

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Polona MRAK

**MORFOLOGIJA VRANICE MOČERILARJEV**  
**(Amphibia: Proteidae)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Polona MRAK

**MORFOLOGIJA VRANICE MOČERILARJEV (Amphibia: Proteidae)**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MORPHOLOGY OF THE SPLEEN OF PROTEIDAE  
(Amphibia: Proteidae)**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani in na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Borisa Buloga in za somentorico asist. dr. Lilijano Bizjak - Mali.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Jasna ŠTRUS  
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

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.

Datum zagovora: 22.11.2007

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Polona Mrak

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
DK 591.4:597.6(043.2)=163.6  
KG vranica/Proteidae/svetlobna mikroskopija  
AV MRAK, Polona  
SA BULOG, Boris (mentor)/BIZJAK MALI, Lilijana (somentor)  
KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
LI 2007  
IN MORFOLOGIJA VRANICE MOČERILARJEV (AMPHIBIA: PROTEIDAE)  
TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)  
OP X, 81 str., 2 tab., 52 sl., 58 vir.  
IJ sl  
JI sl/en  
AI S svetlobnim mikroskopom smo raziskali osnovno zgradbo vranice pri močerilarjih, in sicer pri nepigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus anguinus*, pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* in blatnem kužku *Necturus maculosus*. Uporabili smo različna histološka barvanja in histokemijske teste za železo in melanin. Pri nepigmentirani podvrsti močerila smo pripravili tudi razmaze krvi in poltanke rezine vranice. Med celicami v krvi močerila so v največjem številu zastopani eritrociti in trombociti, prisotni pa so tudi eritroblasti ter limfociti, granulociti in monociti. Vranica močerilarjev je podolgovate oblike. Obdana je s tanko vezivno kapsulo, nad katero je enojen sloj mezotelnih celic. Parenhim ima retikularno ogrodje. Večina vranice zavzema rdeča pulpa, ki jo sestavlja celične vrvice in številni sinusoidi. V celičnih vrvicah so limfociti, eritrociti, hemocitoblasti, eritroblasti in pigmentni makrofagi. Sinusoidi so napoljeni s krvnimi celicami, hemocitoblasti in eritroblasti. Kri polni sinusoide in celične vrvice, kar pomeni, da je krvni obtok skozi vranico odprt. Limfoidno tkivo, ki sestavlja belo pulpo, je difuzno razporejeno med rdečo pulpo. Pulpi sta razločni, vendar med njima ni jasne meje. V vranici se skladiščijo zreli eritrociti, poteka pa tudi začetek eritropoeze, ki se lahko dokonča v periferinem krvоžilju. Pigmentni makrofagi se večinoma pojavljajo posamično. V njihovi citoplazmi so lahko fagosomi, siderosomi in melanosomi. V pigmentnih makrofagih vranice močerilarjev poteka razgradnja eritrocitov ter shranjevanje železa, a v manjšem obsegu kot v jetrih. Hemosiderin je prisoten pri vseh poskusnih živalih, več ga je pri stradanih osebkih in pri pigmentirani podvrsti močerila. Pigmentni makrofagi z melaninom so zelo redki, več jih je le pri pigmentirani podvrsti močerila.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC 591.4:597.6(043.2)=163.6  
CX spleen/Proteidae/light microscopy  
AU MRAK, Polona  
AA BULOG, Boris (supervisor)/BIZJAK MALI, Lilijana (co-supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB University of Ljubljana, Biotechnical faculty, Department of Biology  
PY 2007  
TI MORPHOLOGY OF THE SPLEEN OF PROTEIDAE (AMPHIBIA: PROTEIDAE)  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 81 p., 2 tab., 52 fig., 58 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB The basic morphology of the spleen of Proteidae, namely *Proteus anguinus anguinus*, *Proteus anguinus parkelj* and *Necturus maculosus*, was examined by light microscopy. Various histological stains and histochemical tests for iron and melanin were used. Blood smears of *Proteus anguinus anguinus* and semi-thin sections of spleen of *Proteus anguinus anguinus* were also prepared. Erythrocytes and thrombocytes are the most numerous cells in blood of *Proteus anguinus anguinus*, however erythroblasts, lymphocytes, granulocytes and monocytes are also present. The spleen of Proteidae is an elongated organ. It is covered by a thin connective tissue capsule. There is a single layer of mesothelial cells above the capsule. The parenchyma has a reticular framework. The greater part of parenchyma is occupied by red pulp, consisting of cell cords and numerous sinusoids. The cell cords contain lymphocytes, erythrocytes, hemocytoblasts, erythroblasts and pigment macrophages. Blood cells, hemocytoblasts and erythroblasts fill the sinusoids. Blood fills both the sinusoids and the cell cords, which shows that circulation through spleen is open. Lymphoid tissue, representing white pulp, is diffusely distributed through the red pulp. Red and white pulp are distinct areas, although not clearly separated. Storage of mature erythrocytes and the beginning of erythropoiesis, which may continue in the peripheral circulation, are main functions of the spleen. Pigment macrophages mostly appear individually. Phagosomes, siderosomes and melanosomes are present in their cytoplasm. The role of the pigment macrophages in the spleen of Proteidae is destruction of erythrocytes and iron storage, but less extensive as in the liver. Hemosiderin is present in the spleens of all experimental specimens. A greater amount of hemosiderin was detected in the spleens of starving specimens and in *Proteus anguinus parkelj*. Pigment macrophages containing melanin are very rare. They are more numerous in the spleen of *Proteus anguinus parkelj*.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE.....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO TABEL.....</b>	<b>IX</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 VRANICA VRETENČARJEV.....	1
1.2.1 Funkcije vranice .....	2
1.2.2 Zgradba vranice .....	3
1.2.3 Krvni obtok vranice .....	6
1.3 MORFOLOGIJA VRANICE DVOŽIVK .....	8
1.4 VRANICE OSTALIH VRETENČARJEV .....	10
<b>2 MATERIAL IN METODE DELA.....</b>	<b>13</b>
2.1 ŽIVALI, UPORABLJENE ZA RAZISKAVO .....	13
2.2 KRVNI RAZMAZI .....	15
2.2.1 Priprava krvnega razmaza .....	15
2.2.2 Barvanje krvnega razmaza po Giemsi .....	16
2.2.3 Izračun povprečnih dimenzij celic iz krvnega razmaza .....	16
2.3 PRIPRAVA PREPARATOV ZA HISTOLOGIJO .....	17
2.3.1 Fiksacija vzorcev in priprava parafinskih rezin.....	17
2.3.2 Histološka barvanja in histokemijski testi v parafinskih rezinah .....	17
2.3.2.1 Barvanje hematoksilin – eozin.....	18
2.3.2.2 Trikromno barvanje po Massonu .....	18
2.3.2.3 PAS reakcija (Periodic acid Schiff).....	19
2.3.2.4 Barvanje po Perlsu .....	19
2.3.2.5 Barvanje po Masson – Fontani .....	20
2.3.2.6 Srebrova impregnacija za retikulin .....	21
2.3.2.7 Barvanje po Giemsi.....	22
2.4 PRIPRAVA POLTANKIH REZIN.....	22
2.4.1 Fiksacija tkiva in priprava poltankih rezin.....	23
2.4.2 Barvanje poltankih rezin po Richardsonu .....	23
2.5 MIKROSKOPIRANJE .....	23
<b>3 REZULTATI.....</b>	<b>24</b>
3.1 CELICE V KRVNEM RAZMAZU .....	24
3.1.1 Opisi krvnih celic nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) .....	24
3.1.1.1 Eritrociti.....	24
3.1.1.2 Predstopnje eritrocitov .....	24
3.1.1.3 Trombociti .....	25
3.1.1.4 Limfociti.....	25

3.1.1.5	Monociti .....	25
3.1.1.6	Bazofilni granulociti .....	25
3.1.1.7	Eozinofilni granulociti .....	26
3.1.1.8	Nevtro/heterofilni granulociti .....	26
3.1.2	Dimenziije celic iz krvnega razmaza .....	26
3.2	<b>MORFOLOGIJA VRANICE</b> .....	31
3.2.1	Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) ..	31
3.2.1.1	Območja bele pulpe .....	36
3.2.1.2	Rdeča pulpa .....	36
3.2.2	Vranica pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ).....	42
3.2.3	Vranica nektura ali blatnega kužka ( <i>Necturus maculosus</i> ) .....	42
3.3	<b>PIGMENTNI MAKROFAGI VRANICE</b> .....	47
3.3.1	Identifikacija železa .....	49
3.3.1.1	Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus a.</i> ) .....	49
3.3.1.2	Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ) .....	49
3.3.2	Identifikacija melanina.....	53
3.3.2.1	Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus a.</i> ) .....	53
3.3.2.2	Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ) .....	53
3.3.3	Identifikacija železa in melanina v vranici pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ) .....	56
<b>4</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b> .....	<b>57</b>
4.1	CELICE V KRVI .....	57
4.2	MORFOLOGIJA VRANICE.....	61
4.3	PIGMENTNI MAKROFAGI VRANICE .....	66
4.4	SKLEPI.....	72
<b>5</b>	<b>POVZETEK</b> .....	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>VIRI</b> .....	<b>77</b>
6.1	CITIRANI VIRI .....	77
6.2	DRUGI VIRI.....	81

**ZAHVALA**

## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Shema vranične zgradbe pri sesalcih.....	5
<b>Slika 2:</b> Shema odprtega in zaprtega vraničnega krvnega obtoka .....	7
<b>Slika 3:</b> Priprava tankega krvnega razmaza.....	15
<b>Slika 4a-b:</b> Eritroidne celice iz krvi nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Barvanje po Giemsi. (a) Zreli eritrociti so eliptične oblike. (b) Predstopna eritrocita (pod njim je viden del zrelega eritrocita).....	28
<b>Slika 5:</b> Trombocit iz krvi nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Barvanje po Giemsi.....	28
<b>Slika 6a-b:</b> Agranulirana levkocita iz krvi nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Barvanje po Giemsi. (a) Limfocit. (b) Monocit. ....	29
<b>Slika 7a-c:</b> Granulociti iz krvi nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Barvanje po Giemsi. (a) Bazofilni granulocit. (b) Eozinofilni granulocit. (c) Nevrofilni granulocit.....	30
<b>Slika 8:</b> Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ).....	31
<b>Slika 9:</b> Periferni del vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Vranico obdaja tanka kapsula (K) iz kolagenskega veziva (roza), nad katerim so mezotelne celice (MC). Pod kapsulo je nekaj manjših žil (kž) in rdeča pulpa (RP) iz sinusoidov (→) in celičnih vrvic (CV). Vmes je območje bele pulpe (BP) z limfociti in majhnimi krvnimi žilami z debelim ovojem. ....	33
<b>Slika 10:</b> Osrednji del vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Večina je območja rdeče pulpe (RP) s številnimi sinusoidi (→), med katerimi so celične vrvice (CV). V sinusoidih in v vrvicah je veliko eritrocitov (rdeče obarvani). Belo pulpo (BP) predstavljajo posamezna območja med rdečo pulpo, ki vsebujejo limfocite v retikularnem ogrodju in manjše žile (kž), obdane z veliko veziva in obsežnimi svetlimi celicami. ....	33
<b>Slika 11:</b> Retikularno ogrodje v parenhimu vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikulinska vlakna, ki podpirajo celice v parenhimu, so obarvana črno. ....	34
<b>Slika 12a-b:</b> Primerjava anteriornega in posteriornega dela vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje....	35
<b>Slika 13:</b> Območje bele pulpe v vranici nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Retikularne celice (→) raztezajo svoje izrastke okrog retikularnih vlaken. Med retikularno mrežo se nahajajo limfociti (L) in posamezni eritrociti (E). ....	38
<b>Slika 14:</b> Rdeča pulpa vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Rdeča pulpa sestavljajo celične vrvice (CV) in sinusoidi (S). CV so iz retikularnih celic (RC) in vlaken (niso obarvana). Vmes so limfociti (L), eritrociti (E), hemocitoblasti (H) in eritroblasti v različnih stopnjah razvoja (EB). Retikularne celice s svojimi izrastki obdajajo sinusoide. ....	38
<b>Slika 15:</b> Bela pulpa vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Limfoldno tkivo okoli debelostene žile. Retikularne celice (RC) z izrastki tvorijo mrežo, med njimi so limfociti (L). En, endotel žile.....	39

<b>Slika 16:</b> Limfociti v vranici nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. ....	39
<b>Slika 17:</b> Eritrociti v vranici nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. ....	39
<b>Slika 18:</b> Celice, najverjetneje hemocitoblasti, v vranici nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje....	40
<b>Slika 19:</b> Vena (V) tik pod kapsulo (K) v vranici nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje....	40
<b>Slika 20a-c:</b> Krvne žile v parenhimu vranice nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Trikromno barvanje po Massonu. <b>(a)</b> Rdeča pulpa (RP) je prepletena s številnimi sinusoidi (→ ). Vidne so tudi: arterije(A), arteriole(a), vene(V), obdane s kolagenskim vezivom (svetlo modro). Bela pulpa (BP) je območje limfocitov (L), s krvno žilo (kž), okrog nje je veliko kolagenskega veziva (svetlo modro). <b>(b)</b> Arterija v rdeči pulpi. <b>(c)</b> Vena v rdeči pulpi.....	41
<b>Slika 21:</b> Vranica pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Retikularne celice (RC) z izrastki tvorijo mrežo, v njej se nahajajo eritrociti (rdeči), limfociti, hemocitoblasti. V parenhimu je veliko pigmentnih makrofagov (PM), ki vsebujejo melaninski pigment.....	44
<b>Slika 22:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Vranico obdaja kapsula iz kolagenskega veziva (K), nad katerim ležijo mezotelne celice (MC). Pod njo je rdeča pulpa (RP) s sinusoidi in celičnimi vrvicami. Limfociti so razpršeno po celi vranici, mestoma pa se pojavljajo manjša območja, kjer je večja zgostitev limfocitov (L).....	44
<b>Slika 23a-b:</b> Retikularno ogrodje v parenhimu vranice nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikulinska vlakna soobarvana črno.....	45
<b>Slika 24:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Trikromno barvanje po Massonu. Med rdečo pulpo (RP) je območje večje koncentracije limfocitov (L), kjer je tudi zbranih več ven in arterij. Kolagensko vezivo okrog žil je modro obarvano. ....	46
<b>Slika 25:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Med rdečo pulpo (RP) so manjša območja koncentracije limfocitov (L) brez žile v centru. ....	46
<b>Slika 26a-d:</b> Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ), poltanke rezine, barvane z azur (II) metilen modrim. Na slikah od a do d so vidni pigmentni makrofagi z različnimi vključki. <b>(a)</b> Pigmentni makrofag z različnimi vključki: siderosomi (temno rdeči), melanosomi (temno modri), fagosomi, lizosomi. <b>(b)</b> Del eritrocita v makrofagu (→). <b>(c)</b> Pigmentni makrofag, ki v citoplazmi poleg melanosomov in fagosomov vsebuje še maščobne kaplje (svetlo modre). <b>(d)</b> Celica, napolnjena s številnimi svetlimi vakuolami. ....	48
<b>Slika 27:</b> Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ), hranjen osebek. Barvanje po Perlsu. Hemosiderin je modro obarvan. ....	50
<b>Sliki 28a-b:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ), hranjen osebek. Barvanje po Perlsu. <b>(a)</b> V primerjavi z močerilom je tu prisotno manjše število pigmentnih celic (modro). <b>(b)</b> Pigmentna celica (PC) pod večjo povečavo. Histokemijska reakcija za železo je rahlo pozitivna (modro). ....	50
<b>Slika 29a-d:</b> Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ), stradani osebki. <b>a in b</b> Osebek P147, <b>c in d</b> Osebek P177 <b>(a)</b> Barvanje po Perlsu. Pigmentne celice (PC) vsebujejo precejšno količino železa v obliki hemosiderina	

(modro obarvan). <b>(b)</b> Barvanje po Perlsu. Rahlo pozitivna reakcija za železo je tudi v retikularnih celicah (RC). <b>(c)</b> Barvanje po Perlsu. Zelo velika količina hemosiderina pri stradanem osebku. Močno pozitivna reakcija za železo je v številnih skupkih pigmentnih celic (PC) in rahlo pozitivna v retikularnih celicah. <b>(d)</b> Hematoksilin-eozinsko barvanje. Pri stradanem osebku ima vranica v svojih številnih pigmentnih celicah prisoten v veliki večini svetlo rjav hemosiderin. Temno rjavega melaninska pigmenta ni tako veliko. ....	51
<b>Slika 30a-b:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ), stradan osebek. Barvanje po Perlsu. Prisotno je nekaj več hemosiderina (modro) kot pri hranjenem osebku. Temen pigment v pigmentnih celicah je melanin. ....	52
<b>Slika 31a-b:</b> Vranica nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ). Barvanje po Masson-Fontana. <b>(a)</b> Hranjen osebek. Pigmentne celice, ki vsebujejo melanin, so maloštevilne. Melanin je črno oziroma zelo temno rjav obarvan. <b>(b)</b> Stradan osebek. Pigmentne celice se združujejo v skupke. Melanina je malo, prisotna pa je velika količina svetlo rjavega pigmenta (hemosiderin v naravni barvi). ....	54
<b>Slika 32a-b:</b> Vranica nektura ( <i>Necturus maculosus</i> ). Barvanje po Masson-Fontana. <b>(a)</b> Prisotne so le redke pigmentne celice, ki vsebujejo melanin (črno oziroma zelo temno rjav obarvan). <b>(b)</b> Pigmentna celica pod večjo povečavo. Temno obarvan pigment je melanin, svetlo rjav pigment pa je hemosiderin v naravni barvi. ....	55
<b>Slika 33a-b:</b> Vranica pigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ). Barvanje po Perlsu. Pigmentne celice (→) so številne, v citoplazmi je veliko hemosiderina (modro) in melanina (črno). ....	56

## KAZALO TABEL

<b>Tabela 1:</b> Podatki o eksperimentalnih živalih. ....	14
<b>Tabela 2:</b> Povprečne dimenzijske krvnih celic iz krvnega razmaza nepigmentirane podvrste močerila ( <i>Proteus anguinus anguinus</i> ) v μm.....	26

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BP – bela pulpa  
RP – rdeča pulpa  
K – kapsula  
MC – mezotelna celica  
Ko – kolagen  
kž – manjša krvna žila  
A – arterija  
a - arteriola  
V – vena  
v - venula  
S – sinusoid  
CV – celična vrvica  
En – endotel  
mv – mišično vlakno

E – eritrocit  
EB – predstopnja eritrocita, eritroblast  
L - limfocit  
H – hemocitoblast  
T – trombocit  
G - granulocit  
RC – retikularna celica  
PC – pigmentna celica  
PM – pigmentni makrofag  
j – jedro

## 1 UVOD

### 1.1 NAMEN DELA

Pri dvoživkah je osnovna zgradba vranice raziskana predvsem pri brezrepceh (Anura), medtem ko je pri repatih dvoživkah (Urodela) slabše poznana. Z našo raziskavo smo želeli spoznati osnovno organizacijo vranice močerilarjev, med katerimi smo izbrali nepigmentirano podvrsto močerila *Proteus anguinus anguinus* in pigmentirano podvrsto močerila *Proteus anguinus parkelj* ter blatnega kužka *Necturus maculosus*, njihovega sorodnika površinskih voda Severne Amerike. Zgradbo vranice smo primerjali med omenjenimi osebki in z zgradbo pri ostalih vretenčarjih.

Pri odraslih nižjih vrstah vretenčarjev ima vranica poleg limfoidne tudi pomembno hematopoetsko vlogo. Z našo raziskavo smo na nivoju svetlobno mikroskopskega proučevanja želeli spoznati ureditev limfoidnega in hematopoetskega tkiva v tem organu.

Za poikilotermne vretenčarje je za visceralne organe, med drugimi tudi za vranico, značilen ekstrakutaneusni pigmentni sistem. Preverili smo prisotnost hemosiderina in melanina v pigmentnih celicah vranice omenjenih osebkov.

V zgradbi vranice močerilarjev pričakujemo določena odstopanja v primerjavi z zgradbo vranice brezrepcev (Anura) in višjih vretenčarjev, saj naj bi vranica repatih dvoživk (Urodela) imela filogenetsko primitivnejšo organizacijo (Alvarez, 1990). V vranici močerilarjev pričakujemo tudi prisotnost pigmentnih celic, vendar v manjšem obsegu, kot je to značilno za jetra teh osebkov (Prelovšek, 2002).

### 1.2 VRANICA VRETEŇČARJEV

Pri večini vretenčarjev je vranica organ v trebušni votlini, pritrjen na levo stran želodca blizu pankreasa (Pitchappan, 1980; Liem in sod., 2001). Z želodcem jo povezuje del

dorzalnega mezenterija, imenovan gastrosplenični ligament (Kent, 1992). Pri večini rib, repatih dvoživk in plazilcev ima podolgovato obliko, kar je primitivna oblika, pri ostalih vretenčarjih pa je vranica bolj kompaktne zgradbe (Romer, 1956).

Vranični rudiment se embrionalno prvič pojavi kot kondenzacija mezodermalnega mezenhima v mezenteriju blizu rudimenta pankreasa. Ko vranični rudiment prevzame določeno obliko, se oblikujejo kapilare in sinusi (Pitchappan, 1980). Obe, embrionalna kot tudi zrela vranica, kažeta asimetrijo. Predvranično tkivo je sprva simetrično nameščeno na obeh straneh embrija. Lokacija vranice na levi strani telesne osi je posledica prednostnega razvoja vraničnih izvornih celic na levi strani embrija, vsled migracije prekurzorjev ali pa zaradi programirane celične smrti (Patterson in sod., 2000).

### 1.2.1 Funkcije vranice

Vranica je pomemben hematopoetski organ. Pri embrijih vseh vretenčarjev tu nastajajo krvne celice, ta funkcija pa se večinoma ohrani tudi pri odraslih vretenčarjih. Pri sesalcih jo prevzame kostni mozeg (Romer, 1956). Pri dvoživkah sicer nobeno tkivo nima monopolja za produkcijo krvnih celic, je pa vranica večje mesto hematopoeze. Pri nekaterih odraslih brezrepnih se pojavi kot hematopoetsko tkivo tudi kostni mozeg (Turner, 1988). Pri brezrepnih nastajajo vsi granulociti v istem organu, ponavadi v vranici ali ledvicah, pri repatih dvoživkah pa je granulopoeza ločena. Bazofilni granulociti nastajajo v vranici, nevtrofilni in eozinofilni granulociti pa večinoma v jetrih (Cowden in sod., 1964, cit. po Turner, 1988; Cowden, 1965, cit. po Turner, 1988; Hightower in Haar, 1975). Že zelo zgodaj, ko so obravnavali hematopoezo pri močerilarjih (Proteidae), so kot pomembnejše mesto izpostavili vranico. Jordan je leta 1932 pri močerilu (*Proteus anguinus*) ugotovil, da eritrociti in trombociti nastajajo intravaskularno v vranici, bazofilni granulociti ekstravaskularno v vranici (predvsem v subkapsularnem območju), nevtrofilni in eozinofilni granulociti pa v mezonefrosu v intertubularni stromi in v subkapsularnem območju (Jordan, 1932). Tudi pri nekturu (*Necturus*) je diferenciacija eritrocitov in trombocitov omejena na vranico. Največja kopičenja limfogranulopoetskega tkiva nektura so v intertubularnem vezivnem tkivu mezonefrosa. Granulopoetsko tkivo se nahaja še v

perihepatičnem sloju v jetrih, v perikardu, v vezivnem tkivu prebavnega trakta in v velikem maščobnem telesu ventralnega skeletogenega septuma repa (Dawson, 1931).

Vranica vretenčarjev je tudi mesto kopičenja eritrocitov, v določeni meri pa tu poteka še odstranjevanje in razgradnja eritrocitov, za kar so odgovorni številni makrofagi (Romer, 1956). Ti iz hemoglobina obnovijo železo in ga shranijo v obliki feritina ali hemosiderina do ponovne uporabe (Ross in sod., 2003).

Vranica je sekundarni limfatični organ, kjer poteka antigensko odvisna aktivacija limfocitov (Pitchappan, 1980; Manning in Horton, 1982, cit. po Turner, 1988; Alvarez, 1990; Ross in sod., 2003). Je največji sekundarni limfatični organ in edini limfatični organ, ki je vključen v krvni in ne v limfni obtok (Kent, 1992). Izrastki makrofagov, ki segajo v svetline specializiranih vaskularnih prostorov, t.i. sinusoidov, imunološko kontrolirajo kri (Ross in sod., 2003).

Pri poikilotermnih vretenčarjih nekateri visceralni organi, med njimi tudi vranica, vsebujejo tudi celice, ki sintetizirajo melanin. Te celice so del ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema in poleg tega, da so sposobne sinteze melanina, pripadajo makrofagom (Pintucci in sod., 1990; Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998). Za razliko od melanocitov, ki so nevralnega izvora, te celice izhajajo iz hemopoetske linije (Sichel in sod., 1997). Imajo drugačen mehanizem melanogeneze, saj so odkrili druge encimske aktivnosti kot v kožnih melanocitah (Gallone in sod., 2002). V vranici so lahko posamezno ali pa v majhnih skupkih. Poleg črnega melaninskega pigmenta vsebujejo tudi rumen železov pigment, ki nastaja pri fagocitozi in razgradnji eritrocitov. V nekaterih celicah prevladuje eden, v drugih pa drug pigment. Pri dvoživkah se število enih in drugih celic sezonsko spreminja (Scalia in sod., 2004).

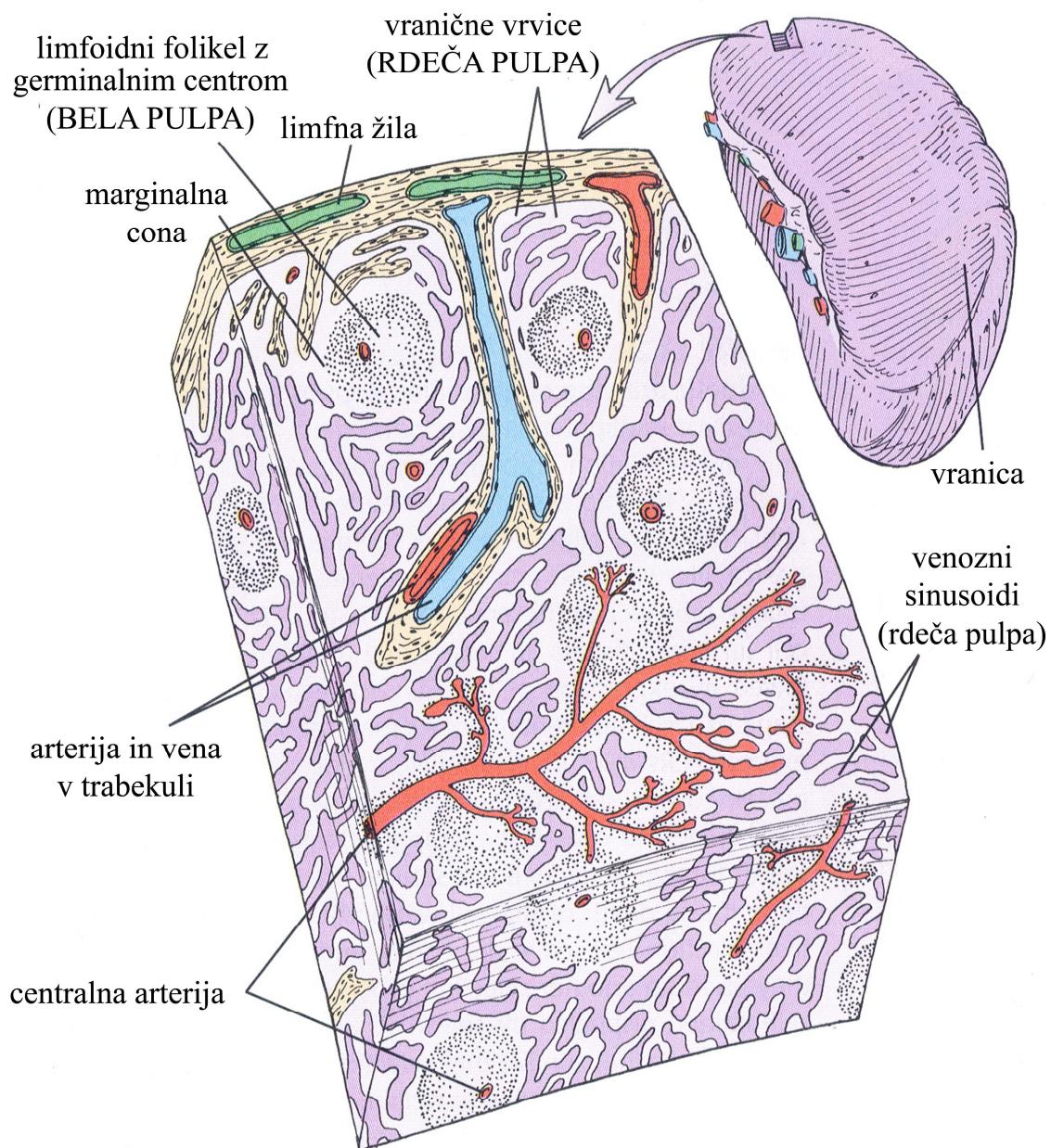
### **1.2.2 Zgradba vranice**

Vranica je v dorzalnem mezenteriju, obdana z vezivno kapsulo (Romer, 1956). Pri bolj razviti vranici se iz kapsule v parenhim razširjajo trabekule, ki so tako kot kapsula iz

gostega vezivnega tkiva in vsebujejo večje žile, lahko tudi gladke mišične celice oziroma miofibroblaste (Ross in sod., 2003). Pri vseh vretenčarjih pa parenhim vsebuje obsežno retikularno mrežo, ki skupaj s kapsulo in trabekulami, če so prisotne, predstavlja ogrodje vranice. V medprostorih te mreže sta prisotni dve funkcionalno in morfološko različni tkivi: bela in rdeča pulpa. Bela pulpa vsebuje skupke limfocitov, rdeča pulpa pa velike skupine vseh krvnih celic, predvsem eritrocitov (Romer, 1956; Ross in sod., 2003). V rdeči pulpi je veliko venoznih sinusoidov. To so posebne sinusoidne žile, obdane samo z endoteljnimi celicami. Med sinusoidi so vranične oziroma celične vrvice, kjer je v mreži retikularnih celic in vlaken veliko število eritrocitov, makrofagov, limfocitov in drugih krvnih celic (Ross in sod., 2003).

