



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Lucija Bastiančić

**USPOREDBA MORFOLOŠKIH
ZNAČAJKI I ENZIMSKE AKTIVNOSTI
DIJELOVA PROBAVNOG SUSTAVA U
ODABRANIH VRSTA HRSKAVIČNJAČA
(CHONDRICHTHYES) I KOŠTUNJAČA
(OSTEICHTHYES) IZ JADRANSKOGA
MORA**

DOKTORSKI RAD

Mentori:

prof. dr. sc. Snježana Kužir

dr. sc. Damir Valić

Zagreb, 2023.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Lucija Bastiančić

**COMPARISON OF MORPHOLOGICAL
CHARACTERISTICS AND ENZYME
ACTIVITIES OF THE DIGESTIVE
SYSTEM IN CARTILAGINOUS
(CHONDRICHTHYES) AND BONY
(OSTEICHTHYES) FISH ORIGINATING
FROM THE ADRIATIC SEA**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

Full Prof. Snježana Kužir, PhD

Damir Valić, PhD

Zagreb, 2023



Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

IZJAVA

Ja, Lucija Bastiančić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat
mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristila drugim izvorima do
onih navedenih u radu.

(potpis studenta)

Zagreb, 2023.

O MENTORIMA:

Prof. dr. sc. Snježana Kužir rođena je 9. travnja 1969. u Zagrebu. Diplomirala je 1996. na Veterinarskom Fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Kao jedna od 10 % najboljih studenata 1997. izabrana je na radno mjesto mlađeg asistenta – znanstvenog novaka na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te je upisala poslijediplomski znanstveni studij istog smjera. Akademski stupanj magistre znanosti iz područja biomedicine i zdravstva stekla je 2002., a 2006. akademski stupanj doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, znanstvenog polja veterinarska medicina/veterinarska medicina. U travnju 2007. izabrana je u znanstvenog suradnika, u studenom 2008. u višeg znanstvenog suradnika, u lipnju 2012. u znanstvenog savjetnika te 2019. u znanstvenog savjetnika u trajnom zvanju u znanstvenom području biomedicine i zdravstva, polje veterinarske medicine. U veljači 2010. izabrana je u znanstveno-nastavno zvanje docenta, u rujnu 2015. u znanstveno-nastavno zvanje izvanredni profesor te u prosincu 2020. u znanstveno-nastavno zvanje redoviti profesor.

Tijekom rada na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju sudjelovala je u izvođenju i unaprjeđenju nastave više predmeta u okviru Integriranog preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija veterinarske medicine. Za prvu generaciju studenata studija na engleskom jeziku pokrenula je predmet Histology with General Embryology. Voditeljica je dva obvezna te je suradnica na četiri izborna predmeta. Nadalje, voditeljica je jednog predmeta te suradnica na dva predmeta poslijediplomskog specijalističkog studija Sudsko Veterinarstvo. Uključena je kao voditeljica jednog i suradnica na dva predmeta doktorskog studija Veterinarske znanosti.

Do sada je bila uključena u istraživanja vezana uz tri znanstvena projekta MZOŠ i tri projekta Hrvatske zaklade za znanost. Nadalje, suradnica je na projektu *Unapređenje suradnje između ribara i znanstvenika u svrhu uvođenja naprednih tehnologija označavanja ribolovnih alata, zaštite zdravlja riba i očuvanja okoliša* (Europski fond za pomorstvo i ribarstvo te Republika Hrvatska). Bila je suradnica na tri projekta tematski vezana uz nastavu te voditeljica ili suradnica na šest projekata u okviru Potpora u znanstvenom istraživanju. Voditeljica je Laboratorija za histologiju, histokemiju i imunohistokemiju Zavoda. Nadalje, recenzentica je u više znanstvenih časopisa te članica uredničkog kolegija časopisa *Veterinar* te pridružena urednica časopisa *Veterinarski arhiv*. Aktivno sudjeluje u radu tijela Fakultetskog vijeća Veterinarskog fakulteta. Učlanjena je u Hrvatsku veterinarsku komoru, Hrvatsko društvo morfologa, Hrvatsko društvo za kalcificirana tkiva te Hrvatsko ekološko društvo. Aktivna je

članica European Association of Veterinary Anatomists i International Society of Education in Animal Sciences.

Sudjelovala je u objavi prvog e-priručnika u Hrvatskoj *3D atlas privjesnog kostura konja* te prijevodu udžbenika iz 2014. *Veterinarska embriologija* autora T. A. McGeadyja, P. J. Quinna, E. S. FitzPatricka i M. T. Ryana u Nakladi Slap. Znanstveni interes povezan je s morfologijom domaćih i divljih životinja, a uže područje znanstvenog djelovanja je histologija domaćih i divljih životinja s naglaskom na istraživanja riba. Pregled objavljenih radova dostupan je na: <https://www.croris.hr/crosbi/searchByContext/2/2792>.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:

BASTIANČIĆ, L., D. HUBER, N. ŠKVORC, S. KUŽIR (2023): Variations in the histological methods of processing samples in histology and histopathology. Proceedings Book of the III International Congress of Education in Animal Sciences, 15. – 16. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 53.

BASTIANČIĆ, L., I. VLAHEK, V. BENKO, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2023): Histochemical research of enzymes involved in cellular digestion in the digestive tract of tub gurnard, *Chelidonichthys lucerna*. Fish Physiol. Biochem. Special Issue: Regulation of Nutrient Metabolism in Fish.

DOI: 10.1007/s10695-023-01188-3

BASTIANČIĆ, L., K. MATANOVIĆ, E. GJURČEVIĆ, N. ŠKVORC, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2022): Histological characteristics of the posterior part of digestive tract in small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). Proceedings of the 11th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2022, 20. – 22. srpnja, Zürich, Švicarska, str. 17.

BASTIANČIĆ, L., K. MATANOVIĆ, E. GJURČEVIĆ, N. ŠKVORC, V. BENKO, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2022): Histology of the digestive tract in European hake (*Merluccius merluccius*). Book of abstracts of the 9th International Scientific Meeting “DAYS

OF VETERINARY MEDICINE – 2022”, 22. – 25. rujna, Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 136.

BASTIANČIĆ, L., N. ŠKVORC, V. KUBALE DVOJMOČ, M. LUKAČ, S. KUŽIR (2022): Histological study of the skin in yellow-headed water monitor (*Varanus cumingi*). Anat. Histol. Embryol. 51, 6-7.
doi: 10.1111/ahe.12759

BASTIANČIĆ, L., N. ŠKVORC, S. KUŽIR (2021): Morphological characteristics of lizard skin (Lacertilia, Squamata). Proceedings of 2nd International Scientific and Professional Meeting on Reptiles and Exotic Animals “REPTILIA”, 21. – 22. svibnja, Zagreb, str. 37-41.

BASTIANČIĆ, L., M. KOLENC, K. KORPES, S. KUŽIR (2019): Correlation of methods of histological sample preparation and success of their usage in teaching. Proceedings of the 10th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2019, 24. – 26. srpnja, Bukurešt, Rumunjska, str. 66-67.

BASTIANČIĆ, L., S. KUŽIR, K. DRAŠNER, K. MATANOVIĆ, I. VLAHEK, E. GJURČEVIĆ (2019): Early detection of *Thelohanellus nikolskii* infection by Alcian Blue-Alizarin Red S double staining technique. Proceedings of the 8th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 10. – 12. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 136.

DRAGUN, Z., D. IVANKOVIĆ, N. KRASNIĆI, Z. KIRALJ, M. CVITANOVIĆ, I. KARAMATIĆ, D. VALIĆ, F. BARAC, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, T. MIJOŠEK, E. GJURČEVIĆ, K. MATANOVIĆ, S. KUŽIR (2022): Metal-binding biomolecules in the liver of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758): the first data for the family Esocidae. Comp. Biochem. Phys. C. 257, 109327.
DOI: 10.1016/j.cbpc.2022.109327

GJURČEVIĆ, E., S. KUŽIR, D. VALIĆ, F. MARINO, V. BENKO, K. KURI, K. MATANOVIĆ (2022): Pathogenicity of *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) in naturally infected chub (*Squalius cephalus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Arhiv 92, 339-348.

DOI: 10.24099/vet. arhiv.1553

KUŽIR, S., I. LEHUNŠEK PANIĆ (2023): Overcoming communication barriers. Proceedings Book of the III International Congress of Education in Animal Sciences, 15. – 16. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 16-18.

KUŽIR, S., L. BASTIANČIĆ, N. ŠKVORC (2021): Bone Remains from Archaeological Sites in the Podravina Area with Traces of Metallurgical Activity. U: Interdisciplinary Research into Iron Metallurgy along the Drava River in Croatia: The TransFER Project. (Sekelj Ivančan, T., T. Karavidović, Ur.), Archaeopress Publishing Ltd, Summertown, Oxford, str. 227-232.

KUŽIR, S., K. DRAŠNER, K. MATANOVIĆ, L. BASTIANČIĆ, I. VLAHEK, S. SAVOCA, E. GJURČEVIĆ (2020): Trade-off between fast growth and the ossification process in common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Arhiv 90, 485-492.

DOI: 10.24099/vet.arhiv.1166

RELJIĆ, S., A. SERGIEL, N. PRVANOVIĆ BABIĆ, A. BECK, S. KUŽIR, B. RADIŠIĆ, R. MASLAK, M. BEDNARSKI, T. PIASECKI, D. HUBER, Đ. HUBER (2019): Determination of reproductive span through morpho-histological studies on the ovaries of captive brown bears (*Ursus arctos*) – a short communication. Vet. Arhiv 89, 233-246.

