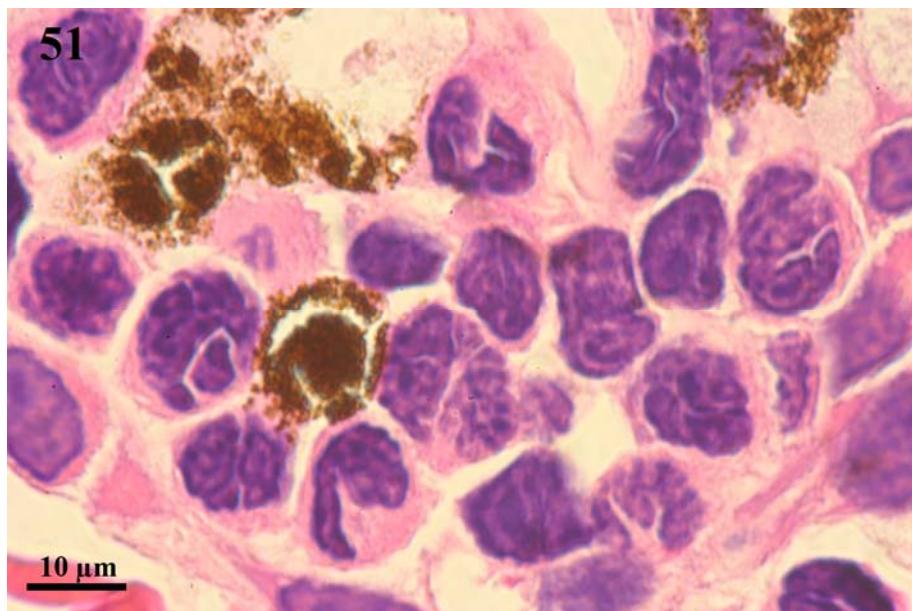
Slika 48: Perihepatična plast v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Inficiran osebek N31. Hematoksilin-eozin barvanje. Pod celicami mezotela (m) in vezivno kapsulo (ve) leži perihepatična plast (→), ki je na meji s parenhimom v stiku s sinusoidom (s).



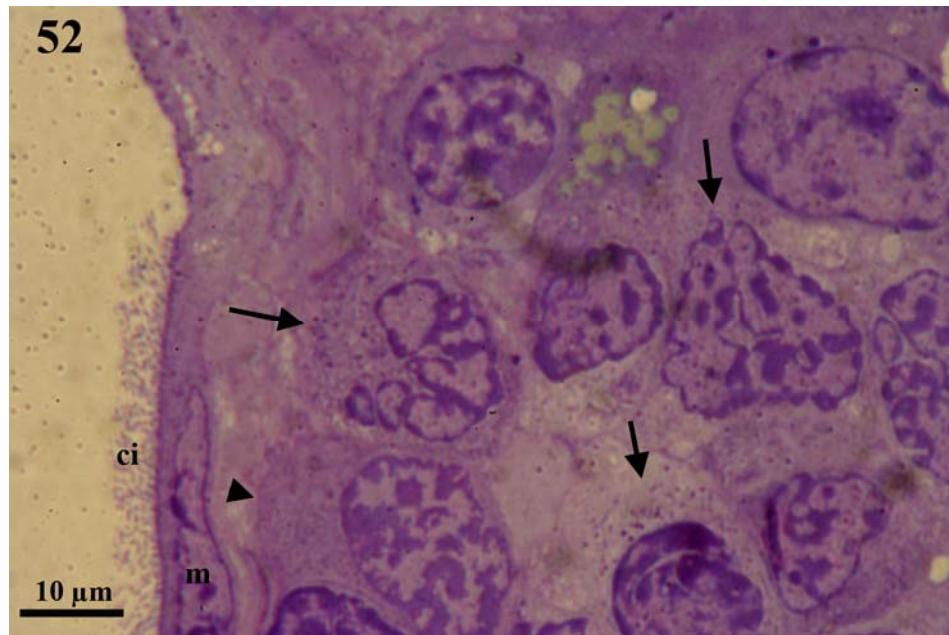
Slika 49: Obsežnejše mesto perihepatične plasti v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Inficiran osebek N31. Hematoksilin-eozin barvanje. Pod mezotelnimi jedri (m) in vezivno kapsulo (→) je v jetrih inficiranega osebka plast debela tudi do 6 slojev celic. Od parenhima je perihepatična plast ločena z vezivom (ve). krvne žile (kž).



Slika 50: Deleča se celica (→) v perihepatičnem tkivu pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Inficiran osebek N31. Hematoksilin-eozin barvanje. s-sinusoid.



Slika 51: Heterofilni granulociti v perihepatičnem tkivu pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Povečan izsek slike 48. Inficiran osebek N31. Hematoksilin-eozin barvanje.



Slika 52: Perihepatično tkivo v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Poltanka rezina. Barvanje s toluidinskim modrilom. Pod mezotelom (m), ki je pri samičkah mestoma ciliaren (ci), in vezivno kapsulo so vidna jedra različnih tipov celic perihepatičnega tkiva. Puščice označujejo heterofilne programulocite z različno oblikovanim jedrom in temnejšim kromatinom ob jedrnem ovoju in v skupkih v notranjosti jedra. V citoplazmi so vidne granule. Glava puščice označuje zgodnjo stopnjo heterofilnega programulocita. Jedro je ovalne oblike in s svetlejšim kromatinom. V citoplazmi so komaj opazne in zelo drobne granule.

### 3.3.5 Intersticijska mesta v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*)

Intersticijska mesta krvnih celic so med hepatičnimi ploščami in običajno mejijo na sinusoid (sl. 53). Krvne celice so pogosto med pigmentnimi celicami, ki so posamično ali v skupkih.

Tudi pri intersticijskih mestih smo opazili večja odstopanja med osebki. Osebek z obsežnejšim perihepatičnim tkivom, ki je bil inficiran, je imel ponekod tudi obsežnejša intersticijska mesta, ki so po obsežnosti zelo podobna mestom pri nepigmentirani podvrsti močerila (sl. 54b). Taka mesta imajo tudi več pigmentnih celic, izgled samih mest pa je zelo podoben perihepatičnemu tkivu in intertubularnim mestom v ledvicah. Pri drugih osebkih so mesta manj obsežna (količina krvnih celic je manjša), z le nekaj pigmentnimi celicami (sl. 54a).

#### 3.3.5.1 Tipi krvnih celic v intersticiju

Krvne celice v intersticiju jeter so podobne krvnim celicam v ledvicah pisanega nektura. Določili smo **heterofilne in eozinofilne programulocite, zrele heterofilne in eozinofilne granulocite** ter agranulirane celice: prekurzorje in limfocite.

**Heterofilni granulociti** so najpogostejša oblika celic intersticija. Njihova jedra so zelo raznolikih oblik, bodisi lobulirana, različno globoko vgreznjena, ali zavita (sl. 55). Na hematoksilin-eozinskih histoloških preparatih so prav tako kot v perihepatičnem tkivu jedra videti »svaljkasta«. Te celice so v različnih razvojnih stopnjah.

**Heterofilni programulociti** (proHG) imajo v začetnih stopnjah jedra, ki so okrogla do ledvičasto oblikovana (sl. 56a). Jedro je obsežno. Citoplazme je malo in je pri barvanju z azur-eozinskim barvilm bazofilna. Jedra poznejših stopenj **heterofilnih programulocitov** (proHG) so izrazito vgreznjena in »kolačasto« ali podkvasto oblikovana (sl. 56b, c). Citoplazma je luknjičastega izgleda, z drobnimi rdečimi in vijoličnimi granulami. Barva same citoplazme pa se spremeni iz svetlejšo vijolične v vijolično-roza.

**Zreli heterofilni granulociti** imajo lobulirana jedra, pomaknjena ob rob citoplazme (sl. 57). Temnejše obarvani heterokromatin je nakopičen ob jedrni membrani in v večjih skupkih v notranjosti jedra. Število lobulov je med 2 in 7. Pri hematoksilin-eozinskem barvilu v roza do rdečasti citoplazmi granule niso razločne. Na poltankih rezinah drobne granule heterofilnih granulocitov večkrat niso opazne (sl. 58).

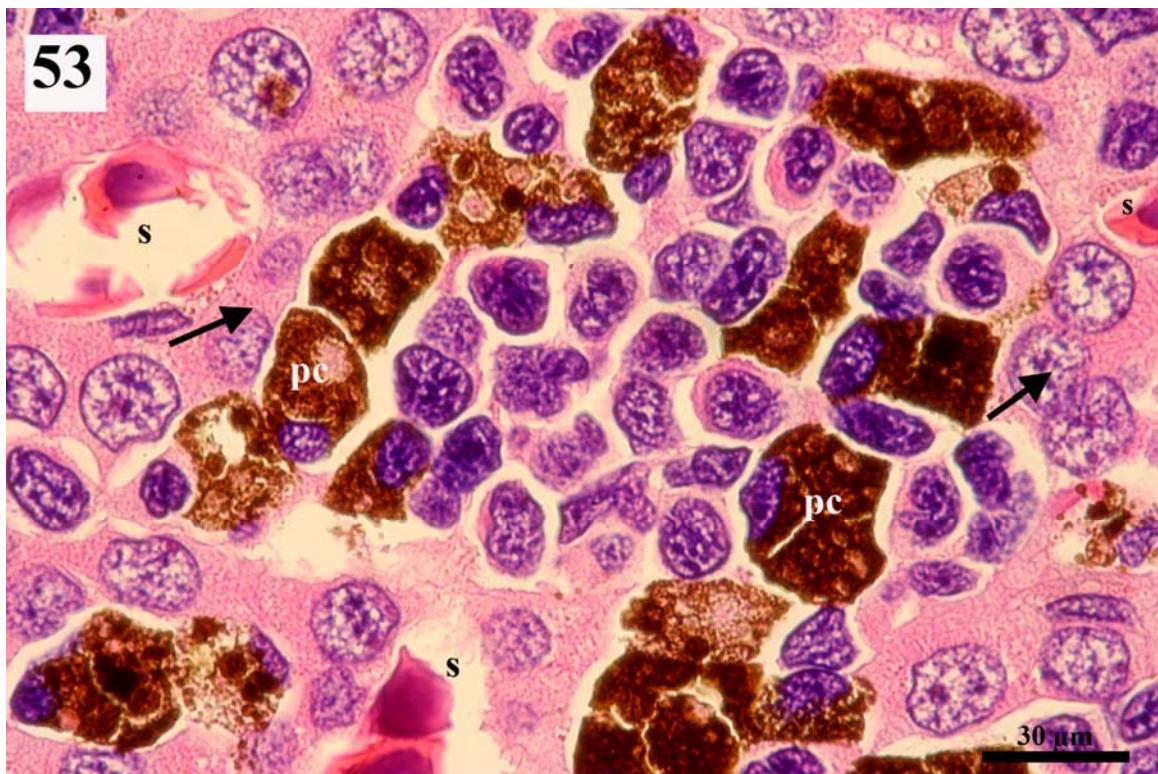
Manj pogoste so celice, ki imajo s hematoksilin-eozinskem barvanjem večje, eozinofilne granule kot heterofilni granulociti, citoplazma pa je intenzivneje obarvana rdeče. To so eozinofilni granulociti. Zgodnejše faze **eozinofilnih programulocitov** imajo bodisi

okroglo, ledvičasto oblikovano ali podolgovato in vgrezljeno jedro, ki zapolnjuje velik del citoplazme (sl. 59a, b). V jedru so na poltankih rezinah vidna manjša jederca (sl. 60). Temnejšega kromatina je ob jedrni membrani malo. Citoplazma se z diferencialnimi barvili obarva purpurno. V citoplazmi je v začetnih stopnjah zoritve malo granul. Število se z dozorevanjem poveča.

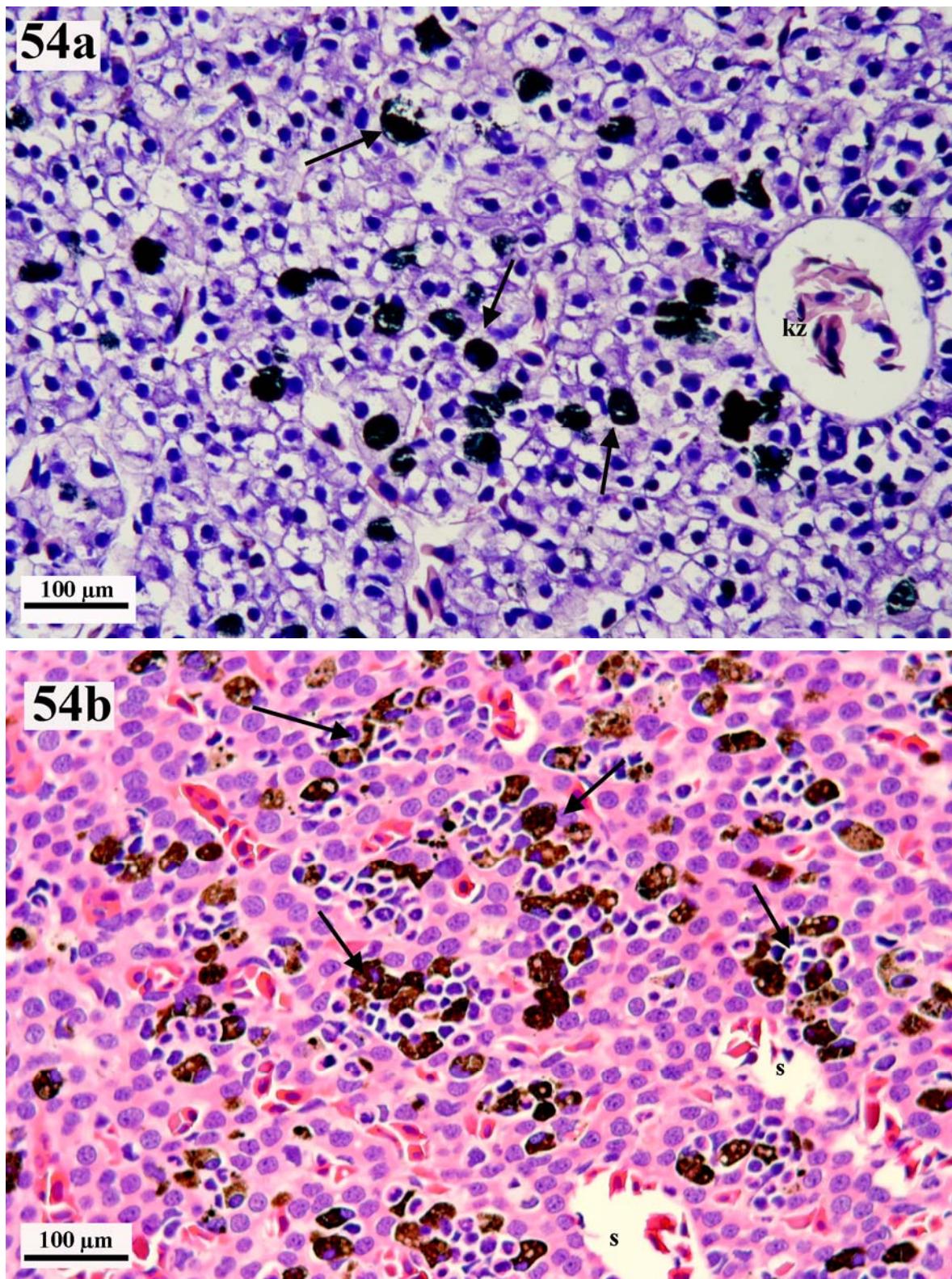
**Zreli eozinofilni granulociti** so celice z lobuliranim in manjšim acentričnim jedrom (sl. 61). Ob jedrnem ovoju je več temnejšega kromatina, nahaja pa se tudi v skupkih znotraj samega jedra (sl. 58). Citoplazmo zapolnjujejo granule, ki so različno velike ter različno intenzivno obarvane.

