

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tina CENTRIH

**MORFOMETRIČNA ANALIZA SKELETA ČRNEGA  
MOČERILA (*Proteus anguinus parkelj*) Z  
RAZLIČNIMI METODOLOŠKIMI PRISTOPI**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tina CENTRIH

**MORFOMETRIČNA ANALIZA SKELETA ČRNEGA MOČERILA  
(*Proteus anguinus parkelj*) Z RAZLIČNIMI METODOLOŠKIMI  
PRISTOPI**

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**MORFOMETRIC ANALYSIS OF THE SKELETAL SYSTEM OF THE  
BLACK OLM (*Proteus anguinus parkelj*) USING VARIOUS  
METHODOLOGICAL APPROACHES**

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo v laboratoriju Katedre za zoologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Snemanje z metodo magnetne resonance je potekalo na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko trdne snovi. Snemanje z metodo računalniške tomografije je potekalo na Kliničnem oddelku za nevrologijo Univerzitetno kliničnega centra v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Borisa Buloga.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Cene FIŠER

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: doc. dr. Petra GOLJA

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Boris BULOG, mentor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

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

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tina Centrih

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK 591.485:57.08:597.92(043.2)=163.6
- KG morfometrična analiza/skeletni sistem/črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*)/presvetlitvene tehnike/računalniška tomografija/magnetna resonanca
- AV CENTRIH, Tina
- SA BULOG, Boris (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2011
- IN MORFOMETRIČNA ANALIZA SKELETA ČRNEGA MOČERILA  
(*Proteus anguinus parkelj*) Z RAZLIČNIMI METODOLOŠKIMI PRISTOPI
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XVIII, 118 str., 8 pregl., 117 sl., 3 pril., 41 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Pri morfometrični analizi skeleta črnega močerila (*Proteus anguinus parkelj*) smo preizkusili klasične in sodobne tehnike, ki omogočajo raziskave na skeletnem sistemu. Preizkusili smo klasično metodo presvetljevanja tkiv ter sodobni metodi magnetno resonanco (MRI) in računalniško tomografijo (CT). Pri uporabi presvetlitvenih tehnik smo koščene elemente obarvali z alizarinom ter jih tako napravili boljše prepoznavne in dobili jasnejši vpogled v skeletne elemente lobanje, oplečja in okolčja ter v število in obliko repnih vretenc pri črnem močerilu. Z metodo računalniške tomografije smo izdelali tridimenzionalne modele okostij močerilov, ki so omogočili podrobnejši vpogled v obliko lobanjskih kosti, koščene elemente oplečja in okolčja ter obliko in število vretenc v posameznih regijah hrbtenice. S pomočjo omenjenih modelov smo izmerili in ovrednotili večje lobanjske kosti, glavne elemente visceralnega skeleta, propodialna elementa humerus (nadlahtnica) in femur (stegenica) ter vsa vretenca, razen najmanjših repnih vretenc. Izračunani korelacijski koeficienti so potrdili našo hipotezo, da so izmerjeni elementi skeleta (kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in stegenice) v pozitivni linearni odvisnosti glede na telesno dolžino črnih močerilov. Prav tako smo s pomočjo CT-posnetkov določili prostornino kalcija (Ca) v kostnem tkivu močerilov. Na podlagi pričujočega vzorca statistično značilne razlike v prostorninah Ca med pigmentirano in nepigmentirano podvrsto močerila nismo ugotovili. Magnetna resonanca se ni izkazala za tako uspešno metodo, kot smo sprva pričakovali. Tridimenzionalnega modela okostja iz nastalih slik ni bilo mogoče izdelati.

### KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC 591.485:57.08:597.92(043.2)=163.6
- CX morphometric analysis/skeletal system/black olm (*Proteus anguinus parkelj*)/clearing and staining method/computed tomography/magnetic resonance imaging
- AU CENTRIH, Tina
- AA BULOG, Boris (mentor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2011
- TI MORFOMETRIC ANALYSIS OF THE SKELETAL SYSTEM OF THE BLACK OLM (*Proteus anguinus parkelj*) USING VARIOUS METHODOLOGICAL APPROACHES
- DT Graduation Thesis, University studies
- NO XVIII, 118 p., 8 tab., 117 fig., 3 ann., 41 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB For the morphometric analysis of the skeletal system of the black olm we applied traditional and modern techniques which enable the study of the skeletal system. Methods we applied were the clearing and staining method (CS) and the modern techniques of magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT). With CS we cleared the bodies of black specimens and stained the bones with alizarin. This allowed us to achieve a detailed view of the bony elements of the skeletal system. With images acquired with CT we constructed three-dimensional models of olm skeletons. These models provided a detailed view of the skull, the pectoral and the pelvic girdle and the form and number of vertebrae. Using these models we were able to measure the larger bones of the skull, the bony elements of the splanchnocranium, the propodial elements humerus and femur and all the vertebrae, except for the smallest caudal vertebrae. Statistics confirmed our hypothesis that the measured elements of the skeletal system (the condilo-basal length and the length of humerus and femur) showed a positive linear correlation in comparison to the body length of the black olms. We also used CT images to examine the calcium (Ca) content in the bone tissues of the examined olms. On the basis of our sample, statistically significant differences in Ca content between the black and the white subspecies were not found. MRI has proven not to be as successful as initially expected. Three-dimensional models of the skeleton could not be made from the resulting images.

## KAZALO VSEBINE

	str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC.....	XV
KAZALO PRILOG .....	XVI
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....	XVII
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA .....	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE.....	2
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ČLOVEŠKA RIBICA ( <i>PROTEUS ANGUINUS</i> ).....	3
2.1.1 Evolucija.....	3
2.1.2 Črni močeril ( <i>Proteus anguinus parkelj</i> ).....	4
2.1.3 Ogroženost in varstvo.....	5
2.2 SKELET DVOŽIVK .....	6
2.2.1 Splošni pregled skeletnih elementov pri dvoživkah.....	6
2.2.2 Skeletne posebnosti repatih dvoživk in močerila .....	8
2.2.3 Zgodovinski pregled raziskav na skeletu močerila.....	13
2.3 PRESVETLITVENE TEHNIKE .....	16
2.4 TRIDIMENZIONALNO MODELIRANJE .....	18
2.4.1 Magnetna resonanca .....	19

2.4.2 Računalniška tomografija .....	20
<b>3 MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>23</b>
3.1 POSKUSNE ŽIVALI.....	23
3.2 PRESVETLITVENE TEHNIKE .....	25
3.2.1 Kemikalije .....	25
3.2.2 Izbira metod.....	25
3.2.3 Priprava nepigmentirane podvrste močerila (P95).....	26
3.2.4 Priprava pigmentirane podvrste močerila (J1 in J'93) .....	27
3.3 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA.....	28
3.3.1 Merjenje prostornine kalcija v kostnem tkivu močerilov .....	30
3.4 MAGNETNA RESONANCA .....	31
<b>4 REZULTATI.....</b>	<b>32</b>
4.1 PRESVETLITVENE TEHNIKE .....	32
4.2 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA.....	38
4.2.1 Posnetki tridimenzionalnih modelov okostij močerilov.....	38
4.2.2 Opisna statistika izmerjenih elementov skeleta.....	88
4.2.2.1 Telesna dolžina.....	88
4.2.2.2 Kondilo-bazalna dolžina.....	89
4.2.2.3 Humerus .....	89
4.2.2.4 Femur.....	90
4.2.2.5 Mandibularni lok .....	90
4.2.2.6 Squamosum .....	91
4.2.2.7 Ceratohyale.....	91
4.2.2.8 Ceratobranchiale I .....	92
4.2.2.9 Epibranchiale I.....	92
4.2.3 Odvisnost med izbranimi elementi skeleta.....	93
4.2.4 Sorazmernostni količniki.....	99
4.2.5 Štetje vretenc .....	101
4.2.6 Merjenje prostornine kalcija v kostnem tkivu močerilov.....	102
4.3 MAGNETNA RESONANCA .....	104

<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>105</b>
5.1 RAZPRAVA.....	105
5.1.1 Presvetlitvene tehnike.....	105
5.1.2 Računalniška tomografija.....	106
5.1.3 Magnetna resonanca .....	109
5.2 SKLEPI.....	111
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>112</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>114</b>



## KAZALO SLIK

	str.
<b>Slika 1:</b> Skelet repate dvoživke.....	9
<b>Slika 2:</b> Lateralni pogled na lobanjo močerila (Dolivo-Dobrovolsky, 1926). .....	9
<b>Slika 3:</b> Ventralni pogled na visceralni skelet nektura (Wischnitzer, 1993).....	11
<b>Slika 4:</b> Lobanji črnega (levo) in belega (desno) močerila (Sket, 1994). .....	14
<b>Slika 5:</b> Zadnja kavdalna vretenca pri črnem (a) in belem (b, c) močerilu (Sket in Arntzen, 1994). .....	15
<b>Slika 6:</b> Potek spiralnega skeniranja (Kalender, 2006). .....	22
<b>Slika 7:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na skelet lobanje .....	33
<b>Slika 8:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na dentarno kost spodnje čeljusti.....	33
<b>Slika 9:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Anteriorni pogled na atlas. ....	34
<b>Slika 10:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Posteriorni pogled na atlas.....	34
<b>Slika 11:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Ventralni (v) in dorzalni (d) pogled na trupni vretenci.....	35
<b>Slika 12:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na zaporedna trupna vretenca.....	35
<b>Slika 13:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Lateralni pogled na zaporedna repna vretenca.....	36
<b>Slika 14:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Lateralni pogled na zadnja repna vretenca .....	36
<b>Slika 15:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Lateralni pogled na oplečje .....	37
<b>Slika 16:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin .....	40
<b>Slika 17:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	40
<b>Slika 18:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	41
<b>Slika 19:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	41

<b>Slika 20:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	42
<b>Slika 21:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	42
<b>Slika 22:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	43
<b>Slika 23:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	43
<b>Slika 24:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	44
<b>Slika 25:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	44
<b>Slika 26:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	45
<b>Slika 27:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	45
<b>Slika 28:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	46
<b>Slika 29:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	46
<b>Slika 30:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	47
<b>Slika 31:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	47
<b>Slika 32:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	48
<b>Slika 33:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	48
<b>Slika 34:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	49
<b>Slika 35:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	49

<b>Slika 36:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	50
<b>Slika 37:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	50
<b>Slika 38:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	51
<b>Slika 39:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	51
<b>Slika 40:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	52
<b>Slika 41:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	52
<b>Slika 42:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	53
<b>Slika 43:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	53
<b>Slika 44:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	54
<b>Slika 45:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	54
<b>Slika 46:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	55
<b>Slika 47:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	55
<b>Slika 48:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	56
<b>Slika 49:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	56
<b>Slika 50:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	57
<b>Slika 51:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	57

<b>Slika 52:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	58
<b>Slika 53:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	58
<b>Slika 54:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	59
<b>Slika 55:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	59
<b>Slika 56:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	60
<b>Slika 57:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	60
<b>Slika 58:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	61
<b>Slika 59:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	61
<b>Slika 60:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	62
<b>Slika 61:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	62
<b>Slika 62:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin .. ..	63
<b>Slika 63:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	63
<b>Slika 64:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	64
<b>Slika 65:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	64
<b>Slika 66:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin.. ..	65
<b>Slika 67:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.. ..	65

<b>Slika 68:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	66
<b>Slika 69:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	66
<b>Slika 70:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	67
<b>Slika 71:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	67
<b>Slika 72:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	68
<b>Slika 73:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	68
<b>Slika 74:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	69
<b>Slika 75:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	69
<b>Slika 76:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	70
<b>Slika 77:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	70
<b>Slika 78:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	71
<b>Slika 79:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	71
<b>Slika 80:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	72
<b>Slika 81:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	72
<b>Slika 82:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	73
<b>Slika 83:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	73

<b>Slika 84:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin .....	74
<b>Slika 85:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	74
<b>Slika 86:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	75
<b>Slika 87:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin .....	75
<b>Slika 88:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	76
<b>Slika 89:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	76
<b>Slika 90:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	77
<b>Slika 91:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin .....	77
<b>Slika 92:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin .....	78
<b>Slika 93:</b> Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. ....	78
<b>Slika 94:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	79
<b>Slika 95:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	79
<b>Slika 96:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	80
<b>Slika 97:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin .....	80
<b>Slika 98:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	81
<b>Slika 99:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	81

<b>Slika 100:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	82
<b>Slika 101:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	82
<b>Slika 102:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	83
<b>Slika 103:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	83
<b>Slika 104:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	84
<b>Slika 105:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	84
<b>Slika 106:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	85
<b>Slika 107:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	85
<b>Slika 108:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. ....	86
<b>Slika 109:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	86
<b>Slika 110:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	87
<b>Slika 111:</b> Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin.....	87
<b>Slika 112:</b> Odvisnost med KBD in telesno dolžino .....	94
<b>Slika 113:</b> Odvisnost med dolžino nadlahtnice in telesno dolžino .....	95
<b>Slika 114:</b> Odvisnost med dolžino stegenice in telesno dolžino.....	96
<b>Slika 115:</b> Odvisnost med dolžino nadlahtnice in KBD .....	97
<b>Slika 116:</b> Odvisnost med dolžino stegenice in KBD.....	98
<b>Slika 117:</b> MRI posnetek nepigmentirane podvrste močerila (P111). Ventralni pogled na skelet.....	104

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
<b>Preglednica 1:</b> Podatki o poskusnih živalih.. .....	24
<b>Preglednica 2:</b> Osnovne statistične vrednosti izmerjenih elementov skeleta v vzorcu črnih močerilov. ....	88
<b>Preglednica 3:</b> Izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti skupaj s stopnjo značilnosti za izbrane spremenljivke v vzorcu črnih močerilov .....	93
<b>Preglednica 4:</b> Izračunani deleži sorazmernostnih količnikov za vzorec črnih močerilov. ....	99
<b>Preglednica 5:</b> Izračunani deleži sorazmernostnih količnikov za vzorec belih močerilov. ....	100
<b>Preglednica 6:</b> Število trupnih vretenc za vzorec črnih močerilov .....	101
<b>Preglednica 7:</b> Prostornina kalcija (v mm <sup>3</sup> ) v kostnem tkivu belih močerilov .....	102
<b>Preglednica 8:</b> Prostornina kalcija (v mm <sup>3</sup> ) v kostnem tkivu črnih močerilov .....	103



## KAZALO PRILOG

**Priloga A:** Protokol priprave nepigmentirane podvrste močerila P95

**Priloga B:** Protokol priprave pigmentirane podvrste močerila J1 in J'93

**Priloga C:** Izmerjene vrednosti izbranih skeletnih elementov za vzorec črnih močerilov

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a – atlas

an – angulare

bbr – basibranchiale

cbr – ceratobranchiale

ce – centrum

chy – ceratohyale

con – condylus occipitalis

conv – vezno mesto (sklepna površina) za condylus occipitalis

cv – cervikalno vretence

d – dorzalno

den – dentare

epb – epibranchiale

f – femur

fī – fibula

fr – frontale

h – humerus

hbr – hypobranchiale

hhy – hypohiale

hk – hrbtenični kanal

hl – hemalni lok

ht – hemalni trn

il – ilium

is – ishium

mc – metacarpalia

mt – metatarsalia

nl – nevralni lok

nt – nevralni trn

opo – opisthotic

pa – parietale

pac – prearticulare

pc – procoracoid

ph – phalange

pip – puboischiatna plošča

pmx – premaxilla

poz – postzygapophysis

pp – pterygopalatinum

prz – prezygapophysis

ps – parasphenoid

q – quadratum

r – radius

sc – scapula

sq – squamosum

sv – sakralno vretenca

ti – tibia

tp – transversalni processus

tv – trupna vretenca

u – ulna

v – ventralno

vo – vomer

## 1 UVOD

Človeška ribica (*Proteus anguinus*) je edini jamski vretenčar v Evropi. Poznamo dve podvrsti človeške ribice. Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) je pigmentirana podvrsta močerila, ki živi le v podzemlju v ožji okolici Črnomlja in je belokranjski endemit (Bulog in Sket, 2004). Pigmentirana podvrsta je bila kmalu po odkritju deležna večje pozornosti in opravljene so bile raziskave, ki so med drugim vključevale primerjavo različnih morfometričnih parametrov, med katerimi so bile tudi primerjave elementov okostja med belo in črno podvrsto. Pri tem je bil zajet le manjši vzorec črnih živali. Kasneje so bile raziskave na močerilu usmerjene predvsem na preučevanje funkcionalno morfoloških značilnosti prebavnega trakta, čutilnih organov ter oogeneze in nadaljnje analize na skeletu niso bile opravljene (Bizjak-Mali, Bulog 2004; Bulog 2007; Prelovšek, Bizjak-Mali, Bulog 2008; Schlegel, Steifartz, Bulog, 2009; Bizjak-Mali, Bulog 2010).

Morfometrične podatke o skeletu so v preteklosti pridobivali s klasičnimi metodami, kot so izolacija okostja in priprava barvnih preparatov. Dandanes nam računalniška tehnologija omogoča načine osnovne anatomske analize, ki ne zahtevajo žrtvovanja živali in zahtevne izolacije organov. S pomočjo tridimenzionalne rekonstrukcije lahko rekonstruiramo posamezne kosti ali celotno okostje ter na ta način pridobljeni tridimenzionalni objekt v virtualnem prostoru vrtimo v vseh smereh, ga ogledujemo z vseh perspektiv ter s pomočjo ustrezne programske opreme tudi izmerimo izbrane morfometrične parametre. Pri morfometrični analizi skeleta črnega močerila smo se odločili za souporabo tako klasičnih presvetlitvenih metod kot sodobnih računalniških tehnik. Z njihovo primerjavo želimo ugotoviti, ali so primerne in kako dobre rezultate nam lahko zagotovijo.

Sodobni metodi magnetna resonanca (MRI) in računalniška tomografija (CT) sta zelo uporabni predvsem zaradi neinvazivnosti, torej za preiskavo ni potrebno žrtvovati. To je še posebej uporabno pri morfometričnih raziskavah na okostju strogo zavarovane vrste, kot je črni močeril, katerega velikosti populacije še ne poznamo in je število osebkov, namenjenih raziskavam ustrezno majhno. Pričakujemo, da bi z uporabo teh metod uspešno fotodokumentirali in izmerili posamezne dele okostja pri črnem močerilu.

Z uporabo klasičnih in sodobnih metod za preučevanje skeleta ter s številčno večjim vzorcem pigmentiranih živali želimo ponovno ovrednotiti in dopolniti že obstoječa dognanja o skeletu črnega močerila.

### 1.1 CILJI DIPLOMSKEGA DELA

- o Predvidevali smo, da bomo s pomočjo uporabljenih metod dobili natančnejši vpogled v zgradbo posameznih skeletnih elementov glave, oplečja in okolčja ter število repnih vretenc pri črnem močerilu.
- o S pomočjo računalniške tomografije smo nameravali pridobiti podrobnejše morfometrične podatke o dimenzijah posameznih kosti ter njihovih razmerjih v povezavi s telesno dolžino živali.
- o S pomočjo statistične analize smo nameravali ugotoviti, ali obstaja statistično značilna odvisnost med dolžinami posameznih kosti ter velikostjo živali.
- o S pomočjo računalniške tomografije smo nameravali izmeriti vsebnost kalcija v kostnem tkivu, tako pri pigmentirani kot pri nepigmentirani podvrsti močerila.

### 1.2 DELOVNE HIPOTEZE

- o Predvidevali smo določene specifične razlike v morfometričnih znakih skeleta glave in skeleta trupa znotraj črne podvrste glede na velikost živali oz. njihovo starost.
- o Predvsem smo pričakovali specifične morfometrične razlike v razmerju dolžine in širine skeleta glave in dolžine skeleta trupa ter repa.
- o Predvidevali smo, da se bodo dolžine izbranih kosti večale z naraščajočo telesno dolžino živali.
- o Analiza z računalniško tomografijo naj bi posredovala natančnejše podatke o številu trupnih in repnih vretenc, ki bi jih primerjali z dosedanjimi analizami.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 ČLOVEŠKA RIBICA (*Proteus anguinus*)

Človeška ribica, tudi močeril ali proteus (*Proteus anguinus*), živi v podzemnih vodah Dinarskega krasa od porečja reke Soče pri Trstu v Italiji, prek južne Slovenije in jugozahodne Hrvaške do hercegovsko-črnogorske meje (Sket, 1993; Sket, 1997). Uvrščamo jo med dvoživke (Amphibia), in sicer med repate krkone (Urodela) in v družino močerilarjev (Proteidae). Je edina vrsta evropskih jamskih repatih dvoživk in najopaznejši troglobiont. Je dinarski endemit, a tudi reliktna nekdanje splošno razširjene favne (Bulog, 1994; Bizjak-Mali, Bulog 2004; Bulog 2007; Prelovšek, Bizjak-Mali, Bulog 2008).

Za razvoj človeške ribice je značilna pedomorfoza. Živali spolno dozori, do preobrazbe pa ne pride. Mladostni znaki se ohranijo celo življenje. Pri odraslem osebku se ohranijo zunanje škrge, škržne reže in koža z mnogimi značilnostmi ličinke. Za nepigmentirano podvrsto močerila so značilne nekatere splošne troglomorfne značilnosti, kot so zakrnele oči, depigmentirana koža, specializirana čutila, podaljšani posamezni telesni deli, počasen metabolizem in majhna potreba po hrani, odpornost na stradanje ter dolga življenjska doba (Bulog in sod., 2002b; Bizjak-Mali, Bulog 2004).

#### 2.1.1 Evolucija

Številna in obsežna subtropska terciarna jezera na sedanjem dinarskem ozemlju je poseljevala bogata favna dvoživk. Med njimi je morala biti tudi današnjemu črnemu močerilu podobna vrsta. Ko se je ozemlje začelo zakrasevati in so tako nastale jame in jamske vode, je ta pramočeril uspel prodreti v podzemlje in se prilagoditi tamkajšnjim razmeram. S postopnim poslabšanjem razmer v površinskih habitatih so se ohranile le v jamah živeče populacije in tako je močeril postal le jamska žival (Sket, 1993; Sket, 1997).

Genetske raziskave pri močerilu kažejo, da se je močeril razcepil na niz nekoliko različnih ras (morda pa celo vrst) že v površinskih rekah in jezerih v pliocenu. Ob napredujočem zakrasevanju so se populacije razširile tudi v podzemeljske vode, njihovi površinski deli pa so izumrli. Danes so populacije morfološko zelo podobne, kar je verjetno posledica prilagajanja na podobne razmere v okolju. Njihovo naseljevanje v podzemlje je nedvomno potekalo ločeno, saj živijo v biogeografsko ločenih območjih, ki med sabo nimajo podzemeljskih vodnih povezav. Da je današnji vzorec razširjenosti predvsem posledica geografskih in klimatskih sprememb v preteklosti, dokazuje tudi dejstvo, da se razširjenost ujema z razširjenostjo drugih jamskih organizmov, npr. jamske kozice (*Troglocaris*), ki imajo popolnoma drugačno ekologijo (Sket, 1993; Sket, 2007; Gorički, 2006).

Rezultati biokemijske analize nekaterih slovenskih populacij (Sket in Arntzen, 1994) in geografsko obširnejše analize mitohondrijske DNA so pokazale, da skupina populacij bele podvrste ni monofiletska. Z analizo zaporedij mitohondrijske DNA so ugotovili, da je močeril globoko genetsko diferenciran. Vrsto sestavlja vsaj šest ločenih kladov, ki pripadajo geografskim območjem Istre, Like in Gorskega Kotarja, Dalmacije in Hercegovine, Bosanske krajine, jugozahodne Slovenije in jugovzhodne Slovenije, katere del je tudi črna podvrsta (Gorički, 2006).

Biokemijske analize so pokazale, da so dolenski beli močerili tesneje sorodni s črnim, kot so med seboj beli močerili iz Dolenjske in Notranjske. Črni močeril je tako le populacija iz dolenske skupine, ki je najverjetneje zaostala v prilagajanju na jamsko okolje (Gorički, 2006; Bulog, 2007).

### **2.1.2 Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*)**

Črni močeril (*Proteus anguinus parkelj*) je podvrsta močerila, ki živi le v podzemlju v ožji okolici Črnomlja in je belokranjski endemit. Prvič so ga našli leta 1986 člani Inštituta za raziskovanje krasa, ko so preučevali vodo iz kraškega izvira Dobljčice na Dolenjskem (Bulog in Sket, 2004). Večje število raziskav na črnem proteusu je bilo opravljenih po letu

1990, saj je bilo v tem času odkrito drugo nahajališče pigmentirane podvrste močerila v bližini Jelševnika (Sket in Arntzen, 1994).

Črna in bela človeška ribica se med seboj jasno razlikujeta po zunanji morfologiji, pa tudi po drugih znakih. Najočitnejša razlika je pigmentirana koža, po kateri je podvrsta dobila tudi ime. Hrbet in boki črne človeške ribice so temni, pri nekaterih osebkih temno rjavi, pri drugih pa skoraj popolnoma črni z vijoličastim nadihom. Gobec je sajasto črn, okončine pa svetlejšje s temnim vzorcem. Melaninski pigment se nahaja v pigmentnih celicah, melanoforah v usnjici kože. Glava črnega močerila je krajša, a enako široka kot glava belega močerila. Opazne so izrazitejšje izbokline na glavi, ki so posledica močnejše razvitih čeljustnih mišic. Število zob je manjše kot pri nepigmentirani podvrsti. Trup je daljši z večjim številom trupnih vretenc. Vretenca sama so nekoliko robustnejša, a ne toliko kot pri drugih repatih krkonih. Rep in oba para okončin so krajši kot pri belem močerilu. Oči pri črnem močerilu so bolj razvite, pri odraslih osebkih dva- do štirikrat večje od oči belega močerila, a vseeno sorazmerno drobne v primerjavi z drugimi dvoživkami. Razlika je tudi v senzitivnosti nekaterih čutil. Zvočna valovanja pod vodo črni močerili zaznavajo ravno tako dobro kot beli in se orientirajo po zemeljskem magnetnem polju (Bulog, 1994; Bulog in Schlegel 2000; Bulog, 2007; Schlegel in sod., 2009).

### **2.1.3 Ogroženost in varstvo**

Ogroženost jamskih biotopov je povezana z onesnaženjem površinskih voda na kraškem svetu. S ponikalnicami pritekajo v podzemno okolje industrijsko in komunalno onesnažene vode, zaradi česar so jamske živali življenjsko ogrožene (Bulog in sod., 2002a). K polnjenju kraških vodnih rezervoarjev in vnašanju onesnažil veliko prispevajo ponikajoči površinski vodotoki, ki so zelo občutljivi na kakršno koli onesnaženje. Med suho sezono površinski vodotoki pogosto presahnejo, v podzemeljskih vodah pa se odplake skoncentrirajo. Kompleksno pretakanje podzemeljskih vod tako prispeva k redčenju kot tudi razširjanju onesnaženja z enega žarišča (Sket in Velkoverh, 1981). Z industrijsko in komunalno onesnaženimi vodami prihajajo v podzemlje strupene in nevarne snovi, kot so umetna gnojila, pesticidi, kovine in drugi onesnaževalci. Večinoma gre za kemijske snovi,



ki se le počasi, če sploh, razgrajujejo z naravnimi procesi. Te snovi so za živa bitja toksične, če se akumulirajo v večjih količinah (Bulog in sod., 2002a). Za obstanek življenja v vodotoku niso pomembne le povprečne koncentracije posameznih onesnaževalcev, ampak tudi vrednosti najnižjih in najvišjih koncentracij (Sket in Velkoverh, 1981).

Življenje v podzemlju je človeški ribici vtisnilo značaj prave jamske živali. Pogoje za uspešno življenje najde le v okolju, na katerega je dobro prilagojena. Povečana onesnaženost njenega življenjskega prostora z nevarnimi in strupenimi organskimi snovmi ter kovinami pa je zanjo lahko usodna. Človeška ribica živi več deset let (do 100 let) in je zato lahko izpostavljena stresom, ki jih povzročijo morebitna spremenjena kakovost voda in jamskih usedlin. Na povečano koncentracijo kovin se lahko odzove z njihovim prekomernim kopičenjem v tkivih oziroma organih, kar lahko resno ogrozi njen obstoj (Bulog in sod., 2002a).

Na ravni Evropske unije za človeško ribico velja Direktiva o ohranjanju naravnih habitatov ter prosto živečih rastlinskih in živalskih vrst. Odvzem ali zadrževanje osebkov sta dovoljena le pod strogo nadzorovanimi pogoji in v omejenem številu, ki ga določijo pristojni državni organi. Pri delu z osebki te vrste veljajo predpisi iz Pravilnika o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst. Človeško ribico uvrščamo na rdeči seznam, njene habitate pa v slovenski del omrežja Nature 2000 (Uradni list Republike Slovenije, 2002). Močeril je uvrščen tudi v dodatek II in IV Habitatne direktive EU (92/43/EEC) in uvrščen na rdeči seznam IUCN (International Union for Conservation of Nature).

## 2.2 SKELET DVOŽIVK

### 2.2.1 Splošni pregled skeletnih elementov pri dvoživkah

Najstarejše raziskave na dvoživkah so prav gotovo grobi in podrobni morfološki opisi posameznih organov oziroma celotnih organskih sistemov. Opazovanje in opisovanje morfoloških značilnosti je bilo včasih osnovno gonilo, ki je pripomoglo k razumevanju

poteka filogenetskega razvoja preučevane vrste. Morfologija izbrane vrste nam pove, v kakšni interakciji je organizem s svojim okoljem in kako je nanj prilagojen (Duellman in Trueb, 1986).

Morfologija vrste oziroma njen gradbeni načrt je rezultat večgeneracijske interakcije predstavnikov vrste z izbranim življenjskim okoljem. Osnovna skeletna zgradba je pri danes živečih redovih dvoživk (Anura, Urodela, Ceacelia) v osnovi podobna. Vendar so v gradbenih načrtih posameznih redov razlike, ki so nastale kot posledica prilagajanja dvoživk na različna življenjska okolja. Skeletni sistem odraslih dvoživk lahko razdelimo v tri enote: kranialni skelet, osni skelet in skelet okončin (Duellman in Trueb, 1986).

Kranialni skelet (lobanja in visceralni skelet) je pri dvoživkah kompleksna enota okostja. Lobanja dvoživk je glede na prvotno labirintodontno lobanjo močno modificirana. Lobanja je sploščena, število elementov nevrokraniuma in dermokraniuma pa je reducirano. Nevrokranium ostaja večinoma hrustančen. Kosti, ki obkrožajo orbito so reducirane, prav tako pa se izgubijo elementi temporalne regije. Hiobranhialni aparat je del visceralnega skeleta. Leži na dnu ustne odprtine med parno mandibulo (spodnja čeljust) in oplečjem ter služi kot strukturna opora jeziku. Sestavljajo ga hioidni lok in več branhialnih lokov. Ima pomembno vlogo pri dihanju in prehranjevanju dvoživk (Duellman in Trueb, 1986).

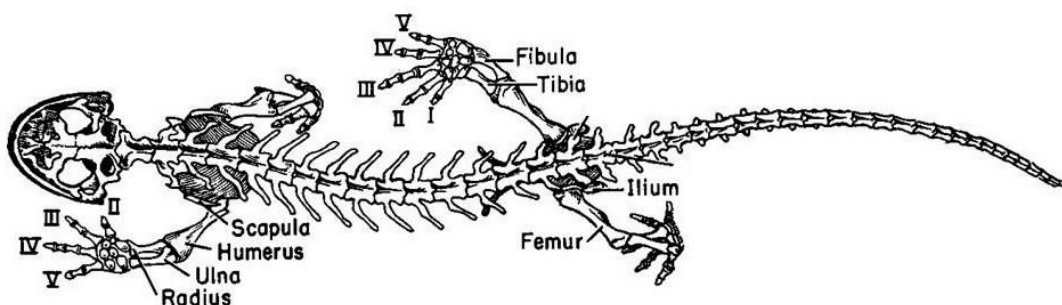
Osni skelet ali hrbtenica je toga, vendar fleksibilna vzdolžna os, ki daje oporo glavi, okončinam in notranjim organom ter služi kot zaščita za hrbtenjačo. Hrbtenica je pri različnih vrstah dvoživk sestavljena iz različnega števila vretenc. Vsako vretence je sestavljeno iz centralnega dela (centruma), ki je cilindrične oblike, in različno oblikovanih stranskih izrastkov. Dorzalno so nameščeni nevralni loki z nevralnimi trni. Zigapofize so parni izrastki trupnih vretenc in omogočajo omejeno dorzi-ventralno fleksijo hrbtenice trupne regije. Ločimo pre- in postzigapofize. Diapofize ali transverzalni izrastki so nameščeni lateralno in služijo za pripenjanje mišic ter kot vezavna mesta za rebra. Hrbtenico dvoživk lahko razdelimo v štiri osnovne regije: vratno, trupno, križno ter repno regijo (Liem in sod., 2001).

Oplečje in okolčje skupaj s pripadajočimi udi predstavljajo skeletne elemente okončin. Tako oplečje kot okolčje sta vezana na hrbtenico, kosti udov pa se pripenjajo na omenjena obroča. Oplečje leži neposredno za glavo in je sestavljeno iz treh parnih kosti: scapula (lopatica) s ploščato suprascapula, coracoid (korakoid) ter procoracoid. Scapula in coracoid v predelu stika sestavljata fosso glenoidalis ali mesto za sklepno vezavo sprednje okončine. Okolčje je nameščeno ob koncu trupa in je povezano z edinim sakralnim vretencem. Sestavljeno je iz treh parnih kosti: ilium (črevnica), ischium (sednica) in pubis (sramnica), ki v predelu stika tvorijo acetabulum za vezavo stegenice (Duellman in Trueb, 1986).

Okončine so sestavljene iz petih osnovnih segmentov. V distalni smeri si sledijo propodialni elementi, epipodialni elementi, mesopodialni elementi, metapodialni elementi ter falange. Pri vseh dvoživkah sta propodialna elementa humerus (nadlahtnica) in femur (stegenica). Epipodialna elementa, ki sledita nadlahtnici, sta radius (koželjnica) in ulna (podlahtnica), stegenici pa tibia (golenica) in fibula (mečnica). Mesopodialni elementi, ki oblikujejo zapestje in gleženj, so sestavljeni iz večjega števila manjših koščic. Dlani in podplate sestavljajo metapodialni elementi ali metakarpalne kosti. Najbolj distalni deli okončin, torej prsti, pa so sestavljeni iz falang (Liem in sod., 2001).

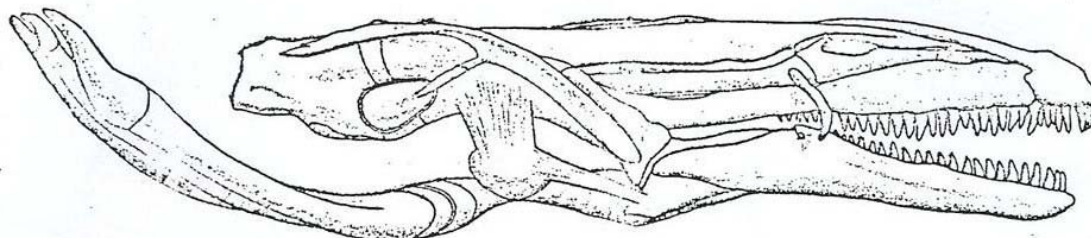
### **2.2.2 Skeletne posebnosti repatih dvoživk in močerila**

Za razliko od brezrepcev (*Anura*) in sleporilov (*Ceacelia*) so repate dvoživke (*Urodela*) prepoznavne po vitkem telesu, štirih okončinah, repu ter značilni hoji. Lobanja večine repatih dvoživk je obokana, ozka ter ima več povezav s hrbtenico (4), kot je to značilno za ostale dvoživke (2). Največ skeletnih posebnosti najdemo pri vodnih predstavnikih repatih dvoživk, med katere uvrščamo tudi človeško ribico. Pogosto je posledica vodnega načina življenja redukcija skeletnih elementov, predvsem na skeletu okončin (Duellman in Trueb, 1986).



Slika 1: Skelet repate dvoživke (<http://www.arthursclipart.org/skeletons/skeletons/salamander.gif>).

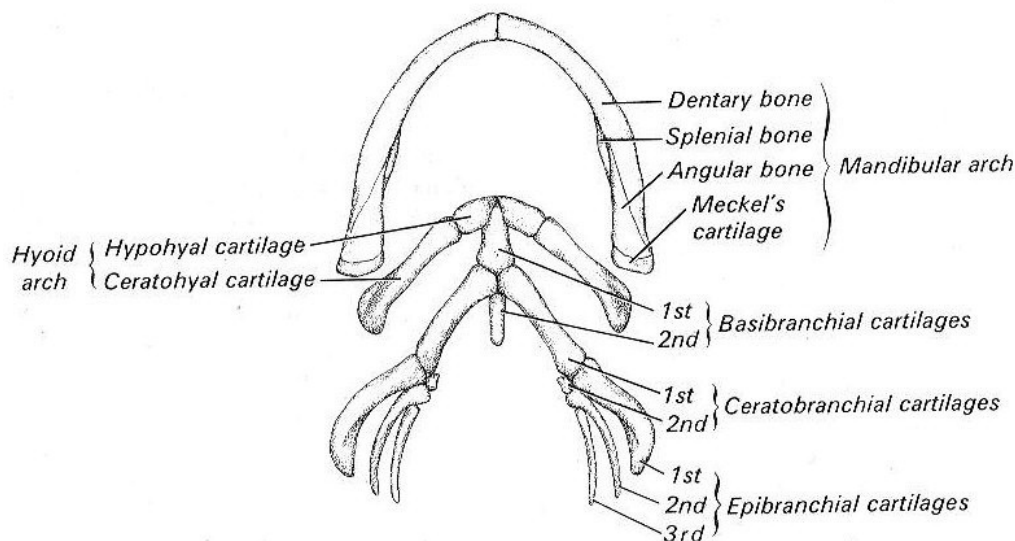
Lobanje repatih dvoživk so kompaktnjše od lobanj ostalih dvoživk. Kranialna arhitektura je raznolika in prilagojena kopenskemu ali vodnemu načinu življenja. Dermalne kosti strehe so majhne in jih je malo. Temporalne fose so odprte, orbite so velike, področje okoli dermalne kosti nasale pa je šibkeje obokano. Maksilarni lok je nepopoln, nevrokranium pa je slabo razvit (Duellman in Trueb, 1986). Dolivo-Dobrovolsky (1926) v svojem delu navaja, da je za močerila značilna ozka, nekoliko podolgovata lobanja z večjim številom hrustančnih elementov. Predstavnikom družine močerilarjev (*Proteidae*) manjkajo dermalni skeletni deli: nasale, prefrontale in maxilla (čeljustnica). Avtor prav tako opaza, da sta za predstavnike močerilarjev značilni lobanjski strukturi pterygopalatinum in opisthotic (okostelina). Pri močerilarjih je pterygopalatinum prisoten vse življenje, pri ostalih družinah repatih dvoživk pa med metamorfozo izgine. Po navedbah Dolivo-Dobrovolskega gre v primeru prisotnosti pterygopalatinum ter visokega deleža hrustančnih struktur na lobanji človeške ribice za jasne embrionalne znake, ki potrjujejo dejstvo, da ima močeril značilnosti urodelske larve.



Slika 2: Lateralni pogled na lobanjo močerila (Dolivo-Dobrovolsky, 1926).

Pri večini repatih dvoživk je zgornja čeljust sestavljena iz spredaj ležeče premaxilla (predčeljustnica), ki je lahko parna ali ne, ter zadaj ležeče maxilla (čeljustnica). Parno premaxilla najdemo pri človeški ribici. Pri večini repatih dvoživk maxilla predstavlja lateralni del zgornje čeljusti, pri močerilu pa je reducirana. Spodnja čeljust je pri repatih dvoživkah sestavljena iz dveh dermalnih kosti in Meckelovega hrustanca. Pri močerilu sta to dentare in angulare. Obdajata Meckelov hrustanec, ki je na prednjem delu pokostel in kot tak tvori spoj med mandibulama. Kost spodnje čeljusti, na kateri so nameščeni zobje, je dentare. Pri močerilarjih je to največja kost spodnje čeljusti (Duellman in Trueb, 1986).

Oblika visceralnega skeleta pri repatih dvoživkah je raznolika. Kljub raznolikostim med posameznimi družinami repatih dvoživk pa je osnovna zgradba visceralnega skeleta podobna. Pri večini odraslih repatih dvoživk je visceralni skelet sestavljen iz mandibularnega in hioidnega loka ter treh do petih branhialnih lokov. Prvi visceralni lok je mandibularni lok ali spodnja čeljust, kamor sodi tudi Meckelov hrustanec kot jedro spodnje čeljusti in sklepna vezava z zgornjo čeljustjo. Drugi visceralni lok je hioidni lok, ki leži neposredno za spodnjo čeljustjo. Sestavljen je iz dveh elementov, krajšega hipohialnega elementa, ki se veže na sprednji del prvega basibranchialnega neparnega elementa, in daljšega ceratohialnega elementa, ki je nameščen dorzilateralno. Osrednji ventralno ležeči podolgovati neparni elementi visceralnega skeleta so t. i. basibranchialni elementi, na katere so pričvrščeni ostali deli visceralnega skeleta. Za neotenične repate dvoživke, med katere sodi tudi človeška ribica, je značilno, da imajo dva osrednja longitudinalna elementa. Pri močerilu je basibranchiale I koščen, basibranchiale II pa hrustančen. Neposredno za hioidnim lokom je nameščenih pet parov branhialnih lokov, ki tvorijo tretji, četrti, peti, šesti in sedmi visceralni lok. Vsak branhialni lok sestavljata parni ceratobranhialni in epibranchialni element. Prvi in drugi branhialni lok imata dobro razvita oba omenjena elementa. Prvi branhialni lok (= tretji visceralni lok) tvori ventromediano tudi povezavo z osrednjima basibranchialnima elementoma. Pri močerilarjih so peti, šesti in sedmi visceralni lok (= tretji, četrti in peti branhialni lok) reducirani, saj ceratobranhialni elementi povsem manjkajo, ohranjeni pa so le epibranchialni elementi (Wischnitzer, 1993).



Slika 3: Ventralni pogled na visceralni skelet nektura (Wischnitzer, 1993).

Visceralni skelet repatih dvoživkam omogoča, da lahko stegnejo jezik in ga tako uporabljajo za lov. Zaradi takšnega načina prehranjevanja repate dvoživke nimajo posebej izoblikovanih čeljusti in zob, zato pa imajo toliko bolj razvita čutila, s katerimi zaznavajo svoj plen. Navadno so pri njih dobro razvit vid ter voh, sluh pa je v primerjavi z brezrepci mnogo slabše razvit (Duellman in Trueb, 1986). Tudi tukaj je močeril posebej. Pomanjkanje svetlobe in s tem povezano nezmožnost uporabe vida za orientacijo kompenzira z drugimi čutili, ki so bolj razvita kot pri dvoživkah, ki živijo v površinskih okoljih (Schlegel in sod., 2009). Nproporcionalna rast glave, ki se kaže predvsem v močno podaljšanem sprednjem delu, verjetno predstavlja prilagoditev za življenje v jamah. Podobno nesorazmerno podaljšanje glave je ugotovil tudi pri ameriških repatih dvoživkah, ki živijo v jamskem okolju. Na povečanem sprednjem delu glave so namreč strateško razporejeni mehano- in elektrosensorni čutilni organi pobočnice (Istenci in Bulog 1984; Bulog 2007, Schlegel in sod., 2009).

Hrbtenico repatih dvoživk lahko razdelimo na štiri med seboj slabo diferencirane regije, t.j. vratno, trupno, križno in repno regijo. V vratni regiji je le eno vretenca – t. i. atlas, ki ne nosi reber. Za razliko od ostalih dvoživk je atlas pri repatih krkonih z glavo povezan preko štirih sklepnih povezav in ne zgolj preko dveh, kot je to značilno za ostale dvoživke. Atlas

je na prednjem delu oblikovan tako, da tvori sklepno povezavo z lobanjo preko dveh jamičastih sklepov (kondilov), ki tvorita sklep s parnima izrastkoma ocipitalne kosti lobanje. Preostala spoja sta nameščena ventro-mediano. Trupna regija leži med atlasom in križnim vretencem. Število vretenc v tej regiji se pri repatih dvoživkah giblje od 10 do 60 vretenc. Odvisno od podvrste pri močerilu v tej regiji najdemo od 29 do 35 vretenc. Za vretenca te regije je značilno, da so si med seboj precej podobna. So amfihelna in imajo značilno obliko peščene ure. Križno vretenca je pri večini repatih dvoživk zgolj malo večje trupno vretenca s transverzalnimi izrastki, ki skupaj z rebri v tem delu podpirajo medenični obroč. Odvisno od vrste repatih dvoživk se število vretenc v repni regiji giblje od 20-100 vretenc. Za vretenca v tej regiji je značilno postopno manjšanje zigapofiz in transverzalnih izrastkov. Vsa repna vretenca nosijo na trebušni strani koničaste izrastke, t. i. hemalne loke, ki tvorijo koščeni kanal za kavdalno potekajoče arterije in vene (Duellman in Trueb, 1986). Pri močerilu imajo repna vretenca značilne koničaste, trikotno oblikovane nevralne trne. Repna vretenca se postopno manjšajo vse tja do 24. oziroma 27. vretenca. Tem nato sledi od 3 do 7 končnih vretenc, ki so povsem brez izrastkov (Sket in Arntzen, 1994).

