

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka ROZMAN

**MIKROSKOPSKA ANATOMIJA KALCIJEVIH  
TELESC PRI RAKU ENAKONOŽCU *HYLONISCUS*  
*RIPARIUS***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Alenka ROZMAN

**MIKROSKOPSKA ANATOMIJA KALCIJEVIH TELESČ PRI RAKU  
ENAKONOŽCU *HYLONISCUS RIPARIUS***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**MICROSCOPIC ANATOMY OF CALCIUM BODIES IN ISOPOD  
CRUSTACEAN *HYLONISCUS RIPARIUS***

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2012

Diplomski delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Katedri za zoologijo Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za biologijo je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. Dr. Jasno Štrus.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: doc. dr. Primož ZIDAR  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
Recenzent: prof. dr. Boris BULOG  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
Mentorica: prof. dr. Jasna ŠTRUS  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora:

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu 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.

Alenka Rozman

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn  
 DK UDK 595.36(043.2)=163.6  
 KG kalcijeva telesca/kopenski raki enakonožci/skladiščenje kalcija/bakterije/  
 AV ROZMAN, Alenka  
 SA ŠTRUS, Jasna (mentorica)  
 KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
 ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
 LI 2012  
 IN MIKROSKOPSKA ANATOMIJA KALCIJEVIH TELESC PRI RAKU ENAKONOŽCU *HYLONISCUS RIPARIUS*  
 TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)  
 OP X, 62 str., 3 pregl., 59 sl., 22 vir.  
 IJ sl  
 JI sl/en  
 AI Mineralizirane strukture v živih organizmih nastajajo z biomineralizacijo organskega matriksa. Raki so zanimivi za študij biomineralizacij, ker imajo mineralizirano kutikulo. Kalcijeva telesca so strukture v telesni votlini kopenskih enakonožcev iz skupine Synocheta v katerih se kopiči kalcij. Podatki o kalcijevih telescih rakov enakonožcev so redki in si med seboj nasprotujejo, zato smo si kot glavni cilj zastavili natančen opis njihovega števila, namestitve in morfologije pri vrsti *Hyloniscus riparius*. Prostorsko zgradbo kalcijevih telesc smo opisali z računalniško tridimenzionalno rekonstrukcijo histoloških rezin. Za identifikacijo sestavin matriksa kalcijevih teles smo uporabili histokemijske tehnike in tehnike za pripravo vzorcev za presewno elektronsko mikroskopijo. Vrsta *Hyloniscus riparius* ima dva para med seboj ločenih kalcijevih telesc, ki ležijo ob prebavilu. Vsako telesce je epitelijska cevka s pecljatim lateralnim izrastkom. Anteriorni par kalcijevih telesc leži med 4. in 6. členom pereona in vsebuje topen kalcij in elektronsko goste delce nanometrskih dimenzij. Ultrastrukturne značilnosti epitelijske kažejo na visoko stopnjo presnovne aktivnosti in proteinske sinteze in sekrecije. Posteriorni par telesc leži med 6. členom pereona in 1. členom pleona. Vsebuje matriks, v katerem so kisli ogljikovi hidrati, kristalin kalcij in bakterije. Ultrastrukturne značilnosti epitelijske kažejo visoko stopnjo presnovne aktivnosti in intenziven transmembranski transport.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn  
DC UDC 595.36(043.2)=163.6  
CX calcium bodies/terrestrial isopods/calcium storage/bacteria  
AU ROZMAN, Alenka  
AA ŠTRUS, Jasna (supervisor)  
PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111  
PB Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo  
PY 2012  
TI MICROSCOPIC ANATOMY OF CALCIUM BODIES IN ISOPOD CRUSTACEAN *HYLONISCUS RIPARIUS*  
DT Graduation Thesis (University studies)  
NO X, 62 p., 3 tab., 59 fig., 22 ref.  
LA sl  
AL sl/en  
AB Biomineralizations are mineralized structures in living organisms and processes of their formation in organic matrix. Crustaceans are interesting for studies of biomineralizations because of their mineralized cuticle. Calcium containing structures, called calcium bodies were found in haemolymph space of terrestrial isopods from the Synocheta group. Published data about these structures is contradictory. We thus aimed to describe the number, position and morphology of calcium bodies in the isopod species *Hyloniscus riparius*. We described the spatial structure of calcium bodies by computerized threedimensional reconstruction of histological sections. We used histochemical techniques and techniques of sample preparation for transmission electron microscopy. *Hyloniscus riparius* has two pairs of calcium bodies positioned along the gut. Each calcium body is an epithelial tube with lateral outgrowth. The anterior calcium body pair is positioned between the 4th and 6th pereonite and contains soluble calcium as well as electron dense nanoparticles. The ultrastructure of epithelial cells demonstrates a high metabolic and protein synthesis rate and secretory activity in anterior calcium bodies. The posterior pair of calcium bodies is positioned between the 6th pereonite and the 1st pleonite, and contains a matrix with acid polysaccharides, crystalline calcium and bacteria. Epithelial ultrastructure shows a high metabolic rate and an intense transmembrane transport.

## KAZALO VSEBINE

<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>IX</b>
<b>SLOVARČEK.....</b>	<b>X</b>
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 RAKI.....	3
2.1.1 Raznolikost rakov .....	3
2.1.2 Značilnosti rakov enakonožcev (Isopoda) .....	4
2.1.3 Kopenski raki enakonožci (Oniscidea) .....	6
2.2 BIOMINERALIZACIJA IN BIOMINERALIZIRANE STRUKTURE .....	7
2.2.1 Izvor, razširjenost in pomen biomineralizacije v živem svetu.....	7
2.2.2 Biomineralizacije pri višjih rakih (Malacostraca).....	8
<b>3. MATERIAL IN METODE .....</b>	<b>15</b>
3.1. HISTOLOŠKE REZINE.....	15
3.1.1 Priprava vzorcev in rezanje.....	15
3.1.2. Barvanje in priprava trajnih preparatov .....	16
3.1.3. Pregled in fotografiranje rezin .....	17
3.1.4. Računalniška izdelava trodimenzionalnih rekonstrukcij .....	17
3.2. POLTANKE IN ULTRATANKE REZINE .....	17
3.3 PRIPRAVA BARVIL.....	19
<b>4. REZULTATI.....</b>	<b>21</b>
4.1. ŠTEVILO, NAMESTITEV IN MORFOLOGIJA KALCIJEVIH TELESC .....	21
4.2 HISTOKEMIJA IN ULTRASTRUKTURA KALCIJEVIH TELESC .....	27
4.2.1 Anteriorna kalcijeva telesca .....	27
4.2.2 Posteriorna kalcijeva telesca .....	33

4.3 KALCIJEVA TELESCA V FAZI MEDLEVITVE .....	47
<b>5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....</b>	<b>51</b>
5.1 RAZPRAVA .....	51
<b>5.1.1 Število, namestitev in morfologija kalcijevih telesc.....</b>	<b>51</b>
<b>5.1.2 značilnosti matriksa kalcijevih telesc.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1.3 Ultrastruktura epitelov kalcijevih telesc .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1.4 vloga kalcijevih telesc med levitvijo .....</b>	<b>55</b>
5.2 SKLEPI.....	56
<b>6 POVZETEK.....</b>	<b>57</b>
<b>7 VIRI .....</b>	<b>59</b>
<b>ZAHVALA .....</b>	<b>.....</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Poenostavljena shema sistematike rakov; črtkane črtice kažejo, da v višji takson uvrščamo tudi druge skupine. (povzeto po Martin in Davis, 2001). .....	3
Slika 2: Morfologija enakonožnih rakov (Isopoda) (Fox, online).....	4
Slika 3: Anatomija črevesa enakonožnih rakov (Isopoda) (povzeto po Lešer in sod., 2008) .....	5
Slika 4: Osebek vrste <i>Protracheoniscus politus</i> , ki je ravno levil sprednji del telesa in se prehranjuje s svojim levom (Hornung, 2011).....	5
Slika 5: Filogenetski odnosi med skupinami kopenskih enakonožcev (Oniscidea) (povzeto po Schmidt, 2008). .....	6
Slika 6: Naravno izpostavljeni primerki <i>Cloudina carinata</i> n. sp. v apnencu (Cortijo in sod., 2010). .....	7
Slika 7: Gastroliti pri rodu <i>Gecarcinus</i> (Luquet in Frédéric, 2004). .....	8
Slika 8: Posteriorni ceki pri vrsti <i>Orchestia cavimana</i> (Amphipoda) (Luquet in Frédéric, 2004).....	9
Slika 9: Depoziti na ventralni strani pleomer pri vrsti <i>Tylos europaeus</i> (Ziegler, 2003). .....	10
Slika 10: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Mesoniscus graniger</i> (Méhely, 1932).....	10
Slika 11: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Hyloniscus riparius</i> (Méhely, 1932).....	11
Slika 12: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Androniscus dentiger</i> (Méhely, 1932).....	11
Slika 13: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Trichoniscus noricus</i> (Méhely, 1932).....	12
Slika 14: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Tachysoniscus austriacus</i> (Méhely, 1932).....	12
Slika 15: Sternalni depoziti in kalcijeva telesca pri vrsti <i>Androniscus roseus</i> (Ziegler, 2003).....	13
Slika 16: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Trichoniscus pusillus</i> (Ziegler, 2003).....	13
Slika 17: Kalcijeva telesca pri vrsti <i>Hyloniscus riparius</i> (Ziegler, 2003). .....	14
Slika 18: Kalcijeva telesca.....	21
Slika 19: Splošen prikaz lege kalcijevih telesc.....	22
Slika 20: Lega kalcijevih telesca v šestem členu pereona. ....	23
Slika 20: Anteriorno in posteriorno kalcijevo telesce. ....	23
Slika 21: Cevke kalcijevih telesc se tesno prilegajo prebavilu, izrastki pa štrlijo v področje mišic. ....	24
Slika 22: Anteriorno in posteriorno kalcijevo telesce sta stisnjena med cevke hepatopankreasa in črevo.....	25
Slika 23: Predel prebavila, kjer ležita anteriorno in posteriorno kalcijavo telesce.....	25
Slika 24: Lega anteriornega para kalcijevih telesc na histološki rezini.....	26
Slika 25: Lega posteriornega para kalcijevih telesc na histološki rezini. ....	26
Slika 26: Povezava anteriornega kalcijevega telesca z izrastkom. ....	27
Slika 27: Matriks anteriornega kalcijevega telesca .....	28
Slika 28: Anteriorno kalcijevo telesce.....	28
Slika 29: Vzdolžni prerez anteriornega kalcijevega telesca. Poltanka rezina. ....	29
Slika 30: Vzdolžni prerez anteriornega kalcijevega telesca. ....	30



Slika 31: Bazalni del epitela anteriornega kalcijevega telesca. ....	31
Slika 32: Apikalni del epitela anteriornega kalcijevega telesca. ....	31
Slika 33: Septni stik med epitelnimi celicami anteriornega kalcijevega telesca. ....	32
Slika 34: Matriks anteriornega kalcijevega telesca. ....	32
Slika 35: Povezava med glavno cevko posteriornega kalcijevega telesca in izrastkom. ....	33
Slika 36: Matriks posteriornega kalcijevega telesca. ....	33
Slika 37: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	34
Slika 38: Matriks v posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	34
Slika 39: Matriks posteriornega kalcijevega telesca. ....	35
Slika 40: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	36
Slika 41: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	36
Slika 42: Matriks v skrajno posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	37
Slika 43: Matriks v skrajno posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca. ....	37
Slika 44: Poltanka rezina posteriornega kalcijevega telesca. ....	38
Slika 45: Epitel in del matriksa posteriornega kalcijevega telesca. ....	39
Slika 46: Epitel in del matriksa posteriornega kalcijevega telesca. ....	40
Slika 47: Bazalna lamina in bazalni labirint epitelne celice. ....	41
Slika 48: Apikalni del epitelne celice. ....	42
Slika 49: Citoplazma epitelne celice. ....	43
Slika 50: Kristalno področje matriksa posteriornega kalcijevega telesca. ....	44
Slika 51: Področje paličastih struktur v matriksu posteriornega kalcijevega telesca. ....	44
Slika 52: Matriks posteriornega kalcijevega telesca. ....	45
Slika 53: Stik epitelov posteriornega kalcijevega telesca in črevesa. ....	46
Slika 54: Kalcijeva telesca pri osebku v medleivitveni fazi. ....	47
Slika 55: Kalcijeva telesca pri osebku, ki se ne levi. ....	48
Slika 56: Anteriorna kalcijeva telesca pri osebku v medleivitveni fazi. ....	49
Slika 57: Matriks anteriornih kalcijevih telesc pri osebku v medleivitveni fazi. ....	49
Slika 58: Posteriorna kalcijeva telesca pri osebku v medleivitveni fazi. ....	50
Slika 59: Matriks posteriornih kalcijevih telesc pri osebku v medleivitveni fazi. ....	50

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Številčnost skupin kopenskih enakonožcev (Oniscidea) in tipični habitati, v katerih živijo njihovi predstavniki.....	7
Preglednica 2: Priprava vzorcev za histološke rezine.....	16
Preglednica 3: Priprava vzorcev za izdelavo poltankih in ultratankih rezin.....	18

## SLOVARČEK

Biom mineralizacija	proces nastajanja mineraliziranih struktur v organskem matriksu.
Pereon	del telesa med glavo in zadkom pri rakah. Pri enakonožcih je sestavljen iz sedmih členov.
Pleon	del zadka pri rakah. Pri enakonožcih je sestavljen iz petih členov.
Medlevitvena faza	časovno obdobje med levitvijo posteriornega in anteriornega dela kutikule, značilno za enakonožce.
MiliQ voda	filtrirana in deionizirana voda.

## 1 UVOD

Biom mineralizacija je proces nastajanja mineraliziranih struktur v organskem matriksu. Gre za zelo razširjen proces v živem svetu. Natančnejše poznavanje biom mineralizacije bi pripomoglo k izboljšavam na mnogih področjih človekovega delovanja, izpostavili pa bi radi področje medicine, materialov ter nanotehnologije.

Kalcij ima v človeškem telesu mnoge ključne funkcije, zato je študij njegove dinamike še kako pomemben za medicino. Vendar pa so metode dela za človeško telo mnogokrat neprimerne, zato uporabljamo druge objekte. Študij biom mineralizacij pri modelnih organizmih med drugim prispeva k poznavanju dinamike kosti, zob in drugih mineraliziranih tkiv v človeškem telesu ter razvoju implantatov (Xin in sod., 2007)

Poznavanje biom mineralizacije je pomembno tudi za vede o materialih in biomimetiko. Minerali v neživih sistemih pogosto nastajajo v zelo ostrih razmerah, kot so na primer visoke temperature in pritiski ter ekstremen pH, v organizmih pa minerali nastajajo pri normalnem pritisku in relativno nizkih temperaturah, navadno v vodnem okolju. Od mineralov, nastalih v neživih sistemih, se pogosto ločijo po velikosti, sestavi, obstojnosti, elastičnosti in drugih lastnostih, vsebujejo pa tudi organski matriks. S posnemanjem biom mineralizacije bi se postopki umetnega pridobivanja mineralov močno poenostavili in pocenili, uporaba umetno pridobljenih materialov z lastnostmi biom mineralov, kot je na primer obstojen kalcijev karbonat v amorfnih oblikah, pa bi močno razširili tehnološke možnosti (Aaddai in sod., 2003).

V nanotehnologiji je večina tradicionalnih pristopov k sintezi materialov nanometrskih velikosti energijsko zelo potratnih, zahtevajo ostre razmere, kot so visoka temperatura, visok pritisk in ekstremen pH, poleg tega pa v procesih pogosto nastajajo strupeni stranski produkti. Izkoristki so navadno majhni, zaradi težkega nadzora nad aglomeracijo pa nastalih materialov pogosto ni mogoče reproducirati. Po drugi strani biološki materiali, kot že omenjeno, nastajajo v milejših razmerah, sestavijo pa se vedno na isti način. Poleg tega so nastale strukture visoko organizirane, hkrati dinamične, kompleksne, sposobne samopopravljanja in uporabne za različne namene. S posnemanjem procesov biom mineralizacije bi se postopki pridobivanja nanomaterialov poenostavili in pocenili, nove lastnosti tako pridobljenih materialov pa bi razširile možnosti uporabe v nanotehnologiji (Sarıkaya, 1999)

Raki so kot skupina izjemno zanimivi za študij biom mineralizacije. Ob vsaki levitvi sintetizirajo mineralizirano kutikulo in različne druge strukture, ki se med seboj razlikujejo tako po morfologiji, kot tudi po mineralni sestavi, med drugim lahko vsebujejo tudi stabilne amorfne biom minerale. Kalcijev transport pri cikličnem nalaganju in resorpciji mineralov poteka v epiteljih, ki so zelo podobni nekaterim vretenčarskim epitelijem, na primer črevesnemu epiteliju, ledvičnim kanalčkom ali placenti. Regulacija procesov

povezanih z mineralizacijo, je pri rakah hormonska in sicer gre verjetno za podobne hormone, ki so odgovorni za regulacijo dinamike kalcija pri človeku (Luquet in Frédéric, 2004). Zaradi podobnosti s procesi v človeškem telesu so biominerali rakov odlični modeli za študij mineralizacije matriksov, cikličnost nalaganja in resorpcije pa pomeni napovedljivost in ponovljivost procesov.

Raki so kot skupina izjemno raznoliki, zato se mora posameznik pri svojem delu usmeriti v ožje področje. V našem laboratoriju se večinoma ukvarjamo s kopenskimi enakonožci, med drugim nas zanimajo procesi povezani z levitvijo in mineralizacijo kutikule. Pri predhodnih študijah smo naleteli na zanimive strukture v telesni votlini kopenskih enakonožcev iz skupine Synocheta, ki vsebujejo kalcijeve spojine, zato smo jih poimenovali kalcijeva telesca. Podatki v literaturi o njihovem številu in namestitvi so redki in si med seboj nasprotujejo, o njihovi mikroskopski anatomiji in vlogi pa ni objavljenih podatkov. Zato smo si kot glavni cilj te naloge zastavili natančen opis števila, namestitve in morfologije kalcijevih telesc. Kot metodo za opis smo uporabili računalniško rekonstrukcijo iz histoloških rezin, ki je zelo primerna za prikaz kompleksnih struktur. Iz rezultatov predhodne študije smo sklepali, da ima vrsta *Hyloniscus riparius* dva para med seboj ločenih kalcijevih telesc. Postavili smo tudi hipotezo, da so kalcijeva telesca povezana z drugimi tkivi, na primer s črevesom, kot je značilno za postranice. Poleg splošnega opisa kalcijevih telesc smo želeli zastaviti tudi smernice za nadaljnje raziskave. Predpostavili smo, da matriks vsebuje kalcij, ogljikove hidrate in proteine, zato smo na majhnem vzorcu živali preizkusili različne histokemijske tehnike, da bi natančneje opredelili vsebino kalcijevih telesc. Pripravili smo tudi ultratanke rezine enega vzorca, na katerih smo s pomočjo presevnega elektronskega mikroskopa opisali lastnosti epitelija, delno pa tudi vsebino kalcijevih telesc. Ker ima kalcij pomembno vlogo pri levitvi rakov smo sklepali, da v procesu sodelujejo tudi kalcijeva telesca. Da bi se prepričali, ali je v tej smeri pomembno nadaljevati raziskave, smo naredili rekonstrukcijo kalcijevih telesc pri enem osebku v fazi medlevitve.

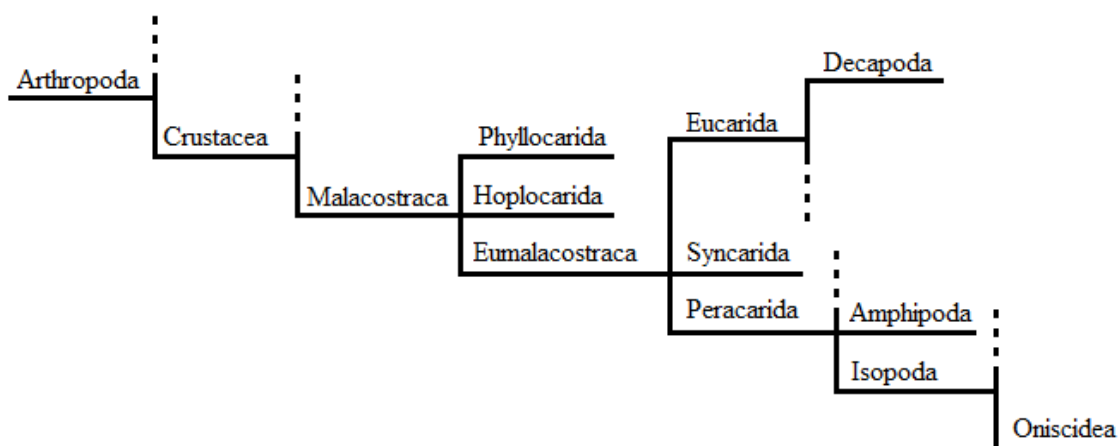
## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 RAKI

#### 2.1.1 Raznolikost rakov

Poddeblo rakov zajema okrog 52 000 opisanih vrst, kar jih po številčnosti postavlja na četrto mesto med mnogoceličnimi živalmi (Metazoa) (za žuželkami, mehkužci in pipalkarji). Kot skupina obstajajo že vsaj od zgodnjega kambrija, verjetno pa mnogo dlje. Rezultat mnogih milijonov let evolucije je najvišja morfološka raznolikost med vsemi taksoni na Zemlji. S tem so seveda povezane težave pri razvrščanju rakov v sistem ter kompleksnost posameznih taksonov (slika 1).

