UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marjeta KONEC

TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA NOTRANJEGA UŠESA PRI MOČERILU (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela)

DIPLOMSKO DELO Univerzitetni študij

THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION OF INNER EAR IN OLM (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela)

GRADUATION THESIS University studies Diplomsko delo je bilo opravljeno v laboratorijih Katedre za Zoologijo in Katedre za Botaniko Oddelka za Biologijo Biotehniške Fakultete. Snemanje z metodo magnetne resonance je potekalo na Institutu Jožef Stefan, na Odseku za fiziko trdne snovi. Barvanje nekaterih preparatov je potekalo na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega študija biologije je dne 5.6.2009 za mentorja naloge imenovala prof. dr. Borisa Buloga, univ. dipl. biol. in za recenzenta prof. dr. Marijo Štefančič, univ. dipl. biol.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:	Prof. dr. Jasna ŠTRUSuniv. dipl. biol. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo					
Član:	prof. dr. Boris BULOG, univ. dipl. biol. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo					
Članica:	Prof. dr. Marija Štefančič, univ. dipl.biol. Univerza v Ljubljani, Biotehniška Fakulteta, Oddelek za biologijo					

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

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 591.485: 597.9 (043.2) = 163.6
- KG tridimenzionalna rekonstrukcija/ notranje uho/ membranski labirint/ poravnava serijskih rezin/ Proteus anguinus/ Amphibia
- AV KONEC, Marjeta
- SA BULOG, Boris (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2009
- IN TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA NOTRANJEGA UŠESA PRI MOČERILU (PROTEUS ANGUINUS, AMPHIBIA: URODELA)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 70 str., 2 pregl., 41 sl., 7 pril., 45 vir.
- IJ
- JI sl/en

sl

AI Iz serijsko rezanih histoloških rezin (parafinske, 10 µm) otične regije nepigmentirane podvrste močerila smo uspešno izdelali tridimenzionalni model levega in desnega membranskega labirinta. Na modelu so rekonstruirani tudi čutilni epiteli in perilimfatičen sistem. Naredili smo tudi tridimenzionalen model desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila, ki smo ga izdelali iz serijsko rezanih poltankih rezin (2,5 µm). Te smo naredili iz izoliranega organa. Vse prereze smo fotografirali. Za rekonstrukcijo smo uporabili brezplačen program Reconstruct, ki se je izkazal za uporabnega. Omogoča uporabo vseh bistvenih korakov izdelave rekonstrukcije: uvoz fotografij v program, poravnava, orisovanje in generiranje tridimenzionalnega objekta. Pri poravnavi, so se bolje obnesle poltanke rezine, kjer smo vklopni medij uporabili kot zunanjo označbo. Modele smo dopolnili še s fotografijami prerezov in tako predstavili anatomijo notranjega ušesa pri močerilu. To nam je omogočilo potrditev že objavljenih rezultatov morfologije notranjega ušesa pri nepigmentirani podvrsti močerila in opis notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila. Izkazalo se je, da je membranski labirint pigmentirane podvrste res krajši v primerjavi z nepigmentirano podvrsto, kar potrdi našo hipotezo. Vendar je treba poudariti, da opis temelji na enem notranjem ušesu in potrebno rezultate potrditi z nadaljnjimi raziskavami. bi bilo Metodo tridimenzionalne rekonstrukcije se lahko uporabi tudi za rekonstrukcijo drugih organov močerila. Preizkusili smo tudi metodo snemanja z magnetno resonanco, vendar je notranje uho premajhen objekt. Na prerezih se ni videlo membranskih struktur. Zaradi tega tudi ni bilo mogoče izdelati tridimenzionalnega modela iz teh podatkov.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 591.485: 597.9 (043.2) = 163.6
- CX three-dimensional reconstruction/ inner ear/ membranous labyrinth/ alignment serial sections/ Proteus anguinus/ Amphibia
- AU KONEC, Marjeta
- AA BULOG, Boris (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2009
- TI THREE-DIMENSIONAL RECONSTRUCTION OF INNER EAR IN OLM (PROTEUS ANGUINUS, AMPHIBIA: URODELA)
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 70 p., 2 tabl., 41 fig., 7 ann., 45 ref.
- LA
- AL sl/en

sl

AB From serial histological sections (paraffin-embedded, 10 µm) of otic region, a threedimensional model of left and right inner ear in non-pigmented subspecies of olm was made. Sensory epithelia and perilymphatic system were also reconstructed. A three-dimensional model of right inner ear in pigmented subspecies of olm was made, but from serial semi-thin sections (2,5 µm). Those were made from isolated organ. All sections were photographed. A free program, called Reconstruct was used for reconstruction. It turned out to be useful. It enables all crucial steps in reconstruction: import of pictures, alignment, tracing and generating the threedimensional model. The semi-thin sections were easier to align, because the sides of the block were still seen and served as fiducial marks. Three-dimensional models were accompanied by pictures of sections and so detailed anatomy of the inner ear was presented. This enabled us to confirm previous results and describe the anatomy of inner ear in pigmented subspecies of olm. Membranous labyrinth turned out to be shorter, which confirms our hypothesis. The description is based on only one individual organ, therefore it must be confirmed by additional research. Threedimensional reconstruction method can be used for reconstructing other organs of the olm. We also tested Magnetic Resonance Imaging method, but it was not successful. The inner ear is too small to be imaged in detail. No membranous structures were noticed and reconstruction from this data was not possible.

KAZALO VSEBINE

Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key Words Documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VI
Kazalo slik	VII
Kazalo prilog	IX
Okrajšave in simboli	X

1	IZHODIŠČA RAZISKAVE IN NAMEN DELA	1
2	UVOD	
2.1	NOTRANJE UHO	3
2.1.1	Splošen pregled struktur ušesa	3
2.1.2	Uho dvoživk	9
2.1.3	Brezrepci	9
2.1.4	Repate dvoživke	13
2.1.5	Močeril	15
2.2	TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA	17
2.3	MAGNETNA RESONANCA	21
3	MATERIAL IN METODE	
3.1	POSKUSNE ŽIVALI	22
3.2	HISTOLOŠKI PREPARATI	24
3.2.1	Parafinske rezine	24
3.2.2	Poltanke rezine	25
3.3	ZUNANJE OZNAČBE	26
3.4	TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA	27
3.5	MAGNETNA RESONANCA	29
4	REZULTATI	
4.1	NEPIGMENTIRANA PODVRSTA MOČERILA	30
4.2	PIGMENTIRANA PODVRSTA MOČERILA	42
4.3	MAGNETNA RESONANCA	55
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	59
5.1	NOTRANJE UHO MOČERILA	59
5.2	METODA TRIDIMENZIONALNE REKONSTRUKCIJE	62
5.3	MAGNETNA RESONANCA	64
5.4	SKLEPI	65
6	POVZETEK	66
7	VIRI	67

ZAHVALA PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1 : Podatki o poskusnih živalih	23
Preglednica 2: Postopki priprave histoloških rezin na posameznih osebkih	24

KAZALO SLIK

sti	r.
Slika 1: Membranski labirinti pri različnih vretenčarjih7	7
Slika 2: Membranski labirint zelene žabe (Rana esculenta) lateralno)
Slika 3: Membranski labirint zelene žabe (Rana esculenta) mediano10	0
Slika 4: Shema žabjega ušesa11	l
Slika 5: Membranski labirint planinskega pupka (Triturus alpestris) lateralno1.	3
Slika 6: Membranski labirint planinskega pupka (Triturus alpestris) mediano13	3
Slika 7: Prečni prerez ušesne regije pupka (Taricha granulosa)14	4
Slika 8: Membranski labirint pri nepigmentirani podvrsti močerila (Proteus anguinus	
anguinus), z lateralne (zgoraj) in mediane (spodaj) strani	6
Slika 9: Prerez treh popolnoma različnih teles je enak1	7
Slika 10: Slika prikazuje kako lahko z napačno poravnavo in z raztezanjem dobimo napačen	
razultat	9
Slika 11: Dve zaporedni rezini pred poravnavo (levo) in po poravnavi (desno)2'	7
Slika 12. Orisane strukture (rumeno), ki jih program lahko prikaže v tridimenzionalnem	
prikazu	;
Slika 13: Nepigmentirana podvrsta močerila (P151) levi membranski labirint. 1, 2 lateralno ir	a
3, 4 mediano	0
Slika 14: Nepigmentirana podvrsta močerila (P151) desni membranski labirint. 1, 2 lateralno	
in 3, 4 mediano	1
Slika 15: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) levi membranski labirint. 1, 2 lateralno in	n
3, 4 mediano	2
Slika 16: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) levi membranski labirint, perilimfatična	
cisterna, perilimfatični kanal in endolimfatična vrečka. 1, 2 lateralno, 3 mediano in 4 z	
anteriorne strani	3
Slika 17: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint. 1, 2 lateralno	
in 3,4 mediano	4
Slika 18: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint. 1, 2 dorzalno	
in 3, 4 ventralno	5
Slika 19: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint in	n
perilimfatični prostor. 1, 2 lateralno, 3 mediano in 4 ventralno	6
Slika 20: Tridimenzionalni model desnega membranskega labirinta nepigmentirane podvrst	e
močerila (P150), model pogled lateralno. Ravnine prerezov glave skozi otično regijo s	0
onačene na modelu s črtami, ki označujejo določen prerez	7
Slika 21: Prečni prerez skozi posteriorni del leve in desne otične regije osebka P150	9
Slika 22: Prečni prerez skozi desno otično regijo osebka P150 v predelu amfibijske papile in	n
utrikularno-sakularnega kanala)
Slika 23: Prečni prerez skozi levo otično regijo osebka P150 v predelu odprtin	e
endolimfatičnega kanala)
Slika 24: Ventralni pogled na desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4)).
Otična kapsula je z ventralne strani odstranjena	2
Slika 25: Ventralni pogled na desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4)).
Otična kapsula je z ventralne strani odstranjena.	3
Slika 26: Izolirano desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Ventraln	ni
pogled, izostrene in označene so dorzalno ležeče strukture.	4
Slika 27: Izolirano desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Ventraln	ni
pogled, izostrene in označene so ventralno ležeče strukture.	5
Slika 28: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4). 1, 2 lateralno in 3	3,
4 mediano	6

Slika 29: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4). 1, 2 dorzalno in 3,
4 ventralno
Slika 30: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4) s perilimfatičnim
kanalom, perilimfatično cisterno in endolimfatično vrečko. 1 lateralno, 2 mediano, 3 z
anteriorne strani in 4 s posteriorne strani
Slika 31: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4) z VIII.
možganskim živcem. 1 ventralno, 2 ventralno, z 0.6 prosojnostjo, tako da so vidni čutilni
epiteli znotraj membranskega labirinta, 3 mediano in 4 s posteriorne strani. Na 3 in 4 je dodan
še perilimfatičen kanal
Slika 32: Tridimenzionalna rekonstrukcija desnega membranskega labirinta pigmentirane
podvrste močerila (Č4). Model pogled lateralno. Ravnine prerezov notranjega ušesa so
označene na modelu s črtami, ki označujejo določen prerez50
Slika 33: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu
utrikulo-sakularnega kanala
Slika 34: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu
sakulo-lagenarnega kanala
Slika 35: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu
odprtine endolimfatičnega kanala
Slika 36: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste
močerila (P188) s posteriorne strani
Slika 37: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste
močerila (P188) z dorzalne strani. 55
Slika 38: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste
močerila (P188) z anteriorne strani
Slika 39: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste
močerila (P188) z ventralne strani
Slika 40: Prerezi glave nepigmentirane podvrste močerila (P188) v predelu notranjega ušesa
izdelani s tehniko magnetne resonance
Slika 41: Slike prečnih prerezov glave nepigmentirane podvrste močerila (P188) izdelane s
tehniko magnetne resonance

KAZALO PRILOG

PRILOGA A: Barvanje hematoksilin in eozin (HE)

PRILOGA B: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z EDTA (Č12)

PRILOGA C: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z dušikovo kislino (Č7)

PRILOGA D: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z dušikovo kislino (Č15)

PRILOGA E: Protokol priprave glave pigmentirane podvrste močerila s pomočjo mikrovalovnega sistema (Č13)

PRILOGA F: PRIPRAVA MEDIJA ZA VKLOP = SPURR

PRILOGA G: Navodila za uporabo programa Reconstruct

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

a – anteriorno AA – ampulla anterior ADE – apertura ductus endolymphaticus ADP – apertura ductus perilymphaticus (v cysterno perilymfaticus) ADP* – apertura ductus perilymphaticus (v možgansko votlino) AE – ampulla externa AP – ampulla posterior CA - canalis anterior CE – canalis externus CP – canalis posterior CRA - crista anterior CRE – crista externa CRP - crista posterior CS-L – canalis sacculo-lagenaris CU-S - canalis utriculo-saccularis CYP - cysterna perylimphatica d – dorzalno DE - ductus endolymphaticus DP – ductus perilymphaticus FP – foramen perilyphaticum L – lagena 1 – lateralno m – mediano ML – macula lagenae MS – macula sacculi MT – membrana tectoria MU – macula utriculi OK – otična kapsula p – posteriorno PA – papilla amphibiorum RPA – recessus papillae amphibiorum RU – recessus utriculi RA – ramus anterior VIII. možganskega živca RP – ramus posterior VIII. možganskega živca S – sacculus SE – saccus endolymphaticus SP – sinus posterior SS - sinus superior

- U utriculus
- v ventralno

1 IZHODIŠČA RAZISKAVE IN NAMEN DELA

V preteklih letih so bile narejene podrobne anatomske raziskave membranskega labirinta pri nepigmentirani podvrsti močerila (Istenič in Bulog, 1976), ki so temeljile na klasični sekciji in svetlobni mikroskopiji. Narejene so bile tudi kvantitativne analize kalcija in kristalografske analize otokonialne mase. Kasneje (Bulog, 1990) so spoznanja razširili še s proučevanjem ultrastukturnih značilnosti čutilnih epitelov in čutnic (Bulog, 1989a, Bulog, 1989b).

V družini Proteidae, kamor poleg *Proteus* spada tudi *Necturus*, se kot slušni epitel pojavi samo amfibijska papila. Pri drugih repatih dvoživkah pa je prisoten še dodaten slušni epitel, in sicer papilla lagenae (Wever, 1985) oziroma bazilarna papila. Istenič in Bulog (1976) sta pri večjih osebkih nepigmentirane podvrste močerila našla na mediani strani lagene manjšo žepasto izboklino. Domnevala sta, da je to zasnova za bazilarno papilo, saj izboklina topografsko ustreza položaju recesusa bazilarne papile.

Pigmentirana podvrsta močerila se od nepigmentirane podvrste razlikuje predvsem v pigmentaciji kože, popolnoma razvitih očeh, širših in krajših lobanjskih kosteh, številu zob, mišičju čeljusti, proporcionalni dolžini trupa z večjim številom vretenc, krajših udih in krajšim repom (Sket in Artzen, 1994).

Raziskava podvodnega sluha obeh podvrst močerila (Bulog in Schlegel, 2000) je pokazala, da se frekvence, pri katerih je odziv živali največji oziroma pri katerih so najbolj občutljive, med obema podvrstama razlikujejo. Nepigmentirana podvrsta močerila je najbolj občutljiva na frekvence okoli 1,5 kHz, pigmentirana podvrsta pa na frekvence okoli 2 kHz pri vzdražnostnem pragu 40–50 dB. Močerilove slušne sposobnosti segajo od 10 Hz do preko 12.000 Hz, kar trenutno predstavlja edinstveno sposobnost zaznavanja zvočnega valovanja pod vodo v takem frekvenčnem razponu in prekaša vse raziskane dvoživke in večino rib (Schlegel et al., 2006; Schlegel et al., 2009).

O slušnih sposobnostih repatih dvoživk vemo zelo malo. Repate dvoživke namreč nimajo votline srednjega ušesa in bobniča. Raziskave pri nekaterih drugih dvoživkah so pokazale, da ustna votlina in verjetno tudi pljuča, napolnjena z zrakom, lahko pod vodo služijo kot pretvorniki zvočnega tlaka. Pri močerilu so ugotovili tesno anatomsko povezavo med stropom ustne votline in ovalnim oknom (Schlegel et al., 2009). Na ta način bi se lahko zvočno valovanje iz vodnega okolja prenašalo skozi obsežno ustno-žrelno votlino, napolnjeno z zrakom in s povišano amplitudo do notranjega ušesa.

Močeril bi lahko v svojem okolju zaznal mnoge vire zvočnega valovanja, ki nastanejo ob pretakanju vode skozi množico razpok in kanalov ter se po njih orientiral. Predvsem ob nenadnem dvigu podtalnice, zaradi večje količine padavin, bi bilo to zanj življenjskega pomena, saj bi se lahko pravočasno umaknil v globje predele, kjer je manjša verjetnost, da ga močni vodni tokovi izvržejo na površino.

Upoštevajoč drugačno oblikovanost regije glave lahko predvidevamo, da notranje uho pigmentirane podvrste močerila ni tako dolgo in dorziventralno sploščeno kot pri nepigmentirani podvrsti močerila. Vendar pa notranje uho pigmentirane podvrste močerila do sedaj še ni bilo raziskano, zato je naš namen potrditi navedeno hipotezo.

Notranje uho je organ z zapleteno tridimenzionalno strukturo in prav to je eden od bistvenih dejavnikov njegove funkcije.

Anatomsko zgradbo lahko analiziramo s klasično sekcijo in izolacijo organa. Rezultate analize notranjega ušesa so včasih predstavili v obliki narisanih modelov (19. stoletje), kasneje s pomočjo kinamatografskih metod (1905–1975), v novejšem času pa tudi s pomočjo računalniških modelov. Dandanes nam računalniška tehnologija omogoča tudi drugačne načine osnovne anatomske analize, ki ne zahteva izolacije organa. S pomočjo tridimenzionalne rekonstrukcije lahko iz serijsko narezanih histoloških rezin rekonstruiramo določen organ ali celico in njeno ultrastrukturo, če delamo na elektronsko mikroskopskem nivoju. Na trgu obstaja veliko programov, ki nam omogočajo takšno rekonstrukcijo. Ko enkrat posnamemo slike preparatov, jih moramo med seboj poravnati in označiti, kaj želimo predstaviti kot tridimenzionalno podobo. Na ta način lahko tridimenzionalni objekt v virtualnem prostoru vrtimo v vseh smereh in si ga ogledamo z vseh perspektiv. Nekateri programi tudi omogočajo kvantitativno merjenje raznih parametrov, kot npr. volumen, premer itn. (Fiala, 2005).

Tudi za anatomsko analizo notranjega ušesa močerila smo se odločili uporabiti sodobne računalniške tehnike in ugotoviti, ali so res primerne in kako dobre rezultate nam lahko prinesejo. Pri tem smo uporabili material, ki je bil shranjen od predhodnih funkcionalno-morfoloških študij.

Tudi metoda magnetne resonance se je izkazala za uporabno pri raziskavah notranjega ušesa. Sbarbati in kolegi (1992 a in b) so s to metodo uspešno analizirali sakularno otokonialno maso ter polkrožne kanale pri žabi (*Rana esculenta*). Med seboj so lahko ločili perilimfatične in endolimfatične prostore. Raziskava je bila opravljena na narkotizirani živali.

Ta metoda je zelo uporabna, ker je popolnoma neinvazivna in živali za preiskavo ni potrebno žrtvovati. To bi bilo še posebej uporabno pri raziskavah morfologije telesa strogo zavarovane vrste močerilov, ki so ponekod že ogroženi in je število osebkov namenjeno raziskavam zelo majhno. Pričakujemo, da bi na ta način lahko uspešno poslikali in določili dele notranjega ušesa pri močerilu.

2 UVOD

2.1 NOTRANJE UHO

2.1.1 Splošen pregled struktur ušesa

Notranje uho je se je prvič pojavilo že pri najstarejših brezčeljustnicah in se je v evolucijski zgodovini Craniatov spreminjalo tako strukturno kot funkcionalno. Embriološke raziskave in homologija čutnic kažejo na homologno zgradbo sekundarnih čutnic notranjega ušesa in sistema bočne linije (Lewis et al., 1985). Prav zaradi tega se ju pogosto obravnava skupaj kot oktavolateralni sistem. Čutnice v notranjem ušesu so izolirane od okolja, saj se nahajajo v otičnem labirintu v kosti ter pod mišičjem in kožo. A kljub temu, tako kot čutnice bočne linije, zaznavajo premike tekočin. S to razliko, da tu zaznajo premik tekočin znotraj organa, ki je posledica spremembe položaja in gibanja telesa (ravnotežje in pospeški) ter zvočnega valovanja, ki ga doseže (Liem et al., 2001).