Pogoste so celične delitve krvnih celic intersticija, manjštevilne pa tudi v sinusoidih (sl. 62a, b). Celic v fazah delitve nismo določili.

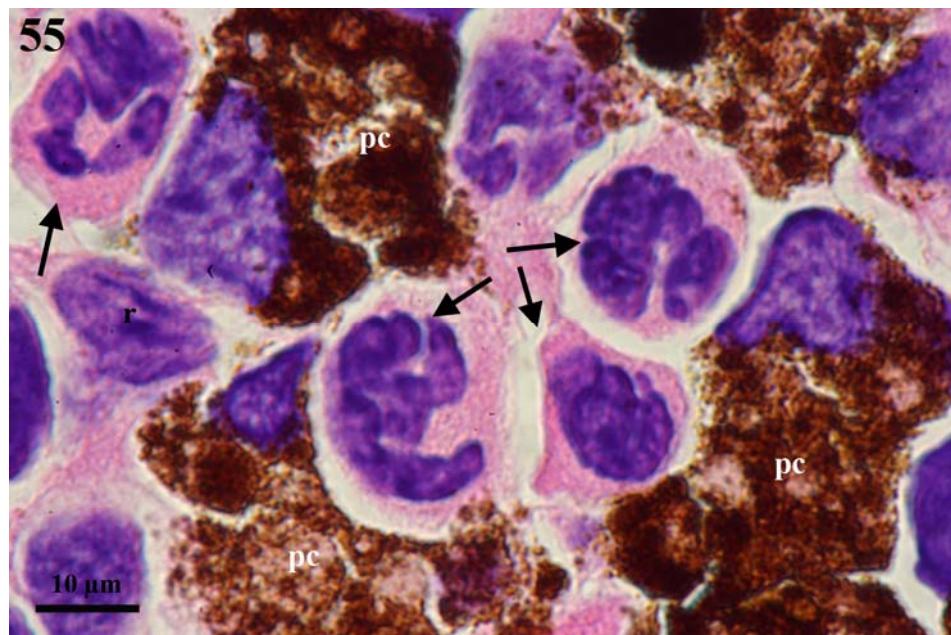
Kot v perihepatičnem tkivu smo tudi v intersticiju jeter velkokrat opazili velike, agranulirane celice (sl. 63), ki so zelo podobne prekurzorskim celicam v ledvicah. Največkrat se **prekurzorske celice** pojavljajo posamič, redkeje v večjih skupinah. Jedro prekurzorskih celic je okroglasto, včasih bolj podolgovato. Zaradi rahlega kromatina, ki tvori skupke in daje jedru mrežast videz, so jedra velkokrat svetlejša od ostalih celic. Na poltankih rezinah so v jedru manjši skupki heterokromatina, ki jih od jederc ne moremo ločiti (sl. 58). Citoplazma je lahko različno obilna, razlikuje pa se tudi v intenzivnosti bazofilije in kompaktnosti. Velkokrat je na prerezih citoplazma zaradi krhkosti poškodovana.



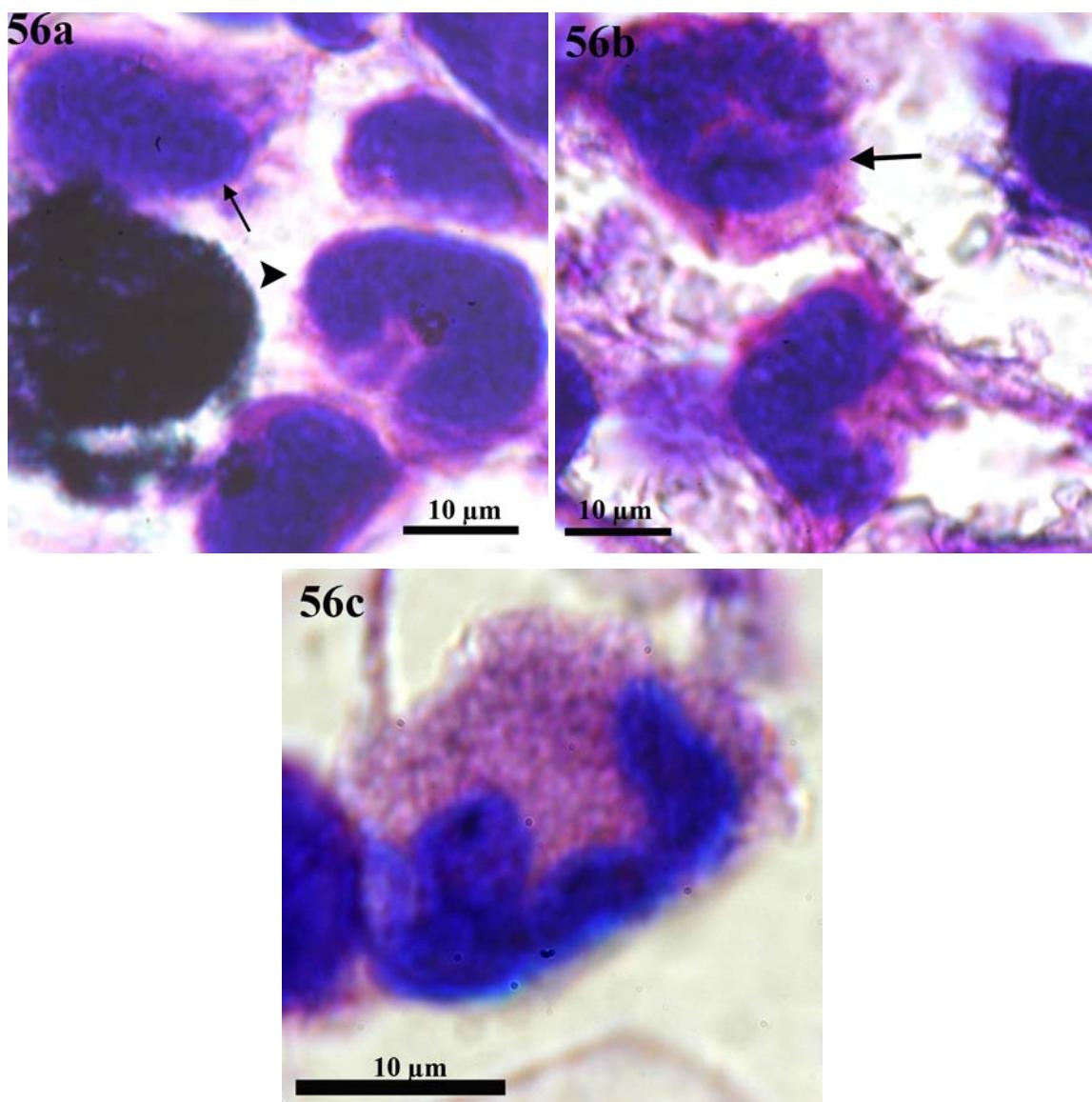
Slika 53: Intersticijsko mesto v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Inficiran osebek N31. Hematoksilin-eozin barvanje. Hepatociti (→) obkrožajo intersticijsko mesto, ki ga ločujejo od sinusoidov (s). pc-pigmentne celice.



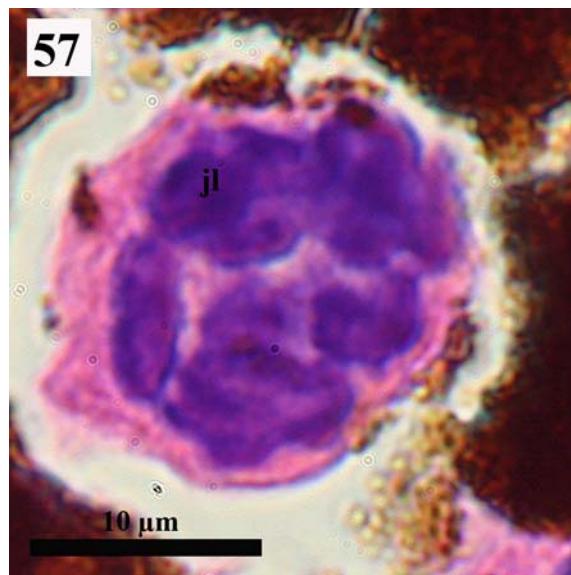
Slika 54a-b: Intersticijska mesta (→) v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). (a) Hematoksilin-eozin barvanje. (b) Azur-eozin barvanje. Pri inficiranem osebku N31 so intersticijska mesta obsežnejša (sl. b).



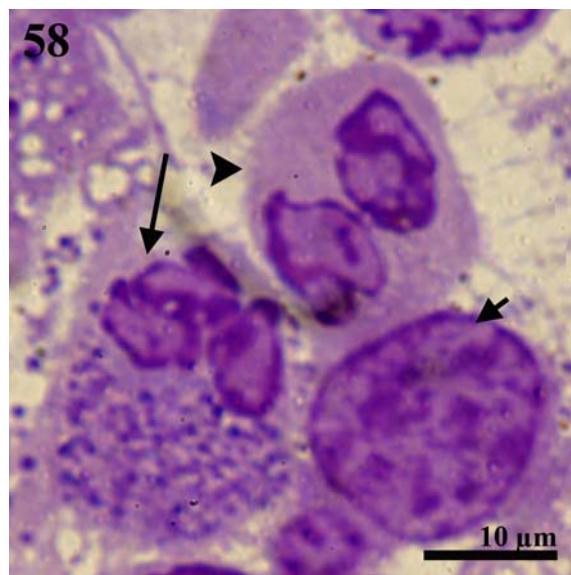
Slika 55: Heterofilni granulociti v intersticiju pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Puščice nakazujejo heterofilne granulocite z različno oblikovanim jedrom in »svaljkastim« izgledom. r-jedro retikularne celice, pc-pigmentne celice.



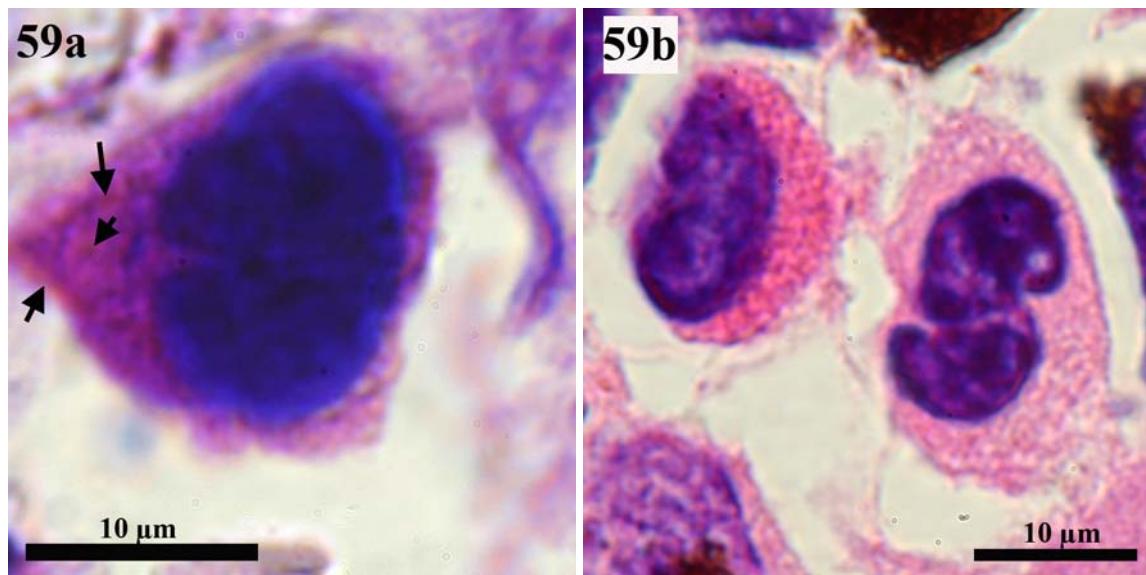
Slika 56a-c: Heterofilni programulociti v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Azur-eozin barvanje. **(a)** Zgodnejši heterofilni programulocit (→) ima centralno nameščeno jedro, ki zajema večji del citoplazme. (►) heterofilni programulocit z vgreznjениm jedrom. **(b)** Kolačasto oblikovano jedro (►) je značilnost poznejših heterofilnih programulocitov. Spodaj je zgodnejša stopnja heterofilnega programulocita. **(c)** Poznejši heterofilni programulocit pod večjo povečavo. Jedro je acentrično, globoko vgrezljeno, podkvasto. V vijolični, vakuolizirani citoplazmi so drobne vijolične in temno rdeče granule.



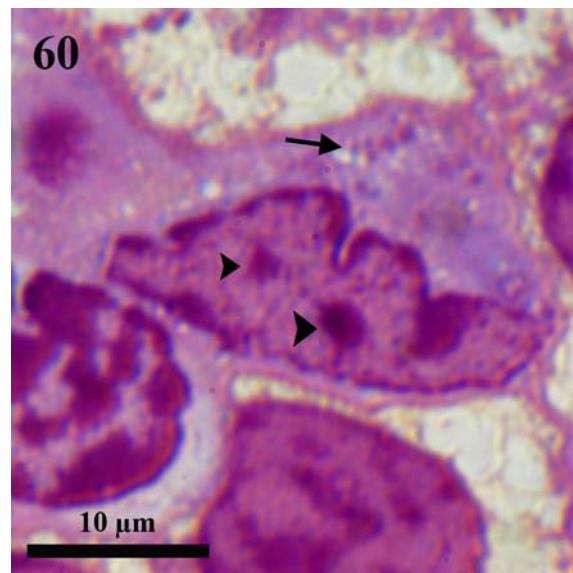
Slika 57: Zrel heterofilni granulocit v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Jedro je razdeljeno na veliko lobulov. Citoplazma je rdečasto obarvana, granule niso razločne.