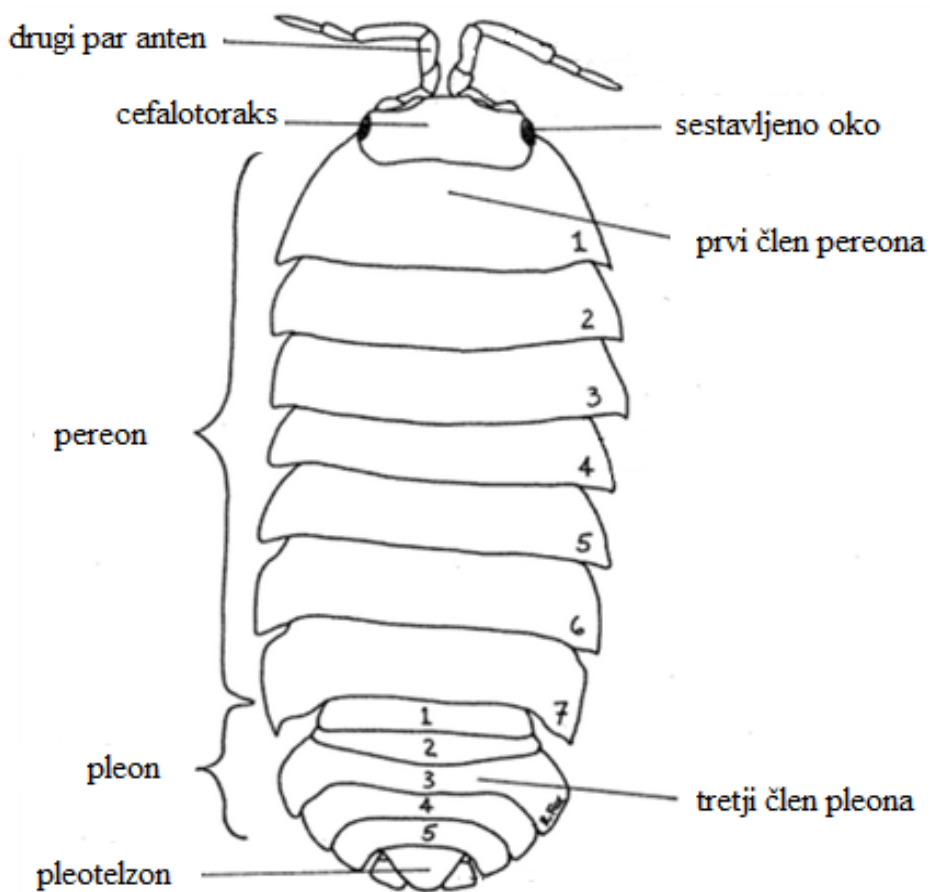
Ali so raki monofiletska skupina, kje v skupini členonožcev (Arthropoda) je njihovo mesto na filogenetskem drevesu in ali je skupina členonožcev sploh monofiletska, ostajajo odprta vprašanja. Uvrščanje rakov kot poddeblo je dogovorno, saj bi jih lahko obravnavali tudi kot samostojno deblo ali le enega od razredov. Naslednje vprašanje je, koliko razredov vsebuje poddeblo rakov in tudi to vprašanje še nima dokončnega odgovora, saj filogenetski odnosi znotraj rakov še niso pojasnjeni. Kakorkoli, skupina višji raki (Malacostraca) je zagotovo eden izmed njih, čeprav tudi monofilija te skupine še ni dokončno potrjena. Skupina višjih rakov tradicionalno vključuje poleg pravih višjih rakov (Eumalacostraca) še skupine Phyllocarida in Hoplocarida. Prave višje rake delimo na tri skupine: Syncarida, Peracarida in Eucarida. Med Eucaride uvrščamo tudi desetonožce (Decapoda), enakonožci (Isopoda) in postranice (Amphipoda) pa so eden od devetih redov valilničarjev (Peracarida) (Martin in Davis, 2001) (slika 1).



Slika 1: Poenostavljena shema sistematike rakov; črtkane črtice kažejo, da v višji takson uvrščamo tudi druge skupine. (povzeto po Martin in Davis, 2001).

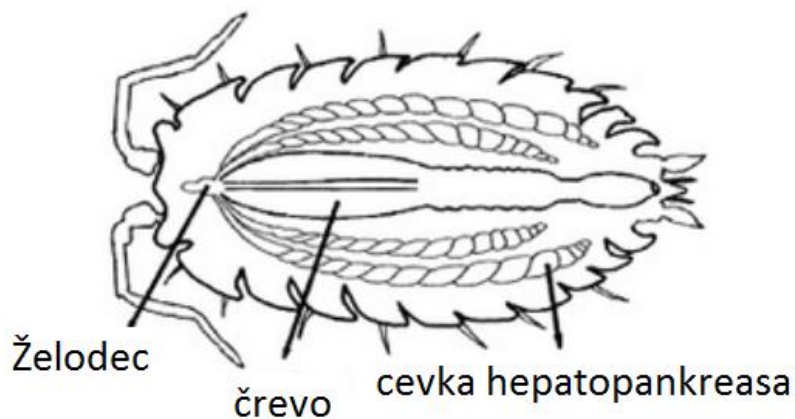
### 2.1.2 Značilnosti rakov enakonožcev (Isopoda)

Raki enakonožci so morfološko enotna skupina. Njihovo telo je iz glavoprsja (cefalotoraksa), pereona ter zadka iz pleona in pleotelzona. Prvi od osmih členov toraksa je zlit z glavo v cefalotoraks, okončine tega člena pa so del obustnega aparata. Pereon je iz sedmih prostih segmentov, na vsakem je po en par hodilnih nog. Zadek je sestavljen iz petih prostih segmentov (pleon) s pleopodi in pleotelzona z uropodi (slika 2).



Slika 2: Morfologija enakonožnih rakov (Isopoda) (Fox, online).

Prebavilo je sestavljeno iz požiralnika, želodca in zadnjega črevesa. Srednje črevo je večinoma reducirano, zato je celotno prebavilo prekrto s kutikulo, ki se levi. Iz želodca v predelu atrija izraščajo štiri cevke hepatopankreasa, ki potekajo vzporedno s črevesom (slika 3).



Slika 3: Anatomija črevesa enakonožnih rakov (Isopoda) (povzeto po Lešer in sod., 2008)

Za enakonožce je značilna dvofazna levitev (slika 4). Posteriorni del kutikule namreč levijo nekaj ur ali dni pred anteriornim delom. Meja med obema deloma poteka med četrtim in petim členom pereona. Obdobje med levitvijo obeh delov kutikule imenujemo medlevitvena faza . (Wägele, 1992)

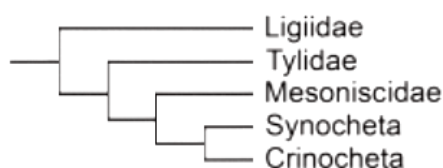


Slika 4: Osebek vrste *Protracheoniscus politus*, ki je ravno levil sprednji del telesa in se prehranjuje s svojim levom (Hornung, 2011).



### 2.1.3 Kopenski raki enakonožci (Oniscidea)

Kopenski raki enakonožci (Oniscidea) so ena od osmih skupin enakonožcev (Isopoda) in vključujejo več kot 3600 opisanih vrst. Pogosto predstavljajo velik del talne favne, saj jih je lahko v kvadratnem metru tal več sto, zaužijejo pa do 12% rastlinskega detrita. Pomembni so tudi kot hrana plenilskih členonožcev. Za obstoj ne potrebujejo odprte vode, saj njihov zgodnji ontogenetski razvoj kot pri vseh valilničarjih (Peracarida) poteka v valilniku (marzupiju), ki se razvije iz oostegitov sprednjih sternitov samice. So edina skupina rakov, ki je primarno kopenska (Schmidt, 2008).



Slika 5: Filogenetski odnosi med skupinami kopenskih enakonožcev (Oniscidea) (povzeto po Schmidt, 2008).

Kopenski enakonožci vključujejo pet skupin (Preglednica 1), njihovi filogenetski odnosi so prikazani na sliki 5. Skupina Ligiidae je bazalna in šteje okrog 80 vrst, ki večinoma živijo na morskih obalah in v vlažnem okolju. Skupina Tylidae šteje okrog 20 vrst, med katerimi je le ena popolnoma kopenska, druge pa živijo na morskih obalah. V skupino Mesoniscidae uvrščamo le dve jamski vrsti.

V skupino Synocheta spada 16 % vrst kopenskih enakonožcev. Predstavniki so večinoma majhni, nimajo pleopodnih pljuč in so omejeni na habitate z visoko vlažnostjo. Nekaj jamskih vrst je sekundarno vodnih. Skupino delimo na štiri družine: Trichoniscidae, Styloniscidae, Titaniidae in Schoebliidae, med katerimi je družina Trichoniscidae parafiletska bazalna skupina, ki vključuje vse predstavnike brez značilnosti ostalih treh družin (Schmidt, 2008). Med Trichoniscidae uvrščamo tudi vrsto *Hyloniscus riparius*, ki jo obravnavamo v naši raziskavi.

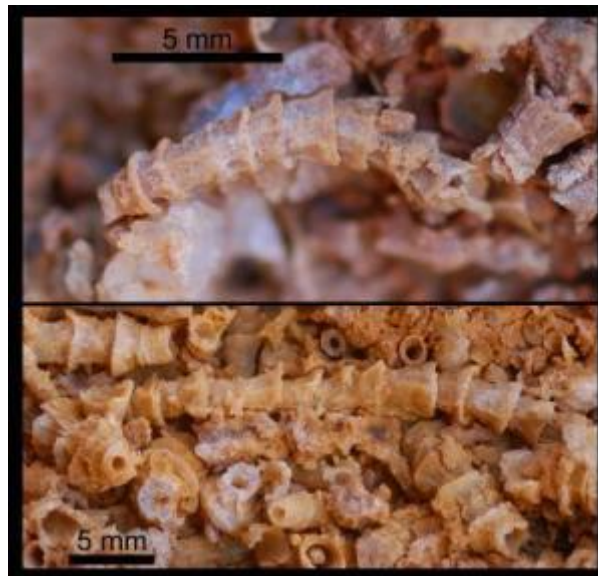
Skupina Crinocheta je z okrog 2750 predstavniki daleč najštevilčnejša. Predstavniki te skupine so najbolj prilagojeni na življenje na kopnem (Schmidt, 2008).

Preglednica 1: Številčnost skupin kopenskih enakonožcev (Oniscidea) in tipični habitati, v katerih živijo njihovi predstavniki.

skupina	Št. vrst	habitat
Ligiidae	80	morske obale, vlažna okolja
Tylidae	20	morske obale, 1 vrsta kopenska
Mesoniscidae	2	Alpe in Karpati (jamski)
Synocheta	630	vlažni habitati, jame
Crinocheta	2750	relativno suhi habitati

## 2.2 BIOMINERALIZACIJA IN BIOMINERALIZIRANE STRUKTURE

### 2.2.1 Izvor, razširjenost in pomen biomineralizacije v živem svetu



Slika 6: Naravno izpostavljeni primerki *Cloudina carinata* n. sp. v apnencu (Cortijo in sod., 2010).

Prvi jasen dokaz biokalcifikacije so našli v ostankih nevretenčarja *Cloudina* (slika 6), ki se je prvič pojavil pred 550 milijoni let (Grant in Frost, 1990), med kambrijsko eksplozijo v naslednjih 40 milijonih let pa so sposobnost biokalcifikacije pridobili predstavniki vseh sodobnih živalskih debel. Kot kažejo molekularne raziskave, je do divergence teh skupin prišlo že nekaj sto milijonov let pred pojavom biomineraliziranega kalcija (Wray in sod., 1996), zato Kirschvink in Hagadron (2000) sklepata, da je predispozicija za ta proces obstajala že pri skupnem predniku. Menita, da je prišlo do spremembe sistema za biomineralizacijo magnetita, ki je v živem svetu prisoten že vsaj dve milijardi let, na način, ki je omogočil biomineralizacijo kalcija. Kot dokaz navajata homologijo med proteinoma za transmembranski prenos železa in kalcija. Evolucijsko predispozicijo za biomineralizacijo kalcija je predstavljal tudi mehanizem za natančno regulacijo dinamike znotrajceličnega kalcija pri regulaciji celičnih procesov evkariontov.

Razlogi za pojav biokalcifikacije niso jasni, obstajajo pa različne hipoteze. Med verjetnejšimi sta hipoteza o zaščiti pred predacijo in hipoteza o nevtralizaciji visoke koncentracije ionov v oceanih. V času kambrijske eksplozije so se namreč močno povečale koncentracije fosfatov in karbonatov v oceanih, kar je spodbujalo biomineralizacijo kalcijevega fosfata ( $\text{CaPO}_4$ ) in kalcijevega karbonata ( $\text{CaCO}_3$ ). (Luquet in Frédéric, 2004).

Biomineralizacija je v sodobnem živem svetu izjemno razširjen in raznolik pojav, saj vsa trenutno poznana kraljestva vključujejo predstavnike, ki so sposobni tvorbe mineralov, v

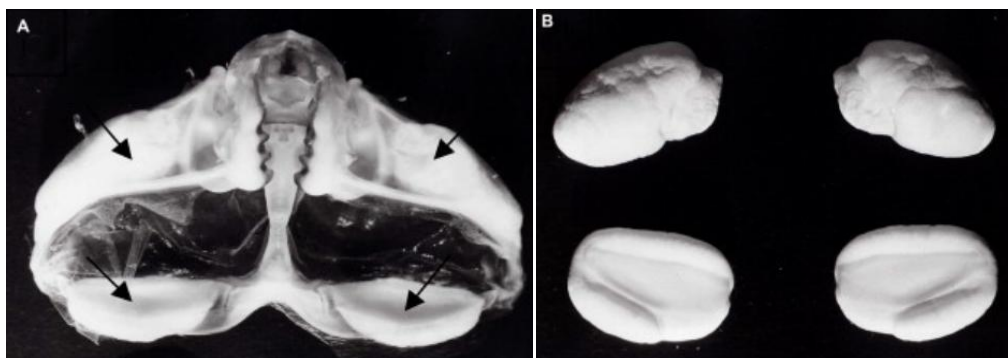
organizmih pa so našli več kot 60 različnih mineralov. Biomineralizirane strukture večinoma telesu zagotavljajo oporo (npr. skelet) in zaščito pred okoljem (npr. oklep), omogočajo predacijo (npr. zobje), ali pa opravljajo kakšno drugo specifično nalogo, kot je zazanavanje gravitacije (npr. statoliti) ali magnetnega polja (npr. kristali magnetita). (Cuif in sod., 2011)

### 2.2.2 Biomineralizacije pri višjih rakih (Malacostraca)

Za razliko od kutikule ostalih členonožcev kutikula rakov ni le sklerotizirana, temveč tudi mineralizirana. Kutikularni matriks višjih rakov je iz štirih slojev, ki si od zunanosti navznoter sledijo v naslednjem zaporedju: epikutikula, eksokutikula, endokutikula in membranski. Ekso- in endokutikula sta mineralizirani. Mineralizacija v osnovi poteka s precipitacijo kalcijevega karbonata in v manjši meri kalcijevega fosfata med hitinsko-proteinskimi lamelami kutikularnega matriksa.

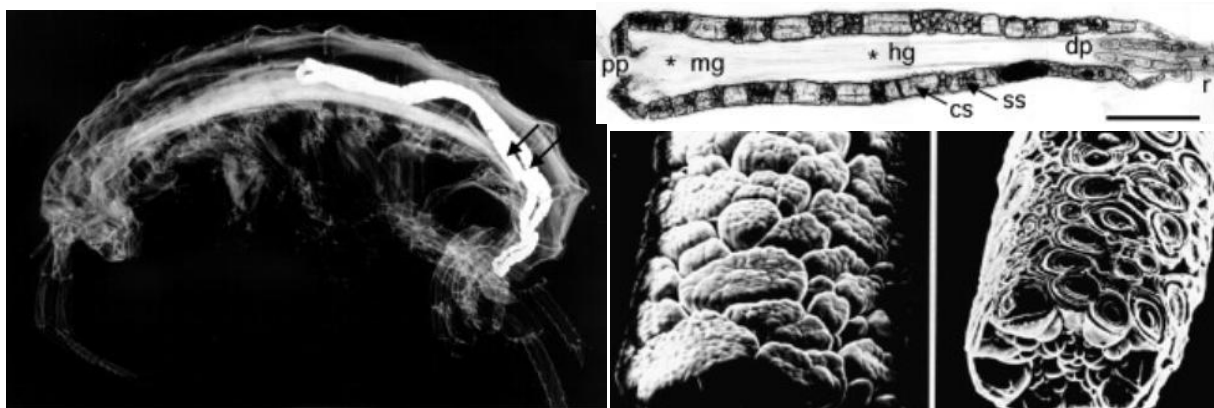
Viri kalcija za mineralizacijo kutikule se razlikujejo glede na okolje, kjer vrsta živi. Ne glede na dostopnost okoljskega kalcija večina skupin rakov kalcij pred levitvijo tudi mobilizira iz stare kutikule in ga skladišči. Uskladiščen kalcij pokriva med 4% in 75% potreb za mineralizacijo nove kutikule. Ko raki porabijo uskladiščen kalcij, začnejo za mineralizacijo izkoriščati zunanje vire, tudi staro kutikulo. V procesu mineralizacije nove kutikule poteka transport kalcija skozi krovne epitelije. Za preprečevanje preobremenitve epitelnih celic s kalcijem transport večinoma poteka paracelularno, vendar tudi transcelularno skozi plazmalemo in z vezikularnim transportom.

Mesta skladiščenja kalcija so zelo raznolika. Pri rakih deseteronožcih (Decapoda) je znano, da kalcij skladiščijo v hemolimfi (vrsta *Holthusiana transversa*), v hepatopankreasu (vrste *Carcinus maenas*, *Cancer Pagurus*, *Paratelphusa hydrodomous*) ali kot posebne strukture v steni želodca, imenovane gastroliti (skupina Astacidea) (Slika 7). Glede na raznolikost skupine bodo prihodnje študije zagotovo razkrile tudi druga mesta skladiščenja.



Slika 7: Gastroliti pri rodu *Gecarcinus* (Luquet in Frédéric, 2004).  
A - nastajanje gastrolitov v steni želodca; B – izolirani gastroliti dolžine 12 mm

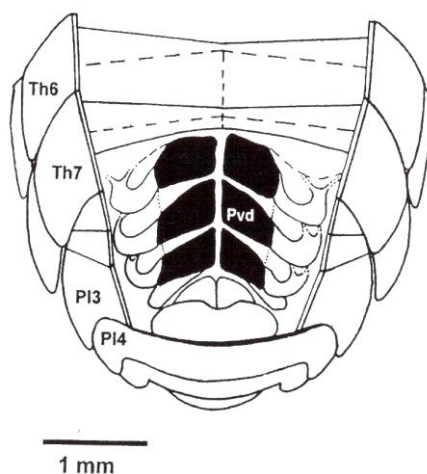
Zanimiv primer so tudi postrance (Amphipoda), ki kalcij skladiščijo v parnih izrastkih srednjega črevesa, imenovanih posteriorni cekci, nekatere pa tudi v samem črevesu (slika 8) (Luquet in Frédéric, 2004).



Slika 8: Posteriorni cekci pri vrsti *Orchestia cavimana* (Amphipoda) (Luquet in Frédéric, 2004).  
 levo: rentgenska fotografija osebkov tik pred levitvijo, posteriorni cekci so označeni s puščicama; desno zgoraj: posteriorna ceka, dorzalni pogled; pp: proksimalni del, dp: distalni del, mg: srednje črevo, hg: zadnje črevo, r: rektum, cs: spojene kroglice kalcijevega karbonata, ss: samostojne kroglice kalcijevega karbonata; desno spodaj: vsebina posteriornih cekov tik pred levitvijo (leva slika) in deset ur po levitvi (desna slika), posneto z vrstičnim elektronskim mikroskopom.

Glede biokalcifikacij so kopenski enakonožci (Isopoda: Oniscidea) zelo raznolika skupina. Že dolgo je znano, da kalcij pred levitvijo uskladiščijo v obliki depozitov v levitvenem prostoru med kutikulo in hipodermisom sternitov prvih štirih členov pereona. Gre za hidriran amorfen kalcijev karbonat v organskem matriksu, ki ga pred levitvijo sprednjega dela kutikule popolnoma resorbirajo (Ziegler, 1994). Tvorbo sternalnih depozitov pri vrstah *Porcellio scaber*, *Oniscus asellus* in *Ligia italica* so opisali številni raziskovalci (Ziegler, 2003; Zidar, 2003; Štrus in Compere 1996).

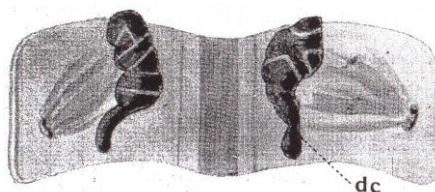
Poleg značilnih sternalnih depozitov pa pri različnih vrstah najdemo tudi druge kalcificirane strukture. *Tylos europaeus* iz družine Tylidae ima na primer poleg sternalnih depozitov še tri pare velikih depozitov v levitvenem prostoru na ventralni strani prvih treh pleomer, v katerih prevladuje kalcijev fosfat, vsebujejo pa tudi precej magnezija (slika 9). Nastanejo pred levitvijo, vendar se levijo skupaj s kutikulo, ki za razliko od sternalnih depozitov vsebuje pretežno kalcijev fosfat in precej magnezija. Natančnejša analiza kutikule pleona pri vrsti *Porcelio scaber* iz skupine Crinocheta je razkrila podobne depozite, ki pa s prostim očesom niso vidni.



Slika 9: Depoziti na ventralni strani pleomer pri vrsti *Tylos europaeus* (Ziegler, 2003).  
Th6, Th7 – šesti in sedmi člen pereona; Pl3 in Pl4 – tretji in četrti člen pleona; Pvd: depoziti

Druga vrsta iz družine Tylidae, *Helleria brevicornis*, nima nobenih vidnih depozitov, pač pa se pred in med levitvijo sferule kalcijevega karbonata s premerom do šest  $\mu\text{m}$  pojavijo med hipodermisom in lateralnim maščobnim tkivom (Ziegler, 2003).

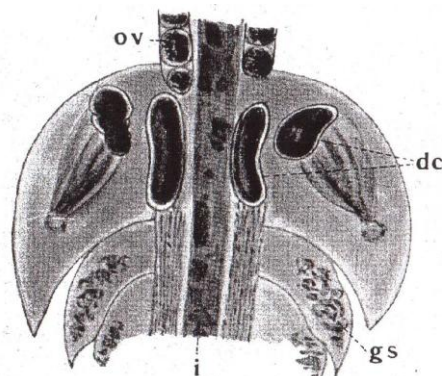
Za družino Synocheta so poleg sternalnih depozitov značilne kalcijeve tvorbe v telesni votlini, vendar so podatki o teh strukturah redki ter med sabo nasprotujoči. Prvi jih je omenil Verhoeff (1926) in jih poimenoval telesca z založnim kalcijem (kalksreservekörper), Méhely (1932) pa je te strukture natančneje raziskal in jih poimenoval kalcijeve zaloge ali založne strukture (kalkspeicher), ki jih bomo v nadaljevanju enotno imenovali **kalcijeva telesca**. Pri vrsti *Mesoniscus graniger* je v petem členu pereona našel en par hruškastih kalcijevih telesc (slika 10).



Slika 10: Kalcijeva telesca pri vrsti *Mesoniscus graniger* (Méhely, 1932)  
dc – kalcijeva telesca

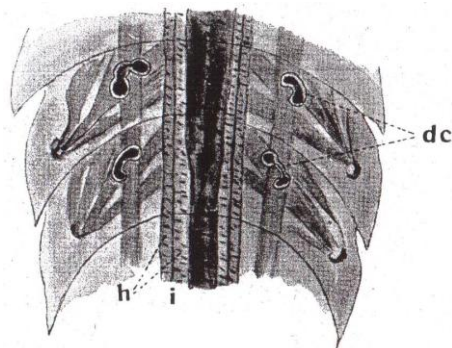


Pri vrstah rodu *Hyloniscus* (*riparius*, *vividus*, *transsylvanicus*, *Mariae* in *siculus*) je Méhely (1932) v sedmem členu pereona našel dva para kalcijevih telesc, od katerih je notranji prstaste, zunanji pa fižolaste oblike, v članku pa je le skica stanja pri vrsti *H. riparius* (slika 11).



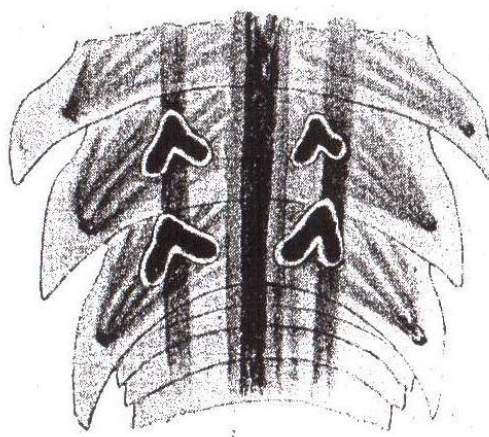
Slika 11: Kalcijeva telesca pri vrsti *Hyloniscus riparius* (Méhely, 1932)  
ov – ovarij, dc – kalcijeva telesca, i – črevo.

