

# FIZIOLOGIJA PROBAVE U DINARSKOGA VOLUHARA

## Dinaromys bogdanovi (V. et E. Martino, 1922)

---

Jurić, Maja

Doctoral thesis / Doktorski rad

2024

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:217:968465>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-26**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

MAJA JURIĆ

**FIZIOLOGIJA PROBAVE U  
DINARSKOGA VOLUHARA *Dinaromys  
bogdanovi* (V. et E. Martino, 1922)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE  
DEPARTMENT OF BIOLOGY

MAJA JURIĆ

**PHYSIOLOGY OF DIGESTION IN  
BALKAN SNOW VOLE *Dinaromys  
bogdanovi* (V. et E. Martino, 1922)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2024.

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za animalnu fiziologiju i Zoološkom vrtu Grada Zagreba, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Duje Lisičića u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

## INFORMACIJE O MENTORU

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić završio je studij biologije i kemije na Fakultetu prirodoslovno-matematičkih znanosti i odgojnih područja u Splitu 2000. godine, obranivši diplomski rad pod naslovom "Manipulacija plijenom i kemorepcija kod blavora (*Ophisaurus apodus*, PALLAS, 1775)" (mentor: doc. dr. sc. Zoran Tadić). Magistrirao je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu 2005. godine obranom rada pod naslovom "Hematologija poskoka, *Vipera ammodytes* (Serpentes, Viperidae)", a doktorat znanosti stekao je 2009. godine obranom doktorske disertacije "Biologija vrste kućnog macaklina (*Hemidactylus turcicus*) i zidnog macaklina (*Tarentola mauritanica*) na otocima Hvaru i Visu".

Na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu zaposlen je od 2001. godine, najprije kao stručni suradnik, zatim asistent, te je napredovao do višeg asistenta 2009., docenta 2014., i izvanrednog profesora 2021. godine. Uz navedeno, sudjeluje u nastavi na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, gdje je izabran za predavača 2007., te za višeg predavača 2012. godine. Područja njegovog znanstvenog interesa uključuju animalnu i komparativnu fiziologiju, ekofiziologiju, komparativnu ekologiju te međuvrsne odnose i ponašanje životinja. Posebno ga zanimaju složeni biološki i biomedicinski problemi na razini cijelog organizma koji zahtijevaju integrativnu fiziološku, evolucijsku i/ili bihevioralnu analizu. Specijalnost mu je rad na životinjskim modelima u laboratoriju i u prirodi. Sudjeluje u izvođenju nastave na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu i na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu. Mentor je dvije doktorske disertacije, voditelj 31 diplomskog rada, suvoditelj 31 diplomskog i jednog magistarskog rada te autor više skripti za studente.

Član je Hrvatskog herpetološkog društva (Hyla), Udruge za biološka istraživanja (BIOM) i Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama (CroLASA). Sudjelovao je u nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih i stručnih projekata, a trenutno sudjeluje u projektu "Dopamine regulation of competitive behaviour in coexisting populations of lizards *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* - BOLDeR" Hrvatske zaklade za znanost.

Autor je 39 znanstvenih radova i sudjelovao je na brojnim domaćim i međunarodnim kongresima kao izlagač ili pozvani predavač.

Više detalja o publikacijama dostupno je na:

CRORIS: <https://www.croris.hr/osobe/profil/1823>

SCHOLAR: <https://scholar.google.hr/citations?hl=hr&user=eMPhaY8AAAAJ>

## ZAHVALE

*Na početku želim izraziti najdublju zahvalnost mentoru izv. prof. dr. sc. Duji Lisičiću. Tvoja stručnost, vodstvo i predanost bili su ključni tijekom cijelog ovog perioda.*

*Zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Goranu Kišu, izv. prof. dr. sc. Viboru Roji, izv. prof. dr. sc. Romani Gračan i izv. prof. dr. sc. Ivanu-Conradu Šoštariću-Zuckermannu na stručnoj i nesebičnoj pomoći te savjetima.*

*Hvala svim asistentima, laborantima i tehničarima koji su sudjelovali u ovom istraživanju na ogromnoj pomoći i strpljenju prilikom izrade preparata i analiza uzoraka.*

*Hvala marljivim i dragim kolegama (Igoru, Miji, Mateu, Maji, Neli i Nives) koji su radili na dinarskim voluharima u zatočeništvu.*

*Velika hvala kolegama Marku Glogoškom i Tomislavu Gojaku na pomoći u statističkoj obradi podataka.*

*Hvala svim kolegama iz Zoološkog vrta Grada Zagreba s kojima sam surađivala i koji su omogućili ovo istraživanje. Posebna hvala Andrei i Davorki za vjeru u mene te razumijevanje i podršku. Hvala timariteljima koji su se zajedno sa mnom svakodnevno brinuli o dinarskim voluharima pune četiri godine te svim kolegama koji su uskakali kada su meni životne prilike to onemogućile.*

*Zahvaljujem i svojim dragim kolegama i prijateljima Loreni, Josipu, Mireli, Đurđici i Renee. Hvala vam što ste dio moje svakodnevnice i što u nju unosite zabavu, veselje i smijeh.*

*Zahvaljujem svojoj obitelji, ponajviše roditeljima bez kojih ne bi bila ovdje gdje jesam. Njihova bezgranična ljubav, podrška i svakodnevna briga pomogle su mi izguram do kraja.*

*Najveća hvala mojem Filipu. Bez tebe i Ivana ništa od ovog ne bi bilo potpuno.*

## FIZIOLOGIJA PROBAVE U DINARSKOGA VOLUHARA

*Dinaromys bogdanovi* (V. et E. Martino, 1922)

MAJA JURIĆ

Zavod za animalnu fiziologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta  
Sveučilišta u Zagrebu, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

Dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*) je mali biljojedni glodavac, endem Balkanskog poluotoka i strogo zaštićena vrsta u Hrvatskoj. Cilj istraživanja bio je proučiti prilagodbe žvačnog sustava, morfološke i histološke karakteristike probavnog sustava, brzinu probave i sposobnost probavljanja kod ove vrste. *In vivo* mjerenja sile ugriza pokazala su očekivane vrijednosti s obzirom na tjelesnu masu, s većim vrijednostima kod ženki. Anatomska analiza žvačnih mišića otkrila je da *m. masseter profundus anterior* i *m. temporalis anterior* najviše doprinose ukupnoj masi aduktora čeljusti. Morfološka i histološka analiza probavnog sustava otkrila je specifične prilagodbe u strukturi tipične za potporodicu Arvicolinae. Istraživanje brzine probave pokazalo je da dinarski voluhar koristi mehanizam kolonske separacije poznat kao "mukozna zamka" za zadržavanje tekuće frakcije probave i mikroorganizama, ključnih za fermentaciju i apsorpciju hranjivih tvari. Rezultati pokazuju visoku efikasnost probave i apsorpcije hranjivih tvari, s razlikama između spolova. Ovo istraživanje doprinosi razumijevanju fiziologije probave dinarskog voluhara, pružajući prve uvide u morfološke i fiziološke karakteristike probavnog sustava ove vrste, koje ukazuju na specijalizaciju prema biljojednoj hranidbi.

(207 stranica, 63 slike, 13 tablica, 392 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: dinarski voluhar, žvačni sustav, probavni sustav, brzina probave, probavljivost

Mentor: izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Davor Zanella

izv. prof. dr. sc. Romana Gračan

prof. dr. sc. Marko Čaleta

prof. dr. sc. Goran Kiš

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

## **PHYSIOLOGY OF DIGESTION IN BALKAN SNOW VOLE**

***Dinaromys bogdanovi* (V. et E. Martino, 1922)**

MAJA JURIĆ

Division of Animal Physiology, Department of Biology, Faculty of Science University of Zagreb, Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb

The Balkan snow vole (*Dinaromys bogdanovi*) is a small herbivorous rodent, endemic to the Balkan Peninsula and classified as a strictly protected species in Croatia. This study examined adaptations of the masticatory system, as well as the morphological and histological characteristics of the digestive system, digestion rate, and digestibility of this species. *In vivo* bite force measurements showed expected values relative to body mass, with higher values in females. Anatomical analysis of the masticatory muscles revealed that the *m. masseter profundus anterior* and *m. temporalis anterior* contribute most to jaw adductor mass. Morphological and histological analysis of the digestive system revealed specific adaptations typical of the subfamily Arvicolinae. Digesta passage rates confirmed a mucus trap colonic separation mechanism, retaining the liquid fraction and microorganisms crucial for fermentation and nutrient absorption. The results indicate high efficiency in digestion and nutrient absorption, with sex-related differences. This research contributes to the understanding of the digestive physiology of the Balkan snow vole, providing the first insights into the morphological and physiological characteristics of its digestive system, which indicates specialization towards a herbivorous diet.

(207 pages, 63 figures, 13 tables, 392 references, original in Croatian)

Keywords: Balkan snow vole, masticatory system, digestive system, MRT, digestibility

Supervisor: Assoc. Prof. Duje Lisičić, PhD

Reviewers: Prof. Davor Zanella, PhD

Assoc. Prof. Romana Gračan, PhD

Prof. Marko Čaleta, PhD

Prof. Goran Kiš, PhD



## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURNI PREGLED.....</b>	<b>4</b>
2.1. Biološka i evolucijska obilježja vrste <i>Dinaromys bogdanovi</i> .....	4
2.1.1. Filogenetski položaj unutar potporodice Arvicolinae.....	4
2.1.1.1. Evolucijski razvoj potporodice Arvicolinae.....	4
2.1.1.2. Ekološke karakteristike potporodice Arvicolinae.....	5
2.1.2. Dinarski voluhar ( <i>Dinaromys bogdanovi</i> ).....	7
2.1.2.1. Sistematika i evolucija.....	7
2.1.2.2. Filogenetika i rasprostranjenost.....	8
2.1.2.3. Stanište i ekološka niša.....	10
2.1.2.4. Biologija vrste.....	11
2.1.2.5. Stupanj ugroženosti i mjere zaštite.....	13
2.2. Probavni sustav i probava.....	14
2.2.1. Funkcionalna anatomija žvačnog sustava.....	14
2.2.1.1. Građa žvačnog sustava kod glodavaca.....	16
2.2.1.2. Trofička niša i žvačni sustav.....	18
2.2.2. Morfologija i histologija probavne cijevi.....	20
2.2.2.1. Osnovna građa probavne cijevi.....	20
2.2.2.1.1. Anatomska i histološka građa probavne cijevi sisavaca.....	22
2.2.2.1.1.1. Vršaste stanice i vrsta sekreta.....	28
2.2.2.2. Morfohistološka varijabilnost probavnog sustava glodavaca.....	29
2.2.2.3. Prilagodba probavne cijevi na trofičku nišu.....	35
2.2.3. Oblici i brzina probave.....	36
2.2.3.1. Fermentatori stražnjeg crijeva.....	37
2.2.3.2. Mehanizmi separacije u kolonu.....	39
2.2.3.3. Koprofagija i cekotrofija.....	41
2.2.3.4. Metode istraživanja brzine probave.....	42
2.2.3.5. Markeri.....	42
2.2.4. Fiziologija probave.....	44
2.2.4.1. Izvanstanična i unutarstanična probava.....	45
2.2.4.2. Enzimatska probava (kemijska probava).....	46

2.2.4.2.1	Probava ugljikohidrata.....	47
2.2.4.2.2	Probava bjelančevina.....	48
2.2.4.2.3	Probava masti.....	49
2.2.4.3.	Probavljivost.....	51
2.2.4.3.1.	Određivanje probavljivosti.....	51
2.2.5.	Obrazloženje teme.....	53
<b>3.</b>	<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....</b>	<b>54</b>
<b>4.</b>	<b>HIPOTEZE.....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>MATERIJALI I METODE.....</b>	<b>58</b>
5.1.	Porijeklo istraživanih životinja.....	58
5.2.	Prostori i uvjeti za držanje životinja.....	58
5.3.	Funkcionalna anatomija žvačnog sustava.....	60
5.3.1.	Postavke istraživanja.....	60
5.3.2.	<i>In vivo</i> mjerenje sile ugriza.....	60
5.3.3.	Anatomska analiza mišića i mišićne mase.....	61
5.3.4.	Statistička obrada podataka.....	61
5.4.	Morfologija i histologija probavnog sustava.....	62
5.4.1.	Postavke istraživanja.....	62
5.4.2.	Morfologija i morfometrija probavnog sustava.....	63
5.4.2.1.	Prikupljanje morfoloških i morfometrijskih podataka.....	63
5.4.3.	Histologija i histokemija probavnog sustava.....	63
5.4.3.1.	Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva.....	64
5.4.3.2.	Bojenje stakalaca s rezovima.....	66
5.4.3.3.	Bojenje hematoksilinom i eozinom.....	67
5.4.3.4.	Histokemijsko bojenje vrčastih stanica metodom AB/PAS.....	68
5.4.3.5.	Kvantitativna histomorfometrijska analiza izrađenih mikroskopskih preparata.....	71
5.4.3.6.	Histomorfometrijska i histokemijska analiza.....	72
5.4.4.	Statistička obrada podataka.....	74
5.5.	Brzina probave.....	75
5.5.1.	Istraživanje brzine probave pomoću fizikalnih markera.....	75
5.5.1.1.	Postavke istraživanja.....	75
5.5.1.2.	Korišteni fizikalni markeri.....	75
5.5.1.3.	Sakupljanje uzoraka.....	77

5.5.1.4.	Laboratorijska analiza uzoraka.....	77
5.5.1.5.	Statistička obrada podataka.....	78
5.5.2.	Istraživanje brzine probave pomoću kemijskih markera.....	78
5.5.2.1.	Priprema biljnog materijala.....	78
5.5.2.2.	Postavke istraživanja.....	79
5.5.2.3.	Sakupljanje uzoraka.....	80
5.5.2.4.	Priprema uzoraka za određivanje tehnikom ICP-AES.....	80
5.5.2.5.	Određivanje kobalta i kroma ICP-AES.....	81
5.5.2.6.	Statistička obrada podataka.....	82
5.6.	Probavljivost.....	83
5.6.1.	Postavke istraživanja.....	83
5.6.2.	Skupljanje uzoraka.....	84
5.6.3.	Kemijske analize.....	84
5.6.4.	Statistička obrada podataka.....	87
<b>6.</b>	<b>REZULTATI.....</b>	<b>89</b>
6.1.	Funkcionalna anatomija žvačnog sustava.....	89
6.1.1.	<i>In vivo</i> sila ugriza.....	89
6.1.2.	Anatomska analiza mase i muskulature žvačnog sustava.....	91
6.2.	Morfologija i histologija probavnog sustava.....	93
6.2.1.	Makroskopski opis i morfološke karakteristike probavnog sustava.....	94
6.2.2.	Morfometrija probavnog sustava.....	97
6.2.3.	Mikroskopski opis probavne cijevi, histomorfometrijska i histokemijska analiza pojedinih slojeva.....	99
6.3.	Brzina probave.....	112
6.3.1.	Određivanje brzine probave pomoću fizikalnih markera.....	112
6.3.1.1.	Razlika u brzini probave mužjaka i ženki.....	113
6.3.1.2.	Brzina probave tijekom ljetne sezone.....	114
6.3.1.3.	Brzina probave tijekom zimske sezone.....	114
6.3.1.4.	Usporedba brzine probave tijekom ljetne i zimske sezone.....	115
6.3.2.	Određivanje brzine probave pomoću kemijskih markera.....	116
6.4.	Probavljivost.....	119
<b>7.</b>	<b>RASPRAVA.....</b>	<b>124</b>
7.1.	Funkcionalna anatomija žvačnog sustava.....	124
7.2.	Morfologija i histologija probavnog sustava.....	130

7.3. Brzina probave.....	145
7.4. Probavljivost.....	151
<b>8. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>156</b>
<b>9. POPIS LITERATURE.....</b>	<b>158</b>
<b>10. PRILOZI.....</b>	<b>191</b>
<b>11. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>207</b>

## 1. UVOD

Svrha ovog istraživanja je pružiti sveobuhvatno razumijevanje fiziologije probavnog sustava dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*, V. et E. Martino, 1922) kroz četiri ključna elementa: 1) funkcionalnu anatomiju žvačnog sustava preko sile ugriza, rasporeda i mase mišića čeljusti, 2) morfologiju, histologiju i histokemiju probavne cijevi, 3) brzinu probave te 4) probavljivost (sposobnost probavljanja).

Funkcionalna anatomija žvačnog sustava sisavaca, posebno malih biljojednih glodavaca, predstavlja važan predmet istraživanja zbog njihove jedinstvene prilagodbe hranidbi. Prilagodbe u denticiji i pripadajućoj muskulaturi omogućuju glodavcima učinkovito iskorištavanje različitih hranidbenih resursa, poboljšavajući efikasnost probave i preživljavanje u različitim ekološkim nišama (Butler, 1983.; Kavanagh i sur., 2007.). Specifična struktura sjekutića koji neprestano rastu, omogućuje glodavcima grickanje i žvakanje na način koji je specifičan za njihove hranidbene navike (Meng i Wyss, 2005.; Nowak, 1999.). Žvačni mišići pokazuju visok stupanj specijalizacije, omogućujući snažan ugriz i efikasnu obradu hrane, što je bio ključan čimbenik u evoluciji i ekološkom uspjehu ovog reda (Becht, 1954.; Butler, 1983.; Hiimäe i Ardran, 1968.; Ungar, 2015.).

U okviru prvog dijela istraživanja, analizirane su funkcionalne karakteristike žvačnog sustava dinarskih voluhara kroz mjerenje sile ugriza i distribucije mase žvačnih mišića. Istraživanje je uključivalo *in vivo* mjerenja sile ugriza pomoću izometrijskog Kistlerovog transduktora i post-mortem analizu mišićne mase. Žive jedinke korištene su za mjerenje maksimalne sile ugriza, dok su mišićni parametri procijenjeni na temelju uzoraka uginulih jedinki koje su konzervirane i analizirani pomoću stereomikroskopa. Statistička analiza obuhvaćala je usporedbu omjera sile ugriza i tjelesne mase, analizu razlika između spolova te usporedbu mase i distribucije žvačnih mišića između različitih jedinki kako bi se identificirale moguće funkcionalne varijacije. Pretpostavka je da dinarski voluhari posjeduju specifične prilagodbe u žvačnom sustavu koje im omogućuju razvijanje snažnog ugriza u odnosu na tjelesnu masu, što je ključna prilagodba za konzumaciju tvrde biljne hrane. Također se očekuje da dinarski voluhari imaju relativno veći udio žvačnog (*musculus masseter*) i sljepoočnog mišića (*musculus temporalis*) u usporedbi s glodavcima koji su svejedi, što im omogućuje generiranje većih sila ugriza potrebnih za učinkovitu obradu biljne hrane.

Dosadašnja istraživanja o morfologiji i histologiji probavnog trakta sisavaca pokazala su značajne varijacije među vrstama, ovisno o hranidbenim navikama i uvjetima okoliša (Eto i sur., 2016.; Gross i sur., 1985.; Naya, 2008.). Istraživanja su također pokazale da hranidbene razlike često dovode do adaptivnih varijacija u probavnom traktu malih sisavaca kao što su glodavci (Langer i Clauss, 2018.). Probavni sustav voluharica, sastoji se od niza organa koji se razlikuju po svojoj morfološkoj i histološkoj strukturi. Ti organi uključuju jednjak, želudac, tanko crijevo, slijepo crijevo, debelo crijevo i rektum. Svaki od tih dijelova probavne cijevi obavlja specifične funkcije koje su ključne za probavu i apsorpciju hranjivih tvari. Sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza su osnovni slojevi stijenke probavne cijevi, a njihove strukture i funkcije se značajno razlikuju ovisno o dijelu probavnog sustava (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.).

U okviru drugog dijela istraživanja, provedena je sveobuhvatna analiza morfologije i histologije probavnog sustava dinarskog voluhara te su istražene anatomske-gastrointestinalne prilagodbe povezane s njihovom hranidbom. Metode korištene u istraživanju uključuju prikupljanje uzoraka probavnog sustava uginulih jedinki, njihovu fiksaciju i histološku obradu te analizu histoloških presjeka pod svjetlosnim mikroskopom. Kvantitativna histomorfometrijska i histokemijska analiza korištena je za mjerenje debljine različitih slojeva probavne cijevi i za identifikaciju specifičnih vrsta stanica poput vrčastih stanica koje luče mucine. Statistička analiza obuhvaća utvrđivanje postotnih udjela i razlika u debljini slojeva i broja vrčastih stanica različitih organa unutar probavnog sustava. Pretpostavka je da morfološke i histološke karakteristike probavnog trakta dinarskog voluhara pokazuju specifične prilagodbe koje su rezultat njihove hranidbe i okolišnih uvjeta u kojima žive.

Istraživanje brzine probave predstavlja značajan doprinos razumijevanju probavnih procesa kod malih biljojednih sisavaca. Brzina probave kod biljojeda često varira između krute i tekuće frakcije probave, što zahtijeva upotrebu specifičnih markera za precizno mjerenje oba dijela (Udén i sur., 1980.). Korištenje fizikalnih markera, poput plastičnih trakica, omogućuje osnovno određivanje brzine probave, dok kemijski markeri, kao što su Co-EDTA i Cr-mordantizirana vlakna, pružaju detaljniji uvid u prolazak tekuće i krute frakcije kroz probavni sustav (Sakaguchi, 2003.). Ova metoda se pokazala učinkovitom u prethodnim istraživanjima na sličnim vrstama (Faichney, 1975.; Rittenhouse i sur., 1982.).

U okviru trećeg dijela istraživanja, kvantificirana je brzina probave kod dinarskog voluhara korištenjem fizikalnih i kemijskih markera. Cilj je utvrditi razlike u brzini probave ovisno o spolu životinja i tipu hranidbe. Fizikalni markeri (plastične trakice) korišteni su za osnovno mjerenje brzine probave, dok su kemijski markeri (Co-EDTA i Cr-mordantizirana vlakna) omogućili detaljnu analizu prolaska tekuće i krute frakcije kroz probavni sustav. Metoda je uključivala praćenje markera kroz probavni sustav voluhara te statističku analizu prikupljenih podataka kako bi se odredile brzine prolaska i zadržavanja probavnih frakcija. Pretpostavka je da dinarski voluhari koriste mehanizam kolonske separacije za optimizaciju probave te da brzina probave varira između krute i tekuće frakcije, ali ne pokazuje značajne razlike između spolova ili sezona.

Probava je složen proces koji uključuje mehaničke, kemijske, sekretorne i mikrobiološke reakcije, transformirajući hranu u oblik koji se može apsorbirati iz probavnog trakta u krvotok (Bornhorst i sur., 2016.). Glavne organske komponente u hrani uključuju ugljikohidrate, lipide (masti), proteine (bjelančevine) i nukleinske kiseline, koje se razgrađuju na jednostavnije jedinice prije nego što se apsorbiraju ili metaboliziraju za proizvodnju energije (Voet i sur., 2016.). Razumijevanje ovog procesa i koeficijenata probavljivosti može pružiti značajne uvide za optimizaciju hranidbe, osobito u zatočeništvu (McDonald i Warner, 1975.). Probavljivost hrane ključna je za razumijevanje kako dinarski voluhari učinkovito koriste dostupne hranidbene resurse. To se odnosi na sposobnost organizma da razgradi hranu i apsorbira hranjive tvari, što je posebno važno za biljojedne vrste koje ovise o složenim biljnim materijalima (Stevens i Hume, 1995.).

U okviru četvrtog dijela istraživanja, analizirana je probavljivost hrane kod dinarskih voluhara kako bi se razumjeli ključni čimbenici koji utječu na učinkovitost probave. Kvantificirane su različite komponente hrane, uključujući bjelančevine, masti, ugljikohidrate i vlakna, te je analiziran utjecaj spola na probavljivost. Metode su uključivale kemijske analize hranjivih tvari u hrani i fecesu, statističku analizu podataka te određivanje koeficijenata probavljivosti. Pretpostavka je da će dinarski voluhari pokazati visoke vrijednosti probavljivosti za sve ključne hranjive tvari, s razlikama ovisno o spolu.

Ove četiri teme istraživanja pružaju sveobuhvatan uvid u fiziologiju probave dinarskog voluhara. Prikupljeni podaci mogu poslužiti kao temelj za daljnja istraživanja i primjenu u zaštiti i upravljanju populacijama ove endemske vrste, kako u zatočeništu tako i u prirodi.

## 2. LITERATURNI PREGLED

### 2.1. Biološka i evolucijska obilježja vrste *Dinaromys bogdanovi*

#### 2.1.1. Filogenetski položaj unutar potporodice Arvicolinae

##### 2.1.1.1. Evolucijski razvoj potporodice Arvicolinae

Potporodica Arvicolinae (voluharice, leminzi i bizamski štakor) razvila se tijekom proteklih 5,5 milijuna godina (Bužan i sur., 2008.; Bužan i sur., 2010.). Najstariji nedvojbeni primjerci ove porodice pojavljuju se u fosilima ranog pliocena, dok su se nekoliko linija vjerojatno povezanih "mikrotidnih cricetida" pojavile kasnije, u miocenu, te su preživjele sve do pleistocena (McKenna i Bell, 1997.). Unatoč mnogim pokušajima rekonstrukcije odnosa unutar potporodice Arvicolinae, njihova filogenija ostaje i dalje sporna zbog nedostatka fosilnih dokaza i molekularnih podataka (Bužan i sur., 2008.).

Klasifikacija potporodice Arvicolinae i odnosi unutar njega prvotno su rekonstruirani usporedbom morfoloških obilježja suvremenih i izumrlih oblika; najvažniji rezultati sažeti su u nekoliko publikacija (Gromov, 1972.; Gromov i Polyakov, 1992.; Hinton, 1926.; Kretzoi, 1969.). Kako su analize kariotipa (Modi, 1987.; Zagorodnyuk, 1990.), alozima (Chaline i Graf, 1988.; Mezhzherin i sur., 1995.) i molekularne evolucije (Conroy i Cook, 1999.; Bužan i sur., 2008.; Galewski i sur., 2006.; Modi, 1996.) razvijene, modificirane su i tribusi temeljeni na novim podacima. Sveobuhvatna analiza potporodice otkrila je nekoliko dobro definiranih tribusa (Myodini, Langurini, Ellobiusini, Arvicolini), koja se pojavljuju u svim klasifikacijama (Gromov, 1972.; Gromov i Polyakov, 1992.; Martin i sur., 2000.; McKenna i Bell, 1997.; Musser i Carleton, 2005.; Shenbrot i Krasnov, 2005.).

Međutim, odnosi između tribusa i vrijeme njihove divergencije još uvijek su nejasni. Rekonstrukcija evolucije i odnosa brzo evoluirajuće skupine na temelju morfoloških obilježja moguća je samo do određene mjere, čak i kada postoje mnogi fosili. To je zato što je dostupno samo nekoliko obilježja za usporedbu suvremenih vrsta s izumrlim oblicima (koji su uglavnom zastupljeni zubima i fragmentima lubanje), i zato što su multiple reverzije i homoplazije vjerojatne u evoluciji morfoloških obilježja (Bužan i sur., 2008.; Abramson i sur., 2021.).

Širenje potporodice Arvicolinae bilo je uvjetovano geografskim barijerama i klimatskim uvjetima (Chaline i sur., 1999.; Feldhamer i sur., 2007.). Danas su predstavnici ove porodice rasprostranjeni od Arktičkog oceana na sjeveru do subtropske zone na jugu (Carleton i Musser, 1984.). Raznolikost vrsta u potporodici proizlazi iz tri glavna impulsa širenja - prvi tijekom



kasnog miocena kada su nastali različiti rodovi, drugi od kasnog miocena prema ranom pliocenu, kada se dogodila divergencija predaka današnjih Myodina. Myodini su divergirali od zajedničke grane Arvicolinae nakon prve (bazalne) radijacije, ali prije radijacije Lagurini/Ellobiusini/Arvicolini (Chaline i sur., 1999.; Conroy i Cook, 1999.; Musser i Carleton, 2005.).

Treći impuls širenja dogodio se tijekom ranog pliocena kada su Lagurini i Arvicolini postali glavni evolucijski put potporodice, postupno se prilagođavajući konzumiranju vegetativnih dijelova biljaka i kolonizirajući livade (Arvicolini) i stepe (Lagurini). Ellobiusini pružaju izniman primjer brzih evolucijskih promjena povezanih s prilagodbom podzemnom životu. U razdoblju od otprilike 10 milijuna godina, članovi ove potporodice razvili su se u 140 linija unutar 37 rodova; 151 recentna vrsta sada je raspoređena u 28 rodova (Chaline i sur., 1999.; Feldhamer i sur., 2007.).

Karika hipotetskog zajedničkog pretka rodova *Prometheomys* i *Dinaromys* nedostaje u istraživanjima, iako se pretpostavlja da bi se najraniji fosili te karike mogli povezati s današnjim vrstama (Bužan i sur., 2008.).

#### 2.1.1.2. Ekološke karakteristike potporodice Arvicolinae

U istraživanju paleoekologije, paleoklime, paleogeografije i evolucije, voluharice često služe kao ključni indikatori, s obzirom na brojna otkrića fosila i arheoloških nalaza (Chaline i sur., 1999.). Arvicolinae su velika potporodica hrčkolikih glodavaca koji su jednoliki po izgledu, ali raznoliki po svojim navikama, a čine ih leminzi, voluharice i bizamski štakor.

Ključna razlika između voluharica i leminga je u smještaju i veličini donjih sjekutića; voluharice imaju duže donje sjekutiće postavljene dijagonalno od jezika prema usnama, između korijena drugog i trećeg kutnjaka, što ih čini sličnijima hrčcima, dok su sjekutići leminga kraći (Chaline i sur., 1999.). Sjekutići voluharica mogu biti ortodontni, pistodontni ili protodontni, dok kutnjaci mogu biti ukorijenjeni ili stalno rastući (Carleton i Musser, 1984.; Nowak, 1999.).

Veličina tijela pripadnika potporodice Arvicolinae varira od 70 mm do preko 300 mm, s zdepastim tijelom, malim zaobljenim ušima, kratkim nogama i tupom njuškom. Masa se obično kreće između 15 g i 1,8 kg, a duljina repa uvijek je kraća od duljine tijela s glavom, varirajući

od 5 do 295 mm. Gustoća krzna varira u boji i teksturi ovisno o sezoni, često u nijansama smeđe i sive, koja s trbušne strane prelazi u svjetliju nijansu (ADW, 2024.).

Voluharice grade gnijezda ispod zemlje, u pukotinama stabala i grana, te često skladište hranu za kasniju upotrebu tijekom perioda manjka hrane (Nowak, 1999.). Socijalne karakteristike obuhvaćaju različite tipove ponašanja, od solitarnog i agresivnog do teritorijalnog, društvenog i kolonijalnog (Carleton i Musser, 1984.; Nowak, 1999.). Neki su izrazito vokalni, često se oglašavajući u slučaju uzbune ili tijekom kontakta s jedinkama iste vrste (Nowak, 1999.).

Naseljavaju raznolika, većinom kopnena staništa na površini zemlje, s nekoliko izuzetaka među vrstama koje su akvatične, arborealne ili fosorijalne (Feldhamer i sur., 2007.). Neke vrste grade složene sustave tunela pod zemljom, kroz travu ili ispod snijega (Nowak, 1999.). Većina ih je aktivna i danju i noću, s time da su neke vrste aktivnije noću, dok nekoliko njih pokazuje isključivo dnevnu aktivnost. Vrste koje se hrane sjemenkama i kukcima često su noćne, dok se vrste koje jedu zelene dijelove biljaka izmjenjuju između hranjenja i odmora tijekom cijelog dana i noći. One su plijen mnogim malim grabežljivcima poput jastreba, sova, zmija i manjih mesojednih sisavaca (Carleton i Musser, 1984.; Nowak, 1999.).

Voluharice pripadaju R-selekcijском tipu, što podrazumijeva brzu izmjenu generacija, kratak životni vijek te rano postizanje spolne zrelosti. Iako većina vrsta unutar ove potporodice prakticira promiskuitetno ponašanje, postoje i iznimke u kojima monogamni parovi zajednički brinu o potomstvu. Parenje kod mnogih vrsta može se odvijati tijekom cijele godine, dok se kod drugih parovi formiraju samo tijekom toplijih mjeseci, od proljeća do jeseni. Voluharice su poznate po svom visokom reproduktivnom kapacitetu, stvarajući gusto naseljene populacije koje su ključne za opstanak mnogih grabežljivaca koji ih koriste kao izvor hrane (ADW, 2024.).

Rod *Microtus* može imati legla od čak 17 mladunaca, iako je prosječna veličina legla većine vrsta mnogo manja, obično između 3 i 7 mladunaca. Mladi dolaze na svijet slijepi i bez dlake, a većina vrsta postiže spolnu zrelost već nakon mjesec dana života (Grzimek, 1990.). Mnoge vrste voluharica pare se samo nekoliko sati nakon okota, što znači da se brinu za mlade dok su istovremeno opet gravidne (Grzimek, 1990.). Gestacija nakon implantacije embrija traje od 16 do 30 dana. Većina vrsta obično ima dva legla godišnje, iako su neke vrste u mogućnosti podići četiri ili više legla (Wilson i sur., 2017.). U divljini, voluharice obično žive samo nekoliko mjeseci, dok u zatočeništvu mogu doživjeti nekoliko godina (Gruder-Adams i Getz, 1985.).

Potporodica Arvicolinae predstavlja značajnu skupinu glodavaca, koja naseljava prostrana staništa tundre te šumska i stepska područja sjeverne hemisfere u velikim populacijama (Shenbrot i Krasnov, 2005.). Glodavci iz potporodice Arvicolinae pokazuju iznimnu raznolikost vrsta i plodnost, čineći ih izuzetno uspješnom skupinom u procesu evolucije (Chaline i Main, 1979.).

## 2.1.2. Dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*)

### 2.1.2.1. Sistematika i evolucija

Dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*) (V. et E. Martino, 1922.) (eng. *Balkan Snow Vole* ili *Martino's Snow Vole*), maleni je biljojed iz potporodice Arvicolinae (Slika 1.).



Slika 1. Dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*). Preuzeto iz arhive Zoološkog vrta Grada Zagreba.

Prvi put je opisan 1922. godine kao vrsta roda snježnih voluharica (*Chionomys*), no ubrzo nakon toga je prebačen u rod *Dolomys*. Tek 1955. godine dobio je status novog zasebnog roda *Dinaromys* (Bužan i sur., 2008.). Klasifikacija vrste je prikazana u Tablici 1.

Tablica 1. Klasifikacija dinarskog voluhara (Kryštufek, 2018.)

Sistematska kategorija	Naziv
Carstvo	Animalia
Koljeno	Chordata
Potkoljeno	Vertebrata
Razred	Mammalia
Red	Rodentia
Porodica	Cricetidae
Potporodica	Arvicolinae
Rod	<i>Dinaromys</i>
Vrsta	<i>Dinaromys bogdanovi</i> , dinarski voluhar

Dinarski voluhar jedini je preživjeli predstavnik linije *Pliomys*, starog roda potporodice Arvicolinae koji se razvio neovisno o ostalim živućim voluharicama i leminzima tijekom kasnog miocena. Također je jedini živući predstavnik tercijarnog roda *Dinaromys*, dok se iz fosilnih nalaza iz pliocena poznaju još dvije izumrle vrste ovog roda (*D. allegranzii* i *D. dalmatinus*), što sugerira spor tempo evolucije (Kryštufek i Bužan, 2008.). Postoje podaci o unutarnjem strukturiranju vrste dinarskog voluhara prema tradicionalnoj taksonomiji koja uvjetno prepoznaje sedam podvrsta (Petrov i Todorović, 1982.). Važno je napomenuti da su ove podvrste temeljene na malim razlikama u boji i morfometriji (Kryštufek i sur., 2007.).

#### 2.1.2.2. Filogenetika i rasprostranjenost

Analizom mitohondrijskog gena citokrom b utvrđena je povezanost roda *Dinaromys* s monospecifičnim rodом *Prometheomys*, endemičnim za područje Kavkaza (Bužan i sur., 2008.). Prema procjenama, ovi rodovi su se razdvojili prije 6,2 milijuna godina, što se podudara s ranom diverzifikacijom potporodice Arvicolinae (Kryštufek i Bužan, 2008.). Od 2005. godine, rod *Dinaromys* svrstava se u tribus Pliomyini, ponekad zajedno s tribusom Protheomyini, čiji je trenutno jedini predstavnik (Bužan i sur., 2008.).

Analiza temeljena na mitohondrijskom genu citokrom b ukazuje na tri vrlo divergentne alopatrijske filogeografske linije: sjeverozapadnu (NW), centralnu (C) i jugoistočnu (SE) liniju, sugerirajući postojanje tri odvojena središta iz perioda glacijala unutar Zapadnog Balkana (Kryštufek i Bužan, 2008.; Kryštufek i sur., 2007.). Ove rezultate potvrđuju i morfološke razlike u lubanjama ovih triju linija. Primarne razlike uključuju veličinu uha, foramen magnuma, duljinu incizivnog foramena i širinu rotera (Kryštufek i sur., 2012.). Raznolikost haplotipova opada od sjeverozapadne linije prema centralnoj i zatim prema jugoistočnoj liniji, u skladu s

postupnim širenjem. Distribucija haplotipova ne pokazuje geografsko preklapanje, što potvrđuje da linije potječu od alopatrijske (geografske) fragmentacije (Kryštufek i sur., 2007.).

Promjene u ciklusima glacijala i interglacijala imale su utjecaj na raznolikost unutar vrste. Tijekom interglacijalnih razdoblja, poboljšanje klimatskih uvjeta omogućilo je širenje šuma, što je rezultiralo fragmentacijom populacija vezanih uz otvorena staništa. Takve izolirane populacije opstale su u glacijalnim refugijima gdje su se diferencirale genskim driftom, a možda i selekcijom (Bilton i sur., 1998.; Kryštufek i sur., 2007.).

Iako su tri glavne linije ostale izolirane tijekom razdoblja potencijalnog međusobnog miješanja populacija, postoje dokazi o uzastopnim izolacijama i ponovnim kontaktima unutar svake linije. Takve povijesno izolirane populacije, koje su se razvijale neovisno, predstavljaju evolucijski značajne jedinice (eng. *evolutionary significant units*, ESUs) koje igraju ključnu ulogu u očuvanju unutarvrstne raznolikosti (Kryštufek i sur., 2007.).

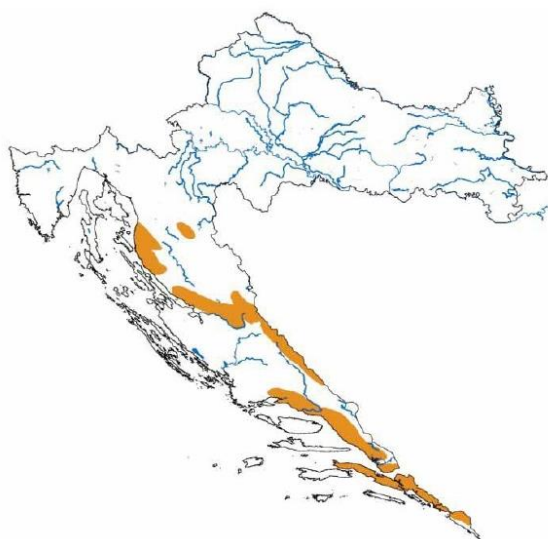
Topografske varijacije na Balkanskom poluotoku pružile su povoljan okoliš za promjene u visini potaknute klimatskim promjenama tijekom glacijalnih i interglacijalnih perioda. Ova dinamika rezultirala je manjom brzinom izumiranja i stvaranjem novih vrsta u ekološki stabilnom okolišu. Takvi uvjeti također su doprinijeli alopatrijskoj izolaciji u manjoj mjeri (Kryštufek i sur., 2007.). Prema paleontološkim nalazima, područje rasprostranjenosti dinarskog voluhara u prošlosti bilo je veće nego što je danas (Bužan i sur., 2010.), uglavnom obuhvaćajući sjeverni Jadran i zapadni dio Balkana (Kryštufek i Bužan, 2008.).

Dinarski voluhar je endemičan za područje Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Srbije, Crne Gore i zapadne Makedonije. Potencijalno područje distribucije uključuje i Albaniju (Bego i sur., 2008.; Kryštufek i Bužan, 2008.) te vjerojatno i sjevernu Grčku, iako trenutno nema konkretnih dokaza za to (Kryštufek i Bužan, 2008.). Unatoč ukupnoj površini rasprostranjenosti (više od 40 000 km<sup>2</sup>), stvarni teritorij koji ova vrsta pokriva s obzirom na specifične zahtjeve za staništem procjenjuje se na svega 5 200 km<sup>2</sup>. Posebno zabrinjavajuća je sjeverozapadna linija, čija je rasprostranjenost vrlo ograničena (manje od 2 000 km<sup>2</sup>; Kryštufek i Bužan, 2008.), i visoko fragmentirana; poznato je samo 17 lokaliteta duž otprilike 300 km planinskog lanca Dinarida (Kryštufek i sur., 2007.). Pretpostavljeni areal dinarskog voluhara na zapadnom Balkanu prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Pretpostavljena rasprostranjenost dinarskog voluhara na području zapadnog Balkana. Preuzeto iz Kryštufek, 2018.

U Hrvatskoj, ova vrsta je evidentirana u području od Gornje Klade, Babrovače i Zavižana kraj Jurjeva na Velebitu i Vrhovina na Maloj Kapeli, preko Dinare, Kozjaka i Biokova, pa sve do Sniježnice u Konavlima (Kryštufek i Tvrković, 1988.; Antolović i sur., 2006.), dok na otocima nije zabilježena. Na slici je prikazana rasprostranjenost dinarskog voluhara na prostoru Republike Hrvatske (Slika 3.).



Slika 3. Rasprostranjenost dinarskog voluhara u Republici Hrvatskoj. Preuzeto iz Antolović i sur., 2006.

### 2.1.2.3. Stanište i ekološka niša

Dinarski voluhar preferira specifična staništa, prvenstveno krške tipove bez obzira na nadmorsku visinu (Kryštufek i Tvrković, 1988.). Ova vrsta je usko vezana uz krševiti reljef,

uključujući škrape, jame, ulaze u špilje, te pukotine na liticama (Kryštufek i Bužan, 2008.); čak su zabilježeni primjerci na dubini od 70 metara u nekim jamama (Antolović i sur., 2006.). Osim toga, može se pojaviti na otvorenim livadama, kamenim zaravnima, te u podzemnim staništima, ali samo kada je prisutan krški element, izbjegavajući pritom šumska područja (Bužan i sur., 2010.). Dinarski voluhar je visinski generalist, zabilježen na nadmorskim visinama manjim od 50 m pa sve do 2200 metara, pri čemu većina nalaza potječe sa staništa iznad 1400 metara, dok je manji broj nalaza zabilježen ispod 1000 metara (Bužan i sur., 2010.).

Nalazi ove vrste gotovo isključivo potječu s područja vapnenačkih stijena (Kryštufek i Bužan, 2008.). Jedina iznimka su planina Karadžica i planina Jablanica, gdje su primjerci prikupljeni između kamenih blokova nepropusnih metamorfnih stijena. U Dinaridima, gdje se većina populacije ove voluharice nalazi, stijene su pretežito čisti karbonat s tek nekoliko neotopljenih ostataka drugih materijala koji su ostali nakon procesa okršavanja odnosno erozije vapnenačkih stijena koje se događa pod utjecajem vode (Kryštufek i Bužan, 2008.).

Specifični zahtjevi za staništem mogli bi objasniti prisutnost malih i često izoliranih populacija, odnosno metapopulacija (Kryštufek i Bužan, 2008.; Kryštufek i sur., 2007.). U područjima gdje prevladavaju neprikladna staništa, dinarski voluhar naseljava samo odabrane fragmente (Bužan i sur., 2010.). Protok gena između populacija je ograničen, iako nema vidljivih promjena koje bi utjecale na propadanje koridora kretanja koji povezuju pogodna staništa (Bužan i sur., 2010.).

#### 2.1.2.4. Biologija vrste

Duljina tijela i glave ove vrste varira između 13 i 15 centimetara, dok rep, čineći gotovo polovicu duljine tijela, doseže 6 do 7,5 cm. Tijelo je prekriveno gustom i mekom dlakom, s leđnom stranom u nijansama sive do smeđe-sive boje, dok je trbušni dio svjetlije sive nijanse. Noge su snažne i bijelo obojene, dok je rep obično tamnosmeđ ili siv s gornje strane, a bijel s donje strane. Uši su velike i blago dlakave, dok su dlanovi i stopala goli, osim oko peta. Palac ima malu spljoštenu nokatnu ploču, dok ostali prsti imaju kratke i oštre kandže, jednake duljine na prednjim i stražnjim nogama. Za orijentaciju u prostoru koristi se širokom lepezom osjetilnih dlaka (*vibrissa*) prosječne duljine 6 cm (Grzimek, 1990.). Nema vidljivog spolnog dimorfizma u izgledu i masi, te su mužjaci i ženke jednako veliki, s masom koja se kreće od 68 do 84 g (Kryštufek i Tvrčković, 1988.).

Dinarski voluhar se kreće hodanjem, trčanjem, skakanjem, penjanjem. Penje se i po stijenama, uključujući i one vrlo strme, te ga se primjećuje kako boravi u grmlju i drveću. Aktivan je pretežito noću i u sumrak, a rijetko tijekom dana. U centralnoj Bosni, samo 15% ulova zabilježeno je tijekom dana, dok je preostalih 85% zabilježeno noću (Wilson i sur., 2017.).

Za razliku od drugih pripadnika potporodice Arvicolinae, dinarski voluhar ima karakteristike K-selekcijskog tipa. Razmnožava se tijekom cijele godine s vrhuncem reprodukcije od ožujka do kasnog listopada. Ženke dostižu spolnu zrelost u drugoj godini života te donose najviše 2 legla godišnje. Gestacija traje otprilike 30 dana, a broj mladih u leglu varira od 1 do 4 (prosječno 2,3) (Kryštufek i Bužan, 2008.). Očekivano trajanje života je do 36 mjeseci. Mladi se obično rađaju od ožujka do kraja kolovoza, s minimalnim razmakom u razmnožavanju od četiri mjeseca (Kryštufek i sur., 2000.). Gnijezda u prirodi obično se grade ispod blokova stijena i u manjim špiljama (Antolović i sur., 2006.). Pronalasci gnijezda su rijetki. Jedan od malobrojnih primjera je gnijezdo izrađeno od trave promjera otprilike 20 cm, pronađeno na Bjelašnici (Petrov i Todorović, 1982.).

Dinarski voluhari su biljojedi. Hrane se raznovrsnim vrstama biljaka, uključujući mlado lišće bukve, grančice jele, trave i ljekovito bilje (Antolović i sur., 2006). Vrste biljaka koje dinarski voluhari konzumiraju istražene su putem analize sadržaja želuca, pregledom pronađenih skladišta hrane te promatranjem ponašanja životinja. Među zabilježenim biljkama nalaze se: ovčja vlasulja (*Festuca ovina*), pirika (*Agropyron repens*), dvorednodlakava čestoslavica (*Veronica chamaedry*), udovčica (*Scabiosa leucophylla*), glavatka (*Cephalaria* sp.), obična sunčanica (*Helianthemum vulgare*), petoprsta (*Potentilla* sp.), broćika (*Galium* sp.), kozlačica (*Thalictrum* sp.), šumski kopitnjak (*Asarum europaeum*), šumski pavlovac (*Aremonia agrimonoides*), alpska kamenica (*Arabis alpina*), poljski slak (*Convolvulus arvensis*), puzava ivica (*Ajuga reptans*) i druge. Osim toga, utvrđeno je da dinarski voluhar konzumira drvenaste biljke poput bukve (*Fagus sylvatica*) i četinjača kao što je jela (*Abies alba*) (Petrov i Todorović, 1982.). Također je poznato da skladište hranu za zimu (Grzimek, 1990.). Skladišta hrane su otkrivena čak i u snježnicama (Antolović i sur., 2006.). Prilikom istraživanja količine i vrsta hrane koju konzumira u zatočeništvu, otkriveno je da dinarski voluhar tijekom zime jede manje količine hrane u usporedbi s ljetom te pokazuje preferenciju prema određenim vrstama hrane (Ivić, 2017.; Katanović, 2013.; Rezo, 2014.).



Plijen su mnogobrojnim malim grabežljivcima kao što su lasica (*Mustela nivalis*), kuna bjelica (*Martes foina*) i poskok (*Vipera ammodytes*) (Antolović i sur., 2006.).

#### 2.1.2.5. Stupanj ugroženosti i mjere zaštite

Prema zaključcima Bužan i sur. (2010.), kao i istraživanju od Kryštufek i Bužan (2008.), snježna voluharica (*Chionomys nivalis*) mogla bi predstavljati potencijalnog konkurenta dinarskom voluharu. Ove dvije vrste dijele sličnu morfologiju i vjerojatno preferiraju isti tip staništa (Kryštufek i Bužan, 2008.). Ipak, snježna voluharica koristi drugačiju životnu strategiju, budući da spada u vrstu R-selekcijskog tipa. Suživot obje vrste i preklapanje područja rasprostranjenosti mogu rezultirati isključivanjem dinarskog voluhara (Antolović i sur., 2006.). S druge strane, postoje zapisi o dinarskom voluharu u suživotu s drugim filogenetski daljim vrstama, poput *Apodemus epimelas* i *Eliomys quercinus*, kako navode Kryštufek i Tvrković (1988.). Staništa dinarskog voluhara uglavnom su teško dostupna, što eliminira potencijalni direktni utjecaj čovjeka (Kryštufek i Bužan, 2008.).

Unatoč većem naglasku na ugroženosti velikih sisavaca, mali sisavci također su izuzetno podložni izumiranju. Primjerice, glodavci su prednjačili u izumiranju tijekom posljednjih 400 godina, što ih čini ugroženijom skupinom od većih sisavaca (Kryštufek i sur., 2009.). Balkanski poluotok se izdvaja kao područje s velikim brojem endemskih vrsta glodavaca, iako su mnoge od tih vrsta nedovoljno istražene, što otežava njihovu valjanu zaštitu (Amori i Gippolitti, 2003.). Unatoč svojoj ključnoj ulozi u ekosustavu, mali sisavci često nisu smatrani ugroženima zbog nedostatka taksonomskih informacija i informacija o statusu populacija (Amori i Gippoliti, 2003.; Gippoliti i Amori, 2007.; Kryštufek i sur., 2009.).

Dinarski voluhar kategoriziran je kao nedovoljno poznata i vjerojatno ugrožena (DD – data deficient) vrsta u Crvenoj knjizi sisavaca Hrvatske (Antolović i sur., 2006.) i kao osjetljiva vrsta prema IUCN-ovom Crvenom popisu (VU – vulnerable; Kryštufek, 2018.). Prema Rabinowitzovom modelu "sedam oblika rijetkosti", dinarski voluhar zadovoljava kriterije rijetkosti zbog ograničene rasprostranjenosti, specifičnog staništa i malih, izoliranih populacija koje se suočavaju s kontinuiranim opadanjem veličine teritorija (Bužan i sur., 2010.; Kryštufek i sur., 2007.). Genska kriptička raznolikost ove vrste na maloj geografskoj skali dodatno potvrđuje važnost Balkana kao "vruće točke" bioraznolikosti (Kryštufek i sur., 2007.). Nedostatak informacija o biologiji i potencijalnim prijetnjama, zajedno s filogenetskim

karakteristikama i osjetljivošću na izumiranje, ukazuje na potrebu za dugoročnim monitoringom populacija dinarskog voluhara (Kryštufek i Bužan, 2008.).

## 2.2. Probavni sustav i probava

### 2.2.1. Funkcionalna anatomija žvačnog sustava

Mali biljojedni sisavci prilagođavaju se hranidbi biljkama kroz različite promjene u probavnom sustavu, koje mogu uključivati povećanje njegovog kapaciteta (Batzli i Cole, 1979.) ili strukturne prilagodbe probavnog trakta (Björnhag, 1987.). Iako se u prošlosti malo pažnje posvećivalo zubima i pripadajućoj muskulaturi koja ih pokreće, novija istraživanja potvrđuju njihovu ključnu ulogu u probavi, evoluciji i ekologiji sisavaca (Bezzobs i Sanson, 1997.).

Raznovrsnost oblika zuba kod sisavaca omogućila je prilagodbu različitim hranidbenim potrebama, što je poboljšalo efikasnost probave i povećalo šanse za preživljavanje u različitim ekološkim nišama (Butler, 1983.; Kavanagh i sur., 2007.). Nadalje, razvoj visokokrunastih zuba (hipsodontizam) nije samo prilagodba na konzumaciju trave, već je povezan i s obradom drugih grubih biljnih materijala (Strömberg, 2006.; Ungar, 2015.). Dodatno, muskulatura koja podržava rad zuba ima ključnu ulogu u omogućavanju sisavcima da koriste različite izvore hrane, što je bio značajan čimbenik u njihovom evolucijskom uspjehu i sposobnosti da se prilagode različitim ekološkim uvjetima (Butler, 1983.; Ungar, 2015.).

Žvakanje je ključna funkcija kod sisavaca, koja ih razlikuje od drugih skupina kralješnjaka po načinu obrade hrane (Cox i Jeffery, 2011.). Obrada hrane započinje u ustima, gdje se inicira kemijsko i mehaničko razlaganje. Osnovna karakteristika žvačnog sustava sisavaca uključuje razvijenu opskrbu slinom i raznoliku denticiju koja služi različitim funkcijama kao što su hvatanje hrane prednjim zubima i temeljitu obradu kutnjacima. Da bi zubalo učinkovito obavljalo svoju funkciju, potrebno je zajedničko djelovanje s mekim tkivima usne šupljine, poput jezika, usana i obraza (Turnbull, 1970.).

Kako bi učinkovito usitnili hranu, sisavci su razvili složen sustav žvačnih mišića (Turnbull, 1970.). Žvačna muskulatura sisavaca sastoji se od četiri glavne skupine mišića: sljepoočni mišić (*musculus temporalis*), žvačni mišić (*musculus masseter*), krilasti mišić (*musculus pterygoideus*) i dvotrbušasti mišić (*musculus digastricus*). *Musculus temporalis* se proteže od temporalne regije lubanje straga do orbite i koronoidnog nastavka mandibule. *Musculus masseter* pruža se od zigomatičnog luka i pričvršćuje se na ventrolateralnu površinu ramusa

mandibule. *Musculi pterygoidei* se protežu između pterigoidne regije ventralno od orbite i ventromedijalne površine mandibule. *Musculus digastricus* se nalazi ispod mandibule i sastoji se od dva trbuha povezana tetivom: anteriorni trbuh pričvršćen je na donju površinu mandibule, dok je posteriorni trbuh pričvršćen na mastoidni nastavak temporalne kosti (Becht, 1954.; Herring, 2007.).

*Musculus temporalis* i *m. masseter* su skupni mišići koji se mogu dalje podijeliti u različite podjedinice. *Musculus temporalis* se sastoji od tri podjedinice: prednji (anteriorni) dio (*pars anterior*), koji je odgovoran za povlačenje mandibule prema gore; srednji (medijalni) dio (*pars medialis/suprazygomatica*), koji povlači mandibulu unazad; stražnji (posteriorni) dio (*pars posterior*), koji povlači mandibulu unazad i prema gore.

*Musculus masseter* se također sastoji od tri podjedinice: površinski (superficialni) dio (*pars superficialis*), koji se proteže od zigomatičnog luka do ramusa mandibule i igra ključnu ulogu u podizanju mandibule; srednji dio (*pars medialis*), koji se nalazi između površinskog i dubokog dijela i sudjeluje u podizanju mandibule; duboki dio (*pars profundus*), koji se proteže od zigomatičnog luka do ramusa mandibule, pomaže u podizanju i stabilizaciji mandibule (Becht, 1954.; Herring, 2007.). Za zatvaranje čeljusti služe mišići *m. temporalis* i *m. masseter*, dok je mišić *m. digastricus* ključan za otvaranje čeljusti (Herring, 2007.).

Relativni omjeri ovih mišića variraju među sisavcima na način koji je povezan s njihovom hranidbom i načinom obrade hrane, kao što su žvakanje, grizenje ili gutanje. Mesojedi pokazuju raspored u kojem je *m. temporalis* značajno veći od *m. masseter* i *m. pterygoidei* (Maynard i Savage, 1959.). *Musculus temporalis* ima snažnu liniju djelovanja, što omogućuje mesojedima snažan ugriz. Također, *m. masseter (pars profundus)* im dopušta široko otvaranje usta i gutanje velikih komada hrane (Becht, 1954.).

Suprotno tome, biljojedi pokazuju konfiguraciju povećanih *m. masseter* i *m. pterygoidei* te smanjen *m. temporalis* (Turnbull, 1970.). *Musculus masseter* se kod biljojeda proteže dalje prema naprijed i može tako djelovati kao poluga drugog reda te izvršavati značajan žvačni pritisak na kutnjake što daje očitu prednost kod drobljenja biljnog materijala. Nadalje, složena, slojevita priroda *m. massetera* i otvorena morfologija temporomandibularnog zgloba omogućuju mediolateralna i anteroposteriorna kretanja donje čeljusti (Maynard i Savage, 1959.).

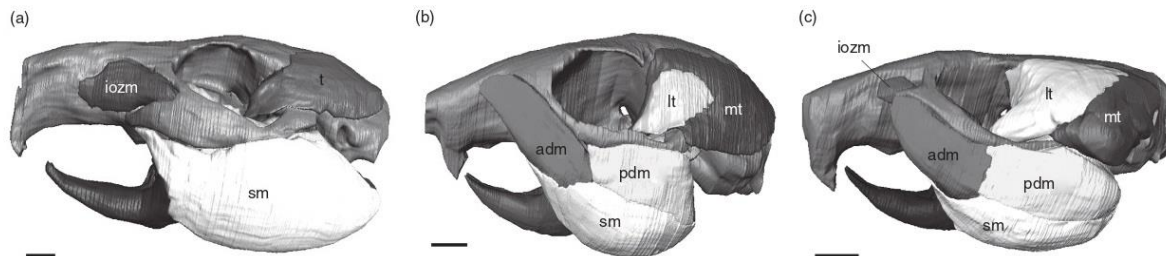
### 2.2.1.1. Građa žvačnog sustava kod glodavaca

Glodavci su poznati po svojoj visoko specijaliziranoj anatomiji žvačnog sustava. Ono što ih posebno definira je izrazito uvećani par sjekutića s otvorenim korijenima, koji su prisutni u gornjoj i donjoj čeljusti te koji neprekidno rastu tijekom života (Nowak, 1999.). Konstrukcija sjekutića, s caklinom na bukalnoj površini i dentinom na jezičnoj, uzrokuje diferencijalno trošenje vanjskih i unutarnjih površina, što rezultira samooštrenjem tijekom žvakanja. Kutnjaci su uglavnom sastavljeni od dentina (Nowak, 1999.) i odvojeni su od sjekutića velikom dijastemom uzrokovanom gubitkom očnjaka i prednjih kutnjaka (Meng i Wyss, 2005.). Međutim, u nekim skupinama glodavaca zub identificiran kao prvi kutnjak zapravo može biti mliječni pretkutnjak, dok je trajni pretkutnjak potisnut (Wilson, 1956.; Lechleitner, 1958.).

Specijalizacija zubi omogućuje glodavcima da se hrane na dva različita načina: ili se sjekutići nalik na dljetu mogu spojiti u grickanju (Druziński i sur., 2011.); ili kutnjaci mogu biti brušeni jedan o drugog, u nizu mediolateralnih i/ili anteroposteriornih pokreta, što rezultira žvakanjem (Becht, 1954.; Byrd, 1981.; Gorniak, 1977.; Maynard i Savage, 1959.). Međutim, zbog razlike u duljini lubanje i donje čeljusti, ovi zubi ne mogu biti u kontaktu istovremeno (Hiimäe i Ardran, 1968.). Da bi sjekutići bili u okluziji, donja čeljust mora biti izbačena, dok za poravnavanje kutnjaka za žvakanje, donja čeljust mora biti povučena (Turnbull, 1970.). Glodavci koji se uglavnom hrane sjemenkama i orašastim plodovima (sjemenojedi) obično koriste sjekutiće prilikom hranjenja, što rezultira jačim silama ugriza na tim zubima. S druge strane, glodavci koji se hrane listovima biljaka (najčešće u literaturi referirani kao biljojedi) uglavnom koriste kutnjake prilikom hranjenja, te obično imaju slabije sile ugriza na sjekutićima (Cox i sur., 2012.; Maestri i sur., 2016.).

Da bi se mogla nositi s ovakvim zahtjevima, žvačna muskulatura glodavaca postala je visokospecijalizirana (Becht, 1954.; Hiimäe i Ardran, 1968.). *Musculus masseter* je dominantni mišić za zatvaranje čeljusti, koji čini između 60 i 80% žvačne muskulature (Turnbull, 1970.), i podijeljen je u tri sloja kod glodavaca: površinski maseter (*masseter pars lateralis/superficialis*), duboki maseter (*masseter pars profundus*) i zigomatično-čeljusni (*masseter pars medialis*) (Cox i Jeffery, 2011.; Druziński i sur., 2011.; Wood, 1965.). *Musculus masseter (pars lateralis/superficialis)* je smješten prema prednjem dijelu čeljusti, gdje omogućuje generiranje snažnih sila kako na sjekutićima, tako i na kutnjacima. Međutim, važno je napomenuti da neke vrste glodavaca i dalje održavaju relativno veliki *m. temporalis*, koji može činiti 30% ili više ukupne mase žvačne muskulature (Druziński, 2010.).

Visoko specijalizirana žvačna struktura glodavaca nije samo vrlo različita od one kod drugih sisavaca; također pokazuje veliku varijaciju unutar samog reda. Naime, morfologija *m. masseter* povijesno se koristila kao osnova za klasifikaciju glodavaca u tri glavne skupine: sciuromorfe, histrikomorfe i miomorfe (Brandt, 1855.; Hautier i sur., 2015.; Simpson, 1945.; Tullberg, 1899.; Waterhouse, 1839.; Wood, 1965.) (Slika 4.).



Slika 4. Lubanja, mandibula i žvačni mišići (a) zamorca, (b) vjeverice i (c) štakora, digitalno rekonstruirani iz kontrastno poboljšanih mikroCT skenova. **adm**, *m. masseter profundus anterior*; **iozm**, *m. zygomaticomandibularis pars infraorbitalis* (*m. masseter anterior*); **lt**, *m. temporalis pars anterior*; **mt**, *m. temporalis pars posterior*; **pdm**, *m. masseter profundus posterior*; **sm**, *m. masseter superficialis*; **t**, *m. temporalis pars suprazygomatica*. Mjerilo = 10 mm. Preuzeto i prilagođeno iz Cox i Jeffery, 2011.

Među ovim morfotipovima, ustanovljeno je da sciuromorfi, poput vjeverica, imaju veliki površinski mišić *m. masseter superficialis* koji se proteže prema prednjem dijelu lubanje (rostrumu), što je povezano s promjenama u strukturi kutnjaka mandibule (Korth, 2001.; Wood, 1965.). Ove promjene poboljšavaju sposobnosti grickanja sciuromorfnih glodavaca (Cox i sur., 2012.; Druziński, 2010.), omogućujući im jače ugrize u usporedbi s drugim glodavcima. S druge strane, histrikomorfi su specijalizirani za žvakanje. Morfološka specijalizacija uključuje povećanje mišića *masseter medialis*, koji prolazi kroz infraorbitalni otvor (značajno ga povećavajući) i veže se za rostrum (Korth, 2001.; Wood, 1965.). Takva konfiguracija omogućuje učinkovitije hranjenje s kutnjacima (Cox i sur., 2012.; Hautier i sur., 2011.).

Histrikomorfni glodavci hrane se uglavnom vegetacijom, a većina strogo biljojednih glodavaca ima ovaj morfotip; s druge strane, sciuromorfnih glodavci jedu prvenstveno sjemenke i orašaste plodove, zbog čega su sjemenojedi (Maestri i sur., 2016.). Na kraju, štakori i miševi, članovi vrlo uspješne skupine Muroidea koja čini više od polovice svih vrsta glodavaca, pokazuju mioformno stanje. Ovo stanje uključuje promjene i proširenja oba mišića *masseter medialis* i *superficialis*, učinkovito kombinirajući karakteristike sciuromorfne i histrikomorfne stanja

(Korth, 2001.; Wood, 1965.). Miomorfija se smatra kompromisom između specijalizacija za grickanje i žvakanje što ih čini "visokoeffikasnim generalistima", koji nadmašuju i sciuriformne i histrikomorfne glodavce u njihovim specijalizacijama (Cox i sur., 2012.; Maestri i sur., 2016.).

Iako se takvi nazivi i dalje široko koriste kao pojmovi za opis morfologije muskulature i lubanje, sada je jasno da se svaka konfiguracija mišića razvila nekoliko puta neovisno kod glodavaca i, kao takva, ne može se koristiti za pružanje čvrstog filogenetskog okvira za ovaj red (Wood, 1965.).

#### 2.2.1.2. Trofička niša i žvačni sustav

Jedan od osnovnih principa evolucije putem prirodne selekcije je da se vrste natječu za resurse (Darwin, 1859.), što potiče evoluciju različitih karakteristika, uključujući morfologiju i životni ciklus (Lack, 1947.). Kada se susretnu vrste sličnih ekoloških zahtjeva, mogu se primijetiti promjene u njihovim karakteristikama (Adams i sur., 2011.; Lack, 1947.). Zbog važnosti konkurencije, svaka osobina koja omogućava korištenje različitih, novih ili neiskorištenih resursa bit će pod snažnim selekcijskim pritiskom.

Raznolikost žvačnog aparata kod sisavaca, uključujući prilagodbe žvačnih mišića i pripadajućih struktura lubanje, oblik mandibule, položaj kondilarnog procesa (izbočen dio mandibule koji se spaja s lubanjom u temporomandibularnom zglobu, omogućujući razne pokrete čeljusti kao što su žvakanje, govor i otvaranje usta) u odnosu na niz očnjaka te oblik i veličinu zuba, omogućila im je zauzimanje različitih ekoloških niša i korištenje raznovrsnih izvora hrane (Turnbull, 1970.; Ungar, 2015.). Ove anatomske karakteristike, zajedno s rasporedom i veličinom žvačnih mišića, koreliraju s ekološkim zahtjevima vrste, uključujući korištenje staništa, hranidbene navike i strategije hranjenja.

Ekološki značajna karakteristika koja omogućava sisavcima korištenje različitih resursa je upravo sila ugriza (Aguirre i sur., 2003.; Anderson i sur., 2008.; Herrel i sur., 2008.). Maksimalna sila ugriza kod sisavaca varira zbog čimbenika kao što su ekološka niša, hranidba i struktura zuba, te se smatra ključnim za sposobnost vrste da uhvati i preradi plijen (Aguirre i sur., 2002.; Freeman, 1984., 1992.) ili otvori tvrdu hranu (Smith, 1970.). Anatomske karakteristike, poput tjelesne mase, pokazale su se značajnim prediktorima sile ugriza (Anderson i sur., 2008.; Freeman i Lemen, 2008a.; Marshall i sur., 2012.; Wroe i sur., 2005.).

Omjer sile ugriza i tjelesne mase omogućuje usporedbu ugrizne snage među vrstama različitih veličina te pruža uvid u učinkovitost korištenja tjelesne mase za generiranje te sile. Ovaj omjer ima ključnu ulogu u razumijevanju načina na koji različite vrste optimiziraju svoje fizičke resurse za preživljavanje i reprodukciju (Freeman i Lemen, 2008b.). Visoki omjer može ukazivati na specijalizaciju za konzumaciju specifičnih vrsta hrane ili na prilagodbe za borbu i obranu, dok niži omjer može biti karakterističan za manje predatore ili biljojede koji se oslanjaju na lakše dostupne resurse (Maestri i sur., 2016.). Pored toga, veličina žvačnih mišića i povezano ponašanje, poput napada i lova plijena, iskopavanja gomolja ili kopanja podzemnih tunela, također utječu i koreliraju sa silom ugriza (Christiansen i Wroe, 2007.; Becerra i sur., 2014.; Freeman i Lemen, 2008b.; Wroe i sur., 2005.). Hranidbene navike pokazuju posebno snažnu vezu sa sposobnošću ugriza (Christiansen i Wroe, 2007.; Maestri i sur., 2016.; Wroe i sur., 2005.).

Predatorima koji se oslanjaju na sposobnost efikasnog onesposobljavanja i raskidanja plijena, procjena sile ugriza temeljena je i na morfologiji lubanje (Christiansen i Wroe, 2007.). Nasuprot tome, manja sila ugriza pronađena je kod kukcojeda koji se oslanjaju na plijen koji je lakši za svladavanje i konzumiranje (Aguirre i sur., 2002.; 2003.; Wroe i sur., 2005.). Međutim, i drugi čimbenici poput interspecijskih interakcija (Damasceno i sur., 2013.; Downes i Bauwens, 2002.) i spola mogu igrati ulogu (Herrel i sur., 2007.; Thomas i sur., 2015.). Snažan ugriz može biti od velike važnosti tijekom agresivnih susreta (npr. u obrani teritorija i kolonija ili u konkurenciji za spolne partnere) i stoga je također dobar prediktor dominacije i reproduktivnog uspjeha kod mnogih životinja (Husak i sur., 2006.; Lailvaux i Irschick, 2007.).

Cleuren i sur. (1995.) utvrdili su da korištenje različitih dijelova mišićnog kompleksa omogućuje široku modulaciju sile ugriza, te da male morfometrijske razlike mogu odrediti promjene u ekologiji hranjenja blisko povezanih vrsta, stoga se čini da je temeljito određivanje orijentacije vektora mišićne sile od ključne važnosti.

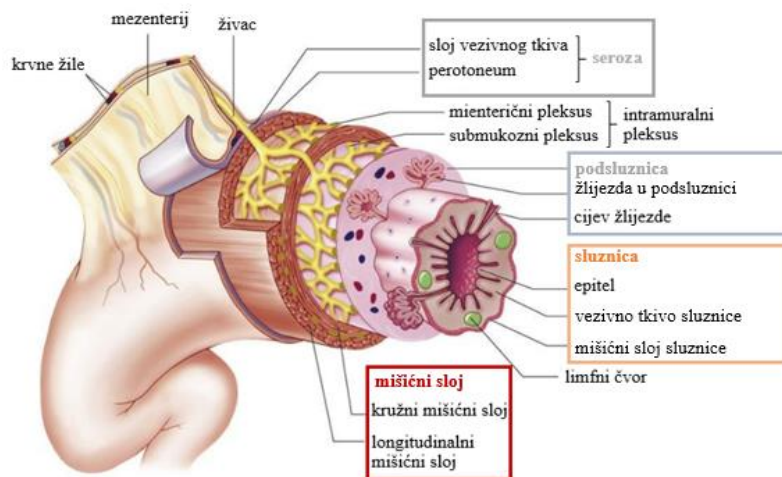
Sila ugriza se može procijeniti *in vivo* (Erickson i sur., 2003.) ili neizravno na temelju mjerenja odabranih morfoloških karakteristika lubanje, zuba i mišića, a izražava se kao pritisak ili sila po jedinici površine kada usta obuhvate objekt (Christiansen i Wroe, 2007.; Herrel i sur., 2008.). Međutim, korištenje biomehaničkih modela temeljenih na CT skeniranju za procjenu sile ugriza može rezultirati podcjenjivanjem stvarnih podataka *in vivo* (tj. za do tri puta manje) (Curtis i sur., 2010.).

## 2.2.2. Morfologija i histologija probavne cijevi

### 2.2.2.1. Osnovna građa stijenke probavne cijevi

Prolaskom kroz probavni sustav omogućuje se pretvorba hrane u iskoristivu energiju koja se može iskoristiti. Probavni sustav se sastoji od prohodne probavne cijevi kroz koju hrana prolazi i pridruženih probavnih žlijezda koje proizvode probavne sokove koji omogućuju lakši prolaz i razgradnju hrane (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.).

Svaki od tubulusnih organa probavnog trakta, sastoji se od slojeva sluznice (*tunica mucosa*), podsluznice (*submucosa*) i vanjskih mišića (*tunica muscularis*), obavijenih vanjskom opnom (*tunica externa*), koja može biti građena kao adventicija ili seroza (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.) (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz građe stijenke probavne cijevi. Preuzeto i prilagođeno iz Patton, 2014.

