

# Komparativna histomorfometrijska i histokemijska analiza probavnog sustava pet vrsta glodavaca

---

Jakopović, Mia

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:563414>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Mia Jakopović

**Komparativna histomorfometrijska i  
histokemijska analiza probavnog sustava  
pet vrsta glodavaca**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Mia Jakopović

**Comparative histomorphometric and  
histochemical analysis of gastrointestinal  
tract of five rodent species**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju i na Zoologijskom zavodu Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Duje Lisičića te komentorstvom doc. dr. sc. Romane Gračan. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije (mag. biol. exp.), modul zoologija.

## ZAHVALE

Zahvaljujem se svojim mentorima izv. prof. dr. sc. Duji Lisičiću i doc. dr. sc. Romani Gračan, što su mi pružili priliku da radim na ovom istraživanju i diplomskom radu te da sudjelujem u raznim aspektima tijekom njegove provedbe. Pružili su mi puno podrške, savjetovali me i omogućili mi da jako puno toga naučim tijekom cijelog procesa. Mnoga znanja i vještine koje sam pritom razvila ostat će mi vrlo vrijedna, a brojni sati koje sam provela kod njih na zavodima ostat će vrijedna i draga sijećanja. Hvala puno na iskazanom povjerenju i svom strpljenju koje su uložili u mene i moj rad.

Također sam vrlo zahvalna pokojnoj tehničarki Zrinki Benčini, na silnoj pomoći u laboratoriju, uvođenju u protokole i razne tehnike, navođenju i podučavanju pri samoj izradi preparata te vrlo ugodnom društvu. Mnoge sam sate i dane provodila u laboratoriju, a njezina je pristupačnost i ljubaznost učinila svaki dolazak ugodnim i poučnim te je vrijeme brzo prolazilo.

Hvala i asistentu Marku Glogoškom, koji je odvojio svoje vrijeme da mi pomogne s formiranjem i obradom podataka te prijateljima Marinu i Danimiru, koji su svoje slobodno vrijeme odvajali za odgovaranje na moja pitanja, pomaganje, navođenje i savjetovanje u statističkoj obradi podataka i programiranju. Uz njihovu sam pomoć stekla novo znanje i razumijevanje u tom području brže i kvalitetnije, nego bih ikad mogla sama.

Nadalje, puno hvala Maji Damjanović, koja je još od prije početka uložila puno povjerenje u mene za izradu ovog diplomskog rada, i prijateljicama Dori i Tei, za potporu, savjete i bodrenje tijekom ovog dugotrajnog procesa. Posebno hvala mom bratu Denisu, koji je strpljivo slušao sve probleme i napretke te bio (skoro) svakodnevna potpora i savjetnik, i na kraju, hvala svima od obitelji, prijatelja i poznanika, koji su bili tu uz mene tijekom mog studija.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Komparativna histomorfometrijska i histokemijska analiza probavnog sustava pet vrsta glodavaca

Mia Jakopović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prehrana životinja odražava se u građi probavnog sustava, a razlike se mogu očitovati u debljini pojedinih slojeva te broju i tipu žljezdanih vrčastih stanica koje izlučuju mukozni sekret za probavu i zaštitu. U ovom radu izabrala sam pet vrsta glodavaca koji žive u simpatriji na krškom području centralne Dalmacije, s ciljem utvrđivanja postoje li histomorfometrijske i histokemijske razlike u građi probavnog sustava koje su rezultat razlika u prehrani ovih vrsta. Uključene vrste su *Apodemus epimelas*, *Apodemus sylvaticus*, *Dinaromys bogdanovi*, *Eliomys quercinus* i *Glis glis*. Histomorfometrijski rezultati su pokazali veću debljinu oroženog epitela jednjaka i manju debljinu vanjskog mišićnog sloja jednjaka kod karnivornih vrsta, dok vrste koje se hrane visoko kaloričnom i lako probavljivom hranom imaju manju debljinu sluznice žlijezdanog dijela želuca i deblji epitel debelog crijeva. Vrste kod kojih prehrana sadrži otrovne tvari imaju specifične prilagodbe debljine pojedinih slojeva. Histokemijska analiza pokazala je da karnivorne vrste imaju više kiselih vrčastih stanica u tankom crijevu, a granivorne više mješovitih. Ovi rezultati predstavljaju nove podatke za uključene vrste i daju novi uvid u postojanje razlika između srodnih vrsta istraživanih glodavaca s različitom prehranom, ali i između različitih porodica, miševa iz roda *Apodemus* i puhova, sa sličnom prehranom.

Ključne riječi: gastrointestinalni slojevi, jednjak, crijeva, vrčaste stanice  
(68 stranica, 19 slika, 4 tablice, 94 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)  
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić  
Komentor: Doc. dr. sc. Romana Gračan

Ocjenitelji:  
Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić  
Izv. prof. dr. sc. Ivana Buj  
Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Rad prihvaćen: 8. rujna 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# Comparative histomorphometric and histochemical analysis of gastrointestinal tract of five rodent species

Mia Jakopović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Animal diet is reflected in the structure of the digestive tract. Some of the differences can be manifested in the thickness of individual layers or the number and type of glandular goblet cells that secrete mucose for digestion and protection. For this thesis, I selected five species of rodents that live in a sympatry in the karstic area of central Dalmatia, with the aim of determining if there are any histomorphometric and histochemical differences in the structure of the gastrointestinal tract, as a result of distinct diets of the species. Species that were included are *Apodemus epimelas*, *Apodemus sylvaticus*, *Dinaromys bogdanovi*, *Eliomys quercinus* i *Glis glis*. The histomorphometric results showed thicker esophageal keratinized epithelium and thinner esophageal outer muscular layer in carnivorous species, while species with high-calorie and easily digestible diets have thinner mucose layer of the glandular part of the stomach and thicker epithelium of the large intestine. Species whose diet contains toxic substances showed specific adaptations in the thicknesses of certain layers. Histochemical analysis showed that carnivorous species have more acidic goblet cells in the small intestine, while granivorous species have more mixed ones. These results represent new data for included species and provide new insight into the existence of both differences between related species of rodents with distinct diets, and between species of different families but with similar diet, as between *Apodemus* genus and dormice species.

Keywords: gastrointestinal layers, oesophagus, intestines, goblet cells  
(68 pages, 19 figures, 4 tables, 94 references, original in: Croatian)  
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Assoc. Dr. Duje Lisičić, PhD  
Co-mentor: Asst. Prof. Romana Gračan, PhD

Reviewers:  
Assoc. Dr. Duje Lisičić, PhD  
Assoc. Dr. Ivana Buj, PhD  
Dr. Ivana Maguire, PhD

Thesis accepted: 8<sup>th</sup> September, 2022

# SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Karakteristike vrsta korištenih u istraživanju	1
1.2. Građa probavnog trakta	3
1.3. Utjecaj prehrane na probavni trakt	9
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJAL I METODE	14
3.1. Potrebne dozvole za provedbu istraživanja	14
3.2. Prikupljanje istraživanih glodavaca	14
3.3. Držanje životinja u kontroliranim uvjetima	15
3.4. Eutanazija životinja i prikupljanje tkiva	16
3.5. Uklapanje tkiva u parafinske blokove i rezanje tkiva	17
3.6. Bojenje stakalaca s rezovima	18
3.6.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom	19
3.6.2. Bojenje kombinacijom alcijanskog modrila, perjordne kiseline i Schiffvog reagensa	19
3.6.3. Dehidracija i izrada trajnih mikroskopskih preparata	21
3.7. Analiza izrađenih mikroskopskih preparata	21
3.7.1. Histomorfometrijska analiza	22
3.7.2. Histokemijska analiza	25
3.7.3. Statistička obrada podataka	26
4. REZULTATI	30
4.1. Histomorfometrijska analiza	30
4.2. Histokemijska analiza	43
5. RASPRAVA	51
5.1. Histomorfometrijska analiza	51
5.2. Histokemijska analiza	54
6. ZAKLJUČAK	57
7. LITERATURA	59
8. ŽIVOTOPIS	66
9. PRILOZI	67



## KRATICE

<b>HE</b>	metoda bojenja mikroskopskih preparata hematoksilinom i eozinom
<b>AB-PAS</b>	metoda bojenja mikroskopskih preparata kombinacijom alcijanskog modrila, periodne kiseline i Schiffovog reagensa
<b>ApEp</b>	istraživana skupina vrste <i>Apodemus epimelas</i>
<b>ApSy</b>	istraživana skupina vrste <i>Apodemus sylvaticus</i>
<b>DiBo</b>	istraživana skupina vrste <i>Dinaromys bogdanovi</i>
<b>ElQu</b>	istraživana skupina vrste <i>Eliomys quercinus</i>
<b>GIGI</b>	istraživana skupina vrste <i>Glis glis</i>
<b>JM</b>	debljina sluznice jednjaka
<b>JE</b>	debljina višeslojnog pločastog epitela jednjaka
<b>JKE</b>	debljina oroženog dijela višeslojnog pločastog dijela epitela jednjaka
<b>JSE</b>	debljina neoroženog dijela višeslojnog pločastog dijela epitela jednjaka
<b>JMM</b>	debljina mišićnog sloja sluznice jednjaka
<b>JTM</b>	debljina vanjskog mišićnog sloja jednjaka
<b>GG</b>	debljina sluznice žlijezdanog dijela želuca
<b>TCE</b>	debljina jednoslojnog cilindričnog epitela tankog crijeva
<b>DCE</b>	debljina jednoslojnog cilindričnog epitela debelog crijeva
<b>SCE</b>	debljina jednoslojnog cilindričnog epitela slijepog crijeva

# 1. UVOD

## 1.1. Karakteristike vrsta korištenih u istraživanju

Red glodavaca (Rodentia) najveća je i najraznolikija skupina sisavaca, čiji su predstavnici prisutni na svim kontinentima te zauzimaju vrlo raznolike ekološke niše (Perrin i Curtis 1980). Dijele se na pet podreda: Castorimorpha, Anomaluromorpha, Myomorpha, Sciuromorpha i Hystricomorpha (Alderton 1999, Nowak 1999, Wilson i sur. 2016), od kojih su u ovom istraživanju uključene tri vrste unutar podreda Myomorpha – dvije vrste porodice Muridae i jedna vrsta porodice Cricetidae, te dvije vrste unutar podreda Sciuromorpha, porodice Gliridae.

Porodica Muridae najveća je, kozmopolitski rasprostranjena i najpoznatija porodica glodavaca, čiji pripadnici obuhvaćaju vrste od pravih omnivora, generalnih herbivora do raznih specijalista po tipu prehrane (Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Dvije vrste od interesa u ovom istraživanju iz ove porodice su krški miš – *Apodemus epimelas* (Nehring, 1902) i obični šumski miš – *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758).

Obje su vrste svejedi, međutim *Apodemus epimelas* je slabo istražena vrsta i nema puno podataka o tipu i udjelu pojedinih tipova hrane te samoj ekologiji vrste. Dužina tijela mu je 100 do 159 mm te rep 102 do 146 mm, a masa oko 28 do 56 g. Preferira suha staništa s kamenjarima i grmovitom vegetacijom te mu se prehrana sastoji od raznih zelenih dijelova biljaka, voća, sjemenja i insekata (Macdonald 2005, Wilson i sur. 2017).

*Apodemus sylvaticus* ima dužinu tijela između 80 i 110 mm te dužinu repa 70 do 115 mm te teži 14 do 30 g. Nastanjuje različite šume, od listopadnih do zimzelenih, rubove šuma, te vrtove i polja. Hrani se ponajviše sjemenjem i žirevima, a uz to još i raznim voćem, cvjetovima, stabljikama bilja, gljivama te beskralježnjacima poput gujavica, puževa i insekata (Macdonald 2005, Wilson i sur. 2017). Srodna i morfološki iznimno slična vrsta s *A. sylvaticus* na ovim prostorima je žutogrli šumski miš – *A. flavicollis* (Melchior, 1834). Iako su u literaturi zabilježene morfološke razlike između ovih vrsta, na našim prostorima varijabilnost i preklapanje u mjerama i obojenju krzna onemogućava pouzdano vizualno raspoznavanje (Jojić i sur. 2014, Macdonald 2005, Popov 1993, Tvrčković 1979). *A. flavicollis* također nastanjuje šume i šikare te ove dvije vrste često žive simpatrijski na staništu. Doduše *A. flavicollis* preferira starije dijelove tih staništa s boljom pokrivenošću krošnjama, otpadaka drvne mase i

većim udjelom listopadnih vrsta stabala te je dominantnija vrsta pa djelomično istiskuje *A. sylvaticus* (Marsh i Harris 2000, Montgomery 1978, 1980, Mujezinović i sur. 2013). Pritom *A. flavicollis* zauzima ponajviše arborealna mikrostaništa, dok se *A. sylvaticus* zadržava na tlu (Hoffmeyer 1973). Također, Macdonald (2005) navodi i vremensku segregaciju ovih vrsta, pri čemu je *A. flavicollis* aktivan isključivo noću, dok je *A. sylvaticus* aktivan i nekoliko sati prije izlaska, odnosno poslije zalaska sunca.

Porodica Cricetidae također je jedna od najvećih porodica glodavaca, unutar koje je velika potporodica Arvicolinae s većinski herbivornim vrstama, iako postoje i omnivorne vrste (Nowak 1999, Wilson i sur. 2017). Vrsta dinarski voluhar – *Dinaromys bogdanovi* (Martino, 1922) jedini je živući predstavnik svojeg roda koji potječe iz pliocena (Kowalski 2001 i Maul 1990 prema Kryštufek i Bužan 2008).

Dužina tijela *D. bogdanovi* je oko 99 do 152 mm, dužina repa 74 do 119 mm, a masa između 30 i 82 g. Nastanjuje kamenita krška staništa te je prema prehrani herbivor. Većinom se hrani stabljikama i lišćem raznih vrsta trava i livadnog bilja koje sadrže veliku količinu celuloze te biljke koje sadrže otrovne kemijske supstance za obranu protiv herbivora (Macdonald 2005, Wilson i sur. 2017).

Svi živući predstavnici porodice Gliridae su omnivorni te se pretežito hrane visoko nutritivnom izvorima hrane poput različitih plodova biljaka te nekim beskralježnjacima, malim kralježnjacima i ptičjim jajima, a prije zime povećavaju svoju masu za pripremu na period hibernacije (Nowak 1999, Perrin i Curtis 1980). Iako se svi klasificiraju kao omnivori, postoje vrste koje su nešto više karnivorne, poput vrtnog puha – *Eliomys quercinus* (Linnaeus, 1766) te one koje su pretežito herbivorne, poput sivog puha – *Glis glis* (Linnaeus, 1766), koji su oboje bili uključeni u ovo istraživanje (Feldhamer i sur. 1999, Nowak 1999, Wilson i sur. 2016).

*Eliomys quercinus* ima dužinu tijela od 100 do 175 mm te rep dužine oko 90 do 135 mm. Masa tijela varira od 33 do 65 g, a prije hibernacije i do 120 g (Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Obitava na raznim staništima, od stepskih i kamenitih područja sve do listopadnih, mješovitih i zimzelenih šuma te čak i u vlažnim močvarnim područjima (Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Prehrana mu je vrlo raznovrsna i varira tijekom godine, a prije zime povećava svoju težinu za hibernaciju do idućeg zatopljenja (Gil-Delgado i sur. 2010, Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Od biljne hrane konzumira razno voće, orašaste plodove, sjemenke, pupove i cvjetove, a od životinjske razne beskralježnjake poput mnogih vrsta insekata, paukova, puževa i gujavica, ptičja jaja te male kralježnjake, poput guštera, ptica pjevica, rovki

i manjih glodavaca (Feldhamer i sur. 1999, Gil-Delgado i sur. 2010, Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Također često jede i stonoge, čije žlijezde sadrže niz otrovnih tvari – klor, jod, benzaldehid i hidrogen cijanid, bez vidljivih problema (Kuipers i sur. 2012, Wilson i sur. 2016).

*Glis glis* je najveća vrsta puha, s dužinom tijela od oko 130 do 190 mm te kitnjastim repom od oko 120 mm, a masa mu je oko 120 do 150 g tijekom godine, ali prije hibernacije dosegne i do preko 250 g (Kryštufek 2010, Nowak 1999, Wilson i sur. 2016). Nastanjuje razne listopadne i mješovite šume diljem Europe, s razvijenim krošnjama i grmovitim pokrovom, ali često zalazi i u voćnjake, parkove i urbana područja (Kryštufek 2010). Posebice je često vezan uz listopadne šume bukve (*Fagus*) i hrasta (*Quercus*), koji proizvode velike količine plodova (Kryštufek 2010, Wilson i sur. 2016). Većinom se hrani raznim voćem, orašastim plodovima i sjemenkama, ali zna konzumirati i druge dijelove biljaka, poput pupova i cvjetova te gljive. Ponekad jede i hranu animalnog podrijetla, poput insekata, ptičjih jaja te ptica pjevica i manjih kralježnjaka (Hürner i Michaux 2009, Kryštufek 2010). Nowakowsky i sur. (2006) su pokazali da *G. glis* preferira biljnu hranu naspram životinjske te u njihovom istraživanju nije pokazao preferencu za pojedini tip biljne hrane.

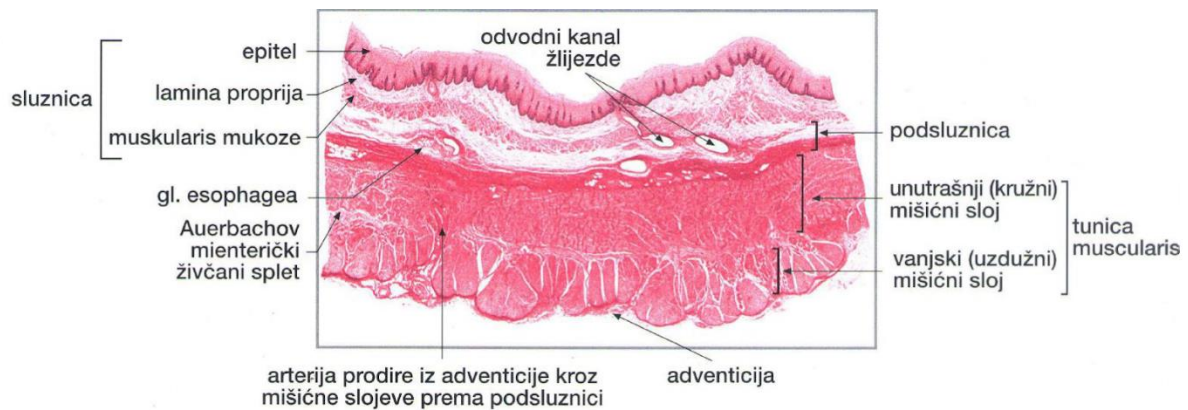
Ukratko, u kompleksu vrsta obuhvaćenim ovim istraživanjem jedino je *D. bogdanovi* herbivor, dok su ostale vrste omnivorne. Od ostalih vrsta razlikujemo dvije skupine – rod *Apodemus* te porodicu puhova. Unutar te dvije skupine, *A. sylvaticus* i *E. quercinus* konzumiraju više hrane animalnog podrijetla od njihovih „parova“ *A. epimelas* i *G. glis*. Osim toga, *A. sylvaticus* i *G. glis* konzumiraju veće količine sjemenki i orašastih plodova, dok *A. epimelas* jede vlaknima bogate dijelove biljaka. *E. quercinus* i *D. bogdanovi* konzumiraju hranu s otrovnim tvarima.

## 1.2. Građa probavnog trakta

Probavni trakt se proteže od usnog otvora u glavi, kroz cjevaste organe ždrijela, jednjaka, želuca te tankog i debelog crijeva, sve do analnog otvora. Uz cjevaste organe u njega se ubrajaju i pridružene probavne žlijezde, jetra i gušterača, koje izlučuju svoje sekrete u šupljinu probavnog sustava, čime pomažu u probavi hrane. Svaki od cjevastih organa sastoji se od slojeva sluznice (*mucosa*), podsluznice (*submucosa*) i vanjskih mišića (*tunica muscularis*) koji su obavijeni vanjskom opnom adventicijom (*adventitia*) ili serozom, a razlikuju

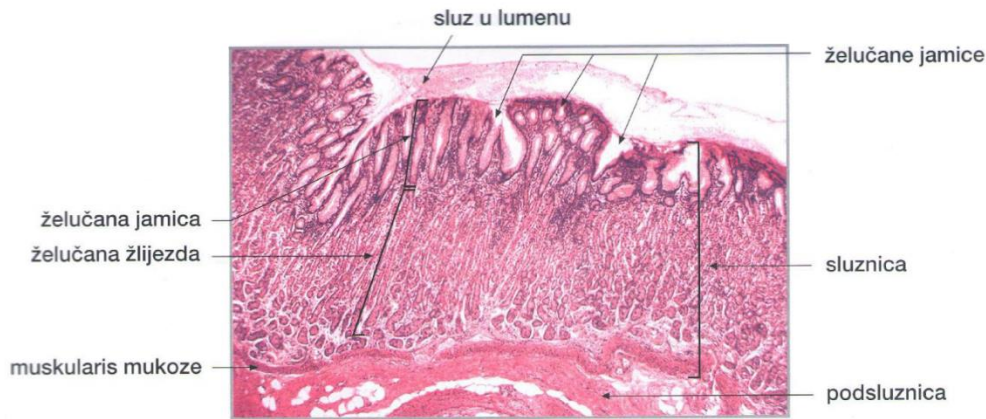
se u građi i razvijenosti pojedinih slojeva te prisustvu pojedinih žlijezdi i stanica unutar sluznice (Kerr 1999, Treuting i sur. 2018, Young i Heath 2003).

Unutar jednjaka vidljiva je vrlo razvijena i složena sluznica s nekoliko različitih slojeva (Slika 1). Veliki dio sluznice čini višeslojni pločasti epitel (*epithelium stratificatum squamosum*) koji prema površini orožnjava (*epithelium stratificatum squamosum cornificatum*) te se ljušti. Oroženi (orožnjeli) sloj štiti sluznicu od mehaničkih oštećenja uzrokovanih grubom hranom (Goodarzi 2019). Ispod bazalne membrane sluznice nalazi se sloj rijetkog vezivnog tkiva sluznice (*lamina propria*) te je od podsluznice odvojen tankim slojem mišića sluznice (*lamina muscularis mucosae*). Mišići sluznice stvaraju lokalizirane pokrete sluznice te održavaju potrebni tonicitet, kojim se pospješuje izlučivanje sluzi iz žlijezda (Young i sur. 2003). Osim toga, oni djeluju kao čvrsta barijera prolasku bakterija i unesenih tvari u okolne organe te je moguće da sprječavaju pretjerano širenje jednjaka prilikom prolaska hrane (Nagai i sur. 2003). Unutar sloja podsluznice umetnute su egzokrine žlijezde jednjaka čiji odvodni kanali prolaze sve do površine višeslojnog pločastog epitela i otpuštaju sekret u lumen kroz koji prolazi hrana. U vezivnom tkivu sluznice i podsluznice su također vidljive krvne i limfne žile, kao i arterije koje prodiru kroz mišićno tkivo. Prema vanjskom mišićnom sloju (*tunica muscularis*) vezivno tkivo podsluznice postaje gušće. Poprečnim presjekom kroz jednjak vidljivi su unutarnji kružni mišićni sloj te vanjski uzdužni mišićni sloj koji je obujmljen seroznim tkivom (*adventitia*) (Bradamante i Švajger 2002, Kerr 2000). Vanjski mišići proizvode peristaltičke kontrakcije kojima se hrana provodi kroz probavni trakt (Kerr 1999, Young i sur. 2003). Mjestimično su vidljivi i Auerbachovi mienterički te Meissnerovi submukozni živčani spletovi. Auerbachovi spletovi nalaze se između vanjskog uzdužnog i unutarnjeg kružnog mišićnog sloja koje inerviraju, dok su Meissnerovi spletovi u podsluznici te su zaslužni za kemijsku regulaciju i sekreciju žlijezdi (Purves i sur. 2001, Shahrestani i Das 2022).

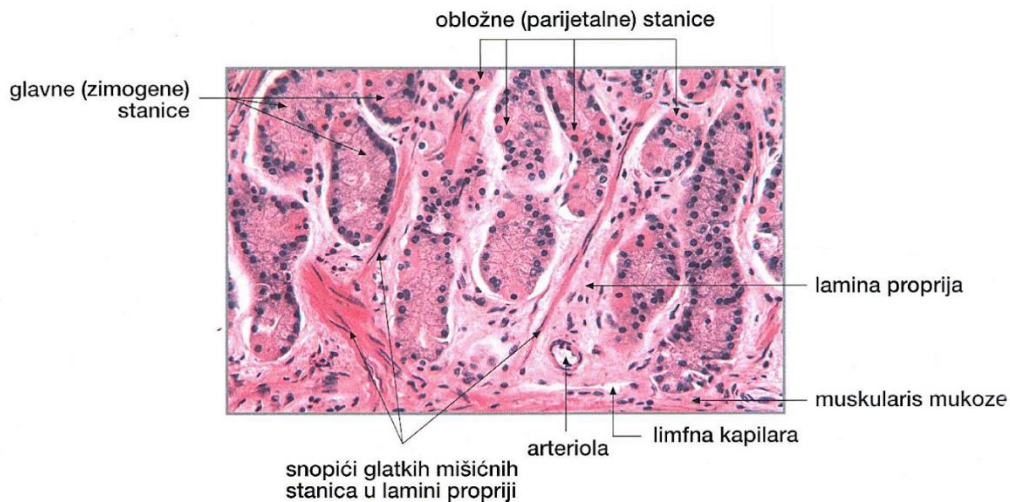


**Slika 1.** Poprečni presjek kroz stijenku jednjaka čovjeka s označenim pojedinim slojevima i strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).

U želucu razlikujemo tri regije: kardiju, fundus i pilorus. Kardija obuhvaća mali dio cjelokupnog volumena oko ulaza jednjaka u želudac, zatim slijedi regija fundusa te krajnje pilorička regija na kaudalnom dijelu želuca prema izlazu u tanko crijevo. Svaku od tih regija karakteriziraju posebne želučane žlijezde (kardijačke, gastičke i piloričke). Sve žlijezde izlučuju sluz, a gastične žlijezde proizvode većinu probavnih enzima. Žlijezde se protežu od mišića mukoze (Slika 2) te u njima razlikujemo pet vrsta stanica: mukozne, parijetalne, zimogene, enteroendokrine te matične. U bazalnom dijelu žlijezde koji se nalazi pri mišićnom sloju sluznice prevladavaju bazofilne zimogene stanice, koje izlučuju enzime, te eozinofilne parijetalne stanice (Slika 3), koje izlučuju klorovodičnu kiselinu u lumen želuca i bikarbonatne ione u kapilare (Kerr 2000). Unutar njih umetnute su i enteroendokrine stanice koje izlučuju tvari direktno u krv. Od bazalnog dijela prema površini proteže se vrat žlijezde u kojem prevladavaju mukozne stanice te istmus u kojem se nalaze matične stanice od kojih se diferenciraju sve ostale. Na površini sluznice se žlijezde otvaraju u želučane jamice (Slika 2) koje prekriva jednoslojni cilindrični epitel. Stanice žlijezdi povezuje vezivno tkivo kroz koje se pri bazi protežu limfne kapilare i arteriole te su mjestimično vidljivi limfni čvorovi i mali snopovi glatkih mišića. Mjestimično su u sluznici želuca vidljivi umetnuti dijelovi sluznice tankog crijeva s Lieberkühnovim kriptama. Podsluznica želuca je građena od vezivnog tkiva te kroz nju prolaze krvne i limfne žile. Ispod sluznice se protežu glatki mišići obavijeni serozom unutar kojih su pri vanjskoj površini umetnuti Auerbachovi mienterički spletovi (Kerr 2000).



**Slika 2.** Poprečni presjek sluznice želuca čovjeka u regiji fundusa s označenim vidljivim slojevima i strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).