Ramenski obroč repatih dvoživk je v večji meri hrustančen in ne vsebuje kosti dermalnega nastanka. Dorsolateralno nameščena kost je scapula in je koščena, nad njo ležeči spoj, tako imenovana suprascapula, je hrustančna. Scapula se stika z ventralno ležečim korakoidom in procoracoid. Koščena dela korakoida in procoracoid skupaj z lopatico tvorita sklepno jamico za humerus. Anteriorni del procoracoid je tako kot večji del korakoida hrustančen. Sternum (prsnica) je pri vseh repatih dvoživkah v celoti hrustančen (Duellman in Trueb, 1986). Pri proteju je večinski del oplečja hrustančen. Samo manjši del lopatice je koščen in ima značilno paličasto obliko (Herre, 1935). Prednje okončine so sestavljene iz proksimalno ležeče nadlahtnice ter distalno nameščene koželjnice in podlahtnice. Epifizni deli kosti običajno niso pokosteneli. Število mesopodialnih elementov je reducirano, preostali pa so hrustančni. Običajno so prisotni štirje metakarpalni elementi, ki so povezani s štirimi prsti. Metakarpalni elementi ter prsti pa so v celoti hrustančni. Pri močerilu je to število zmanjšano na tri (redukcija 4. in 5. prsta). Medenični obroč je sestavljen iz puboischiatne plošče ter dorzalno nameščene parne črevnice, ki se z dorzalno stranjo pritrja na križno vretenca. Ventralno je vsaka od črevnic spojena s posteriornim delom sednice in anteriornim delom sramnice. Skupaj tvorijo acetabulum, sklepno jamico za

vezavo femurja. Pri močerilu je večinski del okolčja hrustančen. Zgolj manjši del črevnice, sednice in acetabulum je koščen. Femur se z medeničnim obročem spaja v predelu acetabulum. Golen sestavljata golenica in mečnica. Večina mezopodialnih elementov je reduciranih, tisti deli, ki pa so še prisotni, pa so v celoti hrustančni. Običajno so prisotni štirje metatarzalni elementi, povezani s petimi prsti. Pri močerilu je število metatarzalnih elementov in prstov še močnejše reducirano, saj imajo na zadnjih okončinah le dva prsta. Pri tem gre najverjetneje za redukcijo 3., 4. in 5. prsta (Duellman in Trueb, 1986).

### 2.2.3 Zgodovinski pregled raziskav na skeletu močerila

Močeril je bil prvič omenjen v velikem delu Janeza Vajkarda Valvasorja Slava vojvodine Kranjske (1689). Da gre za jamsko žival, so spoznali, ko ga je Jeršinovič von Loewengrif leta 1797 našel v Črni jami. Tako je bil močeril prepoznani kot prva specializirana jamska žival (Sket, 1993; Sket in Arntzen, 1994).

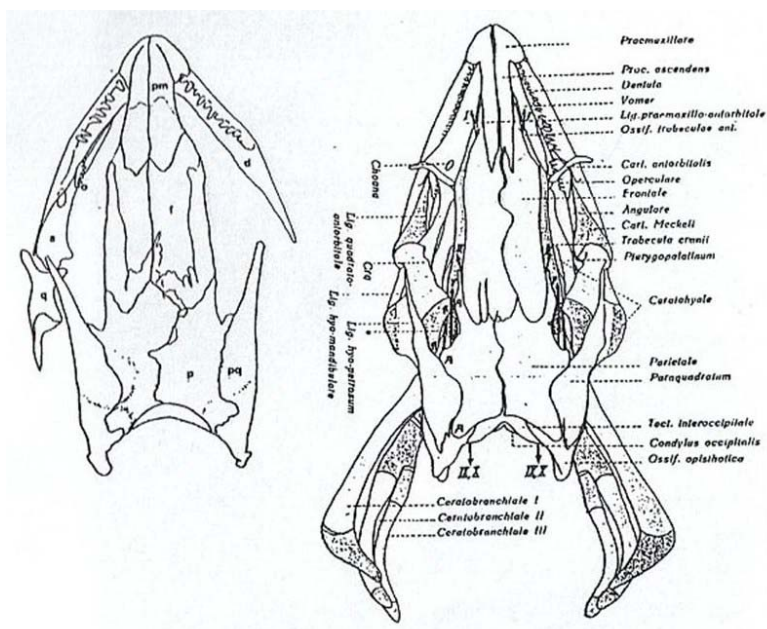
Po prvem znanstvenem opisu človeške ribice (Laurenti, 1768) je bila ta v znanstvenih krogih deležna precejšnjega zanimanja. Že leta 1837 je Hoffmann v svoji razpravi vključeval izsledke o okostju človeške ribice. Parker in Wiedersheim sta leta 1877 prvič opisala razlike in podobnosti v zgradbi lobanje med močerilom in njemu sorodnem nekturu. Velik korak v preučevanju in opisovanju lobanje belega močerila je s svojim delom opravil Dolivo-Dobrovolsky leta 1926 ko je svojo razpravo obogatil z velikim številom natančno izrisanih risb (Herre, 1935). Herre se je v svojem obsežnem delu leta 1935 poglobil v skeletne razlike med močerilom in nekturom ter tako poskušal dokazati sorodstvene vezi med omenjenima predstavnikoma in fosilnimi ostanki nekdanje živeče vrste repate dvoživke, ki jo je poimenoval *Palaeoproteus klatti*.

V novejšem obdobju so bile raziskave na močerilu usmerjene predvsem v preučevanje funkcionalno morfoloških značilnosti čutilnih organov, za katere so raziskovalci predvidevali pomembno čutilno vlogo v podzemnem vodnem okolju, preučevanje prebavnega sistema ter oogeneze (Bulog, Schlegel 2000, Bizjak-Mali, Bulog 2004; Bulog 2007; Prelovšek, Bizjak-Mali in Bulog 2008; Schlegel in sod., 2009; Bizjak-Mali, Bulog



2010). Istočasno so potekale tudi okoljske raziskave, predvsem na tistih mestih, kjer je bil močeril zaradi onesnažil najbolj ogrožen (Bulog in sod., 2002; Bulog 2007; Pezdirc in sod. 2011). Po odkritju črnega močerila (leta 1986) so se zaradi vprašanja o taksonomskem statusu vrste zopet pojavile raziskave, ki so med drugim zahtevale tudi analizo skeletnih elementov. Tako sta Sket in Arntzen v raziskavi leta 1994 prvič opisala razlike v določenih skeletnih elementih med pigmentirano in nepigmentirano podvrsto močerila. Nekatere elemente skeleta je v sklopu morfometričnih meritev zajela tudi Š. Gorički v svojem delu leta 2006.

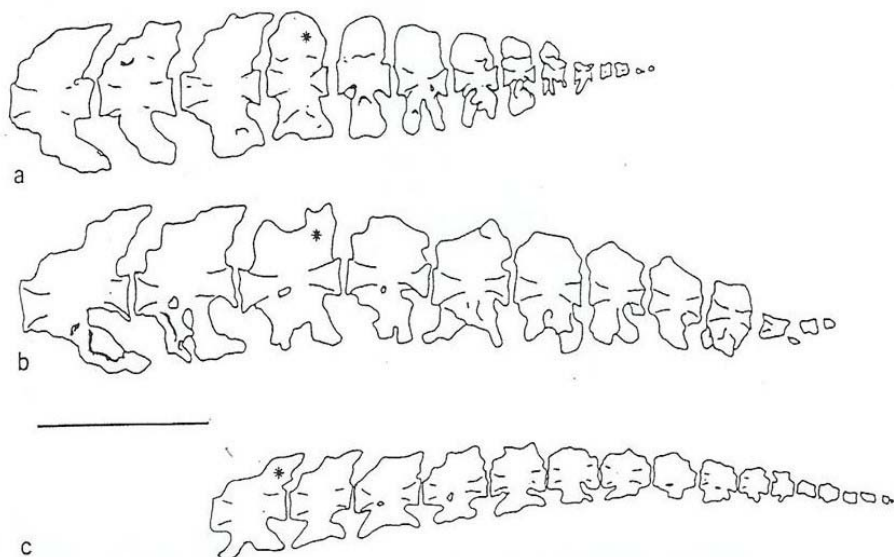
Sket in Arntzen (1994) sta v raziskavi poleg zunanjih morfoloških razlik in biokemijske analize prvič opisala razlike v določenih skeletnih elementih med pigmentirano in nepigmentirano podvrsto močerila. S pomočjo preparatov in rentgenskih posnetkov sta ugotavljala obliko lobanje in lobanjskih kosti, štela vretenca od lobanje do zadnjih okončin ter opazovala obliko repnih vretenc.



Slika 4: Lobanji črnega (levo) in belega (desno) močerila (Sket, 1994).

Njune ugotovitve kažejo, da sta si lobanji črnega in belega močerila precej podobni, razlikujeta pa se v razmerjih. Nevrokranium je pri pigmentirani podvrsti nekoliko širši. Prav tako so pri črnem močerilu ploske lobanjske kosti (parietale, frontale in premaxilla) nekoliko krajše in širše v primerjavi z lobanjskimi kostmi nepigmentirane podvrste.

Rezultati njune raziskave so pokazali, da se podvrsti značilno razlikujeta v številu trupnih vretenc, saj je za nepigmentirano podvrsto značilnih od 29 do 32 trupnih vretenc, pri črnem močerilu pa je ta številka nekoliko višja, saj je običajno število vretenc v tej regiji med 34 in 35. Trupna vretenca so si tako pri črnem kot pri belem močerilu precej podobna med seboj in se po dolžini bistveno ne razlikujejo. Repna vretenca se postopno manjšajo in imajo značilne koničaste, trikotno oblikovane nevrálne trne. Repna vretenca se postopno manjšajo vse tja do 24. oziroma 27. vretenca. Tem nato sledijo še najmanjša vretenca repne regije, ki so povsem brez izrastkov. Pri belem močerilu je število le-teh v povprečju nekoliko večje kot pri črnem.



**Slika 5:** Zadnja kavdalna vretenca pri črnem (a) in belem (b, c) močerilu (Sket in Arntzen, 1994).

## 2.3 PRESVETLITVENE TEHNIKE

Mnogo znanstvenih raziskav v biologiji zahteva podrobne podatke o zgradbi okostja. V veliko pomoč pri tovrstnem raziskovanju so tako imenovane presvetlitvene tehnike v kombinaciji z diferencialnim barvanjem, ki omogočajo vpogled v razvojne procese, razporeditev in celotni ustroj okostja živali v intaktnem telesu (Hanken in Wasserung, 1981).

Pred uvedbo presvetlitvenih tehnik so raziskave, povezane s preučevanjem zgradbe in razvoja skeleta, temeljile na mikroskopskih tehnikah, ki so vključevale tehnično zahtevno in časovno zamudno metodo izdelave serijskih rezin. Zaradi vse večjih potreb v primerjalnih analizah skeleta na različnih vretenčarskih skupinah se je sčasoma razvila metoda, ki je v kombinaciji z diferencialnim barvanjem omogočila celosten vpogled v razvojne procese in zgradbo vretenčarskega skeleta. S hitrim in učinkovitim presvetljevanjem živalskih teles in sočasnim diferencialnim barvanjem koščenih in hrustančnih elementov je bilo možno pripraviti veliko število osebkov v sorazmerno kratkem času, kar je omogočilo natančno analizo skeleta tako pri še razvijajočih se zarodkih kot tudi pri odraslih osebkih (Hanken in Wasserung, 1981).

Danes poznamo veliko različnih tehnik presvetljevanja. V večini primerov gre za prilagojene različice prvotne metode, ki jo je leta 1897 prvi uvedel Schultze v raziskavah na okostjih človeških zarodkov. Schultze je prvi predstavil uporabo kalijevega hidroksida in glicerina v tehnikah presvetljevanja. Vsaka presvetlitvena tehnika, ki vključuje uporabo kalijevega hidroksida, je izpeljanka osnovne Schultzejeve metode. Osnovna metoda po Schultzeju (1897) temelji na odstranjevanju kožnih pigmentov v preparatu s pomočjo vodikovega peroksida, ultravijolične svetlobe ali drugih belilnih sredstev ter razbarvanju mehkih tkiv s pomočjo alkalne raztopine in glicerina. Sočasno poteka barvanje koščenih elementov s pomočjo selektivnih barvil (Dwight Davis in Gore, 1936).

Pomembno spremembo k prvotni Schultzejevi metodi je leta 1905 uvedel Lundval. Kot novost je predstavil uporabo barvila alizarin za barvanje koščenih elementov v

presvetljenih preparatih. Po izsledkih raziskave se je omenjeno barvilo izkazalo kot najbolj učinkovito za barvanje skeletnih elementov, saj je kazalo izredno selektivne lastnosti do vezave s kalcijem, ki ga v veliki meri najdemo v vretenčarskih kosteh (Dwight Davis in Gore, 1936).

Prvotno so bile presvetlitvene tehnike v kombinaciji z diferencialnim barvanjem namenjene raziskavam, ki so preučevale razvoj in zgradbo skeleta človeških zarodkov. Šele kasneje se je njihova uporaba pojavila pri raziskavah na živalih. Posebej koristna se je izkazala pri preučevanju okostij manjših vrst vretenčarjev, kjer so preparacije koščenih elementov zaradi majhnosti kosti zelo težavne (Dwight Davis in Gore, 1936).

Po navedbah Dwight Davisa in Gora (1936) ter Greena (1952) je metoda presvetljevanja zelo učinkovita pri raziskavah na okostjih različnih vretenčarskih skupin. Po njihovem mnenju je bistvena prednost tehnike v barvanju celega skeleta, ki poteka v nepoškodovanem telesu osebka in tako omogoča, da pri tem ne izgubimo posameznih manjših koščenih elementov. Verjetnost, da napačno določimo kosti, je tako minimalna. Z uporabo barvila naredimo kosti bolje vidne, zaradi selektivne lastnosti barvila pa zagotovimo prepoznavnost tudi najmanjših koščenih elementov znotraj samega skeletnega sistema (Dwight Davis in Gore, 1936). Tak način predstavitve okostja dopušča malo možnosti za napačno interpretacijo koščenih elementov in omogoča enostavno primerjavo posameznih skeletnih delov ali celotnih okostij. Velika uporabnost presvetlitvenih tehnik se kaže tudi v njihovi veliki prilagodljivosti, saj so z manjšimi spremembami uporabne za vse vretenčarske skupine (Green, 1952).

Green (1952) je mnenja, da je metoda še posebej primerna za preučevanje kosti manjših vretenčarskih vrst, kot so dvoživke in ribe, saj lahko opazujemo natančno lego še tako majhnih skeletnih elementov, kot so metatarzalni in metakarpalni elementi okončin. Posamezne skeletne elemente lahko po končanem presvetljevanju enostavno ločimo od preostalega skeleta in jih tako natančneje preučimo. Kot navajata Dwight Davis in Gore (1936), je velika prednost te metode tudi njena izredno hitra izvedba ter enostavna priprava večjega števila preparatov hkrati. Tako je uporaba te metode idealna pri študijah

primerjalne narave, kjer moramo preučiti večje število osebkov v sorazmerno kratkem času.

Dwight Davis in Gore (1936) navajata, da se kljub prosojnosti okoliškega tkiva vsi deli okostja ne razločijo enako dobro. Z metodo presvetljevanja običajno dobimo zelo dober vpogled v elemente osnega skeleta in kosti okončin, elementi lobanje pa so običajno slabše vidni. Razlog je v veliko kompleksnejši zgradbi same lobanje in prisotnosti organov, kot so jezik in očesna zrkla, ki s svojo debelino in strukturo zakrivajo koščene elemente glave. Zadovoljive rezultate dobimo s predhodnim odstranjevanjem teh tkiv.

## 2.4 TRIDIMENZIONALNO MODELIRANJE

Ljudje smo vizualna bitja in opazovanje strukture nam poda bistvene informacije o predmetu, ki ga preučujemo. Naš svet je tridimenzionalen in navajeni smo gledati zunanje površine struktur. Tako si včasih težko oblikujemo predstavo o tridimenzionalnem predmetu, če imamo pred seboj samo njegove dvodimenzionalne prereze (Russ, 1999).

Prav zaradi tega ker težko raziskujemo tridimenzionalno strukturo na podlagi dvodimenzionalnih podob, so se razvile mnoge tehnike, ki omogočajo prikaz tridimenzionalne strukture. Poznamo direktne in indirektne tehnike. Pri direktnih tehnikah vse potrebne informacije za rekonstrukcijo strukture zberemo naenkrat (3D tomografija, magnetna resonanca), pri indirektnih pa najprej zberemo informacije o dvodimenzionalni sliki ter jih naknadno sestavimo v tridimenzionalne modele (2D tomografija, histološke rezine, rentgen) (Russ, 1999).

Tridimenzionalni modeli, narejeni s pomočjo direktnih ali indirektnih tehnik, se tako pogosto uporabljajo pri poučevanju in različnih bazičnih ter kliničnih raziskavah (Cavey in sod., 1993). Omenjeni modeli navadno služijo tudi kot osnova za razvoj atlasov, ki prikazujejo anatomijo manjših laboratorijskih živali (Dogdas in sod., 2007).

Tomografija je vsaka metoda, ki s pomočjo matematičnih modelov iz serije projekcij rekonstruira strukturno informacijo objekta. Tovrstne metode poznamo predvsem kot diagnostična orodja v medicini in veterini. To so: rentgen in računalniška tomografija (X-žarki), magnetna resonanca (magnetno polje) in ultrazvok (zvočni valovi). Te metode s pomočjo absorpcije ali odboja različnih žarkov merijo gostoto ali kompozicijo elementov. Iz dobljenih podatkov s primerno računalniško obdelavo nato sestavimo 3D sliko objekta (Russ, 1999).

#### **2.4.1 Magnetna resonanca**

Magnetna resonanca izhaja iz magnetnih lastnosti jedra atoma. Nukleoni (protoni in nevtroni) so delci, ki sestavljajo jedro atoma. Če si nukleone predstavljamo kot majhne klasične dipole, ki se vrtijo okoli svoje osi, lahko razložimo le del pojavov v zvezi s slikanjem z jedrsko magnetno resonanco. Za razlago principov magnetne resonance moramo upoštevati, da v jedru veljajo zakoni kvantne mehanike. Nukleoni v jedru so nosilci jedrskega spina. Spin je fizikalna količina, katere lastnosti ni mogoče izpeljati iz klasične fizike in je sorazmeren z magnetnim dipolnim momentom delca. Spinsko število nam pove, v katerih energijskih stanjih se lahko nukleoni nahajajo v magnetnem polju. Pojav magnetne resonance je možen samo v jedrih, kjer je skupni magnetni moment različen od 0. To se lahko zgodi v jedrih, kjer je število nukleonov liho (Demšar in sod., 1996).

Magnetna resonanca deluje na osnovi interakcije med zunanjim magnetnim poljem in jedrom atoma, ki ima svoj spin. Tega določa zgradba atoma in vsak element v periodnem sistemu z izjemo argona in cerija ima vsaj en izotop, ki ima spin. V naravi je najbolj pogost proton vodika, ki ima svoj spin in je navadno osnova za magnetno resonanco. Je tudi sestavni del molekule vode in maščob, ki primarno sestavljajo vsako živalsko telo (Brown in Semelka, 2003).

V močnem magnetnem polju se jedra usmerijo s poljem ali nasproti polja. Ti dve stanji imata različno energijsko stanje. Magnetno-resonančni eksperiment naredimo tako, da dovedemo energijo s pravo radiofrekvenčno frekvenco, ki povzroči prehod iz nižjega v višje energijsko stanje (Demšar in sod., 1996). Atomi v vzorcu to dodano energijo absorbirajo in jo čez nekaj časa emitirajo. Oddano energijo zaznajo detektorji v napravi in jo matematično procesirajo. Ker se energija v različnih tkivih različno absorbira in emitira, na ta način zaznamo razlike med tkivi in na končni sliki se poslikana tkiva med seboj tudi ločijo (Demšar in sod., 1996; Brown in Semelka, 2003).

#### **2.4.2 Računalniška tomografija**

Računalniško tomografijo, bolj znano pod kratico CT (angl. Computed Tomography), v klinične namene uporabljajo že od leta 1972 (Kalender, 2006).

Diagnostika s CT poteka z meritvijo absorpcije rentgenskih žarkov. Rentgenski slikovni prikaz določenih organov je mogoč zato, ker imajo različna tkiva, organi in snovi različne fizikalne lastnosti. Ob prehodu skozi snov rentgenski žarki slabijo, se sipajo ali razpršujejo. Mineralizirana tkiva (kosti) slabijo rentgenske žarke bolj kot mehka tkiva, zato so na rentgenski sliki vidna kot svetli predeli (Som in sod., 1996).

Rentgensko slikanje je odvisno od prosojnosti bioloških tkiv. Če gre rentgenski žarek direktno skozi telo, bo del fotonov zapustil telo brez interakcije, del fotonov pa bo reagiral s tkivom. Tako ločimo med transmisivnostjo oz. prepustnostjo (fotoni ostanejo nespremenjeni), absorpcijo (fotoni oddajo energijo snovi) in sipanjem (fotoni spremenijo smer). Elastično sipanje in absorpcija sta specifična pri različnih kotih za vse energije določenega fotona ter za vse atome. Na splošno dobimo pri rentgenski radiografiji zelo dober kontrast med kostjo in mehkim tkivom ter slab kontrast med različnimi tipi mehkih tkiv (Buzug, 2008).

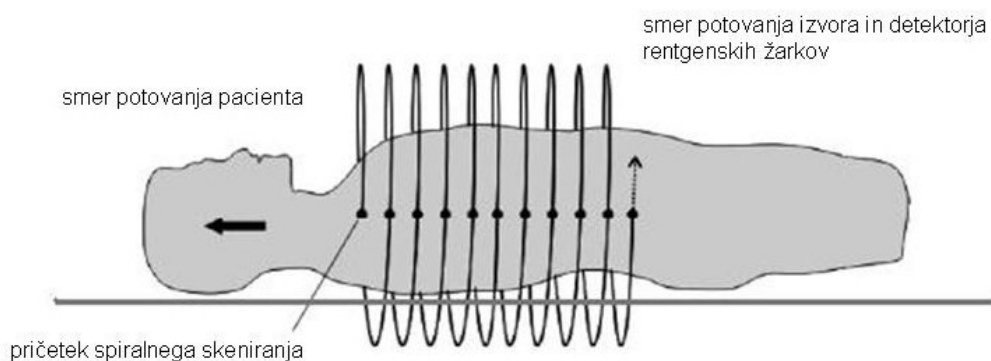
Vsa klasična rentgenska slikanja (RTG) imajo to slabost, da organe in tkiva, ki so tridimenzionalne strukture, prikažejo dvodimenzionalno. Tako ne dobimo informacije o debelini ter položaju tkiv in organov v smeri potovanja rentgenskih žarkov in je tako nemogoče oceniti določene parametre, kot je na primer debelina kosti (Hofer, 2007).

Računalniška tomografija ima v primerjavi z navadno RTG tehniko mnogo prednosti. V nasprotju z navadnim rentgenom omogoča natančen in jasen pogled na veliko različnih tipov tkiv in organov, saj je s to tehniko možno ločevanje majhnih kontrastnih razlik. Tako so na primer zelo dobro vidne nekatere spremembe v kosti, kot so kompleksnejši zlomi v sami notranjosti kosti ali pa spremembe v gostoti kostne mase, ki so lahko posledica določenih bolezni, kot je osteoporoza (Buzug, 2008).

Pri preiskavi s klasičnim medicinskim CT-aparatom poležemo preiskovanca na pomično preiskovalno mizo v odprto preiskovalne naprave med rentgensko cev (izvor RTG žarkov) in detektor ionizirajočega sevanja, ki krožita okrog preiskovanca. Pri ekspoziciji vstopi v preiskovani objekt znana količina rentgenskih žarkov, na drugi strani pa detektor ionizirajočega sevanja meri, koliko rentgenskih žarkov se je v določeni smeri absorbiralo v telesnih organih. Te podatke analizira računalnik in na osnovi oslabitve žarkov izračuna oslabitev v posameznih volumskih delih preiskovalnega reza. Iz teh podatkov nato s pomočjo računalniške obdelave pridobimo panoramske posnetke, slike prerezov v poljubnih ravninah ali iz posameznih ravnin rekonstruiramo tridimenzionalno sliko (Hofer, 2007).

Preiskovani del telesa lahko s CT-napravo slikajo z več strani in ne samo z ene kot pri navadnem rentgeni. Posnetki so preglednejši od klasičnih rentgenskih slik, saj je zaradi boljšega kontrasta možno razlikovati med različnimi tkivi, kot so kosti, mišice in maščobna tkiva (Buzug, 2008).





**Slika 6:** Potek spiralnega skeniranja. Med slikanjem miza z ležečim bolnikom potuje skozi odprtino aparature, hkrati pa rentgenska cev kroži okrog bolnika. Na podlagi spiralnega skeniranja objekta dobimo veliko število optičnih rezin, ki nam omogočajo volumetrično (tridimenzionalno) rekonstrukcijo preučevanega objekta. Tovrstno preiskavo je mogoče opraviti na vseh delih telesa oziroma organih, zaradi visoke prostorske ločljivosti je s to tehniko mogoče prikazati tudi drobne strukture, denimo celo ušesne koščice (Kalender, 2006).

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Za potrebe diplomskega dela smo uporabili 20 živali, od tega 6 osebkov nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in 14 osebkov pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*). Uporabili smo tako žive kot fiksirane osebke (preglednica 1).

Žive živali smo vzeli iz jamskega laboratorija na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete. Za potrebe diplomske naloge smo uporabili dva živa osebka nepigmentirane podvrste močerila (P184 in P194) in štiri žive osebke pigmentirane podvrste močerila (Č16, Č17, Č18, Č19).

Štirje osebki nepigmentirane podvrste (P95, P111, P180 in P181) in dva osebka pigmentirane podvrste močerila (Čv in J93) so bili vzeti iz zbirke Skupine za funkcionalno anatomijo vretenčarjev. Vsi osebki so bili narkotizirani po predpisani metodi s podaljšano narkozo v MS 222 in na ta način humano usmrčeni. Vse živali so bile shranjene v 70% etanolu. Vsi osebki so registrirani v evidenčni knjigi katedre, kjer so zbrani vsi podatki o posamezni izrabi tkiv omenjenih osebkov.

Osem živali pigmentirane podvrste močerila (D1, J1, J3, J6, J7, J8, J15 in J16) smo vzeli iz zbirke Skupine za zoologijo nevretenčarjev. Živali J1, J3, J6, J7, J8, J15 in J16 so bile najdene Na trati pri Jelševniku blizu Črnomlja leta 1991. Osebki J1, J3, J6 in J8 so bili leta 1994 uporabljeni v morfoloških analizah, deli notranjih organov osebkov J6 in J8 pa še v aloencimskih raziskavah.

Vsi zgoraj navedeni osebki so bili ulovljeni na osnovi dovoljenj, ki jih izdaja Ministrstvo za okolje in prostor RS in Agencija za okolje RS. Vsak osebek je bil v celoti izrabljen za funkcionalno-morfološke ali okoljske raziskave.

**Preglednica 1:** Podatki o poskusnih živalih. N – nepigmentirana podvrsta močerila, P – pigmentirana podvrsta močerila, PT – presvetlitvene tehnike, MRI – magnetna resonanca, CT – računalniška tomografija, / – ni podatka.

Oznaka	Podvrsta	Datum ulova	Lokaliteta	Datum fiksacije	Metoda dela
P95	N	21.10.1985	Planinska jama	24.6.1986	PT
P111	N	11.5.1994	Potiskalška jama	12.5.1994	MRI
P180	N	8.11.2005	Grčarske ravne	15.11.2005	CT
P181	N	8.11.2005	Grčarske ravne	6.12.2005	CT
P184	N	13.6.1905	Sohorec	živ	CT
P194	N	27.10.2008	Planinska jama	živ	CT
Čv	P	/	Jelševnik	/	CT
Č16	P	15.5.2006	Jelševnik	živ	CT
Č17	P	3.6.2002	Jelševnik	živ	CT
Č18	P	3.6.2002	Jelševnik	živ	CT
Č19	P	21.11.2004	Jelševnik	živ	CT
J1	P	29.10.1990	Jelševnik	/	CT
J3	P	29.10.1990	Jelševnik	/	CT in PT
J6	P	25.11.1991	Jelševnik	24.8.1994	CT
J7	P	25.11.1991	Jelševnik	24.8.1994	CT
J8	P	25.11.1991	Jelševnik	24.8.1994	CT
J15	P	25.11.1991	Jelševnik	24.8.1994	CT
J16	P	25.11.1991	Jelševnik	24.8.1994	CT
J'93	P	26.6.1993	Jelševnik	/	PT
D1	P	10.10.1986	Jelševnik	/	CT

## 3.2 PRESVETLITVENE TEHNIKE

### 3.2.1 Kemikalije

- očetna kislina
- 70% etanol
- tripsin
- natrijev borat
- hidrogen peroksid
- kalijev hidroksid
- barvilo alizarin red-S
- 100 %glicerin
- tymol v kristalu
- destilirana voda

### 3.2.2 Izbira metod

Da bi za potrebe diplomske naloge zagotovili najboljše rezultate, smo na testnem osebku P111 (nepigmentirana podvrsta močerila) predhodno preizkusili tri različne metode presvetljevanja (Davids in Gore, 1936; Hanken in Wasserung, 1981 ter Humason, 1967). Metode smo najprej preizkusili ločeno, potem pa še v različnih kombinacijah.

Pri končni pripravi osebka nepigmentirane podvrste močerila (P95) smo izbrali kombinacijo metod Davids in Gore (1936) ter Hanken in Wasserung (1981). Presvetljevanje preparata je potekalo po metodi Davids in Gore, pripravo barvila in postopek barvanja kosti pa smo opravili po metodi Hanken in Wasserung (1981). Za pripravo osebkov pigmentirane podvrste močerila (J1 in J'93) smo uporabili kombinacijo metod po Hanken in Wasserung (1981) ter Humason (1967), pri čemer je presvetljevanje

preparatov potekalo po metodi Humason, priprava barvila in barvanje kosti pa po principu metode Hanken in Wasserung (1981).

### 3.2.3 Priprava nepigmentirane podvrste močerila (P95)

Osebek smo vzeli iz fiksativa (formalin) in pričeli s spiranjem pod tekočo vodo, ki je trajalo 24 ur. S tem smo iz preparata želeli odstraniti ves odvečen fiksativ. Naslednji korak v pripravi preparata je zahteval odstranitev notranjih organov (za zagotavljanje boljše prosojnosti preparata v kasnejših korakih). Ker je imel osebek P95 že predhodno odstranjene notranje organe, smo ta korak lahko izpustili.

Sledilo je enodnevno namakanje v 70 % etanolu. Po namakanju preparata v alkoholu je sledila priprava raztopine barvila alizarin red-S po metodi Davids in Gore (1936). Raztopino barvila smo dodatno razredčili še z 0,5% kalijevim hidroksidom preden smo začeli z barvanjem preparata. Po navodilih metode naj bi po 24-urnem namakanju preparata v raztopini barvila opazili intenzivno rdeče obarvanje kostnega materiala. Ker po predpisanem času nismo dosegli omenjenih rezultatov, smo čas barvanja podvojili. V tem času so se kosti preparata obarvale intenzivno rdeče.

Nadaljevali smo z namakanjem preparata v 2% kalijevem hidroksidu (KOH). S tem postopkom smo iz neključnih tkiv (vsa tkiva preparata razen kosti) sprali odvečno barvilo. Tudi tokrat v predpisanem času nismo dosegli zelenih rezultatov, zato smo trajanje koraka podaljšali na 48 ur. Tekom teh 48 ur je bilo potrebno raztopino kalijevega hidroksida pogostokrat zamenjati, saj se je ta zaradi izločanja odvečnega barvila iz mehkih tkiv obarvala rožnato.

Razbarvanju tkiv je sledilo bistrenje preparata. Ta postopek smo opravili po metodi Davids in Gore (1936). V raztopini I smo preparat namakali 4 dni, v raztopinah II in III pa tri tedne. Po navodilih metode naj bi v vsakem koraku opazili jasnejšo razbistritev tkiv preparata, kar naj bi omogočilo vedno jasnejši pogled na obarvan kostni material. Ker tega

učinka po prvem postopku bistrenja nismo opazili, smo celoten korak ponovili. Sočasno smo preparat izpostavljali še sončni svetlobi, saj naj bi ta pospešila sam proces bistrenja. Po drugi ponovitvi je bila prosojnost tkiv boljša, vendar preparat ni bil enakomerno presvetljen v celoti. Optimalno so bili presvetljeni tanjši deli telesa, predvsem okončine in zadnji del repa, predeli okoli oprsja pa so bili zaradi debelejšega sloja mišičnega tkiva slabše presvetljeni. Na koncu je bil osebek spravljen v 100% glicerol z dodanim kristalom timola.

### **3.2.4 Priprava pigmentirane podvrste močerila (J1 in J'93)**

Osebek J1 je bil predhodno fiksiran v 70% etanolu. Preparat smo vzeli iz etanola in pričeli z namakanjem v 2% kalijevega hidroksidu. Namakanje je potekalo 2 dni, vmes pa smo večkrat zamenjali raztopino, ker se je med procesom močno obarvala. Po tem, ko smo s KOH odstranili večino pigmenta, smo po metodi Hanken in Wasserung (1981) nadaljevali z barvanjem preparata. Kostni so se v 24 urah intenzivno rdeče obarvale. Sledil je postopek bistrenja preparata po predlogi metode Humason (1967). Kljub doslednemu upoštevanju navodil in priporočil postopka nismo dobili zelenih rezultatov, saj so se mehka tkiva med procesom bistrenja ločila od skeletnih elementov. Mehko tkivo smo zavrgli, kosti pa uporabili za potrebe diplomskega dela.

Osebek J'93 je bil ohranjen v dehidriranem stanju. Pred začetkom izvajanja presvetlitvene tehnike smo iz preparata odvzeli notranje organe in preparat rehidrirali. Sledilo je 24-urno namakanje v 70% etanolu. Da bi iz tkiv (predvsem iz kože) odstranili pigment, smo preparat za 24 ur namočili v 2% raztopino kalijevega hidroksida. V tej raztopini bi moral preparat ostati toliko časa, da bi se iz tkiv izločila večina prisotnega pigmenta. Žal so mehka tkiva kmalu po namakanju v kalijevega hidroksidu razpadla in se ločila od elementov skeleta.

Odpadla mehka tkiva smo odstranili in nadaljevali z barvanjem okostja, saj smo lahko ohranili in obdržali vse skeletne elemente živali in jih z barvanjem naredili še bolj vidne.

Barvanje je potekalo po metodi Hanken in Wasserung (1981). V tej obliki je preparat omogočil natančen vpogled v posamezne skeletne dele živali. Zelo dobro so se ohranila in obarvala posamezna vretenca ter vsi koščeni deli sprednjih in zadnjih okončin. Prisotni so ostali tudi vsi elementi lobanje, ki zaradi razpadanja vezivnega tkiva niso ostali povezani, ampak so razpadli na posamezne elemente.

Ker ne poznamo ozadja o najdbi živali pod oznako J'93, ne vemo, do katere mere je nastopil proces propadanja tkiva, preden je bila žival posušena. Glede na to, da je tkivo začelo odstopati od kosti že na samem začetku procesa presvetljevanja, sklepamo, da je dekompozicija tkiva nastopila še preden je bila žival najdena in konzervirana.

### 3.3 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA

Z metodo računalniške tomografije smo posneli 17 živali. Od tega 13 živali pigmentirane podvrste in 4 živali nepigmentirane podvrste močerila. Snemanje je potekalo na Kliničnem oddelku za nevrologijo Univerzitetno kliničnega centra v Ljubljani, s pomočjo naprave Siemens SOMATOM Sensation Open (40-rezinski) z maksimalno ločljivostjo 0,3 mm. Na pridobljenih posnetkih smo primerjali obliko ter dolžino lobanjskih kosti, kosti sprednjih in zadnjih okončin ter število vretenc v posameznih regijah hrbtenice. Posnetki so bili obdelani s pomočjo programske opreme Syngo CT 3D.

Preparatov, fiksiranih v alkoholu, pred posegom ni bilo potrebno posebej pripravljati. Živali smo vzeli iz fiksativa, jih obrisali ter jih ustrezno orientirali na mizici CT-naprave. Po končanem snemanju smo žival vrnil v fiksativ.

Več priprav je bilo potrebnih ob delu z živimi živalmi. Delo je bilo potrebno opraviti hitro in natančno, da živali nismo poškodovali in pretirano obremenjevali. Žive živali smo v posameznih temperaturno izoliranih zabojnikih, napolnjenih z deklorirano vodo s temperaturo 10 °C, iz Biološkega središča prenesli do Oddelka za nevrologijo na UKC v Ljubljani. Po transportu smo močerile neposredno pred samim posegom uspavali s

pomočjo uspavalne raztopine (0,03% Ethyl3), ki smo jo predhodno pripravili istega dne. Živali smo za deset minut posamično položili v uspavalno raztopino. Ko so se živali umirile, smo jih ročno prenesli do mizice na CT-napravi. Delovna površina je bila prekrita z navlaženimi krpami, da bi zagotovili stalno vlaženje kože poskusnih živali. Pri rokovanju z živalmi smo ves čas uporabljali rahlo navlažene rokavice. Po slikanju, ki je v povprečju trajalo petindvajset sekund, smo živali nemudoma prenesli v transportni zabojnik, napolnjen z deklorirano vodo.

Po posegu smo živali vrnili v Biološko središče. V obstoječi literaturi nismo našli podatka o tem, kako bi sevanje utegnilo vplivati na močerila, zato smo živali pozorno spremljali še teden dni po samem posegu. Iz naših opažanj je razvidno, da so živali poseg uspešno prestale in niso kazale vidnih negativnih posledic. Po prvotnem vznemirjenju so se živali hitro pomirile in prevzele svoje normalne vedenjske vzorce. Prav tako nismo opazili nobenih vidnih sprememb na koži živali. Koža močerilov je občutljiv organ, zato predvidevamo, da bi se negativne posledice sevanja hitro pokazale ravno na njej. Živali tudi nekaj mesecev po posegu niso kazale nobenih negativnih posledic.

Pri slikanju živih živali smo uporabili zelo nizke jakosti sevanja (tokovni sunek = 150 mAs). Za analizo fiksiranih preparatov je bilo potrebno jakost sevanja močno zvišati (tokovni sunek = 250 mAs). Predvidevamo, da je bil vzrok zato visoka koncentracija etanola v tkivih fiksiranih živali, ta pa ima slabše presevalne sposobnosti kot samo tkivo živih živali.

Nastale posnetke smo preoblikovali in analizirali s pomočjo strokovnega osebja Oddelka za nevrologijo Univerzitetno kliničnega centra v Ljubljani.

Parametri pri slikanju:

- anodna napetost: 80 kV
- tokovni sunek: 150 mAs za žive in 250 mAs za preparate



- kolimacija: 20 x 0.6 mm
- rekonstrukcijski algoritem: H60s
- debelina rezine: 0.6 mm
- rekonstrukcijski inkrement: 0.3 mm
- čas skeniranja: 25 s

Parametri pri rekonstrukciji slik:

- 3D VRT (volume rendering technique)
- ločena priprava slik celotnega telesa, glave s sprednjimi okončinami, osrednjega dela hrbtenice in repnega dela z zadnjimi okončinami

### 3.3.1 Merjenje prostornine kalcija v kostnem tkivu močerilov

Prostornino kalcija v kalcificiranih anatomskih strukturah (kosteh) smo ocenili s pomočjo računalniško-tomografskega (CT) slikanja. Raziskave v humani biologiji potrjujejo, da lahko prostornino kalcija v posameznih anatomskih strukturah (najbolj preučevane so koronarne arterije pri človeku) ocenimo s prostornino struktur, ki značilno absorbirajo rentgenske žarke (so "radioopačne"). Prag radioopačnosti za strukture, ki vsebujejo kalcij, smo postavili na 130 Hounsfieldovih enot v skladu s predhodnimi raziskavami v humani biologiji, ki so potrdile tesno korelacijo med histološko-biokemično določeno koncentracijo kalcija v posameznem tkivu ter številom pikselov na CT-posnetkih, ki so bolj radioopačni od 130 Hounsfieldovih enot (Budoff in Gul, 2008).

CT-posnetke poskusnih živali smo pridobili s standardiziranim protokolom na visoko ločljivem CT-aparatu Siemens SOMATOM Sensation Open (40-rezinski) z maksimalno ločljivostjo 0,3 mm. Na vsaki trimilimetrski rezini smo strukture, ki so na CT-posnetkih vsebovale vsaj tri piksele ( $> 0,51 \text{ mm}^2$ ) z več kot 130 Hounsfieldovih enot, označili in s pomočjo prilagojene računalniške programske opreme (Syngo CaScore, Siemens

Healthcare, Forchheim, Nemčija) določili njihovo površino v  $\text{mm}^2$  ter dobljene vrednosti pomnožili z debelino CT-rezine in tako ocenili prostornino kalcija (v  $\text{mm}^3$ ) v kosteh.

### 3.4 MAGNETNA REZONANCA

Snemanje je potekalo na Institutu Jožefa Stefana, na Odseku za fiziko trdne snovi, v laboratoriju za MRI.

Magnetnoresonančni tomograf je osnovan okoli 2.35 T superprevodnega horizontalnega magneta (Oxford Instruments) z odprtino za slikanje premera 15 cm, gradientnih ojačevalnikov in tuljav za slikanje z ločljivostjo do 0.5 mm (makro slikanje) ter do 0.05 mm (MR mikroskopija). Magnet je bil priključen na NMR/MRI spektrometer (Apollo, TecMag), kar je omogočalo izvajanje zapletenih zaporedij za slikanje in spektroskopijo. Žival smo vzeli iz alkohola, jo obrisali in zavili v folijo za živila, da se ne bi med snemanjem izsušila. Nato smo jo vstavili v magnetno-resonančni tomograf. Ta se nahaja v posebni sobi, ki deluje kot Faradajeva kletka in preprečuje zunanje motnje (elektromagnetno valovanje). Snemanje je potekalo čez vikend, brez poprečitve pa je trajalo 9 ur in 17 minut. Naredili smo 3 poprečitve.

Parametri pri slikanju:

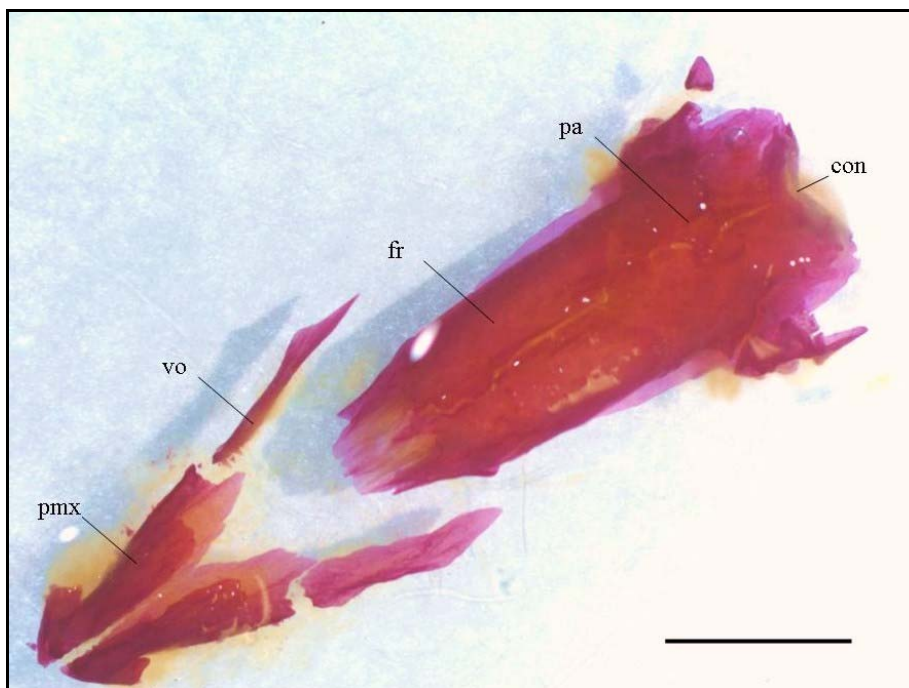
- TE – čas spinskega odmeva; TE = 3 ms
- TR – repetition time; TR = 600 ms
- matrika slikanja = 2563
- vidno polje = 3 cm
- Gr = 62,66
- Gp = 40,10
- Gs = 11,04

## 4 REZULTATI

### 4.1 PRESVETLITVENE TEHNIKE

S presvetlitvenimi tehnikami smo presvetlili dva osebka pigmentirane podvrste. Boljše rezultate smo dobili z barvanjem skeleta osebka pod oznako J'93. Obarvane elemente skeleta smo si ogledali s pomočjo stereolupe Olympus SZX9. Posnetki so bili narejeni s pomočjo kamere ColorView III, nameščene na stereomikroskop.