Sluznica (*tunica mucosa*) je prvi sloj koji obavija unutrašnjost organa i direktno je u kontaktu s hranom. Sluznica se prilagođava i mijenja ovisno o specifičnoj funkciji svakog organa. Sastoji se od tri osnovna sloja: pokrovnog epitela (*lamina epithelialis*), vezivnog tkiva (*lamina propria*) i tankog mišićnog sloja sluznice (*lamina muscularis mucosae*) (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.). Pokrovni epitel probavne cijevi obavlja sljedeće funkcije: selektivna propusna barijera između sadržaja u lumenu i tkiva, posredovanje pri prijenosu i probavljanju hrane, sudjelovanje u apsorpciji probavnih proizvoda, generiranje hormona koji utječu na aktivnost probavnog sustava te stvaranje sluzi koja pruža zaštitu i podmazivanje. Bazalna membrana, koja se nalazi na granici epitela i veziva sluznice služi kao strukturalna potpora (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.). *Lamina propria* je građena od rahlog vezivnog tkiva, te sadržava krvne i limfne žile, žlijezde i limfno tkivo. Brojni limfni čvorovi smješteni u *lamini propriae*

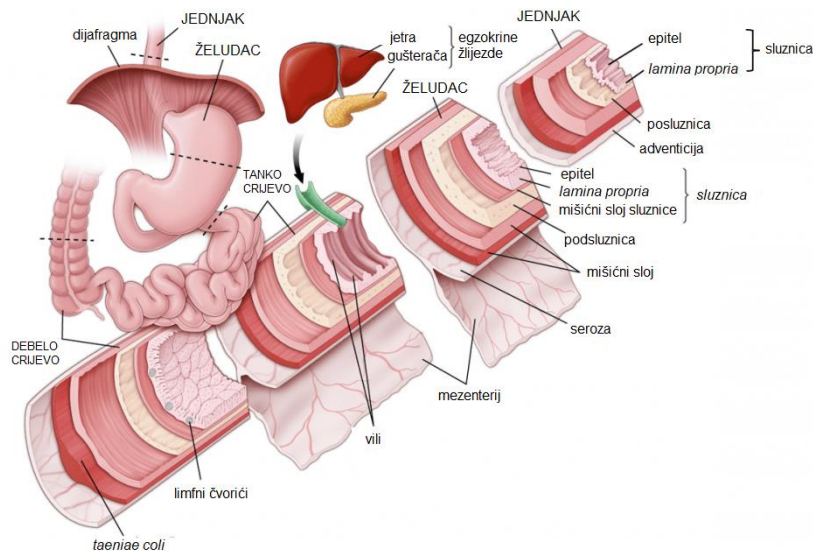


zajedno s epitelom, štite organizam od bakterija (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.). Mišićni sloj sluznice sastoji se od tankih unutarnjih i vanjskih slojeva glatkih mišića koji razdvajaju sluznicu od podsluznice. Ova struktura omogućuje gibanje sluznice neovisno o drugim gibanjima probavne cijevi povećavajući tako njezin dodir s hranom, a pod kontrolom je živčanih spletova. Osim toga, generira lokalizirane pokrete, održavajući tonus i potičući izlučivanje sluzi iz žlijezda, istovremeno djelujući kao čvrsta barijera protiv prolaska bakterija i unesenih tvari u okolna tkiva, što na kraju sprječava širenje jednjaka tijekom prolaska hrane (Nagai i sur., 2003.; Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.).

Podsluznica (*tunica submucosae*) se sastoji od gušćeg vezivnog tkiva prožetog krvnim i limfnim žilama, a može sadržavati žlijezde i limfno tkivo (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.). Dio podsluznice je živčani submukozni plexus - *plexus submucosus Meissneri*, koji inervira probavnu cijev i potiče kontrakciju glatkih mišića u stijenci probavne cijevi. Također, on je odgovoran za kemijsku regulaciju i sekreciju žlijezda, čime se olakšava prenošenje hrane i štiti sluznica (Purves i sur., 2001.; Shahrestani i Das, 2002.).

Mišićni sloj (*tunica muscularis*) sastoji se od snopova glatkih mišićnih stanica organiziranih u najmanje dva sloja s različitim orijentacijama. Unutarnji sloj, bliži lumenu, sastoji se od kružno postavljenih mišićnih stanica, dok je vanjski sloj sastavljen od uzdužno postavljenih mišićnih stanica (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.). Kružni mišićni sloj omogućuje sužavanje ili opuštanje lumena organa, dok uzdužni mišićni sloj pruža dodatnu snagu i potporu za peristaltičke pokrete i pomicanje sadržaja kroz organ (Kerr, 1999.; Young i Heath, 2003.). Između ova dva sloja nalazi se mijenterični plexus (*plexus myentericus Auerbachii*), koji zajedno sa živčanim spletom podsluznice pruža živčanu inervaciju za regulaciju peristaltičkih pokreta (Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.).

Seroza se sastoji od pločastog pokrovnog epitela (mezotel) i tankog rahlog vezivnog tkiva prožetog krvnim i limfnim žilama te masnim stanicama. Na mjestima gdje probavna cijev dotiče druge organe serozu zamjenjuje debela adventicija, građena od vezivnog tkiva, bez pokrovnog epitela. Struktura i razvijenost pojedinih slojeva, kao i prisutnost žlijezda i stanica unutar sluznice, razlikuju se ovisno o pripadnosti pojedinom organu probavnog trakta i njegovoj funkciji (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.; Young i Heath, 2003.) (Slika 6.).

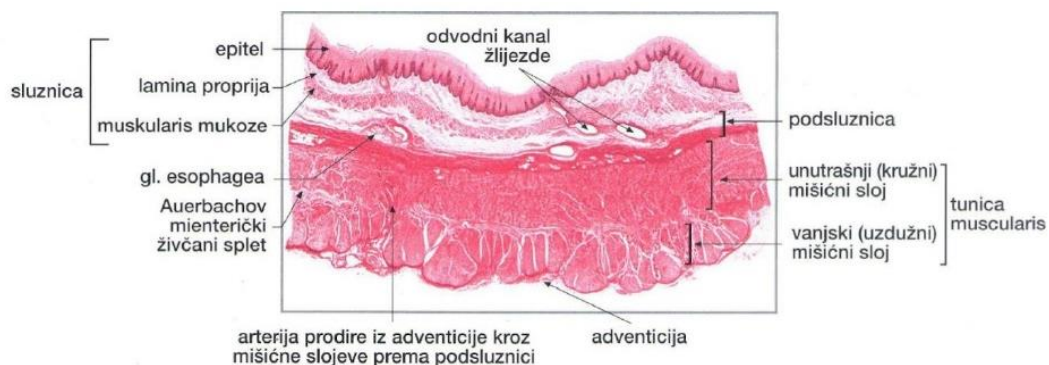


Slika 6. Usporedni prikaz glavnih strukturnih dijelova stijenke probavne cijevi između jednjaka, želuca, tankog i debelog crijeva čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz Pawlina i Ross, 2020.

#### 2.2.2.1.1. Anatomska i histološka građa probavne cijevi sisavaca

U ovom poglavlju će se opisati anatomija presjeka probavne cijevi, s fokusom na pojedine organe, koristeći anatomsku i histološku građu probavne cijevi čovjeka kao reprezentativni primjer za sisavce.

Kod čovjeka, jednjak je obložen s višeslojnim pločastim epitelom (*epithelium stratificatum squamosum*), koji prema površini postaje rožnat (*epithelium stratificatum squamosum cornificatum*) te se redovito obnavlja (Treuting i sur., 2018.) (Slika 7.).

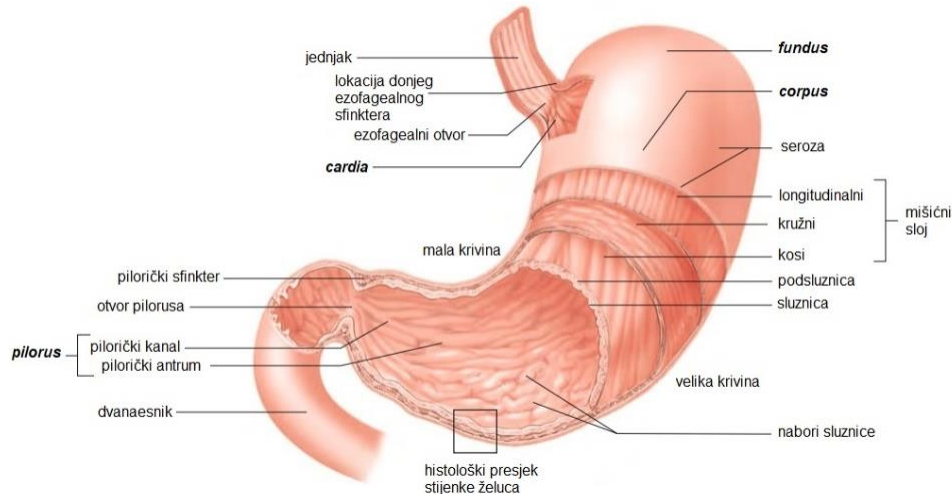


Slika 7. Prikaz poprečnog presjeka kroz stijenku jednjaka čovjeka, s jasno označenim slojevima i strukturama. Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

Ispod bazalne membrane sluznice smješten je sloj vezivnog tkiva, odvojen od podsluznice tankim slojem mišića sluznice. Unutar sloja podsluznice nalaze se nakupine malih mukoznih žlijezda. U vezivnom tkivu sluznice i podsluznice nalaze se krvne i limfne žile, koje prodiru

kroz mišićno tkivo. Prema vanjskom mišićnom sloju, vezivno tkivo podsluznice postaje gušće (Treuting i sur., 2018.). U poprečnom presjeku kroz jednjak, vidljivi su unutarnji kružni i vanjski uzdužni mišićni sloj, koji je obuhvaćen seroznim tkivom (Bradamante i Švajger, 2002., Kerr, 1999.).

Želudac se može podijeliti u četiri regije: kardija, fundus, korpus i pilorus (antrum) koji imaju sličnu histološku građu (Slika 8.) (Treuting i sur., 2018.).



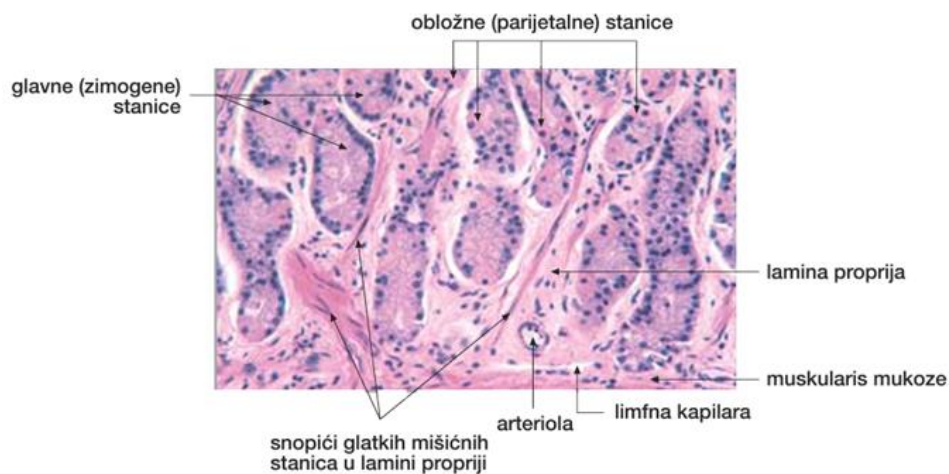
Slika 8. Shematski prikaz građe želuca čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz Seeley i sur., 2008.

Sluznica želuca sastoji se od pokrovnog epitela koji se različito duboko utiskuje u *lamina propria* i tvori želučane jamice (*faveolae gastricae*). U želučane jamice se otvaraju razgranate tubulusne (kardijalne, gastičke i piloričke) žlijezde (Treuting i sur., 2018.). Slobodnu površinu želuca i želučanih jamica oblaže jednoslojni cilindrični epitel u kojem sve stanice izlučuju lužnati mukozni sekret. *Lamina propria* se sastoji od rahlog vezivnog tkiva protkanog glatkim mišićnim i limfnim stanicama, a mišićni sloj sluznice je dijeli od podsluznice (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.) (Slika 8.).



Slika 9. Prikaz poprečnog presjeka sluznice želuca kod čovjeka u fundičkoj regiji prikazan je s jasno označenim slojevima i strukturama. Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

U različitim dijelovima želuca nalaze se specifične žlijezde koje proizvode različiti sekret. U kardijalnoj regiji nalaze se kardijalne žlijezde koje proizvode sluz, lizozim i HCl. U regijama fundusa i korpusa nalaze se razgranate tubulusne gastičke žlijezde (Slika 9.) koje se sastoje od vrata i baze (Treuting i sur., 2018.). U vratu žlijezda nalaze se mukozne, obložne (parijetalne) i nediferencirane stanice, dok su u bazalnom dijelu prisutne obložne, glavne (zimogene) i enteroendokrine stanice (Slika 10.) (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.). Obložne stanice proizvode HCl, dok glavne stanice izlučuju pepsinogen koji se pretvara u pepsin u kiselom okolišu želuca. Također, glavne stanice proizvode lipazu, dok enteroendokrine stanice proizvode hormone poput serotonina i gastrina (Treuting i sur., 2018.).

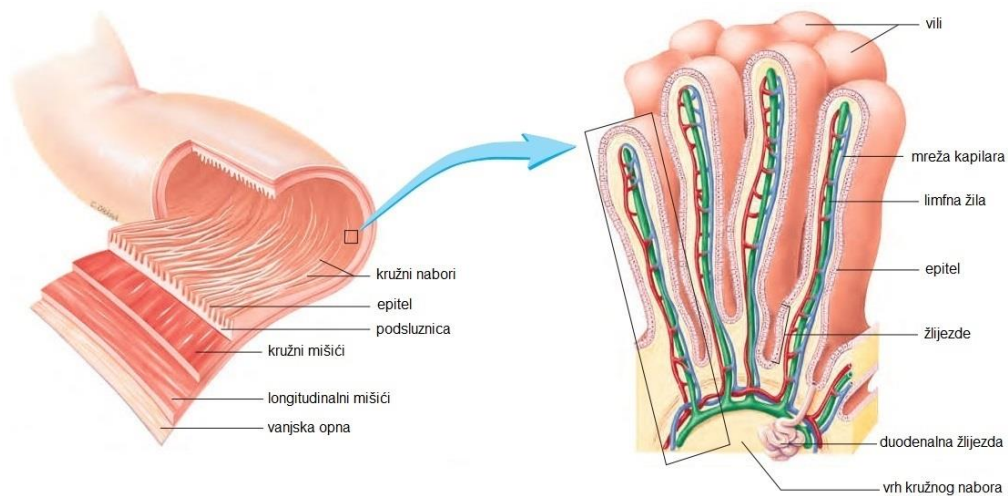


Slika 10. Prikaz bazalnih dijelova žlijezda u fundičkoj regiji želuca čovjeka prikazani su s označenim različitim tipovima stanica i drugim vidljivim strukturama. Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

U piloričkoj regiji želučane jamice su dublje, a piloričke žlijezde izlučuju sluz, lizozim i gastrin dok enteroendokrine stanice izlučuju somatostatin. Ostale slojeve želuca čine podsluznica koja se sastoji od gustog vezivnog tkiva u kojem teku krvne i limfne žile, te pokoji limfocit, makrofag ili mastocit (Treuting i sur., 2018.). Mišićni sloj želuca je građen od glatkih mišićnih stanica koje su raspoređene u tri glavna smjera. U vanjskom sloju teku uzdužno, u srednjem kružno (u području pilorusa je jako zadebljan i čini pilorički sfinkter) i u unutrašnjem sloju koso. Također, želudac je pokriven tankom serozom zbog svog položaja u trbušnoj šupljini (interperitonealno) (Kerr, 1999.).

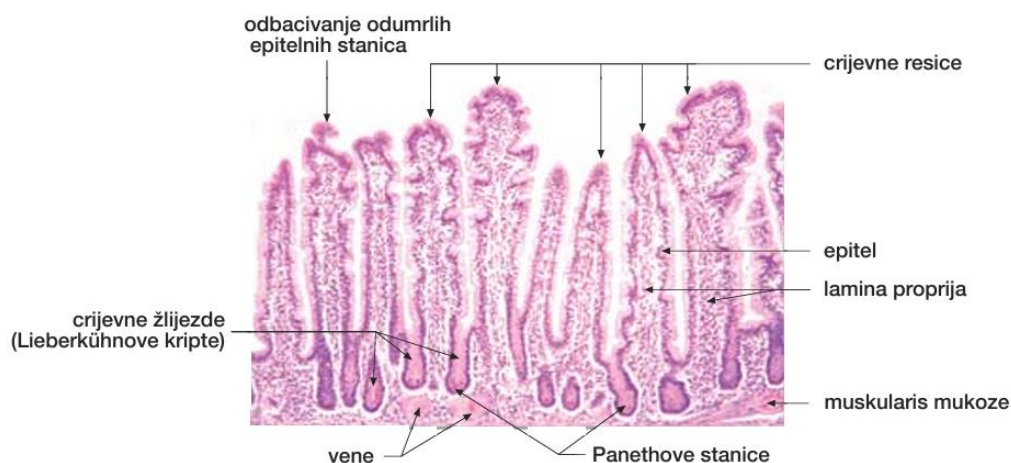
Tanko crijevo se može podijeliti u tri regije, duodenum, jejunum i ileum (Slika 11.). Apsorpciju u tankom crijevu pomažu strukture koje povećavaju površinu izloženu sadržaju crijeva

(absorpcijska površina), a to su: kružni nabori sluznice (*plicae circulares*), crijevne resice (*villi intestinales*) i mikrovili (Treuting i sur., 2018.).



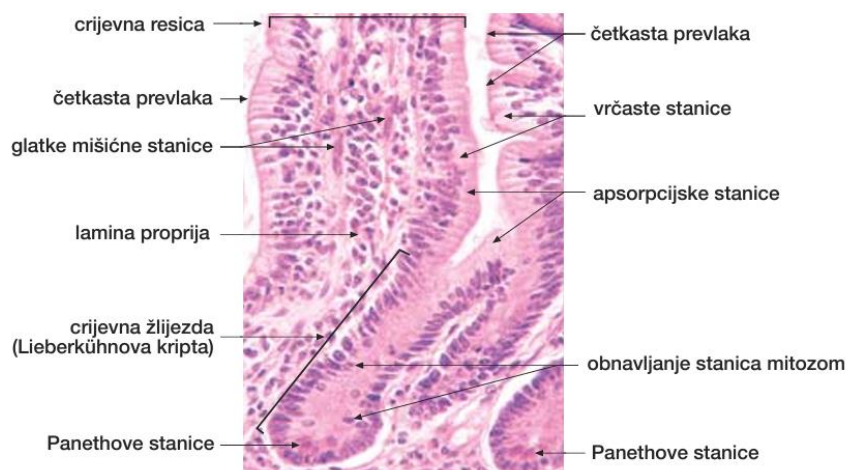
Slika 11. Shematski prikaz građe tankog crijeva čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz Seeley i sur., 2008.

Kružni nabori sluznice sastoje se od sluznice i podsluznice. Crijevne resice su izdanci sluznice i obložene su jednoslojnim cilindričnim epitelom. Resice se razlikuju u dužini ovisno o dijelu tankog crijeva: u duodenumu imaju oblik lista, a prema ileumu postepeno poprimaju oblik prsta. Mikrovili su izdanci apikalne citoplazme crijevnih stanica, koji dodatno povećavaju površinu apsorpcije (Treuting i sur., 2018.). Kružni nabori povećavaju površinu crijeva tri puta, crijevne resice 10 puta, a mikrovili 20 puta. Između baza resica se nalaze jednostavne tubulusne crijevne žlijezde ili Lieberkühnove kripte (Kerr, 1999.) (Slika 12.).



Slika 12. Prikaz poprečnog presjeka kroz sluznicu tankog crijeva kod čovjeka u području jejunuma. Na slici su jasno vidljive resice i Lieberkühnove kripte, a strukture su označene. Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

Lieberkühnove kripe se nalaze unutar sluznice tankog crijeva, započinju s epitelnim slojem i pružaju se kroz vezivno tkivo sve do mišićnog sloja sluznice. Crijevne žlijezde se sastoje od nekoliko vrsta stanica: apsorpcijske stanice (enterociti), vrčaste stanice, Panethove stanice i M stanice (Kerr, 1999.). Apсорpcijske stanice su visoke, cilindrične s jajolikom jezgrom u bazalnom dijelu. Na njihovoj apikalnoj površini nalazi se četkasta prevlaka koja se sastoji od gusto zbijenih mikroresica. Vrčaste stanice su razmještene između apсорpcijskih stanica. Ima ih puno u ileumu, a manje u duodenumu, a proizvode mucine koji tvore sluz. Panethove stanice se nalaze u bazalnom dijelu crijevnih žlijezda. To su egzokrine stanice sa sekrecijskim zrcima u apikalnoj citoplazmi (Slika 13.). M-stanice su specijalizirane epitelne stanice koje se nalaze iznad limfocita u Peyerovim pločama. Imaju udubine bazalnog dijela membrane tvoreći jamice u kojima se nalaze intraepitelni limfociti i makrofagi (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.).

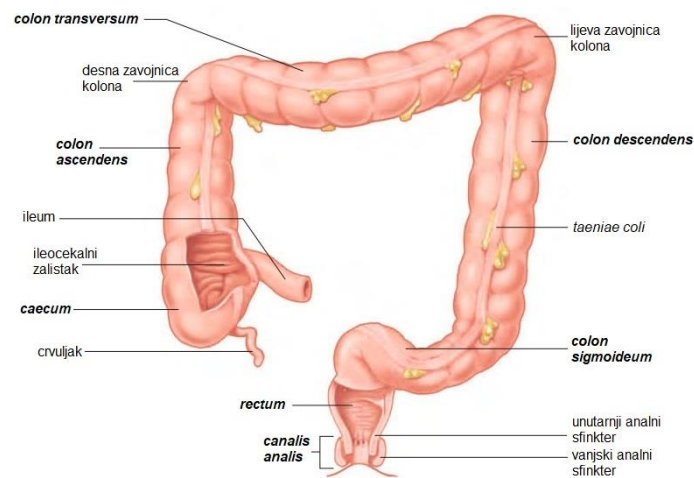


Slika 13. Prikazan je presjek segmenta crijevne resice i prijelaz u tubulusnu žlijezdu, Lieberkühnovu kriptu u području sluznice jejunuma tankog crijeva čovjeka, s naznačenim tipovima stanica (samo M stanice nisu vidljive). Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

*Lamina propria* ulazi u crijevne resice dok glatke mišićne stanice omogućuju kretanje resica što olakšava apsorpciju. Podsluznica ima uobičajenu vezivnu građu, a na području duodenuma sadrži Brunnerove duodenalne žlijezde – zavijene tubulusne mukozne žlijezde koje izlučuju lužnati sekret. *Lamina propria* i podsluznica sadržavaju nakupine limfnih čvorića – Peyerove ploče. Mišićni sloj građen je od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja. Inervacija crijeva sastoji se od unutrašnjeg (Auerbachov mienterički splet) i vanjskog (Meissnerov splet u podsluznici) dijela (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.).

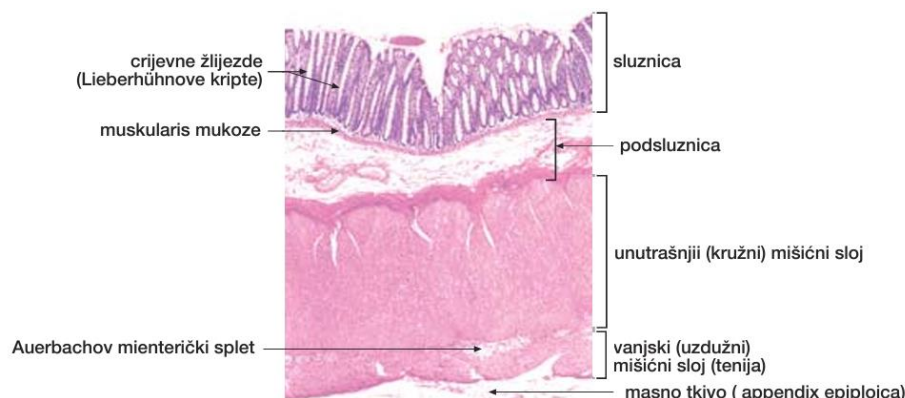
Debelo crijevo se sastoji od: slijepog crijeva (*caecum*), kolona (*colon*), ravnog crijeva (*rectum*) i analnog kanala (*canalis analis*) (Slika 14.). Histološko razlikovanje dijelova debelog crijeva

može biti izazovno zbog slične strukture koja prevladava u cijelom crijevu. Također, manji broj crijevnih žlijezda u debelom crijevu u usporedbi s tankim crijevom otežava identifikaciju specifičnih dijelova (Treuting i sur., 2018.).



Slika 14. Shematski prikaz građe debelog crijeva čovjeka. Preuzeto i prilagođeno iz Seeley i sur., 2008.

Debelo crijevo ima sluznicu bez nabora (osim u rektalnom dijelu), nema crijevnih resica, ali postoje crijevne žlijezde koje se pružaju kroz cijelu sluznicu (Lieberkühnove kripte), a oblaže ih pokrovni jednoslojni cilindrični epitel koji uz apsorpcijske cilindrične stanice s kratkim i nepravilnim mikroresicama sadrži mnogo vrčastih i malo enteroendokrinih stanica. Za razliku od tankog crijeva, sluznica debelog crijeva ne uključuje Panethove stanice (Treuting i sur., 2018.). *Lamina propria* sadržava mnogo limfocita i limfnih čvorića koji se često šire i u podsluznicu. Mišićni sloj se i dalje sastoji od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.) (Slika 15.).



Slika 15. Prikazan je poprečni presjek kroz stijenku debelog crijeva u kolonskom području čovjeka, pri čemu su označeni pojedini slojevi i vidljive strukture. Preuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

U vanjskom uzdužnom sloju glatke su mišićne stanice nakupljene u tri debele trake (*taeniae coli*) (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.). U inteaperitonealnom dijelu seroze nalaze se *appendices epiploidae*, male izrasline građene od masnog tkiva. U analnom dijelu sluznica čini niz uzdužnih nabora - *columnae rectales Morgagni*. Neposredno iznad analnog otvora crijevnu sluznicu zamjenjuje višeslojni pločasti epitel, a *lamina propria* sadržava splet velikih vena (Kerr, 1999.; Treuting i sur., 2018.).

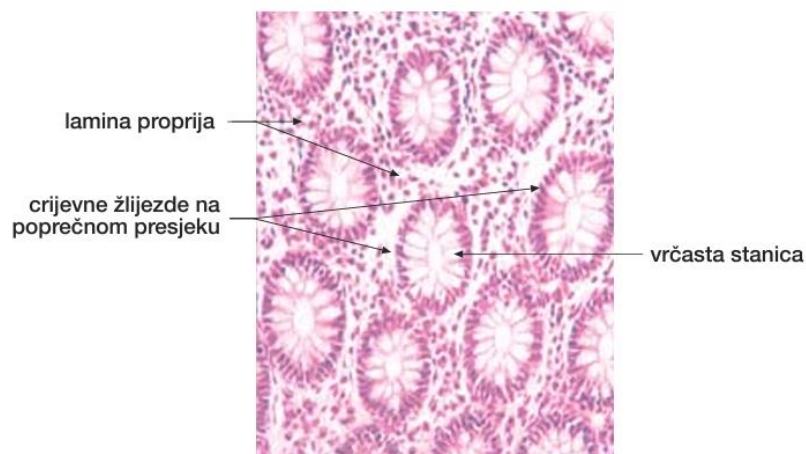
Slijepo crijevo smješteno na početku debelog crijeva, ima sličnu strukturu kao i ostatak debelog crijeva, iako posjeduje manje Lieberkühnovih kripti i žlijezda (Treuting i sur., 2018.). Crvuljak je izdanak slijepog crijeva, ima uzak i nepravilan lumen jer mu je stijenka zadebljana zbog prisutnosti brojnih limfnih čvorića (Treuting i sur., 2018.).

#### 2.2.2.1.1.1. Vršaste stanice i vrsta sekreta

Površine sluznica tijela (probavni, respiratorni i urogenitalni traktovi) su područja na kojima se odvija apsorpcija i izlučivanje tvari (Brownlee i sur., 2005.). Sluz u probavnom sustavu ima više funkcija, uključujući podmazivanje površina organa, zaštitu od oštećenja uzrokovanih želučanom kiselinom i autodigestijom, obranu od prodora stranih tvari i mikroorganizama, te regulaciju apsorpcije nutrijenata i brzine prolaska hrane i neprobavljenih ostataka kroz probavni sustav (Laboisie i sur., 1996.; Linden i sur., 2008.; Montagne i sur., 2004.; Okon, 1977.; Paksuz i Paksuz, 2015.; Pavelka i Roth, 2015.; Young i Heath, 2003.). U odgovoru na mikroorganizme, stanice koje se nalaze u sluznici luče brojne obrambene spojeve, uključujući antitijela, mucine, protegrine, defenzine, kolektine, katlecidine, histatine, lizozime i dušikov oksid (Linden i sur., 2008.).

Unutar želuca i crijeva prisutne su vršaste stanice (Slika 16.), koje luče različite glikoproteine. Ti glikoproteini čine jedan od ključnih sastojaka sluzi i nazivaju se mucinima. Broj vršastih stanica u crijevnom epitelu postepeno se povećava od početka tankog crijeva prema kraju debelog crijeva (Aylward i sur., 2019.; Boonzaier, 2012.; Pinheiro i sur., 2018.). Ovaj porast broja stanica odgovara povećanoj potrebi za dodatnim podmazivanjem relativno suhe neprobavljene tvari tokom njenog prolaska (Okon, 1977.; Paksuz i Paksuz, 2015.). Sastav mucina može se mijenjati, što utječe na viskoznost sluzi u probavnom traktu i pruža dodatnu zaštitu sluznici od invazije patogena (Bansil i Turner, 2006.; Linden i sur., 2008.). Vršaste stanice proizvode mucine različitih sastava, uključujući kisele, neutralne i mješovite, ovisno o vrsti glikoproteina (mucina) koje generiraju.





Slika 16. Prikaz bazalnih dijelova Lieberkühnovih kripti u debelom crijevu čovjeka prikazani s označenim vrčastim stanicama, žlijezdama i vezivnim slojem (*lamina propria*). Peuzeto iz Bradamante i Švajger, 2002.

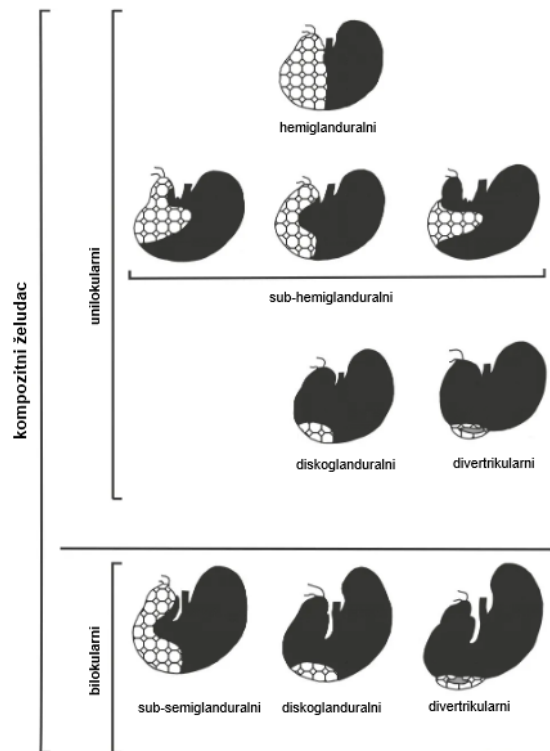
U tankom crijevu, dominantni su neutralni mucini (Aylward i sur., 2019.; Poddar i Jacob, 1979.; Sheahan i Jervis, 1976.; Takehana i sur., 2000.), čija funkcija uključuje zaštitu epitela od želučane kiseline koja prolazi s hranom (Allen i sur., 1993.; Aylward i sur., 2019.; Krause, 1981.; Young i Heath, 2003.). Osim toga, mucini mogu povećavati viskoznost sluzi, pružajući dodatnu zaštitu sluznici (Bansil i Turner, 2006.). Linden i sur. (2008.) predlažu da neutralni mucini možda imaju specifične antigene za određene krvne grupe, što bi moglo pridonijeti zaštiti od specifičnih patogena.

U debelom crijevu sisavaca, primjećuje se povećanje broja kiselih mucina (Aylward i sur., 2019.; Kotzé i Coetzee, 1994.; Sheahan i Jervis, 1976.). Postoji mogućnost da ovi kiseli mucini, posebno unutar Brunnerovih žlijezdi, dodatno štite od bakterijskih infekcija (Cao i Wang, 2009.; Macfarlane i Dillon, 2007.). Miješani mucini prisutni su i u tankom i debelom crijevu sisavaca, obuhvaćajući mucine s različitim kemijskim svojstvima i mješavinama drugih tipova mucina, uključujući neutralne i kisele mucine. Stoga, oni mogu reagirati i s kiselim i s baznim bojama, stvarajući složeniju boju ili ton.

#### 2.2.2.2. Morfohistološka varijabilnost probavnog sustava glodavaca

Glodavci se razlikuju od drugih sisavaca po nekoliko ključnih struktura u svom probavnom sustavu: kompozitni želudac, slijepo crijevo i proksimalni dio debelog crijeva (Langer, 2017.). Ova raznolikost prisutna je i unutar najraznolikije nadporodice glodavaca, Muroidea (Gainsbury i sur., 2018.; Wilman i sur., 2014.).

Želudac može imati "kompozitnu" strukturu što bi značilo da je sastavljen od više od jedne komore ili odjeljka. Na slici 17. prikazane su različite varijacije kompozitnih želudaca unutar porodice Cricetidae (Carleton, 1973.).

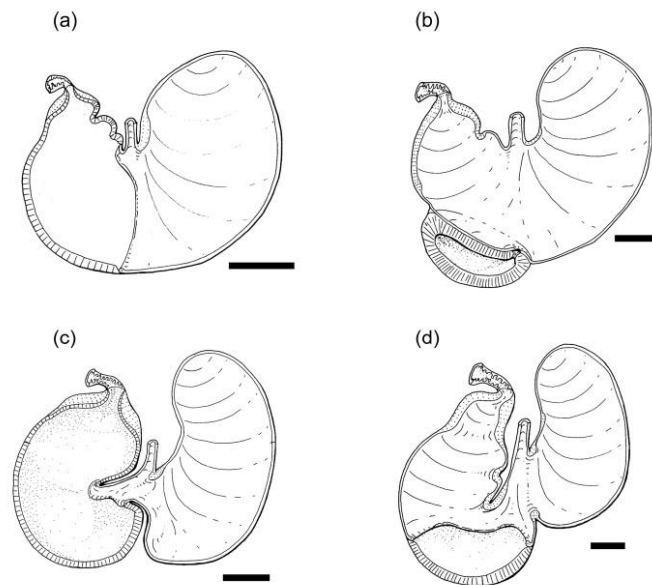


Slika 17. Tip želuca i sluznice u želucu različitih vrsta iz potporodice Cricetinae. Crno obojeno: pločasti epitel, svijetlo obojeno: žljezdana sluznica. Preuzeto i prilagođeno iz Carleton, 1973.

Kada je riječ o strukturi, raznolikosti i nomenklaturi želuca, lumen može biti unilokularan (nepodijeljen) ili plurilokularan (podijeljen) s dvije, tri ili više komore (bilokularan, trilokularan) (Langer, 1985.). Izraz "jednostavan" za unilokularan želudac označava isključivo oblaganje organa isključivo žljezdanom sluznicom (Langer, 1985.). S druge strane, "složen" je sinonim za plurilokularan želudac koji podrazumijeva oblaganje organa s dva tipa sluznice, žljezdanom i nežljezdanom (Langer, 1985.; Vorontsov, 1967.; 1979.).

Želudac nadporodice Muroidea karakteriziraju dva tipa sluznice: nežljezdani mnogoslojni pločasti epitel u predželucu (eng. *forestomach*) i žljezdani epitel u glavnom dijelu želuca (Schaller, 1992.). Predželudac se nalazi blizu početka želuca (kardija), dok se žljezdani dio nalazi bliže izlazu iz želuca (pilorusu). Žljezdani dio želuca sadrži različite omjere kardijalnih, fundičkih i piloričkih žlijezda. Ovakva raspodjela sugerira da hrana prvo ulazi u predželudac prije nego dođe do dijela sa želučanim sokovima. Prijelaz između ta dva područja obično je

oštar, označen rubnim naborom (eng. *greater curvature*) koji je obložen rožnatim epitelom (Langer, 1985.; Vorontsov, 1967.; 1979.) (Slika 18.).



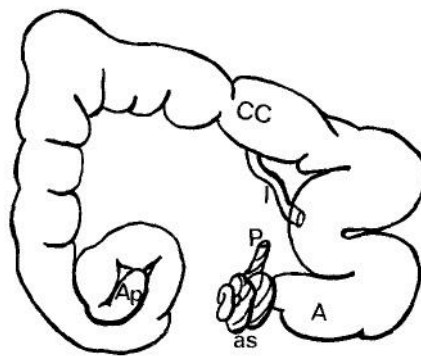
Slika 18. Ilustracija različitih tipova muroidnih želuca, s (a) tipom unilokularnog/hemiglandularnog (*Oxymycterus rutilans*), (b) tipom unilokularnog/diskoglandularnog (*Reithrodontomys mexicanus*), (c) tipom bilokularnog/hemiglandularnog (*Cricetus cricetus*) i (d) tipom bilokularnog/diskoglandularnog (*Neotoma phenax*). Nežljezdani epitel označen je široko razmaknutim crticama. Mjerna skala na svakom prikazu želuca predstavlja 5 mm. Preuzeto iz Carleton, 1973.

Slika 18. prikazuje raznolikost u proširenju želučane sluznice, gdje se organ smatra "hemiglandularnim" kada su žljezdani i nežljezdani dijelovi otprilike jednake veličine. Kada je žljezdana sluznica smanjena, ali još uvijek relativno značajna, koristi se izraz "subhemiglandularan". Žljezdani dio može biti reduciran na manje dijelove ("discoglandularan") ili smanjen na malu vrećicu ili slijepu vrećicu ("divertikularan") (Carleton, 1973.; Langer, 1985.).

Jasno definirana struktura s izraženim nežljezdanim dijelom, kao što je slučaj kod proširenog nežljezdanog područja u jednokomornom želucu, naziva se "predželucom" (engl. *forestomach*) (Carleton, 1973.; Langer, 1985.). Funkcija predželuca dobro je istražena kod velikih biljojeda. U njemu živi mikrobiom koji pomaže u razgradnji biljnih staničnih stijenki (Kunstýr i sur., 1975.; Naumova, 1990.). Funkcija predželuca kod drugih vrsta poput muroidnih glodavaca nije potpuno razjašnjena (Langer, 2017.). Osim što može služiti kao spremište hrane ili vode, djelovati kao zamjena za obraze, ili pomoći u smanjenju veličine čestica hrane, također se

pretpostavlja da može doprinijeti intenzivnijoj probavi bez prisutnosti želučanih izlučevina. Međutim, razlikovanje između djelovanja slinskih i mikrobnih enzima predstavlja izazov (Perrin i Maddock, 1983.). Naime, analize su pokazale da se mikrobiom želuca uglavnom sastoji od bakterija koje proizvode mliječnu kiselinu, a ne mikroorganizama koji fermentiraju vlakna. Vrijednost mikrobioma možda leži u detoksifikaciji određenih sekundarnih spojeva biljaka (Kohl i sur., 2014.). Bakterije koje proizvode mliječnu kiselinu, uključujući laktobacile, štite od gljivica i plijesni (Oliveira i sur., 2014.), te također suzbijaju rast enteropatogenih mikroorganizama (Jena i sur., 2013.).

Myomorpha je podred glodavaca koji je bio predmet obimnih istraživanja posvećenih slijepom crijevu i njegovoj funkciji. Vanjski izgled može se grubo podijeliti na tri glavna dijela. *Ampula caeci*, produžetak "S"-oblikovanog dijela korpusa distalno od ileocekalnog otvora. Proksimalni dio kolona omotan je oko ampule u obliku spirale (*ansa coli paracoecalis*). *Corpus caeci*, glavni dio slijepog crijeva, koji pokazuje niz nepravilno raspoređenih izbočina i suženja duž svoje dužine. Proksimalni dio korpusa lagano je proširen i presavijen oko sebe u obliku slova "S". Ileum ulazi u slijepo crijevo na mezenteričnoj strani prve krivine slova "S". *Apex caeci*, završetak slijepog crijeva, presavija se preko distalnog dijela korpusa poput puža, pričvršćen na mjestu pomoću mezenterija (Snipes, 1979.) (Slika 19.).

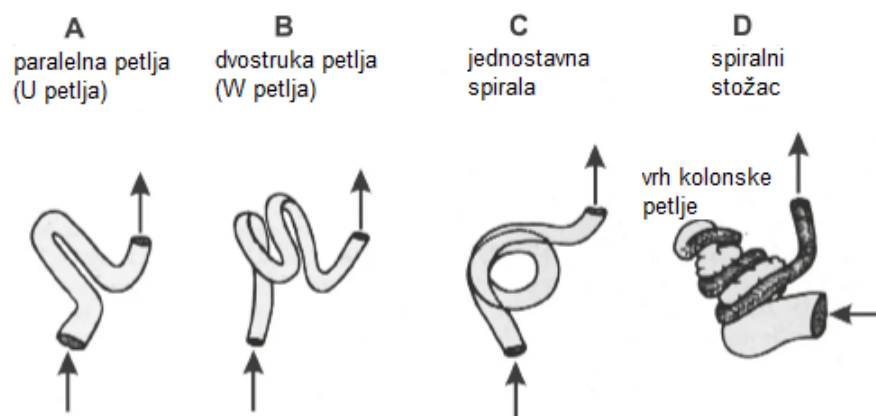


Slika 19. Prikaz građe slijepog crijeva livadne voluharice (*Microtus agrestis*). Ap – apex caeci; CC – corpus caeci; A – ampula caeci; I – ileum; P – colon ascendens; as - ansa coli paracoecalis. Preuzeto i prilagođeno iz Snipes, 1979.

Slijepo crijevo, prilagođeno za smještaj mikroorganizama, sugerira da Lieberkühnove kripte u ovom organu mogu biti ključne strukture od važnosti za simbiotske odnose (Gustafsson i Maunsbach, 1971.). Mikroorganizmi u slijepom crijevu mogu potaknuti povećanu produkciju vrčastih stanica, a varijacije u duljini i masi ovog dijela probavnog trakta izravno su povezane s hranidbenim navikama životinje (Gębczyńska i Gębczyński, 1971.).

Unutar Myomorfa, funkcija debelog crijeva je vjerojatno povezana s različitim vrstama hrane koju različite vrste konzumiraju (Behmann, 1973.). Uzlazni dio debelog crijeva većine vrsta glodavaca pokazuje prisustvo dva uzdužno raspoređena nabora koji formiraju utor koji djeluje kao retrogradni transportni put za mješavinu bakterija i sluzi prema slijepom crijevu (Gorgas, 1967.). Iako se pretpostavlja da sluz igra ključnu ulogu u prijenosu bakterija kroz uzdužni kolonski utor, u literaturi nedostaju istraživanja koja detaljno određuju histokemijske karakteristike mucina u toj regiji (de la Hoz i sur., 2017.).

Diferencijacije u proksimalnom dijelu debelog crijeva Myomorpha prikazane su na slici 20. Cijev debelog crijeva može formirati ukosnicu ili petlju u obliku slova U (A), čije su grane čvrsto povezane mezenterijskim ligamentom, poznatu kao "paralelna petlja". Druga varijacija petlje je dvostruka petlja ili petlja u obliku slova W (B), gdje obje petlje imaju paralelan tok. Treća diferencijacija je jednostavna spirala s jednim zavojem (C). Daljnja diferencijacija može uključivati spiralni stožac s centripetalnim zavojima prema vrhu i centrifugalnim zavojima prema dnu (D), stvarajući trodimenzionalnu strukturu - postcekalnu spiralu (*ansa coli paracoecalis*) (Behmann, 1973.; Tullberg, 1899.).



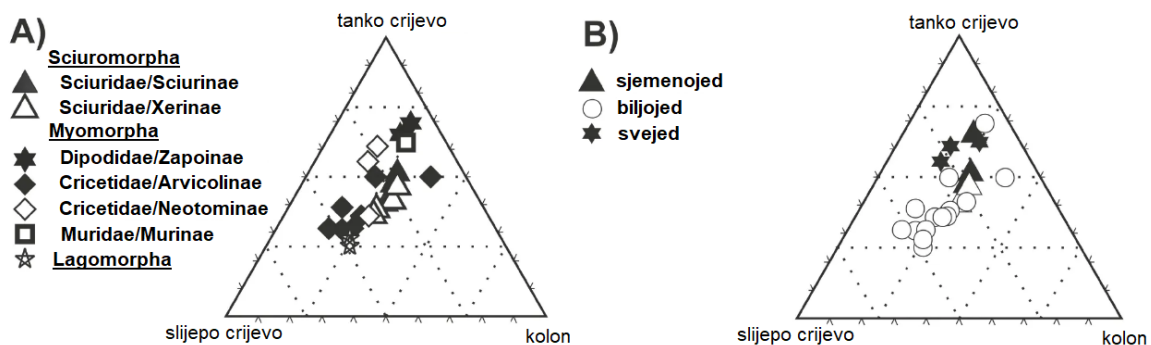
Slika 20. Diferencijacije proksimalnog debelog crijeva u Myomorpha. Strelice pokazuju prolaz probave kroz debelo crijevo. Navedeni primjeri su karakteristični za sljedeće svojite: (A) *Meriones* sp. i *Micromys* sp.; (B) *Reithrodontomys* sp. i *Apodemus* sp.; (C) *Cricetulus* sp. i *Napaeozapus* sp.; (D) *Microtus* sp.. Preuzeto i prilagođeno iz Behmann, 1973.

Postcekalna spirala je dio probavnog sustava i prisutna je samo kod nekih vrsta glodavaca, što može ukazivati da je povezana s zahtjevima ekološke niše različitih životinja (Tullberg, 1899.).

Funkcionalna važnost tankog, slijepog i debelog crijeva može se prikazati analizom njihovog volumena, koji se neizravno može odrediti mjerenjem mase pojedinih organa i njihovog sadržaja (Schieck i Millar, 1985.). Na slici 21. pod A., relativne mase dijelova probavnog

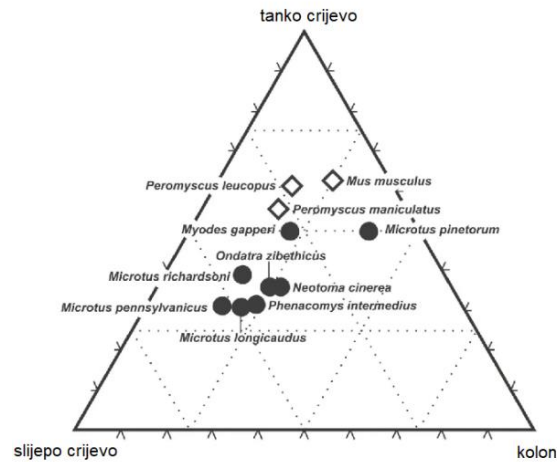
sustava prikazane su u trokutastom dijagramu. Izuzetak su vrste potporodice Arvicolinae, poput šumske (*Clethrionomys glareolus*) i vodenog voluhara (*Arvicola terrestris*), gdje su vrste unutar istog podreda blisko grupirane, sugerirajući sličnosti u omjerima različitih dijelova probavnog sustava. Povećanje duljine tankog crijeva može predstavljati specifičnu prilagodbu hranidbi bogatoj bjelančevinama. U vrstama kod kojih je rađeno mjerenje, kolon ne čini više od 40 % ukupne mase crijeva (Schieck i Millar, 1985.). Međutim, u nekim potporodicama, posebice u Arvicolinae, slijepo crijevo može činiti gotovo polovicu ukupne mase crijeva.

Na slici 21. pod B. vidljivo je da je slijepo crijevo od velike važnosti kod biljojednih glodavaca i dvojezubaca (Lagomorfa). Kod vrsta koje konzumiraju biljnu hranu, slijepo crijevo može činiti do gotovo 60% mase crijeva, dok kolon kod Sciuromorpha i Myomorpha nikada ne prelazi 40% ukupne mase crijeva. Biljojedi se mogu pronaći među sljedećim potporodicama glodavaca: Xerinae, Zapodinae, Arvicolinae i Neotominae (kao i u redu Lagomorpha) (Schieck i Millar, 1985.).



Slika 21. A. Relativne mase tankog, slijepog crijeva i kolona kod različitih svojiti glodavaca i dvojezubaca koji konzumiraju različite vrste hrane. B. Relativne mase tankog, slijepog crijeva i kolona ovisno o vrsti hrane koja je konzumirana. Sjemenojedi su obilježeni ispunjenim trokutima, biljojedi praznim kružicama, svejedi ispunjenim zvjezdicama. Preuzeto i prilagođeno iz Schieck i Millar, 1985.

Podaci Schiecka i Millara (1985.) o masi različitih dijelova crijeva, koje uzimamo kao reprezentaciju volumena tankog, slijepog i debelog crijeva, pružaju uvid u relativne veličine ovih dijelova (Slika 22.). Na temelju tih podataka, primjećujemo da svejedi obično imaju veliko tanko crijevo, često čineći više od 50% ukupnog volumena crijeva. Iako biljojedi također mogu postići sličan postotak, u većini slučajeva tanko crijevo čini manje od 50%, dok slijepo crijevo može biti relativno veliko.



Slika 22. Relativne mase tankog, slijepog crijeva i kolona (uključujući sadržaj), prikazane za 11 vrsta potporodice Muroidea. Svejadi su obilježeni otvorenim dijamantima, biljojedi crnim točkicama. Preuzeto i prilagođeno iz Schieck i Millar, 1985.

Iako postoji niz istraživanja koja uspoređuju morfologiju probavnog trakta različitih vrsta ili analiziraju promjene u hranidbi, ta istraživanja se obično fokusiraju na građu, dužinu i volumen probavnog trakta te pojedinih organa. Međutim, treba napomenuti da debljina pojedinih slojeva unutar organa često nije temeljito istraživana ili naglašena u spomenutim radovima (Aswegan i sur., 1994.; Berghes i sur., 2011.; Ellis i sur., 1994.; Ghoshal i Bal, 1989.; Hume i sur., 2002.; Nzalak i sur., 2010.; Parakkal, 1967.; Schieck i Millar, 1985.; Selim i sur., 2017.).

### 2.2.2.3. Prilagodba probavne cijevi na trofičku nišu

Prema izvornoj trofičkoj niši glodavci su u početku bili svejadi ili kukcojedi (Breed i Ford, 2007.; Landry, 1970.). Danas, glodavci pokazuju širok raspon hranidbenih navika, od biljojeda do mesojeda. Landry (1970.) je okarakterizirao glodavce većim dijelom kao svejeda, razmatrajući pri tome tri od pet podreda glodavaca, tj. Sciuromorpha, Myomorpha i Hystricomorpha. U podredu Castorimorpha nalaze se vrste koje se oslanjaju na vlaknasti biljni materijal kao glavni izvor hrane, dok širom svijeta rasprostranjeni Myomorpha pokazuju izrazitu hranidbenu raznolikost. Raznovrsnost mandibulo-kranijalne regije glodavaca ukazuje na njihovu sposobnost prilagodbe mesojednoj i biljojednoj hranidbi, omogućujući im učinkovito odgrizanje i usitnjavanje različitih dijelova biljaka, ubadanje i hvatanje beskralješnjaka, rezanje mesa kralješnjaka, skidanje kore te manipulaciju malim sjemenkama (Vorontsov, 1962.).

Evolucijski trendovi među glodavcima kao prilagodbe biljojednom načinu hranidbe uključuju modifikacije ne samo na zubima (Vorontsov, 1962.), već i na želucu (Carleton 1973., 1981.; Perrin i Curtis, 1980.; Vorontsov, 1962.) te stražnjem crijevu (eng. *hindgut*) (Behmann, 1973.; Gorgas, 1967.; Tullberg, 1899.; Vorontsov, 1962.). Vorontsov (1962.) je naveo nekoliko evolucijskih trendova među glodavcima koji predstavljaju prilagodbe biljojednom načinu hranidbe. Među tim trendovima su povećanje broja poprečnih grebena na kutnjacima, hipsodontizam i prisutnost kutnjaka koji neprestano rastu te razvijaju korijene samo kasno u životu ili ih uopće ne razvijaju. Također, dolazi do jačanja žvačnih mišića. Ukupan kapacitet probavnog trakta se povećava, a unilokularni želuci (tj. nepodijeljeni) zamjenjuju se bilokularnim, a možda čak i trilokularnim želucima. Istovremeno, smanjuje se udio želučane sluznice obložene žljezdanom sluznicom, dok se povećava površina nežljezdanog višeslojnog pločastog epitela. Duljina tankog crijeva se smanjuje, dok veličina slijepog i debelog crijeva raste. Složenost slijepog crijeva povećava se formiranjem vrećica, proširenja i spiralnih nabora, dok se u proksimalnom dijelu debelog crijeva dodatno javlja s prisutnošću ampula, koso postavljenih nabora i većim brojem zavoja dvostruke spirale.

Vorontsov (1962.) tvrdi da navedeni trendovi ukazuju na promjenu u hranidbi - prelazak s energetski bogate, ali teško dostupne hrane poput beskralješnjaka i sjemenki, na manje energetski bogatu, ali lakše dostupnu hranu u obliku vegetativnih dijelova biljaka. Konkretno, podjela želuca na dva djelomično odvojena odjeljka i smanjenje količine žljezdane sluznice očekivano bi održavalo višu pH razinu u predželucu, što bi, omogućilo proces celulozne fermentacije. Međutim, Carleton (1973.; 1981.) tvrdi da složeni kutnjaci i prostrano slijepo crijevo podržavaju prilagodbu za konzumaciju strukturalnih dijelova biljaka i sjemenki. Kada se oljušte, sjemenke se mogu učinkovito usitniti pomoću tih kutnjaka, a povišeni pH u predželucu omogućuje produljeno djelovanje amilaze iz sline na škrob. što omogućuje glodavcima da koriste raznovrsnu hranu, uključujući vegetativne i reproduktivne dijelove biljaka, umjesto da su usko specijalizirani samo za određene vrste hrane.

### 2.2.3. Oblici i brzina probave

Precizno mjerenje brzine probave uvelike pridonosi razumijevanju složenog odnosa između hranidbe i fiziologije probavnog sustava, posebice kod biljojeda (Sakaguchi, 2003.). Brzina probave igra ključnu ulogu u učinkovitom iskorištavanju hranjivih tvari iz biljaka, utječući na razgradnju biljnog materijala (Holland i sur., 2020.). Ova mjerenja doprinose boljem



razumijevanju kako biljojedi optimiziraju probavne procese za apsorpciju hranjivih tvari poput vlakana, bjelančevina i ugljikohidrata (Müller i sur., 2013.).

#### 2.2.3.1. Fermentatori stražnjeg crijeva (eng. *hindgut fermenters*)

Manje životinje, koje se hrane biljnim materijalom niske energetske vrijednosti ne mogu se u potpunosti osloniti na mikrobnu fermentaciju. Fermentacija se može odvijati u želucu, prije dijela koji izlučuje želučani sok, u debelom crijevu ili na oba mjesta istovremeno. Fermentacijska komora u debelom crijevu sastoji se od slijepog crijeva i/ili proksimalnog kolona. Termin "stražnje crijevo" (eng. *hindgut*) često se koristi kao sinonim za cijelo debelo crijevo, premda se embriološki odnosi samo na silazni kolon i rektum (Hume, 1999a.).

Mikroorganizmi u predželucu djeluju na sve komponente hrane koje ulaze u fermentacijsku komoru, uključujući hranjive tvari koje biljojed može probaviti vlastitim enzimima. U tom slučaju, mikrobna fermentacija često rezultira energetske gubitkom u rasponu od 10-20% ukupno dostupne energije i može dovesti do gubitka dušika u obliku amonijaka. Fermentatori stražnjeg crijeva imaju sposobnost probaviti dijelove hrane prije mikrobne fermentacije, smanjujući tako te gubitke (Björnhag, 1994.).

Maseno specifična energetska potreba homeotermnih životinja relativno je visoka i proporcionalna tjelesnoj masi<sup>(-0,25)</sup>, što znači da manji organizmi imaju veću energetske potrebu po jedinici tjelesne mase. Iznimke su jednootvori, tobočari, pećinari i ljenjivci, životinje s nižim metaboličkim stopama u odnosu na prosjek za njihovu veličinu. Na primjer, voluhar mase 25 g zahtijeva približno 12 puta više energije po kilogramu tjelesne mase u usporedbi s konjem mase 650 kg. To znači da voluhar mora unijeti barem 12 puta više hrane nego konj kada konzumiraju istu vrstu hrane. Posljedično, brzina prolaska hrane kroz probavni sustav je znatno veća kod manjih životinja, dok je brzina fermentacije jednaka kod malih i velikih životinja. Zbog toga se male životinje koje se hrane biljnim materijalima s niskom energetske vrijednosti ne mogu u potpunosti osloniti na mikrobnu fermentaciju. Fermentacija je prespora, a vrijeme zadržavanja hrane prekratko za proizvodnju dovoljnih količina energije koja bi bila dostupna domaćinu. Male biljojedne životinje moraju kombinirati autoenzimatsku probavu (pomoću vlastitih enzima) u prednjem crijevu s aloenzimatskom probavom (pomoću mikroorganizama) u debelom crijevu, što ih čini fermentatorima stražnjeg crijeva (Björnhag, 1994.).

Stražnje crijevo igra ključnu ulogu u posljednjoj fazi probave, gdje se apsorbiraju endogeni elektroliti i voda (Stevens i Hume, 1995.). Također, predstavlja glavno područje mikrobnе fermentacije kod većine biljojeda među gmazovima, pticama i sisavcima. Mikroorganizmi u probavnom traktu imaju sposobnost proizvodnje enzima za razgradnju celuloze, no upravo prisutnost staničnih stijenki biljnog materijala, koje uz celulozu sadrže i lignin, čini mikrobnу fermentaciju sporim procesom (Vaughan i sur., 2000.). Vrijeme zadržavanja ostataka hrane u takvim okolnostima je kratko, znatno kraće od vremena potrebnog mikroorganizmima za razmnožavanje. Stoga, vrijeme zadržavanja mikroorganizama u lumenu crijeva mora biti duže od vremena zadržavanja ostataka hrane; inače će preostati samo mikroorganizmi na stijenci crijeva. Mikroorganizmi se moraju odvojiti od ostataka hrane prije nego što budu izlučeni kao feces (Björnhag, 1994.).

Životinje koje prakticiraju fermentaciju hrane u stražnjem crijevu paralelno žvaču hranu tijekom unosa, pokrećući probavni proces pomoću enzima prisutnih u slini. Glavni dio probave odvija se putem enzimske aktivnosti u želucu i tankom crijevu, uz sudjelovanje enzima iz gušterače i žuči iz jetre. Nakon toga, hrana se prenosi iz tankog crijeva u slijepo crijevo, gdje velike čestice ulaze u debelo crijevo u kojem mikroorganizmi vrše fermentaciju (Langer, 2002.).

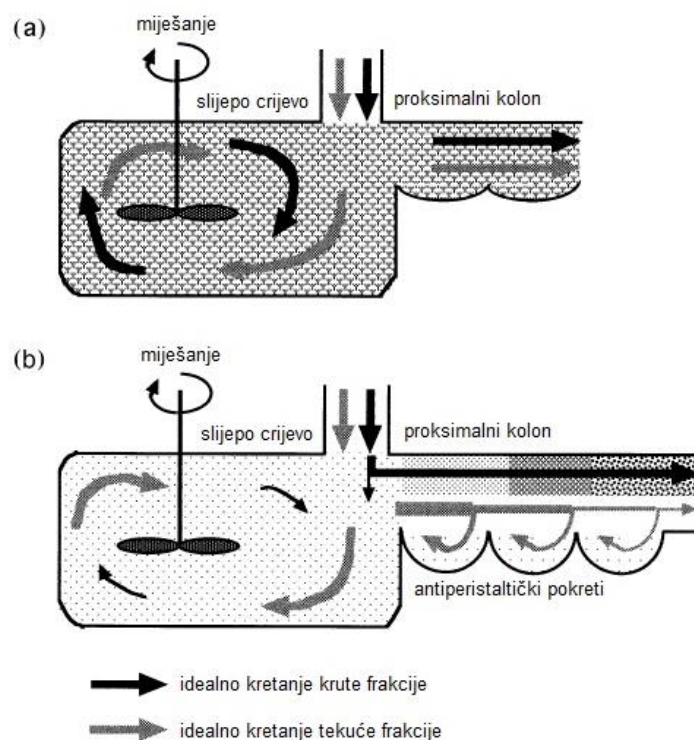
Frakcija probavljene hrane s niskom probavljivošću nije pogodna za fermentaciju kod malih životinja, budući da je potrebno vrijeme fermentacije predugo. Samo frakcije koje se lakše probavljaju trebale bi biti zadržane zajedno s mikroorganizmima, što ukazuje na potrebu za razdvajanjem različitih frakcija probavljene hrane. Zadržane frakcije probavljene hrane vraćaju se u slijepo crijevo, ili se preusmjeravaju prema njemu, čime se usmjerava probavni proces na frakcije s većim potencijalom za fermentaciju. Mnogi mali biljojedi razvili su anatomske i funkcionalne prilagodbe u debelom crijevu kako bi omogućili razdvajanje različitih frakcija i retrogradni protok. Takve prilagodbe nazivaju se mehanizmima razdvajanja u kolonu (CSM) (Sperber i sur., 1983.; Björnhag, 1987.)."

Životinje koje obavljaju fermentaciju hrane u stražnjem dijelu probavnog sustava mogu se dodatno klasificirati kao fermentatori slijepog crijeva (eng. *caecum fermenters*) ili fermentatori debelog crijeva (eng. *colon fermenters*). Fermentatori slijepog crijeva obično su manji od fermentatora debelog crijeva (Hume, 1989.; Hume, 1999b.). U većine malih fermentatora

stražnjeg crijeva (tjelesna masa manja od 10 kg), slijepo crijevo služi kao glavna, a ponekad i jedina komora za fermentaciju (Hume i Warner, 1980.).

### 2.2.3.2. Mehanizmi separacije u kolonu

Približno trećina ukupne dužine debelog crijeva (kolona) odnosi se na proksimalni kolon, gdje se sluznica savija, stvarajući brazdu u kojoj se odvajaju bjelančevine i sitne čestice od težeg, probavljivog sadržaja. Koncentracija bakterija i dušika u spomenutoj brazdi dvostruko je veća nego u lumenu (Holtenius i Björnhag, 1985.). Hranjive tvari iz proksimalnog kolona potom se vraćaju natrag u slijepo crijevo radi daljnje fermentacije pod utjecajem bakterija i praživotinja kao dio mehanizma separacije u debelom crijevu (eng. *colonic separation mechanism, CSM*) (Holtenius i Björnhag, 1985.), dok se teško probavljive tvari eliminiraju putem fecesa (O'Malley, 2005.) (Slika 23.).



Slika 23. Mogući modeli protoka probavljene hrane u slijepom crijevu i proksimalnom kolonu. (a) je model bez selektivne retencije probavljene hrane. Tekuća i kruta frakcija zajedno se kreću kroz cijeli probavni sustav; (b) je model selektivne retencije tekuće frakcije u slijepom crijevu. Tekuća frakcija prenosi se iz proksimalnog kolona u slijepo crijevo putem mehanizma separacije naziva "ponovno ispiranje". Preuzeto i prilagođeno iz Sakaguchi, 2003.

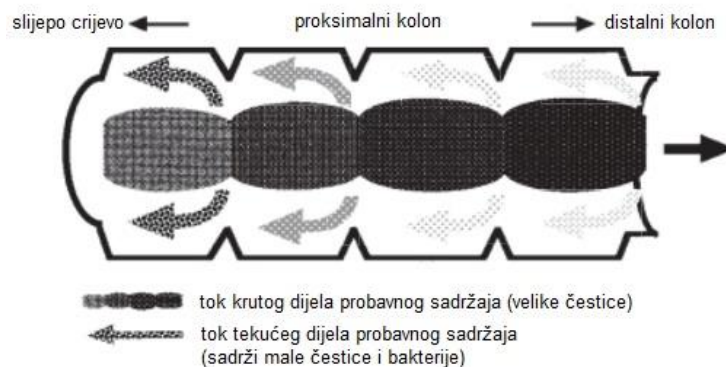
Mehanizam separacije u debelom crijevu (CSM) je prilagodba probavnog sustava koja omogućuje razdvajanje mikroorganizama i malih čestica od neprobavljivih tvari. CSM olakšava

brz prijenos teže probavljive hrane uz paralelno zadržavanje mikroorganizama i lako probavljivih čestica hrane u slijepom crijevu za fermentaciju (Sperber i sur., 1983.; Björnhag, 1987.; Franz i sur., 2011.).

Razlikuju se dvije vrste CSM-a:

1. Ponovno ispiranje (eng. *wash-back*)

Prisutne su male čestice, a vrijeme zadržavanja tekućine je dugotrajno, što rezultira stvaranjem dvije različite vrste fecesa: tipične tvrde kuglice fecesa koje se izlučuju, te mekih cekotrofa koji sadrže visoku razinu dušika i određene vitamine. Životinja konzumira cekotrofe kako bi dodatno apsorbirala hranjive sastojke. Ovaj tip CSM-a lokaliziran je u proksimalnom dijelu debelog crijeva, što omogućava ispiranje tekućine, bakterija i malih čestica natrag u slijepo crijevo (Franz i sur., 2011.) (Slika 24.). Navedeni mehanizam prisutan je kod dvojezubaca.

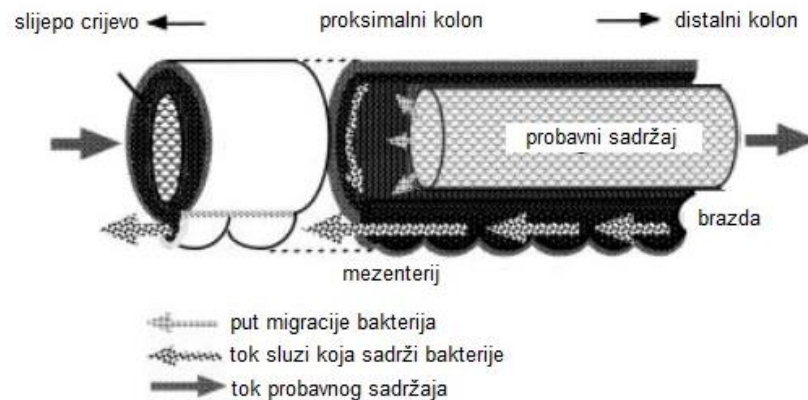


Slika 24. Shematski prikaz tipa mehanizma separacije u debelom crijevu (eng. *colonic separation mechanism, CSM*) nazvanog "ponovno ispiranje" (eng. *wash-back*) opisuje proces vraćanja hranjivih tvari iz proksimalnog kolona u slijepo crijevo. Ovaj mehanizam omogućuje odvajanje finih čestica hranjivih tvari i bakterija od većih čestica nakon čega se prenose u slijepo crijevo putem antiperistaltičkog djelovanja. Veće čestice potom se guraju prema distalnom dijelu peristaltičkom aktivnošću debelog crijeva. Preuzeto i prilagođeno iz Sakaguchi, 2003.

2. Mukozna zamka (eng. *mucus trap*)

Ovaj mehanizam prisutan je kod glodavaca i određenih vrsta iz drugih razreda sisavaca, a sličan proces može biti prisutan i kod drugih kralješnjaka, kao što su gmazovi i ptice. U ovom specifičnom tipu CSM-a, formiraju se brazde u debelom crijevu gdje dolazi do zadržavanja sluzi i bakterija. Nakon toga, one se transportiraju natrag do slijepog crijeva putem

antiperistaltičkih pokreta na dnu brazde. Teže probavljive tvari putuju do distalnog crijeva radi izlučivanja (Holtenius i Björnhag, 1985.; Takahashi i Sakaguchi, 2006.) (Slika 25.).



Slika 25. Shematski prikaz tipa mehanizma separacije u debelom crijevu (eng. *colonic separation mechanism, CSM*) nazvanog "mukozna zamka" (eng. *mucus trap*) opisuje proces vraćanja bakterija iz probavnog sadržaja u proksimalnom dijelu debelog crijeva glodavaca. Bakterije prelaze iz probavnog sadržaja u sluz, koja se zatim kreće u brazdu. Kretanje mješavine sluzi i bakterija u brazdi usmjerava se u oralnom smjeru pomoću antiperistaltičkog kretanja brazde. Preuzeto i prilagođeno iz Sakaguchi, 2003.

Za razliku od prethodno spomenutog mehanizma ponovnog ispiranja, u mehanizmu mukozne zamke istodobno se izlučuje tekućina s česticama hrane, što rezultira malom vizualnom razlikom između izlučenog fecesa i hranjivog cektrofa koji glodavci ponovno probavljaju (Franz i sur., 2011.).

### 2.2.3.3. Koprofagija i cektrofija

Ponovno konzumiranje fecesa predstavlja značajan nutritivni proces kod mnogih životinja, koji se pojavljuje u dva različita oblika, što može uzrokovati nesporazume u literaturi. Neke životinje prakticiraju koprofagiju, pri čemu konzumiraju i tvrdi i mekani feces. Druge proizvode i ponovno konzumiraju specifičan tip fecesa, poznat kao "cektrof", koji je bogat hranjivim tvarima i korisnim mikroorganizmima (Björnhag i Sperber, 1977.). Izraz "cektrofija" odnosi se na ovaj specijalizirani oblik koprofagije, pri kojem životinje selektivno unose samo mekani feces proizveden u slijepom crijevu, koji ima jasno različit kemijski sastav u odnosu na tvrdi feces. Ipak, nije isključena mogućnost da će buduća istraživanja otkriti različite i posredne oblike konzumiranja fecesa u prirodi, što bi moglo dovesti do preispitivanja razlike između koprofagije i cektrofije (Hörnigke i Björnhag, 1980.).

Kvalitativna usporedba između fecesa koji se unosi (cekotrofi) i onog koji se ne unosi pokazala je da cekotrofi imaju viši sadržaj bjelančevina, minerala, vitamina i vlage te niži sadržaj vlakana (Guerra Aldrigui i sur., 2018a.; Guerra Aldrigui i sur., 2018b.). Ova separacija sadržaja završnog crijeva na frakciju bogatu bjelančevinama i frakciju bogatu vlaknima postiže se kod različitih vrsta kroz različite mehanizme separacije u debelom crijevu, koje su detaljno opisali Hume i Sakaguchi (1991.).

Cekotrofija se javlja kada je mehanizam za separaciju deaktiviran, što omogućuje ponovno konzumiranje mekanog fecesa od strane životinje što se događa kada je životinja u mirovanju ili tijekom noći, u vrijeme kada su probavni procesi sporiji. Ovaj proces smanjuje potrebu malih biljojeda za dušikom i esencijalnim aminokiselinama. Životinje koje prakticiraju cekotrofiju obično koriste miris, okus, vizualne signale ili socijalno učenje kako bi prepoznale feces koji sadrži hranjive tvari (Cork i Foley, 1991.).

#### 2.2.3.4. Metode istraživanja brzine probave

Kada se izrađuje model prolaska probave, ključna su tri elementa: markeri za probavu, eksperimenti na životinjama i matematički model. Kvantificiranje brzine probave uključuje pojmove vremena tranzita i vremena retencije. Vrijeme tranzita (eng. *transit time, TT*) definira se kao period između unosa markera u životinju (putem hranjenja ili injekcije) i njegove pojave u određenom dijelu probavnog sustava. Vrijeme retencije, s druge strane, odnosi se na trajanje zadržavanja određenog dijela probave unutar probavnog sustava (eng. *mean retention time, MRT*). Obzirom na različite procese koji se odvijaju u različitim dijelovima probavnog sustava, vrijeme zadržavanja može varirati između tih dijelova (Sakaguchi, 2003.).

Mjerenje brzine probave provodi se praćenjem markera koji prolaze kroz probavni sustav zajedno s ostatkom hrane. Za svako pojedinačno mjerenje, ključno je odabrati odgovarajući marker među mnogim raspoloživim vrstama markera (Sakaguchi, 2003.). Kod biljojeda, probavni proces često se podjednako odvija u krutoj i tekućoj frakciji, pa je za postizanje najboljih rezultata bitno izmjeriti oba dijela koristeći prikladne markere (Udén i sur., 1980.).

#### 2.2.3.5. Marker

Markeri igraju ključnu ulogu u kompartmentalnom modeliranju probavnog sustava, budući da model proizlazi iz informacija o njihovom prolasku kroz organizam. Iz tog razloga, naglašava se nužnost pouzdanih markera, a Faichney (1975.) upozorava na potencijalne pogreške pri

njihovom odabiru. Značaj markera očituje se u boljem razumijevanju razmjera probave i vremena zadržavanja polutekuće želučane kaše (himusa) u različitim dijelovima probavnog sustava. Obzirom na to da obujam probave ovisi o brzini probave i dostupnom vremenu za probavu, precizne procjene vremena zadržavanja himusa postaju od izuzetne važnosti (Faichney, 1975.).

Povijest markera obuhvaća inertne markere koji se koriste već desetljećima za procjenu probavljivosti i brzine proizvodnje fecesa (Rittenhouse i sur., 1982.). Raznolikost markera, od staklenih kuglica do radioaktivnih nuklida, posljedica je nedostatka suglasnosti o najučinkovitijem markeru (Kotb i Luckey, 1972.). Kotb i Luckey (1972.) klasificiraju markere u tri osnovne kategorije: elementi, spojevi i čestice. Nadalje, razlikuju apsorbirajuće markere iz urina od neapsorbirajućih markera iz fecesa.