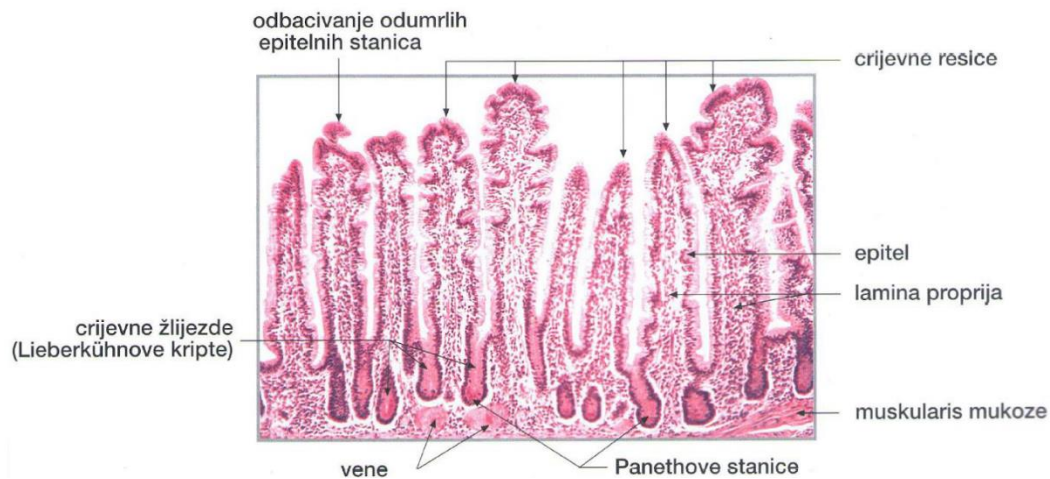


**Slika 3.** Bazalni dijelovi žlijezda želuca čovjeka u regiji fundusa s označenim pojedinim tipovima stanica i drugim vidljivim strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).

Tanko crijevo prekriveno je crijevnim resicama koje su obložene jednoslojnim cilindričnim epitelom (Slika 4) koji apsorbira nutrijente, ali i sa svojim mukoznim površinskim sekretom čini mukoznu barijeru prolasku različitih nepoželjnih tvari (Laboisse i sur. 1996). Njega čine apsorpcijske stanice prekrivene četkastom prevlakom mikrovila te vrčaste stanice koje izlučuju mukozni sekret u lumen crijeva (Kerr 2000). Na dnu između crijevnih resica nalaze se tubulusne žlijezde, Lieberkühnove kripte s matičnim stanicama i Panethovim stanicama (Slika 5), koje sudjeluju u obnovi epitelnih stanica te zaštiti od mikroorganizama (Clevers i Bevins 2013, Kerr 2000). Brunnerove žlijezde vidljive su u podsluznici te se također

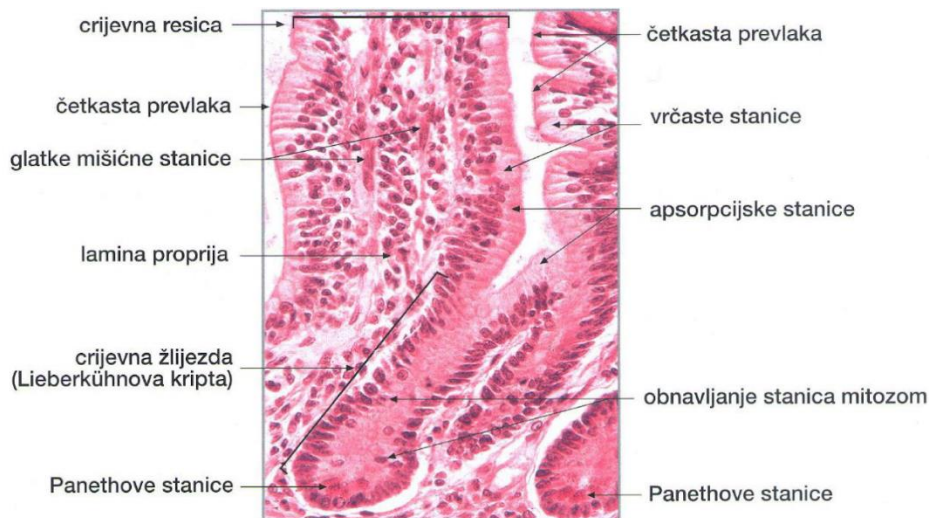
otvaraju u Lieberkühnove kripte i sudjeluju u stvaranju lužnatog sekreta koji neutralizira kiselu hranu koja dolazi iz želuca, obnovi tkiva i zaštiti od mikroorganizama (Krause 1981). Ispod površine epitelnih stanica proteže se vezivno tkivo s pojedinim glatkim mišićnim stanicama. Sluznicu od podsluznice također odvaja sloj mišića sluznice. Podsluznica i vanjski mišićni sloj građeni su jednako kao i u želucu.

Sluznica debelog crijeva ne sadrži crijevne resice, već brojne Lieberkühnove kripte (Slika 6), koje se protežu sve do mišićnog sloja sluznice i, za razliku od tankog crijeva, ne sadrže Panethove stanice (Treuting i sur. 2018). Površinu sluznice oblaže jednoslojni cilindrični epitel s umetnutim vrčastim stanicama, kao i kod tankog crijeva. Slijepo crijevo nalazi se na početku debelog crijeva, kod vrsta koje ga posjeduju, te je slične građe kao i ostatak debelog crijeva, ali s manje Lieberkühnovih kripti i žlijezda. Slijepo crijevo služi kao spremište različitih mikroorganizama koji pomažu u fermentaciji hrane. Podsluznica i vanjski mišićni sloj građeni su kao i u tankom crijevu i želucu (Kerr 2000, Treuting i sur. 2018).

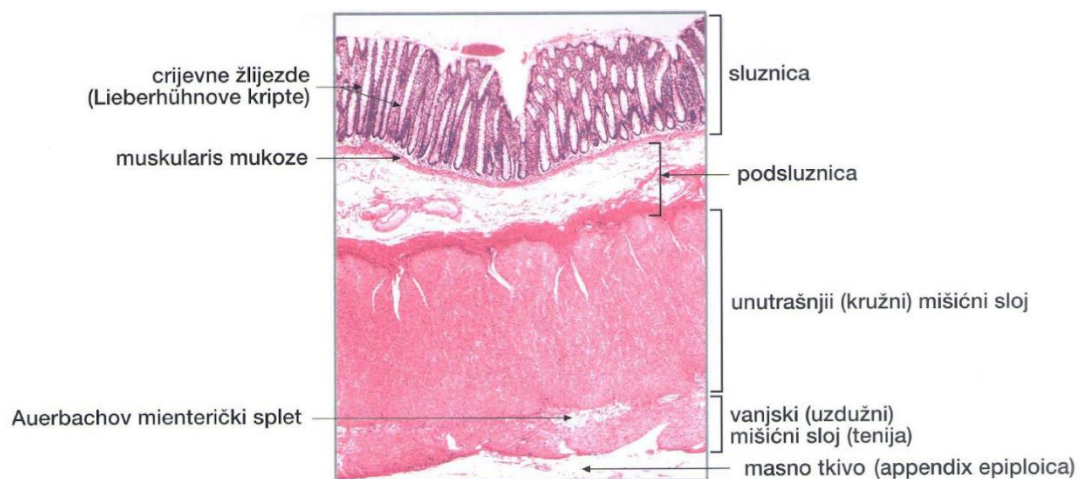


**Slika 4.** Poprečni presjek kroz sluznicu tankog crijeva čovjeka u području tankog crijeva s uočljivim resicama i Lieberkühnovim kriptama te označenim vidljivim strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).





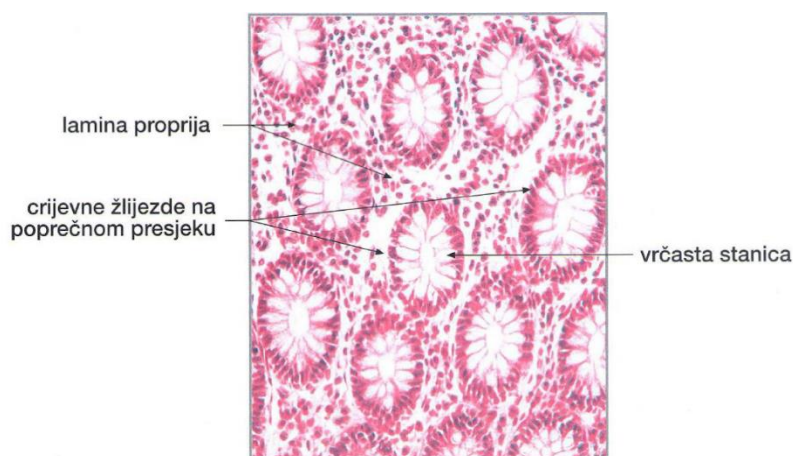
**Slika 5.** Presjek kroz crijevne resice i Lieberkühnove kripte u tankom crijevu čovjeka u području jejunuma te označenim pojedinim strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).



**Slika 6.** Poprečni presjek kroz stijenku debelog crijeva u području kolona čovjeka s označenim pojedinim slojevima i vidljivim strukturama, obojenje hematoksilinom i eozinom (Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).

Unutar želuca i crijeva nalaze se vrčaste stanice (Slika 5 i Slika 7), koje izlučuju različite glikoproteine. Glikoproteini su jedan od sastavnih dijelova sluzi te se tada nazivaju mucinima. Sluz u probavnom sustavu oblaže površinu cjevastih organa i ima brojne funkcije: za podmazivanje površina organa, zaštitu oštećenja sluznice želučanom kiselinom i autodigestije, zaštitu od prodiranja stranih tvari i mikroorganizama te kontrolu apsorpcije nutrijenata i brzine prolaska hrane i neprobavljenih ostataka kroz probavni sustav (Forstner 1978, Kim i Ho 2010,

Laboisse i sur. 1996, Linden i sur. 2008, Montagne i sur. 2004, Okon 1977, Paksuz i Paksuz 2015, Pavelka i Roth 2010, Young i sur. 2006). Promjenom sastava mucina može se mijenjati viskoznost sluzi u probavnom traktu za dodatnu zaštitu sluznice od prodora patogena do sluznice (Bansil i Turner 2006, Kim i Ho 2010, Linden i sur. 2008). Ovisno o sastavu glikoproteina (mucina) koje proizvode vrčaste stanice, one se mogu razvrstati na kisele – koje proizvode kisele mucine, neutralne – koje proizvode neutralne mucine i mješovite – koje proizvode i kisele i neutralne mucine.



**Slika 7.** Bazalni dio Lieberkühnovih kripti debelog crijeva čovjeka u području debelog crijeva s označenim vrčastim stanicama, žlijezdama i vezivnim slojem (lamina propria), obojenje hematoksilinom i eozinom (preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002).

Broj vrčastih stanica u epitelu crijeva postepeno raste od početka tankog crijeva prema kraju debelog crijeva (Aylward i sur. 2019, Boonzaier 2012, Pinheiro i sur. 2018). Razlog porasta broja stanica je vjerojatno potreba za dodatnim podmazivanjem relativno suhe neprobavljene tvari tijekom njenog prolaska (Okon 1977, Paksuz i Paksuz 2015).

U tankom crijevu većinom su prisutni neutralni mucini (Aylward i sur. 2019, Poddar i Jacok 1979, Sheahan i Jervis 1976, Takehana i sur. 2000), za koje se smatra da štite epitel od želučane kiseline koja prolazi zajedno s hranom (Allen i sur. 1993, Aylward i sur. 2019, Krause 1981, Young i sur. 2006). Također, mucini mogu povećavati viskoznost sluzi, kako bi se dodatno zaštitila sluznica (Bansil i Turner 2006), a Linden i sur. (2008) predlažu da neutralni mucini imaju i specifične antigene za pojedine krvne grupe koji mogu štititi od specifičnih patogena. U debelom crijevu sisavaca povećava se brojnost kiselih mucina (Aylward i sur.

2019, Kotze i Coetzee 1994, Sheahan i Jervis 1976) te je moguće da oni unutar Brunnerovih žlijezdi dodatno štite od bakterijskih infekcija (Cao i Wang 2009, Macfarlane i Dillon 2007).

### **1.3. Utjecaj prehrane na probavni trakt**

Smatra se da su prvotno glodavci bili omnivori (Landry 1970) ili granivori i insektivori (Vorontsov 1962 prema Hume 1994) i da su se zatim prilagodili na razne vrste prehrane, ovisno o ekološkim nišama koje su zauzimali, prilikom čega su uslijedile razne anatomske i fiziološke promjene njihovog probavnog sustava (Vorontsov 1962 prema Hume 1994, Perrin i Curtis 1980). One uključuju promjene u zubalu i čeljusnim mišićima, građi i složenosti želuca, slijepog i debelog crijeva te samoj dužini probavnog trakta i veličini pojedinih organa (Perrin i Curtis 1980, Vorontsov 1962 prema Hume 1994).

Ekološka istraživanja divljih vrsta glodavaca i njihovog probavnog sustava dovela su do razvoja teoretskih modela za interpretaciju prilagodbe probavnog trakta ovisno o okolišnim čimbenicima (Naya 2008). Langer (2002) navodi dvije strategije razvoja probavnog trakta sisavaca: kao sustav za razgradnju hrane vlastitim enzimima (autoenzimatska probava) ili kao sustav za održavanje mikroflore koja pomaže u razgradnji inače neprobavljivog biljnog materijala (aloenzimatska probava). Pritom životinje s aloenzimatskom probavom obično imaju vrlo diferenciran želudac, debelo i slijepo crijevo, koji mogu pomagati u održavanju mikroflore (Langer 2002). Životinje s autoenzimatskom probavom, koje se hrane pretežito visoko-kaloričnom i lako probavljivom hranom, primjerice karnivori, granivori (koji se hrane sjemenkama) ili frugivori (koji se hrane voćem) (Baker 1971, Hume 1994, Vorontsov 1960), imaju jednostavniji i kraći probavni sustav od herbivora čija prehrana sadrži velik udio vlakana i celuloze (Langer 2002, Langer i Clauss 2018, Perrin i Curtis 1980, Shieck i Millar 1985, Vorontsov 1962).

Međutim, probavni je trakt iznimno plastičan i za kratkoročne promjene u prehrani, poput volumena hrane, sastava hrane i gladovanja (Gross i sur. 1985, Naya 2008, Wang 2006). Naya (2008) navodi tri razloga za izrazitu fleksibilnost probavnog trakta glodavaca: 1) kao generalno male vrste, njihov je metabolizam vrlo brz te postojanje mehanizama kojima se pospješuje očuvanje energije je iznimno povoljno; 2) promjena kapaciteta probavnog trakta obzirom na volumen unesene hrane pada s povećanjem tijela, stoga je on relevantniji kod malih vrsta; 3) staništa tih vrsta često su vrlo varijabilna, zbog čega im ili tip i količina hrane variraju

sezonski ili konzumiraju velike količine slabo hranjive hrane. Pritom se ponajviše mijenja volumen i dužina probavila i pojedinih dijelova probavila, masa pojedinih organa te broj i veličina stanica (Carey 1990, Naya 2008, Wang i sur. 2006).

Iako postoje različiti radovi koji uspoređuju morfologiju probavnog trakta ovisno o prehrani različitih vrsta ili promjeni prehrane neke vrste, oni se baziraju na građi, dužini i volumenu probavnog trakta i pojedinih organa, dok podaci o debljinama pojedinih slojeva unutar organa često nisu u fokusu istraživanja (Aswegen i sur. 1994, Berghes i sur. 2011, Ellis i sur. 1994, Ghoshal i Bal 1989, Hume i sur. 2002, Kararli 1995, Nzalak i sur. 2010, Parakkal 1967, Schieck i Millar 1985, Selim i sur. 2017, Walters i sur. 2014). Prethodno su opisane debljine slojeva unutar jednjaka pojedinih vrsta glodavaca, poput afričkih vrsta vjeverica *Sciurus anomalus* (Schreber, 1785) (Goodarzi i sur. 2019) i *Funisciurus anerythrus* (Thomas, 1890) (Igbokwe i Obinna 2016). Pokazano je da debljina oroženog sloja ovisi o prehrani životinja, a ne o njihovoj veličini te da životinje koje gladuju duže vrijeme (Treuting et al, 2018) ili se hrane grubom i/ili biljnom hranom (Goodarzi i sur. 2019, Igbowe i Obinna 2016, Parakkal 1967) imaju deblji oroženi sloj. Debljina mišićnog sloja sluznice varira između vrsti glodavaca i prema rezultatima istraživanja, kod afričke je vjeverice *Funisciurus anerythrus*, koja se hrani voćem, sjemenjem, biljkama te mravima i termitima, vrlo debela (Igbokwe i Obinna 2016), dok je nešto je tanja kod vjeverice *Sciurus anomalus* (Goodarzi i sur. 2019), koja je isključivo herbivorna – granivorna, frugivorna i nucivorna (Wilson i sur. 2017). Kod domaćeg zamorčića, *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758) – striktno herbivorne vrste koja jede razne dijelove biljaka i voće također je nešto tanja (Darvishzadeh i Mohammadpour 2014, Wilson i sur. 2017.). Međutim sasvim nedostaje kod omnivorne vrste štakora *Cricetomys gambianus* (Waterhouse, 1840), koji ima sličnu prehranu kao *F. anerythrus*. Također nedostaje kod striktno herbivorne vrste – divljeg kunića, *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) (Nzalak i sur. 2010, Selim i sur. 2017, Wilson i sur. 2016, 2017). Vanjski mišićni sloj jednjaka također je opisan te se kod *O. cuniculus* sastoji od tri sloja (Darvishzadeh i Mohammadpour 2014), dok se kod glodavaca sastoji od dva sloja (Goodarzi i sur. 2019, Igbokwe i Obinna 2016, Darvishzadeh i Mohammadpour 2014, Treuting i sur. 2018). Ti slojevi vanjskih mišića variraju međusobno u debljini te između različitih vrsta, ali točne vrijednosti i usporedbe s veličinom životinja nisu jasno opisane. Struktura želuca vrlo izrazito je različita ovisno o načinu prehrane vrsta te debljina sluznice može varirati sezonski unutar vrste, poput hibernirajuće vrste *Marmota marmota* (Hume i sur. 2002), kod kojeg je uočeno povećanje debljine sluznice tijekom aktivne prehrane i smanjenje tijekom hibernacije. Visina epitelnih stanica u crijevu

povezana je s vremenom od zadnjeg obroka životinje te se veličina stanica u crijevu povećava prilikom aktivne probave i postepeno smanjuje tijekom gladovanja (Wang i sur. 2006), ali za korelaciju visine stanica ovisno o tipu hrane nedostaju podaci.

Što se tiče sastava mucina, dosadašnja istraživanja pokazuju različite rezultate. Sheahan i Jervis (1976) nisu mogli sa sigurnošću potvrditi ovisi li sadržaj pojedinih mucina o prehrani životinje, međutim, kasnija su istraživanja ukazivala na promjene uslijed različitog tipa prehrane te mikroflore u crijevima (Sharma i sur. 1993, Sharma i Schumacher 1995, Boonzaier 2012). Povećan udio teže probavljive hrane u pojedinim je istraživanjima ukazao na veću diferencijaciju vrčastih stanica, ali bez promjene brojnosti (Vahouny 1985, Schneeman i sur. 1982), dok pojedini autori ističu povećanu brojnost vrčastih stanica u tankom crijevu, bez značajne promjene njihovog sastava (Lundin i sur. 1993). Pri histokemijskoj usporedbi probavila različitih vrsta šišmiša, Gadelha-Alves i sur. (2006) su uočili manji broj vrčastih stanica u crijevima kod sanguivorne vrste, što predstavlja vrlo lako probavljivu hranu.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je histomorfometrijska i histokemijska analiza dijelova probavnog sustava, između pet vrsta simpatrijskih glodavaca s područja dinarida: *Apodemus epimelas*, *Apodemus sylvaticus*, *Dinaromys bogdanovi*, *Eliomys quercinus* i *Glis glis*. Od probavnog sustava analiziraju se tkiva jednjaka, žlijezdanog želuca, srednjeg tankog i debelog crijeva, dok se kod vrsta iz roda *Apodemus* te vrste *D. bogdanovi* dodatno analiziralo slijepo crijevo.

Utvdila sam postoje li razlike u debljini pojedinih slojeva tkiva u probavnom sustavu te u broju i tipu vrčastih stanica koje izlučuju mucine. Dobivene rezultate sam usporedila s literaturnim podacima o funkciji pojedinih tkiva i stanica te tipu i načinu prehrane navedenih vrsta u prirodi.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Potrebne dozvole za provedbu istraživanja

Ovaj je rad napravljen u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/2013) te je odobren od strane Etičkog povjerenstva za zaštitu životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (URBROJ: 251-58-10617-17-24). Za svrhu pokusa bilo je nužno uzeti životinje iz prirodnog okoliša te nije bilo moguće koristiti životinje koje su uzgojene za korištenje u pokusima, izuzev jedinki vrste *D. bogdanovi*. Bilo je potrebno izvršiti usmrćivanje u svrhu provođenja pokusa na životinjama, koje je odobrio doktor veterinarske medicine, sukladno stavku 2. članka 12. Zakona o zaštiti životinja.

#### 3.2. Prikupljanje istraživanih glodavaca

Krajem rujna 2017. godine jedinke vrsta *Apodemus epimelas*, *Apodemus sylvaticus*, *Eliomys quercinus* i *Glis glis* su ulovljene u prirodi na planinama Mosor i Dinara, u Hrvatskoj (Slika 8). Prikupljanje jedinki provodio je mentor izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić uz pomoć studenata. Odabrane su lokacije na kojima sve vrste žive sintopijski zajedno s vrstom *Dinaromys bogdanovi*. Životinje su hvatane pomoću žičanih živolovki za male sisavce, dimenzija 21 × 8 × 8 cm, koje se aktiviraju prilikom hranjenja životinje. S obzirom da su vrste *Apodemus epimelas* i *Apodemus sylvaticus* prema dosadašnjim saznanjima ekološki i prehranom vrlo slične te ih morfološki ne možemo razdvojiti, u našem ih istraživanju obje svrstavamo pod *A. sylvaticus*.

Jedinke *D. bogdanovi* su prikupljene iz uzgoja u Zoološkom vrtu Zagreb, koji posjeduje sve potrebne dozvole dobivene od Ministarstva za Zaštitu Prirode i Okoliša (UP/I-612-07/12-33/0338). Populacija u uzgoju potječe od jedinki prikupljenih u prirodi 2010. godine s lokaliteta na planini Dinara i 2012. godine s lokaliteta na planini Kamešnica, nakon čega je strogo kontroliran njihov uzgoj i razmnožavanje. Važno je napomenuti da je *D. bogdanovi* strogo zaštićena svojta hrvatske faune (NN 144/2013) te je zbog toga za prikupljane jedinki ove vrste korišten već uspostavljen uzgoj Zoološkog vrta u Zagrebu.



**Slika 8.** Prikaz lokacija planina Dinare, Kamešnice i Mosora u Hrvatskoj, na kojima su prikupljene životinje uključene u ovo istraživanje istraživanje, osim vrste *D. bogdanovi*.

Ukupno je uhvaćeno po šest jedinki iz prirode od svake vrste, izuzev *D. bogdanovi*. Jedinke ove vrste uključene u istraživanje su prikupljane nakon uginuća u uzgoju te su obrađene u najkraćem mogućem roku, kako bi se izbjeglo raspadanje tkiva. Iz uzgoja je prikupljeno jedanaest jedinki *D. bogdanovi*, međutim, samo šest jedinki je bilo prikladno za histološku analizu i stoga uključeno u daljnja istraživanja, dok je 5 jedinki isključeno jer nisu uzorkovane odmah nakon smrti te su postojali znaci raspadanja tkiva. Sve jedinke korištene u istraživanju su bile odrasle jedinke bez znakova da su gravidne i/ili u laktaciji te bez znakova bolesti probavnog sustava.

### **3.3. Držanje životinja u kontroliranim uvjetima**

Jedinke prikupljene iz prirode su dopremljene na Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, na Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju te su držane dva tjedna pojedinačno u kavezima, kako bi se umanjio učinak vanjskih čimbenika na fiziologiju, a time i građu probavnog trakta (Gross i sur. 1985). Životinje su držane sukladno uvjetima



propisanim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/2017). Žičani kavezi u kojima su držane jedinke dimenzija su  $42 \times 30 \times 22$  cm, odnosno za vrstu *G. glis*  $60 \times 42 \times 22$  cm. Temperatura nastambe bila je u rasponu  $18 - 25^{\circ}\text{C}$ , s relativnom vlažnosti zraka  $40 - 70\%$  i osvjetljenom kroz prozor, prirodnim svjetlom. Unutar kaveza stavljena je stelja od piljevine, glineno sklonište i grane iz prirode za obogaćenje okoliša te je omogućeno uzimanje hrane i vode *ad libitum*. Djelatnici Zavoda za animalnu fiziologiju su nadgledali životinje te su sve životinje hranjene jednakom mješavinom oraha, lješnjaka, jabuke, listova maslačka i sušenih šljiva, koja je mijenjana jednom dnevno.

Jedinke vrste *D. bogdanovi* su u Zoološkom vrtu Zagreb držane zasebno u staklenim terarijima dimenzija  $80 \times 60 \times 60$  cm, sa žičanim pokrovom. Temperatura nastambe održava se na  $10 - 20^{\circ}\text{C}$ , sukladno godišnjem dobu, vlažnost zraka je  $50 - 60\%$  te je održavan prirodan fotoperiod pomoću umjetnog svjetla. Za stelju je korištena mješavina šljunka i piljevine bez prašine, a nastamba je dodatno obogaćena komadima vapnenačkog kamena, granama drveta i glinenim posudama s nekoliko ulaza. Omogućeno je *ad libitum* uzimanje hrane i vode koji su se redovito mijenjali jednom dnevno. Životinje su hranjene mješavinom svježeg livadnog bilja, poput listova maslačka, djeteline, sljeza i sijena, s povremenim dodacima komadića jabuke, cikorijske, rikule, matovilca i mješavine sjemenja.

### **3.4. Eutanazija životinja i prikupljanje tkiva**

Izuzev jedinki *D. bogdanovi* koje su uginule u uzgoju Zoološkog vrta Zagreb, ostale je jedinke eutanazirao izv. prof. dr. sc. Lisičić uz pomoć djelatnika Zavoda za animalnu fiziologiju i studenata, sukladno propisima – injekcijom prekomjerne doze mješavine ketamina i ksilazina sastava prilagođenog za primjenu na laboratorijskim miševima (ketamin:  $80 - 100$  mg/kg + ksilazin:  $5 - 10$  mg/kg IP) u peritonealnu šupljinu (Hau i Van Hoosier 2003).

Nakon uginuća, zabilježili su podatke o spolu jedinke, masi i dužini tijela bez repa. Uzeli su uzorke tkiva srednjeg dijela jednjaka, žlijezdanog dijela želuca, srednjeg dijela tankog, debelog i slijepog crijeva. Kod vrsta puhova, koji ne posjeduju slijepo crijevo, od crijeva je uzet samo uzorak srednjeg dijela tankog i srednjeg dijela debelog crijeva.

### 3.5. Uklapanje tkiva u parafinske blokove i rezanje tkiva

Uzorke tkiva su odmah uronili u Bouinovu otopinu na 24 sata, kako bi se tkivo fiksiralo, a zatim se pripremalo za uklapanje u parafinske blokove. Kako bi se smanjila tvrdoća čistog parafina i time se poboljšala precizna temperatura topivosti i prodiranje smjese u tkivo, korištena je smjesa parafina i plastičnih polimera, koja se naziva paraplast. Za uklapanje tkiva potrebno je sve molekule vode zamijeniti paraplastom, međutim te se tvari ne miješaju, stoga je potrebno prvotno provesti tkivo kroz postupak dehidracije (uklanjanja vode iz tkiva) i prosvjetljenja.

Dehidracijom se uzorci uranjaju u otopine sve veće koncentracije etanola, sve do 100%-tnog etanola. Time se molekule vode u tkivu postupno zamjenjuju molekulama alkohola, a pritom se održava oblik stanice (Suvarna i sur. 2013). U ovom je istraživanju tehničarka Zoologijskog zavoda, Zrinka Benčina, tkiva provodila kroz niz otopina etanola postupno rastućih koncentracija – dva puta u otopinu 70%-tnog etanola, zatim u jednu otopinu 96%-tnog te dvije otopine 100%-tnog. U prvoj je otopini tkivo stajalo 48 sati, a u svakoj idućoj po sat vremena. Nakon postupka dehidracije tkivo se prosvjetljuje, čijim postupkom se molekule alkohola zamjenjuju kemikalijom koja se može miješati s alkoholom i s paraplastom (Kumar i Kiernan 2010). Prosvjetljenje tkiva napravila je pomoću kloroforma, postupnim uranjanjem prvo u otopinu kloroforma i paraplasta u omjeru 1:1 i zatim u dvije otopine čistog paraplasta. Cijeli se postupak uklapanja u paraplast provodio u termostatu, na temperaturi od 60°C te je u svakoj otopini tkivo bilo uronjeno oko 45 minuta. Pri toj temperaturi kloroform isparava, a paraplast je u tekućem obliku, što omogućava njegovo prodiranje u tkiva.