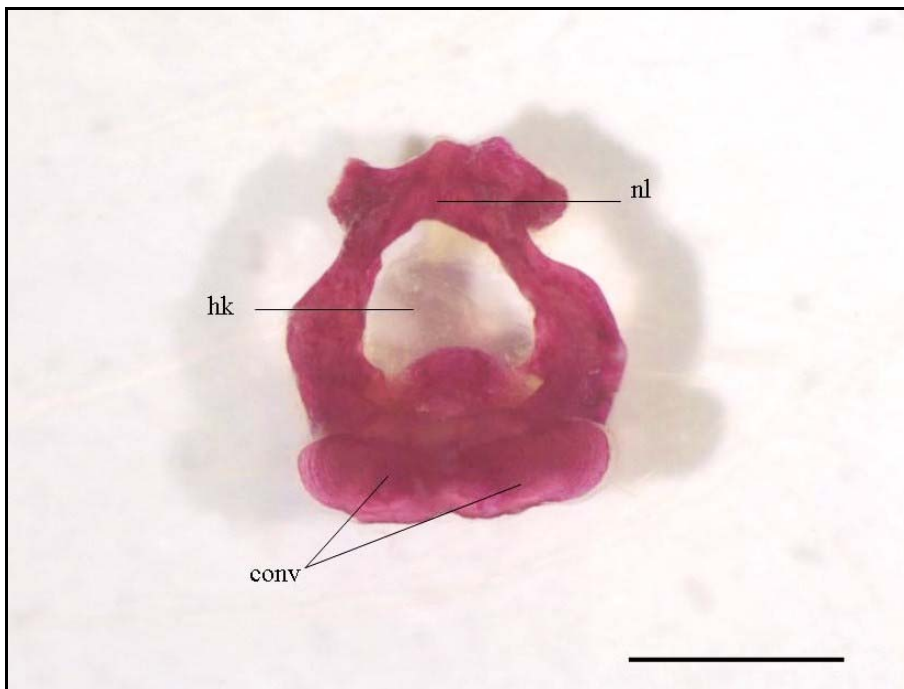
Obarvana lobanja je omogočila jasen pogled na dermalne kosti premaxilla (pmx), frontale (fr), parietale (pa) in vomer (vo). Prav tako lepo vidna je bila največja dermalna kost spodnje čeljusti dentare (den), na kateri smo lahko prepoznali tudi zobe. Zaradi barvanja z alizarinom red-S sta bila na elementu oplečja jasno razpoznavna koščena predela scapula (sc) ter procoracoid (pc), ki sta izstopala od ostalih hrustančnih elementov oplečja. Hrbtenica je v posameznih regijah razpadla oziroma so se vretenca ločila med seboj. Tako smo si lahko podrobno ogledali obliko in zgradbo vretenc v vseh regijah hrbtenice. Posebej smo izpostavili atlas (edino vretenca vratne regije) ter posamezna trupna vretenca. Prav tako smo dobili lepe posnetke vretenc repne regije, vključno z najmanjšimi vretenci te regije, ki so povsem brez izrastkov.



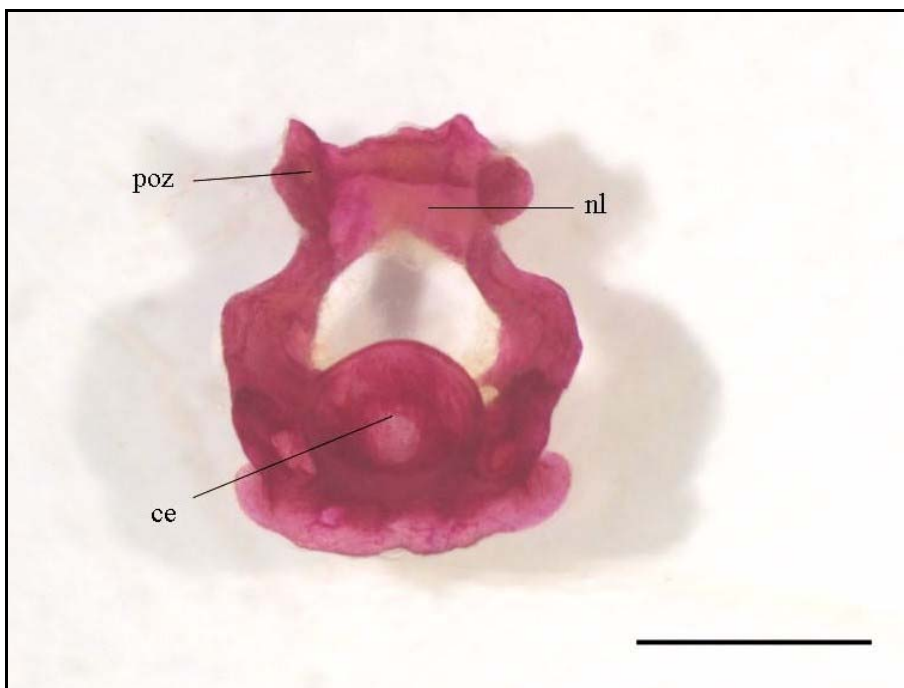
**Slika 7:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na skelet lobanje. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 25 mm.



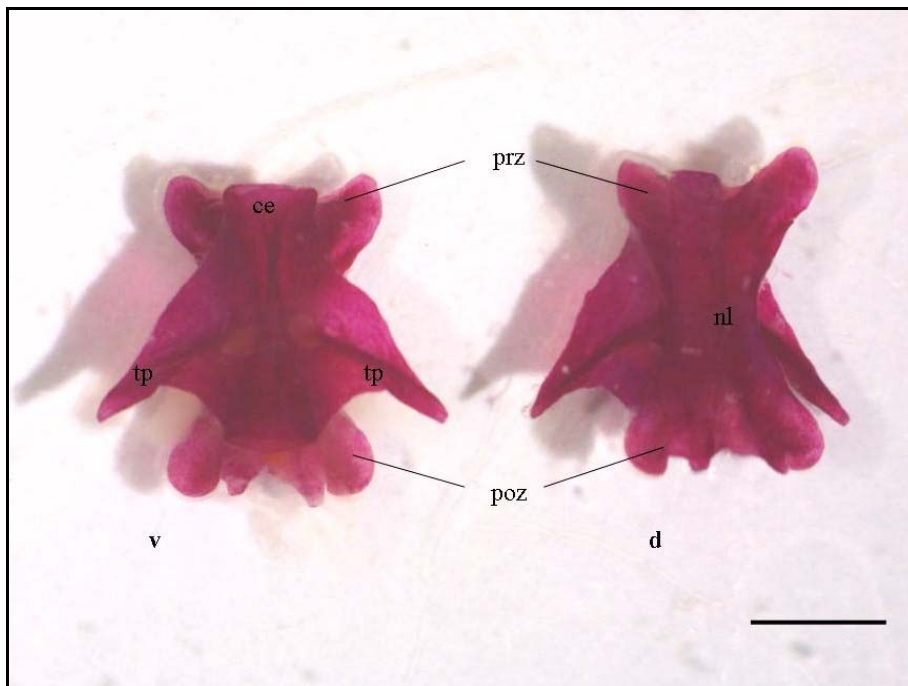
**Slika 8:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na dentarno kost spodnje čeljusti. Spodnja čeljust pri močerilu sestavljata dermalni kosti dentare in angulare, ki obdajata centralno nameščeni Meckelov hrustanec. Dentare je največja kost spodnje čeljusti pri močerilu in je obenem tudi nosilka zob spodnje čeljusti. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



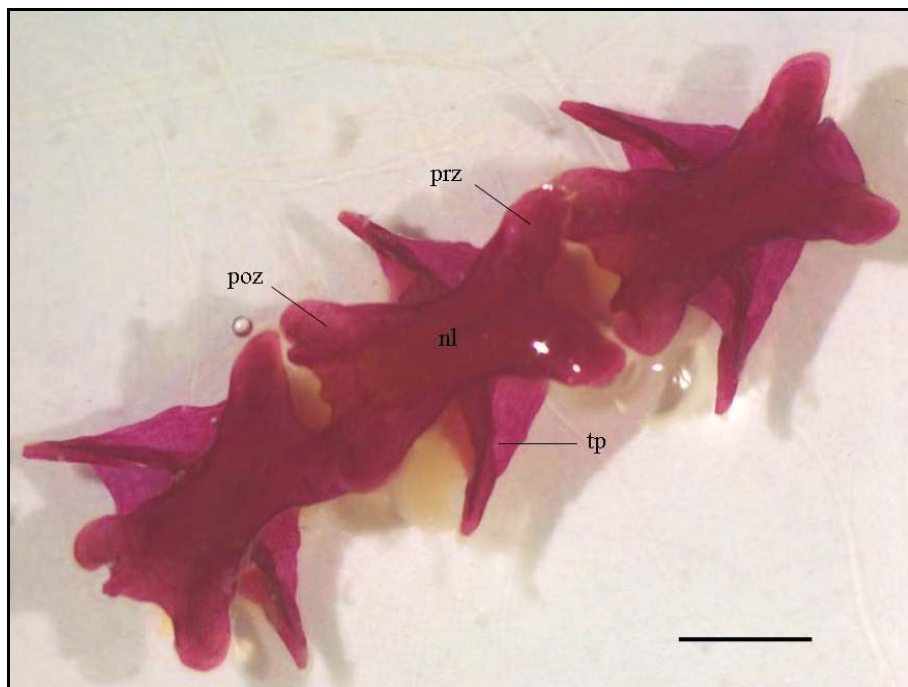
**Slika 9:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Anteriorni pogled na atlas. Atlas je edino vretence vratne regije. Je amphicelno vretence z manjkajočimi sprednjimi zigapofizami. Kranialno in ventralno se na atlasu nahajajo mesta za sklepno vezavo s kondili occipitalke. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



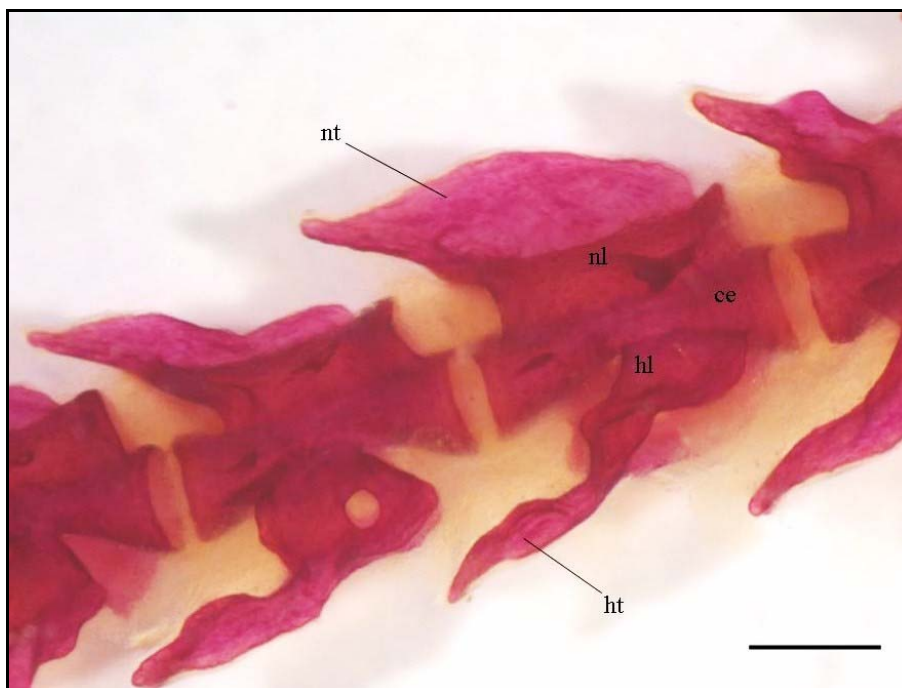
**Slika 10:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Posteriorni pogled na atlas. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



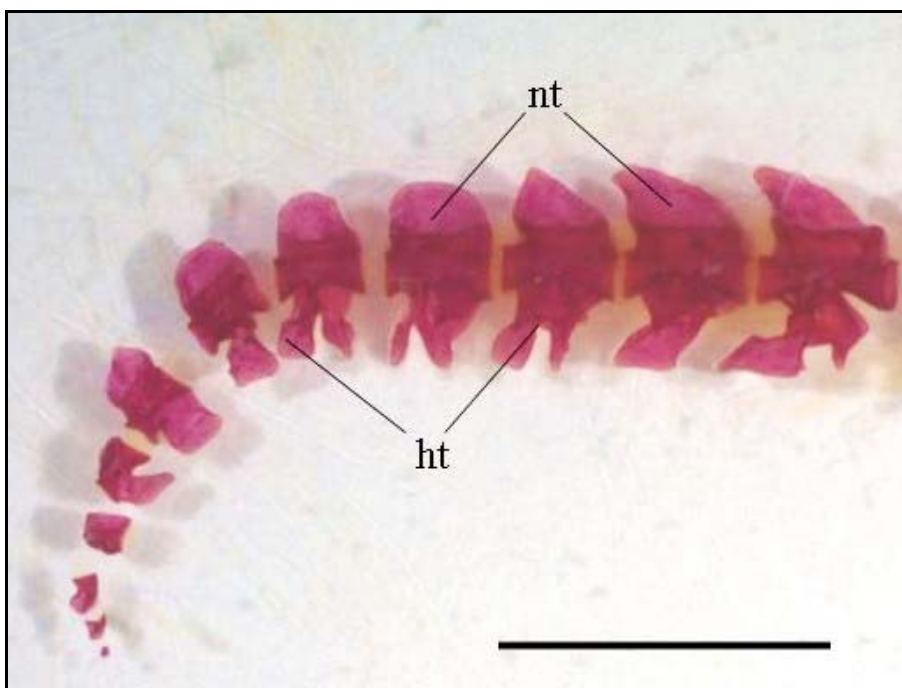
**Slika 11:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Ventralni (v) in dorzalni (d) pogled na trupni vretenci. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



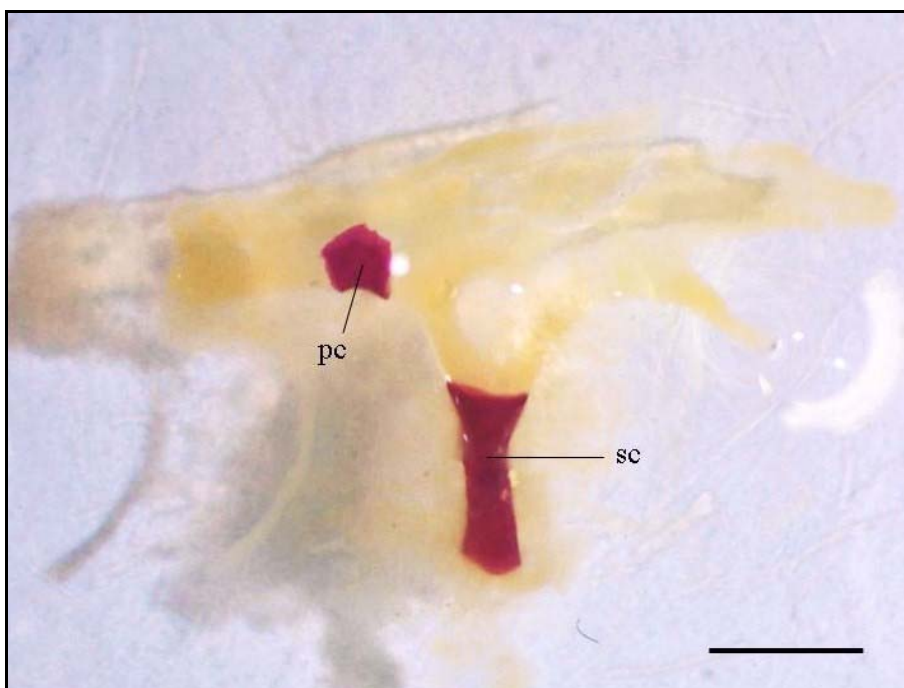
**Slika 12:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Dorzalni pogled na zaporedna trupna vretenca. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



**Slika 13:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Lateralni pogled na zaporedna repna vretenca. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



**Slika 14:** Pigmentirana podvrsta močerila (J'93). Lateralni pogled na zadnja repna vretenca. Barvano z alizarin red-S. Merilce: 10 mm.



**Slika 15:** Pigmentirana podvrsta močerila (J93). Lateralni pogled na oplečje. Barvano z alizarin red-S. Barvilo je obarvalo samo koščene elemente oplečja, ki tako vidno izstopajo od ostalih hrustančnih elementov oplečja. Merilce: 10  $\mu$ m.



## 4.2 RAČUNALNIŠKA TOMOGRAFIJA

### 4.2.1 Posnetki tridimenzionalnih modelov okostij močerilov

S pomočjo posnetkov, pridobljenih s sodobno metodo računalniške tomografije (CT), smo prvič izdelali računalniške tridimenzionalne modele okostij izbranih močerilov. Modeli so omogočali vrtenje skeleta v vseh smereh in približevanje v določene strukture okostja. S CT-tehnologijo smo izdelali modele okostij šestnajstih močerilov (3 živali nepigmentirane in 13 živali pigmentirane podvrste). Ker smo pri snemanju uporabljali tako žive kot fiksirane močerile, smo med postopkom snemanja uporabljali različne jakosti sevanja. Pri živih živalih so bile jakosti sevanja nižje (tokovni sunek = 150 mAs) in tudi sam postopek slikanja z rentgenskimi žarki je potekal krajši čas (25 s) kot pri fiksiranih osebkih (tokovni sunek = 250 mAs, trajanje slikanja = 35 s). Ločljivost koščeni elementov na posnetkih živih živali (Č16, Č17, Č18, Č19, P184 in P194) je tako nekoliko slabša od posnetkov živali, ki so bile fiksirane v 70% etanolu.

Preučevali smo celoten skelet močerilov, ocenili število vretenc ter izmerili dolžino določenih skeletnih elementov. Meritve smo opravili s pomočjo programske opreme Syngo CT 3D. Na posnetkih lobanje smo izmerili kondilo-bazalno dolžino (KBD) ter dolžino mandibularnega loka (man) in squamosum (sq). Na predelu visceralnega skeleta smo izmerili dolžino ceratohiala (chy) ter prvega ceratobranhialnega (cbr I) in prvega epibranhialnega elementa (epb I). Na okostju sprednjih in zadnjih okončin smo izmerili dolžino humerus (hum) in femur (fem). Poleg dolžin posameznih skeletnih elementov, smo iz CT-posnetkov določili tudi telesno dolžino živali (td).

Dorzalni pogledi na skelet lobanje prikazujejo dobro vidne dermalne kosti premaxilla (pmx), frontale (fr), parietale (pa), pterigopalatinum (pp), vomer (vo) ter stransko ležeči squamosum (sq), ki tvori lateralni del zgornjega dela lobanje. Z dorzalnih posnetkov lahko prepoznamo tudi dermalni kosti spodnje čeljusti angulare (an) in dentare (den), ki obdajata Meckelov hrustanec. Na lateralnem pogledu sta, poleg že omenjenih struktur, bolj vidni še dermalna kost qadrum (q) in prearticulare (pac) spodnje čeljusti. Ventralni pogled na

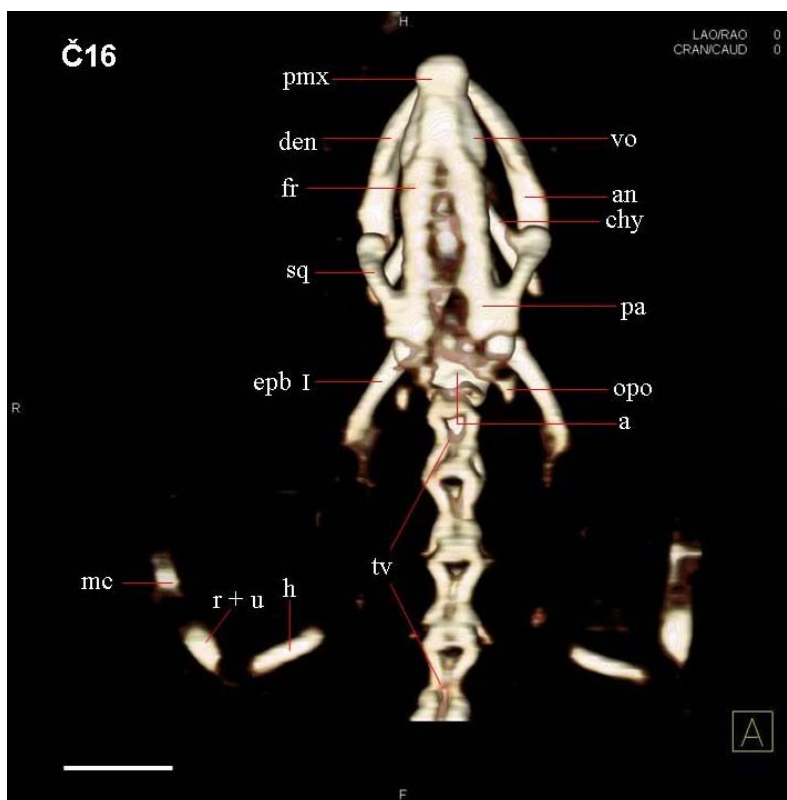
skelet lobanje omogoča še pogled na parasphenoid (ps), ki je kost primarnega neba in je ravno tako dermalnega nastanka.

Ventralni pogledi na kranialni skelet omogočajo dober prikaz koščenih elementov visceralnega skeleta. Tako lahko na posnetkih okostij močerilov jasno ločimo ceratohialni element (chy) (del drugega visceralnega loka), prvi basibranhialni element (bbr I), oba ceratobranhialna elementa (cbr I in cbr II) ter tri pare epibranhialnih elementov (epb I, epb II in epb III). Ceratobranhialna elementa I in II sta sestavna dela prvega in drugega branhialnega loka (oziroma tretjega in četrtega visceralnega loka), epibranhialni elementi I, II in III pa so ostanki tretjega, četrtega in petega branhialnega loka (oziroma petega, šestega in sedmega visceralnega loka).

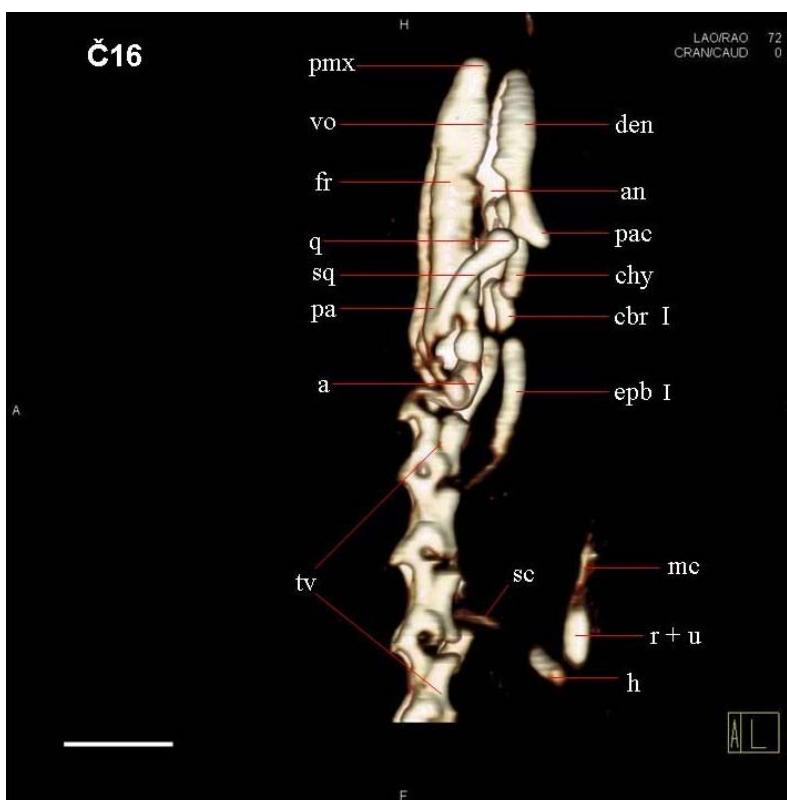
Prvo in edino vretenca vratne regije atlas (a) je dobro vidno na vseh posnetkih okostij močerilov. Prav tako so jasno ločljiva vsa vretenca trupne regije (tv). Sakralno vretenca (sv) se po izgledu bistveno ne ločuje od ostalih vretenc v trupni regiji. Prva repna vretenca (cv) so jasno prepoznavna na vseh posnetkih okostij močerilov. Zadnja repna vretenca pa so, zaradi prenizke ločljivosti CT-naprave, večinoma zlita v celoto.

Ob pogledu na skeletne elemente sprednjih okončin lahko dobro ločimo humerus (h), radius in ulna pa sta pogostokrat zlita v skupno celoto (r + u). Metakarpalni elementi (mc) so prepoznavni na večini posnetkov, končni členki prstov ali phalange (ph) pa le na posnetkih določenih osebkih (Čv, J3, J8, J16, P184, P194). Od elementov oplečja je na večini posnetkov dobro viden koščeni del scapula (sc).

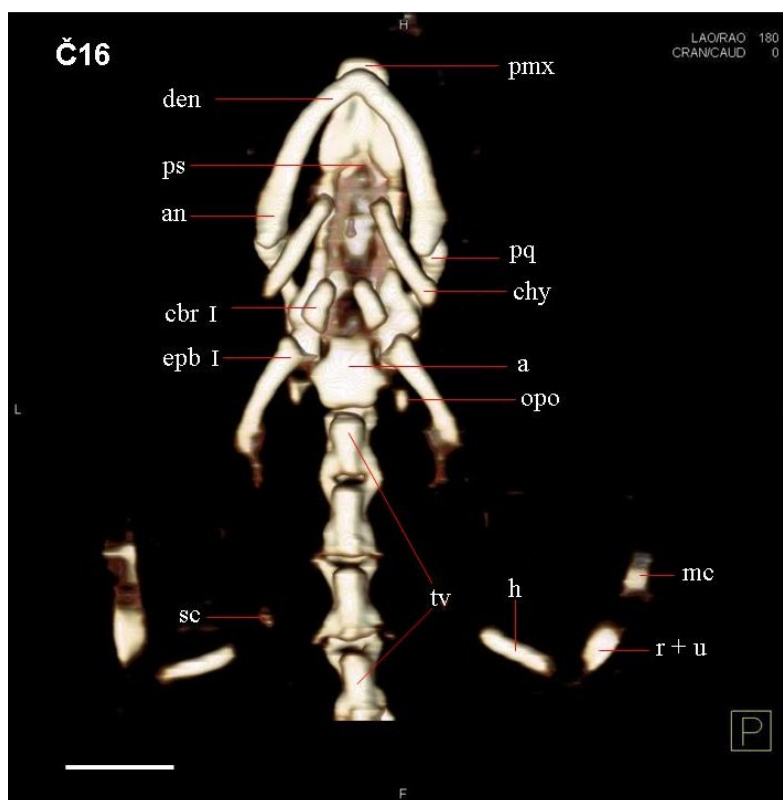
Ob pogledu na skeletne elemente zadnjih okončin prepoznamo femur (f), tibia in fibula pa sta na večini posnetkov zliti v skupno celoto (ti + fi). Metatarzalni elementi so dobro vidni na posnetkih večine močerilov, phalange (ph) pa le na posnetkih določenih živali (Čv, J3, J8, J16, P184, P194). Od elementov okolčja je na večini posnetkov dobro viden koščeni del iliuma (il) in ishiuma (is) ter pri določenih osebkih tudi koščeni del puboischiatne plošče (pip).



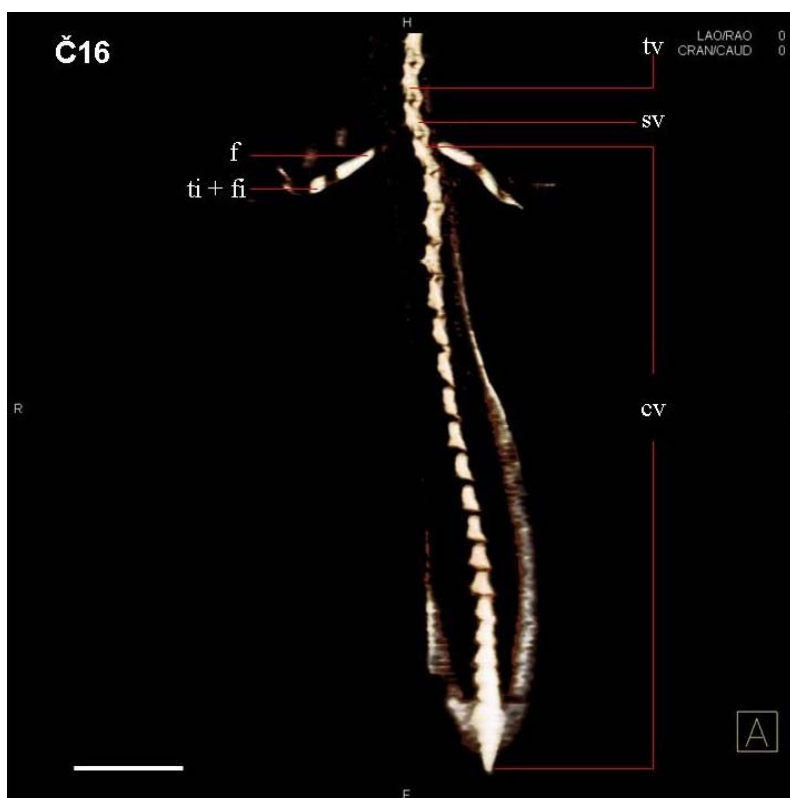
Slika 16: Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



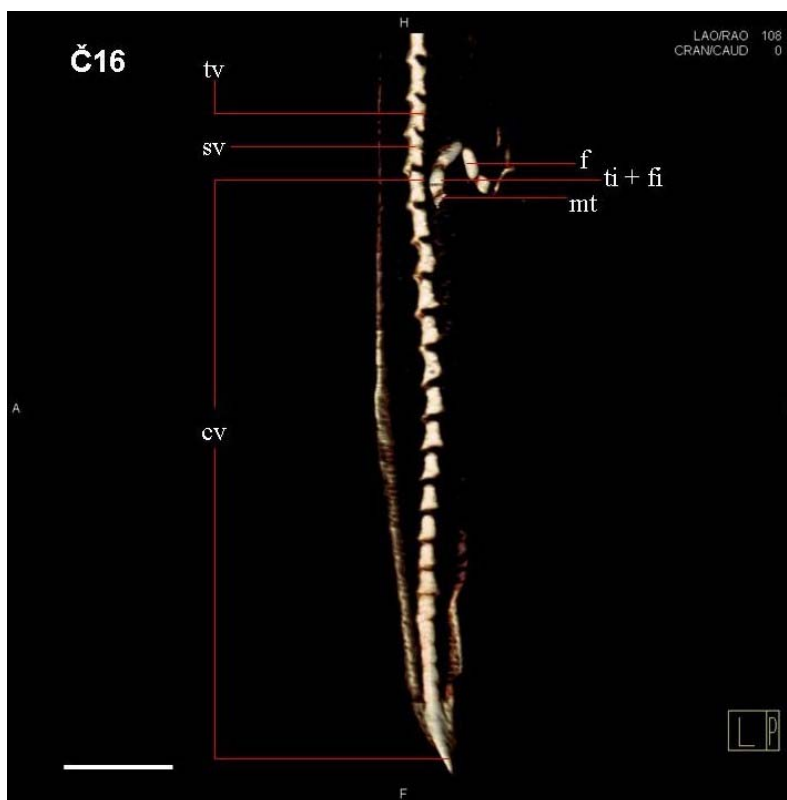
Slika 17: Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



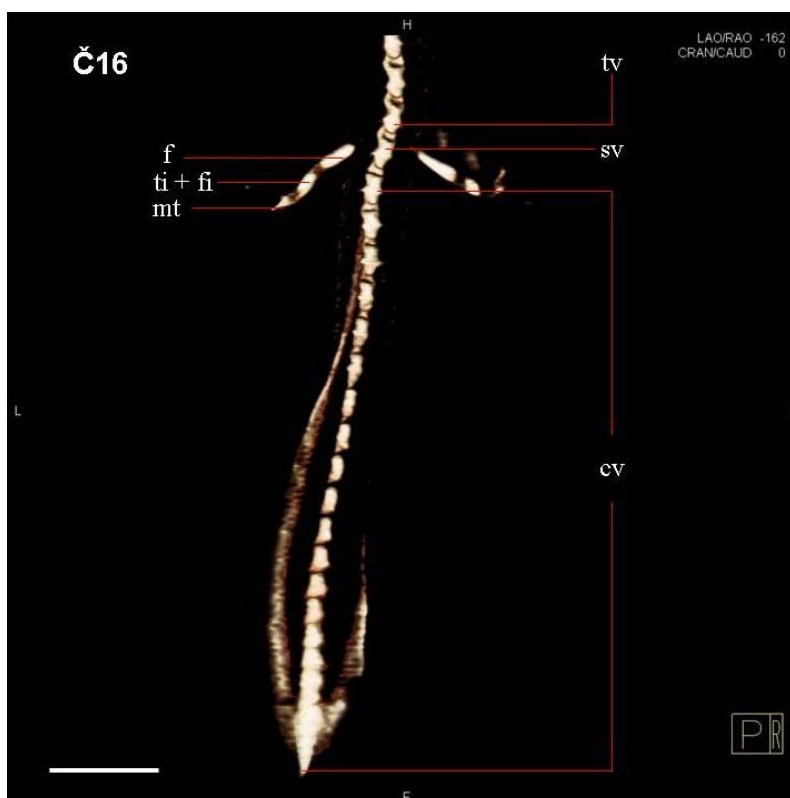
Slika 18: Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



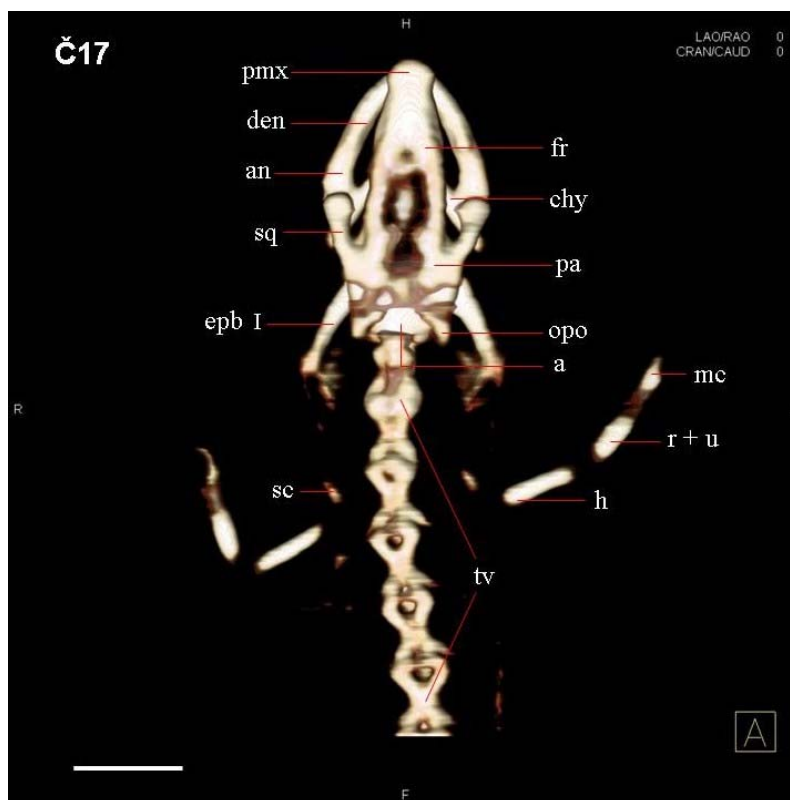
Slika 19: Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Dorzalni pogled na kavalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



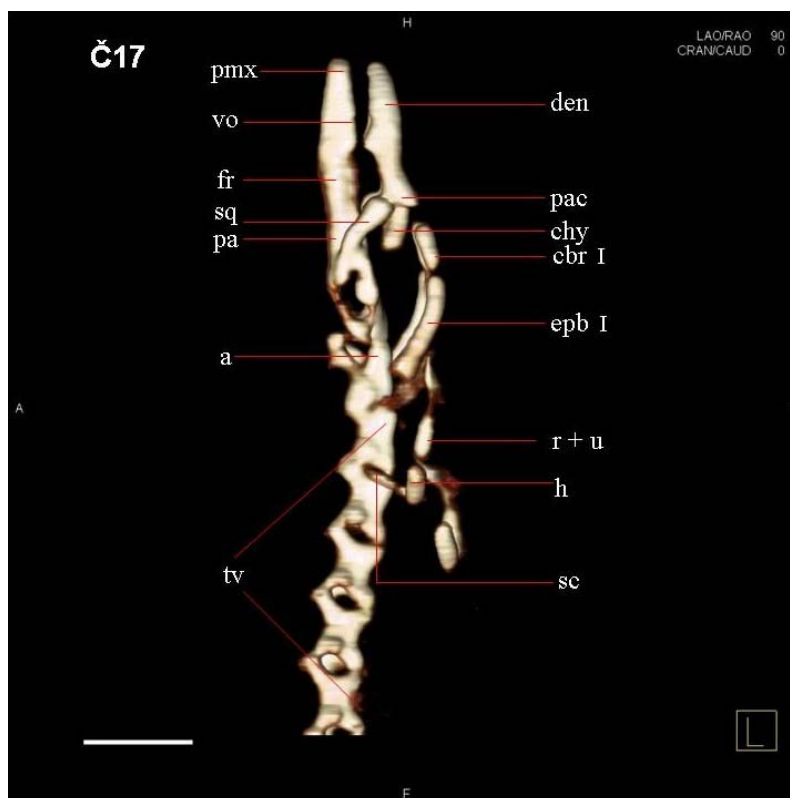
**Slika 20:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



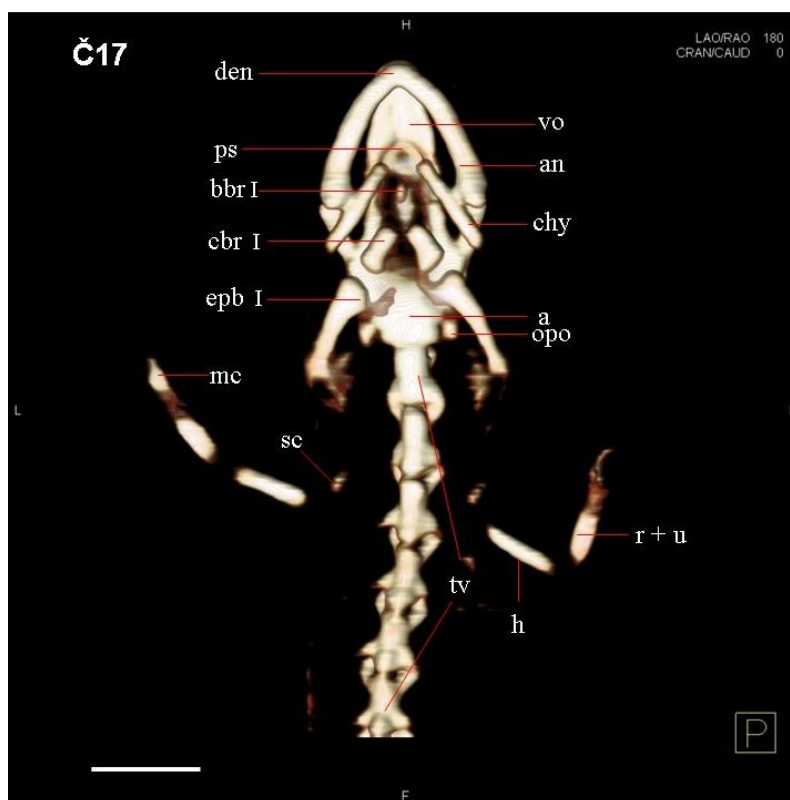
**Slika 21:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č16). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



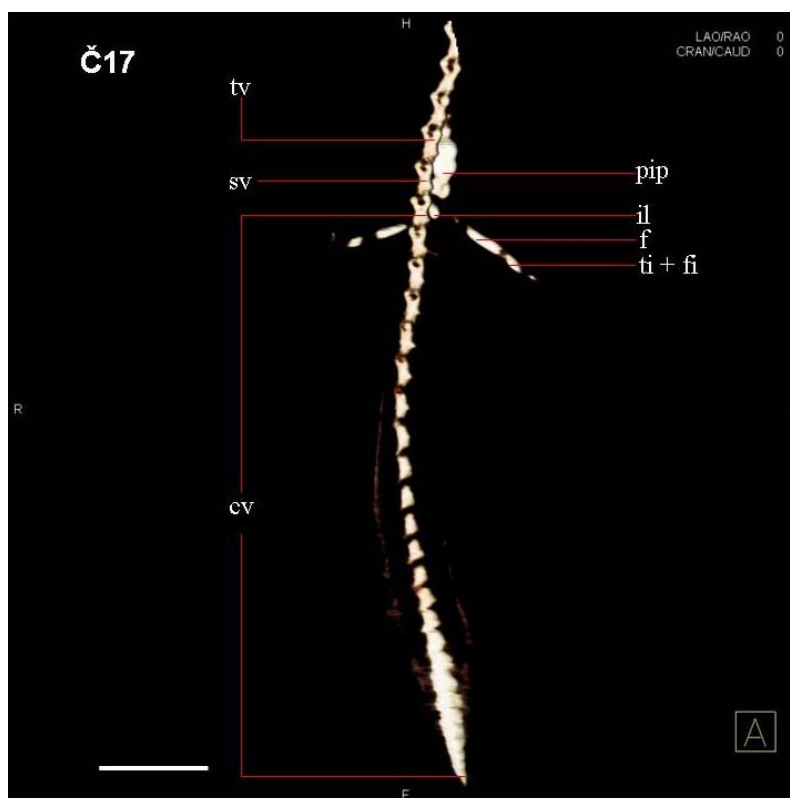
Slika 22: Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



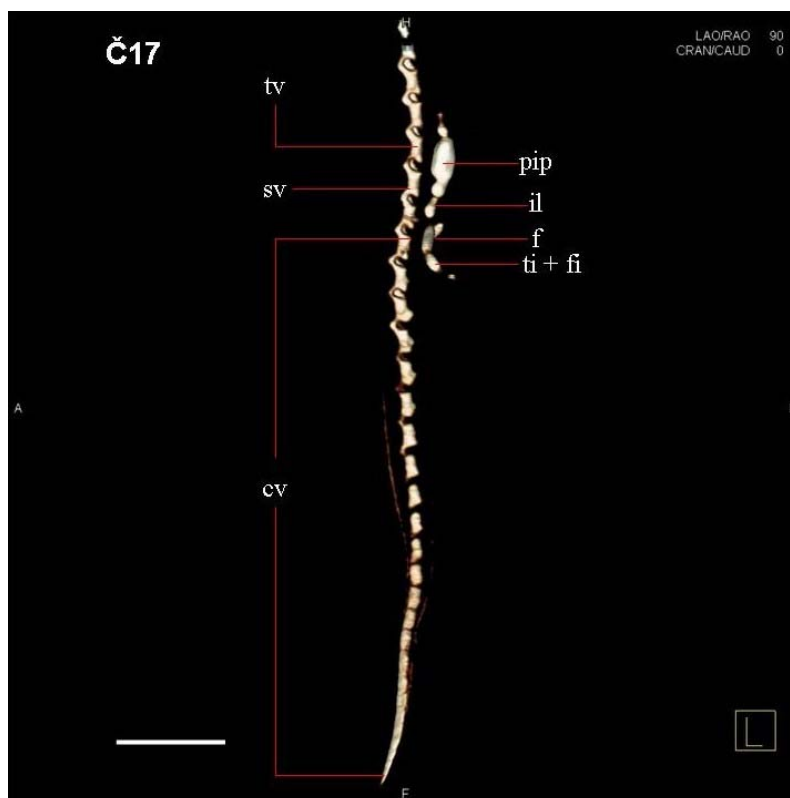
Slika 23: Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



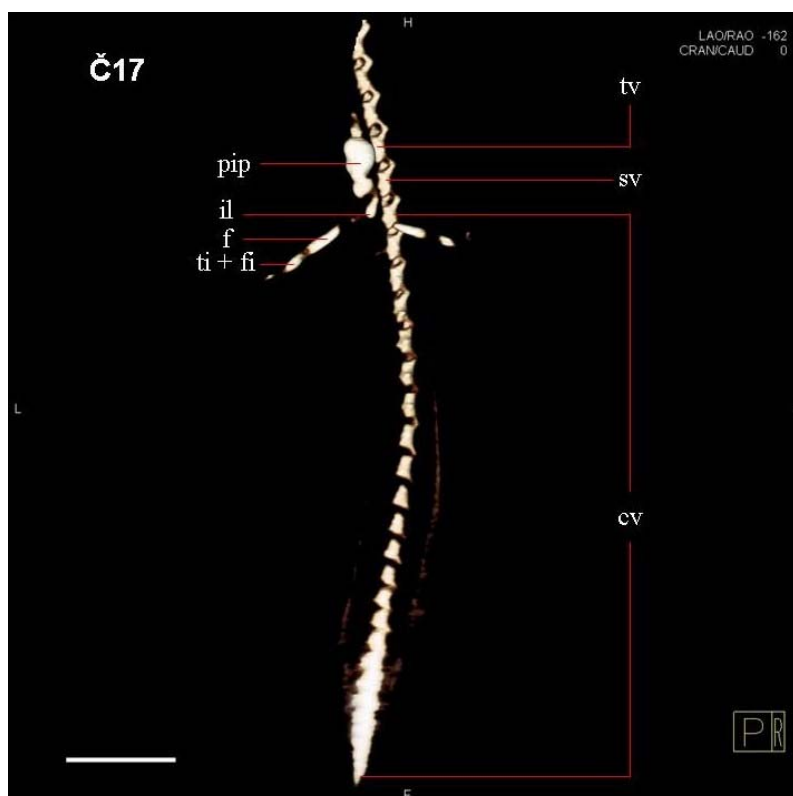
Slika 24: Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



Slika 25: Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Dorzalni pogled na kavalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