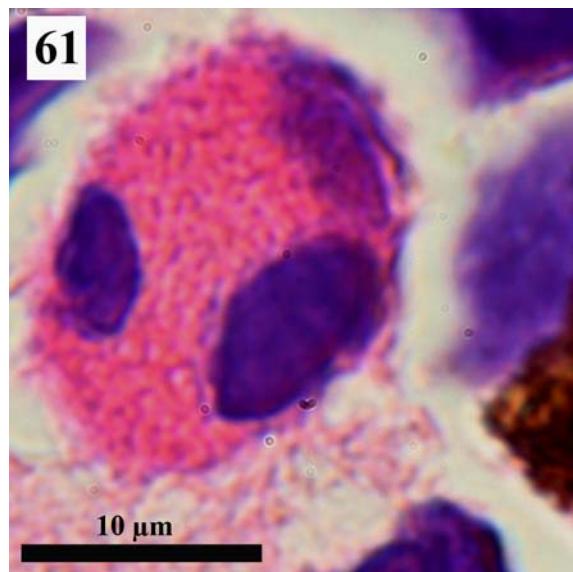
Slika 58: Različna tipa granulocitov v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Poltanka rezina. Barvanje z toluidinskim modrilom. Odrasel eozinofilni granulocit (→) ima acentrično in na tri lobule razdeljeno jedro. Heterokromatin je ob jedrni ovojnici in v skupkih znotraj jedra. Citoplazmo zapolnjujejo velike granule. (►) označuje odrasli heterofilni granulocit. Granule niso vidne. Jedro je deljeno v dva lobula. Krajsa puščica označuje limfoidno celico, najverjetneje prekurzorsko celico. Jedro je okroglo, heterokromatin je razporejen po celotnem jedru v manjše skupke. Citoplazme je malo.



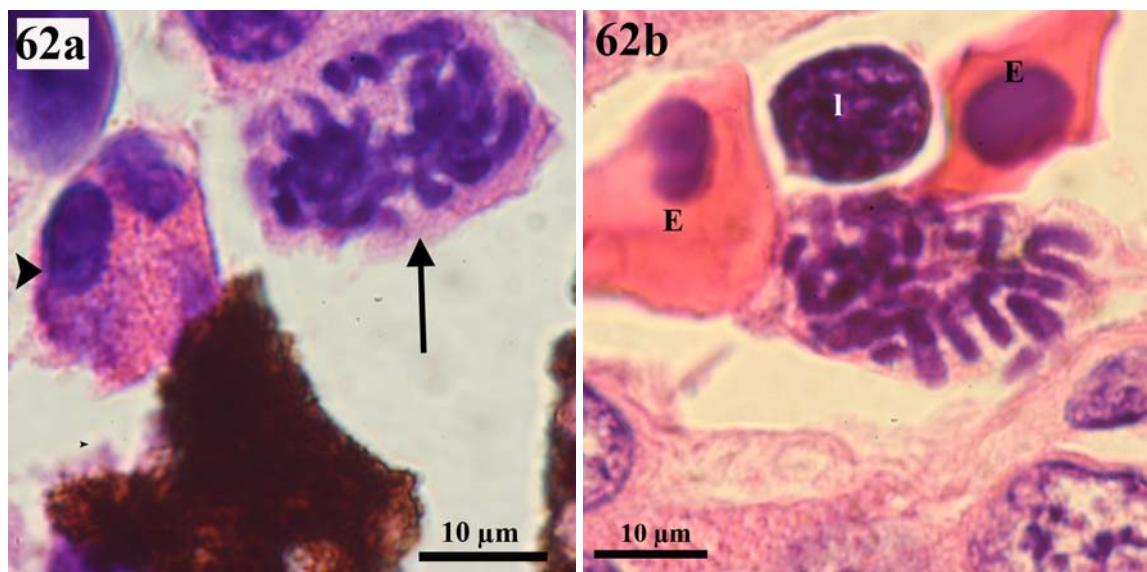
Slika 59a-b: Zgodnji stopnji eozinofilnih programulocitov v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). (a) Jedro je okroglo in zajema večji del purpurno obarvane citoplazme, v kateri je malo rdečih granul (→). Azur-eozin barvanje. (b) Levo zgoraj je celica zgodnjega eozinofilnega programulocita. Jedro je acentrično, ledvičasto oblikovano. Citoplazmo zapolnjujejo rdeče granule. Desno je heterofilni granulocit. Hematoksilin-eozin barvanje.



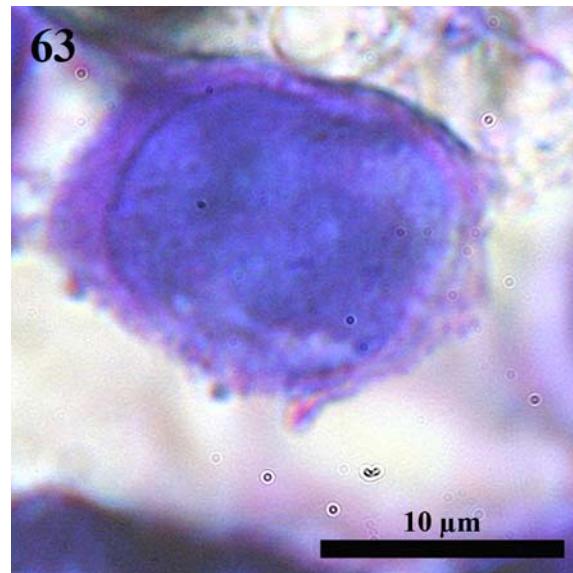
Slika 60: Eozinofilni programulocit v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Poltanka rezina. Barvanje z modificiranim May-Grünwald barvilom. Jedro je ovalno in ponekod rahlo vgreznjeno. V jedru sta jederci (►). Heterokromatin je le v tankem ovoju ob jedrni membrani. Granule (→) so maloštevilne in različnih velikosti.



Slika 61: Zrel eozinofilni granulocit v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje. Jedro celice je majhno in lobulirano, citoplazmo zapolnjujejo številne rdeče granule.



Slika 62a-b: Deleče celice v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje. (a) Deleče celice (→) so pogostejše v intersticijskih mestih. Puščica označuje odrasel eozinofilni granulocit. (b) V redkih primerih so delitve tudi v samih sinusoidih jeter. E-eritrocit, l-limfocit.

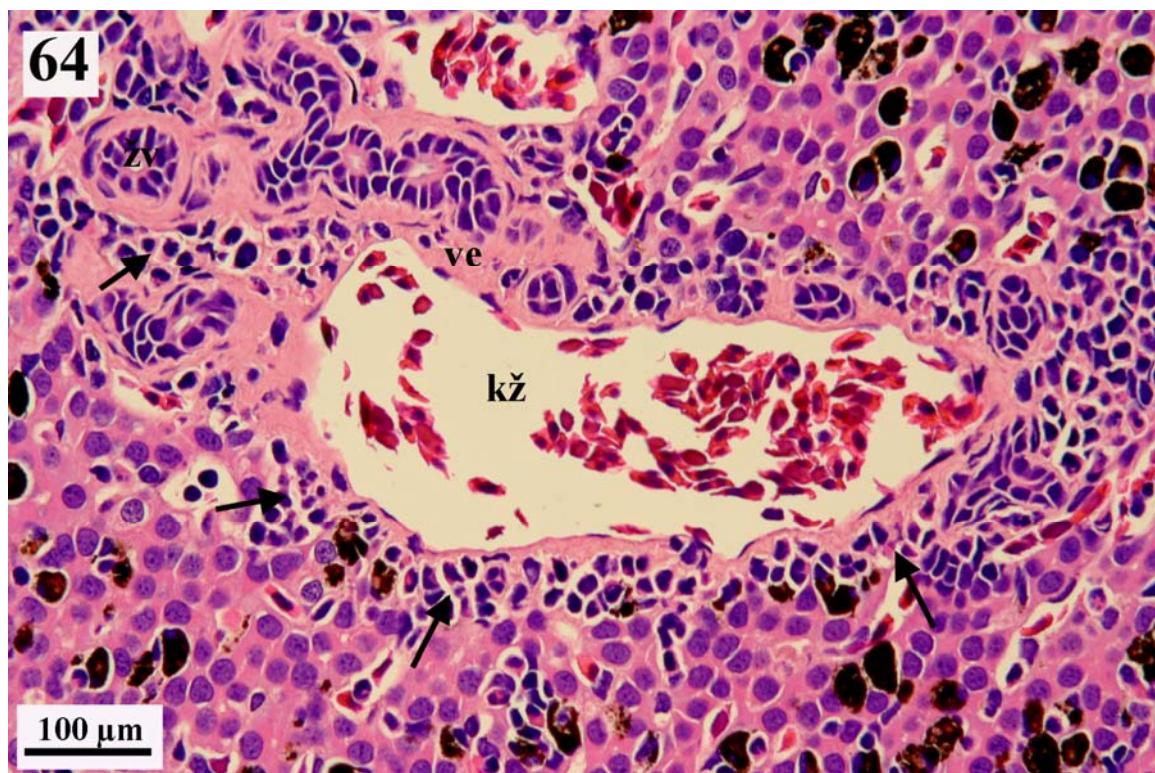


Slika 63: Prekurzorska celica v intersticiju jeter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Azur-eozin barvanje.  
Prekurzorska celica z večjo količino rahle, svetlo vijolične citoplazme in velikim okroglim svetlim jedrom.

### 3.3.6 Perivaskularna mesta v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*)

Perivaskularna mesta so najobširnejša ob vezivu večjih žil in žolčnih vodov, ki vstopajo v jetra (sl. 64). V notranjosti parenhima so perivaskularna mesta obsežnejša le okoli večjih žil, ob manjših žilah so ta mesta manjša.

Celična struktura mest je zelo podobna tisti v intersticiju in perihepatičnem tkivu. Celice perivaskularnih mest so eozinofilni in heterofilni granulociti in njune razvojne stopnje ter prekurzorske celice in limfociti.



Slika 64: Perivaskularno mesto v jetrih pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozin barvanje.  
Perivaskularna mesta (→) na mestih večje koncentracije žolčnih vodov (žv) in žil (kž). ve-vezivo.

## 4 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 4.1 RAZPRAVA

#### 4.1.1 Diferencialno barvanje z barvili Romanowsky-Giemsa

Uporabili smo različna barvila tipa Romanowsky-Giemsa z različnim pH, da bi dobili najbolj ustrezeno barvanje hemopoetskih tkiv pri obeh podvrstah močerila *Proteus anguinus anguinus* in *Proteus anguinus parkelj* ter pisanem nekturu *Necturus maculosus*.

Najboljše rezultate smo pri barvanju ledvic močerilarjev dosegli z modificiranim May-Grünwald barvilm. Pri nepigmentirani in pigmentirani podvrsti močerila se je tkivo ledvic diferencialno obarvalo tudi z Azur-eozin barvanjem. Prav tako sta ti dve barvili ustrezeno barvali jetrno tkivo pigmentirane in nepigmentirane podvrste močerila. Pri pigmentirani podvrsti je bilo sicer barvanje z barvilm May-Grünwald manj uspešno. Pri jetrnem in ledvičnem tkivu pisanega nektura nobeno od uporabljenih diferencialnih barvil ni dalo optimalnih rezultatov. Zadovoljive rezultate smo dobili le z Azur-eozin barvanjem v jetrnem tkivu in z modificiranim May-Grünwaldom v ledvičnem tkivu.

Razlike v uspešnosti barvanja tkiv so najverjetneje posledica postopka priprave tkiva, kot tudi izbire fiksativa. Kiernan (1990) za barvanje hemopoetskih tkiv predlaga Helly fiksativ. V našem primeru so bila tkiva fiksirana v 10% pufranem formalinu ali pa v Carnoy fiksativu. Prav tako so bili nekateri vzorci tkiv dalj časa v fiksativu, predno so bili vklopljeni v paraplast. Za barvanje krvnih celic, še posebno pri barvanju krvnih celic fiksiranega tkiva, je ključen pH raztopin barvila (Kiernan, 1990).

#### 4.1.2 Krvne celice v ledvicah in jetrih močerilarjev

V ledvicah in jetrih močerilarjev (Proteidae) smo določili zrele eozinofilne in heterofilne granulocite ter razvojne stopnje, kot tudi limfocite, prekurzorske celice in eritroblaste v sinusoidih.

##### 4.1.2.1 Zreli eozinofilni granulociti

Celice z dobro vidnimi, kroglastimi ali bolj ovalnimi, rdeče do oranžno-rjavimi granulami, ki bolj ali manj zapolnjujejo citoplazmo, smo uvrstili med zrele eozinofilne granulocite. Citoplazma teh celic je pri močerilu bazofilna, pri pisanem nekturu pa je bolj eozinofila. Jedro ima lahko od dva do štiri lobule. Zreli eozinofilni granulociti se med obema podvrstama močerila ne razlikujejo. Razlike pa so med pisanim nekturom in močerilom. Granule prvih so v obeh organih, barvane z diferencialnimi barvili, videti manjše. Vzrok temu je lahko tehnične narave, izključiti pa ne smemo tudi možnosti, da se eozinofilni granulociti pisanega nektura dejansko razlikujejo od granulocitov močerila.

Jordan (1932) za eozinofilce pri močerilu *Proteus anguinus anguinus* navaja od štiri do pet lobulov jedra. V našem primeru imajo eozinofilci dva do tri jedrne lobule, kar navaja že Mrak (2007) za vranico nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus*. Cambell (1970) pri žabi *Rana pipiens*, Hightower in Haar (1975) pri pupku *Notophthalmus viridescens* in Frank (1989) pri paglavcu žabe *R. esculenta* navajajo bilobulirano jedro, pri drugih vrstah dvoživk pa samo lobulirano (Tooze in Davies, 1968; Meseguer in sod., 1985). Jedro je lahko tudi pravilnih oblik (Spornitz, 1975). Večje število lobulov opisujejo za sleporila vrste *Siphonops annulatus* (Gutierrez in sod., 2008), in sicer od dva do šest lobulov jedra.

Bazofilna citoplazma eozinofilnih granulocitov je značilna za sesalce (Canfield, 1998), ptiče (Canfield, 1998; Campbell, 2004), plazilce (Canfield, 1998; Campbell, 2004; Tosunoğlu in sod., 2004; Alberio in sod., 2005) in ribe (Doggett in sod., 1987; López-Ruiz, 1992; Canfield, 1998). Granule so običajno okrogle, lahko tudi podolgovate, rdeče ali rjavo oranžne tako pri sesalcih (Canfield, 1998; Ross, 2003,) kot pri ptičih (Canfield, 1998; Campbell, 2004), plazilcih (Canfield, 1998; Sevinc in Uğurtaş, 2001; Tonsunoğlu in sod., 2004; Alberio in sod., 2005), dvoživkah (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1968; Turner, 1988; Canfield, 1998; Allender in sod., 2008; Gutierrez in sod., 2008) in ribah (Doggett in sod., 1987; López-Ruiz in sod., 1992; Canfield, 1998). Lahko pa so granule tudi drugačnih oblik in barve (Canfield, 1998; Campbell, 2004). Modre granule imajo eozinofilni granulociti zelenega legvana (Caifield, 1998; Campbell, 2004) in papagajev (Canfield, 1998). Zreli granulociti dvoživk imajo lahko dva različna tipa granul (Hightower in Haar, 1975; Ishizeki, 1980, cit. po Turner, 1988; Gutierrez in sod., 2008). Pri ostalih dvoživkah pa smo v literaturi večinoma zasledili le eno populacijo zrelih granul, ki varirajo v velikosti in obliku, vendar so si podobne po vsebini (Tooze in Davies, 1968; Campbell, 1969; Campbell, 1970; Frank, 1989). Čeprav smo pri močerilu na poltankih rezinah opazili temneje in svetleje obarvane granule, ne moremo potrditi, ali gre za eno ali več različnih populacij granul.