Embrionalni razvoj notranjega ušesa je enak pri vseh vretenčarjih. Razvije se iz otične plakode, ki nastane pod vplivom mezoderma horde na ektoderm glave. Otična plakoda se ugrezne in oblikuje otični vezikel, ki je napolnjen z endolimfo. Sčasoma se vezikel preoblikuje in razdeli na pars superior in pars inferior in formira se membranski labirint (Liem et al., 2001).

Notranje uho se nahaja v lobanji, v otični kapsuli, ki obdaja membranski labirint. Pri višjih vretenčarjih (sesalcih in ptičih) jo imenujemo koščeni labirint. V prostoru med koščenim in membranskim labirintom je periotično vezivno tkivo, ki utrjuje namestitev membranskega labirinta. Ta prostor je napolnjen s perilimfatično tekočino (perilimfa), ki je po ionski sestavi podobna cerebrospinalni tekočini, razlikuje pa se predvsem v vsebnosti proteinov. Notranjost membranskega labirinta zapolnjuje endolimfatična tekočina (endolimfa). Podobna je intracelularni tekočini, vendar ima manj proteinov in drugih organskih molekul (Lewis, 1985). Mehanične in elektrokemijske lastnosti obeh tekočin so pomembne pri delovanju čutnic.

Pri ribah ima otična kapsula odprtino, tako da sta perilimfa in periotično tkivo povezana s perimeningealno tekočino in tkivi, ki obdajajo možgane. Tetrapodi imajo otično kapsulo popolnoma zaprto, tako da ostane perilimfa izolirana. Endolimfa je prav tako izolirana od drugih tekočin, saj se nahaja v zaprtem sistemu, ki pa sega iz otične kapsule kot endolimfatični dukt in se konča kot endolimfatična vrečka v neurokraniumu (Lewis et al., 1985). Izjeme so hrustančnice, pri katerih se endolimfatični kanal odpira na površino glave (Liem et al., 2001).

Membranski labirint lahko razdelimo na dva dela: pars superior in pars inferior.

Pars superior je pri vseh vretenčarjih precej podobno grajen, kar kaže na redke evolucijske spremembe in stabilnost v zgradbi vestibularnega dela. Sestavljajo ga utrikulus (utriculus) in trije polkrožni kanali. Dva kanala sta postavljena vertikalno, to sta anteriorni polkrožni kanal (canalis anterior) in posteriorni polkrožni kanal (canalis posterior) ter en

horizontalno ležeč kanal, lateralni kanal (canalis externus) (Lewis et al., 1985; Istenič in Bulog, 1976). Izjeme so piškurji (Petromyzoniformes), ki jim manjka lateralni polkrožni kanal in glenavice (Myxiniformes), ki imajo samo en polkrožni kanal (Liem et al., 2001). Pars inferior pa je zelo raznolik, tako v obliki, kot v funkciji. Sestavljajo ga sakulus (sacculus) in različne evaginacije, kot so lagena, kohlea ali pa recesesusi (Lewis et al., 1985).

Čutnice so sekundarnega tipa in inervirane z aferentnimi in eferentnimi živčnimi vlakni. Čutnice vseh čutilnih epitelov imajo enako osnovno zgradbo. Na apikalni strani so diferencirane kinocilija in stereocilije, katerih dolžina se z razdaljo od kinocilije zmanjšuje. Obstaja več morfoloških tipov čutnic. Ti so določeni glede na morfologijo telesa celice, sinapso med čutnico in nevronom ter morfologijo ciliarnega šopa. Čutnice so morfološko in funkcionalno orientirane. Orientacija je definirana z ravnjo simetrije in gradientom dolžine stereocilij. Posamezni čutilni epiteli imajo specifično orientirane in porazdeljene čutnice različnih tipov (Lewis et al., 1985).

V membranskem labirintu se nahajajo čutilni epiteli, ki zaznavajo ravnotežje (vestibularni) in zvok (auditorni). Vsak čutilni epitel je sestavljen iz dveh osnovnih tipov celic (čutnic in opornih celic) in nevronov, ki tvorijo sinaptične povezave s čutnicami. Epitel prekriva želatinozna membrana iz glikozaminoglikanov, ki se s fibroznimi vlakni pripenja na oporne celice. Čutnice so povezane z želatinozno membrano preko kinocilije. Te strukture imajo različna imena glede na mesto, kjer se pojavijo. V avditornih epitelih je to tektorialna membrana, v polkrožnem kanalu kupula in v čutilnih epitelih, kjer se pojavlja v povezavi s kalcificiranimi strukturami, otokonialna membrana ali otolitna membrana. V primeru, da je kalcificirana masa večja enotna struktura, jo imenujemo otolit. Če je sestavljena iz več manjših, pa jo imenujemo otokonialna masa, posamezne kristale pa otokoniji. Otoliti se pojavljajo pri žarkoplavutaricah (Actinopterygii), in sicer kot kristali kalcijevega karbonata bodisi vaterit bodisi aragonit. Otokoniji iz kristalov kalcijevega karbonata se pojavljajo tudi pri tetrapodih, kot kalcit pri sesalcih, ptičih in nekaterih plazilcih in kot aragonit pri dvoživkah. Pri plazilcih se pojavlja bodisi aragonit bodisi kalcit. Aragonitni so tudi pri ribah pljučaricah in hrustančnicah. Pri brezčeljustnicah so otokoniji narejeni iz kristala kalcijevega fosfata, apatita. Apatit pa se izjemoma pojavi kot tanek ovoj okoli sicer aragonitnih otokonijev aksolotla (Ambystoma mexicanum, Caudata) (Lewis et al., 1985).

Notranje uho oživčuje VIII. možganski živec. Zunaj otične kapsule se razdeli v dve veji. Anteriorna veja (ramus anterior VIII. možganskega živca) oživčuje čutilne epitele utrikulusa, anteriornega in lateralnega polkrožnega kanala. Posteriorna veja (ramus posterior VIII. možganskega živca) pa oživčuje čutilne epitele posteriornega polkrožnega kanala, lageno in slušne organe. Sakulus je pri različnih skupinah živali različno oživčen. Preko aferentnih živčnih vlaken se prevajajo dražljaji do možganov in ti dobijo informacije o zvočni sliki in položaju telesa (Lewis et al., 1985). Možgani dobijo informacije o položaju telesa tudi s pomočjo vida, proprioreceptorjev in pri tetrapodih iz receptorjev za dotik in pritisk v stopalih (Liem et al., 2001). Skupno delovanje različnih čutil tudi omogoča vestibularni refleks, ki nam omogoča ohraniti telo v ravnotežju in vidno polje v določeni točki, ne gleda na premike glave in telesa (Despopoulos in Silbernagl, 2003).

Trije polkrožni kanali, anteriorni, posteriorni in lateralni so postavljeni približno pravokotno glede na ravnine drugih. Na tak način se endolimfa po njih pretaka v različnih smereh. Navadno so prostorsko povezani z utrikulusom in tako lahko endolimfa kroži. Oblika kanala ni popolno polkrožna. Če med seboj primerjamo različne skupine vretenčarjev, lahko vidimo, da kanali od popolne oblike polkroga odstopajo tako po dolžini kanala kot po stopnji ukrivljenosti. Vsak kanal je na enem koncu odebeljen, ta odebelitev se imenuje ampula. V ampuli se nahaja čutilni epitel krista. V anteriornem kanalu anteriorna krista (crista anterior), v posteriornem kanalu posteriorna krista (crista posterior) in v lateralnem kanalu lateralna krista (crista exterior), ki leži v anteriornem delu lateralnega kanala. Krista je pokrita s kupulo, ki se pritrjuje na kristo, pa tudi na stene ampule in skoraj popolnoma zapolni ampulo (Lewis et al., 1985). Ko obrnemo glavo, se hkrati obrneta tudi kanal in krista, endolimfa pa rahlo zaostaja zaradi inercije. Za kratek čas se na obeh straneh kupule pojavi razlika v tlakih in kupula se premakne. Posledično se premaknejo tudi stereocilije in kinocilija čutnic, ki segajo v spodnji del glikoproteinskega matriksa, kar povzroči spremembo v ionski prevodnosti membrane čutnice. S kristami v polkrožnih kanalih tako zaznamo dinamično ravnotežje. Ker pa so trije polkrožni kanali specifično razporejeni in orientirani, lahko še bolje zaznamo smer, v katero smo obrnili glavo (Despopoulos in Silbernagl, 2003).

Utrikulus je pri večini vretenčarjev oblikovan kot podolgovata vrečka. Pri glenavicah, piškurjih in hrustančnicah ni popolno diferenciran, međtem ko sta pri vseh ostalih vretenčarjih utrikulus in sakulus ločeni strukturi. Med seboj sta povezani z utrikulosakularnim kanalom (canalis utriculo-saccularis). Čutilni epitel je makula. Imenujemo ga utrikularna makula (macula utriculi). Leži v recesusu na anteriorni strani dna utrikulusa. V bližini se nahaja tudi lateralna krista lateralnega kanala, ki je na tem mestu povezan z utrikulusom. Z izjemo nekaterih rib stoji utrikularna makula horizontalno in je rahlo konkavna. Oblikovana je kot nekoliko stisnjen krog. Čutnice prekriva otokonialna membrana z otokoniji. Pri kostnicah pa velik otolit. Za utrikularno makulo je tudi značilno, da so čutnice v njej funkcionalno in morfološko orientirane v dve smeri. Vsaka skupina zavzema polovico makule in čutnice so orientirane v sebi nasprotni smeri. Orientirane so proti liniji, ki deli makulo na ti dve skupini. Ta del imenujemo striola. Utrikularna makula se med različnimi vretenčarji razlikuje predvsem v tipu čutnic in njihovi orientaciji. S tem organom vretenčarji zaznajo linearne pospeške in gravitacijo v smereh orientacije čutnic (Lewis et al., 1985).

Sakulus (sacculus) se pojavlja v bolj raznolikih oblikah, prav tako tudi čutilni epitel, imenovan sakularna makula (macula sacculi). Sakulus stoji posteriorno in ventralno od utrikulusa. Sakularna makula je ponavadi podolgovata ali ovalna, nahaja se na mediani ali ventro-mediani steni sakulusa. Običajno je diagonalno nameščena in je zaradi oblike samega sakulusa konkavna. Prekrita je z otokonialno membrano. Tudi tu so čutnice orientirane v različne smeri, njihova funkcionalno-morfološka orinetiranost pa se med vrstami razlikuje.

Njena funkcija je zelo raznolika in pri nekaterih živalih opravlja tudi več funkcij hkrati. Pri piškurjih zaznava dražljaje, ki so posledica spremembe lege v gravitacijskem polju in vibracije. Pri hrustančnicah so poskusi pokazali, da z njo zaznajo zvok, katerega frekvenca je nižja od 400 Hz, vendar niso testirali odziva na gravitacijo. Prav tako z njo zaznajo zvok nekatere kostnice. Sesalci z njo zaznavajo predvsem linearne pospeške in premik, nagib

glave. So pa poskusi pokazali, da se sajmiri (Saimiri, Primates) odzovejo na vibracije, ki potujejo preko tal in zelo močne zvoke.

Pri dvoživkah je občutljiva na horizontalno rotacijo in gravitacijo, vendar ne pri vseh vrstah. Zazna pa tudi nizkofrekvenčne vibracije, ki se prenašajo preko tal in zvoke, ki se prenašajo preko zraka (Lewis et al., 1985), Wever (1985) pa jo šteje samo med vestibularne organe.

Lagena je posteriorna evaginacija sakulusa. Pri nekaterih ribah je slabo diferencirana, pojavi pa se pri vseh ostalih. Čutilni epitel je makula lagene, ki se pri ribah in dvoživkah nahaja blizu posteriornega dela sakulusa. Pri plazilcih, ptičih in stokovcih je lagenarna makula v distalnem delu podaljšane lagene – kohlearnega dukta. Sesalci, razen stokovcev, je nimajo. Prekrita je z otokonialno membrano, katere velikost in sestava se med vrstami razlikuje. Prav tako se med vrstami razlikuje njena oblika in razporeditev čutnic.

Ribe z njo zaznajo gravitacijo in linearne pospeške, nekatere vrste pa se odzovejo tudi na zvok. Žabe z njo zaznajo linearne pospeške in malo vibracij, vendar pa ne zaznajo zvoka. Pri kuščarjih in ptičih funkcija ni poznana (Lewis et al., 1985).

Crista neglecta (Liem et al., 2001) oziroma papilla neglecta, obstaja pa še kar nekaj poimenovanj za ta čutilni epitel, ki so ga odkrili pri ribah, vključno s piškurji, se nahaja v utrikulusu v bližini utrikulo-sakularnega kanala ali pa v bližini ampule posteriornega kanala. Kasneje so jo odkrili še pri veliko vretenčarjih, vendar pa ni prisotna pri glenavicah, dvoživkah, razen sleporilih in večini sesalcev (redko se pojavi tudi pri človeku). Pokrita je z želatinozno membrano, ki ne vsebuje otokonijev ali otolitov. Njena funkcija je neznana, vendar po morfoloških značilnostih sklepajo, da ima vlogo pri zaznavi ravnotežja (Lewis et al., 1985).

Pri plazilcih, ptičih in sesalcih se je iz lagene razvil kohlearni dukt, ki je napolnjen z endolimfo. Imenujemo ga tudi scala media in je nameščen med dva periotična ductusa: scalo vestibuli in scalo tympani. V njem je slušni epitel, imenovan bazilarna papila (papilla bazilaris). Leži na bazilarni membrani in je prekrita z tektorialno membrano (Lewis et al., 1985).

Liem (2001) pri plazilcih ne govori o kohlearnem duktu, temveč pravi, da se bazilarna papila nahaja v lageni (nekateri avtorji uporabljajo sinonimno še vedno izraz »lagena«). Pri ptičih je kohlearni dukt podaljšan, prav tako tudi bazilarna papila. Tako uho lahko zazna tudi zelo visoke frekvence. Pri sesalcih je kohlearni dukt podaljšan in zavit, enako je oblikovan tudi koščeni labirint, kar imenujemo kohlea. Bazilarno papilo, ki poteka po celi dolžini kohleje, imenujemo Cortijev organ. Ko zvočni valovi potujejo po perilimfatičnem prostoru, povzročijo, da zaniha tudi tektorialna membrana v endolimfatičnem prostoru (scala media). Med čutnicami in membrano se pojavijo strižne sile, kar sproži akcijski potencial in dražljaj se prenese preko sinaptične povezave na živce. Zaradi dolžine strukture povzročijo različne frekvence valov različen premik tektorialne membrane. Visoke frekvence zaznajo čutnice s krajšimi cilijami na dnu kohlee in nizke frekvence čutnice z daljšimi cilijami pri vrhu, tako ločimo tone.

Pri dvoživkah pa kot slušni epitel nastopata bazilarna papila in amfibijska papila.



Slika 1: Membranski labirint pri različnih vretenčarjih (Liem et al., 2001)

V nasprotju z gibanjem in položajem telesa, ki ga zaznavajo vestibularni epiteli, mora zvok priti do auditornih epitelov iz okolice. Zvok se v valovih, ki so posledica ritmičnega dvigovanja in zniževanja tlaka, širi po naši okolici. Lahko se širi preko vode, zraka in kot vibracije preko trdne snovi, v vsakem mediju pa doseže določeno hitrost (1500 m/s v vodi in 330 m/s v zraku) (Despopoulos in Silbernagl, 2003). Zvočni valovi imajo dve komponenti: nizko frekvenčno gibanje delcev in visoko frekvenčne tlačne valove. Prva je močnejša pri izvoru zvoka in z razdaljo naglo pojenja. Druga pa lahko potuje čez večje razdalje. Gibanje molekul vode (nizke frekvence) vodne živali zaznavajo s sistemom bočne linije. To gibanje doseže tudi notranje uho in nekatere hrustančnice tako zelo dobro slišijo. Problem se pojavi pri visokih frekvencah. Ker je telo kostnic po gostoti podobno vodi, potujejo zvočni valovi skozi njih, ne da bi jih zaznale. Zrak v ribjem mehurju se lahko stisne pod vplivom teh zvočnih valov, medtem ko se tekočine v telesu ne morejo. V ribjem mehurju se poveča amplituda zvočnega valovanja, kar se pozna kot vibracije plinske mešanice v mehurju. Te vibracije pripotujejo do notranjega ušesa pri Ostariophysih preko Weberjevih koščic, modificiranih skletenih elementov sprednjega dela osnega skeleta. Na ta način lahko zaznajo tudi visoke frekvence. Mormiridi in nekatere druge vrste imajo

podaljšane divertikle ribjega mehurja, ki segajo do sakula in preko katerih se prenašajo zvočna valovanja (Liem et al., 2001).

Pri tetrapodih, ki živijo na kopnem, kjer se zvok prenaša preko zraka, pa se pojavi drug problem. Tlačni valovi v zraku so prešibki, da bi povzročili valovanje tekočine. To je zaradi zvočnega upora ali impendance, ki se pri pojavi na meji zrak-tekočina v perilimfatičnem in endolimfatičnem delu membranskega labirinta. Senzorični epiteli v notranjem ušesu pa zaznavajo valovanje tekočine, perilimfe in endolimfe. Zaradi tega se je pri tetrapodih razvilo še srednje uho (timpanična votlina), preko katerega se tlačni valovi močno ojačajo.

Tetrapodi, ki lahko zaznajo visoko frekvenčne zvoke, imajo timpanično membrano (bobnič). Ta se lahko nahaja na površini glave, ali je ugreznjena, navadno je tam prisotno še zunanje uho. Pri sesalcih je dobro razvita tudi avrikula (uhelj), ki usmeri zvok in ga ojača, saj ga prenese iz velikega prostora na majhnega. Deluje na tak način, kakor lijak usmeri tekočino iz širokega dela v ozko cev. Srednje uho je na notranji strani bobniča in je povezano z žrelom preko Eustahijeve cevi. Na ta način se izenači tlak in membrana lahko hitro reagira na spremembe.

V timpanični votlini se nahaja vsaj ena slušna koščica. To je kolumela (columella) pri dvoživkah, plazilcih in ptičih ter pri sesalcih stapes, ki ji je homologen, ter maleus in incus. Lateralni del kolumele je v stiku s timpanično membrano, mediani pa je razširjen in zapolnjuje odprtino v otični kapsuli, imenovano ovalno okno. Pri sesalcih se koščice med seboj povezujejo tako, da opravijo enako funkcijo prenosa in ojačitve zvočnih valov. Ob ovalnem oknu mora biti specializiran perilimfatični kanal in skozi perilimfo se širi zvočno valovanje. Ti valovi morajo tudi zapustiti notranje uho bodisi preko okroglega okna v timpanično votlino bodisi v notranjost lobanje (Liem et al., 2001).

2.1.2 Uho dvoživk

Trije redovi dvoživk: brezrepci (Anura), repate dvoživke (Urodela) in sleporili (Ceacilea), imajo notranje uho zgrajeno iz osnovnih anatomskih struktur, ki so skupne vsem vretenčarjem. Vendar pa je med njimi kar nekaj razlik, ki so posledica specializacije posemeznih delov ali redukcije drugih. Te razlike so se pojavile zaradi različnih okolij, v katerih živijo, sposobnost sluha pa je tudi močno povezana s sposobnostjo oglašanja. Amfibijsko notranje uho je atipično po številu senzoričnih epitelov saj npr. za razliko od sesalčjega ušesa, ki ima šest senzoričnih epitelov, lahko vsebuje kar devet senzoričnih epitelov. Nekatere vrste sleporilov in repatih dvoživk nimajo bazilarne papile, kar je izpeljan karakter (Wever, 1985).

Pri dvoživkah ima pomembno vlogo tudi metamorfoza, tekom katere se uho močno spremeni. Še posebej je to očitno pri žabah, ko se iz ušesa, prilagojenega na delovanje v vodi, razvije uho, prilagojeno na zračno zvočno valovanje. Med metamorfozo se razvije srednje uho in timpanična membrana (Gilbert, 2006).

2.1.3 Brezrepci

Membranski labirint brezrepcev je sestavljen iz osnovnih delov, ki so skupni vsem vretenčarjem. Superiorni del sestavljajo utrikulus, anteriorni in posteriorni polkrožni kanal, ki sta med seboj povezana s širokim duktom in se odpira v utrikulus. Ta del imenujemo sinus superior. Lateralni kanal se odpira iz utrikula, lateralna ampula pa se nahaja poleg anteriorne ampule. Sakulus je razdeljen v dva dela, superiorni in inferiorni del, in se nahaja v inferiornem delu membranskega labirinta. Tu sta tudi oba recesusa, v katerih se nahajata slušna epitela: amfibijska papila in bazilarna papila.