Manj organizirana, primitivna vranica, ki jo imenujejo difuzna vranica, nima skupkov limfoidnih celic, ali pa so ti redki in slabo razločni. Limfoidne celice so naključno razmeščene po vsem organu, vendar sta prisotni obe pulpi (Cooper in Wright, 1976, cit. po Alvarez, 1990). Pri vseh primitivnih tetrapodih, posebno pri dvoživkah, so prisotni periarteriolarni limfoidni ovoji - PALS (Murata, 1959, cit. po Welsch in Storch, 1982). Difuzna vranica se med dvoživkami pojavlja predvsem pri repatih dvoživkah in tudi pri nekaterih brezrepcih (Ardavin in sod., 1984, cit. po Alvarez, 1990). Imajo jo tudi sodobne kostnice (Zapata, 1982, cit. po Alvarez, 1990).

V folikularni vranici so limfociti nakopičeni okrog arterij v obliki PALSa in foliklov (sl.1). Folikel nastane pri razširitvi PALSa v eno stran, pri čemer se arterija prestavi v ekscentrični položaj (Ross in sod., 2003). Rdeča in bela pulpa sta oblikovani kot jasni območji, ločeni z razločno marginalno cono (Cooper in Wright, 1976, cit. po Alvarez, 1990). Marginalna cona je jasno viden prehod iz bele v rdečo pulpo, prepoznavna pa je ponavadi po slojih retikularnih celic, pri nekaterih sesalcih pa vsebuje tudi druge celice in celo majhne marginalne sinuse (Garcia Barrutia in sod., 1983; Romano in sod., 1993). Takšna napredna vranica je med dvoživkami bolj izjemna, poznana pri nekaterih brezrepcih, kot sta kremljarka *Xenopus laevis* (Baldwin in Sminia, 1982, cit. po Alvarez, 1990) in pri krastači *Bufo calamita* (Garcia Barrutia in sod., 1983). Značilna je za plazilce (Kroese in van Rooijen, 1982; Saad in Bassiouni, 1993), ptiče in sesalce (Alvarez, 1990; Romano in sod., 1993; Ross in sod., 2003).



Slika 1: Shema vranične zgradbe pri sesalcih (vir: Ross in sod., 2003: 384).

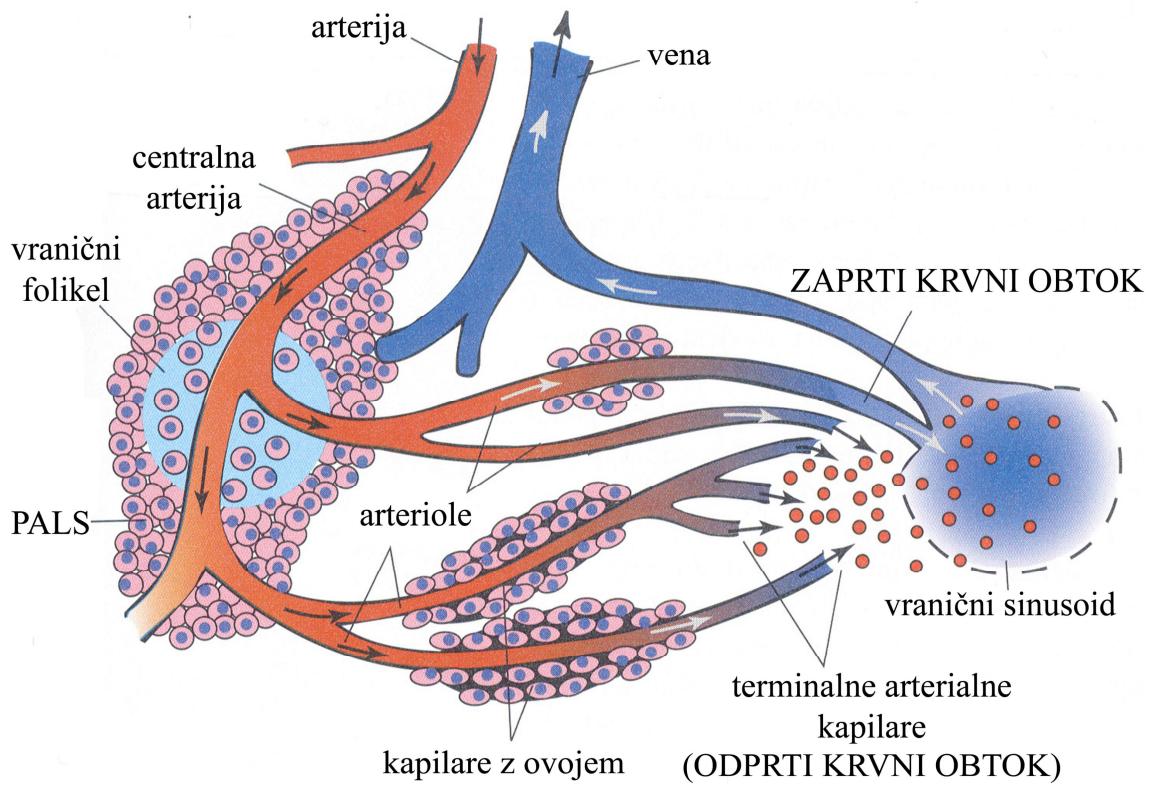
Evolucijski trend od primitivne do napredne bele pulpe je torej od difuzne do koncentrirane ureditve limfocitov v vranici (Cooper in Wright, 1976, cit. po Garcia Barrutia in sod., 1983).

### 1.2.3 Krvni obtok vranice

Arterija, ki oskrbuje vranico, se od hiluma, kjer vstopajo in izstopajo žile, razveja v manjše veje, ki vstopajo v območja bele pulpe, nato pa v bližnjo rdečo pulpo. Arterije se delijo v arteriole, te pa se nadaljujejo v kapilare (Ham in Cormack, 1979). Kapilare se praznijo v retikularno mrežo celičnih vrvic. Kri se preceja skozi celične vrvice in se izpostavlja makrofagom. Nato se skozi steno sinusoidov vrne v krvni obtok. Opisana pot krvi skozi vranico se imenuje odprti krvni obtok (sl.2). Posledično kri polni sinusoide in vrvice rdeče pulpe. Kri je na ta način bolj učinkovito izpostavljena makrofagom (Ross in sod., 2003). Odprti krvni obtok v vranici je opisan pri človeku (Ross in sod., 2003), prisoten pa je še ponavadi pri ribah (Zwillenberg, 1964, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Haider, 1966, cit. po Fänge in Nilsson, 1985) ter pri sleporilih (Welsch in Storch, 1982), repatih dvoživkah in brezrepnih (Sterba, 1950, cit. po Welsch in Storch, 1982).

Pri ostalih vrstah sesalcev ima vranica zaprti krvni obtok, kar pomeni, da gre kri iz arteriolnih kapilar direktno v sinusoide (sl.2).

Zbrana kri v sinusoidih se izliva v venule, vene in nato po vranični veni zapusti vranico skozi hilum (Ross in sod., 2003). Vranična vena se pridruži hepatičnemu portalnemu sistemu (Fänge in Nilsson, 1985).



Slika 2: Shema odprtega in zaprtega vraničnega krvnega obtoka (vir: Ross in sod., 2003: 387).

### 1.3 MORFOLOGIJA VRANICE DVOŽIVK

Vranica je med dvoživkami najbolj raziskana pri brezrepcih (red *Anura*). V primerjavi z repatimi dvoživkami in sleporili ima bolj jasno omejena območja bele pulpe (Manning, 1991).

Alvarez (1990) je pri žabi vrste *Rana perezi* opisal zgradbo vranice, glavnega hematopoetskega organa skozi celo življenje žabe. Določil je, da ima značilnosti difuzne vranice, kjer so limfoidni skupki redki, neizraziti in brez arterijskih žil. Limfoidni skupki so po celiem organu, njihova meja z rdečo pulpo pa je slabo prepoznavna. Trabekul ni, notranje ogrodje tvori le retikularna mreža. Rdeča pulpa deli v dve nejasno ločeni območji, kar nismo zasledili nikjer drugje v literaturi. Oba dela vsebuje krvne sinusoide. Večji del rdeče pulpe, ki ima večjo celično gostoto, vsebuje limfocite, granulocite in monocite ter deleče in razvijajoče se eritroidne celice, torej je mesto hematopoeze. Preostali del ima manjšo celično gostoto in vsebuje posebne retikularne celice, ki so fagocitne, zato je predvideval, da v tem delu poteka razgradnja krvnih celic. Po celi vranici so prisotni makrofagi in pigmentne celice z melanosomi ter makrofagne-pigmentne celice v velikih skupkih, ki imajo vlogo v katabolizmu eritroidnih celic. Pulpi sta torej razločni, ni pa jasne meje med njima, zato vranica žabe vrste *Rana perezi* predstavlja prehodno stanje med primitivnim in naprednejšim tipom (Alvarez, 1990).

Precej drugačna in bolj razvita je vranica male krastače *Bufo calamita*, ki so jo raziskali Garcia Barrutia in sod. (1983). Pulpi sta popolnoma razločljivi med sabo in ločeni z izrazito marginalno cono iz sploščenih retikularnih celic. Bela pulpa je v obliki limfoidnih foliklov okoli ekscentrično nameščenih arterij, kar ustreza folikularnemu modelu vranice. Trabekul ne omenjajo. Večjo pozornost so namenili retikularnim celicam, makrofagom in celicam, podobnim dendritskim. V obeh pulpah so celice, podobne dendritskim. To so ogromne, nepravilne celice s številnim izrastki, ki tvorijo kontakte z limfociti in plazma celicami, ne kažejo pa fagocitognih sposobnosti. Primerjajo jih s podobnimi celicami, opaženimi v vranici kremljarke *Xenopus laevis* (Sterba, 1951, cit. po Garcia Barrutia in sod., 1983; Manning, 1971, cit. po Garcia Barrutia in sod., 1983), ki so jih imenovali XL

celice (Baldwin in Cohen, 1981). Pripisujejo jim vlogo pri lovljenju antigenov na površini njihovih izrastkov. Prosti makrofagi v obeh pulnah pa so sposobni fagocitoze. Makrofagi v rdeči pulpi vsebujejo tudi celične fragmente eritroidnih celic, njihovi izrastki pa segajo tudi v svetlino sinusoidov, med njihove mejne celice (Garcia Barrutia in sod., 1983).

Bolj dovršeno zgradbo bele pulpe med dvoživkami ima krempljarka *Xenopus laevis* (Garcia Barrutia in sod., 1983). To velja tudi za njen celoten imunski sistem, ki ima veliko značilnosti skupnih s sesalčjim (Flajnik in sod., 1987, cit. po Manning, 1991). Vsaka regija bele pulpe je jasno omejena z dvojnim slojem podaljšanih celic. Izven te strukture se razpršeni limfociti nepravilno razširjajo v rdečo pulpo, t.i. perifolikularno cono. Centralna arteriola se cepi v kapilare, ki se podajajo do periferije folikla in mejnega sloja ter se praznijo v perifolikularno območje rdeče pulpe (Sterba, 1951, cit. po Manning, 1991).

Pri redovih sleporilov (*Apoda*) in repatih dvoživk (*Urodea*) je vranica podolgovat organ, ki ima relativno slabe razmejitve med rdečo in belo pulpo (Manning, 1991).

Hightower in St. Pierre (1971) sta raziskala hematopoetska tkiva, med drugim tudi vranico, pri odraslem pupku vrste *Notophthalmus viridescens*. Zanimivo je, da sploh ne omenjajo rdeče in bele pulpe, ampak vranico razdelijo na korteks in medulo. V korteksu so prevladujoči eritrociti in tkivne mast celice. V meduli so majhni in veliki limfociti in njihove razvojne stopnje, vendar limfocitnih foliklov ni. Trombociti so bolj pogosti v meduli, proste retikulo-endotelne celice, s fagocitiranim materialom v citoplazmi, pa v korteksu (Hightower in St. Pierre, 1971). Po opisu sodeč je vranica pri tem pupku najprimativnejša med dvoživkami.

Tudi Tooze in Davies (1968) sta vranico velikega pupka *Triturus cristatus* razdelila na notranjo in zunanjo regijo. Zunanja regija je rdeča pulpa, kjer poteka eritropoeza. Gradijo jo venozni sinus, obdani z retikularnim ogrodjem, ki imajo v notranjosti skupke rdečih krvnih celic v različnih stopnjah razvoja, in tudi druge celice krvožilja. Med sinusoidi so območja retikularnih celic in vlaken, makrofagov ter rdečih in belih krvnih celic. Notranja regija vranice je bela pulpa. Ta vsebuje rahlo razmeščena retikularna vlakna in retikularne celice, ki obdajajo mase limfocitov in nekaj eritrocitov. Vezivno tkivo se razširja v

notranjost kot trabekule, ki se povežejo z retikularno mrežo (Tooze in Davies, 1968). Pri nobeni drugi obravnavani dvoživki vranica ne vsebuje trabekul.

Vranica sleporilov, primitivnih dvoživk (red Apoda), predstavlja vmesni nivo razvoja med dvoživkami (Welsch in Storch, 1982). Rdeča in bela pulpa sta ločeni, kar pa za nekatere repate dvoživke ne velja (Hartmann, 1933, cit. po Welsch in Storch, 1982). Meja med njima je prepoznavna, vendar ni jasna kot pri nekaterih brezrepcih (Sterba, 1950, cit. po Welsch in Storch, 1982). Sinusoidi so omejeni z zelo tankim endotelom brez prekinitev. V celičnih vrvicah se nahajajo enake celice kot v svetlinah sinusoidov, poleg teh pa še pigmentne in plazma celice. Tako kot pri repatih dvoživkah (Hartmann, 1933, cit. po Welsch in Storch, 1982), je sinusoide težje razlikovati od venul in kapilar. Poleg krvnih celic omenjajo tudi 'blast' celice, pigmentne celice z rjavim endogenim pigmentom in makrofage z eritrocitnimi fragmenti v citoplazmi. V vranici sleporilov nastajajo limfociti, trombociti in eritrociti, za granulopoezo pa ni dokaza, čeprav so prisotne vse tri vrste granulocitov. Te so namreč lahko prispele iz krvnega obtoka. Belo pulpo predstavljajo arteriole, obkrožene z gostim ovojem limfocitov, prisotne pa so še posamezne retikularne celice, makrofagi in plazma celice. To so periaortični ovoji (PALS), ni pa foliklov (Welsch in Storch, 1982).

#### 1.4 VRANICE OSTALIH VRETEŃCARJEV

Fänge in Nilsson (1985) sta obravnavala vranico rib, med drugimi tudi z vidika primerjalne anatomije. Obloustke nimajo vranice, imajo pa vranici podobna limfohematopoetska tkiva v črevesju (Fujii, 1981, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Tanaka in sod., 1981, cit. po Fänge in Nilsson, 1985). Pljučarice imajo vranico znotraj želodčne stene in spiralne cevi črevesja (Jordan in Speidel, 1931, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Rafn in Wingstrand, 1981, cit. po Fänge in Nilsson, 1985).

Pri ostalih vretenčarjih je vranica samostojen organ. Hrustančnice imajo veliko vranico glede na velikosti telesa, v primerjavi z vranico sesalcev (Arvy, 1965, cit. po Fänge in

Nilsson, 1985). Pri himerah (Holocephali) je vranica povezana s pankreasom in leži prosto v peritonealni votlini (Fänge in Sundell, 1969, cit. po Fänge in Nilsson, 1985).

Pri ostalih ribah je vranica organ z ločeno žilno in živčno oskrbo (Fänge in Nilsson, 1985). Nahaja se blizu želodca v dorzalnem mezenteriju. Morski psi imajo podaljšano vranico z režnji. Skati imajo relativno majhno, sploščeno okroglo vranico (Fänge in Nilsson, 1985). Bela pulpa pri hrustančnicah je dobro razvita, posebno okoli arterij. Toda periarterialno limfoidno tkivo ni tako jasno obrobljeno kot pri vranici sesalcev in ptičev, tudi germinalnih centrov ni (Fänge in Mattisson, 1981, cit. po Fänge in Nilsson, 1985).

Pri sodobnih kostnicah (Teleostea) je vranica manjši organ glede na velikost telesa v primerjavi z vranico hrustančnic. Zgradba vranice sodobnih kostnic je zelo različna. Ponavadi ni izrazitih trabekul. Parenhim vsebuje enake elemente kot pri drugih vretenčarjih: krvne žile, elipsoide, rdečo pulpo, limfoidno tkivo (belo pulpo), makrofage. Rdeča in bela pulpa nista tako jasno omejeni kot pri homeotermnih vretenčarjih (Fänge in Nilsson, 1985). Bela pulpa je slabo razvita in vsebuje difuzne sloje limfoidnega tkiva, ki lahko obdajajo arterije in melanomakrofagne centre ter limfocite, ki so raztreseni po celotnem parenhimu (Murata, 1959b, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Zapata, 1982, cit. po Fänge in Nilsson, 1985).

Med plazilci razporeditev in razmerje rdeče in bele pulpe v vranici precej varirata (Pitchappan, 1980). Saad in Bassiouni (1993) sta primerjala vranico agame in peskorila. Agama *Agama stellio* ima difuzno organizirano vranico, kjer je bela pulpa slabo razvita, limfoidni skupki so po celiem organu, folikli pa so redki oziroma jih ni. Poleg tega med pulpama ni jasne meje in vranica nima trabekul. Rdeča pulpa, ki prevladuje in ima manjšo gostoto celic kot bela, ima retikularne celice s fagocitozno sposobnostjo. V obeh pulpah so razporejeni makrofagi in pigmentne celice, pigmentni makrofagi pa so povezani v velike skupke. Pikasti peskoril *Chalcides ocellatus* iz družine skinkov pa ima folikularno organizacijo vranice, kar pomeni, da je limfoidno tkivo okoli arteriol (limfoidni folikli) jasno ločeno od rdeče pulpe. Vendar pa jasno vidnega območja med pulpama ni. Trabekule so prisotne, vendar le v zunanjem področju parenhima (Saad in Bassiouni, 1993). Zapata in sod. (1981) so raziskali limfoidno tkivo v vranici želve *Mauremys caspica*. Parenhim ima

dobro ločeni pulpi, z jasno vidno marginalno cono iz podaljšanih retikularnih celic. Trabekule so prisotne. Drobnejše razvejitve arteriol se praznijo direktno v sinusoide, kar pomeni, da je krvni obtok zaprt. Sinusoidi v rdeči pulpi so omejeni s sploščenimi celicami. Želve imajo dve vrsti limfoidnega tkiva. Periarteriolarno limfoidno tkivo (PALS) je okoli arterij z mišično steno in ima večjo celično gostoto, perielipsoidalno limfoidno tkivo (PELS) pa je okoli arteriol, ki pri razvejitvi izgubijo mišično komponento v steni. PELS ima manjšo gostoto limfocitov, ker je med njimi več dendritskih makrofagov kot v PALSu. Te arteriole obkrožajo koncentrični sloji retikularnih celic in vlaken, ki povečajo debelino stene (Zapata in sod., 1981). Podobno morfologijo brezmišičnih žil ima tudi vranica ptičev (Hoshi, 1972, cit. po Zapata in sod., 1981). Pri njih je PELS bursa-odvisen, PALS pa timusno odvisen (Cooper in sod., 1965, cit. po Zapata in sod., 1981). Možno je, da tudi v vranici želve obstajata dve različni populaciji limfocitov (Zapata in sod., 1981). Pitchappan (1980) pravi, da se med evolucijo s prihodom plazilcev pojavi selektivna prostorska razporeditev različnih populacij limfocitov in odvisnost periarteriolane regije od timusa.

Morfologija vranic ptičev in sesalcev je precej podobna. Kot inovacije v vranici homeotermnih vretenčarjev se pojavijo kopiranje limfocitov okrog arterij, pojav kompaktnih foliklov bele pulpe, odvisnost periarteriolarne regije od timusa in pojav germinalnih centrov (Pitchappan, 1980). PALSi (periarteriolarni limfoidni ovoji) so regije T limfocitov, folikli pa B limfocitov. Germinalni centri so območja v foliklih, kjer poteka proliferacija in aktivacija B limfocitov (Ross in sod., 2003).

## 2 MATERIAL IN METODE DELA

### 2.1 ŽIVALI, UPORABLJENE ZA RAZISKAVO

V naši raziskavi smo uporabili vranice živali, ki so bile v večini žrtvovane že za predhodne raziskave skupine za Funkcionalno morfologijo vretenčarjev na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete. Za histološke analize smo uporabili vranice 16 osebkov nepigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus anguinus*, dveh osebkov pigmentirane podvrste močerila *Proteus anguinus parkelj* in štirih osebkov blatnega kužka *Necturus maculosus* (tabela 1). Osebki nepigmentirane podvrste močerila so bili veliki med 18 in 28 cm in težki med 9 in 33 g. Večina osebkov je bilo samic, en osebek je bil juvenilen. Deset osebkov je bilo ujetih v Planinski jami (Planina, Slovenija), eden v Otovškem bregu (Otovec, Slovenija), trije v Grčarskih ravnah in dva v Krupi (tabela 1). Osebka pigmentirane podvrste močerila sta bila oba samca, dolga okoli 25 cm in težka 21 in 23 g. Ujeta sta bila v izviru Jelševnik v Beli Krajini (tabela 1). Osebki nektura so bili dobavljeni iz Severne Karoline, ZDA. Med našimi osebki sta bili dve samici in dva samca, dolžine od 29 do 33 cm in teže od 112 do 162 g (tabela 1). Vse živali so bile vzdrževane v speleološkem laboratoriju Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete, v akvarijih z vodnimi črpalkami in filtri, pri stalni temperaturi 10°C. Hranjene so bile enkrat tedensko s postranicami (Crustacea: Amphipoda), trije osebki nepigmentirane podvrste močerila in en osebek nektura so bili stradani. Močerili so bili v stalni temi, nekturi pa v dnevno - nočnem ciklu (8 ur svetlobe/ 16 ur teme).

**Tabela 1:** Podatki o eksperimentalnih živalih.

oznaka osebka	spol	lokaliteta	dolžina živali (cm)	teža živali (g)	teža vranice (g)	datum ulova / uvoza	datum fiksacije	hranjen/stradan
P 144	♂	Planinska jama	21,9	16,13	/	14.10.99	18.10.99	hranjen
P 145	♀	Planinska jama	26,2	22	/	14.10.99	18.10.99	hranjen
P 146	♀	Planinska jama	23,5	17,5	/	14.10.99	11.11.99	hranjen
P 147	♀	Planinska jama	27	18,8	/	18.12.98	12.04.00	stradan 16 mesecev
P 150	♀	Otoški breg	28	33	/	27.10.00	27.10.00	hranjen
P 168	♀	Planinska jama	25,7	21,26	0,049	24.11.03	26.11.03	hranjen
P 169	♀	Planinska jama	24,3	19,95	0,039	24.11.03	26.11.03	hranjen
P 173	/	Planinska jama	21	11,387	0,022	24.11.04	06.12.04	hranjen
P 175	♂	Planinska jama	25,5	21,695	0,030	24.11.04	20.12.04	hranjen
P 176	♀	Planinska jama	24,3	15,3	0,028	24.11.03	28.01.05	stradan
P 177	♀	Planinska jama	25	11,398	0,026	24.11.03	19.05.05	stradan
P 179	♀	Grčarske ravne	24	19,126	/	28.08.05	08.11.05	hranjen
P 180	♂	Grčarske ravne	20	~ 15	/	08.11.05	15.11.05	hranjen
P 181	♀	Grčarske ravne		13,33	/	/	06.12.05	hranjen
P 186	/	izvir reke Krupe	24,1	25,85	0,03	06.10.06	06.11.06	hranjen
P 187	♀	Krupa	18,0	9,05	0,019	06.10.06	06.11.06	hranjen
Č 12	♂	Jelševnik	24,7	21,45	0,044	03.06.02	23.09.03	hranjen
Č 13	♂	Jelševnik	25,3	23,624	0,050	18.09.03	03.12.03	hranjen
N 18	♂	ZDA	33	162,4	/	april 1999	20.05.03	hranjen
N 19	♂	ZDA	30	125,3	/	april 1999	20.05.03	hranjen
N 20	♀	ZDA	29	118,1	/	april 1999	20.05.03	hranjen
N 21	♀	ZDA	29,5	112,4	/	april 1999	20.05.03	2 meseca stradan, 1 mesec hranjen

**Legenda k tabeli 1:** P – nepigmentirana podvrsta močerila, Č – pigmentirana podvrsta močerila, N – nektur, / - ni podatka.

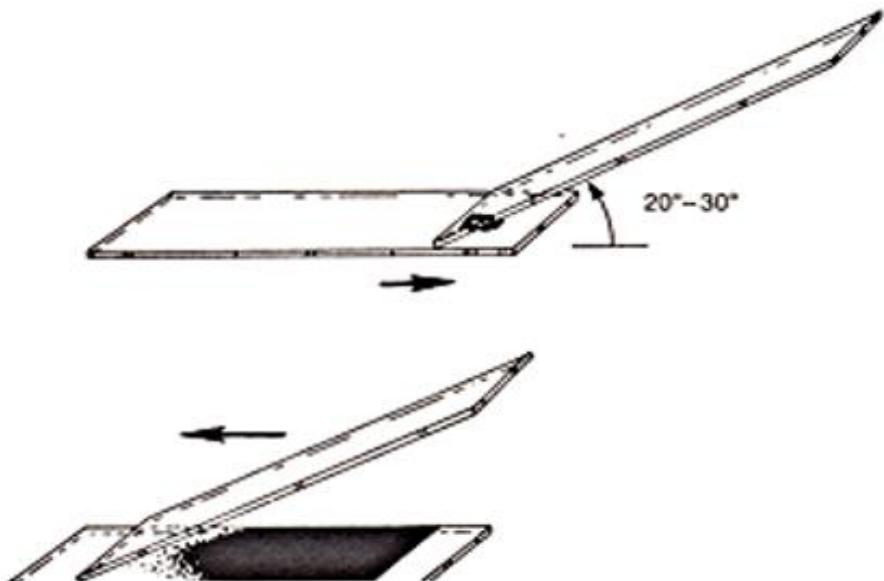
Vse analize smo opravili na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete.

## 2.2 KRVNI RAZMAZI

Da bi lažje prepoznali krvne celice v vranici, smo najprej pregledali krvne celice iz krvi nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Naredili smo krvne razmaze dveh osebkov (P 186 in P 187), ki sta bila žrtvovana v času naše raziskave.

### 2.2.1 Priprava krvnega razmaza

Objektna stekelca smo 24 ur namakali v detergentu, nato smo jih sprali pod vodo, obrisali, očistili s 95% alkoholom in do suhega posušili. Svežo kapljo krvi smo kapnili na desni rob objektnega stekelca. Levo od kaplje krvi smo pod kotom  $20^{\circ} - 30^{\circ}$  postavili drugo stekelce, ga povlekli na desno do krvi in nato proti levi do konca objektnega stekla (sl.3). Ta postopek je potrebno izvršiti precej hitro, saj kri zelo hitro koagulira. Nato smo razmaz posušili na zraku.



Slika 3: Priprava tankega krvnega razmaza (vir: Presnell in Schreibman, 1997).

Razmaze, ki smo jih barvali še isti dan, smo pred barvanjem fiksirali v metanolu, razmaze, ki smo jih nameravali barvati kasneje, pa smo fiksirali v 95% alkoholu za 5 minut, nato sprali v vodi in posušili na zraku.

### 2.2.2 Barvanje krvnega razmaza po Giemsi

Barvanje po Giemsi je nevtralno barvanje, kar pomeni, da je barvilo mešano in vsebuje anionsko (ezin) in kationsko komponento (azur in metilen modro). Uporablja se v hematologiji. Barvilu Giemsa dodamo glicerol in metanol, da je stabilno (Kiernan, 1990). To je barvanje, ki diferencialnoobarva krvne celice. Jedra se obarvajo modro do vijolično. Citoplazma eritrocitov se obarva roza, limfocitov in monocitov svetlo modro do lila, zrnca bazofilnih granulocitov temno vijolično, nevtrofilnih granulocitov vijolično in eozinofilnih granulocitov rdeče do oranžno.

#### Priprava barvila:

Najprej smo zmešali založno Giemsa raztopino. Vzeli smo 2 g Giemsa prahu in ga zmešali s 132 ml glicerola. Mešanico smo dobro premešali in jo v zaprti steklenici postavili za 2 uri v pečico na 60°C. Nato smo dodali 132 ml absolutnega metanola, rahlo pomešali, ohladili in stresali.

Za barvanje krvnih razmazov smo založno Giemsa raztopino razredčili s 40 volumnov destilirane vode. Barvali smo 20 minut, splknili z vodo in posušili na zraku. Da bi preparati ostali trajni, smo jih za 2 minuti potopili v ksilen, vendar so ostali nepokriti.