Pri vrsti *Androniscus dentiger* (v članku *Itea dentigera*) je opisal po en par kalcijevih telesc v obliki ročke v šestem in sedmem členu pereona (slika 12). Pri vrsti *Ligidium hypnorum* naj bi bilo stanje podobno, vendar v članku ni skice.

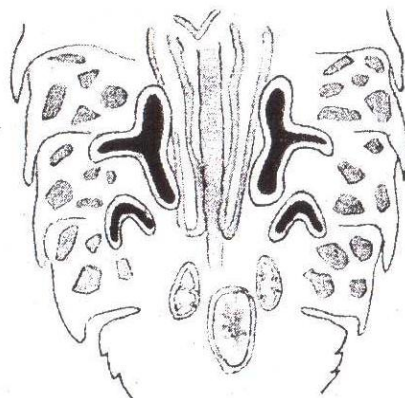


Slika 12: Kalcijeva telesca pri vrsti *Androniscus dentiger* (Méhely, 1932)  
dc – kalcijeva telesca, i – črevo, h – hepatopankreas

Pri vrsti *Trichoniscus noricus* (v članku *Spiloniscus noricus*) je opisal po en par kalcijevih telesc v obliki črke V v šestem in sedmem členu pereona (slika 13), pri vrsti *Tachysoniscus austriacus* (v članku *Spiloniscus austriacus*) pa je sprednji par kalcijevih telesc v obliki črke Y (slika 14). Pri vrsti *Cyphoniscellus gottscheensis* je opisal en par kalcijevih telesc med četrtim in petim členom pereona, vendar skic ni objavil.

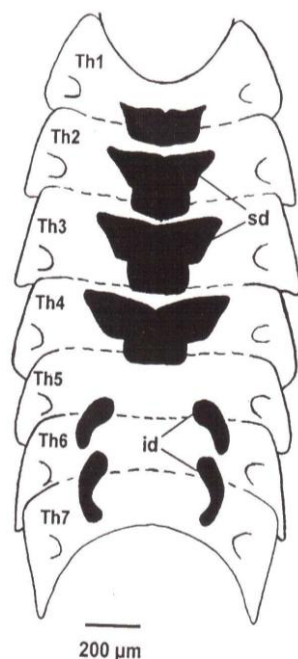


Slika 13: Kalcijeva telesa pri vrsti *Trichoniscus noricus* (Méhely, 1932).



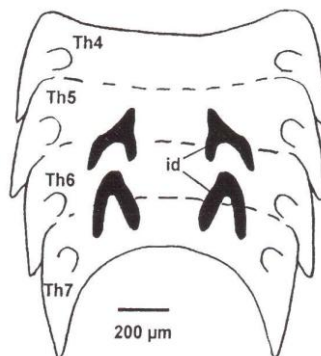
Slika 14: Kalcijeva telesa pri vrsti *Tachysoniscus austriacus* (Méhely, 1932).

Naslednji je o kalcijevih telescih pisal Ziegler (2003), ki jih je poimenoval kalcijevi depoziti v hemolimfnem prostoru oziroma notranji depoziti. Opisal jih je pri štirih vrstah iz skupine Synocheta. Pri vrstah *Androniscus roseus* (slika 15) in *Haplophthalmus montivagus* je poleg sternalnih depozitov opisal tudi dva para fižolastih kalcijevih telesc, ki ležita med petim in šestim ter med šestim in sedmim členom pereona. V nasprotju s sternalnimi depoziti, ki se razvijejo pred levitvijo in vsebujejo kalcijev karbonat, notranji depoziti pri teh dveh vrstah vsebujejo kalcijev fosfat.



Slika 15: Sternalni depoziti in kalcijeva telesa pri vrsti *Androniscus roseus* (Ziegler, 2003).  
Th1 do Th7-prvi do sedmi člen pereona; sd – sternalni depoziti; id – kalcijeva telesa

Vrsta *Trichoniscus pusillus* ima dva para kalcijevih telesc v obliki črke V med petim in šestim ter med šestim in sedmim členom pereona (slika 16), ki vsebujejo kalcijev karbonat ter po levitvi ne izginejo. Pri navedenih vrstah so notranji depoziti pred levitvijo veliki, manjše pa je avtor članka našel pri živalih brez znakov levitve.

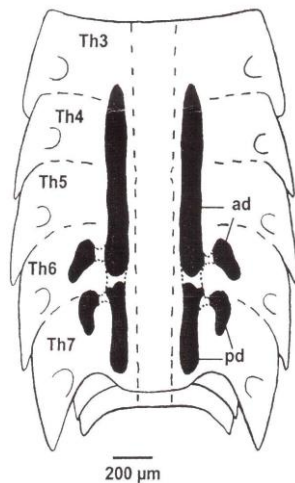


Slika 16: Kalcijeva telesa pri vrsti *Trichoniscus pusillus* (Ziegler, 2003).  
Th4 do Th7-četrti do sedmi člen pereona; id – kalcijeva telesa.

Za vrsto *Hyloniscus riparius* navaja, da ima največje notranje depozite. Dva kompleksa depozitov sta sestavljena iz po ene paličaste strukture med tretjim in šestim členom pereona, po ene paličaste strukture med šestim in sedmim členom pereona ter dveh malih fižolastih depozitov (slika 17). Vsak kompleks naj bi bil zaključena celota, obdana z enotnim epitelom. Navaja tudi, da so anteriorne strukture steklastega videza in vsebujejo



kalcijev karbonat, posteriorne strukture pa so bolj motne in vsebujejo kalcijev fosfat kot osnovno sestavino.



Slika 17: Kalcijeva telesca pri vrsti *Hyloniscus riparius* (Ziegler, 2003).

Th3 do Th7 – tretji do sedmi člen pereona; ad – anteriorna kalcijeva telesca, pd – posteriorna kalcijeva telesca.

### 3. MATERIAL IN METODE

Osebke vrste *Hyloniscus riparius* smo 22.5.2010 nabrali pri vasi Dolenje Jezero pri Cerknici in jih do vrste določili po Verhoeff 1927. Osebke smo nato gojili v kulturi in sicer v steklenem kozarcu, ki smo ga do polovice napolnili z vlažno prstjo in listnim opadom iz lokalitete vzorčenja. Kulturo smo nato hranili v komori na 21°C.

#### 3.1. HISTOLOŠKE REZINE

##### 3.1.1 Priprava vzorcev in rezanje

Za pripravo histoloških rezin smo uporabili sedem odraslih primerkov vrste *Hyloniscus riparius*. Šest osebkov ni kazalo znakov levitve, eden pa je bil v fazi medlevitve. Vse živali smo omamili z etrom, jim s secirnimi škarjami odstrigli pereopode in jih pri sobni temperaturi fiksirali s štiri odstotno vodno raztopino paraformaldehida. Čez nekaj ur smo jih prestavili v hladilnik.

Naslednji dan smo dekalcinirali šest vzorcev tako, da smo jih dali za štiri ure v 10% vodno raztopino dietildiamintetraočetne kisline (EDTA). Enega izmed vzorcev osebkov, ki niso kazali znakov levitve, nismo dekalcinirali, saj smo ga uporabili za histokemijske poskuse.

Po dekalcinaciji smo vzorce dehidrirali v po dveh menjavah destilirane vode, 50%, 70%, 96% in absolutnega etanola ter ksilena. V vsakem mediju so vzorci stali po 20 minut. Na koncu smo vzorce prestavili v tekoč parafin pri temperaturi 60 °C. Po štirih urah v parafinu smo vzorce prestavili v svež parafin in jih pustili čez noč v termostatu na 60 °C. Naslednji dan smo jih prestavili v kalupe in pustili na sobni temperaturi, da se je parafin strdil. Blokce smo pritrdili na lesene nosilce in z britvico odstranili odvečen parafin. Postopek priprave vzorcev je prikazan v preglednici 2.

Histološke rezine debeline osem µm smo narezali na mikrotomu Leica RM 2265 ter jih prenesli v kapljico destilirane vode na objektivnem stekelcu. Objektiva stekelca z rezinami smo nato položili na steklene vilice in jih do suhega posušili na vroči plošči, ki smo jo nastavili na 50°C.

Preglednica 2: Priprava vzorcev za histološke rezine

Postopek	Sredstva	Čas
Obdelava pred fiksacijo	Eter, odstranili pereopode	
Fiksacija	4% paraformaldehid	4 ure na sobni temperaturi, nato v hladilniku čez noč
Dekalcinacija	10% EDTA	4 ure
Dehidracija	Destilirana voda	Dvakrat 20 min
	50% etanol	
	70% etanol	
	96% etanol	
	Absoluten etanol	
Ksilen		
Vklapljanje v parafin	Tekoč parafin pri temperaturi 60 °C	Prva menjava 4 ure, druga menjava čez noč
Izdelava parafinskih blokcev	V kalupih na sobni temperaturi	
Rezanje	Mikrotom Leica RM 2265, 8 µm	

### 3.1.2. Barvanje in priprava trajnih preparatov

Histološke rezine smo barvali s kombinacijo eozina in hematoksilina, eozina in alciana, z alizarinom in z barvilom po Feulgenu. Vse rezine smo najprej rehidrirali v po dveh menjavah ksilena, propanola, 96% in 70% etanola ter v eni menjavi destilirane vode. V vsakem mediju so objektna stekelca z rezinami stala po štiri minute.

Za barvanje hematoksilin-eozin smo rezine najprej sedem minut barvali v hematoksilinu in jih nato pet minut spirali pod tekočo vodo. Temu je sledila diferenciacija s kislim alkoholom in ponovno spiranje v destilirani vodi. Rezine smo nato še 10 minut barvali v eozinu.

Za barvanje alcian-eozin smo objektne najprej prelili z barvilom alcian, pustili pet minut in spirali z destilirano vodo. sledilo je še 10 minutno barvanje v eozinu.

Z alizarinom smo rezine barvali 20 minut. Uporabili smo rezine vzorca, ki ga nismo dekalcinirali.

Za barvanje po Feulgenu smo rezine dve minuti spirali v petmolarni solni kislini, nato pa eno uro hidrolizirali v petmolarni solni kislini. Po končani hidrolizi smo rezine ponovno spirali v petmolarni solni kislini, nato pa še v destilirani vodi. Za tem smo jih v temi dve uri barvali s Shiffovimi reagenti, nato pa še kontrastirali trikrat po dve minuti s kontrastirnim

sredstvom iz koncentrirane solne kisline in natrijevega bisulfitu. Potem smo rezine 15 minut spirali pod tekočo vodo.

Po barvanju smo vse rezine dehidrirali s spiranjem v destilirani vodi, 70% etanolu, dveh menjavah 96% etanola, dveh menjavah propanola in dveh menjavah ksilena. Objektiva stekelca smo nato premazali s Pertexom (Medite) in jih pokrili s krovnimi stekelci.

### 3.1.3. Pregled in fotografiranje rezin

Preparate histoloških rezin smo pregledali z mikroskopom Axioskop OPTON West Germany ter vsako rezino tudi fotografirali pri 400-kratni povečavi s kamero Leica DFC 290 HD. Izbrali smo format velikosti 1920x1080 pikslov.

Strukture oziroma dele struktur na histoloških in poltankih rezinah, ki so nas posebno zanimali, smo na preparatih histoloških rezin pregledali tudi z mikroskopom Zeiss Axio Imager Z.1 ter fotografirali s kamero Zeiss AxioCam HRc.

### 3.1.4. Računalniška izdelava trodimenzionalnih rekonstrukcij

Slike smo najprej obdelali v programu Image J. V program smo uvozili po 20 fotografij enega vzorca naenkrat in jih najprej pretvorili v 8 bitne črno-bele slike, nato pa smo jih med seboj poravnali. Za poravnavanje smo uprabili metodo »rigid body transformation«, ki ohranja obliko objektov, na katere deluje, vključuje pa translacije in rotacije (ne pa npr. raztegov).

Serijske slike smo nato obdelali še s programom Reconstruct. V programu smo nastavili debelino rezin. Žal pri nobeni živali nismo uspeli ustrezno pripraviti čisto vseh rezin, zato deli živali na rekonstrukcijah manjkajo. Da bi zapolnili prazne dele v rekonstrukcijah, smo zadnji ohranjeni rezini v programu nastavili tako debelino, ki je ustrezala praznemu delu.

Ko smo končali z obrisovanjem, smo tridimenzionalne slike objektov generirali kot Boissonnatovo površino. Pri tem načinu program uporabi Delaunayjevo triangulacijo sledi z uporabo algoritma, ki ga je 1988 napisal Jean-Daniel Boissonnat.

## 3.2. POLTANKE IN ULTRATANKE REZINE

Za izdelavo poltankih in ultratankih rezin smo dva odrasla osebka vrste *Hyloniscus riparius*, ki nista kazala znakov levitve, dekapitali. Nato smo ju fiksirali v mešnici dwoodstotnega paraformaldehida in dvojnopol odstotnega glutaraldehida v 0,1 M kakodilatnem pufu (pH = 7,3) več dni. Po fiksaciji smo vzorce dvakrat po 20 minut spirali

v 0.1 M kakodilatnem pufru pH 7.3, nato pa jih za eno uro pustili v enoodstotnem osmijevem tetroksidu ( $\text{OsO}_4$ ).

Vzorci smo nato dehidrirali v po dveh menjavah destilirane vode, 50%, 70%, 90%, in absolutnega etanola. V vsakem mediju so vzorci stali po 20 minut. Sledilo je vklapljanje v epoksi smolo (Spurr). Vzorci smo dali najprej za štiri ure v mešanico epoksi smole in absolutnega etanola v razmerju ena proti ena, nato pa smo jih čez noč pustili v prvi menjavi čiste epoksi smole na mešalu. Naslednji dan je sledila druga menjava čiste epoksi smole, v kateri so bili vzorci na mešalu štiri ure. Nato smo vzorce prestavili v kalupe, jih prelili s čisto epoksi smolo in dva dni pustili polimerizirati v pečici na  $60^\circ\text{C}$ . Postopek je prikazan tudi v preglednici 3.

Preglednica 3: Priprava vzorcev za izdelavo poltankih in ultratankih rezin

Postopek	Material	Čas
Obdelava pred fiksacijo	Dekapitacija	
Fiksacija in osmiranje	2 % paraformaldehid in 2,5 % glutaraldehida v 0,1 M kakodilatnem pufru (pH = 7,3)	Več dni
	0.1 M kakodilatni pufer pH 7.3	Spiranje dvakrat 20 min
	1% $\text{OsO}_4$	1 ura
Dehidracija	Destilirana voda	Dvakrat 20 min
	50% etanol	
	70% etanol	
	90% etanol	
	Absoluten etanol	
Vklapljanje v Spurr	Spurr : absoluten etanol = 1:1	4 ure
	Spurr, mešalo	Čez noč
		4 ure
Polimerizacija	V kalupih pri $60^\circ$	2 dni
Rezanje	Reichert ultracut	

Uporabili smo epoksi smolo Spurr »medium« srednje trdote. Pripravili smo jo iz osnovne komponente vinil cikloheksenov dioksid (ERL), mehčalca diglicidilni eter propilen glikola (DER), trdilca nonenil sukcinjskega anhidrida (NSA) in pospeševalca dimetil aminoetanol (DMAE), ki smo jih zmešali v razmerju 25:12.5:65:1. Prve tri komponente smo najprej na mešalu mešali pol ure, nato pa smo jim dodali pospeševalec in mešali še eno uro.

Po polimerizaciji smo blokce vzeli iz kalupov. Vsakega smo pritrdili na nosilec in z britvico odstranili odvečno smolo. Za rezanje poltankih rezin smo izdelali steklene nože iz 25 mm širokih in šest mm debelih steklenih palic z Leica EM KMR izdelovalcem nožev. Na nože smo z voskom pritrdili plastično banjico, v katero smo natočili filtrirano in

deionizirano vodo. miliQ. Poltanke rezine debele med 0,5 in 2  $\mu\text{m}$  smo narezali s steklenimi noži na ultramikrotomu Reichert ultracut. Vsako rezino smo prenesli v kapljico miliQ vode na objektnem stekelcu. Objektna stekelca smo nato posušili na vroči plošči pri temperaturi 80°C.

Suha objektna stekelca smo prelili z barvilom Azur II – metilen modro. Po eni minuti smo stekelca sprali z miliQ vodo in jih ponovno posušili na vroči plošči. Naslednji dan smo jih premazali z pertexom in pokrili s krovnimi stekelci.

Poltanke rezine smo pregledovali sproti. Na mestih, kjer so bila klacijeva telesca lepo vidna, smo z diamantnim nožem narezali ultratanke rezine debeline 70 nm. V noževu banjico smo nalili miliQ vodo, na kateri so rezine plavale. S pinceto smo jih zajeli na bakrene mrežice in posušili na filtrirnem papirju. Kontrastirali smo jih z uranilnim acetatom 10 minut in svinčevim citratom pet minut.

Ultratanke rezine smo pregledali s presevnim elektronskim mikroskopom Phillips (=FEI) CM 100.in fotografirali s kamero Bioscan 9.

### 3.3 PRIPRAVA BARVIL

Eozin smo pripravili iz enega grama Eozina Y, 70 mililitrov absolutnega etanola, 30 mililitrov destilirane vode in kapljice očetne kisline ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ).

Weigertov hematoksilin smo pripravili iz dveh založnih raztopin. Raztopino mordanta smo pripravili iz dveh in pol gramov železovega klorida ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), štirih in pol gramov železovega sulfata ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), dveh mililitrov solne kisline (HCl) in 298 mililitrov destilirane vode. Raztopino barvila smo pripravili iz enega grama hematoksilina in stotih mililitrov 96% etanola, ter jo pustili zoreti tri tedne. Pred barvanjem smo obe raztopini zmešali v razmerju ena proti ena in dobljeno barvili filtrirali.

Za diferenciacijo rezin, barvanih s hematoksilinom, smo uporabili kisli alkohol, ki smo ga pripravili iz enega mililitra koncentrirane solne kisline (37% HCl) in stotih mililitrov 70% etanola.

Barvilo Alcian blue smo pripravili pri pH 2.8 in sicer iz pol grama kalcijevega klorida ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), enega grama Alcian blue 8GX in 100 mililitrov destilirane vode.

Alizarin smo pripravili tako, da smo pol grama barvila alizarin red S raztopili v 100 mililitrih Tris - HCl pufru pH 9.

Za barvanje po Feulgenu smo uporabili petmolarno solno kislino (HCl), Schiffov reagent ( $\text{C}_2\text{OH}_{19}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$ ) in kontrastno sredstvo. Kontrastirno sredstvo smo pripravili iz enega

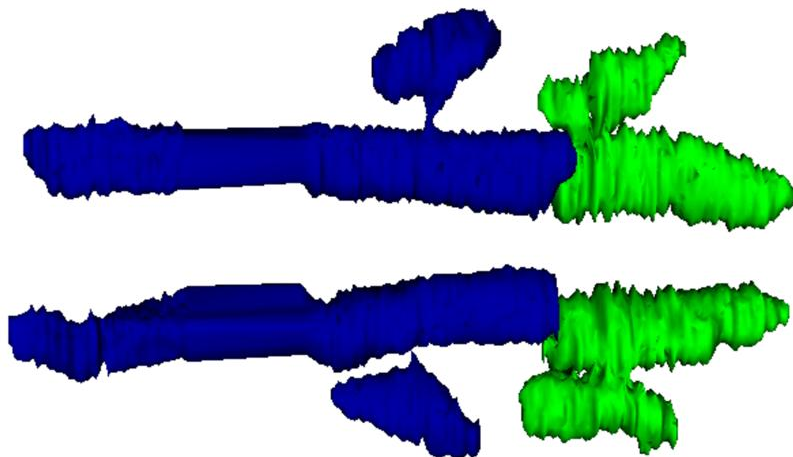
mililitra koncentrirane solne kisline (37% HCl), 0.4 grama natrijevega bisulfita ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) in 100 mililitrov destilirane vode.

Azur II – metilen modro smo pripravili iz dveh založnih raztopin. Raztopina A je enoodstoten natrijev tetraborat ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) in enoodstotno metilensko modrilo v destilirani vodi, raztopina B pa je enoodstotna raztopina Azur II v destilirani vodi. Obe raztopini smo zmešali v razmerju ena proti ena in pred uporabo filtrirali.

## 4. REZULTATI

### 4.1. ŠTEVILO, NAMESTITEV IN MORFOLOGIJA KALCIJEVIH TELESC

Pri trodimenzionalni rekonstrukcij smo ugotovili, da ima vrsta *Hyloniscus riparius* štiri ločena kalcijeva telesca, ki so obdana z epitelijem (slika 18).

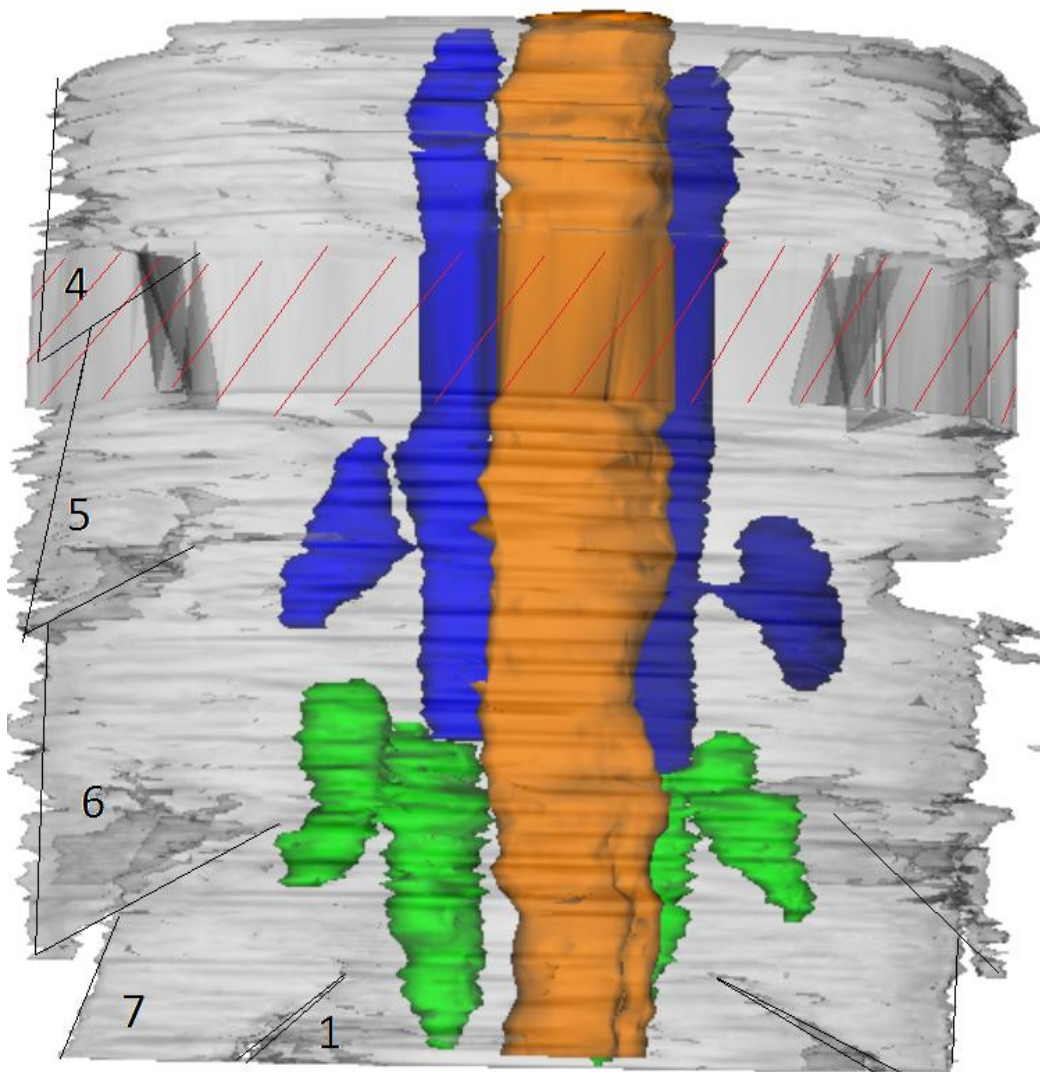


Slika 18: Kalcijeva telesca.

Trodimenziionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z dorzalne strani. Anteriorni kalcijevi telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno.



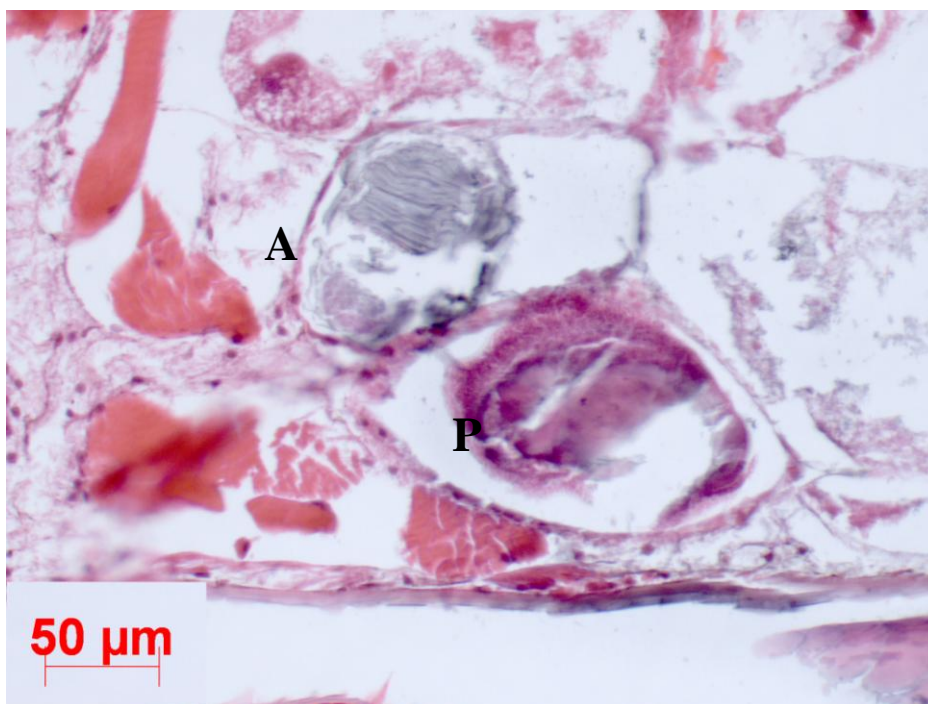
Razporejena so med četrtrim členom pereona in prvim členom pleona (slika 19) vzdolž črevesa nekoliko ventrolateralno. Anteriorni par sega od četrtega do šestega členu pereona, posteriorni par pa od šestega členu pereona do prvega členu pleona. Oba para sta cevaste oblike, vsaka cevka ima po en lateralni pecljat izrastek. Izrastka anteriornega para ležita v petem in šestem členu pereona, izrastka posteriornega para pa v šestem in sedmem členu pereona. Povezava med cevkami telesc in izrastki je zelo tanek pecelj na meji med členoma, v katerih leži izrastek. Pri anteriornih telescih je to zelo tanek pecelj, pri posteriornih telescih pa širši kanalček.



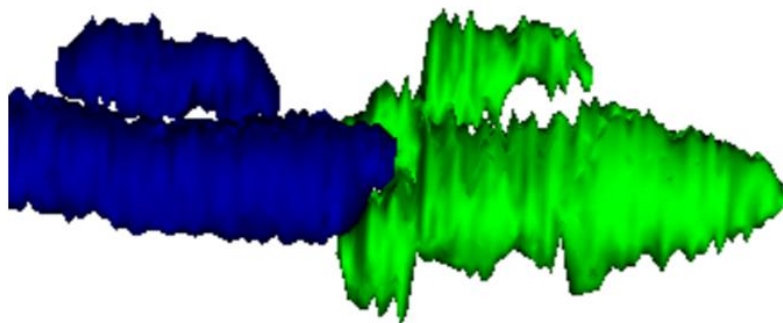
Slika 19: Splošen prikaz lege kalcijevih telesc.

Trodimenzionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z dorzalne strani. Rdeče črtan del ni rekonstruiran iz rezin. Obris telesa: prosojno sivo; črevo: oranžno; anteriorni kalcijevi telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno. Členi so nakazani s črno črto: 1 – prvi člen pleona, 4 do 7 - četrti do sedmi člen pereona.

V šestem členu pereona, kjer sta prisotna oba para, anteriorni par leži nad posteriornim, vendar telesci med seboj nista direktno povezani (sliki 20 in 21).

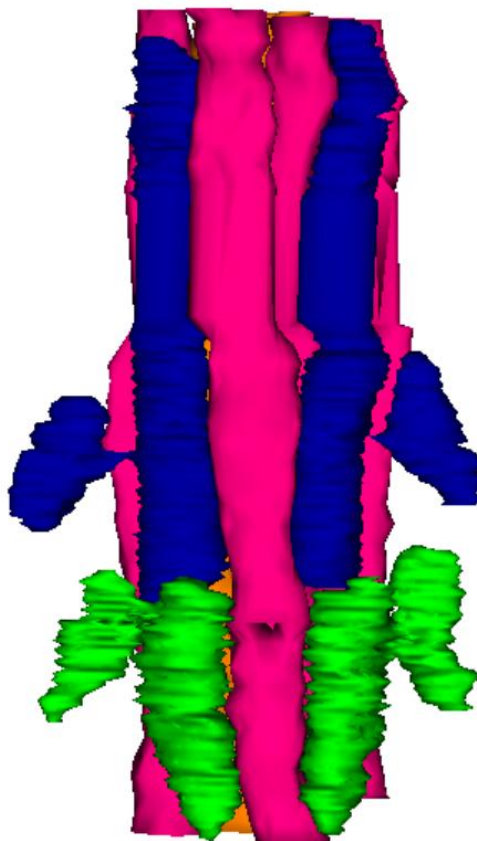


Slika 20: Lega kalcijevih telesca v šestem členu pereona.  
 Prečna rezina, barvanje hematoksilin – eozin, 100x povečava; A – anteriorno kalcijevo telesca, P –  
 posteriorno kalcijevo telesce.

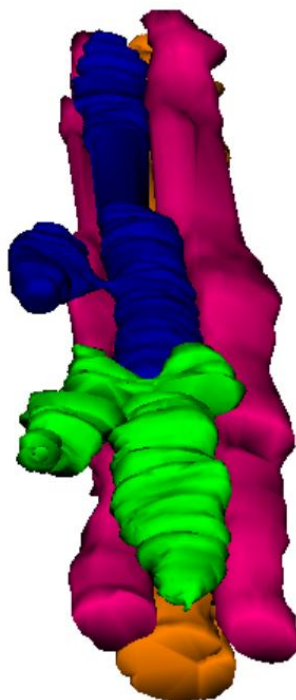


Slika 20: Anteriorno in posteriorno kalcijevo telesce.  
 Trodimenzionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z dorzolateralne strani, detajl. Anteriorni kalcijevi  
 telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno.

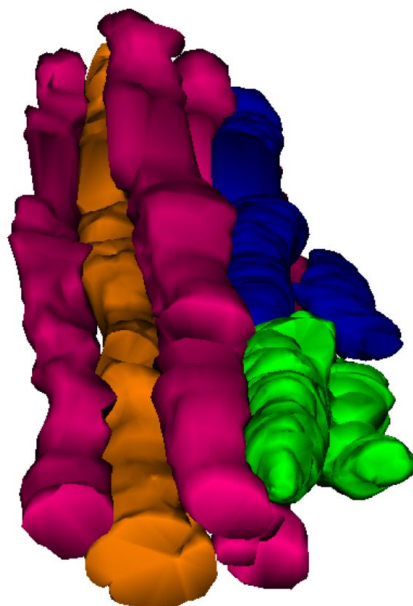
Oba para telesc se po vsej dolžini tesno prilegata cevkam hepatopankreasa, mestoma pa tudi črevesu (slike 21, 22, 23, 24 in 25). Izrastki obeh parov se prebavil ne dotikajo in štrlijo v področje mišic. Pri nobenem preiskovanem osebkcu nismo našli direktne povezave med kalcijevimi telesci in katerikoli delom prebavil. Kalcijeva telesca so zaprte strukture, ki so z epitelom popolnoma ločena od vseh ostalih struktur v telesu.



Slika 21: Cevke kalcijevih telesc se tesno prilegajo prebavilu, izrastki pa štrlijo v področje mišic. Trodimenzionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z ventralne strani. Črevo: oranžno; cevke hepatopankreasa: roza; anteriorni kalcijevi telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno.

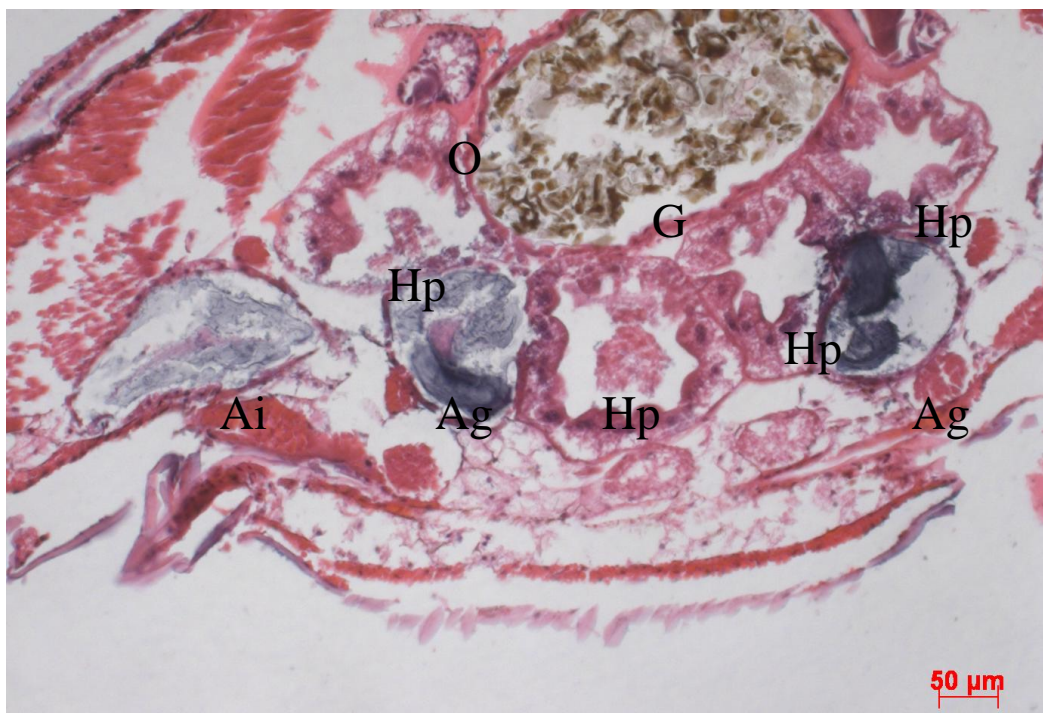


Slika 22: Anteriorno in posteriorno kalcijevo telesce sta stisnjena med cevke hepatopankreasa in črevo. Prikazani sta samo telesci na desni strani telesa. Trodimenzionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z ventrolateralne strani. Črevo: oranžno; cevke hepatopankreasa: roza; anteriorni kalcijevi telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno



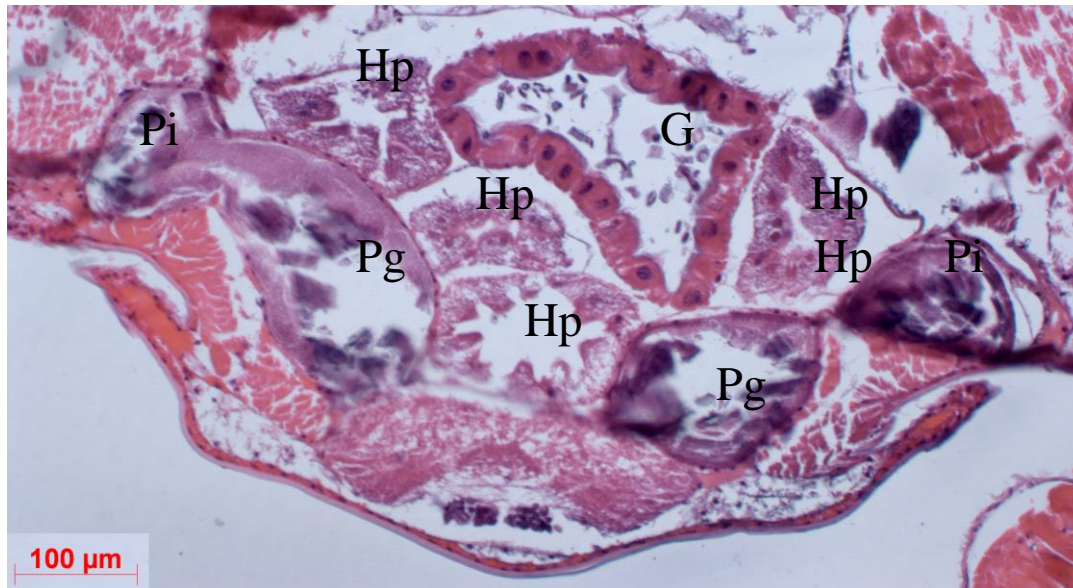
Slika 23: Predel prebavila, kjer ležita anteriorno in posteriorno kalcijavo telesce. Prikazani sta obe telesci na levi strani telesa, telesci z desne strani pa sta na sliki odstranjeni. Trodimenzionalna rekonstrukcija prečnih rezin, pogled z ventrolateralne strani. Črevo: oranžno; cevke hepatopankreasa: roza; anteriorni kalcijevi telesci: modro; posteriorni kalcijevi telesci: zeleno.





Slika 24: Lega anteriornega para kalcijevih telesc na histološki rezini.

Barvanje hematoksilin-eozin; 100x povečava; nedekalciniran vzorec. Ag – glavna cevka anteriornega kalcijevega telesca; Ai – izrastek anteriornega kalcijevega telesca; G – črevo; Hp – hepatopankreas; O – jajčnik



Slika 25: Lega posteriornega para kalcijevih telesc na histološki rezini.

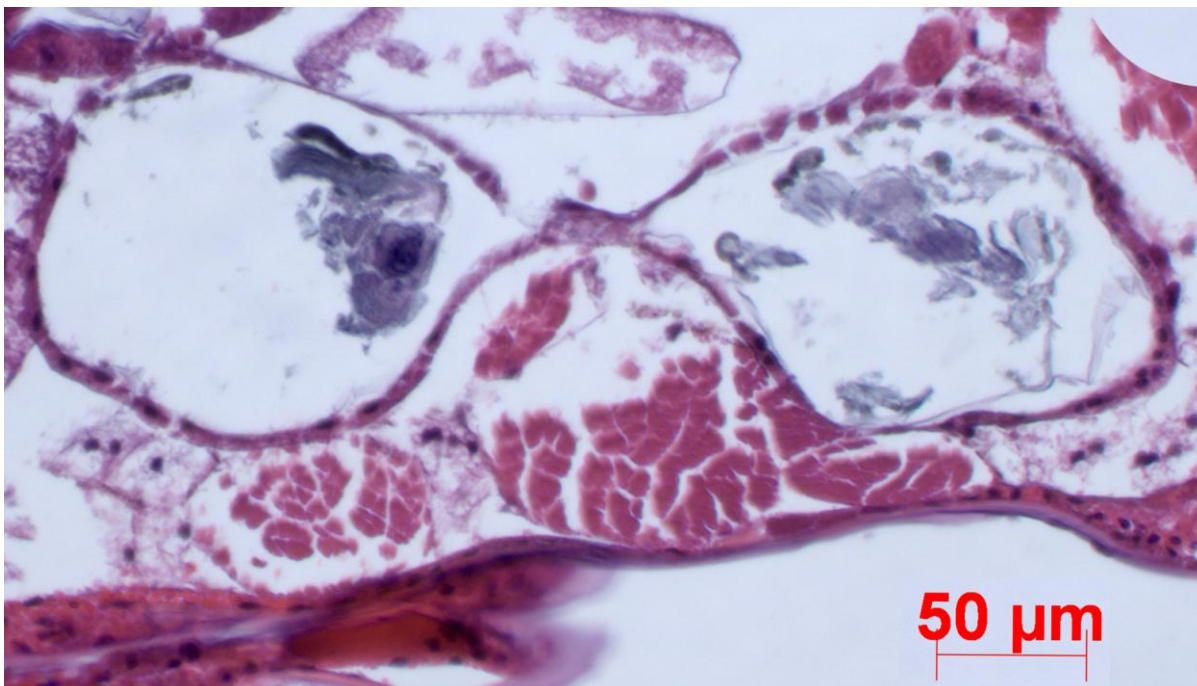
Barvanje hematoksilin-eozin; 100x povečava; nedekalciniran vzorec. Pg – glavna cevka posteriornega kalcijevega telesca; Pi – izrastek posteriornega kalcijevega telesca; G – črevo; Hp – hepatopankreas

## 4.2 HISTOKEMIJA IN ULTRASTRUKTURA KALCIJEVIH TELESC

Anteriorna kalcijeva telesca se od posteriornih močno razlikujejo v kemijski sestavi in ultrastrukturi.

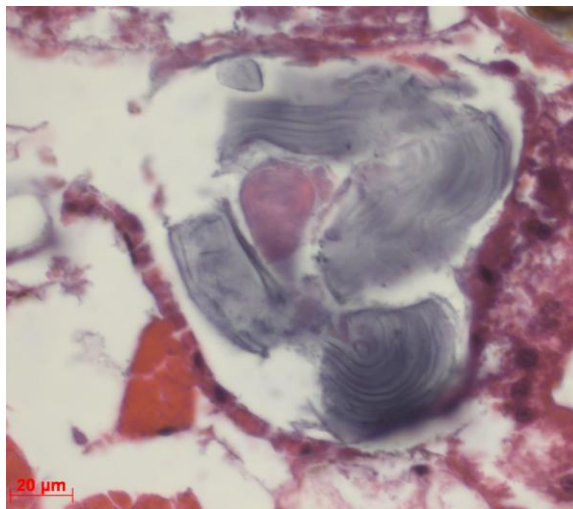
### 4.2.1 Anteriorna kalcijeva telesca

Cevke anteriornega para telesc so povezane z izrastki z zelo ozkim pecljem (slika 26), ki je prisoten pri vseh preiskovanih živalih.

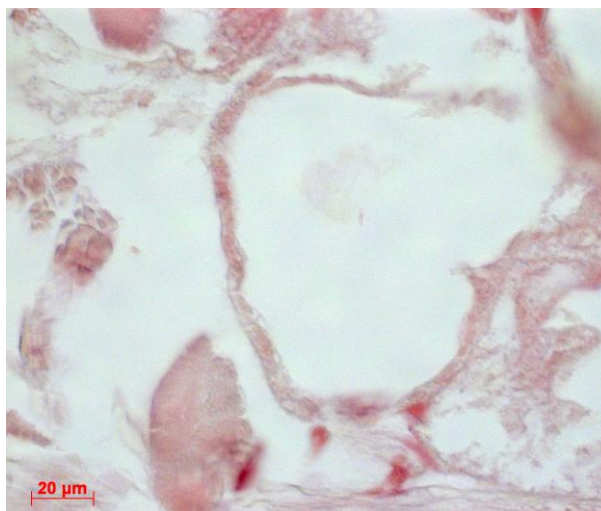


Slika 26: Povezava anteriornega kalcijevega telesca z izrastkom.  
Prečna rezina, barvanje hematoksilin in eozin, 100x povečava.

Vsebina obeh anteriornih telesc in njunih izrastkov je enaka. Vsebino tvori matriks, ki se homogeno barva s hematoksilinom, v osrednjem delu pa tudi z eozinom (slika 27). Del matriksa, ki se barva s hematoksilinom, izgleda koncentrično plastovit. Na rezinah, barvanih z alizarinom, so anteriorna kalcijeva telesca skoraj prazna, ohranjen je le centralni del, ki se sicer barva z eozinom (slika 28).



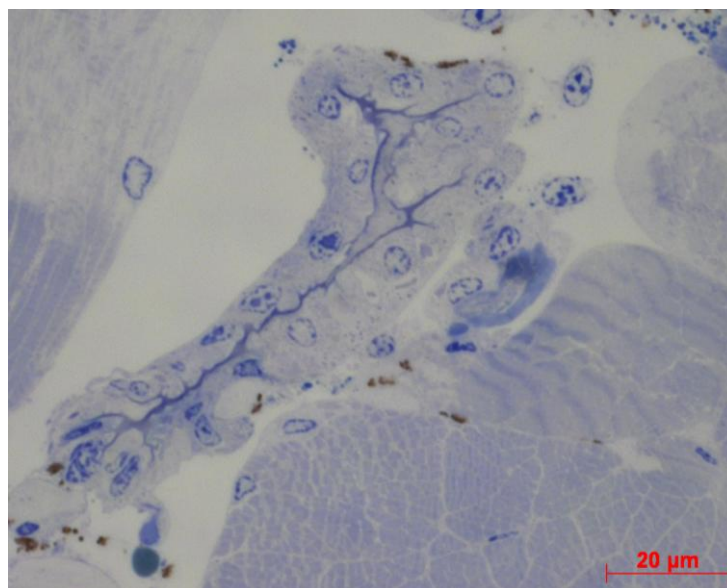
Slika 27: Matriks anteriornega kalcijevega telesca  
Prečna rezina, barvanje hematoksilin in eozin, 100x povečava.



Slika 28: Anteriorno kalcijevo telesce  
Prečna rezina, barvanje alizarin, 100x povečava.