Vanjski markeri obuhvaćaju umjetne tvari koje se daju životinji, dok su unutarnji markeri neprobavljive komponente hrane koje se kvantificiraju u fecesu (poput lignina i celuloze). Uvjeti za topive markere, koje su postavili Warner i Stacy (1968.), naglašavaju važnost netoksičnosti, neapsorpcije na čestice ili stanice tkiva te odsutnosti metabolizma. Kriteriji za korištenje markera u hranidbenim istraživanjima uključuju potpunu obnovljivost (Offer i sur., 1972.).

Najopsežniji opis kriterija idealnog markera daju Kotb i Luckey (1972.): "Da bi tvar mogla biti marker u hranidbenim istraživanjima, trebala bi biti inertna, bez toksičnih, fizioloških ili psiholoških učinaka; ne bi se smjela apsorbirati niti metabolizirati unutar probavnog trakta te bi se stoga morala potpuno oporavljati iz sirove ili obrađene hrane; ne bi smjela imati značajnu masu; morala bi se miješati s uobičajenom hranom i ostati ravnomjerno raspoređena u himusu; ne bi smjela utjecati na lučenje, probavu, apsorpciju, normalnu pokretljivost probavnog trakta ili izlučivanje; ne bi smjela utjecati na mikrofloru probavnog trakta važnu za domaćina; trebala bi imati svojstva koja omogućuju lako, precizno kvantitativno mjerenje i fizičko-kemijska svojstva koja ju čine prepoznatljivom tijekom cijelog probavnog procesa." Young i sur. (1976.) ističu važnost pouzdanih markera, dok Udén i sur. (1980.) naglašavaju prioritete u zahtjevima za markere korištene u mjerenjima brzine prolaska.

Dobre rezultate u mjerenju tekuće frakcije probave postižu se primjenom Cr-mordantiziranih vlakana i Co-EDTA. Stabilnost ovih kompleksa u uvjetima prisutnim u probavnom sustavu

životinja je visoka, a prisutni su u znatnom postotku (Udén i sur., 1980.). Ovi kompleksi, zajedno sa staničnim stijenkama označenim metalnim ionima, mogu se iskoristiti za računanje vremena zadržavanja tekuće frakcije u rumenu (predželucu preživača) ili slijepom crijevu životinja (Pei i sur., 2001a.). Co-EDTA može se pripremiti kao litijeva ili natrijeva sol Co(III)-EDTA.

Stanične stijenske priređuju se tretiranjem biljnog materijala deterdžentom (i po potrebi amilazom, ako biljka sadrži veći udio škroba) kako bi se uklonili topivi materijali koji bi mogli reagirati s metalima. Nakon pažljivog ispiranja, pripremljena biljna vlakna označavaju se kromom (Udén i sur., 1980.).

Markeri se zatim mogu dodati životinjama, primjerice, u komadiću hrane poput jabuke, a nakon njihova unosa u organizam slijedi prikupljanje fecesa u određenim vremenskim intervalima. Za detekciju markera u fecesu koriste se metode poput plamene apsorpcijske spektroskopije. Brzina probave potom se statistički izračunava na temelju dobivenih rezultata. Stanične stijenske, odnosno kruta frakcija probave, označavaju se s Cr, dok se tekuća frakcija probave označava s Co-EDTA (Pei i sur., 2001b.).

#### 2.2.4. Fiziologija probave

Probava (digestija) složen proces sastavljen od mehaničkih, kemijskih, sekretornih i mikrobioloških reakcija koje transformiraju hranu u oblik pogodan za apsorpciju iz probavnog trakta u krv (Bornhorst i sur., 2016.).

Osnovne organske komponente u biljkama i životinjama uključuju ugljikohidrate, mast, bjelančevine i nukleinske kiseline. Ugljikohidrati služe kao primarni izvor energije koji se brzo metabolizira za potrebe organizma, masti su zadužene za dugoročnu pohranu energije, bjelančevine čine osnovne građevne jedinice stanica, dok nukleinske kiseline sadrže genetske informacije (Voet i sur., 2016.).

Većina ovih organskih komponenata ima velike molekule. Čak i najmanji, poput šećera, imaju molekulsku masu od nekoliko stotina daltona. Bjelančevine variraju u veličini, s molekulskim masama od 100 000 do nekoliko milijuna daltona, dok su škrob i celuloza polimeri malih ugljikohidratnih jedinica. Bez obzira na to koristi li se hrana za gorivo ili za izgradnju i održavanje, velike molekule hrane prvo se razgrađuju na jednostavnije jedinice, koje se zatim



apsorbiraju i/ili ugrađuju u tijelo ili metaboliziraju kako bi se stvorila energija. Glavna funkcija probave je razgradnja velikih i složenih molekula u hrani kako bi bile apsorbirane i postale dostupne za korištenje u tijelu. Ovaj proces odvija se u probavnom traktu uz pomoć enzima, koji čine temeljni građevni blok živih organizama, omogućujući im rast, razvoj i održavanje životnih funkcija (Berg i sur., 2004.).

Mehanički procesi, poput žvakanja, gutanja, probave u želucu te probave i apsorpcije u tankom crijevu, ključni su za pripremu hranjivih tvari koje će sluznica probavnog trakta moći apsorbirati. Mehanička probava započinje žvakanjem u ustima, gdje se hrana fizički razgrađuje i miješa sa slinom koja sadrži enzime (Marieb i Hoehn, 2018.). Proces se nastavlja u želucu, gdje se hrana dalje razgrađuje i miješa sa želučanim sokovima, stvarajući himus (Silverthorn, 2019.). U tankom crijevu dolazi do segmentacije, lokaliziranih kontrakcija koje dodatno razgrađuju i miješaju hranu s probavnim sokovima, olakšavajući apsorpciju hranjivih tvari (Hall i sur., 2017.).

Kemijski procesi se odvijaju uz posredovanje probavnih enzima koje stvaraju žlijezde probavnog trakta. Enzimi ubrzavaju probavne procese bez promjene vlastite strukture, djelujući kao biokatalizatori (Marieb i Hoehn, 2018.). Enzimi poput amilaze, pepsina i lipaze razgrađuju velike molekule hrane u manje, apsorbirajuće jedinice. Na primjer, amilaza razgrađuje ugljikohidrate u monosaharide, pepsin razgrađuje bjelančevine u aminokiseline, a lipaza razgrađuje masti u masne kiseline i glicerol (Silverthorn, 2019.). Sekretorni procesi uključuju lučenje probavnih i mukoznih žlijezda, stvarajući optimalno okruženje za probavu (Hall i sur., 2017.). Mikrobiološki procesi uključuju crijevnu mikrofloru koja fermentira neprobavljive ugljikohidrate, sintetizira vitamine i igra ključnu ulogu u održavanju zdravlja probavnog sustava (Flint i sur., 2012.).

#### 2.2.4.1. Izvanstanična i unutarstanična probava

Prema lokalizaciji enzimske aktivnosti, probavu se može klasificirati kao izvanstaničnu i unutarstaničnu (Ugolev, 1965.). Izvanstanična probava uključuje enzime koji djeluju izvan stanica. Primjerice, pepsin iz želuca i enzimi iz gušterače (amilaza, lipaza, proteaza) sudjeluju u razgradnji hrane u lumenu probavnog trakta (Sjaastad i sur., 2016.). Ovi enzimi razgrađuju makromolekule hrane (bjelančevine, masti, ugljikohidrate) u manje, apsorbirajuće jedinice.

S druge strane, unutarstanična probava obuhvaća razgradnju enzimima povezanim s unutarnjim strukturama stanica. Ova vrsta probave može se dalje podijeliti na procese koji se odvijaju unutar vakuola, citoplazme, specifičnih granula ili na unutrašnjoj površini stanične membrane. Enzimi koji sudjeluju u ovoj vrsti probave mogu biti sintetizirani unutar stanice, ali djeluju izvan nje, kao što je slučaj s invertazom u želučanim žlijezdama (Dahlqvist i Brun, 1962.).

Mikrovili i nabori crijevne sluznice igraju ključnu ulogu u ovoj vrsti probave, omogućujući razgradnju molekula na manje komponente koje zatim prolaze kroz pore i ulaze u stanicu putem aktivnog ili pasivnog transporta, gdje se nastavlja intracelularna probava (Ugolev, 1965.). Intenzitet intracelularne probave ovisi o različitim čimbenicima, uključujući pokretljivost probavnog sustava, veličinu pora između mikrovila te razvijenost i sastav enzimatskog sloja (Sjaastad i sur., 2016.; Ugolev, 1965.).

Izvanstanična probava omogućuje unos i razgradnju velikih komada hrane unutar probavnog trakta, dok je intracelularna probava ograničena na manje čestice koje stanice mogu apsorbirati. Izvanstanična probava pruža prednost u kontekstu unosa velikih molekula hrane, dok intracelularna probava osigurava detaljnu razgradnju i apsorpciju hranjivih tvari na staničnoj razini (Sjaastad i sur., 2016.).

#### 2.2.4.2. Enzimatska (kemijska) probava

Većina spojeva hrane su vrlo velike molekule poput bjelančevina, netopive u vodi kao što su masti, ili su velike i netopive poput škroba i celuloze. Prije nego što se hranjive tvari mogu apsorbirati i iskoristiti, potrebno ih je pretvoriti u topivu formu i razložiti na manje komponente (Pintiće i sur., 2016.).

Bjelančevine, škrob i celuloza su polimeri sastavljeni od jednostavnijih građevnih blokova. Masti su esteri masnih kiselina i glicerola, formirani uklanjanjem vode (Voet i sur., 2016.). Razgradnja ovih sastojaka hrane na jednostavnije komponente uključuje dodavanje vode u procesu koji se naziva hidroliza. Hidroliza je spontana reakcija koja oslobađa energiju u obliku topline, no bez katalizatora odvija se vrlo sporo (Berg i sur., 2004.).

Enzimi su biološki katalizatori koje proizvode živi organizmi i ključni su za sve probavne procese. Gotovo svi metabolički procesi unutar stanica ovise o enzimima (Nelson i Cox, 2005.). Temperatura i pH snažno utječu na enzimatsku aktivnost. Enzimi za probavu, poput pepsina i

tripsina, imaju optimalne pH vrijednosti u kiselim, odnosno blago alkalnim otopinama. Pepsin najbolje djeluje pri niskom pH u želucu, dok tripsin djeluje u blago alkalnom pH tankog crijeva (Garrett i Grisham, 2005.). Umjereno povećanje temperature može ubrzati reakciju, dok previsoke temperature mogu denaturirati enzime i inaktivirati ih (Nelson i Cox, 2005.). Većina enzima gubi aktivnost na temperaturama iznad 45-50 °C, no postoje iznimke koje mogu izdržati više temperature (Voet i sur., 2016.).

#### 2.2.4.2.1. Probava ugljikohidrata

Membrana stanice nije propusna za ugljikohidrate veće molekulske mase i složenije strukture. Hidroliza takvih molekula odvija se kombinacijom izvanstanične i unutarstanične probave. Važno je napomenuti da ove molekule brzo napuštaju crijevni lumen, što znači da je njihova koncentracija niska u crijevnim sadržajima, dok je visoka u stijenci crijeva, sugerirajući ključnu ulogu stanične probave (Ugolev, 1965.).

Probava ugljikohidrata slična je kod kralješnjaka i beskralješnjaka. Jednostavni šećeri poput glukoze i fruktoze apsorbiraju se nepromijenjeni, direktno koristeći standardne metaboličke puteve. Disaharidi, kao što su saharoza iz biljaka ili laktoza iz mlijeka, razgrađuju se do monosaharida prije apsorpcije i uporabe u tijelu. Enzim sukraza luči se u crijevima, ali nije prisutan u staničnim mehanizmima životinja. Stoga, ako se saharoza ubrizga u tijelo kralješnjaka, izlučuje se potpuno nepromijenjena u mokraći (Dahlqvist i Brun, 1962.). Velik broj biljaka koristi škrob kao svoju glavnu energetska rezervu. Škrob je složeni spoj sastavljen od glukoznih jedinica, koje su povezane u polimer. Iako je škrob obično netopiv, podložan je hidrolizi enzimom amilazom. Ovaj enzim nalazi se u ljudskoj slini (kao i kod nekih sisavaca) i proizvodi ga gušterača u većim količinama.

Unatoč relativnoj netopivosti, škrob se dobro probavlja kod mnogih životinja. Vrlo je vjerojatno da bakterije igraju ulogu u početnoj razgradnji škroba kod mnogih životinja koje lako probavljaju sirovi škrob, olakšavajući amilazi njegovu daljnju razgradnju (BeMiller i Whistler, 2009.). Ugljikohidratni ostaci dospijevaju u debelo crijevo, gdje ih bakterije probavljaju i koriste za svoje potrebe, proizvodeći kratkolančane masne kiseline koje se mogu apsorbirati i iskoristiti kao izvor energije (Cummings i Stephen, 1980.).

Celuloza, glukozni polimer, predstavlja ključni strukturalni materijal biljaka poznat po svojoj iznimnoj netopivosti i otpornosti na kemijske agense. Kod kralješnjaka, enzimi za razgradnju

celuloze, poznati kao celulaze, nisu prisutni u probavnim izlučevinama, no unatoč tome mnogi kralješnjaci ovise o celulozi kao glavnom izvoru energije. Dok su prave celulaze zabilježene u crijevima nekoliko beskralješnjaka koji se hrane drvenastim i sličnim biljnim materijalima, u mnogim slučajevima probava celuloze odvija se posredstvom simbiotskih mikroorganizama koji nastanjuju probavni trakt svog domaćina (Van Soest, 1964.).

Mnogi sisavci su biljojedi, a većina se hrani hranom koja zahtijeva probavu celuloze. Preživači posjeduju posebno prilagođeni probavni sustav koji je usko povezan sa simbiotskom probavom celuloze. S druge strane, mnogi sisavci koji nisu preživači također ovise o simbiotskim mikroorganizmima za probavu celuloze, unatoč različitim anatomskim prilagodbama u odnosu na prave preživače (Hungate, 1966.; Stevens i Hume, 1995.).

#### 2.2.4.2.2. Probava bjelančevina

Bjelančevine su polimeri sastavljeni od aminokiselina povezanih peptidnim vezama. Aminokiselina je relativno jednostavna organska kiselina koja na ugljikovom atomu odmah uz kiselinsku skupinu (karboksilnu skupinu,  $-\text{COOH}$ ) ima amino skupinu ( $-\text{NH}_2$ ). Peptidna veza formira se uklanjanjem vode između karboksila jedne aminokiseline i aminogrupe druge. Postoji oko 20 uobičajenih aminokiselina koje se u različitim omjerima pojavljuju u gotovo svim živim organizmima. Kada se bjelančevine hidroliziraju u aminokiseline, ove aminokiseline postaju osnovne građevne jedinice potrebne za sintezu gotovo svake specifične bjelančevine (Nelson i Cox, 2005.).

Enzimi odgovorni za probavu bjelančevina dijele se u dvije skupine ovisno o mjestu njihovog djelovanja na molekulu. Egzopeptidaze hidroliziraju terminalne peptidne veze u dugim peptidnim lancima, dok endopeptidaze djeluju unutar peptidnog lanca (Voet i sur., 2016.). Dvije najpoznatije endopeptidaze u probavi kralješnjaka su pepsin i tripsin.

Pepsin se izlučuje u želucu kralješnjaka u obliku neaktivnog prekursora, pepsinogena, koji se u kiselom okolišu želuca aktivira samostalno, stvarajući aktivni enzim, pepsin. Pepsin specifično hidrolizira peptidne veze između aminokiseline koja nosi fenilnu skupinu (tirozin ili fenilalanin) i dioksične kiseline (glutaminska ili asparaginska kiselina) (Garrett i Grisham, 2005.). Tripsin, izlučen iz gušterače u neaktivnom obliku tripsinogena, aktivira se u crijevima pomoću enzima enterokinaze, koji se izlučuje iz žlijezda u stijenci crijeva. Tripsinogen se također aktivira od strane aktivnog tripsina, što je poznato kao autokatalitička aktivacija.

Tripsin najbolje djeluje u blago alkalnom pH-u, između 7 i 9, i hidrolizira peptidne veze susjedne baznim aminokiselinama (lizinu ili argininu) (Nelson i Cox, 2005.). Fragmenti bjelančevina i peptidni lanci formirani djelovanjem pepsina i tripsina dalje se razgrađuju uz pomoć egzopeptidaza, koje djeluju samo na terminalnim peptidnim vezama. Karboksipeptidaza, izlučena iz gušterače, hidrolizira terminalne peptidne veze uz slobodnu karboksilnu skupinu, dok aminopeptidaza, izlučena iz crijeva, hidrolizira peptidne veze uz slobodnu amino skupinu. Na kraju, dipeptidaze hidroliziraju peptidnu vezu fragmenata koji se sastoje od samo dvije aminokiseline (Berg i sur., 2004.).

Probava bjelančevina kod nepreživača inicira se u želucu i nastavlja u tankom crijevu, dok kod preživača probava u predželucima pod utjecajem mikroorganizama ima nastavak u sirištu i crijevima. Nepomični vodeni i zaštitni sloj, također poznati kao eng. *unstirred water layer* (UWL), tanka je slojevita zona tekućine koja se nalazi uz stijenke crijeva. Ovaj sloj ima nekoliko ključnih funkcija u probavnom sustavu, uključujući zaštitu enterocita i prisutnost enzima dipeptidaza, koji su sposobni razgraditi određene dipeptide u aminokiseline prije njihove apsorpcije. Aminokiseline se pojavljuju kao lijevi i desni izomeri, a L-izomeri se brzo resorbiraju aktivnim transportom uz pomoć specifičnih prenositelja koji istovremeno unose  $\text{Na}^+$  (Stevens i Hume, 1995.). D-aminokiseline se resorbiraju isključivo pasivno. U enterocitima tankog crijeva moguće je resorbirati tripeptide i dipeptide, koji se zatim razgrađuju u aminokiseline u citoplazmi. Manji dio aminokiselina podvrgnut je procesu oksidacije u stanicama, a energija koja se generira koristi se za sintezu neproteinskih spojeva (Nelson i Cox, 2005.).

Kod svih sisavaca, uključujući preživače, bakterije u debelom crijevu igraju ključnu ulogu u probavi neprobavljenih bjelančevina i ugljikohidrata. Kod preživača, bjelančevine koji dospiju u tanko crijevo, a izbjegnu probavu u predželucima (do 5%), dolaze u debelo crijevo gdje ih bakterije probavljaju. Tijekom tog procesa dolazi do deaminacije, pri čemu se amonijak resorbira i ulazi u portalni krvotok (Hungate, 1966.). U tankom crijevu preživača, bjelančevine i polipeptidi potječu od hrane, endogenih izvora probavnih sokova i odumrlih stanica (Hume i Warner, 1980.).

#### 2.2.4.2.3. Probava masti

Obične masti, bilo biljnog ili životinjskog podrijetla, sastoje se od estera formiranih između jedne molekule glicerola (trivalentnog alkohola) i tri molekule dugolančanih masnih kiselina.

Budući da su izrazito teško topive u vodi, njihova hidroliza nije laka (Voet i sur., 2016.). Gušterača kralješnjaka luči enzim za hidrolizu masti, lipazu, ali da bi došla u kontakt s mastima, potrebna je pomoć 'deterdženta' – u ovom slučaju, žučnih kiselina izlučenih iz jetre. Žučne kiseline djeluju kao biološki deterdžent koji razgrađuje velike masne kapljice u manje, omogućujući njihovo emulgiranje, što zajedno s mehaničkim pokretima crijeva omogućuje lipazi učinkovitiju razgradnju masti (Berg i sur., 2004.).

Tijekom hidrolize, masne kiseline, koje su također relativno netopljive, održavaju se u crijevnom sadržaju uz pomoć žučnih soli, čime postaju sposobne za apsorpciju. Glicerol, koji je uobičajeni međuproizvod u gotovo svim staničnim metabolizmima, topljiv je u vodi i lako se apsorbira i metabolizira (Nelson i Cox, 2005.). Masne kiseline nastaju hidrolizom triglicerida, pri čemu se odcjepljuju od glicerola. Iako se većina masti mora hidrolizirati prije apsorpcije, neke se masti mogu apsorbirati crijevnim epitelom i bez prethodne hidrolize. Male kapljice koje se stvaraju tijekom emulgiranja masti pomoću žuči direktno apsorbiraju epitelne stanice (Garrett i Grisham, 2005.).

Kod monogastričnih životinja, monogliceroli, masne kiseline, kolesterol i liposolubilni vitamini apsorbiraju se kroz apikalne membrane enterocita u citoplazmu. Masne kiseline s 10–12 ugljikovih atoma izravno ulaze u krv, dok se masne kiseline s više od 10–12 ugljikovih atoma reesterificiraju u triacilgliceride nakon apsorpcije u enterocitima (Nelson i Cox, 2005.). Svi ovi spojevi apsorbiraju se pasivnom difuzijom u limfu.

U enterocitima nastaju triacilgliceroli iz monoglicerola i slobodnih masnih kiselina, kao i iz glicerol-trifosfata koji se stvara tijekom glikogenolize. Tada se formiraju 1,2-digliceroli, trigliceroli i glicerofosfolipidi (Voet i sur., 2016.). Spojevi triglicerola i glicerofosfolipida koji stignu u Golgijev aparat kombiniraju se i stvaraju proteinsku ovojnicu, tvoreći hilomikrone. Ovi hilomikroni se izbacuju iz stanice egzocitozom, prvo ulaze u limfu, a zatim u krvotok (Berg i sur., 2004.). Liposolubilni vitamini apsorbiraju se u enterocitima tijekom razgradnje micela u području mikrovila stanične membrane u obliku vitaminskih estera. Najveći udio apsorpcije masti odvija se u prednjem dijelu tankog crijeva (Nelson i Cox, 2005.).

Kod preživača, razgradnja masti započinje već u predželucima pod utjecajem mikroflore, gdje se hidroliziraju triacilgliceridi, galaktogliceridi i druge masti. U predželucima ne dolazi do

razgradnje dugolančanih masnih kiselina. Slobodne dugolančane masne kiseline i fosfolipidi iz mikroorganizama apsorbiraju se u tankom crijevu (Hungate, 1966.).

#### 2.2.4.3. Probavljivost

Probavljivost je kvantifikacija probavnog procesa, pružajući relativnu mjeru u kojoj je hrana, zajedno s njezinim hranjivim komponentama, probavljena i apsorbirana od strane životinje (McDonald i Warner, 1975.). Samo određeni postotak konzumirane hrane se probavi i njezine se hranjive tvari apsorbiraju, dok se preostali dio izlučuje u obliku fecesa. Ovaj proces određuje koliki postotak konzumirane hrane zaista koristi organizam, osiguravajući nutritivno uravnoteženu hranidbu koja će biti učinkovito iskorištena (Dijkstra i sur., 1993.).

Organizam životinja nije u mogućnosti u potpunosti iskoristiti sve hranjive tvari iz konzumirane hrane, već samo određeni udio. Tijekom procesa probave, hranjive tvari poput ugljikohidrata, bjelančevina i masti razgrađuju se u oblik koji probavni sustav životinje može apsorbirati. Ono što ostane neprobavljeno izlučuje se iz tijela kao feces. Uz neprobavljene ostatke hrane, iz tijela se izbacuju i ostaci želučanih i crijevnih sokova, sluzi, epitelne stanice iz crijeva te djelomično i mikroorganizmi (Van Soest, 1964.). Stoga je ključno imati saznanja o probavljivosti sastojaka i konačnog proizvoda prilikom formuliranja hranidbe, čime se osigurava da se hrana lako probavlja i koristi na optimalan način (Dijkstra i sur., 1993.).

Organizam apsorbira različite količine hranjivih tvari, a to ovisi o svojstvima probavnog sustava, kvaliteti hrane, vrsti i dobi životinje te drugim čimbenicima (Dijkstra i sur., 1993.). Primjerice, probavljivost hrane može biti različita kod mladih i odraslih životinja zbog razlika u enzimatskoj aktivnosti i brzini prolaska hrane kroz probavni trakt. Kvaliteta hrane, uključujući njezin sastav i način pripreme, također igra važnu ulogu u probavljivosti (McDonald i Warner, 1975.).

##### 2.2.4.3.1. Određivanje probavljivosti

Probavljivost hrane mjeri se koeficijentom probavljivosti, koji se izražava u postotnim udjelima. Da bi se dobila ova vrijednost, utvrđuje se količina hranjivih tvari u obroku korištenjem kemijskih analitičkih metoda, a također se analizira njihov sadržaj u fecesu. Razlika između utvrđene količine hranjivih tvari u obroku i fecesu pokazuje koliko je organizam iskoristio. Ako se ta razlika izrazi kao postotak ukupne količine hranjivih tvari u obroku životinje, dobiva se koeficijent probavljivosti hranjivih tvari. Ova razlika u kemijskom

sastavu unesene hrane i fecesa odražava stupanj probavljivosti hranjivih tvari (McDonald i Warner, 1975.; Van Soest, 1964.).

Koeficijenti probavljivosti omogućuju kvantifikaciju probavljivosti. Za određenu hranu mogu se definirati prividni koeficijent probavljivosti (ADC) i stvarni koeficijent probavljivosti (TDC) na sljedeći način:

$$\text{ADC (\%)} = \frac{\text{pojedeni (g)} - \text{feces (g)}}{\text{pojedeni (g)}} \times 100$$

$$\text{TDC (\%)} = \frac{\text{pojedeni (g)} - \text{feces (g)} - \text{endogeni feces (g)}}{\text{pojedeni (g)}} \times 100$$

ADC ovisi o fiziološkom stanju i brzini unosa, dok TDC uglavnom ovisi o vrsti hranidbe i probavnoj sposobnosti vrste (Stanković, 2006.). Endogeni feces odnosi se na dio fecesa koji se sastoji od tvari proizvedenih unutar tijela, uključujući želučane i crijevne sokove, sluz, epitelne stanice iz crijeva te mikroorganizme koji čine dio crijevne flore. Ove komponente, zajedno s neprobavljenim ostacima hrane, čine ukupni feces koji se izbacuje iz tijela (Van Soest, 1964.).

Alternativni pristup određivanju koeficijenta probavljivosti koristi metodu indikatora. Ova metoda koristi tvari koje su nefunkcionalne u procesima probave i ne mogu se apsorbirati, poput  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  i  $\text{SiO}_3$ . Koeficijent probavljivosti izračunava se na temelju koncentracije ovih indikatora u hrani i fecesu. Ova metoda omogućava utvrđivanje probavljivosti uzimanjem reprezentativnih uzoraka, čime se smanjuje potreba za prikupljanjem svih količina hrane i fecesa (Stanković, 2006.).

$$\text{K. P} = 100 - \frac{\% \text{ indikatora u hrani} \times \% \text{ hranjive tvari u fecesu}}{\% \text{ indikatora u fecesu} \times \% \text{ hranjive tvari u hrani}} \times 100$$

Analiza probavljivosti hrane dodatno se komplicira činjenicom da probavni sustav izlučuje tvari koje su već prošle kroz procese probave i resorpcije, uključujući probavne sokove. Ova okolnost može umanjiti preciznost stvarnog stupnja ili koeficijenta probavljivosti. Te razlike se posebno primjećuju kada je riječ o mineralima, kao što je fosfor (McDonald i Warner, 1975.).



Ključni čimbenik koji znatno utječe na probavljivost određene hrane jest udio sirove vlaknine (celuloze) u suhoj tvari. Što je veći udio sirovih vlakana u hrani, to je manja probavljivost te hrane (Van Soest, 1964.). Koeficijent probavljivosti također ovisi o sastavu obroka, načinu pripreme hrane (sjeckanje, mljevenje, peletiranje, termička obrada itd.). U situacijama kada životinje pate od probavnih smetnji, poput proljeva, opaža se smanjenje koeficijenta probavljivosti hrane i njenih komponenata (Stanković, 2006.).

Praktično gledano, koeficijent probavljivosti ima značajnu ulogu. Kapacitet konzumiranja hrane kod životinja je ograničen, a visoke potrebe za hranjivim tvarima, posebice tijekom razdoblja othrane mladunaca, mogu se zadovoljiti ponudom hrane s povećanom probavljivošću i koncentracijom hranjivih tvari (McDonald i Warner, 1975.).

#### 2.5.5. Obrazloženje teme

Unatoč relativno velikom broju istraživanja usmjerenih na filogenetiku i ekologiju dinarskog voluhara, vrlo malo se zna o njihovim hranidbenim navikama, a podaci o građi i fiziologiji probavnog sustava ove endemske vrste u potpunosti nedostaju. Istraživanja o drugim srodnim vrstama naglašavaju važnost razumijevanja ovih aspekata. Budući da dinarski voluhar zauzima specifičnu ekološku nišu u dinarskom području, pretpostavljamo da su razvili jedinstvene prilagodbe u probavnom sustavu koje omogućuju učinkovito iskorištavanje dostupnih hranidbenih resursa. Cilj ovog istraživanja je popuniti praznine u znanju o fiziologiji probavnog sustava dinarskog voluhara. Posebna pažnja usmjerena je na funkcionalnu anatomiju žvačnog sustava, morfolologiju, histologiju i histokemiju probavne cijevi, brzinu probave te probavljivost hrane. Ovi podaci omogućit će bolje razumijevanje specifičnih fizioloških prilagodbi ove vrste, što je ključno za njihovu zaštitu i očuvanje.

### 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ovo istraživanje pruža nove i dosad nepoznate uvide u morfološko-fiziološke karakteristike probavnog sustava dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), malog biljojednog glodavca iz potporodice Arvicolinae. Ciljevi su strukturirani u četiri sadržajne cjeline:

1. Proučavanje funkcionalne anatomije žvačnog sustava:
  - a) mjerenje maksimalne sile ugriza kod odraslih jedinki te usporedba vrijednosti između mužjaka i ženki radi istraživanja utjecaja spola i tjelesne mase na silu ugriza
  - b) analiza rasporeda i veličine žvačnih mišića, uključujući *m. masseter* i *m. temporalis* radi identifikacije specifičnih prilagodbi obzirom na prehrambene navike i ekološku nišu
  - c) istraživanje odnosa sile ugriza i tjelesne mase radi procjene biomehaničke efikasnosti žvačnog sustava u odnosu na prehrambene navike i ekološke niše.
2. Sveobuhvatna morfološka i histološka analiza probavnog trakta:
  - a) proučavanje morfološke strukture probavnog sustava i specifičnih morfoloških prilagodbi, poput povećane duljine probavnog trakta i specijalizacije tkiva, koje omogućuju učinkovitu probavu biljne hrane
  - b) detaljna histološka analiza probavnog trakta s naglaskom na debljinu i organizaciju različitih tkivnih slojeva (sluznice, podsluznice, mišićnog sloja) u različitim dijelovima probavnog sustava, kako bi se utvrdile prilagodbe za optimizaciju apsorpcije i probave, te histokemijska analiza s ciljem identifikacije specifičnih stanica (poput vrčastih stanica) i kemijskih tvari (npr. glikoproteina) prisutnih u različitim dijelovima probavnog trakta, s naglaskom na ulogu ovih stanica i tvari u zaštiti sluznice i sekreciji sluzi.
3. Istraživanje brzine probave:
  - a) određivanje osnovne brzine probave kod dinarskog voluhara primjenom fizikalnih markera (plastične trakice) te analiza razlika u brzini probave među spolovima i sezonama uzimajući u obzir tip prehrane
  - b) istraživanje mehanizama kolonske separacije primjenom kemijskih markera (Co-EDTA i Cr-mordantizirana vlakna) za određivanje brzine prolaska tekuće i krute frakcije kroz probavni sustav.

4. Analiza učinkovitosti probave:

- a) određivanje koeficijenta probavljivosti ključnih hranjivih tvari tijekom ljetnog režima hranidbe dinarskog voluhara, s ciljem procjene njihove sposobnosti probavljanja u uvjetima *ex situ*
- b) proučavanje razlika u sposobnosti probavljanja između mužjaka i ženki dinarskih voluhara.

#### 4. HIPOTEZE

##### Hipoteza 1a: Sila ugriza

Dinarski voluhar će pokazati prosječnu silu ugriza *in vivo*, tipičnu za biljojedne glodavce, koja će varirati među jedinkama različitog spola i tjelesne mase. Ova hipoteza temelji se na prethodnim istraživanjima koja ukazuju na biomehaničke kompromise između glodavaca specijaliziranih za grickanje i onih specijaliziranih za žvakanje, pri čemu se očekuje da biljojedi poput dinarskog voluhara imaju optimiziranu silu ugriza za konzumaciju biljne hrane.

##### Hipoteza 1b: Mišićna masa i morfologija žvačnih mišića

Očekuje se da će dinarski voluhar imati specifične prilagodbe u morfologiji i masi žvačnih mišića, s dominacijom određenih mišića poput *m. massetera* i *m. temporalisa*. Ove prilagodbe bi trebale reflektirati njihovu hranidbu i ekološku nišu, s većim udjelom mišića relevantnih za učinkovito žvakanje biljnog materijala.

##### Hipoteza 1c: Ekološke implikacije žvačnog sustava

Pretpostavlja se da su prilagodbe žvačnog sustava dinarskog voluhara ključne za njihovu egzistenciju unutar ekološke niše. Ove prilagodbe omogućuju efikasno iskorištavanje dostupnih hranidbenih resursa, što je važno za preživljavanje u specifičnim okolišima u kojima obitavaju.

##### Hipoteza 2a: Morfološke i histološke karakteristike probavnog trakta

S obzirom na filogenetsku pripadnost i biljojednu hranidbu dinarskog voluhara, očekuje se da će njihov probavni sustav pokazati specifične prilagodbe kao što su povećana duljina probavnog trakta ili specijalizacija tkiva.

##### Hipoteza 2b: Sastav i broj vrčastih stanica u različitim dijelovima probavnog trakta

Očekuje se da će raspodjela i broj vrčastih stanica varirati između tankog, debelog i slijepog crijeva, što će odražavati prilagodbe za optimizaciju sekrecije sluzi i zaštitu sluznice u različitim dijelovima probavnog trakta.

##### Hipoteza 3a: Sezonske i spolne razlike u brzini probave dobivene primjenom fizikalnih markera

Pretpostavlja se da kod dinarskog voluhara nema značajnih razlika u brzini probave između mužjaka i ženki te između različitih sezona (ljetnog i zimskog razdoblja).

### Hipoteza 3b: Mehanizam kolonske separacije

Dinarski voluhari primjenjuju mehanizam kolonske separacije sa razvijenim morfološkim strukturama za razdvajanje tekuće i krute frakcije probave, slično kao i drugi mali biljojedni sisavci.

### Hipoteza 4a: Koeficijent probavljivosti

Dinarski voluhari će imati visok koeficijent probavljivosti ključnih hranjivih tvari zbog svoje prilagodbe na specifične hranidbene resurse dostupne tijekom ljetnog režima hranidbe. To se temelji na očekivanju da će visoka probavljivost osigurati optimalnu iskoristivost hrane u uvjetima prirodne hranidbe.

### Hipoteza 4b: Koeficijent probavljivosti kod mužjaka i ženki

Postoji značajna razlika u probavljivosti između mužjaka i ženki dinarskih voluhara. Ova hipoteza proizlazi iz pretpostavke da bi fiziološke i hormonalne razlike između spolova mogle utjecati na učinkovitost probave.

## 5. MATERIJALI I METODE

### 5.1. Porijeklo istraživanih životinja

U svrhu istraživanja, korišteni su dinarski voluhari (*Dinaromys bogdanovi*) iz Ustanove Zoološki vrt grada Zagreba, čija populacija izvorno potječe s područja Vrdova. Za provođenje istraživanja u kontroliranom okruženju, odnosno u zatočeništvu, dobiveno je odobrenje od nadležnih tijela, konkretno od Ministarstva zaštite okoliša i prirode (današnje Ministarstvo zaštite okoliša i zelene tranzicije), prema referentnom broju UP/I-612-07/12-33/0338.

Za potrebe smještaja dinarskih voluhara unutar Zoološkog vrta pažljivo se pridržavalo smjernica i preporuka iz područja doprinosa zooloških vrtova zaštiti divljih vrsta, kako je predloženo u radu Gippoliti i Amori (2007). Ograničenja u vezi s brojem jedinki uključenih u istraživanje proizlaze iz specifičnosti istraživanja endemske vrste (Kryštufek, 2018.). Također, Zakon o zaštiti prirode propisuje posebne mjere zaštite za kralješnjake (NN 80/13, 15/18, 14/19, 127/19, 155/23), što otežava njihovo prikupljanje u divljini. Nadalje, solitarno ponašanje ove vrste, uz relativno velike prostorne zahtjeve u usporedbi s laboratorijskim glodavcima slične veličine, predstavlja dodatan izazov u procesu prikupljanja i održavanja populacije za potrebe istraživanja.

### 5.2. Prostori i uvjeti za držanje životinja

U svrhu provođenja znanstvenog istraživanja, stvoreni su uvjeti za smještaj dinarskih voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) koji su vjerno simulirali prirodno stanište, uzimajući u obzir ključne varijable poput promjena sezona, prirodnog osvjetljenja, temperature i vlažnosti. Osvjetljenje, uključujući dodatno osvjetljenje lampama, prilagođavalo se duljini dana. Mikroklimatske karakteristike nastambi prilagođene su činjenici da dinarski voluhari često koriste špiljske prostore do 70 metara dubine, gdje temperature nisu izložene varijacijama kakve su prisutne na otvorenom prostoru.

Temperature u prostorijama su održavane unutar raspona od 10 do 25 °C, ovisno o sezoni, dok je vlažnost regulirana između 50% i 60% tijekom proljeća i ljeta, te između 70% i 80% tijekom jeseni i zime. Parenje životinja se provodilo tijekom proljeća i ljeta, dok je vansezonsko razdoblje parenja modelirano kao zimska sezona, u skladu s ranijim saznanjima o reprodukciji dinarskih voluhara (Petrov i Todorović, 1982).

Svaka jedinka smještena je u individualni stakleni terarij standardnih dimenzija (80 cm x 60 cm x 60 cm), opremljen mrežom za prirodno prozračivanje. Terariji su postavljeni na način koji osigurava jednakost uvjeta držanja za svaku životinju, čime se smanjuje utjecaj na rezultate eksperimenata. Podloga terarija sastojala se od šljunka i sterilne stelje, dok je voda bila dostupna *ad libitum* i mijenjala se svakodnevno. Hranjenje, u skladu s hranidbenim programom Zoološkog vrta, provodilo se također svakodnevno. Sve su životinje zadržavale ostatke prethodnog obroka u skladištima, što je bilo u skladu s njihovim prirodnim ponašanjem (Antolović i sur., 2006).

Unutar svakog terarija postavljene su četiri keramičke posude smještene u kutovima, koje su služile kao sklonište, skladište hrane i mjesto za obavljanje nužde. Raspored posuda bio je pažljivo planiran kako bi svaka životinja imala pristup skloništu i skladištu hrane, uzimajući u obzir ulaz u terarij. Za poticanje izgradnje gnijezda životinjama je bila dostupna suha trava, dok su terariji bili obogaćeni kamenjem i granama iz njihova prirodnog staništa. Ove pažljivo odabrane komponente doprinijele su stvaranju okoliša što vjernijeg prirodnom.

Jedinke dinarskog voluhara u zatočeništvu tijekom godine prolaze kroz dva režima hranidbe, ljetni i zimski. Glavna razlika između ova dva režima je u hrani koja se nudi životinjama. Tijekom ljeta, životinje se hrane mješavinom svježih trave i livadnog bilja koja se sastoji većim dijelom od maslačka (*Taraxacum* sp.), djeteline (*Trifolium* sp.) te ostalog livadnog bilja koje je uobičajeno za područje oko grada Zagreba. Zimski režim hranidbe se bazira na različitim vrstama lisnatog povrća iz komercijalnog uzgoja kao što su crveni radič (*Cichorium* sp.), rikola (*Eruca* sp.), matovilac (*Valerianella* sp.), itd. te peletiranoj hrani za listojedne majmune (Mazuri Zoo Food Leaf Eater Primates ®). Tijekom oba razdoblja, voluharima je osigurana dovoljna količina svježih hrane, sijena i grančica.

Prilagođavajući uvjete okoliša unutar zatočeničkih prostora prema prirodnim ciklusima, stvoreni su optimalni uvjeti za njihovo reproduktivno ponašanje. Sustavnim pristupom postignuto je da minimalan broj životinja bude uključen u proces razmnožavanja, čime je postignuta ravnoteža između osiguravanja dovoljnog broja jedinki za kvalitetno provedeno istraživanje i pridržavanja principa odgovorne uporabe životinja u znanstvenim istraživanjima. Svaka faza procesa razmnožavanja pažljivo je dokumentirana kako bi se omogućila precizna analiza rezultata, a sam proces odvijao se pod stalnim nadzorom veterinarima i stručnjaka za ponašanje životinja.

Ovakav pristup ne samo da jamči znanstvenu valjanost prikupljenih podataka, već i osigurava etičnost i pažljivo upravljanje populacijom dinarskih voluhara u zatočeništvu, podupirući pritom ciljeve očuvanja i istraživanja u zaštiti ove vrste.

### 5.3. Funkcionalna anatomija žvačnog sustava

#### 5.3.1. Postavke istraživanja

Za potrebe znanstvenog istraživanja fokusiranog na proučavanje funkcionalne anatomije žvačnog sustava dinarskih voluhara, korišteno je ukupno petnaest odraslih jedinki, starosti najmanje dvanaest mjeseci. *In vivo* mjerenja dobivena su od živih jedinki iz zatočeništva, uključujući četiri ženke i jedanaest mužjaka, s prosječnom tjelesnom masom od  $73,36 \pm 5,64$  g. S druge strane, mišićni parametri procijenjeni su kod tri reprezentativna primjerka životinja koje su uginule prirodnom smrću, u skladu sa statusom strogo zaštićene vrste (NN 80/13, 15/18, 14/19), 127/19, 155/23), obuhvaćajući oba spola, s prosječnom tjelesnom masom od  $88,33 \pm 11,33$  g, iz iste populacije.

Uginule jedinke bih odmah nakon pronalaska konzervirala; prvo 48 sati u 5% formaldehidu, nakon čega bih ih isprala i premjestila u 70% etilni alkohol, te organizirala njihov transport na Odjel za ekologiju i upravljanje biološkom raznolikošću Centra za znanstvena istraživanja Nacionalnog prirodoslovnog muzeja u Francuskoj (Département d'Ecologie et de Gestion de la Biodiversité, Centre National de la Recherche Scientifique/Muséum National d'Histoire Naturelle).

Sva eksperimentalna istraživanja odobrena su od strane Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka (URBROJ: 251-58-10617-17-24). U istraživanju je sudjelovala studentica Mia Jakopović, dok je u obradi i analizi podataka sudjelovao dr. sc. Antony Herrel iz Centra za znanstvena istraživanja Nacionalnog prirodoslovnog muzeja u Francuskoj.

#### 5.3.2. *In vivo* mjerenje sile ugriza (eng. *bite force*)

Individualna mjerenja sile ugriza bilježila sam pomoću izometrijskog Kistlerovog transduktora (Kistler, tip 9203, raspon  $\pm 500$  N; Kistler, Winterthur, Švicarska). Razmak između pokretnih ugriznih ploča bio je prilagođen tako da je kut otvaranja usta bio unutar granica od  $\pm 10^\circ$ . Ugrizne ploče su bile obložene tankim zaštitnim slojem od gume kako bi se spriječilo oštećenje zuba životinja.



Sile ugriza bilježila sam tijekom dva dana, pri čemu sam poticala životinje da ugrizu ugrizne ploče transduktora pet puta svakog dana, što je rezultiralo s ukupno deset mjerenja snage ugriza. Životinje sam poticala na obrambeni ugriz držeći ih u rukama te stimulirajući zagriz na detektorskom dijelu transduktora. Svih pet mjerenja snage ugriza unutar jednog dana trajalo je ukupno oko 60 sekundi.

Neke životinje nisu htjele ugristi transduktor, stoga za te jedinke nismo uspjeli prikupiti podatke o snazi ugriza. Jedna ženka i dva mužjaka imala su vrlo male snage ugriza, te sam ih odlučila isključiti iz analize jer su značajno odskakali od ostalih. Najjači ugriz iz svih mjerenja smatrala sam maksimalnom izvedbom ugriza za svaku jedinku (Becerra i sur., 2011.). U obradi podataka uzimala sam u obzir samo najveće vrijednosti sile ugriza.

### 5.3.3. Anatomska analiza mišića i mišićne mase

Proučavala sam mišićnu strukturu lubanje *m. digastricus*, *m. masseter superficialis*, *m. masseter profundus anterior*, *m. masseter profundus posterior*, *m. zygomaticomandibularis anterior*, *m. zygomaticomandibularis posterior*, *m. zygomaticomandibularis pars infraorbitalis*, *m. pterygoideus internal*, *m. pterygoideus external*, *m. temporalis pars anterior*, *m. temporalis pars posterior*, *m. temporalis pars suprazygomatica* tri odrasle jedinke dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*).

Nabrojani mišići lubanje su fotografirani pod stereomikroskopom, zatim disecirani i izvagani (Herrel i sur., 2008.; Slika 36.). Mase mišića sam izmjerila pomoću elektroničke vage Mettler AE100, preciznost  $\pm 0.0001$  g.

### 5.3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu koristila Excel 2013. Vrijednosti sile ugriza *in vivo* i masa tijela prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, te minimalne i maksimalne vrijednosti.

Omjer sile ugriza i tjelesne mase izračunat je dijeljenjem vrijednosti sile ugriza (N) s vrijednošću tjelesne mase (g) (Tablica 8A. i 8B.). Ova normalizacija omogućuje usporedbu jačine zagriža među različitim jedinkama uzimajući u obzir varijacije u njihovoj tjelesnoj masi. Na taj način može se preciznije procijeniti je li razlika u jačini zagriža rezultat veličine jedinke ili drugih čimbenika. Zbog nedovoljnog broja ženki, nisam bila u mogućnosti provesti statističku analizu omjera sile ugriza i tjelesne mase za usporedbu između spolova.

Sve vrijednosti izmjerenih masa mišića prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija te udio ukupne mase pojedinog mišića unutar ukupne mase aduktora čeljusti (Tablica 9.).

#### 5.4. Morfologija i histologija probavnog sustava

##### 5.4.1. Postavke istraživanja

Istraživanje je provedeno između rujna 2017. godine i listopada 2020. godine. U skladu sa statusom strogo zaštićene vrste (NN 80/13, 15/18, 14/19, 127/19, 155/23), koristila sam isključivo životinje koje su uginule prirodnom smrću. Kako bih to postigla, svakodnevno sam pregledavala nastambe kako bi na vrijeme identificirala svježe uginule životinje. Dane kada nisam bila u mogućnosti sama prekontrolirati životinje, to su činili timaritelji.

Uginule jedinice bih odmah nakon pronalaska premještala na hladno (+4 °C) kako bi se spriječilo nepotrebno propadanje tkiva, nakon čega bih što je prije moguće, organizirala njihov transport na Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Prije uključivanja u istraživanje, svaka pojedina životinja podvrgnuta je pažljivoj dijagnostičkoj analizi kako bi se osiguralo da nisu uginule od tumora ili sličnih bolesti te da nisu imale poremećaje u probavnom sustavu. U tom trenutku, pažljivo sam ocjenjivala prikladnost svake životinje, uzimajući u obzir očuvanje integriteta uzoraka, te nisam razmatrala one koje su pokazivale bilo kakve naznake raspadanja ili patoloških promjena koje bi mogle utjecati na izgled probavnog sustava.

Za potrebe znanstvenog istraživanja fokusiranog na proučavanje morfologije i histologije probavnog sustava dinarskih voluhara, uključeno je ukupno jedanaest odraslih jedinki, starosti minimalno dvanaest mjeseci. Među ovim jedinkama, četiri su bile ženke, dok su preostalih sedam bile mužjaci. Od ukupnog broja, sedam (pet mužjaka i dvije ženke) od jedanaest jedinki bilo je prikladno za morfometrijsku analizu, dok su četiri jedinice isključene zbog nemogućnosti izmjere svih dijelova probavnog sustava. Što se tiče histološke analize, opis strukture probavila i pripadajućih slojeva u stijenci temeljio se na tri reprezentativna primjerka koji nisu pokazivali znakove raspadanja tkiva, omogućujući detaljan opis i mjerenje svih slojeva. Istovremeno, pet (četiri mužjaka i jedna ženka) od jedanaest jedinki bile su prikladne za kvantitativnu histokemijsku analizu vrčastih stanica, te su stoga uključene u daljnja istraživanja.

U istraživanju je sudjelovala studentica koja je dio podataka koristila za izradu diplomskog rada (Jakopović, 2022.). U izradi preparata nam je pomogla tehničarka Zrinka Benčina, dok je u obradi i analizi podataka sudjelovala izv. prof. dr. sc. Romana Gračan.

#### 5.4.2. Morfologija i morfometrija probavnog sustava

##### 5.4.2.1. Prikupljanje morfoloških i morfometrijskih podataka

Prije početka disekcija, pažljivo sam zabilježila podatke o spolu životinje, duljini tijela bez repa (tj. duljinu od vrha njuške do baze repa) te tjelesnoj masi. Postupak disekcije obuhvatio je izolaciju probavnog sustava životinja, nakon čega sam temeljito provela čišćenje od vezivnog tkiva i masti. Jednjak, želudac, tanko, debelo i slijepo crijevo detaljno sam isprala fiziološkom otopinom, nakon čega sam ih pažljivo osušila papirnatim ručnicima. Organe sam potom pažljivo izdužila na njihovu prirodnu duljinu bez istezanja, nakon čega sam ih fotografirala.

Nakon ovih pripremnih koraka, sustavno sam izmjerila duljine svih organa. Duljinu jednjaka sam mjerila od kraja ždrijela do početka želuca, dok sam duljinu želuca mjerila dijagonalno, od vrha fundusa do kraja piloričke regije. Duljinu tankog crijeva sam mjerila od početka dvanaesnika, odmah distalno od pilorusa, do ileocealnog spoja. Slijepo crijevo sam mjerila od distalnog vrha do spoja slijepog i debelog crijeva, dok je duljina debelog crijeva izmjerena od spoja slijepog i debelog crijeva do rektuma.

Mjerenja sam obavila pomoću pomične mjerke i konca (u cm). Sve navedene duljine izračunala sam i izrazila kao postotak ukupne duljine probavnog sustava kako bi se omogućila usporediva analiza. Nakon mjerenja dužina, pojedinačni organ sam škaricama odijelila od susjednih organa i izvagala svaki organ (uključujući i sadržaj organa) posebno pomoću digitalne tehničke vage (model Bonvoisin Digital Lab Scale, do 600 g s preciznošću od 0,01 g).

Nakon što su završena fotografiranja i mjerenja, želudac i slijepo crijevo sam očistila od sadržaja te sam pristupila uzimanju histoloških uzoraka iz svakog organa.

#### 5.4.3. Histologija i histokemija probavnog sustava

Uzorkovala sam tkivo različitih dijelova probavnog sustava, uključujući srednji dio jednjaka, žljezdani i mišićni dio želuca, srednji dio tankog crijeva (jejunum), proksimalni i transverzalni dio debelog crijeva i tijelo slijepog crijeva (*corpus caeci*).

Za jednjak sam izmjerila ukupnu debljinu sluznice, debljinu oroženog dijela višeslojnog pločastog epitela, višeslojnog pločastog epitela, *laminae propriae*, mišićnog sloja sluznice, podsluznice, ukupnog mišićnog sloja (vanjski i unutarnji mišićni sloj) te vanjskog sloja vezivnog tkiva.

Za mišićni dio želuca sam izmjerila ukupnu debljinu sluznice, debljinu višeslojnog pločastog epitela, oroženog dijela višeslojnog pločastog epitela, *laminae propriae*, mišićnog sloja sluznice, podsluznice, ukupnog mišićnog sloja te vanjskog sloja vezivnog tkiva, za žljezdani dio želuca sam izmjerila ukupnu debljinu sluznice, debljinu višeslojnog pločastog epitela, *laminae propriae*, mišićnog sloja sluznice, podsluznice, ukupnog mišićnog sloja te vanjskog sloja vezivnog tkiva.

Za tanko, debelo i slijepo crijeva sam izmjerila debljinu sluznice, jednoslojnog cilindričnog epitela, *laminae propriae*, mišićnog sloja sluznice, podsluznice, ukupnog mišićnog sloja te vanjskog sloja vezivnog tkiva.

#### 5.4.3.1. Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva

Za potrebe histološke analize dijelova probavne cijevi, odabrala sam fragmente tkiva koje sam podvrgnula procesu pripreme za izradu trajnih histoloških preparata korištenjem parafinske tehnike. Ova tehnika omogućuje da se fiksirano tkivo uklopi u blok parafina koji se može tanko narezati te obojati histološkim bojama koje ističu pojedine strukture u tkivu, omogućujući njihovo promatranje pod svjetlosnim mikroskopom. U novije vrijeme, umjesto parafina, kao uklopni medij koristi se paraplast, smjesa parafina i plastičnih polimera, koji nije topljiv u vodi i alkoholu, nego samo u ksilolu, te ima nešto precizniju točku taljenja.

Paraplast djeluje kao privremeni medij čija je primarna svrha stabilizacija tkiva radi omogućavanja preciznog rezanja, nakon čega se uklanja iz tkiva. Kako bi paraplast mogao ući u tkivo i prožeti ga, prethodno provodim postupak dehidracije radi uklanjanja vode iz tkiva. Zatim tkivo uranjam u organsko otapalo, poput kloroforma, koji istiskuje zaostali alkohol iz tkiva i omogućuje prodiranje paraplasta, budući da se s njime miješa.

Kako bih očuvala morfologiju probavne stijenke, komadiće organa veličine oko 1-2 cm<sup>3</sup> odmah nakon izolacije stavljam u Bouinov fiksativ na 24 sata. Nakon fiksacije, tkiva uranjam u seriju

rastućih koncentracija etanola (Tablica 2.), kako bi se postupno uklonila voda, čime se smanjuju oštećenja u tkivu (Mescher, 2013.).

Tablica 2. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u postupku dehidracije tkiva.

Kemikalija	Trajanje (u satima)
70%-tni alkohol 1	48
70%-tni alkohol 2	1
96%-tni alkohol	1
100%-tni alkohol 1	1
100%-tni alkohol 2	1

Tkiva držim u kloroformu preko noći, dok istovremeno paraplast stavljam na taljenje u termostat na 60 °C do idućeg dana. Kako bih poboljšala topljivost parafina i njegovo prodiranje u tkivo, koristim paraplast, mješavinu parafina i plastičnih polimera.

Cijeli postupak uklapanja u paraplast provodim u termostatu na 60 °C kako bih spriječila hlađenje, a time i stvrdnjavanje paraplata. Ova temperatura također omogućuje isparavanje kloroforma, što omogućava paraplastu da prožme cijelo tkivo (Mescher, 2013.). Koraci uklapanja u paraplast prikazani su u Tablici 3.

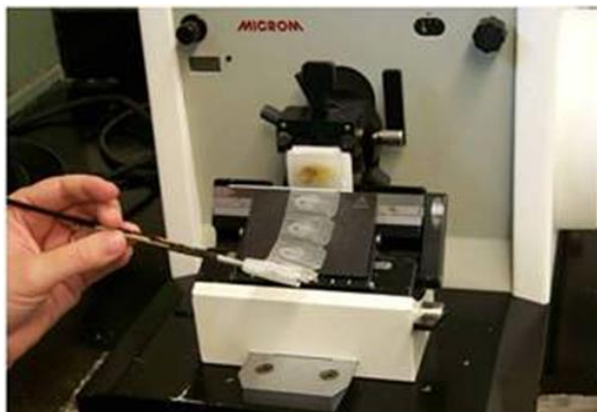
Tablica 3. Postupak uklapanja tkiva u paraplast.

Smjesa	Trajanje (u minutama)
Kloroform : paraplast (1:1)	30"-60"
Paraplast 1	30"-60"
Paraplast 2	30"-60"

Tkiva zatim uklapam u blokove za daljnju obradu i ostavljam ih da se hlade na sobnoj temperaturi preko noći. Kao kalup koristim papirnate lađice. Na dno lađice, uz pomoć igle i pincete, precizno postavljam uzorak tkiva tako da ploha koja se reže bude okrenuta prema dnu lađice. Nakon toga, preko tkiva dodajem paraplast.

Pri postavljanju tkiva u blok, osiguravam da otvor cjevastog organa, odnosno okomiti presjek želuca, bude okrenut prema dnu bloka kako bih rezanjem na mikrotomu dobila poprečne presjeke i stvarnu debljinu slojeva organa. Svaki blok označavam protokolskim brojem koji je tom tkivu dodijeljen prilikom uzorkovanja. Blokove ostavljam na hlađenje na sobnoj temperaturi do idućeg dana.

Za rezanje parafinskih blokova koristim rotacijski mikrotom (Shandon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific, USA; Slika 26.).



Slika 26. Rezanje tkiva uklopljenog u parafinski blok na rotacijskom mikrotomu.

Blokove režem na debljinu od 7 do 8 mikrona, a dobivene rezove prenosim kistom na vodenu kupelj zagrijanu na 50°C radi izravnavanja, tzv. peglanja (Slika 27.).



Slika 27. Izravnavanje histoloških rezova na vodenoj kupelji.

Rezove zatim prenosim na predmetno stakalce prethodno premazano glicerom bjelanjkom, označavam ih protokolskim brojem, te ih ostavljam da se suše na sobnoj temperaturi. Na svako predmetno stakalce nanosim 2-3 najbolja reza, dok je za svaki uzorak tkiva izrezan veći broj rezova. U prosjeku izrađujem 5 mikroskopskih stakalaca s rezovima za svaki uzorak, koji su naknadno pregledani pod mikroskopom i izabrani za daljnja bojanja.

#### 5.4.3.2. Bojenje stakalaca s rezovima

Za svoje istraživanje koristila sam različite metode bojenja, prilagođene tipu tkiva i analizi koju provodim. Prije nego što sam provela bojenja, tkivo sam morala deparafinizirati (ukloniti parafin i vratiti vodu u tkivo kako bi boje mogle prodrijeti u njega). Proces deparafiniziranja

i bojenja provodila sam u staklenim posudicama za bojenje, koje su imale stalak za umetanje do deset uspravno postavljenih predmetnih stakalaca. Cijeli proces izvodila sam unutar digestora radi zaštite od hlapljivih i/ili opasnih kemikalija, često držeći staklene posudice zatvorenima staklenim poklopcem. Proces deparaplastiranja uključivao je uranjanje predmetnih stakalaca s preparatima u niz otopina na određeno vrijeme kako bi se postupno uklonile molekule paraplasta iz tkiva. Prvo sam uronila preparat u otopinu ksilena, 15 minuta u prvu posudu, zatim 15 minuta u drugu. Otopina u prvoj posudi brže se zagađivala paraplastom, pa sam je mijenjala češće kako bih ubrzala proces. Nakon toga, preparat sam rehidrirala provođenjem kroz seriju otopina etanola padajućih koncentracija, svaki put ostavljajući ga 5 minuta, počevši od čistog (100%) pa zatim u 96%, 80% i 70% etanola. Na kraju, preparat sam uronila u destiliranu vodu dva puta po 5 minuta (Tablica 4.).

Tablica 4. Protokol za pripremu tkiva za bojenje hematoksilinom i eozinom

Deparaplastiranje i rehidriranje	Trajanje (u minutama)
Ksilen 1	15"
Ksilen 2	15"
100%-tni etanol	5"
96%-tni etanol	5"
80%-tni etanol	5"
70%-tni alkohol	5"
Destilirana voda 1	5"
Destilirana voda 2	5"

Koristila sam rutinsko histološko bojenje hematoksilinom i eozinom (HE bojenje) za razlučivanje različitih struktura i tkiva potrebnih za histomorfometrijsku analizu. Također, primijenila sam kombinaciju bojenja alcijanskim modrilom, perjodnom kiselinom i Schiffovim reagensom (Alcian-PAS) za histokemijsku analizu vrčastih stanica u probavnom traktu.

#### 5.4.3.3. Bojenje hematoksilinom i eozinom

Za histološko bojenje (HE bojenje) prilagodila sam formulacije hematoksilina i eozina specifičnostima svojih tkiva. Hematoksilin se oksidira u anionski hematein, koji se zatim veže na metalni kation ili drugi fiksator, dobivajući pozitivan naboj i vežući se za anionska područja u stanici. Različite boje postizemo ovisno o vrsti soli metala koja se koristi kao fiksator hematoksilina (Suvarna i sur., 2013.). Koristila sam Mayerov hemalaun (HEMH-OT, BioGnost) s aluminijevim solima, koji daje crvenu boju jezgrama, a nakon izlaganja alkalnoj otopini prelazi u plavu do crnu boju. Eozin, kao anionska boja, veže se za pozitivno nabijene

molekule, stvarajući različite nijanse od roze do crvene boje u citoplazmi i vlaknima vezivnog tkiva (Suvarna i sur., 2013.). Korištene kemikalije uključuju: ksilen, etanol (različitih koncentracija), destiliranu vodu, Hematoksilin H (HEMH-44/19, BioGnost) te Eozin Y 0,5%-tni alkoholni (EOYA-05-22/19, BioGnost) (Slika 28.). Za bojenje preparata pomoću hematoksilina i eozina (HE) koristila sam protokol prikazan u Tablici 5.



Slika 28. Pripremljene boje i nizovi alkohola i ksilena korišteni u postupku deparaplastiranja, rehidracije, HE bojenja, rehidracije i prosvjetljivanja u metodi izrade trajnih histoloških preparata parafinskom tehnikom.

Nakon deparafiniranja i ispiranja, preparat sam prvo uronila u Hematoksilin H otopinu na 6 minuta, nakon čega sam ispirala uranjanjem u vodu iz slavine, dva puta po 10 minuta. Zatim sam uranjala preparate u otopinu eozina nešto kraće od dvije minute, a odmah potom isprala preparate u destiliranoj vodi, uranjajući ih dva puta po 5 minuta.

Tablica 5. Protokol za bojenje hematoksilinom i eozinom

Bojenje	Trajanje (u minutama)
Hematoksilin H	6"
Tekuća voda 1	10"
Tekuća voda 2	10"
Eozin 0,5%	2"
Destilirana voda 1	5"
Destilirana voda 2	5"

#### 5.4.3.4. Histokemijsko bojenje vrčastih stanica metodom AB/PAS

Bojanje provodim nakon što uklonim paraplast i vratim vodu u tkivo (proces deparaplastiranja i rehidriranja su isti kao i u postupku HE bojenja; Tablica 6.).



Glavni sastav mukoznog sekreta, kojeg izlučuju vrčaste stanice u probavnom sustavu, čine visoko glikozilirane bjelančevine poznate kao mucini. Mucini su glikoproteini velike molekularne mase (>200 kDa) s velikim brojem postranih ugljikohidratnih lanaca vezanih za proteinsku jezgru (Devine i McKenzie, 1992.; Hatstrup i Gendler, 2008.). Klasificiraju se prema svojoj sposobnosti stvaranja gela, odnosno na one koji stvaraju gel (sekretorni) i one koji ne stvaraju gel (vezani za membranu) (Devine i McKenzie, 1992.). Ovisno o neto naboju molekule, mucini se klasificiraju kao neutralni ili kiseli. Kiseli mucini sastavljeni su od kiselih glikozaminglikana (mukopolisaharida) i dalje se diferenciraju prema svojim histokemijskim svojstvima na one koji sadrže sulfate (sulfomucini) i mucine koji sadrže sijaličnu kiselinu (sijalomucini) (Filipe, 1979.).

Alcijansko modriilo (AB) je pozitivno nabijena boja koja se veže na kiselinske skupine mukopolisaharida (Pearse, 1968.), pa se vrčaste stanice koje sadrže plavo obojene kisele glikoproteine nazivaju AB pozitivnim vrčastim stanicama. Alcijansko modriilo selektivno se veže na polianionske molekule poput proteoglikana, hijaluronske kiseline i kiselih mucina – sijalomucina i sulfomucina. Ovisno o obliku alcijanskog modrila, ove molekule dobivaju nijanse plave do zelene boje (Fagan i sur., 2020.; Hayat, 1993.; Kumar i Kiernan, 2010.; Suvarna i sur., 2013.). pH vrijednost također utječe na bojanje, omogućujući razlikovanje specifičnih tkiva (Fagan i sur., 2020.; Hayat, 1993.). Na primjer, pri niskom pH bojaju se samo proteoglikani i sulfomucini, dok se pri višem pH boje i vezivna tkiva (Fagan i sur., 2020.; Hayat, 1993.). Alcijansko modriilo pripremila sam tako da sam 3 g praha (CA8GX-P, BioGnost) otopila u 100 mL 3% octene kiseline.

Histokemijska metoda za prikazivanje vrčastih stanica s neutralnim sekretom uključuje korištenje perjordne kiseline i Schiffovog reagensa (PAS). PAS-reakcija boji neutralne glikoproteine, posebno glikogen, u grimizno-crvenu boju, a vrčaste stanice koje sadrže mukozne supstance obojene su grimizno-crveno i nazivaju se PAS pozitivne stanice. Bojanje perjordnom kiselinom i Schiffovim reagensom omogućava razlikovanje različitih struktura u tkivu probavnog sustava, prikazujući ih u varijacijama ružičaste boje. Perjordna kiselina oksidira hidroksilne skupine u aldehidne, vežući bazični fuksin iz Schiffovog reagensa, što rezultira ružičastim obojenjem nakon reakcije sa sumporastom kiselinom. Bazični fuksin, inicijalno tamno zelene boje, dobiva ružičastu nijansu u vodenoj otopini, postajući bezbojan reakcijom sa sumporastom kiselinom. Ispiranjem u vodi, sulfonatna skupina se odvaja, vraćajući fuksin u ružičastu boju (Suvarna i sur., 2013.; Verdugo, 1990.; Hayat, 1993.; Kumar i Kiernan, 2010.).

Otopinu periodne kiseline pripremila sam miješanjem 0,5 g periodne kiseline sa 100 mL vode. Schiffov reagens pripremam miješanjem 192 mL destilirane vode, 8 mL koncentrirane klorovodične kiseline, 5 g natrijevog metabisulfita i 0,5 g bazičnog fuksina (FB-P, BioGnost), te miješam smjesu 2 sata dok ne postane bezbojna ili žućkasta. Nakon toga, dodajem aktivni ugljen, filtriram ga nakon dvije minute miješanja (Hayat, 1993.), i ponavljam postupak još dva puta uz dodatak 0,5 g ugljena. Za reakciju sa sulfonatnim skupinama koristim 10%-tnu otopinu natrijevog bisulfita ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), pomiješanu s klorovodičnom kiselinom. Pripremam 10%-tnu vodenu otopinu natrijevog bisulfita, te miješam 18 mL te otopine s 15 mL jednomolarne klorovodične kiseline i 300 mL destilirane vode.

Kombinirano bojenje AB s PAS jasno razdvaja kisele i neutralne mucine jedne od drugih (Bancroft i Stevens, 1990.): kiseli mucini prikazuju se plavo, a neutralni mucini boje se grimizno-crveno, dok se miješani (neutralni i kiseli mucini) boje ljubičasto. Za svoje AB-PAS bojenje, tkivo sam prvo obojila alcijanskim modrilom, a zatim periodnom kiselinom i Schiffovim reagensom. Ovaj postupak koristim jer neutralni mucini, ako se prvo oboje, mogu poprimiti ljubičastu boju umjesto ružičaste.

Tijekom PAS bojanja, anionske skupine nastaju na neutralnim mucinima, a te skupine mogu reagirati s alcijanskim modrilom (Kumar i Kiernan, 2010.). Nakon deparafinizacije, tkivo sam uronila u otopinu alcijanskog modrila 30 minuta, isprala destiliranom vodom, zatim uronila u 0,5%-tnu otopinu periodne kiseline 30 minuta.

Nakon ispiranja u vodi, tkivo sam uronila u otopinu Schiffovog reagensa 15 minuta. Zatim sam tkivo uronila u 0,5%-tnu otopinu natrijevog bisulfita s klorovodičnom kiselinom, podijeljenu u tri posude, pri čemu je tkivo u svakoj posudi bilo uronjeno po 5 minuta. Na kraju, tkivo sam isprala uranjanjem dva puta u vodu iz slavine, po 10 minuta svaki put.

Tablica 6. Protokol za bojenje vrčastih stanica metodom AB/PAS

Bojenje	Trajanje (u minutama)
Alcijansko modrilo	30"
Kratki uron u destiliranu vodu	-
Periodna kiselina 0,5%	30"
Tekuća voda	-
Schiffovog reagens	15"
Natrijev bisulfit s klorovodičnom kiselinom 0,5% 1	5"

Tablica 6. – nastavak. Protokol za bojenje vrčastih stanica metodom AB/PAS

Bojenje	Trajanje (u minutama)
Natrijev bisulfit s klorovodičnom kiselinom 0,5% 2	5"
Natrijev bisulfit s klorovodičnom kiselinom 0,5% 3	5"
Tekuća voda 1	10"
Tekuća voda 2	10"

Nakon bojenja, preparati se provlače kroz postupak dehidracije, pri čemu ih uranjam u postupno sve veće koncentracije etanola, a zatim u ksilen. Nakon izdvajanja iz ksilena, odmah postavljam preparate u kanadski balzam i prekrivam ih pokrovnim staklom kako bih spriječila isušivanje tijekom hlapljenja ksilena. Sljedeći korak je prirodno sušenje i stvrdnjavanje kanadskog balzama na preparatima, što rezultira trajnim preparatima (Tablica 7.).

Tablica 7. Protokol za uklop u kanadski balzam

Dehidriranje	Trajanje (uroni)
70%-tni alkohol	5"
96%-tni alkohol 1	5"
100%-tni alkohol 1	5"
Prosvjetljivanje	Trajanje (u minutama)
Ksilen 1	5"
Ksilen 2	5"
Uklop u kanadski balzam	

5.4.3.5. Kvantitativna histomorfometrijska i histokemijska analiza izrađenih mikroskopskih preparata

Za analizu histoloških preparata koristila sam svjetlosni mikroskop (Nikon Eclipse E600) (Slika 29.).

Fotografije analiziranih područja na preparatima snimila sam digitalnom samostojećom kamerom za mikroskop u boji ZEISS Axiocam ERc 5s, koristeći program ZEISS ZEN2 Lite (Carl Zeiss Microscopy GmbH).

Za histomorfometrijsku analizu, preparate sam slikala pod povećanjem od  $\times 100$ ,  $\times 200$  i  $\times 400$ , dok sam za analizu vrčastih stanica u crijevima koristila povećanje od  $\times 400$ . Sve datoteke pohranila sam u Carl Zeiss Image (.dzi) formatu, dok sam mjerne elemente i vrijednosti spremila u Carl Zeiss (.cz) i Extensible Markup Language (.xml) formate unutar programa.

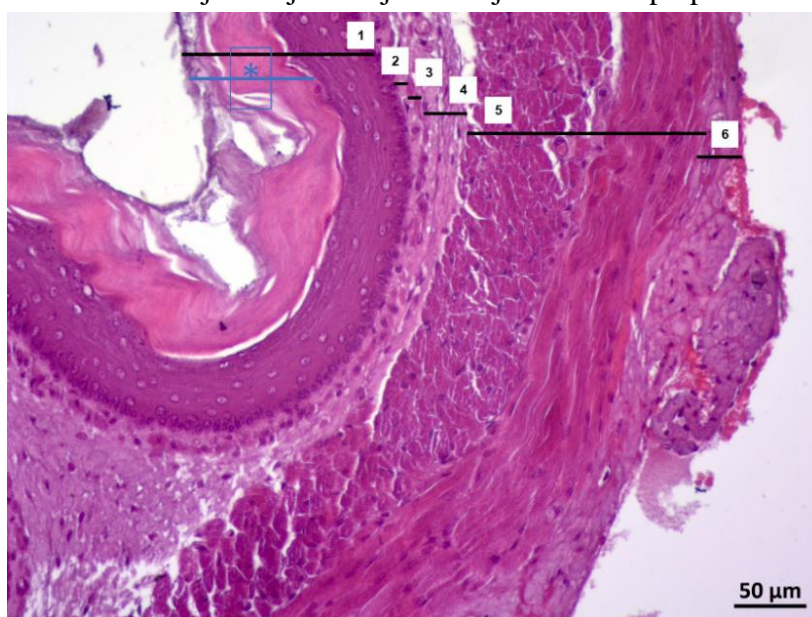


Slika 29. Mikroskop s kamerom i računalo na kojem su izrađeni histološki preparati slikani i morfometrijski obrađeni, smješten u Zoologijskom zavodu na Biološkom odsjeku PMF-a.

#### 5.4.3.6. Histomorfometrijska i histokemijska analiza

Za histomorfometrijsku analizu koristila sam fotografije preparata poprečnih presjeka jednjaka, želuca (mišićnog i žljezdanog dijela), tankog crijeva (jejunum), debelog crijeva (proksimalni i transverzalni dio) i slijepog crijeva (*corpus caeci*), obojenih HE bojenjem kako bih jasno razlučila strukture i slojeve unutar tkiva.