Nakon uklapanja u paraplast, tehničarka je tkiva uklopila u parafinski blok, nakon čega ih je ostavila da se hlade na sobnoj temperaturi preko noći. U parafinski blok je tkiva postavila tako da otvor cjevastog organa, odnosno okomiti presjek želuca, stoji okomito na dno bloka, kako bi se rezanjem na mikrotomu dobili poprečni presjeci i stvarne debljine slojeva organa. Parafinske je blokove s tkivima rezala rotacijskim mikrotomom na rezove debljine 7 – 8 µm, čime je dobiven jasno vidljiv sloj stanica. Rezove je zatim pažljivo kistom prenijela na vodenu kupelj temperature 40°C, što je otprilike 10°C niže od temperature otapanja paraplasta. Time se rezovi mogu dodatno izravnati na površini vode te pregledati za odabir optimalnih rezova rezova (Kumar i Kiernan 2010, Suvarna i sur. 2013). Uranjanjem predmetnih stakalaca u kupelj te pažljivim izvlačenjem, rezovi se mogu pozicionirati na njima, nakon čega su ostavljeni da

se suše preko noći na sobnoj temperaturi. Za svaki su preparat na stakalce izdvojena dva do tri poprečna presjeka, kako bi se osiguralo postojanje kvalitetnog preparata za provedbu analiza.

### **3.6. Bojenje stakalaca s rezovima**

Za daljnja istraživanja koriste se različita bojenja preparata, ovisno o tipu tkiva i analizi koja se želi provesti, a prije samog bojenja tkivo je potrebno deparafinirati, kako bi boje, koje su najčešće otopljene u vodi ili alkoholu, mogle prodrijeti u njega. Postupke deparafiniranja i bojanja provodile smo tehničarka Zrinka Benčina i ja te smo pritom koristile staklene posudice za bojenje, koje imaju stalak za umetanje do deset uspravno postavljenih predmetnih stakalaca. Preparati se pritom ne dodiruju te je svaki u doticaju s otopinom u koju se uranjaju. Pošto su neke od kemikalija lakše hlapljive i/ili opasne za ljude, cijeli smo postupak provodile unutar digestora te smo staklene posudice držale zatvorenima pomoću odgovarajućeg staklenog poklopca. Kako bi se zaštitile prilikom rukovanja s kemikalijama, bilo je potrebno nositi laboratorijsku kutu i rukavice te se što kraće zadržavati u blizini otvorenih posuda prilikom procesa bojenja.

U ovom je istraživanju koristile smo rutinsko histološko bojenje hematoksilinom i eozinom (HE bojenje) te bojenje kombinacijom alcijanskog modrila te perjordne kiseline i Schiffovog reagensa (AB-PAS bojenje). HE bojenje omogućilo mi je razlučivanje različitih struktura i tkiva u uzorcima potrebnim za histomorfometrijsku analizu, a pomoću AB-PAS bojenja sam provela histokemijsku analizu kojom sam kvalitativno i kvantitativno odredila vrčaste stanice u probavilu.

Postupak deparafiniranja se sastoji od uranjanja predmetnog stakalca s preparatima kroz niz otopina na određeno vrijeme, kako bi se postupno molekule paraplata uklonile iz tkiva. Preparat smo prvo uranjale u otopinu ksilola, na 15 minuta u prvu posudu i zatim 15 minuta u drugu. U prvoj se posudi otopina puno brže zagadi paraplantom, zbog čega ju je potrebno češće mijenjati te se uranjanjem u novu otopinu pospješuje i ubrzava proces. Nakon dviju otopina ksilola, preparat smo provele kroz niz otopina etanola, u kojima je svaki put ostavljen na 5 min, počevši od čistog (100%-tnog) i zatim u 96%-tni, 80%-tni te 70%-tni etanol. Nakon toga preparat smo isprale uranjanjem dva puta na 5 minuta u destiliranu vodu.

### **3.6.1. Bojenje hematoksilinom i eozinom**

Za HE bojenje mogu se koristiti različiti tipovi hematoksilina i eozina, ovisno o potrebi obojenja određenih tipova tkiva. Hematoksilin je tvar koja oksidacijom prelazi u anionski hematein, a zatim vezanjem na metalni kation ili neki drugi fiksator prelazi u kationski oblik. Takav oblik poprima pozitivni naboj i može se zatim vezati za anionska područja u stanici, poput nukleinskog kromatina. Ovisno o soli metala koja se koristi kao fiksator hematoksilina, mogu se dobiti različita obojenja (Suvarna i sur. 2013). Mi smo koristile Mayerovu hemalaun otopinu (HEMH-OT, BioGnost), koja sadrži aluminijske soli te prilikom bojanja daje crveno obojenje jezgre, a nakon uranjanja u alkalnu otopinu, obojenje postaje plave do crne boje. Eozin je anionska boja koja se veže za pozitivno nabijene molekule. U kiselj otopini proteini u citoplazmi protoniraju i oslobađaju svoje anione, koji se zatim izmjenjuju s anionima eozina i boja se veže za protonirane proteine. Time se citoplazma i vlakna vezivnog tkiva boje u različite nijanse od roza do crvene boje te se dobiva dobra razlučivost različitih tipova tkiva (Suvarna i sur. 2013). Postoje različite otopine eozina, a za uporabu s Mayerovom otopinom predlaže se korištenje 0,5% eozin Y vodene otopine, 0,5% ili 1% eozin Y alkoholne otopine (Sigma-Aldrich 2019). Mi smo koristile 0,1% eozin Y alkoholnu otopinu, s 96%-tnim etanolom (EOYA-05(10)-OT, BioGnost).

Nakon deparafiniranja i ispiranja, preparat smo prvo uronile na 6 minuta u Mayerovu hemalaun otopinu, nakon čega smo ispirale uranjanjem u vodu iz slavine dva puta na 10 minuta. Zatim smo uranjale preparate u otopinu eozina nešto kraće od dvije minute, jer nakon dvije minute postoji opasnost da bojenje previše prevlada, a odmah potom smo isprale preparate u destiliranoj vodi uranjajući ih dva puta na 5 minuta.

### **3.6.2. Bojenje kombinacijom alcijanskog modrila, perjodne kiseline i Schiffovog reagensa**

Specijalno AB-PAS bojenje korisno je za dokazivanje prisutnosti i razlučivanje kiselih i neutralnih mucina unutar tkiva. Pritom alcijansko modriilo boja kisele mucine u nijanse plave boje, a Schiffov reagens neutralne mucine u nijanse ružičaste. Time se dobiva spektar boja od plave, preko ljubičaste, do ružičaste, ovisno o kiselosti mucina, što je povoljno za razlikovanje tipova vrčastih stanica u probavnom traktu (Kumar i Kiernan 2010, Liu i sur. 2014).

Alcijansko modriilo je grupa kationskih bazičnih boja s bakrom koja se može selektivno vezati na polianinonske molekule poput proteoglikana, hijaluronske kiseline i kiselih mucina – sijalomucina i sulfomucina. Vezanjem za te molekule, one se bojaju u nijanse plave do zelene boje, ovisno o obliku alcijanskog modrila koje se upotrebljava (Fagan i sur. 2020, Hayat 1993, Kumar i Kiernan 2010, Suvarna i sur. 2013). Ovisno o pH vrijednosti mijenja se obojenost određenih tkiva pa se pri pH 1 bojaju samo proteoglikani i sulfomucini, odnosno hrskavično tkivo i mucini vrčastih stanica u debelom crijevu, a pri većem pH se bojaju i vezivna tkiva (Fagan i sur. 2020, Hayat 1993). Za pripremu alcijanskog modrila otopile smo 3 g praha (CA8GX-P, BioGnost) u 100 mL 3%-the octene kiseline.

Bojenje pomoću perjordne kiseline i Schiffovog reagensa omogućava diferencijaciju glikogena, škroba, neutralnih i sijalomucina, glikoproteina, retikulina i bazalnih membrana unutar tkiva probavila, bojajući ih raznim nijansama ružičaste boje. Unutar probavila se vrlo dobro mogu razlučiti vrčaste stanice s kiselim mucinima od okolnog tkiva, koje je slabije ružičaste boje (Suvarna i sur. 2013, Verdugo 1990). Perjordna kiselina služi za oksidaciju hidroksilnih skupina u ugljikohidratima u aldehidne, za koje se veže bazični fuksin Schiffovog reagensa i zatim nakon reakcije sa sumporastom kiselinom daje ružičasto obojenje (Hayat 1993, Kumar i Kiernan 2010). Bazični fuksin je prah tamno zelene boje koji u vodenoj otopini poprima ružičastu boju, a reakcijom sa sumporastom kiselinom, otopina postaje bezbojna, jer se na njega veže sulfonatna skupina. Nakon ispiranja u vodi, sulfonatna skupina se odvađa te se vraća ružičasta boja (Kumar i Kiernan 2010).

Otopinu perjordne kiseline smo pripremale dodatkom 0,5 g perjordne kiseline u 100 mL vode. Za pripremu Schiffovog reagensa, u 192 mL destilirane vode smo dodale 8 mL koncentrirane klorovodične kiseline, zatim 5 g natrijevog metilsulfata i nakon toga 0,5 g bazičnog fuksina (FB-P, BioGnost). Zatim se otopina treba miješati 2 sata na električnoj miješalici, dok ne postane posve bezbojna ili lagano žućkasta. Nakon toga se dodaje aktivni ugljen u otopinu te se miješa dvije minute, dok se otopina ne vrati u posve bezbojnu tekućinu, a zatim se filtrira od aktivnog ugljena (Hayat 1993). Miješanje otopine s aktivnim ugljenom provele smo dva puta s 0,5 g ugljena i potom filtrirale. Otopina se može višekratno koristiti, ali se treba skladištiti na temperaturi od 4°C (Hayat 1993). Za dobivanje reakcije sa sulfonatnim skupinama koristi se natrijev metabisulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) otopljen u vodi te s dodatkom klorovodične kiseline (Hayat 1993). Pritom nastaje otopina natrijevog bisulfita, a ispušta se i sumporov dioksid, stoga je potrebno izbjegavati udisanje i izlaganje sluznica (Essec USA 2017). Napravile smo 10%-tnu (vodenu) otopinu natrijevog bisulfita i zatim smo pomiješale

18 mL te otopine s 15 mL standardne jednomolarne klorovodične kiseline i 300 mL destilirane vode.

Za AB-PAS bojenje, tkivo se prvo boja alcijanskim modrilom, a zatim perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom, jer u suprotnom neutralni mucini mogu poprimiti ljubičastu boju umjesto ružičaste. Razlog tomu je da se tijekom PAS bojanja na neutralnim mucinima stvaraju anionske skupine koje zatim mogu reagirati s alcijanskim modrilom (Kumar i Kiernan 2010). Nakon deparafiniranja i ispiranja, preparate smo uronile u otopinu alcijanskog modrila na 30 minuta i potom ga isprale destiliranom vodom. Zatim smo uronile u 0,5%-tnu otopinu perjodne kiseline na idućih 30 min, nakon čega smo ih ispirale uranjanjem u vodu iz slavine na 5 minuta i potom na svega par sekundi u destiliranoj vodu te odmah uronile u otopinu Schiffovog reagensa na 15 minuta. Nakon toga uranjale smo preparate u 0,5%-tnu otopinu natrijevog bisulfita s klorovodičnom kiselinom, koja je bila podijeljena u tri zasebne posude te su preparati u svakoj bili uronjeni na 5 minuta. Na kraju smo ispirale uranjanjem dva puta na 10 minuta u vodu iz slavine.

### **3.6.3. Dehidracija i izrada trajnih mikroskopskih preparata**

Nakon bojenja, preparati se provlače kroz postupak dehidracije, prilikom čega se preparati uranjaju u postupno sve veću koncentraciju etanola i zatim u ksilol. Obrnuto postupku deparafiniranja, prvo smo uranjale po 5 minuta u 70%-tni etanol, zatim 80%-tni, 96%-tni i zatim čisti etanol. Nakon toga smo uranjale u dvije otopine ksilola, također po 5 minuta u svaku.

Nakon vađenja iz ksilola, preparate smo što prije uklapale u kanadski balzam i prekrile pokrovnim stakalcem, kako se ne bi isušili prilikom hlapljenja ksilola. Zatim smo ostavile da se kanadski balzam na preparatima suši i stvrdne, čime su dobiveni trajni preparati.

### **3.7. Analiza izrađenih mikroskopskih preparata**

Histološke preparate sam promatrala pomoću svjetlosnog mikroskopa Nikon Eclipse E600, a fotografije promatranih polja na preparatima sam pohranila pomoću digitalne samostojeće kamere za mikroskop u boji ZEISS Axiocam ERc 5s unutar programa ZEISS

ZEN2 Lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH) te sam unutar istog programa izvršila analizu. Preparate za histomorfometrijsku analizu sam slikala i analizirala pod ukupnim povećanjem od  $\times 100$ ,  $\times 200$ , i  $\times 400$ , dok sam za histokemijsku analizu vrčastih stanica u crijevima preparate analizirala pod povećanjem od  $\times 400$ , a u želucu  $\times 200$ .

U programu sam pod postavkama odabrala odgovarajuće povećanje korišteno na mikroskopu, kako bih mogla izvršiti mjerenja na slikama te sam namjestila optimalne postavke krivulje svjetline, kontrasta i gama razine za što bolje razlučivanje slojeva i ujednačen izgled promatranih preparata. Za mjerenje debljine pojedinih slojeva unutar programa dodavala sam elementi – linije. Linije sam obojala različitim bojama, ovisno o sloju koji sam mjerila. Za mjerenje površine koristila sam element “spline contour” kojim se automatski izračunava obuhvaćena površina. Elemente markere u obliku “x” koristila sam za brojanje vrčastih stanica unutar površine sluznice te sam koristila različite boje markera, ovisno o tipu mucina koje sadržavaju. Na kraju sam na svaku sliku preparata dodala mjerilo.

Datoteke sam pohranila u Carl Zeiss Image (.dzi) formatu, a mjerne elemente i odgovarajuće vrijednosti uzete unutar programa spremila sam dodatno u Carl Zeiss (.cz) te Extensible Markup Language (.xml) formatima.

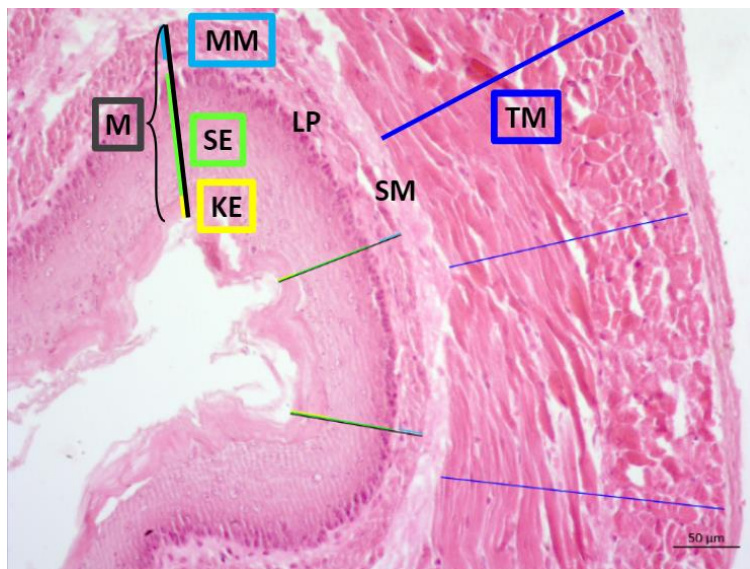
### **3.7.1. Histomorfometrijska analiza**

Za histomorfometrijsku analizu koristila sam preparate poprečnih presjeka jednjaka, tankog, debelog i slijepog crijeva, obojenih HE bojenjem, kako bi se raspoznale pojedine strukture i slojevi unutar tkiva. Za analizu tkiva žlijezdanog dijela želuca koristila sam preparate poprečnog presjeka kroz tkivo obojanog AB-PAS bojenjem.

Za svaku sam jedinku odabrala dva polja na preparatima, na kojima su svi slojevi od interesa čitavi, kompaktni i jasno razlučivi, kako bih mogla pravilno izvršiti mjerenja. Na odabranim poljima sam uzela mjere debljine pojedinih slojeva od interesa na tri različita mjesta. Najčešće je to bilo nasumično, osim u slučajevima kada je postojala velika razlika u debljini unutar istog polja, tada su unutar ova tri mjerenja subjektivno odabrani i ekstremi (minimum, maksimum i srednja veličina).

Unutar slikanog testnog polja sam mjerila ukupnu debljinu sluznice jednjaka, debljinu višeslojnog pločastog epitela, oroženi dio višeslojnog pločastog epitela, mišićni sloj sluznice

te ukupni vanjski mišićni sloj, bez dodatnog razlučivanja na uzdužne, poprečne i kose mišiće koji se pojavljuju u pojedinim dijelovima probavnog sustava (Slika 9).



**Slika 9.** Prikaz histomorfometrijske analize preparata poprečnog presjeka jednjaka jedinke *G. Glis*. Izmjerene su duljine: M – sluznica (*mucosa*), crna linija; SE – višeslojni pločasti epitel (*epithelium stratificatum squamosum*), zelena linija; KE – oroženi višeslojni pločasti epitel (*epithelium stratificatum squamosum cornificatum*), žuta linija; MM – mišićni sloj sluznice (*lamina muscularis mucosae*), svijetlo plava linija; TM – vanjski mišićni sloj (*tunica muscularis*), tamno plava linija. Označeni su dodatno LP – sloj vezivnog tkiva (*lamina propria*) i SM – podsluznica (*submucosa*). Obojenje hematoxilinom i eozinom, povećanje  $\times 200$

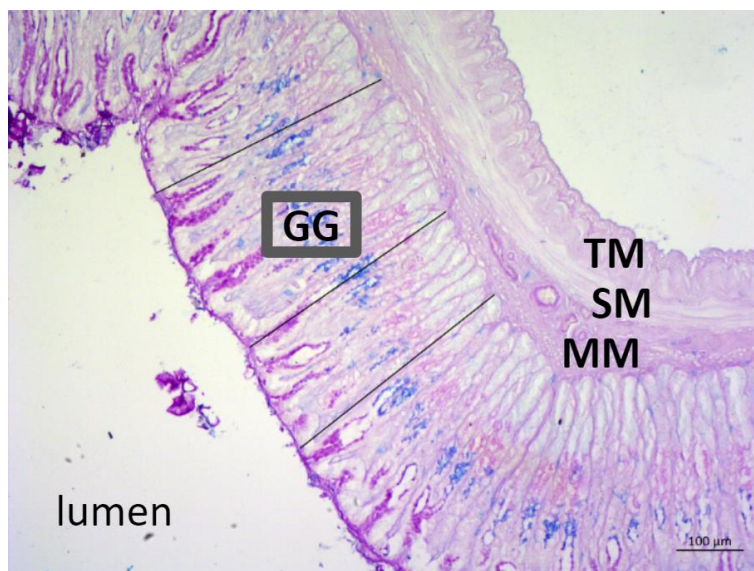
Preparate tankog, debelog i slijepog crijeva analizirala sam pod ukupnim povećanjem od  $\times 400$ , kako bi se jasno vidjela visina stanica jednoslojnog cilindričnog epitela. Mjerila sam visinu stanice duž smjera protezanja stanice, od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez uključivanja apikalno smještenih mikrovila (Slika 10). Mjere sam uzimala na području resice izvan kripte, a točne lokacije odabrane su nasumično na mjestima gdje je jasno vidljiva stanica.

Za mjerenje debljine sluznice želuca sa želučanim žlijezdama, koristila sam preparate obojene AB-PAS bojenjem te sam mjere uzimala pod ukupnim povećanjem od  $\times 100$ , kako bi debljina cijele sluznice mogla stati u okvir polja. Debljinu sam mjerila od bazalne membrane do krajnjeg apikalnog dijela epitela koji graniči s lumenom, tako da su obuhvaćene želučane žlijezde (Slika 11).





**Slika 10.** Prikaz preparata poprečnog presjeka debelog crijeva *G. glis*. Izmjerena je duljina E – visina epitelne stanice (epithelium) od bazalne membrane do vrha, bez visine mikrovila (crvena linija). Dužina je mjerena od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez uključivanja apikalno smještenih mikrovila. Obojenje hematoksilinom i eozinom, povećanje  $\times 400$



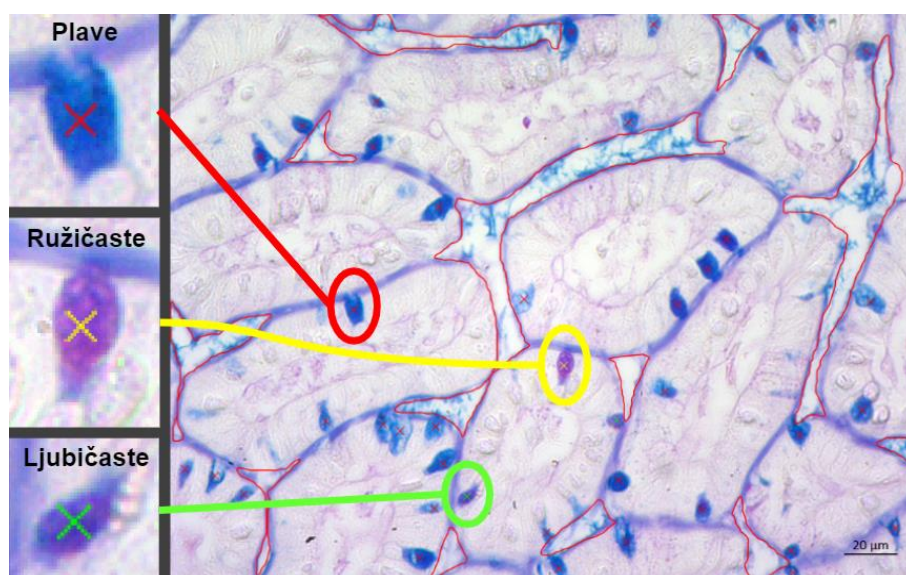
**Slika 11.** Prikaz preparata poprečnog presjeka žlijezdanog dijela želuca *G. glis*. Izmjerena je duljina GG – sluznica sa želučanim žlijezdama (*glandulae gastricae*), crna linija. Označeni su dodatno MM – mišićni sloj sluznice (*lamina muscularis mucosae*), SM – podsluznica (*submucosa*) i TM – vanjski mišićni sloj (*tunica muscularis*). Lumen označava centralnu šupljinu, odnosno dio probavnog sustava kroz koji prolazi hrana. Obojenje kombinacijom alcijanskog modrila, perjodne kiseline i Schiffovog reagensa, povećanje  $\times 100$

### 3.7.2. Histokemijska analiza

U sklopu histokemijske analize promatrala sam preparate tankog, debelog i slijepog crijeva, obojenih AB-PAS bojenjem.

Preparate tankog, debelog i slijepog crijeva analizirala sam pod ukupnim povećanjem od  $\times 400$ . Za svaku sam jedinku odabrala četiri polja na preparatima crijeva, na kojima je sluznica neraspadnuta i kompaktna te su stanice jasno vidljive, kako bih mogla pravilno izvršiti mjerenja. Također sam pazila da površina sluznice pokriva što veći dio pregledavanog polja, kako bi ukupna pregledavana površina između svake jedinke bila što sličnija.

Na odabranim poljima sam uzela mjere površine koju pokriva sluznica te sam unutar te površine brojala vidljive vrčaste stanice. Pritom sam razlikovala tri tipa vrčastih stanica ovisno o kiselosti mucina koje luče: plave (s kiselim mucinima), ružičaste (s neutralnim mucinima) i ljubičaste (s miješanim kiselim i neutralnim mucinima). Brojala sam sve vidljive vrčaste stanice neovisno o njihovoj veličini i smještaju u sluznici (Slika 12).



**Slika 12.** Prikaz preparata crijevnih resica tankog crijeva *G. Glis*. Izmjerena je ukupna površina sluznice čiji je rub označen crvenom linijom. Vrčaste stanice označavane su markerima ovisno o boji mucina koje sadrže: kiseli mucini (crveni marker), neutralni mucini (žuti marker) i miješani kiseli i neutralni mucini (zeleni marker). Obojenje kombinacijom alcijanskog modrila, perjodne kiseline i Schiffovog reagensa, povećanje  $\times 400$

Za analizu sluznice želuca koristila sam preparate ukupnog povećanja  $\times 100$ . Zbog slabe razlučivosti stanica u želucu, nije bilo moguće brojati vrčaste stanice u sluznici želuca, već sam mjerila debljine slojeva tipova stanica ovisno o obojenju: tamno plavo, ljubičasto i ružičasto, koji odgovaraju bojama vrčastih stanica u crijevima, te dodatno svijetlo roza i svijetlo plavo obojenje. Uočila sam različite redoslijede obojenja unutar sluznice, od bazalne membrane prema krajnjoj apikalnoj strani epitelal te sam mjerenja provela za svako obojenje prisutno u preparatu jedinke. Za svako obojenje nasumično sam odabrala tri lokacije mjerenja debljine sluznice i slojeva te su sva mjerenja izvršena duž iste osi na kojoj je mjerena i ukupna debljina sluznice za histomorfometrijsku analizu.

### 3.7.3. Statistička obrada podataka

Za lakšu daljnju obradu podataka, dobivene mjere uzimane u programu ZEN2 Lite sam prepisala u Excel Open XML Spreadsheet (.xlsx) format. Pritom sam koristila kratku skriptu napisana u Python programskom jeziku kojom su se automatski za svaki preparat ispisali podaci o tipu elementa, pripadajućoj duljini te boji elementa u zasebnu datoteku Excel Open XML Spreadsheet (.xlsx) formata. Time se izbjegla mogućnost nastanka pogreške uslijed ručnog prepisivanja. Podatke iz dobivenih tablica za svaki pojedini preparat objedinila sam zatim u jednu tablicu unutar Excel programa (Microsoft Corporation, verzija 16.0.4266.1001).

Pomoću Excel programa sam izračunala srednje vrijednosti mjera debljine slojeva za svaku jedinku te su daljnje analize podataka rađene na izračunatim srednjim vrijednostima. Prilikom mjerenja debljine sluznice želuca, uzimala sam po tri mjere na svakom dijelu sluznice na kojem je uočen drugačiji redoslijed obojenja prema AB-PAS bojenju. Minimalno sam uzela tri mjere, kada je u cijelom preparatu utvrđen uniformni redoslijed boja, a za svaki idući raspored boja uzela sam po još tri mjere. Minimalno tri mjere su uzete za jedinke: *A. epimelas* 3 i 5, *D. bogdanovi* 1, 3, 4 i 5 te *G. glis* 2, 3 i 4, maksimalno je uzeto 15 mjera za jedinku *A. sylvaticus* 1, a za ostale jedinke je uzeto po 6, 9 ili 12 mjera. Za svaku sam jedinku izračunala srednje vrijednosti svih uzetih mjera te sam daljnju statistiku radila na tim vrijednostima. Za obradu podataka histokemijske analize crijeva zbrojila sam vrčaste stanice određenog tipa na svim preparatima za svaku jedinku, kao i ukupne pregledane površine. Zatim sam broj vrčastih stanica podijelila s površinom sluznice, kako bih dobila omjer za svaku jedinku. Time sam za svaku vrstu imala skup podataka od šest neovisnih vrijednosti za svaku od navedenih mjera.

Za histokemijsku analizu želuca sam ispisala sve zabilježene redosljedne obojenja vrčastih stanica u sluznici, za svaku jedinku. Zatim sam izbrojala koliko često se koji pojavljuje, kako bih se ustanovila koji su redosljedi najpogodniji za dodatnu analizu i usporedbu između vrsta. Izračunala sam srednje vrijednosti debljine svakog sloja u pojedinom rasporedu obojenja za daljnju analizu.

Daljnju statističku analizu podataka napravila sam u programskom jeziku R, unutar programa RStudio (RStudio, verzija 1.4.1717). Za statističke analize te izradu grafova koristila sam knjižnice tidyverse, verzije 1.3.1 (Wickham, 2021), ggplot2 verzije 3.3.6 (Wickham i sur. 2022), ggpubr verzije 0.4.0 (Kassambara 2020), conover.test verzije 1.1.5 (Dinno 2017a). Također sam napravila kutijaste dijagrame (eng. *box plot*), dijagrame raspršenja (eng. *scatter plot*) i stupičaste dijagrame (eng. *bar plot*) unutar istog programa.