Endolimfatični kanal se začne v posteriornem delu sakulusa in se nadaljuje v možgansko votlino. Tu se oblikuje endolimfatična vrečka, katere oblika je zelo kompleksna, saj sega v spinalni kanal in oblikuje kalcijeve vrečke ob spinalnih ganglijih.



Slika 2: Membranski labirint zelene žabe (Rana esculenta) lateralno (Wever, 1985)



Slika 3: Membranski labirint zelene žabe (Rana esculenta) mediano (Wever, 1985)

Brezrepci imajo dobro razvito tudi srednje uho, ki jim omogoča zaznavo zvoka na kopnem. Timpanična membrana je območje modificirane kože, ki je zelo tanka. V primerjavi s kožo ji manjka subkutana plast. Pripenja se na hrustančni timpanični anulus. Sredina timpanične membrane je odebeljena z vezivnim tkivom, na katerega se pripenja kolumela. Ta je sestavljena iz treh delov: zunanji (pars externa), ki se pripenja na timpanično membrano, srednji (pars media) in notranji (pars interna), ki je odebeljen in se stika z lateralno odprtino v otični kapsuli (ovalno okno). Zunanji in notranji del kolumele sta hrustančna, srednji del pa je koščen. Lateralno odprtino otične kapsule poleg kolumele zapira še druga slušna koščica, operkulum. Na sliki (Slika 4) vidimo oba slušna epitela, ki sta v recesususih, napolnjenih z endolimfo. Pri obeh vidimo, da ju s perlimfatičnim prostorom loči tanka membrana. Perilimfatična vrečka zapolnjuje posteromedialni del otične kapsule in malo sega tudi v možgansko votlino, kjer tanka membrana ločuje perilimfo in možgansko tekočino. Na spodnjem delu otične kapsule je okroglo okno, kjer je membrana debelejša. Tu je še plast mišic in epitelno tkivo, sicer pa se tu že nahaja ustna votlina, napolnjena z zrakom.

Ko tlačni val zvoka zaniha timpanično membrano, se premakne kolumela in povzroči premik perilimfatične tekočine. Ustvari se zvočno valovanje, ki potuje tudi preko endolimfe in ta premik tekočine povzroči dražljaj čutnice v slušnih epitelih. Tako žival zazna zvok. Valovanje potuje naprej preko tankih membran nazaj v perilimfo in preko okroglega okna ven iz otične kapsule (Pot valov je na sliki 4 označena s puščicami.).



Slika 4: Shema žabjega ušesa (Wever, 1985)

Pri brezrepcih se je razvil tudi prav poseben mehanizem zvočne regulacije, ki se ne pojavi pri nobeni drugi živalski skupini. Ker je njihovo oglašanje zelo glasno, bi lahko poškodovalo slušne epitele. Ugotovili so, da je prav operkulum tu ključen element. Zraven sodelujejo še mišice srednjega ušesa (operkularna mišica, kolumelarna mišica in superiorna dvigovalka lopatice), ki kontrolirajo, kakšen je kontakt med operkulmom, kolumelo in otično kapsulo. Operkularna in kolumelarna mišica delujeta antagonistično. Ko je operkularna mišica sproščena in kolumeralna skrčena, se notranji razširjeni del kolumele tesno prilega operkolumu. Lahko bi rekli, da ju "zaklene" skupaj in trdno se prilegata odprtini otične kapsule. Ko se sedaj kolumela zaradi zračnih tlačnih valov premakne, se pojavi močna nasprotna sila. Zaradi tega se pravzaprav premakne vsa otična kapsula in glava. Posledica tega je, da so valovi perilimfatične in endolimfatične tekočine šibkejši, saj se sila razporedi na večjo površino. Na ta način ne pride do poškodb slušnih epitelov (Wever, 1985).

2.1.3.1 Amfibijska papila in bazilarna papila pri brezrepcih

Amfibijska papila naj bi bila po mnenju starejših avtorjev homologna s papilo neglecto rib. Vendar pa je papila neglecta običajno nameščena v zgornjem delu ušesa – pars superior. Pri brezrepcih in sleporilih pa se nahaja v izboklitvi pars inferior in je torej povezana s sakulom. Pri sleporilih se obe nahajata v notranjem ušesu in zelo verjetno se je amfibijska papila razvila neodvisno.

Amfibijska papila se nahaja v recesusu amfibijske papile, ki je evaginacija sakulusa. Nahaja se na njegovem dorzalno posteriornem delu. Malo nižje, na mediano ventralnem delu sakulusa, se nahaja recesus bazilarne papile. (Slika 2 in Slika 3)

Amfibijska papila je pri naprednih žabah diferencirana v dva dela, ki delujeta na različna načina. Anteriorni del čutilnega epitela sestavlja velika masa čutnic, ki jih prekriva kompaktna tektorialna membrana. V posteriornem delu, pa je epitel kot ozek trak. Na en del se pripenja tanka membrana. Te čutnice zaznajo zelo šibke zvoke, medtem ko čutnice v najbolj posteriornem delu zaznajo le najmočnejše (Wever, 1985). Raziskave so pokazale, da je pri krastači tonotopično organizirana. Z amfibijsko papilo zaznavajo nizke frekvence. Visoke frekvence pa zaznavajo s bazilarno papilo (Lewis et al., 1985).

Ta je sestavljena iz čutnic, ki so v obliki polmeseca razporejene po obodu recesusa. Tanka tektorialna membrana zapolnjuje približno tretjino lumna recesusa, ki je cevaste oblike. Tanka membrana ga ločuje od perilimfatičnega prostora (Wever, 1985).

2.1.4 Repate dvoživke

Notranje uho je v primerjavi z brezrepci podaljšane oblike, čutilni epiteli pa se nahajajo na istih mestih. Večina repatih dvoživk ima samo amfibijsko papilo, ki pa je enostavnejša kot pri brezrepcih. Sestavljena je iz enega samega enotnega dela. Leži na limbični polici in epitel je sestavljen iz opornih celic, ki se pripenjajo na limbično tkivo, na njih pa so čutnice. Epitel je prekrit s tektorialno membrano, ki je kupolaste oblike. Natančnejša zgradba nam razkrije, da je sestavljena iz kanalčkov, ki se združijo v gostejšo maso. Ta masa je sestavljena iz veziklov nepravilnih oblik in razporeditve. Recesus amfibijske papile in perilimfatični kanal ločuje zelo tanka membrana, imenovana tudi perilimfatično okno (Wever, 1985) oziroma kontaktna membrana (Istenič in Bulog, 1976).



Slika 5: Membranski labirint planinskega pupka (Triturus alpestris) lateralno (Wever, 1985)



Slika 6: Membranski labirint planinskega pupka (Triturus alpestris) mediano (Wever, 1985)

Drug slušni epitel, ki se pojavi pri nekaterih repatih dvoživkah, je bazilarna papila. Ker se pojavlja kot izboklina iz lagene in ne sakulusa, kot pri brezrepcih, jo Wever (1985) imenuje lagenska papila. Poleg pozicije se od bazilarne papile brezrepcev razlikuje tudi v odnosu glede na ostale strukture membranskega labirinta in nakazuje tudi na to, da deluje na drugačen način. Ker stoji zelo blizu amfibijske papile, se valovi prenesejo mimo legenske papile na enak način, po enaki poti. Tektorialna membrana je podobne oblike kot pri amfibijski papili in ne tanka membrana kot pri bazilarni papili brezrepcev.

Drugi avtorji pa jo kljub temu imenujejo bazilarna papila in ne poudarjajo razlik z brezrepci (Lewis et al., 1985; Istenič, Bulog, 1976).

Repate dvoživke nimajo timpanične membrane in votline srednjega ušesa. Tako uho je zelo slabo prilagojeno na sprejem zračnih zvočnih valovanj. Na kopnem naj bi zaznali le vibracije, ki se prenašajo preko tal. Obstaja hipoteza, da take vibracije zaznajo tako, da se do ušesa prenesejo preko kosti sprednjih nog in mišic. Bolj verjetno pa je, da na kopnem pač ne slišijo dobro in se orientirajo ter opazujejo okolico z očmi. V vodi dobro slišijo. Nekateri salamandri se celo oglašajo in tak način privabljanja samic v vodi, kjer se parijo, je bolj učinkovit, kot pa privabljanje s kemičnimi spojinami. Repate dvoživke pred matamorfozo in tiste, ki so stalno v vodi, lahko dobro izkoristijo zvoke pod vodo za svojo orientacijo in iskanje hrane ter za skrivanje pred plenilci. *Necturus*, iz družine Proteidae, slabo zaznava zvok preko zraka, zato sklepajo, da je to uho prilagojeno za zvok, ki potuje preko vodnega medija in nizke frekvence. Prav tako ni prisotna bazilarna papila, s katero zaznavajo druge dvoživke višje frekvence (Wever, 1985). Enako je tudi pri močerilu. Bulog in Schlegel (2000) predvidevata, da kot resonator delujejo pljuča in ustna votlina, napolnjena z zrakom.

Koščica srednjega ušesa je pri nekaterih vrstah repatih dvoživk operkulum (Salamandridae), pri drugih samo kolumela (Proteidae, Cryptobranchidae, Amphiumidae in Sirenidae), ali pa sta prisotni obe in sta zraščeni skupaj (Plethodontidae).

Koščica, katerakoli že je, je prekrita s plastjo mišic in kožo. Prilega se v odprtino ovalnega okna. Okroglega okna, kakršnega srečamo pri brezrepcih, pa repate dvoživke nimajo. Pri njih se je razvil drugačen način odvajanja valovanja. (Slika 7) Valovi se preko odprtine v otokranialnem septumu prenesejo skozi možgansko votlino v nasprotno otično kapsulo do ovalnega okna. V možgansko votlino vodi perilimfatični kanal (Wever, 1985). Enak način prehajanja valov preko možganske votline bi lahko imel tudi močeril (Istenič in Bulog, 1976).



Slika 7: Prečni prerez ušesne regije pupka (Taricha granulosa) (Wever, 1985)

2.1.5 Močeril

Membranski labirint je zelo dolg in nizek. Sinus superior, dorzalna razširitev utrikulusa, je močno reduciran, utrikulus pa močno podaljšan. Posledično se poveča tudi razmak anteriornega in posteriornega polkrožnega kanala. Pars superior membranskega labirinta je le neznatno oddaljen od pars inferior. Lateralni polkrožni kanal je najdaljši, na obeh straneh se odpira v utrikulus. Na anteriornem delu utrikulusa, na ventralni strani, se nahaja utrikularni recesus, v njem pa utrikularna makula (Istenič in Bulog, 1976). Utrikularna makula je pahljačaste oblike z razširjenim anteriornim delom. Funkcionalno-morfološka orientiranost čutnic je dvosmerna, kar je enako kot pri drugih dvoživkah (Bulog, 1089b,1990). Tik pred tem mestom se nahaja tudi ampula lateralnega kanala z lateralno kristo (Istenič in Bulog, 1976). Vse kriste so podolgovati čutilni epiteli, katerih orientiranost čutnic je enotna (Bulog, 1989b, 1990).

Sinus posterior je po obliki podoben polkrožnemu kanalu in povezuje utrikulus s posteriornim kanalom.

Sakulus se nahaja pod utrikulusom, med seboj sta povezana z utrikularno-sakularnim kanalom, ki je zelo kratek. Sakulus ima obliko medio-lateralno sploščene vreče, nameščen je poševno, zgornji rob pa je trikotasto zožen. Mediana stena je odebeljena in daje vrsto diferenciacij, na njej se nahaja tudi sakularna makula, lateralna pa je izredno tenka (Istenič in Bulog, 1976). Sakularna makula je okrogle oblike in konkavna. Na njej so štiri področja z različno funkcionalno-morfološko orientiranimi čutnicami. Zato lahko predpostavimo, da ima sakularna makula tudi vlogo pri zaznavanju smeri vira zvočnega delovanja. Ta orientiranost je veliko bolj zapletena kot pri drugih dvoživkah (Bulog, 1989b, 1990). Iz zgornjega roba mediane stene izhaja tudi endolimfatični kanal.

Tik pod utrikulo-sakularnim kanalom, na dorzo-mediani strani sakulusa, leži recesus amfibijske papile z amfibijsko papilo (Istenič in Bulog, 1976). Je najmanjši čutilni epitel in ima trikotno obliko, nameščen je skoraj vertikalno. Na njem sta dve področji s čutnicami, ki so orientirane vzporedno z vzdolžno osjo recesusa amfibijske papile (Bulog, 1989b,1990).

Mediano-posteriorno iz sakulusa izhaja lagena in v njej se nahaja lagenska makula. Pri nekaterih primerkih se na tem delu pojavi še dodatna izboklina, ki po lokaciji ustreza bazilarni oziroma lagenski papili.

Kot pri vseh vretenčarjih oživčuje notranje uho VIII. možganski živec. Anteriorna veja živca oživčuje anteriorno in lateralno kristo ter utrikularno makulo. Posteriorna veja pa oživčuje posteriorno kristo, sakularno makulo, lagensko makulo in amfibijsko papilo.

Živci in žile se nahajajo v perilimfatičnem tkivu, ki tudi pripenja membranski labirint v otično kapsulo. Tvori obsežen perilimfatičen prostor, ki se močno razširi ob sakulusu. Tanka membrana ga ločuje od lumna recesusa amfibijske papile, prehaja pa tudi v možgansko votlino.

Znatna razlika oblike in poteka perilimfatičnega kanala se pojavi pri različnih osebkih, kot tudi pri istem med levim in desnim ušesom. Variabilnost se pojavi tudi pri razvejitvah

živcev in pa v izboklini lagene, ki ni prisotna pri vseh, lahko pa celo samo v enem od obeh ušes (Istenič in Bulog, 1976).





Slika 8: Membranski labirint pri nepigmentirani podvrsti močerila (*Proteus anguinus anguinus*), z lateralne (zgoraj) in mediane (spodaj) strani (Bulog, 1976)

2.2 TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA

Ljudje smo vizualna bitja in opazovanje struktur nam pove največ. Naš svet je tridimenzionalen in navajeni smo gledati zunanje površine struktur. V primeru, da je kakšen del prosojen, vidimo tudi v notranjost, a to je redko. Prav zaradi tega imamo lahko težave pri predstavi, kaj pravzaprav gledamo, če vidimo samo prerez nečesa. Vsaj dokler se ne naučimo, kaj gledamo.

Dober primer, kako težko si predstavljamo prerez zapletene tridimenzionalne strukture, lahko ponazorimo s preprostim preizkusom. Vzamemo posodo makaronov ali kosmičev v obliki prstanov in si poskušamo predstavljati, kakšen bi bil prečen prerez. Najbolje, da to kar narišemo. Potem kosmiče prelijemo s karamelo in pustimo, da se strdi. Sedaj jih lahko prerežemo in ugotovili bomo, da se dejanski prerez največkrat močno razlikuje od slike, ki smo jo narisali prej. Zelo malo kosmičev je dejansko prerezanih tako, da se vidi kolobar.

Še težje pa si je predstavljati, kako izgleda tridimenzionalna struktura, če imamo pred seboj samo dvodimenzionalne prereze. To velja tudi za ljudi, ki so sicer zelo vešči prepoznave dvodimenzionalno prerezanih struktur.

Iz samega dvodimenzionalnega prereza je že težko ugotoviti, koliko struktur je prerezanih, kaj šele njihovo pravo zgradbo. Slika 9 lepo ilustrira, kako lahko iz treh popolnoma različnih struktur dobimo enak prečni prerez (Russ, 1999).



Slika 9: Prerez treh popolnoma različnih teles je enak (Russ, 1999)

Prav zaradi tega, ker tako težko raziskujemo tridimenzionalno strukturo na podlagi dvodimenzionalnih podob, se je razvilo že kar nekaj tehnik, ki omogočajo prikaz tridimenzionalne strukture. Poznamo direktne in indirektne tehnike. Direktne zberejo vse potrebne informacije za rekonstrukcijo strukture naenkrat (3D tomografija), pri indirektnih pa se zberejo informacije o dvodimenzionalni sliki in se te naknadno sestavi v tridimenzionalno (2D tomografija, histološke rezine, optične rezine) (Russ, 1999).

Takšni modeli, narejeni s pomočjo bodisi direktnih bodisi indirektnih tehnik, so zelo uporabni v didaktične namene (Cavey et al., 1993; Liu et al., 2007), bazične raziskave in razne klinične aplikacije. Še posebej so uporabni pri raziskavah raznih tubularnih struktur (Boag et al., 2001; Jirkovská et al., 2005; Stoltenberg et al., 1997). Model je možno kasneje še dodatno obdelati, kot so to storili Liu in sodelavci (2007), ki so iz tridimenzionalnega modela kohlee pri morskem prašičku razvili virtualni endoskop. Takšna orodja so pomembna pri pripravi na operacije, kot je vstavljanje kohlearnega implantata.

Tridimenzionalni modeli so tudi osnova za razvoj atlasov, to so modeli navadno manjših laboratorijskih živali, ki so tudi dostopni na internetu in prikazujejo anatomijo živali (Dogdas et al., 2007). Takšni atlasi imajo dodane še druge informacije, kot so npr. ekspresija genov (Ju T. et al., 2006). Primarno so bili narejeni kot orodje pri genetskih, farmakoloških in patoloških raziskavah. Med seboj povezujejo informacije o molekulah, genotipu, strukturi in funkciji nekega organa ali organizma (Bai et al., 2005).

Tomografija je vsaka metoda, ki rekonstruira strukturno informacijo znotraj objekta, tako da jo matematično rekonstruira iz serije projekcij. Tovrstne metode so nam predvsem znane kot diagnostično orodje v medicini in veterini. To so: rentgen in CT (X-žarki), magnetna resonanca (magnetno polje) in ultrazvok (zvočni valovi). Poleg teh se uporabljajo v drugih znanostih, kot so npr. kemija, fizika, še drugačne valovne dolžine elektromagnetnega polja: elektroni, nevtroni, radioaktivno sevanje in v geologiji sezmični valovi. Te metode s pomočjo absorbcije ali odboja različnih žarkov merijo gostoto ali kompozicijo elementov in iz teh podatkov računalnik sestavi sliko (Russ, 1999). Z uporabo tovrstnih tehnik, ki se s hitrim razvojem računalnikov stalno izpopolnjujejo, je v biomedicinskih raziskavah tridimenzionalna rekonstrukcija postala rutinska. Prednost teh tehnik je tudi ta, da so vsi prerezi navidezni in med seboj poravnani (Streicher et al., 1997). Tovrstne tehnike dandanes že omogočajo visoko resolucijo in so uporabne v raziskavah majhnih struktur, kot je notranje uho. So tudi precej hitrejše od histoloških metod (Van Spaendonck et al., 2000; Liu et al., 2007), vendar je slika, ki jo dobimo, črno-bela. Dobimo lahko zelo jasne slike tkiv z visoko gostoto in kontrastom, kot so kosti v ušesnem labirintu, ne dobimo pa hkrati tudi dobrih slik mehkih tkiv (Liu et al., 2007).

Vsaka zgoraj našteta metoda, med katere spada tudi magnetna resonanca, deluje na več načinov. Lahko se posname posamezne prereze ali pa direktno tridimenzionalno strukturo. To se je za uspešno izkazalo pri snemanju notranjega ušesa in živcev pri človeku (Held et al., 1997). Velika prednost tovrstnih tehnik je tudi ta, da lahko delamo z živim materialom.

Indirektna tehnika, ki je najbolj pogosta v bioloških laboratorijih, je rekonstrukcija iz histoloških rezin. Te so lahko pripravljene za svetlobno ali elektronsko mikroskopijo. Če želimo narediti dobro rekonstrukcijo, potrebujemo čim več zaporednih rezin.

V osnovi je rekonstrukcija sestavljena iz šestih korakov: dekonstrukcija strukture (rezanje serijskih rezin), barvanje, digitilizacija rezin, poravnava, priprava podatkov za tridimenzionalno rekonstrukcijo (orisovanje) in izdelava modela (Jirkovská et al., 2005).