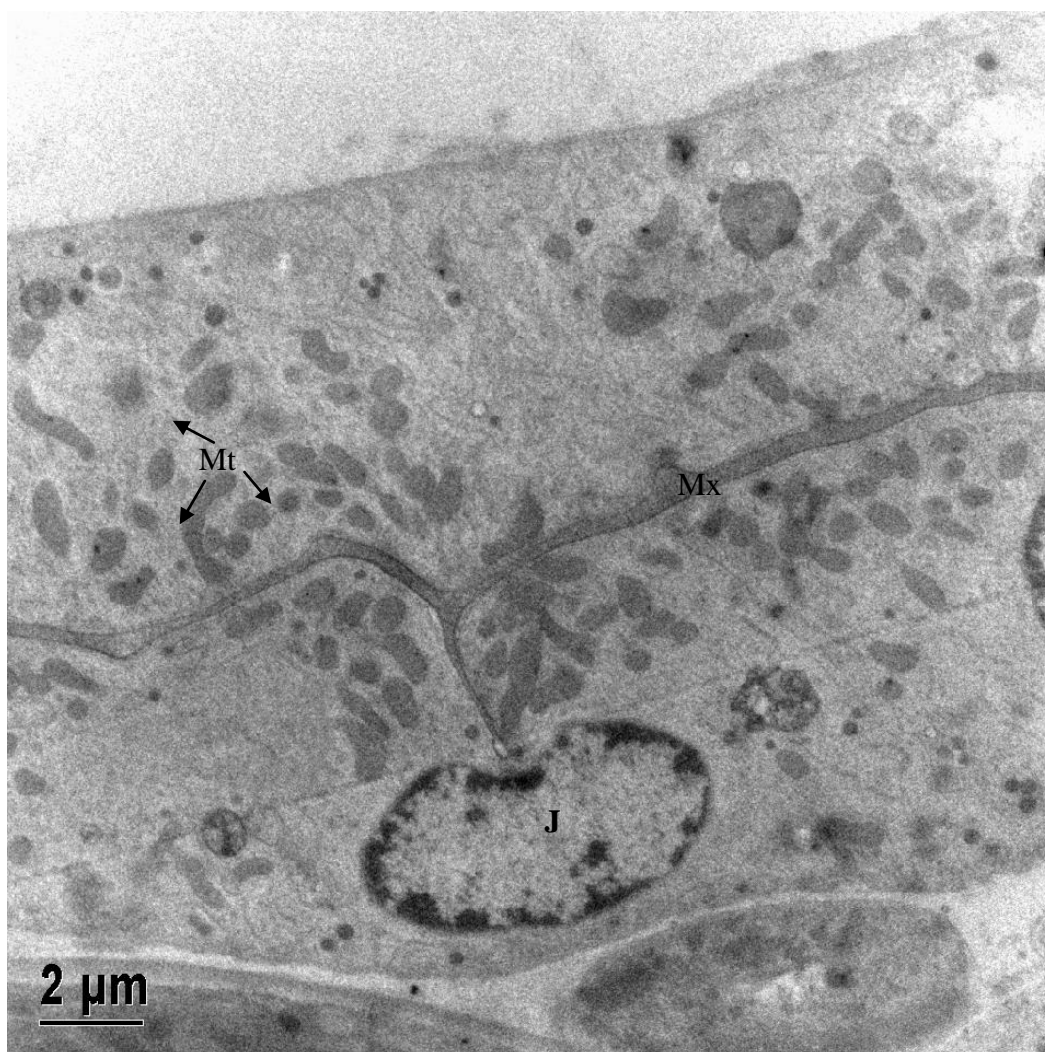
Na poltankih rezinah vsebuje anteriorno kalcijevo telesce malo matriksa (slika 29). ki se ob robu obarva temno modro, centralno pa svetleje. Jedra epitelnih celic so okrogla, nameščena v sredini.



Slika 29: Vzdolžni prerez anteriornega kalcijevega telesca. Poltankna rezina.

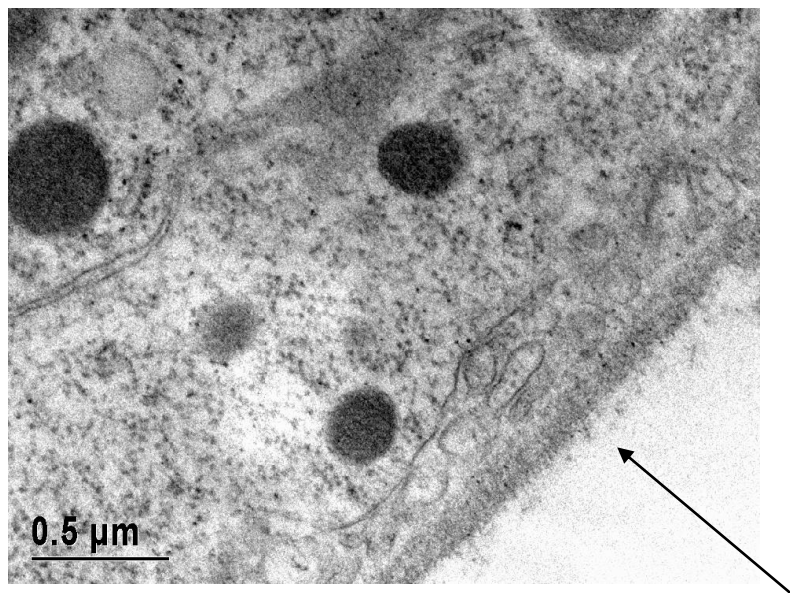


Pregled anteriornega kalcijevega telesca s presevnim elektronskim mikroskopom je pokazal, da kalcijevo telesce v tem preparatu vsebuje malo matriksa. Epitelne celice vsebujejo veliko mitohondrijev, ki so večinoma razporejeni v apikalnem delu celic ob lumnu telesca in vsebujejo precej osmiofilnih zrn. Jedra vsebujejo relativno malo heterokromatina, večinoma je nameščen ob ovoju (slika 30).

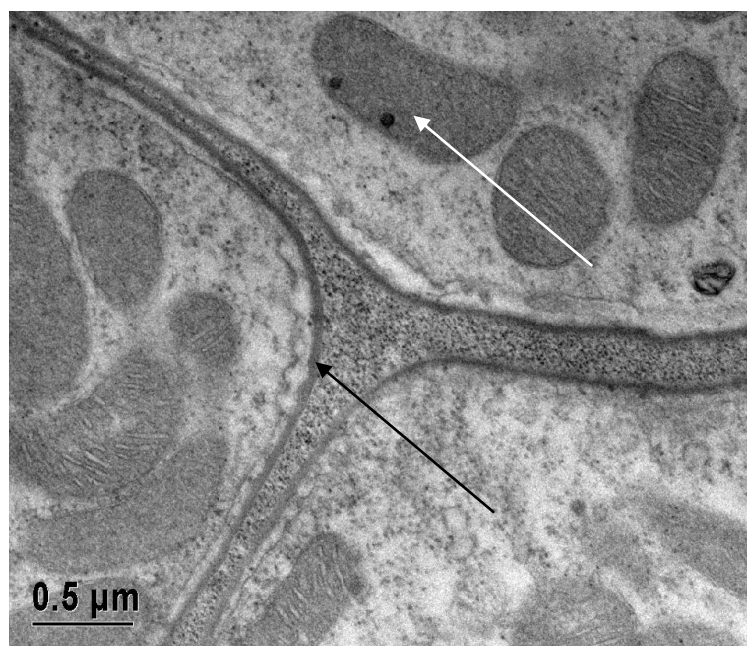


Slika 30: Vzdolžni prerez anteriornega kalcijevega telesca.  
Presevni elektronski mikroskop. J – jedro, Mt – mitohondrij, Mx – matriks

Bazalni labirint je relativno slabo razvit (slika 31). Apikalna membrana je malo nagubana in prekrita s tanko plastjo elektronsko gostega zunajceličnega matriksa (slika 32). Na membrani so elektronsko gosta področja, v apikalni citoplazmi so krajše cisterne GER.

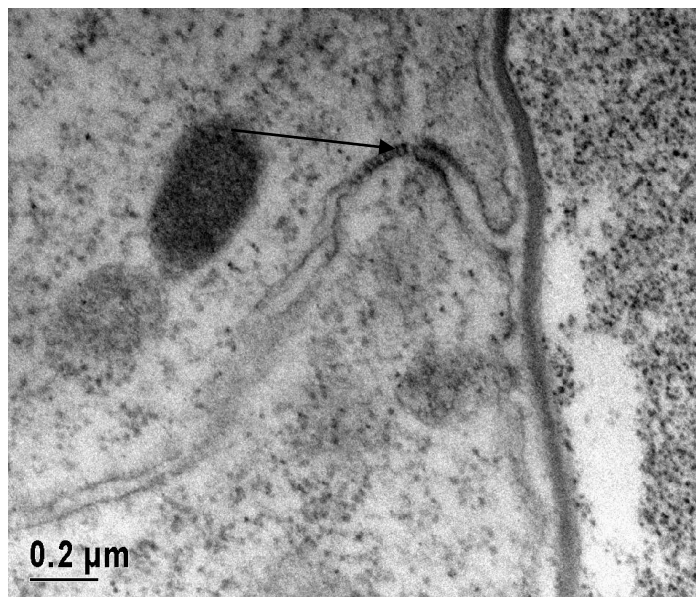


Slika 31: Bazalni del epitela anteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop. Bazalni labirint je označen s puščico.

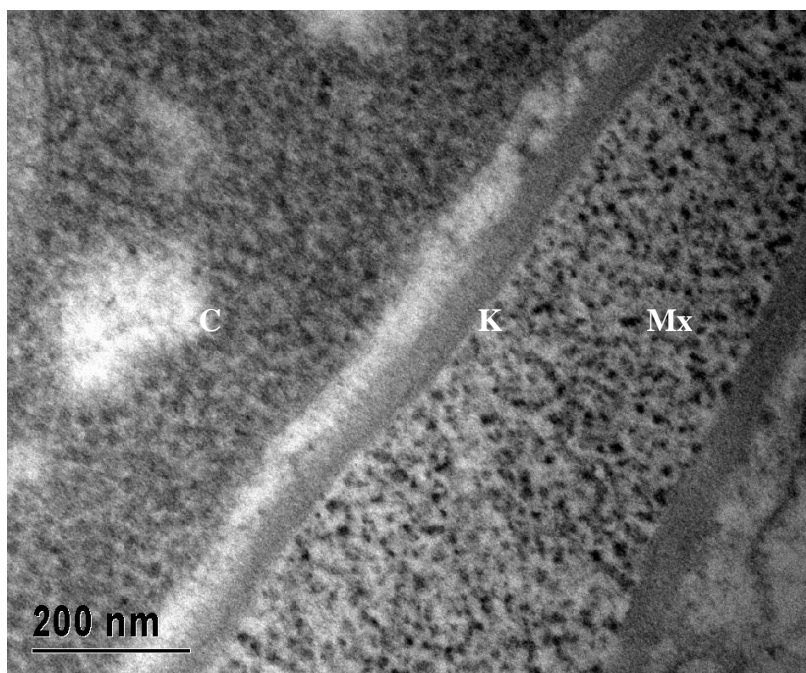


Slika 32: Apikalni del epitela anteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop. Mt – mitohondrij, Mx – matriks v lumnu, K – tanka plast elektronsko gostega matriksa, črna puščica označuje elektronsko gosto področje na membrani, bela pa osmiofilno zrno v mitohondriju.

Epitelne celice so povezane s septnimi stiki (slika 33). Matriks v lumnu kalcijevega telesca je precej homogen in vsebuje relativno veliko elektronsko gostih zrn (slika 34).



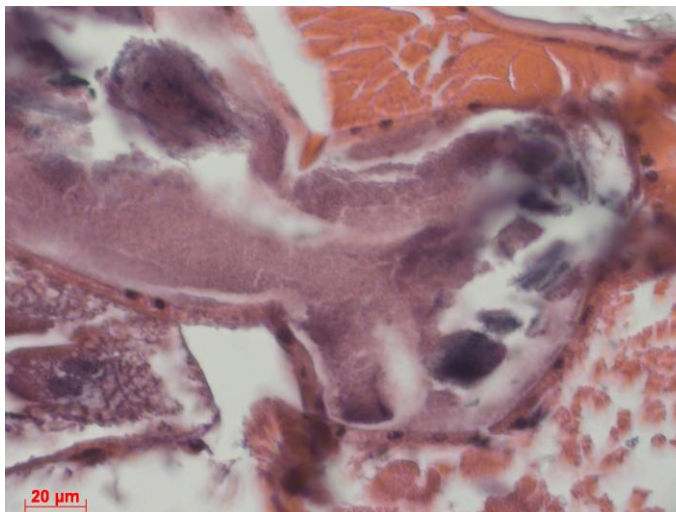
Slika 33: Septni stik med epitelnimi celicami anteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop. Črna puščica označuje septni stik.



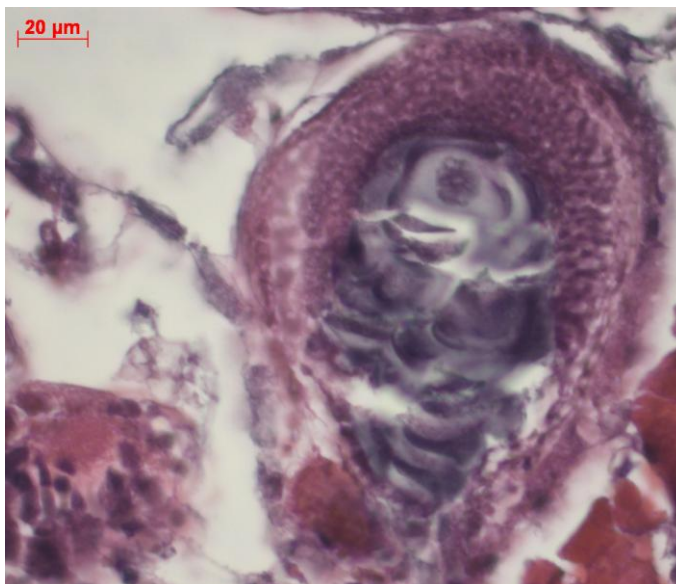
Slika 34: Matriks anteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop. Mx – matriks v lumnu, K – tanka plast elektronsko gostega matriksa, C – citoplazma. Puščica označuje plazmalemo.

#### 4.2.2 Posteriorna kalcijeva telesca

Posteriorni telesci tvorita širšo, kanalsko povezavo z izrastki (slika 25, 35), ki smo jo našli pri vseh preiskovanih osebkih. Tudi vsebina posteriornih telesc in izrastkov je matriks, v katerem se relativno dobro ločita osrednje in robno področje. Osrednje področje je na preparatih bolj krhko in se zato pri rezanju lomi. Obe področji se barvata z eozinom in hematoksilinom, vendar se centralno področje bolj barva s hematoksilinom, robno pa z eozinom (slika 36).



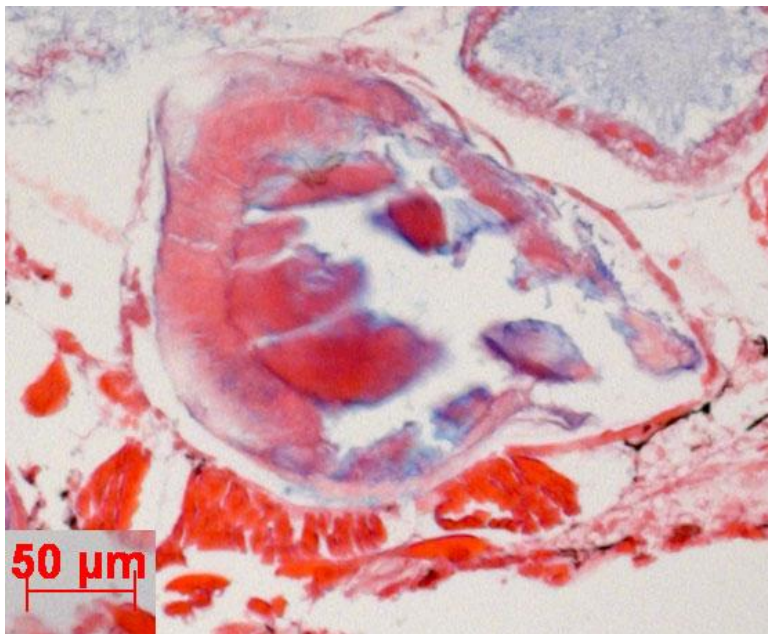
Slika 35: Povezava med glavno cevko posteriornega kalcijevega telesca in izrastkom. Prečna rezina, barvanje hematoksilin in eozin, 100x povečava



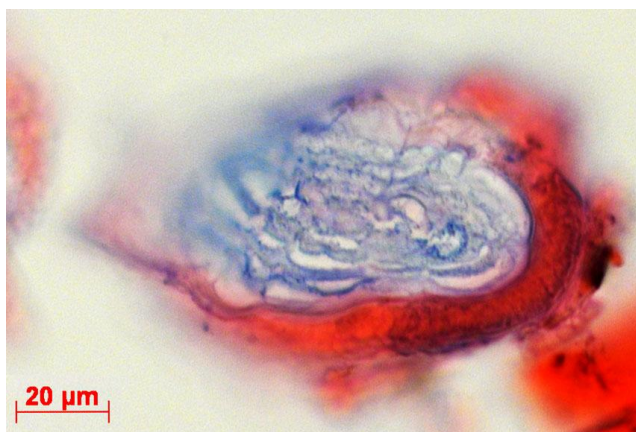
Slika 36: Matriks posteriornega kalcijevega telesca. Prečna rezina, barvanje hematoksilin in eozin, 400x povečava.



V medianem delu posteriornih kalcijevih telesc se ves matriks obarva z alicianom in eozinom (slika 37), med tem ko se v skrajno posteriornem delu telesc matriks obarva le z alicianom (slika 38).

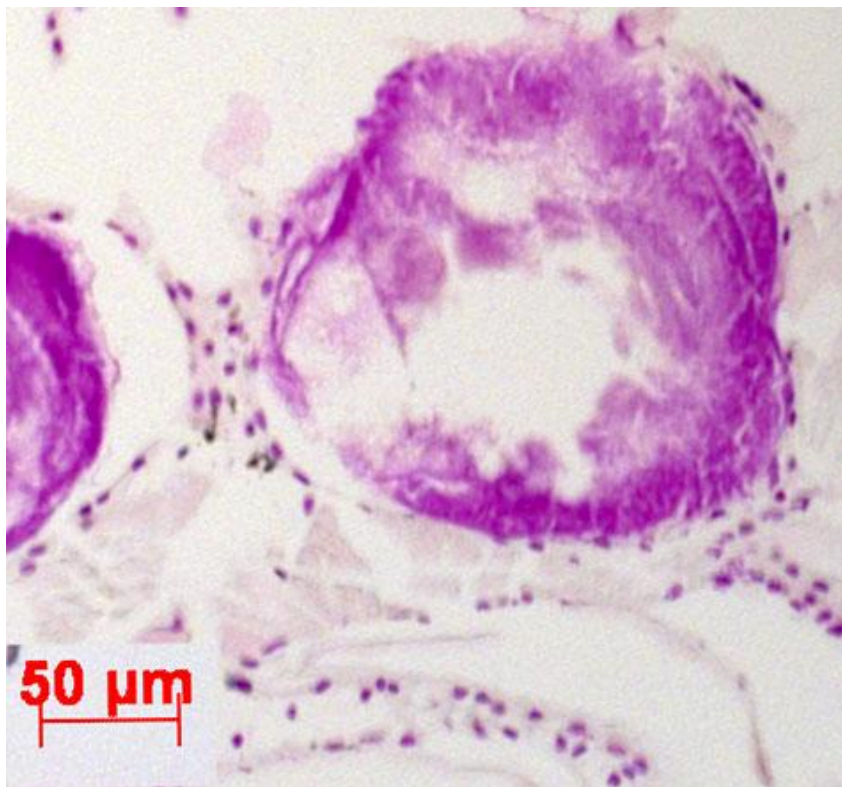


Slika 37: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca.  
Prečne rezina, barvanje eozin, alcian, 400x povečava.



Slika 38: Matriks v posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca.  
Prečne rezina, barvanje eozin, alcian, 400x povečava.

Robno področje matriksa posteriornega para telesc se po Feulgnu obarva vijolično (slika 39).

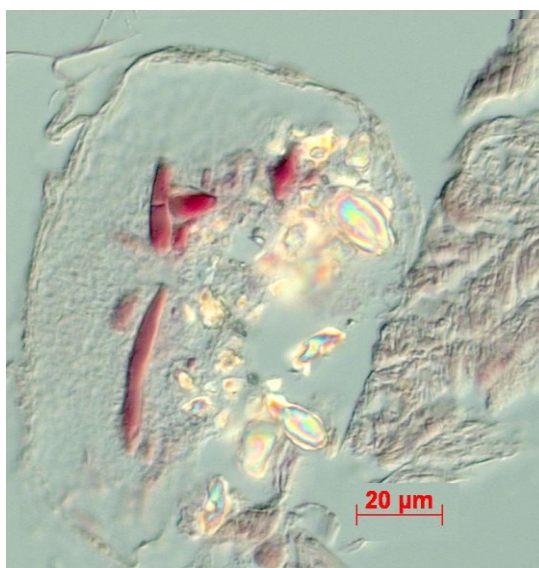


Slika 39: Matriks posteriornega kalcijevega telesca.  
Prečna rezina, barvane po Feulgeu, 400x povečava

Pri barvanju z alizarinom je matriks prisoten po vsem lumnu posteriornih kalcijevih telesc. V medianem delu se matriks skoraj ne obarva z alizarinom, vključuje pa podolgovate strukture, ki se močno obarvajo z alizarinom in strukture kristalnega videza, ki se z alizarinom ne obarvajo (slika 40). Diferencialno interferenčni kontrast pokaže, da imajo strukture kristalnega videza tudi kristalno rešetko, saj zaradi sukanja polarizacijske ravnine izgledajo mavrično (slika 41).

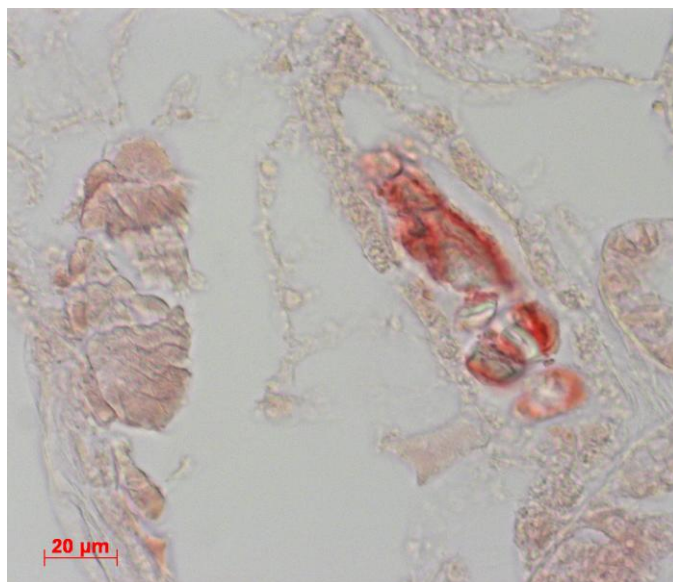


Slika 40: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca.  
Prečne rezina, barvanje alizarin, 400x povečava.

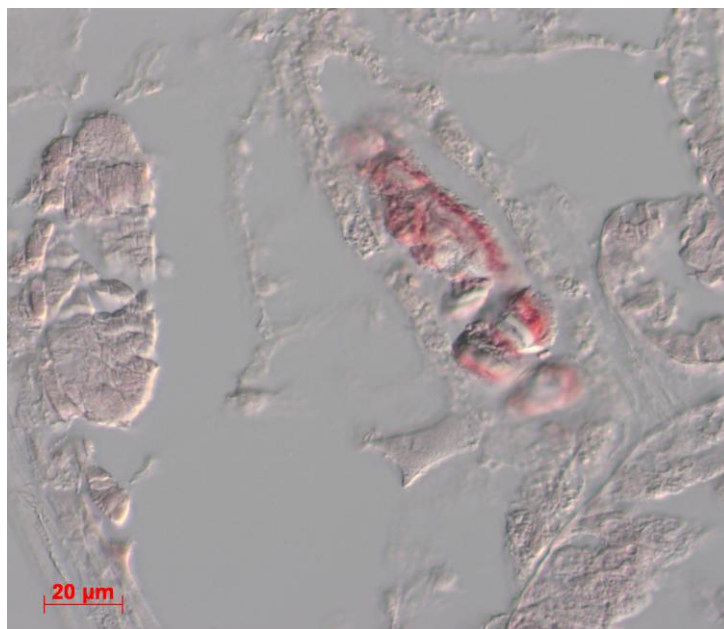


Slika 41: Matriks v medianem delu posteriornega kalcijevega telesca.  
Prečne rezina, barvanje alizarin, diferencialno interferenčni kontrast, 400x povečava.