Zbog malog broja podataka u svakoj skupini, nije bilo moguće pretpostaviti normalnu distribuciju. Stoga sam koristila neparametarske testove koji ne podrazumijevaju normalnu distribuciju podataka, kako bih osigurala točnost provedenih testova. Neparametarskim se testovima vrijednosti prvo rangiraju te se zatim ti rangovi uspoređuju. Zbog toga nije moguće uspoređivati varijancu niti srednju vrijednost između samih skupina, već se podaci prvo rangiraju i potom se uspoređuju srednje vrijednosti rankova i medijani (Fowler i sur. 1998).

Za testove sam odredila razinu značajnosti  $\alpha = 0,05$ . Također sam koristila Benjamini-Hochberg korekciju p-vrijednosti, zbog provedbe više usporedbi na istim podacima. Navedenom se korekcijom kontrolira stopa lažnog otkrića, odnosno lažnog pozitivnog rezultata za značajnu razliku, do kojeg može doći pukom slučajnošću. Pojedinačne p-vrijednosti se poredaju od najmanje prema najvećoj i time najmanja p-vrijednost ima rang  $i = 1$ , iduća po redu ima  $i = 2$ , i tako dalje. Zatim se svaka pojedinačna p-vrijednost uspoređuje s Benjamini-Hochbergovom kritičnom vrijednošću, čija je formula:  $(i/m)q$ , gdje je  $i$  rang,  $m$  je ukupni broj testova, a  $q$  je stopa lažnog otkrića. Najveća p-vrijednost koja je manja od  $(i/m)q$  je granica značajnosti te su sve p-vrijednosti manje od nje također značajne, čak i ukoliko pojedinačno nisu manje od vlastite Benjamini-Hochberg kritične vrijednosti (Benjamini i Hochberg 1995, McDonald 2014).

Testirala sam značajnu razliku između veličina životinja ovisno o vrsti pomoću Kruskal-Wallis H testa. Kruskal-Wallis H test ili one-way ANOVA na rangovima je neparametarski test rankova kojim se može odrediti postoji li statistički značajna razlika između dvije ili više grupa neovisnih varijabli na kontinuiranoj ili ordinalno zavisnoj varijabli

(Fowler i sur. 1998). Nul hipoteza testa pretpostavlja da su medijani rankova između skupina jednaki.

Nakon potvrde postojanja razlike, testirala sam pojedine parove pomoću Wilcoxonovog testa sume rangova, koji se još naziva i Mann-Whitney U test. Za korištenje navedenog testa uspoređivane skupine moraju biti neovisne i nulta hipoteza testa je da su medijani uspoređivanih skupina jednaki. Ovim se testom rangiraju observacije svih skupina zajedno, od najmanje do najveće, i zatim se vrijednosti rankova zbroje za svaku skupinu posebno. Manja vrijednost zbroja rankova uspoređuje se s kritičnom vrijednošću za navedeni broj observacija te ona mora biti jednaka ili manja od navedene kritične vrijednosti da bi se nulta hipoteza odbacila (Fowler i sur. 1998, Sullivan i LaMorte 2017, Wild 1997). U literaturi se navode dvije definicije rezultata testa, ovisno o tome oduzima li se od krajnje vrijednosti, ili ne, minimalna moguća vrijednost:  $m(m+1)/2$ , gdje je  $m$  veličina uzorka. Rezultat pomoću `wilcox.test` funkcije izračunavan je s navedenim oduzimanjem, a prikazuje se i pomoću p-vrijednosti. Zbog načina mjerenja dužine tijela životinja, unutar te skupine podataka postoje jednake vrijednosti, zbog čega nije bilo moguće izračunati točnu p-vrijednost, već je distribucija aproksimirana normalnom, iz čega je zatim dobivena p-vrijednost (R Core Team 2022). S obzirom da veličina tijela unutar iste vrste varira ovisno o pripadnosti određenoj populaciji, ovim sam provjerila prate li populacije odabrane za ovo istraživanje trendove veličina koji su dostupni u literaturi.

Za histomorfometrijsku analizu sam zatim testirala korelaciju debljine pojedinih slojeva s duljinom životinje bez repa, pomoću Spearmanovog testa korelacije. Spearmanov test uspoređuje rankove dviju vrijednosti za svaku pojedinu skupinu te izražava rezultat  $\rho$  varijable u rasponu od -1 do 1, gdje je -1 potpuna negativna korelacija, 1 je potpuna pozitivna korelacija, a rezultat 0 prikazuje nepostojanje korelacije (Fowler i sur. 1998).

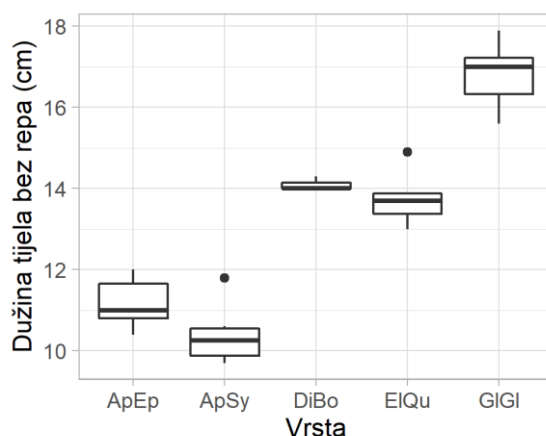
Naknadne analize histomorfometrijskih podataka radila sam na izvornim, nekorigiranim vrijednostima debljina pojedinih slojeva te na korigiranim vrijednostima, koje su podijeljene s dužinom tijela životinje bez repa. Korekcijom vrijednosti se debljine slojeva koje ovise o veličini životinje mogu jednostavnije međusobno uspoređivati, a dužina repa nije uključena, jer ona izuzeno varira ovisno o vrsti te nije odraz veličine životinje.

Za usporedbu značajnosti razlika u varijanci korigiranih i nekorigiranih debljina pojedinih slojeva, kao i udjelu pojedinih vrčastih stanica koristila sam prvo Kruskal-Wallis H test na cijelom skupu podataka te, ukoliko je potvrđeno postojanje značajne razlike, Conover-Iman test za usporedbu pojedinih parova. Nul hipoteza Conover-Iman testa kaže da vjerojatnost

da je nasumično odabrana vrijednost iz jedne skupine veća od nasumično odabrane vrijednosti iz druge skupine iznosi pola (Dinno 2017b, Fowler i sur. 1998). Pritom sam koristila zapis p-vrijednosti takav da za odbacivanje nul hipoteze p-vrijednost treba biti manja ili jednaka  $\alpha$ , odnosno manja ili jednaka 0,05, kao što je i za ostale testove. U suprotnom bi se ovim testom p-vrijednost uspoređivala s  $\alpha/2$  (Dinno 2017b).

## 4. REZULTATI

Komparacija izmjerenih dužina tijela za istraživane vrste glodavaca pokazala je da se dužine tijela (bez repa) razlikuju između vrsta te je pomoću Wilcoxonovog testa sume rankova značajna razlika potvrđena između gotovo svih usporedbi parova, izuzev između vrsti roda *Apodemus* ( $p = 0,06414$ ) te između *D. bogdanovi* i *E. quercinus* ( $p = 0,06086$ ). *Glis glis* značajno je duži od svih drugih vrsta ( $p < 0,0050$ ) te su od roda *Apodemus* značajno duži *D. bogdanovi* ( $p \approx 0,0043$ ) i *E. quercinus* ( $p \approx 0,0050$ ). Dakle, usporedba dužina tijela pokazuje da je *G. glis* značajno najduži, zatim slijede *D. bogdanovi* i *E. quercinus*, a najkraće tijelo imaju *A. epimelas* i *A. silvaticus* (Slika 13, Prilog 1).



**Slika 13.** Izmjerene dužine tijela (bez repa) jedinki pet različitih vrsta glodavaca, prikazanih putem kutijastih dijagrama. Pojedine vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGl – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su potencijalni izuzetci (eng. *outliers*) skupina. Različita slova označavaju značajne različitosti između grupa dobiveni Wilcoxonovim testom.

### 4.1. Histomorfometrijska analiza

Spearmanova korelacija dužine tijela životinja (bez repa) i izmjerenih histomorfometrijskih mjera pojedinih dijelova probavila za svaku istraživanu vrstu nije pokazala statističku značajnost, ali kada su se usporedile debljine pojedinih slojeva dužine tijela

svih životinja, ne uzimajući u obzir pojedine vrste, pojedini slojevi su pokazali statističku značajnost (Tablica 1).

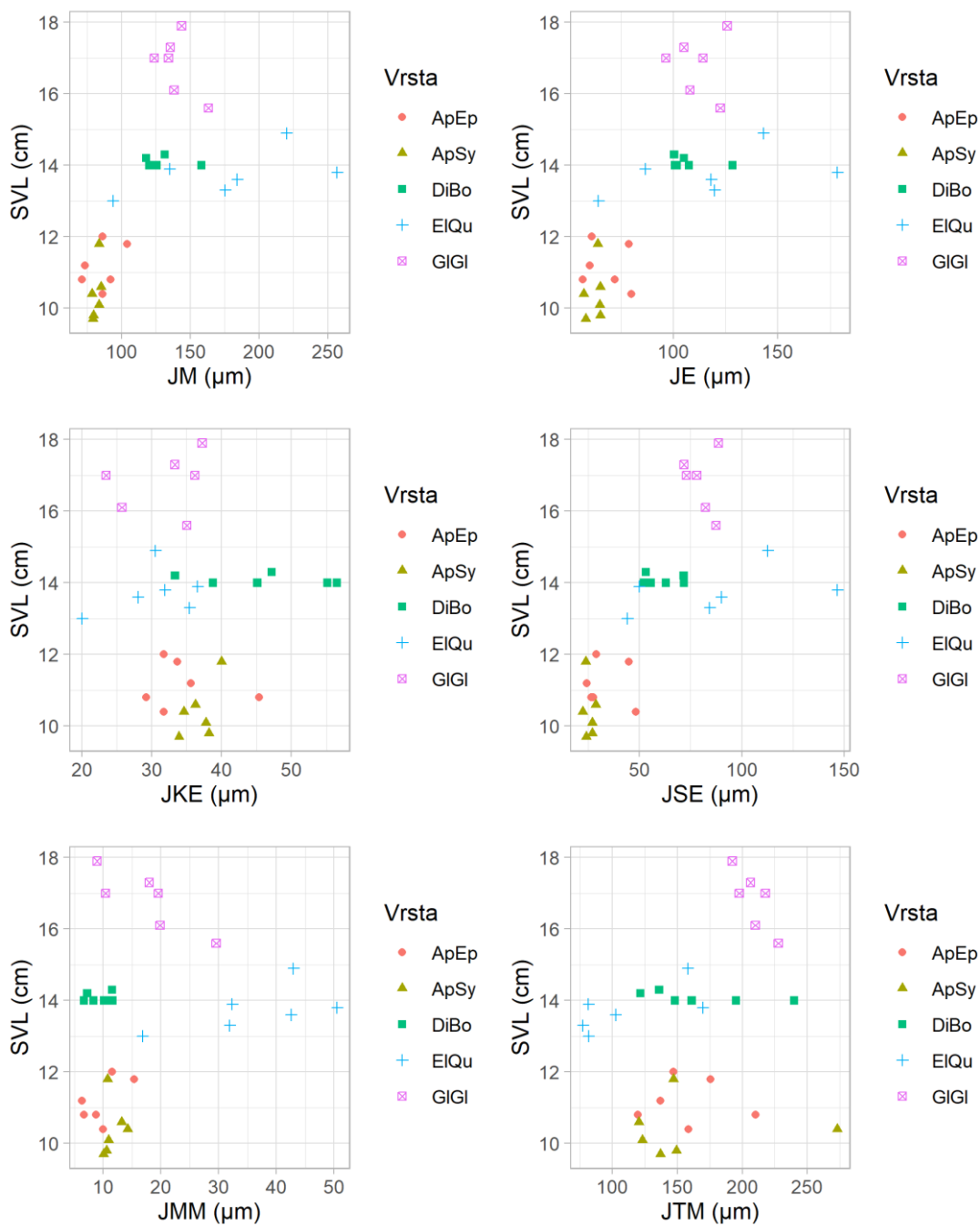
Pritom je korištena Benjamini-Hochberg korekcija sa stopom lažnog otkrića od 0,05. Korelacija je prikazana grafički putem scatter plot grafova, za svaki pojedini sloj (Slika 14) te je dodatno označena podjela na vrste, kako bi se vidjeli trendovi unutar vrsta.

Debljina slojeva sluznice jednjaka, višeslojnog epitela i neoroženog dijela višeslojnog epitela jednjaka pokazali su visoku i statistički značajnu pozitivnu korelaciju s dužinom tijela životinje. Debljina epitela debelog crijeva pokazala je značajnu srednje veliku korelaciju, a epitel slijepog crijeva, slojevi mišića sluznice i vanjskih mišića u jednjaku te sluznice želuca pokazali su malu pozitivnu korelaciju, ali bez značajne p-vrijednosti. Oroženi dio višeslojnog pločastog epitela jednjaka i visina epitela u tankom crijevu nisu pokazali postojanje korelacije (Tablica 1). Za daljnju su analizu uspoređeni rezultati na nekorigiranim vrijednosti debljina slojeva i vrijednosti koje su korigirane dužinom životinje bez repa, jer rezultati analize i grafičkog prikaza korelacije nisu prikazali jasne trendove između istraživanih porodica te unutar pojedinih porodica (Slika 14).

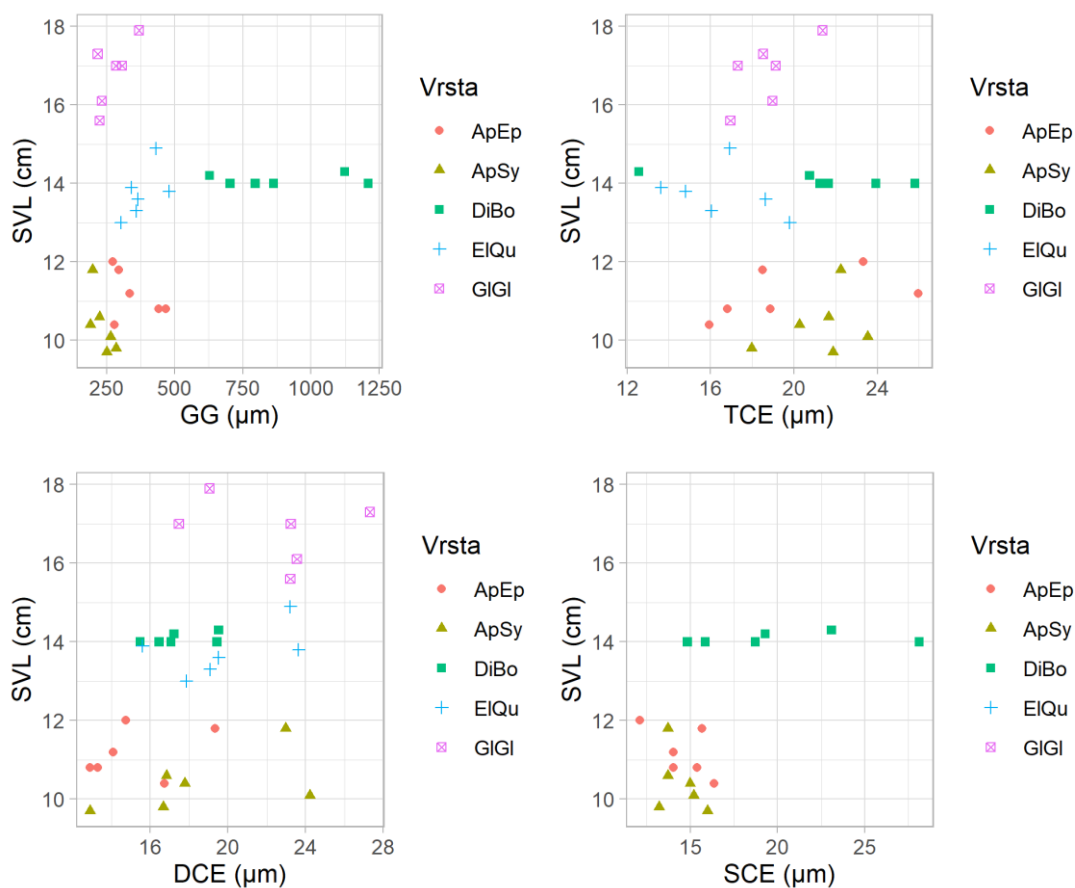


**Tablica 1.** Rezultati Spearmanovog testa korelacije dužine tijela jedinke bez repa i izmjerenih histomorfometrijskih mjera dijelova probavnog sustava, prikazanih za sve istraživane vrste glodavaca zajedno. JM – jednjak, debljina sluznice; JE – jednjak, debljina višeslojnog pločastog epitela; JKE – jednjak, debljina oroženog višeslojnog pločastog epitela; JSE – jednjak, debljina neoroženog višeslojnog pločastog epitela; JMM – jednjak, debljina mišićnog sloja sluznice; JTM – jednjak, debljina vanjskih mišićnih slojeva; GG – želudac, debljina sluznice sa želučanim žlijezdama; TCE – tanko crijevo, visina epitelne stanice; DCE – debelo crijevo, visina epitelne stanice; SCE – slijepo crijevo, visina epitelne stanice. Zvezdicom su označene značajne p-vrijednosti testa.

	<b>Rho</b>	<b>p-vrijednost</b>
JM	0,7377	< 0,0001 *
JE	0,7273	< 0,0001 *
JKE	-0,0644	0,7353
JSE	0,7819	< 0,0001 *
JMM	0,2473	0,2345
JTM	0,3492	0,1172
GG	0,2801	0,1913
TCE	-0,1660	0,4230
DCE	0,4748	0,0200 *
SCE	0,4218	0,1354



**Slika 14a.** Korelacije dužine tijela životinje bez repa (na y osi) i debljina pojedinih izmjerenih slojeva tkiva unutar jednjaka (na x osi). JM – jednjak, debljina sluznice; JE – jednjak, debljina višeslojnog pločastog epitela; JKE – jednjak, debljina oroženog višeslojnog pločastog epitela; JSE – jednjak, debljina neuroženog višeslojnog pločastog epitela; JMM – jednjak, debljina mišićnog sloja sluznice; JTM – jednjak, debljina vanjskih mišićnih slojeva. Pojedine su vrste označene različitim simbolima na grafu: ApEp – *A. epimelas* (crveni krug); ApSy – *A. sylvaticus* (žuti trokut); DiBo – *D. bogdanovi* (zeleni kvadrat); EIQu – *E. quercinus* (plavi plus); GIGI – *G. glis* (roza prekriveni kvadrat).



**Slika 14b.** Korelacije dužine tijela životinje bez repa (na y osi) i debljina pojedinih slojeva tkiva u probavnom sustavu istraživanih vrsta glodavaca (na x osi). GG – želudac, debljina sluznice sa želučanim žlijezdama; TCE – tanko crijevo, visina epitelne stanice; DCE – debelo crijevo, visina epitelne stanice; SCE – slijepo crijevo, visina epitelne stanice. Pojedine su vrste označene različitim simbolima na grafu: ApEp – *Apodemus epimelas* (crveni krug); ApSy – *Apodemus sylvaticus* (žuti trokut); DiBo – *Dinaromys bogdanovi* (zeleni kvadrat); ElQu – *Eliomys quercinus* (plavi plus); GIGI – *Glis glis* (roza prekriveni kvadrat). Na zadnjem su grafu prikazane samo prve tri vrste, jer vrste *E. quercinus* i *G. glis* ne posjeduju slijepo crijevo.

Rezultati Kruskal-Wallis testa za korigirane i nekorigirane histomorfometrijske debljine slojeva probavila za svaku vrijednost prikazane su u Tablici 2. Nulta hipoteza testa da su medijani rankova između vrsta jednaki je bila odbačena za sve vrijednosti, osim za nekorigiranu debljinu epitela tankog crijeva ( $p = 0,0661$ ) te korigiranu debljinu epitela slijepog crijeva ( $p = 0,6758$ ). Izuzev tih skupina, napravljen je Conover-Iman test za pojedine parove vrsta u svakoj skupini podataka (Prilog 3.)

**Tablica 2.** Kvalitativna i kvantitativna usporedba debljine pojedinih slojeva između istraživanih vrsta, za nekorigirane vrijednosti te vrijednosti korigirane dužinom životinje bez repa (SVL). Korištena je Benjamini-Hochberg korekcija p-vrijednosti sa stopom lažnog otkrića od 0,05. JM – jednjak, debljina sluznice; JE – jednjak, debljina višeslojnog pločastog epitela; JKE – jednjak, debljina oroženog višeslojnog pločastog epitela; JSE – jednjak, debljina neoroženog višeslojnog pločastog epitela; JMM – jednjak, debljina mišićnog sloja sluznice; JTM – jednjak, debljina vanjskih mišićnih slojeva; GG – želudac, debljina sluznice sa želučanim žlijezdama; TCE – tanko crijevo, visina epitelne stanice; DCE – debelo crijevo, visina epitelne stanice; SCE – slijepo crijevo, visina epitelne stanice. Rezultati Kruskal Wallis testa prikazuju „ $\chi^2$ “ (chi kvadrat) koji označava udaljenost medijana, „df“ koji označava stupnjeve slobode (eng. *degrees of freedom*) te “p-vrijednost” koja pokazuje značajnost rezultata analize. Zvezdicom su označene značajne p-vrijednosti testa.

	$\chi^2$	df	p-vrijednost		$\chi^2$	df	p-vrijednost
JM	22,4559	4	0,0008 *	JM / SVL	13,0968	4	0,0180 *
JE	18,9376	4	0,0020 *	JE / SVL	10,6753	4	0,0339 *
JKE	12,4473	4	0,0239 *	JKE / SVL	21,4151	4	0,0013 *
JSE	22,5505	4	0,0016 *	JSE / SVL	17,3634	4	0,0033 *
JMM	17,5785	4	0,0030 *	JMM / SVL	18,5849	4	0,0024 *
JTM	11,7720	4	0,0273 *	JTM / SVL	11,6215	4	0,0291 *
GG	21,8366	4	0,0007 *	GG / SVL	23,0624	4	0,0012 *
TCE	8,8086	4	0,0661	TCE / SVL	21,2086	4	0,0010 *
DCE	11,2387	4	0,0300 *	DCE / SVL	10,7226	4	0,0373 *
SCE	7,0643	2	0,0325 *	SCE / SVL	0,7836	2	0,6758

Usporedba nekorigiranih vrijednosti ukazuje na značajno manju debljinu sluznice roda *Apodemus* od drugih vrsta ( $p \leq 0,0010$ ), dok *E. quercinus* ima najveću debljinu koja se značajno razlikuje i od *D. bogdanovi* ( $p = 0,0239$ ). *G. glis* ima sluznicu nešto deblju od one kod *D. bogdanovi*, a užu nego *E. quercinus* te ne pokazuje značajnu razliku ni od jedne od ove dvije vrste. Kod korigiranih vrijednosti rod *Apodemus* ima značajno užu sluznicu od *D. bogdanovi* ( $p \leq 0,01$ ) i *E. quercinus* ( $p < 0,0001$ ), ali ne i od *G. glis*. *G. glis* se ne razlikuje značajno od *D. bogdanovi*, ali ima značajno užu sluznicu od *E. quercinus* ( $p = 0,0120$ ).

Ukupna nekorigirana i korigirana debljina višeslojnog pločastog epitela pokazuje značajno najmanju debljinu kod roda *Apodemus* naspram ostalih vrsta ( $p \leq 0,0015$ ), dok se ostale vrste ne razlikuju značajno, iako *E. quercinus* ima najviše vrijednosti i najveći raspon debljina. Nekorigirana debljina oroženog dijela višeslojnog pločastog epitela pokazuje samo

značajno deblju sluznicu *D. bogdanovi* naspram *A. epimelas* ( $p = 0,0255$ ), *E. quercinus* ( $p = 0,0105$ ) i *D. bogdanovi* ( $p = 0,0193$ ), dok se ostale vrste međusobno ne razlikuju značajno. Korigirane vrijednosti izdvajaju skupinu puhova s manjom debljinom oroženog sloja od drugih vrsta ( $p \leq 0,0016$ ). Za neuroženi dio epitela, nekorigirane vrijednosti ukazuju na značajno manju debljinu sloja za rod *Apodemus* od drugih vrsta ( $p \leq 0,0036$ ) te za *D. bogdanovi* od *G. glis* ( $p = 0,0307$ ), ali ne i od *E. quercinus* ( $p = 0,0617$ ). Korigirane vrijednosti opet izdvajaju rod *Apodemus* s najužim slojem (*A. epimelas* i *G. glis*  $p = 0,0233$ ; ostali parovi  $p \leq 0,0039$ ), ali se ne izdvaja *D. bogdanovi* naspram puhova.

Nekorigirana debljina mišićnog sloja sluznice značajno je deblja kod *E. quercinus* naspram svih drugih vrsta ( $p \leq 0,0424$ ). Druga po debljini je kod *G. glis*, značajno deblja od *A. epimelas* ( $p = 0,0187$ ) i *D. bogdanovi* ( $p = 0,0211$ ), ali ne i od *A. sylvaticus*. I kod korigiranih se vrijednosti izdvaja *E. quercinus* s najdebljom sluznicom ( $p \leq 0,0222$ ), a zatim slijede *A. sylvaticus* i *G. glis* koji imaju značajno deblji mišićni sloj od *D. bogdanovi* ( $p = 0,0034$  i  $p = 0,0294$ ), ali ne i od *A. epimelas*.

Kod debljine vanjskog mišićnog sloja, za nekorigirane vrijednosti *G. glis* ima najdeblji sloj, ali se značajno razlikuje samo od *E. quercinus* ( $p = 0,0042$ ), koji ima najuži sloj. Rod *Apodemus* i *D. bogdanovi* imaju vrijednosti koje se preklapaju te se ne razlikuju značajno. Kod korigiranih vrijednosti *G. glis* se više ne izdvaja od drugih vrsta, ali se pokazuje značajno manja debljina sloja kod *E. quercinus* naspram roda *Apodemus* ( $p = 0,0097$  i  $p = 0,0195$ ).

Ukratko za jednjak, *E. quercinus* ima najveći raspon vrijednosti i najdeblju sluznicu, zatim nešto tanju imaju *D. bogdanovi* i *G. glis* te najtanju ima rod *Apodemus*. U usporedbi s dužinom tijela, *G. glis* se ne razlikuje značajno od roda *Apodemus*. Višeslojni pločasti epitel, njegov neuroženi dio i mišićni sloj sluznice su najdeblji kod *E. quercinus*, koji ujedno ima i najveći raspon tih vrijednosti. *Dinaromys bogdanovi* i *G. glis* imaju nešto tanji pločasti epitel i neuroženi dio, dok rod *Apodemus* ima najtanja oba sloja, što vrijedi i za korigirane vrijednosti. Oroženi dio pločastog epitela najdeblji je kod *D. bogdanovi* te on ima najveći raspon vrijednosti. Izuzev jedne vrijednosti *A. epimelas*, *A. sylvaticus* je sljedeći po debljini i zatim su ostale vrste, s time da puhovi imaju veći raspon niskih vrijednosti. Naspram dužina životinja, puhovi imaju značajno tanji oroženi dio epitela. Uz *E. quercinus*, *G. glis* također ima deblji mišićni sloj sluznice od drugih vrsta i veći raspon vrijednosti, a uz korekciju dužinom životinje, kod *G. glis* i *A. sylvaticus* je on značajno deblji nego kod *A. epimelas* i *D. bogdanovi*. Vanjski mišićni sloj je najdeblji dok *G. glis* i najtanji kod *E. quercinus*, a *A. sylvaticus* ima jednu

izuzetno visoku vrijednost. U odnosu na dužinu tijela, *D. bogdanovi* ima nešto tanji sloj od roda *Apodemus* i *G. glis*, a *E. quercinus* ima najtanji sloj (Slika 15, Prilog 1 i 3).