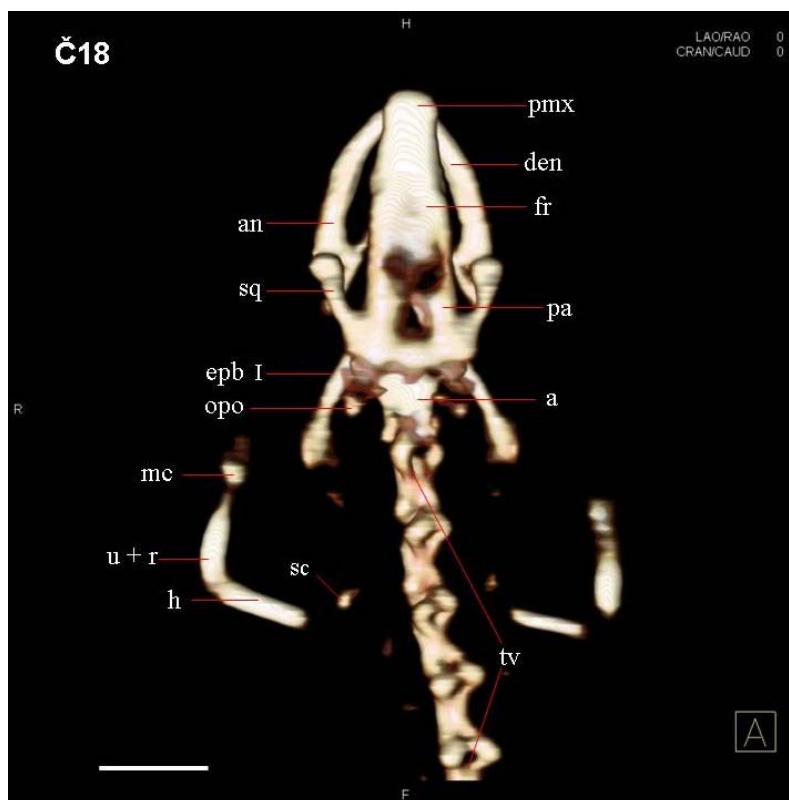


**Slika 26:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

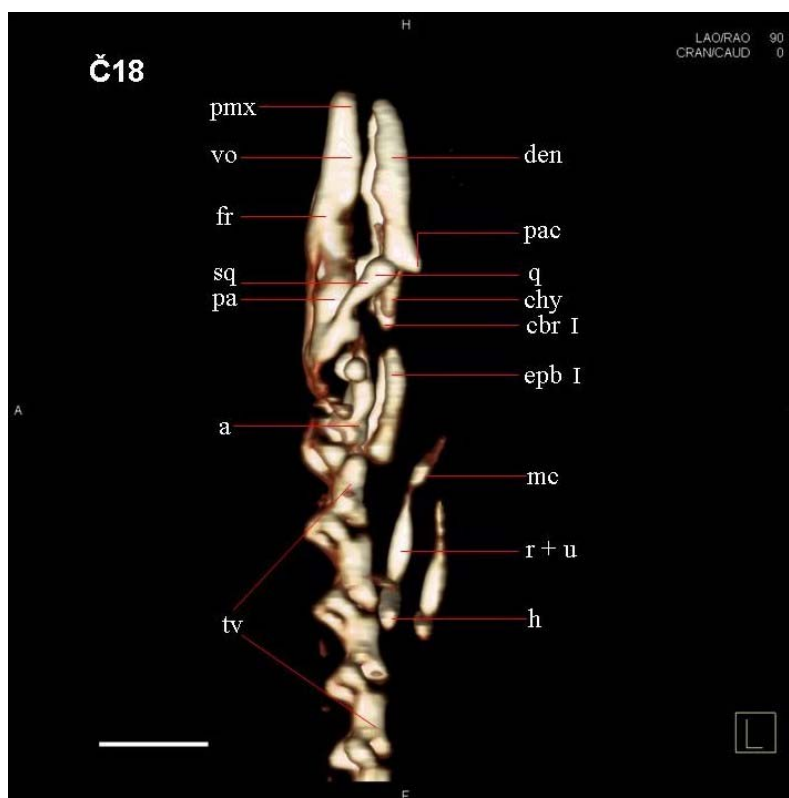


**Slika 27:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č17). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

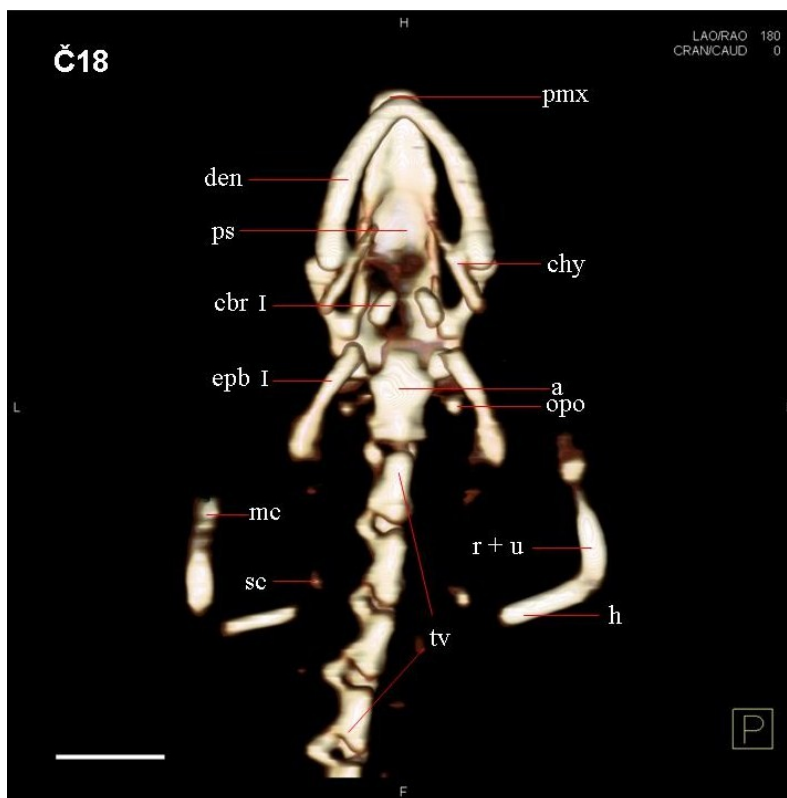




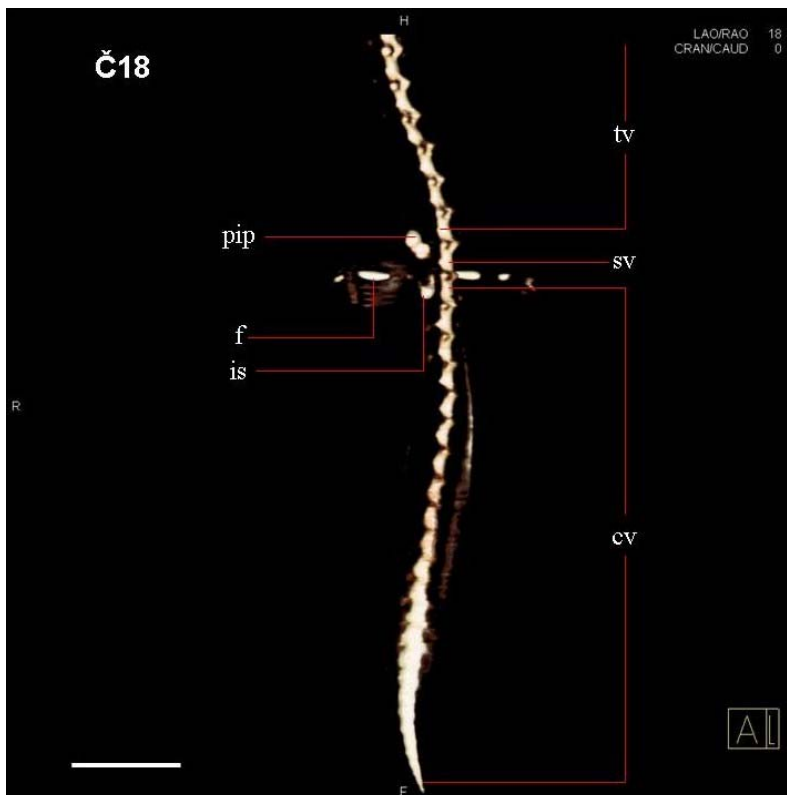
Slika 28: Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



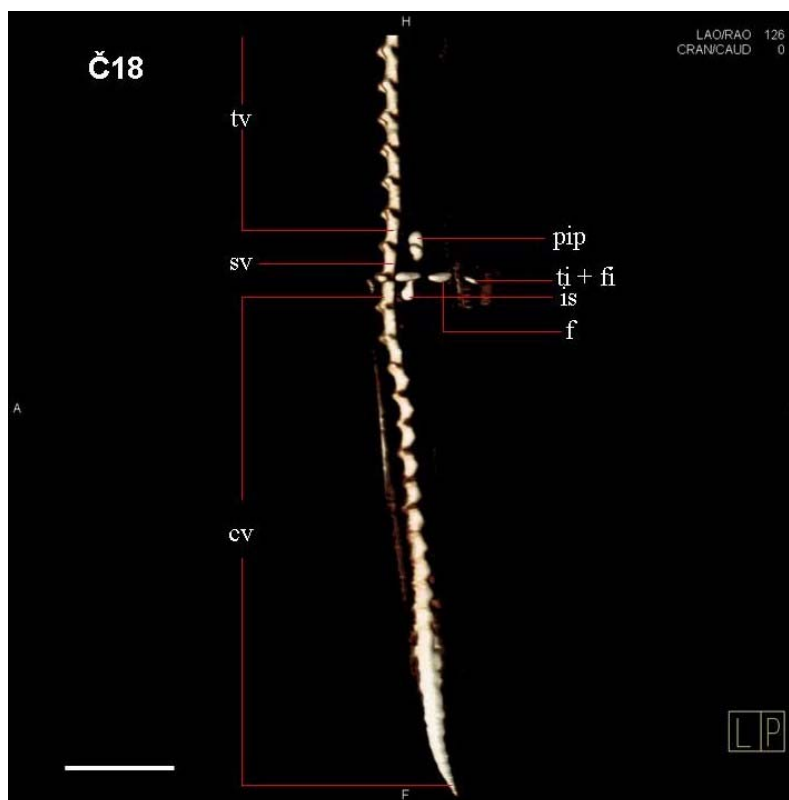
Slika 29: Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



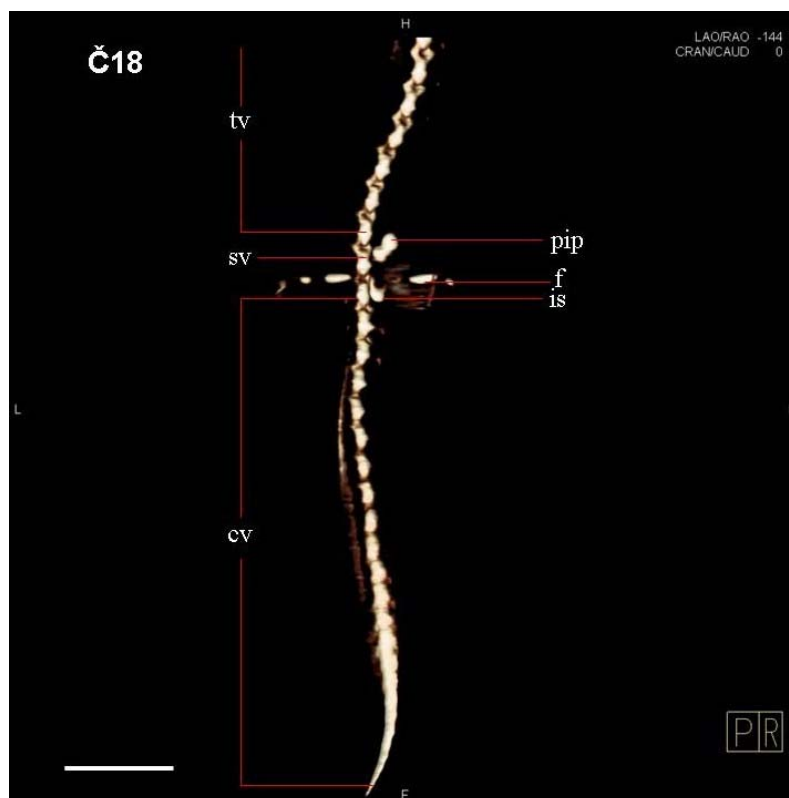
**Slika 30:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



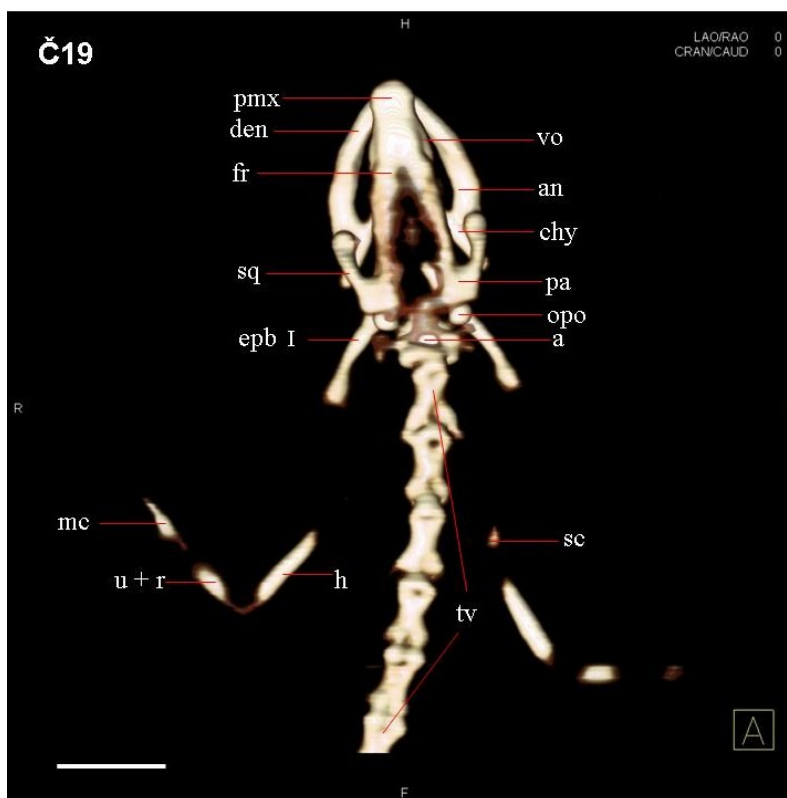
**Slika 31:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Dorzalni pogled na kavalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



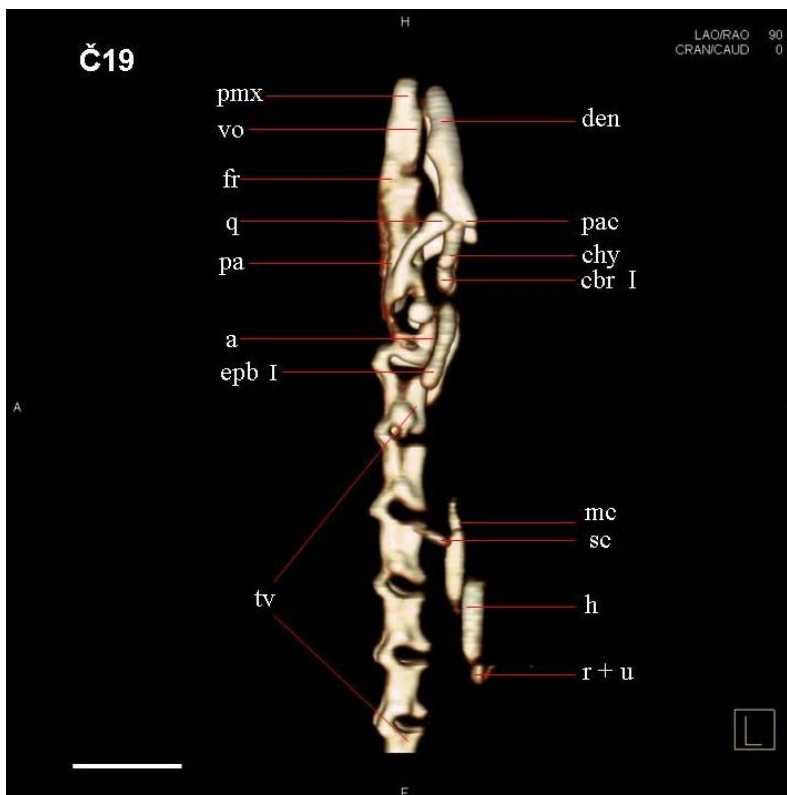
**Slika 32:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5mm.



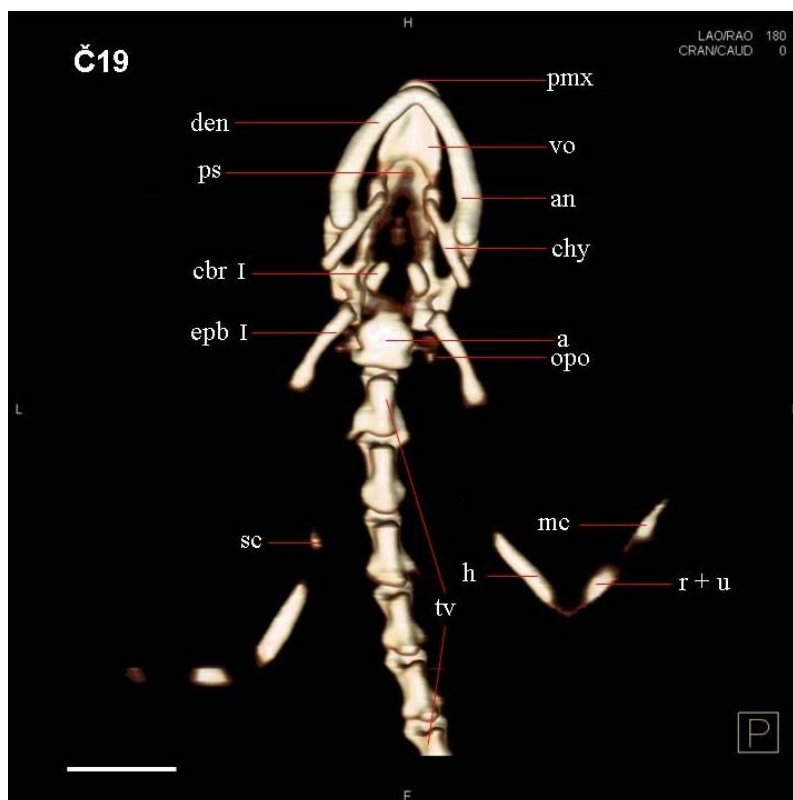
**Slika 33:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č18). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



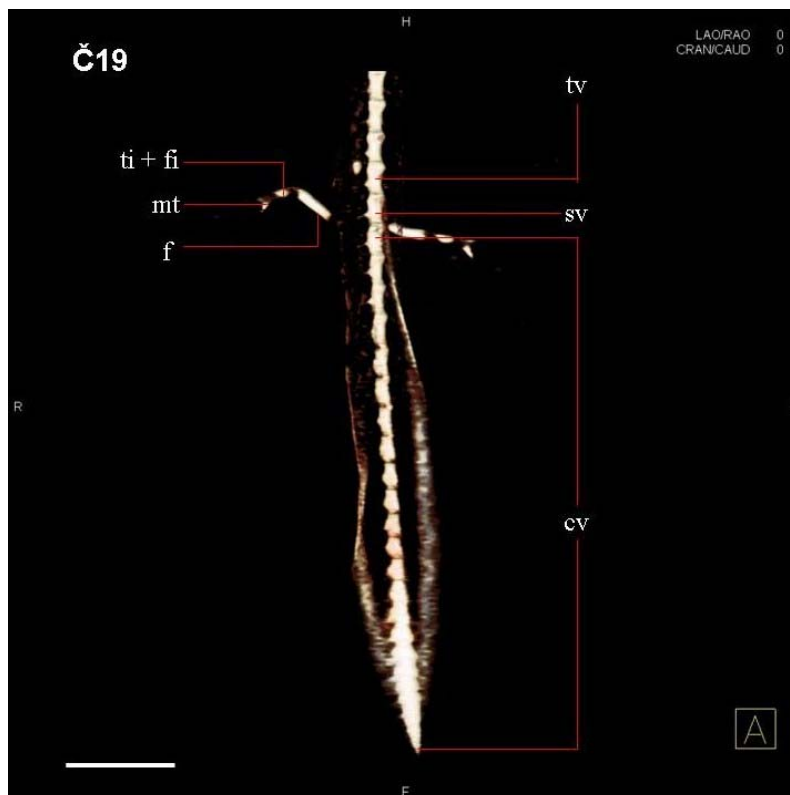
Slika 34: Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



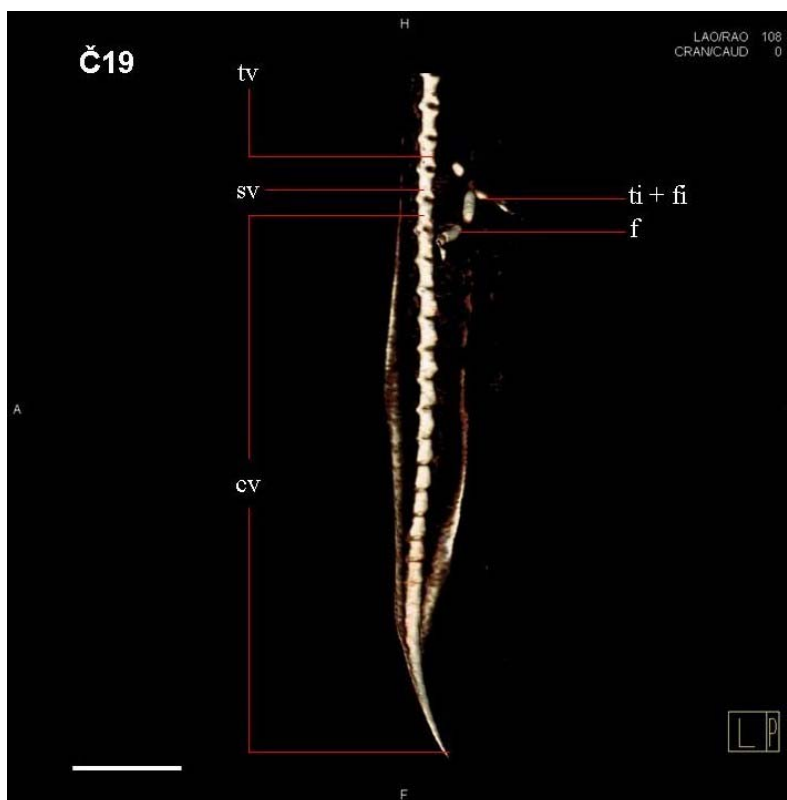
Slika 35: Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



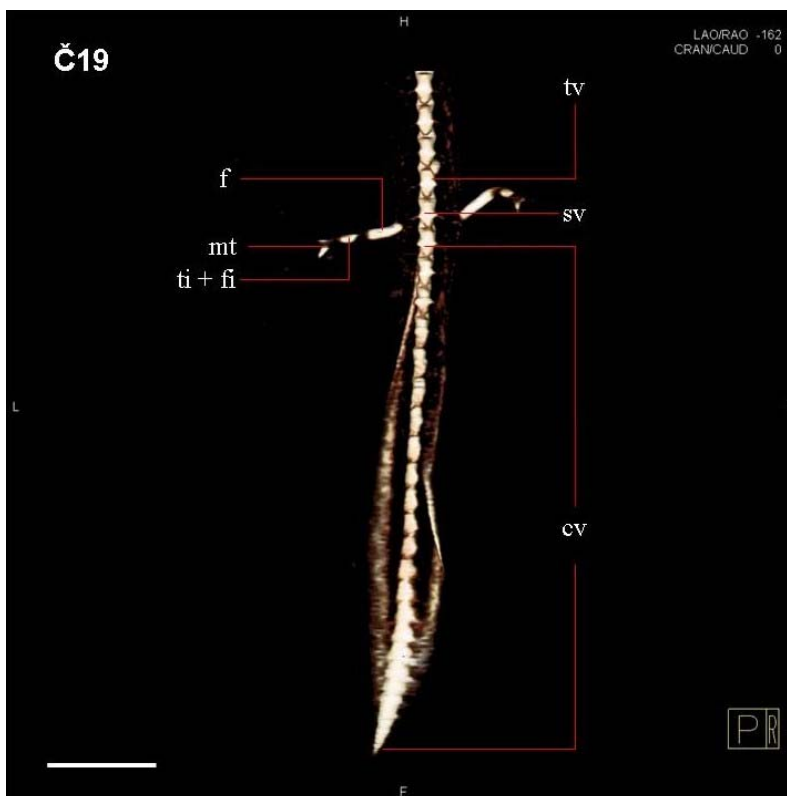
**Slika 36:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



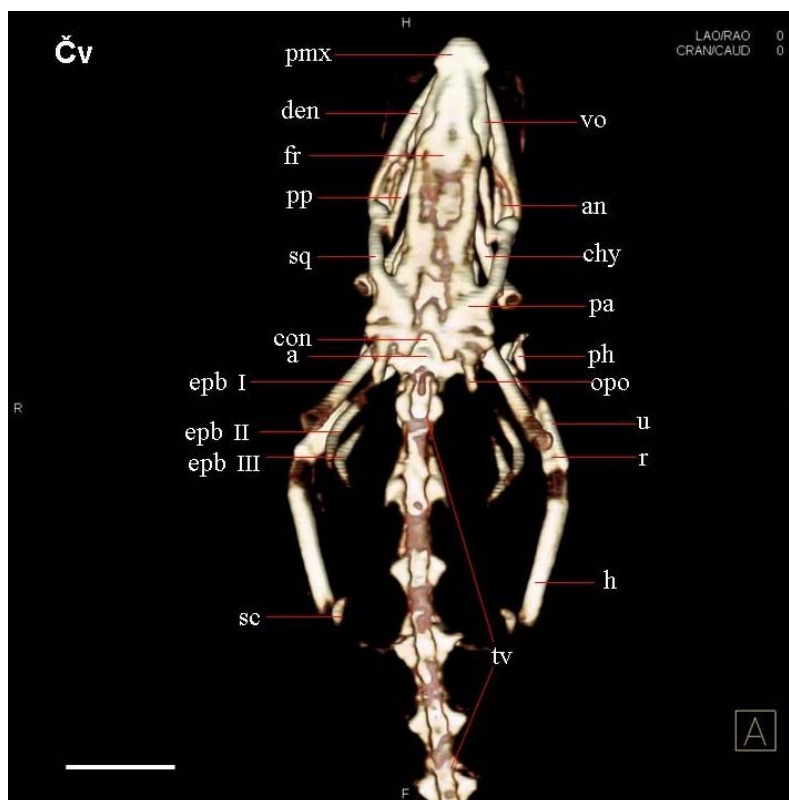
**Slika 37:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



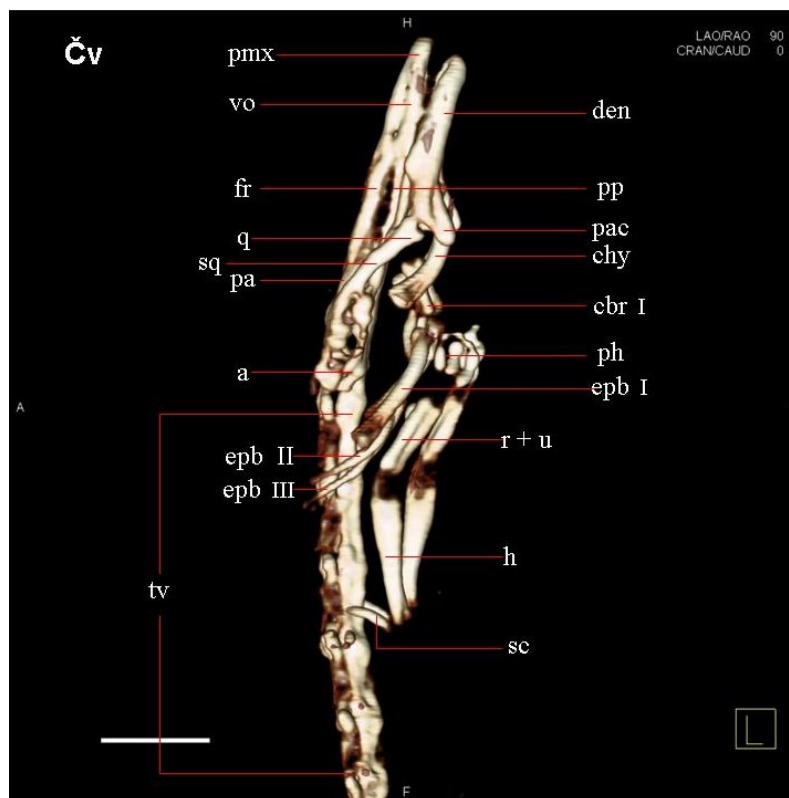
**Slika 38:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



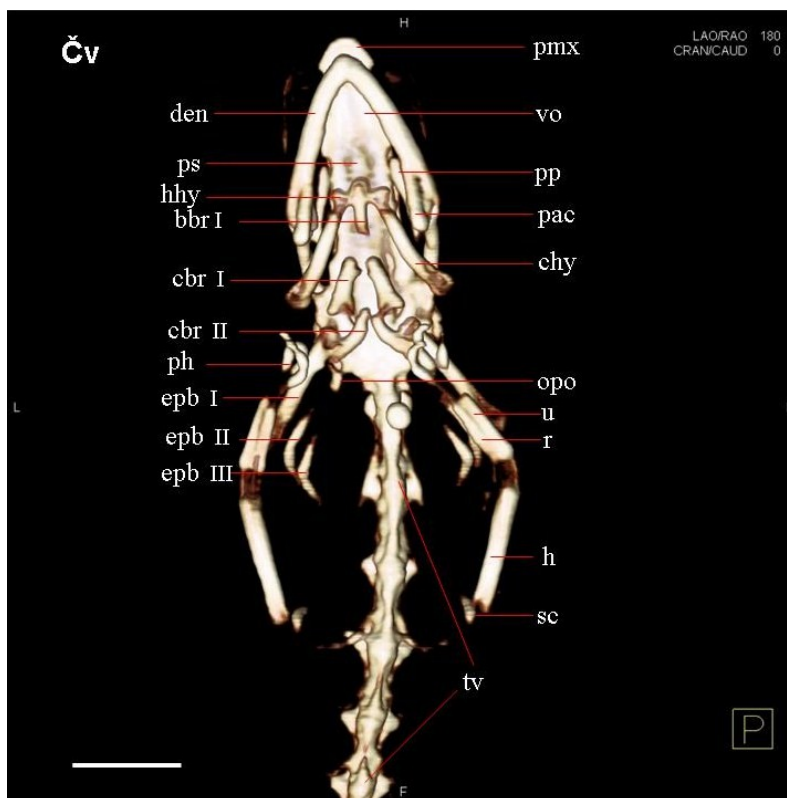
**Slika 39:** Pigmentirana podvrsta močerila (Č19). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



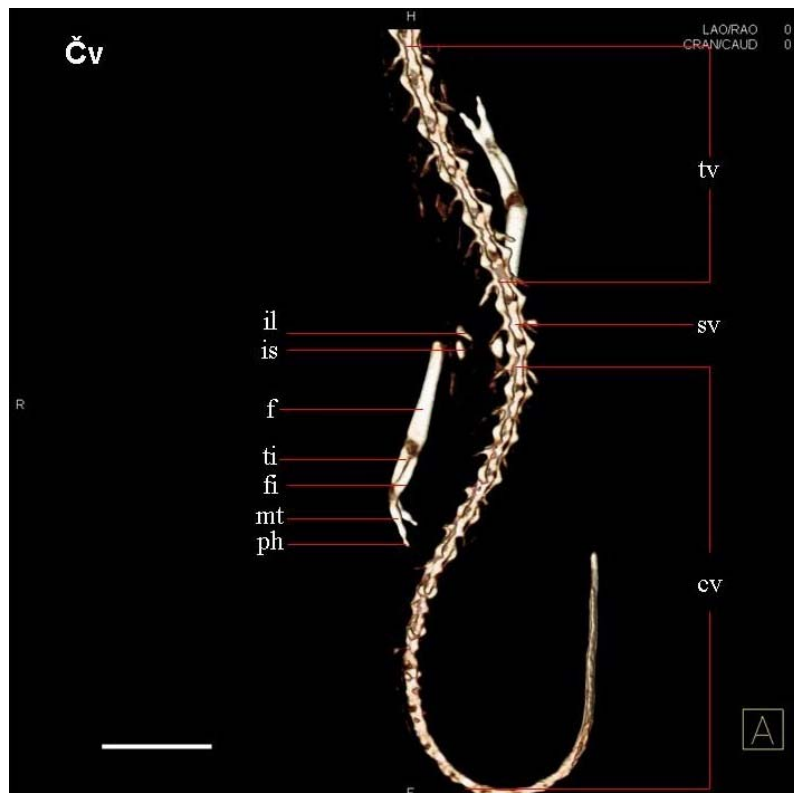
Slika 40: Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



Slika 41: Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm

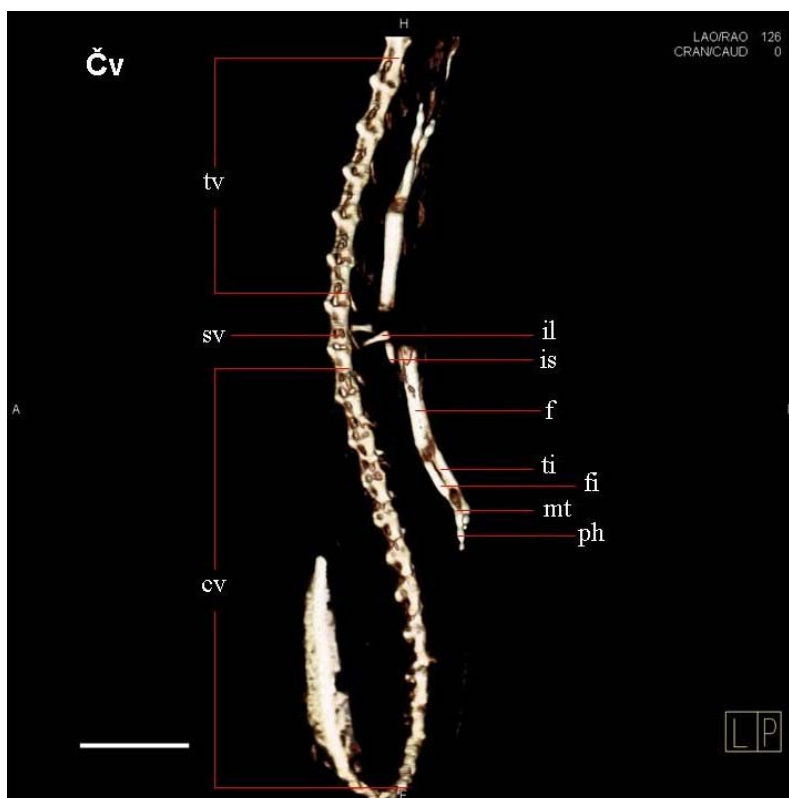


**Slika 42:** Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

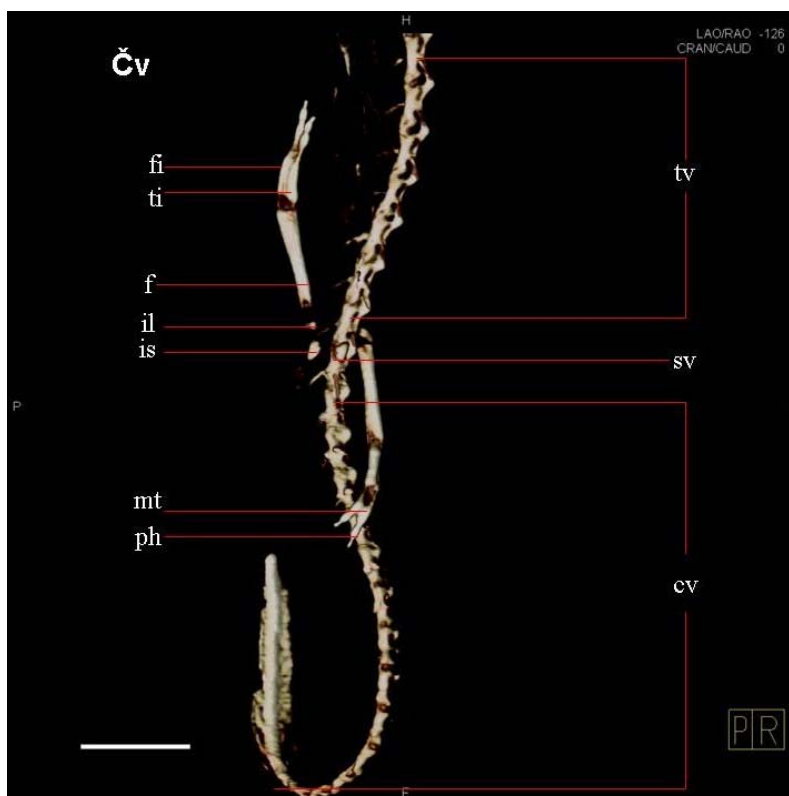


**Slika 43:** Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

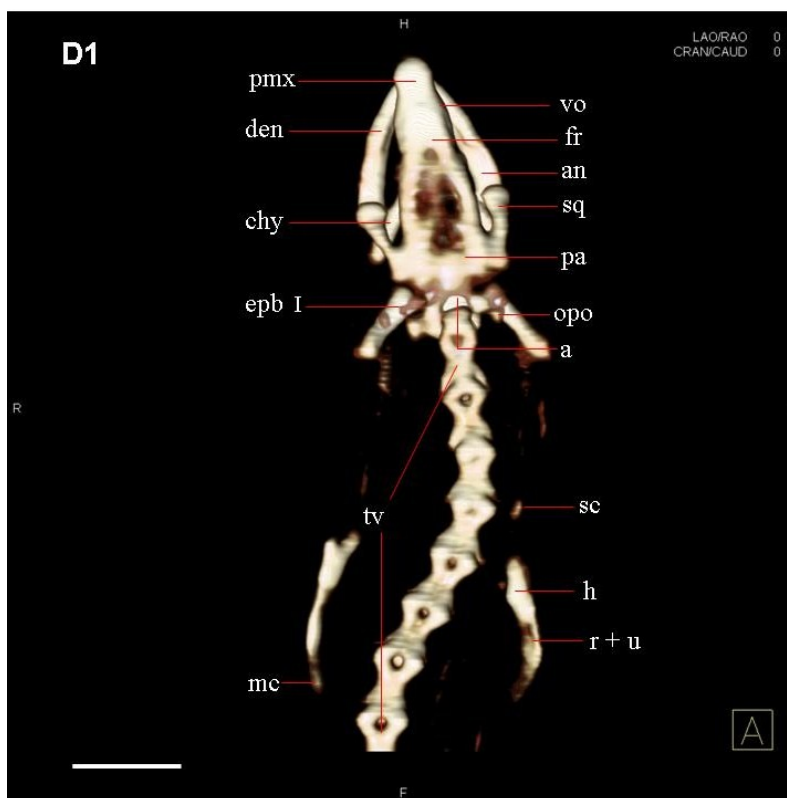




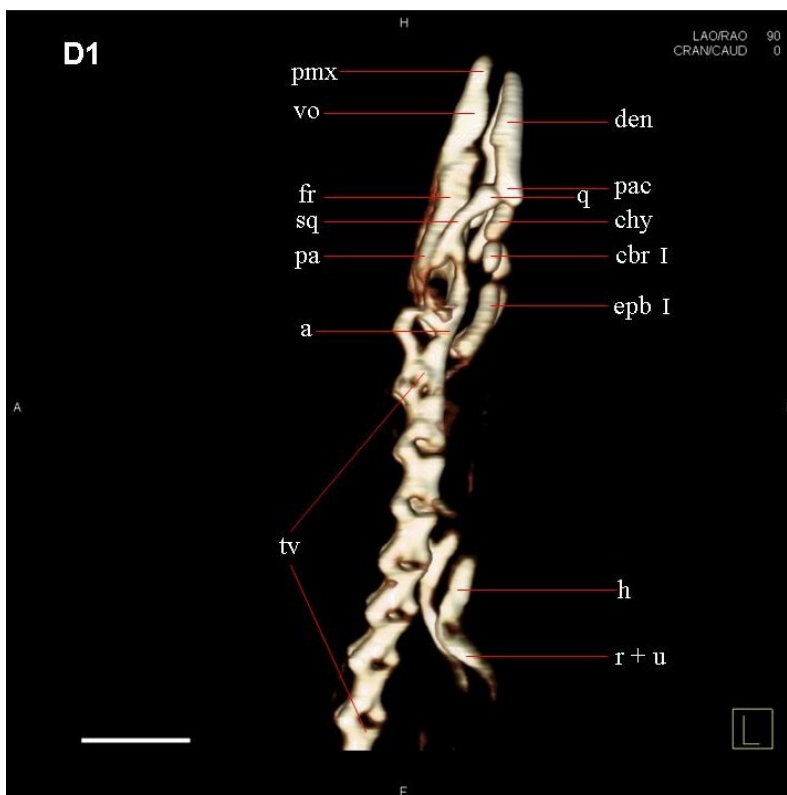
**Slika 44:** Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



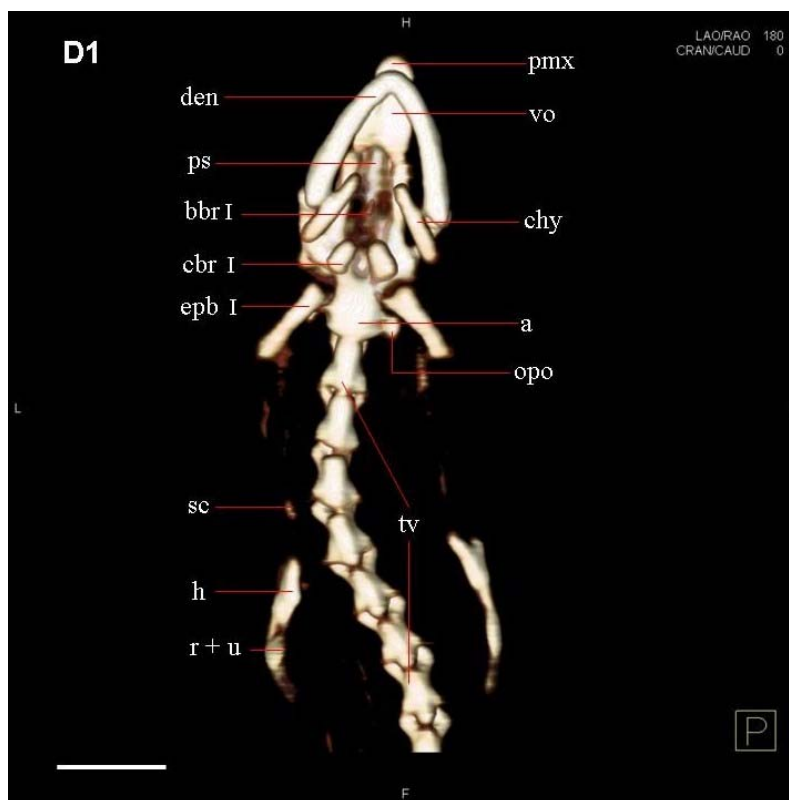
**Slika 45:** Pigmentirana podvrsta močerila (Čv). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm



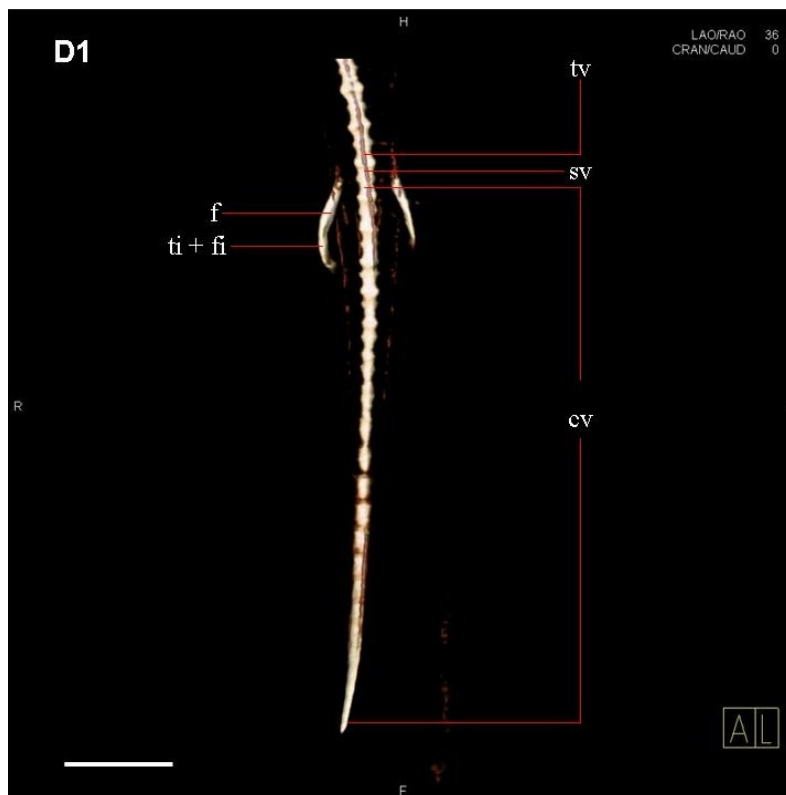
Slika 46: Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



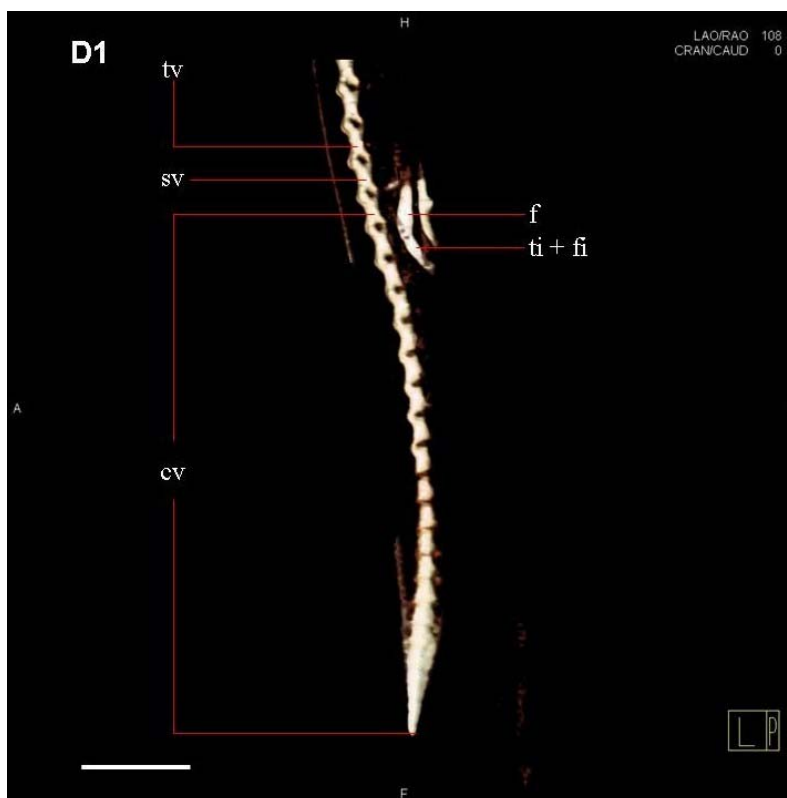
Slika 47: Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