DOI: 10.24099/vet.arhiv.0471

SAVOCA, S., K. MATANOVIĆ, G. D'ANGELO, V. VETRI, S. ANSELMO, T. BOTTARI, M. MANCUSO, S. KUŽIR, N. SPANÒ, G. CAPILLO, D. DI PAOLA, D. VALIĆ, E. GJURČEVIĆ (2021): Ingestion of plastic and non-plastic microfibers by farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common carp (*Cyprinus carpio*) at different life stages. Sci. Total Environ. 782, 1-10.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146851

ŠKVORC, N., L. BASTIANČIĆ, M. POLETO, S. KUŽIR (2023): Exploring modern learning preferences: the impact of computerization on younger generation students. Proceedings Book of the III International Congress of Education in Animal Sciences, 15. – 16. lipnja 2023., Zagreb, Hrvatska, str. 64.

ŠKVORC, N., L. BASTIANČIĆ, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ, S. KUŽIR (2022): Macroscopic and microscopic structure of the adrenal glands in the Eurasian badger (*Meles meles*) – case study. Proceedings of the 11th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists -YGVA 2022, 20. – 22. srpnja 2022., Zürich, Švicarska, str. 31.

ŠKVORC, N., L. BASTIANČIĆ, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ, N. ŠPREM, M. BUJANIĆ, (2022): Cytomorphological characteristics of European mouflon (*Ovis aries musimon*) blood cells. Anat. Histol. Embryol. 51, 53-54.

DOI: 10.1111/ahe.12759

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, A. MUTVAR, L. TARLE, L. BASTIANČIĆ, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ (2022): Mineral density of red deer (*Cervus elaphus*) antlers up to two and half months after velvet shedding – preliminary results. Book of Abstracts of the 10th International Deer Biology Congress, 4. – 9. rujna 2022., Osijek, Hrvatska, str. 144.

TOMIČIĆ, L., D. VIDUŠIN, E. GJURČEVIĆ, L. BASTIANČIĆ, S. KUŽIR (2020): Histološke osobitosti oka određenih vrsta riba Jadranskog mora. Veterinar, 1, 2-6.

ZADRAVEC, M., N. MALTAR-STRMEČKI, S. KUŽIR, T. GOMERČIĆ, M. MITAK, M. ĐURAS (2020): Aging-related histomorphometric changes in cortical bone tissue of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). Zoomorphology 139, 407-420.

Damir Valić rođen je u Splitu 9. listopada 1976. godine. Osnovno i gimnazijsko obrazovanje stekao je u Splitu. Na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu diplomirao je 2001. godine te magistrirao 2006. i doktorirao 2010. na poslijediplomskom studiju Molekularna i stanična biologija. Zaposlio se u lipnju 2001. kao znanstveni novak na Institutu za oceanografiju i ribarstvo u Splitu, a od 2004. zapošljava se u Zagrebu kao znanstveni novak na Institutu Ruđer Bošković. Od ožujka 2021. radi kao znanstveni suradnik u Laboratoriju za biološke učinke metala Zavoda za istraživanje mora i okoliša pri Institutu Ruđer Bošković.

Godine 2013. Damir Valić izabran je u znanstveno zvanje i na radno mjesto znanstvenog suradnika. Aktivno sudjeluje u organizaciji i izvođenju nastave na Sveučilištu u Zagrebu Veterinarskom fakultetu iz predmeta Primijenjena forenzika na poslijediplomskom specijalističkom studiju (2014. – 2017.) te iz predmeta Ribarstvo na integriranom preddiplomskom i diplomskom studiju (2016. – 2021.).

Voditelj je i koordinator projekta Ministarstva poljoprivrede RH u okviru mjere I.3. Od 2015. za Ministarstvo poljoprivrede, kao i za HEP Proizvodnja d.o.o. vodi programe praćenja stanja riba.

Od 2001. je kao suradnik uključen na 15-ak znanstvenih projekata, od koji su još dva aktivna projekta HRZZ te Interreg projekt s Italijom.

U 2014. bio je član organizacijskog odbora za *International scientific workshop*. Član je Hrvatskog ihtiološkog društva, Hrvatskog botaničkog društva, znanstvenog vijeća Zavoda za istraživanje mora i okoliša IRB-a. Recenzent je u 11 međunarodnih znanstvenih časopisa te je i član Editorial Boarda. Član je povjerenstva za pisanje Zakona o slatkovodnom ribarstvu, kao i povjerenstva za planove upravljanja pri Ministarstvu poljoprivrede. Posjeduje tečaj za rad s laboratorijskim životinjama LabANIM i stalni je sudski vještak. Voditelj je i mentor doktoranda Tomislava Kralja koji je uspješno obranio doktorsku disertaciju 4. svibnja 2023. Područje znanstvenog rada: dijagnostika bolesti morskih i slatkovodnih riba; citogenetička i molekularna istraživanja slatkovodnih riba; sistematika i filogenija; ekologija slatkih voda; invazivne vrste te izrada ribolovno-gospodarskih studija i *monitoringa*.

Koautor je jedne knjige te jednog poglavlja u knjizi; objavio je preko 249 znanstvenih i stručnih radova te studija, 38 izvornih znanstvenih radova citiranih u bazi podataka WoS (288 citata; h-indeks 10) te je sudjelovao je na više od 50 međunarodnih i domaćih konferencija.

PUBLIKACIJE U PROTEKLIH PET GODINA:

DRAGUN, Z., D. IVANKOVIĆ, N. KRASNIĆI, Z. KIRALJ, M. CVITANOVIĆ, I. KARAMATIĆ, D. VALIĆ, F. BARAC, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, T. MIJOŠEK, E. GJURČEVIĆ, K. MATANOVIĆ, S. KUŽIR (2022): Metal-binding biomolecules in the liver of northern pike (*Esox lucius* Linnaeus, 1758): the first data for the family Esocidae. Comp. Biochem. Phys. C. 257, 109327.

DOI: 10.1016/j.cbpc.2022.109327

DRAGUN, Z., D. STIPANIČEV, Ž. FIKET, M. LUČIĆ, N. UDIKOVIĆ KOLIĆ, A. PULJKO, S. REPEC, Z. ŠOŠTARIĆ VULIĆ, D. IVANKOVIĆ, F. BARAC, Z. KIRALJ, T. KRALJ, D. VALIĆ (2022): Yesterday's contamination – a problem of today? The case study of discontinued historical contamination of the Mrežnica River (Croatia). Sci. Total Environ. 848, 157775.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.157775

DRAGUN, Z., N. TEPIĆ, S. RAMANI, N. KRASNIĆI, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, D. VALIĆ, D. KAPETANOVIĆ, M. ERK, K. REBOK, V. KOSTOV, M. JORDANOVA (2019): Mining waste as a cause of increased bioaccumulation of highly toxic metals in liver and gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). Environ. Pollut. 247, 564-576.

DOI: 10.1016/j.envpol.2019.01.068

FILIPOVIĆ MARIJIĆ, V., N. KRASNIĆI, D. VALIĆ, D. KAPETANOVIĆ, I. VARDIĆ SMRZLIĆ, M. JORDANOVA, K. REBOK, S. RAMANI, V. KOSTOV, R. NASTOVA, Z. DRAGUN (2023): Pollution impact on metal and biomarker responses in intestinal cytosol of freshwater fish. Environ. Sci. Pollut. R. 30, 63510-63521.

DOI: 10.1007/s11356-023-26844-2

FILIPOVIĆ MARIJIĆ, V., T. MIJOŠEK, Z. DRAGUN, A. RETZMANN, A. ZITEK, T. PROHASKA, N. BAČIĆ, Z. REDŽOVIĆ, I. GRGIĆ, N. KRASNIĆI, D. VALIĆ, D. KAPETANOVIĆ, J. ŽUNIĆ, D. IVANKOVIĆ, I. VARDIĆ SMRZLIĆ, M. ERK (2022): Application of Calcified Structures in Fish as Indicators of Metal Exposure in Freshwater Ecosystems. Environments 9, 14.

DOI: 10.3390/environments9020014

GJURČEVIĆ, E., S. KUŽIR, D. VALIĆ, F. MARINO, V. BENKO, K. KURI, K. MATANOVIĆ (2022): Pathogenicity of *Clinostomum complanatum* (Digenea: Clinostomidae) in naturally infected chub (*Squalius cephalus*) and common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Arhiv 92, 339-348.

DOI: 10.24099/vet. arhiv.1553

IVANOVA, L., K. REBOK, M. JORDANOVA, Z. DRAGUN, V. KOSTOV, S. RAMANI, D. VALIĆ, N. KRASNIĆI, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, D. KAPETANOVIĆ (2021): Effects of water contamination with metals on pigmented macrophages in spleen of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928) from three rivers in the North-Eastern region of North Macedonia. Period. Biol. 123, 55-64.

DOI: 10.18054/pb.v123i3-4.10421

IVANOVA, L., K. REBOK, M. JORDANOVA, Z. DRAGUN, V. KOSTOV, S. RAMANI, D. VALIĆ, N. KRASNIĆI, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, D. KAPETANOVIĆ (2020): The effect of different pollutants exposure on the pigment content of pigmented macrophage aggregates in the spleen of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman, 1928). Microsc. Res. Techniq. 83, 1141-1152.

DOI: 10.1002/jemt.23506

KIRALJ, Z., Z. DRAGUN, J. LAJTNER, K. TRGOVČIĆ, D. VALIĆ, D. IVANKOVIĆ (2023): Accumulation of metal(loid)s in the digestive gland of the mussel *Unio crassus* Philipsson, 1788: A reliable detection of historical freshwater contamination. Environ. Pollut. 334, 122164, 11.

DOI: 10.1016/j.envpol.2023.122164

KRALJ, T., K. ŽGANEC, R. ČUK, D. VALIĆ (2022): Contribution of alien peracarid crustaceans to the biocontamination of benthic macroinvertebrate assemblages in Croatian large rivers. Limnetica 41, 181-199.

DOI: 10.23818/limn.41.24

KRALJ, T., R. ČUK, D. VALIĆ, S. SCHULTZ, K. ŽGANEC (2022): The relationship between alien crustaceans and pollution in Croatian large rivers: implications for biological monitoring. Hydrobiologia 849, 3315-3334.