### 2.2.3 Izračun povprečnih dimenziј celic iz krvnega razmaza

Na mikroskopskih slikah krvnih razmazov smo s pomočjo meritca izmerili premere krvnih celic in za posamezne vrste krvnih celic izračunali povprečne premere (d). Iz povprečnih premerov smo izračunali površine celic (S) po formulah:

- pri okroglih oblikah:  $S = \pi \cdot r^2$ ,  $r = d/2$  (polmer)

- pri elipsoidnih oblikah:  $S = \pi \cdot r_1 r_2$ ,  $r_1 = d_1/2$ ,  $r_2 = d_2/2$  (krajši in daljši polmer).

Ker se med eritropoezo velikost jedra znatno spreminja, smo pri eritroblastih in eritrocitih poleg dimenzij celic izmerili tudi dimenzije njihovih jeder. Podatki so podani v tabeli 2.

## 2.3 PRIPRAVA PREPARATOV ZA HISTOLOGIJO

### 2.3.1 Fiksacija vzorcev in priprava parafinskih rezin

Vranice so bile fiksirane v različnih fiksativih, v 10% formalinu, v Holland-Bouin fiksativu in Helly fiksativu. Helly fiksativ je priporočljiv za hematopoetska tkiva. Poleg formaldehida vsebuje še živosrebrov klorid, kalijev dikromat in natrijev sulfat. Po fiksaciji so bila tkiva ustrezno spirana in dehidrirana v rastoti alkoholni vrsti. Sledilo je bistrenje v ksilenu (2 krat 1h) in infiltracija s paraplastom (2 krat 2 h 30 min). Ta postopek je potekal v avtomatski histokineti na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Parafinske vzorce smo rezali z mikrotomom znamke Reichert Jung 2040, debelina rezin je bila 5 µm. Rezi so bili večinoma vzdolžni, nekaj pa tudi prečnih.

### 2.3.2 Histološka barvanja in histokemijski testi v parafinskih rezinah

Prisotnost posameznih kemijskih sestavin celice lahko kvalitativno ugotavljamo s pomočjo histokemijskih reakcij, ki nam omogočajo njihovo identifikacijo in lokalizacijo v histološkem preparatu. Osnova vseh histokemijskih reakcij je specifična vezava barvila na določeno kemijsko substanco v preparatu. Ta substanca je bodisi fiziološka sestavina celice ali pa nastane v prvem delu reakcije iz molekul, ki so v celici prisotne.

Preparate smo barvali z vodotopnimi barvili, zato je bilo treba iz rezin odstraniti hidrofobni parafin in jih ponovno hidrirati. Pred barvanjem smo iz rezin s ksilenom najprej odstranili parafin (2 krat po 3 minute), rezine smo nato prenesli v propanol (2 krat po 3 minute), ter

jih hidrirali preko padajoče etanolne vrste (96% in 70% etanol; v vsakem 2 krat po 3 minute) do destilirane vode. Po končanem barvanju smo vse rezine najprej sprali z destilirano vodo in nato dehidrirali v 70% in 96% (v vsakem 2 krat po nekaj sekund), jih prenesli v propanol (2 krat po nekaj sekund) in zbistrili v ksilenu (2 krat nekaj sekund ali dlje). Na koncu smo na vsako stekelce kapnili Pertex in ga prekrili s krovnim stekelcem.

### 2.3.2.1 Barvanje hematoksilin – eozin

Hematoksilin – eozin (H&E) je zelo razširjena tehnika splošnega histološkega barvanja. Hematoksilin je bazično barvilo inobarva jedra modro vijolično, eozin pa je kislo barvilo in obarva citoplazmo roza do rdečkasto. To je preprosta metoda, s katero pa ne moremo določiti kemijske sestave celic (Kiernan, 1990).

Hidrirane preparate smo prenesli v Weigertov železov hematoksilin za 1.5 minute in sprali v tekoči vodi. Jedra smo za nekaj sekund diferencirali s solno-kislom alkoholom (iz 70% etanola in koncentrirane HCl) in sprali z destilirano vodo. Sledilo je barvanje z eozinom za 3 minute, dehidracija, bistrenje in prekrivanje.

### 2.3.2.2 Trikromno barvanje po Massonu

To je selektivno barvanje za kolagen, razkrije nam drobna kolagenska in retikularna vlakna ter bazalne lamine (Kiernan, 1990). Kolagen se obarva modro, jedra modro-črno, citoplazma opekasto do rožnato rdeče, eritrociti rdeče ter mišična vlakna rdeče.

Hidrirane preparate smo 0.5 do 1 minute barvali z Weigertovim železovim hematoksilinom in sprali v tekoči vodi. Za razbarvanje vezivnih vlaken smo preparate prelili z 1 % ocetno kislino (nekaj sekund) in temeljito sprali z vodovodno vodo. Stekelca smo za 3.5 minute potopili v prefiltirano mešanico raztopine A (vsebuje kisli fuksin) in B (vsebuje ponceau de xylidine) v razmerju 1 : 2 in sprali z destilirano vodo. Vezivna vlakna smo razbarvali z 1 % fosfor molibdensko kislino in brez izpiranja preparate prenesli v raztopino C (vsebuje

anilinsko modrilo) za 30 sekund ter jih stresali. Nato smo preparate sprali z destilirano vodo, prelili z 1 % ocetno kislino, dehidrirali s 96% alkoholom, bistrili s ksilenom in prekrili.

#### 2.3.2.3 PAS reakcija (Periodic acid Schiff)

S PAS reakcijo pozitivno reagira veliko snovi: ogljikovi hidrati, kisli in nevtralni mukopolisaharidi, glikolipidi, mukoproteini, glikoproteini, hipofizni gonadotropini in tirotropini, nenasičeni lipidi, fosfolipidi itd. (Presnell in Schreibman, 1997). S perjodno kislino oksidativno cepimo vez med ogljikovima atomoma v molekuli sladkorja. Nastane dialdehid, ki reagira s Schiffovim reagentom in seobarva rdeče-vijolično (pozitivna reakcija) (Presnell in Schreibman, 1997). Polisaharidi (npr. glikogen) ostanejo pri predhodni obdelavi z amilazo razbarvani (kontrola).

Hidrirane preparate smo 15 minut oksidirali v 0,5 % perjodni kislini in dobro sprali z destilirano vodo. Potem smo jih za 15 minut inkubirali v Schiffovem reagentu in 20 minut spirali pod vročo tekočo vodo (rdeča obarvanost rezin). Jedra smo obarvali modro z Mayerjevim hematoksilinom (1 minuto) in sprali z destilirano vodo. Preparate smo dehidrirali, bistrili in prekrili. Nekaj preparatov smo predhodno obdelali z 1 % raztopino diastaze (amilaze) v fosfatnem pufru (1 uro pri 37°C), nato pa barvali po zgoraj opisanem postopku.

#### 2.3.2.4 Barvanje po Perlsu

To je histokemijski test, pri katerem feri ion ( $Fe^{3+}$ ), ki se nahaja v hemosiderinu (iz njega ga sprostimo s klorovodikovo kislino), vežemo s kalijevim ferocianidom v netopno modro oborino, v železov ferocianid. Železovi pigmenti se pri tem barvanju obarvajo zeleno modro, jedra rdeče in ostali celični elementi svetlo rdeče in roza (Kiernan, 1990; Presnell in Schreibman, 1997).

Hidrirane preparate smo za 40 minut potopili v sveže pripravljeno Perlsovo raztopino, ki jo pripravimo iz enakih deležev 2% kalijevega ferocianida in 2% klorovodikove kisline, pripravljenih v destilirani vodi. Postopek poteka v temi. Sledilo je spiranje v destilirani vodi ter barvanje jeder z barvilm Kernechtrot (5 minut). Preparate smo sprali v destilirani vodi, dehidrirali, bistrili in jih prekrili.

### 2.3.2.5 Barvanje po Masson – Fontani

Osnova Masson-Fontana metode je značilnost nekaterih fenolnih substanc in derivatov tirozina, da reducirajo srebrove raztopine v kovinsko srebro. Takšno lastnost ima tudi melanin, kar je osnova njegove identifikacije po tej metodi. Zaradi redukcije se na melaninskih granulah nalaga kovinsko srebro, zaradi česar se le-te obarvajo močno črno. Jedra se z barvilm Kernechtrot obarvajo rdeče do roza.

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

Fontana raztopino pripravimo po sledečem postopku: 20 ml 10% raztopine srebrovega nitrata po kapljicah dodajamo koncentrirano raztopino amoniaka, dokler ne ostane le nekaj delcev precipitata. Nato dodamo 20 ml destilirane vode in pustimo stati čez noč v temni steklenici. Pred uporabo jo prefiltriramo.

Hidrirane parafinske rezine smo najprej tretirali 10 minut v lugolni raztopini (gram iodin) in spirali 3 minute pod tekočo vodo. Nato smo jih razbarvali v 5% natrijevem tiosulfatu (2 minuti). Po nekaj minutah spiranja pod tekočo vodo smo rezine pustili čez noč v Fontana raztopini v temnem prostoru. Naslednji dan smo vzorce dobro sprali z destilirano vodo, jih 3 minute tretirali z 0.2% zlato kloridno raztopino ( $AuCl$ ), sledilo je ponovno spiranje z destilirano vodo, tretiranje s 5% natrijevim tiosulfatom (2 minuti), spiranje pod tekočo

vodo (5 minut) ter kontrastiranje z barvilom Kernechtrot (5 minut). Rezine smo nato po klasični metodi dehidrirali, zbistrili v ksilenu in prekrili.

Kot negativno kontrolo smo uporabili rezine tkiva, ki smo jih predhodno 24 ur tretirali s 10% vodikovim peroksidom, Masson-Fontana reakcija na tako tretiranem vzorcu je negativna.

#### 2.3.2.6 Srebrova impregnacija za retikulin

Ta metoda temelji na značilnosti aldehidnih skupin ogljikovodikov v retikulinu, da reducirajo in precipitirajo srebro. Tkivo je najprej oksidirano, potem senzibilizirano z železovim alumom, tega pa nadomesti srebro. Temno rjavo 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 rjavo (Ham in Cormack, 1979).

Objektna stekelca, ki smo jih kasneje barvali po tej metodi, smo pred rezanjem potopili v mešanico raztopine želatine in krom kalijevega sulfata ( $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2$ ) (Boyd, 1955, cit. po Presnell in Schreibman, 1997) in s tem zagotovili, da so rezine po barvanju ostale na stekelcu.

Srebrovo raztopino smo pripravili po naslednjem postopku: 10% srebrevemu 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 rezine smo prenesli za 5 minut v sveže pripravljeni kalijev permanganat, v katerega smo dodali 3% žveplovo kislino. Stekelca smo na hitro splaknili z vodo in jih tretirali z 1% oksalno kislino. Po 2 minutah smo jih splaknili z destilirano vodo in nato sprali pod tekočo vodo. Sledilo je 10 minutno tretiranje 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 jih za 1 minuto prenesli v 10% formalin. Potem smo stekelca najprej oprali v vodovodni vodi in nato v destilirani. Sledilo je 2 minutno tretiranje z 0.2% zlato kloridno raztopino (AuCl), hitro spiranje z destilirano vodo in 2 minutno tretiranje s 5% natrijevim tiosulfatom. Nato smo stekelca dobro oprali v vodovodni vodi in jih splaknili z destilirano vodo. Sledilo je še barvanje jeder z barvilm Kernechtrot (5 minut), spiranje v destilirani vodi, dehidracija skozi naraščajočo vrsto alkoholov, bistrenje v ksilenu in prekrivanje stekelc.

#### 2.3.2.7 Barvanje po Giemsi

Za hematopoetska tkiva je barvanje po Giemsi uporabno zato, ker diferencialno obarva krvne celice.

Založno Giemsa raztopino smo zmešali iz 2,25 g Giemsa prahu, 125 ml absolutnega metanola in 125 ml glicerola. Raztopino smo 5 do 10 minut stresali in jo pustili stati čez noč. Pri tej metodi je pomemben tudi pH delovne raztopine. Naredili smo dve delovni raztopini z različnim pH:

- A raztopina: 5 ml Giemse raztopine v 65 ml destilirane vode, pH = 4.8 do 5.2
- B raztopina: 4 kapljice Giemsa raztopine v 65 ml destilirane vode, pH = 6.5 do 6.8

Polovica hidriranih stekelc smo prenesli v delovno Giemsa raztopino A za 2 uri, polovica stekelc pa v delovno raztopino B do naslednjega dne. Potem smo preparate razbarvali z 1% ocetno kislino, nato smo jih prenesli v 96% etanol, bistrili v ksilenu in jih prekrili.

### 2.4 PRIPRAVA POLTANKIH REZIN

Naredili smo poltanke rezine nekaj vranic nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanke rezine smo naredili predvsem zato, da bi ugotovili, katere celice se nahajajo v vranici in da bi dobili bolj natančne podatke o lastnostih teh celic.

#### 2.4.1 Fiksacija tkiva in priprava poltankih rezin

Koščke tkiva smo fiksirali 3 ure v fiksativu Karnovsky z osmolarnostjo 307 mOsmol/kg. Karnovsky je mešanica 0,5 % paraformaldehida in 1,15 % glutaraldehida v 0,05 M kakodilatnem pufru (pH 7,4). Tkivo smo izpirali v izpiralni tekočini (0,05 M kakodilatni pufer in 0,25 M saharoza) z osmolarnostjo 307 mOsmol/kg (dve menjavi: čez noč in še 2 uri). Sledila je postfiksacija v 2 % OsO<sub>4</sub> s fericianidom (2 uri in 30 minut v temi pri sobni temperaturi). Tkivo smo nato izpirali v destilirani vodi (tri menjave po 10 minut). Nato smo tkivo dehidrirali v 50 %, 70 %, 90 % in absolutnem alkoholu (v vsakem dve menjavi po 15 minut, v absolutnem alkoholu še dodatno 30 minut). Sledilo je vklapljanje v vklopni medij Spurr (ERL), najprej v mešanici absolutnega alkohola in ERL (1 : 1) dvakrat po 15 minut, nato v samem ERL (tri menjave: eno uro, nato čez noč in ponovno eno uro). Polimerizirali smo v sveže pripravljenem ERL pri 70°C (čez noč).

Vklopljeno tkivo smo rezali na 0,5 µm debele rezine (poltanke rezine) s steklenimi noži na ultramikrotomu Reichert Ultracut. Rezine smo polagali na kapljico destilirane vode na objektnem stekelcu in jih raztezali pri temperaturi termoplošče 96°C.

#### 2.4.2 Barvanje poltankih rezin po Richardsonu

Po vsaj polurnem sušenju na termoplošči smo rezine najprej pokapali z 1% perjodno kislino (5 minut na sobni temperaturi) in sprali z destilirano vodo. Nato smo preparate barvali z barvilom Azur II Methylen blue (3 minute na vroči termoplošči), ponovno sprali z destilirano vodo in posušili.

### 2.5 MIKROSKOPIRANJE

Histološke preparate in poltanke rezine smo pregledovali s svetlobnim mikroskopom OPTON – Axioskop Zeiss in fotografirali z digitalnim fotoaparatom Nikon Coolpix 4500. Fotografije smo obdelali z računalniškim programom Adobe Photoshop 6.0.

### 3 REZULTATI

#### 3.1 CELICE V KRVNEM RAZMAZU

Za lažje prepoznavanje krvnih celic v vranici smo najprej naredili krvne razmaze nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), jih barvali po Giemsi in opisali v njih prisotne krvne celice. Najbolj pogoste in prepoznavne celice so bili eritrociti, našli pa smo tudi nekaj njihovih predstopenj ter veliko trombocitov. Med levkociti je bilo največ limfocitov in granulocitov ter nekaj monocitov.

##### 3.1.1 Opisi krvnih celic nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*)

###### 3.1.1.1 Eritrociti

Eritrociti so eliptične oblike (sl. 4a). Nekateri so precej podaljšani, drugi malo manj. Jedro je majhno, ovalno in centralno nameščeno. Obarvano je temno modro. Kromatin je zelo kondenziran. Citoplazma je homogena in polna hemoglobina, zato je eozinofilna – obarvana roza. Eritrociti so v krvi v veliki večini. Med krvnimi celicami ima eritrocit največjo površino. Ta povprečno znaša  $1054,9 \mu\text{m}^2$ , daljši premer pa blizu  $50 \mu\text{m}$  (tabela 2).

###### 3.1.1.2 Predstopnje eritrocitov

V primerjavi z zrelim eritrocitem sta celica in jedro njihovih predstopenj bolj okrogle, citoplazme je manj, jedro je večje (sl. 4b). Citoplazma je obarvana modro do vijolično. Jedro je centralno nameščeno in obarvano svetlo modro. Ta celica ustreza opisu bazofilnega eritroblasta. Citoplazma je pri bazofilnem eritroblastu zaradi številnih ribosomov bazofilna.

### 3.1.1.3 Trombociti

Celica in jedro trombocitov sta rahlo ovalna, včasih tudi bolj okrogla (sl. 5). Jedro je za razliko od citoplazme veliko, obarvano je temno modro. Na dveh nasprotnih koncih celice je količina citoplazme malo povečana, drugje jo je manj. Robovi celic niso gladki, ampak imajo majhne izrastke. Trombociti so manjše krvne celice, s povprečno površino  $306,3 \mu\text{m}^2$  in so le malo večji od najmanjših krvnih celic, limfocitov (tabela 2).

### 3.1.1.4 Limfociti

Jedro limfocitov je okroglo, obarvano temno modro, okrog njega pa je tanek ovoj citoplazme (sl. 6a). Ta je obarvana temno modro do vijolično. Limfociti so med krvnimi celicami najmanjši, njihova povprečna površina je  $289,5 \mu\text{m}^2$  (tabela 2).

### 3.1.1.5 Monociti

Celica monocitov je okrogle oblike. Jedro je ekscentrično, ovalno do okroglo, obarvano svetlo modro in zavzema precejšen del celice (sl. 6b). Citoplazma je šibko bazofilna, svetlejša kot jedro in je vidna le na eni strani celice. Monociti so poleg eritroidnih celic in granulocitov ene izmed večjih krvnih celic, s povprečno površino  $460 \mu\text{m}^2$  (tabela 2). V krvi smo jih našli redko.

### 3.1.1.6 Bazofilni granulociti

Citoplazma bazofilnih granulocitov je polna vijolično obarvanih velikih bazofilnih zrn, ki prekrivajo okroglo jedro (sl. 7a). Celica je nepravilno okrogla, zrna tik pod plazmalemo oblikujejo površino celice. Oblika celice je lahko tudi bolj ovalna in nepravilna.

### 3.1.1.7 Eozinofilni granulociti

Jedro eozinofilnih granulocitov je lobulirano, ponavadi z dvema ali tremi režnji, obarvano svetlo modro (sl. 7b). Velika eozinofilna zrnca v citoplazmi so oranžne do rdeče barve. Oblika celice je okroglja, lahko tudi ovalna. Eozinofilni granulociti so med levkociti največji, njihova povprečna površina znaša  $615,8 \mu\text{m}^2$  (tabela 2).

### 3.1.1.8 Nevtro/heterofilni granulociti

Jedro nevtrofilnih granulocitov je zelo lobulirano, obarvano svetlo modro (sl. 7c). Citoplazma in zrnca so slabo obarvane – nevtrofilne. Zrnca so majhne v primerjavi z zrnici drugih granulocitov. Celica je ponavadi pravilno okrogla in najmanjša med granulociti, s povprečno površino  $419,1 \mu\text{m}^2$  (tabela 2). Nevtrofilni granulociti so se v krvnih razmazih pojavljali najbolj pogosto od granulocitov.

## 3.1.2 Dimenzijs celic iz krvnega razmaza

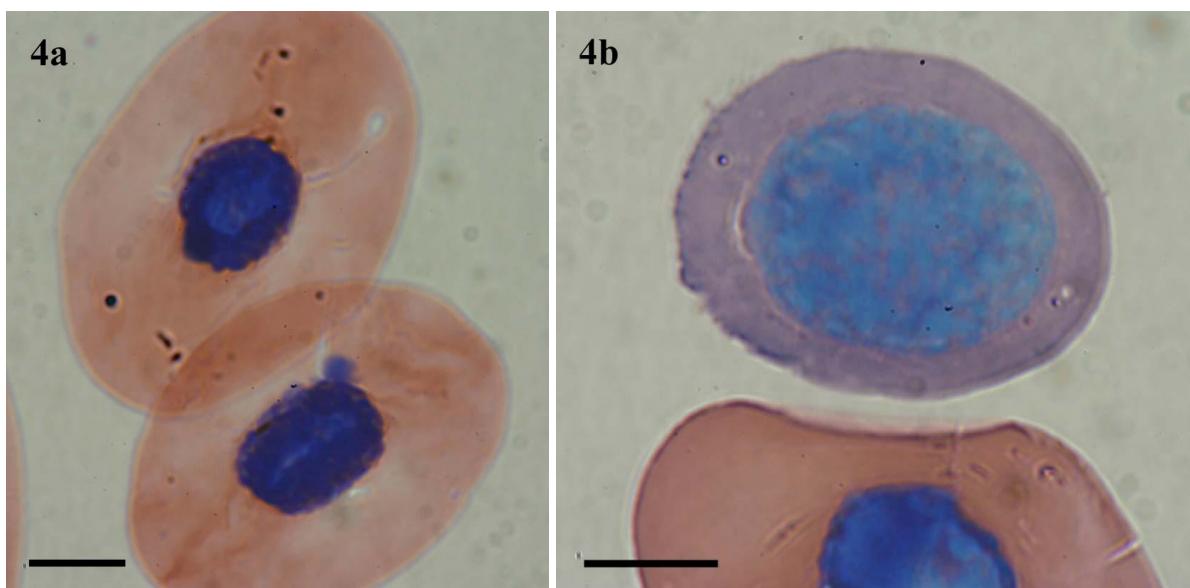
**Tabela 2:** Povprečne dimenzijs krvnih celic iz krvnega razmaza nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) v  $\mu\text{m}$ .

Celica	Premer celice - d oz. d <sub>1</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Krajši premer celice – d <sub>2</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Površina celice - S ( $\mu\text{m}^2$ )	Daljši premer jedra – j <sub>1</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Krajši premer jedra – j <sub>2</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Površina jedra ( $\mu\text{m}^2$ ) - S <sub>j</sub>
<b>Eritrocit</b>	49,2	27,3	1054,9	17,8	12,1	169,2
<b>Eritroblast</b>	33,0	23,1	598,7	21,8	17,4	297,9
<b>Trombocit</b>	20,1	19,4	306,3			
<b>Limfocit</b>	19,2		289,5			
<b>Monocit</b>	24,2		460,0			
<b>Nevtro/heterofilni granulocit</b>	23,1		419,1			
<b>Eozinofilni granulocit</b>	28,0		615,8			
<b>Bazofilni granulocit</b>	27,3	25,0	536,0			

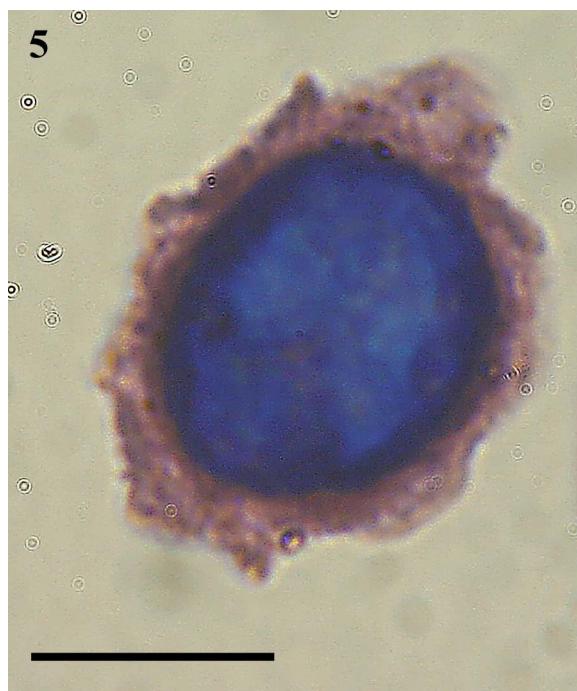
Pri zoritvi eritroblasta v eritrocit se premer in s tem površina celice povečujeta, jedro pa se manjša in je tudi vedno bolj kondenzirano. Razmerje med daljšim in krajšim premerom celice ( $d_1: d_2$ ) je pri eritroblastu povprečno 1.43, jedra ( $j_1: j_2$ ) pa 1.25. Pri eritrocitu je  $d_1: d_2$  povprečno 1.8,  $j_1: j_2$  pa 1.47. To pomeni, da se med eritropoezo celica in jedro podaljšuje.

Dimenzijske eritroblastov so bile precej različne, saj so bili v različnih zrelostnih stopnjah. Površina največjega zgodnjega eritroblasta je bila  $735,1 \mu\text{m}^2$ , njegovega jedra pa  $494,8 \mu\text{m}^2$ . Površina največjega poznega eritroblasta pa je znašala  $1184,4 \mu\text{m}^2$ , torej več kot pri povprečnem zrelem eritrocitu. Med eritroblaste smo ga uvrstili zaradi slabo eozinofilne citoplazme ter predvsem zaradi svetlega, bolj nekondenziranega in velikega jedra s površino  $325,2 \mu\text{m}^2$ .

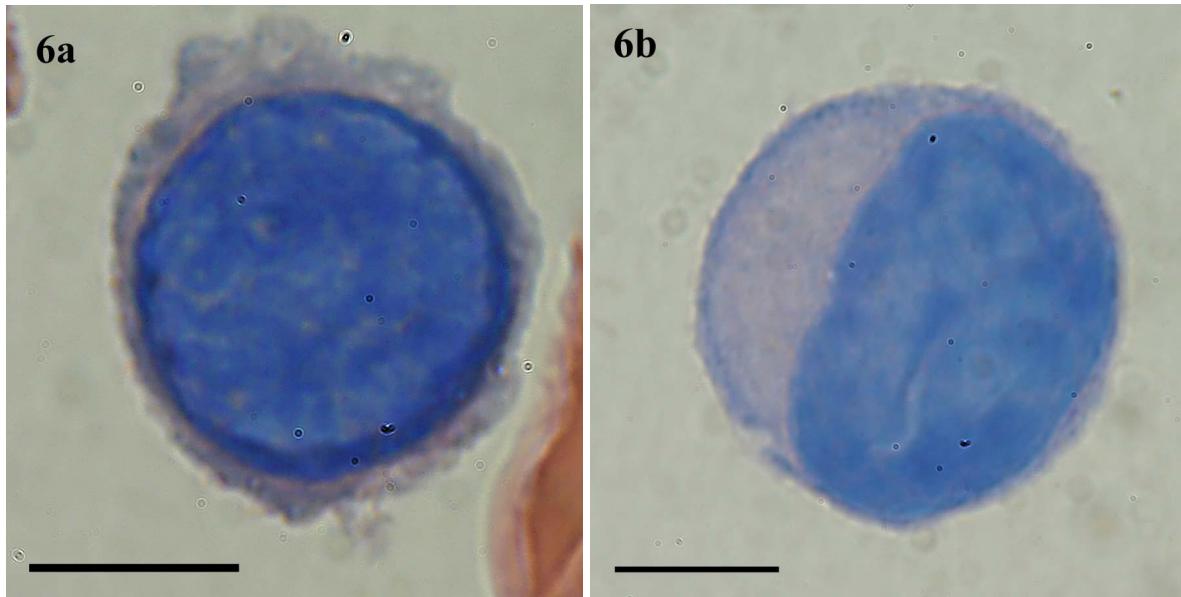
Precej različne so tudi oblike in dimenzijske zrelih eritrocitov. Daljši premer ( $d_1$ ) znaša od 41 do  $60 \mu\text{m}$ , krajši ( $d_2$ ) pa od 18 do  $37 \mu\text{m}$ .



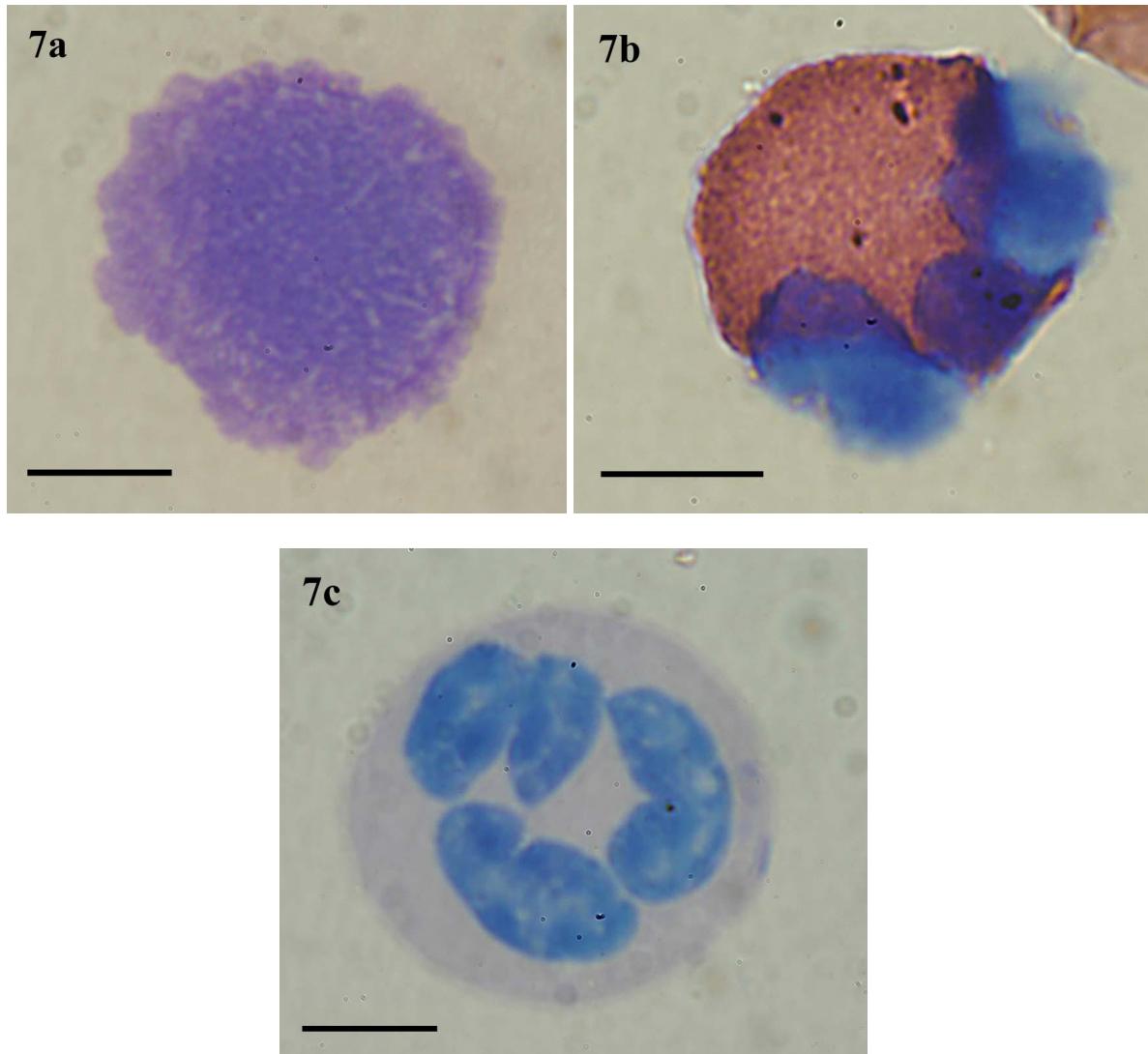
**Slika 4a-b:** Eritroidne celice iz krvi nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje po Giemsi. (a) Zreli eritrociti so eliptične oblike. Jedro je majhno, ovalno, centralno nameščeno, obarvano temno modro. Kromatin je zelo kondenziran. Citoplazma je eozinofilna. (b) Predstopnja eritrocita (pod njim je viden del zrelega eritrocita). V primerjavi z zrelim eritrocitom sta celica in jedro bolj okrogla, citoplazme je manj, jedro je večje. Citoplazma je bazofilna. Jedro je centralno nameščeno in zaradi manj kondenziranega kromatina obarvano svetlo modro. Merilo: 10µm.