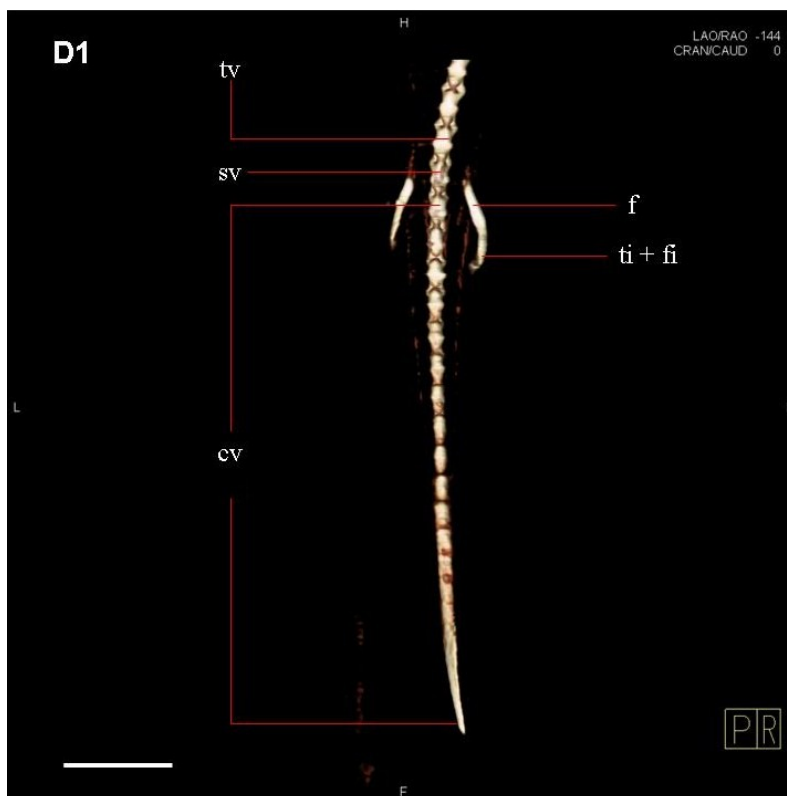
**Slika 48:** Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



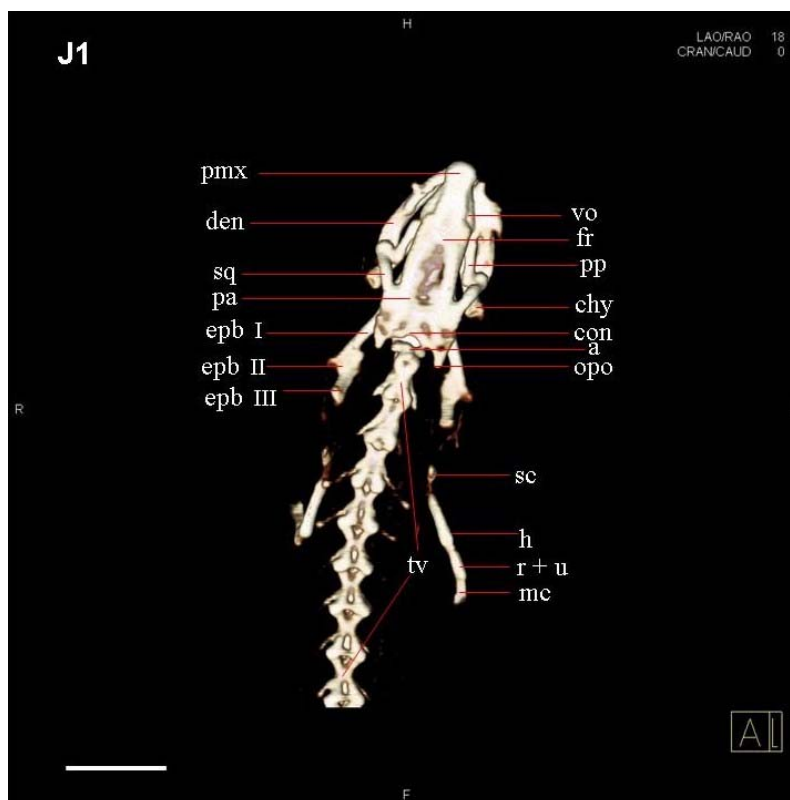
**Slika 49:** Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



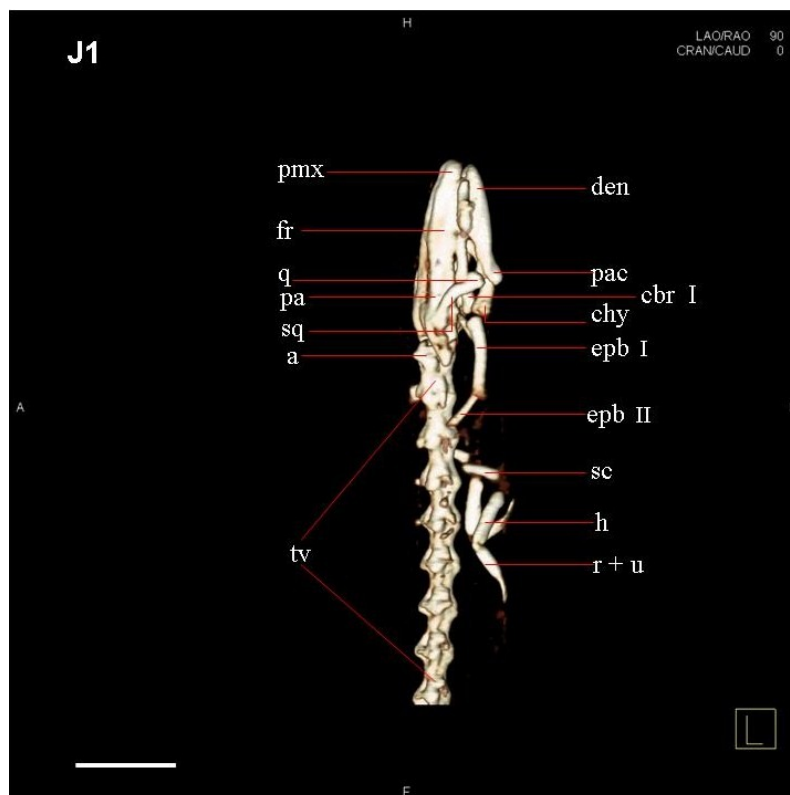
**Slika 50:** Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



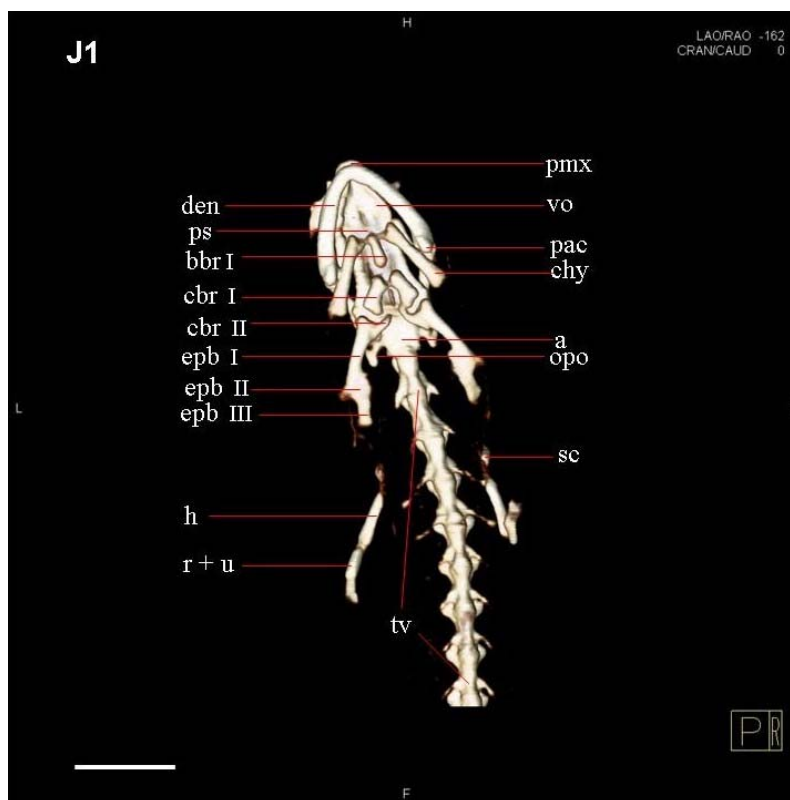
**Slika 51:** Pigmentirana podvrsta močerila (D1). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



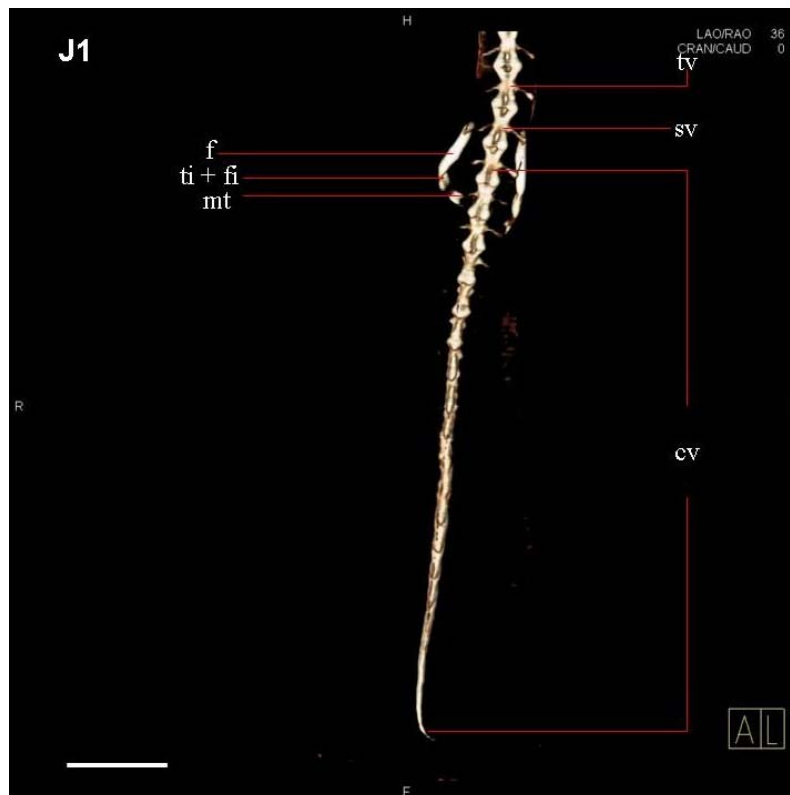
Slika 52: Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



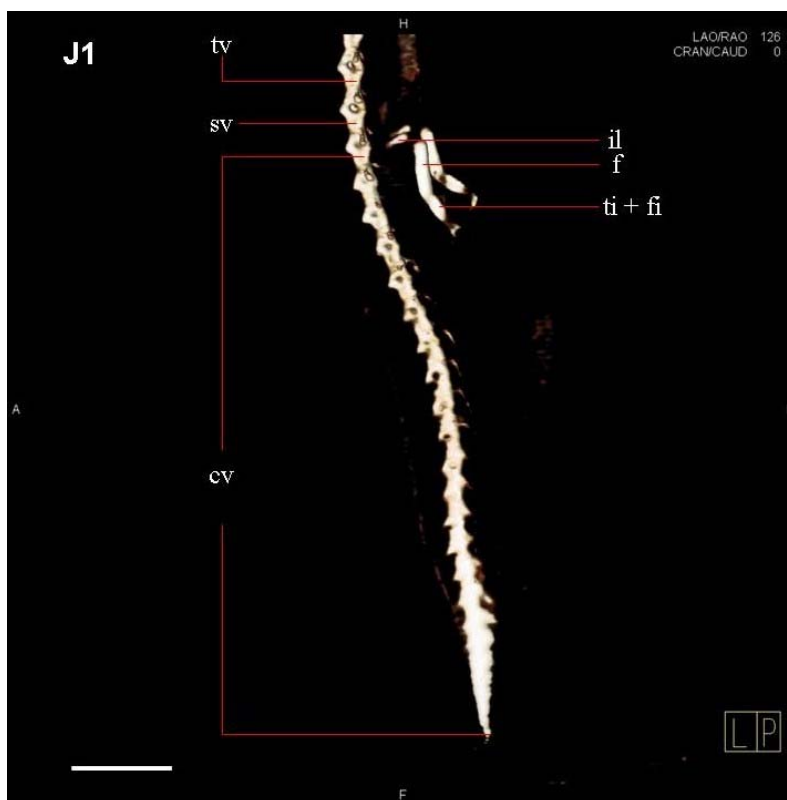
Slika 53: Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



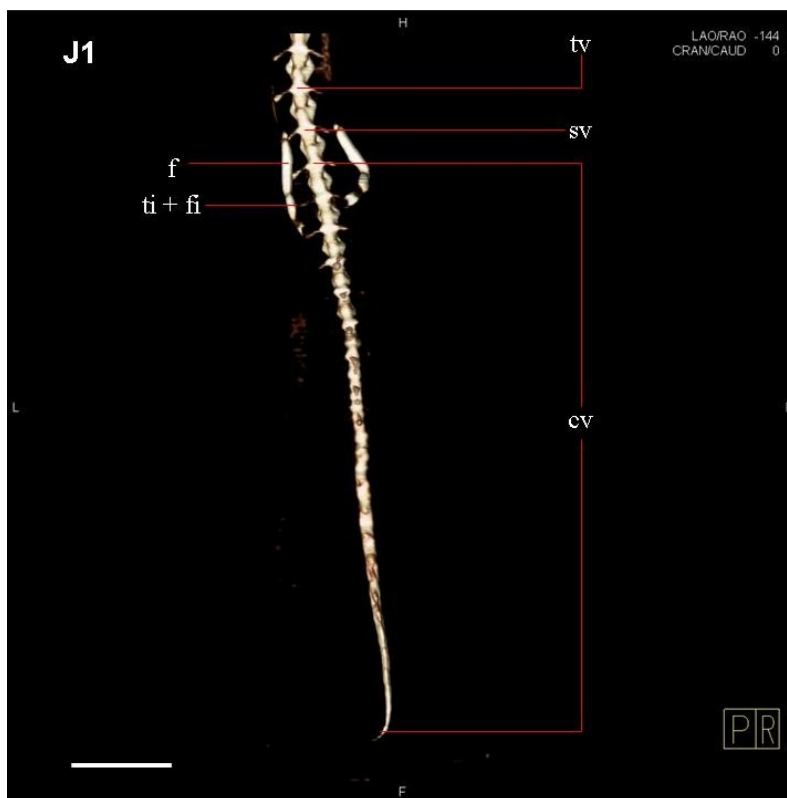
**Slika 54:** Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



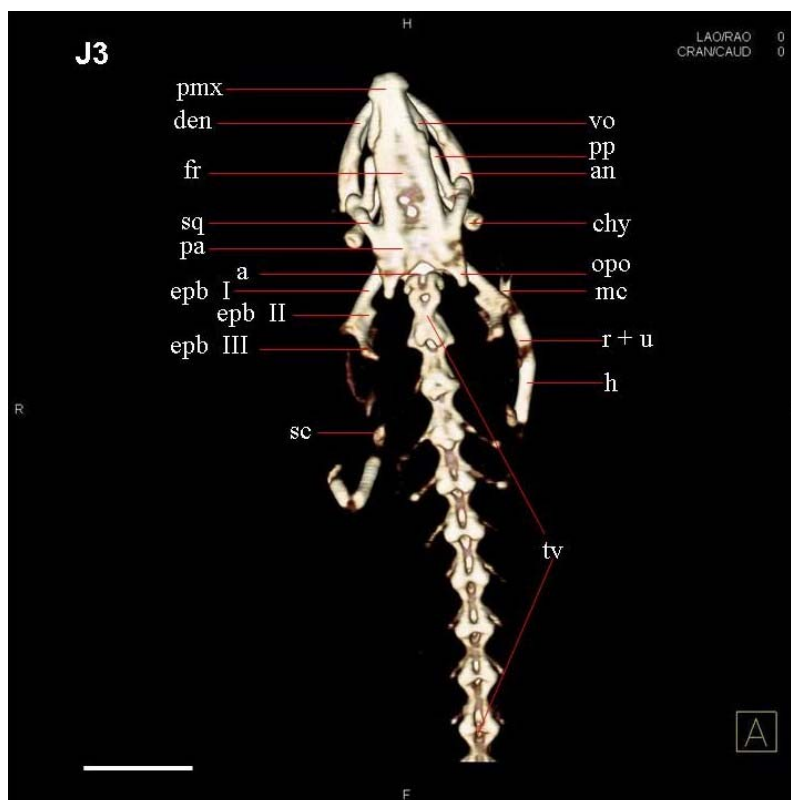
**Slika 55:** Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Dorzalni pogled na kavalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



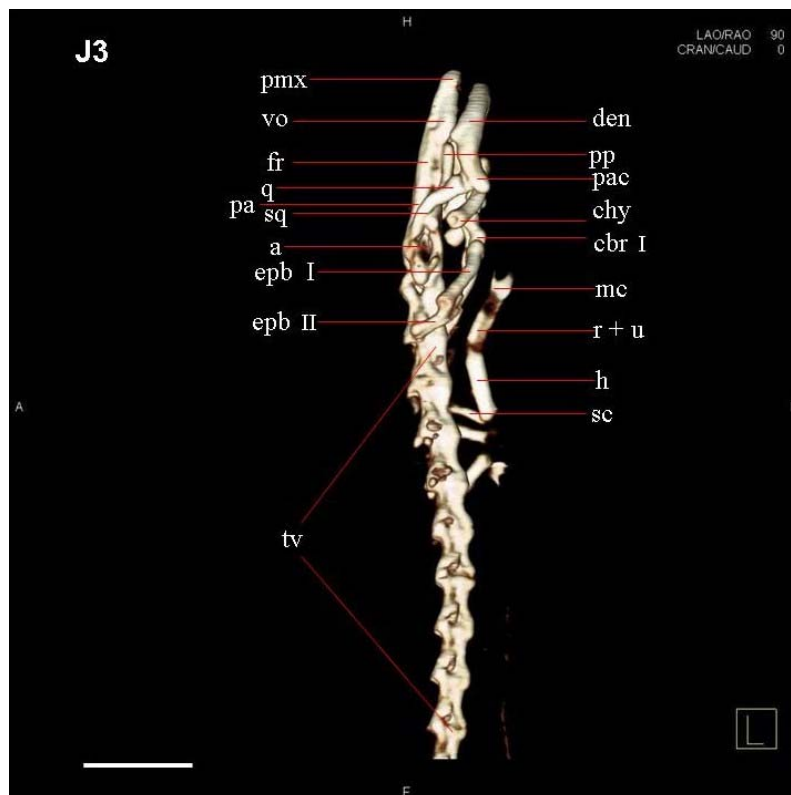
**Slika 56:** Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 57:** Pigmentirana podvrsta močerila (J1). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

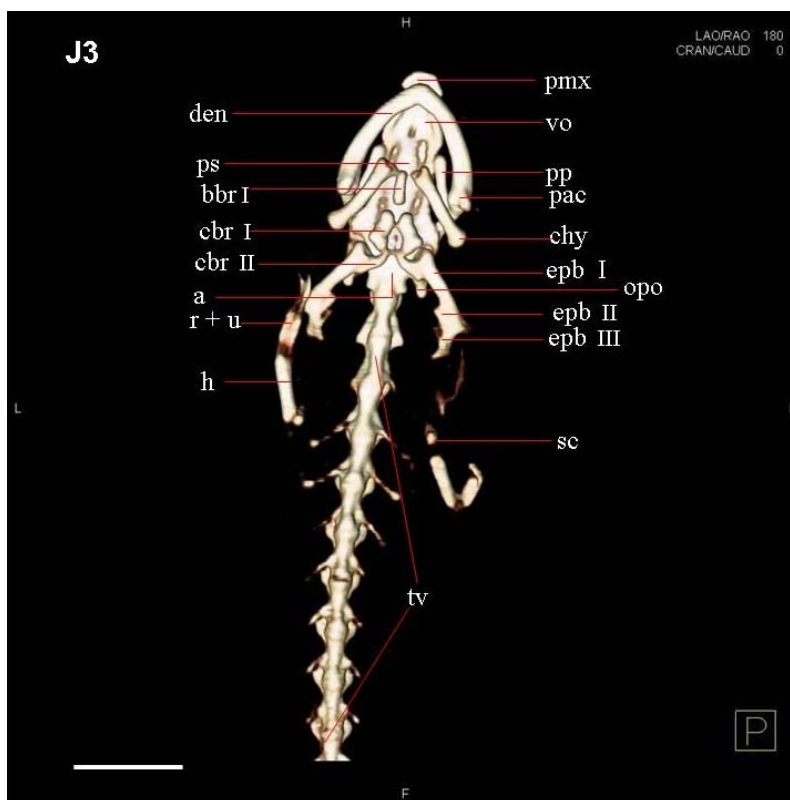


Slika 58: Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

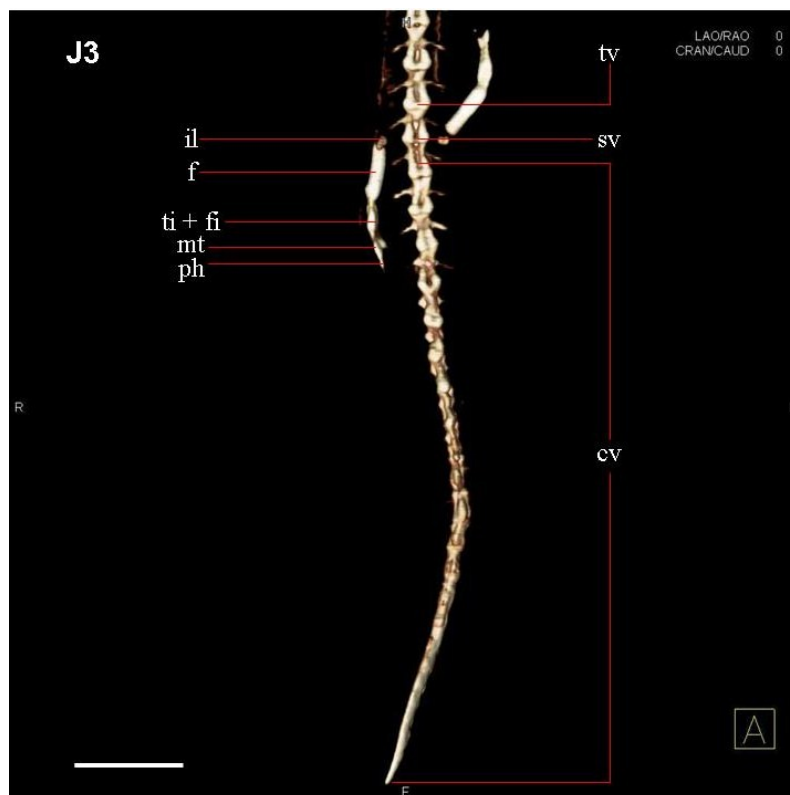


Slika 59: Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

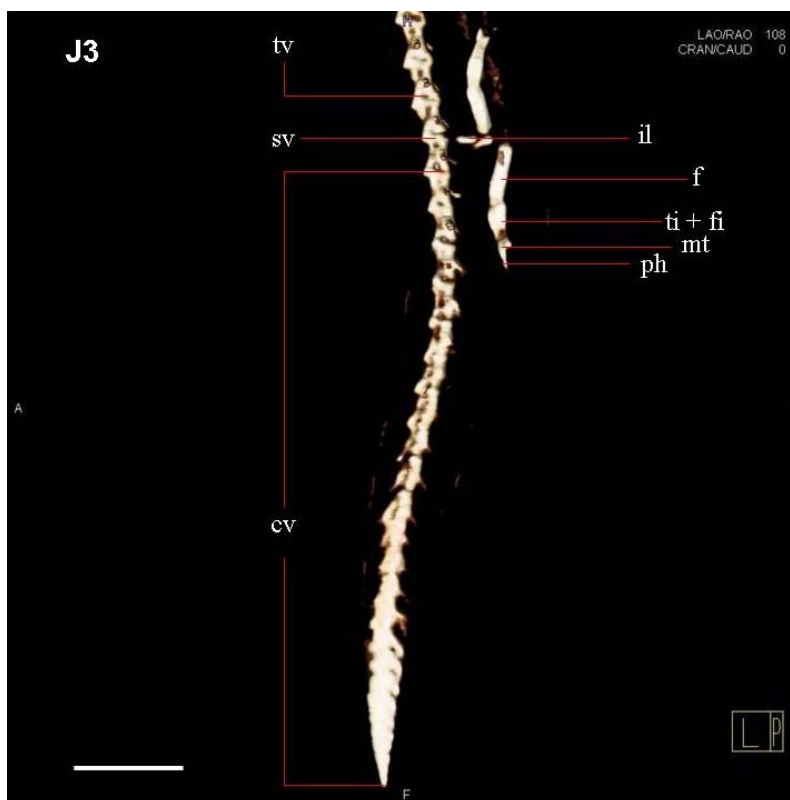




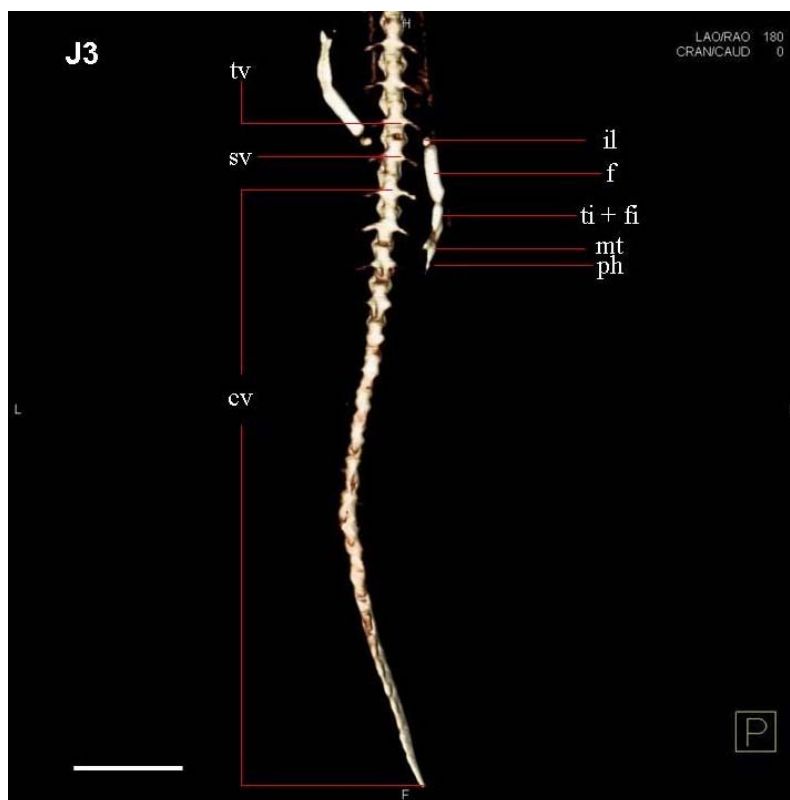
**Slika 60:** Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



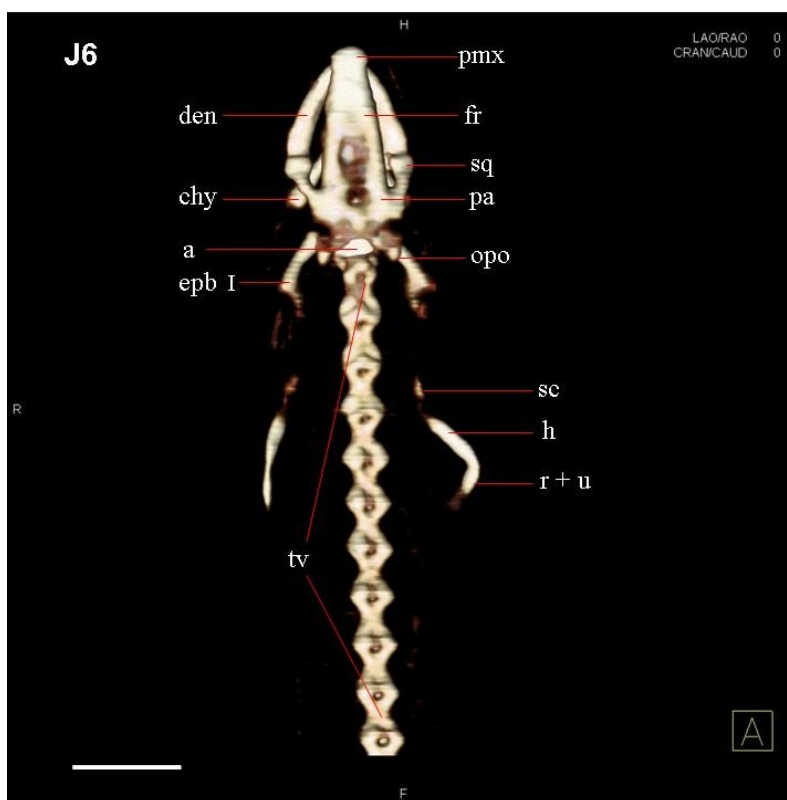
**Slika 61:** Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



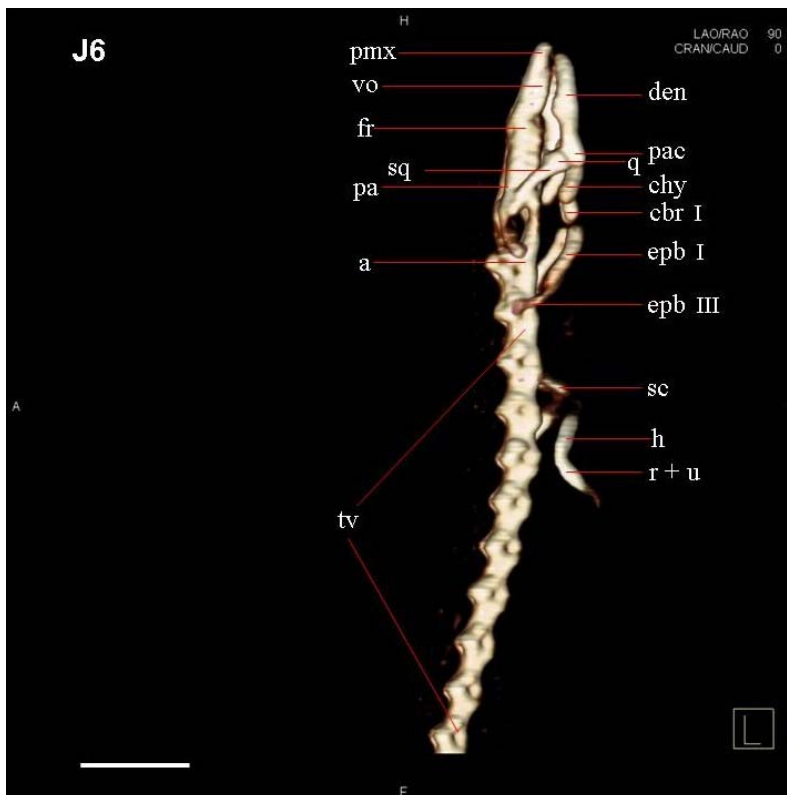
**Slika 62:** Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



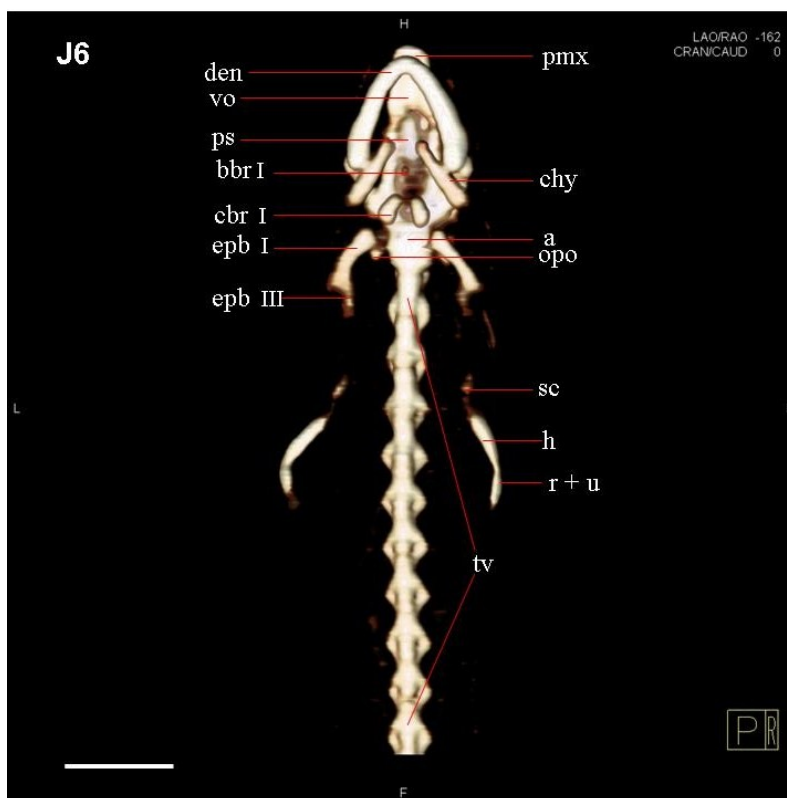
**Slika 63:** Pigmentirana podvrsta močerila (J3). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



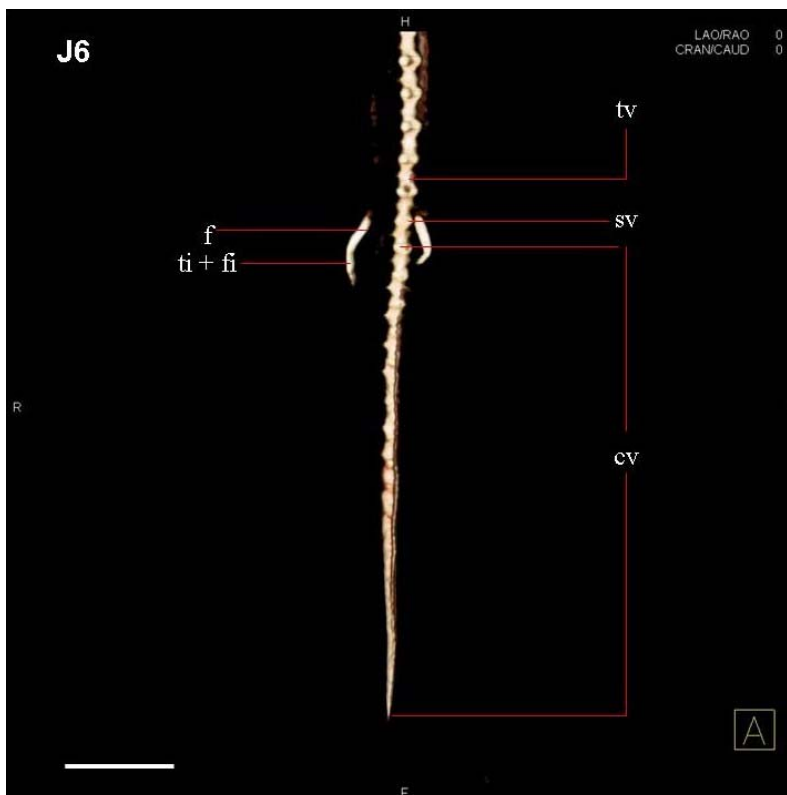
Slika 64: Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



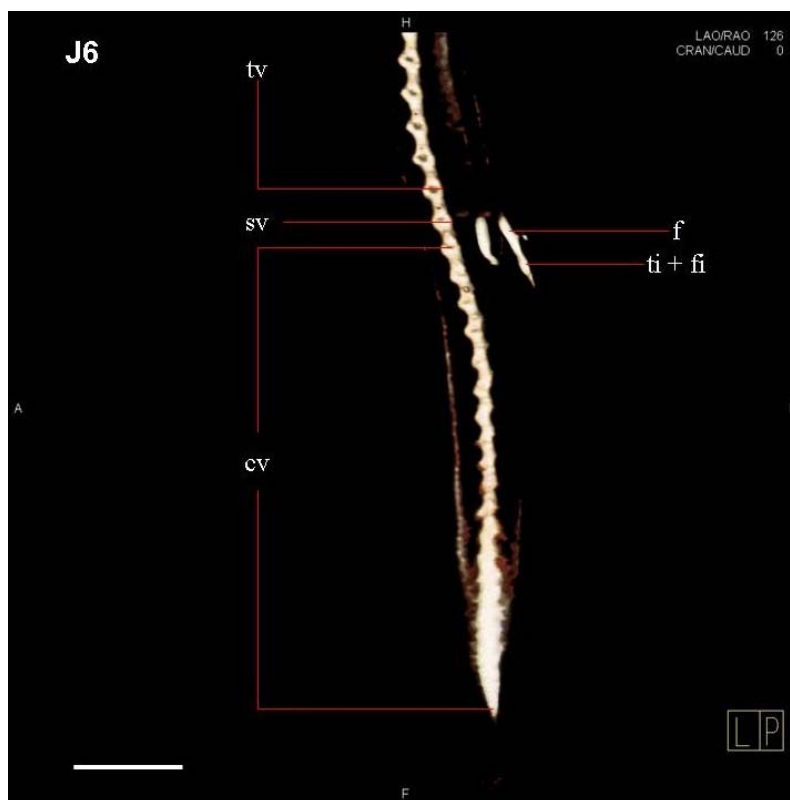
Slika 65: Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



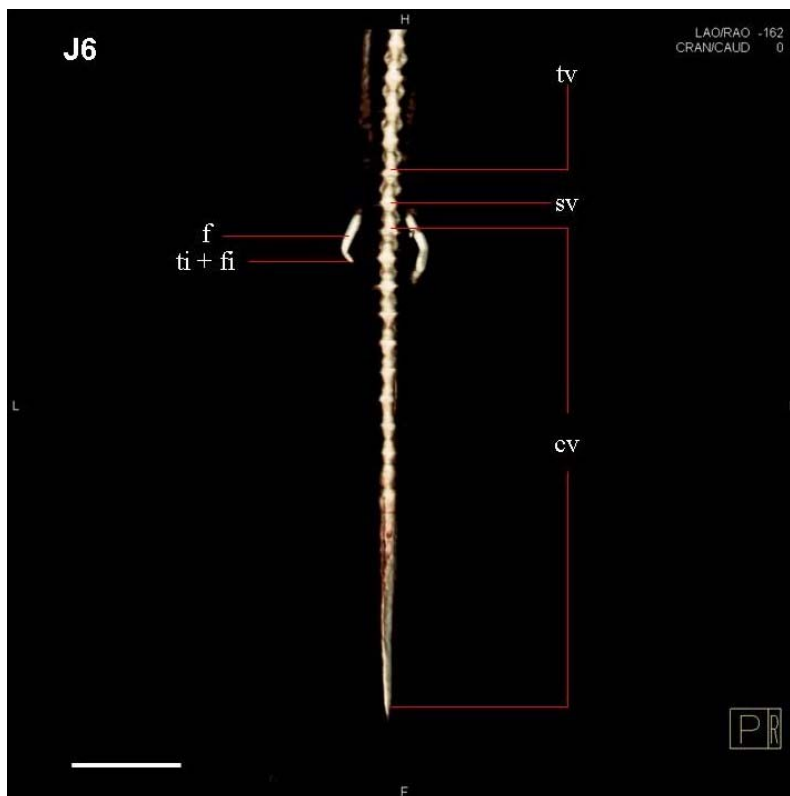
**Slika 66:** Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



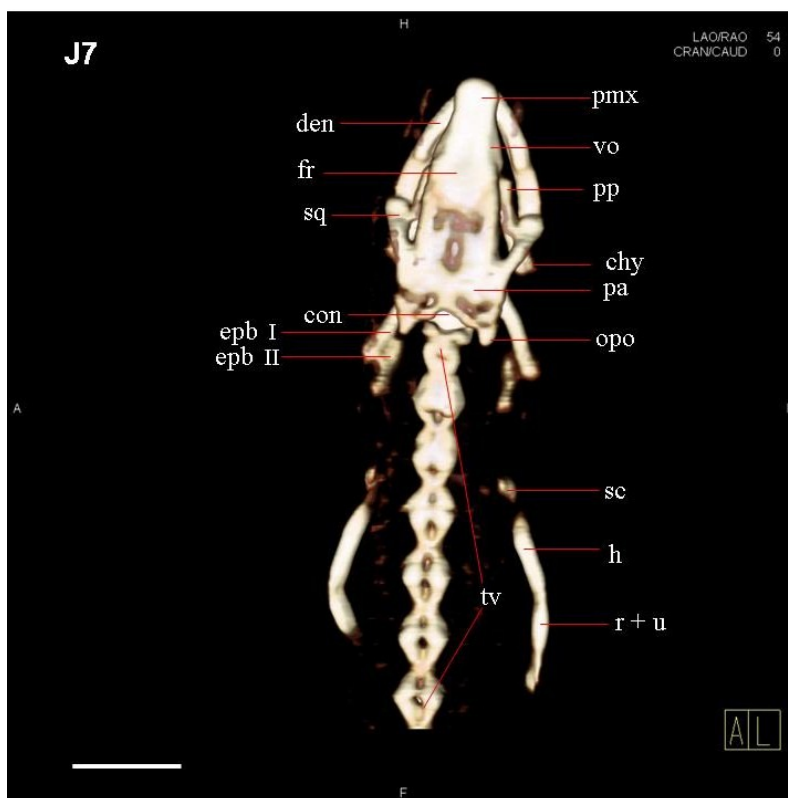
**Slika 67:** Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



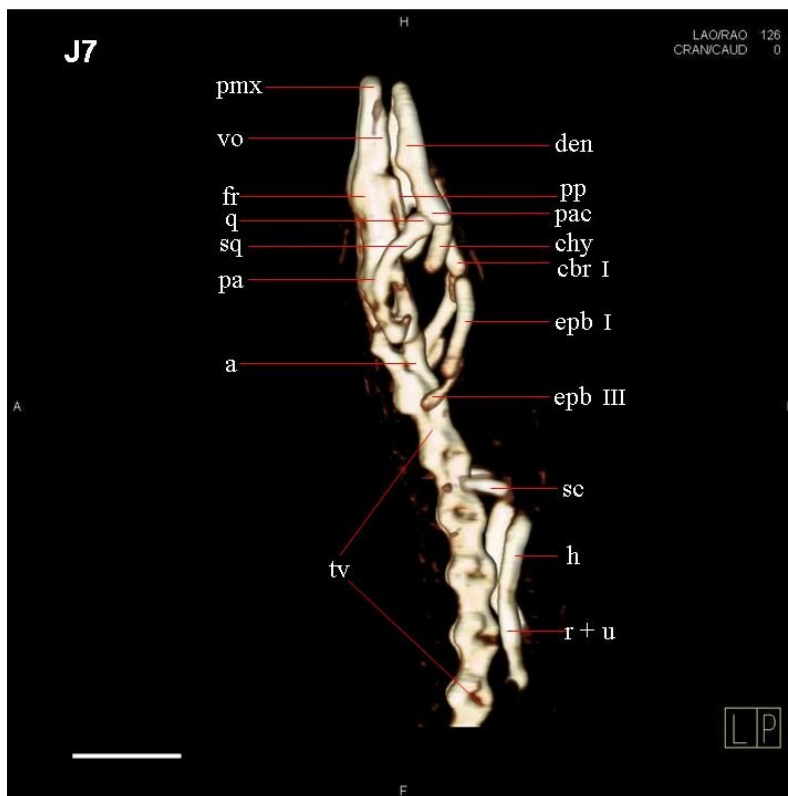
**Slika 68:** Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



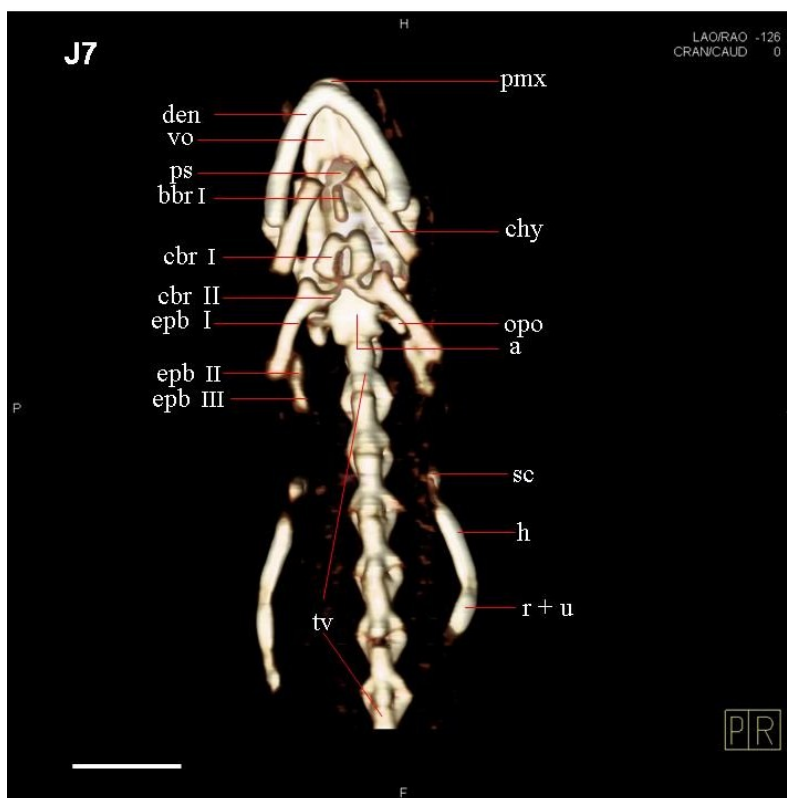
**Slika 69:** Pigmentirana podvrsta močerila (J6). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