DOI: 10.1007/s10750-022-04936-3

MIJOŠEK, T., Z. KLJAKOVIĆ GAŠPIĆ, T. KRALJ, D. VALIĆ, Z. REDŽOVIĆ, S. ŠARIRI, I. KARAMATIĆ, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ (2023): Spatial and temporal variability of dissolved metal(loid)s in water of the karst ecosystem: consequences of long-term exposure to wastewaters. *Environ. Technol. Innov.* 32, 103254, 12.

DOI: 10.1016/j.eti.2023.103254

SAVOCA, S., K. MATANOVIĆ, G. D'ANGELO, V. VETRI, S. ANSELMO, T. BOTTARI, M. MANCUSO, S. KUŽIR, N. SPANÒ, G. CAPILLO, D. DI PAOLA, D. VALIĆ, E. GJURČEVIĆ (2021): Ingestion of plastic and non-plastic microfibers by farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and common carp (*Cyprinus carpio*) at different life stages. *Sci. Total Environ.* 782, 1-10.

DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146851

STIPANIČEV, D., Z. DRAGUN, S. REPEC, D. IVANKOVIĆ, F. BARAC, Z. KIRALJ, T. KRALJ, D. VALIĆ (2023): Dynamics of drug contamination of the river-water in the rural, semirural and urban areas of the Mrežnica River in Croatia during COVID-19 pandemic (2020-2021). *Environ. Sci. Pollut. R.* 30, 93652-93666.

DOI: 10.1007/s11356-023-28845-7

ŽGANEC, K., J. LAJTNER, R. ČUK, P. CRNČAN, I. PUŠIĆ, A. ATANACKOVIĆ, T. KRALJ, D. VALIĆ, M. JELIĆ, I. MAGUIRE (2020): Alien macroinvertebrates in Croatian freshwaters. *Aquat. Invasions* 15, 593-615.

DOI: 10.3391/ai.2020.15.4.04

ŽGANEC, K., J. LAJTNER, S. SCHULTZ, D. VALIĆ (2020): Invasion of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in a Dinaric karst river after formation of a new reservoir. *BioInvasions Records* 9, 519-537.

DOI: 10.3391/bir.2020.9.3.08

ŽUTINIĆ, P., A. KULAŠ, Z. LEVKOV, M. ŠUŠNJARA, S. ORLIĆ, S. KUKIĆ, G. GORETA, D. VALIĆ, M. GLIGORA UDOVIČ (2020): Ecological status assessment using periphytic

diatom communities – case study Krka River. Macedonian Journal of Ecology and Environment 22, 29-44.

DOI: 10.59194/MJEE20221029zh

SAŽETAK

Usporedba morfoloških značajki i enzimske aktivnosti dijelova probavnog sustava u odabranih vrsta hrskavičnjača (*Chondrichthyes*) i koštunjača (*Osteichthyes*) iz Jadranskoga mora

Hipoteza istraživanja je da se u odabranih taksonomskih skupina riba očekuju specifične morfološke razlike probavnog sustava te razlike u lokalizaciji i enzimskoj aktivnosti bez obzira na njihova zajednička obilježja. S ciljem provjere hipoteze odabrane su četiri vrste grabežljivih riba slične prehrane i pridnenog staništa: mačka bljedica (*Scyliorhinus canicula*), pas mekaš (*Mustelus mustelus*), oslić (*Merluccius merluccius*) i lastavica prasica (*Trigla lyra*). Ukupno 119 riba iz tih dviju taksonomskih skupina, hrskavičnjača i koštunjača, analizirane su u svrhu opisa i usporedbe morfoloških značajki i enzimske aktivnosti različitih dijelova probavnog sustava. Za potrebe istraživanja makroskopske građe probavnog sustava ribe su izmjerene i izvagane te im je izmjerena dužina crijeva. U svrhu daljnjeg opisa makroskopske građe nasumično je odabrano po 10 adultnih primjeraka mačaka bljedica, oslića i lastavica prasica te 9 pasa mekaša. U tih riba utvrđeni su i opisani pojedini dijelovi probavnog sustava. U svrhu opisa mikroskopske građe uzorkovani su precizno definirani dijelovi stražnjeg dijela probavne cijevi. Tkivne komponente prikazane su pomoću pet metoda bojenja (hematoksilin-eozinska, Mallory-trikromska, Verhoeff-Van Giesonova, komplet za prikaz retikularnih vlakana i Alcian Blue-PAS komplet). Za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi korištene su azo-tehnike bojenja za dokaz alkalne fosfataze, kisele fosfataze, nespecifične esteraze i aminopeptidaze. Unatoč sličnim prehrambenim navikama makroskopska i mikroskopska građa stražnjeg dijela probavne cijevi u hrskavičnjača znatno se razlikuje od one u koštunjača. U svih istraženih riba, iako su crijeva mjesta najintenzivnijeg metabolizma, ostatak probavne cijevi također je, u određenoj mjeri, uključen u probavu i apsorpciju hranjivih tvari. Istraživanje je rezultiralo novim spoznajama o morfologiji probavnog sustava mačke bljedice, psa mekaša, oslića i lastavice prasice te je postavilo temelj za razumijevanje fizioloških procesa probave. Znanstvene spoznaje unaprijeđene su podacima o tri vrste riba u kojih ovakav detaljan opis građe probavnog sustava nije dosad opisan.

Ključne riječi: morfologija; ribe; probavni sustav; probava; enzimi

EXTENDED ABSTRACT

Comparison of morphological characteristics and enzyme activities of the digestive system in cartilaginous (Chondrichthyes) and bony (Osteichthyes) fish originating from the Adriatic Sea

INTRODUCTION

The digestive system consists of the digestive tract and associated glands. The digestive tract of fish can be divided into anterior and posterior part. The posterior part of the digestive tract consists of the foregut (esophagus and stomach), midgut (intestine) and hindgut (rectum). The midgut refers to the intestine proper, and in most fish, it can be further subdivided into the anterior, middle, and posterior parts. The intestine represents the longest part of the digestive tract, thereby serving as a key location for enzymatic digestion and nutrient absorption.

For understanding of the physiology of the digestive system in fish, it is essential to have knowledge of metabolism and digestion processes. Digestion is the foundation of metabolism. The breakdown and absorption of nutrients determine their availability for all biological processes. The function of digestive system involves the mechanical, chemical, secretory and microbiological activities. Mechanical activities include the intake and processing of food into the oral cavity, swallowing, as well as stomach and intestinal movements. Chemical activities include the secretion and action of digestive enzymes. Secretory activities involve the secretion from associated glands and intraepithelial mucous glands. Microbiological activities refer to bacterial colonies that assist the digestive process and have significant role in certain fish species. In general, between all mentioned activities, the degree of digestion highly depends on the availability of enzymes. Based on the site of enzyme action, the digestion can be either extracellular or cellular.

The study of the digestive system of fish is specific due to the wide diversity of species, their habitats and diets. Accordingly, variations in the structure and function of the digestive system are numerous. Although, there is comprehensive literature focusing on the physiology of the digestive system, the physiology of many fish species remains insufficiently researched. This gives rise to the question about the variations in structure and function of the digestive system found in fish with common characteristics. Therefore, the fundamental assumption of this research was that, among cartilaginous and bony fish, specific morphological differences in the digestive system are expected, as well as variations in enzyme localization and activity, regardless of their common characteristics.

MATERIAL AND METHODS

To determine variations in digestive system, this study encompasses two taxonomic groups of fish, cartilaginous and bony fish. Within these groups, the predatory fish with similar diets and habitats were selected. Two representatives from each group were chosen: the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) and the smooth-hound (*Mustelus mustelus*) as representatives of cartilaginous fish, and the European hake (*Merluccius merluccius*) and the piper gurnard (*Trigla lyra*) as representatives of bony fish.

Fish were caught with longline fishing in the Adriatic Sea as a part of scientific project “Improvement of cooperation between fishermen and scientists for the purpose of introducing advanced technologies of marking of fishing tools, fish health and environmental protection”. After measurements, fresh, ice-cold fish were dissected and the digestive tract was removed. In this study, 30 small-spotted catsharks, 30 European hakes and 30 piper gurnards were used. Within each species, 10 fish were used for the descriptive (topographical) investigation of macroscopic structure of the digestive tract, 10 for histological and histochemical research and 10 for the investigation of the localization and enzymatic activity in the digestive tract. Additionally, 29 smooth-hounds were used: 9 for the descriptive (topographical) investigation, 10 for histological and histochemical research and 10 for the investigation of the localization and enzymatic activity in the digestive tract.

The macroscopic structure of the posterior part of digestive tract was investigated descriptively (topographically) and morphometrically. Organ parts of the digestive system were identified and described. For morphometric research, the digestive tract was removed from the body cavity. The intestine length was measured, and the relative intestinal length was calculated. Morphometric research included all 119 fish. Sampling was carried out within the anatomical borders of the organs, in accordance with variations in the morphology of the digestive system in cartilaginous and bony fish.

For histological and histochemical research, the tissue samples were fixed in 10% neutral buffered formalin, embedded in paraffin, and sectioned with microtome into 6 µm sections. The sections were stained using five different methods: hematoxylin and eosin, Mallory trichrome, Verhoeff-Van Gieson, Alcian Blue-PAS kit and the seven-reagent kit for determining reticulin fibers. For the investigation of cellular digestive processes, the distribution and intensity of alkaline phosphatase, acid phosphatase, non-specific esterase and aminopeptidase were investigated. The tissue samples were taken, embedded in Cryofix gel and sectioned with cryostat into 8 µm sections. To detect the enzymatic reactions, azo-coupling

methods were used and the optical density (OD) of the reactions was measured using ImageJ software.