Največji problem predstavlja dejstvo, da je rezina, ko je enkrat odrezana, podvržena različnim dejavnikom, ki jo spremenijo. Razmerje dimenzij in ne linearne deformacije so posledica rezanja, zvijanja, sušenja, naklona preparata, temperaturnih sprememb in optičnih distorzij mikroskopa. Poleg tega dodatne težave predstavlja deparifinizacija rezin, ki so bile vklopljene v parafin in barvanje (Fiala, 2005; Jirkovská et al., 2005; Streicher et al., 1997). Tem težavam se ne izognemo tudi z uporabo optičnih rezin (Jirkovská et al., 2005), kjer so napake posledica neujemanja refraktarnega indeksa na svetlobni poti in tudi samega krčenja tkiva, tekom priprave preparata. Enako velja tudi za klasične histološke rezine. Tkivo se krči skozi postopek dehidracije in predvsem bistrenja (Bucher et al., 2000). Vsaj delu težav se izognemo, če tkivo vklopimo v trši medij, ki ga ne odstranimo, ta pa tudi tkivu nudi boljšo oporo in bolje ohrani medsebojni položaj tkiv (Jirkovská et al., 2005, cit po Fujimura in Nozaka, 2002; Li et al., 2006).

Za čim boljše rezultate je bistvena poravnava. Če za poravnavo uporabimo same strukture na rezinah in posamezne rezine obračamo in raztezamo (odvisno kaj vse nam omogoča program), dobimo dokaj dobro poravnavo. Problem je v tem, da lahko poravnamo strukture, ki v resnici niso popolnoma poravnane. Rezultat je, da lahko iz prvotno nagnjenega valja naredimo pokončen valj ali iz okroglega valja eliptičnega, če je bila struktura rezana pod kotom. Prav tako moramo biti zelo pozorni pri raztezanju struktur, saj lahko strukturo, ki se v resnici zožuje, raztegnemo in dobimo nepravilno obliko (Russ, 1999). (Slika 10)



Slika 10: Slika prikazuje kako lahko z napačno poravnavo in raztezanjem dobimo napačen rezultat. (Navodila programa Reconstruct)

Nekateri računalniški programi omogočajo avtomatično poravnavo. Razvitih je že kar nekaj algoritmov, vendar je rezultat močno odvisen od samih podatkov. Zato je največkrat najbolje delati z ročnim označevanjem intrinzičnih ali umetno narejenih zunanjih označb (eksternih markerjev) (Fiala, 2005). Te se vključi v blok pred rezanjem in se jih nato reže skupaj s preparatom. Na ta način se nahajajo v vsaki rezini, njihova prednost pa je, da natančno poznamo njihovo obliko in potek. Če poznamo še njihove absolutne koordinate, pa nam to lahko pomaga izničiti raztezanje in deformacijo rezin. S tem tudi močno zmanjšamo napako v dimenzijah in volumnu modela. Označbe lahko naredimo z laserjem, v medij za vklapljanje poleg tkiva vstavimo vlakna (umetna ali organska) ali pa vrežemo žlebove v blokec (Russ, 1999).

Različni avtorji so se tega problema lotili na različne načine.

Li in sodelavci (2006) so predel notranjega ušesa temporalne kosti človeka vklopili v celoidin, ki ga po rezanju tudi niso barvali. Na ta način so se izognili napakam na rezinah, ki bi nastale pri barvanju. Pred rezanjem blokca pa so vanj, pravokotno na smer rezanja, blizu tkiva izvrtali štiri luknjice. Te so kasneje služile kot zunanje označbe pri poravnavi.

Luknje so v metakrilatni blokec izvrtali tudi Streicher in sodelavci (1997). Naredili so štiri luknje, tri so uporabili kot označbe, četrta pa je služila kot kontrola. Sicer so še dodatno naredili program, ki je poravnal rezine na osnovi teh označb in končni rezultat je bil zelo dober. Četrta luknja je bila tudi pravilno poravnana in je imela enako obliko kot ostale tri. Na ta način so bili lahko prepričani, da je model, v njihovem primeru tačka mišjega embrija, zanesljiv.

Meyer in Domanico (1988) sta izdelala poseben modelček, v katerega sta vlila medij za vklapljanje (epon), tako da je bil blokec pravilen kvader z znanimi dolžinami stranic. Le tega sta prebarvala z barvo (akrilne, emajlne barve) in nato še obdala s eponom. Na koncu je bil na vsaki rezini okoli tkiva viden kvadrat, ki je služil kot zunanja označba.

Podobno lahko dosežemo tudi s pomočjo dvojnega vklapljanja agar-parafin, kjer agar predhodno obarvamo (Streicher et al., 1997, cit po Arnolds, 1978).

Blokec in tkivo se lahko prebode z iglo (Boag, 2001), vendar tu tvegamo, da poškodujemo kakšno ključno strukturo.

Tudi sam trajen medij lahko služi s svojimi robovi kot zunanja označba (Jirkovská et al., 2005, cit po Fujimura in Nozaka, 2002). Vse opisne metode pridejo v poštev le v primeru, da medija za vklapljanje, v katerem so zunanje označbe, ne odstranimo.

Poravnavo pa lahko naredimo tudi brez predhodno narejenih zunanjih označb in se zanesemo na kontiniuteto struktur našega preparata (Arnold in Lang, 2001; Rother et al., 2003).

Liu in sodelavci (2007) pa so se poslužili drugačne metode zbiranja rezin. Kohleo morskega prašička so obarvali, napolnili z modro želatino in pripravili za kriorezine. Ključ njihove metode je zbiranje surovih podatkov. Med samim rezanjem na kriotomu so sproti fotografirali blokec s tkivom. Tako so dobili fotografijo kohlee, ki je bila intaktna. Zbrali so serijo navideznih rezin, ki pa so se izkazale za zelo dobre, saj niso bile podvržene individulanim spremembam. Predhodno barvanje je omogočilo, da so se posamezne strukture dobro videle in ločile med seboj. Notranjost, napolnjena s želatino, je preprečila, da bi se videle spodnje plasti, ki še niso bile odrezane. To metodo so prej uspešno uporabili pri projektih Visible human project (Liu et al., 2007, cit po Spitzer in whitlock, 1998) in Virtuale chinese human project (Liu et al., 2007, cit po Yuan et al., 2003), kjer so na ta način pridobili fotografije prečnih prerezov celega človeka.

Obstajajo še druge metode, ki se izognejo problemu rezanja. Ena je metoda, pri kateri strukturo, v tem primeru notranje uho, napolnimo z barvo. Glavo se prehodno zbistri, da je vidna tudi notranjost, nato se naredi luknjo in v votel organ vbrizgne barvo (barvo za stene, ki se jo dobi v vsaki trgovini). Ta se strdi in lahko izoliramo uho. Metoda je zelo hitra, poceni in uporabna, če nas zanima groba morfologija organa (Bever et al., 2003; Kiernan, 2006).

Ghanem in sodelavci (1998) so izolirali notranje uho ribe in ga celega vklopili v prozoren medij. Nato so ga poslikali z vseh šestih stranic in te ortagonalno postavljene slike sestavili v tridimenzionalni model.

Ko so enkrat rezine poravnane, lahko nadaljujemo z rekonstrukcijo. V primeru, da se na zaporednih rezinah nahaja le ena struktura, lahko takoj nadaljujemo z izdelavo modela. Takšne rezine navadno dobimo s konfokalnim ali fluorestenčnim mikroskopom. Navadno pa histološke rezine vsebujejo mnogo struktur. Takrat je potreben dodaten korak in sicer segmentacija struktur. To delo zelo težko prepustimo računalniku, čeprav obstajajo tudi avtomatski načini. Najbolje je ročno izbrati dele, ki želimo, da so kasneje predstavljeni kot tridimenzionalni model. To naredimo tako, da orišemo izbrane strukture. Iz teh označenih struktur nato računalniški program generira površino modela in ga še dodatno osenči, da je bolj realističen (Fiala, 2005).

Kako natančno poteka strukturiranje oziroma orisovanje in generiranje modela, je odvisno od samega programa. Na trgu je na voljo mnogo programov, kot so npr. Amira, Neurolucida, 3D Doctor, ki so plačljivi. Program Reconstruct pa se brezplačno lahko dobi na internetu (<u>http://synapses.bu.edu/</u> ali <u>http://synapses.mcg.edu/</u>). Omogoča nam vse opisane korake, od uvoza slik v program, poravnave, orisovanja, do generiranja modela. Model lahko tudi pregledamo v 3D sceni, kjer ga obračamo in ga izvozimo kot sliko ali VRML datoteko, ki jo lahko odpremo v kateremkoli programu za prikaz tridimenzionalnih podob (Fiala, 2005).

2.3 MAGNETNA RESONANCA

Magnetna resonanca izhaja iz magnetnih lastnosti jedra atoma. Atomsko jedro sestavljajo nevtroni in protoni, s skupnim imenom imenovani nukleoni. Nabite delce v jedru si predstavljamo kot magnetne dipole, ki se vrtijo okoli svojega jedra. To gibanje naboja ustvari magnetno polje. Nukleonom lahko pripišemo nuklearni spin, to je fizikalna količina, izpeljana iz kvantne fizike. Spinsko število nam pove, da se nukleoni v magnetnem polju nahajajo samo v točno določenih energijskih stanjih oziroma smereh. V jedru se navadno uredijo po parih, tako da je skupni magnetni moment enak nič. Pojav magnetne resonance pa je mogoč, ko je magnetni moment različen od nič (Demšar et al., 1996).

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

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

3 MATERIAL IN METODE

3.1 POSKUSNE ŽIVALI

Za potrebe diplomskega dela smo uporabili glave nepigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus anguinus*) in pigmentirane podvrste močerila (*Proteus anguinus parkelj*).

Eno žival smo vzeli iz zbirke (Č7), ostale pa so že bile uporabljene v drugih raziskavah skupine za Funkcionalno anatomijo vretenčarjev in so bile zato glave hranjene posebej.

Dva osebka (P150, P151) nepigmenirane podvrste močerila sta bila ulovljena v Otoškem bregu leta 2000 in isti dan tudi fiksirana. Glavi teh dveh osebkov sta bili leta 2001 vklopljeni v paraplast in hranjeni kot parafinska blokca. Podatkov o velikosti glave in načinu priprave preparata nismo našli. Osebek P188 nepigmenirane podvrste močerila je bil ulovljen v Krupi leta 2007. Bil je uporabljen v študiji PCB in je bila glava posebej hranjena v 70% etanolu. To glavo smo uporabili za snemanje z magnetno resonanco in je tako ostala cela.

Vseh pet osebkov pigmentirane podvrste močerila je bilo ujetih v Jelševniku. Tri živali so bile že uporabljene v drugih raziskavah, tako da so bile glave posebej hranjene v alkoholu. Dve (Č12, Č13) sta bili samo odstranjeni s telesa in fiksirani, Č4 pa je bila fiksirana v osmijevem tetroksidu in je bila že uporabljena v druge namene, vendar je bila otična kapsula še nedotaknjena. Izolirali smo eno uho. En osebek je bil hranjen v zbirki (Č7) in smo ga za potrebe študije dekapitirali in telo shranili. Največji osebek (Č15) pa je poginil v laboratoriju in ni bil tako dolgo v alkoholu kot drugi osebki. Vzeli smo glavo in odstranili spodnjo čeljust, ki smo jo shranili v alkoholu. Osebek je bil hkrati uporabljen še v druge namene.

Oznaka osebka	Spol	Lokaliteta	Datum ulova	Datum fiksacije	Dolžina telesa	Dolžina glave	Širina glave [cm]
P150	4	Otoški breg	27.10.2000	27.10.2000	28 cm	/	/
P151	9	Otoški breg	27.10.2000	27.10.2000	24 cm	/	/
P188	8	Krupa	30.6.2007	11.7.2007	26 cm	3,4 cm	2,1
Č12	8	Jelševnik	3.6.2002	23.9.2003	24,7 cm	2,8 cm	1,3 in 1,6
Č13	8	Jelševnik	18.9.2003	3.12.2003	25,3 cm	2,8 cm	1,3 in 1,6
Č7	/	Jelševnik	30.1.1997	28.12.1997	21 cm	2,6 cm	0,9 in 1,4
Č15	2	Jelševnik	5.6.2006	januar 2008	36 cm	4 cm	1,3 in 2,2
Č4	/	Jelševnik	/	1994	17,9 cm	2 cm	/

Preglednica 1 : Podatki o poskusnih živalih

/ - ni podatka

3.2 HISTOLOŠKI PREPARATI

Oznaka osebka	Fiksativ	Dekalcinacija	Rezanje (serijsko)	Barvanje
P150	Holland-Bouin	/	52 x 6 in 118 x 4	HE
P151	Holland-Bouin	/	10 x 12 in 180 x 6	HE
P188	70% etanol	Slikanje z metodo	magnetne resonance)
Č12	Bouin	EDTA klasično	265 x 6	HE
Č13	Bouin	EDTA MW in	Klasično +	
		5% HNO ₃ MW	kriorezine	
Č7	75% etanol	5% HNO ₃	1 x 8, 3 x 6 in	HE
		klasično	42 x 5	
Č15	70 % etanol	5% HNO ₃	45 x (6-7)	HE
		klasično		
Č4	osmij	EDTA klasično	Poltanke, izolirano	AMB

Preglednica 2: Postopki priprave histoloških rezin na posameznih osebkih

MW- mikrovalovni sistem HE - hematoksilin eozin AMB - Azur II Methylen blue / - ni podatka

3.2.1 Parafinske rezine

Dve glavi nepigmentirane podvrste močerila (P150 in P151) sta bili že vklopljeni v paraplast. Rezali smo jih z mikrotomom Reichest Jung 2040 na debelino 10 μ m. Rezani sta bili z anteriorne strani proti posteriorni, tako so se ohranili še posteriorni deli glav. Pri P150 smo pred rezanjem z mikrotomom odrezali anteriorni del gobca. Rezine smo rezali serijsko. Pobarvane so bile s hematoksilin in eozin barvanjem v avtomatskem sistemu na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. (Priloga A)

Glave pigmentirane podvrste močerila so bile shranjene v fiksativu, zato jih je bilo potrebno dekalcinirati, dehidrirati v alkoholni vrsti, razbistriti in vklopiti v paraplast. Uporabili smo dva načina dekalcinacije: dianatrij etilen diamino tetraocetno kislino (EDTA) (Priloga B), ki deluje kot helator dvovalentnih ionov (Ca²⁺) in 5 % dušikovo kislino (HNO₃). (Priloga C in D)

Eno glavo (Č13) smo dekalcinirali z EDTA s pomočjo mikrovalovnega sistema Pelco biowave, ki močno skrajša čas postopka (Madden in Henson, 1997). (Priloga E) Metoda ni bila uspešna, ker se je glava močno skrčila in postala tako trda, da je ni bilo mogoče rezati.

Glavo Č12 smo rezali celo, serijsko od anteriorne proti posteriorni strani. Debelina rezin je bila 10 μ m. Pri glavi Č7 smo še pred dekalcinacijo odstranili kožo in mišice z otične regije, prav tako pri glavi Č15, kjer pa smo še dodatno odstranili spodnjo čeljust. Vklopljene dele glave oziroma otične regije smo rezali serijsko, z mikrotomom Reichert Jung 2040 na 10 μ m debele rezine. Vse, razen Č15, so bile pobarvane s hematoksilin in eozin barvanjem v avtomatskem sistemu na Inštitutu za patologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Glavo Č15 smo barvali v histološkem laboratoriju na Oddelku za biologijo. (Priloga A)

Težave pri rezanju so se pojavile pri vseh v paraplast vklopljenih glavah pigmentirane podvrste močerila. Č12 očitno ni bila dovolj dekalcinirana in so se pri rezanju potrgali vsi deli membranskega labirinta in je na rezinah viden samo koščeni labirint. Prav tako niso uspele rezine drugih dveh glav, saj je vmes manjkalo preveč rezin, med rezanjem so se trgale, tako da so bile neuporabne. Nismo dobili zadostno število dobrih zaporednih rezin, iz katerih bi se dalo narediti tridimenzionalni model.

Zaradi težav pri pripravi parafinskih rezin Č13 smo poskusili pripraviti še kriorezine, kar pa se tudi ni izkazalo za uspešno. Rezina se je sicer zelo lepo odrezala, vendar jo je bilo nemogoče celo dobiti na stekelce, prekrito s Cr-galun želatino. Rezine se na stekelce niso dobro prijele, tako da se določenih struktur ni dalo videti, ker so bile zavite. Tudi barvati se jih ne bi dalo, ker bi se med postopkom odlepile s stekelca. (Priloga E)

3.2.2 Poltanke rezine

Glava Č4 je bila shranjena v 70 % etanolu in fiksirana v osmijevemtetraoksidu (OsO₄). Žal nismo našli nobenih podatkov o tem, kako natančno je bila tretirana. Dekalcinirali smo jo v EDTA, in sicer 4 dni, tako da se je raztopila tudi otokonialna masa v sakulusu. Nato smo spirali pod tekočo vodo čez vikend spravili v 70 % etanol. Zopet smo jo sprali z vodo in izolirali desni membranski labirint. Fotografirali smo ga že med samo sekcijo, ko sta bili odstranjeni le lateralna in ventralna stena ter popolnoma izoliranega. Fotografirali smo jih pod lupo Olympus SZX9, s kamero Olympus ColorView. Uporabili smo 20 x in 28,5 x povečavo. Preparat smo še dodatno osvetlili z lučko Olympus Europe Highlight 3100. Program, ki smo ga uporabili za zajem fotografij in njihovo optimalno nastavitev je bil CellB. Notranje uho smo nato dehidrirali in vklopili v Spurr. (Priloga F) Rezali smo z ultramikrotomom Leica CM1850.

Za obarvanje rezin smo uporabili metodo barvanja po Richardsonu.

Rezine smo iz vode prenesli v kapljico vode na objektnem stekelcu in jo pol ure pustili na termoplošči, da se posuši. Rezine smo nato pokapali z 1 % perjodno kislino (2 min na sobni temperaturi) in sprali z destilirano vodo. Pobarvali smo jih z barvilom Azur II Methylen blue (nekaj sekund na vroči plošči), sprali z destilirano vodo in posušili.

3.3 ZUNANJE OZNAČBE

Za olajšanje poravnave smo preizkusili več načinov, kako bi dodali zunanje označbe. Pri parafinskih rezinah ne pridejo v poštev nobene luknje, saj se pred barvanjem parafin odstrani. Zato smo poskusili dvojno vklapljanje v agar-parafin. Metodo smo preizkusili na majhnem koščku kože ribe in samo koščku agarja brez kakršnega koli tkiva. Pripravili smo agar (Gabe, 1976) in ga obarvali s safraninom. Nato smo ga dehidrirali (dvakrat 10 min v 70 % etanolu, 10 min in 15 min v 96 % etanolu) in zbistrili v ksilenu (dvakrat po 10 min). V paraplastu smo ga pustili čez noč. Ko smo oba vzorca poskušali rezati na mikrotomu, je bil agar premehak. Zdelo se je, da se paraplast sploh ni infiltriral vanj. Zato te metode nismo preskušali na glavi močerila.

Poskusili smo tudi z metodo, ki sta jo uporabila Meyer in Domanico (1998). Izdelali smo lesen kvader in naredili njegov kalup. Nato smo v ta modelček znanih dimenzij v paraplast vklopili glavo. Ko se je paraplast strdil, smo ga vzeli ven in premazali z lakom za nohte. Pred tem smo preizkusili tudi akrilno barvo, vendar ni ostala na stekelcu, če smo ga tretirali s ksilenom. Zato smo sklepali, da bi bila po barvanju neuporabna. Blokec, premazan z lakom, smo še enkrat vklopili v paraplast. Pri rezanju se je lak luščil in se ni prijel stekelca. Tudi ta metoda zunanjih označb se ni izkazala kot uspešna.

Poizkusili smo s fotografiranjem preparata med samim rezanjem, kot so to storili Lui in sodelavci (2007), vendar se metoda ni obnesla.

Pri poravnavi se je kot uspešna zunanja označba odrezal Spurr, ki se ga po rezanju ne odstrani. Prav tako se ne razteza, je pa na nekaterih delih počil in se zavihal, a to ni bilo moteče. Hkrati smo se opirali tudi na samo strukturo ušesa. Rezine smo lahko poravnali glede na njihove robove, saj smo jih poslikali pod majhno povečavo, tako da se je videl ves medij.
3.4 TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA

Vse rezine, na katerih je bilo prisotno notranje uho, smo fotografirali pod povečavo 2,5 x objektiva. Delali smo na mikroskopu Axioskop 2 MOT Zeiss, z Axiocam MRc Zeiss in programom Axiovision 3.1. Za tako majhno povečavo smo se odločili zato, ker je omogočala da je bilo v vidnem polju zajeto celotno notranje uho in nekaj okoliškega tkiva. Na ta način smo se izognili sestavljanju slik v celoto. Dodatne strukture oziroma robovi rezin pri poltankih rezinah so tudi služili kot oporne točke pri poravnavi rezin. Fotografije so bile shranjene v tiff formatu. Pred nadaljnjo uporabo v programu Reconstruct smo slike spremenili v jpeg format s pomočjo programa ACDsee 6.0 in tako zmanjšali njihovo velikost.