V smeri proti zadnjemu delu posteriornega para kalcijevih telesc je v matriksu vedno manj kristalnih struktur, matriks pa vsebuje vedno več predelov, ki se intenzivno barvajo z alizarinom. V skrajno posteriornem delu je matriks že ves obravan z alizarinom (sliki 42). Diferencialno interferenčni kontrast pokaže, da ima vsebina matriksa drugačno optično gostoto od ostalega tkiva, saj deluje bolj izbočeno (slika 43).



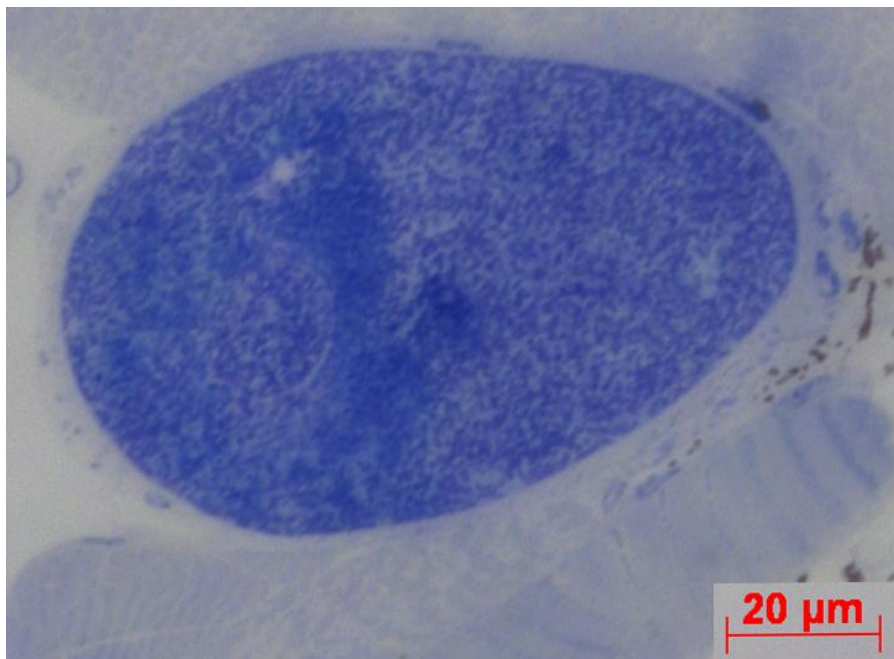
Slika 42: Matriks v skrajno posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca. Prečne rezina, barvanje alizarin, 400x povečava.



Slika 43: Matriks v skrajno posteriornem delu posteriornega kalcijevega telesca. Prečne rezina, barvanje alizarin, diferencialno interferenčni kontrast, 400x povečava.

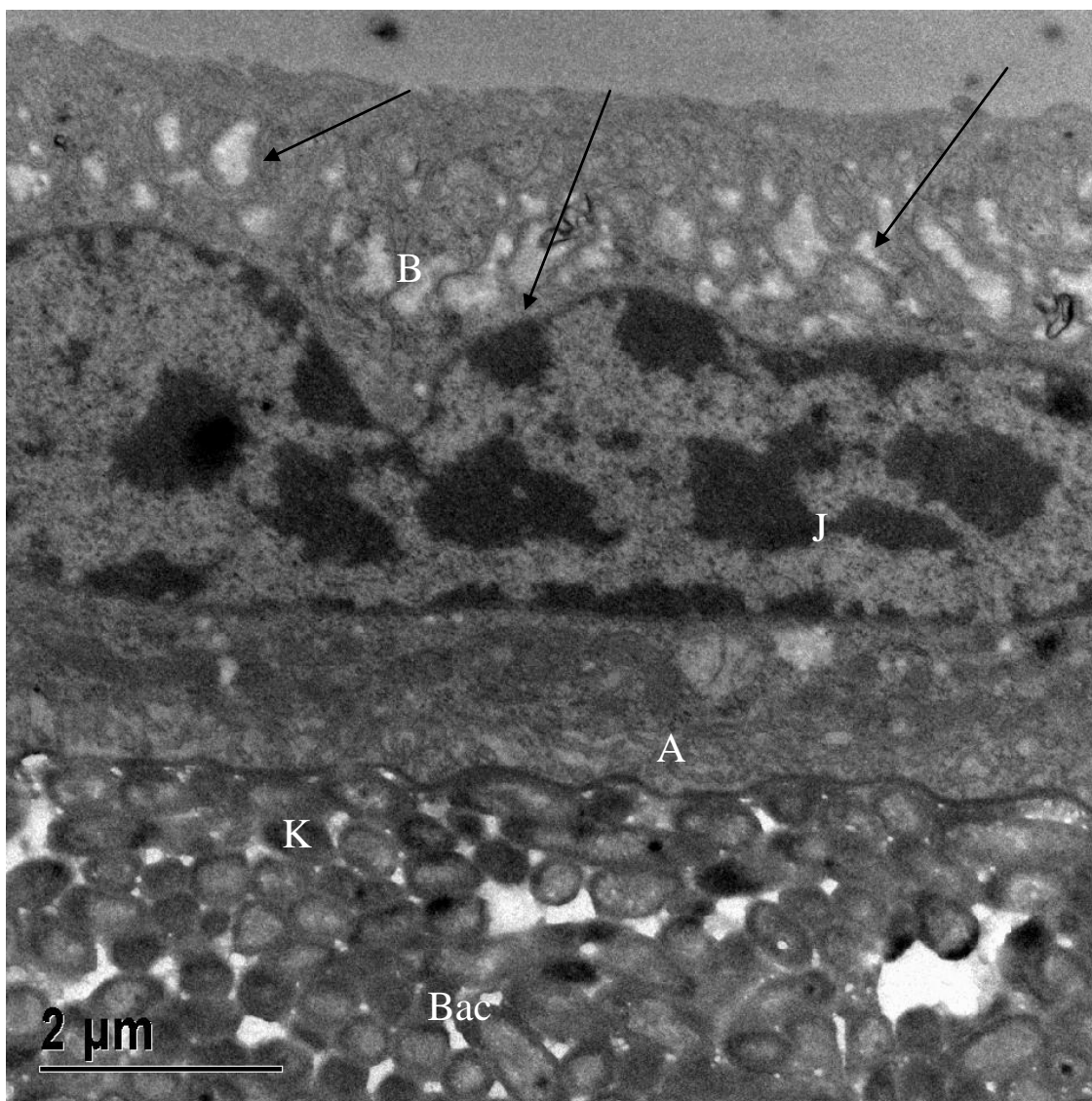
Na poltankih rezinah se matriks posteriornih kalcijevih telesc obarva intenzivno modro, epitel, ki ga obdaja pa je zelo svetel (slika 44)





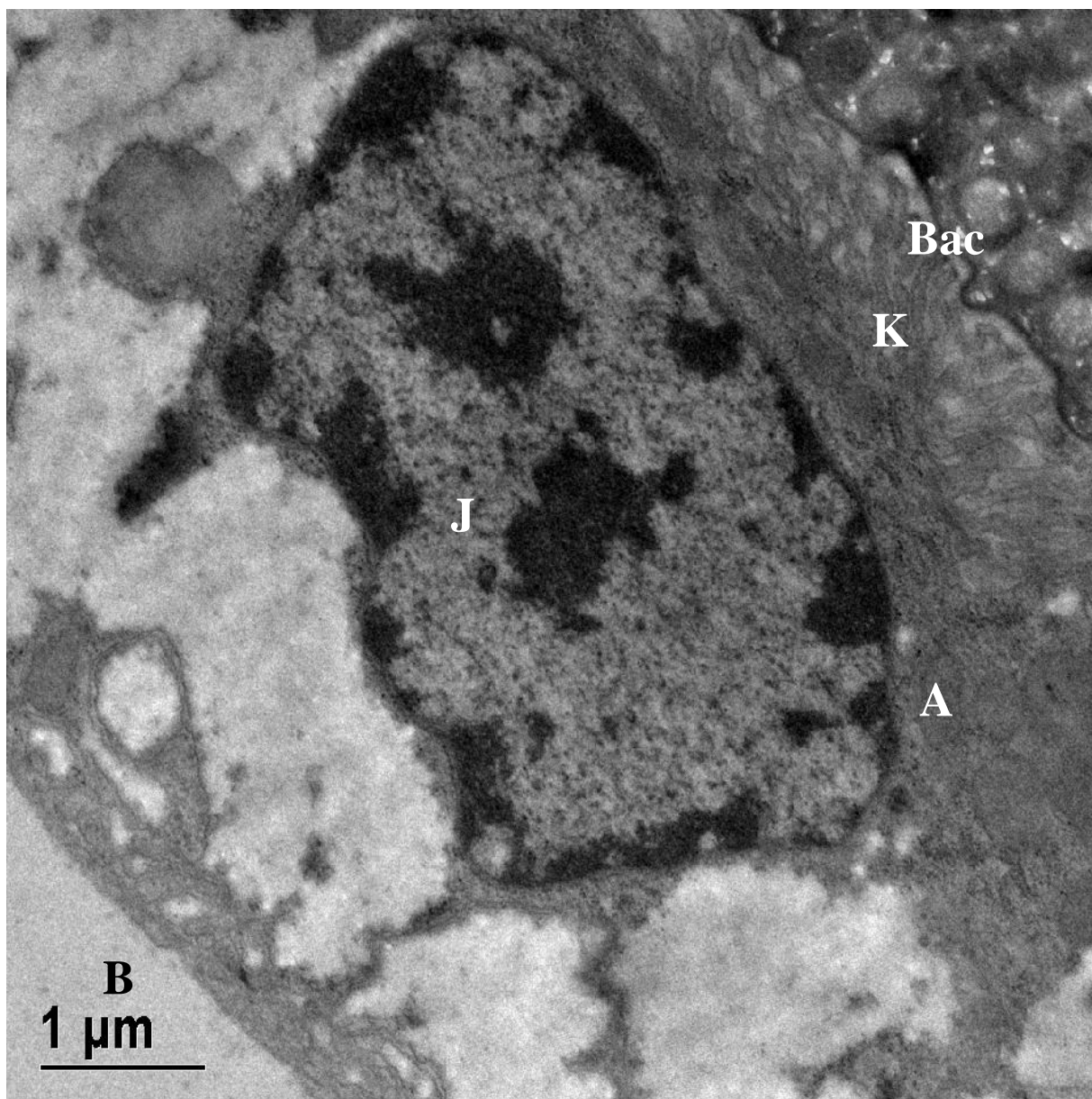
Slika 44: Poltanka rezina posteriornega kalcijevega telesca.  
Vzdolžni prerez, 1000x povečava

Ultrastruktura epitelinih celic kaže na izrazito polarno zgradbo epitela posteriornih kalcijevih telesc (sliki 45 in 46).



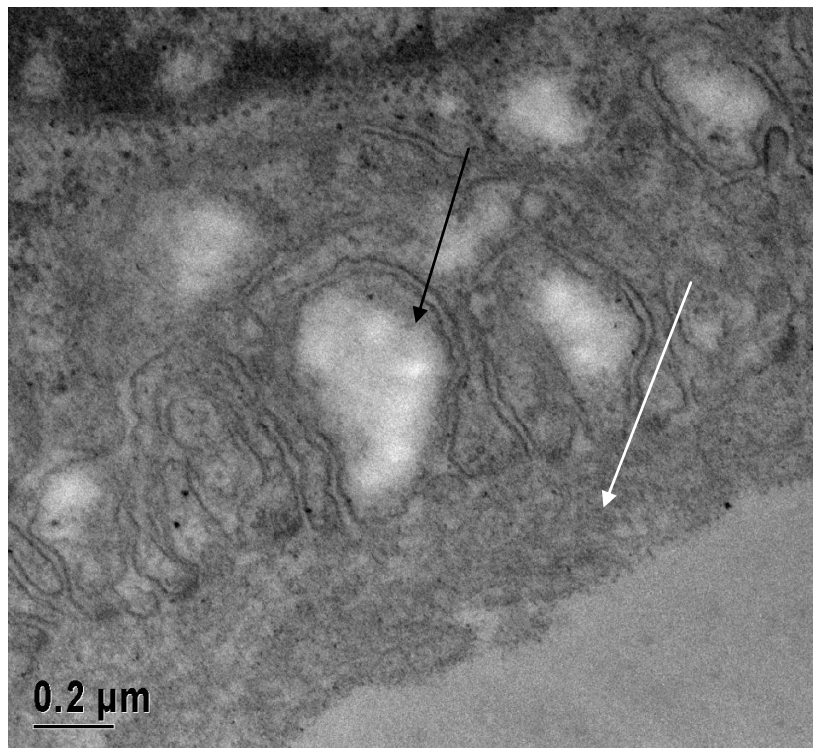
Slika 45: Epitel in del matriksa posteriornega kalcijevega telesca.

Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. B – bazalni del celice, J – jedro, A – apikalni del celice, K – tanka plast elektronsko gostega matriksa, Bac – bakterijam podobne paličaste strukture v lumnu telesca. S puščicami so označena elektronsko redka področja.

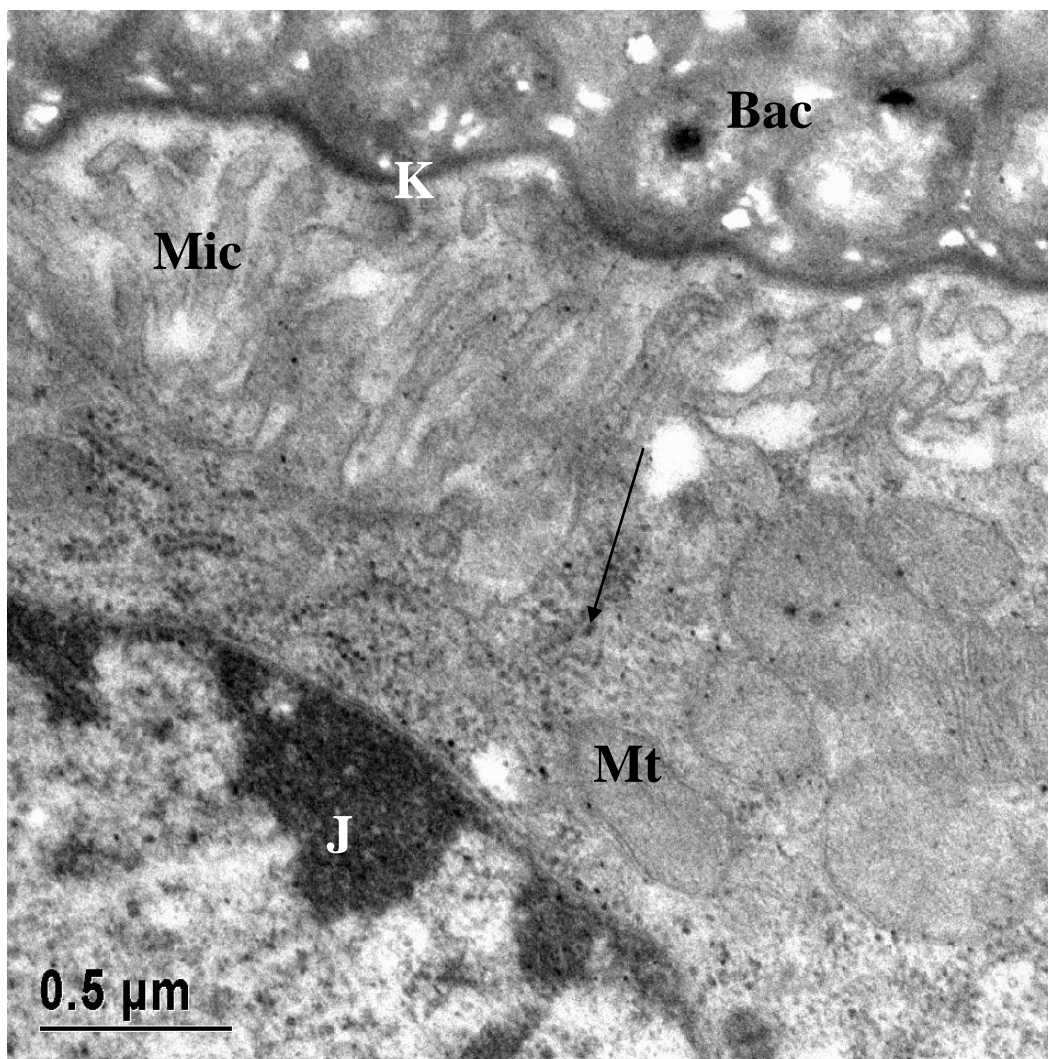


Slika 46: Epitel in del matriksa posteriornega kalcijevega telesca.  
Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. B – bazalni del celice, J – jedro, A – apikalni del celice, K - tanka plast elektronsko gostega matriksa, Bac – bakterijam podobne paličaste strukture v lumnu telesca. S puščicami so označena elektronsko redka področja v bazalnem delu celice.

Od bazalnega dela proti apikalnemu si sledijo zelo gost bazalni labirint, katerega uvihki segajo do retikuluma ob jedru (slika 47), vmes so elektronsko redka območja citoplazme (slike 45, 46 in 47). Jedra so velika in ovalna s precej heterokromatina. V apikalnem predelu je veliko mitohondrijev, apikalna celična membrana tvori dolge prstaste izrastke (slika 48). Membrano prekriva elektronsko gosta plast apikalnega zunajceličnega matriksa ob katerem so zgoščene bakterije.



Slika 47: Bazalna lamina in bazalni labirint epitelne celice.  
Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. S črno puščico je označeno elektronsko redko področje, z belo pa bazalna lamina.

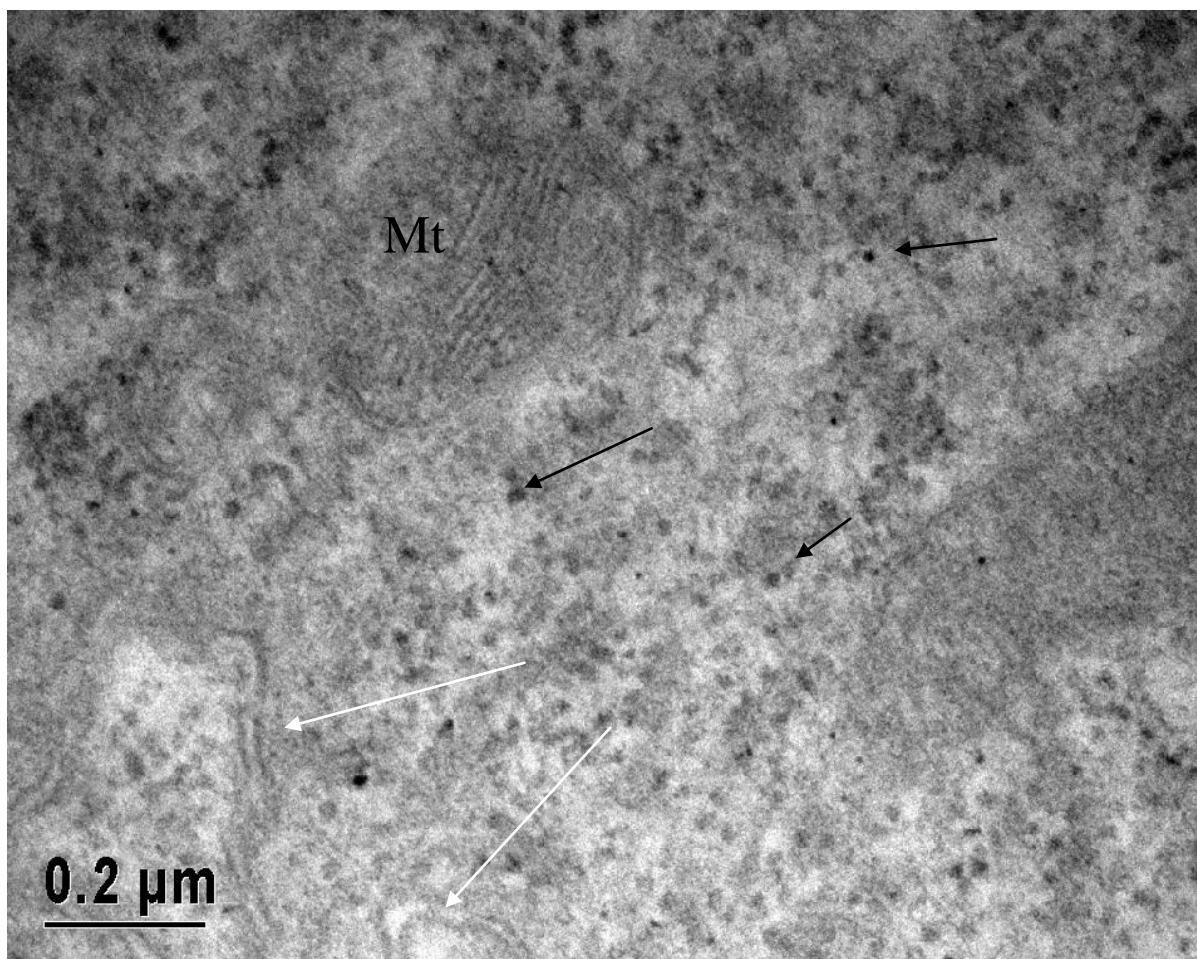


Slika 48: Apikalni del epitelne celice.

Presečni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. Bac – bakterijam podobne paličaste strukture, J – jedro, Mt – mitohondrij, Mic – mikrovili, K - tanka plast elektronsko gostega matriksa. S puščico je označen zrnati endoplazemski retikulum.



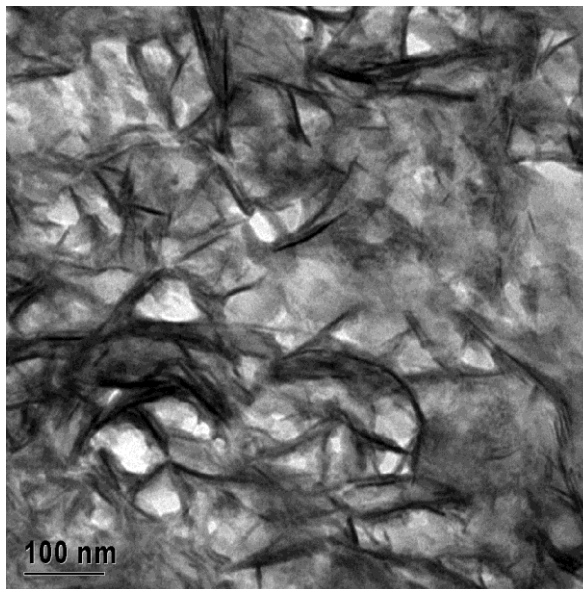
Citoplazma epitelnih celic je relativno gosta; vsebuje precej endoplazemskega retikuluma, mitohondrije in elektronsko gosta zrnca (slika 49).