#### 4.1.2.2 Zreli heterofilni granulociti

Velikokrat samo poimenovanje granulocitov temelji na njihovem videzu ne pa tudi na funkciji. Zaradi tega prihaja pri terminologiji granulocitov v literaturi do zmede, saj se morfologija jedra in granul zelo razlikujeta med vrstami znotraj redov in med redovi samimi (Canfield, 1998). Tako kot pri višjih vretenčarjih so tudi pri dvoživkah celice podobne eozinofilcem, bazofilcem in nevtrofilcem (Turner, 1988). Pri slednjih je v literaturi uporabljeno različno poimenovanje. Messeguer in sod.(1990) navajajo, da heterofilci kot polimorfonuklearni levkociti in nevtrofilci označujejo isti tip celice. Vendar Ellis (1977, cit. po López-Ruiz in sod., 1992) uporabo izraza polimorfonuklearni levkocit

za nesesalčje granulocite odsvetuje, saj je ta uporabljen za poimenovanje pri sesalcih in bi ga bilo neprimerno uporabljati pri katerikoli drugi vretenčarski skupini.

Kljub veliki neenotnosti tujih raziskovalcev glede kriterijev za poimenovanje tega tipa granulocitov, smo se odločili za uporabo izraza, ki ga za nesesalčje celice predlaga Canfield (1998). Drugi razlog za uporabo izraza heterofilni granulocit pri močerilarjih pa je barva njihove citoplazme in granule, ki so večinoma vidne že na standardno obdelanih histoloških rezinah. Canfield (1998) granulocite z drobnimi in neopaznimi zrnci pri sesalcih poimenuje nevtrofilni granulociti. Nesesalčje granulocite (Canfield, 1998) in granulocite nekaterih dvoživk (Cambell, 2004, cit. po Allender in sod., 2008) z grobimi ali opaznimi zrnci avtorji imenujejo heterofilni granulociti. Po navedbi različnih avtorjev (Ellis, 1977, cit. po López-Ruiz in sod., 1992) se ime nevtrofilec uporablja za levkocite z granulami, ki se ne barvajo intenzivno s kislimi ali bazičnimi barvili pri nevtralnem pH, izraz heterofilni granulocit pa kot splošen izraz za nevtrofilne granulocite vseh živalskih vrst ne glede na barvno reakcijo njihovih zrnc v histoloških vzorcih (Vozelj, 1996).

Zreli heterofilni granulociti imajo pri močerilarjih intenzivno vijolično-rdečo do vijolično citoplazmo, z dvo ali več lobuliranim jedrom. V citoplazmi so drobne bazofilne in eozinofilne granule ter vakuole. Vakuole so značilnost nevtrofilih granulocitov ribe *Oreochromis mossambicus* (Dogget in sod., 1987). Na poltankih rezinah so granule heterofilih granulocitov okroglih in paličastih oblik. Večjih razlik med močerilom in nekturom pri temu tipu granulocitov ni.

Po navedbah nekaterih avtorjev se jedro heterofilih granulocitov pri dvoživkah oblikuje v veče število lobulov kot pa jedro eozinofilnih granulocitov (Turner, 1988; Allender in sod., 2008; Gutierrez in sod., 2008), kar smo pri močerilarjih opazili tudi mi. Čeprav Canfield (1998) opisuje nelobulirana jedra heterofilih granulocitov za večino dvoživk, pa ostali avtorji za dvoživke opisujejo polimorfna, multilobulirana ozziroma segmentirana jedra (Tooze in Davies, 1968; Cambell, 1969; Hightower in Haar, 1975; Spornitz, 1975; Meseguer in sod., 1985; Frank, 1989a; Allender in sod., 2008; Abreu Manso in sod., 2009). Jordan (1932) in tudi Mrak (2007) sta pri heterofilih granulocitih močerila opisala jedra z večimi segmenti, kar smo potrdili tudi mi za obe podvrsti močerila in prav tako za pisanega nektura. Med jedrnimi lobuli heterofilih in tudi eozinofilnih granulocitov smo večkrat opazili zožena mesta, ki lobule povezujejo. Zožanja jedrne membrane sta opisala tudi Spornitz (1975) pri zrelih heterofilih granulocitih kremljarke *Xenopus laevis* in Jordan (1932) pri eozinofilnih granulocitih močerila *Proteus anguinus anguinus*.

Granule sesalčjih nevtrofilcev so različnih barv (Canfield, 1998), medtem ko so granule nesesalčjih heterofilih granulocitov rdeče do rjave, različnih oblik in velikosti (Canfield, 1998). Citoplazma pri nekaterih dvoživkah je z diferencialnimi barvili neobarvana, granule

pa niso vidne (Tooze in Davies, 1968; Allender in sod., 2008; Gutierrez in sod., 2008), spet pri drugih vrstah so granule eozinofilne in vidne (Allender in sod., 2008). Nevtrofilni granulociti nepigmentirane podvrste močerila imajo slabo obarvano in slabo vidno bazofilno citoplazmo in zrnca (Mrak, 2007). Granul nevtrofilnih granulocitov pri močerilu tudi Werzeg (1911, cit. po Jordan, 1932) ni opazi. Prav tako kot mi pri močerilarjih pa tudi Jordan (1932) pri močerilu opazi granule nevtrofilnih granulocitov. Granule v bazofilni citoplazmi heterofilnih granulocitov močerilarjev so eozinofilne in bazofilne, kar Alberio in sodelavci (2005) navajajo za kuščarja *Ameiva ameiva*. Pri nevtrofilcih ribe *Oreochromis niloticus* pa Shin'ya in sodelavci (2003) z May-Grünwald Giemsa barvanjem opišejo kar štiri tipe granul, med njimi tudi eozinofilne in bazofilne. Bazofilno citoplazmo heterofilnih granulocito imajo tudi nekateri nižji vretenčarji (Doggett in sod., 1987; Tosunoğlu in sod., 2004; Alberio in sod., 2005). Granule so različnih velikosti in oblik (Cambell, 1970; Turner, 1988), najpogosteje so paličaste, ročkaste in okrogle (Cambell, 1969; Spornitz, 1975, Tooze in Davies, 1975; Frank, 1989a; Frank, 1989b; Gutierrez, 2008). Prav tako kot pri eozinofilnih granulocitih močerilarjev tudi pri heterofilnih granulocitih ne moremo določiti koliko je populacij granul.

#### 4.1.2.3 Bazofilni granulociti

Tako kot višjih vretenčarjih imajo tudi dvoživke eozinofilne, bazofilne in nevtrofilne granulocite (Turner, 1988; Alleder in sod., 2008), vendar niti v ledvičnem niti v jetrnem tkivu močerilarjev nismo našli bazofilnih granulocitov. V krvožilju nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* jih navaja tudi Mrak (2007). Bazofilne granulocite opisujejo za krvožilje sleporila *Siphonops annulatus* (Gutierrez in sod., 2008) in v vranici pupka *Triturus cristatus* (Tooze in Davies, 1968). Bazofilci so v krvožilju sesalcev, medtem ko v tkivih normalno niso prisotni (Vozelj, 2000; Ross in sod., 2003). Vendar so tako eozinofilni kot bazofilni granulociti pri zdravih živalih v krvožilju v majhnem številu (Canfield, 1998).

Avtorji pri odraslih brezrepcih in paglavcih v granulocitopoetskem tkivu navajajo poleg že omenjenih dveh tipov granulocitov tudi bazofilne in njihove razvojne stopnje, ki pa so maloštevilni v primerjavi z ostalima dvema granulocitnima tipoma (Slonimski, 1941; Cambell, 1970; Spornitz, 1975; Meseguer in sod., 1985; Frank, 1988; Frank, 1989b). Nasprotno pa pri repatih dvoživkah v nobenem primeru granulocitopoetsko tkivo poleg heterofilnih in eozinofilnih granulocitov nima bazofilnih granulocitov (Jordan, 1932; Cambell, 1969; Hightower in Haar, 1975; Goldblatt in sod., 1987; Abreu Manso in sod., 2009). Odsotnost bazofilcev v granulocitopoetskem tkivu repatih dvoživk bi lahko pripisali dejству, da granulociti repatih dvoživk po mnenju avtorjev (Jordan, 1932; Cowden in sod., 1941, cit. po Turner, 1988, Cowden, 1965, cit. po Turner, 1988) nastajajo v vranici, ostala dva tipa pa v jetrih. Tako pri močerilu Jordan (1932) navaja vranico kot mesto nastanka

bazofilnih granulocitov, vendar Mrak (2007) v vranici nepigmentirane podvrste močerila bazofilcev ne opisuje. Prav tako pa Slonimski (1941) v perihepatični plasti mehiškega aksolotla *Ambystoma mexicanum* opisuje tudi zrele bazofilne granulocite, medtem ko Barrett (1936, cit. po Slonimski, 1941) pri dveh drugih vrstah rodu *Ambystoma* v jetrih najde le heterofilne in acidofilne granulocite. Nekateri avtorji navajajo občutljivost bazofilnih granulocitov na nekatera fiksacijska sredstva (Holmgrem in Wilander, 1937, cit. po Slonimski, 1941; Slonimski, 1937, cit. po Slonimski, 1941; Canfield, 1998; Cambell, 2004), zato ti mnogokrat niso vidni. Pri močerilarjih tako ne moremo niti potrditi niti ovreči trditve nekaterih avtorjev, da so mesta nastanka bazofilnih granulocitov in ostalih dveh tipov ločena.

#### 4.1.2.4 Razvojne faze eozinofilnih in heterofilnih granulocitov

Z zorenjem heterofilnih in eozinofilnih granulocitov močerilarjev se jedro pomika proti periferiji celice in se spremeni iz okrogle ali ovalne oblike v vgrezljeno in kasneje lobulirano jedro. Povečajo se heterokromatinski skupki ob jedrni membrani in v notranjosti jedra. Jedrca se zmanjšajo. V citoplazmi se povečuje število granul. To so le nekatere značilnosti zorenja eozinofilnih in heterofilnih granulocitov tudi pri ostalih dvoživkah (Cambell, 1968; Cambell, 1970; Hightower in Haar, 1975; Meseguer in sod., 1985; Frank, 1989; Abreu Manso in sod., 2009). Poznejša stopnja, ki je pri heterofilnih granulocitih pogosteja kot pri eozinofilnih, je pasasta (angl. band cell), v kateri je jedro podkvaste oblike. Ross in sodelavci (2003) jo pri sesalcih navajajo kot značilnost nevtrofilcev, prav tako je pri volovski žabi *Lithobates catesbeianus* ta stopnja značilnost le heterofilnih granulocitov (Abreu Manso in sod., 2009). Canfield (1998) meni, da je pasasta stopnja značilnost granulocitopoeze pri tistih vrstah, kjer je jedro odrasle celice lobulirano. Vendar jo večina avtorjev pri granulocitopoezi dvoživk ne omenja (Cambel, 1969; Cambell, 1970; Hightower in Haar, 1975; Spornitz, 1975; Meseguer in sod., 1985; Frank, 1989). Kolačasto obliko, ki je bila pogosta med heterofilnimi granulociti močerilarjev, so pri brancinu *Dicentrarchus labrax* uvrstili v metamielocitno stopnjo (Meseguer in sod. 1990).

Granule nekaterih poznih eozinofilnih programulocitov nepigmentirane podvrste močerila so v poltankih rezinah različnih velikosti in različne intenzitete barvanosti. Prevladujejo majhne, svetle granule. V zrelih eozinofilnih granulocitih so granule temnejše, prevladujejo pa velike granule. Večanje granul z zorenjem pri eozinofilcih za močerila navaja že Jordan (1932), podobno tudi Cambell (1969) za močerada *Batrachoseps attenuatus*, kjer se z zorenjem poleg večanja granul povečuje tudi elektronska gostota. Kot smo že omenili, se podrobneje v granulogenezo nismo spuščali, zato tudi razlik v velikosti in intenziteti barve ne moremo z gotovostjo pripisati spremembam v razvojnih stopnjah, kljub temu, da ostale lastnosti celice, kot so zmanjšanje velikosti, sprememba oblike jedra

ter povečanje kromatinskih skupkov, kažejo na različni zrelostni stopnji. Prav tako ne moremo govoriti o zorenju ene same populacije granul, kar je značilno za nekatere dvoživke (Cambell, 1969; Campbell, 1970; Frank, 1989a; Frank, 1989b), kot tudi ne o različnih populacijah v teku zorenja, značilnih za nekatere druge dvoživke (Hightower in Haar, 1975; Meseguer in sod., 1985).

Na poltankih rezinah zgodnejših programulocitov je ob jedrni ovojnici viden temnejši kromatin, ki ga je v primerjavi s kasnejšimi stopnjami manj, nekaj ga je tudi v skupkih v notranjosti jedra. Na nekaterih prerezih so opazna jedrca, ki so bolj ali manj pravilnih oblik, velikokrat pa jih je težko ločiti od kromatinskih skupkov. Nekaj kromatina je vedno zgoščenega in ni nikoli udeležen v transkripciji. Tak kromatin je konstitutivni kromatin (Cross in Mercer, 1993). Fakultativni heterokromatin pa sestavlja DNK, ki se le v določenem času ne prepisuje, njegova količina pa se spreminja s celično aktivnostjo oziroma celičnim tipom (Cross in Mercer, 1993).

Tooze in Davies (1967) pri ultrastruktturni analizi zgodnejših stopenj eritropoeze v vranici pupka *Triturus cristatus* poleg nekaj velikih kep kondenziranega kromatina opišeta tudi majhne, elektronsko goste kromatinske regije, ki jih na svetlobnem mikroskopu lahko ločimo ali pa tudi ne. V kasnejših stopnjah se ti manjši skupki združijo v velike gmote, ki so na svetlobnomikroskopskem nivoju vidni in jih pogosto razlagamo kot kondenziranje razpuščenega kromatina. Vendar avtorja ločita ta dva procesa. Tako pomeni skupkanje proces, kjer se manjše regije kondenziranega kromatina združujejo in tvorijo velike gmote. Kot eno izmed možnosti navajata, da so ti manjši skupki kromatina aktivni v tvorbi mRNA in s tem pri hemoglobinski sintezi. Prav tako pri isti vrsti pupka v eritroidnih prekurzorskih celicah in zgodnejših stopnjah eritropoeze v jedru Grasso (1973) opiše kromatinske mase ali skupke, ki tvorijo mrežo omejeno z interkromatinskimi mesti različnih obsežnosti. Vendar imajo ti skupki drobno, rahlo sestavo, medtem ko so tisti kasnejših razvojnih stopenj grobi in elektronsko gostejši, kromatin pa je bolj kondenziran.

Na histoloških rezinah je kromatin v jedru zgodnjih stopenj rahel, razpuščen in prav tako razporejen v vidne gruče ali mase (Grasso, 1973). Tudi mi smo na poltankih rezinah v zgodnejših programulocitih močerilarjev opazili svetlejše kromatinske skupke za razliko od poznejših faz. Na histoloških preparatih imajo jedra zgodnejših stopenj manjše temnejše skupke, obarvane temneje in svetlejša mesta. Jedro izgleda svetlejše. Pozne in zrele razvojne stopnje imajo večje skupke, ki so razločnejši in temneje obarvani, posledica česar je temnejše jedro.