Izabrala sam tri reprezentativna primjerka životinja koje su pokazivale najbolju očuvanost tkiva. Odabrala sam i uslikala tri polja na preparatima za svaku jedinku, na kojima su svi slojevi od interesa bili čitavi, kompaktni i jasno razlučivi, osiguravajući pravilno izvršavanje mjerenja. Karakteristika od interesa bila je debljina slojeva vidljivih na tim preparatima (Slika 30.).



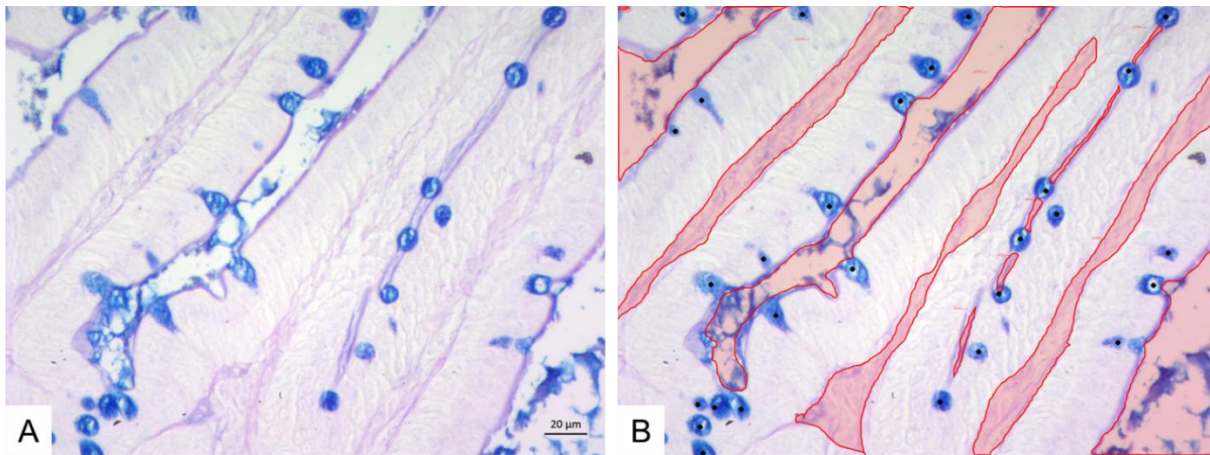
Slika 30. Histološki preparat dijela poprečnog presjeka kroz tkivo jednjaka dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) obojanog HE metodom. Navedeni su reprezentativni slojevi probavne cijevi koji su se mjerili u svim analiziranim regijama duž probavne cijevi.

Slika 30. – nastavak. Vodoravna linija označava debljinu pojedinog sloja. Zvezdica (\*) označava rožnati sloj pokrovnog epitela koji je bio prisutan samo u jednjaku i dijelu mišićnog želuca.

Za histokemijsku analizu crijeva, korištena kombinacija AB i PAS pozitivnih stanica omogućila mi je kvantifikaciju postotnog udjela sekretornih vrčastih stanica unutar epitela sluznice crijeva. Budući da se vrčaste stanice nalaze i u pokrovnom epitelu crijevnih resica i u epitelu tubulusnih žlijezda, mjerenja sam provela unutar oba područja.

Izabrala sam pet reprezentativnih primjeraka životinja koje su pokazivale najbolju očuvanost tkiva. Za svaku jedinku, odabrala sam četiri testna polja na crijevnim preparatima, na kojima je sluznica bila netaknuta i kompaktna, a stanice jasno uočljive kako bih omogućila precizna mjerenja.

Izmjerila sam referentnu površinu, koja se odnosila na pokrovni epitel crijeva i epitel tubulusnih žlijezda, te sam na toj površini izbrojala PAS pozitivne (crveno-grimizne), AB pozitivne (plave) i miješane stanice (ljubičaste). Izbrojane stanice prikazala sam kao broj stanica na 1 mm<sup>2</sup> površine (Slika 31.).



Slika 31. A. Originalna digitalna slika histološkog prereza tkiva tankog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) obojena AB/PAS metodom i B. morfometrijski analizirana slika istoga tkiva s označenim referentnim prostorom (pokrovni epitel s vrčastim stanicama) na kojem je brojanje stanica izvršeno. Crveno označena polja su područja lumena i vezivnog tkiva koja su isključena iz referentnog prostora. Crnim točkicama su označene izbrojane pozitivne stanice obojene alcijanskim modrilom.

#### 5.4.4. Statistička obrada podataka

Za potrebe morfometrijske analize, mase i duljine punih probavnih organa (jednjak, želudac, tanko crijevo, debelo i slijepo crijevo), su izražene kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, minimumi i maksimumi vrijednosti te udio mase i duljine organa unutar probavnog trakta (Tablica 10A. i 10B.).

U svrhu histomorfometrijske i histokemijske analize, kako bih olakšala daljnju obradu podataka, mjere dobivene u programu ZEN2 Lite objedinila sam u jednu tablicu unutar programa Excel (Microsoft Corporation, verzija 16.0.4266.1001).

Sve vrijednosti izmjerenih visina slojeva jednjaka, želuca i crijeva za svaku jedinku prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, minimumi i maksimumi vrijednosti te udio debljine slojeva unutar probavne cijevi (Tablica 11.).

Nakon toga, provela sam testiranje kako bih utvrdila eventualne razlike u debljini slojeva stijenki različitih organa (jednjak, mišićni i žljezdani dio želuca, jejunum, tijelo slijepog crijeva te proksimalni i transverzalni dio kolona) koristeći Friedmanov test. Nakon što sam utvrdila postojanje razlika u debljini slojeva, primijenila sam Holm-Bonferronijevu korekciju kako bih odredila između kojih slojeva se javljaju razlike. Holm-Bonferroni korekcija je metoda koja se koristi za kontrolu lažno pozitivnih rezultata (tj. kako bi se izbjeglo pogrešno zaključivanje da postoji značajna razlika kad je zapravo nema) kod višestrukog testiranja. Podatke sam analizirala na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

Za obradu podataka histokemijske analize crijeva izbrojala sam vrčaste stanice određenog tipa na svim preparatima za svaku jedinku, kao i ukupne pregledane površine. Unutar svake označene površine, broj vrčastih stanica koje sadrže specifične mucine je izbrojen i njihov broj je izražen po jedinici površine što predstavlja gustoću stanica po  $\text{mm}^2$ . Rezultati izračuna prikazani su kao srednje vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija.

Nakon toga, provela sam testiranje kako bih utvrdila eventualne razlike u broju vrčastih stanica unutar tankog, slijepog i debelog crijeva koristeći Friedmanov test. Nakon što sam utvrdila postojanje razlika u broju stanica, primijenila sam Wilcoxon Signed-Rank test kako bih odredila između kojih dijelova crijeva se javljaju razlike u broju. Podatke sam analizirala na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

## 5.5. Brzina probave

### 5.5.1. Istraživanje brzine probave pomoću fizikalnih markera

#### 5.5.1.1. Postavke istraživanja

Za potrebe znanstvenog istraživanja usmjerenog na proučavanje brzine probave u dinarskih voluhara korištenjem fizikalnih markera, ukupno je korišteno trinaest jedinki. Tijekom ljetnog razdoblja, proučavala samo brzinu probave kod deset mužjaka i tri ženke, dok sam tijekom zimskog razdoblja isto istraživanje provela kod sedam mužjaka i šest ženki.

Broj ženki uključenih u ljetno istraživanje bio je manji jer je većina imala potomke, te ih iz tog razloga nisam uključila u istraživanje. Jednu jedinku iz ljetne sezone isključila sam iz analize jer nisam pronašla sve potrebne fizikalne markere.

Dinarski voluhari koji su držani u zatočeništvu tijekom godine prolaze kroz dva hranidbena režima, ljetni i zimski, što je detaljnije pojašnjeno u poglavlju 5.2. Shodno tome, provela sam dva kruga eksperimenata: jedan u ljetnom periodu, koji je obuhvaćao ljetni režim hranidbe, i jedan u zimskom periodu, koji je obuhvaćao zimski režim hranidbe. Dinarskim voluharima u oba razdoblja osigurane dovoljne količine svježe hrane, sijena i grančica.

Tijekom srpnja i listopada 2016. godine provedeno je mjerenje brzina probave za ljetni period, dok je tijekom siječnja 2017. godine provedeno mjerenje za zimski period. Eksperimentalni rad smo realizirali u prostorijama Zoološkog vrta Grada Zagreba, dok smo laboratorijsku obradu uzoraka izvršili u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Svaka jedinka je prošla kroz tri ciklusa eksperimenta u obje sezone (ljetna i zimska). Svaki eksperimentalni ciklus obuhvaćao je davanje označene hrane dinarskim voluharima, prikupljanje fecesa tijekom 24 sata, te analizu uzoraka u laboratoriju sljedećeg dana. U istraživanju je sudjelovao student koji je dio podataka koristio za izradu diplomskog rada (Miloš, 2017.).

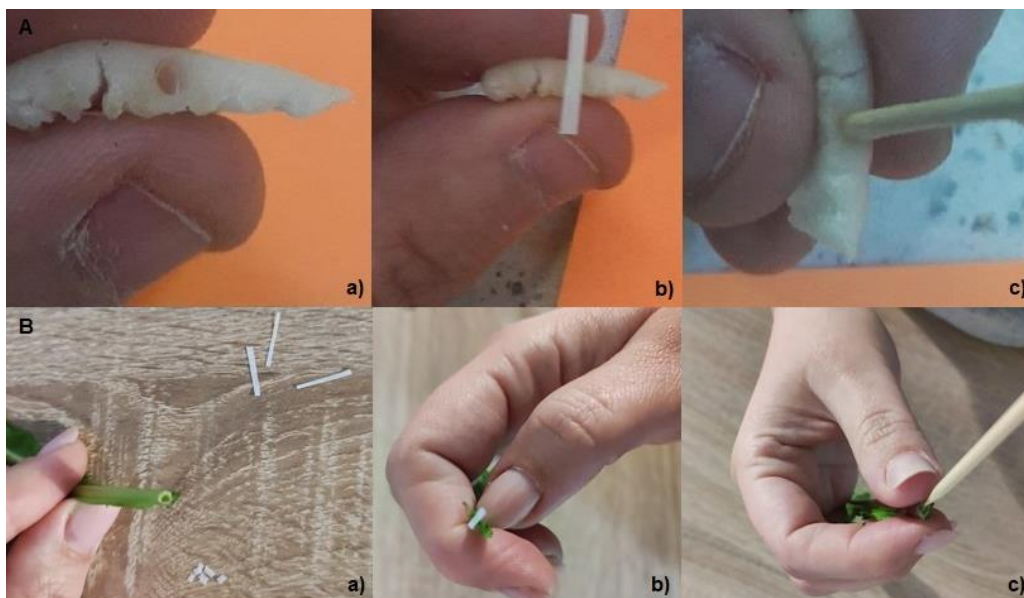
#### 5.5.1.2. Korišteni fizikalni markeri

Plastične markere korištene u istraživanju izradili smo od bijele plastične folije koja se uobičajeno koristi za proizvodnju plastičnih vrećica namijenjenih prehrambenoj uporabi (HDPE - polietilen visoke gustoće). Smatrali smo da je ova vrsta plastike bila sigurna za

unošenje u organizam. Dimenzije markera bile su 5 mm x 2 mm. Prije početka eksperimenata, proveli smo pilot istraživanje kako bismo utvrdili postojanost plastike tijekom probave. Komadi plastike postavljeni su u tri erlenmeyerove tikvice koje su sadržavale klorovodičnu kiselinu različitih koncentracija. Nakon 24 sata inkubacije na 40 °C, pregledali smo markere i nismo primijetili nikakve promjene na plastici.

Zatim smo nasumično odabrali dvije zdrave odrasle jedinke dinarskih voluhara za testiranje sigurnosti markera. Ponudili smo im dva lista maslačka, svaki s četiri markera, a nakon 24 sata, pronašli smo sve markere u fecesu dinarskih voluhara. Dinarski voluhari su potom promatrani tijekom sljedećih sedam dana kako bismo zabilježili moguće posljedice prolaska markera kroz probavni trakt, no nismo primijetili nikakve promjene.

Kao nosače markera, u ljetnom dijelu eksperimenta koristili smo listove svježe ubranog maslačka (*Taraxacum* sp.), dok smo u zimskom dijelu koristili listove komercijalno uzgojenog crvenog radiča (*Cichorium* sp.). Pripremili smo listove maslačka tako da smo ih odrezali na manje komade dužine otprilike 4 cm od baze lista, gdje je žila najšira, te smo u te rupe umetnuli markere. Listove radiča smo pripremili tako da smo odrezali debelu bazu listova, bušili ih iglom do dubine od oko 1 cm i u te rupe umetnuli markere (Slika 32.).



Slika 32. Proces umetanja fizikalnog markera u hranu: A. lista radiča; B. lista maslačka: a – baza lista radiča i maslačka s izbušenom rupom za označavanje, b – marker se položi preko rupe, c – čačkalicom se marker ugura u rupu. Preuzeto i prilagođeno iz Miloš, 2017.



Svaki list smo označili s tri markera, a svakom voluharu smo dali dva takva lista u jednom ciklusu eksperimenta. Markeru su pažljivo postavljeni kako bi ostali u žilama lista tijekom hranjenja, a voluhari ih ne bi primijetili dok jedu označene listove. Kako bismo osigurali da voluhari pojedu označene listove u što kraćem vremenskom roku, dan prije eksperimenta im nismo ponudili svježu hranu. Tijekom cijelog eksperimenta, voluhari su imali na raspolaganju sijeno i grančice kako bi osigurali da imaju normalno popunjen probavni sustav.

#### 5.5.1.3. Sakupljanje uzoraka

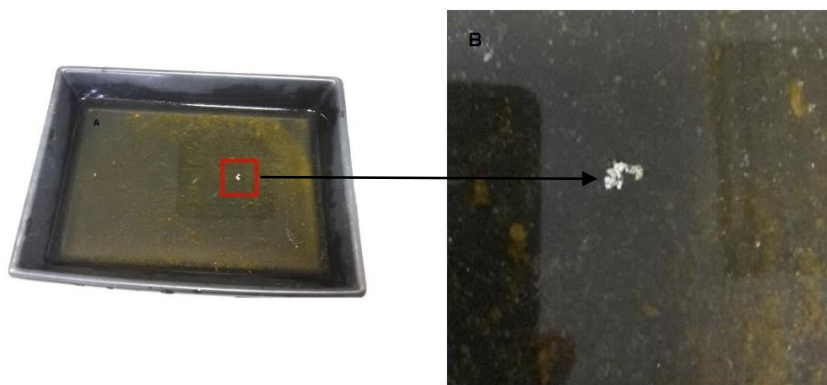
Označene listove smo postavili u terarij u 09:00 h, odmah nakon što smo uklonili ostatke hrane od prethodnih hranjenja i očistili područje terarija gdje voluhari obavljaju nuždu. Promatranjem smo utvrdili da su jedinke konzumirale listove maslačka s umetnutim plastičnim oznakama. Sve jedinke su konzumirale označeni maslačak unutar prvih 2 sata.

Uzorke smo prikupljali sustavno u intervalima od 4 sata tijekom prvih 12 sati (13:00 h, 17:00 h, 21:00 h) te dodatno nakon sljedećih 12 sati (09:00 h sljedećeg dana). Nakon toga, uzorci fecesa su pažljivo odvojeni i pohranjeni u označene epruvete i kivete te čuvani na sobnoj temperaturi. Tijekom istraživanja prikupila sam 36 odnosno 39 uzoraka fecesa od svake od 12 odnosno 13 jedinki dinarskog voluhara kroz tri ciklusa eksperimenta, tijekom ljetne i zimske sezone.

#### 5.5.1.4. Laboratorijska analiza uzoraka

Nakon što smo prikupili uzorke tijekom 24 sata od početka istraživanja, isti su transportirani u laboratorij Zavoda za animalnu fiziologiju na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu radi analize. Uzorci su pažljivo organizirani prema vremenskim kategorijama, a svaka plastična epruveta je napunjena s 1/4 volumena uzoraka fecesa. Zatim smo epruvetu napunili toplom vodom iz vodovoda do 2/3 volumena, čvrsto zatvorili i energično protresli. Pripremljene smjese uzoraka i vode ostavili smo 15 minuta uz periodično snažno protresanje.

Omekšana smjesa prenesena je u crnu plastičnu posudu dimenzija 30 cm x 20 cm x 10 cm, koja sadrži vodu zauzimajući približno 20% volumena posude. Smjesa se razrijedi tijekom izlivanja u posudu, što omogućuje jasnu vidljivost i brojanje bijelih markera u tamnoj smjesi i posudi (Slika 33.). Nakon što smo pronašli sve markere u pojedinoj epruveti, sadržaj posude smo ispraznili i postupak ponovili za svaku sljedeću epruvetu.



Slika 33. Traženje markera u laboratorijskoj analizi: A. Omekšana smjesa uzorka fecesa u crnoj posudi (crveno označen marker); B. Uvećana slika markera u smjesi (preuzeto iz Miloš, 2017.).

#### 5.5.1.5. Statistička obrada podataka

Podaci su analizirani i prezentirani kroz deskriptivnu statistiku, pružajući uvid u raspored markera u specifičnim vremenskim kategorijama, kao i naglašavajući minimalne i maksimalne vrijednosti podataka. Za statističku analizu koristila sam Excel 2013. i internet portal <https://www.socscistatistics.com/>. Prvi korak u obradi bio je zbrajanje podataka iz sva tri ciklusa eksperimenta. Podatke sam zbrajala posebno za ljetnu i zimsku sezonu, za svaku vremensku kategoriju (4, 8, 12 i 24 sata) i svaku pojedinu životinju. Nakon toga, provela sam testiranje kako bih utvrdila: 1. Eventualne razlike između mužjaka i ženki koristeći Mann-Whitney U test. Usporedbu brzine probave među spolovima provela sam isključivo na podacima zimske sezone, s obzirom na ograničeni broj ženki uključenih u istraživanje tijekom ljetne sezone; 2. Postojanje značajnosti u pojavnosti markera unutar vremenskih kategorija između sezona koristeći Mann-Whitney U test. 3. Pojavnost fizikalnog markera ovisno o vremenskoj kategoriji analizirala sam koristeći Friedmanov test zasebno za zimsku i ljetnu sezonu. Nakon što sam utvrdila postojanje razlika u pojavnosti markera, primijenila sam Wilcoxon Signed-Rank test kako bih odredila između kojih parova vremenskih kategorija se javljaju razlike.

#### 5.5.2. Istraživanje brzine probave pomoću kemijskih markera

##### 5.5.2.1. Priprema biljnog materijala

Mjerenje brzine probave smo obavili koristeći kemijske markere, kobalt (Co-EDTA) i krom (Cr-mordantizirana vlakna). Kobalt (Co-EDTA) se koristi za mjerenje tekuće frakcije probave, dok se krom (Cr-mordantizirana vlakna) koristi za mjerenje krute frakcije probave.

Za pripremu staničnih stijenki za označavanje, biljni materijal (sijeno) prvo smo pažljivo osušili, usitnili, te prenijeli u filter vrećice gdje smo ga kuhali u 5 litara otopine SLS-a (natrijev lauril-sulfat) i alfa-amilaze tijekom sat i pol. Nakon kuhanja, materijal je dvostruko ispran, prvo vrućom destiliranom vodom, zatim acetonom, nakon čega smo ga sušili preko noći na 65 °C. Zatim smo označili dobivene uzorke kromom (Cr-mordantizirana vlakna) i kobaltom (Co-EDTA) na sljedeći način: usitnili smo dva prethodno izvagana peleta Mazuri Zoo Food Leaf Eater Primate® u tarioniku, pomiješali ih s 0,05 g Co-EDTA i 0,1 g Cr-mordantiziranim vlaknima, te dodali oko 0,250 – 0,300 g kukuruznog škroba. Postupno smo dodavali destiliranu vodu kap po kap dok nismo dobili konzistentnu smjesu koju smo mogli oblikovati u pelete. Pelete smo zatim ostavili da se osuše u sušioniku (Slika 34.).

U pripremi biljnog materijala i istraživanju sudjelovala je studentica koja je dio podataka koristila za izradu završnog rada (Marčina, 2017.).



Slika 34. A. Priprema biljnog materijala za obilježavanje; B. Potrebna aparatura; C. Kuhanje biljnog materijala u deterdžentu; D. Priprema kobalt-etildiamintetraoctene kiseline (Co-EDTA) (preuzeto iz Marčina, 2017.).

#### 5.5.2.2. Postavke istraživanja

Istraživanje je provedeno tijekom ljetnog razdoblja 2019. godine, kada se dinarski voluhari hrane smjesom svježe trave i livadnog bilja. Zbog visokih financijskih troškova istraživanja, proveden je samo jedan ciklus eksperimenta. Ovaj put nisam bilježila razlike između spolova ili sezona, jer prethodno istraživanje u kojem smo koristili fizikalni marker nije pokazalo značajne razlike u hranidbi među spolovima ili sezonama. Proučavala sam vrijeme retencije hrane (MRT) kod 15 zdravih odraslih jedinki dinarskih voluhara – 8 mužjaka i 7 ženki prosječne tjelesne mase  $81,61 \pm 6,70$  g. Iz eksperimenta su isključene bolesne jedinke, ženke s mladuncima i parovi uključeni u proces parenja.

Prije početka eksperimenta, izvršila sam vaganje svih životinja kako bi prikupila podatke o njihovoj masi. Zatim smo temeljito očistili terarije i svu opremu, uključujući kamenje, kućice od terakote i grane, koristeći sapunicu i toplu vodu te ih na posljetku dezinficirali. Kada su se terariji osušili, unutar njih je postavljena sterilna stelja, a sva oprema je vraćena na svoje mjesto. Nakon pripreme terarija, pažljivo sam odabrala životinje koje će biti upotrijebljene u pokusu te ih premjestila u pripremljene terarije kako bi prošle sedmodnevnu aklimatizaciju prije početka eksperimenta. Tijekom tog razdoblja, svakodnevno sam pratila ponašanje životinja, hranila ih i čistila. Dan prije početka pokusa, uklonila sam sve ostatke hrane iz terarija. Svaka pojedinačna jedinka je prošla kroz jedan ciklus eksperimenta. Svaki eksperimentalni ciklus uključivao je davanje označene hrane dinarskim voluharima, prikupljanje uzoraka fecesa tijekom 48 sati te analizu tih uzoraka u laboratoriju nakon završetka eksperimenta.

Eksperimentalni rad realiziran je u prostorijama Zoološkog vrta Grada Zagreba, dok je laboratorijska obrada uzoraka izvršena u laboratoriju Zavoda za ekologiju i uzgajanje šuma, Šumarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Detaljan protokol za pripremu terarija i životinja koje su ušle u pokus nalazi se u Prilogu 1.

#### 5.5.2.3. Sakupljanje uzoraka

Prije početka glavnog dijela eksperimenta, izvršena su preliminarna ispitivanja na dvije životinje sa svrhom razrade metodologije. Ispitivanja su uključivala analizu malog broja uzoraka fecesa (ukupno 37) radi detekcije Co i Cr. Ostaci hrane od prethodnih hranjenja izvađeni su iz njihovih nastambi 24 sata prije eksperimenta. Pelet s Cr i Co je ponuđen svakoj od 15 životinja za konzumaciju u 10:00 h. Uzorci fecesa prikupljeni su svakih 4 sata tijekom 48 sati. Uzorci su nakon prikupljanja spremljeni u zamrzivač (- 18 °C). Nakon prikupljanja svih uzoraka, isti su prevezeni na Šumarski fakultet, Sveučilišta u Zagrebu na odjel Ekološko-pedološkog laboratorija. Detaljan protokol za pripremu za sakupljanje uzoraka i sama metodologija skupljanja uzoraka nalazi se u Prilogu 2.

#### 5.5.2.4. Priprema uzoraka za određivanje tehnikom ICP-AES

Uzorci fecesa razarani su kiselinskom reagensu pomoću mikrovalnog sustava za razaranje uzoraka. Kemikalije korištene za raščinjavanje uzoraka su: dušična kiselina (HNO<sub>3</sub>, 65%, *p.a.*, "Carlo Erba", Italija) i vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%, *p.a.*, "Carlo Erba", Italija). Uređaj kojim je provedena digestija uzoraka jest: Anton Paar MW-3000 – Microwave digestion system, opremljen visokotlačnim teflonskim kivetama i rotorom XFS-100. Uzorak (~0,5000 g) odvagan

je u teflonskoj kiveti i pomiješan s 5 mL HNO<sub>3</sub> i 2 mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Instrumentni parametri digestije podešeni su kako slijedu:  $t_{\max} = 200$  °C,  $p_{\max} = 60$  bar;  $\tau$ (postupno zagrijavanje) = 10 min,  $\tau$ (zagrijavanje pri maksimalnim  $t, p$ ) = 20 min,  $\tau$ (hlađenje) = 20 min. U pojedinom ciklusu, s obzirom na kapacitet rotora XFS-100 razarano je po sedam ili osam uzoraka, pri čemu je u svakom drugom ciklusu digestiji bila podvrgnuta po jedna slijepa proba (sama smjesa HNO<sub>3</sub> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mL i 2 mL) (Radić i sur., 2018.). Priređene otopine kvantitativno su prenošene u polipropilenske odmjerne tikvice i nadopunjene do 100 mL. Na spektrometru ICP-AES takve su otopine mjerene: a) bez daljnjeg razrjeđenja i b) nakon daljnjeg razrjeđenja od 10x. Između dvaju ciklusa digestije uzoraka provedeno je ispiranje teflonskih kiveta, postupkom koji je analogan gore opisanoj metodi raščinjavanja uzoraka. Nakon toga kivete su bile temeljito isprane ultračistom vodom i osušene na zraku prije vaganja naredne serije uzoraka.

#### 5.5.2.5. Određivanje kobalta i kroma tehnikom ICP-AES

Kvantificiranje Co i Cr obavljeno je mjerenjem pri dvama razrjeđenjima: a) u otopinama koje su bile priređene razrjeđivanjem 7 mL otopine na 100 mL, te b) u otopinama koje su priređene daljnjim razrjeđenjem od 10x otopina opisanih pod a). Za mjerenje je korišten atomski emisijski spektrometar uz induktivno spregnutu plazmu (ICP-AES) Thermo Fisher iCAP 6300. Za mjerenje su odabrane valne duljine 228,616 nm (Co) i 205,552 nm (Cr). Kalibracijski pravac konstruiran je mjerenjem serije standardnih otopina: 0; 1; 10; 100; 500  $\mu\text{gL}^{-1}$ , koje su (osim instrumentne slijepa probe - 0  $\mu\text{gL}^{-1}$ ) bile priređene odgovarajućim razrjeđivanjem komercijalne standardne otopine (100 mg/L) proizvođača CPAChem (Bugarska). Uređaj je podešen na stabilne uvjete rada te je obavljena vanjska kalibracija serijom standardnih otopina priređenih razrjeđivanjem komercijalne multielementne standardne otopine ( $100 \pm 0,2$  mg L<sup>-1</sup>, 5% v/v HNO<sub>3</sub>) proizvođača CPAChem Ltd., Bugarska.

Detekcijske granice metode izračunate su kao trostruka standardna devijacija mjerenja slijepih proba procedure, preračunate na krute uzorke i iznose: Co – 0,054 mg/kg i Cr – 0,042 mg/kg. Glavni radni parametri spektrometra ICP-AES nalaze se u Prilogu 3. Rezultati mjerenja u otopinama preračunati su na krute uzorke te su iskazani kao maseni udjeli analita (Co i Cr) u uzorku fecesa. Konstatirano je da su rezultati dobiveni iz dviju serija otopina uzoraka međusobno podudarni. Pretpostavili smo da je marker potpuno izlučen kada su koncentracije markera u fecesu bile slične pozadinskim razinama određenim u uzorcima fecesa prije primjene markera.

#### 5.5.2.6. Statistička obrada podataka

Uzorci izlučivanja prikazani su na grafikonima koji prikazuju koncentracije markera iz fecesa tijekom vremena (Clauss i sur., 2007a.), izražavajući ih u apsolutnim vrijednostima i udjelima maksimalne koncentracije kako bi se nadoknadile razlike u apsolutnim koncentracijama postignutim za različite markere (Matsuda i sur., 2015.). Izračun postotka maksimalne koncentracije (engl. *percentage of maximum concentration*) proveli smo koristeći sljedeću formulu:

$$\% \text{ maksimalne koncentracije} = \frac{\text{trenutna koncentracija}}{\text{maksimalna koncentracija}} \times 100$$

"Trenutna koncentracija" predstavlja trenutnu vrijednost koncentracije tvari, dok "maksimalna koncentracija" označava najveću ili najvišu koncentraciju koja je postignuta za tu tvar.

Daljnji korak u obradi podataka bio je izračunavanje srednjih vremena retencije za tekuću i krutu frakciju probave (Tablica 12.). Srednje vrijeme retencije (eng. *mean retention time*, MRT), koje je najbolja pojedinačna mjera brzine prolaska želučane kaše (himusa) kroz probavni trakt, izračunato je prema Thielemans i sur. (1978.) pomoću formule:

$$\text{MRT} = \frac{\sum t_i C_i dt_i}{\sum C_i dt_i}$$

s  $C_i$  = koncentracija markera u uzorcima fecesa iz intervala predstavljenog vremenom  $t_i$  (sati nakon primjene markera, koristeći sredinu intervala uzorkovanja).

Interval (sati) odgovarajućeg uzorka ( $dt_i$ ), izračunat je kao:

$$dt_i = \frac{(t_{i+1} - t_i) + (t_i - t_{i-1})}{2}$$

Razlike između MRT-ova dva markera statistički su testirane pomoću Excel-a 2013 i internet portala <https://www.socscistatistics.com>. MRT između tekuće i krute frakcije uspoređivan je pomoću parnog t-testa. Podatke sam analizirala na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

Pretpostavlja se da je marker potpuno izlučen kada su koncentracije markera u fecesu bile slične pozadinskim razinama utvrđenima u uzorcima fecesa prije primjene markera. Za analizu podataka korišten je set podataka iz Excel datoteke "KROM.xlsx" za Cr, odnosno "KOBALT.xlsx" za Co. Učitavanje podataka iz Excel datoteke obavljeno je koristeći funkciju `read_excel` iz R jezika. Podaci su sadržavali mjerenja u različitim vremenskim točkama (4h, 8h, 12h, 16h, 20h, 24h, 28h, 32h, 36h, 40h, 44h, 48h), a svakoj koloni dodijeljeni su odgovarajući nazivi.

Za svaku vremensku točku (kolonu) izveden je Mann-Whitney U test (Wilcoxonov rang-sum test) kako bi se usporedile vrijednosti iz podataka sa zadanim vrijednostima: 0,741, 1,38, 0,530, 0,313 i 0,286. Ovaj test ne pretpostavlja normalnu distribuciju podataka, čineći ga prikladnim za ovakav tip analize. Test je proveden 100 puta, pri čemu je u svakoj iteraciji nasumično odabrano pet ID-ova iz seta podataka, nakon čega su uzete pripadajuće vrijednosti za testiranje. Za svaki test izračunate su P-vrijednosti za svaku vremensku točku. Rezultati su zatim agregirani i za svaku vremensku točku izračunati su intervali pouzdanosti (95% Cr/Co) za p-vrijednosti korištenjem funkcije kvantile.

Za vizualizaciju rezultata korištena je datoteka `ggplot2`. Napravljen je grafikon koji prikazuje srednje p-vrijednosti i njihove intervale pouzdanosti za svaku vremensku točku (Prilog 5.) Crvena isprekidana linija na grafikonu označava razinu značajnosti ( $p=0.005$ ). Ova metoda omogućava uvid u varijabilnost p= vrijednosti te identificiranje vremenskih točaka gdje postoji značajna razlika u vrijednostima između uzroka podataka i zadanih vrijednosti.

Kako bismo odredili tip kolonske separacije, izračunali smo faktor selektivnosti prema sljedećoj jednadžbu:

$$\text{Faktor selektivnosti} = \frac{\text{MRT tekuća frakcija (otopina)}}{\text{MRT kruta frakcija (čestice)}}$$

## 5.6. Probavljivost

### 5.6.1. Postavke istraživanja

Za potrebe znanstvenog istraživanja fokusiranog na proučavanje učinkovitosti probave kod dinarskih voluhara, korišteno je ukupno 30 jedinki, od kojih su tri služile kao rezerva u slučaju pogreške prilikom uzorkovanja ili analize uzoraka. Dinarski voluhari koji su držani u

zatočeništvu tijekom godine prolaze kroz dva hranidbena režima, ljetni i zimski, što je detaljnije pojašnjeno u poglavlju 5.2. Pokus je proveden na tijekom ljetnog režima hranidbe kako bi ispitala koliki će biti koeficijent probavljivosti hrane koja je sličnija onoj iz njihovog prirodnog staništa.

Istraživanje je provedeno tijekom kolovoza i rujna 2019. godine. Eksperimentalni rad se odvijao u prostorijama Zoološkog vrta Grada Zagreba, dok je laboratorijska obrada uzoraka izvedena u laboratoriju Zavoda za hranidbu životinja, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Gorana Kiša.

Svaka pojedinačna jedinka prošla je kroz deset ciklusa eksperimenta tijekom deset uzastopnih dana. Svaki eksperimentalni ciklus obuhvaćao je davanje njihove uobičajene hrane za ljetni period, uzimanje uzoraka iste hrane, prikupljanje uzoraka fecesa, vaganje preostale hrane i analizu tih uzoraka u laboratoriju.

#### 5.6.2. Sakupljanje uzoraka

Za početak sam napravila pilot istraživanje kako bih utvrdila kolike količine uzoraka je moguće prikupiti te mogu li se isti uspješno analizirati. U samoj provedbi istraživanja (priprema hrane, prikupljanje fecesa, početna vaganja tvari), sudjelovala je kolegica Ivana Kovarik Antonović, te dvije studentice, Nives Marčina i Maja Rendulić. Nakon uspješne provedbe pilot istraživanja, usuglasili smo se oko protokola za prikupljanje te sam započela s glavnim pokusom. Da bismo smanjili moguće pogreške uzrokovane sušenjem fecesa, uzorke smo uvijek prikupljali na isti način i u isto vrijeme svakog dana. Uzorci su nakon prikupljanja prevezeni u laboratorij Zavoda za hranidbu životinja, Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Detaljan protokol za prikupljanje uzoraka za testiranje probavljivosti nalazi se u u Prilog 4.

#### 5.6.3. Kemijske analize

Analiza fecesa i ostataka hrane provodila se svakodnevno za svaku jedinku, dok smo hranu koju smo nudili analizirali kao skupni uzorak svaki drugi dan. Nakon što smo osušili uzorke hrane, ostataka hrane i fecesa, mljeli smo ih u Cyclotec<sup>TM</sup> 1093 Sample Mill (Foss, Danska) kako bismo postigli veličinu čestica od  $\leq 1$  mm. Zatim smo proveli osnovnu kemijsku analizu prema normativima HRN ISO 6498:2001 (HRN, 2001.). Ova analiza obuhvaćala je određivanje mokre (svježe) tvari (MT), suhe tvari (ST), pepela, sirovih masti (SM), sirovih vlakana (SV) i sirovih bjelančevina (SB). Analiza svježe i suhe tvari za ostatke hrane i feces napravljena je za



svaku jedinku zasebno za svih deset dana, dok je analiza pepela, sirovih bjelančevina, masti i vlakana provedena samo za prvih pet dana zbog visokih troškova kemijske analize.

Sadržaj vode u uzorku smo odredili prema proceduri HRN ISO 6496:2001 (HRN, 2001.). Sušili smo oko 5 g uzorka u sušioniku s prisilnom ventilacijom na 103 °C tijekom četiri sata. Nakon sušenja, izračunali smo sadržaj vode pomoću sljedeće formule:

$$\text{Sadržaj vode (\%)} = \frac{m_1 - (m_3 - m_2)}{m_1} \times 100$$

Gdje je:  $m_1$  - masa uzorka (g),  $m_2$  - masa posudice za sušenje (g),  $m_3$  - masa posudice za sušenje s osušenim uzorkom (g).

Množenjem sadržaja vode (%) s 10 dobije se sadržaj vode u g/kg. Sadržaj suhe tvari (g/kg) izračunava se tako da se sadržaj vode (izražen u g/kg) oduzme od 1000 g/kg.

$$\text{Sadržaj suhe tvari } \left(\frac{g}{kg}\right) = 1000 - \text{sadržaj vode } \left(\frac{g}{kg}\right)$$

**Pepeo** u uzorku smo odredili prema proceduri HRN ISO 5984:2004 (HRN, 2004.). Za početak, uzeli smo oko 3 g uzorka i stavili ga u prethodno izvagani lončić. Lončić s uzorkom stavili smo na plamenik u digestoru te uzorak spaljivali tijekom 3 sata. Nakon toga, izvadili smo uzorak iz peći, ohladili ga na sobnu temperaturu te polili malo vode preko njega. Zatim smo uzorak stavili u sušionik zagrijan na  $103 \pm 2$  °C kako bi se prosušio oko pola sata. Prosušeni uzorak smo vratili u peć i nastavili s procesom spaljivanja još 1 sat. Nakon što je uzorak potpuno spaljen, ohladili smo ga u eksikatoru do sobne temperature te ga zatim izvagali na analitičkoj vagi. Maseni udio pepela u uzorku izračunali smo iz razlike u masi prije i poslije spaljivanja. Ovaj postupak nam je omogućio precizno određivanje sadržaja pepela u uzorku.

$$\text{Pepeo } \left(\frac{g}{kg}\right) = \frac{m_1 - (m_3 - m_2)}{m_1} \times 1000$$

Gdje je:  $m_1$  - masa uzorka (g),  $m_2$  - masa posudice za sušenje (g),  $m_3$  - masa posudice za sušenje s osušenim uzorkom (g).

Količinu **sirovih bjelančevina (SB)** smo odredili metodom po Kjeldahlu prema HRN ISO 5983-2:2010 (HRN, 2010.). Precizno 0,5 g uzorka smo spaljivali u bloku za spaljivanje Tecator™ Digestion System™ 2020 (Foss, Danska) na temperaturi od 420 °C. Uz dodatak 98%-tne sulfatne kiseline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i dvije tablete katalizatora Kjeltabs<sup>®</sup> (sadrže 3,5 g kalijevog sulfata i 0,4 g bakar (II) sulfata pentahidrata po tableti), stvorila se otopina amonij sulfata. Destilacija amonijaka i titracija su istovremeno izvršene u automatskom sistemu Kjeltac™ 2200 (Foss, Danska). U digest je dodana 30%-tna otopina natrijevog hidroksida (NaOH) u suvišku pri čemu je NH<sub>4</sub><sup>+</sup> prešao u amonijak (NH<sub>3</sub>). Oslobođeni amonijak je destilirani vodenom parom u 1%-tnu otopinu borne kiseline (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) s dodatkom otopine indikatora metil crvenog (C<sub>15</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>) i bromkrezol zelenog (C<sub>21</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S). Titracija je izvršena s otopinom klorovodične kiseline (0,1 mol/l). Sadržaj dušika je izračunat iz količine proizvedenog amonijaka, a sadržaj sirovih bjelančevina je preračunat množenjem dobivenog sadržaja dušika s faktorom 6,25. Ovaj postupak nam je omogućio precizno određivanje količine sirovih bjelančevina u uzorku, u skladu s metodom po Kjeldahlu.

Sadržaj **sirovih masti (SM)** u uzorcima smo odredili prema HRN ISO 6492:2001 (HRN, 2001.) normativima. Za pripremu uzorka, 1 g je ekstrahirano u lakom petroleteru (s točkom vrelišta od 40-60 °C) koristeći poluautomatsku jedinicu za ekstrakciju Soxtec™ 1040 (Foss, Danska). Nakon ekstrakcije, ostatak uzorka koji je dobiven je osušen u ventiliranom sušioniku na 103 °C tijekom 10 ± 0,1 minuta, nakon čega je izvagan. Sadržaj SM određen je prema formuli:

$$\text{Sirove masti } \left(\frac{\text{g}}{\text{kg}}\right) = \frac{w_1 - (w_3 - w_2)}{w_1} \times 1000$$

Gdje je: w<sub>1</sub> - masa suhog uzorka, (g), w<sub>2</sub> - masa ekstrakcione posudice, (g), w<sub>3</sub> - masa ekstrakcione posudice s ostatkom nakon ekstrahiranja i sušenja, (g).

**Sirova vlakna (SV)** čine organski ostatak hrane koji nije rastvoren pri kuhanju u otopini 0,225 M sumporne kiseline, a potom u 0,313 M otopini natrijeve lužine, prema metodi Henneberg i Stohmann (1860.). Cilj određivanja sirovih vlakana je razlikovanje visokoprobavljivih od niskoprobavljivih ugljikohidrata. Ova metoda temelji se na pretpostavci da otapanje u razblaženoj kiselini, a zatim u lužini, imitira proces probave u probavnom sustavu životinja. Osim toga, sadržaj sirovih vlakana služi kao pokazatelj energetske vrijednosti krmiva, pri čemu visok sadržaj sirovih vlakana ukazuje na nisku dostupnost energije. Analiza sirovih vlakana ne

obuhvaća sve sastojke vlaknaste krme, već samo 50-80% celuloze, 25% hemiceluloze i 10-50% lignina, dok pektini i silikati nisu obuhvaćeni (Van Soest, 1964.). Sirova vlakna se određuju u laboratoriju Sirova vlakna se određuju u laboratoriju Odjela za kontrolu kvalitete stočne hrane na Agronomskom fakultetu korištenjem analizatora Fibercap.

U prethodno izvađenu i izvađenu suhu Fiber Cap kapsulu ( $m_1$ ) s poklopcem, dodaje se 1 g uzorka ( $m_2$ ). Kapsula se zatvori, a uzorak se odmastiti uranjanjem u posudu s acetonom (preporučljivo za uzorke s 1-9% masti, a obavezno za one s 10% masti). Nakon odmašćivanja, uzorak se uranja u posudu s vrućom otopinom  $H_2SO_4$  (0,128 M), poklapa hladilom i lagano zagrijava pola sata. Nakon zagrijavanja, kapsula se tri puta ispere s vrućom destiliranom vodom. Potom se uzorak uranja u vruće otapalo NaOH (0,233 M), poklapa hladilom i ponovno lagano zagrijava pola sata. Nakon toga, uzorak se ponovno tri puta ispere s vrućom destiliranom vodom. Kapsula s uzorkom se zatim suši na 130 °C ( $m_2$ ), prenosi u prethodno izvagani lončić za žarenje ( $m_0$ ) i žari do konstantne mase na 600 °C. Sadržaj sirovih vlakana računa se prema formuli:

$$\text{Sadržaj sirovih vlakana (\%)} = \frac{(m_2 - m_0)}{(m_1 - m_0)} \times 100$$

Gdje je:  $m_0$  - masa prazne posudice,  $m_1$  - masa posudice sa uzorkom,  $m_2$  - masa posudice sa pepelom.

Sadržaj svih hranjivih tvari izražen je kao g/kg suhe tvari.

#### 5.5.2.6. Statistička obrada podataka

Za statističku analizu koristila Excel 2013. i internet portal <https://www.socscistatistics.com/>. Prvi korak u obradi podataka bio je izračunavanje količine pojedene hrane, na osnovu količine ponuđene hrane i ostataka. Nakon toga, izračunata je suha tvar ponuđene i pojedene hrane te fecesa. Na kraju sam iz dobivenih podataka izračunala prividni koeficijent probavljivosti (ADC, %) svježe i suhe tvari, sirovih bjelančevina, masti i vlakana. Prividni koeficijent probavljivosti svježe i suhe tvari izračunat je za svaku jedinku zasebno za svih deset dana, dok je za pepeo, sirove bjelančevine, masti i vlakna izračunat za prvih pet dana zbog visokih troškova kemijske analize.

Vrijednosti za prividni koeficijent probavljivosti organske i suhe tvari prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku jedinku (Tablica 13.). Nakon toga provela sam testiranje kako bih utvrdila eventualne razlike u koeficijentima između mužjaka i ženki prividne probavljivosti svježe i suhe tvari, pepela, sirovih bjelančevina, masti i vlakana koristeći Mann-Whitney U test. Podatke sam analizirala na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

Vrijednosti za prividni koeficijent probavljivosti sirovih bjelančevina, masti i ugljikohidrata prikazane su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija za svaku jedinku (Tablica 13.).

## 6. REZULTATI

### 6.1. Funkcionalna anatomija žvačnog sustava

#### 6.1.1. *In vivo* sila ugriza

*In vivo* zabilježene sile ugriza kod dinarskog voluhara su pokazale razlike u masi, sili ugriza i omjeru sile ugriza i tjelesne mase između mužjaka i ženki. Prosječna masa dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) iznosila je 72,75 g, prosječna sila ugriza bila je 25,84 N, a omjer sile ugriza i tjelesne mase iznosio je 357,05 N/kg (Tablica 8A.).

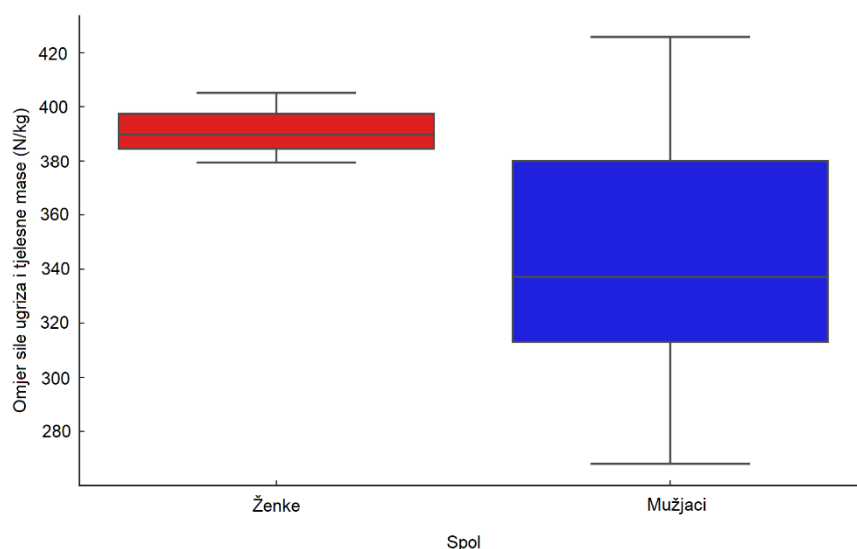
Tablica 8A. Sila ugriza *in vivo* i masa tijela i omjer sile ugriza i tjelesne mase kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimumi i maksimumi)), N=12.

Jedinka	Spol	Masa tijela (g)	Sila ugriza (N)	Omjer sile ugriza i tjelesne mase (N/kg)
DB1	Ž	77	30,0	389,61
DB2	M	70	26,6	380,00
DB3	M	77	24,1	312,99
DB4	M	68	28,0	411,76
DB5	M	68	25,3	372,06
DB6	Ž	79	32,0	405,06
DB7	M	70	23,6	337,14
DB8	M	70	29,8	425,71
DB9	Ž	63	23,9	379,37
DB10	M	78	20,9	267,95
DB11	M	81	22,4	276,54
DB12	M	72	23,5	326,39
<b>SV <math>\pm</math> SD</b>		<b>72,75 <math>\pm</math> 5,51</b>	<b>25,84 <math>\pm</math> 3,44</b>	<b>357,05 <math>\pm</math> 52,24</b>
<b>(min – max)</b>		<b>(63,00–81,00)</b>	<b>(20,90–32,00)</b>	<b>(267,95–425,71)</b>

Prosječna masa mužjaka (N=9) bila je  $72,67 \pm 4,77$  g, sila ugriza  $24,91 \pm 2,81$  N, a omjer sile ugriza i tjelesne mase  $345,62 \pm 55,88$  N/kg. Kod ženki (N=3) prosječna masa tijela bila je  $73,00 \pm 8,72$  g, sila ugriza  $28,63 \pm 4,22$  N, a omjer sile ugriza i tjelesne mase  $391,35 \pm 12,94$  N/kg (Tablica 8B.; Slika 35.).

Tablica 8B. Sila ugriza *in vivo* i masa tijela (srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimumi i maksimumi)) i omjer sile ugriza i tjelesne mase kod mužjaka i ženki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), N=12.

Spol	Masa tijela (g)	Sila ugriza (N)	Omjer sile ugriza i tjelesne mase (N/kg)
Mužjaci (N=9)	72,67 $\pm$ 4,77 (68 – 81)	24,91 $\pm$ 2,81 (20,90 – 29,80)	345,62 $\pm$ 55,88 (267,90 – 425,71)
Ženke (N=3)	73,00 $\pm$ 8,72 (63 – 79)	28,63 $\pm$ 4,22 (23,90 – 32,00)	391,35 $\pm$ 12,94 (379,37 – 405,06)

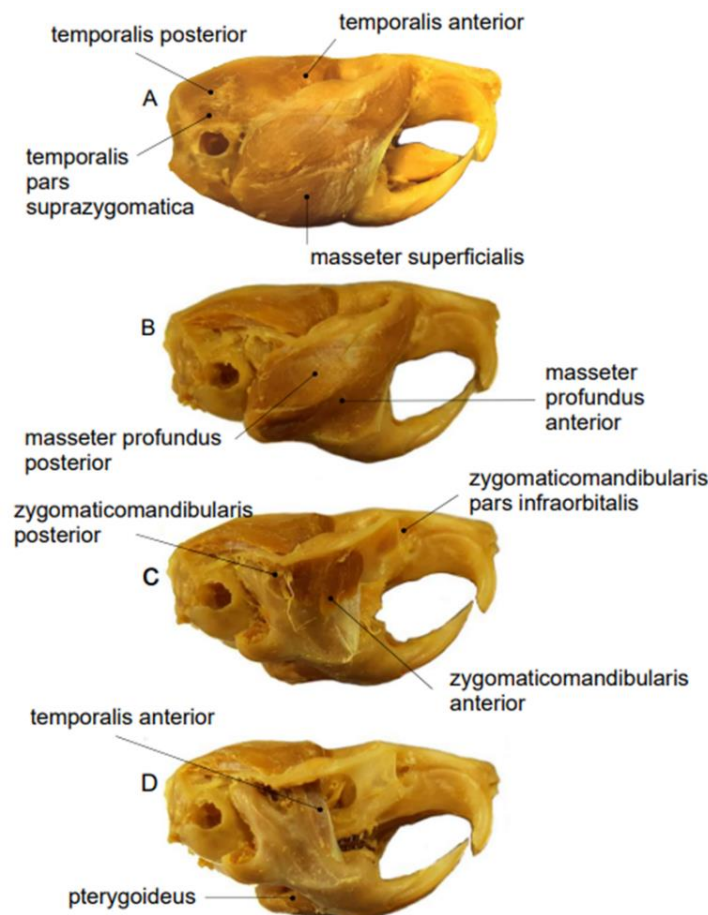


Slika 35. Grafički prikaz omjera *in vivo* sile ugriza i tjelesne mase kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), podijeljen prema spolu. Crvena kutija na grafu predstavlja raspodjelu podataka za ženke, plava kutija za mužjake. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim (25%) i gornjim kvartilima (75%), linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti.

Na grafu je vidljivo da ženke imaju veći i konzistentniji omjer sile ugriza i tjelesne mase u usporedbi s mužjacima, što je naznačeno manjim rasponom i višom vrijednošću medijana kod ženki. Mužjaci pokazuju veći raspon vrijednosti, što ukazuje na veću varijabilnost u omjeru sile ugriza i tjelesne mase. Najveća zabilježena vrijednost bila je kod ženke mase 0,079 kg i iznosila je 32 N, što je gotovo 405 N po kilogramu njezine tjelesne mase. Nadalje, najveći zabilježeni omjer sile ugriza i tjelesne mase bio je kod mužjaka i iznosio je 425,71 N/kg. Važno je napomenuti da je broj ženki uključenih u ovo istraživanje bio mali, što može utjecati na pouzdanost rezultata ili podataka.

### 6.1.2. Anatomska analiza i mase muskulature žvačnog sustava

Žvačna muskulatura (*m. mandibularis*) dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) sastoji se od sljepoočnog mišića (*m. temporalis*), žvačnog mišića (*m. masseter*), krilastog mišića (*m. pterygoideus*) i dvotrbušastog mišića (*m. digastricus*). *Musculus masseter* se sastoji od tri dijela: *m. masseter superficialis*; *m. masseter profundus* (*anterior* i *posterior*) i *m. masseter zygomaticomandibularis* (*anterior*, *posterior* i *infraorbitalis*). *Musculus pterygoideus* se sastoji od dva dijela: *m. pterygoidei internus* i *m. pterygoidei externus*. *Musculus temporalis* je također podijeljen u nekoliko dijelova: *m. temporalis anterior*, *m. temporalis suprazygomatica* i *m. temporalis posterior* (Slika 36.).

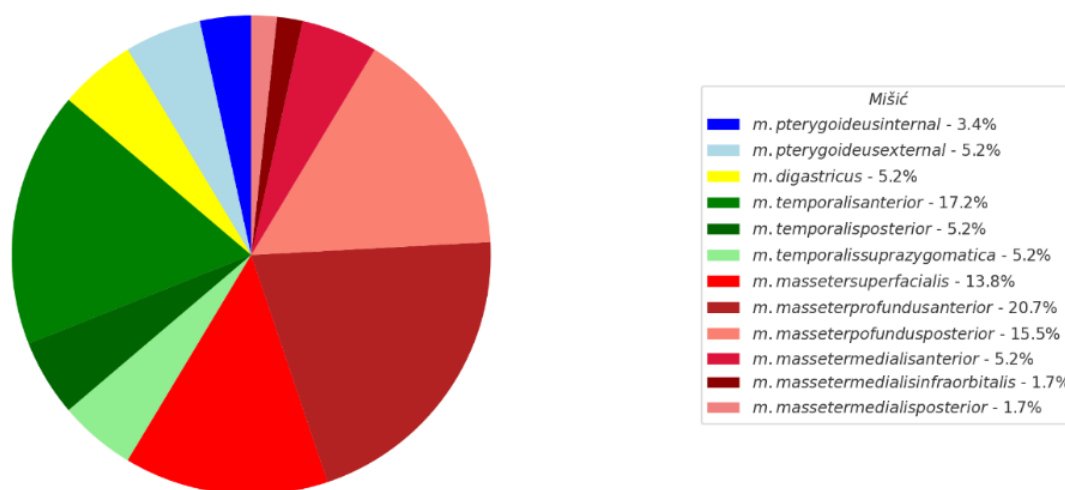


Slika 36. Mišići aduktora čeljusti kod vrste dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*). A. Nakon uklanjanja *m. digastricus*; B. Nakon uklanjanja *m. masseter pars superficialis*; C. Nakon uklanjanja *m. masseter pars profundus*; D. Nakon uklanjanja *m. zygomaticomandibularis*.

Mišići se znatno razlikuju po masi: *m. masseter profundus anterior* i *m. temporalis anterior* najviše doprinose ukupnoj masi aduktora čeljusti (20,69 i 17,24%), a zatim slijedi *m. masseter posterior* (15,52%) (Tablica 9.; Slika 37.).

Tablica 9. Mase i postotni udjeli mišića (srednja vrijednost ± standardna devijacija) unutar žvačnog sustava dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), N=3.

Žvačni mišići ( <i>m. mandibularis</i> )	Masa (g)	Udio mase pojedinog mišića unutar ukupne mase svih žvačnih mišića (%)
<i>m. digastricus</i>	0,0343 ± 0,0028	5,17
<b><i>m. digastricus</i> ukupno</b>	<b>0,03</b>	<b>5,17</b>
<i>m. masseter superficialis</i>	0,0799 ± 0,0040	13,79
<i>m. masseter profundus anterior</i>	0,1188 ± 0,0107	20,69
<i>m. masseter profundus posterior</i>	0,0909 ± 0,0009	15,52
<i>m. masseter medialis anterior</i>	0,0316 ± 0,0047	5,17
<i>m. masseter medialis infraorbitalis</i>	0,0128 ± 0,0047	1,72
<i>m. masseter medialis posterior</i>	0,0079 ± 0,0012	1,72
<b><i>m. masseter</i> ukupno</b>	<b>0,34</b>	<b>58,62</b>
<i>m. pterygoidei internus</i>	0,0243 ± 0,0038	3,45
<i>m. pterygoidei externus</i>	0,0345 ± 0,0131	5,17
<b><i>m. pterygoideus</i> ukupno</b>	<b>0,05</b>	<b>8,62</b>
<i>m. temporalis anterior</i>	0,1027 ± 0,0246	17,24
<i>m. temporalis posterior</i>	0,0323 ± 0,0032	5,17
<i>m. temporalis suprazygomatica</i>	0,0282 ± 0,0139	5,17
<b><i>m. temporalis</i> ukupno</b>	<b>0,16</b>	<b>27,59</b>



Slika 37. Grafički prikaz postotnih udjela mase pojedinog mišića unutar ukupne mase svih žvačnih mišića (%) kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) prikazan je prema bojama: plava i svijetlo plava označavaju *m. pterygoideus*, žuta označava *m. digastricus*, različite nijanse zelene predstavljaju *m. temporalis*, a crvene i ružičaste nijanse predstavljaju *m. masseter*.



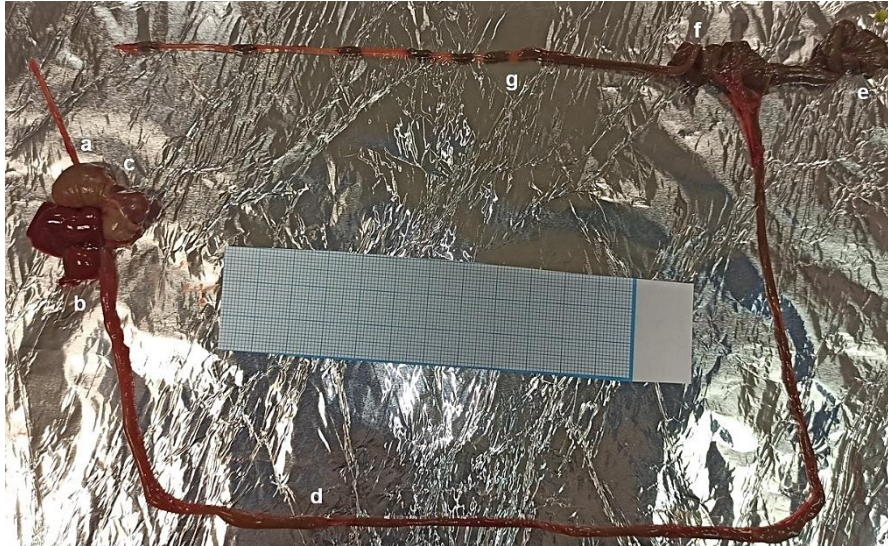
## 6.2. Morfologija i histologija probavnog sustava

Probavni sustav dinarskog voluhara sastoji se od usne šupljine, jednjaka, želuca, tankog, slijepog i debelog crijeva te rektuma (Slika 38.; Slika 39.).

Jednjak je skriven ispod dušnika. Želudac se nalazi u gornjem lijevom dijelu trbušne šupljine, dok se tanko crijevo prostire duž desne središnje strane. Velika jetra zauzima veći dio desne strane trbušne šupljine. Slijepo crijevo je smješteno na spoju tankog i debelog crijeva na lijevoj strani. Debelo crijevo započinje od slijepog crijeva i proteže se uzduž stražnje strane trbušne šupljine prema rektumu. Rektum je smješten u donjem dijelu trbušne šupljine.



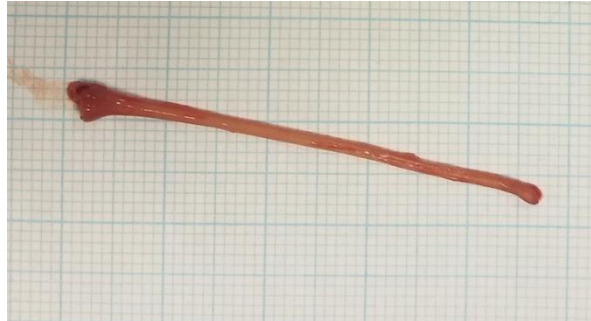
Slika 38. Topografski prikaz sekcije dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Prednji trbušni zid je uklonjen, prikazujući trbušne organe na njihovom mjestu. Jetra (1) i želudac (4) nalaze se u desnom i lijevom prednjem dijelu trbušne šupljine, redom. Petlja uzlaznog debelog crijeva (2) je savijena i zauzima veći dio lijeve strane trbušne šupljine zbog svoje veličine. Petlje tankog crijeva (3) nalaze se na desnoj strani dok se slijepo crijevo (5) nalazi uz lijevi zid trbušne šupljine.



Slika 39. Prikaz izoliranog probavnog trakta vrste dinarski voluhar (*Dinaromys bogdanovi*) Jednjak (a), jetra (b) i želudac (c), tanko crijevo (d), slijepo crijevo (e), proksimalni kolon (f), distalni kolon (g).

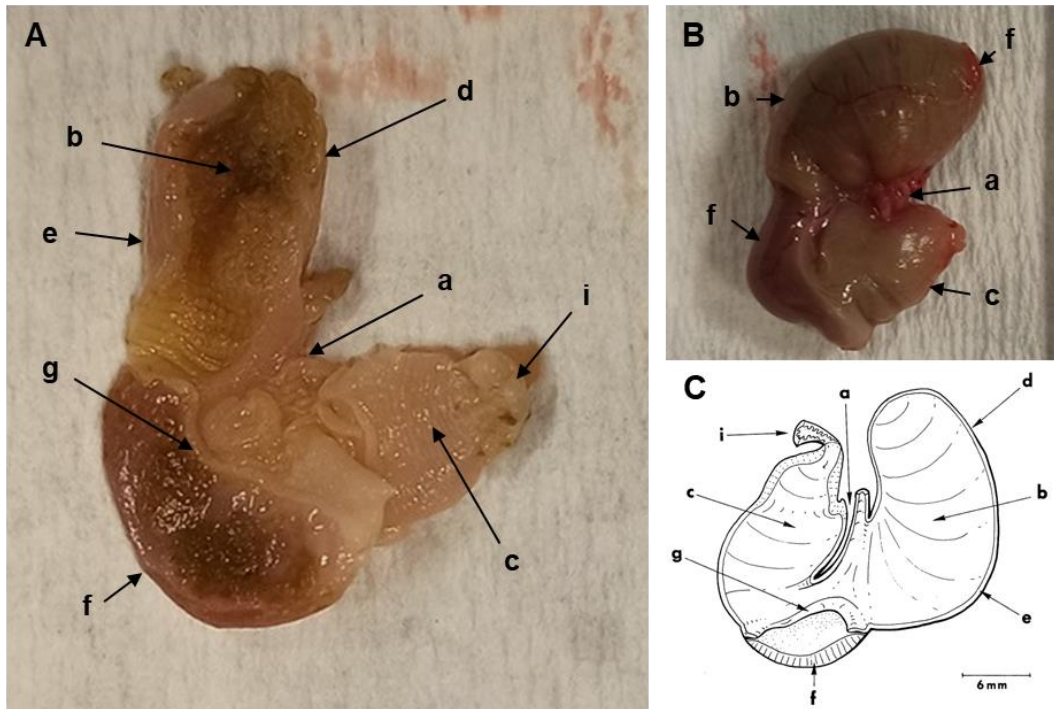
#### 6.2.1. Makroskopski opis i morfološke karakteristike probavnog sustava

**Jednjak** dinarskog voluhara je uska, tubularna struktura koja se proteže od usne šupljine do želuca (Slika 40.).



Slika 40. Prikaz jednjaka dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*)

**Želudac** je bilokularan hemiglanduralni (diskoidni). Morfološkom analizom primijećena je duboka konstrikcija, kutni utor (*incisura angularis*), koja je gotovo podijelila želudac na dva dijela. *Fornix ventricularis* se proteže iznad otvora jednjaka i lagano se povija prema njemu. Histološka analiza organa potvrdila je pretpostavku da se sastoji od nežljezdanog višeslojnog pločastog epitela i žljezdanog dijela (vidi odjeljak "6.2.3"). Žljezdani dio želuca jasno je okružen rubnim naborom (eng. *bordering fold*), ograničen je na malo područje u obliku diska na većem dijelu krivulje. Keratinizirani višeslojni pločasti epitel prekriva ostatak antruma (pilorusa) i korpusa (Slika 41.).



Slika 41. A. Prikaz vanjske i unutrašnje građe bilokularnog hemiglandularnog želuca dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). B. Vanjski prikaz bilokularnog hemiglandularnog želuca dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). C. Shematski prikaz bilokularnog hemiglandularnog želuca vrste meksički vulkanski miš (*Neotomodon alstoni*) – a. *incisura angularis*; b. *corpus*; c. *pilorus*; d. *fornix ventricularis*; e. keratinizirani višeslojni pločasti epitel; f. žljezdani epitel; g. rubni nabor; i. prednji dio duodenuma. Preuzeto i prilagođeno iz Carleton, 1973.

**Tanko crijevo** predstavlja jednostavnu tubularnu strukturu (Slika 42.).



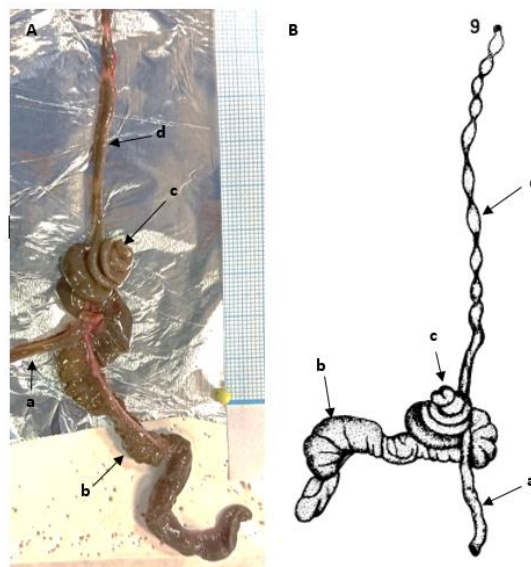
Slika 42. Prikaz tankog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*)

**Slijepo crijevo** dinarskog voluhara ističe se kao jedna od najvidljivijih struktura u probavnom traktu. Promjer slijepog crijeva je varijabilan i ovisi o količini sadržaja koji se nalazi unutar njega. Jedna od karakteristika koja ga izdvaja je njegova složena arhitektura nabora. Ovi nabori, poznati i kao *plicae semilunares*, stvaraju povećanu površinu unutar organa (Slika 43.).



Slika 43. Prikaz građe slijepog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) s vidljivim naborima. Uz slijepo crijevo prikazana je i postcekalna spirala na lijevoj strani slike, koja je uvijena i drugačije boje od ostatka slijepog crijeva.

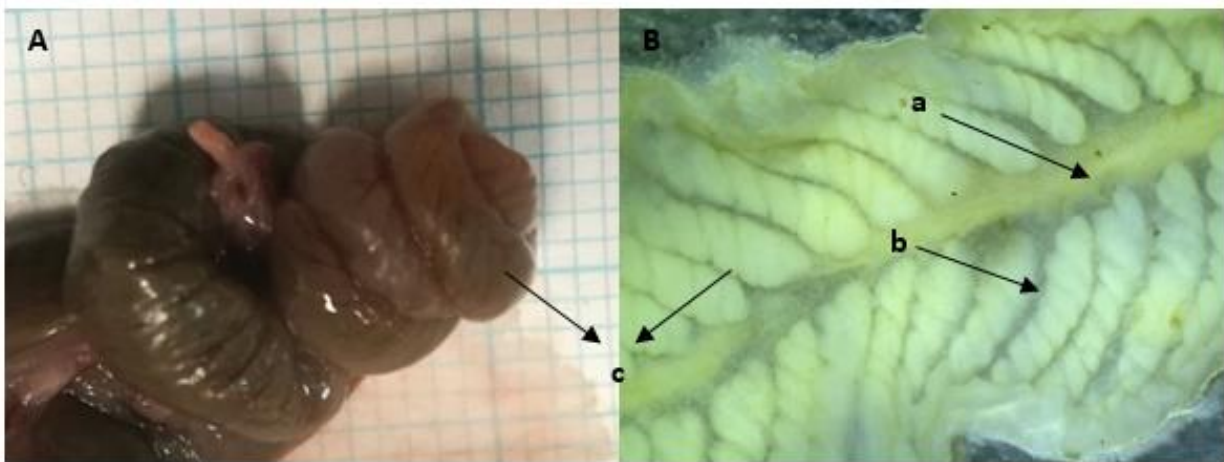
**Debelo crijevo** dinarskog voluhara prostire se od slijepog crijeva do anusa, završavajući rektumom. Između slijepog i debelog crijeva kod dinarskog voluhara uočila sam kolonsku petlju, odnosno post-cekalnu spiralu (*ansa coli paracoecalis*) koja se sastoji od uzlaznog i silaznog dijela. Uzlazni dio, nazvan *ampula coli*, jednako je širok kao slijepo crijevo, ali vrlo je kratak. Silazni dio je uzak i oblikuje dvostruku spiralu. Uvrnuti uzlazni dio tvori jezgru spirale preko koje se silazni dio namata prema dolje. Makroskopski, uzlazni dio izgleda kao produžetak samog slijepog crijeva, dok silazni dio više podsjeća na debelo crijevo (Slika 44.).



Slika 44. A. Prikaz građe slijepog crijeva te proksimalnog dijela debelog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). B. Shematski prikaz građe slijepog i proksimalnog debelog crijeva vrste vodeni voluhar (*Arvicola terrestris*) – a. tanko crijevo (*ileum*); b. slijepo crijevo; c. *ansa coli paracoecalis*; d. *colon*. Preuzeto i prilagođeno iz Lange i Staaland, 1970.

Sluznica na početku spiralnog kolona ima uzdužni nabor koji se proteže duž crijeva otprilike dva kruga. Taj nabor gotovo potpuno dijeli lumen crijeva na dva odvojena kanala: uski kanal i glavni kanal. Na svojem proksimalnom kraju, uski kanal se otvara u ampulu. Na svojem distalnom kraju, nastavlja se uzdužnim utorom s povezanim kosim brazdama u zidu debelog crijeva (Slika 45.).

Brazde razdvajaju nabore sluznice raspoređene u uzorku ribljih kostiju, ali se ne povezuju na aksijalnoj sredini debelog crijeva, gdje se nalazi uzdužni utor. Nabore se može pronaći od sredine unutarnje spirale do kraja proksimalnog dijela debelog crijeva.



Slika 45. Prikaz vanjske i unutarnje građe proksimalnog dijela debelog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). A. Makroskopski pogled na vanjsku površinu uzlaznog dijela debelog crijeva; B. lupa, povećanje 1,5x; a. glavni kanal; b. uski kanal; c. nabori sluznice.

#### 6.2.2. Morfometrija probavnog sustava

Prosječna masa dinarskih voluhara obuhvaćenih ovim dijelom istraživanja iznosi  $67,67 \pm 9,45$  g. Prosječna masa punog probavnog trakta iznosi  $10,36 \pm 2,39$  g, što čini 15,31% ukupne mase životinje. Dijelovi probavnog trakta iz kojih nije odstranjen sadržaj, tj. jednjak, želudac, tanko, slijepo i debelo crijevo imaju mase  $0,08 \pm 0,02$  g,  $3,86 \pm 1,45$  g,  $2,22 \pm 0,66$  g,  $3,54 \pm 0,89$  g,  $0,66 \pm 0,24$  g odnosno čine 0,77%, 37,28%, 21,45%, 34,15%, 6,35% ukupne mase probavnog trakta životinje.

Prosječna masa crijeva sa sadržajem iznosi  $6,42 \pm 1,46$  g. Tanko, slijepo i debelo crijevo čine 34,62%, 55,10%, 10,25% ukupne mase crijeva. Nadalje, prosječna masa praznog želuca i praznog slijepog crijeva iznosi  $0,99 \pm 0,09$  g,  $1,38 \pm 0,24$  g (Tablica 10A.).

Tablica 10A. Morfometrijske mjere mase pojedinih organa dinarskog vouhara (*Dinaromys bogdanovi*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimalna do maksimalna vrijednost) te udio mase organa unutar probavnog trakta. Uzete mjere za komponente probavnog sustava s njihovim sadržajem.

<i>Dinaromys bogdanovi</i> n = 7	Masa organa (g)	Udio organa unutar probavnog trakta (%)	Udio organa unutar probavnog trakta (bez jednjaka) (%)	Udio organa unutar probavnog trakta (samo crijeva) (%)
Jednjak pun	0,08 $\pm$ 0,02 (0,05 – 0,12)	0,77	-	-
Želudac pun	3,86 $\pm$ 1,45 (2,13 – 5,63)	37,28	37,57	-
Tanko crijevo puno	2,22 $\pm$ 0,66 (0,91 – 3,11)	21,45	21,62	34,62
Slijepo crijevo puno	3,54 $\pm$ 0,89 (2,84 – 5,50)	34,15	34,41	55,10
Debelo crijevo puno	0,66 $\pm$ 0,24 (0,22 – 0,92)	6,35	6,40	10,25
Tanko, slijepo i debelo crijevo puno	6,42 $\pm$ 1,46 (5,15 – 9,53)	61,95	62,43	

Prosječna duljina probavnog trakta iznosi 839,16  $\pm$  148,28 mm. Prosječne duljine jednjaka, želuca, tankog, debelog i slijepog crijeva iznose 45,43  $\pm$  5,75 mm, 35,73  $\pm$  7,22 mm, 463,4  $\pm$  59,19 mm, 196,86  $\pm$  59,23 mm i 97,57  $\pm$  54,96 mm redom, što čini 5,54%, 4,26%, 55,24%, 23,46% i 11,63% ukupne duljine probavnog trakta (Tablica 10B.).