**Slika 5:** Trombocit iz krvi nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje po Giemsi. Celica in jedro sta ovalna, včasih tudi bolj okrogla. Jedro je glede na citoplazmo veliko, obarvano je temno modro. Na dveh nasprotnih koncih celice je količina citoplazme malo povečana, drugje jo je malo. Merilo: 10 µm.



**Slika 6a-b:** Agranulirana levkocita iz krvi nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje po Giemsi. **(a)** Limfocit. Jedro je okroglo, zaradi zelo kondenziranega kromatina obarvano temno modro, okrog njega pa je tanek ovoj citoplazme, ki je bazofilna in zato obarvana temno modro do vijolično. **(b)** Monocit. Celica je okrogle oblike. Jedro je ekscentrično, ledvičasto do okroglo, obarvano svetlo modro in zavzema precejšen del celice. Citoplazma je na enem delu celice bolj obširna, je šibko bazofilna in svetlejša kot jedro. Merilo: 10 µm.



**Slika 7a-c:** Granuloci iz krvi nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje po Giemsi. (a) Bazofilni granulocit. V citoplazmi so številna bazofilna zrnca, ki prekrivajo okroglo jedro. (b) Eozinofilni granulocit. Jedro je segmentirano, ponavadi z dvema ali tremi segmenti, obarvano svetlo modro. Citoplazma je oranžna do rdeča in vsebuje velika eozinofilna zrnca. (c) Nevtrofilni granulocit. Jedro je zelo segmentirano, obarvano svetlo modro. Citoplazma in zrnca so nevtrofilna in zato slabo obarvana. Merilo: 10 µm.

### 3.2 MORFOLOGIJA VRANICE

#### 3.2.1 Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*)

Vranica leži v plevroperitonealni votlini in je podolgovat organ, povprečne dolžine 2 cm in debeline 1 mm. Opazili smo variacije v zunanjem izgledu vranic pri različnih osebkih, ki se nanašajo predvsem na posteriorni del, ki je bodisi močno odebeljen (debeline 2 do 3 mm) ali pa močno zožen (sl. 8). Pri nekaterih osebkih so imele vranice še dodatne priveske, kot je razvidno s slike 8.

anteriorno



posteriorno

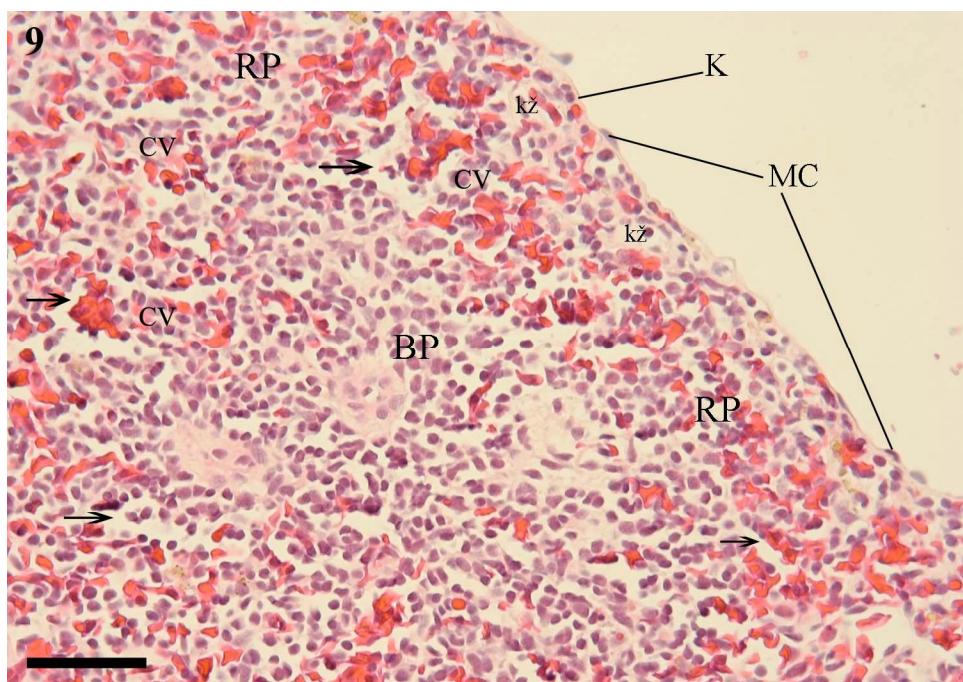
**Slika 8:** Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Merilo: 1 mm.

Vranico obdaja tanka kapsula iz vezivnega tkiva (sl. 9). V vezivu so kolagenska vlakna in celice kolagenskega veziva, verjetno fibroci in fibroblasti. Nad njo je enojen sloj podolgovatih mezotelnih celic, ki so del peritoneja. Parenhim vranice je razdeljen v rdečo in belo pulpo, med katerima ni jasne meje. Marginalne cone nismo opazili. Ogrodje obeh pulp predstavljajo retikularne celice in vlakna (sl. 11).

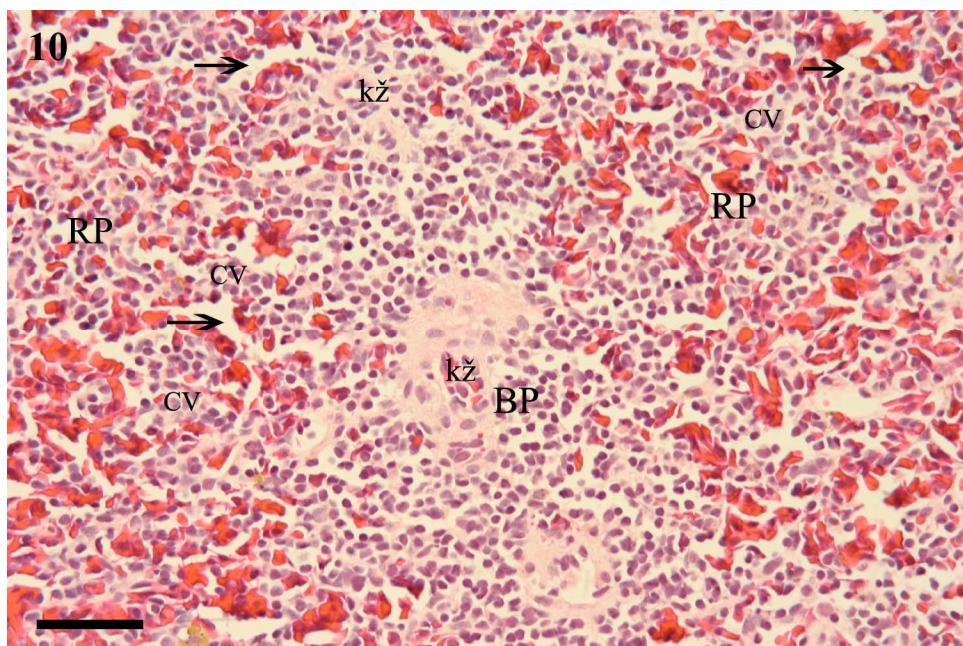
Na kapsulo ponavadi meji rdeča pulpa, v katero segajo posamezni kolagenski snopi, tipičnih trabekul ni (sl. 9). Rdeča pulpa zavzema tudi večino preostalega parenhima vranice in je prepletena s številnimi sinusoidi, med katerimi so celične vrvice. Prav tako je v njej veliko eritrocitov (sl. 10). Belo pulpo predstavljajo posamezna območja med rdečo pulpo, v katerih so predvsem limfociti v retikularnem ogrodju, vmes pa so ponavadi vidne majhne krvne žile z debelim vezivnim ovojem (sl. 9, 10).

Pri vranicah, ki imajo v posteriornem delu kratek predel debelejšega premra kot ostali del vranice, smo opazili razlike v histološki zgradbi (sl. 12a in b).

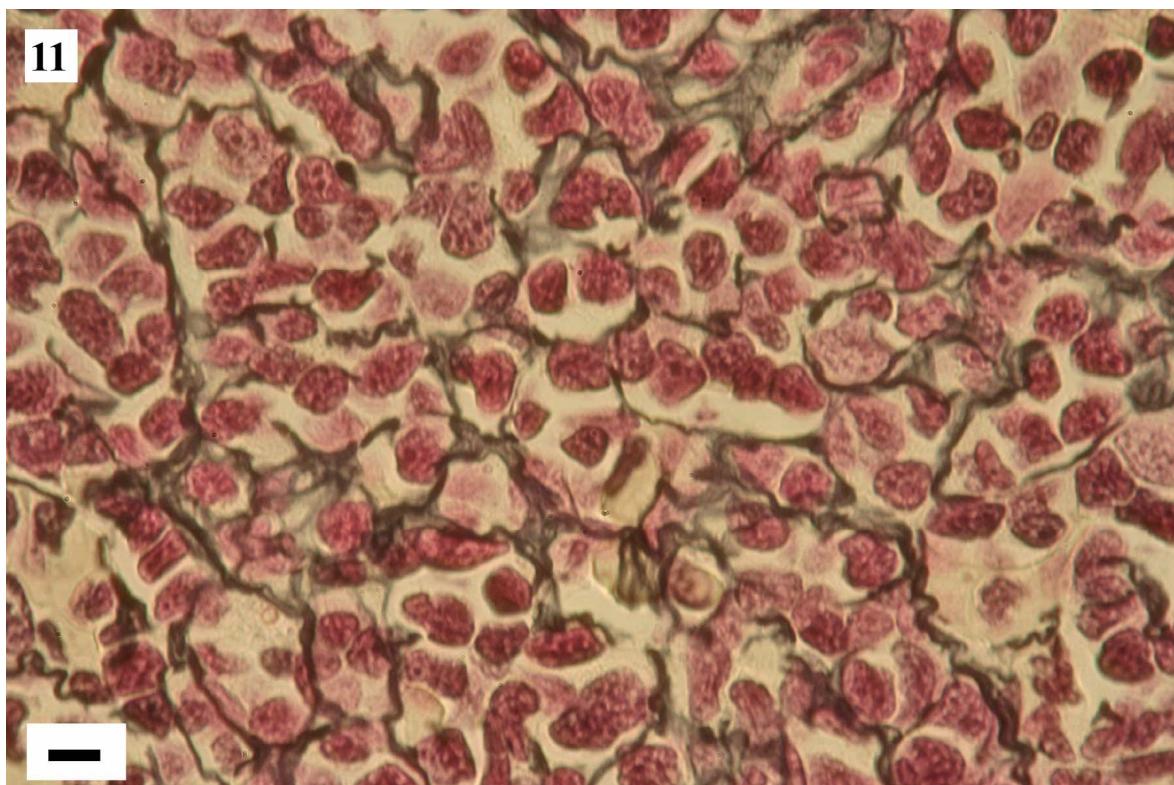
V ožjih predelih vranice je gostota celic manjša in sinusoidi so bolj prazni, vsebujejo manj krvi (sl. 12a). Manj je tudi kolagenskega veziva, kapsula pa je po celotnem obsegu zelo tanka. Vranica je v debelejšem predelu bolj kompaktna, gostota celic je večja in sinusoidi so bolj napolnjeni s krvjo (sl. 12b). Predvsem na periferiji je več kolagenskega veziva. Kapsula je debelejša.



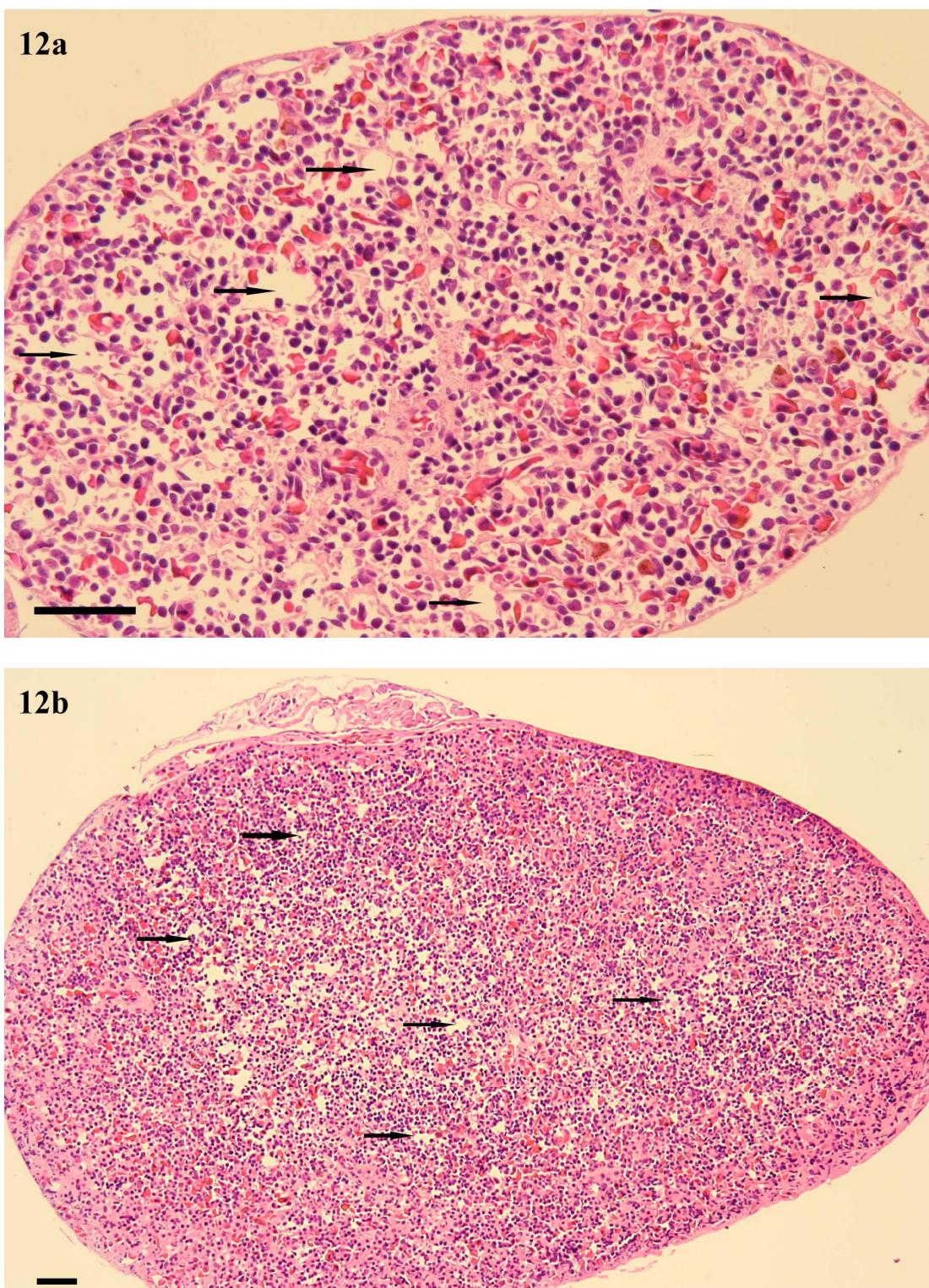
**Slika 9:** Periferni del vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Vranico obdaja tanka kapsula (K) iz kolagenskega veziva (roza), nad katerim so mezotelne celice (MC). Pod kapsulo je nekaj manjših žil (kž) in rdeča pulpa (RP) iz sinusoidov (→) in celičnih vrvic (CV). Vmes je območje bele pulpe (BP) z limfociti in majhnimi krvnimi žilami z debelim ovojem. Merilo: 100 µm.



**Slika 10:** Osrednji del vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Večina je območja rdeče pulpe (RP) s sinusoidi (→), med katerimi so celične vrvice (CV). V sinusoidih in v vrvicah je veliko eritrocitov (rdeče obarvani). Belo pulpo (BP) predstavlja posamezna območja med rdečo pulpo, ki vsebujejo limfocite v retikularnem ogrodju in manjše žile (kž), obdane z veliko veziva in obsežnimi svetlimi celicami. Merilo: 100 µm.



**Slika 11:** Retikularno ogrodje v parenhimu vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikulinska vlakna, ki podpirajo celice v parenhimu, so obarvana črno. Merilo: 10 µm.



**Slika 12a-b:** Primerjava anteriornega in posteriornega dela vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. **(a)** Na anteriornem predelu ima vranica manjšo gostoto celic in sinusoidi so bolj prazni (→). Manj je kolagenskega veziva (obarvan roza), kapsula je po celiem obsegu zelo tanka. **(b)** Na posteriornem, debelejšem predelu je vranica bolj kompaktna, gostota celic je večja, sinusoidi so bolj napolnjeni s krvjo (→). Predvsem na periferiji je več kolagenskega veziva (obarvan roza). Kapsula je debelejša. Merilo: 100 µm.

### 3.2.1.1 Območja bele pulpe

Ogrodje tvorijo retikularne celice in retikularna vlakna. Retikularne celice imajo svetla jedra nepravilnih oblik in tanek ovoj citoplazme, ki razteza svoje izrastke okrog retikularnih vlaken (sl. 13). Med seboj se povezujejo v mrežo. Med to mrežo se nahajajo predvsem limfociti in redko pa tudi posamezni eritrociti. Posamezni eritrociti se pojavljajo tudi na meji z rdečo pulpo.

Limfociti so glavne in najstevilčnejše celice bele pulpe. Jedra so okrogla in obarvana temneje (sl. 13, 16). Na poltankih rezinah je razvidno, da ima jedro plitve invaginacije jedrne membrane in vsebuje temneje obarvane skupke kondenziranega heterokromatina, ki je neaktivni kromatin (sl. 16). Citoplazma je le v tanki plasti okrog jedra, in je zato pogosto komajda opazna. Limfociti ponavadi niso tesno drug ob drugem, ampak je med celicami veliko pravnega prostora.

Limfoidno tkivo je običajno koncentrirano okoli krvne žile z majhno svetlico in tankim epitelom ter obsežnim vezivom in celicami s svetlimi okroglimi jedri (sl. 15). Okoli takšnega ovoja žile je limfoidno tkivo.

### 3.2.1.2 Rdeča pulpa

Rdečo pulpo sestavljajo celične vrvice in sinusoidi (sl. 14).

Celične vrvice so iz krvnih celic, eritroidnih predstopenj, pigmentnih makrofagov in retikularnega veziva (sl. 14). Retikularne celice imajo svetla nepravilna jedra in dolge tanke izrastke citoplazme, ki se ovijajo okoli retikularnih vlaken in so med seboj povezane v mrežo. To je opora za različne celice, kot so:

- limfociti,
- eritrociti,
- hemocitoblasti,

- eritroblasti v različnih stopnjah razvoja,
- posamezni pigmentni makrofagi.

Hemocitoblasti so v celičnih vrvicah manj številni (sl. 14). So izvorne celice krvnih celic, torej so nediferencirane celice. Jedro je okroglo, a večje in svetlejše (več aktivnega nekondenziranega evkromatina) kot pri limfocitu. Tudi tu je citoplazma slabo opazna, zastopana v tankem sloju okrog jedra.

Na poltankih rezinah vranice so pogoste celice, katerih jedro je relativno veliko, homogeno, z jedrcem (sl. 18). Kromatin je večinoma razpršen, nekondenziran. Kondenziran kromatin je le na obodu jedra in v drobnih skupkih v notranjosti. Citoplazme okrog jedra ni veliko. To bi lahko bili hemocitoblasti.

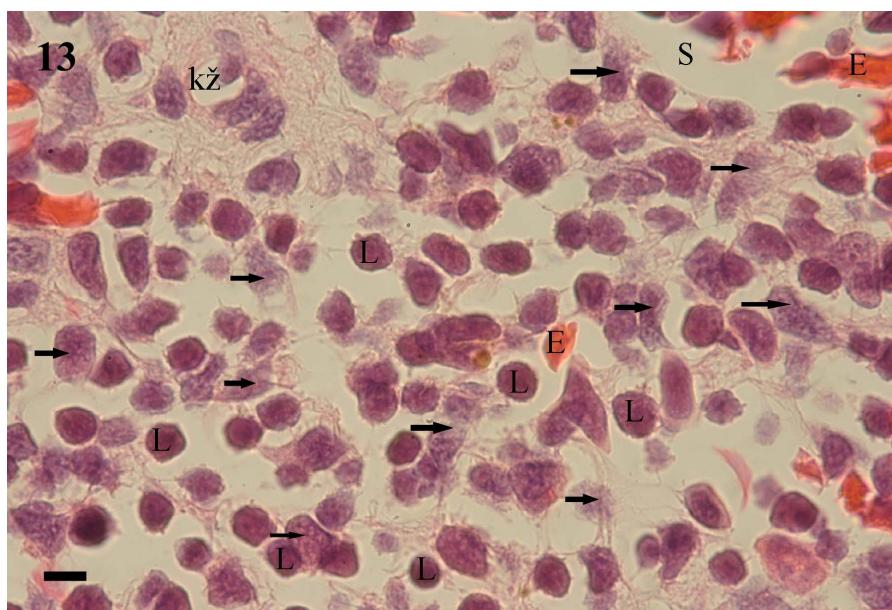
Sinusoidi so precej obsežni med celičnimi vrvicami. Prepoznnavni so po večjem praznem prostoru, v katerem so krvne celice, hemocitoblasti in predstopnje eritrocitov (sl. 14). Retikularne celice z izrastki in retikularnimi vlakni obdajajo sinusoide.

Na poltanki rezini, barvani z azur (II) metilen modrim, so eritrociti dobro opazni. Vidna so homogena, zelo kondenzirana jedra in obilna homogena citoplazma (sl. 17). Oblike celic in jeder so zelo različne in ponavadi niso eliptične, saj so stisnjene med drugimi celicami. Oblike so odvisne tudi od tega, na katerem mestu je eritrocit prerezan.

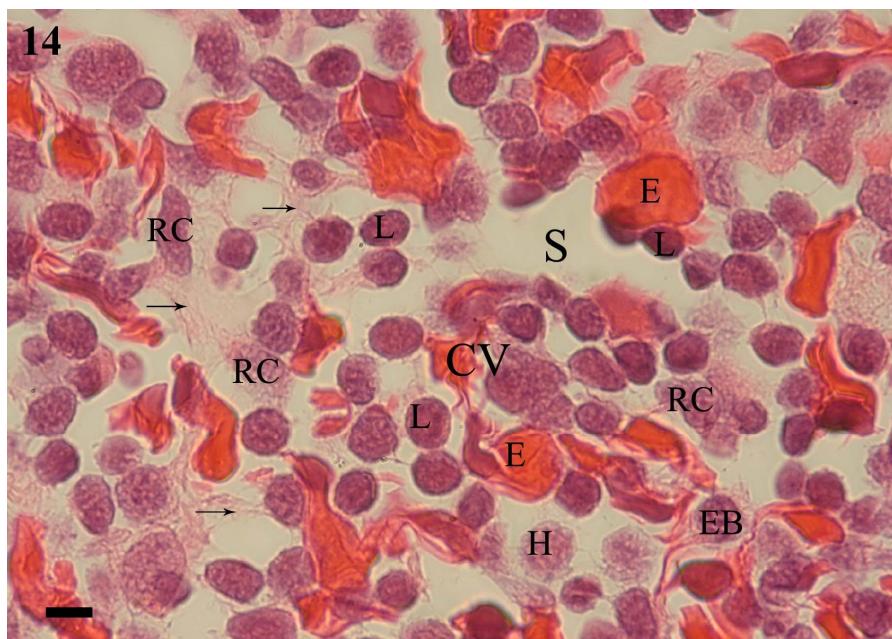
V rdeči pulpi so večje in manjše krvne žile, arterije, arteriole, venule in vene (sl. 20a). Obdane so z bolj ali manj obsežnim kolagenskim vezivom. Svetlina žil je večinoma zapolnjena s krvnimi celicami, med katerimi prevladujejo eritrociti.

Arterije in arteriole imajo glede na svojo svetlino debelo steno, ki jo gradijo visoke endotelne celice, kolagenska vlakna in gladka mišična vlakna (sl. 20b).

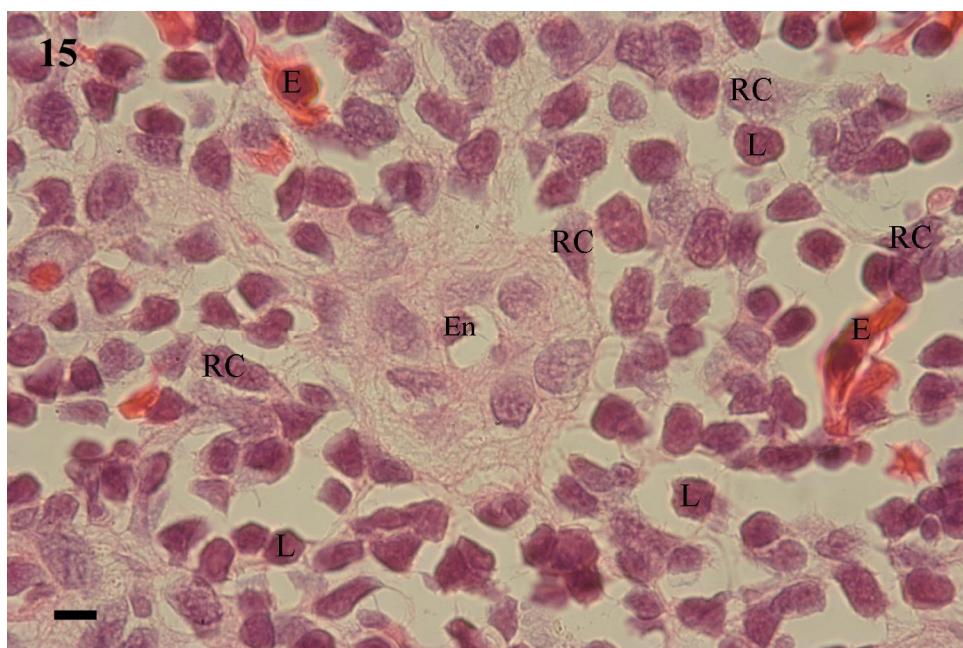
Vene in venule imajo večjo svetlino in tanjšo steno v primerjavi z arterijami in arteriolami. V steni so sploščene endotelne celice, tanek sloj kolagenskega veziva in gladka mišična vlakna (sl. 19 in 20c).



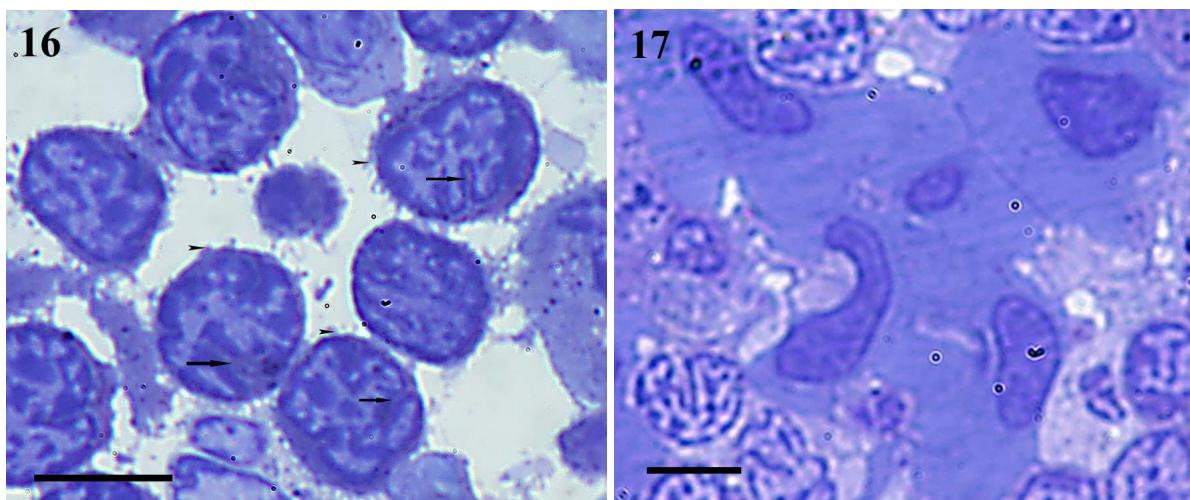
**Slika 13:** Območje bele pulpe v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Retikularne celice (→) raztezajo svoje izrastke okrog retikularnih vlaken. Vidni so izrastki retikularnih celic, obarvani roza, retikularna vlakna pa niso obarvana. Med retikularno mrežo se nahajajo limfociti (L) in posamezni eritrociti (E). Zgoraj levo je vidna krvna žila (kž), obdana z obsežnimi svetlimi celicami in vezivom. V desnem zgornjem kotu je viden del rdeče pulpe. Sinusoid (S) obdajajo retikularne celice. Meja med rdečo in belo pulpo ni jasna. Merilo: 10 µm.