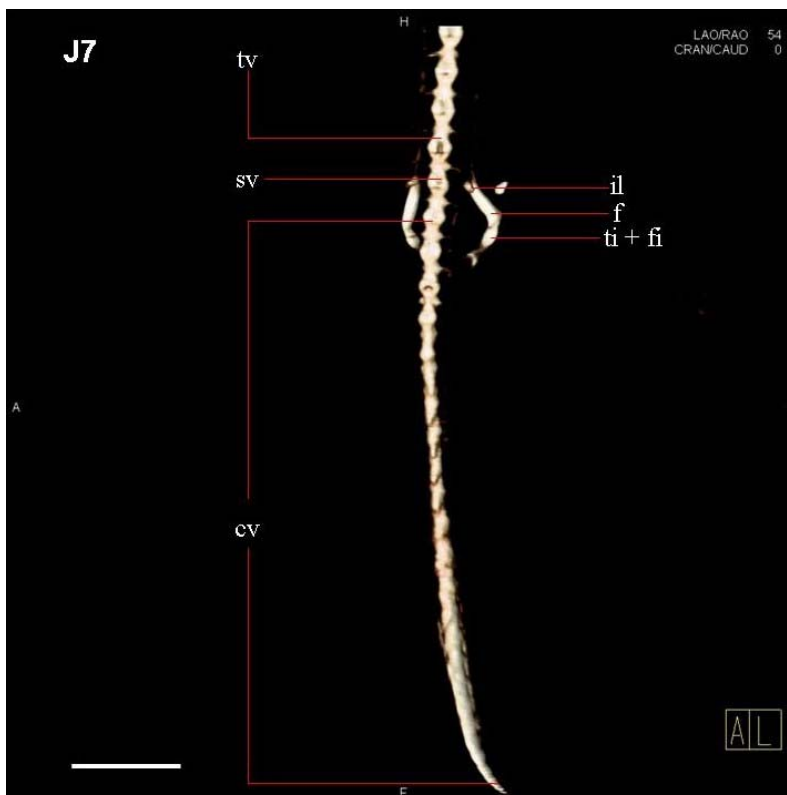
Slika 70: Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



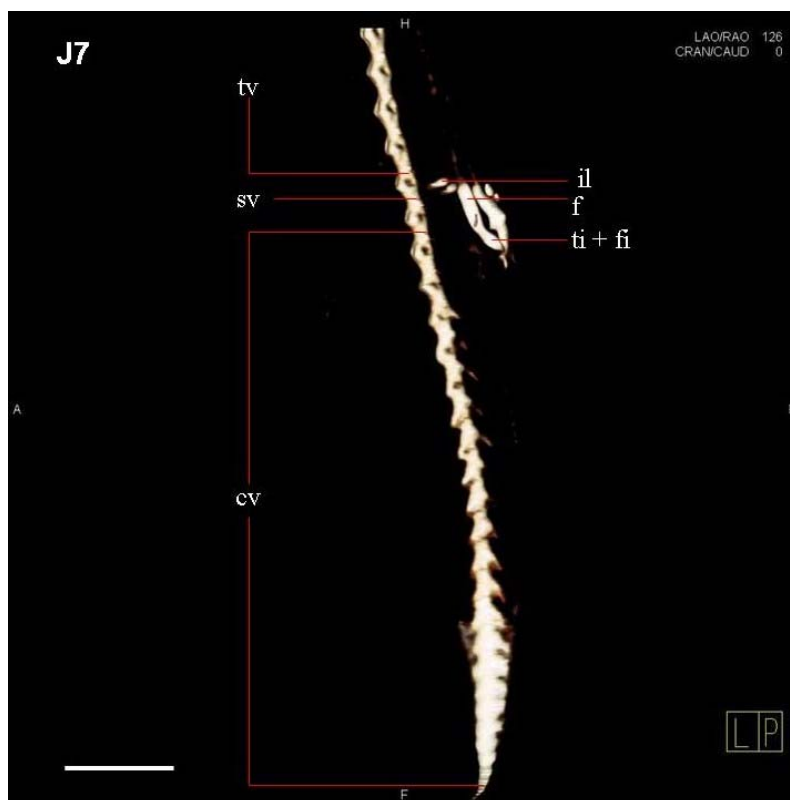
Slika 71: Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 72:** Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 73:** Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

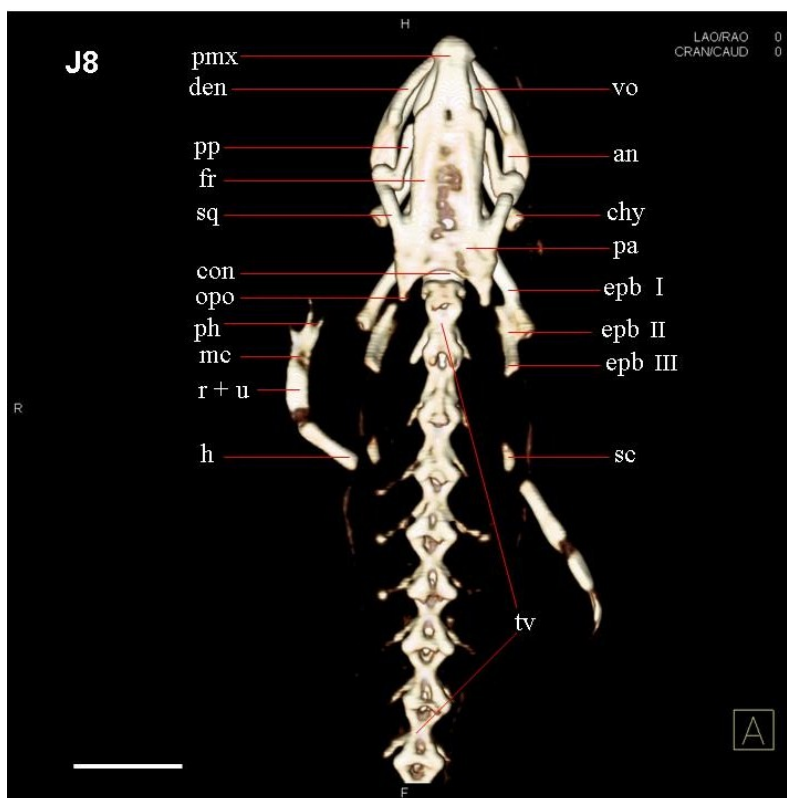


**Slika 74:** Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

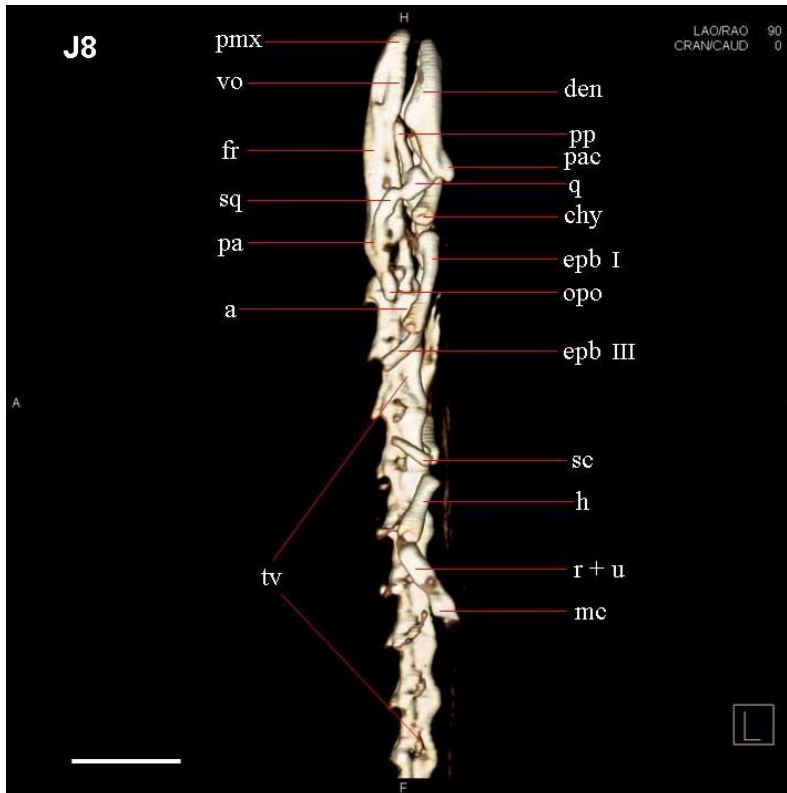


**Slika 75:** Pigmentirana podvrsta močerila (J7). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

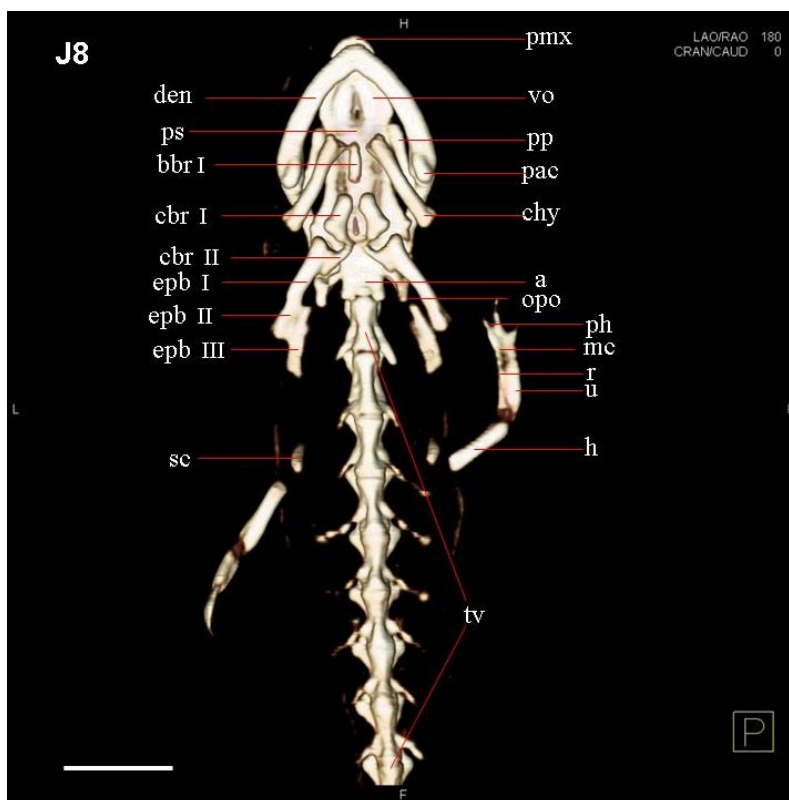




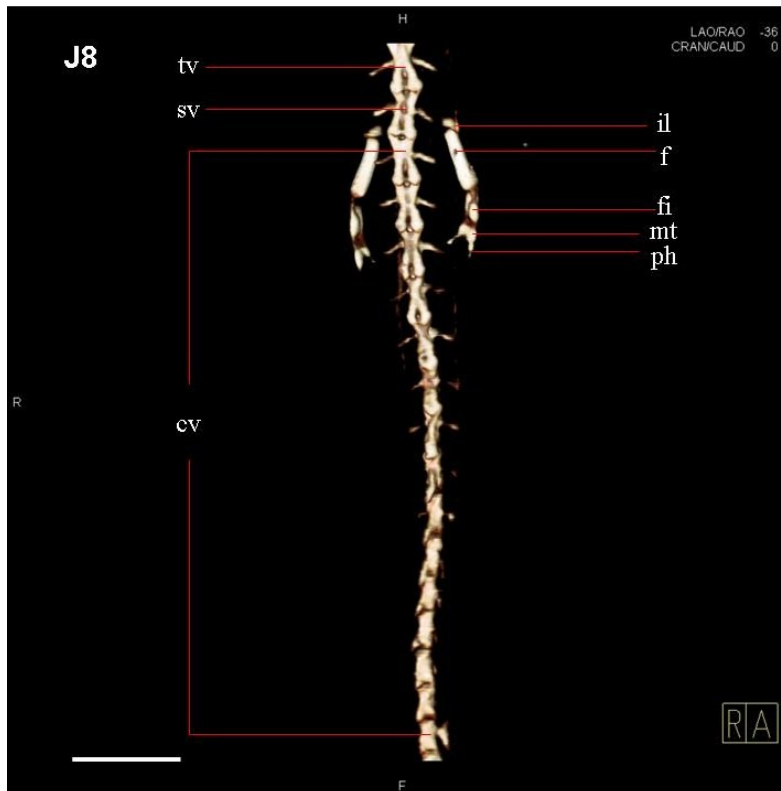
Slika 76: Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



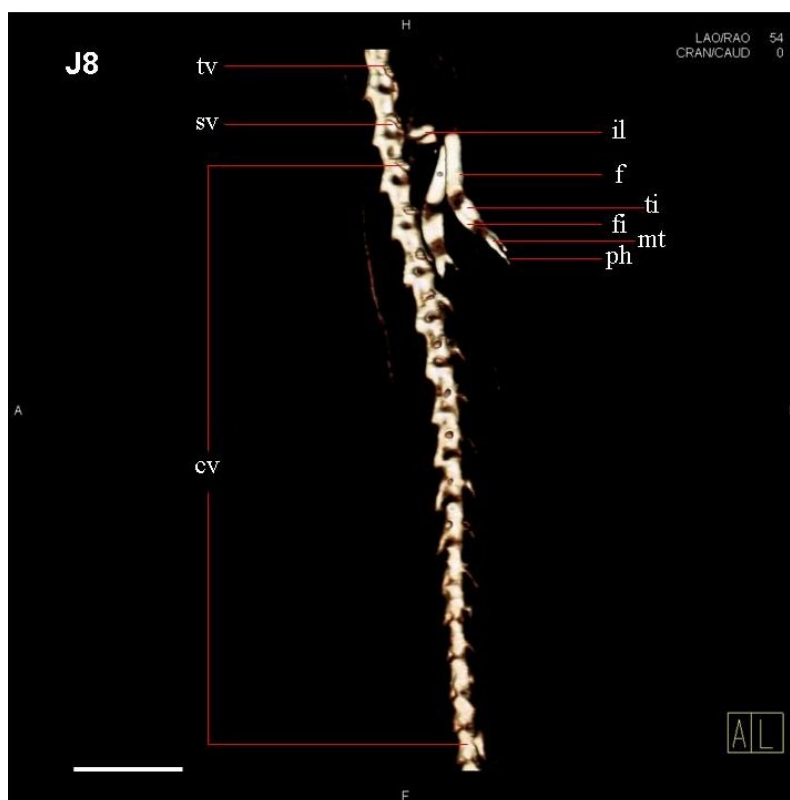
Slika 77: Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



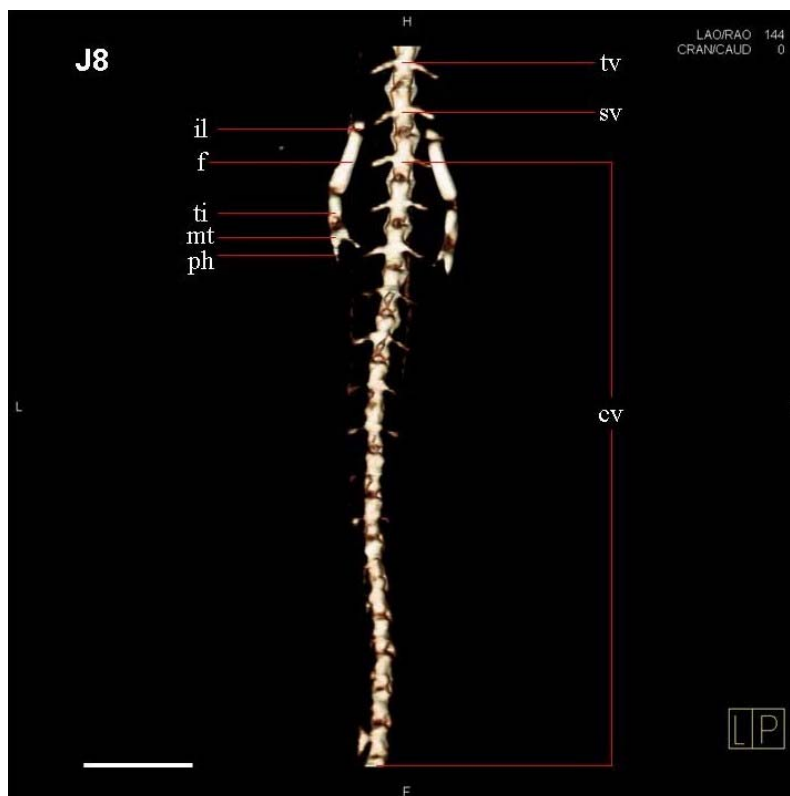
**Slika 78:** Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



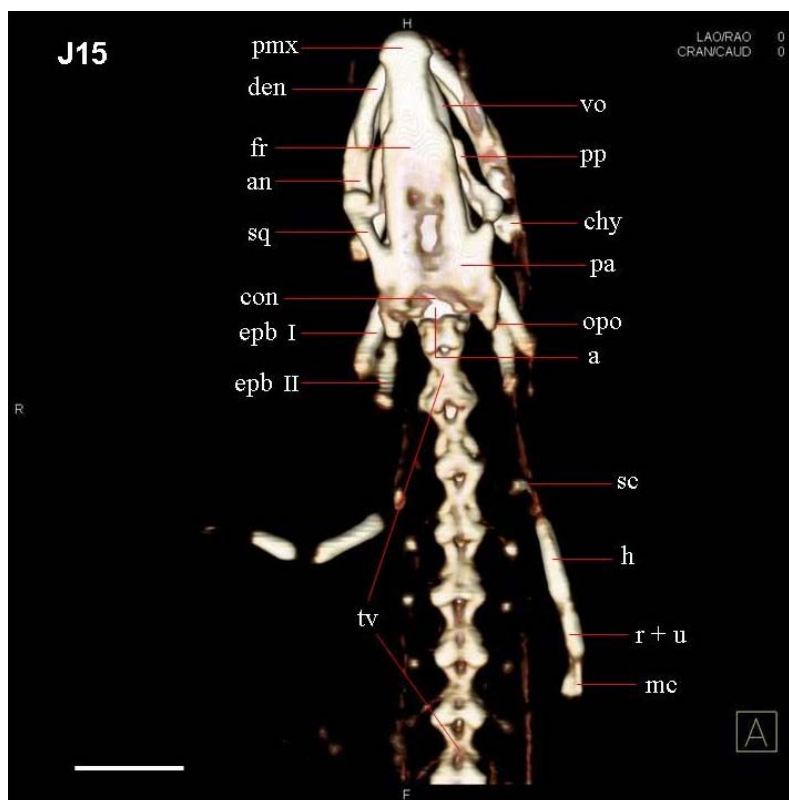
**Slika 79:** Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



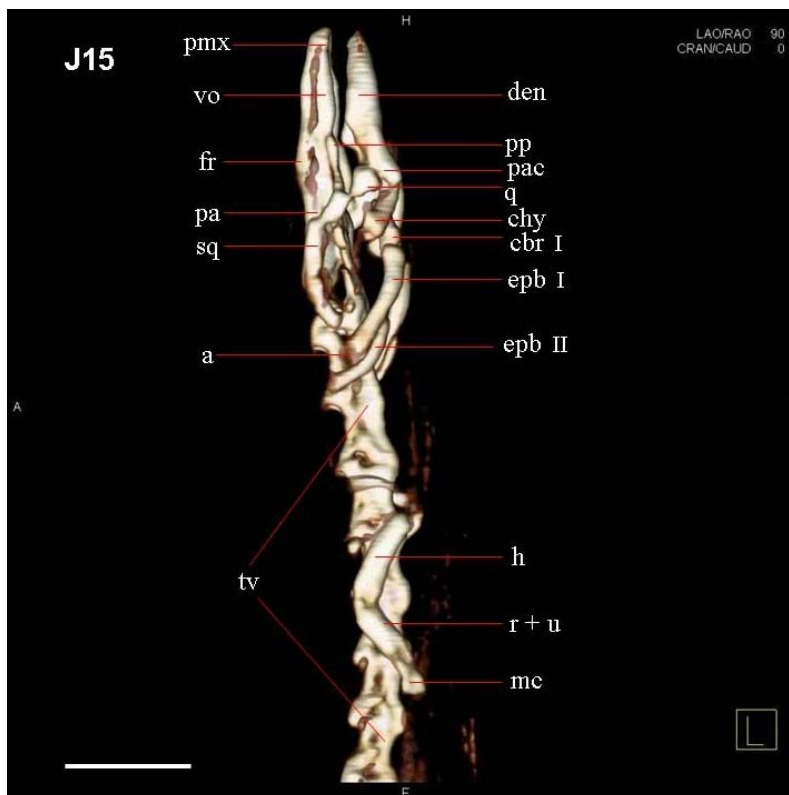
**Slika 80:** Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



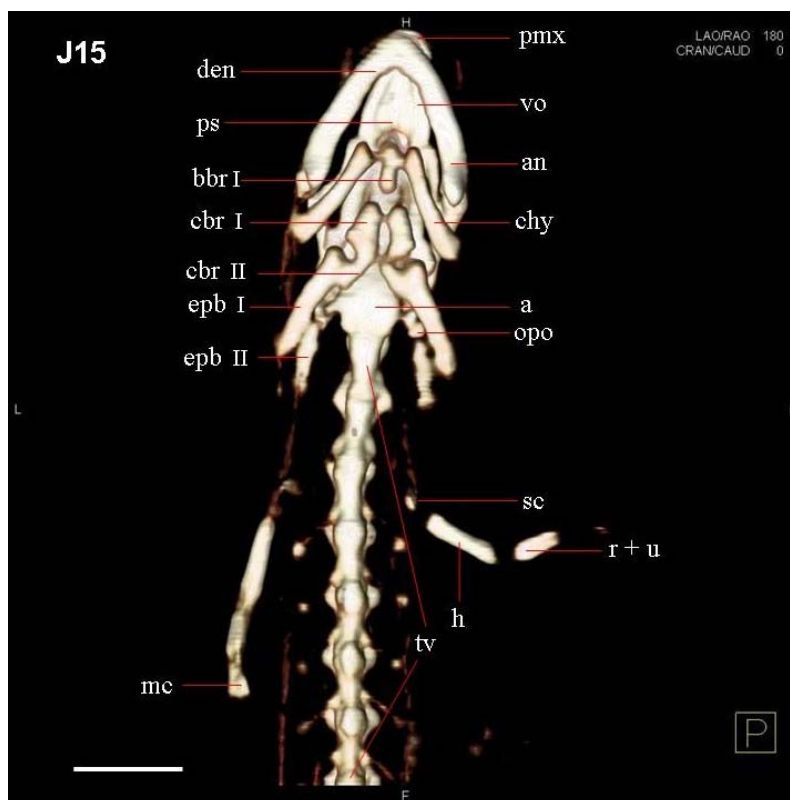
**Slika 81:** Pigmentirana podvrsta močerila (J8). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



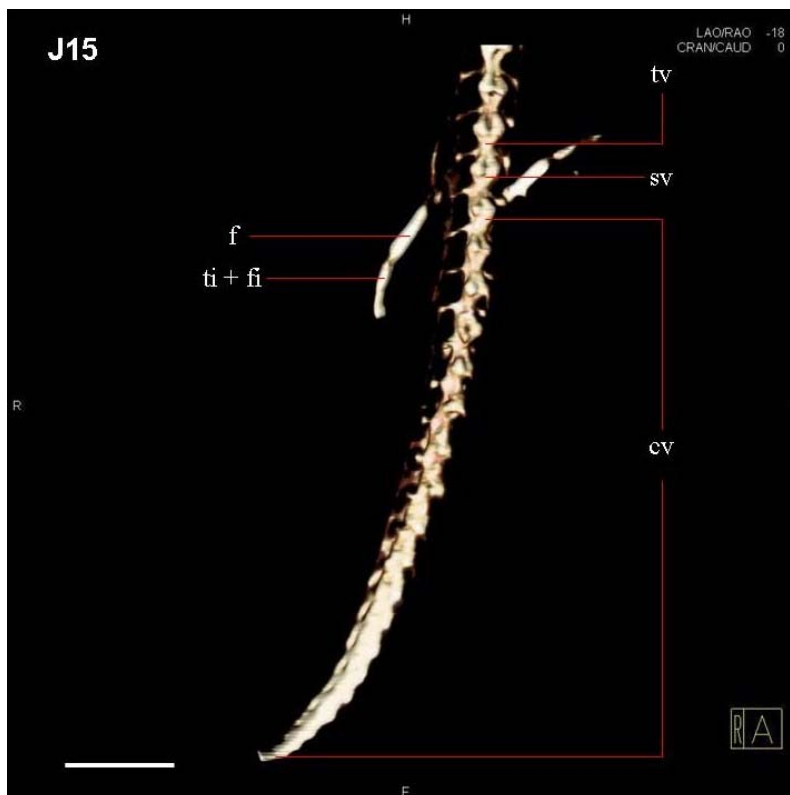
Slika 82: Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



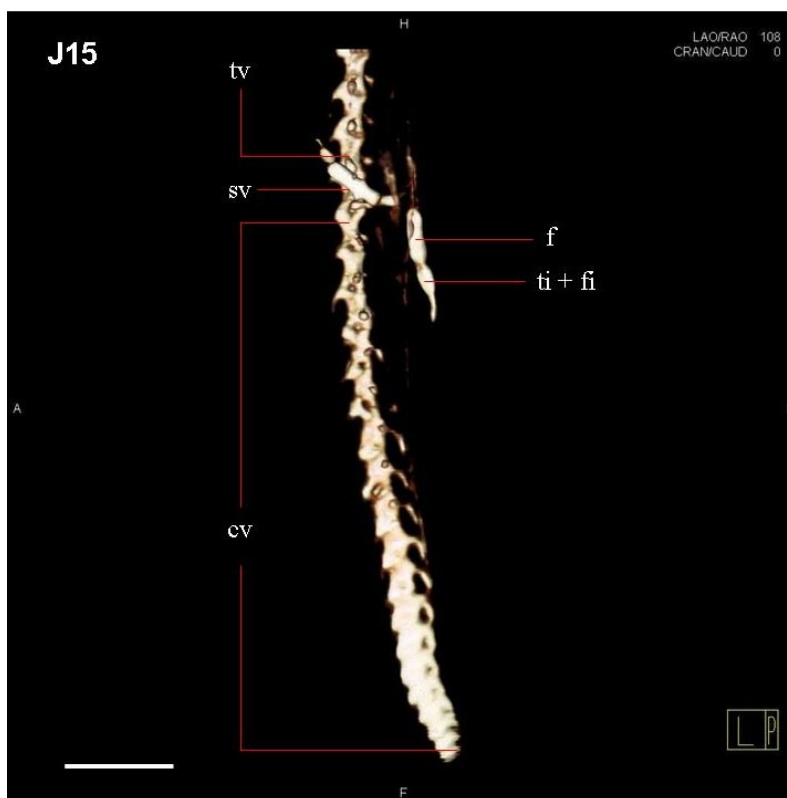
Slika 83: Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 84:** Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



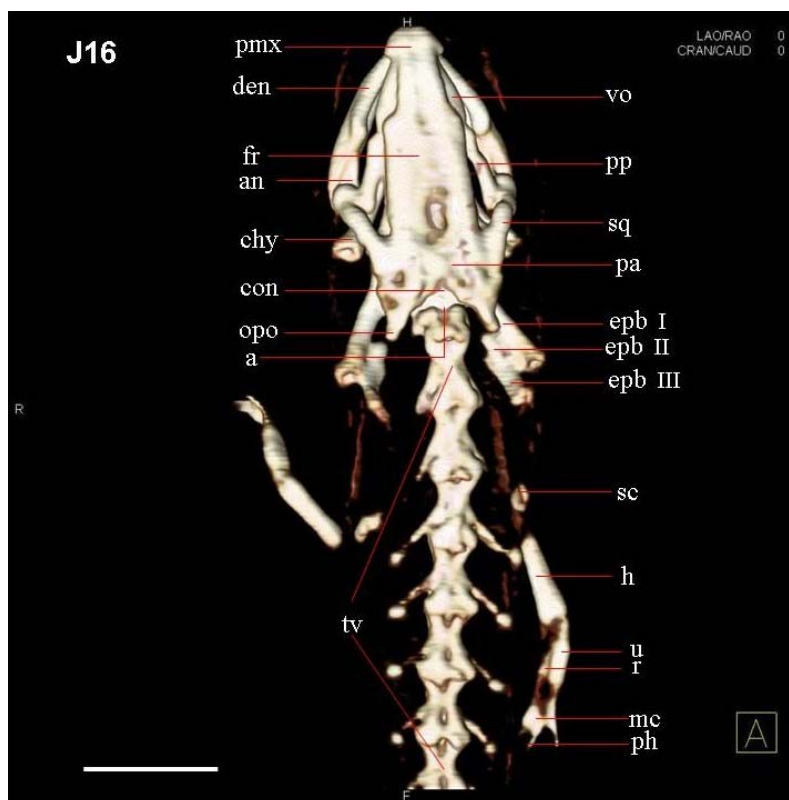
**Slika 85:** Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Dorzalni pogled na kaudalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



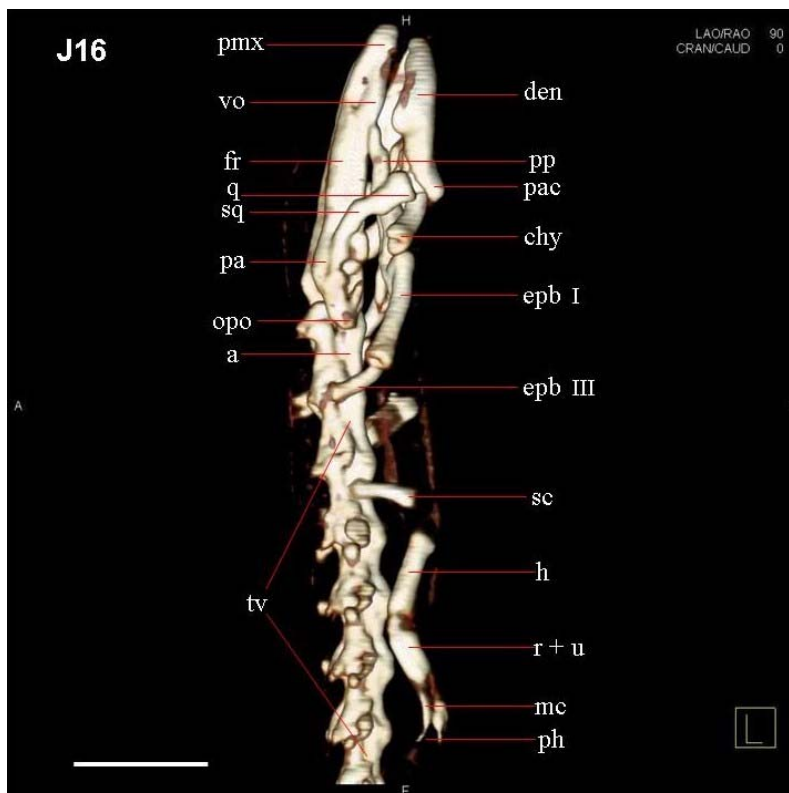
**Slika 86:** Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



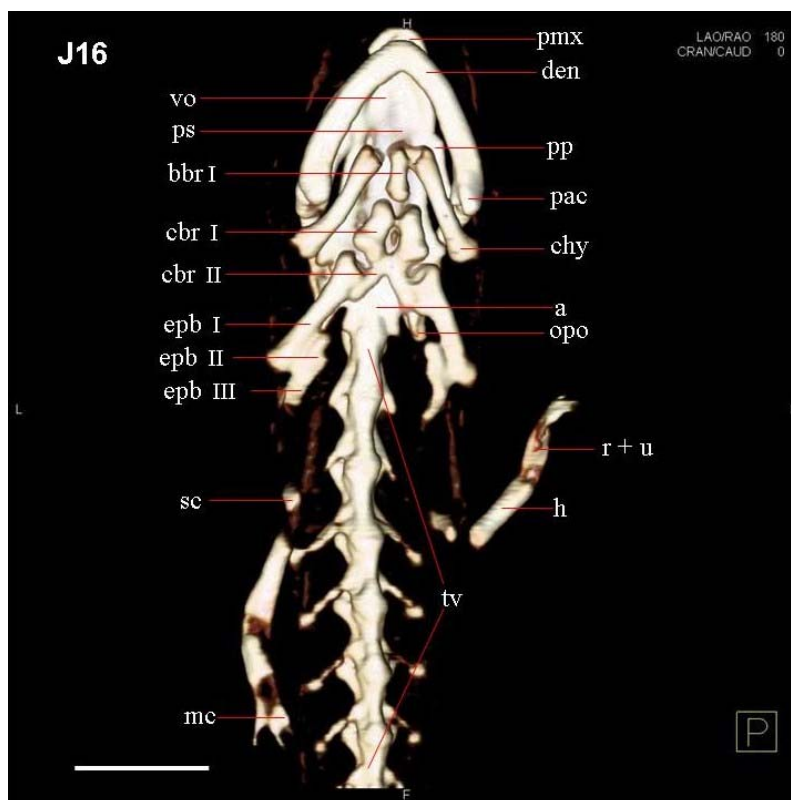
**Slika 87:** Pigmentirana podvrsta močerila (J15). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 88:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 89:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

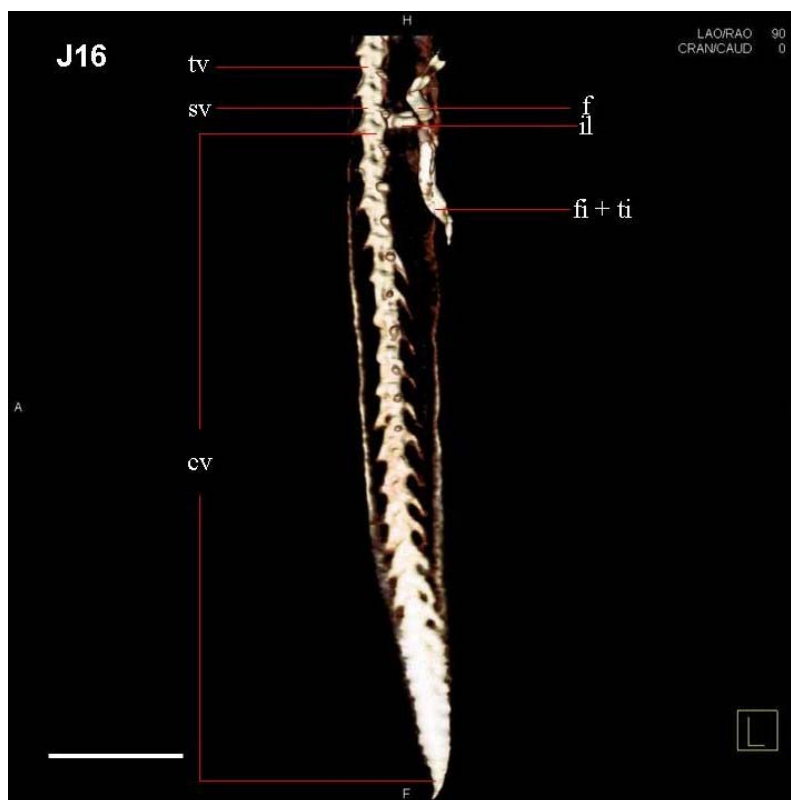


**Slika 90:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 91:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

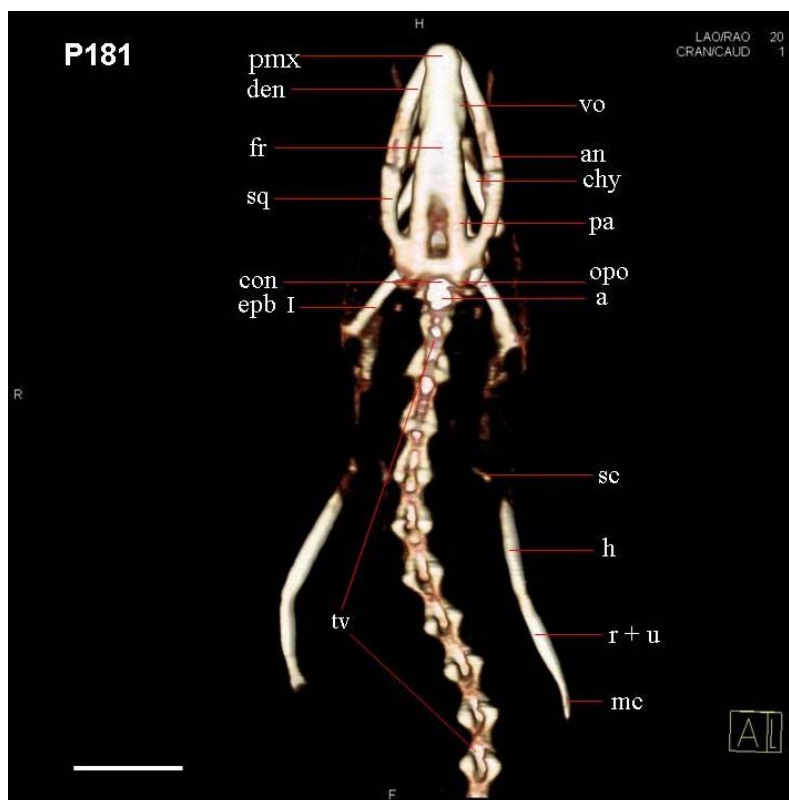




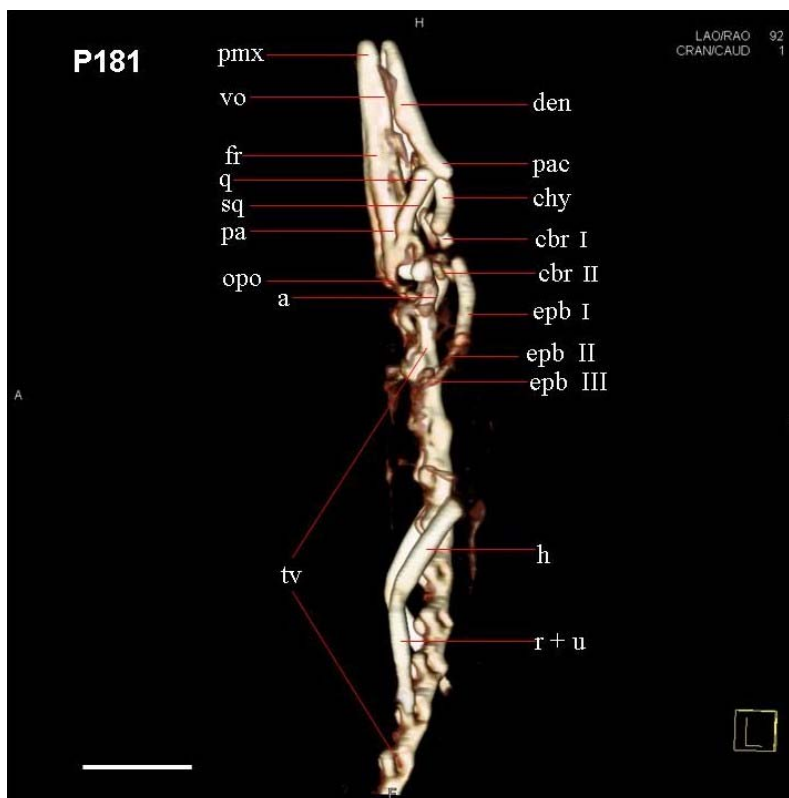
**Slika 92:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



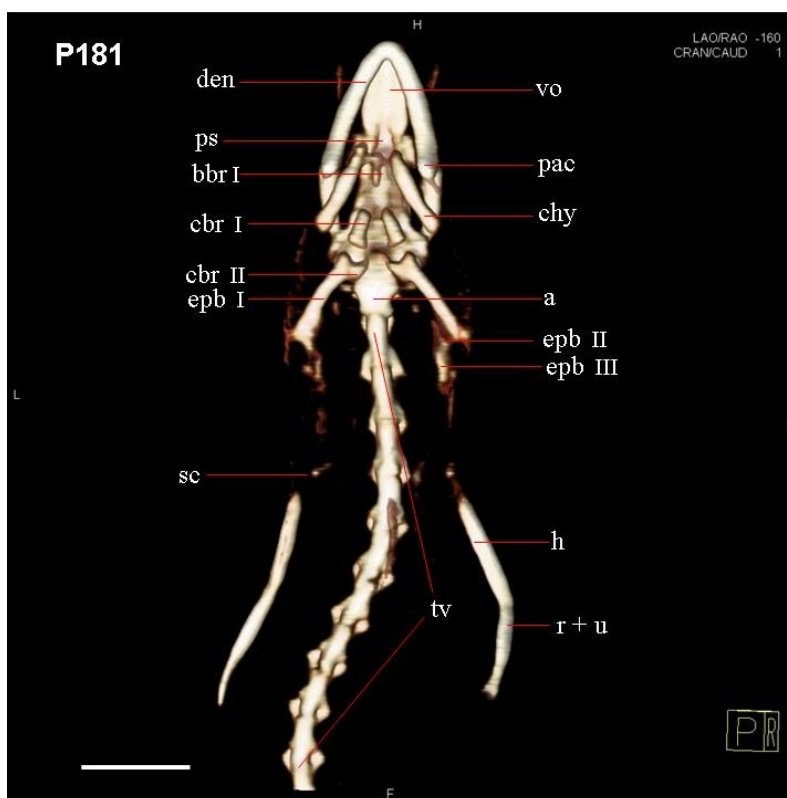
**Slika 93:** Pigmentirana podvrsta močerila (J16). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



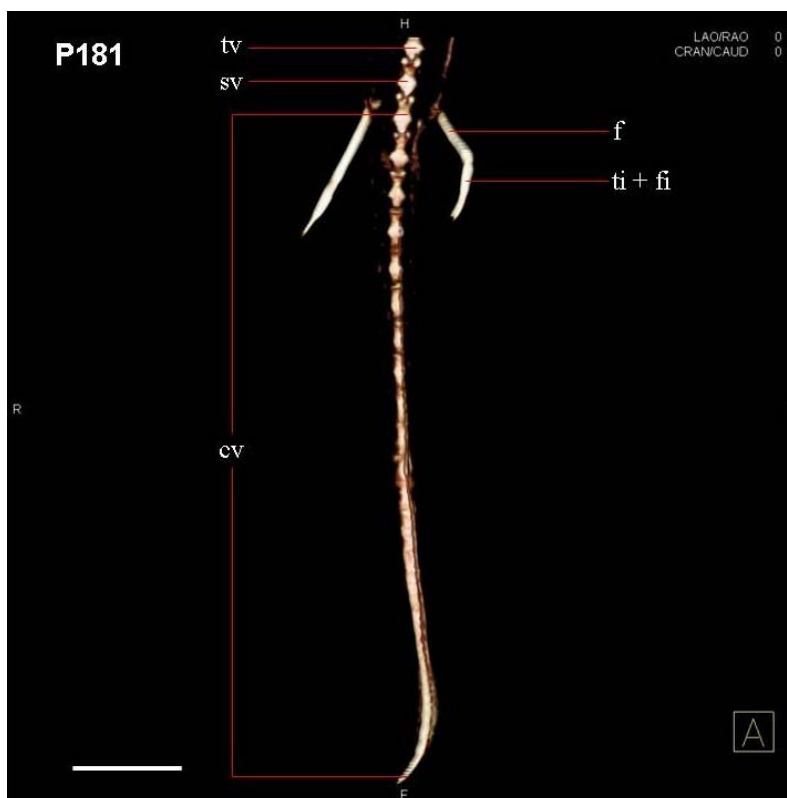
**Slika 94:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 95:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



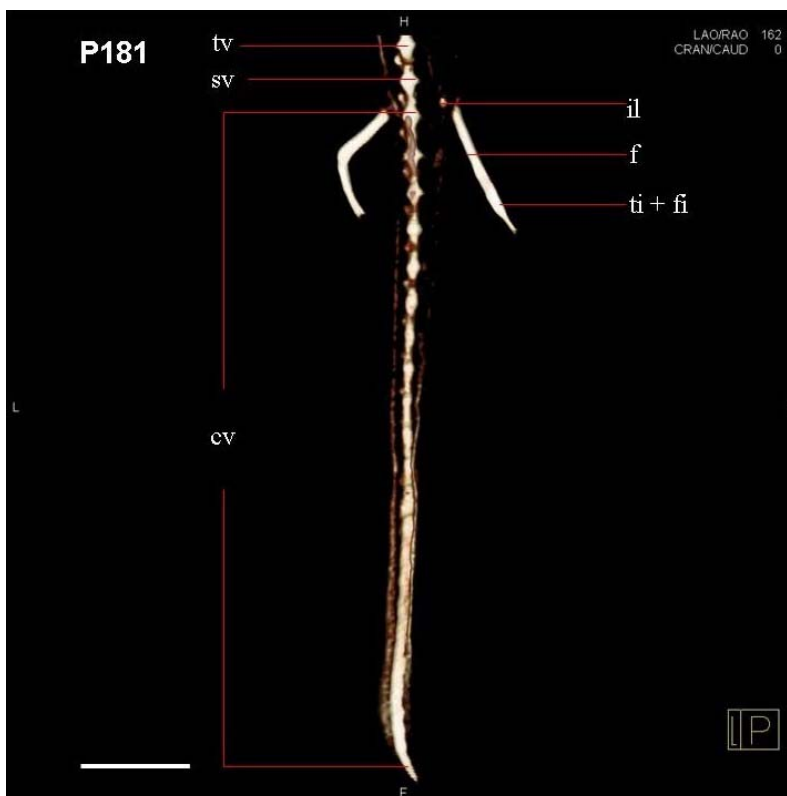
**Slika 96:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