Nekorigirane debljine sluznice žlijezdanog dijela želuca ukazuju na daleko najdeblji sloj *D. bogdanovi* od drugih vrsta ( $p \leq 0,0055$ ). *Apodemus epimelas* i *E. quercinus* imaju značajno deblji sloj od *A. sylvaticus* ( $p = 0,0026$  i  $p = 0,0002$ ) i nešto deblji od *G. glis*, ali je samo značajno za *E. quercinus* ( $p = 0,0055$ ). Korigirane vrijednosti ukazuju na značajne razlike između gotovo svih vrsta ( $p \leq 0,0213$ ), osim između *E. quercinus* i roda *Apodemus*, te pokazuju jednak redoslijed prema debljini. Dakle, *D. bogdanovi* ima daleko najdeblju sluznicu i najveći raspon vrijednosti te *A. epimelas* i *E. quercinus* imaju deblju sluznicu od *A. sylvaticus* i *G. glis*. Korekcijom s dužinom životinje, *G. glis* ima najtanju sluznicu (Slika 15, Prilog 1 i 3).

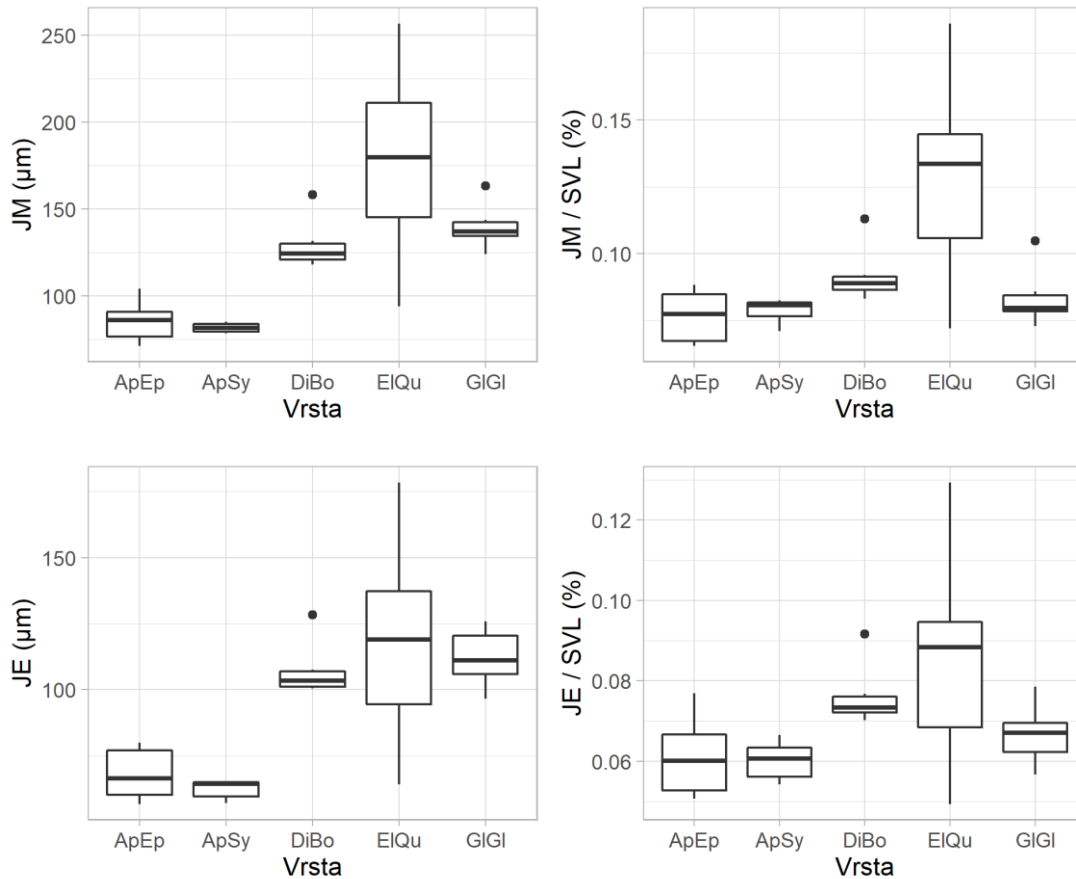
Za debljinu epitela tankog crijeva, kod nekorigiranih vrijednosti *D. bogdanovi* i *A. sylvaticus* imaju najviše vrijednosti, a *E. quercinus* najmanje, no nije pokazana nikakva značajnost Krustal-Wallis testom. Na korigiranim vrijednostima rod *Apodemus* ima značajno veće vrijednosti od *D. bogdanovi* ( $p = 0,0386$  za *A. epimelas*,  $p = 0,0009$  za *A. sylvaticus*) i od puhova ( $p \leq 0,0004$ ). Nakon njih je *D. bogdanovi*, kod kojeg je epitel značajno deblji od *G. glis* ( $p = 0,0135$ ) te se zatim *E. quercinus* djelomično preklapa s *D. bogdanovi* i *G. glis*.

U debelom crijevu, kod nekorigiranih vrijednosti, najdeblji sloj ima *G. glis*, zatim *E. quercinus* pa *D. bogdanovi* i na kraju *A. epimelas*, a *A. sylvaticus* ima vrlo širok raspon te se preklapa sa svim vrstama. Jedina značajna razlika vidljiva je između krajnjih vrsta *G. glis* i *A. epimelas* ( $p = 0,0098$ ). Korigiranjem vrijednosti, *A. sylvaticus* pokazuje najveće vrijednosti, ali je značajna razlika samo naspram *D. bogdanovi* ( $p = 0,0123$ ). Ostale se vrste međusobno preklapaju te, iako *E. quercinus* ima nešto više vrijednosti od *D. bogdanovi*, nije se pokazalo značajno ( $p = 0,0694$ ).

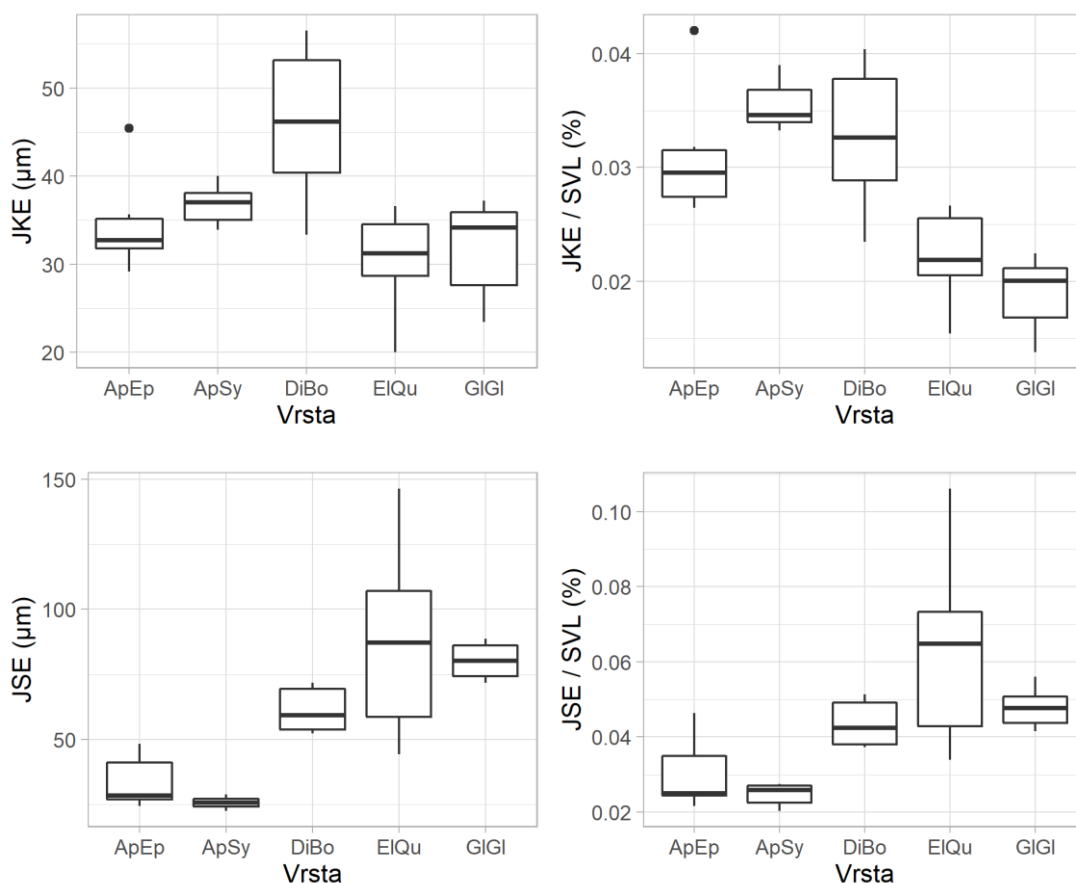
U slijepom crijevu samo su tri vrste uspoređivane. Nekorigirane vrijednosti pokazuju značajno deblji epitel vrste *D. bogdanovi* od roda *Apodemus* ( $p = 0,0350$  i  $p = 0,0240$ ), dok kod korigiranih vrijednosti nije pokazano postojanje značajnih razlika Kruskal-Wallis testom.

Dakle, što se tiče epitela u crijevima, u tankom crijevu *A. epimelas* ima najveći raspon i *D. bogdanovi* ima jednu izuzetno malu vrijednost, ali generalno puhovi imaju nešto tanji epitel naspram drugih vrsta. Obzirom na veličinu životinja, rod *Apodemus* ima najdeblji epitel, zatim je *D. bogdanovi* i zatim su puhovi, s time da *G. glis* ima dosta manji raspon vrijednosti od ostalih vrsta. U debelom crijevu *A. sylvaticus* ima najveći raspon, a prema debljini od najvećih

vrijednosti prema nižima su *G. glis*, zatim *E. quercinus* i *A. sylvaticus*, *D. bogdanovi* i na kraju *A. epimelas*. Korekcijom naspram dužine, *A. sylvaticus* ima najdeblji epitel, dok se ostali preklapaju, iako *E. quercinus* ima malo više vrijednosti od drugih vrsta. U slijepom crijevu *D. bogdanovi* ima daleko veći raspon i veće vrijednosti naspram roda *Apodemus*, ali obzirom na dužinu tijela nema značajne razlike (Slika 15, Prilog 1 i 3).

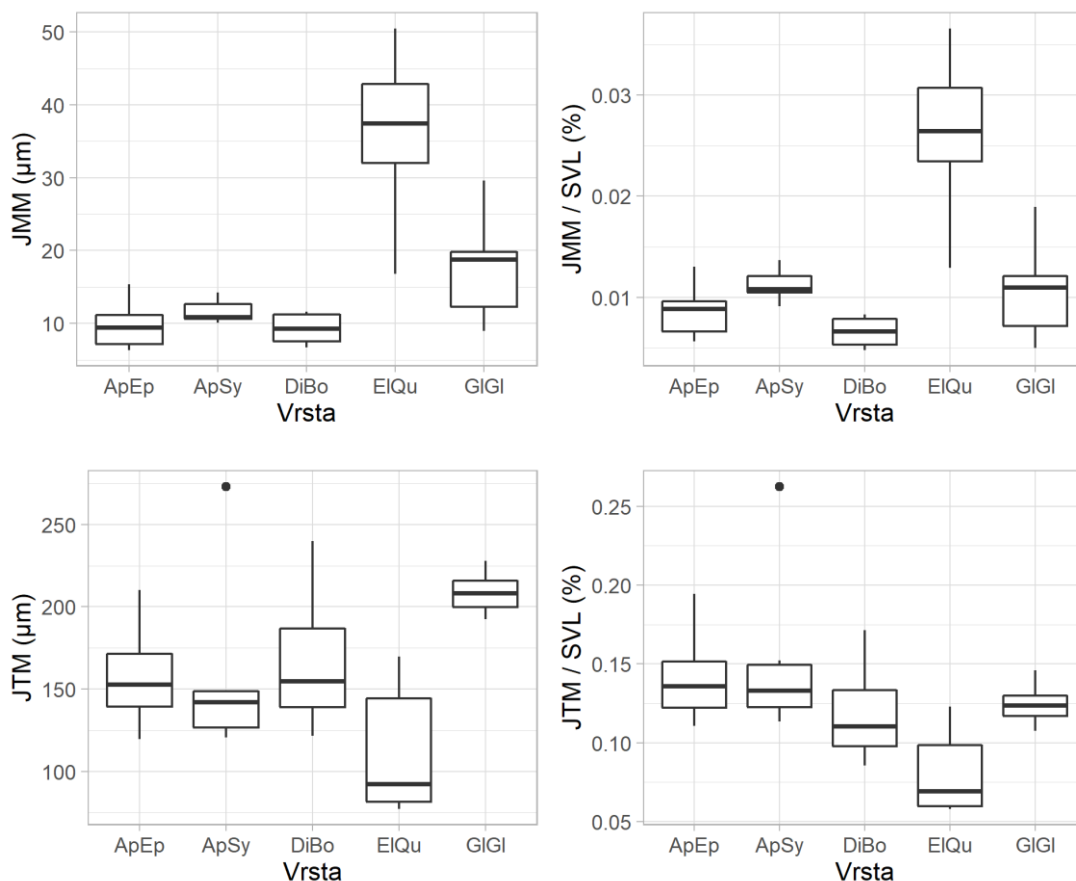


**Slika 15a.** Histomorfometrijski rezultati prikazuju debljinu pojedinih slojeva u probavnom sustavu izmjerenih na pet različitih vrsta glodavaca, prikazani putem kutijastih dijagrama. U lijevom stupcu su debljine slojeva izražene u mikrometrima (nekorigirane vrijednosti), a u desnom su podijeljene s dužinom životinje bez repa (SVL) i izražene u postotku (korigirane na SVL). JM – jednjak sluznica; JE – jednjak epitel. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

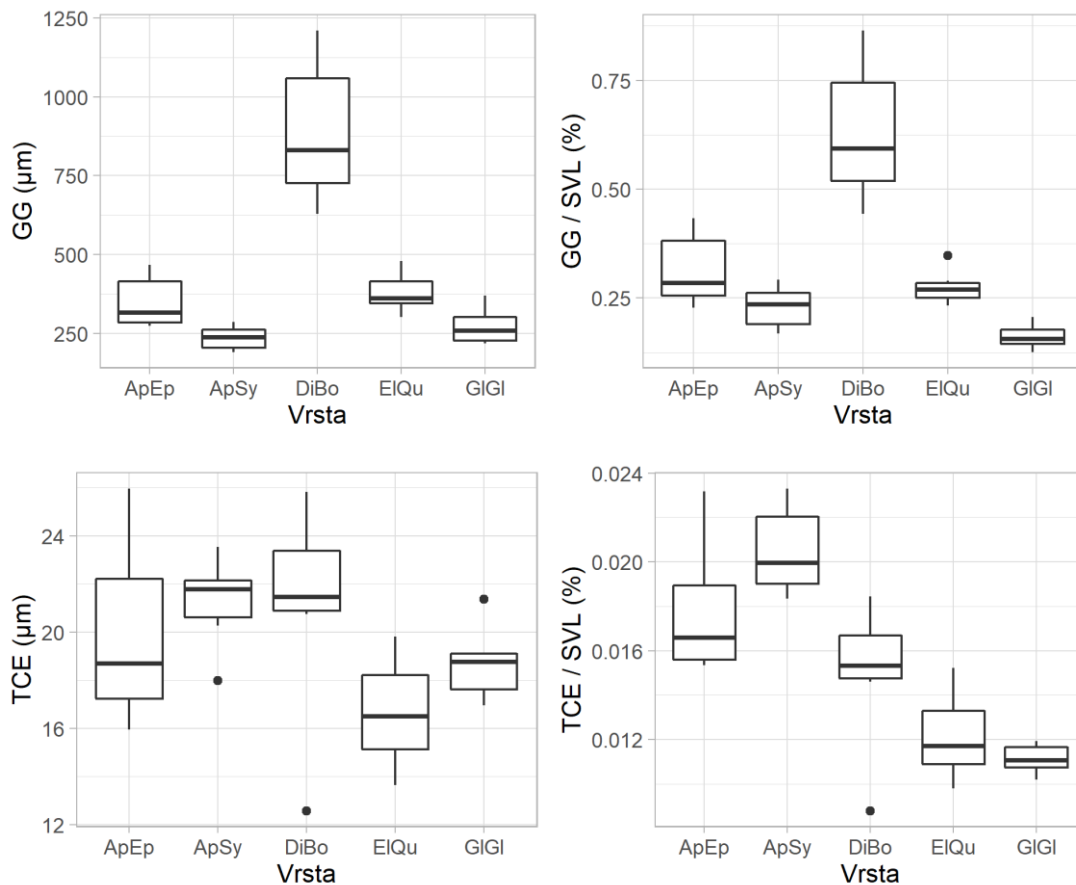


**Slika 15b.** Histomorfometrijski rezultati prikazuju debljinu pojedinih slojeva u probavnom sustavu izmjerenih na pet različitih vrsta glodavaca, prikazani putem kutijastih dijagrama. U lijevom stupcu su debljine slojeva izražene u mikrometrima (nekorigirane vrijednosti), a u desnom su podijeljene s dužinom životinje bez repa (SVL) i izražene u postotku (korigirane na SVL). JKE – jednjak oroženi epitel; JSE – jednjak neoroženi epitel. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

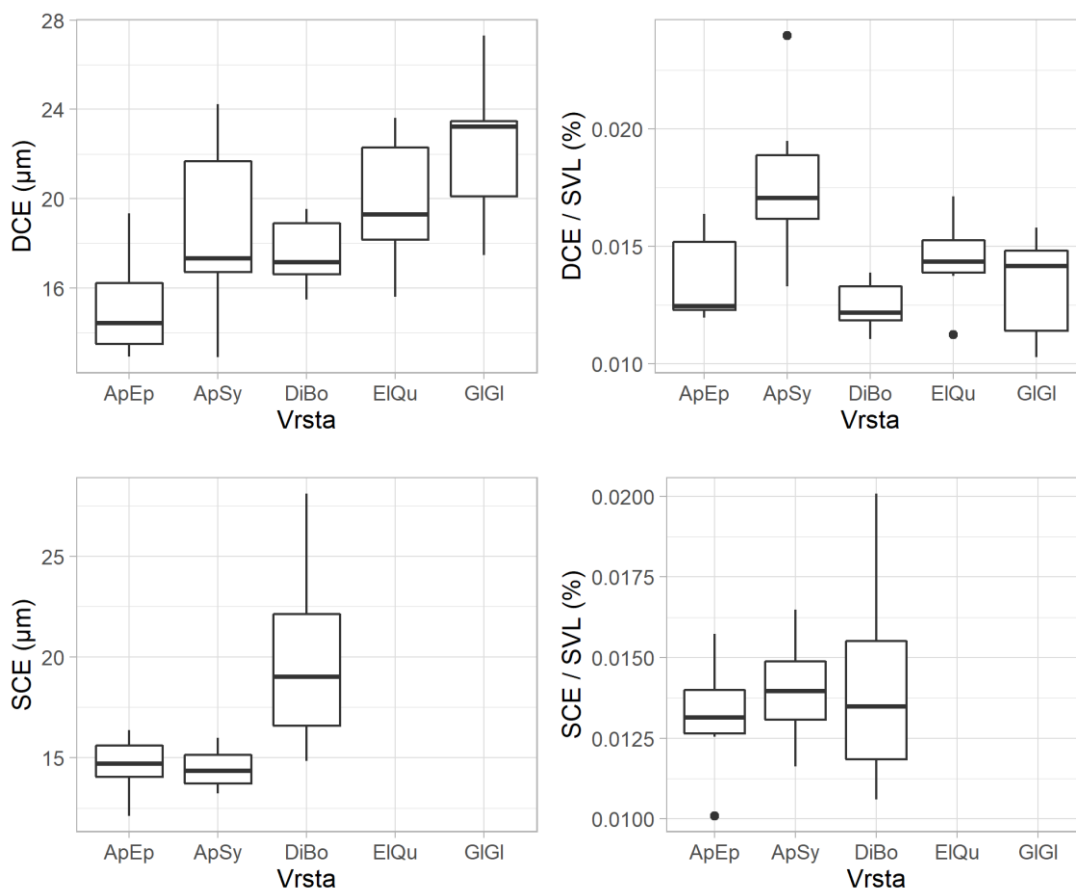




**Slika 15c.** Histomorfometrijski rezultati prikazuju debljinu pojedinih slojeva u probavnom sustavu izmjerenih na pet različitih vrsta glodavaca, prikazani putem kutijastih dijagrama. U lijevom stupcu su debljine slojeva izražene u mikrometrima (nekorigirane vrijednosti), a u desnom su podijeljene s dužinom životinje bez repa (SVL) i izražene u postotku (korigirane na SVL). JMM – jednjak mišićni sloj sluznice; JTM – jednjak vanjski mišićni sloj. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.



**Slika 15c.** Histomorfometrijski rezultati prikazuju debljinu pojedinih slojeva u probavnom sustavu izmjerenih na pet različitih vrsta glodavaca, prikazani putem kutijastih dijagrama. U lijevom stupcu su debljine slojeva izražene u mikrometrima (nekorigirane vrijednosti), a u desnom su podijeljene s dužinom životinje bez repa (SVL) i izražene u postotku (korigirane na SVL). GG – želudac žlijezde; TCE – tanko crijevo epitel. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.



**Slika 15e.** Histomorfometrijski rezultati prikazuju debljinu pojedinih slojeva u probavnom sustavu izmjerenih na pet različitih vrsta glodavaca, prikazani putem kutijastih dijagrama. U lijevom stupcu su debljine slojeva izražene u mikrometrima (nekorigirane vrijednosti), a u desnom su podijeljene s dužinom životinje bez repa (SVL) i izražene u postotku (korigirane na SVL). DCE – debelo crijevo epitel; SCE – slijepo crijevo epitel. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Na grafu za slijepo crijevo su prikazane samo prve tri vrste, jer vrste *E. quercinus* i *G. glis* ne posjeduju slijepo crijevo. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

## 4.2. Histokemijska analiza

Površina pregledavane sluznice crijeva na kojoj su kvalitativno i kvantitativno analizirane vrčaste mukozne stanice je varirala na preparatima, što je vidljivo u Prilogu 2. Rezultati Kruskal-Wallis testa pokazali su značajnu razliku pregledane površine debelog crijeva za pojedinu jedinku između vrsta ( $p = 0,0048$ ). Ukupna pregledana površina sluznice na svim preparatima za pojedinu vrstu unutar tankog crijeva iznosi između  $1,11 \text{ mm}^2$  i  $1,23 \text{ mm}^2$ , unutar debelog crijeva između  $1,11 \text{ mm}^2$  i  $1,28 \text{ mm}^2$  a unutar slijepog između  $1,03 \text{ mm}^2$  i  $1,20 \text{ mm}^2$ .

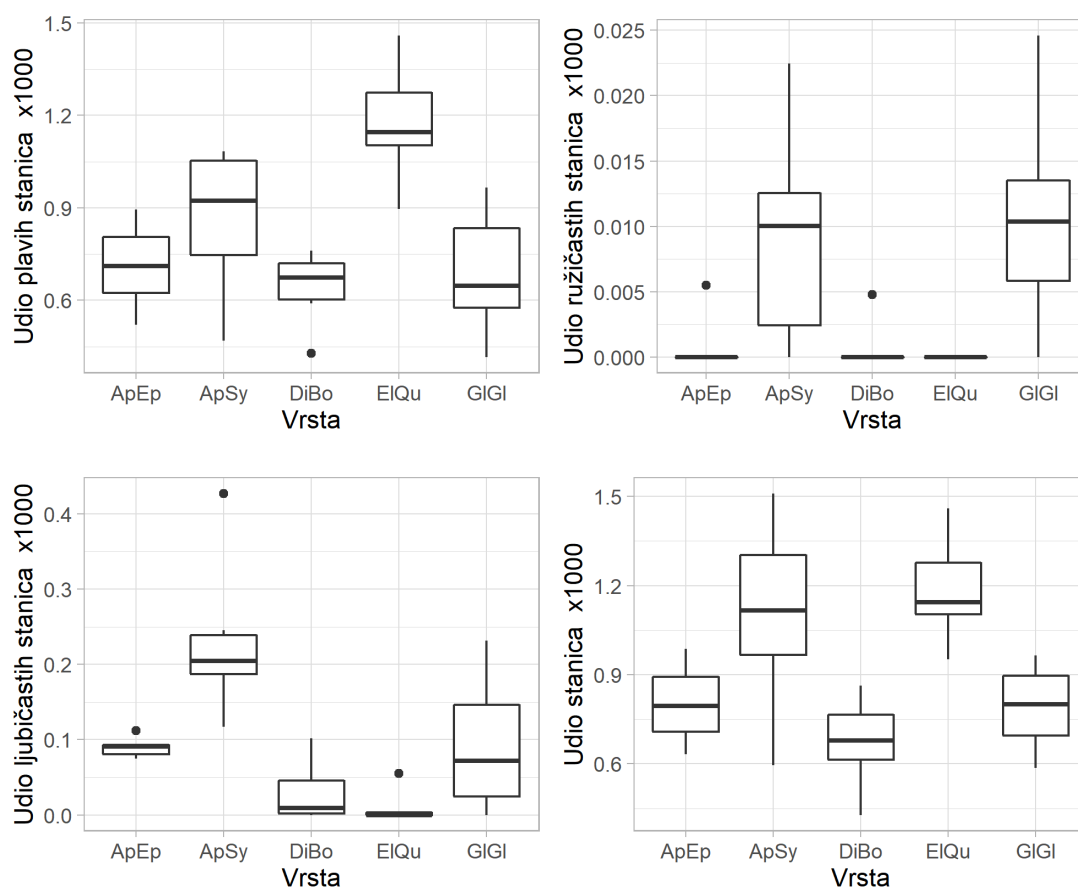
Prilikom pregleda sluznice tankog, debelog i slijepog crijeva, kod pojedinih jedinki nije uočena niti jedna vrčasta stanica određenog tipa (Prilog 2). U daljnju statističku analizu udjela vrčastih stanica po površini sluznice pojedinog crijeva uključene su samo vrste kod kojih je u četiri ili više jedinki zabilježena barem jedna vrčasta stanica. *Apodemus sylvaticus* je jedina vrsta koja je za svaki tip vrčastih stanica u svakom crijevu ulazila u analizu. Pritom su značajne razlike između uključenih vrsta testirane pomoću Kruskal-Wallis i Conover-Iman testa (Tablica 3, Prilog 4).

Udio ukupnog broja vrčastih stanica najbliži prati trend udjela kiselih vrčastih stanica, zbog njihove najveće brojnosti, a udio mješovitih i neutralnih varira. Po ukupnom broju vrčastih stanica u tankom crijevu izdvajaju se *A. sylvaticus* i *E. quercinus* od drugih vrsta ( $p \leq 0,0296$ ), s najvećim vrijednostima (Slika 16). U debelom crijevu se s najvećim ukupnim udjelom izdvajaju *A. epimelas* i *E. quercinus* ( $p \leq 0,0141$ ) (Slika 17). U slijepom crijevu značajno manji ukupni udio stanica ima *D. bogdanovi* ( $p \leq 0,0027$ ), dok se *A. epimelas* i *A. sylvaticus* ne razlikuju značajno (Slika 18). Ukupan broj stanica kod svih je vrsta veći u debelom crijevu nego u tankom (Prilog 2), a u slijepom crijevu se kod *A. epimelas* nešto povećava naspram u tankom, dok je kod *A. sylvaticus* i *D. bogdanovi* manji. U slijepom crijevu udio mješovitih je kod *A. epimelas* povećan naspram tankog crijeva, kod *A. sylvaticus* je smanjen, a kod *D. bogdanovi* je samo lagano veći nego u tankom crijevu.

**Tablica 3.** Kvalitativna i kvantitativna usporedba udjela vrčastih stanica određenog tipa po površini sluznice tankog crijeva (TC), debelog crijeva (DC) i slijepog crijeva (SC), između istraživanih vrsta glodavaca. U analizu su ulazile vrste kod kojih je u četiri ili više jedinki zabilježena barem jedna vrčasta stanica određenog tipa. Obojenja vrčastih stanica su: P – plave (s kiselim mucinima), Lj – ljubičaste (s miješanim kiselim i neutralnim mucinima), R – ružičaste (s neutralnim mucinima) te Ukupno – svi tipovi vrčastih stanica. Uspoređivane vrste su: *A. epimelas*, *A. sylvaticus*, *D. bogdanovi*, *E. quercinus* i *G. glis*. Rezultati Kruskal-Wallis testa prikazuju „ $\chi^2$ “ (chi kvadrat) koji označava udaljenost medijana, „df“ koji označava stupnjeve slobode (eng. *degrees of freedom*) te “p-vrijednost” koja pokazuje značajnost rezultata analize. Zvezdicom su označene značajne p-vrijednosti testa.