**Slika 14:** Rdeča pulpa vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Rdeča pulpa sestavlja celične vrvice (CV) in sinusoidi (S). CV so iz retikularnih celic (RC) in vlaken (niso obarvana). RC imajo dolge tanke izrastke citoplazme (→), med seboj povezane v mrežo. Vmes so limfociti (L), eritrociti (E), hemocytoblasti (H) in eritroblasti v različnih stopnjah razvoja (EB). Sinusoidi (S) so bolj ali manj napolnjeni s krvnimi celicami, hemocytoblasti in predstopnjami eritrocitov. Retikularne celice z izrastki obdajajo sinusoide. Merilo: 10 µm.

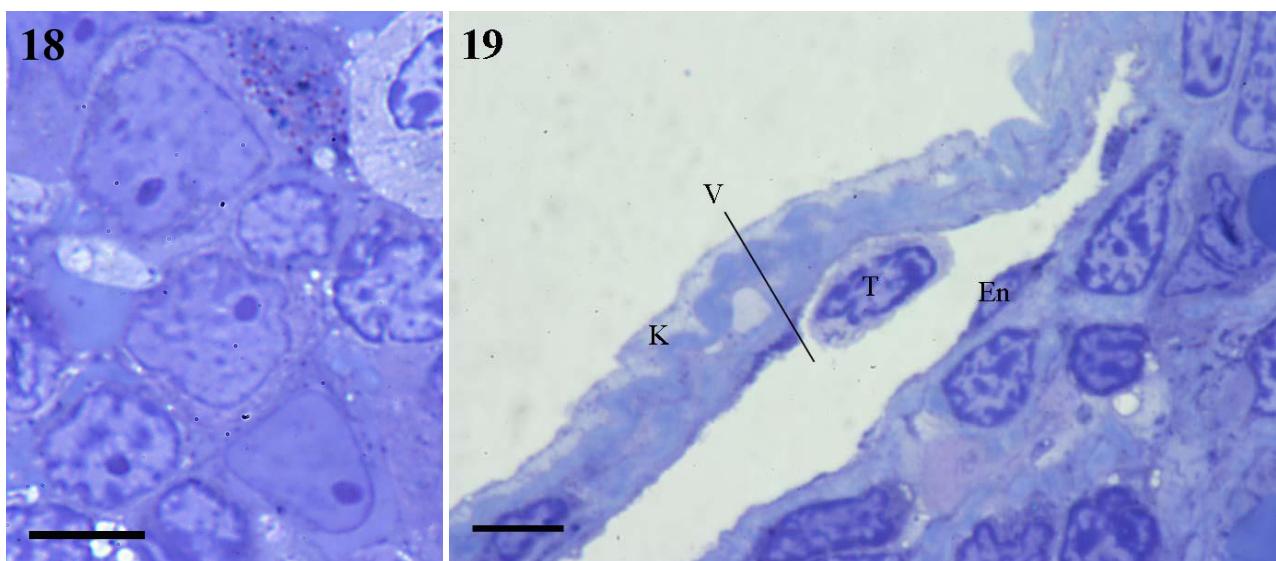


**Slika 15:** Bela pulpa vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Limfoidno tkivo okoli debelostene žile. Retikularne celice (RC) z izrastki tvorijo mrežo, med njimi so limfociti (L), na meji z rdečo pulpo pa se pojavljajo posamezni eritrociti (E). En, endotel žile. Merilo: 10 µm.



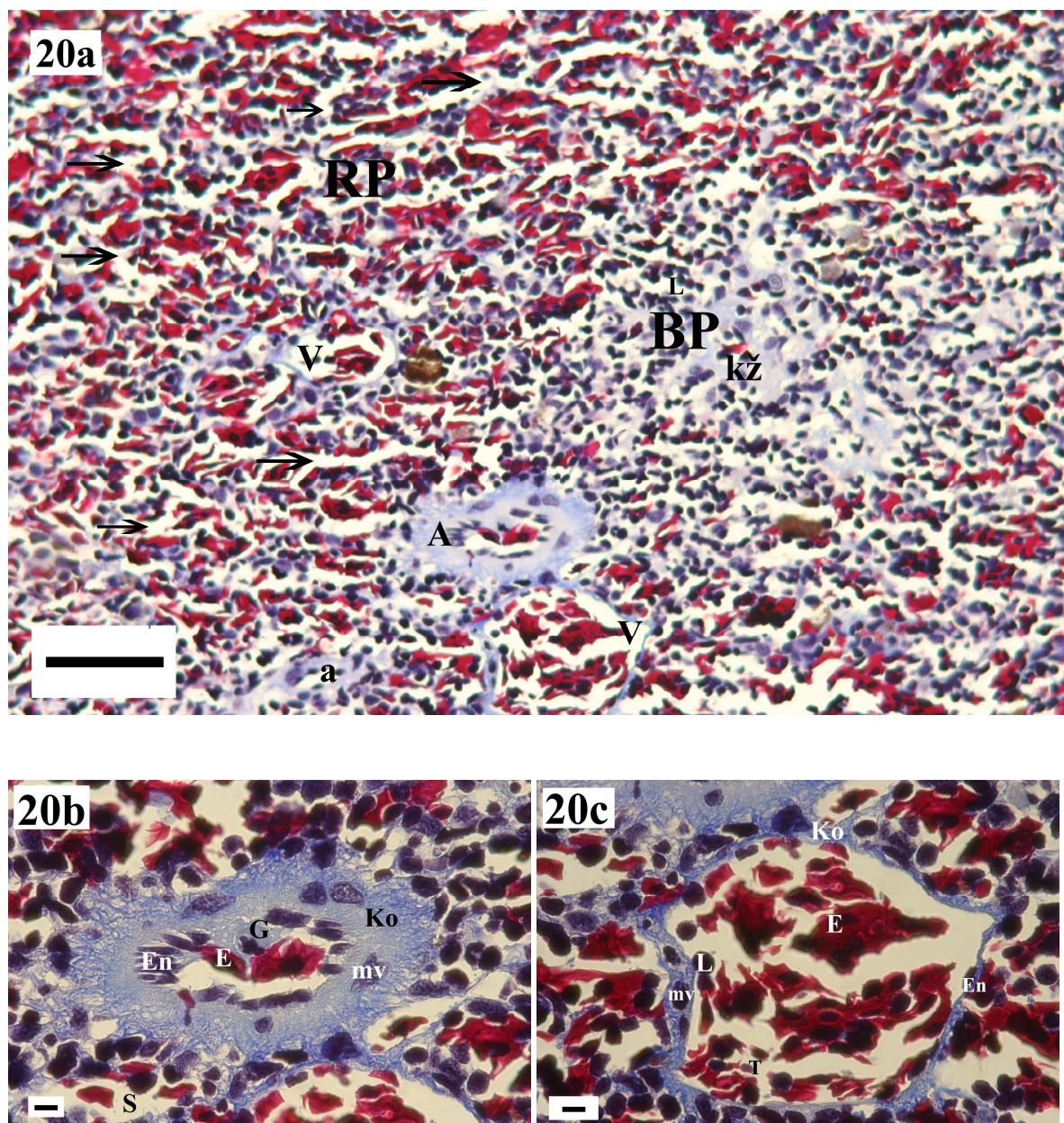
**Slika 16:** Limfociti v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. Celica in jedro sta okrogle ali rahlo ovalne oblike. Jedro ima plitve invaginacije jedrne membrane (→) in vsebuje nekaj temneje obarvanih skupkov kondenziranega kromatina. Okrog jedra je tanek rob citoplazme s kratkimi prstastimi izrastki (►). Merilo: 10 µm.

**Slika 17:** Eritrociti v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. Vidna so homogena, zelo kondenzirana jedra in obilna homogena citoplazma. Oblike celic in jeder so zelo različne in ponavadi niso eliptične, saj so stisnjene med drugimi celicami. Oblike so odvisne tudi od tega, v katerem delu je eritrocit prerezan. Merilo: 10 µm.



**Slika 18:** Celice, najverjetneje hemocitoblasti, v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus*). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. Jedro je relativno veliko, homogeno, z jedrcem in ima večinoma nekondenziran kromatin (svetel). Kondenziran kromatin (temen) je le na obodu jedra in v drobnih skupkih v notranjosti. Merilo: 10 µm.

**Slika 19:** Vena (V) tik pod kapsulo (K) v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus*). Poltanka rezina. Azur (II) metilen modro barvanje. Stena vene je tanka, endotelne celice (En) so sploščene. V svetlini je trombocit (T). Merilo: 10 µm.



**Slika 20a-c:** Krvne žile v parenhimu vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Trikromno barvanje po Massonu. (a) Rdeča pulpa (RP) je prepletena s številnimi sinusoidi (→), med njimi so celične vrvice. Vidne so tudi večje in manjše krvne žile: arterije (A), arteriole (a), vene (V), obdane s kolagenskim vezivom (svetlo modro). Bela pulpa (BP) je območje limfocitov (L), s krvno žilo (kž), okrog nje je veliko kolagenskega veziva (svetlo modro). Merilo: 100 µm. (b) Arterija v rdeči pulpi. V svetlini je prisotnih več eritrocitov (E) in granulocit (G). Stena je debela in jo gradijo visoke endotelne celice (En), kolagenska vlakna (Ko) in gladka mišična vlakna (mv - njihova jedra). Merilo: 10 µm. (c) Vena v rdeči pulpi. Svetlina je večji in stena je tanjša kot pri arteriji. Večina celic v svetlini je eritrocitov (E), nekaj je limfocitov (L) in trombocit (T). V steni so sploščene endotelne celice (En), tanek sloj kolagenskega veziva (Ko) in gladka mišična vlakna (mv - njihova jedra). Merilo: 10 µm.

### 3.2.2 Vranica pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*)

Razen razlik v količini pigmentnih celic večjih razlik med nepigmentirano in pigmentirano podvrsto močerila v zgradbi vranice ni opaznih. V vranici pigmentirane podvrste močerila retikularne celice z izrastki tvorijo mrežo, ki predstavlja ogrodje parenhima (sl. 21). Med retikularnimi celicami so eritrociti, limfociti, hemocitoblasti. Te celice so tako v parenhimu kot tudi v sinusoidih. Pigmentni makrofagi se nahajajo v parenhimu (sl. 21, 33a in b) in jih je številčno precej več kot v vranici nepigmentirane podvrste močerila in nektura.

### 3.2.3 Vranica nektura ali blatnega kužka (*Necturus maculosus*)

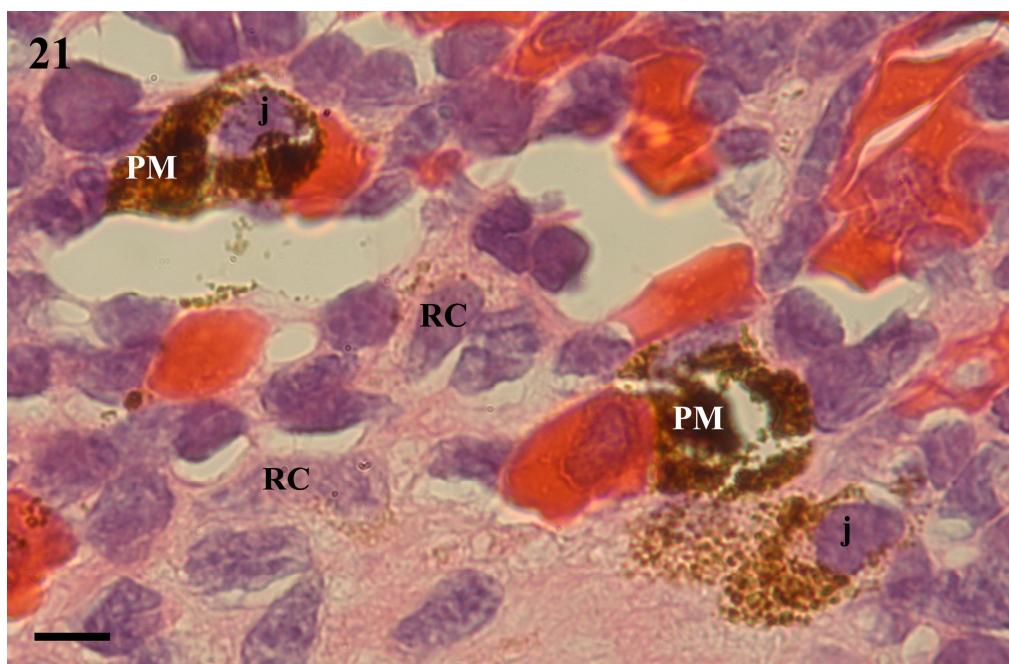
Vranica nektura ima drugačno obliko kot vranica močerila. Je manj podolgovata in je v prečnem prerezu širša in bolj ovalna.

Vranica nektura ima v splošnem enako zgradbo kot vranica močerila, le da je videti polnejša, bolj kompaktna. Celice so tesneje skupaj, manj je vmesnih praznih prostorov. Poleg tega so območja bele pulpe manj izrazita, kopiranja limfocitov so manj obsežna in so prisotna tudi brez žile. Limfociti so bolj difuzno razporejeni po vranici kot pri močerilu.

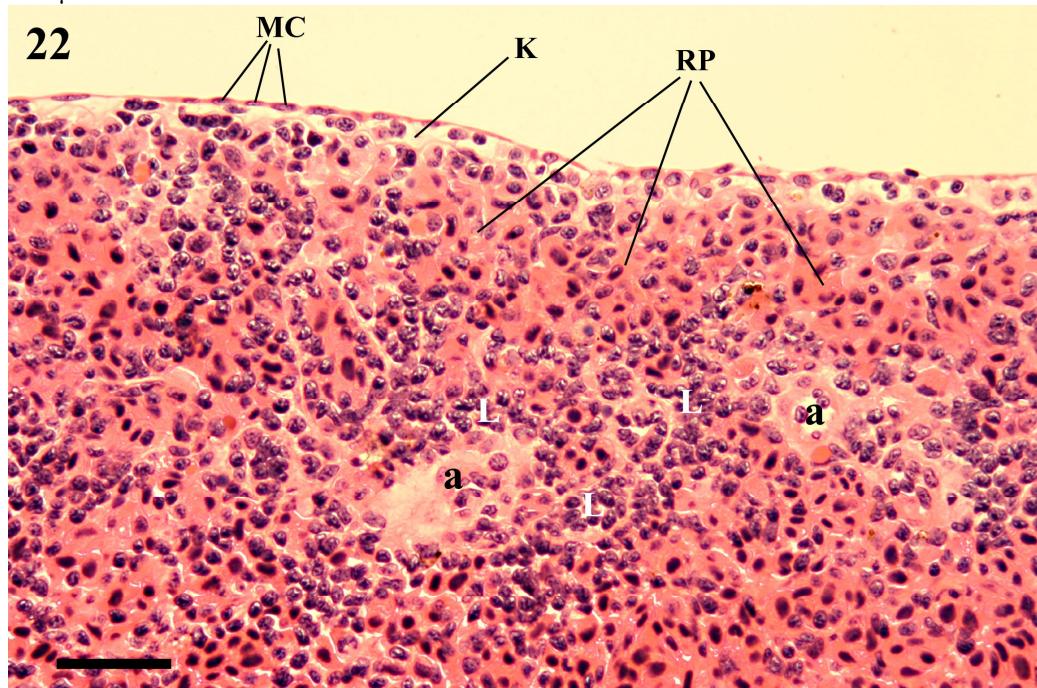
Vranico obdaja različno debela kapsula iz kolagenskega veziva, nad katerim ležijo mezotelne celice (sl. 22). Pod kapsulo je rdeča pulpa s sinusoidi in celičnimi vrvicami. Podobno kot pri močerilu ogrodje notranjosti vranice tvori le retikularna mreža iz retikularnih celic in vlaken, kolagenskih trabekul pa ni (sl. 23a in b).

Limfociti so raztreseni po celotni vranici, mestoma pa se pojavljajo manjša območja, kjer je večja koncentracija limfocitov. Taka območja so pogosto okoli arteriol, ki so obdane z veliko veziva (sl. 22 in 24). Za razliko od močerila pa se pri nekturu večje koncentracije limfocitov pojavljajo tudi tam, kjer ni žil (sl. 25). Večinoma so območja limfocitov bolj v centru vranice in niso jasno ločena od rdeče pulpe, temveč postopoma prehajajo vanjo.

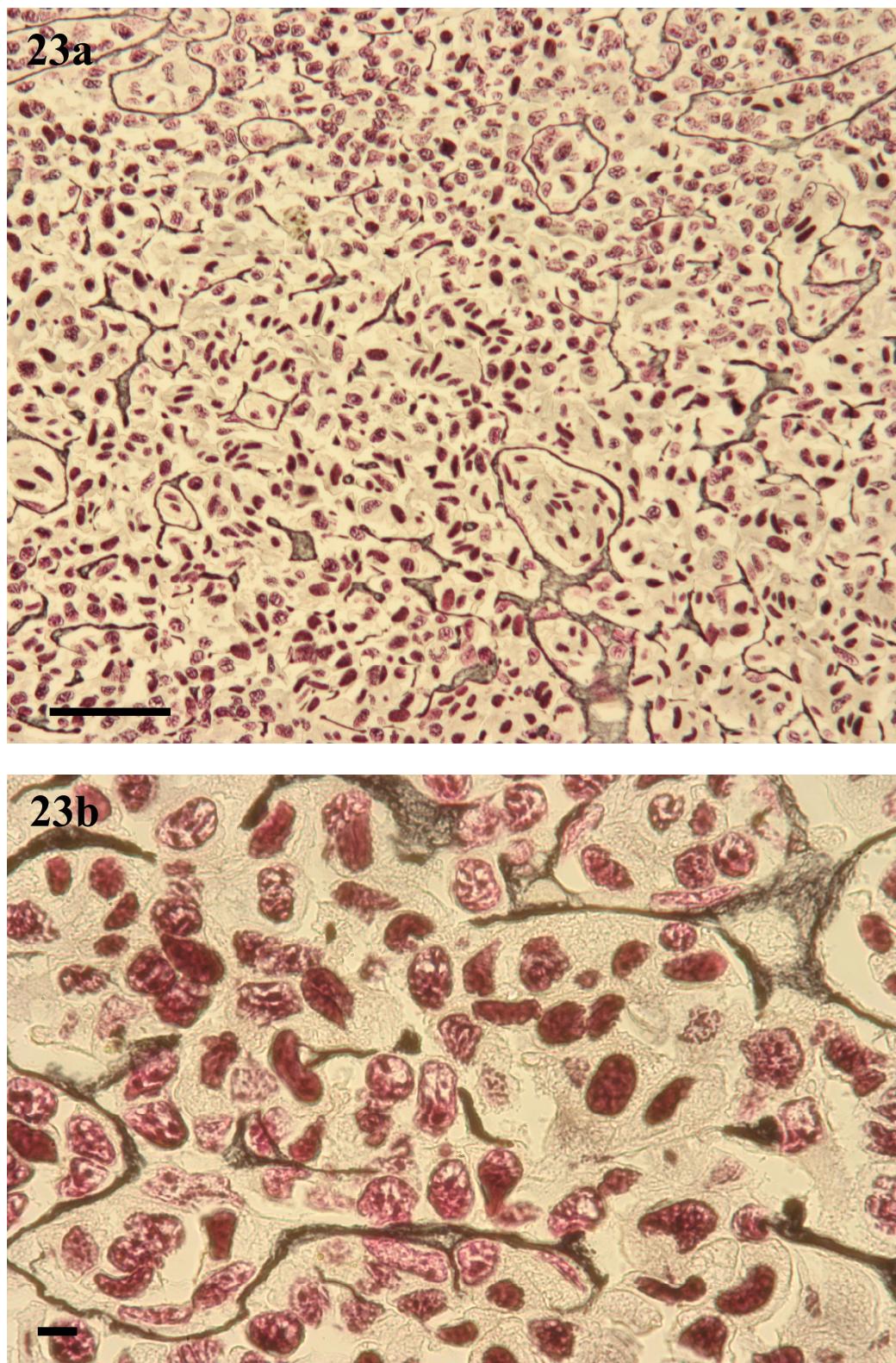
Večina celic v rdeči pulpi, tako v sinusoidih kot v parenhimu, je eritrocitov (sl. 22, 24, 25). Ti so v različnih stopnjah razvoja. V parenhimu se pojavljajo še limfociti, hemocitoblasti, retikularne celice in pigmentni makrofagi, v sinusoidih pa še ostale krvne celice (sl. 22, 25). Pri nekturu so meje sinusoidov slabše prepoznavne kot pri močerilu, zato se sinusoidi težje ločijo od parenhima (sl. 22, 25).



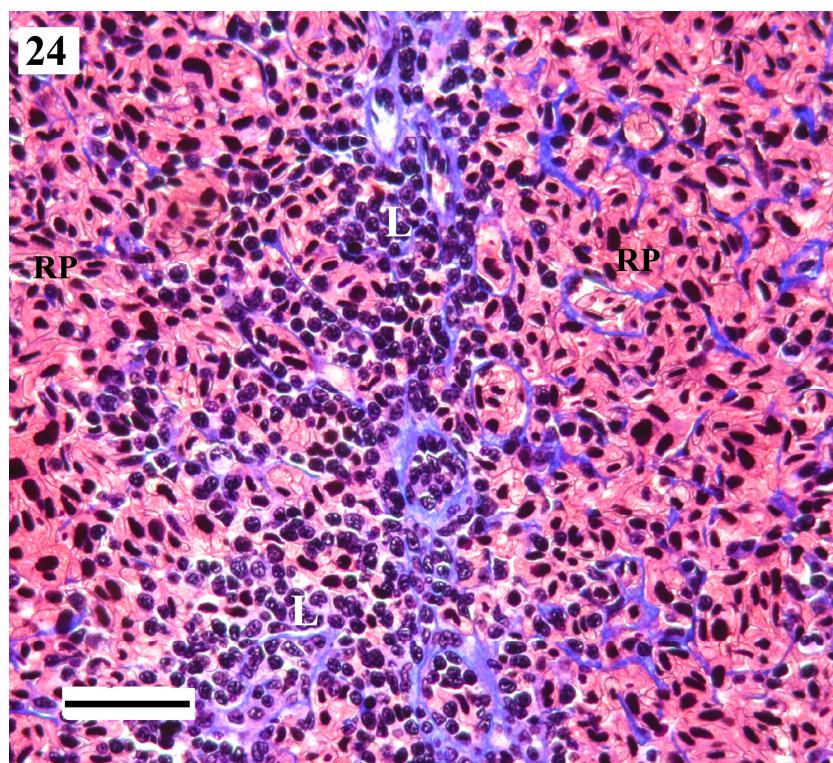
**Slika 21:** Vranica pigmentirane podvrste močerilarjev (*Proteus anguinus parkeli*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Retikularne celice (RC) z izrastki tvorijo mrežo, v njej se nahajajo eritrociti (rdeče obarvani), limfociti, hemocitoblasti. Te celice so tako v parenhimu kot tudi v sinusoidih. V parenhimu je veliko pigmentnih makrofagov (PM), ki vsebujejo melaninski pigment. Ta je pri hematoksilin-eozinskem barvanju viden v naravni temno rjavi barvi. Jedro pigmentnih makrofagov (j) je ekscentrično in nepravilno oblikovano. Merilo: 10 µm.



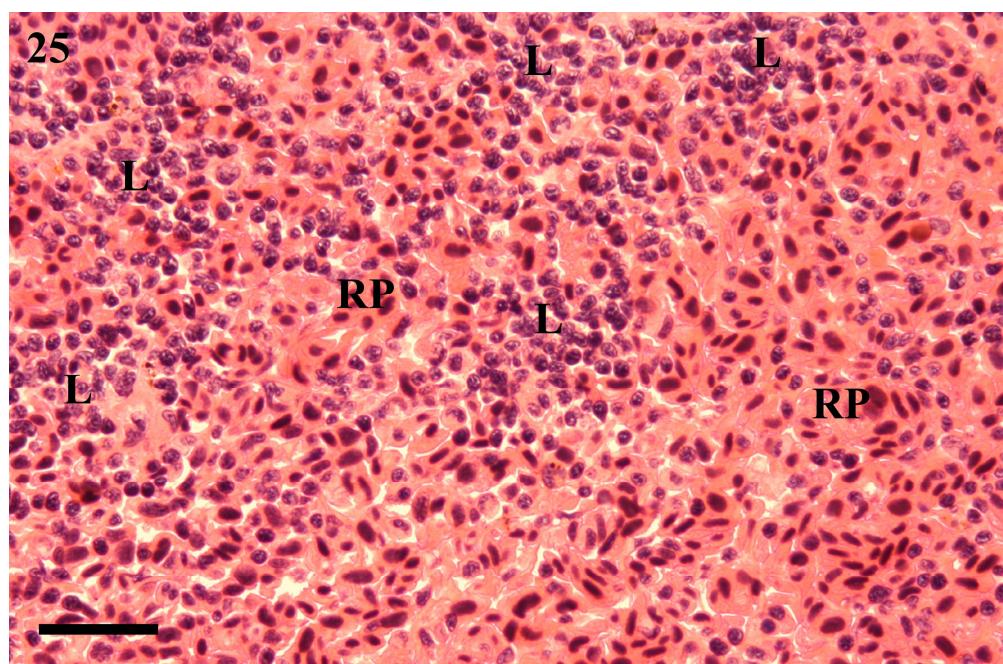
**Slika 22:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Vranico obdaja različno debela kapsula iz kolagenskega veziva (K), nad katerim ležijo mezotelne celice (MC). Pod njo je rdeča pulpa (RP) s sinusoidi in celičnimi vrvicami. Limfociti so razprtšeno po celi vranici, mestoma pa se pojavljajo manjša območja, kjer je večja zgostitev limfocitov (L). Taka območja so najbolj pogosto okoli arteriol (a), ki so obdane z veliko veziva. Merilo: 100 µm.



**Slika 23a-b:** Retikularno ogrodje v parenhimu vranice nektura (*Necturus maculosus*). Srebrova impregnacija za retikulin. Retikulinska vlakna so obarvana črno. Razporejena so po rdeči in beli pulpi, tudi okrog sinusoidov in žil. (a) Merilo: 100 µm. (b) Merilo: 10 µm.



**Slika 24:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*). Trikromno barvanje po Massonu. Med rdečo pulpo (RP - levo in desno na sliki) je območje večje koncentracije limfocitov (L), kjer je tudi zbranih več ven in arterij. Kolagensko vezivo okrog žil je modro obarvano. Območje limfocitov prehaja v rdečo pulpo, kjer je večina celic eritrocitov (rožnato-rdeča citoplazma). Merilo: 100 µm.



**Slika 25:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*). Hematoksilin-eozinsko barvanje. Med rdečo pulpo (RP) so manjša območja koncentracije limfocitov (L) brez žile v centru. Večina celic v rdeči pulpi (RP), tako v sinusoidih kot v parenhimu, je eritrocitov, v različnih stopnjah razvoja. V parenhimu se pojavljajo še limfociti, hemocitoblasti, retikularne celice, v sinusoidih pa še ostale krvne celice. Merilo: 100 µm.