#### 4.1.2.5 Prekurzorske celice

Prekurzorske celice smo poimenovali populacijo celic, ki se med seboj morfološko razlikujejo po velikosti, obsežnosti in bazofilnosti citoplazme ter njeni krhkosti. Citoplazma pogosto izgleda penasto oz. vakuolizirano. Videz jedra je pri vseh celicah podoben. Jedro je veliko in zajema večji del citoplazme. Kromatin je rahel, razpuščen, razporejen v gruče in daje jedru mrežast izgled, kar navaja Jordan (1932) za hemocitoblaste pri močerilu in Grasso (1973) za eritroidne prekurzorske celice pupka *Triturus cristatus*. Občasno so opazna jedrca.

Zelo podobne celice po izgledu opiše Grasso (1973) pri pupku. Zaradi povezave z eritropoezo jih imenuje eritroidne prekurzorske celice. Gre za serijo celic, ki se prav tako morfološko razlikujejo, kar je po avtorjevo posledica postopne diferenciacije v bazofilni eritroblast in nato v polikromatofilni eritroblast. Zgodnje celične oblike imajo malo citoplazemskih ribosomov in malo organelov. Golgijev aparat in endoplazemski retikulum sta slabo razvita. Količina ribosomov sčasoma narašča, od tod tudi naraščanje citoplazemske bazofilije na svetlobno mikroskopskem nivoju (Grasso, 1973). S tem bi lahko pojasnili različno bazofilijo citoplazme prekurzorskih celic močerilarjev. Sem Grasso (1973) prišteva tudi proeritroblast, ki je pri sesalcih poleg mieloblasta, ki vodi v granulocitno diferenciacijo, prva mikroskopsko prepoznavna celica (Ross in sod., 2003).

V literaturi zasledimo, da avtorji pri dvoživkah prvim diferencijskim stopnjam pripišejo tako funkcije diferenciacije v katerikoli granulocitni tip, kot tudi funkcije zarodne celice (angl. stem cell) oziroma hemocitoblasta. V vseh primerih gre za razmeroma nediferencirane celice z malo celičnimi vključki (Cambell, 1970; Hightower in Haar, 1975; Meseguer in sod., 1985; Frank, 1989a). Zarodnih celic ne moremo uvrstiti na osnovi morfologije v nobeno zarodno linijo (Crooss in Mercer, 1993). Zato kljub temu, da so nekatere prekurzorske celice močerilarjev po izgledu podobne hemocitoblastom, ki jih opisuje Jordan (1932), te terminologije nismo uporabili, saj so po avtorjevo to multipotentne zarodne celice. Prav tako smo se izognili izrazu mieloblast, saj kljub temu, da smo našli nekatere programulocitne razvojne stopnje ne moremo trditi, da prekurzorske celice vodijo v nastanek granulocitne vrste. Morfološko tudi ne moremo ločiti morebitnih mieloblastov ob morebitnih zarodnih celic. Zato smo uporabili zgolj izraz prekurzorske celice, ki imajo značilnosti nediferenciranih celic in za katere ne moremo trditi, v katero razvojno linijo krvnih celic vodijo.

#### 4.1.2.6 Eritroblasti

Eritropoeza pri vseh redovih vretenčarjev vključuje izvorne celice, ki se diferencirajo v proeritroblaste (pronormoblast), nato v bazofilne, polikromatofilne in ortokromatofilne eritroblaste (normoblaste), ki jim sledijo brezjedrni retikulociti pri sesalcih. Zrela celica je

eritrocit, ki je brez jedrn pri sesalcih in z jedrom pri ostalih vretenčarjih (Tooze in Davies, 1967; Canfield, 1998). Zgodnejši eritroblasti so celice z večjimi jedri in manjšo količino citoplazme, med zorenjem pa se količna citoplazme povečuje. Oblika celice se spreminja od okrogle do ovalne, zreli eritrociti pa so eliptični. Med zorenjem eritrocita se količina hemoglobina povečuje, zmanjšuje pa se količina ribosomov. Ustavi se tudi sinteza ribosomalne in sporočevalne RNK (Tooze in Davies, 1967; Gasso, 1973b, cit. po Glomski in sod., 1997). Posledica tega je zmanjševanje bazofilnosti citoplazme in povečevanje eozinofilnosti.

Pogosto smo eritroblaste zasledili v sinusoidih močerila, kar za krvožilje nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* navajata že Jordan (1932) in kasneje tudi Mrak (2007). V krvožilju repatih dvoživk potekata diferenciacija in tudi proliferacija eritrocitov (Jordan, 1932; Barrett, 1947; Grasso, 1973), vendar nekateri avtorji trdijo, da pri repatih dvoživkah eritropoeza v krvožilju poteka le ob odstranitvi vranice ali v določeni sezoni (Jordan in Spiedel, 1924, 1930, cit. po Tooze in Davies, 1967; Dawson, 1931; Tooze in Davies, 1967, 1968). Vranica močerila tvori izvorne celice, ki vstopijo v krvožilje, ki je mesto diferenciacije in proliferacije v eritrocite in trombocite (Jordan, 1932). Mrak (2007) v svojem delu za nepigmentirano podvrsto močerila navaja krvožilje kot mesto dokončanja eritropoeze. Tudi pri nekturu je vranica eritropoetski in trombopoetski organ (Dawson, 1931). Večkrat smo pri močerilarjih opazili v sinusoidih tudi mitotične delitve, nismo pa znali določiti, katerim krvnim celicam pripadajo. V krvožilju volovske žabe *Lithobates catesbeianus* so celice v mitozi ortokromatofilni eritroblasti (Abreu Manso in sod., 2009). Pri sesalcih je polikromatofilni eritroblast zadnja stopnja, ki je sposobna diferenciacije (Ross in sod., 2003). Zaradi pomanjkanja podatkov ne moremo potrditi ugotovitev Jordana (1932), niti Mrakove (2007).

#### 4.1.2.7 Limfociti

Lastnosti limfocitov so si pri vseh redovih vretenčarjev podobne (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1967, 1968; Cambell, 1970; Canfield, 1998; Ross in sod., 2003). Okoli okroglega jedra je le tanka, svetlo bazofilna citoplazma. Velikokrat citoplazma ni vidna, ali pa jo opazimo kot sij okoli jedra. Jedro je na histoloških rezinahobarvano temno. Na poltankih rezinah so vidni veliki, temno obarvani kromatinski skupki. Pri nekaterih vretenčarjih omenjajo avtorji tri velikostne razrede limfocitov, kot so majhni, srednji in veliki (Temkin in McMillan, 1986; Canfield, 1998; Vozelj, 2000), kar pri našem raziskovanju nismo opazili.

#### 4.1.3 Ledvice močerilarjev kot hemopoetski organ

Pod peritonejem in vezivno kapsulo je ledvični parenhim, ki ga tvorijo tubuli, renalni korpuskuli, žile in vezivno tkivo, ki te elemente povezuje.

Vezivo, ki povezuje ledvične elemente pri močerilarjih, tvorijo retikularna vlakna. Ta tip veziva navajajo kot stromo hemopoetskih in limfatičnih organov vretenčarjev (Zapata in sod., 1995, cit. po Abreu Manso in sod., 2009; Vozelj, 2000; Ross in sod., 2003). Vloga retikularnih vlaken je pritrjanje in pomoč pri snovanju hemopoetskih progenitorjev (Zapata in sod., 1995, cit. po Abreu Manso in sod., 2009). Retikularna vlakna strome hemopoetskih in limfatičnih organov tvorijo retikularne celice, ki s svojo citoplazmo obdajajo retikularna vlakna (Ross in sod., 2003). Pri rutinskem H&E barvanju teh vlaken ne moremo identificirati, zato so potrebna specifična barvanja (Ross in sod., 2003), ki smo jih pri obeh organih močerilarjev izvedli tudi mi. Subkapsularno in intertubularno retikularno stromo pri ledvicah močerila navaja že Jordan (1932), opisujejo jo tudi za opistonefros paglavca žabe *R. esculenta* (Frank, 1988). Retikularna vlakna med tubuli navajajo pri odrasli volovski žabi *Lithobates catesbeianus* (Abreu Manso in sod., 2009), retikularne celice pa v ledvicah smrkeža *Misgurnus anguillicaudatus* (Ishizeki in sod., 1984).

Morfološki kriteriji, ki smo jih uporabili za določitev mest hemopoeze so prisotnost različnih razvojnih stopenj krvnih celic, ki odražajo hemopoezo glede na razmišlanje tudi drugih avtorjev (Jordan, 1932; Cambell, 1969; Hightower in Haar, 1975; Spornitz, 1975; Ishizeki in sod., 1984; Mesguer in sod., 1985; Meseguer in sod., 1992; Abreu Manso in sod., 2009). V ledvicah obeh podvrst močerila smo na ta način določili zrele celice eozinofilnih in heterofilnih granulocitov kot tudi njune razvojne stopnje in jih poimenovali programulociti, prekurzorske celice in limfocite. Zadnjih pri pisanem nekturu nismo ločili. Razlog temu je najverjetneje že omenjeno slabše barvanje tkiva pisanega nektura, posledica česar je verjetno tudi manjše število vidnih eozinofilnih granulocitov. Posamezni tipi programulocitov skupaj s prekurzorskimi celicami tvorijo hemopoetska mesta, ki jih opisujejo tudi za ledvično hemopoetsko tkivo volovske žabe *Lithobates catesbeianus* (Abreu Manso in sod., 2009). Zrele celice so pogosteje posamične in velikokrat ob žilah. V hemopoetskih mestih ledvic močerilarjev so pogoste mitotične delitve, kar za močerila navaja tudi Jordan (1932), vendar posameznih celic v delitvi nismo uspeli prepoznati.

Ledvic močerilarjev so glede na raziskovanja tudi hemopoetski organ. V njih nastajajo eozinofilni in heterofilni granulociti. Jordan (1932) navaja granulocitopoetsko tkivo mezonefrosa navaja za močerila, izgled samega tkiva pa je zelo podoben tistemu v limfogranulocitopoetski jetni skorji rodov *Triturus* in *Amphiuma*. Pri nekturu naj bi zaradi tanke plasti perihepatičnega tkiva granulocitopoeza potekala tudi v mezonefrosu (Dawson,

1931; Drzewina, 1905, cit. po Jordan, 1932). Pri večini predstavnikov brezpljučih močeradov so limfogranulocitopoetska mesta prisotna, vendar slabo razvita. Popolnoma so odsotna pri italijanskem jamskem močeradu *Hydromantes italicus*, prav tako iz družine brezpljučih močeradov (Barrett, 1947). Ledvica repatih dvoživk so pomemben limfogranulo-citopoetski organ samo pri družini Proteidae (Drzewina, 1903, cit. po Barrett, 1947; Dawson, 1932, cit. po Barrett, 1947; Foxon, 1964; Turner, 1988). Pri brezrepcih so ledvice pri nekaterih vrstah granulocitopoetska v larvalnem obdobju (Jordan in Spiedel, 1923; Meseguer in sod., 1985; Turner, 1988; Frank, 1988, 1989a, 1989b), pri drugih pa tudi pri odraslih osebkih (Turner, 1988; Abreu Manso in sod., 2009). Ledvica nižjih vretenčarjev so najpogosteje hemopoetski organ, šele s pojavom kostnega mozga pa ledvica to funkcijo izgubi (Abreu Manso in sod., 2009). Hemopoeza poteka v ledvicah pri sodobnih kostnicah in repatih dvoživkah (Hadji-Azimi in sod., 1987, cit. po Abreu Manso in sod., 2009). Jordan in Spiedel (1923) sta z izzvano metamorfozo pri žabi *R. catesbeiana* odkrila, da hemopoeza sprva poteka v ledvicah, po metamorfozi pa v vranici, vsled prehoda iz nižjega metabolizma ličinke na višji metabolizem odraslih. Predvidevata tudi, da razvoj kostnega mozga pri žabah in drugih vretenčarjih korelira s pojavom višjega metabolizma (Jordan in Spiedel, 1923). Tudi za močerila je značilen upočasnjen metabolizem (Jordan, 1932; Hervant in sod., 2000, 2001, cit. po Prelovšek, 2002). Novejše raziskave kažejo, da so ledvica pri odrasli volovski žabi tudi hemopoetski organ, vendar avtorji predvidevajo, da hemopoetski progenitorji pripotujejo vanjo po krvožilju iz kostnega mozga (Abreu Manso in sod., 2009).

V ledvicah močerila so pogosti skupki limfocitov, kot tudi posamezne celice. Limfociti so prisotni tudi v ledvicah drugih dvoživk (Meseguer in sod., 1985; Turner, 1988; Frank, 1988; Abreu Manso in sod., 2009). Pri ličinki žabe ameriške leopardovke *Rana pipiens* sta pronefros in mezonefros glavna organa v produkciji limfocitov B, delno pa so udeležena tudi jetra. Po metamorfozi pa to vlogo prevzame kostni mozeg (Zettergren in sod., 1980; Eipert in sod., 1979, cit. po Hansen in Zapata, 1998). Frank (1988) pri paglavcu žabe podobno opisuje pronefros in opistonefros tudi kot mesta diferenciacije limfocitov, medtem ko so ledvica hemopoetsko mesto tudi za limfocite pri odrasli volovski žabi *Lithobates catesbeianus* (Abreu Manso in sod., 2009). Pogosto imajo organi dvoživk, ki so eritropoetski ali granulocitopoetski tudi limfoidno tkivo (Turner, 1988). Najverjetneje počasen tok krvi v ledvicah omogoča, da se limfociti združujejo in reagirajo s tukti iz telesnih votlin (Turner, 1973, cit. po Turner, 1988).

Intertubularnega limfoidnega tkiva ledvic pri močerilu ne moremo opredeliti niti kot primarno niti kot sekundarno tkivo.

#### 4.1.4 Jetra močerilarjev kot hemopoetski organ

V jetrih močerilarjev so večje skupine krvnih celic v subkapsularni plasti ali v perihepatičnem področju, v intersticijskih mestih ob in med pigmentnimi celicami, kot tudi perivaskularno ob žilah in žolčnih vodih. Mesta krvnih celic v jetrih repatih dvoživk podobno razdeli že Barrett (1936, cit. po Slonimski, 1941) in jih opredeli kot limfo-granulocitopoetska mesta.