	$\chi^2$	df	p-vrijednost
TC P	15,2215	4	0,0043 *
TC Lj	11,4913	3	0,0093 *
TC R	0,2400	1	0,6242
TC Ukupno	15,3419	4	0,0040 *
DC P	20,6839	4	0,0004 *
DC Lj	7,5000	1	0,0062
DC R		0	
DC Ukupno	19,7290	4	0,0006 *
SC P	12,7368	2	0,0017 *
SC Lj	3,2398	2	0,1979
SC R	2,1600	1	0,1416
SC Ukupno	11,5556	2	0,0031 *

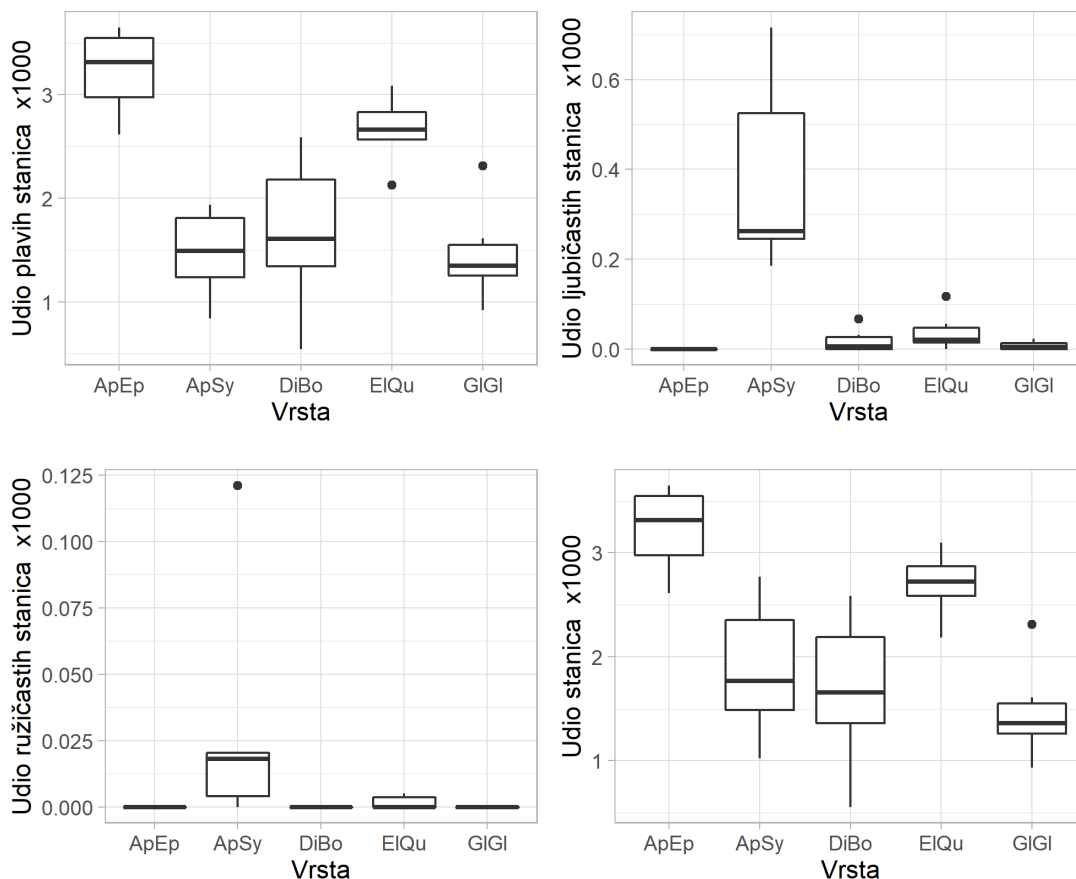
Unutar tankog crijeva (Slika 16), *E. quercinus* ima značajno više kiselih vrčastih stanica od drugih ( $p \leq 0,0275$ ). *Apodemus sylvaticus* ima nešto više kiselih vrčastih stanica od *A. epimelas*, *D. bogdanovi* i *G. glis*, ali samo je za *D. bogdanovi* pokazana značajnost ( $p = 0,0366$ ). *Apodemus sylvaticus* također ima najviše mješovitih vrčastih stanica, značajno više od *A. epimelas* ( $p = 0,0039$ ) i *D. bogdanovi* ( $p = 0,0003$ ). *Apodemus epimelas* ima najmanju varijabilnost. Neutralne stanice u tankom crijevu imaju samo *A. sylvaticus* i *G. glis*, ali se po brojnosti oni međusobno ne razlikuju značajno.



**Slika 16.** Komparativni rezultati udjela plavih – kiselih (gore lijevo), ljubičastih – mješovitih (gore desno), ružičastih – neutralnih (dolje lijevo) te ukupnog broja vrčastih mukoznih stanica (dolje desno) u epitelu sluznice tankog crijeva pet istraživanih vrsta glodavaca. Udio stanica izražen je na skali pomnoženoj s 1000, za bolju preglednost. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; EIQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

U debelom crijevu (Slika 17) *A. epimelas* ima najviše kiselih vrčastih stanica, a razlika je statistički značajna u usporedbi s *A. sylvaticus*, *D. bogdanovi* i *G. glis* ( $p > 0,0001$ ), ali ne i od *E. quercinus*. *Eliomys quercinus* se značajno razlikuje od *A. sylvaticus* ( $p = 0,0003$ ) i *G. glis* ( $p = 0,0002$ ), ali ne od *D. bogdanovi*. *Dinaromys bogdanovi* pokazuje najveći raspon vrijednosti kiselih vrčastih stanica. Mješovite vrčaste stanice u debelom crijevu su uspoređivane samo između *A. sylvaticus* i *E. quercinus* te rezultati pokazuju da *A. sylvaticus* ima značajno više stanica ( $p = 0,0007$ ). *Dinaromys bogdanovi* i *G. glis* imaju mješovite stanice u samo tri preparata debelog crijeva, s time da *D. bogdanovi* u dva preparata ima za jedan red

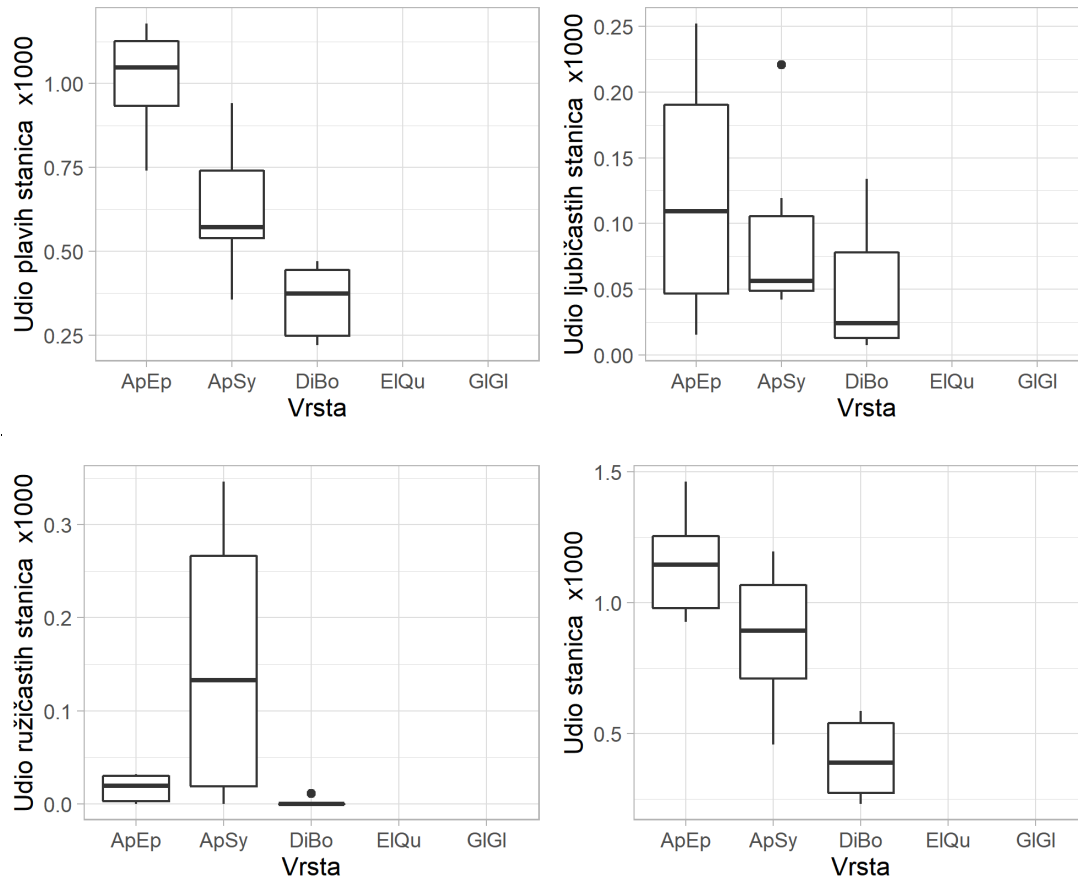
većine više nego *G. glis*. Neutralne stanice su brojne jedino kod *A. sylvaticus*, kod *E. quercinus* su nađene povremeno i u malom broju, a kod ostalih nisu zabilježene.



**Slika 17.** Komparativni rezultati udjela plavih – kiselih (gore lijevo), ljubičastih – mješovitih (gore desno), ružičastih – neutralnih (dolje lijevo) te ukupnog broja vrčastih mukoznih stanica (dolje desno) u epitelu sluznice debelog crijeva pet istraživanih vrsta glodavaca. Udio stanica izražen je na skali pomnoženoj s 1000, za bolju preglednost. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; EIQu – *Eliomys quercinus*; GI GI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

U slijepom crijevu (Slika 18) *A. epimelas* ima značajno više kiselih vrčastih stanica naspram *A. sylvaticus* i *D. bogdanovi* ( $p \leq 0,0044$ ). Brojnost mješovitih vrčastih stanica se ne razlikuje značajno među vrstama, ali *A. epimelas* ima najveći raspon vrijednosti. *Apodemus sylvaticus* i *D. bogdanovi* imaju nešto manji broj mješovitih stanica, s time da *A. sylvaticus* ima

jedan izuzetak (eng. *outlier*) s vrlo velikim brojem mješovitih vrčastih stanica. Veći broj neutralnih vrčastih stanica u slijepom crijevu vidljiv je kod *A. sylvaticus*, *A. epimelas* ima konzistentno mali broj, a kod *D. bogdanovi* je zabilježena prisutnost u samo jednom preparatu.



**Slika 18.** Komparativni rezultati udjela plavih – kiselih (gore lijevo), ljubičastih – mješovitih (gore desno), ružičastih – neutralnih (dolje lijevo) te ukupnog broja vrčastih mukoznih stanica (dolje desno) u epitelu sluznice tankog crijeva pet istraživanih vrsta glodavaca. Udio stanica izražen je na skali pomnoženoj s 1000, za bolju preglednost. ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Pravokutnici označavaju interkvartilni raspon između gornjeg i donjeg kvartila (25 – 75% podataka), vertikalne linije se protežu od gornjeg ili donjeg kvartila do 1,5 puta interkvartilnog raspona, horizontalne linije predstavljaju medijane skupina, a točke su izuzetci (eng. *outliers*) skupina.

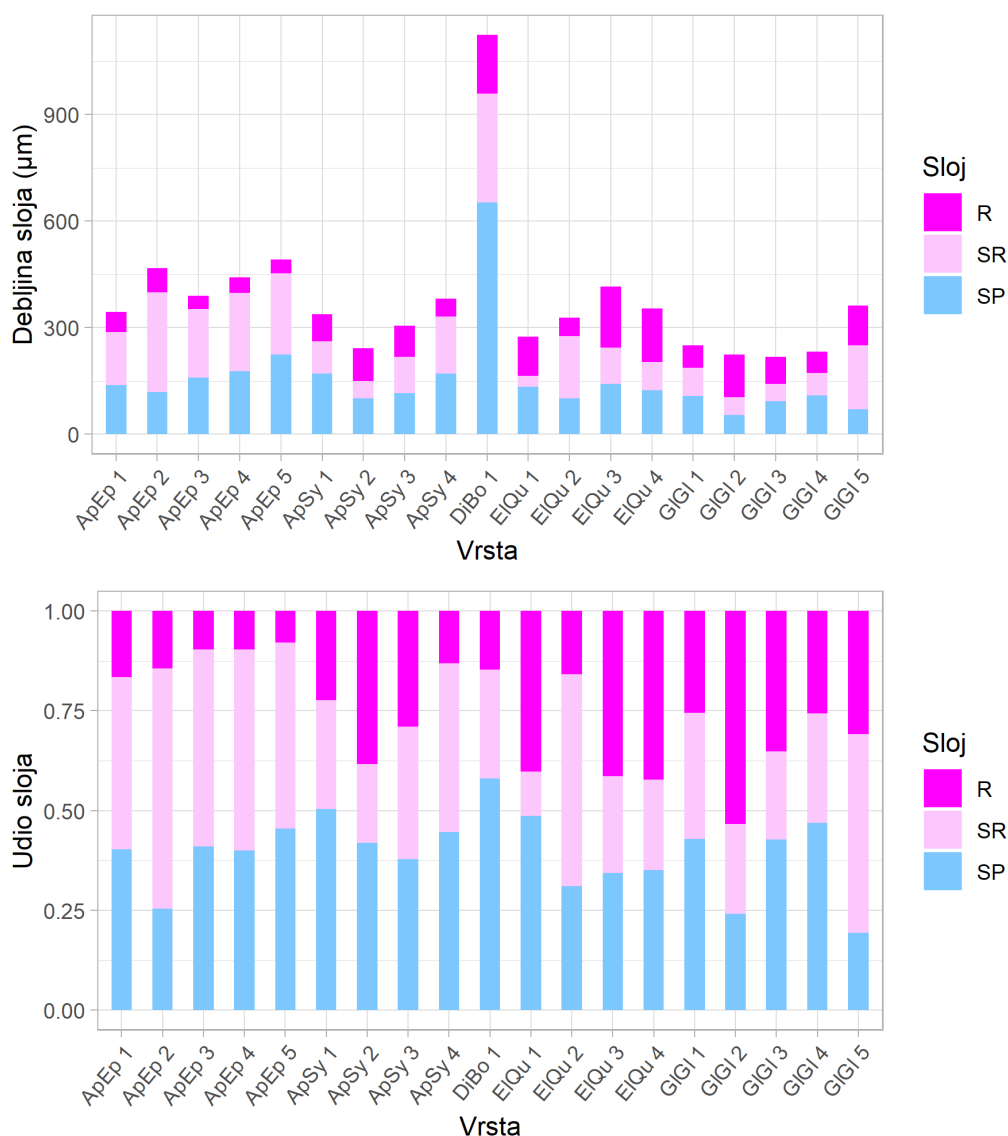


U sluznici želuca uočen je velik broj različitih rasporeda slojeva obojenja vrčastih stanica (Tablica 4). Najčešći raspored je bio od bazalne membrane prema vrhu: svijetlo plava – svijetlo roza – ružičasta, koji nađen u devetnaest jedinki te u svim vrstama (sivo označen raspored u Tablici 4). Iako je kod većine vrsta zabilježen više puta, kod *D. bogdanovi* uočen je u samo jednom preparatu. Prisutnost ljubičastog (mješovitog) sloja zabilježena je u svega pet jedinki – dvije jedinke *A. sylvaticus*, jedne jedinke *E. quercinus* te dvije jedinke *G. glis*.

**Tablica 4.** Uočeni rasporedi slojeva različitih obojenja vrčastih stanica u žlijezdanom dijelu želuca kod istraživanih vrsta te broj preparata u kojima su uočeni. Slojevi su pisani redom od bazalne membrane prema površini sluznice: SP – svijetlo plavo; SR – svijetlo roza; TP – tamno plavo; Lj – ljubičasto; R – ružičasto. Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGl – *Glis glis*. Sivo je označen raspored slojeva koji je bio najčešće uočen, ukupno devetnaest puta.

Vrsta	Redoslijed slojeva	Broj	Vrsta	Redoslijed slojeva	Broj
ApEp	SP – SR – R	5	ElQu	SP – SR – TP – R	5
	TP – R	3		SP – SR – R	4
	SP – SR	1		TP – R	1
	SP – R	1		SR – TP – R	1
	SP – TP – SR – R	1		SP – TP – R	1
ApSy	SP – SR – R	4		Lj – SR – R	1
	TP – R	4	GIGl	SP – SR – R	5
	L	2		SP – TP – R	1
	SP – TP – R	2		SP – Lj – R	1
	SP – SR	1		SP – Lj – SR – R	1
	Lj – R	1		SP – SR – TP	1
	SP – R – SR	1	DiBo	SR – TP – R	3
	TP – Lj	1		L	2
DiBo	SR – TP – R	3		SP – SR – R	1
	L	2		TP – R	1
	SP – SR – R	1		SP – SR – R – TP	1
	TP – R	1			
	SP – SR – R – TP	1			

Za najčešći raspored obojenja sluznice uspoređene su različite vrste, kako prema ukupnoj debljini, tako i za udio pojedinog sloja u sluznici (Slika 19, Prilog 5). Provjerena je značajna razlika između vrsta Kruskal-Wallis testom i zatim Conover-Iman testom, osim s vrstom *D. bogdanovi*, jer je za nju postojao samo jedan podatak.



**Slika 19.** Debljine (gore) i udjeli debljine (dolje) pojedinih slojeva najčešćeg rasporeda obojenja vrčastih stanica u žlijezdanom dijelu želuca, zabilježenom za devetnaest jedinki. Raspored obojenja, od bazalne membrane prema vrhu sluznice: svijetlo plava (SP) – svijetlo roza (SR) – ružičasta (R). Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGl – *Glis glis*.

U usporedbi debljina slojeva, za *A. epimelas* je ustanovljen značajno deblji svijetlo plavi sloj u usporedbi s *G. glis* ( $p = 0,0062$ ), kao i značajno deblji svijetlo roza sloj u usporedbi s *A. sylvaticus* ( $p = 0,0360$ ), *E. quercinus* ( $p = 0,0378$ ) te *G. glis* ( $p = 0,0232$ ). Druge se vrste nisu značajno razlikovale u debljini pojedinih slojeva. U udjelu pojedinih slojeva, potvrđena je značajna razlika samo za ružičasti sloj, koji je kod *A. epimelas* značajno manji naspram *E. quercinus* ( $p = 0,0103$ ) i *G. glis* ( $p = 0,0080$ ).

## 5. RASPRAVA

Dužine tijela jedinki koje su mjerene u ovom istraživanju uglavnom odgovaraju literaturnim podacima dužine odraslih jedinki tih vrsta. *Apodemus epimelas* u literaturnim podacima može doseći 160 mm (Macdonald 2005, Wilson i sur. 2016), ali su jedinke u našem istraživanju sve bile dugačke do 120 mm, što može biti karakteristika populacije s predjela s kojeg su uzimane. *Apodemus sylvaticus* je obično nešto manje dužine, do 110 mm (Wilson i sur. 2016), što je vidljivo i u našim podacima, međutim, zabilježen je i jedan izuzetak od čak 118 mm, što prelazi raspon veličine ove vrste u nekim literaturnim podacima (Wilson i sur. 2016). Za *D. bogdanovi* zabilježene su mjere izrazito malog raspona te čak četiri jedinke imaju zabilježenu jednaku dužinu od 140 mm. Pošto je istraživanje rađeno na samo šest jedinki ove vrste, ovakav mali raspon dužina vjerojatno je slučajan. *E. quercinus* i *G. glis* su imali očekivane raspone koji se poklapaju s literaturnim podacima.

### 5.1. Histomorfometrijska analiza

Na grafovima korelacije debljine slojeva s dužinom životinje uočljivi su različiti trendovi korelacija unutar vrsta te čak i negativni trendovi. Kako korelacije nisu bile značajne unutar vrsti, bio bi potreban veći broj podataka kako bi se oni mogli potvrditi. Za vrstu *D. bogdanovi* nikakav trend korelacije nije moguće razaznati, jer je većina životinja jednake dužine.

Pregledom literature uočava se da nedostaju podaci o korelaciji debljine pojedinih slojeva u probavnom traktu s veličinom životinja, čime ovaj rad postaje vrijedniji jer donosi nove podatke za istraživane vrste. Grafički prikazi korelacije debljine sluznice, ukupnog pločastog epitela i neuroženog dijela pločastog epitela prikazuju slične raspone vrijednosti te su svi značajno visoko korelirani s dužinom tijela životinje. Takav sličan raspon vrijednosti može ukazivati na međusobnu korelaciju debljina tih slojeva, jer najveći dio debljine sluznice čini pločasti epitel, a neuroženi dio je živi dio pločastog epitela. Stoga, ako je neuroženi dio epitela koreliran s veličinom životinje, to bi se prenijelo i na slojeve koji ga obuhvaćaju – ukupni pločasti epitel i ukupnu debljinu sluznice. Oroženi dio pločastog epitela ovisi o tipu hrane koju glodavci konzumiraju, a ne njihovoj veličini (Wang i sur. 2006), pošto se on neprestano ljušti prolaskom hrane i obnavlja, stoga je manjak korelacije s dužinom životinje očekivan. Za mišićni sloj sluznice i vanjski mišićni sloj nedostaju literaturni podaci o korelaciji

s veličinom životinje, ali naši rezultati upućuju na to da ne postoji korelacija, kao niti za debljinu sluznice želuca te su vjerojatno drugi čimbenici bitniji. Epitel unutar crijeva je jednoslojni cilindrični i očekivano je veliko preklapanje između različitih vrsta, ali je pokazana značajna razlika unutar debelog crijeva te su u slijepom crijevu vidljive daleko veće vrijednosti za *D. bogdanovi*, iako ta vrijednost nije bila statistički značajna. Međutim, s obzirom da i drugi čimbenici poput učestalosti prehrane utječu na epitel slijepog i debelog crijeva (Wang i sur. 2006), potrebna su daljnja istraživanja koja uključuju i ekologiju prehrane ovih vrsta.

Na temelju pretpostavke da se probavilo manjih vrsta brže prilagođava promjeni prehrane (Naya 2008), mogle bi se očekivati manje razlike u debljinama slojeva između vrsta roda *Apodemus*, naspram vrsta puhova. U našim rezultatima razlike u slojevima jednjaka jesu manje između vrsta roda *Apodemus*, ali u sluznici želuca te epitelu crijeva to nije bio slučaj. Vjerojatno razlika između skupina nije uočljiva, jer su sve vrste poprilično male, dok je za očekivati da su razlike veće kada je i razlika u veličini tijela veća.

Sluznica jednjaka je u kontaktu s unesenom hranom, stoga bi deblja sluznica pritom mogla pružiti bolju zaštitu od prodiranja tvari u okolno tkivo. Od pet istraživanih vrsta, *Eliomys quercinus*, koji jede otrovne beskralježnjake, ima najdeblju sluznicu jednjaka, slično kao i *D. bogdanovi*, koji se hrani otrovnim biljkama, dok je kod ostalih vrste ustanovljena tanja sluznica.

Višeslojni pločasti epitel je u izravnom kontaktu s hranom i zaslužan je za proizvodnju oroženog zaštitnog sloja. *Dinaromys bogdanovi* je pokazao najdeblji oroženi sloj, što se poklapa s prijašnjim rezultatima da biljna hrana pozitivno korelira s debljinom navedenog sloja (Igbowe i Obinna 2016, Parakkal 1967), ali kod *A. epimelas* to nije uočeno. Što se tiče zaštite od grube hrane (Goodarzi i sur. 2019), razlike nisu jasno izražene. Ostale se vrste hrane raznim sjemenkama, orašastim plodovima i/ili insektima, koji bi se mogli svi smatrati grubom hranom te bi mogli imati podjednak utjecaj. Neoroženi dio epitela je najdeblji kod *E. quercinus*, za kojeg je poznato da jede otrovne beskralježnjake (Kuipers et al. 2012, Wilson et al 2016) te je moguće da veća debljina sloja pruža dodatnu zaštitu od prodora otrovnih tvari u okolne organe. S druge strane, čak i s korekcijom u odnosu na duljinu životinje, rod *Apodemus* ima tanji sloj od drugih vrsta, ali razlog tomu nije jasan.

Mišićni sloj sluznice također je značajno deblji kod *E. quercinus* i mogao bi također imati ulogu u zaštiti od otrova, možda kao barijera prolasku tvari (Nagai i sur. 2003) ili za pospješeno lučenje mukoze iz žlijezda podsluznice (Young i sur. 2003), kojom bi se ublažio

njegov utjecaj. Vjeverica *Funisciurus anerythrus*, koja se, među ostalim, hrani mravima i termitima također ima deblju sluznicu od *Sciurus anomalus*, koja je isključivo herbivorna (Igbokwe i Obinna 2016, Goodarzi i sur. 2019). Doduše, *Cricetomys gambianus* ima sličnu prehranu, ali nema mišićni sloj sluznice (Nzalak i sur. 2010), a *D. bogdanovi* ima vrlo tanak sloj. Moguće je da različite skupine koriste različite mehanizme zaštite, poput prethodno navedenog debelog oroženog sloja, ali bi takvo što bilo potrebno dodatno istražiti. S druge strane, lučenjem mukoznog sekreta se olakšava prolazak tvrde hrane, poput orašastih plodova i ljuštura insekata, kojima se hrane *A. sylvaticus*, *E. quercinus* i *G. glis* te se debljina njihovog mišićnog sloja sluznice, koji sudjeluje u izbacivanju sekreta u lumen, pokazala veća naspram *A. epimelas* i *D. bogdanovi*.

Kod debljine vanjskog mišićnog sloja, koji uzrokuje peristaltiku jednjaka, vrste koje su više karnivorne (*A. sylvaticus* i *E. quercinus*) imaju tanji sloj od svojih više herbivornih srodnika (*A. epimelas* i *G. glis*) te od *D. bogdanovi*. *Eliomys quercinus* ima značajno najtanji vanjski mišićni sloj i pitanje je preuzimaju li možda njegovi iznimno debeli mišićni slojevi sluznice dio funkcije peristaltike ili postoji drugačije objašnjenje.

Deblja sluznica žlijezdanog dijela želuca može podržavati duže želučane žlijezde i više stanica za izlučivanje enzima i klorovodične kiseline, čime se može povećati aktivnost razgradnje (Hume i sur. 2002). *Dinaromys bodganovi* ima daleko najdeblju sluznicu, a obzirom da se hrani biljkama s otrovnim supstancama, moguće je da na taj način može efektivno neutralizirati njihove otrovne tvari. Osim toga, biljna hrana s velikim udjelom vlakana je teško probavljiva te se povećanjem debljine sluznice povećava zaštita želuca tijekom dugotrajnijeg miješanja hrane. *Apodemus sylvaticus* i *G. glis*, koji se oboje hrane većim udjelom lako probavljivih i energetske bogatih sjemenki i orašastih plodova, imaju tanju sluznicu od svojih srodnika.

Epitel crijeva čine cilindrične apsorpcijske stanice, čija je veličina povezana s aktivnošću probave te se njihovim povećanjem povećava i dužina mikrovila u tankom crijevu (Wang i sur. 2006), odnosno sama površina crijeva. Međutim, za samu visinu epitelnih stanica nije jasno postoji li povezanost s tipom ili načinom prehrane, odnosno s veličinom životinje. Povećanjem visine stanica mogla bi se povećati apsorpcija nutrijenata u crijevu, jer se pritom povećava i veličina stanica, ali bi se također mogla povećati zaštita od prodora tvari i patogena, jer se stvara deblja barijera. Međutim, točnost takve pretpostavke trebala bi se dodatno istražiti, a naši rezultati ne daju jasnu sliku o tome. Zanimljivo je da *A. sylvaticus* u tankom i debelom

crijevu ima nešto veću debljinu epitela od *A. epimelas*, iako nije pokazana značajnost. U slijepom crijevu *D. bogdanovi* ima značajno deblji epitel od roda *Apodemus*, iako takva razlika nije uočena u tankom i debelom crijevu. Pošto slijepo crijevo služi kao spremište mikroorganizama (Kerr 2000, Treuting i sur. 2018), koji su iznimno bitni u probavi biljnog materijala kod životinja s aloenzimatskom probavom (Langer 2002), moguće je da debljina epitela kod *D. bogdanovi* odražava specijalizaciju na takvu prehranu. Veća debljina epitela u slijepom crijevu koje sadrži velik broj mikroorganizama mogla bi ići u prilog pretpostavci o većoj zaštiti od prodora neželjenih tvari u organizam. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se mogle razjasniti ovakve uočene razlike debljine epitela između različitih vrsta.