Prosječna duljina tankog i debelog crijeva iznosi 660,43  $\pm$  100,09 mm, što čini 78,70% ukupne duljine probavnog sustava. Prosječna duljina slijepog i debelog crijeva iznosi 294,43  $\pm$  103,46 mm, što čini 35,09% ukupne duljine probavnog sustava. Nadalje, prosječna duljina crijeva je 758  $\pm$  142,10 mm. Tanko, slijepo i debelo crijevo činili su 61,16%, 12,87%, 25,97% ukupne duljine crijeva (Tablica 10B.).

Tablica 10B. Morfometrijske mjere duljina pojedinih organa probavnog sustava dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimalna do maksimalna vrijednost) te udio duljine organa unutar probavnog trakta. Uzete su mjere za jednjak, želudac, tanko, debelo i slijepo crijevo.

<i>Dinaromys bogdanovi</i> n = 7	Duljina organa (mm)	Udio organa unutar probavnog trakta (%)	Udio organa unutar probavnog trakta (bez jednjaka) (%)	Udio organa unutar probavnog trakta (samo crijeva) (%)
Jednjak	45,43 $\pm$ 5,74 (39 – 55)	5,41		
Želudac	35,73 $\pm$ 7,22 (28 – 45)	4,26	4,50	
Tanko crijevo	463,57 $\pm$ 59,19 (375 – 542)	55,24	58,40	61,16
Slijepo crijevo	97,57 $\pm$ 54,96 (64 – 219)	11,63	12,29	12,87
Debelo crijevo	196,86 $\pm$ 59,26 (140 – 290)	23,46	24,80	25,97
Tanko i debelo crijevo	660,43 $\pm$ 100,09 (515 – 798)	78,70	83,20	87,13
Slijepo i debelo crijevo	294,43 $\pm$ 103,46 (206 – 798)	35,09	37,09	38,84

### 6.2.3. Mikroskopski opis probavne cijevi, histomorfometrijska i histokemijska analiza pojedinih slojeva

Budući da sve tri jedinke nisu imale potpuno očuvan probavni sustav i nisu bile fiksirane odmah nakon uginuća, zabilježene su manje promjene u građi sluznice tankog i debelog crijeva kod nekih jedinki, uključujući oštećenja površinskog sloja i raslojavanja između vezivnog i okolnih slojeva.

U ovom dijelu rada rezultati histološkog opisa i morfometrije temelje se na tri reprezentativna primjerka, osim u sljedećim slučajevima: žljezdani dio želuca gdje su *tunica externa* i *lamina epithelialis* izmjerene kod dvije jedinke; tanko crijevo gdje je *tunica externa* izmjerena kod dvije jedinke; debelo crijevo gdje su *tunica mucosa* i *tunica externa* izmjerene kod dvije jedinke; te slijepo crijevo gdje je *tunica muscularis* izmjerena kod dvije jedinke, a *tunica externa* kod jedne jedinke. Koristeći linearnu regresiju i uzimajući u obzir vrijednosti stupca i

prosjeck ostalih vrijednosti pojedinog sloja za jedinku, popunila sam tablicu vrijednosti koje nisu mogle biti izmjerene.

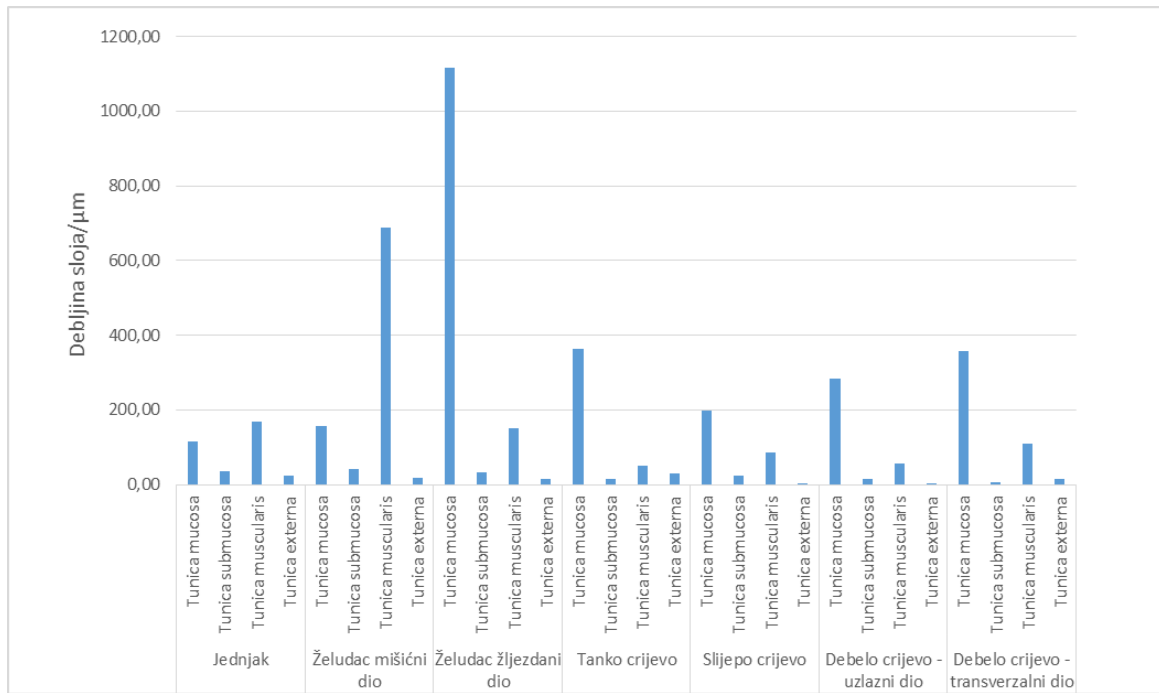
Histološka analiza izrađenih trajnih preparata na svjetlosnom mikroskopu pokazala je da građa probavne stijenke ove vrste sadržava tipične slojeve sluznice, podsluznice, mišićnog sloja i vanjske ovojnice različitih debljina (Tablica 11.; Slika 46.; Slika 47.).



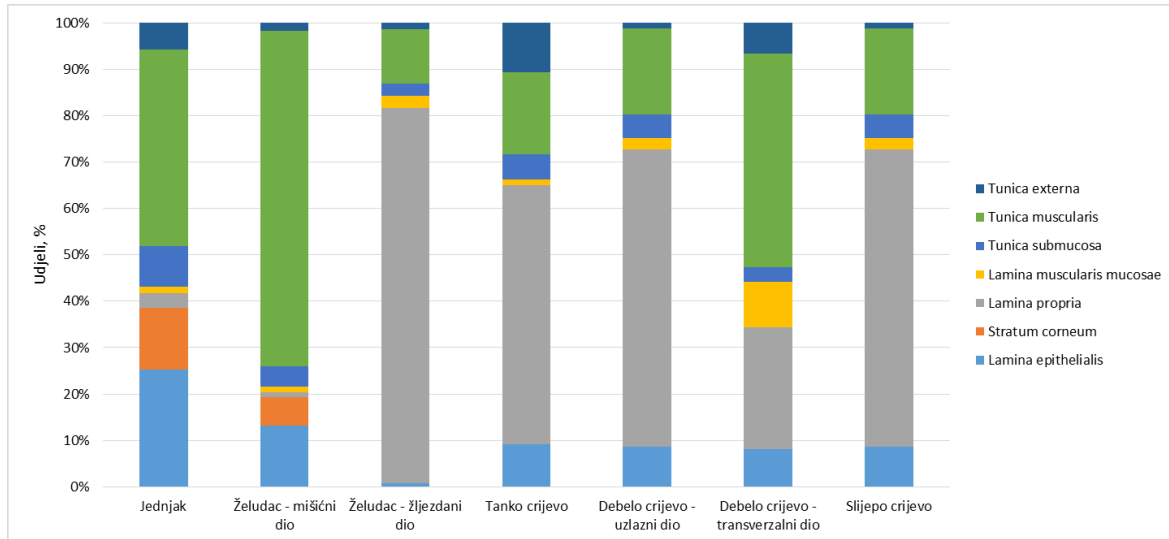
Tablica 11. Srednje vrijednosti po uzorkovanoj jedinki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) za histomorfometrijske mjere pojedinih slojeva za jednjak, mišićni i žljezdani dio želuca, tanko, debelo i slijepo crijevo. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost ± standardna devijacija (minimalna do maksimalna vrijednost), (N=3).

Analizirani dijelovi probavne cijevi	<i>Tunica mucosa</i>	<i>Stratum corneum</i>	<i>Lamina epithelialis</i>	<i>Lamina propria</i>	<i>Lamina muscularis mucosae</i>	<i>Tunica submucosa</i>	<i>Tunica muscularis</i>	<i>Tunica muscularis externa</i>	<i>Tunica muscularis interna</i>	<i>Tunica externa</i>
	Debljina pojedinih slojeva (µm)									
Jednjak	115,23 ± 28,23 (75,50 – 155,48)	52,35 ± 25,10 (19,35 – 93,77)	99,94 ± 26,96 (71,12 – 141,17)	12,77 ± 3,12 (7,82 – 17,34)	5,79 ± 1,50 (3,20 – 7,51)	34,81 ± 12,66 (17,54 – 55,83)	167,19 ± 19,75 (145,62 – 210,39)	62,85 ± 9,54 (52,81 – 84,18)	80,42 ± 10,22 (65,59 – 92,98)	22,85 ± 22,75 (4,75 – 80,07)
Želudac mišićni dio	155,63 ± 43,22 (94,77 – 216,16)	58,91 ± 23,77 (21,93 – 100,60)	124,70 ± 32,88 (73,84 – 164,50)	10,33 ± 4,04 (5,43 – 16,92)	11,57 ± 4,84 (5,42 – 19,33)	41,88 ± 20,06 (19,39 – 90,00)	687,52 ± 99,34 (538,01 – 809,27)	-	-	16,67 ± 7,10 (3,73 – 25,37)
Želudac žljezdani dio	1117,38 ± 135,14 (900,31 – 1239,42)	-	9,56 ± 0,63 (8,64 – 10,27)	1021,39 ± 77,42 (908,75 – 1116,69)	32,57 ± 8,28 (17,11 – 44,49)	32,24 ± 16,11 (17,66 – 68,77)	149,73 ± 92,32 (35,98 – 270,29)	-	-	16,11 ± 5,08 (11,28 – 25,78)
Tanko crijevo	362,36 ± 111,96 (213,36 – 519,26)	-	26,49 ± 6,40 (18,84 – 35,37)	160,80 ± 147,17 (18,74 – 448,91)	3,63 ± 1,70 (1,24 – 6,81)	15,52 ± 11,81 (2,21 – 30,31)	51,01 ± 8,78 (35,34 – 61,63)	-	-	30,73 ± 31,78 (5,70 – 73,61)
Slijepo crijevo	356,47 ± 217,92 (137,36 – 688,78)	-	19,31 ± 4,52 (13,14 – 28,88)	62,34 ± 56,25 (15,64 – 201,24)	23,45 ± 15,39 (6,02 – 51,00)	7,39 ± 4,95 (1,19 – 15,28)	109,78 ± 18,74 (91,82 – 150,42)	-	-	15,52 ± 20,14 (1,60 – 53,22)
Debelo crijevo uzlazni dio *	283,98 ± 141,62 (84,13 – 525,26)	-	26,47 ± 7,32 (17,12 – 38,83)	199,05 ± 133,46 (39,81 – 415,30)	7,77 ± 2,23 (2,99 – 10,53)	15,52 ± 15,33 (5,96 – 55,49)	57,75 ± 15,47 (37,79 – 82,59)	-	-	3,51 ± 2,38 (1,92 – 6,25)
Debelo crijevo transverzalni dio	197,25 ± 141,54 (112,65 – 474,70)	-	39,17 ± 14,60 (21,18 – 68,51)	22,79 ± 10,37 (11,06 – 41,89)	10,48 ± 4,92 (4,44 – 20,01)	23,93 ± 16,52 (2,48 – 47,73)	85,37 ± 21,43 (51,27 – 112,09)	-	-	2,65 ± 1,13 (1,27 – 4,37)

\* *ansa coli paracoecalis*



Slika 46. Ukupne srednje vrijednosti histomorfometrijskih mjera za svaki pojedini histološki sloj unutar probavne cijevi dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), te za svaku analiziranu regiju (jednjak, mišićni i žljezdani dio želuca, tanko i slijepo crijevo, te uzlazni i transverzalni dio debelog crijeva) duž probavne cijevi. N = 3.



Slika 47. Prikaz postotnih udjela debljina slojeva u zidu probavne cijevi kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*), za svaku analiziranu regiju (jednjak, mišićni i žljezdani dio želuca, tanko i slijepo crijevo, te uzlazni i transverzalni dio debelog crijeva) duž probavne cijevi. N = 3.

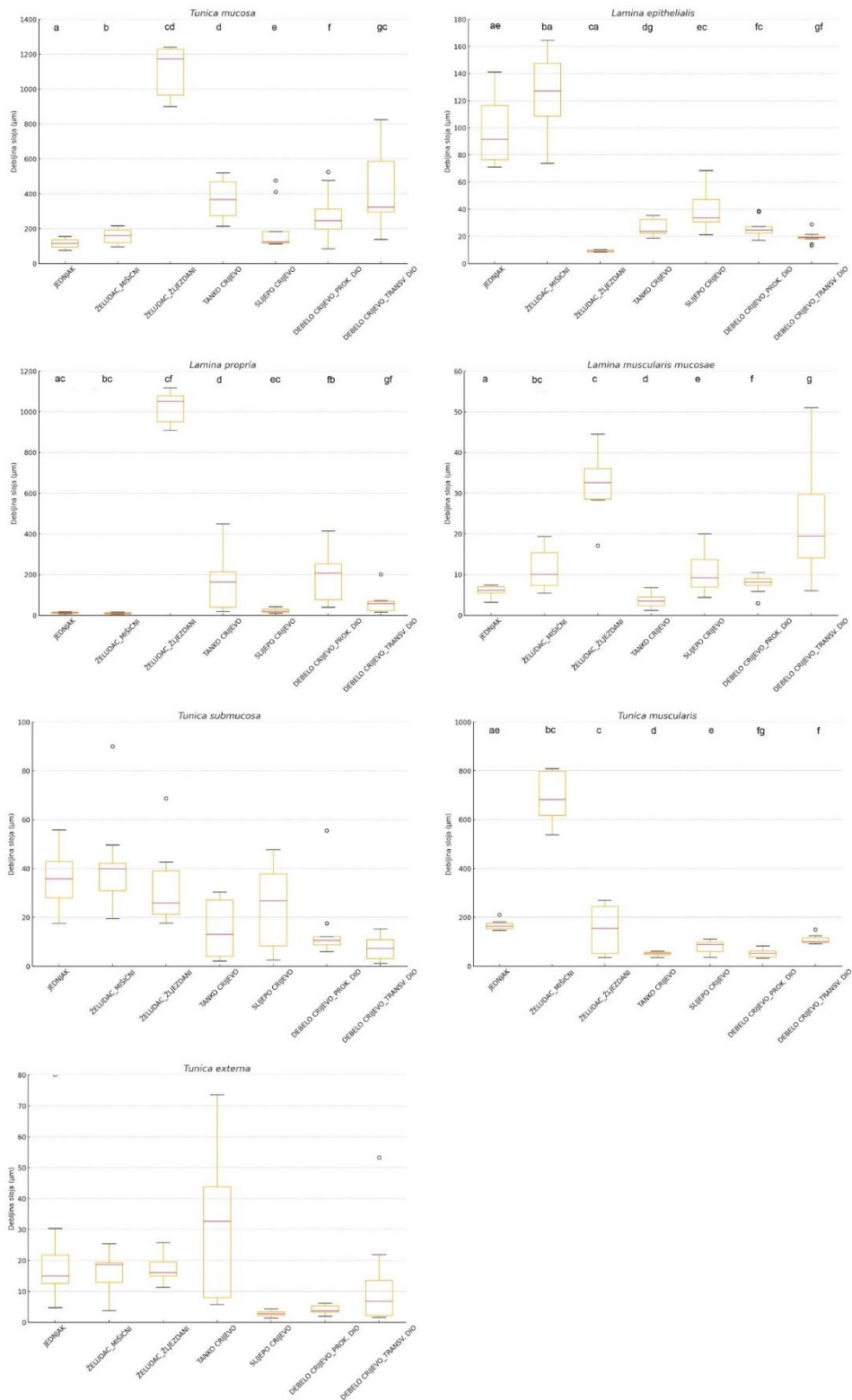
Za statističku analizu razlika u debljini slojeva unutar dijelova probavne cijevi korišten je Friedmanov test, koji je pokazao statistički značajne razlike ( $p < 0,05$ ).

Nakon primjene Holm-Bonferroni korekcije, utvrđeno je da postoje statistički značajne razlike u sloju *tunica mucosa* između žljezdanog želuca i tankog crijeva, kao i između žljezdanog želuca i transverzalnog dijela debelog crijeva.

Daljnja analiza je pokazala statistički značajne razlike u sloju *lamina epithelialis* između transverzalnog i proksimalnog dijela debelog crijeva, jednjaka i slijepog crijeva, mišićnog želuca i jednjaka, žljezdanog želuca i jednjaka, žljezdanog želuca i proksimalnog dijela debelog crijeva, žljezdanog želuca i slijepog crijeva, te tankog crijeva i transverzalnog dijela debelog crijeva.

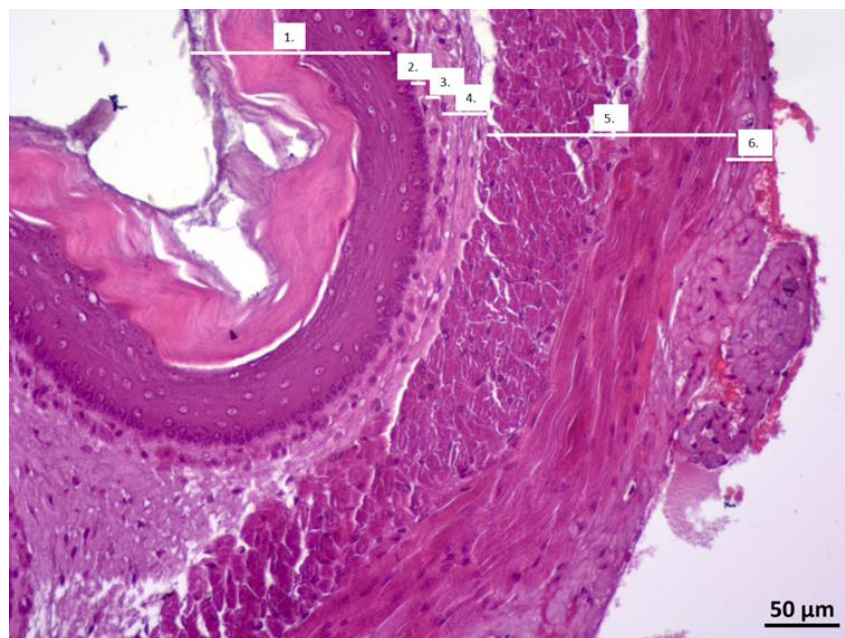
Također, u sloju *lamina propria* primijećene su statistički značajne razlike između žljezdanog i mišićnog želuca, između žljezdanog želuca i jednjaka, između žljezdanog želuca i proksimalnog dijela debelog crijeva, između žljezdanog želuca i slijepog crijeva, između mišićnog želuca i proksimalnog dijela debelog crijeva, te između transverzalnog i proksimalnog dijela debelog crijeva. Što se tiče sloja *lamina muscularis mucosae*, primijećene su statistički značajne razlike između žljezdanog i mišićnog želuca.

Na kraju, u sloju *tunica muscularis* utvrđene su statistički značajne razlike između transverzalnog i proksimalnog dijela debelog crijeva, između jednjaka i slijepog crijeva, te između mišićnog želuca i žljezdanog želuca. Nakon primjene Holm-Bonferroni korekcije, utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u sloju *tunica submucosa* i *tunica externa* (Slika 48.).



Slika 48. Grafički prikaz varijacija u debljini slojeva probavnih stijenki između različitih dijelova probavnog sustava. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti, osim iznimnih (eng. *outlier*) vrijednosti (kružni markeri). Različita slova iznad stupaca predstavljaju značajnu statističku razliku u Friedmanovom testu s Holm-Bonferroni korekcijom.

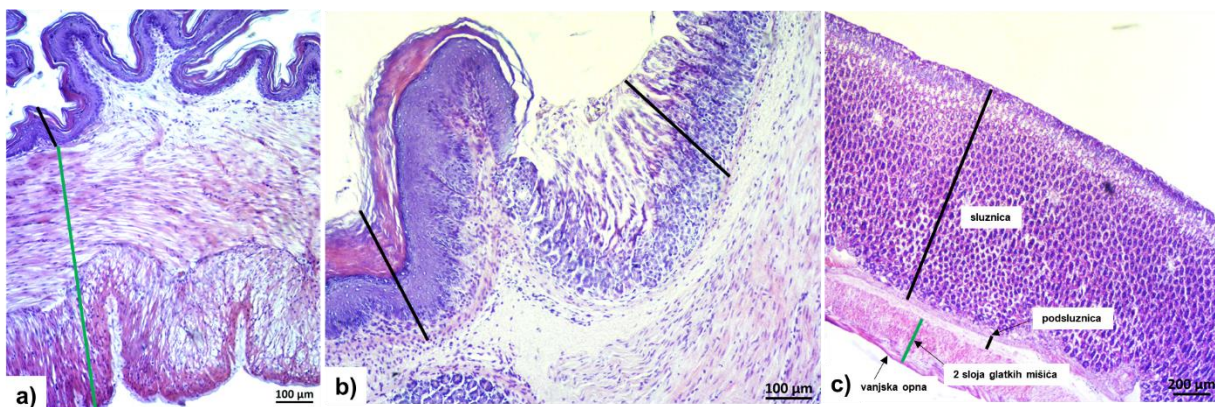
**Jednjak** - Sluznica jednjaka dinarskog voluhara sastoji se od višeslojnog pločastog epitela, unutar kojeg su se mogli razlikovati površinski vanjski keratinizirani sloj (mrtvih stanica koje se ljušte), i unutrašnji sloj živih stanica koje se pri bazi mitotski dijele i leže na bazalnoj membrani. Keratinizirani sloj je bio dosta debeo i varirao je od 19,35 do 93,77  $\mu\text{m}$  debljine, dok je unutrašnji živi sloj epitelnih stanica bio izgrađen najčešće od 5 do 7 slojeva stanica i srednja vrijednost mu je bila oko  $99,94 \pm 26,96 \mu\text{m}$ . Obzirom da je sluznica naborana, debljine izmjerenih slojeva dosta variraju, što je vidljivo u minimalnim i maksimalnim vrijednostima ovoga sloja (75,50 do 155,48  $\mu\text{m}$  debljine) jer su mjerenjima zahvaćeni i nabori, ali i područja između nabora. Vezivno tkivo sluznice je jednostavno građeno od vezivnog tkiva u kojem su krvne žile, bez vidljivih egzokrinih žlijezda. Mišićni sloj sluznice je bio najtanji sloj sluznice, jedva mjerljiv i uočljiv kao jedan niz mišićnih vlakana koja omeđuju sloj sluznice. Podsluznica je građom bila slična vezivnom tkivu sluznice, bez ikakvih uočenih dodatnih struktura. Ovaj sloj je deblji u usporedbi s vezivnim tkivom sluznice, ali je također bio dosta varijabilan u mjerama jer je podsluznica pratila nabore sluznice i zato je na pojedinim mjestima ulazila u te nabore i zadebljavala se. Mišićni sloj je izgrađen od dva ograničena sloja: kružni sloj poprečno prugastih mišića i uzdužni sloj poprečno prugastih mišića. Vanjska opna je bila građena od vezivnog tkiva koja je u pojedinim dijelovima sadržavala snopove živaca i krvnih žila pa je na tim dijelovima bila zadebljala (Slika 49.).



Slika 49. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju jednjak dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u poprečnom presjeku. Oznake na slici predstavljaju dijelove sluznice (1 – lamina epithelialis, 2 – lamina propria, 3 – lamina muscularis mucosae, 4 – tunica submucosa, 5 – tunica muscularis, 6 – tunica externa). HE, x400.

**Želudac** - Na histološkim preparatima želuca se, sukladno vanjskoj morfologiji i funkciji, vidjela podjela na dvije regije: mišićni i žljezdani želudac. Pokrovni epitel mišićnog želuca (Slika 50. pod A) građen je od keratiniziranog višeslojnog pločastog epitela, koji je nešto deblji u odnosu na keratinizirani dio epitela jednjaka ( $52,35 \pm 25,10 \mu\text{m}$  vs  $58,91 \pm 23,77 \mu\text{m}$ ), vezivnog tkiva sluznice u kojem nisu vidljive žlijezde i tankog sloja mišića sluznice. Ovaj dio sluznice je relativno tanak ( $11,57 \pm 4,84$ ) i ima izražene nabore sluznice (ruge). U ovoj regiji želuca cijelom stijenkom probavne cijevi dominira sloj mišića koji je građen od glatkih mišićnih stanica. Vanjska opna je građena od tanke serozne opne.

U prijelaznom dijelu između mišićne i žljezdane regije (Slika 50. pod B) vidljiva je promjena u građi sluznice: epitel se mijenja iz višeslojnog keratiniziranog u jednoslojni cilindrični, a sluznicom dominiraju žlijezde. Prijelaz između ta dva područja je oštar, označen rubnim naborom i obloženim rožnatim epitelom.

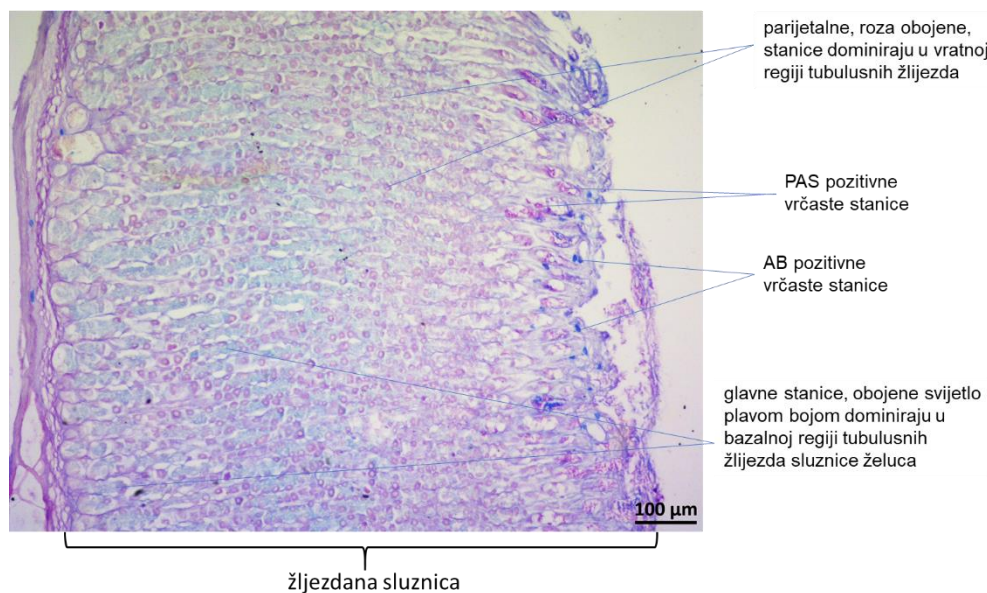


Slika 50. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju želudac dinarskoga voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u (a) mišićnoj regiji želuca, u (b) prijelaznoj regiji i u (c) žljezdanoj regiji. Glavna razlika u građi između mišićne i želučane regije je u građi i debljini sluznice (označena crnom linijom) i debljini mišićnog sloja probavne cijevi (označeno zelenom linijom): u mišićnoj regiji stijenkom probavila dominiraju mišići, dok je u želučanoj regiji najveći dio stijenke žljezdana sluznica.

U žljezdanom dijelu želuca (Slika 50. pod C), sluznica nije imala vidljive nabore kao u mišićnom dijelu. Pokrovni epitel je bio od visokih cilindričnih stanica, a vezivno tkivo sluznice ispunjeno dugačkim tubulusnim želučanim žlijezdama koje su se pružale od pokrovnog epitela na mišićnog sloja sluznice u dosta ravnom trakastom rasporedu. Ovaj dio sluznice sa žljezdanom funkcijom bio je puno deblji u odnosu na sluznicu mišićnog dijela želuca i iznosio je  $1117,38 \pm 135,14 \mu\text{m}$  (vs  $155,63 \pm 43,22 \mu\text{m}$ ). Mišićni sloj sluznice je bio dosta dobro vidljiv

i također nešto deblji u odnosu na mišićni dio sluznice želuca ( $11,57 \pm 4,84 \mu\text{m}$  vs  $32,57 \pm 8,28 \mu\text{m}$ ). Vezivno tkivo podsluznice je bilo jednostavno građeno bez uočenih dodatnih struktura u tkivu. Mišićni sloj je bio u promjeru dosta tanji u odnosu na mišićnu regiju želuca. U najdebljim dijelovima mišićnog sloja mogla su se vidjeti tri sloja glatkih mišića, kružni, uzdužni i kosi mišići, okruženi s nešto veziva u kojem se nalazi živčevlje parasimpatikusa. Vanjska opna probavne stijenke je seroza, dobro prokrvljeno vezivno tkivo, prekriveno sa stanicama mezotela.

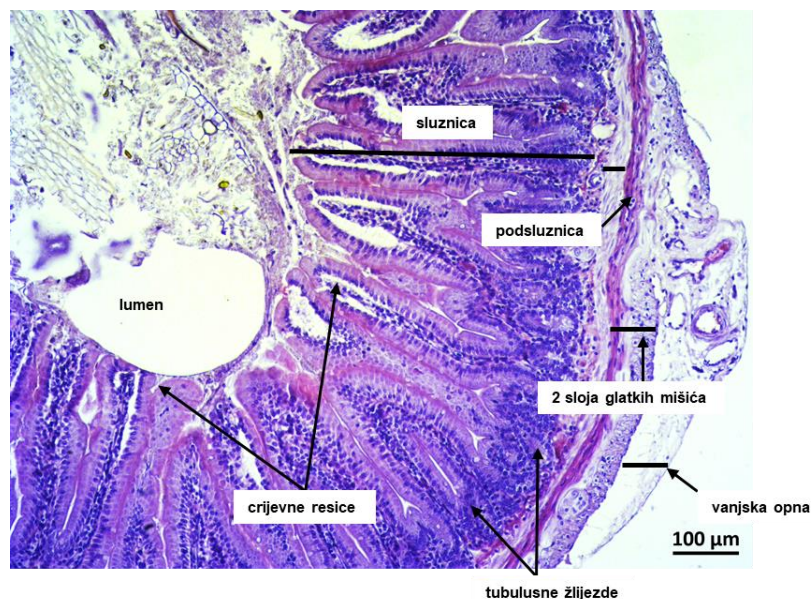
Obojana pomoću histokemijske AB/PAS reakcije, sluznica žljezdanog dijela želuca pokazala je da se površinske mukozne vrčaste stanice dijele na PAS+ stanice (ljubičasta boja) koje označavaju prisutnost neutralnih mucina i AB+ stanice (plava boja) koje prikazuju kiselinu grupu mukopolisaharida. Parijetalne stanice koje proizvode želučanu kiselinu obojane AB/PAS metodom bile su vidljive kao svijetlo roze stanice koje su bile prisutne cijelom dužinom želučanih žlijezda, iako ih je u vratom dijelu žlijezda bilo nešto više. Glavne (zimogene) stanice koje proizvode probavne enzime su se prikazivale kao svijetlo plave stanice (u AB/PAS metodi) te su dominirale u središnjem dijelu sluznice i poglavito u bazalnim dijelovima žlijezda (Slika 51.).



Slika 51. AB/PAS histokemijsko bojenje žljezdanog dijela želuca dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) s jasno vidljivim vrčastim, parijetalnim i glavnim stanicama.

**Tanko crijevo** - Sluznica tankog crijeva (jejunum) građena je od pokrovnog epitela, jednoslojnog cilindričnog epitela s mikrovilima, ispod kojeg se nalazi *lamina propria*, rahlo vezivno tkivo. Sluznica je dosta visoka ( $362,36 \pm 111,96 \mu\text{m}$ ) nabrana u prstolike nastavke,

crijevne resice koje u ispruženom obliku na poprečnom presjeku najčešće budu 350-400  $\mu\text{m}$  duge i pružaju se u lumen crijeva. Mala količina vrčastih stanica (jednostanične mukozne žlijezde) ugrađena je u visoki pokrovni epitel između enterocita ( $26,49 \pm 6,40 \mu\text{m}$ ). Pri bazi crijevnih resica nalaze se Lieberkühnove kripte, jednostavne tubulusne žlijezde. Pokrovni epitel kripti se nastavlja na epitel resica i sadržava isti tip stanica, uglavnom enterocite, s nešto vrčastih stanica. Uz njih, u kriptama se još mogu naći enteroendokrine stanice, nediferencirane stanice i eozinofilne Panethove stanice. Unutrašnjost resica i područje oko kripti ispunjeno je s rahlim vezivnim tkivom sluznice, koja je dobro prokrvljena i ponekad sadržava manje difuzne nakupine limfnog tkiva. Mišićni sloj sluznice je građen od glatkih mišića koji su u jako tankom, jedva vidljivom sloju. Podsluznica je građena od vezivnog tkiva s krvnim i limfnim žilama, bez vidljivih žlijezda. Mišićni sloj je građen od glatkih mišića raspoređenih u dva sloja, unutrašnji kružni i vanjski uzdužni glatki mišići, između kojih je vidljivo vezivno tkivo sa živčevljem. Vanjska opna, seroza (visceralni peritoneum) je na dosta preparata teško prepoznatljiva jer je jako tanka, a građena je od jednog sloja mezotelnih stanica ili povremeno zadebljana, kada sadrži krvne i limfne žile (Slika 52.).

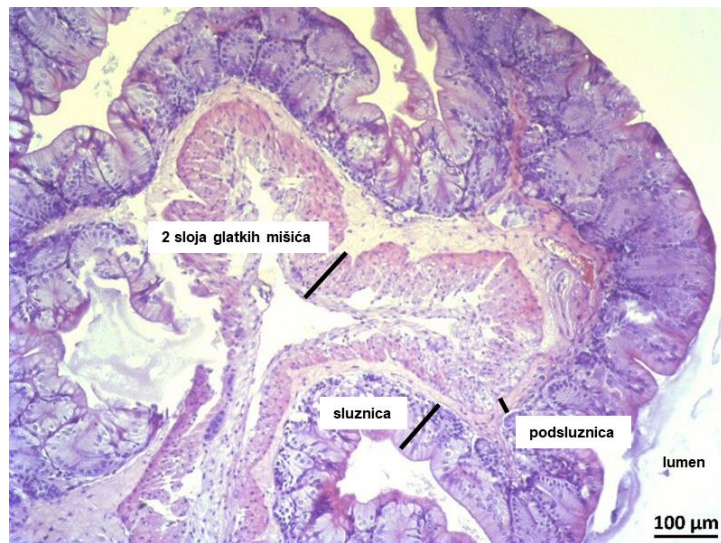


Slika 52. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju tanko crijevo dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u poprečnom presjeku. Metoda HE.

**Slijepo crijevo** - Specifična histološka građa slijepog crijeva vidljiva je u građi pokrovnog jednoslojnog cilindričnog epitela, u kojem većim dijelom izostaju vrčaste stanice, te u naborima sluznice koji su dobro razvijeni, viši i razgranatiji nego u jejunumu ( $26,49 \pm 6,40 \mu\text{m}$  vs  $39,17 \pm 14,60 \mu\text{m}$ ). Podsluznica je prilično tanka u većini područja, ali se na mjestima širi obuhvaćajući limfne čvorove. Mišićni sloj se kao i kod debelog crijeva sastoji od dva dijela:

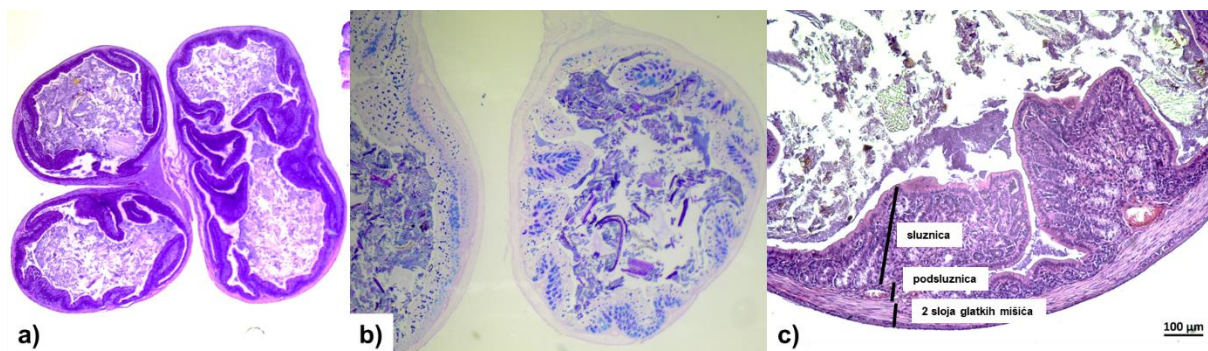


unutarnji kružni sloj se proteže u naborima, dok je tanji, vanjski, uzdužni sloj vrlo naboran što ukazuje na složenu strukturu zida organa. Vanjska opna slična je onoj u tankom crijevu (Slika 53.).



Slika 53. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju slijepo crijevo dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u poprečnom presjeku obojeno HE metodom.

**Debelo crijevo** - Proksimalni dio debelog crijeva je složene građe i sadrži post-cekalnu spiralu (*ansa coli paracoecalis*) (Slika 54.).



Slika 54. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju proksimalni dio debelog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u poprečnom presjeku: (a) lupa povećanje 1,2x obojeno HE metodom; (b) lupa, povećanje 3,5x, obojeno AB/PAS metodom; (c) HE, x400.

Histološka analiza prereza transverzalnog dijela debelog crijeva pokazala je da su prisutni svi dijelovi probavne cijevi, odnosno u pojedinim slojevima se ne pojavljuju nove strukture nego su glavne karakteristike građe debljina sluznice, mišićnog sloja te prošireni lumen. Sluznica je građena od jednoslojnog cilindričnog epitela bez mikrovila, ispod kojeg se nalazi vezivno tkivo. Među cilindričnim epitelom na dnu crijevnih žlijezda nalazi se veliki broj vrčastih stanica koje

luče sluz koja se većim dijelom sastoji od kiselih i neutralnih mucina. Sluznica je u odnosu na slijepo crijevo dosta visoka ( $197,25 \pm 141,54$  vs.  $356,47 \pm 217,92$ ) i nabrana. Vezivno tkivo podsluznice je malo gušće građe s malo više kolagenih vlakana. Slojevi mišića su deblji u odnosu na tanko crijevo ( $51,01 \pm 8,78$  vs.  $109,78 \pm 18,74$ ), dok je lumen širi (Slika 55.).



Slika 55. Histološki prikaz uočenih slojeva koji izgrađuju transverzalni dio debelog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u poprečnom presjeku obojeno HE metodom.

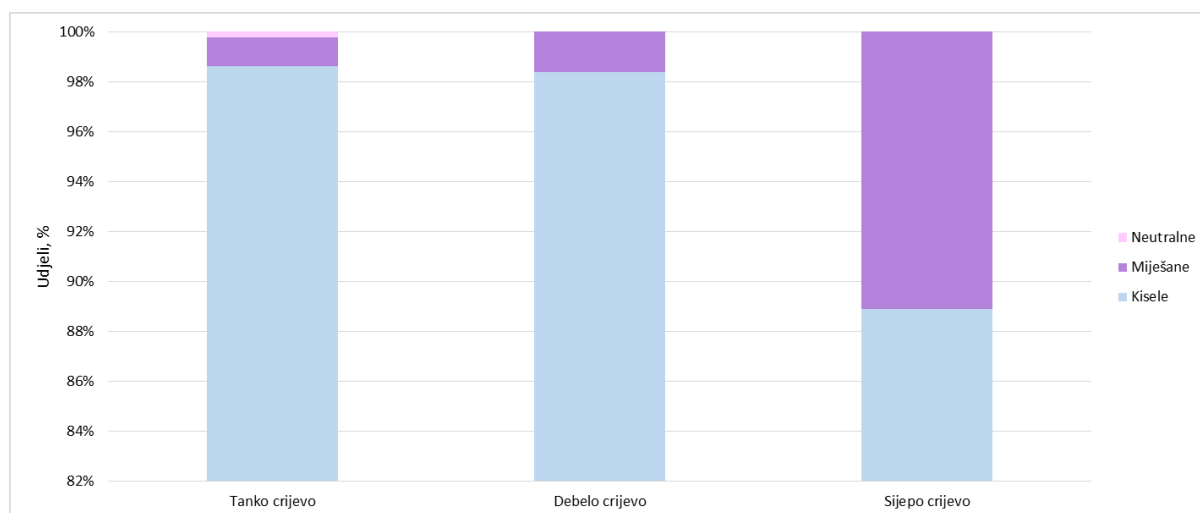
U ovom dijelu rada rezultati histokemijskog opisa temeljeni su na 5 reprezentativnih primjeraka. Površina pregledavane sluznice crijeva na kojoj su kvalitativno i kvantitativno analizirane vrčaste mukozne stanice je varirala na preparatima. Ukupna pregledana površina sluznice na svim preparatima za pojedinu vrstu unutar tankog crijeva iznosi između  $0,01 \text{ mm}^2$  i  $0,05 \text{ mm}^2$ , unutar debelog crijeva između  $0,03 \text{ mm}^2$  i  $0,04 \text{ mm}^2$  a unutar slijepog između  $0,02 \text{ mm}^2$  i  $0,04 \text{ mm}^2$ .

Prilikom pregleda sluznice tankog, debelog i slijepog crijeva, uočeno je da se svi tipovi vrčastih stanica nalaze u tankom crijevu, dok se u slijepom i debelom crijevu nalaze samo kisele i miješane vrčaste stanice. Najveći broj kiselih vrčastih stanica nalazi se u debelom crijevu, dok je njihov broj najmanji u slijepom crijevu. Miješanih stanica ima najviše u slijepom crijevu, a najmanje u tankom crijevu (Tablica 12.; Slika 56.).

Tablica 12. Kvalitativni i kvantitativni prikaz brojnosti vrčastih stanica po  $1 \text{ mm}^2$  sluznice tankog crijeva, debelog crijeva i slijepog crijeva. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija, (minimalna do maksimalna vrijednost). Tipovi vrčastih

stanica su: plave (s kiselim mucinima), ljubičaste (s miješanim kiselim i neutralnim mucinima), ružičaste (s neutralnim mucinima).

Broj stanica st/1mm <sup>2</sup>	Kisele vrčaste stanice	Neutralne vrčaste stanice	Miješane vrčaste stanice
Tanko crijevo	918,68 ± 297,75 (686,57 – 1407,80)	1,24 ± 2,77 (0,00 – 6,19)	6,98 ± 10,21 (0,00 – 22,52)
Debelo crijevo	2436,82 ± 893,26 (1335,67 – 3497,04)	0	25,04 ± 37,28 (0,00 – 83,29)
Slijepo crijevo	459,82 ± 260,99 (239,56 – 881,24)	0	44,03 ± 32,71 (12,89 – 81,98 )

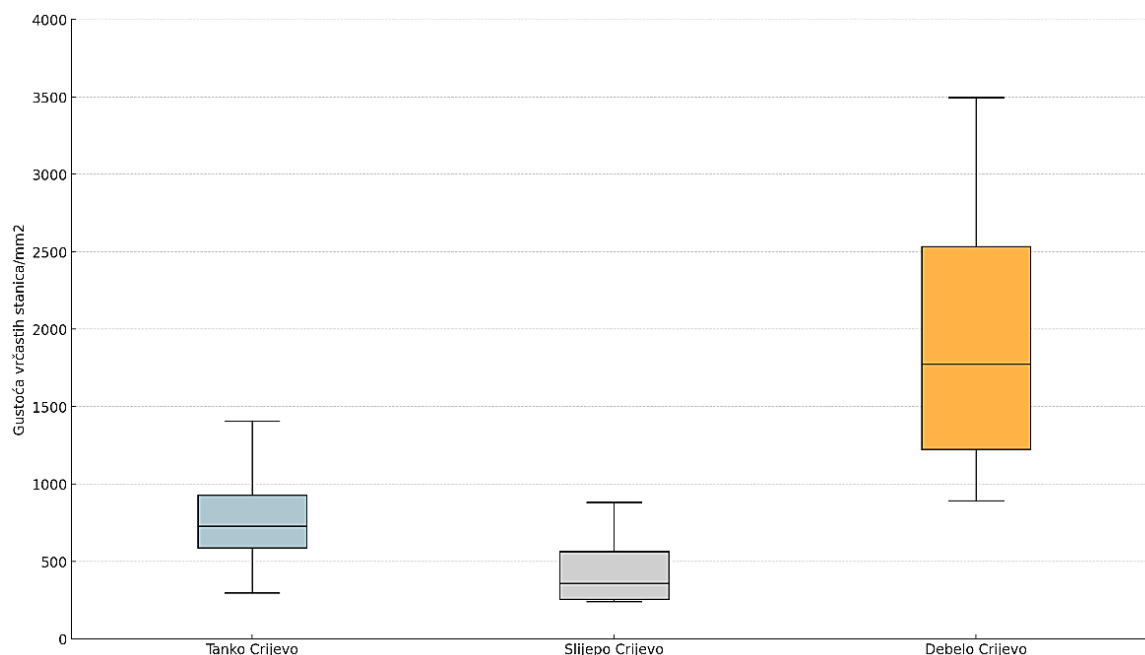


Slika 56. Prikaz postotnih udjela vrčastih stanica određenog tipa u sluznici tankog crijeva, debelog i slijepog crijeva dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Tipovi vrčastih stanica su: plave (s kiselim mucinima), ljubičaste (s miješanim kiselim i neutralnim mucinima), ružičaste (s neutralnim mucinima).

Prilikom pregleda sluznice tankog, debelog i slijepog crijeva, uočila sam da se kisele vrčaste stanice javljaju kod svih jedinki u svim dijelovima crijeva. Miješane vrčaste stanice su pronađene kod svih jedinki unutar slijepog crijeva, dok su u tankom i debelom crijevu pronađene samo kod dvije jedinke. Neutralne vrčaste stanice su pronađene u tankom crijevu samo jedne jedinke. Stoga je Friedmanovim testom uspoređen ukupan broj kiselih vrčastih stanica unutar tankog, slijepog i debelog crijeva, pri čemu su rezultati pokazali značajne razlike u broju tih stanica između crijeva ( $F(2, N=10) = 8,4, p < 0,015$ ).

Kao post hoc analizu koristila sam Wilcoxon Signed-Rank test, koji je potvrdio značajnu razliku u broju kiselih vrčastih stanica između tankog i debelog crijeva ( $p = 0,016$ ) te između debelog

i slijepog crijeva ( $p = 0,008$ ), dok takva razlika nije utvrđena između tankog i slijepog crijeva ( $p = 0,056$ ) (Slika 57.)



Slika 57. Grafički prikaz gustoće kiselih včrastih stanica po mm<sup>2</sup> u tankom crijevu, slijepom crijevu i debelom crijevu dinarskoga voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Svaka kutija na grafu predstavlja raspodjelu podataka za određeni dio crijeva. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti.

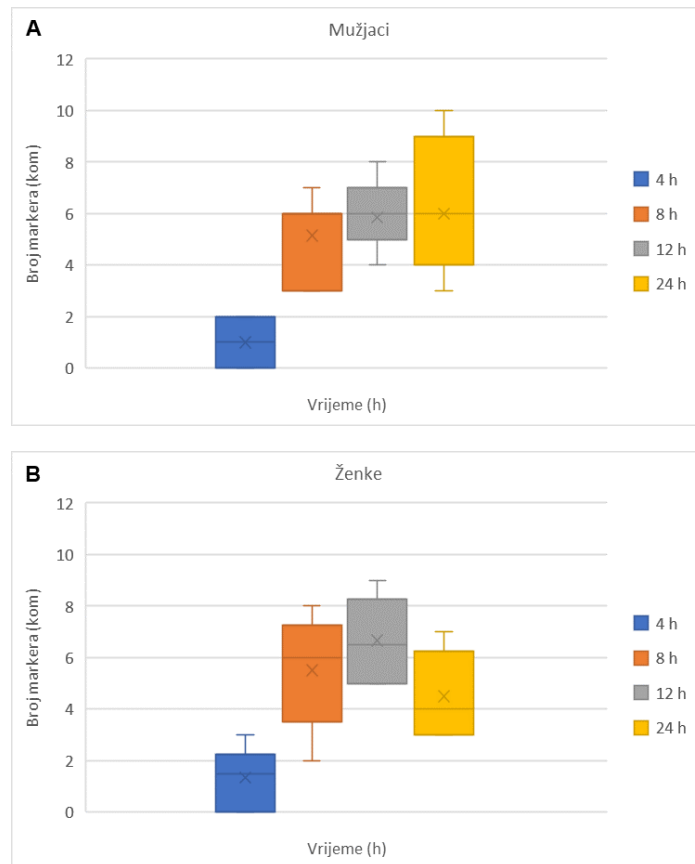
### 6.3. Brzina probave

#### 6.3.1. Određivanje brzine probave pomoću fizikalnih markera

Svi fizikalni markeri zabilježeni su unutar prvih 24 sata kod svih jedinki, osim jedne iz ljetne sezone koja je isključena iz analize zbog nedostatka tih markera.

### 6.3.1.1. Razlike u brzini probave mužjaka i ženki

Na slici 58. prikazane su razlike u brzini probave tijekom zimske sezone između mužjaka i ženki.



Slika 58. Obrazac izlučivanja krute frakcije probave u gastrointestinalnom traktu A. mužjaka. B. ženki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) kod A. mužjaka. B. ženki, tijekom zimske sezone. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti, osim iznimnih (eng. *outlier*) vrijednosti (kružni markeri), dok "x" unutar pravokutnika predstavlja aritmetičku sredinu (prosjek) za dati skup podataka.

Analiza rezultata potvrđuje da među mužjacima i ženkama nema značajnih razlika u brzini probave u prvoj vremenskoj kategoriji od 4 sata (Mann-Whitney U test:  $U = 17,5$ ,  $z = -0,429$ ,  $p = 0,667$ ). Također, rezultati analize pokazuju da nema značajnih razlika u brzini probave između mužjaka i ženki u drugoj vremenskoj kategoriji od 4 do 8 sati (Mann-Whitney U test:  $U = 17,5$ ,  $z = -0,429$ ,  $p = 0,667$ ). U trećoj vremenskoj kategoriji od 8 do 12 sati, analiza rezultata potvrđuje da nema značajnih razlika u brzini probave između mužjaka i ženki (Mann-Whitney U test:  $U = 15$ ,  $z = -0,785$ ,  $p = 0,429$ ). Konačno, u četvrtoj vremenskoj kategoriji od 12 do 24

sata, rezultati analize ukazuju da nema značajnih razlika u brzini probave između mužjaka i ženki (Mann-Whitney U test:  $U = 14$ ,  $z = 0,929$ ,  $p = 0,352$ ).

Obzirom na nedostatak razlike u brzini probave između mužjaka i ženki, daljnje analize obuhvaćaju podatke za oba spola.

#### 6.3.1.2. Brzina probave tijekom ljetne sezone

Usporedbom vremenskih kategorija unutar ljetne sezone Friedmanovim testom pokazano je da postoje razlike između istraživanih vremenskih kategorija  $F_{(3, N=12)} = 16,375$ ,  $p < 0,00095$ ). Naknadnom usporedbom parova vremenskih kategorija pomoću Wilcoxon Signed-Rank Testa dokazano je da postoji značajna razlika između vremenske kategorije 4 h i 8 h ( $z = -3,059$ ,  $p = 0,002$ ), 4 h i 12 h ( $z = -2,902$ ,  $p = 0,004$ ) i 4 h i 24 h ( $z = -2,310$ ,  $p = 0,0193$ ). Ne postoje značajne razlike u brzini prolaska markera između vremenskih kategorija 8 h i 12 h ( $z = -0,222$ ,  $p = 0,825$ ), 8 h i 24 h ( $z = -1,422$ ,  $p = 0,155$ ) i 12 h i 24 h ( $z = -1,376$ ,  $p = 0,167$ ).

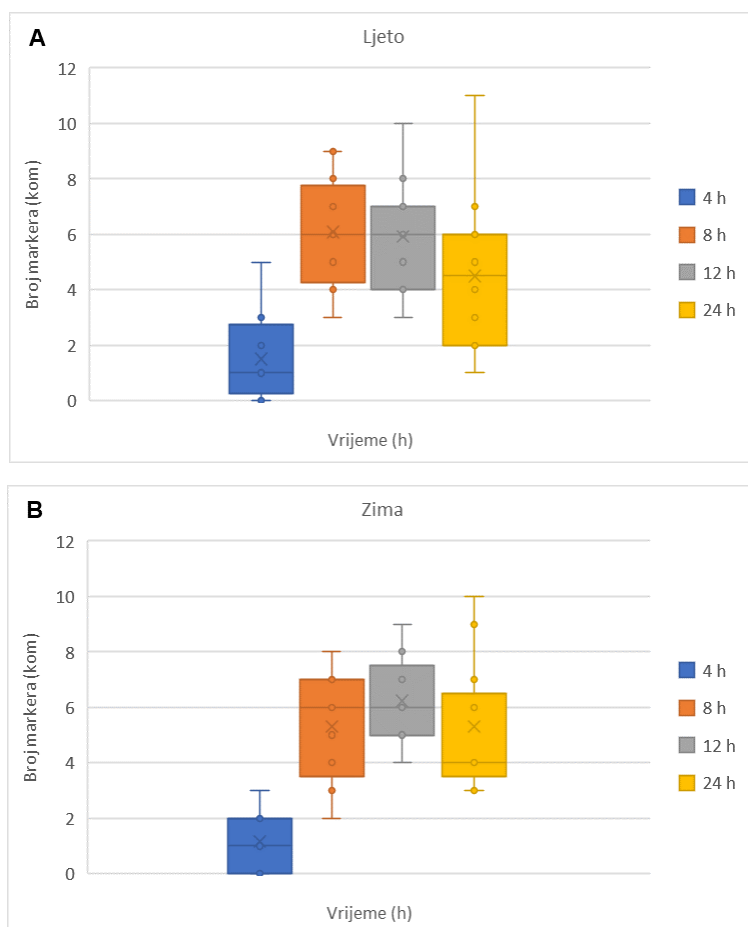
Tijekom ljetne sezone, primijećena je značajna razlika u pojavljivanju markera u fecesu u različitim vremenskim intervalima uzorkovanja. Marker su se prvi put pojavili tijekom prvih 4 sata, a ta vrijednost značajno se razlikuje od ostalih. Nakon prva 4 sata, markeri su iz probavnog trakta izlazili s ujednačenom brzinom, s potpunom eliminacijom markera iz sustava unutar 24 sata.

#### 6.3.1.3. Brzina probave tijekom zimske sezone

Usporedbom vremenskih kategorija unutar zimske sezone Friedmanovim testom pokazano je da postoje razlike između istraživanih vremenskih kategorija  $F_{(3, N=13)} = 23,376$ ,  $p < 0,00003$ ). Naknadnom usporedbom parova vremenskih kategorija pomoću Wilcoxon Signed-Rank Testa dokazano je da postoji značajna razlika između vremenske kategorije 4 h i 8 h ( $z = -3,180$ ,  $p = 0,00148$ ), 4 h i 12 h ( $z = -3,180$ ,  $p = 0,00148$ ) i 4 h i 24 h ( $z = -3,0594$ ,  $p = 0,0022$ ). Ne postoje značajne razlike u brzini prolaska markera između vremenskih kategorija 8 h i 12 h ( $z = -1,156$ ,  $p = 0,246$ ), 8 h i 24 h ( $z = -0,078$ ,  $p = 0,936$ ) i 12 h i 24 h ( $z = -1,153$ ,  $p = 0,250$ ). Tijekom zimske sezone, primijećena je značajna razlika u pojavljivanju markera u fecesu u različitim vremenskim intervalima uzorkovanja. Marker su se prvi put pojavili tijekom prvih 4 sata, a ta vrijednost značajno se razlikuje od ostalih. Nakon prvih 4 sata, markeri su iz probavnog trakta izlazili s ujednačenom brzinom.

#### 6.3.1.4. Usporedba brzine probave tijekom ljetne i zimske sezone

Na slici 59. prikazane su razlike u brzini probave unutar vremenskih kategorija između sezona.



Slika 59. Obrazac izlučivanja krute frakcije probave u gastrointestinalnom traktu A. mužjaka. B. ženki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) tijekom zimske i ljetne sezone. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti, osim iznimnih (eng. *outlier*) vrijednosti (kružni markeri), dok "x" unutar pravokutnika predstavlja aritmetičku sredinu (prosjek) za dati skup podataka.

Rezultati analize potvrđuju da među sezonama nema značajnih razlika u brzini probave u prvoj vremenskoj kategoriji od 4 h (Mann-Whitney U test:  $U = 72$ ;  $z = -0,299$ ;  $p = 0,764$ ). Također, rezultati analize ukazuju na nedostatak značajnih razlika u brzini probave između ljetne i zimske sezone u drugoj vremenskoj kategoriji od 4 h do 8 h (Mann-Whitney U test:  $U = 62,5$ ;  $z = -0,816$ ;  $p = 0,412$ ). U trećoj vremenskoj kategoriji od 8 h do 12 h, rezultati analize potvrđuju da među sezonama nema značajnih razlika u brzini probave (Mann-Whitney U test:  $U = 68,5$ ;  $z = 0,489$ ;  $p = 0,624$ ). Konačno, u četvrtoj vremenskoj kategoriji od 12 h do 24 h, rezultati

analize također potvrđuju da među sezonama nema značajnih razlika u brzini probave (Mann-Whitney U test:  $U = 61$ ;  $z = 0,897$ ;  $p = 0,368$ ).

Brzina prolaska kroz probavni trakt nije pokazala statistički značajne razlike između zimske i ljetne sezone, što ukazuje na sličnu brzinu prolaza krute faze tijekom cijele godine.

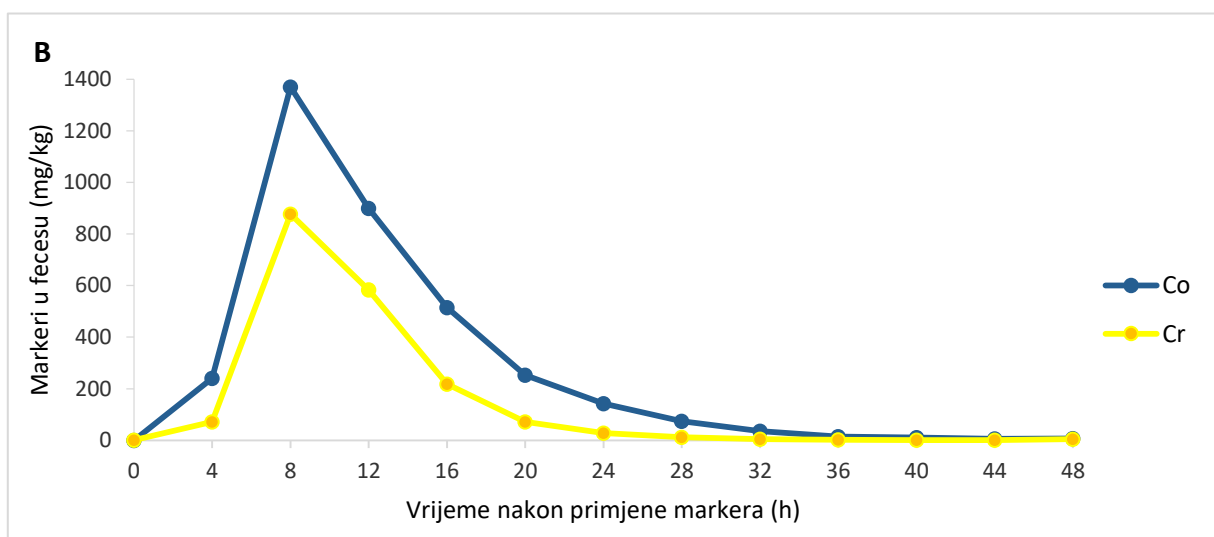
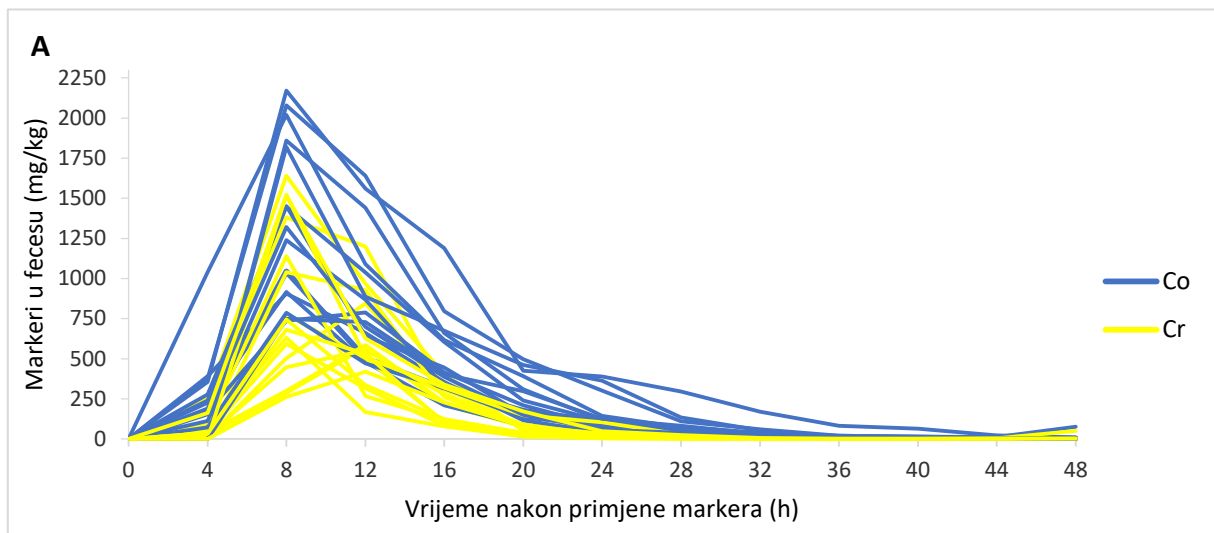
### 6.3.2. Određivanje brzine probave pomoću kemijskih markera

Tijekom istraživanja, za svaku od 15 jedinki prikupljeno je 15 uzoraka fecesa (225). Također, prije početka glavnog eksperimenta, uzeti su uzorci fecesa pet različitih životinja kako bi se procijenile pozadinske razine Co i Cr.

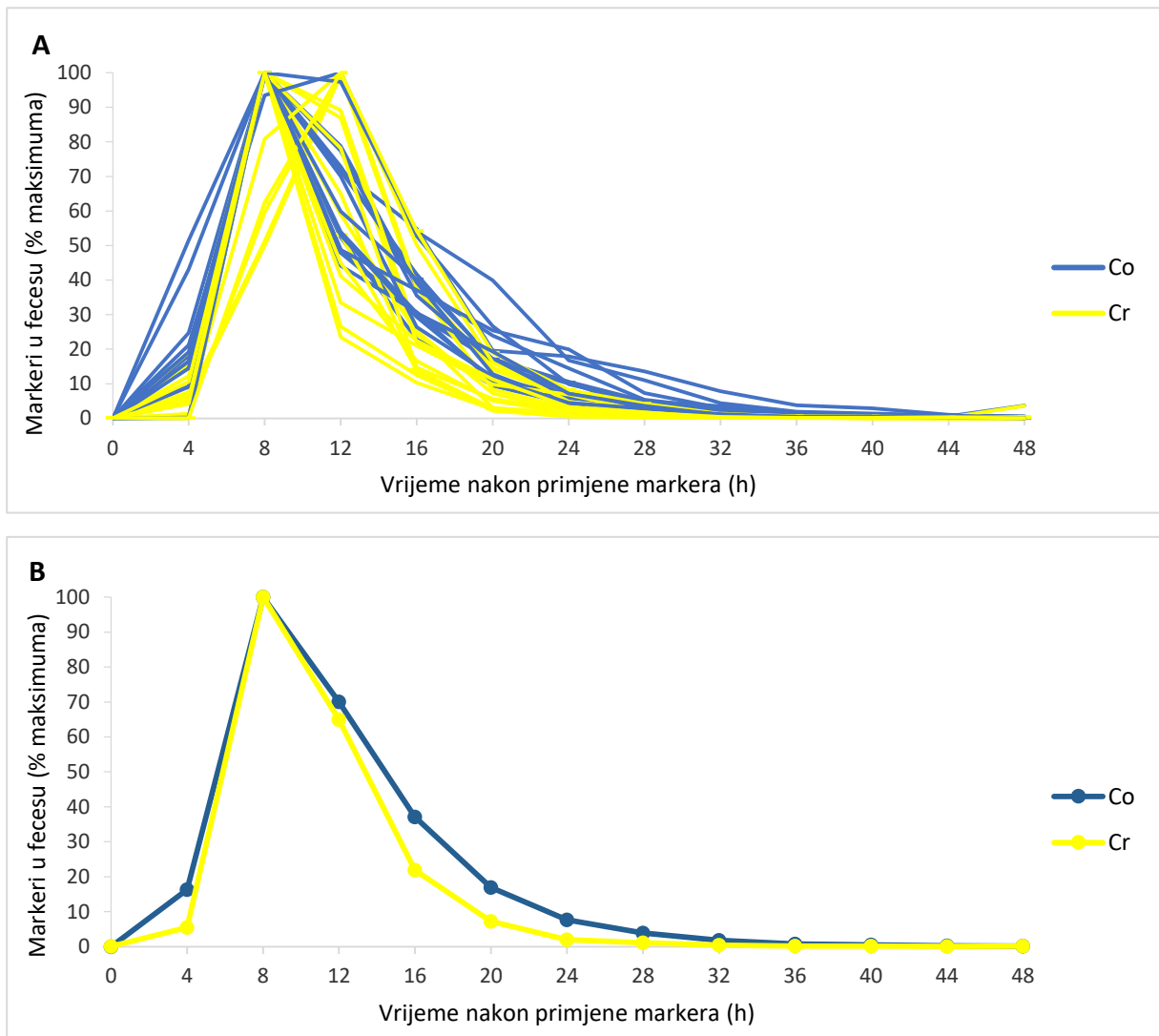
Oba markera pojavila su se u prikupljenom fecesa unutar prva četiri sata nakon doziranja, a njihove koncentracije su zatim rapidno rasle, dostižući vrhunac unutar četiri do osam sati nakon doziranja. Dva markera su se uglavnom kretala paralelno. Vrijednosti koncentracija Cr (kruta frakcija) približile su se pozadinskim razinama između 40 i 44 sata, dok je za Co (tekuća frakcija) to zabilježeno između 44 i 48 sata. Nisu uočeni sekundarni pikovi koji bi ukazivali na ponovno unošenje fecesa (cekotrofa).

Koncentracije markera prikazane su kao apsolutne vrijednosti i postotak njihovog maksimalne vrijednosti tijekom vremena (Matsuda i sur., 2015.). Obrazac izlučivanja markera prikazan je na Slici 60. i 61.





Slika 60. Obrazac izlučivanja tekuće (markirano Co-EDTA) i krute (markirano Cr) frakcije probave u gastrointestinalnom traktu dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). A. Apsolutne vrijednosti za svaku jedinku posebno (mg/kg). B. Apsolutne srednje vrijednosti za Co i Cr (mg/kg).



Slika 61. Obrazac izlučivanja tekuće (markirano Co-EDTA) i krute (markirano Cr) frakcije probave u gastrointestinalnom traktu dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). A. Postotni udio maksimalne koncentracije za svaku jedinku posebno. B. Postotni udio mediana maksimalne koncentracije.

Vrijeme zadržavanja tekuće frakcije koje se kretalo od  $12,21 \pm 1,18$  h, bilo je dulje od vremena zadržavanja krute frakcije, koje se kretalo od  $11,12 \pm 1,20$  h (Tablica 12.). Kako bi utvrdila da li je ta razlika statistički značajna koristila sam parni t – test koji je pokazao da nema značajne razlike u zadržavanju tekuće u odnosu na krutu frakciju ( $t = 0,499$ ,  $p = 0,620$ ). Kašnjenja u izlučivanju kobalta nisu bila toliko izražena kao kod kroma, ali su bila jasno vidljiva (+ 1,09 h). Prosječni omjer MRTtekuće frakcije/MRTkrute frakcije iznosio je  $1,10 \pm 0,11$  (raspon 0,95 – 1,36).

Tablica 12. Prosječna vremena zadržavanja (MRT) u satima tekuće (markirano Co-EDTA) i krute (markirano Cr) frakcije probave u gastrointestinalnom traktu dinarskog voluhara. U zadnjem redu prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije za sve jedinke, N=15.

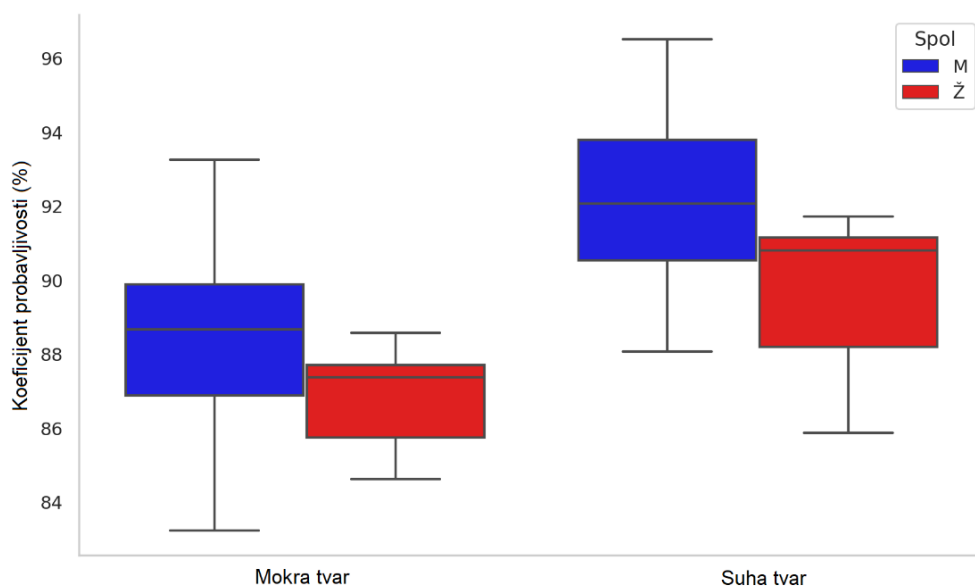
MRT(jedinka)/h	Co-EDTA markirano tekuće	Cr-mordantizirana vlakna markirano kruto	MRT <sub>tekuća frakcija</sub> / MRT <sub>kruta frkacija</sub>
DB1	12,32	12,96	0,95
DB2	14,12	10,42	1,36
DB3	10,63	9,46	1,12
DB4	13,08	11,34	1,15
DB5	12,08	12,33	0,98
DB6	10,73	10,11	1,06
DB7	12,37	11,21	1,10
DB8	11,36	9,50	1,20
DB9	12,43	10,26	1,21
DB10	11,66	10,69	1,09
DB11	12,45	12,36	1,01
DB12	13,74	11,43	1,20
DB13	14,18	13,42	1,06
DB14	11,30	10,39	1,09
DB15	10,73	10,88	0,99
<b>SV <math>\pm</math> SD</b>	<b>12,21 <math>\pm</math> 1,18</b>	<b>11,12 <math>\pm</math> 1,20</b>	<b>1,10 <math>\pm</math> 0,11</b>

#### 6.4. Probavljivost

Prosječni dnevni unos suhe tvari za dinarskog voluhara iznosi 56,61 g/dan, što odgovara unosu od 91,42 g svježe mase. Hranidba dinarskih voluhara, koja je minimalno varirala iz dana u dan, karakterizirana je visokim koeficijentima probavljivosti pojedinačnih komponenti, što ukazuje na njihovu visoku iskoristivost. Koeficijent probavljivosti iznosio je  $91,48 \pm 2,51\%$  za suhu tvar, dok je za mokru (svježu) tvar iznosio  $88,14 \pm 2,34\%$ .

Probavljivost važnijih nutrijenata kretala se u granicama od 82,17% do 95,15% za pepeo, 85,05% do 96,60% za sirove bjelančevine, od 67,13% do 92,40% za sirove masti i od 81,66% do 95,73% za sirova vlakna (Tablica 13.).