RESULTS

Regarding macroscopic structure, cartilaginous fish, the small-spotted catshark and the smooth-hound share several similarities: a short esophagus, a bifurcated stomach shaped like an "U," a short spiral intestine and a rectum that terminates in a cloaca. The bony fish, the European hake and the piper gurnard, also share similarities in the esophagus and stomach (short esophagus and bifurcated stomach shaped like a "Y"). The main differences in macroscopic structure of the bony fish were observed in the part of the digestive system from the pyloric caeca to the rectum (presence of pyloric caeca in the piper gurnard and greater relative intestinal length compared to the European hake). Variations in intestinal length were observed among the studied fish species, despite similar dietary habits. In relation to the total body length, the intestine in cartilaginous fish is relatively short, and the median value of relative intestinal length between the small-spotted catshark and the smooth-hound is similar. The relative intestinal length is greater in the piper gurnard than in the European hake.

Regarding microscopic structure, the digestive systems of the small-spotted catshark and the smooth-hound share many similarities: the same type of epithelium in the esophagus, stomach and spiral intestine, unicellular mucous glands in the epithelium of all parts except the stomach, glands in the lamina propria of the stomach, well-developed lamina muscularis of mucosa in the stomach and spiral intestine, a propria-submucosa in the rectum and similarly developed muscularis of the digestive tract wall. Differences in microscopic structure between these two species were observed in the type of epithelium lining the rectum, the content of mucous glands, and the presence of lamina muscularis of mucosa in the part of the esophagus below the Leydig's organ. The digestive systems of the European hake and the piper gurnard share many similarities: the same type of covering epithelia in all segments of the posterior part of the digestive tract, unicellular mucous glands in the epithelium of all parts except the stomach, glands in the lamina propria of the stomach, well-developed lamina muscularis of mucosa in the stomach but its absence in the anterior and middle part of the intestine, similarly developed muscularis in the walls of organs, and serosa as the outer layer of the digestive tract. Differences in microscopic structure between these two species were observed in the content of mucous glands and in the occurrence of lamina muscularis of mucosa in the esophagus.

In this study, the OD of alkaline phosphatase was measured in the brush border of the intestines of all investigated fish species. Enzymatic activity was detected in the epithelium of the

esophagus of the smooth-hound, European hake, and piper gurnard, as well as in the epithelium of the rectum of the piper gurnard. Additionally, enzymatic activity was found in the layers of connective tissue and around the blood vessels in all investigated fish species. When comparing the mean optical densities (MOD) between the cartilaginous and the bony fish, values were higher in the esophagus of bony fish, being highest in the piper gurnard. In the rectum, activity was found only in bony fish and was higher in the European hake. Although, higher OD were measured in the small-spotted catshark, the difference in the MOD of alkaline phosphatase in the spiral intestine of cartilaginous fish was not statistically significant. In the intestine of the bony fish, the MOD of alkaline phosphatase was higher in the European hake than in the piper gurnard.

In the brush border, the reaction of acid phosphatase was found only in the spiral intestine of the small spotted catshark ($0,227 \pm 0,117$). The activity of acid phosphatase was found in the epithelium and connective tissue of all parts of the digestive tract. Among the cartilaginous fish, the highest MOD was detected in the epithelium of the esophagus of the small-spotted catshark ($0,283 \pm 0,047$). In the smooth-hound, MOD increases up to the spiral intestine, where it is the highest ($0,194 \pm 0,078$) and then it declines afterwards. In the bony fish, the MOD of acid phosphatase in the European hake shows higher values compared to the piper gurnard. In the European hake the highest MOD were measured in the epithelium of the anterior ($0,327 \pm 0,079$) and posterior ($0,327 \pm 0,063$) parts of the intestine. In the piper gurnard, MOD increases up to the pyloric caeca ($0,109 \pm 0,015$), after which its value decreases and then gradually increases along the length of the intestine. The MOD of acid phosphatase reactions in the connective tissue generally follows the increase of the value in the epithelium.

In the cartilaginous fish, the activity of non-specific esterase was found along the epithelium of the entire posterior part of the digestive tract. A similar enzymatic distribution was also observed in the piper gurnard. Unlike the enzymatic localization in the cartilaginous fish and the piper gurnard, enzyme activity in the European hake was only found in the epithelium of the anterior, middle, and posterior parts of the intestine. The localization of non-specific esterase differs in the connective tissue of the digestive tract between the cartilaginous and the bony fish. In the cartilaginous fish, the activity of non-specific esterase was found in the connective tissue of the stomach and spiral intestine. In the piper gurnard, enzymatic activity was found along the connective tissue, from the stomach to the rectum. In contrast, enzymatic activity was not found in the connective tissue of the digestive tract in the European hake. In general, higher values of MOD of non-specific esterase were observed in the small-spotted catshark than in the smooth-hound. The highest value in the small-spotted catshark was

measured in the stomach ($0,250 \pm 0,085$), while in the smooth-hound, it was measured in the spiral intestine ($0,132 \pm 0,039$). In bony fish, the enzyme is significantly more active along the digestive system of the piper gurnard. Despite that, higher values were measured in the intestine of the European hake. In both species of bony fish, the enzyme activity increases up to the posterior part of the intestine where its activity is the highest.

The OD of aminopeptidase was measured in the brush border of the intestines of all the investigated fish species. Additional activity was also found in the epithelium of the esophagus, as well as in the brush border of the pyloric caeca of the piper gurnard and in the rectum of the European hake. In the cartilaginous fish, the MOD of aminopeptidase were higher and more variable in the smooth-hound. The enzymatic distribution suggests that the spiral intestine is the primary site for protein digestion and absorption in these fish. In the smooth-hound, aminopeptidase activity was also measured in the basal part of the esophageal epithelium. In the bony fish, higher MOD of aminopeptidase were found in the brush border of all parts of the European hake's intestine. The highest value was measured in the brush border of the middle part of the intestine proper ($0,314 \pm 0,093$). Additional activity was also found in the basal part of the esophageal epithelium, as well as in the brush border of the pyloric caeca of the piper gurnard and in the rectum of the European hake.

CONCLUSIONS

The macroscopic structure of the posterior part of the digestive system shows similarities between the small-spotted catshark and the smooth-hound, while it differs between the European hake and the piper gurnard. The structure in the cartilaginous fish is significantly different from that found in the bony fish. Despite similar dietary habits, variations in the intestinal length were observed among individual specimens within the same species, as well as between the studied fish species. In all studied fish, the intestine is shorter than the total body length. In the piper gurnard, additional mechanisms have developed to aid the digestion and absorption of nutrients due to the harder-to-digest chitin shells of crustaceans that dominate in their diet.

The microscopic structure of the posterior part of the digestive tract differs between the investigated fish species. The type of the covering epithelia in the esophagus and rectum shows significant differences, as does the development of the lamina muscularis of mucosa along various segments of the digestive tract. Mucous glands were found in all parts of the digestive tract except the stomach. The composition of the secretions in different parts varies between the investigated fish species.

In all investigated fish species, the intestines are the site of the most intense metabolism. In the small-spotted catshark, the main site of fat digestion is stomach, while in the other studied fish, it is the intestine. Although, the breakdown and absorption of proteins are intensive in the intestine, they also occur in other parts of the digestive tract.

Key words: morphology; fish; digestive system; digestion; enzymes

POPIS OZNAKA I KRATICA

AB PAS – Alcian Blue – perjodna kiselina, Schiffova reakcija

DC – dužina crijeva

GIMP – GNU Image Manipulation Program

HE – hematoksilin-eozinska metoda bojenja

MOD – engl. *mean optical density*

MT – Mallory-trikromska metoda bojenja

OD – optička gustoća (engl. *optical density*), u postavkama softvera ImageJ

OG – optička gustoća enzima

RDC – relativna dužina crijeva

RK – Retikulin-komplet

SOG – srednja optička gustoća

SRP – kompleks čestica za prepoznavanje signala (engl. *signal recognition particle*)

TRIS – tris-hidroksimetil-aminometan

UD – ukupna dužina tijela

VVG – Verhoeff-Van Giesonova metoda bojenja

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA	3
2.1. Podjela probavnog sustava u riba.....	4
2.2. Građa stijenke probavne cijevi	5
2.3. Varijacije u građi pojedinih dijelova probavne cijevi	6
2.3.1. Makroskopske i mikroskopske osobitosti stražnjeg dijela probavne cijevi.....	7
2.3.1.1. Jednjak	7
2.3.1.2. Želudac	8
2.3.1.3. Pilorički nastavci	9
2.3.1.4. Crijevo	10
2.3.1.5. Rektum.....	12
2.4. Metabolizam u riba.....	12
2.5. Probava u riba.....	13
2.5.1. Izvanstanična i stanična probava	13
2.5.1.1. Probava ugljikohidrata.....	14
2.5.1.1.1. Hidroliza polisaharida i oligosaharida	14
2.5.1.1.2. Apsorpcija monosaharida	15
2.5.1.2. Probava bjelančevina	15
2.5.1.2.1. Hidroliza bjelančevina, polipeptida i oligopeptida	15
2.5.1.2.2. Apsorpcija manjih peptida i aminokiselina	16
2.5.1.3. Probava i apsorpcija masti	16
2.5.1.3.1. Hidroliza estera masnih kiselina	16
2.5.1.3.2. Apsorpcija micela i slobodnih masnih kiselina	17
2.5.1.4. Hidroliza estera fosforne kiseline	17
2.6. Enzimi u probavnom sustavu riba	17
2.6.1. Fosfataze	19
2.6.1.1. Alkalna fosfataza (E. C. 3.1.3.1.)	19
2.6.1.2. Kisela fosfataza (E. C. 3.1.3.2.)	20
2.6.2. Hidrolaze karboksilnih estera	21
2.6.2.1. Nespecifična esteraza (E. C. 3.1.1.)	21
2.6.3. Proteolitički enzimi	22
2.6.3.1. Aminopeptidaze (E. C. 3.4.11.)	22
2.6.3.1.1. Leucin aminopeptidaza (E. C. 3.4.11.1.)	23
2.7. Vrste riba korištene u istraživanju	23
2.7.1. Hrskavičnjače	23
2.7.1.1. Mačka bljedica	23
2.7.1.2. Pas mekaš	25
2.7.2. Koštunjače	26
2.7.2.1. Oslić	26
2.7.2.2. Lastavica prasica	27
3. OBRAZLOŽENJE TEME	29
4. MATERIJAL I METODE	32
4.1. Podrijetlo uzoraka	33
4.2. Kemikalije korištene za potrebe istraživanja	34
4.3. Uređaji i pribor korišteni za potrebe istraživanja	37