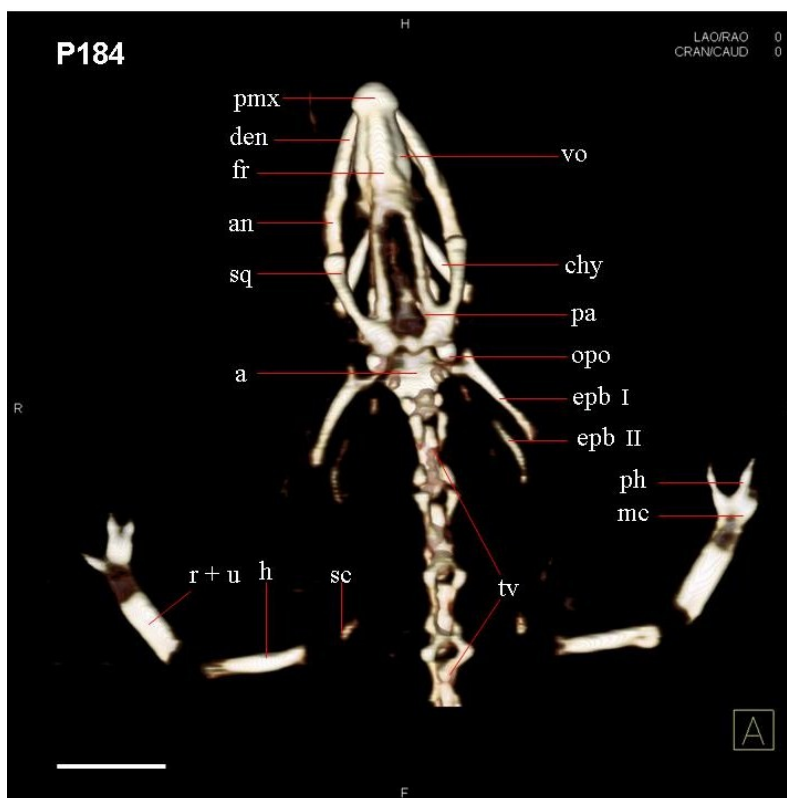
**Slika 97:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Dorzalni pogled na kavalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



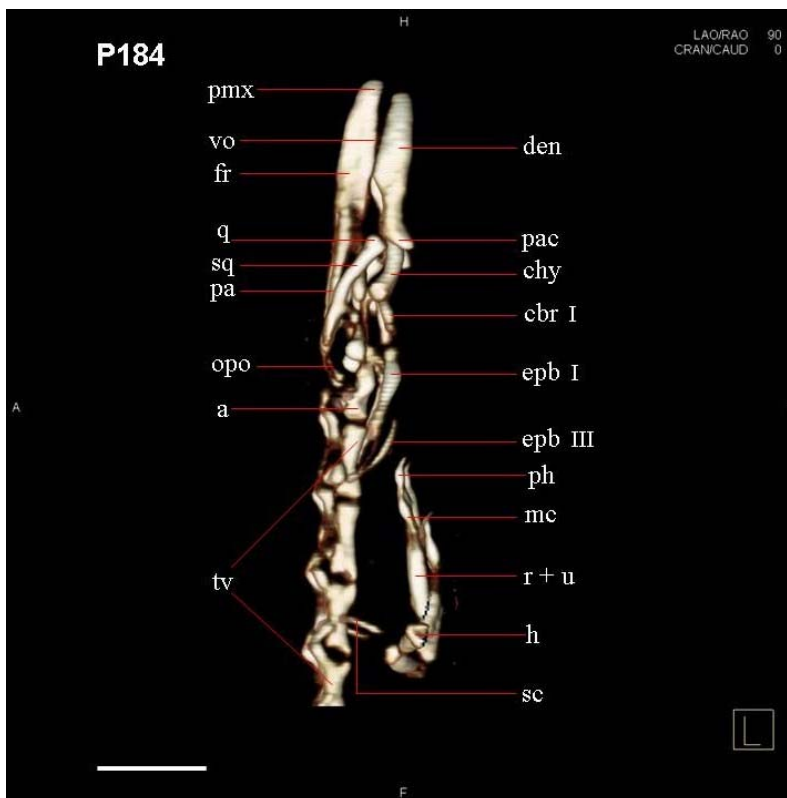
**Slika 98:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



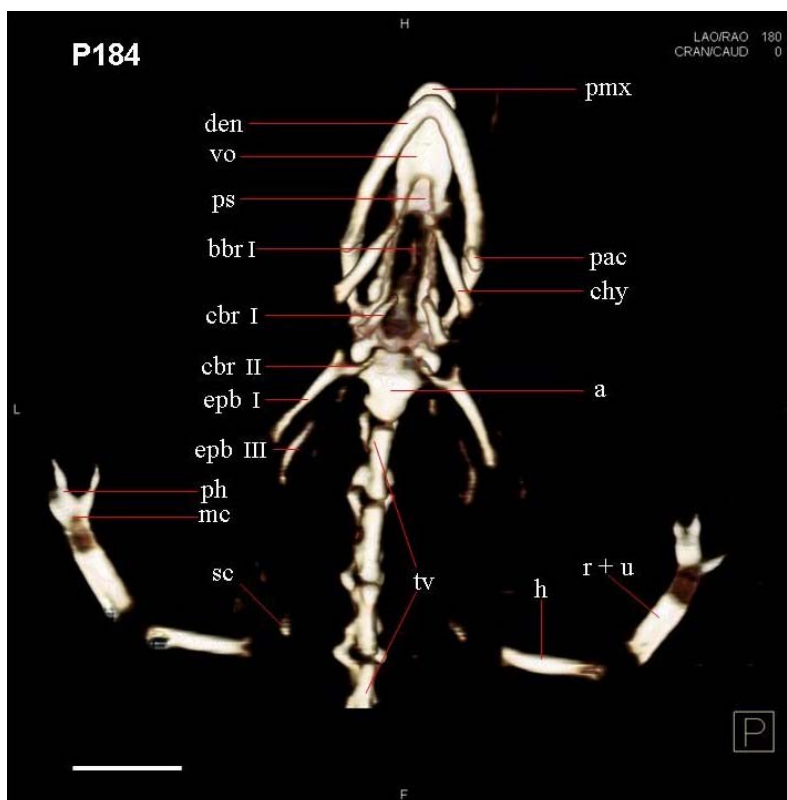
**Slika 99:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P181). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



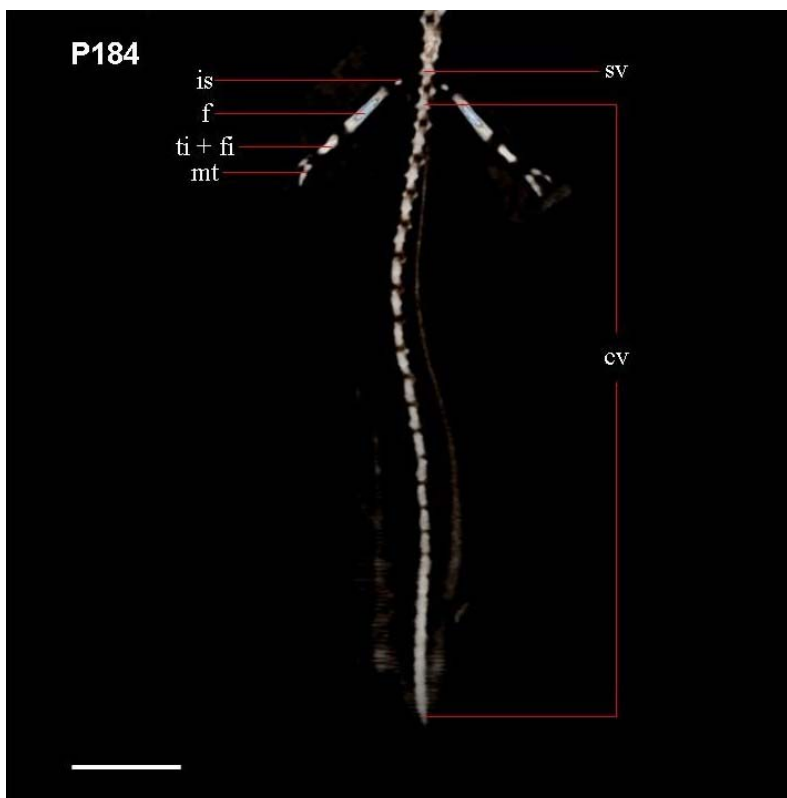
**Slika 100:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



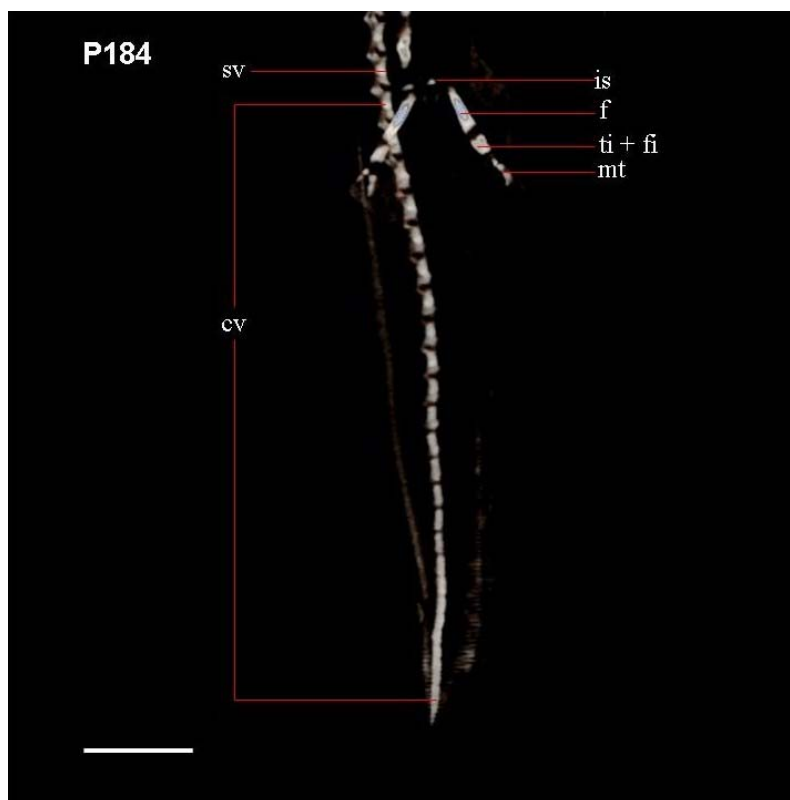
**Slika 101:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



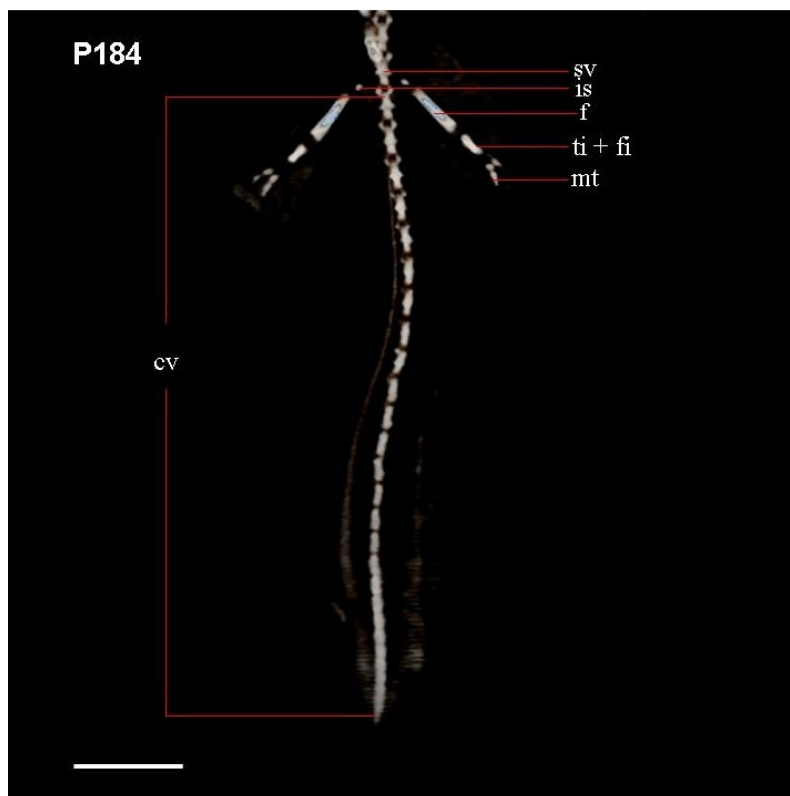
**Slika 102:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



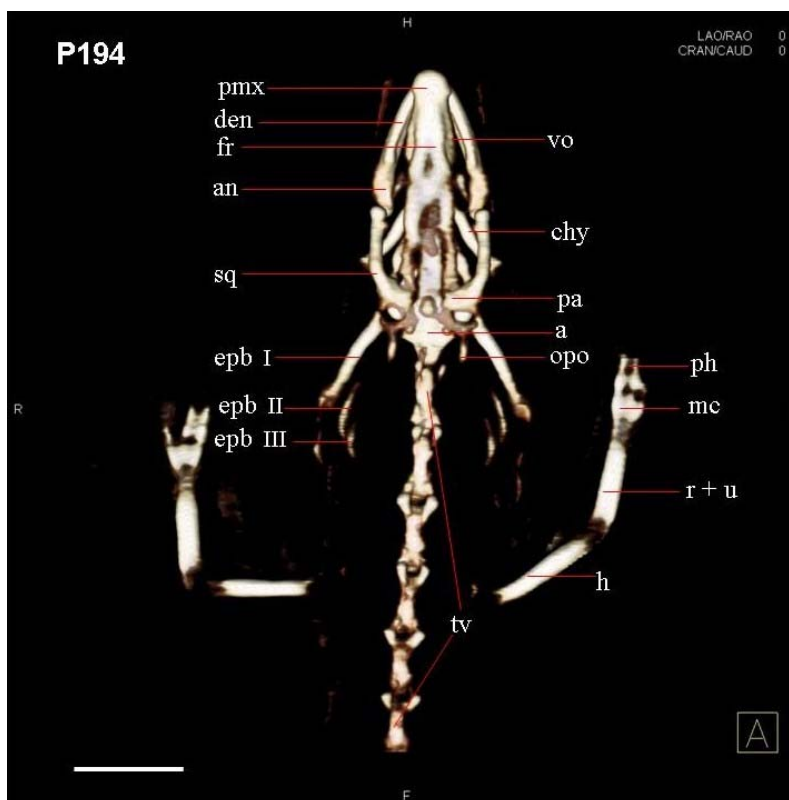
**Slika 103:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



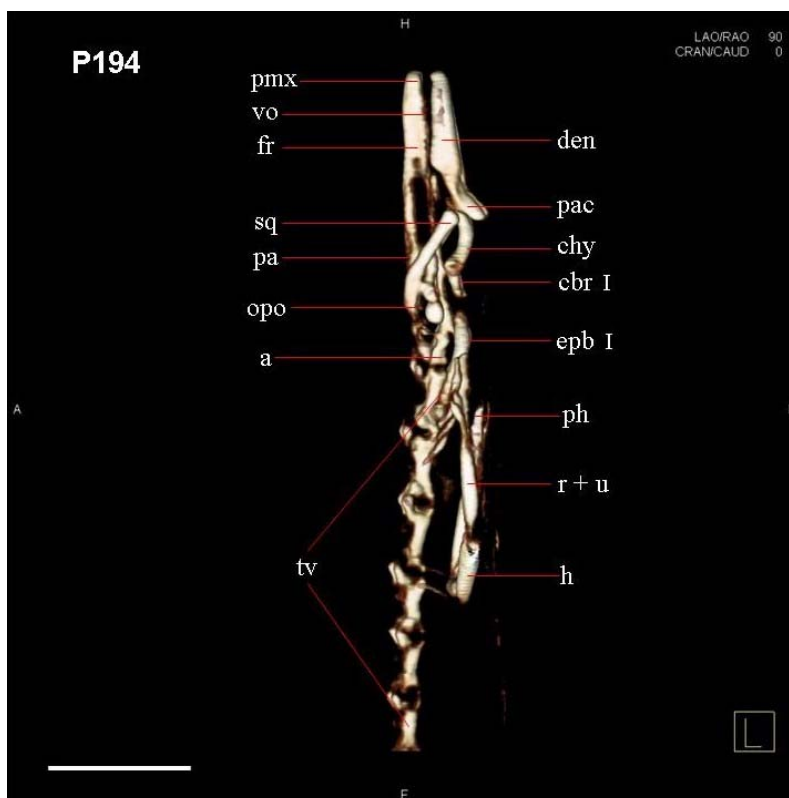
**Slika 104:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 105:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P184). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

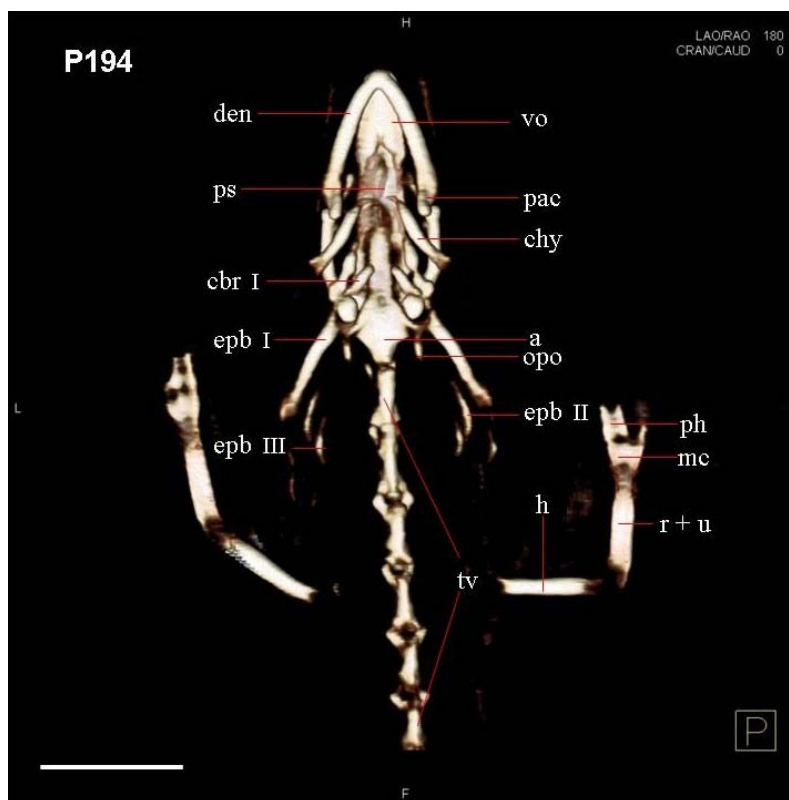


**Slika 106:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Dorzalni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

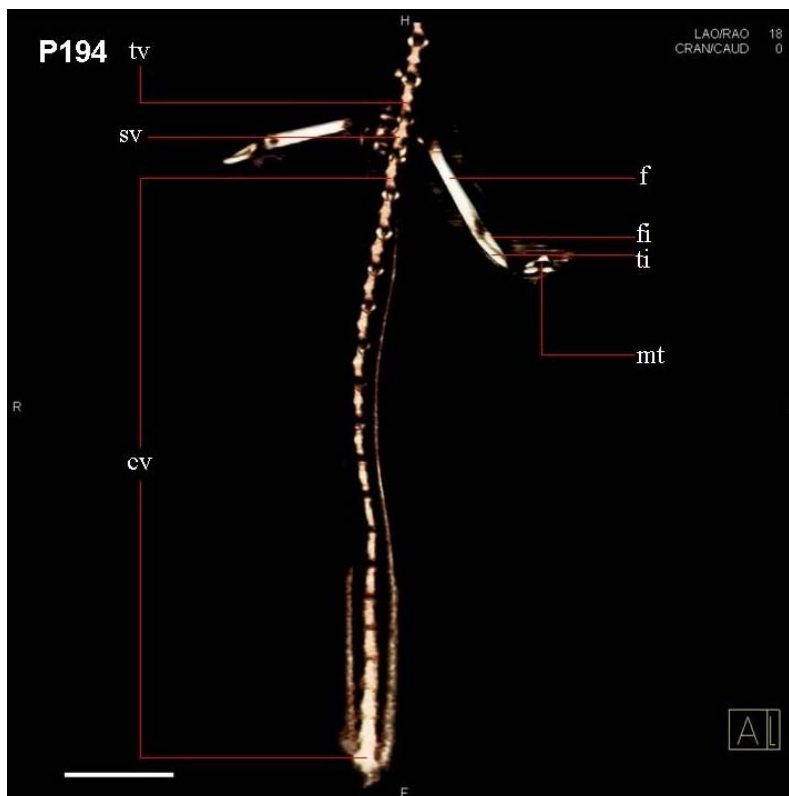


**Slika 107:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Lateralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.

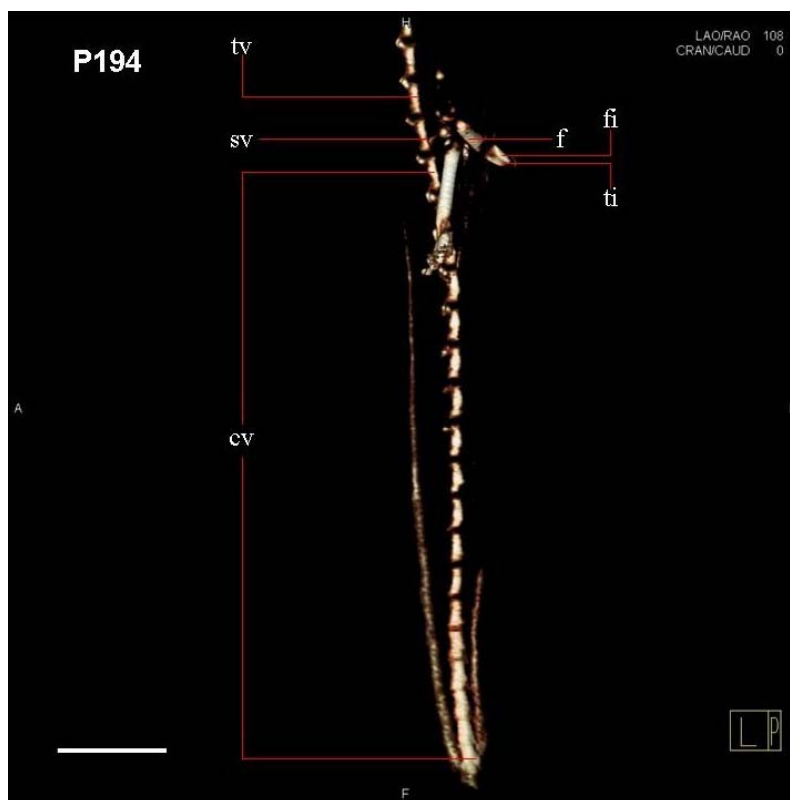




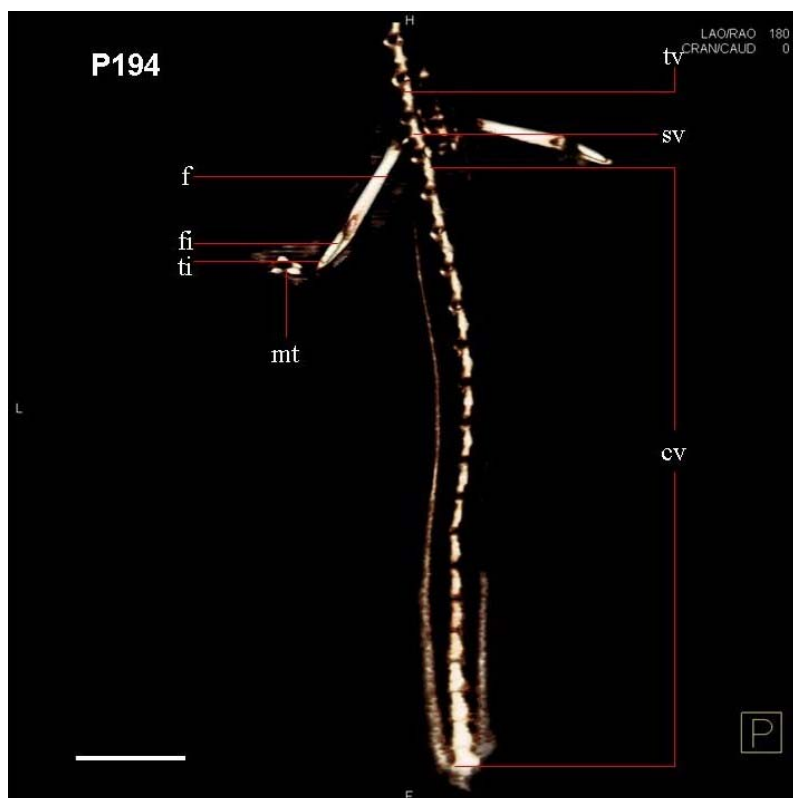
**Slika 108:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Ventralni pogled na skelet glave in sprednjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 109:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Dorzalni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 110:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Lateralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.



**Slika 111:** Nepigmentirana podvrsta močerila (P194). Ventralni pogled na kavdalna vretenca in skelet zadnjih okončin. Merilce: 5 mm.

#### 4.2.2 Opisna statistika izmerjenih elementov skeleta

Opazovali in izmerili smo elemente skeleta pri 13 živalih pigmentirane in 3 živalih nepigmentirane podvrste močerila. Končno statistično analizo smo opravili na izmerjenih kosteh pigmentirane podvrste (preglednica 2). Pri opazovanju vzorca črnih močerilov smo ugotovili, da ena žival močno izstopa od ostalih živali v vzorcu. Zaradi ekstremnih vrednosti smo osebek pod oznako Čv izločili iz nadaljnje statistične analize.

**Preglednica 2:** Osnovne statistične vrednosti izmerjenih elementov skeleta v vzorcu črnih močerilov. Td – telesna dolžina živali, KBD – kondilo-bazalna dolžina, Hum – nadlahtnica, Fem – stegnenica, Man – mandibularni lok, Sq – squamosum, Chy – ceratohyale, Cbr I – ceratobranchiale I, Epb I – epibranchiale I, n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost, Koef. sim – koeficient simetrije, Koef. spl – koeficient sploščenosti.

Oznaka	Td [mm]	KBD [mm]	Hum [mm]	Fem [mm]	Man [mm]	Sq [mm]	Chy [mm]	Cbr I [mm]	Epb I [mm]
n	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Pov	215,242	14,908	4,841	4,722	9,384	7,351	6,073	2,688	6,535
Std N	8,884	0,688	0,289	0,294	0,486	0,603	0,408	0,213	0,415
SD	30,776	2,385	1,001	1,018	1,685	2,088	1,414	0,737	1,439
Min	160,400	11,300	3,340	3,150	7,100	4,730	4,340	1,740	4,350
Maks	275,100	19,100	5,950	6,470	12,050	11,440	8,260	3,850	8,790
Koef. sim	0,117	0,351	-0,191	0,189	0,316	0,779	0,410	0,209	0,124
Koef. spl	0,392	-1,039	-1,739	-0,628	-1,381	-0,098	-1,272	-1,504	-1,130

##### 4.2.2.1 Telesna dolžina

Telesno dolžino živali je predstavljala dolžina od konice predčeljustnice do zadnjega kavdalnega vretenca. V povprečju so bile živali dolge 215,24 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 17,413$  mm). Najkrajša izmerjena žival je merila 160,40 mm, najdaljša pa 275,10 mm. Standardna napaka povprečne vrednosti za telesno dolžino živali znaša 8,884.

Koeficient simetrije znaša 0,117, kar nakazuje, da je porazdelitev telesnih dolžin pigmentiranih živali v vzorcu rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež krajših vrednosti nekoliko večji od deleža daljših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v primeru telesne dolžine znaša 0,392 in nakazuje, da je porazdelitev telesnih dolžin nekoliko koničasta.

#### 4.2.2.2 Kondilo-bazalna dolžina

Kondilo-bazalno dolžino (KBD) smo merili od konice predčeljustnice do kondilov ocipitalne kosti na lobanji močerilov. Povprečna dolžina KBD je znašala 14,908 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 1,349$  mm). Najkrajša izmerjena vrednost KBD je merila 11,30 mm, najdaljša pa 19,10 mm. Standardna napaka povprečne vrednosti za dolžino KBD znaša 0,688.

Koeficient simetrije znaša 0,351, kar nakazuje, da je porazdelitev KBD dolžin pigmentiranih živali v vzorcu rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti znaša  $-1,039$  in nakazuje, da je porazdelitev kondilo-bazalnih dolžin, nekoliko sploščena.

#### 4.2.2.3 Humerus

Pri vseh močerilih smo merili dolžino desnega humerusa. Povprečna dolžina humerusa (nadlahtnice) je merila 4,840 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 0,566$  mm). Najkrajša izmerjena dolžina nadlahtnice je bila 3,34 mm, najdaljša pa 5,95 mm. Vrednost standardne napake je 0,289.

Koeficient simetrije znaša  $-0,192$ , kar nakazuje, da je porazdelitev dolžin nadlahtnic pigmentiranih živali v vzorcu rahlo asimetrična v levo. To pomeni, da je delež krajših vrednosti nekoliko manjši od deleža daljših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v primeru dolžine nadlahtnice znaša  $-1,739$  in nakazuje, da je porazdelitev dolžin nadlahtnic, nekoliko sploščena.

#### 4.2.2.4 Femur

Pri vseh močerilih smo merili dolžino desnega femurja. Povprečna dolžina femurja (stegnenice) je merila 4,721 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm$  0,575 mm). Najkrajša izmerjena dolžina stegnenice je znašala 3,15 mm, najdaljša pa 6,47 mm. Vrednost standardne napake je 0,294.

Koeficient simetrije znaša 0,189, kar nakazuje, da je porazdelitev dolžine stegnenice črnih močerilov v vzorcu rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti za dolžino stegnenic znaša  $-0,628$  in nakazuje na nekoliko sploščeno porazdelitev.

#### 4.2.2.5 Mandibularni lok

Pri močerilu mandibularni lok (spodnje čeljust) sestavljata parni kosti dentare in angulare, ki obdajata centralno ležeči Meckelov hrustanec. Izmerili smo dolžino desnega od obeh parnih lokov, ki skupaj tvorita spodnje čeljust.

Povprečna dolžina mandibularnega loka je znašala 9,384 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm$  0,953 mm). Najkrajša izmerjena vrednost mandibularnega loka je bila 7,10 mm, najdaljša pa 12,05 mm. Standardna napaka povprečne vrednosti znaša 0,486.

Koeficient simetrije za izmerjene vrednosti mandibularnih lokov znaša 0,316 in nakazuje na porazdelitev, ki je rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v tem primeru znaša  $-1,381$  in nakazuje na nekoliko sploščeno porazdelitev izmerjenih vrednosti.

#### 4.2.2.6 Squamosum

Squamosum je parna kost, ki tvori lateralni del zgornjega dela lobanje. Funkcija squamosuma pri močerilu je zelo pomembna, saj pritrjuje prosto ležečo kvadratnico k nevrokraniju. Pri vseh močerilih smo izmerili dolžino desnega squamosuma.

Povprečna dolžina squamosuma v vzorcu je merila 7,351 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 1,181$  mm). Najkrajša izmerjena dolžina squamosuma je znašala 4,73 mm, najdaljša pa 11,44 mm. Vrednost standardne napake je 0,603.

Koeficient simetrije za izmerjene vrednosti squamosuma črnih močerilov v vzorcu znaša 0,779, kar nakazuje, da je porazdelitev asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v tem primeru znaša  $-0,098$  in nakazuje na nekoliko sploščeno porazdelitev izmerjenih vrednosti.

#### 4.2.2.7 Ceratohyale

Ceratohyale (ceratohial) je del visceralnega oz. hiobranhialnega skeleta in je parna struktura. Tvori koščeni del hioidnega loka. Pri vseh močerilih smo merili dolžino desnega ceratohiala.

Povprečna dolžina ceratohiala je znašala 6,073 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 0,800$  mm). Najkrajša izmerjena vrednost je merila 4,34 mm, najdaljša pa 8,26 mm. Vrednost standardne napake je 0,408.

Koeficient simetrije za izmerjene vrednosti dolžin ceratohiala pigmentiranih živali v vzorcu znaša 0,410, kar nakazuje, da je porazdelitev izmerjenih vrednosti rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v tem primeru znaša  $-1,272$  in nakazuje na nekoliko sploščeno porazdelitev vrednosti.

#### 4.2.2.8 Ceratobranchiale I

Ceratobranchiale I (ceratobranhial) je del visceralnega oz. hiobranhialnega skeleta in je parna struktura. Pri vseh močerilih smo merili dolžino desnega ceratobranhiala I.

Povprečna dolžina prvega ceratobranhialnega elementa je merila 2,688 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 0,417$  mm). Najkrajša izmerjena dolžina ceratobranhiala I je bila 1,74 mm, najdaljša pa 3,85 mm. Izračunana vrednost standardne napake znaša 0,213.

Koeficient simetrije znaša 0,209, kar nakazuje, da je porazdelitev izmerjenih vrednosti ceratobranhiala I rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v primeru dolžine prvega ceratobranhialnega elementa v vzorcu črnih močerilov znaša  $-1,504$  in nakazuje, da je porazdelitev izmerjenih vrednosti nekoliko sploščena.

#### 4.2.2.9 Epibranchiale I

Epibranchiale I (epibranhial) je del visceralnega oz. hiobranhialnega skeleta in je parna struktura. Pri vseh močerilih smo merili dolžino desnega epibranhiala I.

Povprečna dolžina prvega epibranhialnega elementa je znašala 6,535 mm (95% interval zaupanja za aritmetično sredino obsega povprečje  $\pm 0,814$  mm). Najkrajša izmerjena vrednost epibranhiala I je znašala 4,35 mm, najdaljša pa 8,79 mm. Standardna napaka povprečne vrednosti za dolžino prvega epibranhialnega elementa je 0,415.

Koeficient simetrije znaša 0,124, kar nakazuje, da je porazdelitev prvega epibranhialnega elementa črnih močerilov v vzorcu rahlo asimetrična v desno. To pomeni, da je delež

daljših vrednosti nekoliko nižji od deleža krajših vrednosti v vzorcu. Koeficient sploščenosti v primeru izmerjenih vrednosti za prvi epibranhialni element znaša  $-1,130$  in nakazuje na nekoliko sploščeno porazdelitev.

#### 4.2.3 Odvisnost med izbranimi elementi skeleta

V tem delu smo preverjali hipotezo, da obstaja pozitivna linearna odvisnost med izbranimi spremenljivkami (kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice) in telesno dolžino živali. To bi pomenilo, da imajo večje živali daljše mere izbranih spremenljivk.

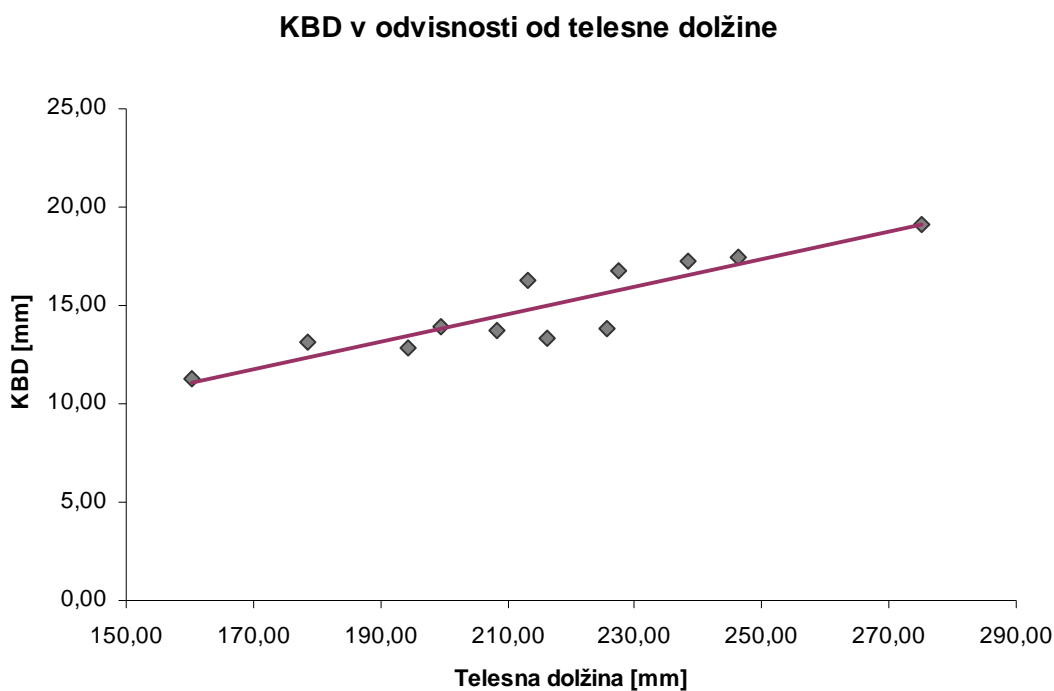
Iz slednjih grafov je razvidna linearna odvisnost med izbranimi spremenljivkami. Tako lahko zgornjo predpostavko preverimo s pomočjo uporabe Pearsonovega korelacijskega koeficienta (Preglednica 3).

**Preglednica 3:** Izračunani Pearsonovi korelacijski koeficienti (Pearson Co) skupaj s stopnjo značilnosti (Sig.) za izbrane spremenljivke v vzorcu črnih močerilov ( $n = 12$ ). Td – telesna dolžina živali, KBD – kondilo-bazalna dolžina, Hum – nadlahtnica, Fem – stegenica.

		Td	KBD	Hum	Fem
Td	Pearson Co	1,000	0,899	0,687	0,793
	Sig.	/	0,000	0,007	0,001
	n	12	12	12	12
KBD	Pearson Co	0,899	1,000	0,896	0,897
	Sig.	0,000	/	0,000	0,000
	n	12	12	12	12
Hum	Pearson Co	0,687	0,896	1,000	0,861
	Sig.	0,007	0,000	/	0,000
	n	12	12	12	12
Fem	Pearson Co	0,793	0,897	0,861	1,000
	Sig.	0,001	0,000	0,000	/
	n	12	12	12	12

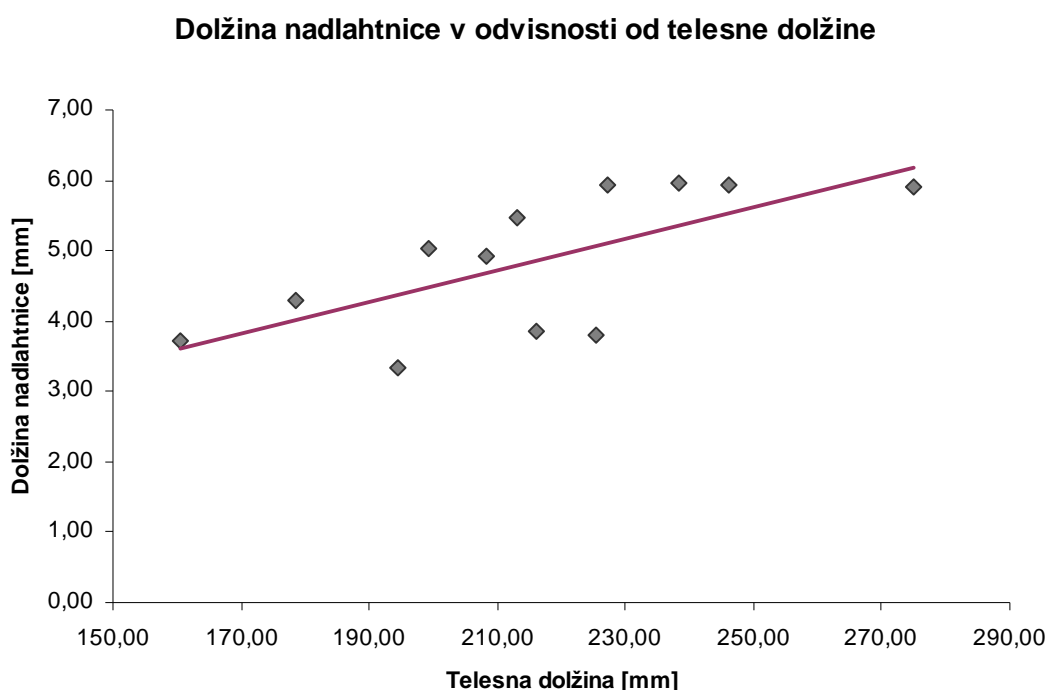


Najprej podajamo povezavo med telesno dolžino in KBD za vzorec črnih močerilov (slika 112). Pearsonov koeficient korelacije v tem primeru znaša 0,899 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Koeficient nakazuje na močno pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in KBD v vzorcu črnih močerilov. Trdimo lahko, da imajo črni močerili z daljšo telesno dolžino tudi daljšo kondilo-bazalno dolžino.



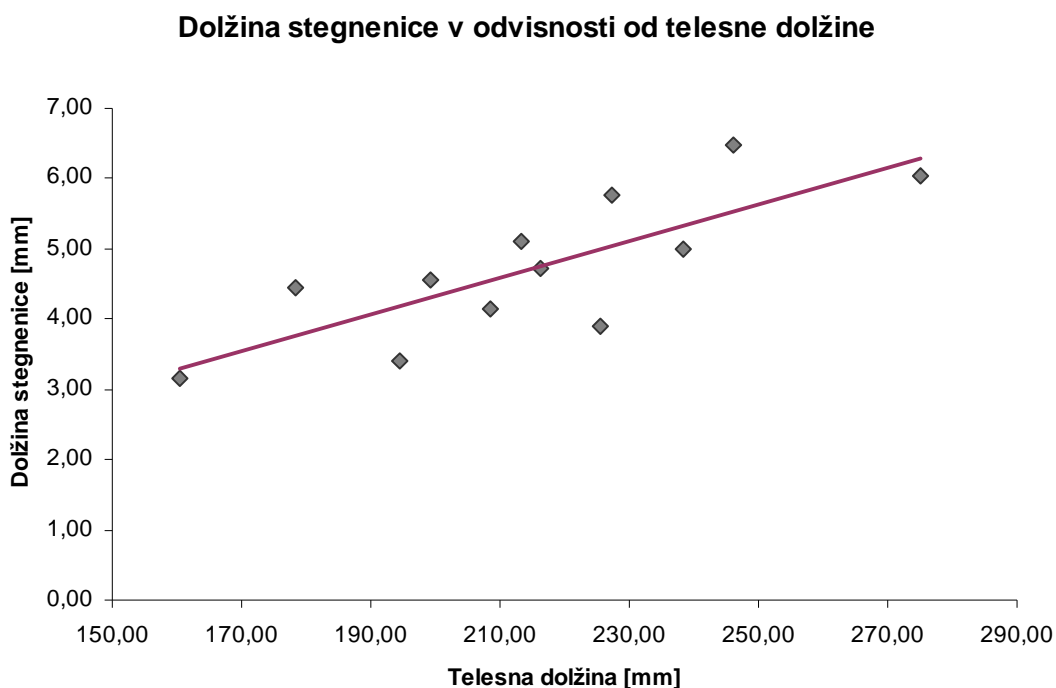
**Slika 112:** Izračunani Pearsonov koeficient korelacije med KBD in telesno dolžino za vzorec črnih močerilov znaša 0,899 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Tako grafična predstavitev kot sam koeficient nakazujeta na močno pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in KBD v vzorcu črnih močerilov.

Na naslednjem grafu podajamo povezavo med telesno dolžino živali in dolžino nadlahtnice (humerus) za vzorec črnih močerilov (slika 113). Pearsonov koeficient korelacije za telesno dolžino in dolžino nadlahtnice znaša 0,687 in je statistično značilen ( $p < 0,007$ ). Koeficient nakazuje na pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in dolžino nadlahtnice v vzorcu črnih močerilov. Tako lahko trdimo, da imajo črni močerili z daljšo telesno dolžino tudi daljšo nadlahtnico.



**Slika 113:** Pearsonov koeficient korelacije za telesno dolžino in dolžino nadlahtnice za vzorec črnih močerilov znaša 0,687 in je statistično značilen ( $p < 0,007$ ). Tako grafična predstavitev kot sam koeficient nakazujeta na pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in dolžino nadlahtnice v vzorcu črnih močerilov.

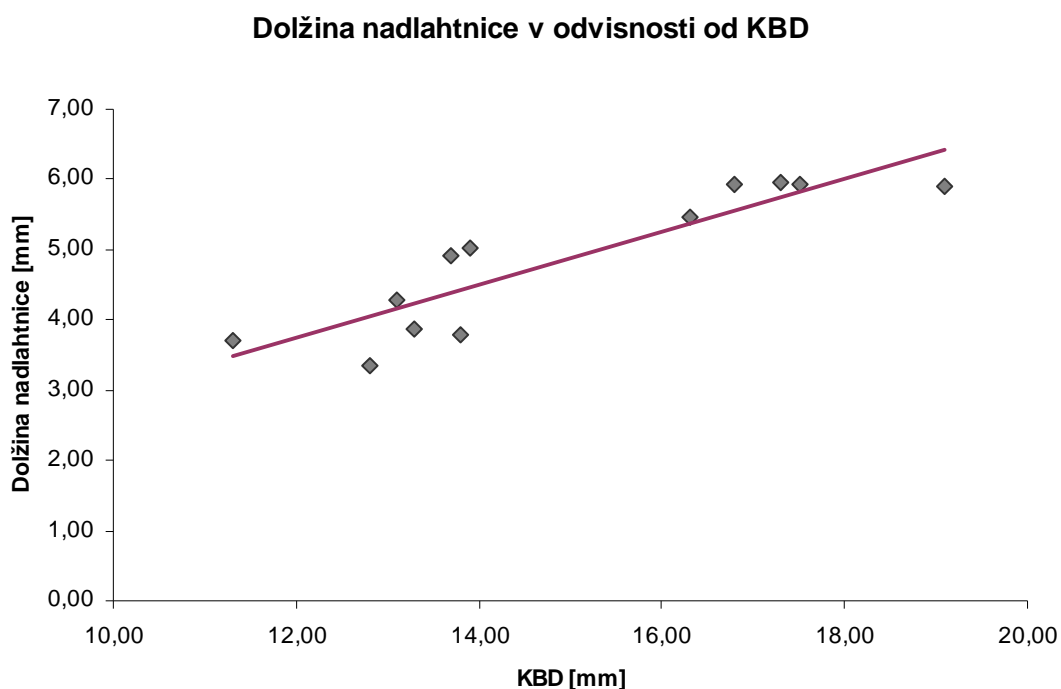
Spodnji graf prikazuje povezavo med telesno dolžino živali in dolžino stegenice (femur) za vzorec črnih močerilov (slika 114). Pearsonov koeficient korelacije v tem primeru znaša 0,793 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Koeficient nakazuje na pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in dolžino stegenice v vzorcu črnih močerilov. Trdimo lahko, da imajo črni močerili z daljšo telesno dolžino tudi daljšo stegenico.