## 5.2. Histokemijska analiza

Tijekom histokemijske analize crijeva, pokušala sam pregledati što sličniju površinu sluznice, kako razlike u rezultatima ne bi proizlazile iz daleko manje pregledane površine za neku vrstu. Pokazana značajna razlika za površinu sluznice debelog crijeva vrlo je blizu granične vrijednosti i vjerojatno proizlazi iz generalno tanje sluznice kod roda *Apodemus* naspram većih vrsta. Unatoč tome su pregledane površine sluznica dovoljno slične da razlike u udjelima stanica vrlo vjerojatno nisu nastale uslijed toga, osim kod iznimno rijetkih stanica.

Vrčaste stanice s kiselim mucinima daleko su najčešće u svim dijelovima crijeva i prisutne su u svim preparatima, dok su vrčaste stanice s neutralnim mucinima najrjeđe i kod nekih vrsta nisu zabilježene niti u jednom preparatu. Stalna prisutnost svih tipova stanica u svim dijelovima crijeva kod *A. sylvaticus*, koji se hrani visokokaloričnom i lako probavljivom hranom, naspram herbivornog *D. bogdanovi* ne slaže se s pretpostavkom da pri većem udjelu teže probavljive hrane u prehrani životinja dolazi do veće diferencijacije tipova mukoznih stanica u probavnom traktu (Vahouny 1985, Schneeman i sur. 1982).

Porast udjela vrčastih stanica prema stražnjem dijelu probavila poklapa se s prijašnjim očekivanjima (Aylward i sur. 2019, Boonzaier 2012, Pinheiro i sur. 2018) te se smatra da one omogućavaju dodatno podmazivanje suhe tvari tijekom njenog prolaska (Okon 1977, Paksuz i Paksuz 2015), a povećanje udjela kiselih stanica u debelom sloju moguće daje dodatnu zaštitu od bakterijskih infekcija (Cao i Wang 2009, Macfarlane i Dillon 2007). Očekivano je da udio neutralnih stanica bude najveći u tankom crijevu, a da se zatim smanjuje u debelom crijevu.

Takav je raspored uočen samo kod *G. glis*, kod *A. sylvaticus* je situacija obrnuta, a kod ostalih vrsta je broj premali da bi se sa sigurnošću moglo ustvrditi.

U tankom crijevu najveći udio vrčastih stanica imaju *A. sylvaticus* i *E. quercinus*, dvije najviše karnivorne vrste, dok *D. bogdanovi* ima najniže vrijednosti, iako ne značajno. Udio kiselih stanica također izdvaja *A. sylvaticus* i *E. quercinus* s višim vrijednostima od više herbivornih vrsta. Nije jasno igra li zaštita od bakterijskih infekcija (Cao i Wang 2009, Macfarlane i Dillon 2007) ulogu i u ovom dijelu probavila. S druge strane, veći udio mješovitih i neutralnih stanica imaju *A. sylvaticus* i *G. glis*, koji se hrane visokaloričnom i lako probavljivom hranom. Mali udio neutralnih vrčastih stanica je neočekivan za tanko crijevo, posebice u kombinaciji s malim udjelom mješovitih stanica kod *D. bogdanovi* ili *E. quercinus*, a za *A. epimelas* je moguće da nedostatak neutralnih vrčastih stanica nadoknađuje mješovitima. Pošto neutralne stanice neutraliziraju pH probavnih sokova (Allen i sur. 1993, Krause 1981 prema Aylward i sur. 2019, Young i sur. 2006), moguće je da kod drugih vrsta preuranjena neutralizacija nije povoljna ili da se zaštita sluznice od kiseline postiže na drugi način. Nije jasno ima li prisutnost otrovnih tvari u prehrani *D. bogdanovi* i *E. quercinus* utjecaj na povećani udio kiselih vrčastih stanica.

Unutar debelog crijeva veliki udio kiselih vrčastih stanica kod *E. quercinus* moguće opet pruža zaštitu od mikroorganizama uslijed karnivorne prehrane, ali razlog tako visokih vrijednosti kod *A. epimelas* nije jasan. Mješovite i neutralne stanice su rijetke, što je očekivano, naspram prijašnjih istraživanja (Aylward i sur. 2019, Kotze i Coetzee 1994, Sheahan i Jervis 1976), međutim, kod *A. sylvaticus* je uočen iznenađujuće veći udio neutralnih i mješovitih stanica naspram drugih vrsta. Moguće je da *A. sylvaticus* nadoknađuje dio kiselih stanica mješovitima koje su povoljnije za prilagodbu uslijed raznovrsnije prehrane naspram *A. epimelas*, dok razlog relativno velikog udjela neutralnih stanica kod te vrste nije jasan.

Najmanji udio vrčastih stanica u slijepom crijevu kod *D. bogdanovi* moguće je prilagodba očuvanju i održavanju mikroflore u njemu. Sami debeli epitel sluznice u njegovom slijepom crijevu moguće pruža dovoljnu zaštitu od prodora nepoželjnih tvari, a smanjenjem broja vrčastih stanica, slijepo je crijevo moguće manje reaktivno. Kod roda *Apodemus*, obzirom da je *A. sylvaticus* više karnivoran, čime ima dosta raznoliku prehranu od pretežito herbivornog *A. epimelas*, raznolikiji sastav vrčastih stanica i veći udio mješovitih vrčastih stanica bi mu mogao pružati jednostavniju prilagodbu za održavanje mikroflore različitog sastava, ovisno o prehrani jedinke.



Sluznica želuca jako varira po sastavu vrčastih stanica ovisno o različitim regijama (Igbokwe i Obinna 2016, Sheahan i Jervis 1975). Tkivo želuca je uzimano s jednakog djela u želucu, ali pošto se vrlo malim vrstama koje su različitih veličina i građe želuca, moguće je da mala varijacija u mjestu uzorkovanja dovodi do izrazito različito strukturirane sluznice. Mala učestalost ljubičastog (mješovitog) sloja je interesantna, kao i sama količina jedinstvenih slojeva pronađenih za vrste. Ovi bi rezultati mogli ukazivati na vrlo složenu i raznoliku sluznicu glede različitih rasporeda slojeva, ali je vrlo moguće da neki od tih rasporeda predstavljaju samo prijelazna područja između dijelova želuca, zbog čega je vidljiva tolika brojnost i varijabilnost. Bilo bi potrebno provesti opsežnije istraživanje pojedinih dijelova žlijezdanog želuca kako bi se mogla vidjeti cijela kompleksnost unutar i između vrsta.

Ružičati sloj s neutralnim stanicama na vrhu želučanih žlijezdi služi za zaštitu sluznice od kiselih probavnih sokova, a tamno plavi sloj ukazuje na prisutnosti kiselih mucina (Igbokwe i Obinna 2016). Svjetlije obojenje slojeva (svijetlo plavi i svijetlo roza) moguće da predstavlja manje aktivne mukozne stanice određenog tipa (kisele ili neutralne). Međutim, dijelovi sluznice s vezivnim tkivom također mogu biti obojeni svijetlo plavo uslijed povećanja pH prilikom bojenja alcijanskim modrilom (Fagan i sur. 2020, Hayat 1993) pa je moguće da je na nekim dijelovima sluznice takvo svijetlo obojenje došlo do izražaja. Mješoviti ljubičasti sloj zabilježen je i kod Sheahan i Jervis (1976), ali nije sigurno koliko je on čest naspram drugih slojeva. Forman (1971) je naveo kako su prethodna bojenja s PAS, alcijanskim modrilom i toluidinskim modrilom pokazala razlike u mukozi između vrsta šišmiša koje se hrane voćem, nektarom, insektima, ribom ili krvlju, ali nije bilo moguće determinirati specifične razlike između herbivornih i karnivornih vrsta.

Najčešći raspored obojenja u našem istraživanju poklapa se i s opisanim slojevima za različite životinje od Sheahan i Jervis (1976), s neutralnim mucinima na vrhu i svijetlim obojenjem kiselih mucina pri bazi želučanih žlijezda. U analizi najčešćeg rasporeda obojenja, jedinka *D. bogdanovi* izuzetno odskače u debljini sluznice želuca naspram ostalih vrsta, ali bi bilo potrebno prikupiti više uzoraka kako bi se vidio jasan trend debljine pojedinih slojeva. U usporedbi samih udjela pojedinih slojeva, nije vidljiva značajna razlika između vrsta, ali je varijacija unutar vrsti poprilično velika.

## 6. ZAKLJUČAK

- S obzirom na složenost i dugotrajnost histomorfometrijskih analiza, koje uključuju prikupljanje jedinki i njihovo držanje u zatočeništvu, precizno uzorkovanje i izradu histoloških preparata te detaljnu histomorfometrijsku analizu uzorkovanih tkiva, ovakva istraživanja nisu česta, stoga rezultati ovoga rada predstavljaju nove, dosad neobjavljene podatke za uključene vrste: *A. epimelas*, *A. sylvaticus*, *D. bogdanovi*, *E. quercinus* i *G. glis*
- Svih pet istraživanih vrsta pokazuje pozitivnu korelaciju za debljinu sluznice jednjaka, debljinu višeslojnog pločastog epitela jednjaka i njegovog neuroženog dijela te za debljinu epitela debelog crijeva u odnosu na dužinu tijela životinje (bez repa)
- Utvrđene su značajne razlike u debljini različitih slojeva unutar probavnog trakta između vrsta ovisno o udjelu hrane animalnog podrijetla, tvrde te lako probavljive hrane u prehrani: vrste koje se hrane tvrdom hranom pokazuju veću debljinu mišićnog sloja sluznice jednjaka, više karnivorne vrste pokazuju veću debljinu oroženog epitela jednjaka i manju debljinu vanjskog mišićnog sloja jednjaka, dok vrste s visoko kaloričnom i lako probavljivom prehranom pokazuju manju debljinu sluznice žlijezdanog dijela želuca i deblji epitel debelog crijeva
- Vrste s prehranom koja sadrži otrovne tvari su pokazale specifične histomorfometrijski značajne adaptacije probavnog sustava pa tako *E. quercinus* ima najdeblji sloj neuroženog dijela epitela i mišića mukoze u jednjaku, ali najtanji sloj vanjskih mišića jednjaka, a *D. bogdanovi* ima najdeblji oroženi dio epitela jednjaka, izuzetno debelu sluznicu žlijezdanog dijela želuca naspram drugih vrsta i deblji epitel slijepog crijeva
- Također su uočene razlike između porodica, unatoč sličnoj prehrani pojedinih vrsta pa tako rod *Apodemus* ima najtanji sloj neuroženog dijela epitela jednjaka, a puhovi imaju manju debljinu epitela u tankom crijevu
- Histokemijska analiza pokazala je da se udio vrčastih stanica u crijevima povećava od tankog crijeva prema debelom crijevu te je najviše uvjetovan brojem kiselih vrčastih stanica
- Također, prehrana utječe na sastav mukozne barijere probavila, pa tako vrste s više karnivornom prehranom imaju više vrčastih stanica u tankom crijevu, a više granivorne vrste imaju više mješovitih stanica u tankom crijevu

- Gledano po vrstama, *A. sylvaticus* ima najraznovrsniji sastav vrčastih stanica u tankom i debelom crijevu te najviše neutralnih stanica u svim dijelovima crijeva, dok *A. epimelas* pokazuje najviše vrčastih stanica u debelom i slijepom crijevu
- Ovakva istraživanja jako dobro opisuju utjecaj sastava prehrane na građu i funkciju probavnog trakta, uključujući i sastav mukozne barijere i mikrobne zajednice probavila koja je direktno povezana s imunim sustavom
- Komparativne analize i rezultati koji prikazuju adaptacije na razlike u prehrani također mogu biti temelj za istraživanja iz ekološke i evolucijske perspektive

## 7. LITERATURA

- Alderton, D., Tanner, B. (1999): Rodents of the World. Blandford Pr, London.
- Allen, A., Flemstrom, G., Garner, A., Kivilaakso, E. (1993): Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews* 73: 823-857.
- Aylward, M., Beselaar, L., Alagaili, A., Amor, N., Mohammed, O., Kotzé, S. (2019): A comparative morphological and histological study of the gastrointestinal tract of four insectivorous bat species: *Asellia tridens*, *Chaerephon pumilus*, *Nycteris thebaica*, *Rhinopoma hardwickii*. *Journal of morphology* 280: 1106-1117.
- Baker, R. H. (1971): Nutritional Strategies of Myomorph Rodents in North American Grasslands. *Journal of Mammalogy* 52: 800. DOI: <https://doi.org/10.2307/1378928>
- Bansil, R., Turner, B. S. (2006): Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11: 164-170.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995): Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *J. Royal Statist. Soc., Series B* 57: 289-300.
- Boonzaier, J. (2012): Morphology and Mucin Histochemistry of the Gastrointestinal Tracts of Three Insectivorous Mammals: *Acomys spinosissimus*, *Crocidura cyanea* and *Amblysomus hottentotus*. Master of Medical Science. University of Stellenbosch.
- Bradamante, Ž., Švajger, A. (2002): Vježbe iz histologije, Slike histoloških preparata, II. dio. Kaligraf, Zagreb.
- Cao, X. J., Wang, W. M. (2009): Histology and Mucin Histochemistry of The Digestive Tract of Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38: 254-261.
- Carey, H. V. (1990): Seasonal changes in mucosal structure and function in ground squirrel intestine. *The American Journal of Physiology* 259: R385-392.
- Darvishzadeh, M., Mohammadpour, A. (2014): Histological and histometrical study of esophagus in rabbit and guinea pig. *Veterinary Researches & Biological Products* 27: 52-59.
- Dharmani, P., Srivastava, V., Kissoon-Singh, V., Chadee, K. (2009): Role of Intestinal Mucins in Innate Host Defense Mechanisms against Pathogens. *Journal of Innate Immunity* 1: 123-135.
- Dinno, A. (2017a): `conover.test`: Conover-Iman Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums.
- Dinno, A. (2017b): Conover-Iman Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums.

- Ellis, B., Mills, J., Kennedy, E., Maiztegui, J., Childs, J. (1994): The relationship among diet, alimentary tract morphology, and life history for five species of rodents from the central Argentine pampa. *Acta Theriologica* 39: 345-355.
- Esseco USA (2017): Safety Data Sheet, Sodium Metabisulfite.
- Fagan, C., Dapson, R. W., Horobin, R. W., Kiernan, J. A. (2020): Revised tests and standards for Biological Stain Commission certification of alcian blue dyes. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 95: 333-340.
- Forman, G. L. (1971): Histochemical Differences in Gastric Mucus of Bats. *Journal of Mammalogy* 52: 191-193.
- Forstner, J. F. (1978): Intestinal mucins in health and disease. *Digestion* 17: 234-263.
- Fowler, J., Cohen, L., Jarvis, P. (1998): *Practical statistics for field biology*, 2nd ed. ed. Wiley, Chichester; New York.
- Gadelha-Alves, R., Rozensztranch, A. M. D. S., Rocha- Barbosa, O. (2008): Comparative Intestinal Histomorphology of Five Species of Phyllostomid Bats (Phyllostomidae, Microchiroptera): Ecomorphological Relations with Alimentary Habits. *International Journal of Morphology* 26.
- Ghoshal, N. G., Bal, H. S. (1989): Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals* 23: 21-29.
- Gil-Delgado, J. A., Mira, Ó., Viñals, A., Gómez, J., Banyuls, N., Vives-Ferrándiz, C. (2010): Diet of the garden dormouse (*Eliomys quercinus* Linnaeus 1766) in orange groves: seasonal variation and use of available resources 74: 147-151.
- Goodarzi, N., Akbari Bazm, M., Naseri, L., Hosseinipour, M. (2019): Histomorphometrical and stereological study of the oesophagus in the adult male Persian squirrel (*Sciurus anomalus*). - Abstract - Europe PMC. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 48: 444-448.
- Gross, J. E., Wang, Z., Wunder, B. A. (1985): Effects of Food Quality and Energy Needs: Changes in Gut Morphology and Capacity of *Microtus ochrogaster*. *Journal of Mammalogy* 66: 661-667.
- Hau, J., Van Hoosier, G. L. (2003): *Handbook of laboratory animal science* / edited by Jann Hau and Gerald L. Van Hoosier, Jr., 2nd ed. ed. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Hayat, M. A. (1993): *Stains and Cytochemical Methods*. Springer Science & Business Media.
- Hochberg, Y. (1988): A Sharper Bonferroni Procedure for Multiple Tests of Significance. *Biometrika* 75: 800-802.
- Hoffmeyer, I. (1973): Interaction and Habitat Selection in the Mice *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus*. *Oikos* 24: 108-116.

- Hume, I. D. (1994): Gut morphology, body size and digestive performance in rodents. U: Chivers, D.J., Langer, P. (ur.), *The Digestive System in Mammals*. Cambridge University Press, 315-323.
- Hume, I., Beiglböck, C., Ruf, T., Frey-Roos, F., Bruns, U., Arnold, W. (2002): Seasonal changes in morphology and function of the gastrointestinal tract of free-living alpine marmots (*Marmota marmota*). *Journal of Comparative Physiology B* 172: 197-207.
- Hürner, H., Michaux, J. (2009): Ecology of the edible dormouse (*Glis glis*) in a western edge population in southern Belgium. *Vie Milieu* 8.
- Igbokwe, C. O., Obinna, S. J. (2016): Oesophageal and Gastric Morphology of the African Rope Squirrel *Funisciurus anerythrus* (Thomas, 1890). *Journal of Applied Life Sciences International* 4: 1-921794.
- Jojić, V., Bugarski-Stanojevic, V., Blagojević, J., Vujosević, M. (2014): Discrimination of the sibling species *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* (Rodentia, Muridae). *Zoologischer Anzeiger - A Journal of Comparative Zoology* 253: 261-269.
- Kararli, T. T. (1995): Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 16: 351-380.
- Kassambara, A. (2020): ggpubr: „ggplot2“ Based Publication Ready Plots.
- Kerr, J. B. (1999): *Atlas of functional histology*. London; St. Louis: Mosby.
- Kim, Y. S., Ho, S. B. (2010): Intestinal Goblet Cells and Mucins in Health and Disease: Recent Insights and Progress. *Current Gastroenterology Reports* 12: 319-330.
- Kotze, S. H., Coetzee, H. L. (1994): A histochemical study of mucus glycoproteins or mucins in the intestinal tract of the African elephant (*Loxodonta africana*).
- Krause, W. J. (1981): Morphological and histochemical observations on the duodenal glands of eight wild ungulate species native to North America. *American Journal of Anatomy* 162: 167-181.
- Kryštufek, B. (2010): *Glis glis* (Rodentia: Gliridae). *Mammalian Species* 42: 195-206.
- Kryštufek, B., Bužan, E. V. (2008): Rarity and decline in palaeoendemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi*. *Mammal Review* 38: 267-284.
- Kuipers, L., Scholten, J., Thissen, J. B. M., Bekkers, L., Geertsma, M. (2012): The diet of the garden dormouse (*Eliomys quercinus*) in the Netherlands in summer and autumn. *Lutra* 55: 17-27.
- Kumar, G. L., Kiernan, J. A. (Ur.) (2010): *Special Stains and H & E*, 2. ed, Education Guide. Dako North America.

- Laboisse, C., Jarry, A., Branka, J.-E., Merlin, D., Bou-Hanna, C., Vallette, G. (1996): Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. *The Proceedings of the Nutrition Society* 55: 259-264.
- Landry, S. O. (1970): The Rodentia as Omnivores. *The Quarterly Review of Biology* 45: 351-372.
- Langer, P. (2002): The digestive tract and life history of small mammals. *Mammal Review* 32: 107-131.
- Langer, P., Clauss, M. (2018): Morphological adaptation of the eutherian gastrointestinal tract to diet.
- Linden, S. K., Sutton, P., Karlsson, N. G., Korolik, V., McGuckin, M. A. (2008): Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology* 1: 183-197.
- Liu, P., Pieper, R., Rieger, J., Vahjen, W., Davin, R., Plendl, J., Meyer, W., Zentek, J. (2014): Effect of Dietary Zinc Oxide on Morphological Characteristics, Mucin Composition and Gene Expression in the Colon of Weaned Piglets. *PloS one* 9: e91091.
- Lundin, E., Zhang, J.-X., Huang, C.-B., Reuterving, C.-O., Hallmans, G., Nygren, C., Stenling, R. (1993): Oat Bran, Rye Bran, and Soybean Hull Increase Goblet Cell Volume Density in the Small Intestine of the Golden Hamster a Histochemical and Stereologic Light-Microscopic Study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 28: 15-22.
- Macdonald, D. (2005): Collins - sisavciCollins Field Guide to the Mammals of Britain and Europe, Collins Field Guides. HarperCollins.
- Macfarlane, S., Dillon, J. f. (2007): Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 102: 1187-1196.
- Marsh, A. C. W., Harris, S. (2000): Partitioning of woodland habitat resources by two sympatric species of *Apodemus*: lessons for the conservation of the yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) in Britain. *Biological Conservation* 92: 275-283.
- Montagne, L., Piel, C., Lallès, J. P. (2004): Effect of Diet on Mucin Kinetics and Composition: Nutrition and Health Implications. *Nutrition Reviews* 62: 105-114.
- Montgomery, W. I. (1978): Intra- and interspecific interactions of *Apodemus sylvaticus* (L.) and *A. flavicollis* (Melchoir) under laboratory conditions. *Animal Behaviour* 26: 1247-1254.
- Montgomery, W. I. (1980): Spatial organization in sympatric populations of *Apodemus sylvaticus* and *A. flavicollis* (Rodentia: Muridae). *Journal of Zoology* 192: 379-401.

- Mujezinović, O., Margaletić, J., Treštić, T., Dautbašić, M. (2013): Utjecaj staništa na prisutnost šumske voluharice (*myodes glareolus*) i žutogrlog šumskog miša (*apodemus flavicollis*) na području Bosne. *Šumarski list* 137: 487-493.
- Nagai, K., Noguchi, T., Hashimoto, T., Uchida, Y., Shimada, T. (2003): The organization of the lamina muscularis mucosae in the human esophagus. *Archives of Histology and Cytology* 66: 281-288.
- Naya, D. E. (2008): Gut size flexibility in rodents: what we know, and don't know, after a century of research. *Revista chilena de historia natural* 81.
- NN 102/2017 (2017): Zakon o zaštiti životinja. *Narodne novine*, 102/2017.
- NN 144/2013 (2013): Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama. *Narodne novine*, 144/2013.
- NN 55/2013 (2013): Pravilnik o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe. *Narodne novine*, 55/2013
- Nowakowski, W. K., Remisiewicz, M., Kosowska, J. (2006): Food preferences of *Glis glis* (L.), *Dryomys nitedula* (Pallas) and *Graphiurus murinus* (Smuts) kept in captivity. *Polish Journal of Ecology* 54: 369-378.
- Nzalak, J., Onyeanusi, B., Samuel, A., Voh, A., Ibe, C. (2010): Gross Anatomical, Histological and Histochemical Studies of the Esophagus of the African Giant Rat (AGR) (*Cricetomys gambianus*-Waterhouse, 1840). *Journal of Veterinary Anatomy* 3: 55-64.
- Okon, E. E. (1977): Functional Anatomy of the Alimentary Canal in the Fruit Bat, *Eidolon helvum*, and the Insect Bat, *Tadarida nigeriae*. *Acta Zoologica* 58: 83-93.
- Paksuz, E., Paksuz, S. (2015): The Morphology of the Intestine of the Greater Mouse-Eared Bat, *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797). *Global Veterinaria* 14: 686-692.
- Parakkal, P. F. (1967): An electron microscopic study of esophageal epithelium in the newborn and adult mouse. *American Journal of Anatomy* 121: 175-195.
- Pavelka, M., Roth, J. (2015): *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology*. Springer.
- Perrin, M. R., Curtis, B. A. (1980): Comparative morphology of the digestive system of 19 species of Southern African myomorph rodents in relation to diet and evolution. *South African Journal of Zoology* 15: 22-33.
- Pinheiro, C., Venter, M. L., Sahd, L., Bronner, G., Kotzé, S. (2018): Comparative gastrointestinal morphology of seven golden mole species (Mammalia: Chrysochloridae) from South Africa. *Journal of morphology*.
- Poddar, S., Jacob, S. (1979): Mucosubstance histochemistry of Brunner's glands, pyloric glands and duodenal goblet cells in the ferret. *Histochemistry* 65: 67-81.



- Popov, V. (1993): Discriminant criteria and comparative study on morphology and habitat selection of *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758) and *Apodemus flavicollis* (Melchior, 1834) (Mammalia, Rodentia, Muridae) in Bulgaria. *Acta Zoologica Bulgarica* 46: 101-111.
- R Core Team (2022): R: The R Stats Package version 4.3.0. The R Stats Package. URL: <https://stat.ethz.ch/R-manual/R-devel/library/stats/html/00Index.html>, (pristupljeno 3. 8. 2022.).
- Schieck, J. O., Millar, J. S. (1985): Alimentary tract measurements as indicators of diets of small mammals 49: 93-104.
- Schneeman, B. O., Richter, B. D., Jacobs, L. R. (1982): Response to Dietary Wheat Bran in the Exocrine Pancreas and Intestine of Rats. *The Journal of Nutrition* 112: 283-286.
- Selim, A., Hazaa, E., Goda, W. (2017): Comparative Histological Studies of the Esophagus Wall of *Oryctolagus cuniculus* Rabbit Adult, Young and Lactating Using Light Microscope. *Journal of Cytology & Histology* 08.
- Shahrestani, J., M Das, J. (2022): Neuroanatomy, Auerbach Plexus StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551559/> (pristupljeno 20.07.2022.)
- Sharma, R., Schumacher, U. (1995): Morphometric analysis of intestinal mucins under different dietary conditions and gut flora in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 40: 2532-2539.
- Sharma, R., Schumacher, U., Ronaasen, V., Coates, M. (1995): Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36: 209-214.
- Sheahan, D. G., Jervis, H. R. (1976): Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *The American Journal of Anatomy* 146: 103-131.
- Sigma-Aldrich (2019): Mayer's hemalum solution for microscopy.
- Sullivan, L., LaMorte, W. W. (2017): Nonparametric tests. URL: [https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704\\_nonparametric/index.html](https://sphweb.bumc.bu.edu/otlt/mph-modules/bs/bs704_nonparametric/index.html), (pristupljeno 3. 8. 2022.).
- Suvarna, K. S., Layton, C., Bancroft, J. D. (Ur.) (2013): Theory and practice of histological techniques, 7. ed. ed. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., Montine, K. S. (Ur.) (2018): Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, 2. ed. Elsevier.

- Vahouny, G. V., Le, T., Ifrim, I., Satchithanandam, S., Cassidy, M. M. (1985): Stimulation of intestinal cytokinetics and mucin turnover in rats fed wheat bran or cellulose. *The American Journal of Clinical Nutrition* 41: 895-900.
- Verdugo, P. (1990): Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. *Annual Review of Physiology* 52: 157-176.
- Walters, J., Marais, S., Johnson, O., Bennett, N. C., Alagaili, A. N., Mohammed, O. B., Kotzé, S. H. (2014): The comparative gastrointestinal morphology of five species of muroid rodents found in Saudi Arabia. *Journal of Morphology* 275: 980-990.
- Wang, T., Hung, C. Y., Randall, D. J. (2006): The Comparative Physiology of Food Deprivation: From Feast to Famine. *Annual Review of Physiology* 68: 223-251.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., Pedersen, T. L., Takahashi, K., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., Dunnington, D. (2022): ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics.
- Wickham, H. (2021): tidyverse: Easily Install and Load the „Tidyverse“.
- Wild, C. (1997): Chapter 10: The Wilcoxon Rank-Sum Test.
- Wilson, D. E., Thomas E. Lacher, J., A. Mittermeier, R. (Ur.) (2016): Handbook of the Mammals of the World. Vol.6: Lagomorphs and Rodents I, 1. ed. LYNX EDICIONS, Barcelona.
- Wilson, D. E., Thomas E. Lacher, J., Mittermeier, R. A. (Ur.) (2017): Handbook of the Mammals of the World. Vol.7: Rodents II, 1. ed. LYNX EDICIONS, Barcelona.
- Young, B., Heath, J. W. (2003): Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas, 4. ed. Churchill-Livingstone.