Koeficijenti prividne probavljivosti svježe i suhe tvari kod dinarskog voluhara pokazuju značajnu razliku između mužjaka i ženki (organska tvar:  $U = 141$ ,  $p = 0,0374$ ; suha tvar 145,  $p = 0,0236$ .; vidi Tablicu 13., Sliku 62.).

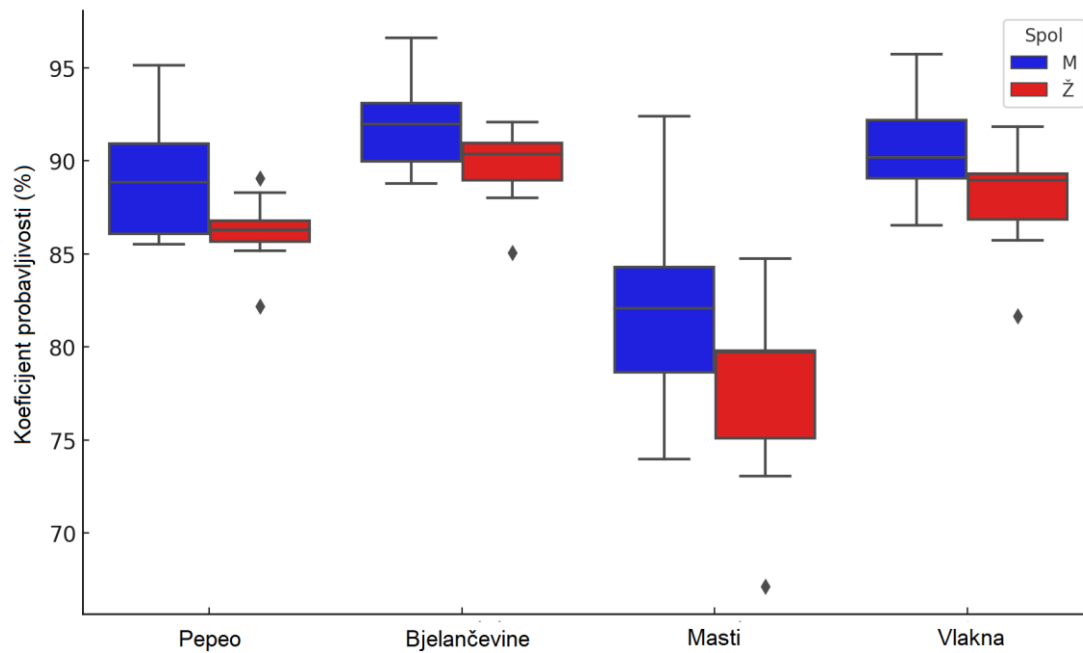


Slika 62. Usporedba koeficijenta prividne probavljivosti svježe i suhe tvari kod mužjaka (N=21) i ženki (N=9) dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Plave kutije na grafu predstavljaju raspodjelu podataka za mužjake, crvene kutije za ženke. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti. Postoji statistički značajna razlika između mužjaka i ženki (MW test, razina značajnosti  $p=0,05$ ).

Prosječni koeficijenti probavljivosti svježe tvari i suhe tvari iznosili su 88,68% i 92,19% za mužjake, te 86,87% i 89,81% za ženke. Najveća vrijednost za organsku i suhu tvar zabilježena je kod mužjaka i iznosi 88,68%, odnosno 96,52%.

Koeficijenti prividne probavljivosti kod dinarskog voluhara pokazuju značajnu razliku između mužjaka i ženki za pepeo i sirove bjelančevine (pepeo:  $U = 139$ ,  $p = 0,0464$ ; sirove bjelančevine:  $U = 140$ ,  $p = 0,0417$ ), dok za sirove masti i vlakna nema značajne razlike (sirove masti:  $U = 137$ ,  $p = 0,0573$ ; sirova vlakna:  $U = 134$ ,  $p = 0,0775$ ; vidi Tablicu 13., Sliku 63.).

Prosječni koeficijenti probavljivosti sirovih bjelančevina, masti i vlakana iznose 91,95%, 82,24% i 90,63% za mužjake te 85,05%, 67,13% i 81,66% za ženke (Slika 63.). Najveće vrijednosti za sirove bjelančevine, masti i vlakna zabilježene su kod mužjaka i iznose 96,6%, 92,4% i 95,73%.



Slika 63. Usporedba koeficijenta prividne probavljivosti pepela, sirovih bjelančevina, masti i vlakana kod mužjaka (N=21) i ženki (N=9) dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Plave kutije na grafu predstavljaju raspodjelu podataka za mužjake, crvene kutije za ženke. Pravokutnici (eng. *box plot*) prikazuju raspon podataka s donjim i gornjim kvartilima, linija unutar pravokutnika predstavlja medijan, dok linije (eng. *whiskers*) iznad i ispod pravokutnika prikazuju minimalne i maksimalne vrijednosti.

Tablica 13. Koeficijenti prividne probavljivosti za mokru (svježu) (MT), suhu tvar (ST), pepeo, sirove proteine (SP), sirove masti (SM) i sirova vlakna (SV). U zadnjem redu prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije (minimalna do maksimalna vrijednost) za sve jedinke, N=30.

ID	Spol	ADC MT, %	ADC ST, %	ADC pepeo, %	ADC SP, %	ADC SM, %	ADC SV, %
DB1	M	87,29 $\pm$ 1,85	90,53 $\pm$ 2,50	89,15 $\pm$ 2,58	90,91 $\pm$ 2,50	79,46 $\pm$ 5,97	89,15 $\pm$ 3,27
DB2	M	86,87 $\pm$ 1,67	89,28 $\pm$ 2,25	86,55 $\pm$ 2,81	88,77 $\pm$ 2,76	74,73 $\pm$ 6,18	86,69 $\pm$ 3,25
DB3	M	88,67 $\pm$ 1,52	91,16 $\pm$ 1,87	89,14 $\pm$ 1,80	90,96 $\pm$ 1,83	79,60 $\pm$ 4,42	89,22 $\pm$ 2,66
DB4	Ž	87,70 $\pm$ 1,70	91,19 $\pm$ 2,75	89,06 $\pm$ 2,92	90,96 $\pm$ 2,44	79,75 $\pm$ 4,95	89,27 $\pm$ 3,06
DB5	Ž	85,18 $\pm$ 2,48	88,20 $\pm$ 3,84	86,78 $\pm$ 4,65	88,95 $\pm$ 4,12	75,09 $\pm$ 9,23	86,85 $\pm$ 4,91
DB6	Ž	85,74 $\pm$ 1,77	88,12 $\pm$ 3,39	85,64 $\pm$ 5,23	88,02 $\pm$ 4,64	73,07 $\pm$ 10,08	85,72 $\pm$ 5,77
DB7	M	87,79 $\pm$ 2,41	91,87 $\pm$ 2,19	86,09 $\pm$ 4,93	89,82 $\pm$ 3,52	84,18 $\pm$ 6,10	89,05 $\pm$ 3,41
DB8	M	91,23 $\pm$ 3,62	94,74 $\pm$ 3,71	93,40 $\pm$ 2,46	95,04 $\pm$ 2,31	92,40 $\pm$ 3,27	94,66 $\pm$ 2,24
DB9	M	86,82 $\pm$ 3,25	90,54 $\pm$ 3,51	85,64 $\pm$ 4,60	89,39 $\pm$ 3,68	83,54 $\pm$ 6,02	88,58 $\pm$ 3,49
DB10	M	90,49 $\pm$ 2,71	93,79 $\pm$ 2,44	89,71 $\pm$ 3,88	92,19 $\pm$ 3,63	87,92 $\pm$ 5,31	91,42 $\pm$ 3,81
DB11	Ž	88,54 $\pm$ 2,17	91,12 $\pm$ 2,93	86,64 $\pm$ 3,94	90,22 $\pm$ 2,83	84,73 $\pm$ 5,24	89,30 $\pm$ 3,39
DB12	Ž	84,62 $\pm$ 2,70	85,87 $\pm$ 3,70	82,17 $\pm$ 5,80	85,05 $\pm$ 5,16	67,13 $\pm$ 12,50	81,66 $\pm$ 6,82
DB13	M	89,07 $\pm$ 1,63	92,07 $\pm$ 2,19	89,90 $\pm$ 2,44	92,04 $\pm$ 2,53	82,09 $\pm$ 6,14	90,17 $\pm$ 3,24
DB14	M	89,89 $\pm$ 1,38	93,29 $\pm$ 1,93	91,24 $\pm$ 2,12	93,11 $\pm$ 2,29	84,28 $\pm$ 6,74	91,60 $\pm$ 2,30
DB15	M	85,43 $\pm$ 2,43	88,50 $\pm$ 3,12	85,82 $\pm$ 2,06	89,00 $\pm$ 2,24	75,23 $\pm$ 6,87	86,52 $\pm$ 2,48
DB16	M	83,24 $\pm$ 2,98	88,06 $\pm$ 3,17	85,90 $\pm$ 1,16	89,04 $\pm$ 1,87	75,23 $\pm$ 6,72	86,54 $\pm$ 2,14
DB17	M	89,02 $\pm$ 2,44	92,65 $\pm$ 2,12	90,93 $\pm$ 1,98	92,89 $\pm$ 2,07	83,72 $\pm$ 6,43	91,22 $\pm$ 2,60
DB18	Ž	87,39 $\pm$ 1,50	90,14 $\pm$ 2,34	88,30 $\pm$ 2,43	90,97 $\pm$ 2,01	79,79 $\pm$ 5,40	88,95 $\pm$ 2,39
DB19	M	91,39 $\pm$ 3,62	95,25 $\pm$ 2,31	91,41 $\pm$ 4,67	94,30 $\pm$ 2,55	86,11 $\pm$ 4,39	93,17 $\pm$ 2,41
DB20	M	86,88 $\pm$ 3,28	90,55 $\pm$ 3,33	88,27 $\pm$ 4,67	91,71 $\pm$ 3,74	78,22 $\pm$ 10,58	89,66 $\pm$ 4,44
DB21	M	86,32 $\pm$ 1,68	89,76 $\pm$ 2,38	85,52 $\pm$ 2,20	89,98 $\pm$ 2,24	73,99 $\pm$ 8,12	87,50 $\pm$ 3,52
DB22	M	93,26 $\pm$ 2,35	96,40 $\pm$ 1,48	95,15 $\pm$ 1,58	96,60 $\pm$ 1,30	91,18 $\pm$ 3,51	95,73 $\pm$ 1,73
DB23	M	87,83 $\pm$ 3,07	92,12 $\pm$ 2,30	87,68 $\pm$ 2,58	91,62 $\pm$ 1,59	78,64 $\pm$ 4,79	89,66 $\pm$ 2,51
DB24	Ž	86,70 $\pm$ 2,05	90,80 $\pm$ 1,69	86,03 $\pm$ 1,54	90,35 $\pm$ 1,88	75,12 $\pm$ 6,30	87,97 $\pm$ 3,03

Tablica 13. – nastavak. Koeficijenti prividne probavljivosti za svježu (MT), suhu tvar (ST), pepeo, sirove proteine (SP), sirove masti (SM) i sirova vlakna (SV). U zadnjem redu prikazane su srednje vrijednosti  $\pm$  standardne devijacije (minimalna do maksimalna vrijednost) za sve jedinke, N=30.

ID	Spol	ADC MT, %	ADC ST, %	ADC pepeo, %	ADC SP, %	ADC SM, %	ADC SV, %
DB25	M	88,11 $\pm$ 1,04	91,56 $\pm$ 2,18	86,02 $\pm$ 1,42	91,96 $\pm$ 1,43	80,92 $\pm$ 3,74	91,81 $\pm$ 1,89
DB26	M	93,23 $\pm$ 3,37	96,52 $\pm$ 2,05	92,56 $\pm$ 4,37	95,71 $\pm$ 2,55	89,62 $\pm$ 6,45	95,47 $\pm$ 3,01
DB27	M	89,87 $\pm$ 1,16	93,86 $\pm$ 1,62	88,85 $\pm$ 3,29	93,46 $\pm$ 2,47	84,27 $\pm$ 6,33	93,24 $\pm$ 2,78
DB28	M	89,68 $\pm$ 1,96	93,47 $\pm$ 1,42	86,63 $\pm$ 1,36	92,36 $\pm$ 0,85	81,75 $\pm$ 3,69	92,20 $\pm$ 1,63
DB29	Ž	88,58 $\pm$ 1,90	91,72 $\pm$ 2,46	86,29 $\pm$ 2,60	92,08 $\pm$ 1,95	80,89 $\pm$ 6,25	91,83 $\pm$ 2,65
DB30	Ž	87,37 $\pm$ 2,16	91,15 $\pm$ 2,69	85,18 $\pm$ 3,96	91,53 $\pm$ 2,35	79,74 $\pm$ 6,91	91,42 $\pm$ 2,58
<b>SV <math>\pm</math> SD</b> <b>(min – max)</b>		<b>88,14 <math>\pm</math> 2,30</b> (83,24 – 93,26)	<b>91,48 <math>\pm</math> 2,46</b> (85,87 – 96,52)	<b>88,06 <math>\pm</math> 2,83</b> (82,17 – 95,15)	<b>91,30 <math>\pm</math> 2,40</b> (85,05 – 96,60)	<b>80,75 <math>\pm</math> 5,70</b> (67,13 – 92,40)	<b>89,87 <math>\pm</math> 3,07</b> (81,66 – 95,73)

## 7. RASPRAVA

### 7.1. Funkcionalna anatomija žvačnog sustava

Veličina tijela ključni je čimbenik koji utječe na arhitekturu i mehaniku organizama, posebno na njihovu sposobnost kretanja i hranidbe (Schmidt-Nielsen, 1984.). Pri analizi sile ugriza u odnosu na tjelesnu masu, manje životinje često proizvode relativno veće sile ugriza od većih, što je posljedica alometrijskih promjena u strukturi tijela i mišića, gdje se proporcionalno veći mišići kod manjih životinja odražavaju na veću snagu ugriza (Peters, 1983.; Sellers i sur., 2017.). Na primjer, sila ugriza kod ljudi iznosi otprilike 7,14 N/kg (sila ugriza  $\approx$  500 N; tjelesna masa  $\approx$  70 kg; Calderón i sur., 2006.), dok je kod afričkog lava (*Panthera leo*) ta vrijednost oko 5,89 N/kg (sila ugriza = 1768 N; tjelesna masa = 300 kg; Wroe i sur., 2005.). U ovom dijelu istraživanja analizirane su funkcionalne karakteristike žvačnog sustava putem mjerenja sile ugriza i raspodjele mase žvačnih mišića kod odraslih jedinki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) s tjelesnom masom između 63 i 81 gram. Cilj istraživanja bio je, po prvi put, pružiti uvid u odnos između sile ugriza, tjelesne mase, te rasporeda i veličine žvačnih mišića, kako bi se procijenila biomehanička efikasnost žvačnog sustava u kontekstu hranidbenih navika i ekološke niše, uz usporedbu s drugim srodnim vrstama.

Dinarski voluhari proizvode prosječnu silu ugriza od 357,05 N/kg pri okluziji sjekutića. Iako je apsolutna sila ugriza relativno mala, ugriz postaje snažan kada se uzme u obzir mala tjelesna masa (Freeman i Lemen, 2008a.; Herrel i sur., 2002.). Rezultati *in vivo* mjerenja pokazali su razlike u sili ugriza i omjeru sile ugriza i tjelesne mase između mužjaka i ženki. Ženka odraslog dinarskog voluhara proizvela je najjači zagriz od 32 N, što je približno 405 N/kg (sila ugriza = 32 N; tjelesna masa = 0,079 kg), dok je najveći zabilježeni omjer sile ugriza i tjelesne mase iznosio 425,71 N/kg kod mužjaka (sila ugriza = 29,8 N; tjelesna masa = 0,070 kg). Važno je napomenuti da je broj ženki uključenih u ovo istraživanje bio mali, što može utjecati na pouzdanost rezultata i interpretaciju podataka.

Rezultati istraživanja na drugim vrstama, koja uključuju maksimalnu silu ugriza, tjelesnu masu i omjere sile ugriza i tjelesne mase, kao i rezultati ovog istraživanja, sažeti su u Prilogu 6. Sila ugriza uglavnom se povećava s tjelesnom masom kod različitih vrsta glodavaca, pri čemu krupniji glodavci proizvode veću silu ugriza (Becerra i sur., 2011.; Ginot i sur., 2018.). Ova varijacija u sili ugriza odražava se na ekološku nišu pojedinih vrsta, budući da je usko povezana s njihovim hranidbenim navikama (Christiansen i Wroe, 2007.; Wroe i sur., 2005.).



Prethodna istraživanja ukazuju da ne postoji biomehanički kompromis između glodavaca specijaliziranih za glodanje, koji se uglavnom hrane sjemenkama, i onih specijaliziranih za žvakanje, koji pretežno konzumiraju zelenu vegetaciju, pri čemu sjemenojedi i biljojedi proizvode slično visoku silu ugriza. Dinarski voluhar proizvodi silu ugriza usporedivu s onom kod sjemenojeda poput trinaestopržna podzemna vjevetica (*Spermophilus tridecemlineatus*), šumski miš (*Apodemus sylvaticus*) i istočni šumski štakor (*Neotoma floridana*).

Glodavci s fosorijalnim (kopajućim) načinom života, poput vrste iz porodice tuko-tukoa (*Ctenomys australis*), obično imaju veću silu ugriza u usporedbi s vrstama koje obitavaju na površini, poput dugorepe činčile (*Chinchilla laniger*), što je vjerojatno posljedica zahtjeva koje im nameće kopanje (Becerra i sur., 2014.). Zanimljivo je da, iako dinarski voluhar obitava na površini, sila njegovog ugriza je usporediva s fosorijalnim vrstama kao što su golokrtičaasti štakor (*Heterocephalus glaber*) i Malavijski krtičasti štakor (*Fukomys whytei*), koje su prilagođene podzemnom načinu života. Ova sličnost ukazuje na to da dinarski voluhar posjeduje funkcionalne prilagodbe koje mu omogućuju učinkovitost u obradi tvrdih ili otpornih biljnih materijala, slično kao kod fosorijalnih vrsta.

Razlike u sili ugriza među srodnim vrstama, poput *Apodemus sylvaticus* i zapadnomediterranski miš (*Mus spretus*), su minimalne, što bi moglo ukazivati na to da drugi čimbenici, poput obilja hrane, mogu smanjiti kompeticiju i time bitno utjecati na silu ugriza (Ginot i sur., 2018.). Budući da dinarski voluhar proizvodi sličnu silu ugriza kao i simpatrijska vrsta *Apodemus sylvaticus*, može se pretpostaviti da obilje hrane u njihovom zajedničkom staništu smanjuje potrebu za izravnom kompeticijom. Takvo obilje omogućuje koegzistenciju unutar iste ekološke niše bez potrebe za značajnom diferencijacijom u sili ugriza. Ova sličnost ukazuje da čimbenici poput raznolikosti i dostupnosti hrane ili specifičnih mikro-staništa mogu imati veću ulogu u oblikovanju ekološke strategije dinarskog voluhara nego same biomehaničke prilagodbe povezane s ugrizom. Međutim, snagu ugriza potrebno je razmatrati u kontekstu tjelesne mase kako bi se steklo dublje razumijevanje ekoloških prilagodbi (Freeman i Lemen, 2008a.; Hite i sur., 2019.; Ginot i sur., 2018.).

Omjer sile ugriza i tjelesne mase pokazuje koliko je ugriz snažan u odnosu na tjelesnu masu životinje, što predstavlja ključnu mjeru za razumijevanje učinkovitosti korištenja mišićne snage kod manjih sisavaca (Freeman i Lemen, 2008a.). Iako dinarski voluhar ima prosječnu silu ugriza, omjer između sile ugriza i tjelesne mase kod ove vrste je relativno visok. U ekološkom

kontekstu, veći omjer može ukazivati na specijalizacije koje omogućuju manjim životinjama učinkovitiju upotrebu ugriza u hranidbenim ili obrambenim aktivnostima (Christiansen i Wroe, 2007.).

Biljojedni glodavci koji se hrane tvrdim biljnim materijalom ili korijenjem mogu imati visok omjer sile ugriza i tjelesne mase, što im omogućava da se učinkovito nose s tvrdim materijalom unatoč svojoj maloj veličini (Freeman i Lemen, 2008a; Becerra i sur., 2014.; Maestri i sur., 2016.). Omjer sile ugriza i tjelesne mase kod dinarskog voluhara vrlo je sličan onom kod njegovog bliskog srodnika, prerijske voluharice (*Microtus ochrogaster*), što ukazuje na slične prilagodbe za obradu tvrdih materijala, unatoč različitim tjelesnim masama. Također, pokazuje vrijednosti uporedive s onima zabilježenim kod vrsta poput džepni gofer (*Geomys bursarius*), golokrtičasti štakor (*Heterocephalus glaber*), livadni skočimiš (*Zapus hudsonius*) i Malavijski krtičasti štakor (*Fukomys whytei*). Ponovo se može primijetiti da, iako dinarski voluhar nije striktno podzemna vrsta, njegov omjer sile ugriza i tjelesne mase usporediv je s fosorijalnim (kopajućim) vrstama poput *Geomys bursarius* i *Heterocephalus glaber*, koje su prilagođene životu pod zemljom.

Ženke dinarskog voluhara pokazale su veće prosječne vrijednosti sile ugriza i omjera sile ugriza i tjelesne mase u usporedbi s mužjacima (391,35 N/kg) (Prilog 7.). Međutim, broj ženki uključenih u istraživanje bio je mali (N=3), stoga te podatke treba promatrati s oprezom. Općenito, razlike u sili ugriza između mužjaka i ženki mogu biti povezane s različitim ekološkim i biološkim potrebama svake vrste, kao što su hranidba, obrana, reproduktivne uloge i socijalna struktura (Herrel i sur., 2002.).

Razlike u omjeru jačine zagrizi i mase tijela između spolova kod vrsta iz porodice tuko-tukoa *Ctenomys tuconax* i *Ctenomys talarum* ukazuju na to da mužjaci imaju jači zagriz, što može biti povezano s obranom teritorija ili većom kompeticijom za resurse među mužjacima (Becerra i sur., 2011.; 2013.) (Prilog 7.). Većina glodavaca ima poliginski sustav parenja, u kojem agresivne interakcije dovode do uspostavljanja hijerarhijskog odnosa među mužjacima (Zenuto i sur., 1999.). Promatranja ponašanja sugeriraju da su agonistički susreti između mužjaka vrlo agresivni, slabo ritualizirani, te da se sjekutići koriste za ozljeđivanje protivnika (Becerra i sur., 2012; Zenuto i sur., 2001.).

Razlika od 45 N/kg pokazuje da ženke dinarskog voluhara imaju veći prosječni omjer jačine zagriža u odnosu na tjelesnu masu u usporedbi s mužjacima. Ovo može biti indikativno za specifične prilagodbe povezane s hranidbenim navikama ili zaštitom potomstva, osim ako nije riječ o artefaktu proizašlom iz malog broja ženki uključenih u istraživanje. Međutim, o dinarskim voluharima se zna vrlo malo, stoga je neizvjesno mogu li se ovi obrasci primijeniti na njih. Nedostatak podataka o njihovom ponašanju i socijalnim interakcijama dodatno otežava izravno povezivanje ovih nalaza s njihovim biološkim i ekološkim karakteristikama.

Žvačnu muskulaturu dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) karakteriziraju veći *m. masseter profundus anterior* i *m. temporalis* te smanjeni *m. masseter superficialis* i *m. pterygoideus*. Ovakve karakteristike žvačnih mišića, gdje *m. masseter* postaje dominantan, dok je *m. temporalis* smanjen u veličini, odgovaraju općoj miomorfnoj građi (Cox i sur., 2012.; Cox i Jeffery, 2011.; Turnbull, 1970.).

Potporodica Arvicolinae pripada porodici Cricetidae i dijeli karakteristične miomorfne osobine u građi žvačnog sustava. Većina pripadnika ove porodice su svejedi koji konzumiraju plodove biljaka, sjemenke i beskralješnjake u različitim omjerima (Nowak, 1999.; Patton i sur., 2015.). Međutim, određene vrste pokazuju specijalizirane hranidbene navike, poput biljojeda iz rodova *Microtus* i *Arvicola* (Patton i sur., 2015.). S obzirom na dobro dokumentirane odnose između morfotipova i hranidbe kod glodavaca, postavlja se pitanje jesu li ovi obrasci primjenjivi na dinarskog voluhara, specijaliziranu endemsku vrstu.

Ovi morfotipovi, koji uključuju prilagodbe u omjeru mišića aduktora čeljusti, često su povezani s različitim hranidbenim strategijama biljojeda i sjemenojeda. Kod pripadnika potporodice Arvicolinae, biljojedi slijede drugačiji evolucijski put u odnosu na histrikomorfe slične hranidbi, što dovodi do divergencije u morfologiji čeljusti i značajnim razlikama u sili ugriza (Druziński, 2010.). Druziński (2010.) je opisao ovaj fenomen, ukazujući na to da je mišić *m. superficialis*, prisutan kod arvikolina, ali odsutan kod histrikomorfa, ključan za proizvodnju sile ugriza. Smanjenje ovog mišića kod dinarskog voluhara moglo bi ukazivati na prilagodbu hranidbi koja ne zahtijeva snažan ugriz, poput konzumacije mekšeg biljnog materijala.

Kako bismo bolje razumjeli biološke karakteristike dinarskog voluhara, važno je analizirati i distribuciju mase njegovih žvačnih mišića. Relativne veličine *m. massetera* (koji uključuje *m. superficialis*, *m. profundus anterior*, *m. profundus posterior*, *m. medialis anterior*, *m. medialis*

*posterior* i *m. medialis infraorbitalis*), *m. temporalis* (koji uključuje *t. anterior*, *t. suprazygomatica* i *t. posterior*) i *m. pterigoideus* (koji uključuje *p. internal* i *p. external*) čine približno 58,62%, 27,59 % i 8,62% ukupne mase aduktorskih mišića, redom (Prilog 8.). Ostatak od 5,17% mase aduktornih mišića pripada *m. digastricus*. Ova distribucija mišićne mase, s dominantnim *m. masseterom*, ali i relativno velikim *m. temporalis*, zabilježena je i kod brojnih glodavaca, kao što su planinski dabar (*Aplodontia rufa*), sjevernoamerički dabar (*Castor canadensis*) (Cox i Baverstock, 2016.) i nekoliko pripadnika porodice Sciuridae (Ball i Roth, 1995.; Druziński, 2010.). Značajno je da su svi ovi glodavci pripadaju sciuriformnom tipu (Wood, 1965.), što znači da imaju proširenje *m. masseter profundus* na rostrum i nisu srodni dinarskom voluharu.

*Musculus temporalis* i *m. masseter superficialis* obično se navode kao ključni mišići za grickanje (tj. ugriz sjekutićima), dok se *m. masseter profundus* i njegovi različiti dijelovi često povezuju sa žvakanjem (tj. žvakanjem kutnjacima). Iako je *m. masseter profundus* primarno odgovoran za žvakanje, Druziński (2010.) je otkrio da je uključen i u grickanje. *Musculus temporalis* može igrati ulogu u kontroli bočnih pokreta čeljusti (Cox i Jeffery, 2011.; Hiimäe i Houston, 1971.). Uzimajući u obzir ove funkcije, može se zaključiti da mišićna konfiguracija dinarskog voluhara omogućuje snažan ugriz i učinkovito žvakanje tvrdog biljnog materijala (poput korijenja, rizoma, lištova sa čvrstom strukturom i stabljika trave), što ukazuje na prilagodbu biljnoj hranidbi.

Ipak, ostaje pitanje je li ta prilagodba ograničena isključivo na konzumaciju tvrdih travnatih tkiva ili može obuhvatiti i druge vrste hrane, poput sjemenki ili druge energetske bogate izvore. Ako bi se dinarskim voluharima ponudile sjemenke ili neka druga energetske bogatija hrana, moglo bi se istražiti hoće li pokazati oportunitet u hranidbi, koristeći tu hranu za optimizaciju hranidbe i povećanje vlastitog fitnessa. U prirodi, mnogi glodavci, čak i oni specijalizirani za određenu vrstu hrane, pokazuju određeni stupanj oportuniteta u odabiru hrane, pogotovo ako je ona energetske bogata i lako dostupna (Laska i sur., 2003.; Vickery i sur., 1994.). Takvo ponašanje moglo bi smanjiti kompeticiju s drugim biljojedima u staništu, omogućujući im da se natječu za različite vrste hrane ovisno o dostupnosti, a time povećaju svoje šanse za preživljavanje i reprodukciju.

Kako bih bolje razumjela morfološke prilagodbe dinarskog voluhara u usporedbi s tipičnim svejedrom istog morfotipa, analizirala sam postotne udjele mase žvačnih mišića kod dinarskog

voluhara i kućnog miša (*Mus musculus*). Podaci o postotnom udjelu mase pojedinih mišića unutar ukupne mase svih žvačnih mišića pružaju uvid u važnost tih mišića u procesu žvakanja kod *Mus musculus*, generalista s raznovrsnom hranidbom, i dinarskog voluhara, specijaliziranog biljojeda (Prilog 8.).

Udio *m. masseter superficialis* je veći kod *Mus musculus* (19,13%) u usporedbi s dinarskim voluharom (14,55%). Ova razlika može biti povezana s različitim načinima hranjenja. Kod miševa, koji često konzumiraju sjemenke i druge tvrde materijale, snažniji površinski dio *m. massetera* može biti ključan za grickanje i lomljenje hrane (Freeman i Lemen, 2008b.). Zanimljivo je da je udio *m. masseter profundus* veći kod dinarskog voluhara (38,18%) nego kod *Mus musculus* (33,32%). *Musculus masseter profundus* je važan za žvakanje i obradu hrane unutar usne šupljine, što može ukazivati na prilagodbu dinarskog voluhara za hranidbu koja uključuje biljne materijale koji zahtijevaju intenzivnije žvakanje (Cox i sur., 2013.). Ukupni udio *m. pterygoideus* je veći kod *Mus musculus* (16,31%) u usporedbi s dinarskim voluharom (9,09%). Osobito je značajan udio *m. pterygoideus internus*, koji je kod miševa 11,56%, dok je kod voluhara samo 3,64%. Ovi mišići sudjeluju u složenim pokretima donje čeljusti, potrebnim za obradu raznolike hranidbe, što je karakteristično za omnivore poput miševa (Cox i Jeffery, 2011.; Hiiemäe i Houston, 1971.). Udio *m. temporalis* je također veći kod dinarskog voluhara (29,09%) nego kod *Mus musculus* (22,44%). *Musculus temporalis* je ključan za snažne ugrize sjekutićima što može ukazivati na prilagodbu voluhara za konzumaciju tvrde biljne hrane (Druziňsky, 2010.) (Prilog 8.). Ovo je zanimljivo jer literatura navodi da je kod miševa, koji često konzumiraju sjemenke i druge tvrde materijale, snažniji površinski dio *m. massetera* ključan za grickanje i lomljenje hrane (Cox i Jeffery, 2011.; Turnbull, 1970.). Dakle, obje vrste posjeduju prilagodbe za jak ugriz sjekutićima, ali ove prilagodbe proizlaze iz različitih dijelova čeljusti i čini se da na kraju imaju različitu funkciju.

Razlike u postotnim udjelima žvačnih mišića između ove dvije vrste ukazuju na divergentne evolucijske putove uslijed različitih hranidbenih strategija. Veći udio *m. masseter superficialis* kod miševa može biti prilagodba za grickanje i lomljenje sjemenki, dok veći udio *m. masseter profundus* i *m. temporalis* kod dinarskih voluhara podržava žvakanje biljnog materijala, što zahtijeva veći napor i snagu ugriza.

Ugrizne sile *in vivo* često se izazivaju kao obrambene reakcije, što znači da učinkovitost eksperimentalnih uvjeta u izazivanju takvih ponašanja utječe na precizno mjerenje maksimalne

sile ugriza. Također, mjerenja *in vivo* sile ugriza predstavljaju maksimalnu voljnu silu ugriza, tijekom koje se svi mišići kontrahiraju (McBrayer i White, 2002.). Stoga se ne može smatrati funkcionalno identičnim ni žvakanju ni grickanju.

Preciznije procjene sile ugriza mogu se dobiti korištenjem PCSA za izračunavanje sila mišića (Ginot i sur., 2018.). PCSA (eng. *Physiological Cross-Sectional Area*) je mjera koja se koristi u biomehanici za procjenu sile koju mišić može proizvesti. To je poprečni presjek mišića okomit na smjer njegovih vlakana, uzimajući u obzir broj i veličinu mišićnih vlakana (Ginot i sur., 2018.). Međutim, cilj ovog rada nije bio pokušati dobiti najprecizniju moguću procjenu, već specifično testirati i usporediti 'pojednostavljene' morfološke procjenitelje. Važno je napomenuti da ovakve 'procjene' ponekad mogu rezultirati preuveličanim vrijednostima, što može utjecati na interpretaciju rezultata. Ova metodološka ograničenja treba imati na umu pri tumačenju dobivenih podataka.

U usporedbi s drugim vrstama glodavaca, dinarski voluhar pokazuje viši omjer jačine zagrizu u odnosu na tjelesnu masu. Ženke dinarskog voluhara imaju veći omjer jačine zagrizu u odnosu na tjelesnu masu u usporedbi s mužjacima. Žvačna muskulatura dinarskog voluhara ima relativno veći udio *m. massetera* i *m. temporalis*, što omogućuje generiranje sila ugriza potrebnih za učinkovito žvakanje i grickanje tvrdih biljnih materijala te manipulaciju čeljusti pri obradi hrane.

## 7.2. Morfologija i histologija probavnog sustava

Probavni sustav glodavaca ključan je za probavu hrane i apsorpciju hranjivih tvari te se prilagođava povećanoj potrošnji energije ili smanjenju kvalitete hrane (Gross i sur., 1985.). Morfološke i histološke strukture probavnog trakta usko su povezane s okolišnim uvjetima, dostupnošću hrane, energetske potrebama i drugim čimbenicima (Eto i sur., 2016.; Naya, 2008.). Hranidbene razlike često su glavni uzrok adaptivnih varijacija u morfologiji i histologiji probavnog trakta među malim sisavcima poput glodavaca (Langer i Clauss, 2018.).

U okviru ovog dijela istraživanja, proučavan je probavni trakt odraslih jedinki dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) s tjelesnim masama između 59,7 i 88 grama. Izmjerene su duljine i mase svih segmenata probavnog kanala zajedno s morfometrijskim mjerama slojeva koji tvore njihovu stijenku. Cilj istraživanja bio je, po prvi put, pružiti sveobuhvatnu morfološku i histološku analizu probavnog trakta dinarskog voluhara, usporediti ga s drugim

srodnim vrstama te istražiti eventualne anatomsko-gastrointestinalne prilagodbe povezane s biljnom hranidbom kod ove vrste.

Dinarski voluhar je biljojed i pretežito se hrani raznolikim vrstama biljaka koje su bogate vlaknima, uključujući mlado lišće bukve, grančice jele, trave i ljekovito bilje (Antolović i sur., 2006.). Probavni sustav dinarskog voluhara pokazuje tipičnu anatomiju glodavaca, kakvu su opisali Bensley (1905.), Howell (1953.), Mitchell (1905.) i drugi. Budući da dinarski voluhar konzumira biljnu hranu (Antolović i sur., 2006.), njegov probavni sustav dijeli karakteristike s probavnim sustavom drugih biljojednih glodavaca (Mitchell, 1905.), uključujući složeni želudac, prostrano slijepo crijevo i relativno dugo debelo crijevo. U prvom dijelu diskusije analizirati ću morfološke karakteristike i odnose unutar probavnog trakta, a zatim ću istražiti histomorfološke i histokemijske karakteristike.

#### Makromorfologija probavnog trakta

Probavni sustav dinarskog voluhara predstavlja složenu i specifično prilagođenu strukturu za obradu biljne hrane. Jednjak je obložen keratiniziranim slojem višeslojnog pločastog epitela, koji pruža zaštitu od abrazivnih čestica iz hrane. Želudac je bilokularni i hemiglandularni, što ukazuje na složenu građu. Sastoji se od mišićnog i žljezdanog dijela, što je karakteristično za životinje koje konzumiraju hranu bogatu vlaknima (Carleton, 1973.). Tanko crijevo ima dobro razvijenu sluznicu s kružnim naborima i visokim crijevnim resicama, koje povećavaju apsorpcijsku površinu. Slijepo crijevo je dominantna struktura s naborima koji također doprinose povećanju apsorpcijske površine, dok debelo crijevo pokazuje složenu građu s naborima i post-cekalnom spiralom.

Rezultati istraživanja na drugim vrstama, uključujući broj životinja korištenih u istraživanjima, hranidbene navike, prosječnu tjelesnu masu, prosječnu masu probavnog trakta te postotni udio mase probavnog trakta, kao i podaci iz ovog istraživanja, sažeti su u Prilogu 9. Kod biljojeda, kapacitet probavnog trakta pokazuje linearnu povezanost s tjelesnom masom, što sugerira da bi i masa probavnog trakta mogla biti proporcionalna tjelesnoj masi (Clauss i sur., 2007b.). Prema prosječnoj masi probavnog trakta u odnosu na tjelesnu masu, dinarski voluhari su slični ostalim biljojednim glodavcima. Masa njihovog probavnog trakta iznosi 15,19% tjelesne mase, što je značajno više nego kod svejeda.

Rezultati istraživanja na drugim vrstama, uključujući broj životinja korištenih u istraživanjima, hranidbene navike, postotni udio duljine probavnog trakta, kao i podaci iz ovog istraživanja, sažeti su u Prilogu 10. Heroldova i Janova (2019.) primijetili su da je probavni trakt biljojedne poljske voluharice (*Microtus arvalis*) relativno veći i složeniji u usporedbi s probavnim traktom sjemenojednog stepskog miša (*Apodemus uralensis*). Najznačajnija razlika između ove dvije vrste je u slijepom crijevu (Heroldova i Janova, 2019.). Biljojedna voluharica posjeduje veće funkcionalno slijepo crijevo, gdje se nalaze mikroorganizmi koji kataliziraju razgradnju celuloze u jednostavne masne kiseline. S druge strane, sjemenojedi, kao što je stepski miš, pokazuju intenzivniju probavu hrane u tankom crijevu, gdje se škrob, masti i bjelančevine razgrađuju uz pomoć enzima. Himus, koji prelazi iz tankog crijeva u debelo crijevo, pretežno se sastoji od vode i neprobavljene materije poput celuloze (vlakna ili grubih vlakana) dok je glavna funkcija debelog crijeva apsorpcija vode, osiguravajući tako formiranje čvrstog fecesa (Hume, 1994.). Dakle, povećanje duljine probavnog trakta može povećati kapacitet i produžiti vrijeme probave i apsorpcije (Karasov i Martinez del Rio, 2007.).

Također, voluharice imaju dulje prosječno zadržavanje hrane u probavnom traktu od miševa, zahvaljujući simbiotskoj probavi (Gębczyńska i Gębczyński, 1971.; Kostelecka-Myrcha i Myrcha, 1964.). Kotzé i sur. (2006.) proučavali su probavni trakt južnoafričkog podzemnog voluhara (*Bathyergus suillus*), najveće vrste među podzemnim voluharima, koji se hrani niskokaloričnom hranom, uglavnom travom. Njihovo istraživanje ukazuje da veliko slijepo crijevo i uzlazni kolona kod ove vrste mogu biti prilagodba hranidbi. Stevens i Hume (1995.) primijetili su da relativno povećanje veličine slijepog crijeva i uzlaznog dijela kolona ukazuje na sposobnost fermentacije hrane u debelom crijevu, gdje mikroorganizmi razgrađuju ugljikohidrate.

Schieck i Millar (1985.) su istražili povezanost duljine probavnog trakta s hranidbenim navikama 35 vrsta malih sisavaca. Njihovi nalazi sugeriraju da biljojedi obično posjeduju dulje debelo crijevo od svejeda, a ukupna duljina crijeva kod biljojeda je često veća nego kod svejeda i mesojeda (Prilog 10.). Budući da biljojedi konzumiraju biljnu hranu bogatu vlaknima i relativno niskim kalorijskim sadržajem, proces probave zahtijeva više vremena kako bi se izdvojile potrebne hranjive tvari. To rezultira povećanjem volumena i površine debelog crijeva (Wilczyńska, 1998.). Schieck i Millar (1985.) također su zaključili da je debelo crijevo precizniji pokazatelj hranidbenih navika od tankog crijeva. Primjerice, kod južnoafričkog bodljastog miša (*Acomys spinosissimus*), površina i duljina tankog crijeva bile su veće od



kombinirane površine slijepog i debelog crijeva, što sugerira da fermentacija može biti korisna u probavi kod ove vrste, ali vjerojatno nije od ključne važnosti (Boonzaier i sur., 2013a.).

Nadalje, usporedba ukupne duljine crijeva kod dinarskog voluhara s onima kod istočne livadne voluharice (*Microtus pennsylvanicus*) i šumskog štakora (*Neotoma* sp.) pokazuje da ne postoji značajna razlika u duljini tankog, debelog i slijepog crijeva između dinarskog voluhara i istočne livadne voluharice. Međutim, značajna razlika postoji u duljini debelog crijeva između ove dvije vrste i šumskog štakora (Prilog 11.). Sve tri vrste primarno su biljojedi, premda šumski štakor u svoju hranidbu uključuje sjemenke, orašaste plodove, ali i kukce i druge male životinje (Golley, 1960.). Struktura crijeva kod ovih vrsta, osobito kod istočne livadne voluharice i dinarskog voluhara, ukazuje na značajne prilagodbe za probavu biljne materije.

Ako usporedimo dinarskog voluhara s drugim simpatrijskim vrstama glodavaca (Prilog 12.), zanimljivo je da najveći udio duljine probavnog trakta kod dinarskog voluhara otpada na tanko crijevo, u rasponu od 44,45% kod vrtnog puha (*Eliomys quercinus*) do 58,40% kod dinarskog voluhara. Ova razlika u duljini tankog crijeva upućuje na različite strategije probave i apsorpcije hranjivih tvari među vrstama koje dijele stanište s dinarskim voluharom. Nadalje, dinarski voluhar ima znatno duže slijepo crijevo u usporedbi sa simpatrijskim vrstama koje ga posjeduju, poput šumskog miša (*Apodemus sylvaticus*) i krškog miša (*Apodemus epimelas*). Dulje slijepo crijevo može ukazivati na veću sposobnost fermentacije hrane bogate vlaknima, što je često slučaj kod biljojeda (Hume, 1989.).

Velika razlika primjećuje se i u veličini želuca, koji je kod dinarskog voluhara znatno manji nego kod ostalih vrsta. Manji želudac može ukazivati na brži prolazak hrane kroz taj dio probavnog sustava, što može biti prednost pri probavi manje probavljivih dijelova biljne materije. Kada analiziramo duljinu debelog crijeva, dinarski voluhar se prema vrijednostima nalazi u sredini u odnosu na ostale vrste, ali je važno napomenuti da puhovi, koji imaju dulje debelo crijevo, nemaju slijepo crijevo. Kada se puhovi izuzmu iz analize, dinarski voluhar ima najdulje debelo crijevo među preostalim vrstama, što može odražavati prilagodbu koja omogućava učinkovitiju probavu biljne hrane. Dulje debelo crijevo omogućava bolju apsorpciju vode i dodatnu fermentaciju, što može predstavljati evolucijsku prednost u okolišima s ograničenim pristupom vodi ili gdje biljna materija predstavlja glavni izvor hrane (Lange i Staaland, 1970.).

Na temelju analize hranidbe dinarskog voluhara, možemo pretpostaviti da je njegov probavni trakt prošao evolucijske prilagodbe kako bi omogućio zadovoljavanje energetske potrebe za preživljavanje i reprodukciju, unatoč konzumaciji niskokaloričnih izvora hrane. Specifične morfološke karakteristike probavnog trakta, kao što su povećano slijepo crijevo, debelo crijevo s post-cekalnom spiralom te složena struktura želuca s mišićnim i žljezdanim dijelovima, omogućuju prilagodbu funkcija probave i apsorpcije. Ove prilagodbe pomažu dinarskom voluharu da učinkovito iskoristi hranjive tvari iz hrane bogate vlaknima, čime zadovoljava svoje energetske potrebe u skladu s uvjetima staništa (Naya, 2008.). Dinarski voluhari koriste izvore hrane koji su bogati vlaknima i usko su vezani uz krševiti reljef, uključujući škrape, jame, ulaze u špilje, te pukotine na liticama (Kryštufek i Bužan, 2008.). Krška staništa karakteriziraju visoka izloženost stijenama, plitka i diskontinuirana tla te osjetljivi ekosustavi, što ih čini surovim uvjetima za život biljaka i životinja (Wang i sur., 2019.; Liu i sur., 2021.). Odnos između potrošnje energije i duljine probavnog trakta kod životinja, osobito onih koje obitavaju u zahtjevnim staništima, predstavlja područje od značajnog interesa u kontekstu razumijevanja načina na koji te životinje zadovoljavaju svoje energetske potrebe. Ova sinteza razmatra hipotezu da životinje s većom potrošnjom energije razvijaju dulje probavne traktove kako bi optimizirale probavu i apsorpciju hranjivih tvari. Glodavci koji obitavaju na višim geografskim širinama, gdje su izloženi većoj klimatskoj varijabilnosti, pokazuju povećanu fleksibilnost u duljini tankog crijeva, što im omogućuje zauzimanje šireg raspona staništa, podržavajući tezu da zahtjevna okruženja potiču evoluciju prilagodljivijih probavnih sustava (Naya, 2008.).

Iako ovi rezultati mogu ukazivati na razlike u morfologiji probavnih organa među različitim vrstama, treba uzeti u obzir da su ovi morfološki pokazatelji samo potencijalne smjernice te su potrebni dodatni podaci za mjerenje prilagodljivosti životinja hranidbi i energetskim potrebama. Štoviše, Barry (1977.) je pokazao da mjerenje duljine crijeva nije pokazatelj stvarne veličine i apsorpcijske površine crijevnog trakta. Također, duljine probavnog trakta mogu biti pod utjecajem kvalitete hrane, sezonskih promjena te reproduktivne aktivnosti (Korn, 1992.). Na primjer, duže crijevo se očekuje tijekom sušnih sezona zbog povećanog udjela vlakana u hrani te kod ženki tijekom razdoblja parenja zbog povećane potrebe za energijom (Lovegrove, 2010.). Nadalje, duljina i masa probavnog sustava mogu se mijenjati ovisno o trenutnoj hranidbi. Kako glodavci rastu, promjene u duljini i masi njihovog probavnog sustava, ili njegovih određenih njegovih dijelova, često su uzrokovane sezonskom dostupnošću hrane i njezinim sastavom (npr. udio vode i vlakana) (Eto i sur., 2016.). Važno je napomenuti da su ovi

rezultati dobiveni na populaciji u zatočeništvu, koja je držana u stabilnim uvjetima i na idealnoj hranidbi. Stoga bi bilo zanimljivo ponoviti mjerenja direktno na divljim jedinkama kroz različite sezone kako bi se dobio novi set usporedivih podataka.

### Histologija i histokemija probavnog trakta

**Jednjak** dinarskog voluhara je uska, tubulusna struktura. Histološka građa jednjaka razlikuje se između različitih životinjskih vrsta po tipu epitelnog oblaganja, distribuciji i vrsti žlijezda te debljini mišićnih slojeva (Abd El Hafez i sur., 2013.). Sluznica jednjaka zeca (*Lepus europaeus*) (Selim i sur., 2017.), afričkog divovskog štakora (*Cricetomys gambianus*) (Nzalak i sur., 2010.), žutonoge vjeverice (*Paraxerus cepapi*) (Igbokwe i Obinna, 2016.) i perzijske vjeverice (*Sciurus anomalus*) (Goodarzi i sur., 2019.) sadrži nekeratinizirani višeslojni pločasti epitel. S druge strane, kod dinarskog voluhara, kao i kod zamorca (*Cavia porcellus*), konja (*Equus* sp.), deve (*Camelus* sp.) i ljame (*Lama glama*), opaža se keratinizacija epitela jednjaka (Berghes i sur., 2011.; Banks, 1993.; Nabipour i sur., 2001.). Stupanj keratinizacije ovisi o hranidbenim navikama, te se povećava kod biljojedih sisavaca koji konzumiraju grublju hranu. Debljina epitela jednjaka varira ovisno o njegovom anatomskom položaju unutar tijela i vrsti životinje (Goodarzi i sur., 2019.). Kod perzijske vjeverice (*Sciurus anomalus*), najtanji i najdeblji epitel uočen je u abdominalnom (trbušnom) i cervikalnom (vratnom) dijelu jednjaka. Deblji epitel u cervikalnom dijelu vjerojatno je posljedica toga što ta lokacija prva dolazi u kontakt s hranom (Goodarzi i sur., 2019.). U dinarskih voluhara, sluznica jednjaka je naborana, što rezultira značajnim varijacijama u debljini izmjerenih slojeva. Na keratinizirani dio jednjaka otpada 10,25% ukupne debljine stijenke, dok na nekeratinizirani dio otpada 19,56%. Prema istraživanju Scopin i sur. (2015.) unutarnja površina jednjaka laoskog kamenog štakora (*Laonastes aenigmamus*), koji je također biljojed, obložena je keratiniziranim višeslojnim pločastim epitelom koji u prosjeku iznosi 14,0% ukupne debljine stijenke jednjaka, dok je debljina nekeratiniziranog sloja 20,1%. Debeli rožnati sloj epitela može pružiti zaštitu dubljim dijelovima tkiva od ozljeda koje mogu nastati konzumacijom grube i suhe hrane. *Lamina propria* je jednostavno građena od vezivnog tkiva koje sadrži krvne žile, bez vidljive prisutnosti egzokrinih žlijezda. To je iznenađujuće obzirom da se dinarski voluhari hrane krutom i abrazivnom hranom. Naime, mukozna barijera igra važnu ulogu u zaštiti jednjaka od oštećenja (Nzalak i sur., 2010.). Kod biljojeda, sluzni zaštitni sloj povećava viskoznost kako bi olakšao prolazak velikih komada hrane, dok kod svejednih vrsta, poput afričkog divovskog štakora (*Cricetomys gambianus*), sluz pomaže pri imobilizaciji ulovljene hrane, poput člankonožaca i skakavaca (Nzalak i sur., 2010.). Postoji pretpostavka da sluz koju proizvode žlijezde

slinovnice služi kao zaštita sluznice jednjaka od oštih predmeta i stvara povoljno kemijsko okruženje za probavne procese. Također, moguće je da se enzimi s površine kombiniraju sa sluzi iz žlijezda slinovnica kako bi olakšali probavne funkcije u jednjaku. Ovi nalazi podudaraju se s istraživanjem Arellano i sur. (2001.), ali su u suprotnosti s nalazima Parillo i sur. (2004.) i Selvan i sur. (2008.). U mišićnom sloju sluznice jednjaka dinarskog voluhara prisutna su uzdužna glatka mišićna vlakna, što je slično nalazu opisanom u jednjaku zamoraca (*Cavia porcellus*) (Mohammadpour i Darvishzadeh, 2014.). Nasuprot tome, u jednjaku odraslih zečeva (*Lepus europaeus*) (Selim i sur., 2017.) i afričkih divovskih štakora (*Cricetomys gambianus*) (Nzalak i sur., 2010.) ovaj sloj nedostaje. Igbokwe i Obinna (2016.) su opisali da je mišićni sloj sluznice bio dominantan sloj u cervikalnom dijelu jednjaka žutonoge vjeverice (*Paraxerus cepapi*). Međutim, u našem istraživanju, kod dinarskog voluhara, taj sloj je bio izuzetno tanak, teško mjerljiv i jedva primjetan u obliku jednog niza mišićnih vlakana koji omeđuju sluznicu.

Podsluznica jednjaka dinarskog voluhara građom je bila slična vezivnom tkivu sluznice, bez uočenih dodatnih struktura. Ovaj nalaz podudara se s rezultatima prethodnih istraživanja na različitim vrstama, uključujući europsku vjevericu (*Sciurus vulgaris*), južnoafričkog bodljastog miša (*Acomys spinosissimus*), crvenkasto-sivu mošusnu rovku (*Crocidura cyanea*), zlatnu krticu (*Amblysomus hottentotus*) (Igbokwe i Obinna, 2016.) i zamorca (*Cavia porcellus*) (Berghes i sur., 2011.), gdje također nisu pronađene žlijezde smještene u podsluznici jednjaka. Vrsta, broj i raspodjela podsluznih žlijezda variraju među različitim vrstama. Kod dinarskog voluhara ovaj sloj je deblji u usporedbi s vezivnim tkivom sluznice, ali pokazuje znatnu varijabilnost u mjerama zbog prilagodbe podsluznice naborima sluznice. Stoga, na određenim mjestima, podsluznica prodire u te nabore i postaje deblja.

U jednjaku dinarskog voluhara, mišićni sloj čini najveći dio ukupne debljine stijenke, odnosno 32,72%, a sastoji se od dva ograničena sloja: kružnog sloja i uzdužnog sloja poprečno prugastih mišića, slično kao i kod zamorca (*Cavia porcellus*) (Berghes i sur., 2011.) i žutonoge vjeverice (*Paraxerus cepapi*) (Igbokwe i Obinna, 2016.). Nasuprot tome, *tunica muscularis* u jednjaku zečeva sastoji se od tri jasno definirana sloja: unutarnjeg longitudinalnog, srednjeg kružnog i vanjskog longitudinalnog (Mohammadpour i Darvishzadeh, 2014.). Rezultati istraživanja ukazuju na postojanje određenih razlika i sličnosti u histološkoj strukturi jednjaka dinarskog voluhara u odnosu na druge vrste, uključujući druge sisavce, ali nije moguće donijeti konkretne zaključke.

**Želudac** dinarskog voluhara ima složenu građu, a prema klasifikaciji pripada bilokularnom diskoglandularnom tipu želuca. Glodavci pokazuju izvanrednu varijaciju u morfologiji želuca u smislu kompartmentalizacije i tipa sluznice (Carleton, 1973.; Stevens i Hume, 1995.).

Želudac vrsta iz nadporodice Muroidea obično se sastoji od dijela s rožnatim (nežljezdanim) višeslojnim pločastim epitelom i dijela žljezdanog epitela. Ovaj tip želuca naziva se hemiglandularni želudac i smatra se prilagodbom biljojednoj hranidbi (Perrin i Curtis, 1980.). Nežljezdani dio nalazi se blizu kardije, dok se žljezdani dio nalazi blizu pilorusa, što sugerira da se hrana prvo unosi u nežljezdani dio prije nego što dođe u dodir s želučanim izlučevinama. Prijelaz između ova dva područja obično je oštar. Carleton (1973.) je u svojim istraživanjima koristio termin "rubni nabor" (eng. *bordering fold*) za opis strukture koja se formira između slojevitog pločastog epitela i žljezdanih dijelova želuca. Toepfer (1891.) je kod štakora opisao istu strukturu kao "ograničavajući greben" (eng. *limiting ridge*) koji se prema Boonzaier i sur. (2013b.) javlja kod glodavaca s hemiglandularnim želucima. Ova brazda prisutna je i kod dinarskog voluhara i slična je onoj u želucima omnivornih glodavaca, kao što su južnoafrički bodljasti miš (*Acomys spinosissimus*) (Boonzaier i sur., 2013b.); štakori (Ghoshal i Bal, 1989.); miševi, voluharice, leminzi (Carleton, 1973.), te istočni bodljasti miš (*Acomys dimidiatus*) (Walters i sur., 2014.). U prijelaznom dijelu između mišićne i žljezdane regije vidljiva je promjena u građi sluznice: epitel se mijenja iz višeslojnog pločastog u jednoslojni cilindrični, a sluznicom dominiraju žlijezde. Histološki pregled želuca glodavaca iz potporodice Cricetinae pokazao je da vrste koje imaju hemiglandularni tip želuca posjeduju sva tri tipa žlijezda (Blank, 1950.). S druge strane, vrste koje imaju diskoglandularni tip želuca posjeduju samo dva tipa žlijezda (kardijačke i fundičke) (Genest-Villard, 1980.; Golley, 1960.; Horner i sur., 1964.). Odsutnost piloričkih žlijezda povezanih s diskoglandularnim tipom želuca jasno ukazuje na to da se bilokularni diskoglandularni želudac razvio iz unilokularno-hemiglandularnog stanja. Gubitak piloričkih žlijezda može utjecati na učinkovitost mehaničke razgradnje hrane u antrumu. Zamjena žljezdanog epitela keratiniziranim pločastim epitelom pruža otporniju površinu za mljevenje dok peristaltički valovi gnječe i miješaju hranu. Većina učinkovitog miješanja hrane događa se u području antruma, jer najjače mišićne kontrakcije počinju na dijelu gdje je kutni utor (*incisura angularis*) i napreduju prema piloričkom otvoru (Davenport, 1966.). Izraženi kutni utor kod glodavaca s bilokularnim želucem može povećati područje za intenzivno miješanje i preradu hrane (Carleton, 1973.). Da bi se uspješno povezale varijacije u morfologiji želuca s hranidbenim navikama, Carleton (1973.) zaključuje da je važno uzeti u obzir anatomiju cijelog probavnog trakta.

Bensley (1905.) je sugerirao da bi povećana keratinizacija i relativno smanjenje žljezdanog epitela sluznice želuca mogli biti posljedica konzumacije abrazivne hrane, poput hitinskih egzoskeleta artropoda i grubih trava. Međutim, ovu hipotezu nije podržala činjenica da mnogi sisavci, iako konzumiraju grubu i abrazivnu hranu, ne pokazuju keratinizaciju želuca. Primjerice, želudac sjevernoameričkog dabra (*Castor canadensis*) i dvojezubaca ostaju potpuno žljezdani unatoč konzumaciji grubih materijala poput kore drveta, lišća i trave. Vorontsov (1962.) je iznio pretpostavku da bi povećana keratinizacija želuca mogla biti prilagodba biljojedoju hranidbi, pri čemu bi keratinizirani dio mogao funkcionirati kao komora za fermentaciju celuloze od strane simbiotskih bakterija. Međutim, Carleton (1973.) je odbacio Vorontsovu hipotezu, sugerirajući da bi smanjenje žljezdanog epitela zbog keratinizacije moglo rezultirati duljim zadržavanjem amilaze iz sline, što bi moglo poboljšati probavu. Međutim, istraživanja pokazuju da bakterije prisutne u ovom području želuca kod velikog dugorepog hrčka (*Tscherskia triton*) nisu dovoljno raznolike da bi podržale njegovo djelovanje kao fermentacijske komore, kao što je to slučaj kod želuca preživača (Shinohara i sur., 2016.). Uspoređujući s jednostavnim, potpuno žljezdanim želucem sjevernoameričkog dabra (*Castor canadensis*), utvrdila sam da dinarski voluhar ima složeniji, dvostruko odijeljen (bilokularan) želudac, te da je žljezdana sluznica reducirana na manji dio (diskoglandularan).

Histološke karakteristike želuca sisavaca razlikuju se među vrstama, iako postoje osnovne strukturne sličnosti. Mišićni dio želuca ima izražene nabore sluznice (ruge) te je građen od pokrovnog epitela mišićnog želuca, keratiniziranog višeslojnog pločastog epitela, vezivnog tkiva sluznice u kojem nisu vidljive žlijezde i tankog sloja mišića sluznice. U mišićnoj regiji želuca dominira mišićni sloj građen od glatkih mišićnih stanica. Slična građa mišićnog dijela želuca opažena je i kod planinskog zokora (*Esospalax baileyi*) (Cai i sur., 2022.). Ovi nalazi sugeriraju da specifična histološka struktura želuca dinarskog voluhara ne samo da osigurava adekvatnu sekreciju želučane kiseline, sluzi i drugih tvari za kemijsku probavu, već zbog pojačane muskulature u mišićnom dijelu, također poboljšava kontrakciju i peristaltiku želuca (Cai i sur., 2022.; Sahd i sur., 2017.), što ima značajnu ulogu u mehaničkoj probavi.

U ovom istraživanju, tipovi stanica žljezdanog želuca uključuju stanice sluznice vrata, koje luče sluz, pružajući zaštitnu barijeru protiv ozljeda, toksina i patogena, osim što doprinose prirodnom obrambenom sustavu (Corfield i Shukla, 2003.). Histokemijska AB/PAS reakcija pokazala je da se površinske mukozne vrčaste stanice u sluznici žljezdanog dijela želuca dijele na PAS+ stanice, koje označavaju prisutnost neutralnih mucina, i AB+ stanice, koje prikazuju

kiselinsku grupu mukopolisaharida. Ovo je u skladu s opažanjima Sheahan i Jervis (1976.) kod glodavaca poput zamorca. Daljnje istraživanje koje su proveli Pinheiro i sur. (2018.) pokazalo je da su stanice sluznice vrata u svim istraživanim vrstama, uključujući štakore i zamorce, pokazale pozitivnu reakciju na stanice koje luče mješovite mucine. Ova zapažanja potvrđena su i kod drugih vrsta, poput zlatne krtice (*Amblysomus hottentotus*) (Boonzaier i sur., 2013b.), što ukazuje na konzistentnost u distribuciji i funkciji ovih stanica među različitim vrstama.

Kod dinarskog voluhara parijetalne stanice koje proizvode želučanu kiselinu bile su prisutne cijelom dužinom želučanih žlijezda, iako ih je u vratom dijelu žlijezda bilo nešto više. Glavne (zimogene) stanice koje proizvode probavne enzime su dominirale u središnjem dijelu sluznice i poglavito u bazalnim dijelovima žlijezda. Ovaj dio istraživanja koji se odnosi na AB/PAS reakciju u sluznicama želuca i želučanim žlijezdama sličan je u svojim rezultatima istraživanju koje je provedeno na 11 različitih vrsta sisavaca, uključujući neke glodavce (Sheahan i Jervis, 1976.). U ovom istraživanju dinarskog voluhara želučane žlijezde su pokazale snažnu AB/PAS pozitivnu reakciju u svim dijelovima želuca, što ukazuje na lučenje kiselih sluznih tvari iz tih žlijezda.

Analiza debljine slojeva tkiva u želucu dinarskog voluhara ukazuje da se morfološke prilagodbe visokovlknastoj hranidbi protežu izvan opće morfologije želuca. Mukozni sloj u žljezdanom dijelu želuca je deblji, pri čemu su tubulusne želučane žlijezde prisutne samo u dijelu korpusa. U drugim dijelovima želuca, mukozni sloj sastoji se od višeslojnog pločastog epitela s keratiniziranom površinom, bez žlijezda, dok je mišićna stijenka deblja. Deblji mukozni sloj žljezdanog dijela želuca kod planinskog zokora predstavlja prilagodbu probavi hrane bogate vlaknima u surovim uvjetima (Cai i sur., 2022.). S obzirom na to da dinarski voluhari uglavnom konzumiraju hranu bogatu vlaknima poput zeljastog bilja, mladog lišća bukve, grančica, trave i aromatičnog bilja, može se pretpostaviti da je sadržaj njihovog želuca vjerojatno bogat celulozom i ligninom. Stoga, zaključujem da struktura bilokularnog, hemiglandularnog želuca omogućuje dinarskom voluharu probavu i iskorištavanje visokovlknaste hrane za hranidbu. Nadalje, histokemijska analiza želučane strukture potvrđuje visoku diferencijaciju funkcionalnih stanica u želučanom tkivu, što odgovara njihovoj pretežno vlaknastoj hranidbi i sugerira snažne probavne sposobnosti. Carleton (1973.) sugerira da glodavci s različitim hranidbenim navikama često pokazuju sličnosti u morfologiji želuca, ali izražene razlike dalje duž probavnog trakta.

Stijenka **tankog crijeva** dinarskog voluhara sastojala se od tipičnih slojeva koji se nalaze i kod drugih vrsta. Ovaj dio crijeva ima najbolje razvijeni sloj sluznice, što ukazuje na to da se ovdje odvija intenzivna apsorpcija hranjivih tvari. Fokus istraživanja je bio na srednjem dijelu tankog crijeva, odnosno jejunumu. U istraživanju Nzalak i sur. (2015.) utvrđeno je da je površina resica jejunuma bila znatno veća u usporedbi s duodenom i ileumom, što ukazuje na to da je apsorpcijska sposobnost najveća u jejunumu u usporedbi s bilo kojim drugim dijelom tankog crijeva. *Tunica mucosa* jejunuma dinarskog voluhara sastoji se od jednoslojnog cilindričnog epitela s mikrovilima, ispod kojeg se nalazi *lamina propria*. Prisutnost kružnih nabora sluznice ne podudara s opažanjima za tanko crijevo miševa (Treuting i sur., 2018.) i štakora (Hosoyamada i Sakai, 2005.). Kod dinarskog voluhara, sluznica je dosta visoka nabrana u prstolike nastavke, crijevne resice koje u ispruženom obliku na poprečnom presjeku najčešće budu 350-400 µm duge i pružaju se u lumen crijeva. Prema istraživanju Tootian i sur. (2012.), duljina crijevnih resica u jejunumu perzijske vjeverice (*Sciurus anomalus*) iznosila je prosječno  $208,5 \pm 95,4$  µm što je značajno manje nego u dinarskih voluhara.

Bujard (1908.) je proučavao resice tankog crijeva kod različitih domaćih životinja i ptica i pokazao da se općenito morfologija resica može povezati s hranidbenim navikama. On je uspio promijeniti oblik resica štakora mijenjanjem hranidbe, primijetivši da su resice štakora hranjenih životinjskom hranom ili hranidbom na bazi mlijeka bile uže i više od resica štakora koji su se hranili uglavnom biljem ili mlijekom i celulozom. Rezultati istraživanja Barry (1976.) potvrđuju Bujardove nalaze o niskim i širokim resicama kod biljojeda (*Microtus* sp.), visokim i uskim resicama kod mesojeda (*Blarina* sp. i *Eptesicus* sp.), dok su resice svejeda (*Mus* sp. i *Peromyscus* sp.) bile srednje veličine i oblika. Morfologija crijevnih resica dinarskog voluhara je prilagođena hranidbi bogatoj vlaknima, što je u skladu s njegovim biljojednim načinom hranidbe. Ova prilagodba potvrđuje da prirodna hranidba značajno utječe na strukturu crijeva, a promjene u hranidbi, poput onih u zatočeništvu, mogle bi potencijalno izazvati dodatne promjene u obliku resica, u skladu s ranijim istraživanjima na drugim vrstama (Tasman-Jones i sur., 1982.; Sigleo i sur., 1984.).

Manja količina vrčastih stanica (jednostanične mukozne žlijezde) u tankom crijevu dinarskog voluhara smještena je unutar visokog pokrovnog epitela između enterocita. U blizini baze crijevnih resica su Lieberkühnove kripte, čiji se epitel nastavlja na epitel resica. Pokrovni epitel kripte sadrži slične tipove stanica kao epitel resica, uglavnom enterocite, te nešto vrčastih stanica. Osim toga, u kriptama se mogu naći enteroendokrine stanice, nediferencirane stanice i



eoziofilne Panethove stanice. Unutrašnjost resica i područje oko kripti ispunjeno je rahlim vezivnim tkivom sluznice, koje je dobro prokrvljeno i ponekad sadrži manje difuzne nakupine limfnog tkiva. Panethove i enteroendokrine stanice otkrivene su i kod južnoafričkog bodljastog miša (*Acomys spinosissimus*) (Boonzaier i sur., 2013a.). Uobičajeno smještene u tankom crijevu na dnu Lieberkühnovih kripti, Panethove stanice sadrže velike sekretorne granule s antibakterijskim enzimom, lizozimom (Gartner i Hiatt, 2022.). Njihove sekrecije štite luminalnu površinu epitela od potencijalno patogenih mikroorganizama (Kierszenbaum, 2002.; Young i Heath, 2003.). Ovo se slaže s prethodnim zapažanjima u tankom crijevu nekih glodavaca (Sato i sur., 1990.), kao i kod drugih sisavaca, uključujući konje (Takehana i sur., 1998.) i preživače (Banks, 1993.).

Vrčaste stanice izlučuju velike količine sluzi u tanko crijevo. Histokemijski testovi pokazali su da ove stanice u jejunumu dinarskog voluhara luče najvećim dijelom kisele mucine, zatim neutralne pa mješovite. Usporedna histokemijska analiza mucina tankog crijeva 13 različitih vrsta sisavaca, uključujući štakore, voluharice, zamorce i zečeve, pokazala je sličan profil mucina (Schumacher i sur., 2004.). Ovi nalazi sugeriraju da su svojstva mucina koje luče vrčaste stanice sačuvana tijekom evolucije sisavaca. Štoviše, evolucijsko očuvanje specifičnih vrsta mucina može se povezati s prilagodbama koje su nastale zbog različitih hranidbenih potreba i ekoloških uvjeta. Iako se očekivalo da će različiti histokemijski profili mucina biti povezani s određenim redovima sisavaca ili njihovom hranidbom, Schumacher i sur. (2004.) su pokazali da se ovi profili ne mogu jednoznačno pripisati ni redu ni hranidbi svakog sisavca. Ova zapažanja podržavaju i rezultati istraživanja Foremana (1971.), koji je otkrio da vrčaste stanice kod 27 vrsta šišmiša s različitim hranidbenim navikama proizvode isključivo neutralne mucine. Očuvanje ovih karakteristika tijekom evolucije sugerira da su određene vrste mucina, poput kiselih i neutralnih, bile korisne za širok raspon vrsta, uključujući i primitivne sisavce te gmazove (Madrid i sur., 1989.). U tom kontekstu, svojstva mucina kod dinarskog voluhara, koji proizvodi mješovite vrste mucina, predstavljaju specifičnu prilagodbu unutar evolucijskog okvira, a ne isključivo naslijeđenu karakteristiku od primitivnih predaka.

*Lamina propria* se i kod dinarskog voluhara sastoji od rahlog vezivnog tkiva, što je tipična karakteristika opažena kod sisavaca. Mišićni sloj u jejunumu dinarskog voluhara je tanak i sastoji se od glatkih mišića raspoređenih u unutrašnjem kružnom i vanjskom uzdužnom sloju. Mišićni sloj u duodenumu štakora, zamoraca i voluharica je sastavljen od jednog sloja glatkih mišićnih stanica (Schumacher i sur., 2004.). Podsluznica sadrži vezivno tkivo s krvnim i

limfnim žilama, ali nema vidljivih žlijezda. Vanjska opna, često je tanka i teško uočljiva, sastoji se od mezotelnih stanica.

**Slijepo crijevo** dinarskog voluhara ističe se kao dominantna struktura probavnog trakta, što je uobičajena pojava i kod drugih vrsta voluharica (Behmann, 1973.; Golley, 1960.). Terminalni dio slijepog crijeva dinarskog voluhara je čvrsto namotan kao i kod kod vrste *Microtus pennsylvanicus* (Golley, 1960.). Slijepo crijevo čini niz nabora koji služe povećanju površine organa. Tanko crijevo ulazi u slijepo crijevo pod pravim kutom i odvojeno je od tri različite kolonske petlje (*ansa coli paracoecalis*) kratkim vratom.

U slijepom crijevu dinarskog voluhara gotovo i da nema vrčastih stanica. Boonzaier i sur. (2012.) su u svom istraživanju uspoređivali strukturu slijepog crijeva s ostalim dijelovima probavnog sustava kod južnoafričkog bodljastog miša (*Acomys spinosissimus*) i primijetili konstantan pad u broju vrčastih stanica. Ovaj pad vjerojatno je povezan s prisutnošću mikroorganizama u slijepom crijevu. Također, može se nagađati da nedostatak služi kod nekih glodavaca omogućuje direktni kontakt probavljenog materijala (poput jednolančanih masnih kiselina) s mukoznom površinom za apsorpciju (Sharma i sur., 1995.). Međutim, potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila postoji li veza između učestalosti vrčastih stanica i apsorpcije.

Slijepo crijevo dinarskog voluhara, poput onoga kod drugih vrsta voluharica, predstavlja primjer visoko razvijenog oblika sa specijaliziranim unutarnjim razlikama (Perrin i Curtis, 1980.). Ove strukture vjerojatno su povezane s funkcionalnom specijalizacijom slijepog crijeva u procesu fermentacije povezanom s biljojednim navikama (Stevens i Hume, 1995.).

**Debelo crijevo** dinarskog voluhara čine slijepo crijevo, kolon i rektum. Proksimalni dio kolona složene je građe, a uključuje strukture poput ampula (proširenja), nabore i post-cekalnu spiralu (*ansa coli paracoecalis*). Post-cekalna spirala prvi je put opisana od strane Tullberg (1899.), a predstavlja anatomsku strukturu koja se formira između debelog crijeva, sastoji se od uzlaznog i silaznog dijela te je održavana mezenterijem s bogatom opskrbom krvlju. Post-cekalna spirala nedostaje kod porodice Muridae, ali je prisutna kod svih proučenih vrsta porodice Cricetidae (Tullberg, 1899.). Veličina spirale varira među različitim vrstama iz porodice Cricetidae; najviše je razvijena kod leminga (*Lagurus* sp.), dok je najmanje razvijena kod crvenoleđe voluharice (*Clethrionomys gapperi*) (Tullberg, 1899.). Ova struktura potencijalno je povezana

s hranidbenim navikama i prilagodbama na okoliš (Björnhag, 1994.; Hume 1994.). Razumijevanje anatomije i funkcije post-cekalne spirale kod porodice Cricetidae ključno je za shvaćanje njihovih hranidbenih navika i prilagodba na okoliš te može biti važno u kontekstu evolucijske biologije i ekologije glodavaca (Lange i Staalnd, 1970.).