V programu Reconstruct smo uspešno naredili rekonstrukcijo notranjega ušesa osebka P150 in osebka Č4. Naredili smo tudi rekonstrukcijo membranskega labirinta osebka P151, vendar ni popolna. Pri osebku P150 smo uporabili vsako drugo rezino debeline 10 μ m in v programu določili debelino rezine 20 μ m, pri osebku Č4 pa smo uporabili poltanke rezine. Rezine so bile debeline 2,5 μ m, vzeli smo vsako četrto in v programu določili debelino 10 μ m.

Najprej smo fotografije uvozili (import) v program, jih kalibrirali in nato poravnali (align). Poravnavo se naredi med dvema sosednjima rezinama. Na prvi rezini smo izbrali nekaj fiksnih točk, ki se pojavijo tudi na sosednji rezini (npr. mišično vlakno, živčno vlakno ...), jih označili in s funkcijo align poravnali drugo rezino na prvo. Postopek smo ponovili skozi celotno serijo fotografij in jih poravnali drugo na drugo. Pri poltankih rezinah je bil viden medij (Spurr), ki se ne razteza med procesom sušenja in tako smo kar kote rezin uporabili kot referenčne točke za poravnavo.



Slika 11: Dve zaporedni rezini pred poravnavo (levo) in po poravnavi (desno)

Poravnavi je sledilo orisovanje (tracing). Na vsaki rezini je potrebno označiti, kar želimo, da je prikazano v tridimenzionalni sliki. Tako smo s pomočjo grafične tablice (Trust) orisali vse dele membranskega labirinta in čutilnih epitelov. Te so sedaj kot objekt predstavljeni v tridimenzionalnem prikazu.



Slika 12: Orisane strukture (rumeno), ki jih program lahko prikaže v tridimenzionalnem prikazu.

Tridimenzionalni model smo kot sliko shranili kot 360° bitmap. Tako smo dobili večje število slik (odvisno od kota zasuka), ki se jih lahko odpre v vsakem programu za prikazovanje slik, lahko pa se tudi naredi animacijo (Windows Movie Maker). (Priloga G)

3.5 MAGNETNA RESONANCA

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

Magnetnoresonančni tomograf je osnovan okoli 2.35 T superprevodnega horizontalnega magneta (Oxford Instruments) z odprtino za slikanje premera 15 cm, gradientnih ojačevalnikov in tuljav za slikanje z ločljivostjo do 0.5 mm (makro slikanje) ter do 0.05 mm (MR mikroskopija). Magnet je priključen na NMR/MRI spektrometer (Apollo, TecMag), ki omogoča izvajanje zapletenih zaporedij za slikanje in spektroskopijo (http://www-f5.ijs.si/index.php?p=lod&m=&lang=sl&i=113).

Glavo smo vzeli iz alkohola, jo obrisali in zavili v folijo za živila, da se ne bi med snemanjem izsušila. Nato smo jo vstavili v magnetnoresonančni tomograf.

Ta se nahaja v posebni sobi, ki deluje kot Faradejeva kletka in preprečuje zunanje motnje (elektromagnetno valovanje). Snemanje je potekalo čez vikend, brez poprečitev pa je trajalo 11 ur in 7 minut. Naredili smo 6 poprečitev.

Parametri pri slikanju:

 T_E - čas spinskega odmeva; T_E = 3 ms T_R - repetition time; T_R = 600 ms Matrika slikanja = 256³ Vidno polje = 3 cm Gr = 62,66 Gp = 40,10 Gs = 11,04

Ločjivost na sliki je 120 µm.

Metoda snemanja je bila 3D spin echo, ki direktno posname tridimenzionalno sliko. Tip slike je bil tak, da je poudaril kontrast.

Za pregledovanje posameznih navideznih rezin, ki se jih da pogledati iz vseh možnih kotov, smo uporabili program ImageJ. Če želimo format teh slik odpreti v tem programu, je treba imeti dodaten plug-in, ki smo ga dobili na Institutu Jožef Stefan. S tem programom smo tudi pogledali tridimenzionalno sliko cele glave, ki je rezultat snemanja. Za to smo uporabili plug-in VolumeJ.

4 REZULTATI

4.1 NEPIGMENTIRANA PODVRSTA MOČERILA



Slika 13: Nepigmentirana podvrsta močerila (P151) levi membranski labirint. 1,2 lateralno in 3,4 mediano. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 200 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 14: Nepigmentirana podvrsta močerila (P151) desni membranski labirint. 1,2 lateralno in 3,4 mediano. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μ m) v seriji, uporabljenih je bilo 200 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 15: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) levi membranski labirint. 1,2 lateralno in 3,4 mediano. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 196 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 16: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) levi membranski labirint, perilimfatična cisterna, perilimfatični kanal in endolimfatična vrečka. 1,2 lateralno, 3 mediano in 4 z anteriorne strani. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 196 navidezno rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm.





Slika 17: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint. 1,2 lateralno in 3,4 mediano. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 214 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 18: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint. 1,2 dorzalno in 3,4 ventralno. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 214 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 19: Nepigmentirana podvrsta močerila (P150) desni membranski labirint in perilimfatični prostor. 1,2 lateralno, 3 mediano in 4 ventralno. Model je narejen iz vsake druge parafinske rezine (10 μm) v seriji, uporabljenih je bilo 214 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm.



Slika 20: Tridimenzionalni model desnega membranskega labirinta nepigmentirane podvrste močerila (P150), model pogled leteralno. Ravnine prerezov glave skozi otično regijo so označene na modelu s črtami, ki označujejo določen prerez. Merilce na slikah prerezov - 500 μm, povečava 2,5x objektiv.

Iz serijskih rezin glav dveh osebkov nepigmentirane podvrste močerila smo izdelali štiri tridimenzionalne modele membranskega labirinta, levega in desnega pri vsakem. K notranjem ušesu spada še otična kapsula, katere tridimenzionalnega modela nismo naredili. Pri osebku P151 tridimenzionalna modela nista popolna, saj manjka posteriorni del s posteriorno ampulo in posteriorno kristo (Slika 13 in Slika 14). Pri osebku P150 sta oba tridimenzionalna modela cela in dodana sta tudi perilimfatični prostor in perilimfatični kanal ter endolimfatična vrečka. (Slika 15 do Slika 19)

Vsi ti tridimenzionalni modeli so izdelani iz parafinskih rezin debeline 10 μ m. V programu Reconstruct smo zaradi velikega števila rezin uporabili vsako drugo rezino v seriji in sestavili tridimenzionalen model iz rezin z navidezno debelino 20 μ m. Na ta način smo ohranili tretjo dimenzijo (z) v pravem razmerju.

Trije tridimezionalni modeli (P151 oba in P150 levo) so predstavljeni z lateralne in mediane strani. Tridimenzionalni model desnega membranskega labirinta P150 je predstavljen še z ventralne in dorzalne strani (Slika 18). Pri vseh so isti modeli predstavljeni še tako, da je membranski labirint prosojen in se vidijo znotraj le-tega tudi čutilni epiteli. Računalniški program sicer omogoča ogled modela z vseh strani, lahko se ga zvezno obrača in poveča. Na tridimenzionalnem modelu desnega membranskega labirinta P150 so prikazani še posamezni prerezi in na modelu je označeno, čez kateri del potekajo. (Slika 20) To so 10 mikronski prečni prerezi glave v otični regiji, barvani s Hematoksilinom-Eozinom (HE) in fotografirani pod 2,5 x povečavo objektiva.

Membranski labirint nepigmentirane podvrste močerila je podolgovate oblike in in dorziventralno sploščen. Konkretno desni labirint P150 je dolg 4,3 mm in visok 2 mm. (Slika 17)

Anteriorni polkrožni kanal se odpira iz anteriornega dela utrikulusa in poteka do zgornjega dela labirinta – sinus superior, kjer se konča. Tu se odpira tudi posteriorni polkrožni kanal, katerega ampula se v ventralno posteriornem delu membranskega labirinta odpira v sinus posterior. (Slika 15 in Slika 17) Ta del je po svoji obliki podoben polkrožnim kanalom. Odpira se v posterio-ventralni del utrikulusa. Njegov lumen je v primerjavi z ostalimi strukturami na prerezu, to so posteriorni polkrožni kanal, utrikulus in lateralni polkrožni kanal, precej velik in se med levim in desnim labirintom rahlo razlikuje po obliki. (Slika 21)



Slika 21: Prečni prerez skozi posteriorni del leve in desne otične regije osebka P150. Debelina rezine je 10 μm, barvano HE. Merilce znaša 500 μm.

Sakulus je velika struktura v ventralnem delu membranskega labirinta. (Slika 17) Ima debelejšo mediano steno, na kateri se nahaja sakularna makula in tanjšo lateralno steno. Sakularna makula je postavljena v vertikalni smeri in je okrogle oblike. (Slika 17 in Slika 23) Po velikosti med čutilnimi epiteli ne izstopa. Sakulus je z utrikulusom povezan preko ozkega utrikularno-sakularnega kanala, ki se nahaja nekje na sredini dorzalnega dela sakulusa. (Slika 22) Posteriorno od njega se pojavi recesus amfibijske papile.

V seriji rezin se za tem pojavi čutilni epitel, amfibijska papila, ki se slepo konča v izboklini recesusa. Na preparatu je vidna tudi tektorialna membrana, ki je kupulaste oblike. (Slika 20b) Večji del vertikalno orientirane amfibijske papile se nahaja v mediani steni recesusa. Ventralno se vidi tudi tanko kontaktno membrano, ki ločuje recesus amfibijske papile in perilimfatični kanal. (Slika 20b in slika 22) Tudi na tridimenzionalnem modelu je razvidno, tesno prileganje omenjenih struktur. (Slika 16 in slika 19)



Slika 22: Prečni prerez skozi desno otično regijo osebka P150 v predelu amfibijske papile in utrikularno-sakularnega kanala. Debelina rezine je 10 μm, barvano HE. Merilce znaša 500 μm.



Slika 23: Prečni prerez skozi levo otično regijo osebka P150 v predelu odprtine endolimfatičnega kanala. Debelina rezine je 10 μm, barvano HE. Merilce znaša 500 μm.

Obe ampuli, anteriorna in posteriorna, sta precej veliki. Obe kristi sta ozki in podolgovati, nahajata se na distalni steni ampule. Sta podkvaste oblike in obrnjeni proti središču membranskega labirinta. (Slika 17, Slika 18)

Ampula lateralnega polkrožnega kanala leži v njegovem anteriornem delu, in sicer lateralno od utrikularnega recesusa. Krista leži v latero-ventralni steni ampule in je podkvaste oblike. (Slika 17) V primerjavi z lego anteriorne in posteriorne kriste, je lateralna krista postavljena na njuno pravokotno smer. Na tem delu je lateralni polkrožni kanal povezan z utrikulusom. (Slika 20f) Od tu poteka v posterio-lateralni smeri proti posteriorni ampuli, vendar pred njo zavije v anteriorno smer in se zlije z utrikulusom v

njegovem posterio-lateralnem delu. (Slika 17) V tem predelu se nahaja lagena. To je izboklina mediano posteriornega dela sakulusa. S sakulusom je povezana preko sakulolagenarnega kanala. (Slika 20g) V njenem ventralno medianem delu se nahaja makula lagene. (Slika 17 in Slika 20g) Je konkavne ovalne oblike.

Utrikulus je podolgovate oblike in se od anteriornega dela proti posteriornem delu dviga v dorzalni smeri. (Slika 17) V antero-ventralnem delu se nahaja utrikularni recesus in v njegovi ventralni steni utrikularna makula. (Slika 20f) Po obliki je v sprednjem delu širša kot v zadnjem. Nahaja se mediano od lateralne kriste in oba čutilna epitela sta na vseh prerezih vidna blizu skupaj.

Vsi deli membranskega labirinta so prostorsko povezani in po njih se pretaka endolimfatična tekočina. Ta gre tudi v endolimfatični kanal, ki se odpira iz dorzalno medianega dela sakulusa (Slika 23) in prehaja v možgansko votlino, kjer se razširi v endolimfatično vrečko. (Slika 16, slika 19 in slika 20h) Njena oblika se med levim in desnim notranjim ušesom rahlo razlikuje.

Pri vseh strukturah membranskega labirinta se oblika prerezov struktur razlikuje med levim in desnim ušesom. (Slika 21) Enako velja tudi za različne osebke.

Perilimfatični kanal se pojavi tik pred recesusom amfibijske papile, s katerim tvori tanko kontaktno membrano. (Slika 20b) Nato poteka posteriorno, v višini utrikulusa in nad sinus posterior. (Slika 16, Slika 19 in Slika 21) V predelu lagene se odcepi proti odprtini v otični kapsuli, skozi katero preide v možgansko votlino. (Slika 20a) V področju zavoja lateralnega polkrožnega kanala se poveže s perilimfatično cisterno. Ta zapolnjuje velik del otične kapsule. Tesno se prilega lateralni steni sakulusa in se nahaja med sakulusom in lateralnim polkrožnim kanalom. (Slika 23) Na ventralni strani presega membranski labirint, na dorzalni strani pa sega nekje do sredine sinus superior. Anteriorno se pojavi kmalu za lateralno ampulo in se konča malo pred zavojem lateralnega polkrožnega kanala. (Slika 16 in 19) Oblika in položaj sta pri levem in desnem notranjem ušesu v večini enaka, pri desnem se tik pred odprtino v perilimfatični kanal močno zoža in nato malo razširi. Tudi perilimfatični kanal pri obeh notranjih ušesih poteka enako, le da je v levem ob sinus posterior nekoliko sploščen v ventralno-dorzalni osi. (Slika 21) Razlika v obliki prereza je prisotna tudi pri drugem osebku. Tu se pred združitvijo s perilimfatično cisterno perilimfatični kanal razdeli v dva dela. En se združi s cisterno, drug pa kmalu slepo konča.

Pri nobenem osebku se ne pojavi žepasta izboklina na prehodu sakulusa v lageno.

4.2 PIGMENTIRANA PODVRSTA MOČERILA



Slika 24: Ventralni pogled na desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Otična kapsula je z ventralne strani odstranjena. Izostrene so ventralne strukture. Merilce znaša 1 mm. Posneto pod stereo lupo z 20 x povečavo.



Slika 25: Ventralni pogled na desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Otična kapsula je z ventralne strani odstranjena. Izostrene so dorzalno ležeče strukture. Merilce znaša 1 mm. Posneto pod stereo lupo z 20 x povečavo.



Slika 26: Izolirano desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Ventralni pogled, izostrene in označene so dorzalno ležeče strukture. Na sliki je dobro vidno oživčenje membranskega labirinta in njegovih čutilnih epitelov. Povečava 28,5 x. Velikost merilca je 1 mm.



Slika 27: Izolirano desno notranje uho pigmentirane podvrste močerila (Č4). Ventralni pogled, izostrene in označene so ventralno ležeče strukture. Na sliki je dobro vidna inervacija membranskega labirinta in njegovih čutilnih epitelov. Povečava 28,5 x. Velikost merilca je 1 mm.





Slika 28: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4). 1,2 lateralno in 3,4 mediano. Model je narejen iz vsake četrte poltanke rezine (2,5 μm) v seriji, uporabljenih je 290 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 29: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4). 1,2 dorzalno in 3,4 ventralno. Model je narejen iz vsake četrte poltanke rezine (2,5 μm) v seriji, uporabljenih je 290 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm. 2 in 4 prosojnost modela 0.6, tako se vidijo tudi čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta.





Slika 30: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4) s perilimfatičnim kanalom, perilimfatično cisterno in endolimfatično vrečko. Perilimfatična cisterna je na preparatih dobro vidna le v dorzalnem delu, tako da ventralni del ni zanesljiv. 1 lateralno, 2 mediano, 3 z anteriorne strani in 4 s posteriorne strani. Model je narejen iz vsake četrte poltanke rezine (2,5 μm) v seriji, uporabljenih je 290 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm.





Slika 31: Desni membranski labirint pigmentirane podvrste močerila (Č4) z VIII. možganskim živcem. 1 ventralno, 2 ventralno, z 0.6 prosojnostjo, tako da so vidni čutilni epiteli znotraj membranskega labirinta, 3 mediano in 4 s posteriorne strani. Na 3 in 4 je dodan še perilimfatični kanal. Model je narejen iz vsake četrte poltanke rezine (2,5 μ m) v seriji, uporabljenih je 290 rezin. Dolžina merilca znaša 1 mm.



Slika 32: Tridimenzionalna rekonstrukcija desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila (Č4). Model pogled leteralno. Ravnine prerezov notranjega ušesa so označene na modelu s črtami. ki označujejo določen prerez. Merilce na slikah prerezov je 500 μm, povečava 2,5x objektiv.

Tridimenzionalni model desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila je izdelan iz poltankih rezin. Debelina rezin je 2,5 μ m, model pa je sestavljen iz vsake četrte rezine v seriji. Zaradi ohranitve dolžine membranskega labirinta (dimenzija z) smo v programu določili debelino rezine 10 μ m. Tudi tukaj je narejen samo tridimenzionalni model membranskega labirinta, saj je bil velik del otične kapsule med postopkom izolacije odstranjen. Del anteriornega polkrožnega kanala se je pri vklaplanju poškodoval in ni viden na prerezih. (Slika 32b) Ta del je na modelu simuliran z valjasto obliko, pri kateri se jasno vidi, da ni sestavljena iz posameznih rezin. (Slika 28) Na enak način je tudi popravljen del posteriornega polkrožnega kanala.

Tridimenzionalni model desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila je prav tako kot pri nepigmentirani podvrsti močerila predstavljen s štirih strani (lateralno, mediano, ventralno in dorzalno). (Slika 28 in Slika 29) To omogoča medsebojno primerjavo. Prikazani so še posamezni prečni prerezi membranskega labirinta in njihova lega na tridimenzionalnem modelu. (Slika 32) Prečni prerezi so debeline 2,5 µm, barvani po Richardsonu in so fotografirani pod 2,5 x povečavo objektiva.

Na modelu je dodan še perilimfatični kanal in perilimfatična cisterna (Slika 30) ter živci (Slika 31). Njihov potek je dobro viden tudi na fotografijah izoliranega organa. (Slika 24 do Slika 27)



Slika 33: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu utrikulosakularnega kanala. Debelina rezine je 2,5 μm, barvano po Richardsonu. Merilce je 500 μm, povečava 2,5x objektiv.



Slika 34: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu sakulolagenarnega kanala. Debelina rezine je 2,5 μm, barvano po Richardsonu. Merilce je 500 μm, povečava 2,5x objektiv.



Slika 35: Prečni prerez notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) v predelu odprtine endolimfatičnega kanala. Debelina rezine je 2,5 μm, barvano po Richardsonu. Merilce je 500 μm, povečava 2,5x objektiv.

Analiziran tridimenzionalni model notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila je velik približno 3 mm po dolžini in 2,4 mm po višini. Dolžino med anteriono in posteriorno ampulo z ventralne strani lahko ocenimo tudi na fotografijah izoliranega membranskega labirinta. Tudi tu razdalja znaša 3 mm.

V membranskem labirintu se nahaja vseh sedem čutilnih epitelov, ki so bili predhodno opisani pri nepigmentirani podvrsti močerila: anteriorna, posteriorna in lateralna krista, amfibijska papila ter utrikularna, sakularna in lagenarna makula (Istenič, Bulog 1976). Nismo odkrili bazilarne papile.

Utrikulus je precej velik in predstavlja dominanten del membranskega labirinta. (Slika 28) Sinus superior ni posebej izrazit. V anteriornem delu se nahaja utrikularni recesus z utrikularno makulo na ventralni steni. Na mediani strani je okrogle oblike in se na lateralni strani zoža. (Slika 29) Poleg se nahaja lateralna ampula s svojim čutilnim epitelom, lateralno kristo. (Slika 28) Lateralna krista je zelo široka in po velikosti podobna utrikularni makuli. Na prečnem prerezu ju lahko vidimo na isti rezini. (Slika 32b) Lateralna krista se nahaja v ventro-lateralni steni ampule in je podkvaste oblike. Je veliko večja od obeh ostalih krist. (Slika 24 in Slika 29) Lateralni polkrožni kanal je najdaljši od vseh treh. Začne se v ventralnem delu membranskega labirinta in se strmo dviga v posterio-dorzalni smeri, kjer zavije nazaj v anteriorno smer in se priključi utrikulusu. (Slika 28)

Anteriorna in posteriorna krista sta po obliki podkvaste oblike. (Slika 25) Anteriorni polkrožni kanal se konča v zgornjem delu membranskega labirinta in je precej kratek.