4.4.	Postupak s ribama.....	38
4.4.1.	Istraživanje makroskopske građe probavnog sustava	38
4.4.2.	Uzorkovanje, fiksacija i obrada tkiva za istraživanje mikroskopske građe	39
4.4.2.1.	Histološko i histokemijsko istraživanje	42
4.4.2.1.1.	Hematoksilin-eozinska metoda bojenja.....	44
4.4.2.1.2.	Vezivnotkivna bojenja	44
4.4.2.1.2.1.	Mallory-trikromska metoda	44
4.4.2.1.2.2.	Verhoeff-Van Giesonovo bojenje	45
4.4.2.1.2.3.	Bojenje retikularnih vlakana	46
4.4.2.1.3.	Alcian Blue – perjodna kiselina, Schiffova reakcija	47
4.4.2.2.	Istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi	48
4.4.2.2.1.	Alkalna fosfataza (E. C. 3.1.3.1.)	49
4.4.2.2.2.	Kisela fosfataza (E. C. 3.1.3.2.).....	49
4.4.2.2.3.	Nespecifična esteraza (E. C. 3.1.1.).....	50
4.4.2.2.4.	Aminopeptidaza (E. C. 3.4.11.).....	50
4.4.3.	Mjerenje optičke gustoće enzima.....	50
4.4.4.	Statistička obrada podataka.....	51
5.	REZULTATI	53
5.1.	Rezultati makroskopskog istraživanja probavnog sustava hrskavičnjača.....	54
5.1.1.	Makroskopska građa probavnog sustava mačke bljedice	54
5.1.2.	Makroskopska građa probavnog sustava psa mekaša	55
5.2.	Rezultati makroskopskog istraživanja probavnog sustava koštunjača.....	57
5.2.1.	Makroskopska građa probavnog sustava oslića	57
5.2.2.	Makroskopska građa probavnog sustava lastavice prasice	58
5.3.	Mikroskopska građa dijelova probavnog sustava hrskavičnjača	59
5.3.1.	Mikroskopska građa probavnog sustava mačke bljedice.....	60
5.3.1.1.	Jednjak	60
5.3.1.1.1.	Mikroskopska građa dijela jednjaka s Leydigovim organom.....	60
5.3.1.1.2.	Histologija dijela jednjaka bez Leydigovog organa	60
5.3.1.2.	Želudac	62
5.3.1.2.1.	Prednji dio želuca	62
5.3.1.2.2.	Stražnji dio želuca	63
5.3.1.3.	Spiralno crijevo.....	63
5.3.1.4.	Rektum.....	64
5.3.2.	Mikroskopska građa probavnog sustava psa mekaša.....	65
5.3.2.1.	Jednjak	65
5.3.2.1.1.	Mikroskopska građa dijela jednjaka s Leydigovim organom.....	65
5.3.2.1.2.	Histologija dijela jednjaka bez Leydigovog organa	66
5.3.2.2.	Želudac	67
5.3.2.2.1.	Prednji dio želuca	67
5.3.2.2.2.	Stražnji dio želuca	68
5.3.2.3.	Spiralno crijevo.....	69
5.3.2.4.	Rektum.....	70
5.4.	Mikroskopska građa dijelova probavnog sustava koštunjača	71
5.4.1.	Mikroskopska građa probavnog sustava oslića.....	72
5.4.1.1.	Jednjak	72

5.4.1.2.	Želudac	73
5.4.1.2.1.	Prednji dio želuca	73
5.4.1.2.2.	Stražnji dio želuca	74
5.4.1.3.	Crijevo	74
5.4.1.3.1.	Prednji dio crijeva.....	74
5.4.1.3.2.	Srednji dio crijeva.....	75
5.4.1.3.3.	Stražnji dio crijeva.....	75
5.4.1.4.	Rektum.....	76
5.4.2.	Mikroskopska građa probavnog sustava lastavice prasice.....	77
5.4.2.1.	Jednjak	77
5.4.2.2.	Želudac	79
5.4.2.2.1.	Prednji dio želuca	79
5.4.2.2.2.	Stražnji dio želuca	80
5.4.2.3.	Pilorički nastavci	80
5.4.2.4.	Crijevo	81
5.4.2.4.1.	Prednji dio crijeva.....	81
5.4.2.4.2.	Srednji dio crijeva.....	82
5.4.2.4.3.	Stražnji dio crijeva.....	82
5.4.2.5.	Rektum.....	83
5.5.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u dijelovima probavnog sustava hrskavičnjača ...	84
5.5.1.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u mačke bljedice.....	84
5.5.1.1.	Jednjak	84
5.5.1.2.	Želudac	84
5.5.1.2.1.	Prednji dio želuca	84
5.5.1.2.2.	Stražnji dio želuca	85
5.5.1.3.	Spiralno crijevo.....	85
5.5.1.4.	Rektum.....	85
5.5.2.	Statistička analiza enzimske aktivnosti u mačke bljedice.....	86
5.5.2.1.	Alkalna fosfataza	86
5.5.2.2.	Kisela fosfataza.....	86
5.5.2.3.	Nespecifična esteraza	89
5.5.2.4.	Aminopeptidaza.....	90
5.5.3.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u psa mekaša.....	91
5.5.3.1.	Jednjak	91
5.5.3.2.	Želudac	91
5.5.3.2.1.	Prednji dio želuca	91
5.5.3.2.2.	Stražnji dio želuca	92
5.5.3.3.	Spiralno crijevo.....	92
5.5.3.4.	Rektum.....	92
5.5.4.	Statistička analiza enzimske aktivnosti u psa mekaša	93
5.5.4.1.	Alkalna fosfataza	93
5.5.4.2.	Kisela fosfataza.....	93
5.5.4.3.	Nespecifična esteraza	96
5.5.4.4.	Aminopeptidaza.....	97
5.6.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u dijelovima probavnog sustava koštunjača	98
5.6.1.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u oslića.....	98

5.6.1.1.	Jednjak	98
5.6.1.2.	Želudac	98
5.6.1.2.1.	Prednji dio želuca	98
5.6.1.2.2.	Stražnji dio želuca	99
5.6.1.3.	Crijevo	99
5.6.1.3.1.	Prednji, srednji i stražnji dio	99
5.6.1.4.	Rektum.....	100
5.6.2.	Statistička analiza enzimske aktivnosti u oslića	100
5.6.2.1.	Alkalna fosfataza	100
5.6.2.2.	Kisela fosfataza.....	102
5.6.2.3.	Nespecifična esteraza	103
5.6.2.4.	Aminopeptidaza.....	105
5.6.3.	Lokalizacija enzimske aktivnosti u lastavice prasice.....	106
5.6.3.1.	Jednjak	106
5.6.3.2.	Želudac	107
5.6.3.2.1.	Prednji dio želuca	107
5.6.3.2.2.	Stražnji dio želuca	107
5.6.3.3.	Pilorički nastavci	107
5.6.3.4.	Crijevo	108
5.6.3.4.1.	Prednji, srednji i stražnji dio	108
5.6.3.5.	Rektum.....	108
5.6.4.	Statistička analiza enzimske aktivnosti u lastavice prasice	109
5.6.4.1.	Alkalna fosfataza	109
5.6.4.2.	Kisela fosfataza.....	111
5.6.4.3.	Nespecifična esteraza	113
5.6.4.4.	Aminopeptidaza.....	115
5.7.	Usporedba enzimske aktivnosti između istraženih vrsta riba	117
5.7.1.	Alkalna fosfataza	117
5.7.2.	Kisela fosfataza.....	119
5.7.3.	Nespecifična esteraza.....	123
5.7.4.	Aminopeptidaza	124
6.	RASPRAVA	126
6.1.	Makroskopska građa probavnog sustava.....	127
6.2.	Mikroskopska građa probavnog sustava	130
6.3.	Usporedba enzimske aktivnosti probavnog sustava.....	138
6.3.1.	Usporedba lokalizacije i intenziteta alkalne fosfataze	138
6.3.2.	Usporedba lokalizacije i intenziteta kisele fosfataze	140
6.3.3.	Usporedba lokalizacije i intenziteta nespecifične esteraze	141
6.3.4.	Usporedba lokalizacije i intenziteta aminopeptidaze.....	142
7.	ZAKLJUČCI	144
8.	LITERATURA	146
9.	PRILOZI	168
10.	ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA	176

1. UVOD

Istraživanje građe probavnog sustava riba specifično je zbog velike raznolikosti vrsta, njihovog staništa i prehrane. U skladu s tim, varijacije u građi i funkciji probavnog sustava u riba su mnogobrojne. Premda postoji opsežna literatura koja se bavi probavnim sustavom riba, fiziologija probavnog sustava mnogih vrsta još uvijek nije dovoljno istražena. Za sveobuhvatno poznavanje fiziologije probavnog sustava u tih vrsta riba, ključno je razumijevanje temeljne morfologije probavnog sustava.

Kako je prethodno istaknuto, s obzirom na raznolikost vrsta riba, njihovog staništa i prehrane, postoji velika raznolikost u građi probavnog sustava. Pritom se postavlja pitanje postoje li takve varijacije u građi i funkciji probavnog sustava i među ribama koje dijele slična obilježja.