Nabori u debelom crijevu prilagodba su biljojednoj hranidbi (Perrin i Curtis, 1980.). Prema Snipes i Kriete (1991.), nabori u debelom crijevu povećavaju površinu i stoga poboljšavaju kontakt crijevne stijenke s luminalnim sadržajem što može poboljšati učinkovitost apsorpcije natrija, kalija i vode (Lange i Staalnd, 1970.). Nadalje, njihova prisutnost kod nutrija (*Myocaster coypus*) pospješuje povećanje gustoće bakterija u mekanom fecesu, što je ključno za njihovu ulogu u koprofagiji, odnosno ponovnoj probavi vlastitog fecesa (Takahashi i Sakaguchi, 2000.). Prisutnost kolonskih nabora kod dinarskog voluhara, uz petljanje proksimalnog kolona (*ansa coli paracoecalis*) te veličinu slijepog i debelog crijeva, sugerira da je stražnje crijevo specijalizirano za proces fermentacije kao što je to slučaj i kod drugih biljojednih vrsta glodavaca te da dolazi do mehanizma kolonske separacije u kojem se bakterije i sitne čestice hrane putem mukozne zamke vraćaju u slijepo crijevo radi daljnje probave (Björnhag, 1987.; Björnhag i Snipes, 1999.) .

Debelo crijevo u dinarskih voluhara slično je slijepom crijevu i ima jednostavnu strukturu stijenke. Sluznica je sastavljena od jednoslojnog cilindričnog epitela bez mikrovila i bogata je vrčastim stanicama koje luče sluz koja se većim dijelom sastojala od kiselih i neutralnih mucina. Sluznica je visoka i nabrana. Podsluznica je gušća, s više kolagenih vlakana. Mišićni slojevi deblji su nego u tankom crijevu, dok je lumen širi.

Ukupan broj vrčastih stanica u crijevima povećava se od proksimalne do distalne regije crijeva, što je trend koji se podudara s onim viđenim kod miševa, štakora i zamoraca (Sakata i Engelhardt, 1981.) te Hottentotskih zlatnih krtica (*Amblysomus hottentotus*) (Boonzaier i sur., 2013b.). Porast broja stanica koje luče sluz sugerira snažan sloj sluzi u distalnoj regiji crijeva dinarskog voluhara, slično onome što se vidi u kolonskoj regiji štakora (Atuma i sur., 2001.). Pokazano je da debeli sloj sluzi u debelom crijevu sprječava izravan kontakt sluznice s luminalnim bakterijama, čime se sprječavaju upalne reakcije kao u slučaju oštećenja sloja sluzi (Swidsinski i sur., 2007.). Dominacija i porast miješanih vrčastih stanica koje luče sluz u ovom istraživanju slična je onoj viđenoj kod kukcojeda proučenih od strane Boonzaier i sur. (2013b.),

kao i kod 11 vrsta sisavaca proučenih od strane Sheahan i Jervis (1976.), što sugerira da je to trend uočen kod mnogih vrsta sisavaca, bez obzira na hranidbu ili taksonomsku pripadnost.

Perrin i Curtis (1980.) su otkrili da morfologija probavnog sustava glodavaca iz porodica Cricetidae ili Muridae nije direktno povezana s njihovim hranidbenim navikama. Slične zaključke donio je i Gorgas (1967.), koji je proveo usporedno istraživanje različitih vrsta glodavaca s ciljem povezivanja duljine probavnog trakta s hranidbenim navikama. Niti Perrin i Curtis (1980.) niti Gorgas (1967.) nisu mjerili relativne površine različitih dijelova probavnog trakta. Postoje različiti čimbenici koji mogu utjecati na preciznost mjerenja morfologije probavnog sustava, kao što su količina sadržaja u crijevima u trenutku smrti te promjene u tkivima zbog postupka fiksacije.

Ovo istraživanje je ukazalo na postojanje složenih i razvijenih morfološko - histoloških struktura probavnog trakta kod dinarskog voluhara. Probavni trakt ključan je dio probavnog sustava životinja, a morfološke i histološke karakteristike omogućuju vrstama provedbu specifičnih funkcija koje poboljšavaju njihovu prilagodljivost okolišu. Dinarski voluhar je kroz evoluciju razvio složen, bilokularni, hemiglandularni želudac i dobro razvijenu histološku strukturu probavnog trakta. Međutim, važno je napomenuti da sam se u ovom istraživanju ograničila na morfologiju i histologiju probavnog trakta. Prilagodba evolucije funkcije stanica, aktivnosti enzima i mikrobne zajednice u probavnom traktu predstavlja dodatan važan aspekt koji zahtijeva daljnje istraživanje.

Poznavanje probavnog sustava pridonosi održavanju, domestifikaciji i očuvanju divljih i ugroženih vrsta (Ewer, 1967.). Prvo, razumijevanje probavnog sustava omogućuje bolje razumijevanje hranidbenih potreba i navika životinja. To je ključno za pravilnu hranidbu u zatočeništvu ili za očuvanje njihovih prirodnih staništa. Na primjer, poznavanje specifičnih hranidbenih zahtjeva divljih vrsta može pomoći u razvoju planova upravljanja za očuvanje njihove populacije, osiguravajući adekvatnu hranidbu i staništa. Drugo, proučavanje morfometrije, morfologije i histoloških karakteristika probavnog trakta omogućuje bolje razumijevanje fiziologije i biologije vrste. Ovo znanje može poslužiti kao osnova za razvoj medicinskih tretmana ili terapija za vrste koje su ugrožene zbog bolesti ili drugih zdravstvenih problema povezanih s probavnim sustavom.

Osnovne informacije o morfometriji, morfologiji i histološkim karakteristikama probavog trakta dinarskog voluhara poslužiti će kao referentni podaci za daljnja istraživanja.

### 7.3. Brzina probave

Kao što je spomenuto ranije mali biljojedni sisavci razvili su specifične probavne strategije kako bi nadoknadili manju tjelesnu masu i zadovoljili energetske potrebe (Hume, 1994.). Cekotrofija, koju prakticira mnogo malih biljojeda, ima važnu nutritivnu ulogu pružajući izvor vitamina, aminokiselina i drugih hranjivih tvari koje se izlučuju u fecesu (Karasov i Martínez del Rio, 2007.). Cekotrofno ponašanje mora biti podržano mehanizmom separacije u kolonu (Björnhag, 1987.). Prosječno vrijeme zadržavanja probavnog sadržaja (eng. *mean retention time, MRT*) smatra se ključnim parametrom u probavnoj fiziologiji (Clauss i sur., 2007a.; Stevens i Hume, 1998.), osobito kod biljojeda, gdje se aloenzimatska probava biljnih vlakana odvija sporije (Stevens i Hume, 1998.). MRT se obično procjenjuje davanjem markera i mjerenjem njihove pojave na određenoj točki duž probavnog sustava, a važno je odabrati marker koji reprezentira cijeli probavni sadržaj ili relevantnu frakciju istog (Warner, 1981.).

Istraživanje brzine probave bilo je podijeljeno na dva dijela. U prvom dijelu koristila sam fizikalni marker (plastična trakica) kako bi odredila osnovnu brzinu probave kod dinarskog voluhara, te analizirala razlike u brzini probave među spolovima i sezonama, uzimajući u obzir tip hranidbe. Rezultati prvog dijela su mi pomogli postaviti okvire drugog dijela istraživanja u kojem sam koristila kemijske markere (Co-EDTA i Cr-mordantizirana vlakna). Osnovni cilj drugog dijela istraživanja bio je odrediti brzinu prolaska tekuće (Co) i krute (Cr) frakcije kroz probavni sustav, istražiti primjenjuju li dinarski voluhari mehanizam kolonske separacije (Franz i sur., 2011.), te utvrditi podudara li se ta strategija s onom koju koriste drugi mali biljojedni sisavci (Foley i Cork, 1992.).

U prvom dijelu eksperimenta, svi voluhari su izbacili fizikalne markere unutar 24 h nakon konzumacije označene hrane, pri čemu su prvi markeri primijećeni u fecesu već tijekom prvih 4 h. Nisu uočene značajne razlike u brzini probave ovisno o sezoni, tipu hranidbe ili spolu životinja. Preliminarno istraživanje pokazalo je da su upotrijebljene plastične trakice sigurne za probavni sustav dinarskog voluhara i nisu izazvale nikakve zdravstvene probleme. Trakice su se pokazale kao suptilni indikatori, budući da životinje nisu pokazivale znakove otkrivanja markera tijekom konzumacije niti su reagirale na njihovu prisutnost. Svi markeri koji su konzumirani s hranom kasnije su pronađeni u fecesu unutar 24 h, osim u jednom slučaju, a nije

zabilježen niti jedan slučaj izrazito brzog ili sporog prolaska kroz probavni trakt, što dodatno potvrđuje da ovaj tip fizikalnog markera predstavlja neinvazivnu metodu za jednostavnu procjenu brzine probave.

Rezultati prvog dijela istraživanja potvrdili su efikasnost fizikalnih markera, ali i tvrdnju da njihova primjena može biti ograničena kod životinja sa složenijom probavom, pružajući samo djelomičan uvid u brzinu probave (Hume, 1994.). Udén i sur. (1980.) također ističu važnost kemijskih metoda u određivanju brzine probave, budući da fizikalni markeri ne mogu opstati u tekućoj frakciji hrane, koja se zadržava u slijepom crijevu, već nastavlja put kroz probavni sustav zajedno s ostatkom krute frakcije probave te, u slučaju dinarskog voluhara, brzo napušta probavni sustav, vjerojatno kako bi se omogućio daljnji unos hrane (Hume, 1994.). S obzirom na nedostatak značajnih varijacija u brzini probave među spolovima i sezonama u prvom dijelu istraživanja, drugi dio nije bio usmjeren na te varijable.

U dijelu istraživanja u kojem sam koristila kemijske markere, srednje retencijsko vrijeme za krutu frakciju iznosilo je otprilike 11 h, dok je tekuća frakcija imala nešto dulje srednje retencijsko vrijeme, zadržavajući se unutar probavnog sustava i nakon 12 h. Kemijski markeri iz probavnog sustava dinarskog voluhara počeli su se izlučivati između 0 i 4 h nakon konzumiranja označene hrane. Kašnjenja u izlučivanju kobalta (tekuća frakcija) (+ 1,09 h) nisu bila toliko izražena, ali su bila jasno razlučiva od izlučivanja kroma (kruta frakcija). Razine Co (tekuća frakcija) i Cr (kruta frakcija) vratile su se na početnu vrijednost između 40 i 44 h odnosno 44 i 48 h nakon unosa. Omjer diferencijalnog zadržavanja tekuće naspram krute frakcije kod dinarskog voluhara iznosi između 0,9 i 1,3 (prosjek 1,1). Nisu uočeni sekundarni pikovi koji bi ukazivali na ponovno unošenje fecesa (cekotrofa).

Rezultati ovog istraživanja pružaju važan uvid u probavnu fiziologiju dinarskog voluhara. Prvo, istraživanje je pokazalo da dinarski voluhari imaju sličan obrazac prolaska hrane kroz probavni sustav kao i drugi pripadnici potporodice Arvicolinae, što ukazuje da dijele slične prilagodbe probave (Hagen i sur., 2018.; Hume i sur., 1993.; Lee i Houston, 1993b.; Pei i sur., 2001a.). Drugo, rezultati ukazuju na selektivno zadržavanje tekuće frakcije hrane u probavnom sustavu kod dinarskog voluhara, što se očituje kroz zadržavanje tekuće frakcije u odnosu na krutu frakciju. Ovaj obrazac je u skladu s nalazima drugih istraživanja (Chilcott i Hume, 1985.; Cork i sur., 1999.; Cork i Warner, 1983.; Foley i Hume, 1987.; Hume i sur., 1993.; Krockenberger, 1993.; Sakaguchi i sur., 1987.; Sakaguchi i sur., 1992a.; Sakaguchi i sur., 1992b.; Sakaguchi i

Nabata, 1992.; Sakaguchi i Ohmura, 1992.), koja su također zabilježila selektivno zadržavanje tekuće frakcije u odnosu na krutu frakciju kod srodnih vrsta. Zanimljivo je napomenuti da je ovo opći trend, jer su neke jedinice pokazale suprotan obrazac – tekuća frakcija se izlučivala brže od krute. Nadalje, omjer diferencijalnog zadržavanja tekuće frakcije naspram krute frakcije podupire hipotezu da dinarski voluhari prakticiraju mehanizam kolonske separacije poznat kao mukozna zamka (Hume i sur., 1993.; Sakaguchi i sur., 1992a.; Sakaguchi i Nabata, 1992.; Sakaguchi i Ohmura, 1992.), što se smatra prilagodbom biljnoj hranidbi (Björnhag, 1994.). Dinarski voluhar pripada porodici specijaliziranoj za hranidbu zelenim biljkama i smatra se isključivim biljojedom (Antolović i sur., 2006.). Stoga, ovi nalazi naglašavaju važnost specifičnih prilagodbi u probavnom traktu ove vrste, omogućujući im učinkovito iskorištavanje hranjivih tvari iz biljne hrane.

Rezultati istraživanja na drugim vrstama temeljenih na istim ili sličnim markerima tekućih i krutih frakcija, kao i onih korištenih u ovom istraživanju sažeti su u Prilogu 13. Prema prethodnim istraživanjima, mehanizam kolonske separacije (eng. *colonic separation mechanism, CSM*) odgovoran je za selektivno zadržavanje probavljene hrane u slijepom crijevu voluhara i leminga (Hagen i sur., 2018.). Ovaj proces odvija se u proksimalnom dijelu debelog crijeva (Sperber i sur., 1983.), gdje se formira dvostruka spirala i "mukozna zamka" (Vorontsov, 1979.), usmjeravajući protok bakterija natrag prema slijepom crijevu (Björnhag, 1987.; Sperber i sur., 1983.). Sličan mehanizam primijećen je i kod drugih glodavaca (Hume i sur., 1993.; Sakaguchi i sur., 1992a.; Sakaguchi i Nabata, 1992.; Sakaguchi i Ohmura, 1992.). Drugi tip CSM-a (Björnhag, 1972.; Pickard i Stevens, 1972.), nazvan "ponovno ispiranje" (Cork i sur., 1999.), opisuje se kao proces u kojem vodena struja nosi tekuću frakciju hrane i bakterije do slijepog crijeva, podržana antiperistaltičkim pokretima i promjenama u sekreciji i apsorpciji vode (Björnhag, 1981.). Ovaj tip CSM-a prisutan je kod dvojezubaca i nekih vrsta listojednih tobolčara (Björnhag, 1987.; Hume, 1999b.). Ovi različiti tipovi CSM-a odražavaju se u obrascima pojave fecesa nakon primjene inertnih markera koji su specifični za neapsorbirane tekuće ili krute frakcije hrane. Postoji izraženija selektivna retencija markera tekuće frakcije u tipu CSM "ponovnog ispiranja" nego u tipu CSM "mukozne zamke" (Cork i sur., 1999.; Björnhag, 1972.; Björnhag, 1981.; Pickard i Stevens, 1972.).

Dinarski voluhar pokazuje slične brzine probave za tekuću i krutu frakciju, s kašnjenjima u izlučivanju tekuće frakcije (+1,09 h), što ukazuje na sklonost zadržavanju bakterija radi

poboljšanja probavne učinkovitosti. Prosječna vremena zadržavanja kod dinarskog voluhara bila su nešto kraća nego u Townsendove voluharice (*Microtus townsendii*), odnosno gotovo dvostruko duža nego u Brandtove voluharice (*Microtus brandtii*) (Hume i sur., 1993.). Ove razlike mogu se pripisati razlici u tjelesnoj masi između vrsta; Brandtova voluharica (40 – 46 g) i Townsendova voluharica (55 g) imaju manju tjelesnu masu u usporedbi s dinarskim voluharom (70 – 90 g), što rezultira manjim kapacitetom crijeva kod manjih vrsta. Osim toga, hranidba s niskim udjelom vlakana kod Brandtove voluharice smanjuje unos hrane uz održavanje stabilnog unosa probavljive energije, što može rezultirati kraćim vremenom zadržavanja. Ograničeni porast volumena crijeva na hranidbi s visokim udjelom vlakana također može dodatno smanjiti prosječno vrijeme zadržavanja (Lou i sur., 2015.). Sva tri čimbenika (veći unos hrane, manji volumen crijeva i ograničeni porast volumena crijeva na hranidbi s visokim udjelom vlakana) trebaju se uzeti u obzir pri objašnjavanju razlika u vremenima zadržavanja između Brandtove voluharice, Townsendove voluharice i dinarskog voluhara (Hume i sur., 1993.). Nadalje, na vrijeme zadržavanja probavnog sadržaja utječu i mnoga druga svojstva pojedene hrane, poput specifične mase čestica, njihove veličine i količine (Cork, 1994.; Conklin-Brittain i Dierenfeld, 1996.; Wenninger i Shipley, 2000.).

Omjer MRT (srednje rezidentno vrijeme) tekuće i krute frakcije pokazuje koliko dugo različite vrste hrane (tekuća i kruta) ostaju u probavnom sustavu prije nego što se apsorbiraju ili eliminiraju. Viši omjer znači da tekuća hrana ostaje dulje u probavnom traktu u odnosu na krutu hranu, dok niži omjer znači da se tekuća i kruta hrana probavljaju sličnom brzinom. Vrste s mehanizmom ponovnog ispiranja pokazuju veće razlike između MRT tekuće i krute frakcije, dok vrste s mehanizmom mukozne zamke imaju sličniji MRT za obje frakcije. Za mehanizam ponovnog ispiranja, omjer prosječnog vremena zadržavanja tekuće i krute frakcije kreće se od 1,3 do 4,8. Nasuprot tome, za mehanizam mukozne zamke, prijavljeni omjeri su najviše 1,2 za štakore i zamorce (Stevens i Hume, 1995.). Najkraće vrijeme zadržavanja krute frakcije u odnosu na tekuću frakciju sugerira efikasniju probavu krute hrane u usporedbi s tekućom. Dinarski voluhar ima prosječni omjer MRT tekuće i krute frakcije od 1,1, što ukazuje na slične brzine probave za obje vrste hrane. Ovakav nizak omjer, blizu 1, sugerira prilagodbu homogenoj hranidbi. Vrste s višim omjerima imaju različite brzine probave, što može ukazivati na specijalizirane probavne strategije za različite tipove hrane. Najkraće vrijeme zadržavanja krute u odnosu na tekuću frakciju zabilježeno je kod vrsta *Cavia porcellus*, *Dolichotis patagonum*, *Myocastor coypus*, *Phyllotis darwini* (Hume i sur., 1993.; Sakaguchi i sur., 1992a.; Sakaguchi i sur., 1992b.; Sakaguchi i Nabata, 1992.; Sakaguchi i Ohmura, 1992.). Literatura o



probavnoj fiziologiji kod malih biljojeda razmatra ova dva tipa CSM-a kao podjelu (Björnhag i Snipes, 1999.; Franz i sur., 2011.; Hume i Sakaguchi, 1991.; Pei i sur., 2001a.), međutim Hagen i sur. (2018.) predlažu da se glodavci ne bi automatski trebali svrstavati u jedan od dva krajnja tipa CSM-a. Umjesto toga, trebalo bi promatrati kontinuum između tih krajnjih tipova, gdje bi glodavci iz potporodice Arvicolinae zauzimali različite pozicije unutar tog spektra.

Selektivno zadržavanje tekuće frakcije, sitnih čestica hrane i bakterija kod fermentatora stražnjeg crijeva često je povezano s cekotrofijom (Björnhag i Sjöblom, 1977.; Cranford i Johnson, 1989.; Kenagy i Hoyt, 1979.; Lee i Houston, 1993a.; Ouellette i Heisinger, 1980.). Sekundarni pikovi izlučivanja markera dokumentirani su u različitim istraživanjima mjerenja brzine probave kod dvojezubaca i glodavaca te se obično tumače kao posljedica cekotrofnog ponašanja, što rezultira ponovnim uzimanjem prolaznih markera (Clauss i sur., 2007a.; Franz i sur., 2011.; Hagen i sur., 2015.; Hagen i sur., 2016.; Lee i Houston, 1993a.; Pei i sur., 2001a.) (Prilog 14.). Za sam proces cekotrofije poznato je da varira ovisno o hranidbi (Carabaño i sur., 1988.; García i sur., 1995.; Guerra Aldrigui i sur., 2018a.; Fekete i Bokori, 1985.; Nogueira-Filho i sur., 2013.) i rasporedu hranjenja (Guerra Aldrigui i sur., 2018b.). Kod dinarskih voluhara nisam uočila sekundarne pikove u krivuljama izlučivanja mrakera i samim time nisam pronašla dokaze da prakticiraju cekotrofiju.

Jedan od potencijalnih problema u procjeni cekotrofnog ponašanja, posebno kod vrlo malih vrsta koje konzumiraju feces tijekom cijelog dana, jest to što takvo ponašanje može izravnati krivulju izlučivanja, što otežava identifikaciju sekundarnih ili kasnijih pikova markera (Hagen i sur., 2018.). Međutim, čak i kod vrsta s vrlo visokom dnevnom učestalošću cekotrofije, poput voluharica (Hirakawa, 2001.), pikovi markera mogu biti identificirani na grafovima izlučivanja markera (Hume i sur., 1993.; Pei i sur., 2001a.). Osim toga, iznimno duga prosječna vremena zadržavanja kod malih sisavaca zbog stalnog recikliranja markera putem ponovljenog konzumiranja fecesa mogu ukazivati na cekotrofiju.

Učestalost i pojava cekotrofije mogu razlikovati ovisno o hranidbi (Hagen i sur., 2018.). Na primjer, kod dvojezubaca, manje je vjerojatno da će uzimati cekotrofe na hranidbi bogatoj bjelančevinama, dok će na vlaknastoj niskokaloričnoj hranidbi njihova konzumacija biti maksimalna (Carabaño i sur., 1988.; Fekete i Bokori, 1985.). Sukladno tome, zabilježeno je povećanje cekotrofije s povećanjem sadržaja dijetalnih vlakana kod barem jedne divlje vrste glodavaca (npr. *Arvicola terrestris*) (Woodall, 1989.). Testiranje je li cekotrofija dio probavne

strategije vrste najprikladnije je provesti na hranidbi s niskim udjelom bjelančevina i visokim udjelom vlakana (Hagen i sur., 2018.).

Kombinacija velikog slijepog crijeva s vrećastim proširenjima, selektivnog zadržavanja probavnog sadržaja i cekotrofije omogućuje pripadnicima potporodice Arvicolinae učinkovito iskorištavanje hrane s visokim udjelom vlakana, unatoč njihovoj maloj tjelesnoj veličini (Batzli i Cole, 1979.). Njihova prilagodba staništima travnjaka, uz sposobnost održavanja ili povećanja unosa suhe tvari kako bi se nadoknadila niža probavljivost vlaknaste hrane, dodatno potvrđuje specifične karakteristike njihove probavne fiziologije (Cranford i Johnson, 1989.; Batzli, 1985.).

Kako bi se poboljšala preciznost istraživanja točnih vremena zadržavanja probavnog sadržaja kod dinarskog voluhara potrebno je provesti dodatne pokuse koji bi uključivali varijacije u tipovima hranidbe. Također, trebalo bi dodatno istražiti moguće razlike tijekom sezone parenja i podizanja mladih, s obzirom na to da tada mogu postojati razlike u kvaliteti hranidbe između spolova. Provođenje dodatnih analiza kako bi se provjerila moguća kontaminacija markera i ponovljene analize uzoraka mogu povećati pouzdanost interpretacije rezultata. U slučaju pojave sekundarnih pikova u krivuljama s većim vremenskim odmakom od primjene markera, korisno bi bilo primijeniti češći i radno intenzivniji režim uzorkovanja fecesa. Obrasci izlučivanja markera uvijek bi trebali biti razmatrani u kontekstu drugih morfoloških i fizioloških podataka (Matsuda i sur., 2015.).

Istraživanje fiziologije probave kod životinja koje žive u zatočeništvu često se suočava s izazovima. Hranidba u zatočeništvu se nerijetko razlikuje od hranidbe u prirodi (Conklin-Brittain i Dierenfeld, 1996.). Naime, hrana kojom se životinje hrane u zatočeništvu često je visoko probavljiva i s niskim udjelom vlakana, što može rezultirati smanjenom frekvencijom defekacije. Jedno od ograničenja istraživanja je i frekvencija uzorkovanja fecesa, koja može ovisiti o rutinama timaritelja. Kada se mjeri vrijeme zadržavanja, važno je razmotriti u kojoj će mjeri frekvencija uzorkovanja utjecati na rezultate (Hagen i sur., 2018.).

U sažetku ovog poglavlja, kod dinarskog voluhara brzina prolaska probavnih sadržaja pokazala je duže zadržavanje tekuće frakcije u usporedbi s krutom frakcijom, bez razlika između spolova i sezona. Brzina prolaska probavnih sadržaja upućuje na prisutnost mehanizma kolonske

separacije u obliku mukozne zamke. Dokazi da dinarski voluhar prakticira cektrofiju nisu pronađeni, međutim postoji velika vjerojatnost da je ona prisutna.

#### 7.4. Probavljivost

Cilj ovog dijela istraživanja bio je analizirati učinkovitost probave kod dinarskih voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) i utvrditi postoje li razlike u koeficijentima probavljivosti između mužjaka i ženki u uvjetima ljetnog hranidbenog režima. Rezultati su pokazali visoke koeficijente probavljivosti ključnih hranjivih tvari, što ukazuje na njihovu visoku iskoristivost. Konkretno, prosječni koeficijenti probavljivosti mokre (svježe) tvari i suhe tvari iznosili su 88,68% i 92,19% za mužjake te 86,87% i 89,81% za ženke. Ovi rezultati ukazuju na visoku iskoristivost hrane, što može biti ključna prilagodba na specifične hranidbene resurse dostupne tijekom ljetnih mjeseci. Visoki koeficijenti probavljivosti bjelančevina, masti i vlakana kod mužjaka (91,95%, 82,24% i 90,63%) i ženki (85,05%, 67,13% i 81,66%) ukazuju na razlike između spolova. Ove razlike mogu biti rezultat različitih metaboličkih potreba ili fizioloških razlika, što zahtijeva daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razumjeli ovi procesi.

Kako bi se odgovorilo na pitanje postavljeno u uvodu – koji se dio hranjivih tvari unesenih hranom asimilira, a koji dio se izlučuje u obliku fecesa – provedeni su hranidbeni eksperimenti probavljivosti, pri čemu su dinarski voluhari hranjeni svježom travom i livadnim biljem. Vrijednosti probavljivosti utvrđene kod dinarskog voluhara spadaju među najviše zabilježene za biljojede na različitim kvalitetama hranidbe. Nadalje, sličnost u procijenjenoj probavljivosti suhe tvari i vlakana ukazuje na visoku sposobnost dinarskog voluhara za probavu vlakana te na njegovu učinkovitost u iskorištavanju hranjivih tvari iz hranidbe.

Rezultati istraživanja na drugim vrstama, uključujući njihovu masu, podatke o unosu hrane i probavljivosti, kao i podaci iz ovog istraživanja, sažeti su u Prilogu 15. Prosječni dnevni unos suhe tvari za dinarskog voluhara iznosi 56,61 g/dan, što je znatno više u usporedbi s drugim vrstama glodavaca, poput livadne voluharice (*Microtus agrestis*) (9,8 g/dan) i stepskog leminga (*Lagurus lagurus*) (6,6 g/dan) (Hagen i sur., 2018.). Kada se ovaj unos izrazi kao udio tjelesne mase, dinarski voluhar unosi 76,86% svoje tjelesne mase u suhoj tvari dnevno, dok livadna voluharica unosi 34,27%, a stepski leming 33,33%. Ova razlika može biti povezana s različitim metaboličkim potrebama i ekološkim nišama koje zauzimaju ove vrste (Müller i sur., 2013.). Također, moguće je da dinarski voluhar ima veći kapacitet za obradu hrane zbog svoje veće tjelesne mase.

Iznimno visoka probavljivost organske tvari (88,22%) i suhe tvari (91,59%) kod dinarskog voluhara usporediva je s onom kod poljske voluharice (*Microtus arvalis*), koja postiže 93,54% i 94,02% u istim kategorijama (Drózdž, 1968.). Poljska voluharica pokazuje visoku probavljivost sirovih bjelančevina (91,34%) (Drózdž, 1968.), što je također usporedivo sa vrijednostima kod dinarskog voluhara (91,30%). Nasuprot tome, poljski miš (*Apodemus agrarius*) ima niže razine probavljivosti za bjelančevine (74,51%) i masti (83,55%) u odnosu na poljsku voluharicu, što naglašava razlike u efikasnosti iskorištavanja hranjivih tvari (Drózdž, 1968.). Visoka probavljivost sirovih vlakana kod dinarskog voluhara (89,95%) ukazuje na njegovu sposobnost da učinkovito probavlja biljnu hranu bogatu vlaknima. Ova vrijednost je slična onoj zabilježenoj kod poljske voluharice, koja ima probavljivost sirovih vlakana od 87,82% (Drózdž, 1968.). Sposobnost učinkovite probave vlakana može biti od ključne važnosti za preživljavanje u ekološkim nišama u kojima prevladava hrana bogata vlaknima, te predstavlja karakteristiku koja jasno razlikuje prave biljojede od drugih životinja koje tu sposobnost možda nemaju (Veloso i Bozinovic, 1993.).

Probavljivost hrane uglavnom ovisi o njezinom kemijskom sastavu (Grodziński, 1985.). Kod glodavaca, probavljivost suhe tvari u hranidbi bogatoj hranjivim tvarima može biti vrlo visoka, čak oko 89,07% (Drózdž, 1968.), što je slično vrijednosti od 91,48% zabilježenoj kod dinarskih voluhara. Niska probavljivost hrane može biti povezana je s tri čimbenika: visokim sadržajem vlakana, visokom brzinom prolaska hrane kroz probavni trakt, i smanjenjem učinkovitosti probave pri konzumaciji prekomjernih količina hrane (Veloso i Bozinovic, 1993.). Sadržaj vlakana značajno utječe na snižavanje koeficijenta probavljivosti. Nehring (1965.) tvrdi da povećanje vlakana u hrani za 1% rezultira smanjenjem probavljivosti za 0,6 jedinica kod preživača i za 2 jedinice kod glodavaca. Vlakna predstavljaju frakciju hrane koja sadrži teško probavljive ili neprobavljive komponente poput celuloze, pentozana, kutina, lignina, često inkrustiranih mineralnim solima. Takva vlakna čine balast hrane koji, kada se daje u višku, može uzrokovati snižavanje probavljivosti svih hranidbenih komponenata. Međutim, veće fluktuacije u probavljivosti primijećene su kada su životinje hranjene hranom s visokim sadržajem vlakana (Vorontsov, 1967.). Niska probavljivost hrane može biti uzrokovana visokim sadržajem vlakana u odnosu na bjelančevine, što ponekad dovodi do smanjenja probavljivosti (Nehring, 1965.). Nije zabilježen učinak sadržaja masti na probavljivost (Van Soest, 1964.).

Kada se glodavci hrane voluminoznom hranom dolazi do vrlo brzog prolaska sadržaja hrane kroz probavni trakt. Kod biljojeda, takva hrana često sadrži velike količine vlakana, poput trave i sijena, što rezultira niskom gustoćom hranjivih tvari po jediničnoj masi (Codron i sur., 2007.). Prema Myrcha (1964.), poljske voluharice (*Microtus arvalis*) hranjene zelenom biljnom hranom (pšenica) mogu izlučiti hranu već nakon jednog sata. Očito je da tako kratko vrijeme nije dovoljno za temeljitu probavu. Poljska voluharica (*Microtus arvalis*) i šumske voluharice (*Clethrionomys glareolus*) hranjene zelenom biljnom hranom konzumirale su u prosjeku 25 g svježe mase, što predstavlja 114,68% tjelesne mase za poljsku voluharicu i 111,61% tjelesne mase za šumsku voluharicu (Drózd, 1968.). Ovakav unos hrane može preopteretiti probavni trakt i smanjiti probavljivost (Davis i Golley, 1963.). Manje količine hrane zadržavaju se dulje u probavnom traktu te se stoga bolje iskorištavaju (Myrcha, 1964.). Iako neki mali sisavci mogu povećati učestalost hranjenja kada se kvaliteta hranidbe i probavljivost smanje, možda neće biti u stanju dovoljno brzo obraditi potrebnu količinu hrane kako bi održali svoju energetske bilancu i minimizirali vrijeme hranjenja. Dinarski voluhar, koji u prosjeku konzumira 91,42 g svježe mase, što predstavlja 124,11% njegove tjelesne mase, suočava se s izazovom brzog prolaska voluminozne hrane kroz probavni trakt, što može dodatno smanjiti probavljivost. Stoga, minimalna probavljivost može biti ograničavajući čimbenik u odabiru hranidbe. Slična situacija uočena je kod smeđih leminga (*Lemmus lemmus*) koji se hrane mahovinom (Barkley i sur., 1980.; Batzli i Cole, 1979.). Mahovina predstavlja značajnu i često konzumiranu stavku u hranidbi ovih glodavaca, iako je nisu u stanju probaviti te ne mogu preživjeti na isključivoj hranidbi mahovinom u eksperimentalnim uvjetima.

Naši rezultati pokazuju da dinarski voluhari imaju nekoliko mehanizama koji im omogućuju postizanje visokih koeficijenata probavljivosti. Prvo, dinarski voluhari imaju relativno veliko slijepo crijevo i mehanizam za odvajanje u debelom crijevu, što im omogućuje da zadovolje značajan udio osnovnih energetskih potreba. Istraživanjem u sklopu ove doktorske teme otkriveno je da dinarski voluhari zadržavaju čestice hrane unutar svog probavnog trakta, omogućujući više vremena za mikrobnu i mehaničku razgradnju biljnih vlakana. Drugo, temeljito žvakanje hrane također može doprinijeti njihovoj sposobnosti probavljanja vlakana. Male životinje mogu sažvakati hranu u sitne čestice, čime maksimalno izlažu vlakna fermentaciji (Conklin i Dierenfeld, 1994.).

Teorija optimalnog hranjenja predviđa da će životinje, kada se suoče s obilnom ponudom različitih tipova hrane koje variraju u nutritivnoj vrijednosti, odabrati samo one vrste hrane s

višom nutritivnom vrijednošću i zanemariti ostale, čak i ako su vrlo obilne (Krebs, 1978.; Pyke i sur., 1977.). Suprotno tome, kako najbolji tipovi hrane postaju oskudni, u hranidbu se uključuje sve više tipova hrane niže kvalitete. Poljske voluharice (*Microtus pennsylvanicus*) mogu opstati na hranidbi koja se u njihovom prirodnom staništu sastoji prvenstveno od trava i drugih biljaka (Hamilton, 1940.; Thompson, 1965.). Međutim, oni će birati manje vlaknaste mahunarke umjesto travnih vrsta (Thompson, 1965.) i manje vlaknaste dijelove biljnih listova i cvjetova umjesto grubljih stabljika (Hamilton, 1940.). Mahunarke mogu sadržavati samo 40% staničnih stijenki u suhoj tvari, dok travne vrste kao što je *Bromus* sp. može sadržavati čak 70% staničnih stijenki u suhoj tvari (Van Soest, 1964.). Mahunarke sadrže mali udio staničnih stijenki u suhoj tvari, koje su visoko lignificirane i sadrže malo hemiceluloze, dok trave sadrže veliki udio suhe tvari u obliku staničnih stijenki, od kojih lignin čini manji dio, a hemiceluloza veći dio. S obzirom na teoriju optimalnog hranjenja, može se pretpostaviti da dinarski voluhar također preferira hranu s nižim udjelom vlakana, odabirući one hranidbene izvore koji osiguravaju visoku nutritivnu vrijednost i lako probavljive komponente. Ovo bi omogućilo dinarskom voluharu da optimizira probavljivost i učinkovitije zadovolji svoje energetske potrebe u okolišima gdje su resursi ograničeni ili variraju po kvaliteti.

Rezultati prethodnih istraživanja pokazale su da probavljivost hrane može varirati ovisno o sezoni i dostupnosti hranjivih tvari. Probavni sustav životinja može se prilagoditi različitim hranidbenim režimima kako bi se maksimizirala apsorpcija hranjivih tvari (Gross i sur., 1985.; Hammond i Wunder, 1991.; Lee i Houston, 1993b.; Woodall, 1989.). Među glodavcima postoji mnogo primjera sezonskih razlika u hranidbi, npr. šumski glodavci poput šumske voluharice (*Clethrionomys glareolus*) i žutogrlog šumskog miša (*Apodemus flavicollis*) u jesen i zimu hrane se plodovima i sjemenkama drveća, poput žireva i oraha, dok tijekom proljeća i ljeta konzumiraju mješovitu hranu (Drózdž, 1966.). Hranidba poljskih glodavaca poput poljske voluharice (*Microtus arvalis*) i poljskog miša (*Apodemus agrarius*) također je koncentriranija tijekom jeseni i zime (Holišova, 1967.). Ako ove literaturne navode uzmemo u obzir, moguće je da i dinarski voluhar prilagođava svoju hranidbu ovisno o sezoni i dostupnosti hranjivih tvari. Ove prilagodbe mogu uključivati promjene u izboru hrane, pri čemu bi voluhari tijekom proljetnih i ljetnih mjeseci mogli preferirati hranu bogatu hranjivim tvarima, dok bi tijekom jeseni i zime mogli konzumirati hranu s većim udjelom vlakana i nižom energetsom vrijednošću. Takve sezonske prilagodbe mogle bi biti ključne za optimizaciju probavljivosti i preživljavanje dinarskog voluhara u njegovom prirodnom staništu.

Razlike u probavljivosti između mužjaka i ženki dinarskog voluhara vjerojatno su rezultat složenih interakcija fizioloških, hormonalnih, genetskih i ekoloških čimbenika. Mužjaci često imaju veće energetske potrebe zbog većeg tijela ili veće razine aktivnosti, dok ženke mogu imati povećane potrebe tijekom gestacije ili laktacije (Gaillard i sur., 2020.). Hormonalne promjene povezane s reprodukcijom mogu dodatno modulirati probavu i apsorpciju hranjivih tvari, utječući na enzimsku aktivnost i crijevnu mikrofloru (Cox i Calsbeek, 2015.). Razlike u veličini ili strukturi probavnih organa mogu utjecati na brzinu i učinkovitost probave (Karasov i Hume, 1997.). Mužjaci i ženke mogu preferirati različite vrste hrane, što može dovesti do varijacija u probavljivosti; ženke mogu odabrati hranu bogatiju određenim hranjivim tvarima potrebnim za reprodukciju (Clutton-Brock i Vincent, 1991.). Također, genetske razlike između spolova mogu dovesti do različite ekspresije gena uključenih u probavu i metabolizam, što može doprinijeti razlikama u probavljivosti (Ellegren i Parsch, 2007.; Mank i Ellegren, 2009.).

Za buduća istraživanja preporučuje se proširiti uzorak na veći broj jedinki i uključiti oba hranidbena režima (ljetni i zimski) što bi omogućilo dobivanje cjelovite slike probavljivosti kroz cijelu godinu. Posebnu pažnju trebalo bi posvetiti sezonskim razlikama u hranidbi u prirodi, jer promjene u dostupnosti i kvaliteti hrane mogu značajno utjecati na probavni sustav i fiziologiju probave dinarskih voluhara. Također, bilo bi korisno istražiti genetske i fiziološke razlike među jedinkama koje bi mogle utjecati na probavljivost hrane. Dodatna istraživanja mogla bi se usmjeriti na ulogu crijevne mikroflore i njezin utjecaj na probavljivost, što bi pružilo dodatne uvide u optimizaciju hranidbe dinarskih voluhara u različitim sezonskim uvjetima, kao i u zatočeništvu.

Ovo istraživanje pruža vrijedne uvide u probavljivost hrane kod dinarskih voluhara te identificira ključne čimbenike koji utječu na učinkovitost probave. Dobiveni rezultati pokazuju da dinarski voluhari unose velike količine preferirane hrane i imaju vrlo visoke vrijednosti probavljivosti, svrstavajući ih među najučinkovitije vrste u smislu probave. Također, postoje razlike u probavljivosti ovisno o spolu, pri čemu mužjaci probavljaju učinkovitije.

## 8. ZAKLJUČAK

Na temelju istraživanja fiziologije probave dinarskih voluhara u zatočeništvu mogu se donijeti slijedeći zaključci:

1. Dinarski voluhar pokazuje relativno visok omjer sile ugriza u odnosu na tjelesnu masu, što ukazuje na prilagodbe za učinkovito žvakanje i obradu tvrdih i vlaknastih dijelova biljaka, poput grančica, korijenja i lišća, koji čine značajan dio njihove hranidbe u prirodi. Ova karakteristika je usporediva s vrstama koje imaju fosorijalni način života, iako dinarski voluhar nije strogo podzemna vrsta.
2. Ženke dinarskog voluhara pokazuju veći omjer sile ugriza u odnosu na tjelesnu masu u usporedbi s mužjacima. Ova razlika može ukazivati na specifične prilagodbe povezane s hranidbenim navikama ili zaštitom potomstva. Međutim, potrebno je uzeti u obzir da je ovaj rezultat možda artefakt zbog ograničenog uzorka ženki u istraživanju.
3. Dinarski voluhar ima relativno veći udio *m. massetera pars profundus*, što upućuje na prilagodbu za intenzivnije žvakanje tvrdog i vlaknastog biljnog materijala, dok veći udio *m. temporalis* ukazuje na sposobnost generiranja snažnog ugriza sjekutićima. Ovakav raspored žvačne muskulature sugerira prilagodbu na hranidbu koja uključuje tvrde dijelove biljaka, poput grančica, korijenja i lišća bogatog vlaknima.
4. Dinarski voluhar posjeduje složeno strukturiran probavni trakt prilagođen biljnoj hranidbi bogatoj vlaknima. Ovaj sustav uključuje bilokularni hemiglandularni želudac, dobro razvijeno slijepo crijevo i prostrano debelo crijevo, što omogućava učinkovitu probavu i apsorpciju hranjivih tvari iz biljne materije.
5. Probavni trakt dinarskog voluhara pokazuje specifične histološke prilagodbe, uključujući keratinizirani epitel jednjaka i složenu strukturu želuca koja se sastoji od žljezdanog i mišićnog dijela. Ove prilagodbe pomažu u zaštiti probavnog trakta od abrazivne biljne hrane i optimiziraju probavne procese.
6. Struktura probavnog sustava, uključujući duljinu tankog i debelog crijeva te veličinu slijepog crijeva, ukazuje na evolucijske prilagodbe koje omogućuju učinkovitu fermentaciju biljne hrane bogate vlaknima. Ove prilagodbe su ključne za preživljavanje u surovim krškim staništima gdje su dostupni resursi često ograničeni.
7. Brzina prolaska probavnih sadržaja kod dinarskog voluhara pokazuje nešto duže zadržavanje tekuće frakcije u odnosu na krutu, što, upravo zbog male razlike, ukazuje na prisutnost mehanizma kolonske separacije, specifično u obliku mukozne zamke.



8. Iako istraživanje nije pronašlo jasne dokaze da dinarski voluhar prakticira cekotrofiju, mogućnost postojanja ovog ponašanja nije u potpunosti isključena, s obzirom na karakteristike probavnog trakta i specifične prilagodbe povezane s konzumacijom biljne hrane bogate vlaknima.
9. Istraživanje je pokazalo da dinarski voluhari ostvaruju visoku probavljivost konzumirane hrane, što ih svrstava među najučinkovitije vrste u smislu hranidbene iskoristivosti.
10. Postoje značajne razlike u probavljivosti među spolovima, pri čemu mušjaci pokazuju veću efikasnost u probavi od ženki. Ovo bi moglo biti rezultat različitih metaboličkih potreba ili fizioloških razlika između mužjaka i ženki.
11. Koeficijenti probavljivosti ukazuju na visoku učinkovitost probave i apsorpcije ključnih hranjivih tvari, kao što su bjelančevine, masti i vlakna.

## 9. POPIS LITERATURE

Abd El Hafez EA, Mokhtar DM, Abou-Elhamd AS, Hassan AHS (2013) Comparative histomorphological studies on oesophagus of catfish and grass carp. *Journal of Histology* 4: 1-9.

Abramson N, Bodrov S, Bondareva O, Genelt-Yanovskiy E, Petrova T (2021) A mitochondrial genome phylogeny of voles and lemmings (Rodentia: Arvicolinae): Evolutionary and taxonomic implications. *PLoS ONE* 16(11): e0248198

Adams T, Ackland G, Marion G, Edwards C (2011) Effects of local interaction and dispersal on the dynamics of size-structured populations. *Ecological Modelling* 222 (8): 1414-1422.

ADW, 2024. Animal Diversity Web. URL <http://animaldiversity.org/accounts/Arvicolinae/> (pristupljeno 17.03.2024.)

Aguirre LF, Herrel A, van Damme R, Matthysen E (2002) Ecomorphological analysis of trophic niche partitioning in a tropical savanna bat community. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 269: 1271-1278.

Aguirre LF, Herrel A, van Damme R, Matthysen E (2003) The implications of food hardness for diet in bats. *Functional Ecology* 17 (2): 201-212.

Allen A, Flemström G, Garner A, Kivilaakso E (1993) Gastroduodenal mucosal protection. *Physiological Reviews* 73 (4): 823-857.

Amori G, Gippoliti S (2003) A higher-taxon approach to rodent conservation priorities for the 21st century. *Animal Biodiversity and Conservation* 26 (2): 1-18.

Anderson RA, McBrayer LD, Herrel A (2008) Bite force in vertebrates: opportunities and caveats for use of a nonpareil whole-animal performance measure. *Biological Journal of the Linnean Society* 93: 709-720.

Antolović J, Flajšman E, Frković A, Grgurev M, Grubešić M, Hamidović D, Holcer D, Pavlinić I, Tvrtković N, Vuković M (2006) *Crvena knjiga sisavaca Hrvatske*: Ministarstvo kulture i medija Republike Hrvatske; Državni zavod za zaštitu prirode, Zagreb

Arellano JM, Storch V, Sarasquete C (2001) Histological and histochemical observations in the stomach of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *Histology and Histopathology* 16 (2): 511-521.

Aswegen GV, Schoeman JH, De Vos V, Van Noorden S (1994) The oesophagus and stomach of the African elephant: a histological, immunocytochemical and immunofluorescence study. *Journal of Veterinary Research* 61 (3): 223-229.

Atuma C, Strugala V, Allen A, Holm L (2001) The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state *in vivo*. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal Liver Physiology* 280 (5): 922-929.

Aylward M, Beselaar L, Alagaili A, Amor N, Mohammed OB, 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 (3): 1106-1117.

Ball SS, VL Roth (1995) Jaw muscles of New World squirrels. *Journal of Morphology* 224 (3): 265-291.

Bancroft JD, Stevens A (1990) *Theory and Practice of Histological Techniques*. 3rd edn. Churchill Livingstone, London

Banks WJ (1993) *Applied veterinary histology*. 3rd edn. Mosby-Year book, St Louis

Bansil R, Turner BS (2006) Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 11 (2-3): 164-170.

Barkley SA, Batzli GO, Collier BD (1980) Nutritional ecology of microtine rodents: a simulation model of mineral nutrition for brown lemmings. *Oikos* 34 (1): 103-114.

Barry RE (1976) Mucosal surface area and villous morphology of the small intestine of small mammals: functional interpretations. *Journal of Mammalogy* 57 (2): 273-290.

Barry RE (1977) Length and absorptive surface area apportionment of segments of the hindgut for eight species of small mammals. *Journal of Mammalogy* 58 (3): 419-420.

Batzli GO (1985) Nutrition. U: Tamarin R (ed.) *The genus Microtus in North America*. American Society of Mammalogists Special Publication, 779-811

Batzli GO, Cole FR (1979) Nutritional ecology of microtine rodents: digestibility of forage. *Journal of Mammalogy* 60 (4): 740-750.

Baverstock H, Jeffery NS, Cobb SN (2013) The morphology of the mouse masticatory musculature. *Journal of Anatomy* 223(1): 46-60.

- Becerra F, Casinos A, Vassallo AI (2013) Biting performance and skull biomechanics of a chisel tooth digging rodent (*Ctenomys tuconax*; Caviomorpha; Octodontoidea). *Journal of Experimental Zoology* 319: 74-85.
- Becerra F, Echeverría AI, Casinos A, Vassallo AI (2014) Another one bites the dust: Bite force and ecology in three caviomorph rodents (Rodentia, Hystricognathi). *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 321 (4): 220-232.
- Becerra F, Echeverría AI, Marcos A, Casinos A, Vassallo AI (2012) Sexual selection in a polygynous rodent (*Ctenomys talarum*): an analysis of fighting capacity. *Zoology* 115 (6): 405-410.
- Becerra F, Echeverría AI, Vassallo AI, Casinos A (2011) Bite force and jaw biomechanics in the subterranean rodent Talas tuco-tuco (*Ctenomys talarum*) (Caviomorpha: Octodontoidea). *Canadian Journal of Zoology* 89 (4): 334-342.
- Becht G (1954) Comparative biologic-anatomic study on the masticatory apparatus of certain mammals. *Nederlands Tijdschrift Voor Geneeskunde* 98 (12): 809-810.
- Bego F, Kryštufek B, Paspali G, Rogozi E (2008) Small terrestrial mammals of Albania: annotated list and distribution. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 19 (2): 3-21.
- Behmann H (1973) Vergleichend und funktionell anatomische Untersuchungen am Caecum und Colon myomorpher Nagetiere. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 186: 173-294.
- BeMiller J, Whistler R (2009) *Starch: Chemistry and Technology*. 3rd edn. Academic Press, Cambridge
- Bensley RR (1905) The cardiac glands of mammals. *American Journal of Anatomy* 2 (1): 105-156.
- Berg MP, Stoffer M, van den Heuvel HH (2004) Feeding guilds in Collembola based on digestive enzymes. *Pedobiologia* 48 (5-6): 589-601.
- Bergeron JM, Jodoin L (1987) Defining "high quality" food resources for herbivores: the case for meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*). *Oecologia* 71 (4): 510-517.
- Berghes C, Tanase P, Parvu M, Dinu C, Cuca D (2011) Contributions to the study of the esophagus and stomach morphology in Guinea pig. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies* 44 (2): 150-154 (5).

- Bezzobs T, Sanson G (1997) The effects of plant and tooth structure on intake and digestibility in two small mammalian herbivores. *Physiological Zoology* 70 (3): 338-351.
- Bilton DT, Mirol PM, Mascheretti S, Fredga K, Zima J, Searle JB (1998) Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 265 (1402): 1219-1226.
- Björnhag G (1972) Separation and delay of contents in the rabbit colon. *Swedish Journal of Agricultural Research* 2: 125-136.
- Björnhag G (1981) The retrograde transport of fluid in the proximal colon of rabbits. *Swedish Journal of Agricultural Research* 11: 63-69.
- Björnhag G (1987) Comparative aspects of digestion in the hindgut of mammals. The colonic separation mechanism. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 94 (1): 33-36.
- Björnhag G (1994) Adaptations in the large intestine allowing small animals to eat fibrous food. U: Chivers D, Langer P (ed.) *The Digestive System in Mammals: Food, Form and Function*. Cambridge, Cambridge University Press, 287-312
- Björnhag G, Sjöblom L (1977) Demonstration of coprophagy in some rodents. *Swedish Journal of Agricultural Research* 7: 105-114.
- Björnhag G, Snipes RL (1999) Colonic separation mechanism in lagomorph and rodent species – a comparison. *Zoosystematics and Evolution* 75 (2): 275-281.
- Björnhag G, Sperber I (1977) Transport of various food components through the digestive tract of turkeys, geese and Guinea fowl. *Swedish Journal of Agricultural Research* 7: 57-66.
- Blank OE (1950) A histological study of the alimentary canal of the cotton rat, *Sigmodon hispidus*. *The Anatomical Record* 108 (3): 421-439.
- 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
- Boonzaier J, Van der Merwe EL, Bennet NC, Kotzé SH (2013a) Comparative gastrointestinal Morphology of three small mammalian insectivores: *Acomys spinosissimus* (Rodentia),

*Crocidura cyanea* (Eulipotyphla), and *Amblysomus hottentotus* (Afrosoricida). *Journal of Morphology* 274 (6): 615-626.

Boonzaier J, Van der Merwe EL, Bennet NC, Kotzé SH (2013b) A comparative histochemical study of the distribution of mucins in the gastrointestinal tracts of three insectivorous mammals. *Acta Histochemica* 115 (6): 549-556.

Bornhorst G, Gouseti O, Wickham MSJ, Bakalis S (2016) Engineering digestion: multiscale processes of food digestion. *Journal of Food Science* 81 (3): 534-543.

Bradamante Ž, Švajger A (2002) Vježbe iz histologije, Slike histoloških preparata, II. dio. Kaligraf, Zagreb

Brandt JF (1855) Untersuchungen über die craniologischen Entwicklungsstufen und Classification der Nager der Jetztwelt. *Mémoires de l'Académie impériale des sciences de St. Pétersbourg* 6 (9): 1-365.

Breed B, Ford F (2007) Native mice and rats. Australian Natural History Series, CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia

Brownlee IA, Allen A, Pearson JP, Dettmar PW, Havler ME, Atherton MR, Onsøyen E (2005) Alginate as a source of dietary fiber. *Critical reviews in food science and nutrition* 45 (6): 497-510.

Bujard E (1908) Villosites intestinales. Types anatomiques. Variations experimentales. *Anatomischer Anzeiger* 32: 212-222.

Butler PM (1983) Evolution and mammalian dental morphology. *Journal de biologie buccale* 11 (4): 285-302.

Bužan E, Kryštufek B, Hänfling B, Hutchinson WF (2008) Mitochondrial phylogeny of Arvicolinae using comprehensive taxonomic sampling yields new insights. *Biological Journal of the Linnean Society* 94 (4): 825-835.

Bužan EV, Förster DW, Searle JB, Kryštufek B (2010) A new cytochrome b phylogroup of the common vole (*Microtus arvalis*) endemic to the Balkans and its implications for the evolutionary history of the species. *Biological Journal of the Linnean Society* 100 (4): 788-796.

Byrd KE (1981) Mandibular movement and muscle activity during mastication in the guinea pig (*Cavia porcellus*). *Journal of Morphology* 170 (2): 147-169.

- Cai X, Bao D, Ye G, Chu B, Tang Z, Hua R, Hua L (2022) The complex and well-developed morphological and histological structures of the gastrointestinal tract of the Plateau Zokor improve its digestive adaptability to high-fiber foods. *Animals (Basel)* 12 (18): 2447.
- Calderón PS, Kogawa EM, Pereira Lauris JR, Rodrigues Conti PC (2006) The influence of gender and bruxism on the human maximum bite force. *Journal of Applied Oral Science* 14 (6): 448-453.
- Cao XJ, Wang WM (2009) Histology and Mucin Histochemistry of The Digestive Tract of Yellow Catfish, *Pelteobagrus fulvidraco*. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 38 (4): 254-261.
- Carabaño R, Fraga MJ, Santoma G, de Blas JC (1988) Effect of diet on composition of cecal contents and on excretion and composition of soft and hard feces of rabbits. *Journal of Animal Science* 66 (4): 901-910.
- Carleton MD (1973) A survey of gross stomach morphology in New World Cricetinae (Rodentia, Muroidea), with comments on functional interpretations. *Miscellaneous Publication of the Museum of Zoology, University of Michigan*
- Carleton MD (1981) A survey of gross stomach morphology in Microtinae (Rodentia, Muroidea). *Zeitschrift für Säugetierkunde* 46: 93-108.
- Carleton MD, Musser G (1984) Muroid Rodents. U: Anderson S, Jones JK (ed.) *Orders and families of recent mammals of the world*. New York, John Wiley and Sons, 255-265
- Chaline J, Brunet-Lecomte P, Montuire S, Viriot L, Courant F (1999) Anatomy of the arvicoline radiation (Rodentia): palaeogeographical, palaeoecological history and evolutionary data. *Annales Zoologici Fennici* 36 (4): 239-267.
- Chaline J, Graf JD (1988) Phylogeny of the Arvicolidae (Rodentia): biochemical and paleontological evidence. *Journal of Mammalogy* 69 (1): 22-33.
- Chaline J, Mein P (1979) *Les rongeurs et l'évolution*. Doin Éditeurs, Paris
- Chilcott MJ, Hume ID (1985) Coprophagy and selective retention of fluid digesta: their role in the nutrition of the common ringtail possum, *Pseudocheirus peregrinus*. *Australian Journal of Zoology* 33 (1): 1-15.
- Christiansen P, Wroe SW (2007) Bite forces and evolutionary adaptations to feeding ecology in carnivores. *Ecology* 88 (2): 347-358.

- Clauss M, Besselmann D, Schwarm A, Ortmann S, Hatt JM (2007a) Demonstrating coprophagy with passage markers? The example of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147 (2): 453-459.
- Clauss M, Jürgen Streich W, Schwarm A, Ortmann O, Hummel J (2007b) The Relationship of Food Intake and Ingesta Passage Predicts Feeding Ecology in Two Different Megaherbivore Groups. *Oikos* 116 (2): 209-216.
- Cleuren J, Aerts P, De Vree F (1995) Bite and joint force analysis in Caiman crocodilus. *Belgian Journal of Zoology* 125: 79-94.
- Clutton-Brock TH, Vincent ACJ (1991) Sexual selection and the potential reproductive rates of males and females. *Nature* 351 (6321): 58-60.
- Codron D, Lee-Thorp J, Sponheimer M, Codron J (2007) Nutritional content of savanna plant foods: implications for browser/grazer models of ungulate diversification. *European Journal of Wildlife Research* 53: 100-111.
- Conklin NL, Dierenfeld ES (1994) Digestibility and passage of standard zoo diet fed to greater mouse deer (*Tragulus napu*). *Malayan Nature Journal* 48: 41-51.
- Conklin-Brittain NL, Dierenfeld ES (1996) Small ruminants: digestive capacity differences among four species weighing less than 20 kg. *Zoo Biology* 15: 481-490.
- Conroy CJ, Cook JA (1999) MtDNA evidence for repeated pulses of speciation within arvicoline and murid rodents. *Journal of Mammalian Evolution* 6 (3): 221-245.
- Corfield AP, Shukla AK (2003) Mucins: Vital components of the mucosal defensive barrier. *Genomic/Proteomic Technology* 3: 20-22.
- Cork S (1994) Digestive constraints on dietary scope in small and moderately-small mammals: how much do we really understand? U: Chivers D, Langer P (ed.) *The Digestive System in Mammals: Food, Form and Function*. Cambridge, Cambridge University Press, 337-369
- Cork SJ, Foley WJ (1991) Digestive and metabolic strategies of arboreal mammalian folivores to chemical defenses in temperate and tropical forests. U: Palo RT, Robbins CT (ed.) *Plant Defenses against Mammalian Herbivory*. Boca Raton, CRC Press, 133-166



Cork SJ, Hume ID, Faichney GJ (1999) Digestive strategies of nonruminant herbivores: the role of the hindgut. U: Jung HJG, Fahey GC (ed.) Nutritional Ecology of Herbivores. Savoy, American Society of Animal Science, 210-260

Cork SJ, Warner ACI (1983) The passage of digesta markers through the gut of a folivorous marsupial, the koala (*Phascolarctos cinereus*). Journal of Comparative Physiology B: Biochemical Systemic and Environmental Physiology 152 (1): 43-51.

Cox PG, Baverstock H (2016) Masticatory muscle anatomy and feeding efficiency of the American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia, Castoridae). Journal of Mammalian Evolution 23 (2): 191-200.

Cox PG, Jeffery N (2011) Reviewing the morphology of the jaw-closing musculature in squirrels, rats, and guinea pigs with contrast-enhanced microCT. The Anatomical Record (Hoboken) 294 (6): 915-928.

Cox PG, Kirkham J, Herrel A (2013) Masticatory biomechanics of the Laotian rock rat, *Laonastes aenigmamus*, and the function of the zygomaticomandibularis muscle. PeerJ 1: e160.

Cox PG, Rayfield EJ, Fagan MJ, Herrel A, Pataky TC, Jeffery N (2012) Functional evolution of the feeding system in rodents. PLoS ONE 7 (4): e36299.

Cox RM, Calsbeek R (2015) Survival of the fattest? Indices of body condition do not predict viability in the brown anole (*Anolis sagrei*). Functional Ecology 29 (3): 404-413.

Cranford JA, Johnson EO (1989) Effects of coprophagy and diet quality on two microtine rodents (*Microtus pennsylvanicus* and *Microtus pinetorum*). Journal of Mammalogy 70 (3): 494-502.

Cummings JH, Stephen AM (1980) The role of dietary fibre in the human colon. Canadian Medical Association Journal 123 (11): 1109-1114.

Curtis N, Jones MEH, Lappin AK, O'Higgins P, Evans SE, Fagan MJ (2010) Comparison between in vivo and theoretical bite performance: Using multi-body modelling to predict muscle and bite forces in a reptile skull. Journal of Biomechanics 43 (14): 2804-2809.

Dahlqvist A, Brun A (1962) A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities. Application to invertase and trehalase in some animal tissues. Journal of Histochemistry and Cytochemistry 10 (3): 294-302.

- Damasceno EM, Hingst-Zaher E, Astúa D (2013) Bite force and encephalization in the Canidae (Mammalia: Carnivora). *Journal of Zoology* 290 (4): 246-254.
- Darwin C (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London
- Davenport H (1966) *Physiology of the digestive tract: An Introductory Text*. 2nd edn. Year Book Medical Publishers, Chicago
- Davis DE, Golley FB (1963) *Principles in mammalogy*. Reinhold Publishing Corporation, New York
- de la Hoz TMF, Flamini MA, Zanuzzi CN, Díaz AO (2017) The colonic groove of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*): Histochemical evidence of an abrupt change in the glycosylation pattern of goblet cells. *Journal of Morphology* 278 (12): 1606-1618.
- Devine P, McKenzie F (1992) Mucins: structure, function, and associations with malignancy. *BioEssays* 14 (9): 619-625.
- Dijkstra J, Forbes JM, France J (1993) *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. 2nd ed. CABI, Wallingford
- Downes S, Bauwens D (2002) An experimental demonstration of direct behavioural interference in two Mediterranean lacertid lizard species. *Animal Behaviour* 63 (6): 1037-1046.
- Drózdź A (1966) Food habits and food supply of rodents in the beech forest. *Acta theriologica* 11 (12): 363-384.
- Drózdź A (1968) Digestibility and Assimilation of Natural Foods in Small Rodents. *Acta theriologica* 13 (21): 367-389.
- Druziński RE (2010) Functional anatomy of incisal biting in *Aplodontia rufa* and sciuriform rodents - Part 1: Masticatory muscles, skull shape, and digging. *Cells Tissues Organs* 191 (6): 510-522.
- Druziński RE, Doherty AH, De Vree FL (2011) Mammalian masticatory muscles: homology, nomenclature, and diversification. *Integrative and Comparative Biology* 51 (2): 224-234.
- Ellegren H, Parsch J (2007) The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nature Reviews Genetics* 8 (9): 689-698.

- Ellis BA, Mills JN, Kennedy EJT, Maiztegui JI, Child JE (1994) The relationship among diet, alimentary tract morphology, and life history for five species of rodents from the central Argentine pampa. *Acta Theriologica* 39 (4): 345-355.
- Erickson GM, Lappin AK, Vliet KA (2003) The ontogeny of bite-force performance in American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Journal of Zoology* 260 (3): 317-327.
- Eto T, Ozaki R, Kato GA, Sakamoto SH, Koshimoto C, Morita T (2016) Flexibility of digestive tract morphology in response to environmental conditions in the large Japanese field mouse *Apodemus speciosus*. *Mammal Study* 41: 71-76.
- Ewer RF (1967) The behaviour of the African giant rat (*Cricetomys gambianus*, Waterhouse). *Zeitschrift für Tierpsychologie* 24 (1): 6-79.
- Fagan C, Dapson RW, Horobin RW, Kiernan JA (2020) Revised tests and standards for Biological Stain Commission certification of alcian blue dyes. *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 95 (5): 333-340.
- Faichney GJ (1975) The use of markers to partition digestion within the gastrointestinal tract of ruminants. U: McDonald IW, Warner ACI (ed.) *Digestion and Metabolism in the Ruminant*. New South Wales, The University of New England Publishing, 277
- Fekete S, Bokori J (1985) The effect of the fiber and protein level of the ration upon the cecotrophy of rabbit. *The Journal of Applied Rabbit Research* 8: 68-71.
- Feldhamer GA, Drickamer LC, Vessey SA, Merritt JF, Krajewski C (2007) *Mammalogy: adaptation, diversity; ecology*. 3rd edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Filipe MI (1979) Mucins in the human gastrointestinal epithelium: a review. *Investigative Cell Pathology* 2 (3): 195-216.
- Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH (2012) The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* 9 (10): 577-589.
- Foley WJ, Cork SJ (1992) Use of fibrous diets by small herbivores: How far can the rules be 'bent'? *Trends in Ecology & Evolution* 7 (5): 159-162.
- Foley WJ, Hume ID (1987) Passage of digesta markers in two species of arboreal folivorous marsupials – the greater glider (*Petauroides volans*) and the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*). *Physiological Zoology* 60 (1): 103-113.

Foreman GL (1971) Gastric morphology in selected mormoopid and glossophaginae bats as related to systematic problems. *Transactions of the Illinois Academy of Science* 64: 273-282.

Franz R, Kreuzer M, Hummel J, Hatt JM, Clauss M (2011) Intake, selection, digesta retention, digestion and gut fill of two coprophageous species, rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) and guinea pigs (*Cavia porcellus*) on a hay-only diet. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95 (5): 564-570.

Freeman PW (1984) Functional cranial analysis of large animalivorous bats (Microchiroptera). *Biological Journal of the Linnean Society* 21: 387-408.

Freeman PW (1992) Canine teeth of bats (Microchiroptera): size, shape and role in crack propagation. *Biological Journal of the Linnean Society* 45 (2): 97-115.

Freeman PW, Lemen CA (2008a) A simple morphological predictor of bite force in rodents. *Journal of Zoology* 275 (4): 418-422.

Freeman PW, Lemen CA (2008b). Measuring bite force in small mammals with a piezo-resistive sensor. *Journal of Mammalogy* 89 (2): 513-517.

Gaillard JM, Festa-Bianchet M, Yoccoz NG, Loison A, Toïgo (2020) Temporal variation in fitness components and population dynamics of large herbivores. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 31: 367-393.

Gainsbury AM, Tallowin OJS, Meiri S (2018) An updated global data set for diet preferences in terrestrial mammals: testing the validity of extrapolation. *Mammal Review* 48 (3): 160-167.

Galewski T, Tilak MK, Sanchez S, Chevret P, Paradis E, Douzery EJP (2006) The evolutionary radiation of Arvicolinae rodents (voles and lemmings): relative contribution of nuclear and mitochondrial DNA phylogenies. *BMC Evolutionary Biology* 6 (1): 80.

García J, de Blas JC, Carabaño R, García P (1995) Effect of type of lucerne hay on caecal fermentation and nitrogen contribution through caecotrophy in rabbits. *Reproduction Nutrition Development* 35 (3): 267-275.

Garrett R, Grisham CM (2005) *Biochemistry*. 3rd edn. Thomson Brooks/Cole, Belmont

Gartner PL, Hiatt JL (2022) *Atlas and Text of Histology*. 8th edn. LWW, Eighth, North American edition

- Gębczyńska Z, Gębczyński M (1971) Length and weight of the alimentary tract of the root vole. *Acta Theriologica* 16: 359-369.
- Genest-Villard H (1980) Régime alimentaire des rongeurs myomorphes de forêt équatoriale (région de M'Baiki, République Centrafricaine). *Mammalia* 44: 423-484.
- Ghoshal NG, Bal HS (1989) Comparative morphology of the stomach of some laboratory mammals. *Laboratory Animals* 23 (1): 21-9.
- Ginot S, Herrel A, Claude J, Hautier L (2018) Skull size and biomechanics are good estimators of in vivo bite force in murid rodents. *The Anatomical Record* 301 (2): 256-266.
- Gippoliti S, Amori G (2007) Beyond threatened species and reintroduction: establishing priorities for conservation and breeding programmes for European rodents in zoos. *International Zoo Yearbook* 41 (1): 194-202.
- Golley (1960) Anatomy of the digestive tract of *Microtus*. *Journal of Mammology* 41: 89-99.
- 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*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 48 (5): 444-448.
- Gorgas M (1967) Vergleichend-anatomische Untersuchungen am Magen-Darm-Kanal der Sciuromorpha, Hystricomorpha und Caviomorpha (Rodentia). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie* 175: 237-404.
- Gorniak GC (1977) Feeding in golden hamsters, *Mesocricetus auratus*. *Journal of Morphology* 154: 427-458.
- Grodziński W (1985) Ecological energetics of bank voles and wood mice. *Symposia of the Zoological Society of London* 55: 169-192.
- Gromov IM (1972) Systematic groups above species level in the vole subfamily (Microtinae) and their possible affinities. *Trudy Zoologicheskogo Museya Moskovskogo Gosudarstvennogo Universiteta* 13: 8-33.
- Gromov IM, Polyakov IY (1992) Voles (Microtinae), Fauna of the USSR. *Mammals. Smithsonian Institution Libraries and the National Science Foundation.*

- Gross JE, Wang Z, Wunder BA (1985) Effects of food quality and energy needs: changes in gut morphology and capacity of *Microtus ochrogaster*. *Journal of Mammalogy* 66 (4): 661-667.
- Gruder-Adams S, Getz L (1985) Comparison of the mating system and paternal behavior in *Microtus ochrogaster* and *Microtus pennsylvanicus*. *Journal of Mammalogy* 66 (1): 165-167.
- Grzimek B (1990) Grzimek's encyclopedia of mammals. McGraw-Hill Publishing company, New York
- Guerra Aldrigui L, Nogueira-Filho SLG, Mendes A, Souza Altino V, Mendes A, Clauss M, de Cunha Nogueira SS (2018a) Direct and indirect caecotrophy behaviour in paca (*Cuniculus paca*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)* 102 (6): 1774-1782.
- Guerra Aldrigui L, Nogueira-Filho SLG, Mendes A, Souza Altino V, Ortmann S, de Cunha Nogueira SS, Clauss M (2018b) Effect of different feeding regimes on cecotrophy behaviour and retention of solute and particle markers in the digestive tract of paca (*Cuniculus paca*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 226: 57-65.
- Gustafsson BE, Maunsbach AB (1971) Ultrastructure of the enlarged cecum in germfree rats. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 120 (4): 555-578.
- Hagen KB, Besselmann D, Cyrus-Eulenberger U, Vendl C, Ortmann S, Zingg R, Kienzle E, Kreuzer M, Hatt JM, Clauss M (2015) Digestive physiology of the plains viscacha (*Lagostomus maximus*), a large herbivorous hystricomorph rodent. *Zoo Biology* 34 (4): 345-359.
- Hagen KB, Dittmann MT, Ortmann S, Kreuzer M, Hatt JM, Clauss M (2016) Retention of solute and particle markers in the digestive tract of chinchillas (*Chinchilla laniger*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berlin)* 100 (5): 801-806.
- Hagen KB, Müller DHW, Ortmann S, Kreuzer M, Clauss M (2018) Digesta kinetics in two arvicoline rodents, the field vole (*Microtus agrestis*) and the steppe lemming (*Lagurus lagurus*). *Mammalian Biology* 89: 71-78.
- Hall C, Hillen C, Robinson JG (2017) Composition, Nutritional Value, and Health Benefits of Pulses. *Cereal Chemistry* 94: 11-31.
- Hamilton WJ (1940) Life and habits of field mice. *The Scientific Monthly* 50: 425.

- Hammond KA, Wunder BA (1991) The role of diet quality and energy need in the nutritional ecology of a small herbivore. Colorado State University
- Hattrup CL, Gendler SJ (2008) Structure and function of the cell surface (tethered) mucins. *The Annual Review of Physiology* 70: 431-457.
- Hautier L, Cox PG, Lebrun R (2015) Grades and clades among rodents: the promise of geometric morphometrics. U: Cox PG, Hautier L (ed.) *Evolution of the Rodents*. Cambridge, Cambridge University Press, 277-299
- Hautier L, Lebrun R, Saksiri S, Michaux J, Vianey-Liaud M, Marivaux L (2011) Hystricognathy vs Sciurognathy in the Rodent Jaw: A New Morphometric Assessment of Hystricognathy Applied to the Living Fossil *Laonastes* (Diatomyidae). *PLoS ONE* 6 (4): e18698.
- Hayat MA (1993) *Stains and Cytochemical Methods*. 1st edn. Springer Science & Business Media, New York
- Henke Z, Sahd L, Matthee S, Kotzé SH (2018). Morphometric analysis of the gastrointestinal tract of four African muroid rodent species (*Rhabdomys dilectus*, *Rhabdomys pumilio*, *Aethomys chrysophilus*, and *Lemniscomys rosalia*). *Journal of Morphology* 279 (9): 1282-1289.
- Henneberg W, Stohmann F (1860) *Beiträge zur Begründung einer rationellen Fütterung der Wiederkäuer*, Vol. 1. A. Schwetschke u. Sohn
- Heroldova M, Janova E (2018) The pygmy field mouse – what does influence food quality? *Community Ecology* 19: 233-238.
- Heroldova M, Janova E (2019) Feeding strategy of two rodent species in a set-aside field and its influence on alimentary tract morphometry. *Mammalia* 83 (1): 34-40.
- Herrel A, Huyghe K, Vanhooydonck B, Backeljau, Breugelmans K, Grbac I, Van Damme R, Irschick DJ (2008) Rapid large-scale evolutionary divergence in morphology and performance associated with exploitation of a different dietary source. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (12): 4792-4795.
- Herrel A, McBrayer LD, Larson PM (2007) Functional basis for sexual differences in bite force in the lizard *Anolis carolinensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 91 (1): 111-119.