Sakulus je z utrikulusom povezan preko utrikularno-sakularnega kanala, ki je širok in večji kot pri nepigmentirani podvrsti močerila. (Slika 33) Nahaja se tam, kjer se začne formirati recesus amfibijske papile. Sakulus sega ventralno in ima debelejšo mediano in tanko lateralno steno. Na mediani steni leži sakularna makula, ki je okrogle oblike. (Slika 24 in Slika 27) Je podobne velikosti kot utrikularna makula. (Slika 28)

Recesus amfibijske papile se nahaja na mediani strani in sega proti posteriornemu delu. (Slika 28) Amfibijska papila zaseda velik del recesusa, nahaja se v dorzalno mediani steni in je konkavno ubočena. Ventralna stena skupaj s perilimfatičnim kanalom sestavlja kontaktno membrano. (Slika 32e in 32g)

Lagena izhaja iz mediano posteriornega dela sakulusa in je z njim povezana preko sakularno-lagenarnega kanala. (Slika 34) Lagena je precej velika, kroglaste oblike in je usmerjena v posteriorno smer. (Slika 27 in Slika 28) Ko se na prerezih pojavi lagena, je še vedno viden recesus amfibijske papile z amfibijsko papilo. (Slika 32e) Na rezini, kjer je viden zadnji prerez lagene, je viden tudi prerez zavoja lateralnega polkrožnega kanala. (Slika 32a) Makula lagene se nahaja v mediani steni lagene.

Posteriorni del membranskega labirinta je zelo kratek in tu se kmalu pojavi tudi velika posteriorna ampula. (Slika 28 in Slika 29) Posteriorna krista je podkvaste oblike in se nahaja v distalni steni ampule. (Slika 24) Posteriorni kanal izhaja iz dorzalno posteriornega dela utrikulusa in je kratek. Sinus posterior ni izrazit. (Slika 28)

Notranje uho je oživčeno z VIII. možganskim živcem, ki se razdeli v dve veji: ramus posterior in ramus anterior. Anteriorni veja oživčuje anteriorno lažeče čutilne epitele. V področju utrikularnega recesusa se razdeli na dva dela, na manjši veji in ti dve oživčujeta anteriorno in lateralno kristo. (Slika 25, Slika 26, Slika 31) Pred vsako kristo se živec razcepi na veliko posmeznih snopov. Natančne inervacije utrikularne makule na fotografijah, ki so posnete z ventralne strani ni videti. (Slika 24 in Slika 26) Na mikroskopskih fotografijah pa vidimo, da do nje vodijo manjši snopi, ki izhajajo iz anteriorne veje. (Slika 32b)

Iz posteriorne veje se takoj odcepi snop za sakularno makulo, nato pa veja potuje naprej do posteriornega dela membranskega labirinta. Tu se razdeli na več manjših snopov, ki enakomerno oživčujejo področje posteriorne kriste. (Slika 27) Natančno oživčenje makule lagene in amfibijske papile na fotografiji izoliranega organa ni vidno. Iz prerezov in na

rekonstrukciji pa je razvidno (Slika 31), da posteriorna veja potuje ventralno od perilimfatičnega kanala in recesusa amfibijske papile, ob sakulusu in nato za lageno. Vmes se vrine tudi v perilimfatični kanal, ki se na tem mestu razcepi. (Slika 34) Amfibijsko papilo in makulo lagene oživčujejo manjši snopi živcev. Tu ni nikakršne večje odcepitve od posteriorne veje, ki bi tekla do omenjenih struktur. Do sakularne makule segata dve debeli in kratki veji. Posteriorna izvira iz ramus posterior, anteriorna pa ravno iz predela, kjer se VIII. možganski živec razcepi na obe veji. Tako da je težko reči ali je iz anteriorne ali posteriorne veje.

Prisotna je perilimfatična cisterna, ki zapolnjuje prostor med lateralnim polkrožnim kanalom in sakulusom, ki se ji tesno prilega z lateralno steno. Dorzalno sega do sinus superior, ventralni del ne presega sakulusa, vendar tu rekonstrukcija ni čisto realna, ker je bil ta del perilimfatične cisterne tekom izolacije organa poškodovan in ni dobro viden na prerezih. (Slika 32) Perilimfatični kanal se začne rahlo pred recesusom amfibijske papile, s katero tvori kontaktno membrano. Ko se vanj vrine živec, se del kanala premakne lateralno in se nahaja med lageno, utrikulusom in perilimfatično cisterno. (Slika 34) Na posteriornem koncu se obe združita skozi odprtino perilimfatičnega kanala. V predelu živca mediani del ne izgine, temveč se mediano pojavlja še na kar nekaj rezinah, vendar zaradi izolacije ni mogoče določiti, kje se konča oziroma, kje se nahaja perilimfatičen foramen v otični kapsuli. (Slika 30)

Endolimfatični kanal se odpira iz dorzalnega dela sakulusa. (Slika 35) Dorzalno, tik nad sinus superior, sega v možgansko votlino, kjer se nahaja endolimfatična vrečka. (Slika 30) Kanal je precej širok.

4.3 MAGNETNA RESONANCA



Slika 36: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste močerila (P188) s posteriorne strani.



Slika 37: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste močerila (P188) s dorzalne strani.



Slika 38: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste močerila (P188) z anteriorne strani.



Slika 39: MRI posnetek s tehniko 3D spin echo. Pogled na glavo nepigmentirane podvrste močerila (P188) s ventralne strani.

Rezultat snemanja s tehniko magnetne resonance je tridimenzionalna slika glave. Anteriorni del ustne regije je segal iz področja signala zato na slikah manjka.



Slika 40: Prerezi glave nepigmentirane podvrste močerila (P188) v predelu notranjega ušesa izdelani s tehniko magnetne resonance.



Slika 41: Slike prečnih prerezov glave nepigmentirane podvrste močerila (P188) izdelane s tehniko magnetne resonance.

Posamezne slike prerezov iz magnetne resnance sicer prikažejo mnogo struktur, vendar je področje notranjega ušesa premajhno, da bi lahko prepoznali posamezne membranske strukture otične regije. Na nekaj prerezih, se sicer lepo vidita lateralni polkrožni kanal in velik prostor perilimfatične cisterne. Tridimenzionalnega modela iz teh slik ni bilo mogoče izdelati.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 NOTRANJE UHO MOČERILA

Tridimenzionalna rekonstrukcija notranjega ušesa nepigmentirane podvrste močerila potrjuje ugotovitve o zgradbi predhodno analiziranih notranjih ušes s klasično metodo anatomske sekcije in analize, podprto s histološkimi analizami (Istenič, Bulog, 1976, Bulog, 1986). Pri nobenem od osebkov nismo našli izbokline, ki bi lahko bila recesus bazilarne papile. Potrdili smo tudi predhodne ugotovitve, da se perilimfatične strukture med osebki lahko razlikujejo. Potek živcev se v grobem med osebkoma ne razlikuje, čeprav je verjetno kar nekaj razlik, če bi primerjali natančen potek terminalnih odcepov do posameznih senzoričnih epitelov.

Pri pigmentirani podvrsti močerila podroben opis labirinta in živcev temelji le na enem izoliranem notranjem ušesu. Zaradi tega obstaja možnost artefaktov in ne moremo zagotovo potrditi opisa anatomskih značilnosti membranskega labirinta. Predvsem je na večjem številu osebkov treba preveriti in potrditi razmerje med višino in dolžino membranskega labirinta.

Najverjetneje je tudi pri tej podvrsti prisotna variabilnost med osebki. Žal so bili vsi ostali preparati nepopolni in z njimi se ne da podkrepiti anatomske zgradbe notranjega ušesa. Ponekod so vidne posamezne strukture, vendar so pri rezanju nastali artefakti in je nemogoče oceniti, kakšen je natančen medsebojni položaj posameznih struktur.

Najverjetnejši razlog za težave pri pripravi histoloških preparatov otične regije je bil v slabši dekalcinaciji z dinatrijevo etilen diamino tetraocetno kislino (EDTA), kar je povzročilo težave pri rezanju in potrgane membranske strukture. Za boljše rezultate bi bilo potrebno znatno podaljšati čas dekalcinacije v EDTA. Pri drugih pa najverjetneje uporabljena dušikova kislina ni bila ustrezno dekalcinacijsko sredstvo.

Zaradi težav pri dekalcinaciji smo se lotili anatomske izolacije notranjega ušesa in vklapljanja v trši medij, kar se je izkazalo za uspešno metodo. A tudi ta metoda ima poleg prednosti določene slabosti. Trši medij ohrani membranski labirint v pravem položaju in na prerezih so se ohranile vse membranske strukture. Čeprav tudi tu ni šlo brez težav, saj je mehurček zraka povzročil artefakt v anterio-dorzalnem delu membranskega labirinta. Slaba stran izolacije pa je ta, da se lahko labirint poškoduje med samim postopkom anatomske sekcije in infiltracije, saj so izolirane tanke membranske strukture zelo občutljive na mehanske vplive. Na preparatih ni mogoče določiti položaja struktur, ki se nahajajo izven otične regije, v tem primeru je to predvsem perilimfatičen sistem v možganski votlini.

Tridimenzionalna rekonstrukcija desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila kaže, da membranski labirint res ni tako dolg kot pri nepigmentirani podvrsti. Če primerjamo med seboj razmerje v dolžini in višini, bi lahko na grobo ocenili, da je to razmerje pri nepigmentirani podvrsti močerila 2:1, pri pigmentirani podvrsti močerila pa 1:1.

Na prečnih prerezih izoliranega notranjega ušesa opazimo, da je posteriorni del membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila zelo kratek in strukture, kot so lagena in zavoj lateralnega polkrožnega kanala, se pojavijo na prerezu skupaj. Tudi utrikulus je krajši in zelo širok in je dominantna struktura na tridimenzionalnem modelu. Pri nepigmentirani podvrsti močerila je dominantna struktura sakulus, ki pa je pri pigmentirani podvrsti v velikostnem razredu utrikulusa. Opazili smo razliko v velikosti lateralne kriste, ki je pri pigmentirani podvrsti zelo velika. Anteriorna in posteriorna ampula sta veliki tudi pri nepigmentirani podvrsti, kjer pa se nahajata v isti vzdolžni ravnini. Posteriorna krista se namreč na tridimenzionalnem modelu pri pigmentirani podvrsti močerila nahaja v bolj ventralnem delu membranskega labirinta. Potek lateralnega polkrožnega kanala je na modelu pri pigmentirani podvrsti precej strm, medtem ko je pri nepigmentirani podvrsti v vodoravni ravnini. Če primerjamo razdaljo med makulo lagene in posteriorno kristo, je ta pri pigmentirani podvrsti močerila veliko manjša kot pri nepigmentirani podvrsti. Na tridimenzionalnem modelu se vidi, da sta krajša tudi anteriorni in posteriorni polkrožni kanal. Na histoloških rezinah smo še opazili, da se razlika pojavi v velikosti utrikularno-sakularnega kanala, saj je ta pri pigmentirani podvrsti močerila večji. Med oblikami in položaji utrikularne in sakularne makule ni razlike. Na tridimenzionalnem modelu izgleda, da je lagena pigmentirane vrste zelo velika, tako se zdi tudi na preparatih, predvsem ko opazujemo premer strukture. Če primerjamo, na koliko rezinah se pojavi pri obeh podvrstah, pa ni razlike. Najverjetneje velikost lagene pri pigmentirani podvrsti pride do izraza, ker se takoj za njo pojavijo še ostale strukture posteriornega dela membranskega labirinta. Pri nepigmentirani podvrsti je vmes še kar nekaj prostora in močno izražen sinus posterior. Vse te ugotovitve bo potrebno v nadaljnjih funkcionalno-morfoloških analizah otičnega labirinta črne podvrste še dokazati.

Analiza histoloških preparatov nakazuje, da se položaj amfibijske papile med obema podvrstama rahlo razlikuje. Pri nepigmentirani podvrsti se večji del nahaja v mediani steni recesusa amfibijske papile, tako da je čutilni epitel nameščen v vertikalni smeri. Zadnjih nekaj 10 µm pa se zasuka v horizontalno smer in se nahaja v dorzalni steni recesusa amfibijske papile. Pri pigmentirani podvrsti je amfibijska papila na nekaj začetnih rezinah vidna v mediani steni recesusa, na vseh ostalih rezinah pa se nahaja na dorzalni steni recesusa. Zaradi tega tudi ima obliko kupule. Ali to res drži za vse predstavnike pigmentirane podvrste močerila, je treba dokazati na večjem številu osebkov. Na osnovi opisa enega membranskega labirinta ne moremo zagotovo trditi, da omenjen položaj čutilnega epitela v recesusu amfibijske papile ni posledica artefakta. Prav tako ne moremo dokazati, da je podvržen variabilnosti med osebki.

Poleg amfibijske in bazilarne papile pri dvoživkah verjetno lahko zaznavajo zvočne dražljaje tudi drugi čutilni epiteli, kot je pri ribah sakularna makula (Lewis, 1985). Če pogledamo njihovo funkcijo med ostalimi vretenčarji, lahko vidimo, da dostikrat ni natančno določeno, kateri čutilni epitel je avditoren in kateri vestibularen. Še posebej to velja za ribe. Prav sakularna makula je pri močerilu dobro razvita in kompleksno grajena (Bulog, 1989b).

Perilimfatičen sistem je pri pigmentirani podvrsti močerila zelo podoben perilimfatičnemu sistemu pri nepigmentirani podvrsti močerila. Variabilnosti je veliko že med levim in desnim ušesom in med osebki (Istenič in Bulog, 1976). Verjetno enako drži tudi za pigmentirano podvrsto močerila. Tu smo sicer opazili, da se perilimfatični kanal razdeli v

dva dela, ko se vmes vrine ramus posterior VII. možganskega živca. A tudi pri nepigmentirani podvrsti vidimo, da se pred odprtino perilimfatičnega kanala ta razdeli na dva dela. Zaradi tega sklepamo le na veliko variabilnost poteka perilimfatičnega kanala. Namestitev perilimfatične cisterne je bolj uniformna in na tridimenzionalnem modelu enaka pri obeh podvrstah.

Inervacija notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila je v skladu z inervacijo vretenčarskega notranjega ušesa. Ramus VIII. možganskega živca se razdeli na anteriorni in posteriorni del in oživčuje bližnje čutilne epitele. Nejasnosti ostajajo pri natančni inervaciji sakularne makule, kjer nismo mogli določiti natančnega izvora ramulus saccularis. A kot pri nepigmentirani vrsti (Istenič in Bulog, 1976), je tudi tu verjetno prisotna variabilnost med osebki in labirinti iste živali.

Začetna hipoteza je bila, da ima pigmentirana podvrsta krajši in manj dorzi-ventralno sploščen membranski labirint kot nepigmentirana podvrsta močerila. Tridimenzionalni model je to hipotezo potrdil. Kljub temu je treba rezultat potrditi na večjem številu osebkov. To pa je problematično, ker je močeril strogo zavarovana živalska vrsta.

5.2 METODA TRIDIMENZIONALNE REKONSTRUKCIJE

Izdelava tridimenzionalnega modela se je izkazala za uspešno metodo. Ker smo med izolacijo notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila (Č4) fotografirali membranski labirint, lahko tridimenzionalni model primerjamo še z intaktnim membranskim labirintom. Rekonstrukcija inervacije na modelu, ki ga gledamo z ventralne strani tako kot fotografijo, dokazuje, da so posamezne strukture realno prikazane.

Na modelih se sicer jasno vidi, da so sestavljeni iz rezin, vendar to ne vpliva na osnovno anatomijo organa. Nepopolno poravnane rezine dajo modelom rahlo nazobčan videz. Če med seboj primerjamo model iz parafinskih in poltankih rezin, lahko vidimo, da na nazobčenost predvsem vpliva poravnava. Ta je bila pri poltankih rezinah veliko boljša in tudi lažje izvedljiva. Razlog za to je, da se rezine ne raztezajo in ni potrebno odstraniti vklopnega medija. Tako so robovi blokca, ki so ostali vidni kot kvadrat okoli preparata, odlično služili kot zunanje označbe. Ta poravnava je bila kljub večjemu številu rezin narejena v krajšem času. Hkrati smo tudi lahko prepričani, da struktur ne ravnamo napačno ali da jih raztezamo v primeru, ko to ni potrebno. Tu smo samo preprosto poravnali robove rezin. Kakršnekoli napake se pri modelu pojavijo, lahko zagotovo trdimo, da so se pojavile pred postopkom poravnave.

Kot je že opisano v uvodu, največ težav pri poravnavi povzroča dejstvo, da so parafinske rezine potem, ko so odrezane, izpostavljene možnosti poškodb pri rezanju, sušenju, temperaturnim spremembam in optičnim distorzijam mikroskopa. Poleg tega dodatne težave predstavlja deparifinizacija rezin in barvanje. To se odraža kot sprememba v razmerju dimenzij in ne-linearne deformacije (Fiala, 2005; Jirkovská et al., 2005; Streicher et al., 1997). Na preparatu so vidne sledi noža, gube, raztganine, mehurčki zraka ... Določenih deformacij ne opazimo, dokler ne prekrijemo dveh sosednjih rezin. Te napake otežujejo postopek poravnave, posledično je težko popolnoma poravnati rezine med seboj. Kljub večjemu številu struktur, na katere se lahko opremo, so te zamaknjene.

Tekom izdelave rekonstrukcije notranjega ušesa močerila smo poskušali te napake korigirati pri postopku orisovanja, tako da smo strukturo narisali na mestu, kjer naj bi se v resnici nahajala. Zaradi tega, ker ni bilo možno poravnati celotne otične regije, se na tridimenzionalnem modelu membranskega labirinta pri nepigmentirani podvrsti vidijo »stopnice« na lateralnem polkrožnem kanalu.

Drug pomemben faktor je količina materiala, ki je na voljo. Ker je močeril strogo zavarovana vrsta, je na voljo zelo malo materiala. V primeru, da bi dobro uspel prvi poskus izdelave modela, bi uporabili samo eno žival. Drugi avtorji, kot so npr. Liu in sodelavci (2007), so izolirali 20 kohlej morskega prašička in naredili model iz najboljše serije slik. Na ta način so dobili optimalen model, ker je bil izdelan iz najboljših izvornih podatkov.

Skrčenje tkiva močno vpliva na neujemanje v dimenzijah dejanskega vzorca in dimenzijah na rezini. Je posledica dehidracije in bistrenja. Kakšen je odstotek skrčenja, je odvisno od uporabljenih kemikalij in histokemijskih protokolov. Tako se lahko zgodi, da se isti vzorec tkiva, pripravljen po različnih protokolih, na koncu razlikuje v svoji velikosti. Skrčenje
močno vpliva na absolutne morfometrične vrednosti tridimenzionalnega modela. Temu bi se dalo izogniti z natančnim poznavanjem vpliva kemikalij na tkivo (odstotek skrčenosti), kar bi se upoštevalo pri izračunu kvantitativnih vrednosti modela. Problem se pojavi pri velikih in heterogenih kosih tkiva, kjer je ta odstotek zelo težko določiti (Bucher et al., 2000). Odstotek se lahko določi tako, da se izmeri razliko v dimenziji pred in po obdelavi tkiva (Ghanem et al., 1998). Pri pripravi glav močerila je prišlo do skrčenja tkiva med dehidracijo v alkoholni vrsti in predvsem pri bistrenju s ksilenom. Spremembo v velikosti smo opazili tudi po infiltraciji s paraplastom. Poleg tega je treba upoštevati tudi dejstvo, da nismo uporabili svežega materiala, temveč vzorce, hranjene v etanolu, kjer so že bili podvrženi dehidraciji. Zaradi teh razlogov smo s pomočjo tridimenzionalnih modelov le opisali anatomsko zgradbo in nismo zbrali nobenih kvantitativnih podatkov (volumen in površina membranskega labirinta).

Program Reconstruct sicer omogoča meritve velikostnih parametrov. Deluje v arbitrarnem sistemu enot in uporabnik za vsako serijo posebej določi enoto (Fiala, 2005). V našem primeru smo uporabili milimetre. Uporabnik programa določi debelino rezin, ki je lahko drugačna pri vsaki rezini. S to funkcijo v programu smo lahko nadomestili manjkajoče rezine v seriji. Hkrati smo si tudi močno olajšali delo, saj za rekonstrukcijo ni bilo potrebno vzeti vseh rezin v seriji. Program Reconstruct omogoča zajem naslednjih podatkov: površino in volumen rekonstruiranega objekta in dolžino ter površino orisane strukture na rezini (Fiala, 2005). Dolžina in površina orisane strukture ter posledično tudi kvantitativni podatki o objektu, so odvisni od natančnosti uporabnika pri orisovanju. Program tudi omogoča zgladitev površine objekta (Smoother version), kar tudi vpliva na vrednost podatka. S to funkcijo lahko omilimo napake pri poravnavi rezin (stopničke).