## 8. ŽIVOTOPIS

Mia Jakopović, rođena u Zagrebu, 19. listopada 1996. godine, završila je srednju Veterinarsku školu u Zagrebu, nakon čega je 2015. godine upisala preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Nakon završenog preddiplomskog studija, 2020. godine je upisala diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Zoologija. Tijekom studija bila je aktivni član Udruge studenata biologije – BIUS, u kojoj je od 2018. do 2020. godine bila i voditeljica Sekcije za sisavce. Pritom je, uz svoju kolegicu i suvoditeljicu Martinu Kanižu, organizirala i provela brojne radionice i predavanja za studente te terenska istraživanja i projekte „Mala škola mamalogije“ 2018. i 2019. godine, „Posjetitelji bez ulaznica“ 2019. godine, u suradnji sa Zoološkim vrtom grada Zagreba, terenska istraživanja sisavaca na projektima „Šuma Žutica 2018“, „Insula Auri 2019“ i „Žumberak 2020“ te projekt „Rasprostranjenost puha orašara (*Muscardinus avellanarius*) u Parku prirode Medvednica“ 2020. do 2021. godine. Izuzev toga sudjelovala je i na raznim drugim istraživanjima, poput „Reconnecting existing wilderness in Croatia“ 2019. godine i istraživanjima puha orašara u pokrajinama Saska-Anhalt (2019. godine) i Turingija (2021. godine). Izvan Udruge BIUS je volontirala kao studentski koordinator manifestacije „Dan i noć na PMF-u 2018“, kao *Junior mammal scientist* za Operation Wallacea Croatia u Nacionalnom parku Krka 2019. godine, u Udruzi Biom i na kampu „Dinara back to LIFE“ 2021. godine. Aktivno je sudjelovala na Simpoziju studenata bioloških usmjerenja (SiSB) 2019. godine kao jedan od autora s posterom „Posjetitelji bez ulaznica“ te na 11. Međunarodnoj konferenciji o puhovima 2022. godine s predavanjem „The gastrointestinal tract histology of *Eliomys quercinus* and *Glis glis*“. Napisala je nekoliko članaka u studentskom časopisu „In Vivo“, uključujući vodiče za prepoznavanje tragova sisavaca, kao i razne prijevode tekstova na hrvatski ili engleski jezik, a 2022. godine je u suradnji s kolegicom Veronikom Bencerić prijavila rad za Rektorovu nagradu „Isplativost provjere rezultata fotoidentifikacije risa (*Lynx lynx*)“. Također je tijekom studija bila član Studentskog zbora PMF-a i studentski predstavnik vijeća Biološkog odsjeka, tijekom čega je reformirala način provođenja Natječaja za sufinanciranje studentskih projekata te potaknula razna poboljšanja pri izvođenju pojedinih kolegija na Biološkom odsjeku. Krajem fakulteta radila je i u Oikon institutu za primijenjenu ekologiju, kao pomoć na projektima vezanim uz proučavanje šišmiša i malih sisavaca.

## 9. PRILOZI

- Prilog 1.** Tablica srednjih vrijednosti po uzorkovanoj jedinici za histomorfometrijske mjere pojedinih slojeva, za svaku vrstu
- Prilog 2.** Tablica udjela broja vrčastih stanica određenog tipa po površini sluznice tankog, debelog i slijepog crijeva te površina pregledane sluznice za svaku vrstu.
- Prilog 3.** Tablica s rezultatima Conover–Iman testa za analizu značajne razlike debljine pojedinih slojeva između parova vrsta.
- Prilog 4.** Tablica s rezultatima Conover–Iman testa za analizu značajne razlike broja vrčastih stanica u tankom, debelom i slijepom crijevu.
- Prilog 5.** Tablica s rezultatima Kruskal-Wallis testova za analizu značajne razlike debljine i udjela pojedinih slojeva obojenja vrčastih stanica unutar najčešćeg tipa obojenja žlijezdanog dijela želuca.

**Prilog 1.** Tablica srednjih vrijednosti po uzorkovanoj jedinici za histomorfometrijske mjere pojedinih slojeva, za svaku vrstu. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimalna do maksimalna vrijednost). Zadnji stupac prikazuje p-vrijednosti dobivene Kruskal-Wallis testom, za nekorigirane mjere i mjere korigirane dužinom životinje (SVL) te su zvjezdicom označene značajne p-vrijednosti testa. Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGI – *Glis glis*. Uzete su mjere: SVL – dužina tijela životinje bez repa (eng. *snout-to-vent length*); JM – jednjak, debljina sluznice; JE – jednjak, debljina višeslojnog pločastog epitela; JKE – jednjak, debljina oroženog višeslojnog pločastog epitela; JSE – jednjak, debljina neuroženog višeslojnog pločastog epitela; JMM – jednjak, debljina mišićnog sloja sluznice; JTM – jednjak, debljina vanjskih mišićnih slojeva; GG – želudac, debljina sluznice sa želučanim žlijezdama; TCE – tanko crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila; DCE – debelo crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila; SCE – slijepo crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila.

	Vrste					KW p-vrijednost Nekorigirana Korigirana sa SVL
	ApEp	ApSy	DiBo	ElQu	GIGI	
<b>SVL</b> (cm)	11,17 $\pm$ 0,57 (10,40 - 12,00)	10,40 $\pm$ 0,70 (9,70 - 11,80)	14,08 $\pm$ 0,12 (14,00 - 14,30)	13,75 $\pm$ 0,60 (13,00 - 14,90)	16,82 $\pm$ 0,76 (15,60 - 17,90)	< 0,0001 * -
<b>JM</b> ( $\mu$ m)	85,55 $\pm$ 11,11 (71,25 - 104,10)	81,63 $\pm$ 2,52 (78,50 - 84,98)	129,47 $\pm$ 13,54 (117,99 - 158,20)	177,50 $\pm$ 53,13 (93,82 - 256,69)	139,84 $\pm$ 12,06 (123,90 - 163,32)	0,0008 * 0,0180 *
<b>JE</b> ( $\mu$ m)	67,99 $\pm$ 9,28 (56,66 - 79,95)	62,34 $\pm$ 3,41 (57,02 - 65,14)	107,27 $\pm$ 9,75 (100,38 - 128,33)	118,35 $\pm$ 36,92 (64,16 - 178,46)	112,01 $\pm$ 10,08 (96,46 - 125,81)	0,0020 * 0,0339 *
<b>JKE</b> ( $\mu$ m)	34,58 $\pm$ 5,23 (29,18 - 45,40)	36,80 $\pm$ 2,10 (33,92 - 39,98)	46,03 $\pm$ 8,26 (33,35 - 56,55)	30,41 $\pm$ 5,46 (20,02 - 36,58)	31,82 $\pm$ 5,29 (23,45 - 37,23)	0,0239 * 0,0013 *
<b>JSE</b> ( $\mu$ m)	33,41 $\pm$ 9,45 (24,26 - 48,19)	25,54 $\pm$ 2,18 (22,42 - 28,79)	61,24 $\pm$ 8,16 (52,26 - 71,79)	87,94 $\pm$ 35,17 (44,15 - 146,56)	80,19 $\pm$ 6,51 (71,81 - 88,59)	0,0016 * 0,0033 *

	Vrste					KW p-vrijednost Nekorigirana Korigirana sa SVL
	ApEp	ApSy	DiBo	ElQu	GI GI	
<b>JMM</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	9,77 $\pm$ 3,08 (6,34 - 15,35)	11,64 $\pm$ 1,54 (10,09 - 14,25)	9,28 $\pm$ 1,96 (6,71 - 11,60)	36,18 $\pm$ 10,80 (16,82 - 50,49)	17,71 $\pm$ 6,82 (8,95 - 29,58)	0,0030 * 0,0024 *
<b>JTM</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	157,94 $\pm$ 29,10 (119,50 - 210,15)	158,29 $\pm$ 52,48 (120,44 - 273,10)	166,97 $\pm$ 39,86 (121,62 - 239,94)	111,79 $\pm$ 37,81 (77,22 - 169,57)	208,67 $\pm$ 11,87 (192,29 - 227,81)	0,0273 * 0,0291 *
<b>GG</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	348,77 $\pm$ 77,37 (273,81 - 467,15)	235,82 $\pm$ 34,48 (190,90 - 285,89)	887,80 $\pm$ 212,10 (628,92 - 1210,47)	379,46 $\pm$ 58,59 (302,43 - 478,79)	272,91 $\pm$ 53,96 (217,87 - 368,93)	0,0007 * 0,0012 *
<b>TCE</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	19,91 $\pm$ 3,58 (15,95 - 25,97)	21,26 $\pm$ 1,75 (17,98 - 23,54)	21,00 $\pm$ 4,15 (12,57 - 25,81)	16,64 $\pm$ 2,12 (13,63 - 19,80)	18,71 $\pm$ 1,43 (16,95 - 21,37)	0,0661 0,0010 *
<b>DCE</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	15,18 $\pm$ 2,22 (12,91 - 19,33)	18,56 $\pm$ 3,89 (12,90 - 24,22)	17,53 $\pm$ 1,49 (15,48 - 19,53)	19,81 $\pm$ 2,83 (15,61 - 23,63)	22,31 $\pm$ 3,22 (17,48 - 27,31)	0,0300 * 0,0373 *
<b>SCE</b> <b>(<math>\mu\text{m}</math>)</b>	14,60 $\pm$ 1,39 (12,11 - 16,35)	14,47 $\pm$ 0,98 (13,22 - 15,98)	19,99 $\pm$ 4,50 (14,83 - 28,12)			0,0325 * 0,6758

**Prilog 2.** Tablica udjela broja vrčastih stanica određenog tipa po površini sluznice tankog crijeva (TC), debelog crijeva (DC) i slijepog crijeva (SC) te površina pregledane sluznice za svaku vrstu. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimalna do maksimalna vrijednost) te je naveden i broj jedinki (n) kod kojih je zabilježena barem jedna stanica određenog tipa. Kod samo jedne jedinke s određenim tipom stanica, nije navedena srednja vrijednost i standardna devijacija, već samo izvorna vrijednost. Zadnji stupac prikazuje p-vrijednosti dobivene Kruskal-Wallis testom za sve preparate te su zvjezdicom označene značajne p-vrijednosti testa. Tipovi vrčastih stanica su: P – plave (s kiselim mucinima), Lj – ljubičaste (s miješanim kiselim i neutralnim mucinima), R – ružičaste (s neutralnim mucinima) te Ukupno – svi tipovi vrčastih stanica. Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIgl – *Glis glis*.

	Vrste					KW p-vrijednost
	ApEp	ApSy	DiBo	ElQu	GIgl	
TC P	n = 6 0,7114 $\pm$ 0,1282 (0,5201 - 0,8945)	n = 6 0,8632 $\pm$ 0,2203 (0,4686 - 1,0830)	n = 6 0,6419 $\pm$ 0,1109 (0,4277 - 0,7617)	n = 6 1,1751 $\pm$ 0,1756 (0,8969 - 1,4591)	n = 6 0,6869 $\pm$ 0,1882 (0,4161 - 0,9653)	0,0043 *
TC Lj	n = 6 0,0899 $\pm$ 0,0122 (0,0750 - 0,1122)	n = 6 0,2307 $\pm$ 0,0961 (0,1171 - 0,4270)	n = 6 0,0298 $\pm$ 0,0377 (0,0000 - 0,1016)	n = 2 0,0100 $\pm$ 0,0204 (0,0000 - 0,0554)	n = 5 0,0925 $\pm$ 0,0832 (0,0000 - 0,2317)	0,0093 *
TC R	n = 1 0,0055 (0,0000 - 0,0055)	n = 4 0,0093 $\pm$ 0,0078 (0,0000 - 0,0225)	n = 1 0,0048 (0,0000 - 0,0048)	n = 0	n = 5 0,0107 $\pm$ 0,0077 (0,0000 - 0,0246)	0,6242
TC Ukupno	0,8023 $\pm$ 0,1236 (0,6323 - 0,9876)	1,1033 $\pm$ 0,2947 (0,5955 - 1,5101)	0,6725 $\pm$ 0,1389 (0,4277 - 0,8633)	1,1851 $\pm$ 0,1623 (0,9523 - 1,4591)	0,7902 $\pm$ 0,1340 (0,5858 - 0,9653)	0,0040 *
TC Površina sluznice (mm <sup>2</sup> )	0,046 $\pm$ 0,005 (0,032 - 0,053)	0,047 $\pm$ 0,007 (0,035 - 0,058)	0,051 $\pm$ 0,005 (0,034 - 0,059)	0,051 $\pm$ 0,005 (0,041 - 0,059)	0,048 $\pm$ 0,006 (0,037 - 0,056)	0,1891

	Vrste					KW p-vrijednost
	ApEp	ApSy	DiBo	ElQu	GI GI	
DC P	n = 6 3,2288 ± 0,3735 (2,6137 - 3,6479)	n = 6 1,4693 ± 0,3862 (0,8371 - 1,9329)	n = 6 1,6617 ± 0,6774 (0,5432 - 2,5843)	n = 6 2,6577 ± 0,2966 (2,1263 - 3,0833)	n = 6 1,4602 ± 0,4315 (0,9199 - 2,3103)	0,0004 *
DC Lj	n = 0	n = 6 0,3798 ± 0,2034 (0,1853 - 0,7159)	n = 3 0,0183 ± 0,0245 (0,0000 - 0,0673)	n = 5 0,0379 ± 0,0393 (0,0000 - 0,1173)	n = 3 0,0078 ± 0,0087 (0,0000 - 0,0228)	0,0062
DC R	n = 0	n = 4 0,0297 ± 0,0418 (0,0000 - 0,1212)	n = 0	n = 2 0,0017 ± 0,0024 (0,0000 - 0,0052)	n = 0	-
DC Ukupno	12,9132 ± 1,4799 (10,5111 - 14,6324)	5,8568 ± 1,5411 (3,3333 - 7,7359)	6,6591 ± 2,7074 (2,1826 - 10,3739)	10,7773 ± 1,1754 (8,7116 - 12,3863)	5,8684 ± 1,7029 (3,7538 - 9,2476)	0,0006 *
DC Površina sluznice (mm <sup>2</sup> )	0,047 ± 0,005 (0,037 - 0,054)	0,046 ± 0,005 (0,035 - 0,055)	0,051 ± 0,006 (0,040 - 0,059)	0,052 ± 0,004 (0,038 - 0,055)	0,053 ± 0,004 (0,045 - 0,059)	0,0048 *
SC P	n = 6 1,0104 ± 0,1498 (0,7396 - 1,1794)	n = 6 0,6275 ± 0,1888 (0,3551 - 0,9415)	n = 6 0,3518 ± 0,1042 (0,2204 - 0,4700)			0,0017 *
SC Lj	n = 6 0,1216 ± 0,0868 (0,0154 - 0,2523)	n = 6 0,0905 ± 0,0638 (0,0420 - 0,2209)	n = 6 0,0491 ± 0,0478 (0,0075 - 0,1341)			0,1979
SC R	n = 4 0,0169 ± 0,0137 (0,0000 - 0,0317)	n = 5 0,1507 ± 0,1366 (0,0000 - 0,3464)	n = 1 0,0112 (0,0000 - 0,0112)			0,1416



	<b>ApEp</b>	<b>ApSy</b>	<b>Vrste DiBo</b>	<b>ElQu</b>	<b>GIGI</b>	<b>KW p-vrijednost</b>
SC Ukupno	4,5994 ± 0,7762 (3,7074 - 5,8954)	3,5011 ± 1,0339 (1,8584 - 4,8340)	1,6222 ± 0,5669 (0,9139 - 2,3889)			0,0031 *
SC Površina sluznice (mm <sup>2</sup> )	0,046 ± 0,007 (0,036 - 0,059)	0,050 ± 0,006 (0,034 - 0,058)	0,043 ± 0,007 (0,030 - 0,054)			0,0947

**Prilog 3.** Tablica s rezultatima Conover–Iman testa za analizu značajne razlike debljine pojedinih slojeva između parova vrsta, za nekorrigirane vrijednosti te vrijednosti korigirane dužinom životinje bez repa (SVL). Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GlGl – *Glis glis*. Vrijednosti su: JM – jednjak, debljina sluznice; JE – jednjak, debljina višeslojnog pločastog epitela; JKE – jednjak, debljina oroženog višeslojnog pločastog epitela; JSE – jednjak, debljina neoroženog višeslojnog pločastog epitela; JMM – jednjak, debljina mišićnog sloja sluznice; JTM – jednjak, debljina vanjskih mišićnih slojeva; GG – želudac, debljina sluznice sa želučanim žlijezdama; TCE – tanko crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila; DCE – debelo crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila; SCE – slijepo crijevo, visina epitelne stanice od bazalnog do apikalnog dijela stanice, bez visine mikrovila. Stupac “t statistika” pokazuje udaljenost vrijednosti medijana, a “p–vrijednost” pokazuje značajnost rezultata analize. P–vrijednosti su korigirane Benjamini-Hochberg korekcijom te su značajne vrijednosti istaknute zvjezdicom.

Uspoređivane vrste	JM		JM / SVL		JE		JE / SVL	
	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost
ApEp – ApSy	0,8332	0,4126	0,0411	0,9675	0,4135	0,6828	0,3064	0,7586
ApEp – DiBo	-3,9096	0,0010 *	-2,7135	0,0297 *	-3,7731	0,0009 *	-2,6811	0,0015 *
ApEp – ElQu	-6,4733	0,0000 *	-3,4124	0,0110 *	-4,2900	0,0002 *	-2,3747	0,0006 *
ApEp – GlGl	-5,5119	0,0000 *	-0,6989	0,6138	-4,4968	0,0001 *	-1,1873	0,0005 *
ApSy – DiBo	-4,7428	0,0001 *	-2,7546	0,0360 *	-4,1866	0,0003 *	-2,9875	0,0006 *
ApSy – ElQu	-7,3065	0,0000 *	-3,4536	0,0198 *	-4,7035	0,0001 *	-2,6811	0,0004 *
ApSy – GlGl	-6,3451	0,0000 *	-0,7401	0,6660	-4,9102	0,0000 *	-1,4937	0,0005 *
DiBo – ElQu	-2,5637	0,0239 *	-0,6989	0,5456	-0,5169	0,6098	0,3064	0,7622
DiBo – GlGl	-1,6023	0,1521	2,0146	0,0914	-0,7236	0,4760	1,4937	0,6800
ElQu – GlGl	0,9614	0,3840	2,7135	0,0238 *	-0,2068	0,8379	1,1873	0,8379

Usporedivane vrste	JKE		JKE / SVL		JSE		JSE / SVL	
	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost
ApEp – ApSy	-1,6120	0,1992	-2,0836	0,0680	1,5495	0,1487	0,9132	0,4623
ApEp – DiBo	-2,9015	0,0255 *	-0,7739	0,4462	-3,4217	0,0036 *	-2,6435	0,0233 *
ApEp – ElQu	0,8060	0,5348	3,7505	0,0016 *	-5,4876	0,0000 *	-3,9412	0,0019 *
ApEp – GlGl	0,2821	0,7802	4,7626	0,0002 *	-5,8750	0,0000 *	-3,4606	0,0039 *
ApSy – DiBo	-1,2896	0,2986	1,3097	0,2528	-4,9712	0,0001 *	-3,5567	0,0038 *
ApSy – ElQu	2,4179	0,0581	5,8342	0,0000 *	-7,0371	0,0000 *	-4,8544	0,0005 *
ApSy – GlGl	1,8941	0,1397	6,8462	0,0000 *	-7,4245	0,0000 *	-4,3738	0,0009 *
DiBo – ElQu	3,7075	0,0105 *	4,5245	0,0003 *	-2,0659	0,0617	-1,2977	0,2946
DiBo – GlGl	3,1836	0,0193 *	5,5365	0,0000 *	-2,4533	0,0307 *	-0,8171	0,4684
ElQu – GlGl	-0,5239	0,6722	1,0121	0,3569	-0,3874	0,7018	0,4806	0,6350

Usporedivane vrste	JMM		JMM / SVL		JTM		JTM / SVL	
	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost
ApEp – ApSy	-1,6010	0,1742	-1,8798	0,1026	0,2765	0,7844	0,0000	1,0000
ApEp – DiBo	-0,1455	0,8855	1,7273	0,1206	-0,3555	0,8058	1,7305	0,1598
ApEp – ElQu	-5,2880	0,0002 *	-4,6232	0,0005 *	1,7776	0,1461	3,4610	0,0097 *
ApEp – GlGl	-2,9108	0,0187 *	-0,8129	0,4240	-2,2911	0,1022	0,9046	0,4679
ApSy – DiBo	1,4554	0,1975	3,6071	0,0034 *	-0,6320	0,6664	1,7305	0,1917
ApSy – ElQu	-3,6871	0,0037 *	-2,7434	0,0222 *	1,5011	0,2084	3,4610	0,0195 *
ApSy – GlGl	-1,3099	0,2246	1,0669	0,3291	-2,5676	0,0830	0,9046	0,5347
DiBo – ElQu	-5,1425	0,0001 *	-6,3505	0,0000 *	2,1331	0,1073	1,7305	0,2397
DiBo – GlGl	-2,7653	0,0211 *	-2,5402	0,0294 *	-1,9356	0,1286	-0,8259	0,4630
ElQu – GlGl	2,3772	0,0424 *	3,8103	0,0027 *	-4,0686	0,0042 *	-2,5564	0,0568

Uspoređivane vrste	GG		GG / SVL		TCE		TCE / SVL	
	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost
ApEp – ApSy	3,6143	0,0026 *	2,5569	0,0213 *			-1,7034	0,1121
ApEp – DiBo	-4,4106	0,0004 *	-3,8353	0,0013 *			2,3495	0,0386 *
ApEp – ElQu	-1,2252	0,2319	0,6729	0,5072			4,4054	0,0004 *
ApEp – GlGl	2,0215	0,0676	5,6520	0,0000 *			5,2277	0,0001 *
ApSy – DiBo	-8,0249	0,0000 *	-6,3921	0,0000 *			4,0529	0,0009 *
ApSy – ElQu	-4,8394	0,0002 *	-1,8840	0,0792			6,1088	0,0000 *
ApSy – GlGl	-1,5927	0,1375	3,0951	0,0069 *			6,9311	0,0000 *
DiBo – ElQu	3,1855	0,0055 *	4,5081	0,0003 *			2,0558	0,0630
DiBo – GlGl	6,4322	0,0000 *	9,4873	0,0000 *			2,8782	0,0135 *
ElQu – GlGl	3,2467	0,0055 *	4,9791	0,0001 *			0,8223	0,4187

Uspoređivane vrste	DCE		DCE / SVL		SCE		TCE / SVL	
	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost
ApEp – ApSy	-1,7507	0,1845	-2,3777	0,0846	0,5315	0,6028		
ApEp – DiBo	-1,4783	0,2530	1,2656	0,3622	-2,5248	0,0350 *		
ApEp – ElQu	-2,7622	0,0530	-0,6903	0,5515				
ApEp – GlGl	-3,7348	0,0098 *	0,2685	0,7906				
ApSy – DiBo	0,2723	0,7876	3,6433	0,0123 *	-3,0563	0,0240 *		
ApSy – ElQu	-1,0115	0,4018	1,6874	0,2079				
ApSy – GlGl	-1,9841	0,1458	2,6462	0,0694				
DiBo – ElQu	-1,2838	0,3014	-1,9559	0,1544				
DiBo – GlGl	-2,2564	0,1101	-0,9971	0,4689				
ElQu – GlGl	-0,9726	0,3779	0,9588	0,4336				

**Prilog 4.** Tablica s rezultatima Conover–Iman testa za analizu značajne razlike broja vrčastih stanica u tankom crijevu (TC), debelom crijevu (DC) i slijepom crijevu (SC). Stupac “t statistika” pokazuje udaljenost vrijednosti medijana, a “p–vrijednost” pokazuje značajnost rezultata analize. P–vrijednosti su korigirane Benjamini-Hochberg korekcijom te su značajne vrijednosti istaknute zvjezdicom. Vrste su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; DiBo – *Dinaromys bogdanovi*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGl – *Glis glis*. Stupci označavaju boje vrčastih stanica: P – plave (kisele), LJ – ljubičaste (mješovite), R – ružičaste (neutralne) te Ukupno – ukupno svi tipovi vrčastih stanica.

Uspoređivane vrste	TC P		TC Lj		TC R		TC Ukupno	
	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost
ApEp – ApSy	-1,3251	0,2816	-3,4854	0,0085 *			-2,3070	0,0494 *
ApEp – DiBo	0,8834	0,4818	1,3823	0,2217			1,2866	0,3000
ApEp – ElQu	-3,6661	0,0039 *					-3,1942	0,0094 *
ApEp – GIGl	0,5742	0,6344	-0,8778	0,3923			0,2218	0,8263
ApSy – DiBo	2,2085	0,0732	4,4997	0,0019 *			3,5935	0,0070 *
ApSy – ElQu	-2,3410	0,0688					-0,8873	0,4260
ApSy – GIGl	1,8993	0,1152	2,4454	0,0513			2,5288	0,0363 *
DiBo – ElQu	-4,5495	0,0012 *					-4,4808	0,0014 *
DiBo – GIGl	-0,3092	0,7597	-2,1225	0,0732			-1,0647	0,3715
ElQu – GIGl	4,2403	0,0013 *					3,4161	0,0073 *

Uspoređivane vrste	DC P		DC Lj		DC R		DC Ukupno	
	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost
ApEp – ApSy	6,0835	0,0000 *					4,5770	0,0004 *
ApEp – DiBo	5,1169	0,0001 *					5,2232	0,0001 *
ApEp – ElQu	1,8762	0,1034					1,9385	0,0913
ApEp – GIGl	6,2540	0,0000 *					6,3002	0,0000 *
ApSy – DiBo	-0,9665	0,3812					0,6462	0,5241
ApSy – ElQu	-4,2073	0,0006 *	4,3991	0,0007 *			-2,6385	0,0235 *
ApSy – GIGl	0,1706	0,8659					1,7231	0,1215
DiBo – ElQu	-3,2407	0,0056 *					-3,2847	0,0060 *
DiBo – GIGl	1,1371	0,3328					1,0770	0,3242

Uspoređivane vrste	SC P		SC Lj		SC R		SC Ukupno	
	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost	t statistika	p-vrijednost
ElQu – GIGl	4,3778	0,0005 *					4,3617	0,0005 *
ApEp – ApSy	3,3472	0,0044 *					1,9746	0,0670
ApEp – DiBo	6,6944	0,0000 *					5,5648	0,0002 *
ApSy – DiBo	3,3472	0,0066 *					3,5902	0,0040 *

**Prilog 5.** Tablica s rezultatima Kruskal-Wallis testova za analizu značajne razlike debljine i udjela pojedinih slojeva obojenja vrčastih stanica unutar žlijezdanog dijela želuca. Analiza obuhvaća samo vrijednosti koje su rađene na mjestima s rasporedom obojenja od bazalne membrane prema vrhu sluznice: SP – svijetlo plava, SR – svijetlo roza, R – ružičasta. Stupac „ $\chi^2$ “ (chi kvadrat) označava udaljenost medijana skupina, „df“ označava stupnjeve slobode (eng. *degrees of freedom*), a “p–vrijednost” pokazuje značajnost rezultata analize. Zvezdicom su označene značajne p-vrijednosti testa za koje je proveden Conover–Iman test za analizu značajne razlike između pojedinih parova vrsta. Stupac “t statistika” pokazuje udaljenost vrijednosti medijana, a “p–vrijednost” pokazuje značajnost rezultata analize. P–vrijednosti su korigirane Benjamini-Hochberg korekcijom te su značajne vrijednosti istaknute zvezdicom. Vrste koje su uspoređivane su: ApEp – *Apodemus epimelas*; ApSy – *Apodemus sylvaticus*; ElQu – *Eliomys quercinus*; GIGl – *Glis glis*.

	$\chi^2$	df	p–vrijednost
SP debljina	9,4807	3	0,0235 *
SR debljina	8,6702	3	0,0340 *
R debljina	7,8158	3	0,0500
SP udio	1,7088	3	0,6350
SR udio	6,3772	3	0,0946
R udio	9,8368	3	0,0200 *

Uspoređivane vrste	SP debljina		SR debljina		R udio	
	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost	t statistika	p–vrijednost
ApEp – ApSy	1,2383	0,2832	2,6789	0,0360 *	-2,2056	0,0893
ApEp – ElQu	1,6193	0,1915	2,8599	0,0378 *	-3,8647	0,0103 *
ApEp – GIGl	4,1221	0,0062 *	3,4557	0,0232 *	-3,6437	0,0080 *
ApSy – ElQu	0,3615	0,7231	0,1717	0,8661	-1,5740	0,2067
ApSy – GIGl	2,6481	0,0573	0,5792	0,8575	-1,2297	0,2869