### 3.3 PIGMENTNI MAKROFAGI VRANICE

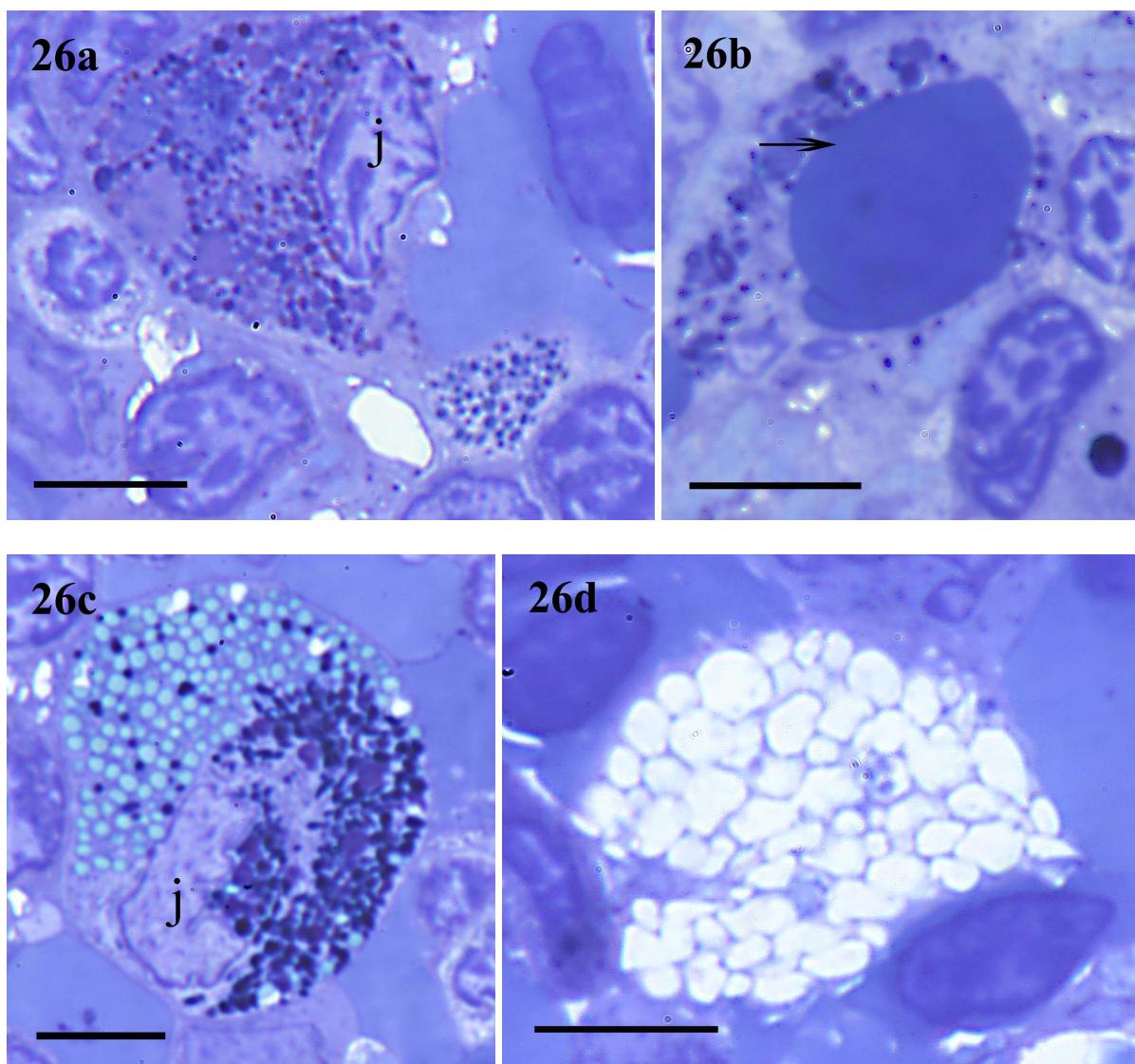
V vranicah močerilarjev so prisotne pigmentne celice ali pigmentni makrofagi. Pri nepigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in pri nekturu (*Necturus maculosus*) so prisotni posamično, nikoli v skupkih. V manjših skupkih se pojavljajo le v vranicah stradanih osebkov in pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*), kjer jih je številčno precej več.

Pigmentni makrofagi so precej velike celice z nepravilno oblikovanim in ekscentrično nameščenim jedrom in z obilno citoplazmo (sl. 26a). V citoplazmi so vezikli z različnim materialom: siderosomi, melanosomi in fagosomi.

V vraničnih makrofagih so vidni tudi deli eritrocitov, ki jih ti fagocitirajo in razgradijo v fagosomih in lizosomih (sl. 26b). Železo iz hemoglobina shranjujejo v siderosomih v obliki hemosiderina. Siderosomi so na poltankih rezinah, barvanih po Richardsonu, obarvani temno rdeče (sl. 26a), melanosomi pa temno modro (sl. 26a, b in c).

V citoplazmi nekaterih pigmentnih makrofagov smo opazili poleg siderosomov, melanosomov in fagosomov še svetlo modre granule (sl. 26c). To so najverjetneje maščobne kaplje. Večina pigmentnih makrofagov jih ne vsebuje ali pa jih vsebujejo v zelo majhnih količinah.

Na poltankih rezinah smo, sicer redko, našli tudi celice, napolnjene s številnimi svetlimi vakuolami (sl. 26d).



**Slika 26a-d:** Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), poltanke rezine, barvane z azur (II) metilen modrim. Na slikah od a do d so vidni pigmentni makrofagi z različnimi vključki. (a) Pigmentni makrofag je dokaj velika celica z nepravilno oblikovanim in ekscentrično nameščenim jedrom (j) in z obilno citoplazmo, polno različnih vključkov: siderosomi (temno rdeči), melanosomi (temno modri), fagosomi, lizosomi. (b) Del eritrocita v makrofagu (→). Jedro makrofaga ni vidno, v citoplazmi so vidne še drugi vključki, značilni za pigmentne makrofage. (c) Pigmentni makrofag, ki v citoplazmi poleg melanosomov in fagosomov vsebuje še maščobne kaplje (svetlo modre). (d) Celica, napolnjena s številnimi svetlimi vakuolami, jedro ni vidno. Merilo: 10 µm.

### 3.3.1 Identifikacija železa

#### 3.3.1.1 Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*)

Posamezni pigmentni makrofagi so razpršeni po rdeči pulpi (sl. 27). Vsebujejo precejšno količino pigmenta, pozitivnega s histokemijskim testom za železo, ki je v obliki hemosiderina (barvanje po Perlsu). Rahlo pozitivna reakcija za železo je tudi v citoplazmi retikularnih celic (sl. 27).

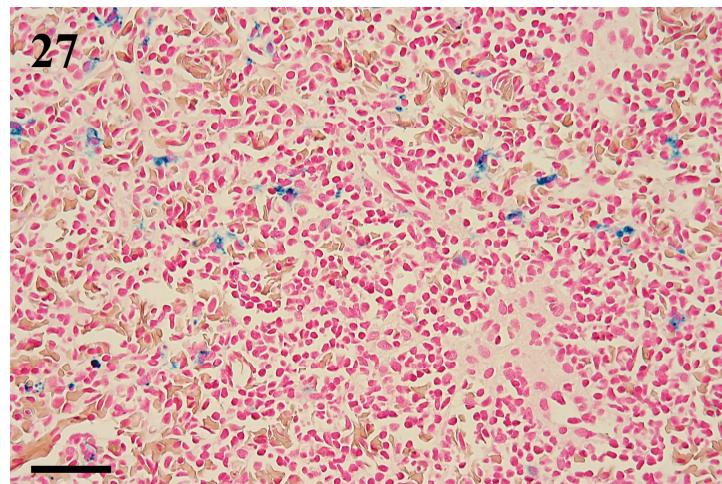
Pri stradanih osebkih je histokemijska reakcija za železo intenzivnejša, kar kaže na večjo količino hemosiderina. Ta je najbolj intenzivno zastopan v pigmentnih celicah, manj intenzivno pa v retikularnih celicah (sl. 29a, b in c).

Pri hematoksilin – eozinskem barvanju pri stradanem osebku smo v številnih pigmentnih celicah opazili, da je v veliki večini prisoten svetlo rjav pigment. To je hemosiderin v naravni barvi. Temno rjavega melaninskega pigmenta ni tako veliko, ga je pa več kot pri ostalih osebkih (sl. 29d).

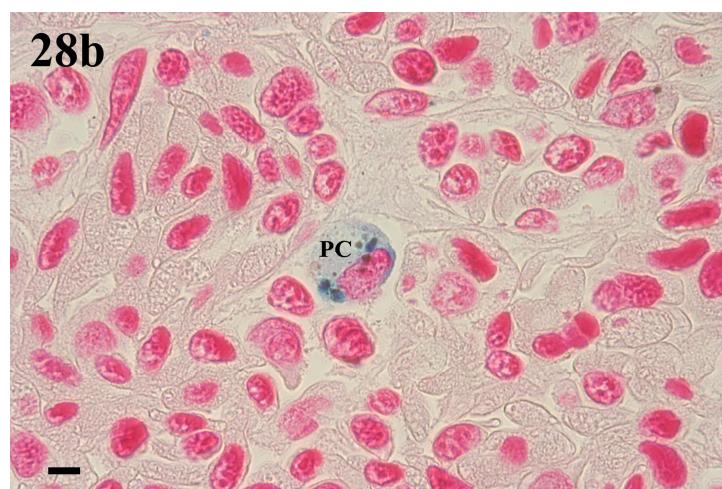
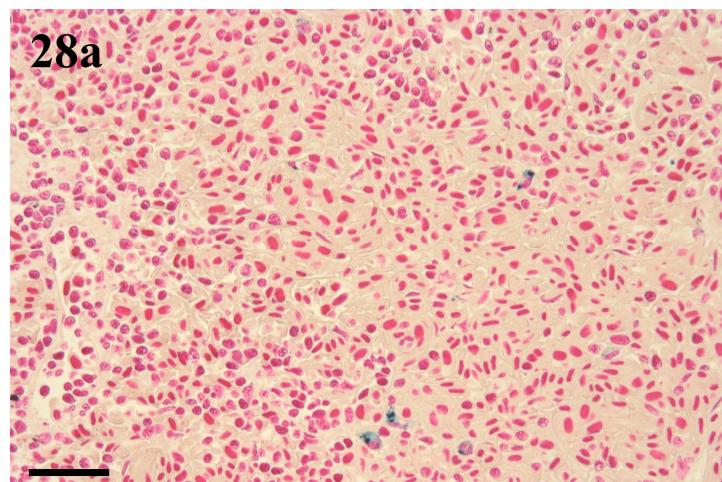
#### 3.3.1.2 Vranica nektura (*Necturus maculosus*)

V primerjavi z vranico nepigmentirane podvrste močerila je tu precej manj pigmentnih celic in železa. Pri vseh štirih osebkih je prisotno manjše število celic, ki vsebujejo železo v obliki hemosiderina, ki je s histokemijskim testom po Perlsu modroobarvan. Opazen je le redko v posameznih pigmentnih celicah. Ponekod je bolj in drugod manj intenziven – svetlo in temno modra barvanost.

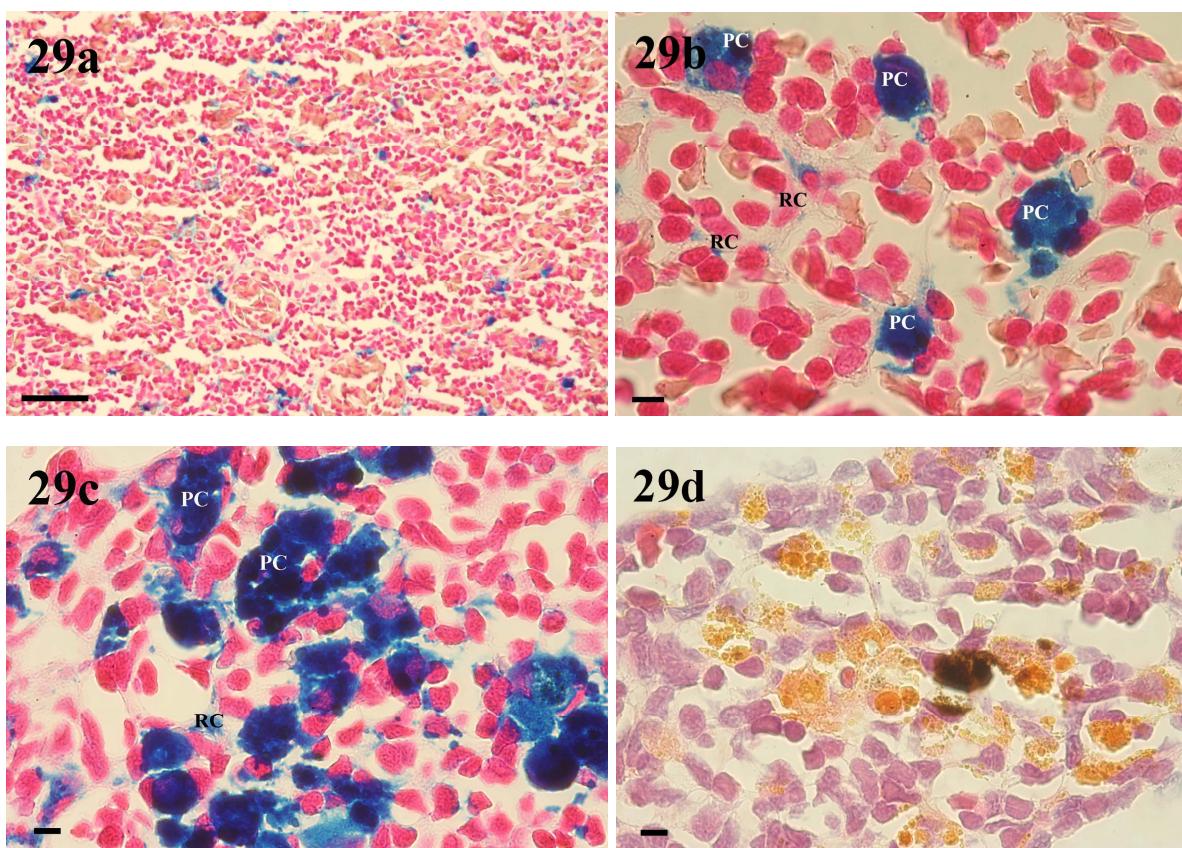
Med osebki obstajajo manjše razlike. Stradan nektur ima nekaj več železa kot normalno hranjen, saj je reakcija za železo intenzivnejša (sl. 30a in b).



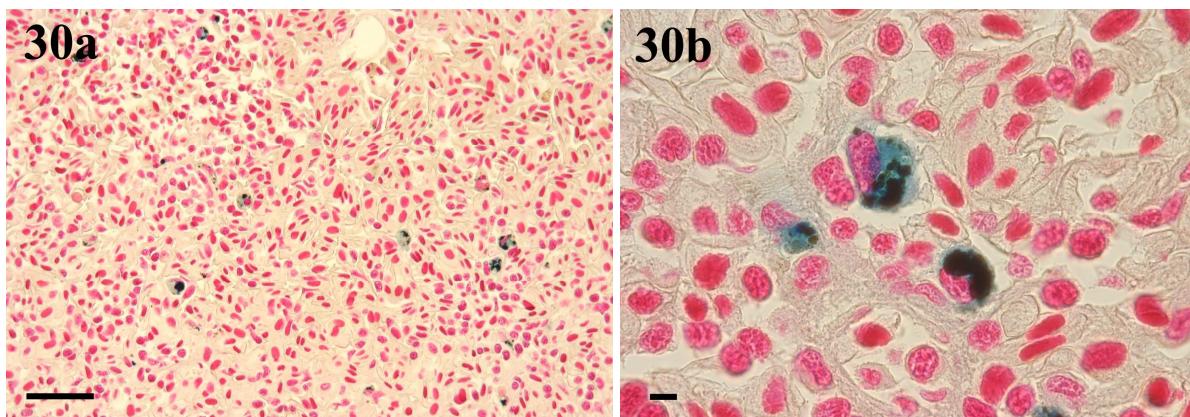
**Slika 27:** Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), hranjen osebek. Barvanje po Perlsu. Pigmentne celice so razpršene po parenhimu. Hemosiderin je modro obarvan. Merilo: 100 µm.



**Sliki 28a-b:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*), hranjen osebek. Barvanje po Perlsu. **(a)** V primerjavi z močerilom je tu prisotno manjše število pigmentnih celic (modro). Merilo: 100 µm. **(b)** Pigmentna celica (PC) pod večjo povečavo. Histokemijska reakcija za železo je rahlo pozitivna (modro). Merilo: 10 µm.



**Slika 29a-d:** Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*), stradani osebki. **a in b** Osebek P147, **c in d** Osebek P177. **(a)** Barvanje po Perlsu. Pigmentne celice (PC) v retikularni mreži rdeče pulpe vsebujejo precejšno količino železa v obliki hemosiderina (modroobarvan). Merilo: 100 µm. **(b)** Barvanje po Perlsu. Rahlo pozitivna reakcija za železo je tudi v retikularnih celicah (RC). Merilo: 10 µm. **(c)** Barvanje po Perlsu. Zelo velika količina hemosiderina pri stradanem osebku. Močno pozitivna reakcija za železo je v številnih skupinah pigmentnih celic (PC) in rahlo pozitivna v retikularnih celicah. Merilo: 10 µm. **(d)** Hematoksilin-eozinsko barvanje. Pri stradanem osebku ima vranica v svojih številnih pigmentnih celicah prisoten v veliki večini svetlo rjav pigment. To je hemosiderin v naravni barvi. Temno rjavega melaninskega pigmenta ni tako veliko. Merilo: 10 µm.



**Slika 30a-b:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*), stradan osebek. Barvanje po Perlsu. Prisotno je nekaj več hemosiderina (modro) kot pri hrانjenem osebku. Rahlo se poveča tako število pigmentnih celic, ki ga vsebujejo, kot tudi gostota hemosiderina v posameznih celicah. Temen pigment v pigmentnih celicah je melanin. **(a)** Merilo: 100 µm. **(b)** Merilo: 10 µm.

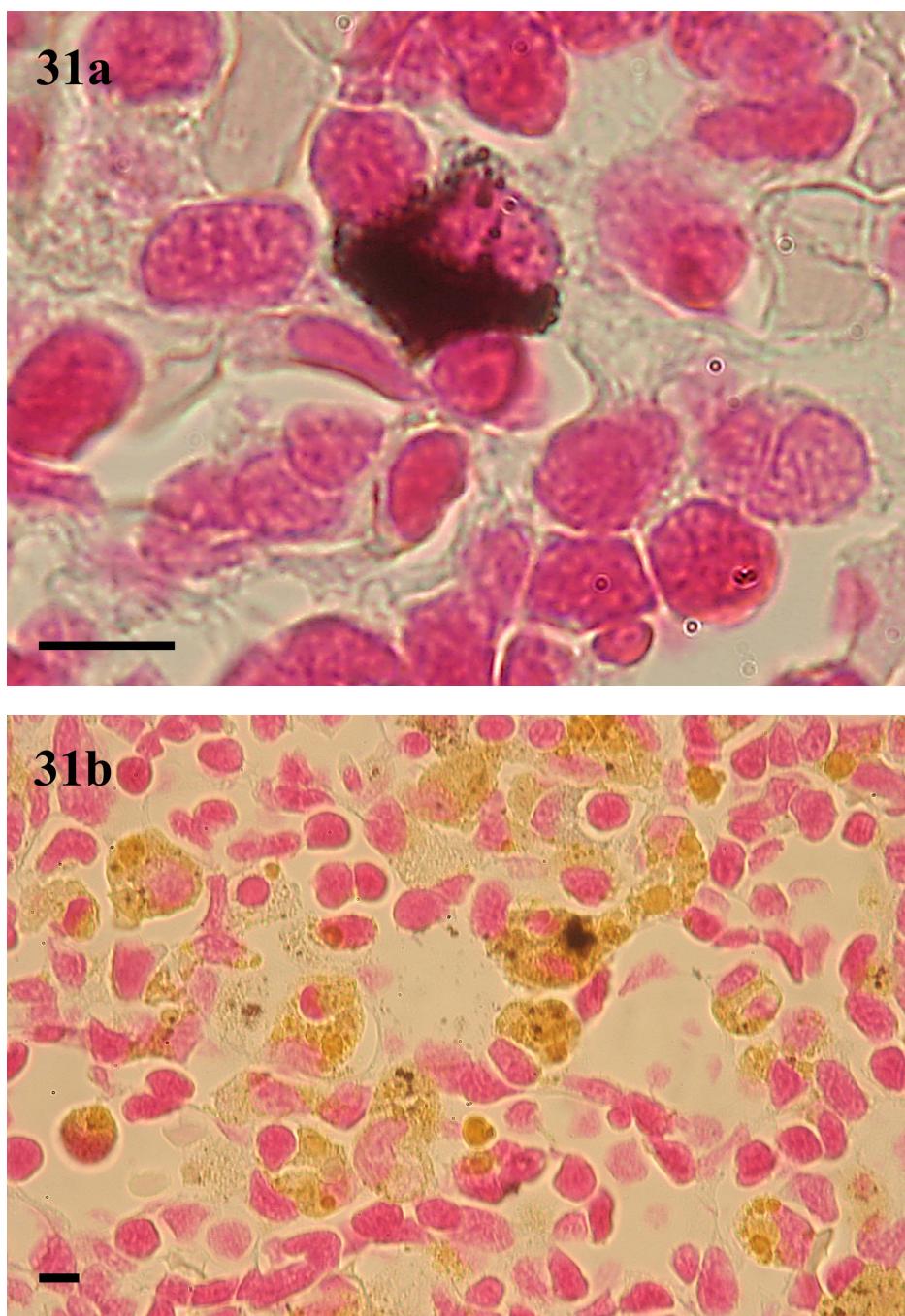
### **3.3.2 Identifikacija melanina**

#### **3.3.2.1 Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*)**

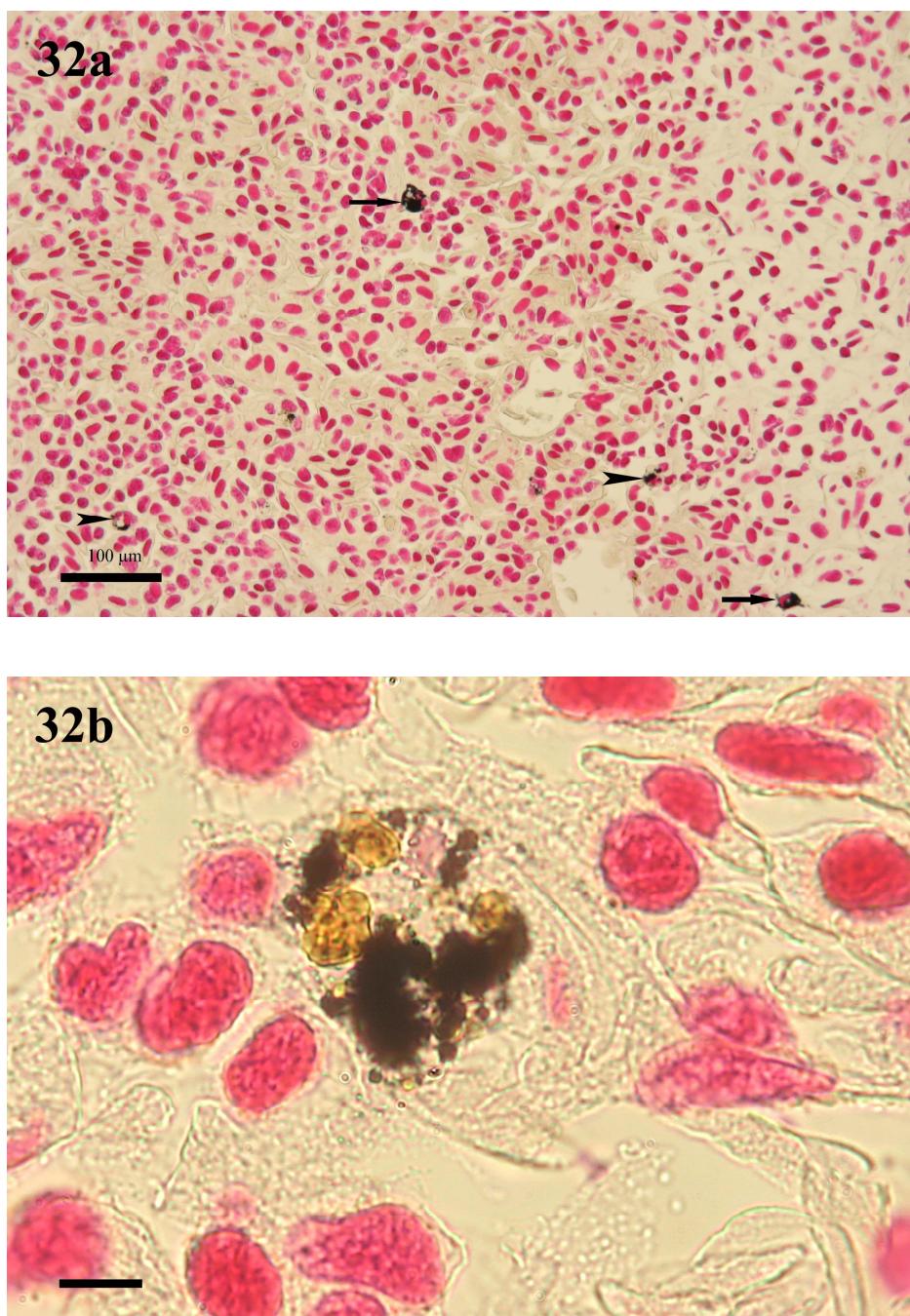
Na posameznih rezinah nismo našli nič ali pa le posamezne (kvečemu 5) celice s pigmentom, pozitivnim s histokemijskim testom za melanin (po Masson-Fontani). Melanin je obarvan črno oziroma zelo temno rjavo in večinoma v celoti zapolnjuje citoplazmo makrofaga (sl. 31a). Tudi vranice stradanih osebkov ne vsebujejo skoraj nič ali zelo malo melanina, vsebujejo pa veliko svetlo rjavega pigmenta - hemosiderina (sl. 31b).

#### **3.3.2.2 Vranica nektura (*Necturus maculosus*)**

Pri normalno hranjenih kot tudi pri stradanih osebkih so prisotne le posamezne pigmentne celice, ki vsebujejo melaninski pigment. Melanin zapolnjuje celotno citoplazmo ali le njen del, ostalo pa je svetlo rjav pigment, verjetno hemosiderin v naravni barvi (sl.32a in b).



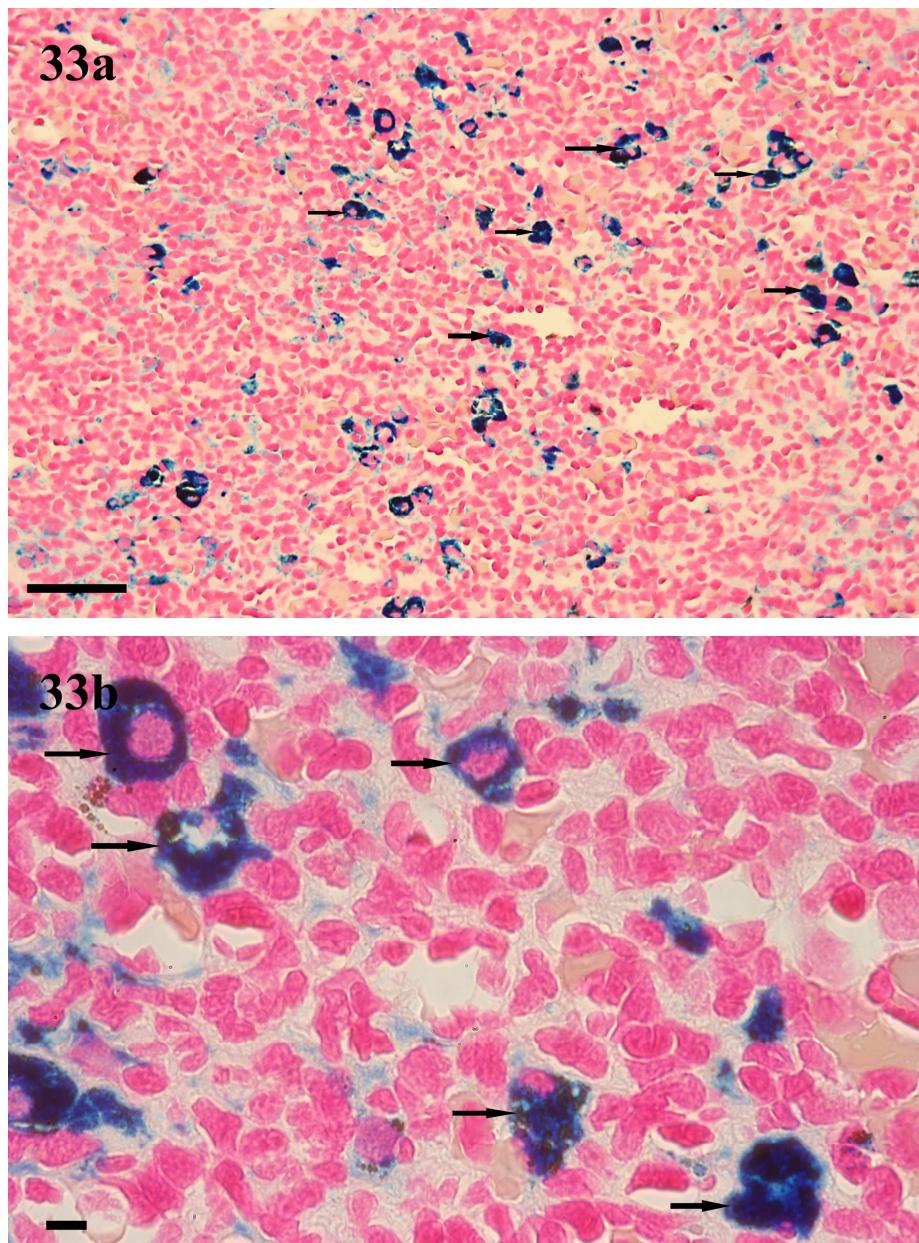
**Slika 31a-b:** Vranica nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*). Barvanje po Masson-Fontana. (a) Hranjen osebek. Pigmentne celice, ki vsebujejo melanin, so maloštevilne. Melanin je črno oziroma zelo temno rjavo obarvan in v celoti zapolnjuje citoplazmo makrofaga. (b) Stradan osebek. Pigmentne celice se združujejo v skupke. Melanina je malo, prisotna pa je velika količina svetlo rjavega pigmenta (hemosiderin v naravni barvi). **a in b** Merilo: 10 µm.



**Slika 32a-b:** Vranica nektura (*Necturus maculosus*). Barvanje po Masson-Fontana. (a) Prisotne so le redke pigmentne celice, ki vsebujejo melanin (črno oziroma zelo temno rjava obarvan). Pri nekaterih zapolnjuje celotno citoplazmo (→), pri drugih pa le del citoplazme (►). Merilo: 100 µm. (b) Pigmentna celica pod večjo povečavo. Temno obarvan pigment je melanin, svetlo rjav pigment pa je hemosiderin v naravni barvi. Prerez gre le skozi majhen del jedra, zato se le-ta slabo vidi. Merilo: 10 µm.

### 3.3.3 Identifikacija železa in melanina v vranici pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*)

Pigmentne celice z melaninom so v vranici pigmentirane podvrste močerila številčnejše kot v vranici nepigmentirane podvrste močerila in nektura (sl. 21, 33a in b). Intenzivnejša je tudi histokemijska reakcija za železo (sl. 33a in b).