Tridimenzionalni model je še posebej uporaben, ko ga lahko vrtimo v tridimenzionalnem prostoru in si z vseh strani ogledamo podrobnejšo zgradbo struktur. Model je mogoče tudi povečati in spreminjati prosojnost. Na ta način lahko vidimo notranje strukture. S to funkcijo smo predstavili čutilne epitele znotraj membranskega labirinta. Ko z računalniškim programom izdelamo model, ga lahko predstavimo z vseh strani in tudi po delih. Lahko predstavimo samo endolimfatični sistem ali perilimfatični sistem, lahko pa oba skupaj. Pri klasičnem risanju modelov je potrebno vsak pogled izdelati posebej, kar zna biti precej zamudno.

Tridimenzionalna rekonstrukcija površinskih delov membranskega labirinta omogoča osnovno anatomsko analizo. Za natančno analizo posameznih struktur v notranjem ušesu bi bilo potrebno narediti modele posameznih epitelov, s tem, da bi rezine fotografirali pri večji povečavi. Če bi tehniko izpopolnili, bi lahko uporabili kakšen bolj sofisticiran program in se lotili rekonstrukcije struktur na nivoju elektronske mikroskopije, bi lahko dobili natančne modele čutilnih epitelov.

Tridimenzionalni modeli so zelo uporabni za primerjalne študije organov pri različnih živalih. Uporabi se jih lahko za primerjavo organa dveh sorodnih vrst, podvrst, kot smo naredili mi na primeru močerila. Med seboj pa se lahko primerja modele organov različnih skupin živali. Veliko se uporabljajo pri embrioloških študijah (Jirkovská et al., 2005, Arnold et al., 2001, Cavey M.J. et al., 1993, Bever et al., 2003, Morsli et al., 1998) v medicini za raziskavo deformacij (Liu et al., 2007, Rothe ret al., 2003) in simulacijo procesov, sem spadajo tudi razne biofizikalne študije (Li et al., 2006). Doda se jim lahko še

druge podatke (atlasi (Dodgas et al., 2007)) in shematsko ponazori razne procese, npr. gastrulacija, organogeneza in uporabi v didaktične namene (Cavey et al., 1993). S pomočjo tridimenzionalnih modelov si je lažje predstavljati strukturo organa, ki ga gledamo na dvodimenzionalnem prerezu. Na takšen način se da zelo natančno predstaviti, kateri prerez gledamo in dobimo bolj celostno sliko o organu.

Če želimo poleg oblike in poteka struktur operirati še s kvantitativnimi podatki, je lažje in bolj objektivno, da so modeli izdelani po enakem postopku.

Pri pregledu literature smo zasledili računalniško izdelane tridimenzionalne modele notranjega ušesa pri sesalcih, kot sta miš (Morsli et al., 1998) in morski prašiček (Liu et al., 2006) in pri človeku (Rother et al., 2003, Li et al., 2006). Podatkov o tridimenzionalnem modelu notranjega ušesa pri repatih dvoživkah nismo našli. Narejeni so bili tridimenzionalni modeli notranjega ušesa žabe, a s popolnoma drugačno tehniko (Kiernan, 2006). Tridimenzionalni model so naredili tako, da so vanj vbrizgali barvo in ko se je le-ta posušila, izolirali odlitek. Uporabili niso nobenih računalniških tehnik.

Pokazali smo, da je metoda uporabna tudi za rekonstrukcijo notranjega ušesa dvoživk. Rekonstruira se lahko tudi druge organe. Kot je že bilo omenjeno, je vse odvisno od uspešno izdelanih histoloških rezin in natančnosti pri pripravi tridimenzionalnega modela.

5.3 MAGNETNA RESONANCA

Magnetna resonanca se žal ni izkazala za tako uspešno metodo, kot smo upali. Za proučevanje podrobnejše zgradbe tako majhnih struktur metoda ni primerna zaradi nizke ločljivosti. Metoda je sicer uporabna za preiskovanje telesne zgradbe živih organizmov, vendar v našem primeru to ni prišlo v poštev. Problem je v tem, da tako snemanje traja zelo dolgo, v našem primeru dva dni, česar žival ne bi mogla preživeti. Dalj časa kot traja snemanje, boljšo sliko dobimo. Drug faktor pa je zmogljivost samega aparata za magnetno resonanco. Magnet na Institutu Jožefa Štefana ima magnetno polje 3 T in je že precej star. Takšno magnetno polje se dandanes smatra za majhno. Magnetno polje aparata, ki so ga uporabili Sbarbati in kolegi (1992) ima 7 T.

A kljub temu je uspel tridimenzionalni posnetek površine glave. Na dvodimenzionalnih prerezih se prepozna veliko struktur v sicer nizki ločljivosti, zato je metoda lahko uporabna za grobo površinsko analizo in proučevanje posameznih večjih struktur.

5.4 SKLEPI

- 1. S tridimenzionalni modelom nepigmentirane podvrste močerila smo potrdili dosedanje ugotovitve o zgradbi notranjega ušesa.
- 2. Tridimenzionalni model notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila je potrdil našo hipotezo o obliki membranskega labirinta. Kljub temu temelji ta rezultat na enem samem notranjem ušesu, zato je treba hipotezo še dodatno potrditi z obsežnejšo raziskavo.
- 3. Metoda tridimenzionalne rekonstrukcije se je izkazala za uspešno. V primerjavi z izoliranim notranjim ušesom in narisanimi modeli, rekonstruirano notranje uho odraža realno stanje.
- 4. Pri poravnavi so se kot odlične zunanje označbe izkazali robovi vklopnega medija pri poltankih rezinah.
- 5. Kakovost modela je odvisna predvsem od kakovosti histoloških rezin iz katerih se model sestavi.
- 6. Metoda tridimenzionalne rekonstrukcije bi se lahko uporabila tudi v druge namene. Rekonstruirati bi se dalo tudi druge organe pri močerilu. Modeli so uporabni tudi za didaktične namene.
- 7. Metoda magnetne resonance ni bila uspešna. Iz posnetih slik nismo mogli izdelati tridimenzionalnega modela notranjega ušesa močerila.

Iz serijsko rezanih histoloških rezin (parafinske rezine, 10 µm) otične regije nepigmentirane podvrste močerila smo uspešno izdelali tridimenzionalni model levega in desnega membranskega labirinta. Na modelu so označeni tudi čutilni epiteli in perilimfatičen sistem. Naredili smo tudi tridimenzionalen model desnega membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila, ki smo ga izdelali iz serijsko rezanih poltankih rezin (2,5 µm). Te smo naredili iz izoliranega organa. Vse prereze smo fotografirali. Za rekonstrukcijo smo uporabili brezplačen program Reconstruct, ki se je izkazal za uporabnega. Omogoča uporabo vseh bistvenih korakov izdelave rekonstrukcije: uvoz fotografij v program, poravnava, orisovanje in generiranje tridimenzionalnega objekta. Pri poravnavi, so se bolje obnesle poltanke rezine, kjer smo vklopni medij uporabili kot zunanjo označbo. Modele smo dopolnili še s fotografijami prerezov in tako predstavili anatomijo notranjega ušesa pri močerilu. To nam je omogočilo potrditev že objavljenih rezultatov morfologije notranjega ušesa pri nepigmentirani podvrsti močerila in opis notranjega ušesa pigmentirane podvrste močerila. Izkazalo se je, da je membranski labirint pigmentirane podvrste res krajši v primerjavi z nepigmentirano podvrsto, kar potrdi našo hipotezo. Vendar je treba poudariti, da opis temelji na rekonstrukciji enega notranjega ušesa in bi bilo potrebno rezultate potrditi z nadaljnjimi raziskavami. Pri nobeni podvrsti nismo našli prisotnega recesusa bazilarne papile. Opisali smo tudi inervacijo notranjega ušesa pri pigmentirani podvrsti močerila. Glavne značilnosti in razlike membranskega labirinta pigmentirane podvrste močerila so velik utikulus, velika lateralna krista, kratka anteriorni in posteriorni polkrožni kanal, kratek posteriorni del labirinta in velika lagena. Večjih razlik v poteku perilimfatičnega sistema ni. Vse te ugotovitve bi morali potrditi na večjem številu osebkov. Tovrstne raziskave je težko izvesti, ker je močeril strogo zavarovana živalska vrsta.

Preizkusili smo tudi metodo snemanja z magnetno resonanco, vendar je notranje uho premajhen objekt. Na prerezih se ni videlo membranskih struktur. Zaradi tega tudi ni bilo mogoče izdelati tridimenzionalnega modela iz teh podatkov.

7 VIRI

Arnold W.H., Lang T. 2001. Development of the membranous labyrinth of human embryos and fetuses using computer aided 3D-reconstruction. Annals of anatomy, 183: 61-66

Bai X., Liu Q., Yu L., Liao Y., Luo Q., Gong H. 2005. The development of small laboratory animal atlas. Proceedings of the 2005 IEEE, Engineering in medicine and biology 27th annual conference, Šanghai, Kitajska, 1-4 september, 2005.

Boag A.H., Kennedy L.A., Miller M.J. 2001. Three-dimensional microscopic image reconstruction of prostatic adenocarcinoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 125: 562-566

Brown M.A., Semelka R.C. 2003. MRI basic priciples and applications. Tretja izdaja. Hoboken, New Jersey John Wiley & Sons, Inc.: 268 str.

Bucher D., Scholz M., Stetter M., Obermayer K., Pflüger H.J. 2000. Correction methods for three-dimensional reconstructions from confocal images: I. tissue shrinking and axial scaling. Journal of Neuroscience Methods, 100: 135-143

Bulog, B. 1986. Diferenciranost senzoričnih epitelov v notranjem ušesu pri močerilu (Proteus anguinus Laur.) : doktorska disertacija. Ljubljana: 1986. 210 str. f., ilustr.

Bulog B. 1989a. Tectorial structures on the inner ear sensory epithelia of *Proteus anguinus* (Amphibia, Caudata). J. morph., 201: 59-68

Bulog B. 1989b. Differentiation of the inner ear sensory epithelia of *Proteus anquinus* (Urodela, Amphibia). J. morph., 202: 325-338

Bulog B. 1990. Čutilni organi oktavolateralnega sistema pri proteju *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia) I. Otični labirint. Biološki vestnik, 38, 4: 1-16

Bulog B., Schlegel P. 2000. Functional morphology of the inner ear and underwater audiograms of *Proteus anguinus* (Amphibia, Urodela). European journal of Physiology, 439: 165-167

Cavey M.J., Stock D.A., Wong G.K. 1993. Computer-assisted reconstruction of vertebrate embrios from serial histological sections. Transactions of the americanmicroscopical society, 112: 93-106

Demšar F., Jevtič V., Bačić G.G. 1996. Slikanje z magnetno resonanco. Ljubljana, Littera picta: 150 str.

Despopoulos A., Silbernagl S. 2003. Color Atlas of Physiology. 5. izdaja. Stuttgard, New York, Thieme: 342

Dogdas B., Stout D., Chatziioannou A.F., Leahy R.M. 2007. Digimouse: a 3D whole body mouse atlas from CT and cryosection data. Physics in Medicine and Biology, 52: 577-587

Fiala J.C. 2005. Reconstruct: a free editor for serial section microscopy. Journal of Microscopy, 218: 52-61

Gabe M. 1976. Histological techniques. Springer- verlag New York, Heidelberg, Berlin.: 95

Ghanem T.A., Rabbitt R.D., Tresco P.A. 1998. Three-dimensional reconstruction of the membranous vestibular labyrinth in the toadfish, *Opsanus tau*. Hearing Research, 124:27-43

Gilbert S.F. 2006. Developmental biology. 8. izdaja. Sunderland, Sinauer associates, Inc.: 588

Held P., Fellner C., Fellner F., Seitz J., Strutz J. 1997. MRI of inner ear anatomy using 3D MP-RAGE and 3D CISS sequences. The British Journal of Radiology, 70: 465-472

Istenič L., Bulog B. 1976. Anatomske raziskave membranskega labirinta pri močerilu (*Proteus anguinus* Laurenti, Urodela, Amphibia). Razprave IV. razreda. Ljubljana, Slovenska akademija znanosti in umetnosti: 27 str.

Jirkovská M., Náprstková I., Janáček J., Kučera T., Macášek J., Karen P., Kubínová L. 2005. Three-dimensional reconstructions from non-deparaffinized tissue sections. Anatomy and Embryology, 210: 163-173

Ju T., Warren J, Carson J., Bello M., Kakadiaris I., Chiu W., Thaller C., Eichele G. 2006. 3D volume reconstruction of a mouse brain from histological sections using warp filtering. Journal of neuroscience methods, 156: 84-100

Kiernan A.E. 2006. The paintfill method as a tool for analyzing the three-dimensional structure of the inner ear. Brain Research, 1091: 270-276

Lewis E.R., Leverenz E.L., Bialek W.S. 1985. The vertebrate inner ear. Boca Raton, CRC Press: 1-194

Li S.F., Zhang T.Y., Wang Z.M. 2006. An approach for precise three-dimensional modeling of the human inner ear. ORL Journal for oto-rhino-laryngology, head and neck surgery, 68: 302-310

Liem K.F., Bemis W.E., Walker, Jr. W.F., Grande L. 2001. Functional anatomy of the vertebrates. An evolutionary perspective. 3. izdaja. ZDA, Brooks/Cole : 703 str.

Liu B., Gao X.L., Yin H.X., Luo S.Q., Lu J. 2007. A detailed 3D model of the guinea pig cochlea. Brain Structure Function, 212: 223-230

Macdonald D. 2004. Die große Enzyklopädie der Säugetiere. Königswinter, Könemann: 930 str.

Madden V.J. 1997. Rapid decalcification of temporal bones with preservation of ultrastructure. Hearing Research, 111: 76-84

Meyer E.P., Domanico V.J. 1988. Three-dimensional reconstruction: a tissue embedding method for alignment of serial sections. Journal of Neuroscience Methods, 26: 129-132

Miller Bever M., Jean Y.Y., Fekete D.M. 2003. Three-dimensional morphology of inner ear development in *Xenopus laevis*. Developmental Dynamics, 227: 442-430

Morsli H., Choo D., Ryan A., Johnson R., Wu D.K. 1998. Development of the mouse inner ear and origin of its sensory organs. The Journal of Neuroscience, 18: 3327-3335

Rother T., Schröck-Pauli C., Karmody C.S., Bachor E. 2003. 3-D reconstruction of the vestibular endorgans in pediatric temporal bones. Hearing Research, 185: 22-34

Russ J.C. 1999. The image processing handbook. 3. izdaja. Boca Raton, CRC Press LLC in Heidelberg, Springer-Verlag Gmbh&Co. KG. 569-687

Schlegel P.A., Briegleb W., Bulog B., Steinfartz S. 2006. Revue et nouvelles données sur la sensitivité à la lumière et orientation non-visuelle chez *Proteus anguinus, Calotriton asper* et *Desmognathus ochrophaeus* (Amphibiens urodelès hypogés). Bulletin de la Société herpétologique de France, 118: 1-31

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

Sbarbati A., Leclercq F., Zancaro C., Antonakis K. 1992. Magnetic resonance imaging of semicircular canals. Journal of anatomy, 180: 343-345

Sbarbati A., Leclercq F., Antonakis K., Osculati F. 1992. Magnetic resonance imaging of the saccular otolithic mass. Journal of Anatomy, 181: 369-372

Sket B., Arntzen J.W. 1994. A black, non-troglomorphic amphibian from the karst of Slovenia: *Proteus anguinus parkelj* n. ssp. (Urodela: Proteidae). Bijdragen tot de Dierkunde, 64: 33-53

StoltenbergM., Andreasen A., Jensen K.B., Juhl S., Danscher G., Ernst E. 1997. PCassisted three-dimensional description of organs containing tubular structures, applied on the epididymis of the rat. Computerized medical imaging and graphics, 21: 323-329 Streicher J., Weninger W.J., Müller G.B. 1997. External marker-based automatic congruencing: a new method of 3D reconstruction from serial sections. The Anatomical Record, 248: 583-602

Van Spaendonck M.P., Cryns K., Van de Heyning P.H., Scheuermann D.W., Van Camp G., Timmermans J.P. 2000. High resolution imaging of the mouse inner ear by microtomography: a new tool in inner ear research. The Anatomical Record 259: 229-236

Wever E.G. 1985. The amphibian ear. New Jersey, Princeton University Press: 485 str.

http://www-f5.ijs.si/index.php?p=lod&m=&lang=sl&i=113 (13.8.2009)

Navodila programa Reconstruct (Reconstruct Help Manual)

ZAHVALA

PRILOGA A: Barvanje hematoksilin in eozin (HE)

- 1. Deparafiniranje: ksilen 1 in ksilen 2 po 3 min
- 2. <u>Rehidracija:</u> propanol 1, propanol 2, 96% etanol 1, 96% etanol 2, 70% etanol. Vse po 3 min. V destilirano vodo, kjer lahko stekelca stojijo dalj časa.
- <u>Barvanje:</u> Weigertov železov hematoksilin 2 min. Speremo z vodo. Prelijemo s solno kislim alkoholom, da se razbarva. Eozin 3 min. (Takoj nadaljujemo s dehidracijo!)
- 4. <u>Dehidracija:</u> Prestavljamo iz banjice v banjico. 70% etanol, 96% etanol 1, 96% etanol 2, propanol 1, propanol 2.
- 5. <u>Razbistrimo</u> v ksilenu 1 in ksilenu 2, kjer stekelca lahko nekaj časa stojijo.
- 6. <u>Pokrivanje</u> s perteksom.

Weigertov železni hematoksilin:

Zmešamo komponento A in komponento B v razmerju 1:1 in mešanico prefiltriramo.

Komponenta A:

2,5g FeCl₃ x 6 H₂O 4,5g FeSO₄ x 7 H₂O 2ml konc. HCl 298 ml dH₂O

Komponenta B:

1g Weigartovega železovega hematoksilina 100 ml 96% etanol

Eozin:

0,5g eozina 500 ml 70% etanol 2,5 ml ocetne kisline

Solno kisli alkohol:

100 ml 70% etanol 1 ml konc. HCl

PRILOGA B: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z EDTA (Č12)

1. Glava je že fiksirana v Bouin fiksativu:

nasičena raztopina pikrinske kisline	1500ml
formaldehid (37%)	500 ml
ocetna kislina (ledena?)	100 ml

2. Izpiranje s pufrom:

Za 100 ml 0,1M pufra: 0,227g Na₂HPO₄ raztopimo v 16 ml destilirane vode 1,31g NaH₂PO₄ raztopimo v 84 ml destilirane vode Obe raztopini zmešamo skupaj. pH mora biti 7,4

Glavo sem dala v pufer in ga na eno uro zamenjala. Zamenjan je bil štirikrat nato je bila glava do naslednjega dne v destilirani vodi. Imela pa sem 0,2 M pufer.

3. Dekalcinacija:

Potrebujemo pufer iz točke 2. Pripravimo 0,1M raztopino EDTA (etilendiamin tetra ocetna kislina), ki deluje kot kelator kalcijevih ionov.

V 100 ml pufra damo 2,92g EDTA. Da se EDTA raztopi je ključen pH!! S 10M NaOH ga umerimo na 7,4 mešamo in EDTA se bo raztopila.

V 0,1M raztopini EDTA je bila glava 7 dni, razen čez vikend je bila zamenjana vsak dan. Volumen raztopine naj bi bil dvajsetkrat večji od volumna tkiva.

- 4. Spiranje s tekočo vodo čez noč. (EDTA lahko s etanolom tvori precipitate, ki poškodujejo tkivo)
- 5. Dehidracija:

30% etanol 90 min 70% etanol čez noč 90% etanol 60 min 96% etanol trikrat po 60 min Ksilen dvakrat po 90 min

6. Vklapljanje v paraplast:

Enkrat je bil paraplast po 24 urah zamenjan, nato je bila glava v paraplastu čez vikend. Tkivo se je dalo rezati, vendar so bile membrane v predelu notranjega ušesa premaknjene in strgane. Razlog je najverjetneje to, da je bila razlika v trdoti kosti in membran prevelika in je nož potrgal membrane.