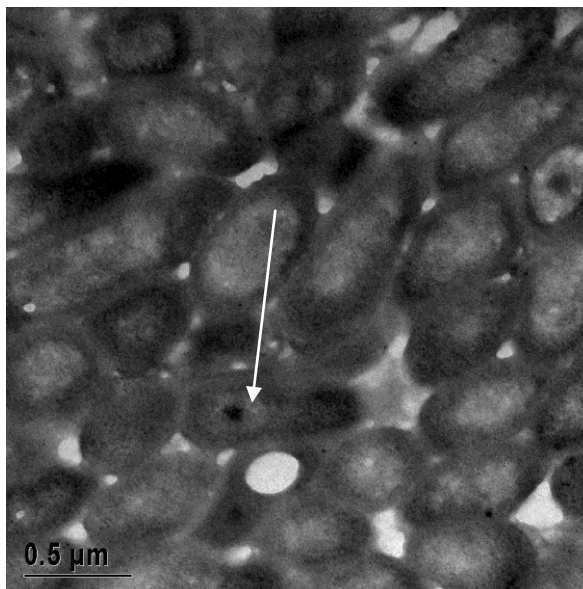
Slika 49: Citoplazma epitelne celice.

Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. Mt – mitohondrij. S črnimi puščicami so označeni elektronsko gosti makromolekularni kompleksi, z belimi puščicami pa endoplazemski retikulum.

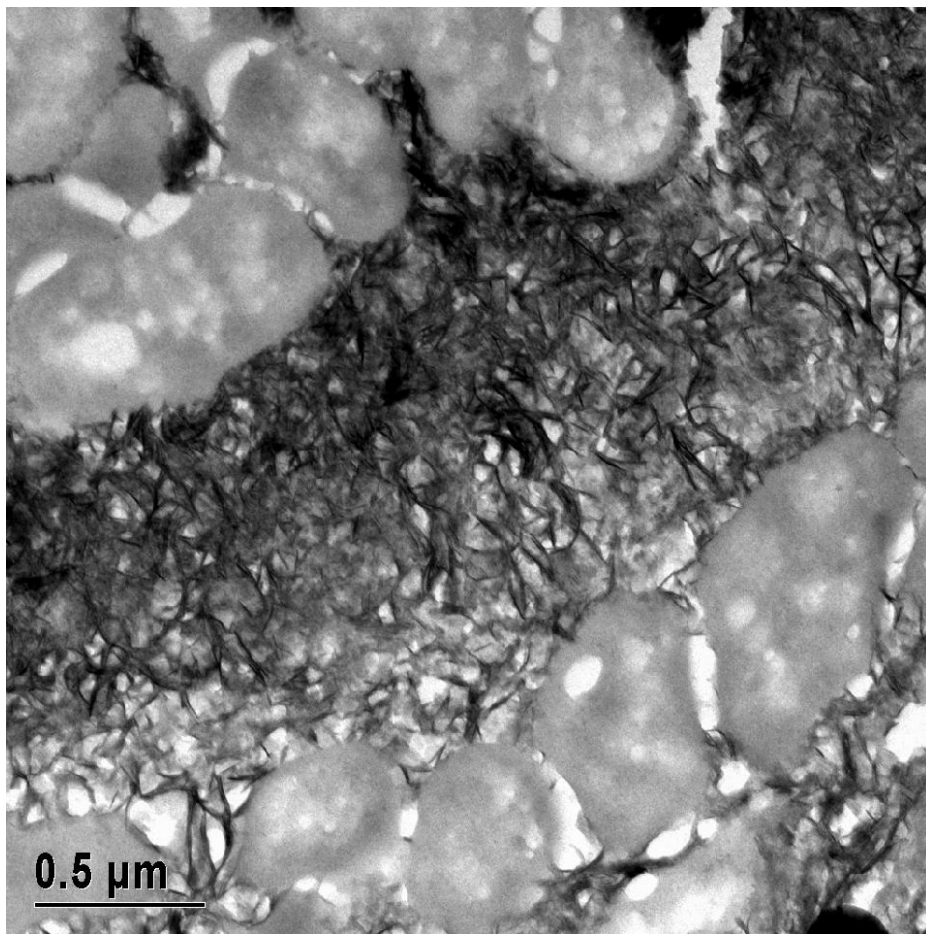
V matriksu se izmenjujejo področja s kristalno strukturo (sliki 50 in 52) in področja gosto nagnetenih paličastih struktur (sliki 51 in 52). Bakterijam podobne, paličaste strukture so večinoma orientirane prečno na os telesca in vsebujejo elektronsko goste vključke (sliki 45 in 51).



Slika 50: Kristalno področje matriksa posteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez.



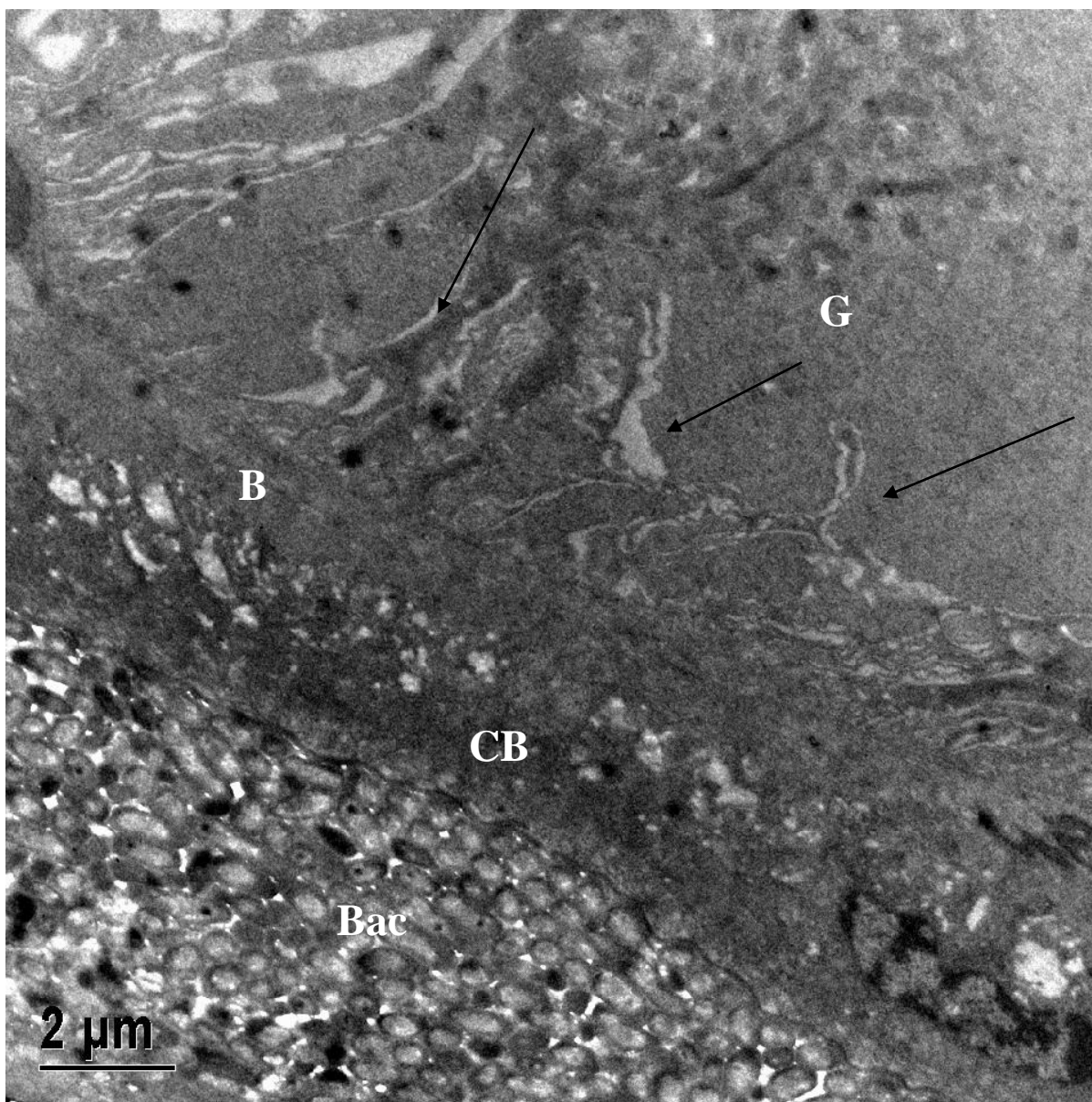
Slika 51: Področje paličastih struktur v matriksu posteriornega kalcijevega telesca. Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. S puščico je označeno elektronsko gosto zrno.



Slika 52: Matriks posteriornega kalcijevega telesca.  
Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez..



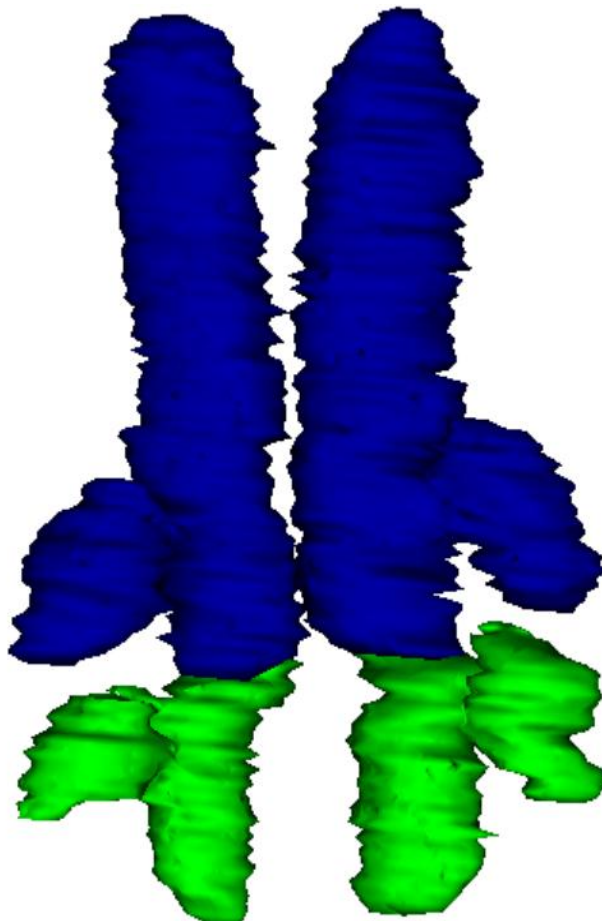
Na mestu, kjer se kalcijevo telesce in črevo dotikata, je plazmalema črevesnega epitela veliko bolj invaginirana kot običajno in tvori bogat bazalni labirint(slika 53).



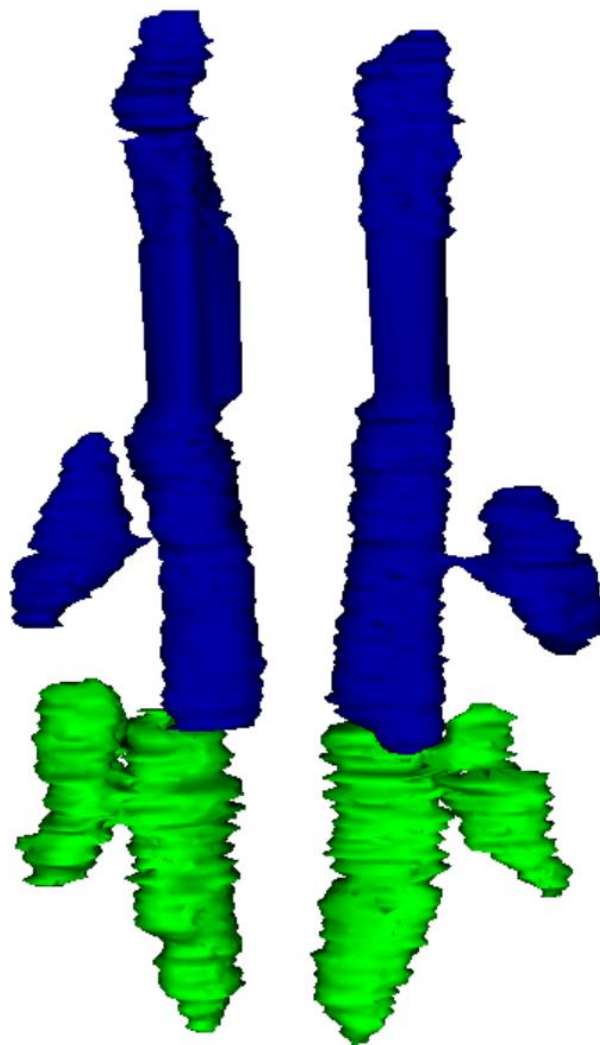
Slika 53: Stik epitelov posteriornega kalcijevega telesca in črevesa. Presevni elektronski mikroskop, vzdolžni prerez. G – črevesni epitel, B – bazalni lamini obeh epitelov, CB – epitel kalcijevega telesca, Bac – paličaste strukture. Puščica ozačuje uvihke bazalnega labirinta črevesa.

#### 4.3 KALCIJEVA TELESKA V FAZI MEDLEVITVE

Anteriorna kalcijeva telesa osebkov v medlevitveni fazi (slika 54) imajo večji premer kot anteriorna telesa osebkov, ki se ne levijo (slika 55). Povečan je tudi premer peclja, ki povezuje cevki anteriornih telesc z izrastki. Dimenzije posteriornih kalcijevih telesc so podobne pri vseh osebkih.

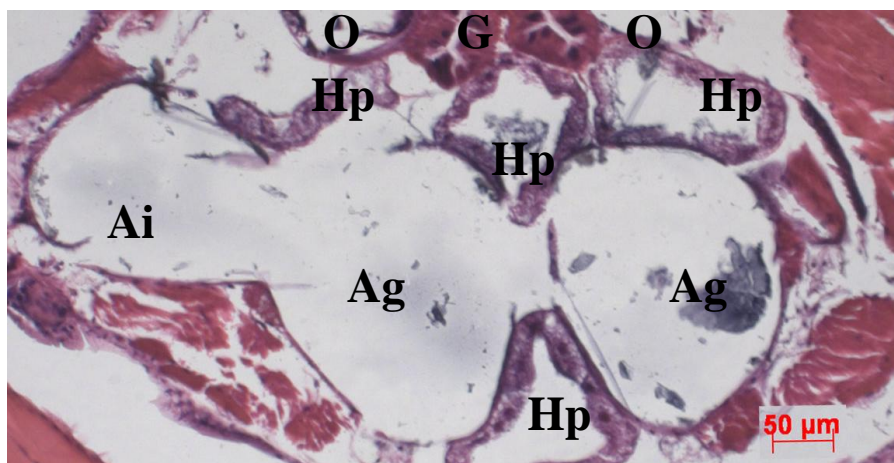


Slika 54: Kalcijeva telesa pri osebkovih v medlevitveni fazi.  
Trojdimenzionalna rekonstrukcija iz prečnih rezin, pogled z dorzalne strani. Anteriorni kalcijevi telesci: temno modro; posteriorni kalcijevi vrečki: zeleno;



Slika 55: Kalcijeva telesa pri osebkcu, ki se ne levi.  
Trodimenzionalna rekonstrukcija iz prečnih rezin, pogled z dorzalne strani. Anteriorni kalcijevi telesci: temno modro; posteriorni kalcijevi vrečki: zeleno;

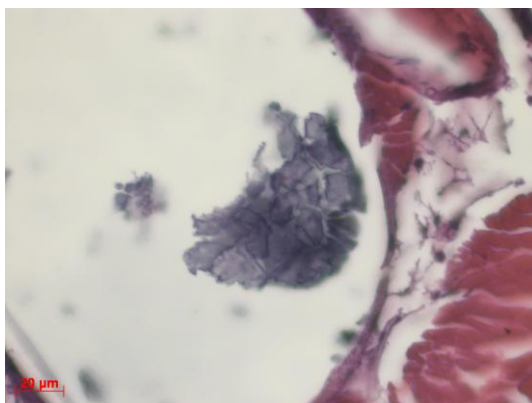
Pri osebkih v fazi med dvema levitvama obe vrečki anteriornega para kalcijevih telesc navadno obdajata mediani cevki hepatopankreasa (slika 29). Pri osebkih v fazi medlevitve pa se močno povečani anteriorni vrečki mediano dotikata, mediani cevki hepatopankreasa pa sta stisnjeni ena ventralno, druga pa dorzalno v nastalem žlebu med anteriornima vrečkama (slika 56).



Slika 56: Anteriorna kalcijeva telesa pri osebku v medlevitveni fazi. .

Prečni prerez, barvanje hematoksilin-eozin; 100x povečava. Ag – glavna cevka anteriornega kalcijevega telesca; Ai – izrastek anteriornega kalcijevega telesca; G – črevo; Hp – hepatopankreas; O – jajčnik

Kalcijeva telesa osebka v medlevitveni fazi se od kalcijevih telesc drugih osebkov razlikujejo tudi po lastnostih matriksa. Matriks v anteriornih telescih se je na rezinah vzorca v medlevitveni fazi ohranil le v sledih (slika 56, 57), ki pa se s hematoksilinom in eozinom obarvajo podobno kot pri drugih osebkih (slika 29). Centralnega dela, ki se pri drugih osebkih barva z eozinom, nismo opazili.



Slika 57: Matriks anteriornih kalcijevih telesc pri osebku v medlevitveni fazi.

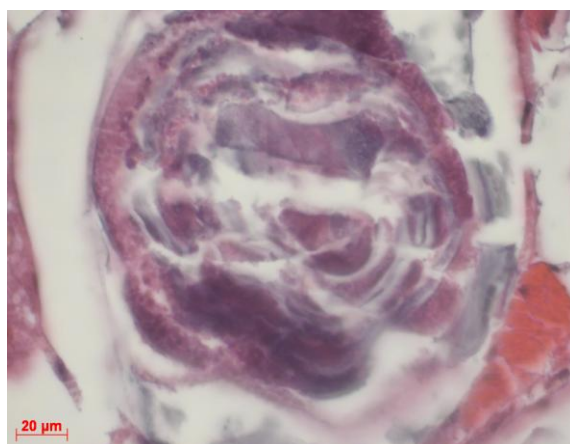
Prečni prerez, barvanje hematoksilin-eozin; 400x povečava

V posteriornih kalcijevih telescih je pri osebkih v medlevitveni fazi matriks veliko bolj koncentrično strukturiran kot pri osebkih v fazi med dvema levitvama. Plasti koncentrično organiziranega matriksa se različno obarvajo s hematoksilinom in eozinom (sliki 58 in 59).





Slika 58:Posteriorna kalcijeva telesca pri osebku v medleivtveni fazi. .  
 Prečni prerez, barvanje hematoksilin-eozin; 100x povečava. Pg – glavna cevka posteriornega telesca; Pi –  
 izrastek posteriornega kalcijevega telesca; G – črevo; Hp – hepatopankreas



Slika 59: Matriks posteriornih kalcijevih telesc pri osebku v medleivtveni fazi.  
 Prečni prerez, barvanje hematoksilin-eozin; 400x povečava

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

#### 5.1.1 Število, namestitvev in morfologija kalcijevih telesc

Rezultati potrjujejo našo predpostavko, da ima vrsta *Hyloniscus riparius* dva ločena para kalcijevih telesc. To sicer ni v skladu z opisi, ki jih navaja Ziegler (2003), namreč, da je ves kompleks kalcijevih struktur na isti strani obdan z istim epitelom in gre po njegovem le za en par depozitov kompleksne oblike. Pri našem delu smo uporabili natančne in zanesljive metode, saj so trodimenzionalne rekonstrukcije rezultat natančnega pregledovanja histoloških preparatov, kjer smo epitel natančno videli. Zanesljivo lahko trdimo, da je anteriorni par kalcijevih telesc ločen od posteriornega para.

Naša ugotovitev nasprotuje tudi podatkom, ki jih navaja Méhely (1932), ki sicer opisuje dva para kalcijevih telesc, a trdi, da oba ležita v sedmem členu pereona. Tudi iz skic je iz položaja telesc razvidno, da je avtor opisal le posteriorni par. Méhely je sicer natančno opisal metode svojega dela in navaja, da je opazoval cele živali, ki jih je predhodno razbarval. Verjetno je podobno metodo uporabil tudi Ziegler (2003), ki navaja le, da je opazoval cele živali in izolirana telesa, pri čemer je anteriorni par kalcijevih telesc izgledal prosojen. Zaradi prosojnosti ga je Méhely pri svojem delu verjetno spregledal. Enako velja tudi za povezavo med posameznim posteriornim kalcijevim telescem in izrastkom posteriornega kalcijevega telesa. Čeprav je na naših rekonstrukcijah povezava očitna, menimo, da jo je na preparatih celih živali možno spregledati in je Méhely zato izrastke opisal kot ločen par telesc. Potrditev za to najdemo v Zieglerjevih skicah, kjer je povezava med izrastki in glavnimi cevki kalcijevih telesc le nakazana.

Ugotovili smo rahla odstopanja naših opisov o namestitvi kalcijevih telesc od podatkov v literaturi. Ziegler (2003) navaja, da anteriorni par leži med tretjim in šestim členom pereona, mi pa smo ugotovili, da sega od četrtega do šestega člena. Iz Zieglerjeve skice je razvidno, da naj bi kalcijeva telesa segala le malo čez rob četrtega v tretji člen pereona, naše slike trodimenzionalnih rekonstrukcij pa kažejo, da telesa segajo le do roba četrtega člena pereona. Za posteriorni par kalcijevih telesc Méhely (1932) trdi, da v celoti leži v sedmem členu pereona, Ziegler (2003) pa navaja, da leži v šestem in sedmem členu pereona. Nobena trditev se ne ujema z rezultati naših raziskav, ki kažejo, da posteriorni par sega od šestega člena pereona do prvega člena pleona. Razlika je tu očitna in pomembna, saj dejstvo, da kalcijeva telesa segajo v pleon, kaže, da njihova vloga ni vezana zgolj na funkcionalnost v oprsnem delu telesa. Na Méhelyjevih skicah izgledajo kalcijeva telesa veliko manjša kot na naših rekonstrukcijah. Razlog za to bi bil lahko predolg čas fiksacije ali drugi postopki, ki povzročajo krčenje tkiva, ali pa so bile živali drugačnih dimenzij ali fizioloških stanj. Druga možnost je tudi, da je robni del matriksa na preparatih prosojen in ga je zato spregledal. Kar se tiče Zieglerjevih ugotovitev pa je iz njegovega opisa razvidno,

da gre za napačno interpretacijo, saj sternit sedmega člena pereona prekriva prvi člen pleona, telesca pa na skici segajo v ta podaljšek sternita.

Očitna je tudi razlika v legi izrastkov, za katere naše rekonstrukcije kažejo, da se z glavnimi cevkami vedno povezujejo na meji med dvema členoma, izrastek pa sega v oba člena. Ziegler (2003) postavlja izrastek anteriornih telesc v celoti v šesti člen pereona, izrastek posteriornih telesc pa v sedmi člen pereona. O razlogih za taka odstopanja ne moremo sklepati, saj kot rečeno Ziegler (2003) ne navaja metod dela. Izpostavimo lahko le dejstvo, da so naše metode dela natančne in zanesljive. Namestitev izrastkov in povezav v člen ali na mejo med dvema členoma je pomembna, saj kaže na izvor in vlogo struktur.