##### 4.1.4.1 Perihepatično mesto močerilarjev

Pod mezotelom in vezivno kapsulo jeter močerilarjev je subkapsularno oz. perihepatično mesto, ki obdaja jetra v celoti, je različnih debelin in mestoma prekinjeno. Pigmentirana podvrsta močerila *P.anguinus parkelj* ima večinoma prekinjeno perihepatično plast, pod mezotelom pa so vidne le posamezne zadebelitve celičnih skupkov. Velikokrat so to le posamezne celice, kar opisuje tudi Lužnik (2004). V sklepih svojega raziskovanja Lužnik povzame, da pri pigmentirani podvrsti močerila perihepatične plasti ni. Perihepatično mesto pigmentirane podvrste močerila bi lahko opisali kot močno reducirano tudi mi, saj za razliko od nepigmentirane podvrste na nobenem delu jeter ne moremo govoriti o plasteh oz. debelini tega tkiva. Jordan (1932) in Prelovšek (1999) zanikata obstoj perihepatičnega tkiva v jetrih nepigmentirane podvrste močerila *P.anguinus anguinus*. Vendar pa oba opisujeta pod kapsulo posamezne skupine limfocitov (Jordan, 1932) oziroma levkocitov (Prelovšek, 1999), medtem ko Novak (2004) tako za pisanega nektura *Necturus maculosus* kot tudi nepigmentirano podvrsto močerila *P.anguinus anguinus* navaja od ena do štiri plasti debelo perihepatično mesto. Razlike v ugotovitvah bi lahko pripisali opisovanju mest pri različnih osebkih, vendar obstoja takšnega področja ne moremo zanikati, saj je na nekaterih delih očitno in debelo.

Medtem ko pri nepigmentirani podvrsti močerila *P.anguinus anguinus* med zdravim in infeciranim osebkom ni bilo odstopanj v debelini perihepatičnega tkiva, pa so ta očitna pri pisanem nekturu *Necturus maculosus* in hkrati primerljiva z dvoživkami, ki imajo dobro razvito perihepatično plast. Perihepatična plast pri inficiranem osebku nektura je lahko debela tudi do šest plasti celic. Pri zdravem osebku nektura je subkapsularna plast manj debela, ali pa so celice posamična. Povečano obsežnost perihepatičnega tkiva opisujejo tudi pri larvi aksolotla *Ambystoma punctatum* ob izzvani krvavitvi (Chiakulas in Schewing, 1964). Mestoma prekinjeno subkapsularno plast za nektura navaja tudi Novak (2004), Dawson (1931) pa jo opiše kot bolj ali manj zvezno. Perihepatična plast je pri dvoživkah različno debela, pri vodnem pupku *Notophthalmus viridescens* je debela eno do štiri plasti celic (Hightower in Haar, 1975; Goldblatt in sod., 1987), pri italijanskem jamskem močeradu *Hydromantes italicus* štiri do pet plasti celic (Barrett, 1947) in pri žabi kremljarki *Xenopus laevis* do deset plasti celic (Spornitz, 1975).

Rodovi bolj specializiranih brezpljučih močeradov, kot so *Plethodon*, *Eurycea* in *Desmognathus* imajo subkapsularno plast, ki je različno debela, prekinjena in močno reducirana (Barrett, 1947). Temu opisu ustreza tudi perihepatična plast nepigmentirane podvrste močerila *P. anginus anginus* in pisanega nektura *Necturus maculosus*, predvsem pa pigmentirane podvrste močerila *P. anginus parkelj*. Nekateri drugi, bolj primitivni rodovi brezpljučih močeradov *Hydromantes*, *Gyrinophilus*, *Pseudotriton*, *Typhlotriton* in druge repate dvoživke kot so *Ambystoma*, *Triturus* in *Chrynobranchus* imajo enotno debelo, neprekinjeno in dobro razvito subkapsularno plast (Barrett, 1936, cit. po Barrett, 1947). Debela, neprekinjena subkapsularna plast je karakteristika primitivnih brezpljučih močeradov in v splošnem repatih dvoživk (Barrett, 1947). Podobno je tudi pri vodnem pupku *Notophthalmus viridescens* (Hightower in Haar, 1975) in kremljarki *Xenopus laevis* (Spornitz, 1975), kjer perihepatična plast skoraj popolnoma obdaja jetra. Jordan (1932) pri nekturu *Necturus maculosus* navaja tanjšo perihepatično plast, kot je to pri rodovih *Triturus* in *Amphiuma*. Isto opisuje Novak (2004) v primerjalni študiji med pisanim nekturom *Necturus maculosus* in planinskim pupkom *Triturus alpestris*.

Veliko avtorjev subkapsularno plast jeter opisuje kot slabo ožiljeno področje (Jordan, 1932; Chiakulas in Scheving, 1964), zrele celice tako prehajajo v krvožilje preko Dissejevega prostora ob sinusoidih (Hightower in Haar, 1975; Goldblatt in sod., 1987). Pogosto so tudi pri močerilarjih le na meji med parenhimom in subkapsularno plastjo sinusoidi in krvne žile, vendar smo pri nepigmentirani podvrsti močerila *P. anginus anginus* opazili tudi manjše krvne žile v notranjosti perihepatičnega tkiva, kar pri mehiškem aksolotlu *Ambystoma mexicanum* opisuje tudi Slonimski (1941).

Celice perihepatičnega mesta močerila so heterofilni in eozinofilni granulociti ter njuni programulociti, kot tudi limfociti in prekurzorske celice, kar v večini velja tudi za ostale dvoživke (Slonimski, 1941; Barrett, 1947; Chiakulas in Scheving, 1964; Cambell, 1969; Hightower in St. Pierre, 1971; Hightower in Haar, 1975; Spornitz, 1975). Pri pisanem nekturu so bili eozinofilni granulociti maloštevilni. Pri pupku *Notophthalmus viridescens* eozinofilnih granulocitov v subkapsularni plasti niso našli (Goldblatt in sod., 1987), za nekatere dvoživke jih navajajo kot maloštevilne celice (Slonimski, 1941; Spornitz, 1975).

Perihepatična mesta so pri močerilu, kot pri večini ostalih dvoživk granulocitopetsko tkivo (Dawson, 1931; Cambell, 1969; Hightower in Harr, 1975; Spornitz, 1975), vendar manj obsežno. Pri pigmentirani podvrsti močerila *P. anginus parkelj* zaradi prisotnosti le posameznih celic ne moremo pisati o hemopoezi v tej plasti. Nekateri starejši avtorji subkapsularni plasti pripisujejo vlogo limfo-granulocitopoeze (Jordan, 1932; Slonimski, 1941; Barrett, 1947), verjetno pa se predpona limfo- nanaša na multipotentnost limfocita pri nastanku krvnih celic po Jordanu. Jordan (1932) jo imenuje tudi limfoidni korteks. Turner (1973, cit. po Turner, 1988) in Rubens in sodelavci (1973, cit. po Hightower in

Haar, 1973) predvidevajo, da lahko skupine limfocitnih celic v subkapsularni plasti zaradi upočasnjenega toka krvi v jetrih reagirajo na antigene iz krvožilja. Podobno Vozelj (2000) pri sesalcih pod sekundarna limfatična tkiva uvršča aggregate limfocitov v vezivnem tkivu vseh organov razen v osrednjem živčevju. Torej bi lahko bila tudi subkapsularna plast jeter močerilarjev sekundarno limfoidno tkivo.

#### 4.1.4.2 Intersticijska in perivaskularna hemopoetska mesta v jetrih močerilarjev

Intersticijska mesta omejujejo hepatične plošče in velikokrat mejijo na sinusoid. Gradniki hemopoetskih mest so pigmentne celice, posamezna ali v skupkih, in krvne celice. Intersticijska mesta so najobsežnejša pri nepigmentirani podvrsti močerila *P.anguinus anguinus*, vendar ima inficirani osebek pisanega nektura *Necturus maculosus* razen debele perihepatične plasti tudi obsežna intersticijska mesta. V primerjavi z nepigmentirano podvrsto močerila ima slabše razvita intersticijska mesta tudi pigmentirana podvrsta močerila *P.anguinus parkelj*. Mesta z večjim številom celic so maloštevilna. Podobne ugotovitve za intersticijska mesta pisanega nektura, nepigmentirano podvrsto močerila in pigmentirano podvrsto močerila navajajo tudi Dawson (1931), Jordan (1932), Novak (2004) in Lužnik (2004), medtem ko Prelovšek (1999) v intersticiju nepigmentirane podvrste močerila ne opisuje večjih območij, ampak le po nekaj granulocitov in limfocitov v parenhimu. Intersticijska hemopoetska mesta so dobro zastopana tudi v jetrih repatih dvoživk iz rodov: *Cryptobranchus*, *Ambystoma*, *Triturus*, *Typhlotriton*, *Typhlomolge*, *Plethodon*, *Hemidactylum* in *Batrachoseps* (Barrett, 1936, cit. po Slonimski, 1941), popolnoma pa so odsotna pri italijanskem jamskem močeradu *Hydromantes italicus* (Barrett, 1947) in žabi kremljarki *Xenopus laevis* (Spornitz, 1975).

Poleg razlik v obsežnosti intersticijskega hemopoetskega tkiva med vrstami močerilarjev, se intersticijska mesta razlikujejo po celični sestavi in njihovi številčnosti tudi med osebkami iste vrste. Inficiran osebek nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* ima obsežna mesta, med sosednjimi mestami ni jasne meje. V intersticijskih mestih so predvsem prekurzorske celice in veliko limfocitov. Z danimi metodami nismo mogli določiti prav vseh celic. Podobne celice zapoljujejo tudi okolne sinusoide in prostore med hepatociti, kamor se raztezajo tudi retikularna vlakna. Jordan (1932) ta mesta pri močerilu poimenuje limfoidno tkivo zaradi številnih limfocitov in hemocitoblastov. Številne celice so tudi v sinusoidih. Ker pa so limfociti multipotentne celice in ker so ta mesta v jetrih dobro prekrvljena, so intersticijska mesta jeter močerila po avtorjevo mesta nastanka eritrocitov in trombocitov (Jordan, 1932). Nasprotno od Jordana (1932) v naši raziskavi v intersticijskem tkivu nismo identificirali razvojnih faz eritrocitov in trombocitov pri nobenem osebku močerila.

Poleg že omenjenih prekurzorskih celic in limfocitov so bili pri inficiranem osebku nepigmentirane podvrste močerila *P.anguinus anguinus* v intersticijskih mestih pogosti zreli eozinofilni granulociti in tudi njihovi programulociti, medtem ko so heterofilni granulociti le maloštevilni. Pri ostalih osebkih nepigmentirane podvrste močerila nismo opazili zlivanj sosednjih intersticijskih mest, prisotne celice pa so tako zrele kot programulocitne celice obeh granulocitnih tipov, kot tudi prekurzorske celice in limfociti.

Podobno kot za ledvice in subkapsularno plast jeter dvoživk, tudi za mesta v notranjosti tega organa Turner (1973, cit. po Turner, 1988) predvideva, da skupki limfocitov reagirajo na antigene iz krvožilja. Protitelesa stvarajoče celice dvoživk so tako kot pri sesalcih (Vozelj, 2000) produkti stimuliranih limfocitov (Turner, 1988). Manning in Horton (1982, cit. po Turner, 1988) sta s študijami pri brezrepcih pokazala, da se običajno, ne pa tudi stalno, pri humorali imunosti v bližini reagiranja z antigenom pojavijo številne proliferacijske aktivnosti in plazmatske celice v vranici kot v drugih sekundarnih limfoidnih organih. Vendar pa so jetra dvoživk po navedbi nekaterih avtorjev (Turner, 1988) tudi lahko limfopoetska. Ker so bila tako obsežna mesta z limfociti prisotna preko celotnega intersticijskega in perivaskularnega področja jeter le pri inficiranem osebku močerila, bi lahko sklepali, da gre v tem primeru za obsežno sekundarno limfoidno tkivo, ki je posledica fiziološkega stanja živali. Celic plazmatk pa nismo identificirali. Kot posledica vnetja, infekcije s paraziti ali pri virusnih boleznih je poznana limfocitoza (Campbell, 2004), kar bi lahko bilo vzrok povečanja limfocitnih celic v intersticiju inficiranega osebka nepigmentirane podvrste močerila *P.anguinus anguinus*. Kljub temu, da smo pri vseh močerilarjih v intersticiju določili programulocite heterofilnih in eozinofilnih granulocitov in bi tako lahko prekurzorske celice uvrstili v granulocitopoetsko linijo, pa zgolj na osnovi morfologije tega ne moremo. Prekurzorske celice se lahko razvijejo tudi v kakšno drugo linijo celic. Zato ne moremo popolnoma izključiti trditve Jordana (1932) o eritropoetski in trombopoetski vlogi jeter močerila, niti možnosti, da bi bila lahko jetra močerila primarni limfoidni organ.

Intersticijska mesta so poleg perihepatične plasti obsežnejša tudi v jetrih inficiranega pisanega nektura *Necturus maculosus*. Vzrok infekcije so najverjetneje paraziti, ki smo jih opazili znotraj žil organa. Tako kot pri inficiranemu osebku nepigmentiran podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus*, bi lahko tudi tukaj obsežnejša intersticijska mesta in tudi debelejšo perihepatično plast pripisali fiziološkemu stanju živali. Iz literature je namreč znano, da so eozinofilci dvoživk (Turner, 1988; Allender in sod., 2008) in sesalcev (Vozelj, 2000) udeleženi v odgovoru na parazitsko okužbo. Nevtrofilci dvoživk so migratorne celice, sposobne fagocitoze (Jordan, 1938, cit. po Turner, 1988; Everly in Hanson, 1965, cit. po Turner, 1988). V intersticiju jeter inficiranega in ostalih osebkov nektura so zreli heterofilni in eozinofilni granulociti in njuni programulociti ter prekurzorske celice. Številne so tudi celice v delitvi.

Poleg že omenjenih celic so v intersticiju jeter pri pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* občasno zastopane celice z majhnim jedrom in eozinofilno homogeno citoplazmo podobno eritrocitni, ali pa je citoplazma polna vključkov in z vakuolami. Omenjene celice so v tesnem stiku s pigmentnimi celicami. Najverjetneje gre za degenerirajoče eritrocite.

Znano je, da siderosomi z železovimi pigmenti nastajajo po razgradnji eritrocitov in hemoglobina (Ghadially, 1997, cit. po Lužnik, 2004). Pigmentnih makrofagov je v vranici nepigmentirane podvrste močerila *P.anguinus anguinus* manj (Mrak, 2007) kot v jetrih (Prelovšek, 2002), iz česar Mrak (2007) sklepa, da so pri močerilu jetra pomembnejše mesto razgradnje eritrocitov kot vranica. Jetra in vranica sta glavna organa pri razgradnji starih in poškodovanih eritrocitov tudi pri kremljarki *Xenopus laevis* (Chegini in sod., 1979). Pigmentne celice jeter nepigmentirane podvrste močerila *P.anguinus anguinus* (Prelovšek, 2002) in pigmentirane podvrste močerila *P.anguinus parkelj* (Lužnik, 2004) vsebujejo veliko siderosomov, v jetrih pisanega nektura *N.maculosus* pa je takih pigmentnih celic malo (Novak, 2004). Novak (2004) predvideva, da je tako najverjetneje zato, ker poteka eritropoeza pri nekturu izključno v vranici (Dawson, 1931), zato je tudi količina železovih pigmentov v primerjavi z močerilom v jetrih manjša. Mrak (2007) za vranico nektura navaja manjšo količino železovega pigmenta kot pri močerilu, kar pripisuje prilagoditvi močerila na jamsko okolje. Znano je namreč, da občasni hipoksični pogoji (Istenič, 1981, cit. po Prelovšek, 2002) in občasna obdobja pomanjkanja hrane v jamskem okolju povzročita pri živali upočasnjen metabolizem (Huppop, 1986, cit. po Prelovšek, 2002). Temu sledi povečana razgradnja eritrocitov (Frangioni in sod., 2000, cit. po Mrak, 2007) in zmanjšano eritropoetsko aktivnost (Meints in Carver, 1972, cit. po Mrak, 2007), posledično povečanje hemosiderina na mestih, kjer poteka razgradnja eritrocitov.