S ciljem postavljanja osnove za buduća istraživanje i dopune postojećih znanstvenih spoznaja, odabrane su četiri različite vrsta riba sličnih obilježja, iz dvije taksonomske skupine. Kao predstavnici hrskavičnjača odabrani su mačka bljedica (*Scyliorhinus canicula*) i pas mekaš (*Mustelus mustelus*), a kao predstavnici koštunjača oslić (*Merluccius merluccius*) i lastavica prasica (*Trigla lyra*). Sve istražene ribe grabežljive su, mesožderne i pridnenog staništa. Važno je napomenuti kako građa probavnog sustava u mačke bljedice, psa mekaša i lastavice prasice nije detaljno opisana.

Za potrebe detaljnog opisa građe i funkcije stražnjeg dijela probavne cijevi (od jednjaka do rektuma) istražena je makroskopska i mikroskopska građa te je ispitana lokalizacija i izmjeren intenzitet četiriju enzima koji sudjeluju u staničnoj probavi. Opisani su svi dijelovi te su uzeti oni reprezentativni koji su doveli do zaključaka o građi i funkciji pojedinih segmenata.

Navedena metodologija provedena je kako bi se provjerila hipoteza rada, prema kojoj se u odabranih taksonomskih skupina riba očekuju specifične morfološke razlike probavnog sustava te razlike u lokalizaciji i enzimskoj aktivnosti bez obzira na njihova zajednička obilježja.

Poznavanje lokalizacije i intenziteta enzimске aktivnosti daje temeljne preduvjete za daljnja istraživanja. Osim za razumijevanje fiziologije probavnog sustava poznavanje enzimске aktivnosti može biti pokazatelj brzine razvoja riba, omogućavajući rješavanje problema povezanih s hranidbom, a koji bi mogli imati utjecaj na zdravlje riba.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Podjela probavnog sustava u riba

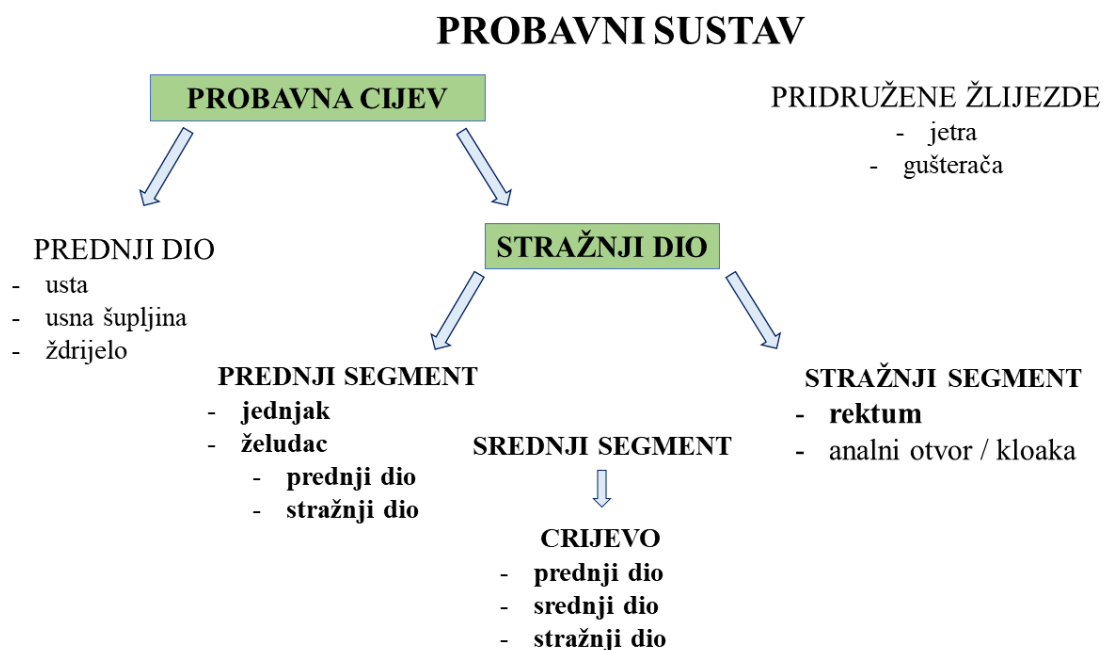
Probavni sustav sastoji se od probavne cijevi i pridruženih (probavnih) žlijezda. Na probavnoj cijevi riba razlikuje se prednji od stražnjega dijela (HELFMAN i sur., 2009.; LIEBICH, 2019.; ALESCI i sur., 2022.). Dijelovi probavne cijevi prikazani su na Slici 1.

Prednji dio probavne cijevi obuhvaća usta, usnu šupljinu s pripadajućim strukturama i ždrijelo. Ovaj dio ima ključnu ulogu u procesu uzimanja hrane i njenoj mehaničkoj obradi. S obzirom na raznolikosti u načinima prehrane i prehrambenim navikama različitih riba prednji dio probavne cijevi pokazuje značajne morfološke varijabilnosti. Granica između prednjeg i stražnjeg dijela definira se prema položaju zadnjeg para škržnih lukova (FIJAN, 1963.; EGERTON i sur., 2018.).

Stražnji dio probavne cijevi dijeli se na prednji, srednji i stražnji segment (EGERTON i sur., 2018.). Ovaj dio ima ključnu ulogu u enzimskoj probavi hranjivih tvari te posljedičnoj apsorpciji nutrijenata. Prednji segment obuhvaća jednjak i želudac. U tim dijelovima u većine riba započinje kemijska probava hranjivih tvari (WILSON i CASTRO, 2011.). Za razgraničenje prednjeg od srednjeg segmenta crijeva služi pilorički sfinkter, odnosno u slučaju kada riba nema želudac, ušće izvodnih kanala jetre i gušterače (FIJAN, 1963.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Srednji segment obuhvaća crijevo u užem smislu, a u većine se riba može dodatno podijeliti na prednji, srednji i stražnji dio crijeva. Radi lakšeg razumijevanja za srednji segment stražnjeg dijela probavne cijevi u ovom radu koristit će se izraz crijevo. Prednji dio ekvivalentan je tankom crijevu u sisavaca, a stražnji debelom crijevu (HOLMGREN i NILSSON, 1999.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Crijevo u riba predstavlja najduži segment probavne cijevi, čime se ističe kao ključno mjesto za enzimске probave i apsorpcije nutrijenata. Iako za razgraničenje pojedinih dijelova crijeva postoji nekoliko značajki, u nekih vrsta riba morfološka razlika između ovih dijelova nije uočljiva (WILSON i CASTRO, 2011.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). U riba u kojih je razlika uočljiva, ona se očituje makroskopski i/ili mikroskopski (MOKHTAR, 2017.). Makroskopski se razlika očituje kao promjena orijentacije nabora sluznice i/ili promjena promjera crijevnog lumena, a mikroskopski kao promjena debljine dijelova stijenke, visine nabora i/ili zadebljanje mišićnog sloja. Stražnji segment stražnjeg dijela probavne cijevi obuhvaća rektum te završava analnim otvorom ili kloakom.

Probavnom sustavu pridružene (probavne) žlijezde su jetra i gušterača, odnosno hepatopankreas u onih riba u kojih je pankreatično tkivo uklopljeno u tkivo jetre. Pridružene

žlijezde u procesu probave sudjeluju kroz emulgaciju masti te sintezu i izlučivanje probavnih enzima (HELFMAN i sur., 2009.).



Slika 1. Podjela probavnog sustava korištena u ovom radu. Dijelovi probavnog sustava otisnuti zadebljano predmet su istraživanja.

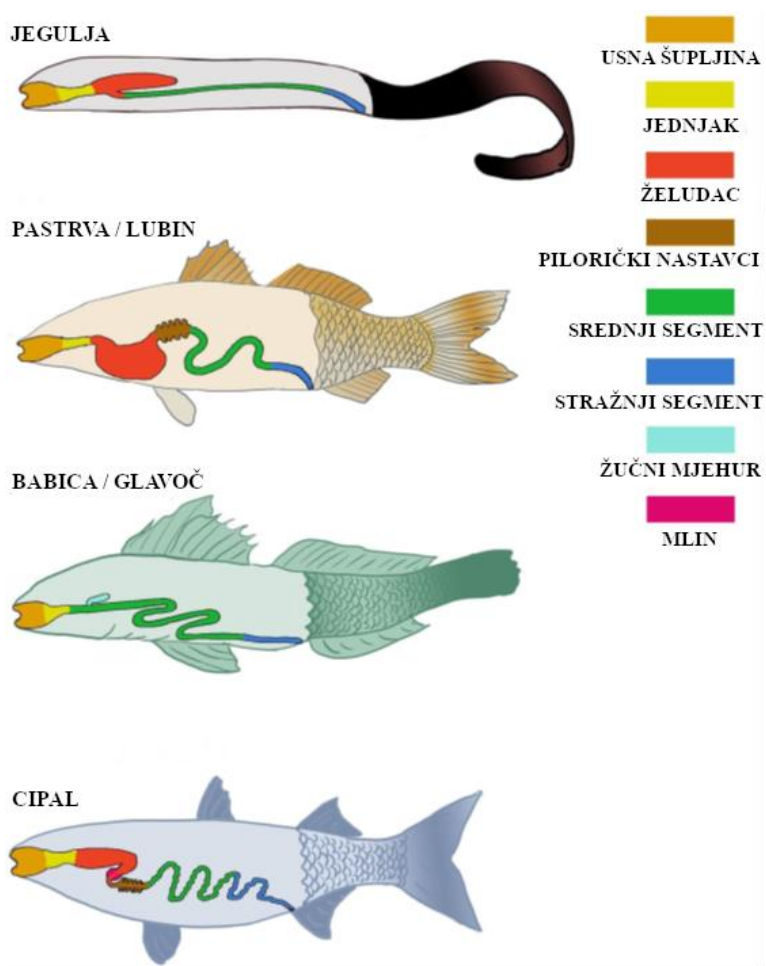
2.2. Građa stijenke probavne cijevi

Stijenku probavne cijevi čine četiri osnovna sloja (KOZARIĆ, 1997.; GENTEN i sur., 2009.; WILSON i CASTRO, 2011.; MOKHTAR, 2017.; LIEBICH, 2019.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Idući od lumena prema vanjskoj površini organa, to su: sluznica (*tunica mucosa*), podsluznica (*tela submucosa*), mišićni sloj (*tunica muscularis*) i adventicija (*tunica adventitia*) ili seroza (*tunica serosa*). Sluznica se sastoji od pokrovnog epitela (*lamina epithelialis mucosae*), lamine proprije (*lamina propria mucosae*) i muskularis mukoze (*lamina muscularis mucosae*). Pokrovni epitel oblaže unutrašnjost probavne cijevi i različitog je tipa u pojedinim dijelovima probavne cijevi. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva i u njoj su smještene krvne žile i živci. Muskularis mukoze građena je od glatkih mišićnih stanica i različito je razvijena u pojedinim dijelovima probavnog sustava. Podsluznica je, kao i lamina proprija, građena od vezivnog tkiva. Mišićni sloj sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja poprečno prugastog ili glatkog mišićnog tkiva. Adventicija je građena od vezivnog tkiva, a