**Slika 33a-b:** Vranica pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Barvanje po Perlsu. Pigmentne celice (→) so številne, v citoplazmi je veliko hemosiderina (modro) in melanina (črno). Pozitivna reakcija za hemosiderin (modra obarvanost) je intenzivna. (a) Merilo: 100 µm. (b) Merilo: 10 µm.

## 4 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 4.1 CELICE V KRVI

V krvi nepigmentirane podvrste močerila so jedrni eritrociti, trombociti in levkociti, kar je značilnost vseh vretenčarjev razen sesalcev (Foxon, 1964). Jordan (1932) omenja, da je pri močerilu (*Proteus anguinus*) krvožilje glavno mesto proliferacije in diferenciacije krvnih celic. Hemocitoblastov, izvornih krvnih celic, v krvi močerila nismo našli, so pa prisotne predstopnje eritrocitov.

Medtem, ko so pri sesalcih eritrociti brezjedrni bikonkavni diskki, so pri vseh ostalih vretenčarjih ovalne, elipsoidne, lahko tudi bolj okrogle celice z jedrom, občasno pa so v krvnem obtoku prisotni brezjedrni eritrociti – eritroplastidi (Canfield, 1998). Ti so predvsem očitni pri repatih dvoživkah brez pljuč, saj na tak način povečajo kapaciteto prenosa kisika v odsotnosti pljuč (Turner, 1988). V krvožilju človeške ribice prisotnost eritroplastidov, kot produktov amitotske delitve, omenja tudi Jordan (1932), vendar jih mi nismo našli. Našli smo le veliko število tipičnih ovalnih do elipsoidnih eritrocitov z ovalnim in centralno nameščenim jedrom. Njihova citoplazma je zaradi hemoglobina eozinofilna. V splošnem imajo nižji redovi vretenčarjev večje eritrocite, vendar pa je velikost znotraj redov različna (Canfield, 1998). Največje eritrocite, celo od vseh vretenčarjev, imajo prav vodne neotene repate dvoživke (Turner, 1988), kot so družine Proteidae, Amphiumidae in Sirenidae. Znotraj družine Proteidae ima močeril *Proteus anguinus* večje eritrocite z manjšimi jedri kot nektur *Necturus maculosus* (Olmo in Morescalchi, 1975, cit. po Gregory, 2003). Povprečne dimenzije eritrocitov nepigmentirane podvrste močerila v naših meritvah so v primerjavi z literaturo bolj podobne dimenzijam eritrocitov pri nekturu kot pri močerilu. Tudi Jordan (1932) je pri močerilu izmeril večjo povprečno velikost eritrocitov ( $60 \times 35 \mu\text{m}$ ) kot mi. Velja omeniti, da so v našem primeru oblike in dimenzije zrelih eritrocitov precej različne in lahko precej odstopajo od povprečnih velikosti.

Eritropoeza pri vseh redovih vretenčarjev vključuje izvorne celice, te se diferencirajo v proeritroblaste (pronormoblasti), potem v bazofilne, polikromatofilne in ortokromatofilne eritroblaste (normoblaste), ki jim sledijo brezjedrni retikulociti pri sesalcih. Končna celica je eritrocit, brezjedrni pri sesalcih in z jedrom pri nižjih redovih (Canfield, 1998). Pri dvoživkah avtorji za izvorne celice eritrocitov in ostalih krvnih celic uporabljajo izraz hemocitoblasti (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1967, 1968). V krvi nepigmentirane podvrste močerila je bilo prisotno manjše število eritroblastov, kar dokazuje, da pri nepigmentirani podvrsti močerila eritropoeza poteka tudi v krvožilju. Dimenzijske eritroblastov v krvi nepigmentirane podvrste močerila so bile precej različne, zaradi različnih zrelostnih stopenj. Te stopnje so primerljive s fazami diferenciacije eritrocitov v vranici pupka *Triturus cristatus*, ki sta jih opisala Tooze in Davies (1967). Zgodnejši eritroblasti so celice z večimi jedri in manjšo količino citoplazme, med zoritvijo pa se jedro manjša, količina citoplazme in površina celice pa se povečuje. Oblika se spreminja od okrogle do ovalne, zreli eritrociti dosežejo eliptično obliko (Tooze in Davies, 1967). Med zorenjem eritrocita se količina ribosomov zmanjšuje, količina hemoglobina pa povečuje (Tooze in Davies, 1967). Zato se zmanjšuje bazofilnost in povečuje eozinofilnost citoplazme. Jedro je pri bazofilnem eritroblastu bolj homogeno in obarvano svetlejše kot pri zrelejših fazah. V jedrih zgodnjih eritroblastov namreč prevladuje bolj razpršen, razširjen, manj kondenziran kromatin. Tak kromatin se aktivno prepisuje in se imenuje evkromatin (Tooze in Davies, 1967). Med zorenjem eritrocita pa jedro postaja temnejše. Kromatin se kondenzira, kopiči v večje skupke in oblikuje heterokromatin (Tooze in Davies, 1967).

Bazofilni granulociti močerila so podobni kot pri večini ostalih vretenčarjev. Okrogla bazofilna zrnca zapolnjujejo citoplazmo, zaradi česar se jedro slabo vidi. Za razliko od sesalčjih bazofilnih granulocitov bazofilni granulociti vseh ostalih vretenčarjev nimajo lobuliranega jedra (Canfield, 1998). Vendar pa sta Tooze in Davies (1968) pri pupku *Triturus cristatus* celice z bilobuliranim jedrom opredelila kot bazofilne granulocite. Od vseh granulocitov smo najbolj redko našli bazofilne granulocite. Doggett in sod. (1987) jih v krvi rib niso našli, domnevno zaradi njihove redkosti, večina avtorjev pa celo misli, da jih v krvi rib ni (cit. po Doggett in sod., 1987). Bazofilni granulociti so najmanj pogoste

krvne celice tudi pri pupku *Triturus cristatus* (Tooze in Davies, 1968) in pri sesalcih (Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003).

Jedro eozinofilnih granulocitov pri večini plazilcev in rib ni lobulirano (Doggett in sod., 1987; Canfield, 1998), pri sesalcih in ptičih je lobulirano, največkrat z dvema režnjema (Ishizeki in Nawa, 1989; Canfield, 1998; Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003), pri dvoživkah pa ima največkrat 3 do 5 režnjev (Jordan, 1932; Fey, 1967a, cit. po Turner, 1988; Tooze in Davies, 1968). Mi smo pri močerilu opazili največ eozinofilnih granulocitov z dvo- ali tri-lobuliranimi jedri.

Canfield (1998) je poimenoval granulocite z drobnimi, neopaznimi zrnici in lobuliranim jedrom pri sesalcih nevtrofilni granulociti, granulocite z grobimi zrnici in bi- ali nelobuliranim jedrom pri ostalih vretenčarjih pa heterofilni granulociti. V literaturi smo za nižje vretenčarje zasledili le izraz nevtrofilni granulocit, ki ga opisujejo kot celico s polimorfnim, multilobuliranim jedrom (večje število režnjev kot pri eozinofilnih granulocitih) in z drobnimi, slabo vidnimi zrnici (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1968; cit. po Turner, 1988). Pri večini rib imajo nevtrofilni granulociti ovalno jedro (Doggett in sod., 1987). Morfologija nevtrofilnih granulocitov pri nepigmentirani podvrsti močerila se ujema z opisi pri ostalih dvoživkah. Tako kot pri močerilu so tudi pri ostalih vretenčarjih nevtrofilni granulociti najbolj številčni granulociti v krvi (Jordan, 1938, cit. po Turner, 1988; David in McMullen, 1972, cit. po Turner, 1988; Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003).

Limfociti nepigmentirane podvrste močerila se razlikujejo od drugih krvnih celic predvsem po zelo velikem razmerju med jedrom in citoplazmo. Celica je okrogla in ima bazofilno citoplazmo. Jedro je temno zaradi velike količine kondenziranega kromatina. To so lastnosti limfocitov pri vseh redovih vretenčarjev (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1968; Doggett in sod., 1987; Turner, 1988; Canfield, 1998; Ross in sod., 2003). Omenjajo tudi velikostne razlike med limfociti, zato ločijo majhne, srednje in velike limfocite. Pri močerilu izrazitih velikostnih razlik nismo opazili.

Oblike trombocitov so pri vretenčarjih lahko zelo različne. Krvne ploščice sesalcev so brezjedrne diskoidne strukture, citoplazemski fragmenti megakariocitov, ki delujejo kot hemostatične celice (Canfield, 1998; Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003). Pri ostalih vretenčarjih pa kot hemostatične celice delujejo trombociti z jedrom, nastali iz tromboblastov. Največkrat so ovalne ali vretenaste oblike, lahko pa so tudi okrogle. Vretenaste oblike imajo okroglo ali ovalno jedro in dva vretenasta podaljska citoplazme (Jordan, 1932; Doggett in sod., 1987; Turner, 1988; Canfield, 1998). Mi smo v krvi močerila našli okrogle do rahlo ovalne trombocite, z majhnimi citoplazemskimi izrastki ali psevdopodiji, ki jih omenjajo tudi drugi avtorji (Jordan 1932; Tooze in Davies, 1968). Pri nekaterih dvoživkah, tudi pri močerilu, omenjajo tudi tromboplastide, brezjedrne oblike trombocitov, ki so podobne sesalčjim krvnim ploščicam (Jordan, 1932; Foxon, 1964), vendar pa jih mi nismo našli. Trombocitov je v krvi močerila manj kot eritrocitov, so pa bolj pogosti kot vsi levkociti skupaj. To je primerljivo tudi s sesalčjo krvjo (Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003).

Monocyte nepigmentirane podvrste močerila se težko razlikuje od limfocitov, saj imajo podobno obliko in obarvanost, jedro monocitov pa je lahko tudi bolj okroglo. Citoplazma, ki je rahlo bazofilna, je na eni strani celice bolj obilna. Pri ribah in dvoživkah je bilo opisanih več različnih oblik jeder monocitov, okroglia, ovalna, ledvičasta, podkvasta in lobulirana (Doggett in sod., 1987; cit. po Turner, 1988). Za sesalce so značilni monociti z ledvičasto oblikovanim jedrom (Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003). Monociti so krvne celice, ki se v tkivu diferencirajo v makrofage (Canfield, 1988).

Če naše rezultate povprečnih velikosti krvnih celic iz krvi močerila primerjamo z velikostmi krvnih celic pri nižinskem urhu (*Bombina bombina*) (Wojtaszek in Adamowicz, 2003), opazimo, da ima urh precej manjše krvne celice kot močeril. Eritrociti so več kot petkrat manjši, ostale celice pa približno od tri do štirikrat manjše. Tako kot pri močerilu so tudi pri urhu najmanjše krvne celice limfociti, le malo večji pa so trombociti. Eritrociti imajo največjo celico in najmanjše jedro, ni pa tako velike velikostne razlike med njimi in drugimi krvnimi celicami, kot je to opazno pri močerilu. Monociti so pri urhu manjši od granulocitov (Wojtaszek in Adamowicz, 2003), pri sesalcih pa je znano, da so monociti največji levkociti (Ross in sod., 2003). Pri močerilu so monociti približno enake velikosti

kot granulociti. Največji granulociti pri močerilu so eozinofilni granulociti, podobno kot pri sesalcih (Gartner in Hiatt, 2000), pri urhu pa so to nevtrofilni granulociti (Wojtaszek in Adamowicz, 2003), vendar pa ni bistvenih razlik.

#### 4.2 MORFOLOGIJA VRANICE

Vranica je pri večini rib, večini plazilcev in večini repatih dvoživk (Urodele) podolgovata, kar velja za primitivno obliko (Romer, 1956). Tudi nepigmentirana in pigmentirana podvrsta močerila ter nektur imajo podolgovato vranico, vendar je pri nekturu manj podolgovata in širša kot pri močerilu. Nekoliko različni zunanji izgledi vranic pri različnih osebkih iste vrste, ki smo jih opazili pri nepigmentirani podvrsti močerila, v literaturi niso omenjeni. Pri nepigmentirani podvrsti močerila smo tudi opazili, da je vranica na debelejših predelih bolj kompaktna in bolj prekrvljena, v ožjih predelih pa je gostota celic in veziva manjša, sinusoidi pa vsebujejo manj krvi. V literaturi nismo zasledili podatkov o različnih debelinah vzdolž vranice, kot tudi ne podatkov o histoloških razlikah v prečnih prerezih različnih predelov.

Vranico močerilarjev obdaja vezivna kapsula, ki je pri močerilu tanjša kot pri nekturu. Prekriva jo sloj mezotelnih celic. V kapsuli so kolagenska vlakna in celice kolagenskega veziva, verjetno fibrociti in fibroblasti. Malo verjetno pa je, da vsebuje tudi celice gladkih mišic. Le-te so omenjene le pri debelih kapsulah bolj razvitih vranic, ki vključujejo tudi krvne in limfatične žile (Romano in sod., 1993; Gartner in Hiatt, 2000). V kapsuli človeške vranice so prisotni miofibroblasti, s kontrakcijo katerih skladiščena kri pri fizičnem stresu hitro steče v krvožilje (Ross in sod., 2003). Pri vranicah brez gladkih mišic v kapsuli in vezivnih trabekulah so za to funkcijo odgovorne žilne gladke mišice (Fänge in Nilsson, 1985). Za bolj razvite vranice so značilne trabekule ali gredice, ki se razširjajo iz kapsule v parenhim in so enako grajene kot kapsula. Trabekule so poleg retikularnega ogrodja dodatno ogrodje parenhima. Preproste trabekule so med nižjimi vretenčarji prisotne le redko v vranicah dvoživk (Tooze in Davies, 1968) ter v bolj razvitih vranicah plazilcev (Zapata in sod., 1981; Saad in Bassiouni, 1993). Pri višjih vretenčarjih pa ima vranica bolj

kompleksne trabekule (Romano in sod., 1993; Gartner in Hiatt, 2000; Ross in sod., 2003). Tipičnih trabekul v vranici močerilarjev ni, parenhim ima le retikularno ogrodje.

Parenhim vranice močerilarjev tvorita rdeča in bela pulpa, ki sta ločeni, vendar med njima ni jasne meje. Večino parenhima vranice zavzema rdeča pulpa, ki jo tvorijo celične vrvice in številni sinusoidi. Belo pulpo oblikujejo difuzni sloji limfoidnega tkiva med rdečo pulpo. Ti obdajajo majhne krvne žile z debelim vezivnim ovojem. Podobna zgradba vranice je opisana pri sodobnih kostnicah (Murata, 1959b, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Zapata, 1982, cit. po Fänge in Nilsson, 1985), pri nekaterih dvoživkah (Welsch in Storch, 1982; Ardavin in sod., 1984, cit. po Alvarez, 1990; Alvarez, 1990) in redko pri plazilcih (Saad in Bassiouni, 1993). Večina teh avtorjev takšno vranico imenuje difuzna vranica, saj je limfoidno tkivo razpršeno. Bolj organizirana, bolj razvita vranica, t.i. folikularna vranica, kjer sta pulpi ločeni s posebnim območjem, t.i. marginalno cono, limfoidno tkivo pa je organizirano v folikle okrog arterij, je značilna za nekatere brezrepce (Baldwin in Sminia, 1982, cit. po Alvarez, 1990; Barrutia in sod., 1983), za večino plazilcev (Kroese in van Rooijen, 1982) ter za ptiče in sesalce (Alvarez, 1990; Romano in sod., 1993; Ross in sod., 2003).

Vranica močerilarjev ima tipične značilnosti difuzne vranice, vendar pa smo opazili določena odstopanja od ostalih opisanih difuznih vranic. Vranica pupka vrste *Notophthalmus viridescens* ni zgrajena iz rdeče in bele pulpe (Hightower in St. Pierre, 1971), zato je bolj primitivna. Tudi vranica velikega pupka *Triturus cristatus*, ki sta jo raziskala Tooze in Davies (1968), se zdi primitivnejša od vranice močerilarjev. Belo pulpo sta opisala kot mase limfocitov in eritrocitov v sredini organa, ne opisujeta pa kopiranja limfocitov okrog žil. Najbolj podobni vranici močerilarjev sta vranica sleporilov (Welsch in Storch, 1982) in vranica žabe *Rana perezi* (Alvarez, 1990), vendar je med njimi nekaj razlik, ki kažejo na malo bolj napreden tip difuzne vranice pri sleporilih in žabi. Poleg difuzne razporeditve limfocitov lahko primitivnost vranic odraža tudi prisotnost jasnih retikularnih območij okrog centralne arterije (Pitchappan, 1980). V beli pulpi vranice močerilarjev smo opazili majhne krvne žile z debelim vezivnim ovojem, kar bi lahko bil znak, da je vranica močerilarjev primitivnejša od vranic sleporilov in žabe *Rana perezi*, pri katerih takšna območja niso omenjena. Alvarez (1990) pri žabi *Rana perezi* opisuje zelo

podobno organizirano limfoidno tkivo, kot je organizirano pri močerilarjih, vendar brez arterijskih žil, rdeča pulpa pa je tu iz dveh področij. Vranica sleporilov (Welsch in Storch, 1982) ima belo pulpo z gostim ovojem limfocitov okrog arteriol, pri vranici močerilarjev pa v območjih bele pulpe limfociti niso gosto nakopičeni. Glede na to, da so v bolj razvitih vranicah limfociti nakopičeni v gostih skupkih, lahko predvidevamo, da je to znak bolj razvite vranice. Tako bi lahko vranico močerilarjev določili za vmesni tip med primitivno in bolj razvito difuzno vranico.

Zgradba vranice je pri vseh treh obravnavanih predstavnikov močerilarjev zelo podobna. Velika podobnost je predvsem med vranicama dveh podvrst močerila, razlike so samo v večjem številu pigmentnih celic pri pigmentirani podvrsti močerila. Vranica nektura pa se od vranice močerila razlikuje v tem, da je bolj kompaktna ter da so območja bele pulpe manj izrazita, kopičenja limfocitov so manj obsežna in so prisotna tudi brez žile. Limfoidno tkivo je po vranici nektura bolj difuzno razporejeno kot po vranici močerila, iz česar lahko sklepamo, da je vranica nektura nekoliko primitivnejša od vranice močerila.

Majhne krvne žile - arteriole, ki se nahajajo v območjih bele pulpe vranice močerilarjev, so obdane z obsežnim vezivom in celicami s svetlimi okroglimi jedri. Pogosto smo v beli pulpi opazili ovoje žil brez vidne svetline. Okoli takšnega ovoja žile je limfoidno tkivo. To vezivo je retikularno, zato lahko takšna območja pri močerilarjih označimo tudi kot retikularna območja okrog centralne arterije limfoidnega tkiva, ki jih Pitchappan (1980) omenja kot eden od znakov primitivnosti vranice. Welsch in Storch (1982) sta v rdeči pulpi vranice sleporilov (primitivne dvoživke) opazila podobne strukture in jih označila za posebne krvne žile, imenovane elipsoide. Tudi za vranico rib Fänge in Nilsson (1985) omenjajo elipsoide. Opisujejo jih kot kapilare z odebeleno steno iz številnih celic in vlaken. Ena od njihovih funkcij je mehanska podpora krvnih žil, delujejo pa tudi kot filtri, ki odstranjujejo stare krvne celice (Dustin, 1939, cit. po Fänge in Nilsson, 1985). Elipsoidni ovoj vsebuje zelo vakuolizirane celice, ki verjetno delujejo kot pore. To omogoča krvi iz vraničnih arterij, da prehaja skozi elipsoide v rdečo pulpo na dva načina: skozi žilno svetlino, če gre za navadne žile ali pa skozi rahlo tkivo elipsoidnega ovoja (Fänge in Nilsson, 1985).

Rdečo pulpo vranice vretenčarjev gosto prepletajo sinusoidi. Tkivo med sinusoidi je iz retikularnega veziva, krvnih celic, njihovih predstopenj in pigmentnih makrofagov (Tooze in Davies, 1968; Welsch in Storch, 1982; Barrutia in sod., 1983; Alvarez, 1990; Saad in Bassiouni, 1993; Romano in sod., 1993; Ross in sod., 2003). Predvsem pri nekaterih primitivnejših vranicah, kjer so meje sinusoidov slabo prepoznavne, avtorji te prostore imenujejo območja med sinusoidi, vendar pa večina avtorjev za ta območja uporablja izraz celične vrvice. Pri vranici močerilarjev smo v njih med retikularno mrežo našli limfocite, eritrocite, hemocitoblaste, eritroblaste v različnih stopnjah razvoja in posamezne pigmentne makrofage.

Na naših preparatih jedro nekaterih eritrocitov ni vidno, ker ni prerezano. V literaturi so večkrat omenjene tudi oblike brez jedra – eritoplastidi, predvsem pri repatih dvoživkah, celo pri močerilu (Jordan, 1932; Turner, 1988; Canfield; 1998). Možno bi bilo, da obstajajo tudi tu, a je zaradi odsotnosti eritoplastidov v krvi močerila to malo verjetno.

V rdeči pulpi vranice nepigmentirane podvrste močerila smo pogosto opazili tudi celice z relativno velikim jedrom, jedrcem in malo citoplazme. Za razliko od limfocitov je kromatin razpršen, nekondenziran. Kondenziran kromatin je le na obodu jedra in v drobnih skupkih v notranjosti. Te celice lahko predvsem na podlagi morfologije jedra (Jordan, 1932; Tooze in Davies, 1968) označimo za hemocitoblaste. Jedro in celica sicer nista okrogle oblike, kot je to značilno za hemocitoblaste, vzrok za to pa je verjetno omejen prostor, ki ga zavzemajo med drugimi celicami. Hemocitoblast ima značilnosti nediferencirane celice (Tooze in Davies, 1968) in je izvorna, multipotentna krvna celica. Njegova diferenciacija v različne tipe krvnih celic je odvisna od specifičnih okoljskih faktorjev (Jordan, 1932). Jordan (1932) jih zaradi podobnosti z limfociti imenuje tudi limfoidni hemoblasti. Hemocitoblasti se pri večini dvoživk in višjih vretenčarjih pojavljajo le v hematopoetskih tkivih, pri močerilu in ribah pa tudi v krvožilju (Jordan, 1932). Pri repatih dvoživkah je vranica mesto produkcije hemocitoblastov, nadaljnja diferenciacija v eritrocite pa poteka v rdeči pulpi vranice in v krvožilju, ki ima relativno počasen tok krvi (Jordan in Speidel, 1924, 1930, cit. po Tooze in Davies, 1967; Jordan, 1932). Pri nepigmentirani podvrsti močerila smo hemocitoblaste našli le v vranici, v krvnih razmazih pa ne.

Od predstopenj krvnih celic smo v vranici poleg hemocitoblastov, ki so izvorne celice vseh krvnih celic, prepoznali le eritroblaste. Te smo našli redko in s histološko analizo nismo znali določiti razvojne stopnje. Pri dvoživkah je vranica večje mesto hematopoeze, vendar ta ne poteka v celoti v tem organu (Turner, 1988). Jordan (1932), ki je edini raziskal vranico močerila (*Proteus anguinus*), je ugotovil, da intravaskularno v vranici poteka eritropoeza in trombopoeza, ekstravaskularno v vranici pa nastajajo bazofilni granulociti. Poudaril pa je še, da vranica producira le izvorne celice, ti pa vstopijo v sinusoide in v periferno krvožilje, kjer se dokončno diferencirajo. Z našo raziskavo lahko potrdimo le, da v vranici poteka eritropoeza, in sicer vsaj začetek razvoja eritrocitov. Glede na to, da smo več eritroblastov, predvsem v kasnejših stopnjah, našli v krvi, je precej verjetno, da se eritropoeza dokonča v krvožilju. Podobno je pri vranici nektura, v kateri smo prepoznali hemocitoblaste in druge nediferencirane krvne celice, nismo pa natančno prepoznali, katere predstopenje krvnih celic so prisotne. Znano pa je, da v vranici nektura (*Necturus*) potekata eritropoeza in trombopoeza (Dawson, 1931). V vranici močerila in nektura je prisotna velika količina zrelih eritrocitov, kar pomeni, da je ena od njenih funkcij tudi njihovo skladiščenje. Za natančnejšo določitev vrst krvnih celic, ki še nastajajo v vranici močerilarjev, bi bilo treba narediti ultrastrukturne analize.

Precej obsežni sinusoidi so v vranici močerilarjev prepoznavni po večjem praznem prostoru, vendar pa so, tako kot celične vrvice, bolj ali manj napoljeni s krvnimi celicami, hemocitoblasti in predstopnjami eritrocitov. Retikularne celice z izrastki in retikularnimi vlakni obdajajo sinusoide. Dolgih sploščenih endotelnih celic sinusoidov, katerih longitudinalne osi so vzporedne smeri žile, značilnih za človeško vranico (Ross in sod., 2003), nismo opazili. V literaturi kot mejo sinusoidov v vranici dvoživk in plazilcev omenjajo zelo tanek epitel brez prekinitev ali s prekinivami (Hartmann, 1930, cit. po Welsch in Storch, 1982; Sterba, 1950, cit. po Welsch in Storch, 1982; Zapata in sod., 1981; Welsch in Storch, 1982) ali pa omenjajo samo retikularno ogrodje okrog sinusoidov (Tooze in Davies, 1968). Pri nekaterih dvoživkah in plazilcih so omenjene retikuloendotelne celice v vranici. Pri pupku *Notophthalmus viridescens* so to proste celice s fagocitiranim materialom (Hightower in St.Pierre, 1971). Tudi pri žabi *Rana perezi* (Alvarez, 1990) in agami *Agama stellio* (Saad in Bassiouni, 1993) jim pripisujejo

fagocitotske sposobnosti in vlogo pri razgradnji krvnih celic v rdeči pulpi. Pri žabi *Rana catesbeiana* pa jih opredeljujejo kot mejne celice sinusoidov (Brown in sod. 1975).

Meja med sinusoidi in celičnimi vrvicami je pri vranici močerilarjev težko prepoznavna, saj so med mejnimi celicami precej veliki intercelularni prostori. Ti omogočajo krvnim celicam, da hitro in brez težav prehajajo v sinusoide in iz sinusoidov (Ham in Cormack, 1979). Prisotnost številnih eritrocitov zunaj žilne svetline v vranici močerila in nektura kaže na to, da kri ne polni samo sinusoidov, ampak se razliva tudi po celičnih vrvicah. To pomeni, da je v vranici močerilarjev med terminalnimi kapilarami in sinusoidi odprt del krvnega obtoka. Pri odprtem krvnem obtoku se kapilare praznijo v retikularno mrežo. Tako se kri precea skozi celične vrvice in se izpostavlja makrofagom ter se skozi steno sinusoidov vrne v krvni obtok. Posledično kri polni sinusoide in vrvice rdeče pulpe. Kri je na ta način bolj učinkovito izpostavljena makrofagom (Ross in sod., 2003). Odprt krvni obtok je prisoten v vranici človeka (Ross in sod., 2003), pri večini rib (Zwillenberg, 1964, cit. po Fänge in Nilsson, 1985; Haider, 1966, cit. po Fänge in Nilsson, 1985) ter pri sleporilih (Welsch in Storch, 1982), repatih dvoživkah in brezrepnih (Sterba, 1950, cit. po Welsch in Storch, 1982). Pri ostalih vrstah sesalcev ima vranica zaprti krvni obtok, kar pomeni, da gre kri iz arteriolnih kapilar direktno v sinusoide (Ross in sod., 2003).

#### 4.3 PIGMENTNI MAKROFAGI VRANICE

Pigmentne makrofage smo v vranici nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in nektura (*Necturus maculosus*) opazili le posamično, nikoli v skupkih. Pri stradanih osebkih in pri pigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus parkelj*), katerih vranica vsebuje številčno precej več pigmentnih celic, se te lahko pojavljajo tudi v manjših skupkih. V vranici nekaterih drugih dvoživk so pigmentne celice bolj pogosto prisotne v manjših skupkih kot posamezno (Gallone in sod., 2002; Scalia in sod., 2004). V jetrih močerila se pigmentne celice vedno pojavljajo v skupkih (Prelovšek, 2002).

Pigmentni makrofagi vranice nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) so večinoma polni siderosomov, melanosomov in fagosomov. Te celice so

podobne tipu pigmentnih celic, ki so jih v jetrih močerila imenovali PC-S celice, pigmentne celice s siderosomi (Prelovšek, 2002). Omenjene celice vsebujejo številne siderosome, skupke melanosomov, občasno pa eritrofagosome in lipofuscin. V njih so dokazali tudi sintezo melanina (Prelovšek, 2002; Prelovšek in Bulog, 2003).

Fagosomi in lizosomi vsebujejo različen material, ki ga makrofag fagocitira in razgrajuje. Njihova prisotnost v pigmentnih celicah vranice nepigmentirane podvrste močerila dokazuje, da gre za makrofagne celice. Funkcija makrofagov je predvsem odstranjevanje in razgradnja odpadlih in tujih snovi iz krvi. Zato vsebujejo veliko fagosomov, ki nastajajo pri fagocitozi teh snovi in lizosomov, kjer poteka razgradnja s hidrolitičnimi encimi (Ham in Cormack, 1979).

Iz prisotnosti siderosomov v pigmentnih makrofagih vranice močerila sklepamo, da je pri močerilu poleg jeter tudi vranica mesto razgradnje starih, abnormalnih in poškodovanih eritrocitov, vendar v manjši meri. Makrofagi jih fagocitirajo in razgradijo v fagosomih in lizosomih (eritrofagocitoza), železo iz hemoglobina pa shranjujejo v siderosomih v obliki zlato-rjavega pigmenta, hemosiderina (Ghadially, 1997). Železo v hemosiderinu je v bolj stabilni, manj reaktivni obliki kot v feritinu (Arias, 1994: 603, cit. po Prelovšek, 2002). Tako se železo vzdržuje v biološko dostopni obliki in je organizem zaščiten pred toksičnimi učinki prevelike količine prostega železa (MacSween in sod., 1994, cit. po Prelovšek, 2002).