PRILOGA C: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z dušikovo kislino (Č7)

Cel osebek je bil shranjen v 75% etanolu. Osebek smo dekapitirali in odstranili kožo ter mišice z dorzalne strani lobanje (otične regije), tako da je predel gobca in oči ostal cel.

- 1. Spiranje s tekočo vodo čez noč.
- 2. Dekalcinacija v 5% HNO₃ 22 ur.
- 3. Spiranje s tekočo vodo čez noč.
- 4. Dehidracija:

30% etanol 30 min 70% etanol 60 min 90% etanol 60 min 96% etanol dvakrat po 60 min ksilen dvakrat po 90 min

Na otip je kost bolj trda, kot je bila pred dehidracijo.

5. Vklapljanje v paraplast:

Enkrat je bil paraplast po 24 urah zamenjan, nato je bila glava v paraplastu čez vikend.

PRILOGA D: Protokol priprave glave na klasičen način – dekalcinacija z dušikovo kislino (Č15)

Cel osebek je bil shranjen v 70% etanolu. Osebek smo dekapitirali in odstranili kožo ter mišice z dorzalne strani lobanje (otične regije), tako da je predel gobca in oči ostal cel. Odstranili smo tudi spodnjo čeljust.

1. Spiranje s tekočo vodo čez noč.

2. Dekalcinacija v 5% HNO₃ 22 ur in 40 min. Konec dekalcinacije smo določili s pomočjo kalcijevega oksalatnega testa.

3. Spiranje s tekočo vodo čez noč.

4. Dehidracija:

30% etanol 120 min 70% etanol 60 min 90% etanol 60 min 96% etanol 45 min ksilen dvakrat po 60 min

Ker se ni dovolj zbistril, smo ga dali nazaj v 96% etanol za petkrat po 15 min in nato v ksilen za 120 minut, vmes smo ga večkrat zamenjali, ker je bil zelo moten od alkohola.

5. Vklapljanje v paraplast:

Enkrat je bil paraplast po 24 urah zamenjan, nato je bila glava v paraplastu čez vikend. Ni se dobro rezalo, tkivo se je močno mečkalo in ni se lepo držalo paraplasta. Zato smo preparat ponovno rehidrirali in dehidrirali ter vklopili v paraplast.

- 1. Čez noč v paraplastu
- 2. Rehidracija:

ksilen 120 min 96% etanol 90 min 90 % etanol 30 min 70% etanol (preparat je bil spravljen v hladilniku v 70% etanolu 14 dni)

3. Dehidracija:

90 % etanol 60 min 96% etanol trikrat po 60 min ksilen dvakrat po 90 min

4. Vklapljanje v paraplast: Trikrat po 24 ur v paraplastu

PRILOGA E: Protokol priprave glave pigmentirane podvrste močerila s pomočjo mikrovalovnegega sistema (Č13)

1. Glava je že fiksirana v Bouin fiksativu:

nasičena raztopina pikrinske kisline	1500ml
formaldehid (37%)	500 ml
ocetna kislina (ledena?)	100 ml

2. Izpiranje s pufrom:

Za 100 ml 0,1M pufra: 0,227g Na₂HPO₄ raztopimo v 16 ml destilirane vode 1,31g NaH₂PO₄ raztopimo v 84 ml destilirane vode Obe raztopini zmešamo skupaj. pH mora biti 7,4

Glavo sem dala v pufer in ga na eno uro zamenjala. Zamenjan je bil štirikrat nato je bila glava do naslednjega dne v destilirani vodi. Imela pa sem 0,2 M pufer.

3. Dekalcinacija:

Potrebujemo pufer iz točke 2. Pripravimo 0,1M raztopino EDTA (etilendiamin tetra ocetna kislina), ki deluje kot kelator kalcijevih ionov.

V 100 ml pufra damo 2,92g EDTA. Da se EDTA raztopi je ključen pH!! S 10M NaOH ga umerimo na 7,4 mešamo in EDTA se bo raztopila.

MW se nastavi: 100% moč, 750 W, 50°C, čas enega cikla je 90min. Vseh ciklov je bilo 6.

1.dan sem naredila 4 cikle (6 ur v MW), čez noč pustila v 0,1M raztopini EDTA, naslednji dan še 2 cikla (3 ure v MW)

Opomba: sproti bi bilo treba preveriti dekalcinacijo, en način je Kalcijev oksalatni test, ki pa ni dal rezultatov. (Glej oksalatni test)

4. Izpiranje EDTA z destilirano vodo: (EDTA lahko s etanolom tvori precipitat)

MW se nastavi: 100% moč, 650 W, 40°C, 10 min. Ponovimo trikrat.

5. Dehidracija:

Etanol [%]	30	70	90	96	96	96
Moč [%]	100	100	100	100	100	100
Moč [W]	650	650	650	650	650	650
Temperatura [°C]	40	40	40	40	40	40
Čas [min]	10	10	10	10	10	10

	ksilen	ksilen	ksilen
Moč [%]	20	50	100
Moč [W]	450	450	650
Temperatura [°C]	30	45	55
Čas [min]	15	15	10

Opomba: glava je bila v ksilenu še dve uri na sobni temperaturi. Že takrat je bila manjša.

6. Infiltracija v paraplast:

Da se paraplast stopi v MW smo nastavili 100% moč, 650 W, 65°C. Vsega skupaj je trajalo 90 min.

Ker temp.probe ne moremo dati v paraplast, smo pripravili vodno kopel. Pri tem je važno, da se vmes dodaja vodo, ker ta hlapi in se tako segreva temperatura coldspota.

V raztopljenem paraplastu v MW na enakih pogojih kot prej je bila 4 ure. Nato sem jo prenesla v inkubator, kjer je bila čez vikend.

Pri rezanju so se pojavile težave, tkivo je padalo ven iz paraplasta in ni se enakomerno debelo rezalo. To nakazuje, da je bilo tkivo pretrdo. Bodisi dekalcinacija ni uspela, bodisi je preveč otrdelo zaradi ksilena ali visokih alkoholov.

Ponovna rehidracija in dekalcinacija z dušikovo kislino v MW

Vklopljeno glavo sem dala za 1 uro v paraplast, da se stopil. Nato je sledilo:

2x po 90 min v ksilenu (ni bilo v MW, odločili smo se za klasičen način)

V MW z enakimi nastavitvami kot pri dehidraciji, le obraten vrstni red.

Etanol [%]	96	96	96	90	70	30
Moč [%]	100	100	100	100	100	100
Moč [W]	650	650	650	650	650	650
Temperatura [°C]	40	40	40	40	40	40
Čas [min]	10	10	10	10	10	10

Čez noč se je glava spirala pod tekočo vodo.

Dekalcinacija s 5% HNO₃:

Nastavitve MW: 100% moč, 650W, 45°C 9 ciklov po 30 min, vmes zamenjana kislina.

Dehidracija:

Etanol [%]	30	70	90	96	100	100
Moč [%]	100	100	100	100	100	100
Moč [W]	650	650	650	650	650	650
Temperatura [°C]	40	40	40	40	40	40
Čas [min]	10	10	10	10	10	10

V ksilen smo spet dali klasično, 2x po 90 min. In v paraplast.

Glave se ni dalo rezati, ker je bilo vso tkivo pretrdo.

Še enkrat sem jo klasično rehidrirala

- 1 ura paraplast
- 2x po 90 min ksilen
- 1x 60 min 96% etanol
- 1x 60 min 90% etanol
- čez noč 70% etanol
- 1x po 60 min 30% etanol
- spiranje pod tekočo vodo

Glava je še vedno trda, zato sem jo spravila v 70% etanol.

Priprava kriorezin (Č13)

Glava je bila shranjena v 70% etanolu, zato sem jo najprej dala spirati pod tekočo vodo, za slabe tri ure.

Nato sem naredila banjico iz folije in glavo dala v medij za kriorezine (Jung) ter jo pustila v kriotomu (Leica CM1850) na temperaturi -7°C, da se je medij strdil. Glavo sem nato zavila v alufolijo in je čez vikend dala v zamrzovalnik na -20°C, da je dobro zamrznila.

Glavo sem rezala pri temperaturi -18°C na 20m rezine. Temperaturo in debelino sem spreminjala, da bi določila optimalne pogoje.

Rezine so bile lepe in so se lepo rezale, vendar se z njimi naprej ni dalo rokovati. Niso se prilepile na stekelca z vso površino.

Sklepamo, da je to zaradi vse prejšnje obdelave (večkratna dehidracija in rehidracija) in tudi heterogenosti tkiva.

PRILOGA F: PRIPRAVA MEDIJA ZA VKLOP = SPURR

Spurr medij je trenutno najbolj pogosto uporabljen medij za vklapljanje. Uvedel ga je Spurr leta 1969. Ima nizko viskoznost (60 cps pri 25°C), omogoča hitro infiltracijo in se polimerizira v manj kot 24 urah.

Sestavljajo ga štiri komponente:

- ERL 4206 vinilcikloheksan dioksid (epoxy monomer)
- DER 736 diglicidil eter polipropilen glikol (flexibilizer)
- NSA nonenil sukcinil anhidrid (hardener)
- DMAE (S-1) dimetil aminoetanol (accelerator)

Komponente hranimo v hladilniku.

Delo poteka v digestoriju. Za pripravo potrebujemo:

- stekleno čašo (spurr pripraviš v stekleni posodi, ker s plastiko reagira)
- plastične pipete (4 za vsako komponento svojo pipeto)
- magnetno mešalo
- magnet (velik)
- tehtnico
- papirnate brisače

Koliko spurra si pripravimo?

• V eno luknjico plitvega modelčka gre približno 0,3 ml vode (malo več).

komponenta	standardna	trda mešanica	mehka	mešanje
	mešanica		mešanica	
ERL 4206	10,0	10,0	10,0	nekaj minut
DER 736	6,0	4,0	8,0	
NSA	26,0	26,0	26,0	1 uro
DMAE (S-1)	0,4	0,4	0,4	3 ure
skupaj (g)	42,6	40,4	44,4	pred uporabo

OPOMBE: ko tehtamo, zlivamo komponente ob pipeti, da se ne zamaže steklovina oz. njen rob; ko se približamo željeni vrednosti, preostanek dodajmo s pipeto. Mešati se mora počasi, da se ne delajo mehurčki.

Steklovino najbolje očistiš z acetonom, lahko tudi s kloroformom ali z absolutnim alkoholom, nikoli pa z vodo. Dobro obrišeš s suho papirnato brisačo.

2. Potek vklapljanja v spurr

- Delo naj poteka v digestoriju.
- Pri delu z osmijevim tetroksidom in pri prelaganju tkiva iz ERL 4 v modelčke uporabljaj masko MP3, zaščitna očala in rokavice (dvojne).

1. dan	priprava fiksativa	Karnovskiy fiksativ	
2. dan	narkotizacija	MS 222 (0,03%)	10 – 20 min
	sekcija		
	fiksacija	Karnovsky fiksativ	2 uri (za manjše koščke tkiva) na 4°C
	izpiranje	izpiralna tekočina	čez noč (vmes nekajkrat zamenjamo izp.t.; lahko zamenjamo zjutraj in še 2 uri pustimo. V izp.t. lahko tkivo ostane tudi teden dni)
3. dan	postfiksacija	$\begin{array}{c} 2\% \; OsO_4 \; s \; ferocianidom \; (ali \; 1\% \\ vodni \; OsO_4) \end{array}$	1-2 uri v temi na 4°C
	Izpiranje	izpiralna tekočina (ali destilirana voda)	3 × 10 min na sobni temp. (lahko tudi izpustimo)
	dehidracija	50% alkohol (iz absolut. alk.)	2 × 15 min
		70% alkohol (iz absolut. alk.)	$2 \times 15 \min$
		90% alkohol (iz absolut. alk.)	2 × 15 min
		absolutni alkohol	$2 \times 15 \min + 1 \times 30 \min$
	vklapljanje	absolutni alk. : ERL (1 :1)	2×15 min (stalno mešati)
		ERL 1	1 ura (stalno mešati)
		ERL 2	čez noč (vzorce pustimo v nastavku na sobni T)
4. dan		ERL 3 (sveže pripravljen)	1 ura (stalno mešati)
	polimerizacija	ERL 4 (sveže pripravljen) tkiva preložiš v modelčke	24 ur pri 70°C (bolje da daš na manj stopinj in pustiš dalj časa v sušilniku)

 \downarrow

Svež ERL pripravimo že 3. dan protokola (tisti dan, ko vzorce dehidreraš). ERL3 naj bo že sveže pripravljen.

- Ostanke ERL lahko shranimo v plastični injekcijski šprici v zmrzovalniku in uporabimo za infiltracijo – pred uporabo moramo odtajati in segreti na sobno temperaturo. Tak ERL ni uporaben za polimerizacijo. Za polimerizacijo moramo vedno pripraviti svež ERL.
- Ependorfke, pipete,...kar je zamazano z ERL, odpadni ERL, polimeriziraš 1 dan na 70°C, nato pa lahko vržeš v smeti.

RAZTOPINE

Karnovsky fiksativ - prilagojena osmolarnost na 307 mOsmol/kg

Za 100 ml fiksativa potrebujemo:

- 0,5 g paraformaldehida (CH₂O)/50 ml destilirane vode \rightarrow dobimo 0,5% paraformaldehid na 100 ml končne raztpine
- segrevamo do 60°C, da se raztopina razbistri (približno 1 uro ob stalnem mešanju), in ohladimo (če raztopina ni bistra, dodamo 5 kapljic 1 N NaOH)
- dodamo 4,6 ml 25% glutaraldehida (C₅H₈O₂) (pH: 4 − 5; če pade pod 3,5 je zanič) → 1,15% glutaraldehid
- dodamo 1,07 g kakodilata (končna raztopina kakodilata je 0,05M) ($M_{kakodilata} = 214,0$ g/mol; 1M kakodilata...214 g/l, 0,05 M kakodilata...10,7 g/l \rightarrow 1,07 g kakodilata/100 ml)
- z destilirano vodo dopolnimo do 100 ml
- umerimo pH na 7,4 z 1N HCl

Raztopina paraformaldehida je obstojna nekaj tednov pri 4°C in v temi. Paraformaldehid prodira hitreje kot glutaraldehid, vendar je fiksacija počasnejša. V kombinaciji z glutaraldehidom mora biti koncentracija paraformaldehida nižja od koncentracije glutaraldehida.

0,03 % MS222

- 0,3 g MS
- $1L dH_2O$

Izpiralna tekočina (0,05M Cacodylatni pufer + 0,25M saharoza)

Za 100 ml izpiralne tekočine potrebujemo:

- 1,07 g kakodilata
- 8,56 g saharoze 100 ml vode
- umerimo pH na 7,4

Saharoza je potrebna za vzdrževanje osmolarnosti:

0,2 M saharoza \rightarrow 215 mOsmol, 0,3 M saharoza \rightarrow 319 mOsmol vzamemo nekje vmes, ker je tkivo močerila 307 mOsmol

2 % osmijev tetroksid s ferocianidom

Z dodatkom ferocianida dosežemo, da pridejo membrane bolj do izraza.

- 2 ml 4 % OsO₄ (ozmij v ampulah hranimo v hladilniku; OsO₄ hitro reducira, zato mora biti čaša, v kateri pripravljamo raztopino, čista)
- 6 ml dH₂O
- $0,137 \text{ g } \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3\text{H}_2\text{O}$

Razlaga: imamo 2 ml 4 % $OsO_4 + 2$ ml dH₂O \rightarrow dobimo 4 ml 2 % OsO_4 . Naredimo 4 ml 3 % K-ferocianida in zmešamo z 4 ml 2 % OsO_4 (da je razmerje 1:1).

Vodna raztopina OsO_4 je obstojnejša (kot OsO_4 v pufru). Lahko jo hranimo več tednov pri 4°C. Raztopina je uporabna, če je svetlo rjavo obarvana, če postaja črna, je zanič. Raztopine ozmija so fotosenzitivne, zato jih hranimo v steklenicah s temnim steklom (s tem zmanjšamo redukcijo OsO_4).

PRILOGA G: Navodila za uporabo programa Reconstruct

(za natančnejša navodila glej Manual v programu)

Najprej je treba v program uvoziti fotografije.

V glavni orodni vrstici odpremo meni Series. Izberemo New..., odpre se pogovorno okno v stilu Raziskovalca in poimenujemo serijo. Končnica imena je .ser.

Nato v meniju Series izberemo Import in Images. Odpre se pogovno okno in izberemo Select. Tako se odpre pogovorno okno Raziskovalca in izberemo fotografije, ki jih želimo vnesti v program Reconstruct. Zelo dobro je zraven vnesti tudi sliko z merilcem, saj se kasneje slik ne da dodajati. (Lahko se jih samo zbriše) Fotografije so sedaj označene z zaporednimi številkami in če smo s tem zadovoljni, pritisnemo Import in nato Quit.

Če pritisnemo Quit pred Import, se pogovorno okno zapre in ves postopek je treba ponoviti od začetka.

Sedaj so slike v programu Reconstruct, s tipko Home jih postavimo na sredino zaslona. Če je potrebno, jih lahko kasneje povečamo (Tools, Select zoom region).

Sledi **kalibracija**: V orodni vrstici Tools izberemo Draw line in označimo znano dolžino, npr merilce. Nato izberemo v glavni orodni vrstici Trace in Calibrate...Odpre se pogovorno okno in vnesemo dolžino. <u>Pazita je treba na enote!</u>! Te se določi v Series, Options, General. (Glej natančnejša navodila v samem programu pod poglavje Calibration and measurment)

Nato se odpre novo pogovorno okno, kjer izberemo Set pixel size to... Določimo še število vseh rezin in OK.

Poravnava:

Ta je lahko ročna, s tipkami puščice in vrstico s tipkami F. Ctrl omogoča manjše premike. Če pritisnemo Presledek se pokažeta dve rezini hkrati in lahko vidimo kako se prekrivata.

Avtomatska poravnava: V orodni vrstici Tools izberemo ikono Stamp shape. V glavni orodni vrstici odpremo meni Traces in izberemo Palette... Odpre se nam orodna vrstica z raznimi pikicami in oblikami. S temi na rezini določimo točke, glede na katere se bo poravnala sosedna rezina. Vedno se ravna drugo na prvo, poravna se rezina, ki jo vidimo na ekranu.

Treba je izbrati različne oblike, a isto obliko za isto točko na obeh rezinah. Na obeh rezinah morajo biti vse točke označene (Ctrl + S). V glavni orodni vrstici izberemo Trace, nato Align in način kako jih poravna (najbolje Rigid). Postopek ponovimo čez celo serijo, tako da so vse rezine med seboj poravnane.

Tudi tu lahko sproti preverjamo poravnavo tako, da pritisnemo Presledek in jih,če je potrebno še ročno popravimo.

Določimo še debelino rezin. Odpremo meni Section, List sections in Modify in Tkickness. Debelino določimo v enotah, ki smo jih izbrali na začetku. Debelina lahko variira med

rezinami, recimo če kakšna manjka. Lahko tudi napišemo, da je debelejša kot je v resnici, če smo uporabili vsako drugo rezino.

Orisovanje:

V orodni vrstici Tools izberemo Draw Freehand. Kurzor je sedaj v obliki svinčnika in lahko prosto rišemo.

Stvari, ki jih želimo videti v 3D sceni orišemo. Na vsaki strani je to označeno kot Trace in vse Trace z istim imenom so Object. Oboje lahko pregledamo tako, da odpremo seznam.

Nato odpremo Object, List objects. Ko ga označimo in pritisnemo Enter se bo izrisal v 3D sceni. Tu tudi lahko določamo barve, transparentnost, ime...

V Series, Series options izberemo 3D. Tu izberemo kako bodo traces oz objects prikazane. Če želimo da imam struktura površino izberemo Boissonnat surface.

Tu lahko nastane problem, če se object z istim imenom pojavi na rezinah, ki niso sosednje, saj bo med njimi narisana črta, kot da so povezane. V tem primeru je najbolje, da vse objecte spremenimo v enega (vse primenujemo v isto ime) ali pa posamezne, ki se držijo skupaj tudi skupno poimenujemo.

3D model lahko hranimo kot jpeg sliko, (3D scene, Scene, Export as...) ali kot 360° bitmap. Tu se shani večje število slik 3D modela gledano z različnih kotov in te slike lahko kasneje sestavimo v animacijo formata npr .avi, ki ga podpira tudi Power Point. Za to lahko uporabimo kar Windows Movie Maker.

UNIVERZA V LJUBLJANI BIOTEHNIŠKA FAKULTETA ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Marjeta KONEC

TRIDIMENZIONALNA REKONSTRUKCIJA NOTRANJEGA UŠESA PRI MOČERILU (*Proteus anguinus*, Amphibia: Urodela)

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009