seroza, koja prekriva dio probavne cijevi smještene unutar tjelesne šupljine, od tankog sloja vezivnog tkiva i jednoslojnog pločastog epitela (mezotela).

2.3. Varijacije u građi pojedinih dijelova probavne cijevi

Varijacije u građi probavne cijevi riba posljedica su evolucije, prehrane i prehrambenih navika te prilagodbe na uvjete okoline (RAY i RINGØ, 2014.). Nadalje, razlike u građi organa izražene su u svim dijelovima probavnog sustava, prilagođavajući se njihovim specifičnim ulogama (Slika 2). Navedene razlike posebno su izražene između hrskavičnjača i koštunjača, kao i između pojedinih vrsta riba unutar ove dvije taksonomske skupine.



Slika 2. Podjela probavnog sustava u različitim morskih vrsta riba (prilagođeno prema EGERTON i sur., 2018.).

2.3.1. Makroskopske i mikroskopske osobitosti stražnjeg dijela probavne cijevi

Stražnji dio probavne cijevi dijeli se na prednji, srednji i stražnji segment (EGERTON i sur., 2018.). Prednji segment obuhvaća jednjak i želudac, srednji segment crijevo u užem smislu, a stražnji segment rektum. Zbog jednostavnijeg izlaganja u ovom doktorskom radu za srednji segment koristit će se pojam crijevo, a za stražnji segment rektum. Probavni sustav završava analnim otvorom ili kloakom.

Jednostanične mukozne žlijezde nalaze se između epitelnih stanica u svim dijelovima probavnog sustava, s iznimkom želuca. Sastav jednostaničnih mukoznih žlijezda u probavnom sustavu riba opisali su brojni autori (DÍAZ i sur., 2003.; ALLEN i FLEMSTRÖM, 2005.; PETRINEC i sur., 2005.; CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; KOZARIĆ i sur., 2008.; DÍAZ i sur., 2008.; GENTEN i sur., 2009.; KIM i HO, 2010.; WILSON i CASTRO, 2011.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; CARDOSO i sur., 2015.; BOČINA i sur., 2016.; MOKHTAR, 2017.).

Dužinu crijeva (srednjeg i stražnjeg segmenta) i njezinu povezanost s prehranom riba istražili su brojni autori (NIKOLSKY, 1963.; HARDER, 1975.; ZIHLER, 1982.; KRAMER i BRYANT, 1995.; HORN, 1998.; KOZARIĆ, 2001.; RINGØ i sur., 2003.; WAGNER i sur., 2009.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.; BALLANTYNE, 2014.; RAY i RINGØ, 2014.; AKIN i sur., 2016.; MOKHTAR, 2017.; EGERTON i sur., 2018.; VIDAL i sur., 2022.).

2.3.1.1. Jednjak

Jednjak je kratka i ravna cijev širokog lumena koja, ovisno o vrsti ribe, povezuje ždrijelo i želudac ili ždrijelo i crijevo.

Sluznica jednjaka tvori uzdužne nabore u odnosu na središnju os organa (BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.; FERGUSON, 2006.; WILSON i CASTRO, 2011.; RAHMAN i sur., 2013.). Izravnavanje nabora omogućava povećanje promjera jednjaka prilikom prolaženja hrane. Prolazak hrane u nekih vrsta riba olakšan je kaudalno orijentiranim izbočinama sluznice (FÄNGE i GROVE, 1979.; HOLMGREN i NILSSON, 1999.; WILSON i CASTRO, 2011.; JHAVERI i sur., 2015.). U mesoždernih riba jednjak je rastezljiviji u odnosu na jednjak u biljoždernih riba (KOZARIĆ, 2001.). Prema vrsti pokrovnog epitela, kao i građi mišićnog sloja, na jednjaku se može razlikovati prednji i stražnji dio (MOKHTAR, 2017.). Pokrovni epitel koji oblaže jednjak varira ovisno o vrsti ribe (LEAKE, 1975.;

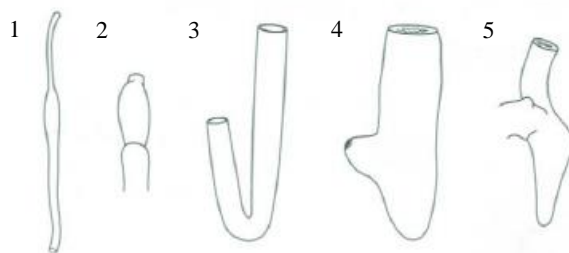
CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; MOKHTAR, 2017.; BOČINA i sur., 2016.). U jednjaku afričkog soma (*Clarias gariepinus*) MOKHTAR i sur. (2017.) opisuju i alarmne stanice. Prema nekim autorima lamina proprija i podsluznica jednjaka tvore jedinstveni sloj vezivnog tkiva (CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; WILSON i CASTRO, 2011.) dok se prema drugima uočava muskularis mukoze koja dijeli ova dva sloja (GENTEN i sur., 2009.; MOKHTAR, 2017.). U ponekih vrsta riba unutar sloja vezivnog tkiva opisane su jednjačke žlijezde (KAPOOR i sur., 1975). Mišićni sloj oba dijela jednjaka građen je od unutarnjeg i vanjskog sloja. MOKHTAR i sur. (2017.) navode kako je mišićni sloj prednjeg dijela jednjaka građen od poprečno prugastih mišićnih vlakana, a izvana je prekriven adventicijom. U stražnjem dijelu jednjaka epitel se snižava, a mišićni sloj građen je od glatkih mišićnih stanica te je izvana prekriven serozom. U riba koje posjeduju riblji mjehur u jednjak se otvara *ductus pneumaticus* oko čijeg se otvora nalazi sfinkter (FIJAN, 1963.; KOZARIĆ, 2001.; GENTEN i sur., 2009.).

2.3.1.2. Želudac

Želudac predstavlja prošireni dio probavne cijevi koji varira u stupnju razvoja ovisno o vrsti ribe (FERGUSON, 2006.). Veličina želuca ovisi o prehrambenim navikama ribe (KAPOOR i sur., 1975.; RAHMAN i sur., 2013). Također, želudac može biti različita oblika (FIJAN, 1963.; HOLMGREN i NILSSON, 1999.; KOZARIĆ, 2001.; GENTEN i sur., 2009.; WILSON i CASTRO, 2011.; EGERTON i sur., 2018.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Na Slici 3 prikazani su samo neki od tipova želuca u riba. Navedena literatura opisuje oblikom ravan želudac, želudac sifonskog oblika i cecalni želudac. Ravan želudac oblika je slova „I“ te je najmanje zastupljen po učestalosti. Ovakav tip želuca nalazi se u štuke (GENTEN i sur., 2009.). Želudac sifonskog oblika opisuje se kao onaj oblika slova „U“ ili „J“ te je najčešći tip želuca u riba. Sastoji se od dva dijela. Cecalni tip želuca oblika je slova „Y“. Sastoji se od dva dijela međusobno odvojena slijepom vrećom. Upravo ta izdužena vrećasta tvorba ovaj tip želuca čini prikladnim za skladištenje veće količine hrane. Cecalni tip želuca nalazi se u jegulje (FIJAN, 1963.). Neke ribe imaju i mlin koji im služi za dodatnu probavu hrane (VAJHI i sur., 2013.; EGERTON i sur., 2018.).

Sluznica želuca oblaže lumen i uzdužno je ili poprečno naborana brojnim naborima (*plicae gastricae*) koji omogućavaju rastezanje kada je želudac ispunjen hranom. Sluznica želuca se sastoji od pokrovnog epitela, lamine proprije i muskularis mukoze. Pokrovni epitel

utiskuje se u laminu propriju čineći želučane jamice (*foveola gastricae*). Želučane jamice su plitke udubine koje čine otvore želučanih žlijezda smještenih između vezivnog tkiva lamine proprije (GENTEN i sur., 2009.). Nomenklatura dijelova želuca prema izgledu sluznice u riba razlikuje se u odnosu na nomenklaturu u sisavaca. Terminologija je različita i ovisi od literature do literature (KAPOOR i sur., 1975.; FÄNGE i GROVE, 1979.; KOZARIĆ, 2001.; WILSON i CASTRO, 2011.; RAY i RINGØ, 2014.). Želudac je obložen jednoslojnim visokoprizmatičnim epitelom. Apikalni dio epitelnih stanica ispunjen je mukoznim sekretom čija svojstva variraju (ALLEN i FLEMSTRÖM, 2005.; CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; BOČINA i sur., 2016.; MOKHTAR, 2017.). Lamina proprija je građena od vezivnog tkiva i žlijezda. Želučane žlijezde riba gradi jedan tip stanice koje izlučuju i pepsin i klorovodičnu kiselinu (engl. *oxynticopeptic*, *oxyntopeptic cells*) (BAKKE i sur., 2011.). Neki autori u želucu opisuju i nespecifične, mukozne žlijezde koje izlučuju sluz (WILSON i CASTRO, 2011.; RAY i RINGØ 2014.). Slojevi vezivnog tkiva želuca odijeljeni su muskularis mukozom koja je građena od glatkih mišićnih stanica. U podsluznici želuca nalaze se elementi krvožilnog i živčanog sustava. Mišićni sloj želuca sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog podužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Pilorički sfinkter predstavlja zadebljanje unutrašnjeg mišićnog sloja završnog dijela želuca (WILSON i CASTRO, 2011.). Vanjska površina želuca prekrivena je serozom koja je građena od mezotela i vezivnog tkiva.