V pigmentnih celicah vranice močerila so prisotni tudi melanosomi, to so vezikli z naravno temno rjavim pigmentom, melaninom. Domnevo, da se melanin v teh celicah tudi sintetizira, pa bi morali dokazati s testiranjem aktivnosti tirozinaze, encima, ki katalizira sintezo melanina. Gallone in sod. (2002) so za pigmentne celice v vranici žabe *Rana esculenta* dokazali, da imajo, podobno kot pigmentne celice v jetrih, poleg značilnosti makrofagov tudi sposobnost melanogeneze. Ti dve lastnosti pigmentnih celic vranice so Scalia in sod. (2004) dokazali tudi pri drugih dvoživkah, med drugim za aksolotla (*Ambystoma mexicanum*), iz močerilarjem sorodne družine. Za melanomakrofagne centre v vranici rib niso dokazali sinteza melanina. V njih potekata fagocitoza eritrocitov in shranjevanje železa ter fagocitoza melanina (Agius, 1979; Zuasti in sod., 1990). Za

pigmentne celice jeter močerila je dokazano, da sinteza melanina poteka le v enem tipu pigmentnih celic, t.i. PC-S celicah (Prelovšek, 2002). Melanin-vsebujoče celice visceralnih organov (jetra, vranica, pljuča) poikilotermnih vretenčarjev spadajo v ekstrakutaneusni pigmentni sistem (Pintucci in sod., 1990; Sichel in sod., 1997; Guida in sod., 1998). Največ raziskav je narejenih na pigmentnih celicah v jetrih, za katere so ugotovili, da sinteza melanina poteka v melanosomih in ima funkcijo zaščite celic pred prostimi kisikovimi radikali in kovinskimi ioni (Scalia in sod., 1990; Corsaro in sod., 1995). Aktivirani kisikovi radikali so toksični zaradi pospeševanja lipidne peroksidacije. Povzročajo tudi različne celične poškodbe, med drugim tudi povečanje količine lipofuscina. Melanin uvrščamo med antioksidantne neencimatske sisteme in deluje kot past za kisikove radikale. Na ta način melanin sodeluje pri preprečitvi lipidne peroksidacije v pigmentiranih tkivih (Scalia in sod., 1990). Poleg tega melanin nastaja tudi pri odzivu živali, namenjenemu varčevanju energije (Frangioni in sod., 2000).

V citoplazmi nekaterih pigmentnih makrofagov so v poltankih rezinah tkivnih vzorcev vidne tudi svetlo modre granule. Predvidevamo, da gre za maščobne kaplje, prisoten pa je lahko tudi lipofuscin. Ker je viden le pri svetlobi določenih valovnih dolžin, bi bilo treba za njegovo identifikacijo ugotoviti avtofluoresenco. Lipofuscin, pigment zlato-rumene do rjave barve, je rezidualno telo, ki ostane v celici po lizosomski razgradnji lipidov in vsebuje zrnast material in eno ali več maščobnih kapelj (Ghadially, 1997).

Prelovšek (2002) je poleg omenjenih PC-S celic v jetrih močerila določila še dva tipa pigmentnih celic, PC-M in PC-V. Za PC-M celice so značilni številni melanosomski kompleksi, v katerih poteka razgradnja melanosomov (Prelovšek, 2002). Na poltankih rezinah vranice močerila podobnih celic nismo opazili. Našli pa smo nekaj celic s številnimi svetlimi vakuolami. Te so podobne PC-V celicam, za katere domnevajo, da so isti tip kot PC-S, le v drugačnem presnovnem stanju (Prelovšek, 2002).

Vranica nepigmentirane podvrste močerila vsebuje manj pigmentnih celic s hemosiderinom v primerjavi z jetri. Ta razlika ni vidna v gostoti hemosiderina v posamezni pigmentni celici, pač pa v precej manjšem številu pigmentnih celic v vranici močerila, kot pa so jih opazili v jetrih močerila (Prelovšek, 2002). Manjša količina hemosiderina v

vranici močerila pomeni, da so pri močerilu jetra bolj pomembno mesto razgradnje eritrocitov kot vranica.

V literaturi je o pigmentaciji vranice pri dvoživkah znanega zelo malo, je pa veliko več znanega o pigmentaciji jeter dvoživk. Večja pigmentacija se pojavi pri stradanju (Spornitz, 1972b, cit. po Prelovšek, 2002), pri večji starosti in velikosti živali (Andrew, 1969, cit. po Prelovšek, 2002), v slabših respiratornih pogojih (Frangioni in sod., 2000) in v hladnih mesecih med hibernacijo (Barni in sod., 1999, 2002). Več o pigmentaciji vranice je znanega pri ribah, kjer vranica vsebuje melanomakrofagne centre. Količina železa v njih se poveča v primeru določenih bolezni in pri stradanju osebka (Agius, 1979). Pigmenti v melanomakrofagnih centrih rib se akumulirajo, zato pigmentacija narašča z leti (Agius, 1981). Spreminjanje pigmentacije so v vranici dvoživk opazili tudi Gallone in sod. (2002) ter Scalia in sod. (2004). Ugotovili so, da melanogeneza pozimi upade, poleti pa naraste, medtem ko za količino železa velja obratno. Meints in Carver (1972) sta ugotovila, da eritropoetska aktivnost v vranici žabe *Rana pipiens* pada pri stradanih osebkih in se poveča po hibernaciji, kar pomeni povečanje količine železa v vranici pri stradanih osebkih in zmanjšanje njegove količine po hibernaciji.

Naši rezultati kažejo povečanje količine hemosiderina pri stradanih močerilih. Pri stradanih močerilih je bila količina hemosiderina precej različna med osebki, kar lahko pripisemo drugim dejavnikom. Količina hemosiderina se namreč lahko poveča tudi zaradi višje starosti osebka (Andrew, 1969, cit. po Prelovšek, 2002; Tanaka, 1974, cit. po Prelovšek, 2002), patološko povečane razgradnje eritrocitov ali prekomernega vnosa železa v telo (Ham in Cormack, 1979; Ghadially, 1997).

Majhne količine hemosiderina so prisotne tudi v nekaterih retikularnih celicah. Pri nekaterih dvoživkah in plazilcih (Hightower in St.Pierre, 1971; Alvarez, 1990; Saad in Bassiouni, 1993) so opisali retikuloendotelne celice v vranici kot celice s fagocitiranim materialom. Pripisali so jim fagocitotske sposobnosti in vlogo pri razgradnji krvnih celic v rdeči pulpi. Menimo, da je lahko vzrok za prisotnost hemosiderina v retikularnih celicah vranice močerila fagocitotska sposobnost teh celic.

Hemosiderin se v vranici nektura pojavlja le v posameznih pigmentnih celicah. Teh je pri nekturu precej manj kot pri nepigmentirani podvrsti močerila. Stradan nektur ima nekaj več pigmentnih celic s hemosiderinom, vendar še vedno manj kot hranjena nepigmentirana podvrsta močerila. Večja količina hemosiderina v vranici močerila kot v vranici nektura je verjetno odraz prilagoditve na jamsko okolje, v katerem živi močeril. Občasni hipoksični pogoji (Istenič, 1981, cit. po Prelovšek, 2002) in občasna obdobja pomanjkanja hrane v janskem okolju povzročita pri živali upočasnjen metabolizem (Huppop, 1986, cit. po Prelovšek, 2002) in padec hematokrita (Hervant in sod., 2001, cit. po Prelovšek, 2002), to pa je lahko vzrok za povečanje hemosiderina na mestih, kjer poteka razgradnja eritrocitov, torej tudi v vranici. Poleg tega se s starostjo živali hemosiderin kopiči v teh mestih. Za močerila je znano, da ima dolgo življenjsko dobo (tudi do 70 let).

Za razliko od jeter nepigmentirane podvrste močerila (Prelovšek, 2002) je v njegovi vranici zelo malo pigmentnih celic z melaninom. Nekoliko več jih je v vranici nektura, vendar še vedno manj v primerjavi z vranicami drugih raziskanih dvoživk (Gallone in sod., 2002; Scalia in sod., 2004). Količina pigmentnih celic z melaninom v vranici stradanih osebkov nepigmentirane podvrste močerila in nektura ni povečana.

Nepigmentirana podvrsta močerila je v janskem okolju velikokrat izpostavljena hipoksičnim pogojem in stradanju, kar zniža presnovno aktivnost živali. To, zaradi povečane razgradnje eritrocitov (Frangioni in sod., 2000) in zmanjšane eritropoetske aktivnosti (Meints in Carver, 1972), vodi do povečanja hemosiderina, to pa je tudi vzrok za povečanje melanina (Frangioni in sod., 2000, 2005). Iz naših rezultatov tega ne moremo v celoti potrditi. Vranica nepigmentirane podvrste močerila sicer vsebuje več pigmentnih celic s hemosiderinom, kar pa ne velja za pigmentne celice z melaninom.

Pigmentnih celic z melaninom je v vranici pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*) številčno precej več kot v vranici nepigmentirane podvrste močerila in nektura, kjer melanina skorajda ni. Tudi pigmentnih celic s hemosiderinom je pri pigmentirani podvrsti močerila veliko, približno toliko kot pri stradanih osebkih nepigmentirane podvrste močerila.

Pigmentacija se v jetrih dvoživk spreminja tudi sezonsko. Melanina je manj poleti (aktivnost) in več pozimi (hibernacija), kar je povezano z upadom metabolne aktivnosti živali v času hibernacije (Barni in sod., 1999, 2002). Za pigmentacijo v vranici dvoživk pa so ugotovili obratno sezonsko spremnjanje melanogeneze kot v jetrih. Pozimi se melanogeneza v vranici zmanjša, količina železovega pigmenta pa naraste (Gallone in sod., 2002; Scalia in sod., 2004). V stabilnem jamskem okolju ni sezonskih nihanj temperature, zato močeril ne hibernira. Sezonskega spremnjanja pigmentacije v visceralnih organih močerila torej ni pričakovati.

#### 4.4 SKLEPI

V krvi močerila je veliko eritrocitov in trombocitov. Prisotne so tudi predstopnje eritrocitov in levkociti, med njimi največ limfocitov in granulocitov ter posamezni monociti. Brezjedrnih oblik eritrocitov in trombocitov ni.

Vranica močerilarjev je podolgovate oblike. Obdaja jo vezivna kapsula, ki jo prekriva sloj mezotelnih celic. Tipičnih trabekul v vranici močerilarjev ni, parenhim ima le retikularno ogrodje.

Parenhim vranice močerilarjev tvorita rdeča in bela pulpa, ki sta ločeni, vendar med njima ni jasne meje. Večino parenhima vranice zavzema rdeča pulpa, ki jo tvorijo celične vrvice in številni sinusoidi. Belo pulpo oblikujejo difuzni sloji limfoidnega tkiva med rdečo pulpo. Ti obdajajo majhne krvne žile z debelim vezivnim ovojem. Vranica močerilarjev je difuzna vranica, in jo lahko opredelimo kot vmesni tip med primitivno in bolj razvito difuzno vranico.

Zgradba vranice vseh treh predstavnikov močerilarjev je zelo podobna. Limfoidno tkivo je po vranici nektura bolj razpršeno kot pri močerilu, iz česar lahko sklepamo, da je vranica nektura nekoliko primitivnejša od vranic nepigmentirane in pigmentirane podvrste močerila.

V vranici nepigmentirane podvrste močerila so prisotne izvorne krvne celice (hemocitoblasti) in ostale predstopnje eritrocitov. V perifernem krvožilju izvornih krvnih celic ni, prisotne so ostale predstopnje eritrocitov. Sklepamo lahko, da v vranici poteka začetek eritropoeze, ki se lahko dokonča v krvožilju.

V vranici močerilarjev je prisotna velika količina zrelih eritrocitov, kar lahko pomeni, da je funkcija vranice tudi skladiščenje eritrocitov.

Vranica močerilarjev ima odprti krvni obtok, kar pomeni, da se kapilare praznijo v retikularno mrežo. Kri ne polni samo sinusoidov, ampak se razliva tudi po celičnih vrvicah.

V vranici močerilarjev so prisotni pigmentni makrofagi, ki se večinoma pojavljajo posamično. V manjših skupkih jih zasledimo le pri stradanih osebkih in pri pigmentirani podvrsti močerila, kjer vranica vsebuje več pigmentnih celic.

Pigmentnih makrofagov s hemosiderinom je v vranici nepigmentirane podvrste močerila manj kot v jetrih, iz česar lahko sklepamo, da so pri močerilu jetra pomembnejše mesto razgradnje eritrocitov kot vranica. Pri stradanih osebkih lahko iz intenzivnosti histokemijske reakcije za hemosiderin sklepamo na povečanje količine hemosiderina. V primerjavi z nekturom je v vranici močerila več pigmentnih makrofagov s hemosiderinom. Menimo, da gre za posledico prilagoditve na jamsko okolje, v katerem živi močeril.

V vranici nepigmentirane podvrste močerila je v primerjavi z jetri zelo malo pigmentnih celic z melaninom. Nekoliko več jih je v vranici nektura, vendar še vedno manj kot v vranicah drugih raziskanih dvoživk. Količina pigmentnih celic z melaninom v vranici stradanih osebkov nepigmentirane podvrste močerila in nektura ni povečana.

Pigmentnih celic z melaninom in pigmentnih celic s hemosiderinom je v vranici pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anginus parkelj*) več kot v vranici nepigmentirane podvrste močerila in nektura.

## 5 POVZETEK

Z našo raziskavo smo proučili osnovno zgradbo vranice pri močerilarjih, družini repatih dvoživk. Raziskali smo vranico pri nepigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus anguinus*, pigmentirani podvrsti močerila *Proteus anguinus parkelj* in blatenem kužku *Necturus maculosus*. Vranica odraslih nižjih vretenčarjev ima limfoidno in hematopoetsko vlogo. Na svetlobno mikroskopskem nivoju smo z različnimi histološkimi barvanji opisali ureditev limfoidnega in hematopoetskega tkiva v vranici, s histokemijskimi testi za železo in melanin pa opredelili pigmentiranost vranice. Da bi bolje spoznali krvne celice in potek nastajanja krvnih celic, smo s svetlobnim mikroskopom pregledali tudi razmaze krvi nepigmentirane podvrste močerila. Za boljše prepoznavanje celic v vranici smo naredili tudi poltanke rezine vranice pri nepigmentirani podvrsti močerila. Pričakovali smo filogenetsko primitivnejšo organizacijo vranice v primerjavi z brezrepimi dvoživkami in višjimi vretenčarji.

Najbolj pogoste celice v krvi močerila so eritrociti, prisotnih pa je tudi nekaj njihovih predstopenj ter veliko trombocitov. Med levkociti je bilo največ limfocitov in granulocitov ter nekaj monocitov. Brezjedrnih oblik eritrocitov in trombocitov ni. V krvi tudi ni izvornih krvnih celic, hemocitoblastov. Krvne celice močerila so v primerjavi z drugimi vretenčarji precej večje, kar je značilno za družino močerilarjev.

Oblika vranice močerilarjev je podolgovata. Vranico obdaja vezivna kapsula, ki je pri močerilu tanjša kot pri nekturu. Prekriva jo sloj mezotelnih celic. V kapsuli so kolagenska vlakna in celice kolagenskega veziva. Parenhim ima le retikularno ogrodje, ni pa prisotnih trabekul, ki pri bolj razvitih vranicah predstavljajo dodatno ogrodje iz kolagenskega veziva.

Parenhim tvorita rdeča in bela pulpa, ki sta ločeni, vendar med njima ni jasne meje, t.i. marginalne cone. Večino parenhima vranice zavzema rdeča pulpa, ki jo tvorijo celične vrvice in številni sinusoidi. V celičnih vrvicah se med retikularno mrežo nahajajo limfociti, eritrociti, hemocitoblasti, eritroblasti v različnih stopnjah razvoja in posamezni pigmentni

makrofagi. Obsežni sinusoidi so, tako kot celične vrvice, bolj ali manj napolnjeni s krvnimi celicami, hemocitoblasti in predstopnjami eritrocitov. Sinusoide obdajajo retikularne celice z izrastki in retikularnimi vlakni. Belo pulpo tvorijo difuzni sloji limfoidnega tkiva med rdečo pulpo. Ti obdajajo majhne krvne žile z debelim vezivnim ovojem. Limfoidno tkivo ni v foliklih, ampak je difuzno razporejeno, zato smo vranico uvrstili med filogenetsko primitivnejšo obliko, t. i. difuzni tip vranice. V primerjavi z difuznimi vranicami drugih nižjih vretenčarjev je vranica močerilarjev vmesni tip med primitivno in bolj razvito difuzno vranico.

Majhne krvne žile, ki se nahajajo v območjih bele pulpe, so obdane z obsežnim vezivom in celicami s svetlimi okroglimi jedri. Okoli takšnega ovoja žile je limfoidno tkivo. Podobna območja okrog centralne arterije v literaturi omenjajo kot znak primitivnosti vranice.

Vranica močerilarjev ima odprti krvni obtok, saj je med terminalnimi kapilarami in sinusoidi odprti del. Kri se preceja skozi celične vrvice in se izpostavlja makrofagom ter se skozi steno sinusoidov vrne v krvni obtok. Med mejnimi celicami sinusoidov so zato precej veliki intercelularni prostori.

Pri močerilu so izvorne krvne celice (hemocitoblasti) prisotne le v vranici, ni jih pa v perifernem krvožilju. Ostale predstopnje eritrocitov so prisotne tako v vranici kot tudi v perifernem krvožilju. To pomeni, da v vranici poteka vsaj začetek eritropoeze, ki se lahko dokonča v krvožilju. V vranici je tudi zelo veliko zrelih eritrocitov, kar lahko pomeni, da je ena od funkcij tega organa tudi skladiščenje eritrocitov.

Zgradba vranice pri vseh treh predstavnikih močerilarjev je zelo podobna, predvsem pri nepigmentirani in pigmentirani podvrsti močerila. Vranica nektura je v primerjavi z vranico močerila bolj kompaktna, območja bele pulpe so manj izrazita, kopiranja limfocitov pa so manj obsežna. Manjši skupki limfocitov so za razliko od močerila pri nekturu prisotni tudi brez žile. Limfoidno tkivo je bolj difuzno razporejeno, iz česar zaključujemo, da je vranica nektura nekoliko primitivnejša od vranice močerila.

Pigmentne celice vranice močerilarjev so del ekstrakutaneusnega pigmentnega sistema. Večinoma se pojavljajo posamično, v manjših skupkih in v večjem številu pa le v primerih stradanja osebka in pri pigmentirani podvrsti močerila. Fagosomi v citoplazmi pigmentnih celic potrjujejo makrofagno vlogo celic. Siderosomi in pozitivna histokemijska reakcija za hemosiderin v teh celicah kažeta na razgradnjo starih, abnormalnih in poškodovanih eritrocitov, kot tudi na shranjevanje železa. Ti procesi potekajo v vranici v manjšem obsegu kot v jetrih teh živali. V pigmentnih celicah so prisotni tudi melanosomi, vendar pa sinteza melanina, ki je značilna za pigmentne celice jeter, v vranici ni dokazana. Histokemijska reakcija za melanin je v večjem obsegu pozitivna le pri pigmentirani podvrsti močerila. Pri nepigmentirani podvrsti močerila in nekturu je celic, pozitivnih za melanin, zelo malo, kar je v nasprotju z vranicami drugih dvoživk.

Iz rezultatov naših raziskav je razvidno, da je vranica močerilarjev primitivni difuzni tip vranice. Ima limfoidno vlogo, vlogo eritropoeze oziroma vsaj njenega začetka, vlogo skladiščenja eritrocitov, v primerjavi z jetri pa je manj pomembna za razgradnjo eritrocitov in shranjevanje železa.

## 6 VIRI

### 6.1 CITIRANI VIRI

AGIUS C. 1979. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases*, 2: 337-343

AGIUS C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of the teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Developmental and comparative immunology*, 5: 597-606

ALVAREZ R. 1990. An ultrastructural study of the spleen of the ranid frog *Rana perezi*. *Journal of Morphology*, 204(1):25-32

BALDWIN W.M. 3rd, COHEN N. 1981. A giant cell with dendritic cell properties in spleens of the anuran amphibian *Xenopus laevis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 5(3):461-73

BARNI S., Bertone V., Croce A.C., Bottiroli G., Bernini F., Gerzeli G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. *J Anat.*, 195 ( Pt 1):19-25

BARNI S., Vaccarone R., Bertone V., Fraschini A., Bernini F., Fenoglio C. 2002. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta L.* *J Anat.*, 200(Pt 2):185-94

BROWN B.A., Wright R.K., Cooper E.L. 1975. Lymphoid organs and amphibian immunity. *Adv Exp Med Biol.*, 64:267-75

CANFIELD P.J. 1998. Comparative cell morphology in the peripheral blood film from exotic and native animals. *Aust Vet J.*, 76(12):793-800

CORSARO C., Scalia M., Blanco A.R., Aiello I., Sichel G. 1995. Melanins in physiological conditions protect against lipoperoxidation. A study on albino and pigmented *Xenopus*. *Pigment Cell Research*, 8(5):279-82

DAWSON A.B. 1931. Hemopoiesis in *Necturus*. Abstract, Proc Am Soc Zool. Anat rec, 51: 72

DOGGETT T.A., Wrathmell, A.B., Harris J.E. 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicus*, Cichlidae. *Journal of Fish Biology*, 31: 147-153

- FÄNGE R., Nilsson S. 1985. The fish spleen: structure and function. *Experientia.*, 41(2):152-8
- FOXON G.E.H. 1964. Blood and respiration. V: Physiology of the Amphibia. Moore J.A. (ed.). Academic Press NY and London: 151-209
- FRANGIONI G., Borgioli G., Bianchi S., Pilozzi S. 2000. Relationships between hepatic melanogenesis and respiratory conditions in the newt, *Triturus carnifex*. *Journal of Experimental Zoology*, 287(2):120-7
- FRANGIONI G., Santoni M., Bianchi S., Franchi M., Fuzzi G., Marcaccini S., Varlani C., Borgioli G. 2005. Function of the hepatic melanogenesis in the newt, *Triturus carnifex*. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol.*, 303(2):123-31
- GALLONE A., Guida G., Maida I., Cicero R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta L.* A new melanogenic system? *Pigment Cell Research*, 15: 32-40
- GARCIA BARRUTIA 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(1):83-94
- GARTNER L.P., Hiatt J.L. 2000. Color atlas of histology. 3. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore
- GHADALLY, F.N. 1997. Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix, 2.del. 4.izdaja, Butterworth-Heinemann, Boston: 640, 642, 660, 668
- GREGORY T.R. Amphibian erythrocyte sizes. 2003. Gregory Lab (15. okt. 2003) <http://www.genomesize.com/cellsizes/amphibians.htm> (9.8.2005)
- GUIDA G., Maida I., Gallone A., Boffoli D., Cicero R. 1998. Ultrastructural and functional study of the liver pigment cells from *Rana esculenta L.* *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal.*, 34: 393-400
- HAM A.W., Cormack D.H. 1979. Histology. 8. izdaja. J.B. Lippincott Company
- HIGHTOWER J.A., St. Pierre R.L. 1971. Hemopoietic tissue in the adult newt, *Notophthalmus viridescens*. *Journal of Morphology*, 135:299-308
- HIGHTOWER J.A., Haar J.L. 1975. A light and electron microscopic study of myelopoietic cells in the perihepatic subcapsular region of the liver in the adult aquatic newt, *Notophthalmus viridescens*. *Cell and Tissue Research*, 159:63-71
- ISHIZEKI K., Nawa T. 1989. Ultrastructural features of the developing eosinophils in bone marrow and spleen of the musk shrew, *Suncus murinus*. *Journal of Morphology*, 202(3):425-33

- JORDAN H.E. 1932. The histology of the blood-forming tissues of the Urodele, *Proteus anguinus*. The American Journal of Anatomy, 51: 215-252
- KENT G. C. 1992. Comparative Anatomy of the Vertebrates. 7. izdaja, Mosby – Year Book, St. Louis: 409, 490
- KIERNAN J.A. 1990. Histological and Histochemical Methods: Theory and Practise. 2. izdaja, Pergamon press, Oxford
- KROESE F.G., van Rooijen N. 1982. The architecture of the spleen of the Red-eared Slider, *Chrysemys scripta elegans* (Reptilia, Testudines). Journal of Morphology, 173(3):279-84
- LIEM K.F., Bemis W.E., Walker W.F.Jr., Grande L. 2001. Functional Anatomy of the Vertebrates. 3. izdaja, Brooks/Cole- Thomson Learning, Belmont: 604
- MANNING M.J. 1991. Histological organization of the spleen: implications for immune functions in amphibians. Res Immunol., 142(4):355-9
- MEINTS R.H., Carver F.J. 1972. Erythropoietic activity in *Rana pipiens*—the influence of nutrition and season on spleen and peripheral blood activities. Comp Biochem Physiol A., 42(2):511-9
- PATTERSON K.D., Drysdale T.A., Krieg P.A. 2000. Embryonic origins of spleen asymmetry. Development, 127(1):167-75
- PINTUCCI G., Manzionna M.M., Maida I., Boffi M., Boffoli D., Gallone A., Cicero R. 1990. Morpho-functional characterization of cultured pigment cells from *Rana esculenta* L. Liver. In Vitro Cell. Dev. Biol., 26 (7): 659-664
- PITCHAPPAN R. 1980. Review on the phylogeny of splenic structure and function. Developmental and Comparative Immunology, 4(3):395-416
- PRELOVŠEK P.M. 2002. Histokemijska in ultrastrukturna analiza pigmentnih celic v jetrih močerila (*Proteus anguinus*, Urodela, Amphibia). Magistrska naloga. Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta
- PRELOVŠEK P.M., Bulog B. 2003. Biogenesis of melanosomes in Kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). Pigment Cell Research, 16(4):345-50
- PRESNELL J.K., Schreibmann M.P. 1997. Humanson's Animal Tissue Techniques. 5. izdaja, The Johns Hopkins University Press, Baltimore in London
- ROMANO T.A., Felten S.Y., Olschowka J.A., Felten D.L. 1993. A microscopic investigation of the lymphoid organs of the beluga, *Delphinapterus leucas*. Journal of Morphology, 215(3):261-87

- ROMER A.S. 1956. The vertebrate body. W.B. Saunders Company, Philadelphia London
- ROSS M.H., Kaye G.I., Pawlina W. 2003. Histology: A text and atlas. 4. izdaja, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore
- SAAD A.-H., Bassiouni W.M. 1993. Structure and histochemical organization of the spleen of *Agama stellio* (Sauria: Agamidae) and *Chalcides ocellatus* (Sauria: Scincidae). Journal of Morphology, 216: 115-120
- SCALIA M., Geremia E., Corsaro C., Santoro C., Baratta D., Sichel G. 1990. Lipid peroxidation in pigmented and unpigmented liver tissues: protective role of melanin. Pigment Cell Research, 3(2):115-9
- SCALIA M., Di Pietro C., Poma M., Ragusa M., Sichel G., Corsaro C. 2004. The spleen pigment cells in some amphibia. Pigment Cell Research, 17(2):119-27
- SICHEL G., Scalia M., Mondio F., Corsaro C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. Pigment Cell Research, 10(5):271-87
- TOOZE J., Davies H.G. 1967. Light- and electron- microscope studies on the spleen of the newt *Triturus cristatus*: the fine structure of erythropoietic cells. J Cell Sci., 2(4):617-40
- TOOZE J., Davies H.G. 1968. Light and electron microscopic observations on the spleen and the splenic leukocytes of the newt *Triturus cristatus*. The American Journal of Anatomy, 123(3):521-56
- TURNER R.J. 1988. Amphibians. V: Vertebrate blood cells. Rowley A.F., Ratcliffe N.A. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge: 129-209
- WELSCH U., Storch V. 1982. Light- and electron microscopical observations on the caecilian spleen. A contribution to the evolution of lymphatic organs. Developmental and Comparative Immunology, 6(2):293-302
- WOJTASZEK J., Adamowicz A. 2003. Haematology of the fire-bellied toad, *Bombina bombina* L. Comp Clin Path, 12: 129-134
- ZAPATA A., Leceta J., Barrutia M.G. 1981. Ultrastructure of splenic white pulp of the turtle, *Mauremys caspica*. Cell and Tissue Research, 220(4):845-55
- ZUASTI A., Ferrer C., Aroca P., Solano F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus*, and *Dicertranchus labrax* (Pisces, Teleostei). Pigment Cell Research, 3: 126-131

## 6.2 DRUGI VIRI

CARVER F.J., Meints R.H. 1977. Studies of the development of frog hemopoietic tissue in vitro. I. Spleen culture assay of an erythropoietic factor in anemic frog blood. *Journal of Experimental Zoology*, 201(1):37-46

GEREMIA E., Corsaro C., Baratta D., Santoro C., Scalia M., Sichel G. 1989. Antioxidant enzymatic systems in pigment tissue of amphibia. *Pigment Cell Research*, 2(3):208-12

OBARA N., Tochinai S., Katagiri C. 1982. Splenic white pulp as a thymus-independent area in the African clawed toad, *Xenopus laevis*. *Cell and Tissue Research*, 226(2):327-35

ZAPATA A. 1980. Ultrastructure of elasmobranch lymphoid tissue. 1. Thymus and spleen. *Developmental and Comparative Immunology*, 4(3):459-71

ZUASTI A., Jimenez-Cervantes C., Garcia-Borron J.C., Ferrer C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. *Arch Histol Cytol.*, 61(4):305-16

<http://library.med.utah.edu/WebPath/HISTHTML/MANUALS/RETIC.PDF> (11.10.2006)