Veliko količino železovih pigmentov v jetrih pigmentirane podvrste močerila *P.anguinus parkelj* Lužnik (2004) povezuje s hemopoetsko vlogo jeter, saj je železo iz hemosiderina in feritina ponovno uporabno za sintezo hemoglobina (McSween in sod., 1994, cit. po Prelovšek, 2002). Kljub temu, da tudi nekateri avtorji (cit. po Tooze in Davies, 1968) navajajo, da prihaja do prenosa materiala med makrofagom in okoliškimi celicami, pa pri pupku *Triturus cristatus* kljub bližini eritroblastnih celic z makrofagi takega prenosa feritina avtorja nista zasledila (Tooze in Davies, 1967). Podobno Abreu Manso in sodelavci (2009) pri volovski žabi *Lithobates catesbeianus* med makrofagi in eritroidnimi progenitorji ne opazijo nobene povezave. Iz tega sklepajo, da lahko eritrociti brezrepcev sami vzdržujejo homeostazo železa in zato ne potrebujejo nobene aktivnosti makrofaga. Pri ličinkah mehiškega aksolotla *Ambystoma mexicanum*, prisiljenih v lakoto in dihanje skozi kožo, opisujejo povečanje limfo-granulocitopoetskega intersticijska mesta jeter in povečano število pigmentnih celic (Slonimski, 1941). Obsežna intersticijska mesta in

številne pigmentne celice so značilnost jeter močerila, kar bi lahko povezali z že omenjenimi prilagoditvami na jamsko okolje.

Opisana povezava krvnih celic z makrofagi pa ni edina. Pri višjih vretenčarjih je aktivacija limfocitov odvisna od interakcije z makrofagi (Veresio in sod., 1980, cit. po Temkin in McMillan, 1986; Vozelj, 2000). Skupke makrofag-limfocit navajajo tudi v vranici morskega psa (Pulsford in sod., 1982, cit. po Temkin in McMillan, 1986) in sodobnih kostnicah (Zapata, 1982, cit. po Temkin in McMillan, 1986; Temkin in Mc Millan, 1986). Jetni makrofagi miši s sproščanjem kolonije stimulirajoče aktivnosti (CSA) spodbujajo proliferacijo granulocitov in mononuklearnih celičnih kolonij in vitro (Joyce in Chervenick, 1975).

Perivaskularna mesta v jetrih močerilarjev so obsežna tako pri pisanem nekturu *Necturus maculosus* kot tudi pri nepigmentirani podvrsti močeila *Proteus anguinus anguinus*. Pri pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* pa o teh mestih ne moremo govoriti, saj so krvne celice redke. Perivaskularna mesta opisujejo pri krempljarki *Xenopus laevis* (Spornitz, 1975), pri rodovih repatih dvoživk kot so *Sirene*, *Pseudobranchus*, *Cryptobranchus*, *Triturus*, *Typhlotriton* in *Amphiuma* (Barrett, 1936, cit. po Slonimski, 1941), medtem ko so pri rodu brezpljučih močeradov *Hydromantes* popolnoma odsotna (Barrett, 1947). Najobsežnejša perivaskularna mesta smo ugotavljali pri inficiranih osebkih nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus* in pisanega nektura *Necturus maculosus*. Perivaskularna mesta so obsežna ob robu jeter, kjer je koncentracija žil in žolčnih vodov največja. Razprostirajo se tudi proti notranjosti jeter, kjer se koncentrirajo ob večjih žilah in žolčnih vodih. Celična sestava perivaskularnih mest je enaka kot v intersticiju jeter.

Glede na prekurzorske in programulocitne celice v intersticiju in perivaskularno v jetrih močerilarjev sklepamo, da sta intersticij jeter in perivaskularna mesta granulocitopoetska, vendar so manj obsežna, kot v ledvicah. Izključiti ne smemo tudi kakšne druge hemopoeze. Med različnimi vrstami družine Proteidae so razlike glede prisotnosti in obsežnosti posameznih hemopoetskih mest, kar navaja tudi Barrett (1947) za različne vrste družine brezpljučih močeradov. Razlike med osebki iste vrste močerilarjev pa so najverjetneje zaradi fizioloških stanj, ki so lahko posledica okužbe z glistami ali z drugimi povzročitelji.

#### 4.2 SKLEPI

- Ledvice močerilarjev (Proteidae) so limfoidni in granulocitopoetski organ, predvsem glede heterofilnih in eozinofilnih granulocitov. Razvojne stopnje slednjih so najštevilčnejše, številni pa so tudi limfociti in prekurzorske celice.
- V jetrih močerilarjev so mesta krvnih celic v subkapsularni plasti, intersticiju in perivaskularno. Razlike v obsežnosti posameznih mest so medvrstne, kot tudi med osebki iste vrste. Prve bi lahko pripisali vrstni specifičnosti, medtem ko so druge posledica fiziološkega stanja živali.
- Subkapsularno oz. perihepatično mesto je pri močerilarjih različno široka plast v jetrih in mestoma prekinjena. Pri pigmentirani podvrsti močerila je izrazito reducirano, zastopani so le posamezni skupki limfocitnih in granulocitnih celic.
- Intersticijska hemopoetska mesta tvorijo pigmentne celice, ki so posamezna ali pa v skupkih in krvne celice. Pri nepigmentirani podvrsti močerila so ta mesta najobsežnejša. Obsežna intersticijska mesta so značilnost jeter močerila, kar bi lahko povezali s prilagoditvijo na jamsko okolje.
- Perivaskularna mesta pri močerilarjih so prisotna, vendar so pri pigmentirani podvrsti močerila krvne celice maloštevilne.
- Perihepatično mesto nepigmentirane podvrste močerila in pisane nektura je mesto nastanka heterofilnih in eozinofilnih granulocitov, ki pa je manj obsežno v primerjavi z ostalimi dvoživkami. Limfocitne celice v subkapsularni plasti jeter so najverjetneje sekundarno limfoidno tkivo. V intersticiju in perivaskularno so pri močerilarjih prav tako programulociti heterofilnih in eozinofilnih granulocitov, njihove zrele stopnje ter prekurzorske celice in limfocitne celice. Sklepamo, da tudi v intersticiju in perivaskularnih mestih močerilarjev poteka nastanek heterofilnih in eozinofilnih granulocitov in pomenijo ta področja limfoidna tkiva.
- Jetra močerilarjev imajo v splošnem tudi hemopoetsko vlog. Tu nastajajo eozinofilni in heterofilni granulociti, vendar ne v tako velikem obsegu, kot je to značilno za ledvice. Prav tako kot ledvice, pa so tudi jetra močerilarjev limfoiden organ.

## 5 POVZETEK

Z našo raziskavo smo opredelili in primerjali hemopoetska področja v jetrih in ledvicah pigmentirane (*Proteus anguinus parkelj*) in nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) ter pisanega nektura (*Necturus maculosus*). Preverili in dopolnili smo tudi rezultate predhodnih raziskav na jetrih močerila (Jordan, 1932; Dawson, 1931; Prelovšek, 1999; Lužnik, 2004; Novak, 2004). Tkiva smo barvali z različnimi histokemijskimi barvili tipa Romanowsky-Giemsa z različnim pH-jem. Naredili smo natančnejšo morfološko analizo celic hemopoetskih mest v jetrih in ledvicah.

Hemopoetska mesta ledvic močerilarjev so med ledvičnimi tubuli, korpuskuli in krvnimi žilami. Najštevilčnejše celice so eozinofilni in heterofilni programulociti ter njihove zrele oblike. Bazofilnih granulocitov nismo našli. Pogoste so bile večje skupine ali posamezne limfocitne celice in prekurzorske celice. Ledvice močerilarjev so torej limfoiden in granulocitopoetski organ.

V jetrih močerilarjev se večje skupine krvnih celic nahajajo v subkapsularni plasti, v intersticijskih mestih ob in med pigmentnimi celicami ter perivaskularno ob žilah in žolčnih vodih.

Pod mezotelom in vezivno kapsulo jeter močerilarjev je subkapsularno oz. perihepatično tkivo, ki je različno široko in prekinjeno. Perihepatična plast pigmentirane podvrste močerila je močno reducirana, pod mezotelom so vidni le posamezni manjši celični skupki ali pa le posamezne celice. Pri pisanem nekturu je subkapsularna plast prekinjena, debela le do dve vrst celic, ali pa so celice posamično. Pri inficiranem nekturu je bila debela tudi do šest plasti celic.

Celice perihepatičnega mesta nepigmentirane podvrste močerila so heterofilni in eozinofilni granulociti ter njuni programulociti, kot tudi posamezni limfociti in prekurzorske celice. Pri pigmentirani podvrsti močerila zaradi prisotnosti le posameznih limfocitnih in granulocitnih celic ne moremo govoriti o plasteh oz. debelini perihepatičnega mesta in zato tudi ne o hemopoezi. Perihepatično tkivo nepigmentirane podvrste močerila in nektura je kot pri večini ostalih dvoživk granulocitopoetsko tkivo. Ker pa je obsežnost perihepatičnega tkiva pri močerilarjih manjša kot pri ostalih dvoživkah, ki imajo dobro razvito perihepatično tkivo, o pomembni hemopoetski vlogi tega tkiva ne moremo govoriti. Le pri inficiranem osebku pisanega nektura, okuženem s paraziti, so mesta tudi do šest plasti debelega perihepatičnega tkiva in zato primerljiva z dvoživkami, ki imajo dobro razvito perihepatično plast. Limfocitne celice v subkapsularni plasti močerila so lahko del sekundarnega limfoidnega tkiva.

Intersticijska mesta omejujejo hepatične plošče in mnogokrat so vsaj na enem mestu ločena od sinusoidov. Gradniki hemopoetskih mest so pigmentne celice, ki so posamezna ali v skupkih in krvne celice. Intersticijska mesta so najobsežnejša pri nepigmentirani podvrsti močerila, manj obsežna pa pri pigmentirani podvrsti. Pri nekturu ima debelo perihepatično plast in obsežna intersticijska mesta le inficiran osebek. Obsežna intersticijska mesta in številne pigmentne celice so značilnost jeter močerila, kar bi lahko povezali s prilagoditvijo na jamsko okolje.

Intersticijska mesta se razlikujejo po obsežnosti in po številnosti določenega tipa celic tudi med osebki iste vrste. Inficiran osebek nepigmentirane podvrste močerila je imel obsežna mesta, ki so vključevala prekurzorske celice in veliko limfocitov. Podobne celice zapolnjujejo tudi okolne sinusoide in prostore med hepatociti. Ker so bila obsežna mesta z limfociti prisotna preko celotnega intersticijskega in perivaskularnega področja jeter le pri inficiranem osebku, bi lahko sklepali, da gre v tem primeru za obsežno sekundarno limfoidno tkivo, ki je posledica fiziološkega stanja živali. Kljub temu, da so pri močerilarjih v intersticiju programulociti heterofilnih in eozinofilnih granulocitov ter njihove zrele stopnje, pa iz same morfologije ne moremo trditi, da so prekurzorske celice intersticijskih mest samo granulocitopoetska linija. Prekurzorske celice lahko vodijo tudi v druge linije celic. Zato ne moremo popolnoma izključiti trditve Jordana (1932) o eritropoetski in trombopoetski vlogi jeter močerila, niti možnosti, da bi bila lahko jetra močerila primarni limfoidni organ.

V intersticiju pigmentirane podvrste močerila smo opazili tudi celice z majhnim jedrom in eozinofilno homogeno citoplazmo podobno eritrocitni, ali pa je vsebovala vključke in vakuole. Omenjene celice so v tesnem stiku s pigmentnimi celicami. Najverjetneje so degenerirajoči eritrociti.

Perivaskularna mesta v jetrih močerilarjev so obsežna tako pri pisanem nekturu *Necturus maculosus*, kot tudi pri nepigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus anguinus*. Pri pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* so na teh mestih krvne celice maloštevilne. Perivaskularna mesta so obsežna ob robu jeter, kjer je koncentracija žil in žolčnih vodov največja. Razprostirajo se tudi proti notranjosti jeter, kjer se zgostijo ob večjih žilah in žolčnih vodih. Celična sestava perivaskularnih mest je enaka kot v intersticiju jeter. Najobsežnejša perivaskularna mesta so pri inficiranih osebkih.

Rezultati naše raziskave izkazujejo, da so jetra močerilarjev limfoidni organ z granulocitopoetsko vlogo pri nastanku eozinofilnih in heterofilnih granulocitov, vendar v manjšem obsegu, kot je to značilno za ledvice močerilarjev. Izključiti ne smemo možnosti hemopoeze druge vrste. Med različnimi vrstami družine Proteidae so razlike v obsežnosti posameznih hemopoetskih mest v jetrih, kar bi lahko pripisali vrstni specifičnosti. Razlike

med osebki iste vrste močerilarjev pa so najverjetneje posledica fiziološkega stanja in tudi različnih okužb.

### 5.1 PREDLOG ZA NADALJNJE RAZISKAVE

Kljud podrobni raziskavi hemopoeze močerilarjev je ostalo nekaj ključnih vprašanj nerešenih. Glede na morfološke značilnosti prekurzorskih celic ne moremo uvrstiti v točno določeno linijo krvnih celic. Prav tako ne moremo niti zavreči, niti potrditi navedbe Jordana (1932), da je intersticij jeter močerila eritro- in trombopoetski. Navkljub zastopanosti limfocitov, jeter ne moremo opredeliti kot sekundarni ali primarni limfoidni organ. Za rešitev omenjenih dilem bi bila smiselna uporaba imunohistokemijskih metod, pri bodočem tovrstnem proučevanju. S takšno sodobno tehnično izvedbo raziskave jeter močerilarjev bi morda lahko pojasnili pomen tega organa v imunski obrambi in morebitno hemopoetsko vlogo.