Opozorili bi še na eno očitno razliko med opisi Zieglerja (2003) in našimi trodimenzionalnimi rekonstrukcijami. Na Zieglerjevi skici se legi anteriornega in posteriornega para v šestem členu pereona ne prekrivata, med tem ko je iz naših rekonstrukcij jasno, da anteriorni par v tem delu leži nad posteriornim. To dejstvo potrjujejo tudi histološke rezine.

Zadnja razlika med podatki v literaturi in našimi rezultati so povezave med deli kalcijevih telesc. V opisih iz literature (Ziegler 2003) so vse povezave le nakazane in vse so narisane enako. Predvidevamo, da je avtor o povezavah le sklepal, ni pa bil pripravljen podati trdnih zaključkov o njihovi pristotnosti in obliki. Iz naših rekonstrukcij je razvidno, da so peclji izrastkov anteriornega para veliko ožji od povezav izrastkov posteriornega para z glavnimi cevkami telesc, povezava med anteriornimi in posteriornimi telseci pa ne obstaja.

Čeprav smo sprva domnevali, da so kalcijeva telesca povezana z drugimi tkivi, pa smo s trodimenzionalno rekonstrukcijo pokazali, da gre za izolirane samostojne strukture. Povezav z drugimi tkivi sicer ne omenjata niti oba članka, ki natančneje opisujeta kalcijeva telesca (Méhely 1932, Ziegler 2003). Smo pa pokazali, da vsa kalcijeva telesca potekajo tesno ob cevkah hepatopankreasa po vsej svoji dolžini, mestoma pa tudi ob črevesu. To ne velja za izrastke, kar kaže na njihovo drugačno vlogo. Na mestih tesnega naleganja na črevo je bazalni labirint črevesnega epitela veliko gostejši kot sicer. To kaže na živahno izmenjavo snovi med črevesom in kalcijevimi telseci.

### 5.1.2 značilnosti matriksa kalcijevih telesc

Ziegler (2003) je natančno opisal, kateri elementi sestavljajo matriks kalcijevih telesc pri vrstah *Trichoniscus pusillus*, *Androniscus roseus*, *Haplophthalmus montivagus* in *Hyloniscus riparius*. Glede na močno obarvanje matriksa anteriornega para kalcijevih telesc s hematoksilinom sklepamo, da prevladuje mineralna komponenta, saj McGee-Russell (1958) navaja, da hematoksilin obarva kalcijeve depozite, pri določenih pogojih celo specifično. Zanimivo je obarvanje centralnega dela z eozinom, kar kaže na vsebnost



bazičnih organskih komponent. Katere so te komponente in kakšna je njihova vloga je tema prihodnjih raziskav.

Pri barvanju z alizarinom, ki obarva kalcij se je sprala vsa vsebina anteriornih telesc. Metoda barvanja z alizarinom namreč zahteva zelo kislo okolje (pH 4), v katerem se mineral raztaplja, barvilo pa se veže na raztopljen kalcij. Glede na to, da je kalcij v anteriornem paru telesc zagotovo prisoten (Ziegler, 2003) lahko sklepamo, da gre za zelo topno obliko minerala, ter da je prisotnost drugih komponent zelo majhna. Druge komponente se namreč med postopkom ne sperejo. Dejstvo, da je matriks anteriornih telesc pretežno mineralen, je verjetno razlog za prosojen videz telesc, ki ga navaja Ziegler (2003). To je verjetno tudi razlog, da so anteriorna telesca vzorcev za poltanke rezine in presevno elektronsko mikroskopijo, ki so dlje stali v fiksativu, stisnjena in skoraj prazna, saj se kalcij raztaplja v paraformaldehidu.

Anteriorno kalcijevo telesce vsebuje elektronsko goste delce nanometrskih dimenzij. Verjetno gre za organsko komponento matriksa, saj se je mineralna komponenta večinoma sprala pri fiksiranju.

Pri prisotnosti mineralov v posteriornem paru kalcijevih telesc je situacija obratna, saj glede na barvanje s hematoksilinom in eozinom centralni del matriksa vsebuje več mineralov. Poleg mineralov matriks posteriornih kalcijevih telesc vsebuje tudi kisle ogljikove hidrate, saj se intenzivno obarva z alcian modrim. Tu ne gre za jasno koncentričnost, temveč bolj za področja v matriksu, ki se barvajo z eozinom in področja, ki se barvajo z alcian modrim. Zanimivo je, da se v skrajno posteriornem delu matriks ves obarva le z alcian modrim.

Pri barvanju z alizarinom smo dobili nekaj nepričakovanih, vendar zanimivih rezultatov. Glede na rezultate barvanja anteriornih kalcijevih telesc smo pričakovali, da bo tudi vsebina posteriornih telesc sprana, vendar se je matriks ohranil tudi v skrajnem posteriornem delu, kjer se je močno obarval. Sklepamo lahko, da v tem delu kalcij stabilizira organski matriks, ki vsebuje ogljikove hidrate, in se zato ne spere. Fotografija z Nomarski mikroskopom kaže, da je optična gostota matriksa v tem delu izrazito drugačna od gostote ostalih tkiv v preparatu. Zelo zanimiv rezultat je tudi, da so v osrednjem delu prisotne paličaste strukture, ki vsebujejo veliko kalcija in niso kristalne, ter kristalne strukture, ki se ne barvajo z alizarinom. Ena možna razlaga je, da je v kristalih kalcij tako močno vezan, da se sploh ne raztaplja in se zato ne obarva. Druga možnost je, da kristali ne vsebujejo kalcija, ampak druge minerale. Glede na podatke iz literature (Ziegler 2003) je prva možnost sicer verjetnejša, vendar o mehanizmih, zakaj bi se del kalcija močno vezal v kristale, del šibkeje in del sploh ne, ne moremo sklepati. Pretežen del matriksa se je z alizarinom le rahlo obarval (kot vsa druga tkiva v preparatu), kar bi lahko pomenilo, da se je kalcij tudi v posteriornih telescih spral pri barvanju, ostala pa je organska komponenta, ki glede na barvanje po Feulgenu vsebuje veliko nukleinskih kislin.

Matriks posteriornih kalcijevih telesc je na preparatih za presevno elektronsko mikroskopijo mnogo bolje ohranjen kot matriks anteriornih telesc. Presenetljiva je prisotnost paličastih struktur, za katere na podlagi barvanja po Feulgenju lahko trdimo, da so bakterije. Orientirane so skoraj izključno pravokotno na kalcijevo telesce, zato na vzdolžnem prerezu izgledajo okroglo. Ker smo njihovo prisotnost zasledili pri vseh preiskovanih vzorcih, gre verjetno za bakterije, ki so stalno prisotne v kalcijevih telescih. Prisotnost osmiofilnih kalcijevih zrn v bakterijah kaže na njihovo vlogo v kalcijevem metabolizmu. Poleg bakterij matriks posteriornih telesc vsebuje tudi področja s kristalno strukturo, ki verjetno predstavlja mineralno komponento. Zanimivo je, da so področja s kristalno strukturo jasno ločena od področij z bakterijami, ki pa so tesno nameščene ena ob drugi. To razloži tudi rezultate barvanja z alcianom in eozinom, kjer so se pokazala jasno ločena področja. Iz obeh rezultatov lahko sklepamo, da področja s kristalno strukturo vsebujejo tudi ogljikove hidrate.

### 5.1.3 Ultrastruktura epitelov kalcijevih telesc

Epitel anteriornih telesc ima precejšnje število mitohondrijev, ki so večinoma razporejeni v apikalnem delu celic. To kaže na visoko stopnjo presnoven aktivnosti celic v apikalnem delu. Številna osmiofilna kalcijeva zrna v mitohondrijih kažejo na vlogo mitohondrijev pri dinamiki kalcija. Apikalna membrana skoraj ni nagubana. Jedra, ki vsebujejo zelo malo heterokromatina, kažejo na visoko stopnjo proteinske sinteze. Slabo razvit bazalni labirint ter šibko nagubana apikalna membrana kažeta, da pri živalih, ki se ne levijo relativno malo izmenjave snovi poteka skozi plazmalemo epitela kalcijevih telesc. Lestvičasti stiki med epitelnimi celicami kažejo na prehodnost manjših molekul in na relativno nizko stopnjo paracelularnega transporta. Tanka plast elektronsko gostega zunajceličnega matriksa, ki prekriva apikalni del epitela je po izgledu podobna kutikuli črevesa, ki je ektodermalnega izvora.

Epitel posteriornega para je izrazito slojevit. Bazalni labirint je zelo gost, njegovi uvihki pa segajo do endoplazemskega retikuluma ob jedru, kar kaže na živahno izmenjavo snovi med celico in bazalno lamino preko plazmaleme. Bazalni labirint je razpreden po obsežnem elektronsko redkem področju, ki so lahko ultrastrukturna posebnost epitela ali pa vsebujejo snovi, ki so se raztopile med pripravo preparata. Jedra epitela posteriornih telesc vsebujejo več heterokromatina, kar kaže na nižjo stopnjo proteinske sinteze. Nad jedri so izrazito gosto nameščeni številni mitohondriji, ki pa vsebujejo manj osmiofilnih kalcijevih zrn kot mitohondriji v epitelu anteriornih telesc. Apikalna membrana tvori izrazite prstaste izrastke, kar kaže na živahno izmenjavo snovi med celico in lumnom telesca. Tudi apikalno membrano posteriornih telesc prekriva tanka plast elektronsko gostega zunajceličnega matriksa, ki je podoben kutikuli.

Za oba epitela lahko rečemo, da imata visoko presnovno aktivnost, proteinska sinteza pa je intenzivnejša v epitelu anteriornih telesc. Lahko rečemo, da v epitelu anteriornih kalcijevih telesc poteka predvsem vezikularni transport, v epitelu posteriornih kalcijevih telesc pa predvsem transmembranski transport skozi plazmaleme. Transmembranski transport skozi epitel posteriornih kalcijevih telesc je verjetno povezan tudi z izmenjavo snovi med gostiteljem in bakterijami.

#### 5.1.4 vloga kalcijevih telesc med levitvijo

V raziskavo smo vključili le en osebek v medlevitveni fazi, saj gre le za preliminarno študijo. Zanimivo je, da je v medlevitveni fazi na račun matriksa izrazito povečan tako premer anteriornega para kalcijevih telesc, kot tudi peclja izrastkov, posteriorni par pa je glede dimenzij skoraj nespremenjen. Glede na to, da je matriks anteriornih telesc pri živalih, ki se ne levijo in pri živali v medlevitveni fazi zelo podoben, lahko sklepamo, da imajo anteriorna tesca pomembno vlogo pri skladiščenju kutikularnega kalcija med levitvijo. Verjetno se v medlevitveni fazi poveča tudi stopnja vezikularnega transporta, ki smo ga sicer opazili pri živali, ki ni kazala znakov levitve. Anteriorna tesca pri vrsti *Hyloniscus riparius* verjetno prevzamejo vlogo sternalnih depozitov, saj je to poleg vrste *Helleria brevicornis* edina znana vrsta kopenskih enakonožcev, ki jih v predlevitveni fazi ne razvije (osebna opažanja).

Matriks posteriornega para je pri živalih v medlevitveni fazi veliko bolj strukturiran kot pri živalih, ki se ne levijo. Iz tega sklepamo, da se v posteriornem paru med levitvijo odvijajo določeni procesi, ki verjetno niso povezani s skladiščenjem kalcija, vendar so na drugačen način pomembni za normalen potek levitve. Ti procesi so nedvomno povezani z bakterijami, ki smo jih našli v lumnu posteriornih telesc.

## 5.2 SKLEPI

V nalogi smo dokončno razjasnili število, namestitev in morfologijo kalcijevih telesc pri vrsti *Hyloniscus*, in odprli mnoga vprašanja onjihovi sestavi in vlogi. Najbolj nenavadno in za nadaljnje raziskave zanimivo je odkritje bakterij v lumnu posteriornih kalcijevih telesc. Nekatera osnovna vprašanja, ki se nanašajo na vrsto in časovno pojavljanje bakterij, njihovo vlogo v izmenjavi snovi z gostiteljem in drugih fizioloških procesih npr. biomineralizacijah bodo ostala za nadaljnje študije. Drugo področje, ki se ga naloga neposredno dotika vendar pušča odprta vprašanja, je vloga kalcijevih telesc med levitvijo. V širšem smislu pa je *Hyloniscus riparius* kot pogosta vrsta, ki jo je lahko gojiti v kulturi, dober model za študij biomineralizacije na splošno. Kalcijeva telesa so primerna struktura za natančno analizo matriksa in morda bodo prispevala k poznavanju genov in molekul, ki sodelujejo pri biomineralizaciji.

## 6 POVZETEK

Pojem biomineralizacija se nanaša na procese nastajanja biomineraliziranih struktur v organskem matriksu živih organizmov. Poznavanje molekul, genov in procesov, ki sodelujejo pri biomineralizaciji prispeva k napredku medicine in tehnologije. Raki so kot skupina zanimivi za študij biomineralizacije, saj ob vsaki levitvi sintetizirajo kutikulo in različne druge strukture, ki se med seboj razlikujejo tako po morfologiji, kot tudi po mineralni sestavi. V laboratoriju za strukturno funkcijske raziskave nevretenčarjev se večinoma ukvarjamo s kopenskimi raki enakonožci, med drugim nas zanimajo procesi povezani z levitvijo in mineralizacijo kutikule. Pri predhodnih študijah smo naleteli na zanimive strukture v telesni votlini kopenskih enakonožcev iz skupine Synocheta, ki smo jih poimenovali kalcijeva telesca. Podatki v literaturi o njihovem številu in namestitvi so redki in si med seboj nasprotujejo, o njihovi mikroskopski anatomiji in vlogi pa ni objavljenih podatkov.

Za objekt raziskav smo si izbrali vrsto *Hyloniscus riparius*. Kot glavni cilj smo si zastavili natančen opis števila, namestitve in morfologije kalcijevih telesc, za kar smo uporabili računalniško trodimenzionalno rekonstrukcijo histoloških rezin. Iz rezultatov predhodne študije smo sklepali, da ima vrsta *Hyloniscus riparius* dva para med seboj ločenih kalcijevih telesc. Predpostavili smo, da so kalcijeva telesca povezana z drugimi tkivi. Poleg splošnega opisa kalcijevih telesc smo želeli zastaviti tudi smernice za nadaljne raziskave. Predpostavili smo, da matriks vsebuje kalcij, ogljikove hidrate in proteine, zato smo na majhnem vzorcu živali preizkusili različne histokemijske tehnike, da bi natančneje opredelili vsebino kalcijevih telesc. Pripravili pa smo tudi ultratanke rezine enega vzorca, na katerih smo s pomočjo presevnega elektronskega mikroskopa opisali lastnosti epitela, delno pa tudi vsebino kalcijevih telesc. Ker ima kalcij pomembno vlogo pri levitvi rakov smo sklepali, da v procesu sodelujejo tudi kalcijeva telesca. Da bi se prepričali, ali je v tej smeri pomembno nadaljevati raziskave, smo naredili rekonstrukcijo kalcijevih telesc pri enem osebku v fazi medlevitve.

Odrasle osebke iz kulture smo vklopili v parafin za histološke rezine in v epoksi smolo Spurr za pripravo poltankih in ultratankih rezin. Histološke rezine smo barvali s hematoksilinom in eozinom, alcian modrim in eozinom, alizarinom in z barvilom po Feulgnu. Zaporedne histološke rezine smo fotografirali in s programoma ImageJ in Reconstruct ustvarili trodimenzionalne rekonstrukcije kalcijevih telesc in nekaterih delov prebavila. Na podlagi rezultatov barvanja histoloških rezin smo sklepali o lastnostih matriksa kalcijevih telesc. Ultratanke rezine smo pregledali z elektronskim mikroskopom in jih uporabili za opis ultrastrukturnih značilnosti epitelov kalcijevih telesc.

Vrsta *Hyloniscus riparius* ima dva para med seboj ločenih kalcijevih telesc. Vsako telesce je sestavljeno iz epitelne cevke in enega pecljatega lateralnega izrastka. Glavne cevke vseh štirih telesc se tesno prilegajo prebavilu, izrastki pa štrlijo v prostor med mišicami. Na mestu stika epitela posteriornega kalcijevega telesca s črevesnim epitelom ima črevo

mного bolj razvejan bazalni labirint kot običajno, iz česar sklepamo o intenzivni izmenjavi snovi.

Anteriorni par kalcijevih telesc leži med četrtem in šestim členom pereona in vsebuje kalcij v zelo topni obliki in elektronsko goste delce nanometrskih dimenzij. Glavna cevka je z ozkim pecljem povezana z izrastkom na meji med petim in šestim členom pereona, izrastek pa sega v oba člena. Ultrastrukturne značilnosti epitela kažejo na visoko stopnjo presnovne aktivnosti in proteinske sinteze ter na pretežno vezikularen transport. V medlevitveni fazi se premer anteriornih kalcijevih telesc močno poveča na račun matriksa, ki je sicer enakot pri živalih, ki se levijo.

Posteriorni par kalcijevih telesc leži med šestim členom pereona in prvim členom pleona. Glavna cevka je z izrastkom povezana s širšim kanalčkom na meji med šestim in sedmim členom pereona, izrastek pa sega v oba člena. Vsebuje matriks, v katerem so kisli ogljikovi hidrati, kalcij in bakterije, ki so verjetno stalno prisotne v telescih. Ultrastrukturne značilnosti epitela kažejo visoko stopnjo presnovne aktivnosti in inteziven transmembranski transport. V medlevitveni fazi se dimenzije telesca ne spremenijo, matriks pa je bolj strukturiran. Verjetno gre za procese, pri katerih imajo pomembno vlogo bakterije in so ključni za normalen potek levitve.

## 7 VIRI

- Addadi L., Raz S., Weiner S. 2003 Taking advantage of disorder: amorphous calcium carbonate and its roles in biomineralisation. *Advanced materials*, 15, 12: 959-970
- Cortijo I., Marti Mus M., Jensen S., Palacios T. 2010 A new species of Cloudina from the terminal Ediacaran of Spain. *Precambrian Research*, 176: 1-10
- Cuif J.P., Dauphin Y., Sorauf J.E. 2011. *Biominerals and fossils through time*. Cambridge, Cambridge university press: 495 str.
- Fox R. 2004 *Invertebrate Zoology OnLine, Laboratory Exercises to Accompany Ruppert EE, Fox RS, Barnes RB. 2004. Invertebrate Zoology, A Functional Evolutionary Approach*, 7. izdaja Brooks Cole Thomson, Belmont, CA. <http://lanwebs.lander.edu/faculty/rsfox/invertebrates/> (4. maj 2012)
- Grant J.A., Frost B.R. 1990. Contact metamorphism and partial melting of pelitic rocks in the aureole of the Laramie anorthosite complex, Morton Pass, Wyoming. *American journal of science*, 290, 4: 425-472
- Hornung E. 2011 Evolutionary adaptation of oniscidean isopods to terrestrial life: structure, physiology and behavior. *Terrestrial arthropod reviews*, 4: 95-130
- Kirschvink J. L., Hagadron J. W. 2000. A grand unified theory of biomineralisation. V: *The Biomineralisation of nano- and micro- structures*. Bäuerlein E. (ur.). Weinheim, Bia: 139-149
- Lešer V., Drobne D., Vilhar B., Kladnik A., Žnidaršič N., Štrus J.. 2008 Epithelial thickness and lipid droplets in the hepatopancreas of *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda) in different physiological conditions. *Zoology*, 111, 6: 419 -432
- Luquet G. 2011 *Mechanisms of mineralization in crustaceans*. V: 8th International symposium of terrestrial isopod biology 2011, Bled, Slovenia, 19 - 23 junij, Zidar P., Štrus J. (ur.). Ljubljana, University of Ljubljana, Biotechnical faculty, department of Biology: 17-25
- Luquet G., Frédéric M. 2004. Biomineralisations in crustaceans: storage strategies. *Comptes Rendus Palevol*, 3, 6/7: 515-534
- Martin J. W., Davis G. E. 2001 An updated classification of the recent crustacea. *Science series*, Natural history museum of Los Angeles, 39, 7: 123
- Méhely L. V., 1932. Beiträge zur Anatomie der Trichonisciden. *Studia zoologica* (Budapest), 2: 103-120



- Sarikaya M. 1999. Biomimetics: materials fabrication through biology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96, 24: 13611-13614
- Schmidt C. 2008. Phylogeny of the terrestrial Isopoda (Oniscidea): a review. Arthropod systematics & phylogeny, 66, 2: 191-226
- Štrus J., Blejec A. 2001. Microscopic anatomy of the integument and digestive system during the molt cycle in *Ligia italica* (Oniscidea). V: Crustacean Issues 13, "Isopod systematics and evolution". Kensley B, Brusca RC. (ur.). Rotterdam, A.A.Balkema Publishers: 343-352
- Štrus J., Compere P., 1996. Ultrastructural analysis of the integument during the moult cycle in *Ligia italica* (Crustacea, Isopoda). Pflugers Archiv: European Journal of Physiology, 431, 2: R251-R252
- Verhoeff K. W. 1926. Über Isopoden der Balkanhalbinsel, gesammelt von Herrn Dr. Buresch. Mitteilungen der bulgarischen entomologischen Gesellschaft in Sofia, 3: 135-158
- Verhoeff K. W. 1927. Über einige südosteuropäische Trichonisciden. Zoologischer Anzeiger 70, 7/8: 200-223
- Wray G.A., Levinton J.S., Shapiro L.H. 1996. Molecular evidence of deep precambrian divergences among metazoan phyla. Science, 274: 568-573
- Xin R., Leng Y., Chen J. Yang X. 2007. Comparison of biomineralization on calcium phosphate implants in rabbit and dog models. Key Engineering Materials, 330: 27-30
- Zidar P., Drobne D., Štrus J. 1998. Determination of moult stages of *porcellio scaber* (isopoda) for routine use. Crustaceana, 71, 6: 646-654
- Ziegler A. 2003. Variations of calcium deposition in terrestrial isopods. V: The biology of terrestrial isopods. Sfenthourakis S., de Araujo P. B., Hornung E., Schmalfluss H., Taiti S. K. Szlavecz (ur.), Leiden, Koninklijke Brill NV: 299-309
- Ziegler A. 1994. Ultrastructure and electron spectroscopic diffraction analysis of the sternal calcium deposits of *Porcelio scaber* Latr. (Crustacea). Journal of structural biology, 122: 110-116
- Ziegler A., Miller B. 1997. Ultrastructure of CaCO<sub>3</sub> deposits of terrestrial isopods (Crustacea, Oniscidea). Zoomorphology, 117: 181-187

## ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem prof. Dr. Jasni štrus. Ne samo za mentorstvo tega diplomskega dela, temveč za pomoč in podporo, ki mi jo je nudila skozi ves študij, od takrat, ko sem kot brucka z željo po delu v laboratoriju potrkala na njena vrata.

Hvala tudi vsem zaposlenim v skupini za splošno zoologijo, ki so mi ves ta čas stali ob strani in tiho skrbeli, da je v laboratoriju vse teklo gladko.

Med njimi se posebej zahvaljujem mlademu raziskovalcu Milošu Vittoriju, ki mi je kot delovni mentor ves čas kupal čez ramo in budno pazil na moje delo. Včasih je imel zato z mojo nalogo celo več dela kot jaz.

Na koncu se zahvaljujem vsem, ki so se ukvarjali z mojo hčerko, med tem ko sem se sama ukvarjala z diplomsko nalogo. Brez obilne podpore moža, mame, tašče in še koga, mi ne bi nikoli uspelo.