- Herrel A, O'Reilly JC, Richmond AM (2002) Evolution of bite performance in turtles. *Journal of Evolutionary Biology* 15 (6): 1083-1094.
- Herring SW (2007) Masticatory muscles and the skull: A comparative perspective. *Archives of Oral Biology* 52 (4): 296-299.
- Hiiemäe K, Houston WJB (1971) The structure and function of the jaw muscles in the rat (*Rattus norvegicus* L.). *Zoological Journal of the Linnean Society* 50: 75-99.
- Hiiemäe KM, Ardran GM (1968) A cinefluorographic study of mastication in the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Zoology* 154 (2): 139-154.
- Hinton MA (1926) *Monograph of the Voles and Lemmings (Microtinae) Living and Extinct*. British Museum, London
- Hirakawa H (2001) Coprophagy in leporids and other mammalian herbivores. *Mammal Review* 31 (1): 61-80.
- Hite N, Germain C, Cain B, Sheldon M, Perala S, Sarko D (2019) The Better to Eat You With: Bite Force in the Naked Mole-Rat (*Heterocephalus glaber*) Is Stronger Than Predicted Based on Body Size. *Frontiers in Integrative Neuroscience* 13: 70 – 70.
- Holišova V (1967) The food of *Apodemus agrarius* (Pall.). *Zoologické listy* 16 (1): 1-14.
- Holland C, Ryden P, Edwards CH, Grundy MML (2020) Plant Cell Walls: Impact on Nutrient Bioaccessibility and Digestibility. *Foods* 9 (2): 201.
- Holtenius K, Björnhag G (1985) The colonic separation mechanism in the guinea pig (*Cavia porcellus*) and the chinchilla (*Chinchilla laniger*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 82 (3): 537-542.
- Horner BE, Taylor JM, Padykula HA (1964) Food habits and gastric morphology of the grasshopper mouse. *Journal of Mammology* 45 (4): 513-535.
- Hosoyamada Y, Sakai T (2005) Structural and mechanical architecture of the intestinal villi and crypts in the rat intestine: integrative reevaluation from ultrastructural analysis. *Anatomy and embryology (Berlin)* 210:1-12.
- Howell AB, Gersh I (1953) Conservation of water by the rodent *Dipodomys*. *Journal of Mammalogy* 16 (1): 1-9.



HRN ISO 5983-2:2010, Stočna hrana – Određivanje količine dušika i izračunavanje količine sirovih proteina – 2. dio: Razaranje u bloku/metoda destilacije parom. Hrvatska norma, HZM, Zagreb

HRN ISO 5984:2004, Stočna hrana - Određivanje pepela. Hrvatska norma, HZM, Zagreb

HRN ISO 6492:2001, Stočna hrana – Određivanje udjela masti. Hrvatska norma. HZM, Zagreb

HRN ISO 6496:2001, Stočna hrana – Određivanje vode i udjela drugih hlapljivih tvari. Hrvatska norma, HZM, Zagreb

HRN ISO 6498:2001, Stočna hrana – Priprema uzorka za ispitivanje. Hrvatska norma, HZM, Zagreb

Hume ID (1989) Optimal digestive strategies in mammalian herbivores. *Physiological Zoology* 62 (6): 1145-1163.

Hume ID (1994) Gut morphology, body size and digestive performance in rodents. U: Chivers D, Langer P (ed.) *The Digestive System in Mammals: Food, Form and Function*. Cambridge, Cambridge University Press, 315-323.

Hume ID (1999a) Fermentation in the Hindgut of Mammals. U: Mackie RI, White BA (ed.) *Gastrointestinal Microbiology*. Chapman and Hall, 84-115.

Hume ID (1999b) *Marsupial Nutrition*. 1st edn. Cambridge University Press, New York

Hume ID, 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.

Hume ID, Morgan KR, Kenagy GJ (1993) Digesta retention and digestive performance in sciurid and microtine rodents: effects of hindgut morphology and body size. *Physiological Zoology* 66 (3): 396-411.

Hume ID, Sakaguchi E (1991) Patterns of digesta flow and digestion in foregut and hindgut fermenters. U: Tsuda T, Saaski Y, Kawashima R (ed.). *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. San Diego, Academic Press, 427-451

Hume ID, Warner ACI (1980) Evolution of microbial digestion in mammals. U: Ruckebusch Y, Thivend P (ed.) *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Lancaster, MTP Press, 665-684

- Hungate RE (1966) The rumen and its microbes. Academic Press, New York and London
- Husak JF, Lappin AK, Fox SF, Lemos-Espinal JA (2006) Bite-Force Performance Predicts Dominance in Male Venerable Collared Lizards (*Crotaphytus antiquus*). *Copeia* 2: 301-306.
- Hörnigke H, Björnhag G (1980) Coprophagy and related strategies for digesta utilization. U: Ruckebusch Y, Thivend P (ed.) Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants. Lancaster, MTP Press, 707-730
- Igbokwe CO, Obinna J (2016) Oesophageal and Gastric Morphology of the African Rope Squirrel *Funisciurus anerythrus* (Thomas, 1890). *Journal of Applied Life Sciences International* 4 (2): 1-9.
- IUCN, 2017. IUCN - The International Union for Conservation of Nature. URL <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=6607/> (pristupljeno 23.04.2017.)
- Ivić L (2017) Odabir hrane kod dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*) u zatočeništvu. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Jakopović M (2022) Komparativna histomorfometrijska i histokemijska analiza probavnog sustava pet vrsta glodavaca. Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Jena PK, Trivedi D, Thakore K, Chaudhary H, Giri SS, Seshadri S (2013) Isolation and characterization of probiotic properties of Lactobacilli isolated from rat fecal microbiota. *Microbiology and Immunology* 57 (6): 407-416.
- Karasov WH, Hume ID (1997) The vertebrate gastrointestinal system. U: Dantzler WH (ed.) Handbook of physiology, section 13: comparative physiology. New York, Oxford University Press, 407-480
- Karasov WH, Martinez del Rio C (2007) Physiological ecology: how animals process energy, nutrients, and toxins. Princeton University Press, Princeton
- Katanović M (2013) Sezonska usporedba prehrane dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi* Martino, 1922) u zatočeništvu, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Kavanagh KD, Evans AR, Jernvall J (2007) Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* 449 (7161): 427-432.

Kenagy GJ, Hoyt DF (1979) Reingestion of feces in rodents and its daily rhythmicity. *Oecologia* 44: 403-409.

Kerr JB (1999) Atlas of functional histology. Elsevier/Mosby, St. Louis

Kierszenbaum AL (2002) Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. Mosby, St. Louis

Kohl KD, Weiss RB, Cox J, Dale C, Dering MD (2014) Gut microbes of mammalian herbivores facilitate intake of plant toxins. *Ecology Letters* 17 (10): 1238-1246.

Korn H (1992) Intestine lengths of southern African savanna rodents and insectivores: intra- and interspecific comparison. *Journal of Zoology London* 228: 455-460.

Korth WW (2001) Comments on the systematics and classification of the beavers (Rodentia, Castoridae). *Journal of Mammalian Evolution* 8 (4): 279-296.

Kostelecka-Myrcha A, Myrcha A (1964) The rate of passage of foodstuffs through the alimentary tracts of certain Microtidae under laboratory conditions. *Acta Theriologica* 9: 37-53.

Kotb AR, Luckey TD (1972) Markers in nutrition. The commonwealth bureau of nutrition - Nutrition abstracts and reviews 42 (3): 813-845.

Kotzé SH, Coetzee HL (1994) A histochemical study of mucus glycoproteins or mucins in the intestinal tract of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 61 (2): 177-181.

Kotzé SH, Van Der Merwe EL, O'Riain MJ (2006) The topography and gross anatomy of the gastrointestinal tract of the Cape dune mole-rat (*Bathyergidae suillus*). *Anatomia, Histologia, Embryologia* 35 (4): 259-264.

Krause WJ (1981) Morphological and histochemical observations on the duodenal glands of eight wild ungulate species native to North America. *American Journal of Anatomy* 162 (2): 167-181.

Krebs JR (1978) Optimal foraging: Decision rules for predators. U: Krebs JK, Davies NB (ed.) Behavioral ecology: An evolutionary approach. Sunderland, MA, Sinauer Associates, 23-63

Kretzoi M (1969) Sketch of the Late Cenozoic (Pliocene and Quaternary) terrestrial stratigraphy of Hungary. *Földrajzi Közlemények* 93: 179-204.

Krockenberger AK (1993) Energetics and nutrition during lactation in the koala, *Phascolarctos cinereus*. Ph.D. Thesis, University of Sidney.

Kryštufek B (2018) *Dinaromys bogdanovi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e.T6607A97220104. URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-1.RLTS.T6607A97220104.en/> (pristupljeno 29.08.2024.)

Kryštufek B, Bužan E. V (2008) Rarity and decline in paleoendemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi*. Mammal Review 38 (4): 267-284.

Kryštufek B, Bužan EV, Hutchinsohn WF, Hänfling B (2007) Phylogeography of the rare Balkan endemic Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, reveals strong differentiation within the western Balkan Peninsula. Molecular Ecology 16 (6): 1221-1232.

Kryštufek B, Klenovšek T, Bužan EV, Loy A, Janžekovič F (2012) Cranial divergence among evolutionary lineages of Martino's vole, *Dinaromys bogdanovi*, a rare Balkan paleoendemic rodent. Journal of Mammalogy 93 (3): 818-825.

Kryštufek B, Kolarić K, Paunović M (2000) Age determination and age structure in Martino's vole (*Dinaromys bogdanovi*). Mammalia 64 (3): 361-370.

Kryštufek B, Tvrtković N (1988) Insectivores and rodents of the Central Dinaric karst of Yugoslavia. Scopolia 15: 1-59.

Kryštufek B, Vohralík V, Obuch J (2009) Endemism, vulnerability and conservation issues for small terrestrial mammals from the Balkans and Anatolia. Folia Zoologica 58 (3): 291-302.

Kumar GL, Kiernan JA (2010) Special Stains and H & E. 2nd edn. Education Guide, Dako North America, Carpinteria

Kunstýr I, Matthiesen I, Matthiesen T (1975) Acute enteritis in rabbits. Zeitschrift Versuch 17 (1): 57-63.

Laboisie C, Jarry A, Branka JE, Merlin D, Bou-Hanna C, Vallette G (1996) Recent aspects of the regulation of intestinal mucus secretion. Proceedings of The Nutrition Society 55 (1B): 259-264.

Lack D (1947) The significance of clutch size. Ibis 89: 302-352.

Lailvaux SP, Irschick DJ (2007) The Evolution of Performance-Based Male Fighting Ability in Caribbean Anolis Lizards. The American Naturalist 170 (4): 573-586.

- Landry SO (1970) The rodentia as omnivores. *The Quarterly Review of Biology* 45 (4): 351-372.
- Lange R, Staaland H (1970) Adaptations of the caecum-colon structure of rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology* 35 (4): 905-919.
- Langer P (1985) The mammalian stomach: structure, diversity and nomenclature. *Acta Zoologica Fennica* 170: 99-102.
- Langer P (2002) The digestive tract and life history of small mammals. *Mammal Review* 32 (2): 107-131.
- Langer P (2017) *Comparative Anatomy of the Gastrointestinal Tract in Eutheria: Taxonomy, Biogeography and Food. Volume I: Afrotheria, Xenarthra and Euarchontoglires. Vol II: Laurasiatheria and General Discussion.* De Gruyter, Berlin
- Langer P, Clauss M (2018) Morphological adaptation of the eutherian gastrointestinal tract to diet. *Vertebrate Zoology* 68: 237-252.
- Laska M, Baltazar J, Luna E (2003) Food preferences and nutrient composition in captive pacas, *Agouti paca* (Rodentia, Dasyproctidae). *Mammalian Biology* 68: 31-41.
- Lechleitner R (1958) An Extra Molar in Erethizon. *Journal of Mammalogy* 39: 447-448.
- Lee WB, Houston DC (1993a) The role of coprophagy in digestion in voles (*Microtus agrestis* and *Clethrionomys glareolus*). *Functional Ecology* 7 (4): 427-432.
- Lee WB, Houston DC (1993b) The effect of diet quality on gut anatomy in British voles (Microtinae). *Journal of Comparative Physiology B* 163 (4): 337-339.
- Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA (2008) Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunology* 1 (3): 183-197.
- Liu C, Huang Y, Wu F, Liu W, Ning Y, Huang Z, Tang S, Liang Y (2021) Plant adaptability in karst regions. *Journal of Plant Research* 134: 889 - 906.
- Lou M, Zhang X, Fu R, Wang D (2015) Effects of dietary fiber content on energetics in nonreproductive and reproductive Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*). *Canadian Journal of Zoology* 93: 251-258.
- Lovegrove BG (2010) The allometry of rodent intestines. *Journal of Comparative Physiology, B. Biochemical, Systematic, and Environmental Physiology* 180 (5):741-755.

Macfarlane S, Dillon JF (2007) Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 102 (5): 1187-1196.

Madrid J, Ballesta J, Pastor L, Perez-Tomas R., Hernández F (1989). Distribution of mucins in the mucosa of the digestive tract of reptiles: a histochemical study. *Acta histochemica* 85(2): 117-29.

Maestri R, Patterson BD, Fornel R, Monteiro LR, de Freitas TRO (2016) Diet, bite force and skull morphology in the generalist rodent morphotype. *Journal of Evolutionary Biology* 29 (11): 2191-2204.

Mank JE, Ellegren H. (2009) Sex-linkage of sexually antagonistic genes is predicted by female, but not male, effects in birds. *Evolution* 63 (6): 1464-1472.

Marčina N (2017) Metoda istraživanja brzine probave kemijskim markerima na životinjskim modelima. Završni rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.

Marieb EN, Hoehn K (2018) *Human Anatomy and Physiology*. 11th edn. Pearson, Hoboken, New Jersey

Marshall CD, Guzman A, Narazaki T, Sato K, Kane EA, Sterba-Boatwright BD (2012) The ontogenetic scaling of bite force and head size in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*): implications for durophagy in neritic, benthic habitats. *Journal of Experimental Biology* 215: 4166-4174.

Martin Y, Gerlach G, Schlötterer C, Meyer A (2000) Molecular phylogeny of European muroid rodents based on complete cytochrome b sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16 (1): 37-47.

Martino NS, Zenuto RR, Busch C (2007) Nutritional responses to different diet quality in the subterranean rodent *Ctenomys talarum* (tuco-tucos). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 147(4): 974-982.

Matsuda I, Sha JCM, Ortmann S, Schwarm A, Grandl F, Caton J, Jens W, Kreuzer M, Marlena D, Hagen KB, Clauss M (2015) Excretion patterns of solute and different-sized particle passage markers in foregut-fermenting proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) do not indicate an adaptation for rumination. *Physiology and Behavior* 149: 45-52.

- Maynard SJ, Savage RJG (1959) The mechanics of mammalian jaws. *School Science Review* 141 (4): 289-301.
- McBrayer LD, White TD (2002) Bite force, behavior, and electromyography in the teiid lizard, *Tupinambis teguixin*. *Copeia* 1: 111-119.
- McDonald IW, Warner ACI (1975) Digestion and Metabolism in the Ruminant. Proceedings of the IV International Symposium on Ruminant Physiology, University of New England Publishing Unit, Sydney
- McKenna MC, Bell SK (1997) Classification of mammals – above the species level. Columbia University Press, New York
- Meng J, Wyss AR (2005) Glires (Lagomorpha, Rodentia). U: Rose KD, Archibald JD (ed.) The rise of placental mammals: origins and relationships of the major extant clades. Baltimore, MD, Johns Hopkins University Press, 145-158
- Mescher AL (2013) Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 13th edn. McGraw-Hill Publishing Company, New York
- Mezhzherin SV, Morozov-Leonov SYu, Kuznetsova IA (1995) Biochemical variation and genetic divergence in Palearctic voles (Arvicolidae): subgenus *Terricola*, true lemmings *Lemmus* Link 1795, pied lemmings *Dicrostonyx* Gloger 1841, steppe lemmings *Lagurus* Gloger 1842, mole voles *Ellobius* Fischer von Waldheim 1814. *Genetika* 31 (6): 788-797.
- Miloš M (2017) Brzina probave dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.
- Mitchell PC (1905) On the intestinal tract. *Transactions of the Zoological Society of London* 17 (5): 437-536.
- Modi WS (1987) Phylogenetic analyses of chromosomal banding patterns among the nearctic Arvicolidae (Mammalia: Rodentia). *Systematic Zoology* 36 (2): 109-136.
- Modi WS (1996) Phylogenetic history of LINE-1 among arvicolid rodents. *Molecular Biology and Evolution* 13 (5): 633-641.
- Mohammadpour A, Darvishzadeh M (2014) Histological and histometrical study of esophagus in rabbit and guinea pig. *Pajoohesh and Sazandegi* 27 (2): 52-59.

- Montagne L, Piel C, Lallès JP (2004) Effect of diet on mucin kinetics and composition: nutrition and health implications. *Nutrition Reviews* 62 (3):105-114.
- Müller DWH, Codron D, Meloro C, Munn A, Schwarm A, Hummel J, Clauss M (2013) Assessing the Jarman-Bell Principle: scaling of intake, digestibility, retention time and gut fill with body mass in mammalian herbivores. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 164 (1): 129-140.
- Musser GG, Carleton MD (2005) Superfamily Muroidea. U: Wilson DE, Reeder DM (ed.) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. Baltimore, The Johns Hopkins University Press, 2142
- Myrcha A (1964) Variations in the length and weight of the alimentary tract of *Clethrionomys glareolus* (Schreber, 1780). *Acta theriologica* 9 (10): 139-148.
- Nabipour A, Khanzadi S, Ghasemi MJ (2001) Anatomical and histological study of the esophagus of one-humped camel. *Journal of Veterinary Research* 4: 113-117.
- 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 (3): 281-288.
- Naumova EI (1990) Morphological and functional consequences of the coevolution of rodents with gastro-intestinal microbial endosymbionts. *Belgian Journal of Zoology* 120 (2): 195-204.
- Naya DE (2008) Gut size flexibility in rodents: what we know, and don't know, after a century of research. *Revista Chilena de Historia Natural* 81 (4): 615-628.
- Nehring K, Schiemann R, Hoffmann L, Klippel W, Jentsch W (1965) Utilization of the energy of concentrates in relation to their nutrient composition. U: Blaxter KL. *Energy Metabolism*. London, New York, Academic Press, 243-268
- Nelson DL, Cox MM (2005) *Lehninger: Principles of Biochemistry*. WH Freeman and Company, New York
- Nogueira-Filho SLG, Mendes A, Kowalski Tavares EF, da Cunha Nogueira SS (2013) Cecotrophy behavior and use of urea as non-protein nitrogen (NPN) source for capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tropical Animal Health and Production* 45 (8): 1703-1708.



- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6th edn. The Johns Hopkins University Press, Baltimore
- Nzalak JO, Izuchukwu OB, Ojo SA, Ambrose VA, Ibe CS (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 (2): 55-64.
- Nzalak JO, Wanmi N, Imam J, Umosen AD (2015) Anatomical and Histological Studies of the Small Intestine of the African Giant Rat (*Cricetomys gambianus*-Water house). II. *Annals of Experimental Biology* 3 (4): 20-26.
- O'Malley B (2005) Clinical anatomy and physiology of exotic species: structure and function of mammals, birds, reptiles and amphibians. 1st edn. Elsevier Saunders, Edinburgh
- Offer NW, Axford RFE, Evans RA (1972) The validity of marker practice for measuring the flow of digesta in sheep. *Proceedings of the Nutrition Society* 31 (1): 41A-42A.
- Okon EE (1977) Functional Anatomy of the Alimentary Canal in the Fruit Bat, *Eidolon helvum*, and the Insect Bat, *Tadarida nigeriae*. *Acta Zoologica* 58 (2): 83-93.
- Oliveira PM, Zannini E, Arendt EK (2014) Cereal fungal infection, mycotoxins, and lactic acid bacteria mediated bioprotection: from crop farming to cereal products. *Food Microbiology* 37: 78-95.
- Ouellette DE, Heisinger JF (1980) Reingestion of feces by *Microtus pennsylvanicus*. *Journal of Mammalogy* 61 (2): 366-368.
- Pagan JD (1998) Measuring the digestible energy content of horse feed. U: Pagan JD (ed.) *Advances in Equine Nutrition*. Nottingham, Nottingham University Press, 71-76
- Paksuz E, Paksuz S (2015) The Morphology of the Intestine of the Greater Mouse-Eared Bat, *Myotis myotis* (Borkhausen, 1797). *Global Veterinaria* 14 (5): 686-692.
- Parakkal PF (1967) An electron microscopic study of esophageal epithelium in the newborn and adult mouse. *American Journal of Anatomy* 121 (2): 175-195.
- Parillo F, Gargiulo AM, Fagioli O (2004) Complex carbohydrates occurring in the digestive apparatus of *Umbrina cirrosa* (L.) fry. *Veterinary Research Communication* 28 (4): 267-278.

- Parmenter MD, Nelson JP, Weigel SE, Gray MM, Payseur BA, Vinyard CJ (2019) Masticatory apparatus performance and functional morphology in the extremely large mice from Gough island. *The Anatomical Record* 303 (1): 167-179.
- Patton JL, Pardiñas U, D'Elia G (2015) *Mammals of South America. Vol. 2. Rodents.* The University of Chicago Press, Chicago and London
- Patton KT (2014) *The Human Body in Health & Disease.* 6th edn. Elsevier/Mosby, St. Louis
- Pavelka M, Roth J (2015) *Functional Ultrastructure: Atlas of Tissue Biology and Pathology.* 1st edn. Springer, Vienna
- Pawlina W, Ross MH (2020) *Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology.* 8th edn. Wolters Kluwer Health, Philadelphia
- Pearse AG (1968) *Histochemistry, Theoretical and Applied. Vol. 1.* Churchill-Livingstone, Edinburgh
- Pei YX, Wang DH, Hume ID (2001a) Effects of dietary fibre on digesta passage, nutrient digestibility, and gastrointestinal tract morphology in the granivorous Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Physiological and Biochemical Zoology* 74 (5): 742-749.
- Pei YX, Wang DH, Hume ID (2001b) Selective digesta retention and coprophagy in Brandt's vole (*Microtus brandti*). *Journal of Comparative Physiology B* 171 (6): 457-464.
- Perrin MR, Curtis BA (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 (1): 22-33.
- Perrin MR, Maddock AH (1983) Preliminary investigations of the digestive processes of the white-tailed rat *Mystromys albicaudatus* (Smith, 1843). *South African Journal of Zoology* 18 (2): 128-133.
- Peters RH (1983) *The Ecological Implications of Body Size.* Cambridge University Press, Cambridge
- Petrov B, Todorović M (1982) *Dinaromys bogdanovi* (V. et E. Martino, 1922). U: Niethammer J, Krapp F (ed.) *Handbuch der Säugetiere Europas, Band 1.* Wiesbaden, Akademische Verlagsgesellschaft, 193-208

Pickard DW, Stevens CE (1972) Digesta flow through the rabbit large intestine. *American Journal of Physiology* 22 (5): 1161-1166.

Pinheiro C, Venter ML, Sahd L, Bronner GN, Kotzé SH (2018). Comparative gastrointestinal morphology of seven golden mole species (Mammalia: Chrysochloridae) from South Africa. *Journal of Morphology* 279 (12): 1776-1786.

Pintić V, Marenčić D, Pintić-Pukec N (2016) Hranidba domaćih životinja. Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Križevci.

Poddar S, Jacob S (1979) Mucosubstance histochemistry of Brunner's glands, pyloric glands and duodenal goblet cells in the ferret. *Histochemistry* 65 (1): 67-81.

Purves D, George JA, Fitzpatrick D, Lawrence CK, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM (2001) *Neuroscience*. 2nd edn. Sinauer Associates Inc, Sunderland

Pyke GH, Pulliam HR, Charnov EL (1977) Optimal foraging: A selective review of theory and tests. *The Quarterly Review of Biology* 52 (2): 137-154.

Radić S, Medunić G, Kuharić Ž, Roje V, Maldini K, Vujčić V, Krivohlavek A (2018) The effect of hazardous pollutants from coal combustion activity: Phytotoxicity assessment of aqueous soil extracts. *Chemosphere* 199: 191-200.

Rezo M (2014) Kvalitativna i kvantitativna analiza prehrane dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi* Martino, 1922.) u zatočeništvu, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek.

Rittenhouse LR, Johnson DE, Borman MM (1982) Comparison of faecal excretion and intake estimates obtained from external markers and total faecal collection. *American Society of Animal Science* 33: 284-286.

Robins MW (1977) Biting loads generated by the laboratory rat. *Archives of Oral Biology* 22 (1): 43-47.

Rubal A, Haim A, Choshniak I (1995) Resting metabolic rates and daily energy intake in desert and non-desert murid rodents. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112A: 511-515.

Sahd L, Pereira DL, Bennett NC, Kotzé SH (2017) Comparative gastrointestinal morphology of *Tachyoryctes splendens* (Rüppell, 1835) and *Heliophobius emini*, (Noack, 1894) two species of east African mole-rats. *Journal of Morphology* 278 (6): 780-790.

Sakaguchi E (2003) Digestive strategies of small hindgut fermenters. *Animal Science Journal* 74 (5): 327-337.

Sakaguchi E, Itoh H, Uchida S, Horigome T (1987) Comparison of fibre digestion and digesta retention time between rabbits, guinea-pigs, rats and hamsters. *British Journal of Nutrition* 58 (1): 149-158.

Sakaguchi E, Kaizu K, Nakamichi M (1992a) Fibre digestion and digesta retention from different physical forms of the feed in the rabbit. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 102 (3): 559-563.

Sakaguchi E, Nabata A (1992) Comparison of fibre digestion and digesta retention time between nutrias (*Myocastor coypus*) and guinea-pigs (*Cavia porcellus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 103 (3): 601-604.

Sakaguchi E, Nippashi K, Endoh G (1992b) Digesta retention and fibre digestion in maras (*Dolichotis patagonum*) and guinea-pigs. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 101 (4): 867-870.

Sakaguchi E, Ohmura (1992) Fibre digestion and digesta retention time in guinea-pigs (*Cavia porcellus*), degus (*Octodon degus*) and leaf – eared mice (*Phyllotis darwini*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 103 (4): 787-791.

Sakata T, Engelhardt W (1981) Influence of short-chain fatty acids and osmolality on mucin release in the rat colon. *Cell and Tissue Research* 219: 371-377.

Satoh I, Kasahara T, Goi N (1990) Amperometric biosensing of copper (II) ions with an immobilized enzyme reactor. *Sensors and Actuators B: Chemical* 1: 499 -503.

Schaller O (1992) Illustrated veterinary anatomical nomenclature. Enke Iverlag, Stuttgart

Schieck JO, Millar JS (1985) Alimentary tract measurements as indicators of diets of small mammals. *Mammalia* 49: 93-104.

Schmidt-Nielsen K (1984) *Scaling: Why is Animal Size so Important?* Cambridge University Press, Cambridge

Schumacher U, Duku M, Katoh M, Jörns J, Krause WJ (2004) Histochemical similarities of mucins produced by Brunner's glands and pyloric glands: A comparative study. *The Anatomical Record Part A Discoveries in Molecular Cellular and Evolutionary Biology* 278 (2): 540-550.

- Scopin AE, Gashkova IV, Saveljev AP, Abramov AV (2015) Histologic features of the gastrointestinal tract of *Laonastes aenigmamus* (Rodentia: Diatomyidae). *Vertebrate Zoology* 65 (1): 151-163.
- Seeley RR, VanPutte CL, Regan J, Russo A (2008) Seeley's anatomy and physiology. 9th edn. McGraw-Hill Publishing Company, New York
- 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 and Histology* 8 (2): 1-4.
- Sellers KC, Middleton KM, Davis JL, Holliday CM (2017) Ontogeny of bite force in a validated biomechanical model of the American alligator. *Journal of Experimental Biology* 220 (11): 2036-2046.
- Selvan PS, Ushakumary S, Ramesh G (2008) Studies on the histochemistry of proventriculus and gizzard of post hatched Guinea fowl (*Numida meleagris*). *International Journal of Poultry Science* 7 (11): 1-4.
- Shahrestani J, Das JM (2002) Neuroanatomy, Auerbach Plexus. StatPearls Publishing Treasure Island (FL). URL <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551559/> (pristupljeno 10.09.2023.)
- Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M (1995) Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 36 (2): 209-214.
- Sheahan DG, Jervis HR (1976) Comparative histochemistry of gastrointestinal mucosubstances. *The American Journal of Anatomy* 146 (2): 103-131.
- Shenbrot GI, Krasnov BR (2005) Atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae). Pensoft Publishing, Sofia
- Shinohara A, Uchida E, Shichijo H, Sakamoto SH, Morita T, Koshimoto C (2016) Microbial diversity in forestomach and caecum contents of the greater long-tailed hamster *Tscherskia triton* (Rodentia: Cricetidae). *Mammalian Biology* 81 (1): 46-52.
- Sigleo S, Jackson M, Vahouny G (1984) Effects of dietary fiber constituents on intestinal morphology and nutrient transport. *The American journal of physiology* 246(1;Pt 1): G34-G39.

- Silverthorn DU (2019) Human Physiology: an Integrated Approach. 8th edn. Pearson Education, New York
- Simpson GG (1945) Principles of Classification and a Classification of Mammals. Bulletin of the American Museum of Natural History 85 (1): 1-350.
- Sjaastad ØV, Sand O, Hove K (2016) Physiology of Domestic Animals. 3rd edn. Scandinavian Veterinary Press, Oslo
- Smith CC (1970) The coevolution of pine squirrels (*Tamiasciurus*) and conifers. Ecological Monographs 40: 349-371.
- Snipes RL (1979) Anatomy of the cecum of the vole, *Microtus agrestis*. Anatomy and Embryology 157: 181-203.
- Snipes RL, Kriete A (1991) Quantitative investigation of the area and volume in different compartments of the intestine of 18 mammalian species. Zeitschrift für Säugetierkunde 56: 225-244.
- Sperber I, Björnhag G; Ridderstråle Y (1983) Function of proximal colon in lemming and rat. Swedish Journal of Agricultural Research 13: 243-256.
- Stanković I (2006) Osnovi opće hranidbe životinja. Suton d.o.o., Široki Brijeg
- Stevens CE, Hume ID (1995) Comparative Physiology of the Vertebrate Digestive System. 2nd edn. Cambridge University Press, New York
- Stevens CE, Hume ID (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiological Reviews 78 (2): 393-427.
- Strömberg CAE (2006) Evolution of hypsodonty in equids: Testing a hypothesis of adaptation. Paleobiology 32 (2): 236-258.
- Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD (2013) Theory and practice of histological techniques, 7th edn. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, Lochs H, Dörffel Y (2007) Comparative study of the intestinal mucous barrier in normal and inflamed colon. Gut: 56 (3): 343-350.

- Takahashi T, Sakaguchi E (2000) Role of the furrow of the proximal colon in the production of soft and hard feces in nutrias (*Myocastor coypus*). *Journal of Comparative Physiology B* 170: 531-535.
- Takahashi T, Sakaguchi E (2006) Transport of bacteria across and along the large intestinal lumen of guinea pigs. *Journal of Comparative Physiology B* 176 (2): 173-178.
- Takehana K, Eerdunchaoluo HU, Kobayashi KI, Sou K (2000) A histochemical study of the camel (*Camelus bactrianus*) duodenal glands. *Journal of Veterinary Medicine Science* 62 (4): 449-452.
- Takehana K, Masty J, Yamaguchi M, Kobayashi A, Yamada O, Kuroda M, Park YS, Iwasa K, Abe M (1998) Fine structural and histochemical study of equine Paneth cells. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 27: 125-129.
- Tasman-Jones C, Owen R, Jones A (1982) Semipurified dietary fiber and small-bowel morphology in rats. *Digestive Diseases and Sciences* 27: 519-524.
- Thielemans MF, Francois E, Bodart C, Thewis A, Dupont F, Lallemand L, Malburny C (1978) Mesure du transit gastrointestinal chez le porc a l'aide des radiolanthanides: Comparaison avec le mouton. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 18(2A): 237-247.
- Thomas P, Pouydebat E, Hardy I, Aujard F, Ross CF, Herrel A (2015) Sexual dimorphism in bite force in the grey mouse lemur. *Journal of Zoology* 296(2): 133-138.
- Thompson DQ (1965) Food preferences of the meadow vole (*Microtus pennsylvanicus*) in relation to habitat affinities. *American Midland Naturalist* 74(1): 76-86.
- Toepfer K (1891) Die morphologie des magens der rodentia. *Morphologisches Jahrbuch* 17: 380-407.
- Tootian Z, Sadeghinezhad J, Sheibani MT, Fazelipour S, De Sordi N, Chiocchetti R (2012) Histological and mucin histochemical study of the small intestine of the Persian squirrel (*Sciurus anomalus*). *Anatomical Science International* 88 (1): 38-45.
- Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS (2018) *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. 2nd edn. Elsevier/Academic Press, London
- Tullberg T (1899) Über das System der Nagethiere, eine phylogenetische Studie. *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis*, 18 (3): 1-514.

- Turnbull WD (1970) Mammalian masticatory apparatus. Field Museum Press, Chicago
- Udén P, Colucci PE, Van Soest P (1980) Investigation of Chromium, Cerium and Cobalt as Markers in Digesta. Rate of Passage Studies. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 31: 625-632.
- Ugolev AM (1965) Membrane (contact) digestion. *Physiological Reviews* 45: 555-595.
- Ungar PS (2015) Mammalian dental function and wear: A review. *Biosurface and Biotribology* 1 (1): 25-41.
- Van Daele PA, Herrel A, Adriaens D (2008) Biting performance in teeth-digging African mole-rats (*Fukomys*, Bathyergidae, Rodentia). *Physiological and Biochemical Zoology* 82: 40-50.
- Van Soest PJ (1964) Symposium on Nutrition and Forage and Pastures: New Chemical Procedures for Evaluating Forages. *Journal of Animal Science* 23 (3): 838-845.
- Vaughan T, Ryan J, Czaplewski N (2000) *Mammalogy*. 4th edn. Saunders College Publication, Fort Worth
- Veloso C, Bozinovic F (1993) Dietary and Digestive Constraints on Basal Energy Metabolism in a Small Herbivorous Rodent. *Ecology* 74: 2003-2010.
- Verdugo P (1990) Goblet Cells Secretion and Mucogenesis. *Annual Review of Physiology* 52: 157-176.
- Vickery W, Daoust J, Wartiti A, Peltier J (1994) The effect of energy and protein content on food choice by deer mice, *Peromyscus maniculatus* (Rodentia). *Animal Behaviour* 47: 55-64.
- Voet D, Voet JG, Pratt CW (2016) *Fundamentals of Biochemistry*. 5th edn. John Wiley & Sons, New York
- Vorontsov NN (1962) The ways of food specialization and evolution of the alimentary system in Muroidea. *Symposium Theriologicum* 1960: 360-377.
- Vorontsov NN (1967) *Evolyutsiya pishchevaritel'noi sistemy mysheobraznykh gryzunov* (Evolution of the Digestive System of Muroid Rodents). Nauka, Novosibirsk
- Vorontsov NN (1979) *Evolution of the Alimentary System in Myomorph Rodents*. Smithsonian Institution, Washington D.C. & Nat. Sci. Foundation, New Delhi



- Walters J, Marais S, Johnson O, Bennet MC, Alagaili AN, Mohammed OB, Kotze SH (2014) The comparative gastrointestinal morphology of five species of muroid rodents found in Saudi Arabia. *Journal of Morphology* 275: 980-990.
- Wang K, Zhang C, Chen H, Yue Y, Zhang W, Zhang M, Qi X, Fu Z (2019) Karst landscapes of China: patterns, ecosystem processes and services. *Landscape Ecology* 34: 2743 - 2763.
- Warner ACI (1981) Rate of passage of digesta through the gut of mammals and birds. *Nutrition Abstracts and Reviews* 51B: 789-820.
- Warner ACI, Stacy BD (1968) The fate of water in the rumen. 1. A critical appraisal of use of soluble markers. *British Journal of Nutrition* 22: 369-387.
- Waterhouse GR (1839) Observations on the Rodentia with a view to point out groups as indicated by the structure of the crania in this order of mammals. *Magazine of Natural History* 3: 90-96.
- Wenninger PS, Shipley LA (2000) Harvesting, rumination, digestion, and passage of fruit and leaf diets by a small ruminant, the blue duiker. *Oecologia* 123: 466-474.
- Wilczyńska B (1998) Anatomical structure and size of large intestinal mucosa in selected species of shrews and rodents. *Acta Theriologica* 43: 363-370.
- Williams SH, Peiffer E, Ford S (2009) Gape and bite force in the rodents *Onychomys leucogaster* and *Peromyscus maniculatus*: does jaw-muscle anatomy predict performance? *Journal of Morphology* 270: 1338-1347.
- Wilman H, Belmaker J, Simpson J, de la Rosa C, Rivadeneira MM, Jetz W (2014) EltonTraits 1.0: Species-level foraging attributes of the world's birds and mammals. *Ecology* 95 (7): 2027-2027.
- Wilson DE, Lacher TE, Mittermeier AR (2017) *Handbook of the Mammals of the World*. Vol. 7. Rodents II, 1st edn. Lynx Edicions, Barcelona
- Wilson R (1956) Dental Formula in the Muroidea. *Journal of Mammalogy* 37: 295-297.
- Wood AE (1965) Grades and clades among rodents. *Evolution* 19: 115-130.
- Woodall PF (1989) The effects of increased dietary cellulose on the anatomy, physiology and behaviour of the captive water voles, *Arvicola terrestris* (L.) (Rodentia: Microtinae). *Comparative Bio-chemistry and Physiology A* 94: 615-621.

Wroe S, McHenry C, Thomason J (2005) Bite club: comparative bite force in big biting mammals and the prediction of predatory behaviour in fossil taxa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 619-625.

Young B, Heath JW (2003) Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. 4th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh

Young M, Theurer B, Ogden P, Nelson G, Hale W (1976) Dysprosium as an indicator in cattle digestion trials. *Journal of Animal Science* 43 (6): 1270-1279.

Zagorodnyuk (1990) Karyotype variability and systematics of the Arvicolini (Rodentia) *Vestnik Zoologii* 2: 26-37.

Zenuto RR, Malizia AI, Busch C (1999) Sexual size dimorphism, testes size and mating system in two populations of *Ctenomys talarum* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Natural History* 33: 305-314.

Zenuto RR, Vassallo AI, Busch C (2001) A method to study social and reproductive behaviour of subterranean rodents in captivity. *Acta Theriologica* 46: 161-170.

## 10. PRILOZI

**Prilog 1.** Postupak pripreme terarija i životinja za testiranje brzine probave pomoću kemijskih markera.

Koraci	Opis postupka i potrebnih materijala.
Korak 1. Pripremiti pokusne terarije	<ul style="list-style-type: none"><li>• izvaditi pokusnu jedinku iz terarija i izvagati je prije premještanja</li><li>• staviti jedinku u prikladni pričuvni terarij</li></ul>
Korak 2. Čišćenje terarija	<ul style="list-style-type: none"><li>• izvaditi sve sadržaje terarija (kamenje, kućice od terakote, grane)</li><li>• oprati terarij sapunicom i toplom vodom, pa ga dobro osušiti i dezinficirati terarij odgovarajućim sredstvom</li></ul>
Korak 3 Čišćenje sadržaja terarija	<ul style="list-style-type: none"><li>• oprati sve predmete (kamenje, kućice od terakote, grane) sapunom i toplom vodom i dezinficirati</li></ul>
Korak 4. Punjenje terarija	<ul style="list-style-type: none"><li>• staviti čistu piljevinu u terarij</li><li>• vratiti sve predmete (kamenje, kućice od terakote, grane) u terarij</li><li>• kamenje složiti tako da se mogu provlačiti i skrivati, a grane tako da se mogu penjati</li><li>• ne stavljati lišće i sl. u terarij tako da se može lakše pratiti gdje jedinke jedu i obavljaju nuždu</li><li>• vratiti pokusnu jedinku u terarij</li></ul>
Korak 5. Priprema pokusnih jedinki	<ul style="list-style-type: none"><li>• odrediti mužjake i ženke koji će biti korišteni u pokusu - 7 ženki i 7 mužjaka + 1 mužjak kao rezerva, ukupno 15 jedinki</li><li>• pokusne jedinke ostaviti na aklimatizaciji u novim ili očišćenim terarijima 7 dana prije početka pokusa</li><li>• dodijeliti svakoj pokusnoj jedinki broj (1-15) koji će označavati redoslijed nuđenja peletima obilježenima kromom i kobaltom, kao i redoslijed skupljanja uzoraka fecesa</li><li>• tijekom perioda aklimatizacije, svakodnevno pratiti pokusne jedinke, bilježeći gdje obavljaju nuždu i eventualne druge napomene</li><li>• svaki dan osigurajte svježu vodu i hranu za pokusne jedinke</li><li>• 24 sata prije početka pokusa, ukloniti svu hranu pokusnim jedinkama (uključujući hranu koju su spremile u kućicama) i osigurati im svježu vodu</li></ul>

**Prilog 2.** Postupak za pripremu za sakupljanje uzoraka i skupljanje uzoraka za testiranje brzine probave pomoću kemijskih markera. na ostalim stranicama.

Koraci	Opis postupka i potrebnih materijala.
Korak 1. Priprema materijala za pokus	<ul style="list-style-type: none"> <li>• označiti mikroeprove za svaki uzorak (na naljepnice napisati šifru životinje (ID), redni broj pokusne jedinice (1-15), datum, redni broj sata za pojedini uzorak (4h-48h) te ostaviti mjesto gdje će se upisati točno vrijeme u koje je pojedini uzorak skupljen (sati i minute), naljepnice još ne lijepiti na mikroeprove</li> <li>• na samu mikroeprovu vodootpornim flomasterom naznačiti skraćenu šifru uzorka, za slučaj da se naljepnice odlijepe, šifra treba biti u obliku: redni broj pokusne jedinice/redni broj sata (npr. 8/10h)</li> <li>• izvagati pelete obilježene kromom i kobaltom, svaki prebaciti u posebnu posudu s poklopcem i dodijeliti pojedinoj pokusnoj jedinici, odnosno svaku posudu označiti brojem (1-15) jedinice kojoj je pojedini pelet dodijeljen</li> </ul>
Korak 2. Davanje označenih peleta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• očistiti mjesto gdje svaka pokusna jedinica obavlja nuždu – ukloniti sav feces zajedno s piljevinom koja je ispod, staviti čistu piljevinu na to mjesto</li> <li>• unaprijed određenim redoslijedom (1-15) ponuditi svakoj pokusnoj jedinici obilježen pelet</li> <li>• tijekom prva 4h obilaziti pokusne jedinice svakih 60 min prva 2h, zatim svakih 30 min, locirati pelet i paziti koliko i jesu li ga pojeli, zapisivati napomene u pripremljenu tablicu</li> <li>• zabilježiti točno vrijeme kada je primijećeno da je pelet pojeđen</li> <li>• ukoliko pokusne jedinice ne pojedu pelet unutar prva 4h, eventualni ostatak peleta ukloniti iz terarija i izvagati ga te zabilježiti masu</li> <li>• kada su svi obilježeni peleti pojedeni ili uklonjeni iz pokusnih terarija, dati pokusnim jedinkama svježu hranu i vodu</li> </ul>
Korak 3. Sakupljanje uzoraka fecesa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• skupiti uzorke* fecesa svaka 4h tijekom 48h istim redoslijedom kojim su pokusnim jedinkama ponuđeni peleti (1-15), zabilježiti točno vrijeme uzimanja uzorka (sati i minute) na naljepnicu</li> <li>• čistom pincetom (dezinficirana etanolom i osušena prije svakog uzorka) uzeti feces s vrha hrpice i staviti u čistu mikroeprovu, napuniti ju do kraja, svaku podjednako i paziti da svaki uzorak bude podjednake mase (oko 1 g), svaki uzorak izvagati i zabilježiti masu u pripremljene tablice</li> <li>• uzeti uzorak od svake pokusne jedinice</li> <li>• nakon uzimanja uzorka za pojedini sat, ukloniti ostatak fecesa iz terarija svake pokusne jedinice</li> <li>• sve eventualne napomene vezano za uzorke bilježiti u pripremljene tablice</li> </ul>

**Prilog 2.** – nastavak. Postupak za pripremu za sakupljanje uzoraka i skupljanje uzoraka za testiranje brzine probave pomoću kemijskih markera.

Koraci	Opis postupka i potrebnih materijala.
Korak 4. Zamrzavanje i čuvanje uzoraka fecesa	<ul style="list-style-type: none"><li>• nakon što su skupljeni svi uzorci za pojedini sat, spremite ih u unaprijed označene vrećice za taj sat i staviti u zamrzivač</li><li>• nakon što su skupljeni i zamrznuti svi uzorci (nakon 48h), prebaciti ih u nove obilježene vrećice tako da svi uzorci za pojedinu jedinku budu u istoj vrećici</li><li>• grupirane i označene uzorke čuvati u zamrzivaču do analize, vratiti pokusnu jedinku u terarij</li></ul>

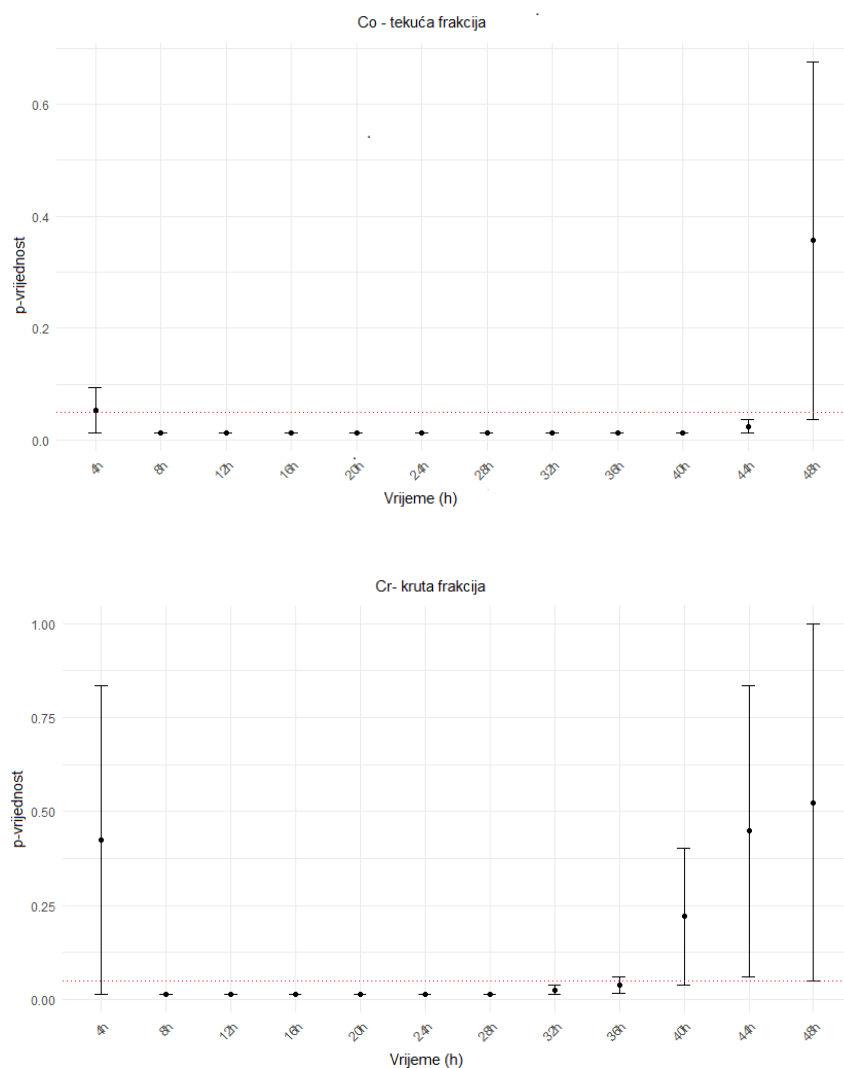
**Prilog 3.** Glavni radni parametri spektrometra ICP-AES

Parametar	Vrijednost
Instrument	Thermo Fisher iCAP6300 Duo
Snaga RF-a	1150 W
Protok rashladnog plina	12 L/min
Protok plina za uzorak	0,65 L/min
Protok pomoćnog plina	0,5 L/min
Sustav za uvođenje uzorka	- automatski uzorkivač CETAC ASX-260 - koncentrični raspršivač s vrtložnom komorom za raspršivanje
Brzina peristaltičke pumpe	45 okr/min
Cijevčice peristaltičke pumpe	- uzorak: narančasto-bijela - ispiranje: bijelo-bijela
Vrijeme uvođenja uzorka	45 s
Vrijeme ispiranja	60 s
Analiza plazme ( <i>Plasma view</i> )	Automatska ( <i>Auto View</i> )
Maksimalno vrijeme mjerenja	- niske valne duljine (160-230 nm): 15 s - visoke valne duljine (230-847 nm): 5 s
Mjerene linije (nm)	Co – 228,616 Cr – 205,552
Kalibracijske otopine	- 0; 1; 10; 100; 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ - zakiseljene s $\text{HNO}_3$ , <i>supra pur</i> , 1% (v/v)
Otopina za ispiranje sustava	Dušična kiselina, $\text{HNO}_3$ , <i>supra pur</i> , 1% (v/v)

**Prilog 4.** Postupak prikupljanja uzoraka za testiranje probavljivosti.

Koraci	Opis postupka i potrebnih materijala.
Korak 1	Prije odlaska u zoo prikupiti odgovarajući broj falkon epruveta, označiti ih i izvagati na analitičkoj vagi. Također, izvagati na istoj vagi označene vrećice u koje će se skupljati uzorci biljaka. Treba po jedna vrećica za rukohvat biljaka po danu i po dvije falkonice za feces po životinji po danu.
Korak 2	Nakon što se nabere mješavina svježe trave i livadnog miksa, uzeti rukohvat istog, rasporediti po bijeloj podlozi i slikati kako bi se kasnije mogle zabilježiti biljke od kojih je mješavina sastavljena. Na podlogu s biljkama napisati datum i sat slikanja.
Korak 3	Rukohvat mješavine svježe trave i livadnog miksa staviti u prethodno izvaganu i označenu vrećicu za smrzavanje i smrznuti. Tako napunjenu vrećicu vagati na istoj vagi na kojoj se vagala i prazna vrećica.
Korak 4	Feces životinje koja je hranjena tom hranom pokupiti 24 h kasnije u prethodno izvaganu i označenu falkonicu. Tu falkonicu kasnije izvagati na istoj vagi na kojoj smo vagali praznu falkonicu. Paziti da hranjenje i vaganje budu uvijek u isti sat s 24 h razmaka.
Korak 5	Hranu koja nije pojedena sakupiti. Uzeti nasumični uzorak hrane koja je ostala i to staviti u prethodno označenu i izvaganu vrećicu koristeći istu vagu.

**Prilog 5.** Grafikon prikazuje p-vrijednosti dobivene Mann-Whitney U testom (Wilcoxonov rang-sum test) za različite vremenske točke, zajedno s njihovim intervalima pouzdanosti. Na x-osi grafikon prikazuje različite vremenske točke (u satima) u kojima su podaci uzimani (4h, 8h, 12h, itd.), dok y-osi prikazuje p-vrijednosti dobivene iz testa za svaku vremensku točku. Crne točke predstavljaju srednje p-vrijednosti za svaku vremensku točku, a vertikalne linije (brkovi) iznad i ispod svake točke prikazuju 95% intervale pouzdanosti za te p-vrijednosti. Crvena isprekidana linija na grafikonu označava razinu značajnosti ( $p = 0,005$ ). Vrijednosti ispod ove linije ukazuju na statistički značajnu razliku između bazalne koncentracije markera u fecesu i koncentracije markera u fecesu nakon testiranja.





**Prilog 6.** Maksimalna sila ugriza, tjelesna masa i omjeri sile ugriza i tjelesne mase među različitim glodavcima, poredani od najmanje prema najvećem omjeru sile ugriza i tjelesne mase, uzimajući u obzir trofičku nišu. (1) Becerra i sur. (2014.); (2) Robins (1977.); (3) Williams i sur. (2009.); (4) Freeman i Lemen (2008a.); (5) Van Daele i sur. (2008.); (6) Parmenter i sur. (2019.); (7) Ginot i sur. (2018.); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	Prosječna sila ugriza (N)	Prosječna masa tijela (g)	Hranidbene navike	Omjer sile ugriza i tjelesne mase (N/kg)	Ref.
<i>Chinchilla laniger</i>	23,50	639,00	H	36,78	1
<i>Apodemus sylvaticus</i>	42,40	22,63	G, O	42,40	7
<i>Mus spretus</i>	55,12	16,29	G, O	55,12	7
<i>Rattus norvegicus</i>	47,00	555,00	G, O	84,68	2
<i>Neotoma floridana</i>	30,26	321,00	H, G	94,27	1
<i>Octodon degus</i>	21,90	206,00	H	106,31	3
<i>Sciurus niger</i>	72,95	588,00	H, O	124,06	4
<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	21,50	144,00	G, O	149,31	4
<i>Mus musculus</i>	5,36	28,60	O	187,41	4
<i>Sigmodon hispidus</i>	19,87	105,00	G, O	189,24	4
<i>Ctenomys australis</i>	68,70	315,00	H	218,10	4
<i>Dipodomys ordii</i>	13,98	63,00	G	221,90	5
<i>Zapus hudsonius</i>	7,63	24,50	G, O	311,43	4
<i>Heterocephalus glaber</i>	20,48	64,67	H	316,68	7
<i>Geomys bursarius</i>	50,61	153,00	H	330,78	4
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>25,84</b>	<b>73,67</b>	<b>H</b>	<b>350,75</b>	<b>ovo istraživanje</b>
<i>Microtus ochrogaster</i>	12,88	34,00	H	378,82	6
<i>Fukomys whytei</i>	31,00	78,00	H	397,44	4
<i>Fukomys micklei</i>	41,00	89,00	H	460,67	5
<i>Onychomys leucogaster</i>	24,70	50,00	O, I	494,00	4
<i>Peromyscus maniculatus</i>	12,90	21,00	G, I	614,29	3
<i>Reithrodontomys megalotis</i>	7,67	12,00	G	639,17	4
<i>Perognathus flavescens</i>	4,64	6,50	H, G	713,85	4

\* H – biljojedi, G – sjemenojedi; I – kukcojedi, O – svejedi

**Prilog 7.** Maksimalna sila ugriza, tjelesna masa i omjeri sile ugriza i tjelesne mase među spolovima između različitih vrsta glodavaca. (1) Becerra i sur. (2011.); (2) Becerra i sur. (2013.); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	Spol	Prosječna sila ugriza (N)	Prosječna masa tijela (g)	Omjer sile ugriza i tjelesne mase (N/kg)	Ref.
<i>Ctenomys tuconax</i>	M	23,50	639,00	144,04	2
<i>Ctenomys tuconax</i>	Ž	47,00	555,00	136,20	2
<i>Ctenomys talarum</i>	M	30,26	321,00	216,03	1
<i>Ctenomys talarum</i>	Ž	21,90	206,00	208,73	1
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>M</b>	<b>24,91</b>	<b>72,67</b>	<b>345,62</b>	<b>ovo istraživanje</b>
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>Ž</b>	<b>28,63</b>	<b>73,00</b>	<b>391,35</b>	<b>ovo istraživanje</b>

**Prilog 8.** Postotni udjeli mišića unutar žvačnog sustava laboratorijskog miša (*Mus musculus*) i dinarskog voluhara (*Dinaromys bogdanovi*). Preuzeto i prilagođeno iz Baverstock i sur., 2013.

Žvačni mišići ( <i>m. mandibularis</i> )	Udio mase pojedinog mišića unutar ukupne mase svih žvačnih mišića (%)	
	<i>Mus musculus</i>	<i>Dinaromys bogdanovi</i>
<i>m. masseter superficialis</i>	19,13	14,55
<i>m. masseter profundus</i> (ukupno)	33,32	38,18
<i>m. masseter medialis</i> (ukupno)	8,08	9,09
<i>m. pterygoideus</i> (ukupno)	16,31	9,09
<i>m. pterygoideus internus</i>	11,56	3,64
<i>m. pterygoideus externus</i>	4,74	5,45
<i>m. temporalis</i> (ukupno)	22,44	29,09

**Prilog 9.** Popis vrsta, broj životinja korištenih u istraživanju, hranidbene navike, prosječna tjelesna masa, prosječna masa probavnog trakta te udio prosječne mase probavnog trakta u odnosu na ukupnu tjelesnu masu. (1) Henke i sur. (2018.); (2) Sahd i sur. (2017.); (3) Walters i sur. (2014.); (4) Boonzaier i sur. (2013a.); (5) Heroldova i Janova (2018.); (6) Kotzé i sur. (2006.); (7) Nzalak i sur. (2015.); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	n	Hranidbene navike	Prosječna tjelesna masa (g)	Prosječna masa probavnog trakta (g)	Udio prosječne mase probavnog trakta u odnosu na tjelesnu masu (%)	Ref.
<i>Acomys spinosissimus</i>	10	G, I*	21,11 ± 6,00	4,37 ± 0,70	18,05	4
<i>Acomys dimidiatus</i>	5	O*	34,20 ± 7,85	6,11 ± 2,38	18,56	3
<i>Acomys cahirinus</i>	4	O*	38,00 ± 7,07	6,17 ± 1,57	16,08	3
<i>Rhabdomys dilectus</i>	5	O*	45,80 ± 8,90	3,90 ± 1,10	8,50	1
<i>Rhabdomys pumilio</i>	5	O*	40,00 ± 14,20	4,40 ± 1,50	11,50	1
<i>Aethomys chrysophilus</i>	5	O*	78,20 ± 17,60	6,40 ± 1,20	8,30	1
<i>Lemniscomys rosalia</i>	5	O*	54,40 ± 23,30	3,10 ± 1,40	5,90	1
<i>Cricetomys gambianus</i>	40	O*	1045,00 ± 28,06	58,18 ± 0,89	5,56	7
Srednja vrijednost prosječne mase probavnog trakta svejeda u odnosu na tjelesnu masu (%)					<b>10,62</b>	
<i>Apodemus uralensis</i>	212	G*	x	2,75 ± 1,50	18,00	5
<i>Microtus arvalis</i>	229	H*	x	4,10 ± 2,40	23,00	5
<i>Tachyoryctes splendens</i>	9	H*	157,35 ± 63,47	30,57 ± 24,58	17,42	2
<i>Heliophobius emini</i>	6	H*	143,33 ± 38,50	23,43 ± 7,90	16,89	2
<i>Bathyergus suillus</i>	9	H*	557,33 ± 306,61	64,31 ± 43,88	11,53	6
<i>Meriones libycus</i>	5	H*	80,80 ± 35,51	14,90 ± 7,18	19,72	3
<i>Dipodillus dasyurus</i>	3	H*	33,00 ± 9,85	5,79 ± 9,85	16,83	3
Srednja vrijednost prosječne mase probavnog trakta biljojeda u odnosu na tjelesnu masu (%)					<b>17,56</b>	
<i>Dinaromys bogdanovi</i>	7	H*	<b>67,67 ± 9,45</b>	<b>10,28 ± 2,39</b>	<b>15,19</b>	<b>ovo istraživanje</b>

\* H – biljojed; G – sjemenojed; O – svejed; I - kukcojed.

**Prilog 10.** Prosječni postotni udio duljine (%) anatomski različitih područja probavnog trakta različitih vrsta. (1) Henke i sur. (2018.); (2) Sahd i sur. (2017.); (3) Walters i sur. (2014.) (4) Boonzaier i sur. (2013a.); (5) Kotzé i sur. (2006.); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	n	Hranidbene navike	ŽE**	TCR**	SCR**	DCR**	SCR + DCR**	TCR + SCR**	Prosječna duljina probavnog trakta (mm)	Ref.
<i>Acomys spinosissimus</i>	10	G, I*	19,92	56,64	11,74	17,70	29,45	86,08	320,90	4
<i>Acomys dimidiatus</i>	5	O*	12,42	50,76	12,55	24,28	39,20	63,31	509,40	3
<i>Acomys cahirinus</i>	4	O*	13,58	47,22	13,72	25,49	29,54	60,94	463,20	3
<i>Rhabdomys dilectus</i>	5	O*	13,70	52,70	8,90	24,70	33,50	86,3	462,00	1
<i>Lemniscomys rosalia</i>	5	O*	11,80	47,20	9,60	31,50	41,10	88,20	438,90	1
<i>Aethomys chrysophilus</i>	5	H, G*	12,40	52,60	8,80	26,20	35,10	87,60	626,00	1
<i>Tachyoryctes splendens</i>	9	H*	11,12	37,85	12,11	38,90	51,02	88,87	99,98	2
<i>Heliophobius emini</i>	6	H*	11,20	40,03	16,98	31,79	48,77	88,80	100,00	2
<i>Bathyergus suillus</i>	9	H*	6,80	37,40	14,50	41,30	55,80	51,90	1339,33	5
<i>Meriones libycus</i>	5	H*	10,63	44,77	15,21	29,39	36,83	59,98	698,00	3
<i>Dipodillus dasyurus</i>	3	H*	8,46	62,01	10,14	19,40	29,54	72,15	542,60	3
<i>Dinaromys bogdanovi</i>	7	H*	<b>4,50</b>	<b>58,40</b>	<b>12,29</b>	<b>24,80</b>	<b>37,09</b>	<b>83,21</b>	<b>793,70</b>	ovo istraživanje

\* H – biljojed; G – sjemenojed; O – svejed; I - kukcojed.

\*\* ŽE – želudac; TCR – tanko crijevo; SCR – slijepo crijevo; DCR – debelo crijevo

**Prilog 11.** Usporedba % ukupne duljine crijeva kod vrsta *Microtus pennsylvanicus*, *Neotoma* sp. i *Dinaromys bogdanovi*. Preuzeto i prilagođeno iz Golley, 1960.

Vrsta	Tanko crijevo	Slijepo crijevo	Debelo crijevo
<i>Microtus pennsylvanicus</i>	58,00	18,0	24,00
<i>Neotoma</i> sp.	46,00	7,00	47,00
<i>Dinaromys bogdanovi</i>	<b>61,08</b>	<b>12,87</b>	<b>25,97</b>

**Prilog 12.** Prosječne proporcionalne duljine (%) anatomski različitih područja probavnog trakta simpatrijskih vrsta (Jurić, neobjavljeni podaci); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	n	Hranidbene navike	ŽE**	TCR**	SCR**	DCR**	SCR + DCR**	TCR + SCR**
<i>Myoxus glis</i>	6	G, I*	19,15	44,42	x	36,43	x	x
<i>Eliomys quercinus</i>	6	O*	22,84	47,03	x	30,13	x	x
<i>Apodemus sylvaticus</i>	6	O*	32,28	47,09	5,76	20,63	21,22	24,80
<i>Apodemus epimelas</i>	6	O*	25,33	53,46	6,23	21,22	27,45	59,69
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>7</b>	<b>H*</b>	<b>4,50</b>	<b>58,40</b>	<b>12,29</b>	<b>24,80</b>	<b>37,09</b>	<b>83,21</b>

\* H – biljojed; O – svejed.

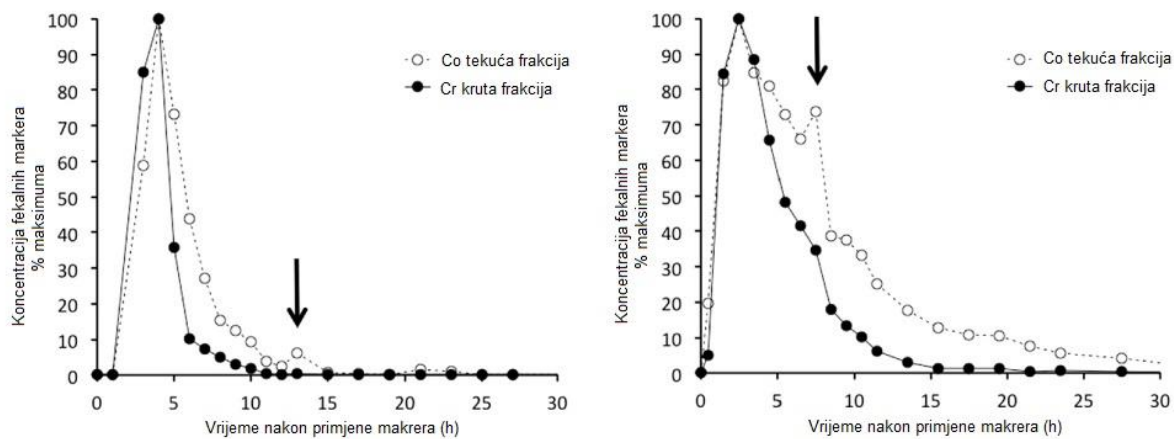
\*\* ŽE – želudac; TCR – tanko crijevo; SCR – slijepo crijevo; DCR – debelo crijevo

**Prilog 13.** Prosječna vremena zadržavanja (MRT) u satima tekuće (markirano Co-EDTA) i krute (markirano Cr) frakcije probave u gastrointestinalnom traktu kod mehanizma "ponovog ispiranja" (eng. "wash back") (A) i "mukozne zamke" (eng. "mucous trap") (B) tipa CSM-a. Preuzeto i preuređeno iz Sakaguchi i sur. (1992a.) (1) Cork i sur. (1999.); (2) Chilcott i Hume (1985.); (3) Foley i Hume (1987.); (4) Cork i Warner (1983.); (5) Krockenberger (1993.); (6) Sakaguchi i sur. (1987.); (7) Sakaguchi i Nabata (1992.) (8) Sakaguchi i sur. (1992b.); (9) Sakaguchi i Ohmura (1992.); (10) Hume i sur. (1993.) (12a – niska razina vlakana; 12b – visoka razina vlakana); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	MRT (h)		MRT <sub>tekuće</sub> / MRT <sub>kruto</sub>	Ref.
	Tekuća frakcija (otopina)	Kruta frakcija (čestice)		
<b>A. „wash-back“ CSM</b>				
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	80,0	16,7	4,79	1
	62,6	38,5	1,29	2
<i>Pseudocheirus peregrinus</i>	63	35	1,80	3
	206,0	102,6	2,01	2
<i>Petaurides volans</i>	51	23	2,22	4
<i>Phascolarctos cinereus</i>	200	130	1,54	5
	99	32	3,09	6
<b>B. "mucus trap" CSM</b>				
<i>Cavia porcellus</i>	16,3	15,9	1,03	7
	22,6	30,7	0,74	8
	18,9	20,9	0,90	9
	20,4	17,1	1,19	10
	15,3	15,1	1,01	1
<i>Myocastor coypus</i>	45,0	44,2	1,02	8
<i>Dolichotis patagonum</i>	26,8	27,3	0,98	9
<i>Octodon degus</i>	19,4	15,5	1,25	10
<i>Phyllotis darwini</i>	9,1	8,8	1,03	10
<i>Microtus townsendii</i>	14,8	13,1	1,13	11
<i>Microtus brandti</i>	7,4	5,1	1,45	12a
	7,0	5,9	1,19	12b
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>12,21</b>	<b>11,12</b>	<b>1,10</b>	<b>ovo istraživanje</b>



**Prilog 14.** Obrazac izlučivanja tekuće (markirano Co-EDTA) i krute (markirano Cr) frakcije probave u probavnom traktu kod A. poljske voluharice (*Microtus agrestis*) i B. stepske voluharice (*Lagurus lagurus*). Strelice označavaju sekundarne vrhove markera koji sugeriraju cektrofiju. Preuzeto i preuređeno iz Hagen i sur. (2018.).



**Prilog 15.** Podaci o masi, unosu hrane i probavljivosti za nekoliko vrsta glodavaca i drugih sisavaca. (1) Hagen i sur. (2018.); (2) Rubal i sur. (1995.); (3) Pei i sur. (2001a.); (4) Martino i sur. (2007.); (5) Pei i sur. (2001b.); (6) Drózdź (1968.); (7) Sakaguchi i Ohmura (1992.); (8) Pagan (1998.); istraživanje na dinarskom voluharu (*Dinaromys bogdanovi*).

Vrsta	Masa tijela (g)	Unos ST (g/d <sup>-1</sup> )	ADC ST (%)	ADC MT (%)	ADC SP (%)	ADC SM (%)	ADC SV (%)	Ref.
<i>Microtus agrestis</i>	28,60	9,80	54,00	53,00				1
<i>Lagurus lagurus</i>	19,80	6,60	49,00	48,00				1
<i>Acomys russatus</i>	63,30		89,30					2
<i>Acomys mystacinus</i>	39,50		90,30					2
<i>Meriones unguiculatus</i>	55,60	6,70	78,00	80,10	72,10			3
<i>Ctenomys talarum</i>			82,00					4
<i>Microtus brandti</i>	46,10	8,00	71,70		79,50	68,90		5
<i>Microtus arvalis</i>			93,54	94,02	86,37	86,95	87,82	6
<i>Clethrionomys glareolus</i>			89,75	90,69	78,58	80,16	66,02	6
<i>Apodemus agrarius</i>			91,70	92,13	74,51	83,55	89,74	6
<i>Dolichotis patagonum</i>			68,80	70,00	67,30			7
<i>Cavia porcellus</i>			71,50	71,30	74,40			7
<i>Equus sp.</i>			62,00	88,22	71,00	58,40	43,40	8
<b><i>Dinaromys bogdanovi</i></b>	<b>73,67</b>	<b>56,61</b>	<b>91,59</b>	<b>88,22</b>	<b>91,34</b>	<b>80,79</b>	<b>89,95</b>	<b>ovo istraživanje</b>

\* koeficijent probavljivosti (ADC) suhe tvari (ST), mokre (svježe) tvari (MT), sirovih proteina (SP), masti (SM) i vlakana (SV).

## 11. ŽIVOTOPIS

Maja Jurić (Damjanović) rođena je 05. kolovoza 1985. godine u Zagrebu. Zvanje magistra biologije - ekologije stekla je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu 2010. godine. Profesionalno iskustvo započela je u Zoološkom vrtu grada Zagreba kao nutricionist. Uz iskustvo hranidbe životinja u zatočeništvu razvijala je istraživački rad Zoološkog vrta, osmišljavala i provodila vježbe za studente te bila pozvani predavač u sklopu kolegija Hranidba životinja na Agronomskom fakultetu te Osnove biologije Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Sudjelovala je u razvoju programa za podizanje svijesti javnosti za koji je Zoološki vrt dobio dvije međunarodne nagrade (od Europskog udruženja zooloških vrtova i akvarija). Radno iskustvo rada u Zoološkom vrtu grada Zagreba stiče od 2011. godine do danas i ono uključuje kreiranje hranidbenih programa za sve životinjske vrste unutar Ustanove.

Popis za ovaj rad relevantnih publikacija i sudjelovanja na kongresima:

Damjanović M, Roje V, Marčina N, Beneta D, Lukač M, Lisičić D (2021) Digesta passage rate – small herbivorous mammal as a model: A review. 2. međunarodni znanstveno-stručni skup o gmazovima i egzotičnim životinjama „REPTILIA”.

Ljuština M, Vidatić L, Safner T, Ivanek I, Budinski I, Damjanović M, Lukač M, Lisičić D (2018) Behavioral response of the endemic Martino's vole *Dinaromys bogdanovi* (Martino, 1922) to environmental complexity. *Acta ethologica* 22 (1), 29–38.

Damjanović M, Burslund S, Molloy S, Bračko A, Rendulić M (2018) Cockatoo (Cacatuine) Nutrition Questionnaire. EAZA annual conference.

Lukač M, Prukner-Radovčić E, Gottstein Z, Damjanović M, Ljuština M, Lisičić D, Horvatek Tomić D (2017) Bacterial and fungal flora in faecal samples from the Balkan snow vole (*Dinaromys bogdanovi*) at the Zagreb Zoo. *Journal of Zoo and Aquarium Research* 5 (4).

Damjanović M, King C, Bračko A, Rendulić M (2016) Glossy Ibis (*Plegadis falcinellus*). EAZA annual conference.

Ljuština M, Katanović I, Rezo M, Ivanek I, Damjanović M, Lisičić D (2015) Seasonal differences in food intake, caching and body mass of the endemic Balkan snow vole (*Dinaromys bogdanovi*) in captivity. 12th Croatian Biological Congress with International Participation.