## 6 VIRI

### 6.1 CITIRANI VIRI

- Abreu Manso P.P., Brito-Gitirana L., Pelajo-Machado M. 2009. Localization of hemopoietic cells in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Cell Tissue Res.*, 337: 301 – 312
- Alberio Sanny O., Diniz Jose A., Silva Edeline O., De Souza Wanderley, Damatta Renato 2005. Cytochemical and functional characterization of blood and inflammatory cells from the lizard *Ameiva ameiva*. *Tissue and cell*, 37: 193 – 202
- Allender Matthew C., Fry Michael M. 2008. Amphibian hematology. *Vet Clin Exot Anim*, 11: 463 – 480
- Barrett, JR W.C. 1947. Hematopoiesis in the european plethodontid *Hydromantes italicus* with reference to phylogeny. *The Anatomical Record*, 98(2): 127 – 136
- Campbell F.R. 1969. Electron microscopic studies on granulocytopoiesis in the Slender Salamander. *Anat Rec*, 163: 427 – 442
- Cambell F.R. 1970. Ultrastructure of the bone marrow of the frog. *Am J Anat*, 129: 329 – 356
- Cambell T.W. 2004. Hematology of lower vertebrates. 55th annual meeting of the American college of veterinary pathologists & 39th annual meeting of the American society of clinical pathology, 13. nov. 2004. Middleton, WI, USA. American college of veterinary pathologist & American society of veterinary clinical pathology.
- Canifield JP. 1998. Comparative cell Canfield morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust Vet*, 76 (12): 793 – 800
- Chiakulas J.J., Scheving L. E. 1964. Mitotic activity in the hemopoietic cortical zone of the liver of urodele larva. *J Morph*, 114: 361 – 372
- Chegini N., Aleporou V., Bell G., Hilder V. A., Maclean N. 1979. Production and fate of erythroid cells in anemic *Xenopus laevis*. *J Cell Sci*, 35: 403 – 415
- Cross P.C., Mercer KL. 1993. Cell and tissue Ultrastructure: A Functional Perspective. USA, WH Freeman & Co
- Dawson A.B. 1931. Hemopoiesis in *Necturus*. Abstract, *Proc Am Soc Zool. Anat rec*, 51: 72

- Doggett T.A., Wrathmell B., Harris J. E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *J Fish Biol*, 31: 147 – 153
- Foxon G.E.H. 1964. Blood and respiration. V: Physiology of the Amphibia. Moore J. A. (ed.). Academic Press Ny and London: 151 – 209
- Frank G. 1988. Granulopoiesis in tadpoles of *Rana esculenta* survey of the organs involved. *J Anat*, 160: 59 – 66
- Frank G. 1989a. Granulopoiesis in tadpoles of *Rana esculenta*. Ultrastructural observations on the developing granulocytes and on the development of eosinophil granules. *J Anat*, 163 : 97 – 105
- Frank G. 1989b. Granulopoiesis in tadpoles of *Rana esculenta*. Ultrastructural observations on the morphology and development of heterophil and basophil granules. *J.Anat*, 163: 107 – 116
- Glomski C.A., Tamburlin J., Hard R., Chainani M. 1997. The phylogenetic odyssey of the erythrocyte. IV. The amphibians. *Histol Histopathol*, 12: 147 – 170
- Goldblaatt P.J., Hampton J.A., Didio L.N., Skeel K.A., Klaunig J.E. 1987. Morfological an histological analysis of the newt (*Notophthalmus viridescens*). The anatomical record, 217: 328 – 338
- Grasso J.A. 1973. Erythropoiesis in the Newt, *Triturus cristatus laur.* I. Indetification of the erythroid precursor cell. *J.Cell.Sci*, 12: 463 – 489
- Gutierrez C.R., Egami M.I., Antoniazzi M.M., Jared C. 2008. Cytochemistry and morphology of granulocytes of the caecilian *Siphonops annulatus* (Amphibia, Gymnophiona). *Comp Clin Pathol*, 17: 221 – 228
- Hansen J.D., Zapata A.G. 1998. Lymphocyte development in fish and amphibians. *Immunological Reviews*, 166: 199 – 220
- Hightower J.A., Harr J.L. 1975. A light electron microscopic study of myelopoietic cells in the perihepatic subcapsular region of the liver in the adult aqatic newt: *Notophthalmus viridescens*. *Cell Tiss Res*, 159: 63 – 71
- Hightower J., St. Pierre R.L. 1971. Hemopoietic tissue in the adult newt: *Notophthalmus viridescens*. *J Moorph*, 135: 299 – 308

- Ishizeki K., Nawa T., Tachibana T., Sakakur Y., Iida S. 1984. Hemopoietic sites and development of eosinophil granulocytes in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *Cell Tissue Res.*, 235: 419 – 426
- Jordan H.E. 1932. The histology of the blood-forming tissues of the urodele, *Proteus anguineus*. *The American journal of Anatomy*, 51: 215 – 251
- Jordan H. E., Speidel C.C., 1923. Blood cell formation and distribution in relation to the mechanism of thyroid- accelerated metamorphosis in the larval frog. *The Jurnal of Experimental Medicine*, 38: 529 – 541
- Joyce R.A., Chervencik P.A. 1975. Stimulation of granulopoiesis by liver macrophages. *J Lab Clin Med*, 86: 112 – 117
- Kent G.C., Carr Robert K. 2001. Comparative Anatomy of the Vertebrates. 9. izdaja, McGraw-Hill, New York
- Kiernan J.A. 1990. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practise. 2. izdaja, Oxford, Pergamon Press
- López-Ruiz A., Esteban M.A., Meseguer J. 1992. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Light and electron microscopic studies. *The anatomical record*, 234: 161 – 171
- Lužnik M. 2004. Morfologija jeter črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*, Amphibia: Urodela). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.
- Maseguer J., Esteban M.A., Garcia Ayala A., Lopez Ruiz A., Agulleiro B. 1990. Granulopoiesis in the head-kidney of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): An ultrastructural study. *Arch Histo Cyto*, 53 (3): 287 – 296
- Meseguer J., Lozano M.T., Agulleiro B. 1985. Ultrastructure of the renal granulopoietic tissue of the *Rana ridibunda* tadpole. *J Submicrosc Cyto*, 17 (3): 391 – 401
- Mrak P. 2007. Morfologija vranice močerilarjev (Amphibia: Proteidae). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.
- Novak J. Morfološka analiza jeter pri blatnem kužku (*Necturus maculosus*, Amphibia: Urodela). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Oddelek za biologijo, Ljubljana
- Prelovšek P.M. 1999. Morfološka analiza jeter pri močerilu (*Proteus anguinus Laurenti*, Urodela, Amphibia). Diplomska naloga. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo, Ljubljana.

- Prelovšek P.M. 2002. Histokemajska in ultrastruktturna analiza pimentnih celic v jetrih močerila (*Proteus anguinus*, Urodela, Amphibia). Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
- Presnell J.K., Schreibmann M.P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5. izdaja, Baltimore in London, The Josh Hopkins University Press
- Ross M., Kaye G.I., Pawlina W. 2003. Histology: A text and atlas. 4 izdaja, Baltimor, Lippincott Williams & Wilkins
- Sevic M., Uğurtaş İ.H. 2001. The morphology and size of blood cells of *Lacerta rufidis bithynica*. Asiatic Herpetological Research, 9: 122 – 129
- Shin'ya Y., Masakazu K., Yukinori T. 2003. May-Grünwald Giemsa staining properties of granules in tilapia *Oreochromis niloticus* neutrophil. Abstract. Journal of national fisheries university, 51 (3): 79 – 85
- Slonimski P.W. 1941. Die Leber als bludbildendes Organ bei *Ambystoma mexicanum* Cope (Urodela). Anatomischer Anzeiger, 90: 64 – 78
- Sporntz U.M. 1975. Studies of the liver of *Xenopus laevis*: I. The ultrastructure of the peritoneal cover and the perihepatic layer. Anat.Embrio., 146: 265 – 277
- Temkin R.J., Mcmillan D.B. 1986. Gut-associated lymphoid tissue of the goldfish, *Carassius auratus*. J Morphol., 190: 9 – 26
- Tooze J., Davies H.G. 1967. Light and electron microscope studies on the newt *Triturus cristatus* : the fine strucrure of erythropoietic cells. J Cell Sci, 2 : 617 – 640
- Tooze J., Davies H.G. 1968. Light and electron microscopic observations on the spleen and splenic leukocytes of the newt *Triturus cristatus*. Am J.Anat, 123 : 521 – 556
- Tosunoğlu M., Ayaz D., Tok Varol C., Dülger Başaran. 2004. An invstigation on the blood cells of leopard gecko, *Eublepharis angramainyu* (Reptila. Sauria: Eublepharidae), 10: 230 – 234
- Turner R.J. 1988. Amphibians. V: Vertebrate blood cells. Rowley A.F., Ratcliffe N.A. (eds.), Cambridge, Cambridge University Press : 129 – 209
- Vozelj M. 1996. Imunologija. Enciklopedijski priročnik. 1. izdaja, Ljubljana, DZS
- Vozelj M. 2000. Temelji imunologije. 1. izdaja, Ljubljana, DZS. d.d.

## 6.2 DRUGI VIRI

- Azevedo A., Lunardi Orive L. 2003. Cytochemical characterization of eosinophilic leukocytes circulating in the blood of the turtle (*Chrysemys dorsignis*). *Acta histochem.*, 105 (1): 99 – 105
- Barni S., Boncompagni E., Grosso A., Bertone V., Freitas I., Fasola M., Fenoglio C. 2007. Evaluation of *Rana esculenta* blood cell response to chemical stressors in the environment during the larval and adult phases. *Aquatic toxicology*, 81: 45 – 54
- Bielek E., Strauss B., 1993. Ultrastructure of the Granulocytes of the South American Lungfish, *Lepidosiren paradoxa*: morphogenesis and Comparison to other leucocytes. *Jurnal of Morphology*, 218: 29 – 41
- Blackstock N., Pickering A.D. 1980. Acidophilic granular cells in the epidermis of the brown trout, *Salmo trutta L.* *Cell Tissue Re.*, 210: 359 – 369
- Carvalho T.C., Junqueria L.C.U. 1999. Histology of the kidney and urinary bladder of *Siphonops annulatus* (Amphibia-Gymnophiona). *Arch Histol Cytol*, 62 (1): 39 – 45
- Charipper H.A., Dawson A.B. 1928. Direct division of erythrocytes and the occurrence of erythroplastids in the circulating blood of *Necturus*. *The anatomical record*, 39 (3): 301 – 313
- Cooper G.M. 2000. The cell. 2. izdaja, Sunderland (MA), Sinauer associates
- Evans T. 1997. Developmental biology of hematopoiesis. Aplastic anemia and stem cell biology 20: 1115 – 1147
- Galli Stephen J. 2000. Mast cells and basophils. *Curr Opin Hematol*, 7: 32 – 39
- Garcia B.M.S., Leceta J., Fonfria J., Garrido E., Zapata A. 1983. Non- lymphoid cells of the anuran spleen: An ultrastructural study in the natterjack *Bufo calamita*. *The American journal of Anatomy*, 167: 83 – 94
- Gilbert, S.F. 2003. Developmental biology. 7. izdaja, Massachusetts USA, Sinauer Associates, Inc.
- Godin I., Cumano A. 2005. Of birds and mice: Hematopoietic stem cell development. *Int J Dev Biol*, 49: 251 – 257
- Hine P.M., Wain J.M. Composition and ultrastructure of Elasmobranch granulocytes. III. Sharks (Lamniformes). 1987. *J Fish Biol*, 30: 567 – 576

- Ishiiieki K., Nawa T. 1989. Ultrastructural features of the developing eosinophils in bone marrow and spleen of the musk shrew, *Suncus murinus*. J Morph, 202: 425 – 433
- Kralj-Klobučar N. 1991. Differentiation of eosinophilic granulocytes of carp (*Cyprinus carpio L.*) Int. J Dev Bio., 35: 341 – 344
- Palis J., Robertson S., Kennedy M., Wall C., Keller G. 1999. Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development, 126: 50073 – 50084
- Peters G., Schwarzer R. 1985. Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. Dis. Aquat. Org., 1: 1 – 10
- Pitol L.D., Issa Mardegan P.J., Caetano H. F., Lunardi Orive L.. 2007. Morphological characterization of the leukocytes in circulating blood of the turtle (*Phrynobatrachus hilarii*). Int. J Morph, 25(4) : 677 – 682
- Reite Ola B. 1996. The mast cell nature of granule cells in the digestive tract of the pike, *Esox lucius*: similarity to mammalian mucosal mast cells and globule leucocytes. Fish and Shellfish immunology, 6: 363 – 369
- Reiti Ola B. 1997. Mast cells/eosinophilic granule cells of salmonids: staining properties and responses to noxious agents. Fish and Shellfish immunology, 7: 567 – 584
- Rifkind A. Richard, Chui D., Epler H. 1969. An ultrastructural study of early morphogenetic events during the establishment of fetal hepatic erythropoiesis. The journal of cell biology, 40: 343 – 365
- Rocha E., Monteiro R.A.F., Pereira C.A. 1996. The pale-grey interhepatocytic cells of brown trout (*Salmo trutta*) are a subpopulation of liver resident macrophages or do they establish a different cellular type? J Submicrosc. Cytol Patho., 28 : 357 – 368
- Tavian M., Peault B. 2005. Embryonic development of the human hematopoietic system. Int J Dev Biol, 49: 243 – 250
- Wojtaszek J., Adamowicz A. 2003. Haematology of the fire bellied toad, *Bombina bombina L.* Comp Clin Path, 12: 129 – 134
- <http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/MGIEMSA.PDF> (12. maj 2009)

## ZAHVALA

Prva in posebna zahvala velja mojima staršema, mami Lenki in očetu Alojzu, ki sta me vsa leta mojega šolanja podpirala, mi zaupala, me tolažila in spodbujala. Hvala, da sta verjela vame! To je tudi vajina diploma.

Hvala sestri Mojci in nečakinji Tjaši. Tjaša, hvala za tvoje znanje o barvah, filmske večere, številne kritike, kruhke s tuno in filozofske debate ☺.

Najlepše se zahvaljujem asist. dr. Lilijani Bizjak-Mali, za vsestransko pomoč, nasvete pri raziskovalnem delu in pisanju diplomske naloge, predvsem pa za ves vložen trud. Hvala, ker niste obupali nad mano.

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Borisu Bulogu za prijaznost, pregled naloge in vse koristne nasvete.

Hvala recenzentki prof. dr. Veri Ferlan-Marolt za hiter in temeljit pregled in popravo diplomske naloge. Zahvala gre tudi prof. dr. Petru Trontlju za sodelovanje v komisiji.

Posebej bi se rada zahvalila Poloni Mrak za uvajanje in pomoč pri laboratorijskem delu, izdelavi diplomske naloge, spodbudo, iskreno prijateljstvo in vse prežurane vikende. Hvala Tatjani Robič za dolgoletno prijateljstvo in pomoč pri oblikovanju diplome ter Katji Zdešar-Kotnik za pomoč v laboratoriju in vso dobro voljo. Punce, najboljše ste.

Zahvalila bi se rada tudi vsem na Katedri za zoologijo in Oddelku za biologijo, ki so mi pri nalogi pomagali. Hvala dr. Nadi Žnidaršič za strokovne nasvete, doc. dr. Roku Kostanjšku za pomoč pri mikroskopiranju in Jožici Murko Bulič za tolažbo in spodbudne besede.

Na koncu še en velik HVALA vsem prijateljem in prijateljicam, ki mi stojijo ob strani, me poslušajo, pomagajo in predvsem sprejemajo takšno kot sem. Hvala Poloni, Tatjani, Nadji, Andreji L. in Aleksandru ter njunima otročkoma Anji in Žanu, Petri, Andreji R., Urški, vsem sošolkam in sošolcem ter celotnemu kadru veterinarske ambulante Nova Gorica. Slednjim tudi hvala za priložnost.