**Slika 114:** Izračunani Pearsonov koeficient korelacije med dolžino stegenice in telesno dolžino za vzorec črnih močerilov znaša 0,793 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Sam koeficient kot tudi grafična ponazoritev nakazujeta na pozitivno linearno povezavo med telesno dolžino in dolžino stegenice v vzorcu črnih močerilov.

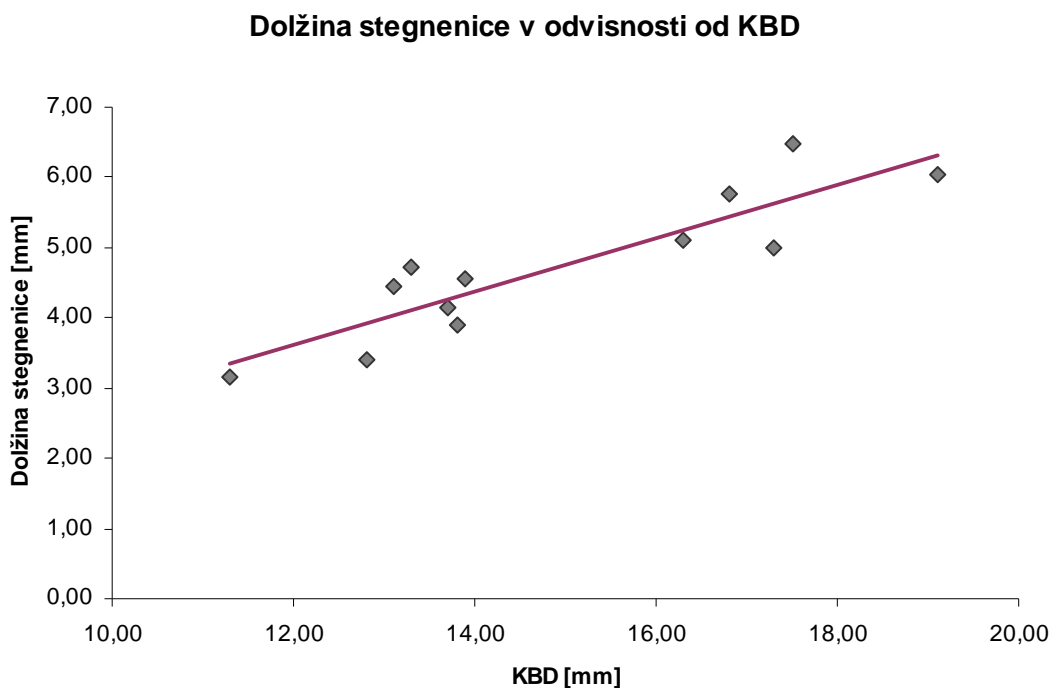
Preverili smo tudi odvisnost med posameznimi spremenljivkami. Zanimala nas je odvisnost med dolžino nadlahtnice in stegenice v odvisnosti od kondilo-bazalne dolžine v vzorcu črnih močerilov. Tako dolžina nadlahtnice kot dolžina stegenice kažeta močno pozitivno linearno odvisnost v povezavi s kondilo-bazalno dolžino.

Pearsonov koeficient korelacije za dolžino nadlahtnice v odvisnosti od KBD za vzorec črnih močerilov znaša 0,896 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Koeficient nakazuje na pozitivno linearno povezavo med KBD in dolžino nadlahtnice v vzorcu črnih močerilov. Trdimo lahko, da imajo črni močerili z daljšo kondilo-bazalno dolžino tudi daljšo nadlahtnico (slika 115).



**Slika 115:** Pearsonov koeficient korelacije za dolžino nadlahtnice v odvisnosti od KBD za vzorec črnih močerilov znaša 0,896 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Tako grafična ponazoritev kot koeficient nakazujeta na pozitivno linearno povezavo med KBD in dolžino nadlahtnice v vzorcu črnih močerilov.

Pearsonov koeficient korelacije za dolžino stegenice v odvisnosti od KBD za vzorec črnih močerilov znaša 0,897 in je statistično značilen ( $p < 0,001$ ). Koeficient nakazuje na pozitivno linearno povezavo med KBD in dolžino stegenice v vzorcu črnih močerilov. Trdimo lahko, da imajo črni močerili z daljšo kondilo-bazalno dolžino tudi daljšo stegenico (slika 116).



**Slika 116:** Izračunani Pearsonov koeficient korelacije za dolžino stegenice v odvisnosti od KBD za vzorec črnih močerilov znaša 0,897 in je statistično značilen ( $p < 0,005$ ). Tako koeficient kot grafična ponazoritev nakazujeta na pozitivno linearno povezavo med KBD in dolžino stegenice v vzorcu črnih močerilov.

#### 4.2.4 Sorazmernostni količniki

Za izbrani vzorec črnih živali ( $n = 12$ ) nas je zanimalo, kolikšen delež telesne dolžine predstavljajo kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice, če jih primerjamo z izmerjeno telesno dolžino živali. V ta namen smo s pomočjo pridobljenih mer posameznih kosti in telesnih dolžin živali izračunali sorazmernostne količnike.

Izračunali smo sorazmernostne količnike za izbrane dolžine kosti (kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice) ter jih primerjali s telesno dolžino močerilov (preglednica 4). Dobljene rezultate smo izrazili v odstotkih in opravili osnovno statistično analizo.

*Sorazmernostni količnik 1 (SK 1) = (kondilo-bazalna dolžina/telesna dolžina) %*

*Sorazmernostni količnik 2 (SK 2) = (dolžina nadlahtnice/telesna dolžina) %*

*Sorazmernostni količnik 3 (SK 3) = (dolžina stegenice/telesna dolžina) %*

**Preglednica 4:** Izračunani deleži sorazmernostnih količnikov za vzorec črnih močerilov. SK1 = KBD/Td, SK2 = Humerus/Td, SK3 = Femur/Td, n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost.

Oznaka	SK1 [%]	SK2 [%]	SK3 [%]
J1	7,391	2,604	2,534
J3	7,260	2,497	2,098
J6	7,045	2,313	1,964
J7	6,971	2,518	2,282
J8	6,943	2,148	2,192
J15	7,108	2,405	2,628
J16	7,645	2,561	2,392
D1	7,339	2,403	2,487
Č16	6,120	1,681	1,734
Č17	6,152	1,785	2,179
Č18	6,584	1,718	1,749
Č19	6,574	2,361	1,987
n	12	12	12
Povprečje	6,928	2,250	2,185
Std N	0,139	0,097	0,085
SD	0,482	0,337	0,294
Min	6,120	1,681	1,734
Maks	7,645	2,604	2,628

V povprečju je pri črnih močerilih kondilo-bazalna dolžina predstavljala 6,928% delež ( $\pm 0,139\%$ ) telesne dolžine. Dolžini nadlahtnice in stegenice sta glede na izmerjeno telesno dolžino predstavljali podobna deleža, saj je bila izračunana povprečna vrednost deleža za dolžino nadlahtnice 2,250% ( $\pm 0,097\%$ ), za dolžino stegenice pa 2,185% ( $\pm 0,085\%$ ).

Za boljšo primerjavo vrednosti sorazmernostnih količnikov za vzorec črnih močerilov smo izračunali sorazmernostne količnike tudi za bele močerile. Zaradi majhnega vzorca belih živali ( $n = 3$ ) smo za lažjo primerjavo dodali podatke povzete, po Herre (1935) (preglednica 5).

**Preglednica 5:** Izračunani deleži sorazmernostnih količnikov za vzorec belih močerilov. SK1 = KBD/Td, SK2 = Humerus/Td, SK3 = Femur/Td. H1, H2 in H3 povzeto po Herre (1935), n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost.

Oznaka	SK 1 [%]	SK 2 [%]	SK 3 [%]
H1	9,535	/	/
H2	8,768	/	/
H3	8,021	/	/
P181	7,692	3,846	3,791
P184	7,135	2,720	2,942
P194	8,110	3,630	4,629
n	6	3	3
Pov	8,210	3,399	3,787
Std N	0,343	0,345	0,487
SD	0,841	0,598	0,844
Min	7,135	2,720	2,942
Maks	9,535	3,846	4,629

V povprečju je v vzorcu belih močerilov kondilo-bazalna dolžina predstavljala 8,210% delež ( $\pm 0,343\%$ ) telesne dolžine. Izračunana povprečna vrednost deleža za dolžino nadlahtnice je bila 3,399% ( $\pm 0,345\%$ ), za dolžino stegenice pa 3,787% ( $\pm 0,487\%$ ).

#### 4.2.5 Štetje vretenc

S pomočjo CT-posnetkov živali in programske opreme AcDsee pro (Photo manager) smo preko dorzalnih in lateralnih posnetkov okostja črnih močerilov poskušali prešteti število vretenc v vseh regijah hrbtenice. Natančnega števila kavdalnih vretenc na posnetkih večine črnih močerilov nismo uspeli določiti, saj so bila najmanjša kavdalna vretenca zaradi prenizke ločljivosti CT-naprave zlita v enoten skupek. Tudi s povečevanjem in obdelavo fotografij natančnega števila zadnjih kavdalnih vretenc ni bilo mogoče določiti (razen v izjemnih primerih na lateralnem CT-posnetku repnega dela). Lahko pa smo natančno opazovali in prešteli vsa vretenca trupne regije (preglednica 6). Dobljene rezultate smo primerjali z že obstoječimi podatki o številu trupnih vretenc pri pigmentirani podvrsti močerila.

**Preglednica 6:** Število trupnih vretenc za vzorec črnih močerilov, n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost.

Oznaka	A + prsna	Metoda
J93	33	PT
J1	35	PT
J3	35	CT
J6	35	CT
J7	34	CT
J8	36	CT
J15	35	CT
J16	35	CT
D1	35	CT
Č16	37	CT
Č17	34	CT
Č18	33	CT
Č19	36	CT
n	13	
Pov	34,846	
Std N	0,329	
SD	1,144	
Min	33	
Maks	37	

Povprečno število vretenc v trupni regiji skupaj z atlasom (ki je prvo in edino vratno vretenca pri močerilu) je bilo 34,8 ( $\pm$  0,329). Najmanjše število vretenc v trupni regiji je imel osebek Č18, in sicer 33 vretenc, največ pa osebek pod oznako Č16, in sicer 37.



#### 4.2.6 Merjenje prostornine kalcija v kostnem tkivu močerilov

S pomočjo posnetkov, pridobljenih s tehniko računalniške tomografije, smo izmerili prostornino kalcija (v  $\text{mm}^3$ ) v kostnem tkivu šestnajstih močerilov (trinajst pigmentiranih in tri nepigmentirane živali). Prostornino kalcija v kostnem tkivu smo izmerili tako za vzorec črnih kot tudi belih močerilov (preglednici 7 in 8). Poleg same prostornine kalcija v kostnem tkivu živali nas je zanimalo tudi, ali se pigmentirana in nepigmentirana podvrsta močerila bistveno razlikujeta v izmerjenih vrednostih.

Na podlagi pričujočega vzorca belih in črnih močerilov razlike v prostorninah kalcija nismo opazili. Povprečna prostornina kalcija v kostnem tkivu belih močerilov ni bila statistično značilno različna od prostornine kalcija v kostnem tkivu črnih močerilov (Studentov t-test,  $p > 0,05$ ).

**Preglednica 7:** Prostornina kalcija (v  $\text{mm}^3$ ) v kostnem tkivu belih močerilov, n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost.

Oznaka	$\text{mm}^3$
P181	246
P184	263
P194	339
n	3
Pov	282,667
Std N	28,591
SD	49,521
Min	246
Maks	339

**Preglednica 8:** Prostornina kalcija (v  $\text{mm}^3$ ) v kostnem tkivu črnih močerilov, n – število osebkov, Pov – povprečje, Std N – standardna napaka povprečja, SD – standardna deviacija, Min – minimalna vrednost, Maks – maksimalna vrednost.

Oznaka	$\text{mm}^3$
Čv	318
Č16	349
Č17	398
Č18	298
Č19	422
D1	201
J1	95
J3	436
J6	365
J7	309
J8	443
J15	73
J16	248
n	13
Pov	304,231
Std N	33,617
SD	121,207
Min	73
Maks	443

#### 4.3 MAGNETNA RESONANCA

Magnetna resonanca se žal ni izkazala za tako uspešno metodo, kot smo upali. Posamezne slike sicer prikažejo celosten izgled okostja, vendar je ločljivost na slikah prenizka, da bi lahko prepoznali posamezne elemente skeleta. Tridimenzionalnega modela okostja iz nastalih slik ni bilo mogoče izdelati.



**Slika 117:** MRI posnetek nepigmentirane podvrste močerila (P111). Ventralni pogled na skelet.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Z uporabo klasičnih in sodobnih metod za preučevanje skeleta ter s številčno večjim vzorcem pigmentiranih živali smo želeli podrobneje ovrednotiti in dopolniti že obstoječa dognanja o skeletu črnega močerila. Tako smo za potrebe diplomskega dela preizkusili tri različne metodološke pristope: klasično metodo presvetljevanja tkiv s souporabo specifičnih barvil, magnetno resonanco (MRI) in računalniško tomografijo (CT). Z njihovo primerjavo smo želeli ugotoviti, ali so primerne za opravljanje raziskav na skeletu črnega močerila ter kakšno stopnjo verodostojnosti in uporabnosti rezultatov nam lahko zagotovijo. Najboljše rezultate smo pričakovali predvsem od sodobnih metod, izmed katerih se je računalniška tomografija (CT) izkazala kot precej učinkovita in uporabna, magnetna resonanca pa se je v primeru morfometričnih raziskav na skeletu črnega močerila izkazala kot precej neuporabna. Za uporabo sodobnih metod magnetne resonance in računalniške tomografije smo se odločili predvsem iz razloga, ker gre za neinvazivni metodi, pri katerih živali za preiskavo ni potrebno žrtvovati. To je še posebej uporabno pri morfometričnih raziskavah na okostju strogo zavarovane vrste, kot je črni močeril, katerega velikosti populacije še ne poznamo in je število osebkov, namenjenih raziskavam, ustrezno majhno.

#### 5.1.1 Presvetlitvene tehnike

Za uporabo presvetlitvene tehnike na skeletu črnega močerila smo se odločili predvsem zaradi njene bistvene prednosti, ki omogoča diferencialno barvanje celotnega skeleta na intaktnem telesu osebka in tako med samim postopkom priprave okostja ne izgubimo posameznih manjših koščenih elementov (Dwight Davis in Gore, 1936; Green, 1952). Glede na dobre rezultate, ki so jih na skeletih dvoživk dosegli že drugi avtorji (Dwight

Davis in Gore, 1936; Green, 1952; Hanken in Wasserung, 1981), smo od metode pričakovali rezultate, ki bi omogočili jasnejšo analizo skeletnih elementov glave, oplečja in okolčja ter vretenc v repni regiji hrbtenice. V ta namen smo poskušali presvetliti dva fiksirana črna osebka. Oba skeleta sta med postopkom presvetljevanja razpadla. Predvidevamo, da sta bili živali že pred samim fiksiranjem (70% etanol) v precej slabem stanju in zato tkivo ni preneslo tretiranja s kemijskimi reagenti, predpisanimi v postopku. Prav tako velja opozoriti, da gre pri uporabljenem materialu za vzorce, ki so bili v etanolu fiksirani že vrsto let. Tako menimo, da ima lahko čas fiksacije v alkoholu vpliv na obstojnost preparata. Predvidevamo, da bi s svežim materialom ali pa z osebki, ki so bili fiksirani zgolj za krajši čas (nekaj dni), dobili boljše končne rezultate. Že Dwight Davis in Gore (1936) navajata, da sta najboljše rezultate na dvoživkah dosegala s svežim materialom. Ker gre v primeru črnega močerila za zaščiteno vrsto in ker je število osebkov, namenjenih raziskavam, majhno, sami nismo poskušali uporabiti svežih osebkov. V nadaljnje to tudi odsvetujemo, saj smo sami dokazali, da lahko dobre rezultate dosežemo s sodobnejšimi metodami (računalniška tomografija), ki ne zahtevajo žrtvovanja živali.

Kljub razpadlemu materialu smo koščene elemente skeleta črnih osebkov obarvali z barvilom alizarin red-S ter jih tako napravili boljše prepoznavne. Iz presvetljenih preparatov smo lahko ovrednotili število repnih vretenc, vendar zaradi majhnega vzorca rezultati niso bili primerni za primerjavo z že obstoječimi podatki. Strukture smo pregledali pod stereolupo ter fotodokumentirali obarvani material. Menimo, da je pričujoči slikovni material dobrodošlo gradivo, ki bi bilo v prihodnje lahko uporaben učni pripomoček.

### **5.1.2 Računalniška tomografija**

Od metode računalniške tomografije smo pričakovali rezultate, ki bi omogočili podrobnejšo tridimenzionalno analizo zgradbe lobanjskih kosti, koščenih elementov oplečja in okolčja ter zgradbo in število vretenc v posameznih regijah, s poudarkom na vretencih repne regije. Izkazalo se je, da je CT-naprava Oddelka za nevrologijo UKC v Ljubljani učinkovita metoda pri anatomskem analiziranju koščenih elementov, zaradi

pre nizke ločljivosti naprave pa je pri živalih velikostnega razreda močerila premalo natančna za analiziranje najbolj drobnih elementov skeleta. Zaradi ločljivosti naprave, ki lahko razločuje le strukture, večje od 0,3 mm, najmanjših struktur okostja nismo uspeli razločevati. Tako so na tridimenzionalnih modelih nekatere kosti zlite skupaj in vidne kot celota, čeprav iz drugih raziskav vemo, da gre v resnici za ločene kosti.

Zanimivo je, da nismo na vseh posnetkih črnih močerilov opazili vseh struktur. Tako so na nekaterih posnetkih jasno vidni vsi trije epibranchialni elementi, medtem ko sta pri drugih črnih močerilih opazna samo dva ali pa zgolj en epibranchialni element. Prav tako na vseh posnetkih ni zaznati prvega ceratobranhialnega elementa, medtem ko sta pri nekaterih živalih opazna tako prvi kot tudi drugi ceratobranhialni element. Tudi končni členki prstov so pri nekaterih živalih dobro vidni, pri drugih pa ne. Predvidevamo, da bi lahko bila za to dva razloga. Prvi je ta, da so bile pri živih živalih jakosti sevanja nižje in tudi sam postopek slikanja z rentgenskimi žarki je potekal krajši čas kot pri fiksiranih osebkih. Ločljivost koščenih elementov na posnetkih živih živali je tako nekoliko slabša od posnetkov živali, ki so bile fiksirane v 70% etanolu. Drugi razlog pa je tudi ta, da smo pri raziskavi uporabljali različno stare živali. Predvidevali smo, da so bile večje živali starejše od manjših živali in zato njihov skelet tudi močneje osificiran. Tako sklepamo, da je pri starejših (večjih) močerilih stopnja osifikacije skeleta višja kot pri mlajših (manjših) živalih. To pomeni, da so imele starejše (večje) živali višjo stopnjo osifikacije in tudi večje število okostenelih elementov kot mlajše (manjše) živali, kar se na tridimenzionalnih modelih odraža v različnem številu najmanjših skeletnih elementov.

Izdelani tridimenzionalni računalniški modeli so omogočili zelo dober celostni tridimenzionalni pogled na posamezne regije skeleta pri črnem močerilu. Tako so bili modeli, primerni za vrednotenje koščenih elementov, večjih od minimalne ločljivosti naprave. Izmerili in ovrednotili smo lahko večje lobanjske kosti, glavne elemente visceralnega skeleta, propodialna elementa humerus in femur ter vsa vretenca, razen najmanjših repnih vretenc.

S pomočjo meritev, opravljenih na tridimenzionalnih računalniških modelih okostij črnih močerilov, smo izmerili in statistično ovrednotili izbrane elemente skeleta. S testiranjem

izmerjenih vrednosti smo potrdili postavljeno hipotezo o pozitivni linearni odvisnosti med izmerjenimi elementi skeleta (kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice) ter telesno dolžino črnih močerilov. Podobne ugotovitve o linearni zveznosti med izmerjenimi morfometričnimi parametri in telesno dolžino živali za bele in črne močerile navaja tudi Gorički (2006) v svoji raziskavi. Sorazmerno velik vzorec črnih močerilov je sicer omogočil statistično analizo podatkov, vendar bi v prihodnje priporočali opraviti statistično analizo na še večjem vzorcu črnih živali, kar bi omogočilo še jasnejši vpogled v odvisnosti med posameznimi skeletnimi elementi. Tako bi lahko podrobneje raziskali tudi vpliv alometrične rasti posameznih skeletnih delov, predvsem lobanje. Z večjim vzorcem črnih močerilov bi lahko zajeli večji velikostni oziroma starostni razpon živali, kar bi omogočilo jasnejši vpogled v proces rasti posameznih skeletnih delov ter značilnosti alometrične rasti skozi celoten ontogenetski razvoj živali.

Za izbrani vzorec črnih in belih močerilov nas je zanimalo, kolikšen delež telesne dolžine predstavljajo kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice, če jih primerjamo z izmerjeno telesno dolžino živali. Pričakovali smo, da bomo z izračunanimi sorazmernostnimi količniki potrdili že znane ugotovitve o skeletu črnega močerila. Naši rezultati so pokazali, da v vzorcu črnih močerilov kondilo-bazalna dolžina ter dolžina nadlahtnice in stegenice predstavljajo manjše deleže, kot če jih primerjamo z enakimi deleži za vzorec belih močerilov. S tem smo potrdili ugotovitve, ki jih za dolžino glave ter sprednjih in zadnjih okončin za črnega močerila navajata že Sket in Arntzen (1994).

S pomočjo izdelanih tridimenzionalnih računalniških modelov smo določili natančno število trupnih vretenc do sakralnega vretenca. Dobljene rezultate smo primerjali z že obstoječimi podatki o številu trupnih vretenc pri pigmentirani podvrsti močerila. Povprečno število vretenc v trupni regiji je sovpadalo z že znanimi podatki o številu trupnih vretenc, ki jih za pigmentirano podvrsto v svojem delu navajata Sket in Arntzen (1994). Opazili smo trend povečevanja števila trupnih vretenc z naraščajočo telesno dolžino živali, a ker so nekatere živali odstopale od tega trenda in ker je vzorec živali relativno majhen, bi opaženo želeli preveriti na večjem številu živali, preden postavimo dokončno trditev.

S pomočjo posnetkov, pridobljenih s tehniko računalniške tomografije, smo izmerili prostornino kalcija v kostnem tkivu močerilov. Poleg same prostornine kalcija v kostnem tkivu živali nas je zanimalo, ali se pigmentirana in nepigmentirana podvrsta močerila bistveno razlikujeta v izmerjenih vrednostih. Pričakovali smo, da bodo rezultati analize prostornine kalcija pokazali razlike v izmerjenih vrednostih med belo in črno podvrsto. Na podlagi pričujočega vzorca belih in črnih močerilov razlike v prostorninah kalcija nismo ugotovili. Zaradi relativno majhnega vzorca, uporabljenega pri našem preizkusu, obstaja možnost, da bi analiza na večjem številu osebkov pokazala drugačne rezultate, zato menimo, da bi bilo vnovično testiranje razlike v prostornini kalcija med črno in belo podvrsto vsekakor priporočljivo opraviti še na večjem vzorcu živali.

Sama metoda računalniške tomografije se je izkazala za učinkovito iz več razlogov. Poleg tega da nam je omogočila tridimenzionalno računalniško rekonstrukcijo in analizo skeletnih delov, je bila relativno enostavna in hitra ter neinvazivna, saj ni predstavljala večjega problema tudi za slikanje živih močerilov. Ob pazljivem delu z živimi živalmi in ustrezno nizki jakosti sevanja slikanje ne predstavlja večjega stresa za žive živali in v kratkem času lahko na ta način poslikamo veliko število osebkov. Računalniška tomografija je omogočila tudi izdelavo dobrih tridimenzionalnih računalniških modelov okostij že fiksiranega materiala. Ugotovili smo, da starost fiksiranega materiala ni vplivala na kakovost izdelave končnih tridimenzionalnih modelov.

### **5.1.3 Magnetna resonanca**

Magnetna resonanca se za preučevanje podrobnejše zgradbe tako majhnih struktur, kot so skeletni elementi močerila, v našem primeru ni izkazala za učinkovito. Metoda je sicer uporabna za raziskovanje telesne zgradbe živih organizmov, vendar v našem primeru ni prišla v poštev, saj je bila ločljivost na nastalih posnetkih prenizka. Posamezne slike so sicer prikazovale celosten izgled okostij, vendar je bila ločljivost na slikah prenizka, da bi na njih lahko prepoznali posamezne elemente skeleta. Tridimenzionalnih modelov okostij iz nastalih slik ni bilo mogoče izdelati. Metoda je lahko uporabna za grobo površinsko



analizo in preučevanje posameznih večjih skeletnih struktur, ne pa za natančno preučevanje elementov skeleta. Problem je predstavljalo tudi izredno dolgo snemanje, ki je v našem primeru trajalo dva dni. Menimo, da bi tako dolgo snemanje pod vplivom uspaval in v umetnem okolju negativno vplivalo na žive živali. Eden od dejavnikov je bila tudi zmogljivost samega aparata za magnetno resonanco. Magnet na Institutu Jožefa Štefana ima magnetno polje zmogljivosti 3 T in je že precej star. Takšno magnetno polje se danes smatra za majhno. Predvidevamo, da bi s sodobnejšo napravo z zmogljivejšim magnetnim poljem lahko pridobili boljše posnetke, ki bi lahko omogočili izdelavo tridimenzionalnih računalniških modelov okostij močerilov.

## 5.2 SKLEPI

1. S tridimenzionalnimi modeli in številčno večjim vzorcem živali pigmentirane podvrste močerila smo potrdili dosedanje ugotovitve o zgradbi skeleta.
2. Presvetlitvene tehnike se niso izkazale kot povsem uspešne, saj je tkivo preparatov razpadlo in tako ni omogočilo celostnega pogleda na okostje. Ohranili so se dobro obarvani posamezni elementi skeleta, katerih slikovni material je uporaben tudi za didaktične namene.
3. Metoda tridimenzionalne rekonstrukcije skeleta s pomočjo računalniške tomografije se je izkazala za uspešno in je omogočila celostni tridimenzionalni pogled na posamezne regije skeleta pri črnem močerilu. Tako so bili modeli, primerni za vrednotenje koščenih elementov, večjih od minimalne ločljivosti naprave.
4. Statistični izračuni so potrdili hipotezo o pozitivni linearni odvisnosti med posameznimi elementi skeleta in telesno dolžino živali.
5. Prostornina kalcija v kostnem tkivu belih močerilov ni bila statistično značilno različna od prostornine kalcija v kostnem tkivu črnih močerilov.
6. Metoda magnetne resonance ni bila uspešna. Zaradi prenizke ločljivosti na slikah posameznih elementov skeleta nismo uspeli prepoznati in tridimenzionalnega računalniškega modela skeleta črnega močerila tako nismo uspeli izdelati.

## 6 POVZETEK

Pri morfometrični analizi skeleta črnega močerila smo se odločili za uporabo klasičnih in sodobnih tehnik, ki omogočajo raziskave na skeletnem sistemu živali. Z njihovo primerjavo smo želeli ugotoviti, ali so primerne za opravljanje raziskav na skeletu črnega močerila ter kako uporabne in korektne rezultate nam lahko zagotovijo. Tako smo za potrebe diplomskega dela preizkusili tri različne metodološke pristope: klasično metodo presvetljevanja tkiv s souporabo specifičnih barvil ter sodobni metodi magnetno resonanco in računalniško tomografijo. Za uporabo sodobnih metod magnetne resonance in računalniške tomografije smo se odločili predvsem zato, ker gre za neinvazivni metodi, pri katerih živali za preiskavo ni potrebno žrtvovati. To je še posebej uporabno pri morfometričnih raziskavah na okostju strogo zavarovane vrste, kot je črni močeril, katerega velikosti populacije še ne poznamo in je število osebkov, namenjenih raziskavam, ustrezno majhno. Za uporabo presvetlitvenih tehnik smo se odločili predvsem z namenom, da bi dobili jasnejši vpogled v skeletne elemente lobanje, oplečja in okolčja ter število in obliko repnih vretenc pri črnem močerilu. V ta namen smo poskušali presvetliti dva črna osebka. Žal sta oba skeleta med postopkom presvetljevanja razpadla. Kljub razpadlemu materialu smo koščene elemente skeleta obarvali z barvilom alizarin red-S ter jih tako napravili bolj kontrastne in prepoznavne. Strukture smo pregledali pod stereolupo ter fotodokumentirali obarvani skeletni material. Iz presvetljenih preparatov smo lahko ovrednotili število repnih vretenc, vendar zaradi majhnega vzorca rezultati niso bili zadostni za primerjavo z že obstoječimi podatki. Pričujoči slikovni material pa je dobrodošlo gradivo, ki bi bilo v prihodnje lahko uporaben učni pripomoček. Od metode računalniške tomografije smo pričakovali rezultate, ki bi omogočili podrobnejši tridimenzionalni vpogled v obliko lobanjskih kosti, obliko koščenih elementov oplečja in okolčja ter obliko in število vretenc v posameznih regijah, s poudarkom na vretencih repne regije. Končni tridimenzionalni modeli so omogočili zelo dober celostni pogled na posamezne regije skeleta pri črnem močerilu. Tako so bili modeli, primerni za vrednotenje koščenih elementov, večjih od minimalne ločljivosti naprave. Izmerili in ovrednotili smo lahko večje lobanjske kosti, glavne elemente visceralnega skeleta, propodialna elementa humerus in femur ter vsa vretenca, razen najmanjših repnih vretenc. Dobljene meritve smo

statistično ovrednotili. Izračunani korelacijski koeficienti potrjujejo našo hipotezo, da so izmerjeni elementi skeleta (kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice) v pozitivni linearni odvisnosti glede na telesno dolžino živali. Za izbrani vzorec črnih in belih močerilov nas je zanimalo, kolikšen delež telesne dolžine predstavljajo kondilo-bazalna dolžina, dolžina nadlahtnice in dolžina stegenice, če jih primerjamo z izmerjeno telesno dolžino živali. Izračunani sorazmernostni količniki so pokazali, da v vzorcu črnih močerilov kondilo-bazalna dolžina ter dolžina nadlahtnice in stegenice predstavljajo manjše deleže, kot če jih primerjamo z izračunanimi deleži za vzorec belih močerilov. S tem smo potrdili ugotovitve, ki jih navajata že Sket in Arntzen (1994). S pomočjo izdelanih tridimenzionalnih modelov okostij črnih močerilov in izbrane programske opreme smo določili natančno število trupnih vretenc do sakralne regije. Povprečno število vretenc v trupni regiji je skladno s podatki o številu trupnih vretenc, ki jih za pigmentirano podvrsto navajata Sket in Arntzen (1994). S pomočjo CT-posnetkov smo izmerili prostornino kalcija v kostnem tkivu šestnajstih močerilov (trinajst živali pigmentirane in tri živali nepigmentirane podvrste močerila). Na podlagi pričujočega vzorca belih in črnih močerilov razlike v prostorninah kalcija med pigmentirano in nepigmentirano podvrsto močerila nismo ugotovili. Magnetna resonanca se ni izkazala za tako uspešno metodo, kot smo sprva pričakovali. Posamezne slike sicer prikažejo celosten izgled okostja, vendar je ločljivost na slikah prenizka, da bi lahko prepoznali posamezne elemente skeleta. Tridimenzionalnega modela okostja iz nastalih slik ni bilo mogoče izdelati.

## 7 VIRI

- Abe S., Watanabe H., Hirayama A., Shibuya E., Hashimoto M., Ide Y. 2000. Morphological study of the femur in osteopetrotic (op/op) mice using microcomputed tomography. *The British Journal of Radiology*, 73: 1078–1082
- Bizjak-Mali L., Bulog B. 2004. Histology and ultrastructure of the gut epithelium of the neotenic cave salamander *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). *Journal of morphology*, 259: 82–89.
- Bizjak-Mali L., Bulog B. 2010. Ultrastructure of previtellogene oocytes in the neotenic cave salamander *Proteus anguinus anguinus* (Amphibia, Urodela, Proteidae). *Protoplasma*, 246: 33–39.
- Brown M. A., Semelka R. C. 2003. MRI basic principles and applications. Tretja izdaja. Hoboken, New Jersey John Wiley & Sons, Inc.: 268 str.
- Bulog B. 1994. Dve desetletji funkcionalno-morfoloških raziskav pri močerilu (*Proteus anguinus*, Amphibia, Caudata). *Acta Carsologica*, XXIII/19.
- Bulog B., Schlegel P. 2000. Functional morphology of the inner ear and underwater audiograms of *Proteus anguinus* (Amphibia, Urodela). *Pflügers Arch*, 439, 3: 165–167
- Bulog B., Mihajl K., Jeran Z., Toman M. J. 2002a. Trace element concentrations in the tissues of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata) and the surrounding environment. *Water air and soil pollut*, 136: 147–163
- Bulog B., Bizjak-Mali L., Kos M., Mihajl K., Prelovšek P. M., Aljančič G. 2002b. Biologija in funkcionalna morfologija človeške ribice (*Proteus anguinus*). *Acta Biologica Slovenica*, 43, 3: 85–102

- Bulog B., Sket B. 2004. Človeška ribica in črni parkelj iz Bele krajine. Ljubljana: BF, Oddelek za biologijo. *Javna predstavitev močerila v Jelševniku pri Črnomlju*
- Bulog B. 2007. Okoljske in funkcionalno-morfološke raziskave močerila (*Proteus anguinus*). *Proteus*, 70, 3: 102–109
- Buzug T. M. 2008. Computed Tomography. From Photon Statistics to Modern Cone – Bean CT. Berlin, Springer Verlag: 512 str.
- Cavey M. J., Stock D. A., Wong G. K. 1993. Computer-assisted reconstruction of vertebrate embryos from serial histological sections. *Transactions of the American microscopical society*, 112: 93–106
- Demšar F., Jevtič V., Bačić G. G. 1996. Slikanje z magnetno resonanco. Ljubljana, *Litterapicta*: 150 str.
- Dolivo-Dobrovolsky V. 1926. Lobanja človeške ribice (*Proteus anguinus Laurenti*). *Rad JAZU*, 232: 190–210, pls. 1–7
- Dogdas B., Stout D., Chatziioannou A. F., Leahy R. M. 2007. Digimouse: a 3D whole body mouse atlas from CT and cryosection data. *Physics in Medicine and Biology*, 52: 577–587
- Duellman W. E., Trueb L. 1986. *Biology of Amphibians*. Baltimore, JHU Press: 670 str.
- Dwight Davis D., Gore U. R. 1936. Clearing and staining skeletons of small vertebrates. *Technique Series no. 4*, Chicago, Chicago Field Museum Press: 16 str.
- Gorički Š. 2006. Filogeografska in morfološka analiza populacij močerila (*Proteus anguinus*). II Dokt. disertacija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za biologijo

- Green M. C. 1952. A rapid method for clearing and staining specimens for the demonstration of bone. *The Ohio Journal of Science*, 52, 1: 31–33
- Hanken J., Wassersug R. J. 1981. The visible skeleton. *Functional Photography*, 44, 16: 22–26
- Herre W. 1935. Die Schwanzlurche der mitteleocänen (oberlutetischen) Braunkohlen des Geiseltales und die Phylogenie der Urodelen unter Einschluss der fossilen Formen. *Zoologica*, 33, 87: 1–85
- Hofer M. 2007. CT Teachnig Manual. A Systematic Approach to CT Reading. 3<sup>rd</sup> ed. Stuttgart, Georg Thieme Verlag: 220 str.
- Istenič L., Bulog B. 1984. Some evidence for the ampullary organs in the European cave salamander *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). *Cell Tissue Res*, 235: 393–402
- Istenič L. 1987. O najdbi črne človeške ribice. *Proteus*, 49, 7: 243–244
- Kalender W. A. 2006. X-ray computed tomography. *Phys. Med. Biol.*, 51: 29–43
- Liem K. F., Bemis W. E., Walker W. F., Grande L. 2001. Functional Anatomy of the Vertebrates: An Evolutionary Perspective. 3<sup>rd</sup> ed. Harcourt College Publishers: 703 str.
- Ohlerth S., Scharf G. 2007. Computed tomography in small animals – basic principles and state of the art applications. *Vet J.*, 2, 173: 237–238
- Pezdirč M., Heath E., Bizjak-Mali L., Bulog B. 2011. PCB distribution in tissues of cave salamander (*Proteus anguinus anguinus*, Amphibia, Urodela) in polluted karstic hinterland of Krupa river, Slovenia. *Chemosphere* (v tisku).

Pravilnik o uvrstitvi ogroženih rastlinskih in živalskih vrst v rdeči seznam. 2010. Ur. l. RS št. 42/2010.

Presnell J. K., Schreibman M. P. 1997. Humason's Animal tissue techniques. 5<sup>th</sup> ed. Baltimore, Johns Hopkins University Press: 572 str.

Russ J. C. 1999. The image processing handbook. 3<sup>rd</sup> ed. Heidelberg, Springer-Verlag GmbH & Co. KG.: 687 str.

Sclegel P. A., Steinfartz S., Bulog B. 2009. Non-visual sensory physiology and magnetic orientation in the blind cave salamander, *Proteus anguinus* (and some other cave-dwelling urodele species). Review and new results on light-sensitivity and non-visual orientation in subterranean urodeles (Amphibia). *Animal biology*, 59: 351–384.

Schultze O. 1897. Über Herstellung und Conservirung durchsichtiger Embryonen zum Stadium der Skelettbildung. *Anat. Anz.*, 13

Sket B. in Velkovrh F. 1981. Postojnsko–planinski jamski sistem kot model za preučevanje onesnaženja podzemeljskih voda. *Naše jame*, 22: 27–44

Sket B. 1993. Nova rasa človeške ribice. Kako se »naredi« novo podvrsto ali članek o članku. *Proteus*, 56: 3–11

Sket B. in Arntzen J. W. 1994. A black, non-troglophic amphibian from the karst of Slovenia. *Bijdragen tot de Dierkunde*, 64, 1: 33–35

Sket B. 1997. Distribution of *Proteus* (Amphibia: Urodela: *Proteidae*) and its possible explanation. *Journal of Biogeography*, 24, 3: 263–280

Sket B. in Arntzen J. W. 1997. Morphometric analysis of black and white European cave salamanders *Proteus anguinus*. *Journal of Zoology*, 241: 699–707



Sket B. 2007. Kaj vemo in kaj si mislimo o človeški ribici. *Proteus*, 70, 1: 14–27

Som P. M., Hugh D., Curtin D. 1996. Head and neck imaging. 3<sup>rd</sup> ed. St. Louis, C. V. Mosby Co.: 896 str.

Wischnitzer S. 1993. Atlas and dissection guide for comparative anatomy. 5<sup>th</sup> ed. New York, W. H. Freeman and Co.: 284 str.

## ZAHVALA

Vesela sem, da sem imela priložnost sodelovanja in izdelave diplomske naloge pod mentorstvom prof. dr. Borisa Buloga. Hvala za strokovno pomoč ter vedno odprta vrata za nasvet, spodbudo in prijazno besedo.

Zahvala gre tudi Katji Zdešar-Kotnik, ki me je uvedla v delo v laboratoriju in je bila vedno pripravljena odgovarjati na moja vprašanja.

Zahvaljujem se asistentu Dejanu Hribarju s Kliničnega oddelka za nevrologijo Univerzitetno kliničnega centra v Ljubljani za sodelovanje in strokovno podporo pri vrednotenju rezultatov.

Hvala tudi Lilijani Bizjak-Mali iz Skupine za funkcionalno morfologijo vretenčarjev za posredovano literaturo in pomoč z nasveti.

Najlepša hvala tudi dr. Borutu Jugu z Univerzitetno kliničnega centra v Ljubljani za sodelovanje in pomoč pri vrednotenju rezultatov.

Zahvala gre tudi članoma komisije doc. dr. Petri Golja in doc. dr. Cenetu Fišerju.

Hvala tudi Mateji Kosi, za pomoč pri lektoriranju.

Rada bi se zahvalila tudi družini in prijateljem za podporo ter veliko mero potrpežljivosti v času izdelave diplomskega dela. Na tem mestu bi se še posebej rada zahvalila staršema ter Violeti in fantu Tilnu.

## PRILOGE

### Priloga A

#### Protokol priprave nepigmentirane podvrste močerila P95

Pri končni pripravi osebka nepigmentirane podvrste močerila P95 smo izbrali kombinacijo metod Davids in Gore (1936) ter Hanken in Wasserung (1981). Presvetljevanje preparata je potekalo po metodi Davids in Gore, priprava barvila in postopek barvanja kosti pa po metodi Hanken in Wasserung. Osebek P95 je bil fiksiran v formalinu.

1. Spiranje pod tekočo vodo, 24 ur
2. Namakanje v 70% EtOH, 24 ur
3. Priprava barvila in barvanje, 24 ur

Barvilo: 100 ml 2% KOH + 1 ml raztopine alizarin red-S

Raztopina alizarin red-S: 5 ml CH<sub>3</sub>COOH + 10 ml gly + 60 ml dH<sub>2</sub>O

Po navodilih metode naj bi po 24-urnem namakanju preparata v raztopini barvila opazili intenzivno rdeče obarvanje kostnega materiala. Ker po predpisanem času nismo dosegli omenjenih rezultatov, smo čas barvanja podvojili. V tem času so se kosti preparata obarvale intenzivno rdeče.

4. Namakanje v 2 %KOH, 24 ur

Tudi tokrat v predpisanem času nismo dosegli zelenih rezultatov, zato smo trajanje koraka podaljšali na 48 ur.

5. Bistrenje preparata:

I. 20 ml gly + 28 ml 2% KOH + 52 ml dH<sub>2</sub>O, 4 dni

II. 50 ml gly + 3 ml 2% KOH + 47 ml dH<sub>2</sub>O, 3 tedne

II. 75 ml gly + 0 ml 2% KOH + 25 ml dH<sub>2</sub>O, 3 tedne

Ker po prvem tretmaju nismo dosegli zelenih rezultatov, smo bistrenje preparata ponovili še enkrat. Sočasno smo preparat izpostavljali sončni svetlobi, saj naj bi ta pospešila sam proces bistrenja.

6. Shranjevanje v 100% glicerolu z dodanim kristalom timola

## Priloga B

### Protokol priprave pigmentirane podvrste močerila J1 in J'93

Za pripravo osebkov pigmentirane podvrste močerila J1 in J'93 smo uporabili kombinacijo metod po Hanken in Wasserung (1981) ter Humason (1967), pri čemer je presvetljevanje preparatov potekalo po metodi Humason, priprava barvila in barvanje kosti pa po principu metode Hanken in Wasserung (1981). Osebkca J1 in J'93 sta bila fiksirana v 70% etanolu.

1. Namakanje v 2% KOH, 24 ur

Kljub doslednemu upoštevanju navodil in priporočil postopka nismo dobili zelenih rezultatov, saj so se mehka tkiva med procesom bistrenja ločila od skeletnih elementov. Odpadlo tkivo smo zavrgli in nadaljevali z barvanjem okostja, saj smo lahko ohranili in obdržali vse skeletne elemente in jih z barvanjem naredili še bolj kontrastne in prepoznavne.

2. Priprava barvila in barvanje, 24ur

Barvilo: 0,5% KOH + raztopina alizarin red-S

Raztopina alizarin red-S: 0,1% alizarin red-S v dH<sub>2</sub>O

3. Bistrenje preparata: korak smo izpustili
4. Shranjevanje v 100% glicerolu z dodanim kristalom timola

## **Priloga C**

Izmerjene vrednosti izbranih skeletnih elementov za vzorec črnih močerilov (n = 12).

Td – telesna dolžina živali, KBD – kondilo-bazalna dolžina, Hum – nadlahtnica,

Fem – stegnenica, Man – mandibularni lok, Sq – squamosum, Chy – ceratohyale,

Cbr I – ceratobranchiale I, Epb – epibranchiale I.

Oznaka	Td [mm]	KBD [mm]	Hum [mm]	Fem [mm]	Man [mm]	Sq [mm]	Chy [mm]	Cbr I [mm]	Epb I [mm]
J1	227,3	16,8	5,92	5,76	10,50	10,54	7,58	3,47	7,73
J3	238,3	17,3	5,95	5,00	11,20	6,86	6,59	3,40	7,57
J6	160,4	11,3	3,71	3,15	7,10	4,73	4,34	1,74	4,35
J7	199,4	13,9	5,02	4,55	8,61	8,67	5,80	2,71	5,68
J8	275,1	19,1	5,91	6,03	12,05	8,24	8,26	3,51	8,79
J15	213,2	16,3	5,46	5,10	10,40	7,71	6,98	2,92	7,20
J16	246,2	17,5	5,92	6,47	11,60	11,44	8,19	3,85	8,49
D1	178,5	13,1	4,29	4,44	7,46	5,19	4,42	2,01	4,77
Č16	225,5	13,8	3,79	3,91	8,43	7,01	5,39	2,30	5,46
Č17	216,2	13,3	3,86	4,71	7,89	6,41	5,41	2,55	5,99
Č18	194,4	12,8	3,34	3,40	8,68	5,40	4,68	1,90	6,75
Č19	208,4	13,7	4,92	4,14	8,69	6,01	5,23	1,90	5,64