Slika 3. Prikaz različitih oblika želuca u riba: ravni želuci (1 i 2), želudac sifonskog oblika (3) i cekalni tipovi želuca (4 i 5) (preuzeto iz BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.).

2.3.1.3. Pilorički nastavci

Pilorički nastavci su slijepi prstoliki izdanci koji dolaze u koštunjača u kojih je razvijen želudac (SANO i sur., 2021.). U morskih vrsta riba opisani su primjerice u atlantskog lososa (DENSTADLI i sur., 2004.; NGUYEN i sur., 2020.), bakalara (BUDDINGTON i DIAMOND, 1987.), lastavice balavice (BASTIANČIĆ i sur., 2023.), kokotića oštruljića (KOZARIĆ i sur.,

2011.), tune (SANO i sur., 2021.) i nekih drugih vrsta (WILSON i CASTRO, 2011.). Pilorički nastavci nalaze se u području stražnjeg dijela želuca (pilorusa), a razvijaju se iz prednjeg dijela crijeva (RAY i RINGØ, 2014.). Njihovi izvodni kanali otvaraju se u prednji dio crijeva (KOZARIĆ, 2001.). Broj piloričkih nastavaka varira u različitim vrsta riba (BUDDINGTON i DIAMOND, 1987.). Osim varijacije u njihovom broju značajne razlike uočavaju se i u strukturi izvodnog kanala (RINGØ i sur., 2003.; RAY i RINGØ, 2014.). U nekih riba sekret se prvo ulijeva u zajednički dio pa u stražnji dio želuca ili u crijevo, dok se u drugih svaki pilorički nastavak zasebno ulazi u želudac ili crijevo. Histološki, pilorički nastavci građeni su slično kao i crijevo. Njihova funkcija očituje se u probavi nutrijenata i apsorpciji hranjivih tvari (BUDDINGTON i DIAMOND, 1987.; DENSTADLI i sur., 2004.; EGERTON i sur., 2018.; NGUYEN i sur., 2020.; SANO i sur., 2021.).

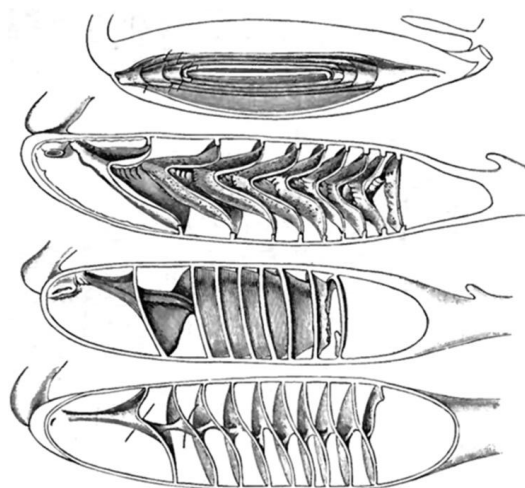
2.3.1.4. Crijevo

Crijevo predstavlja najduži dio probavne cijevi. Neki ga autori dijele na prednji i stražnji dio (HOLMGREN i NILSSON, 1999.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Prednji dio ekvivalentan je tankom crijevu u sisavaca, a stražnji debelom crijevu. Povezanost dužine crijeva s prehranom riba istražili su brojni autori (NIKOLSKY, 1963.; HARDER, 1975.; RIBBLE i SMITH, 1983.; KRAMER i BRYANT, 1995.; HORN, 1998.; RINGØ i sur., 2003.; HELFMAN i sur., 2009.; WAGNER i sur., 2009.; KOZARIĆ i sur., 2011.; RAY i RINGØ, 2014.; AKIN i sur., 2016.; MOKHTAR, 2017.). U crijevu hrskavičnjača nalazi se spiralni nabor (zalistak, pregrada, spirala) koji povećava njegovu površinu za dodir s hranom (HOLMGREN i NILSSON, 1999.; KOZARIĆ, 2001.; LEIGH i sur., 2017.). Upravo radi karakteristična izgleda taj se dio crijeva često naziva spiralno crijevo (Slika 4). Crijevo koštunjača varijabilna je oblika. U nekih vrsta ima izgled ravne cijevi, dok u drugih tvori brojne zavoje unutar tjelesne šupljine (Slika 5).

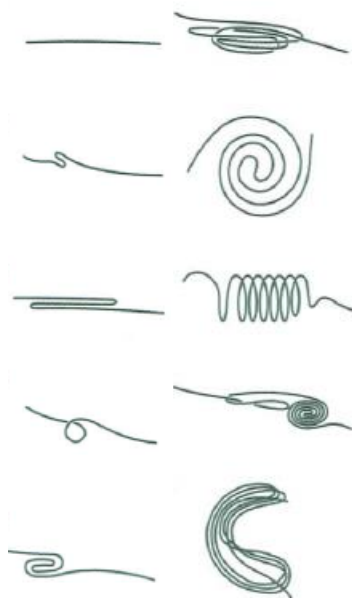
Sluznica crijeva oblaže lumen. Tvori kružne nabore (*plicae circulares*) koji se sastoje od sluznice i podsluznice. Izdanci pokrovnog epitela i lamine proprije, crijevnje resice (*villi intestinales*) prema nekim autorima izostaju (REIFEL i TRAVILL, 1979.; GENTEN i sur., 2009.), dok ih drugi opisuju (VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; VERDILE i sur., 2020.; JOHNSON i CLEMENTS, 2022.). BOČINA i sur. (2016.) tvrde da su nabori ekvivalentni resicama.

Crijevo oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima na slobodnoj površini. Ispod pokrovnog epitela nalazi se vezivno tkivo. Stijenku crijeva riba opisali su brojni

autori (HOLMGREN i NILSSON, 1999.; FIJAN, 1963.; KOZARIĆ, 2001.; CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; LEIGH i sur., 2017; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Osim u nekoliko izuzetaka u lamini propriji crijeva riba nisu razvijene crijevne žlijezde (HELFMAN i sur., 2009.).



Slika 4. Prikaz različitih oblika nabora u spiralnom crijevu hrskavičnjača (preuzeto iz HOLMGREN i NILSSON, 1999.).



Slika 5. Prikaz različitih pojavnosti crijeva u riba (preuzeto iz BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.).

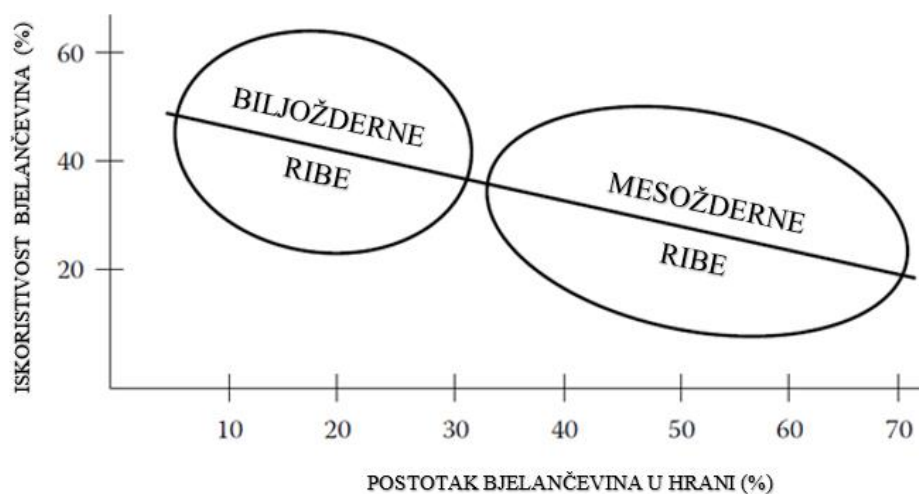
2.3.1.5. Rektum

Rektum završava analnim otvorom ili kloakom. Makroskopski, razlika rektuma spram crijeva očituje se u promjeni promjera lumena. Mikroskopski, razlika se očituje u debljini stijenke (kao posljedica zadebljanja mišićnog sloja), visini resica i broju vrčastih stanica (MOKHTAR, 2017.). U nekih hrskavičnjača, osim smanjenja promjera lumena i zadebljanja mišićnog sloja, uočljiv je prelazak jednoslojnog visokoprizmatičnog epitela u mnogoslojni (HOLMGREN i NILSSON, 1999.).

2.4. Metabolizam u riba

Za razumijevanje fiziologije probavnog sustava riba nužno je poznavanje metabolizma i probave. Probava je osnova metabolizma. Razgradnja i apsorpcija hranjivih tvari određuje njihovu dostupnost za sve biološke procese u riba (SOLOVYEV i GISBERT, 2016.). Stupanj probave ovisi o dostupnosti enzima. Enzimska aktivnost ovisi o vrsti ribe te o biotičkim (veličina, dob, podrijetlo) i abiotičkim (temperatura, prehrana) čimbenicima (HOFER, 1979.; HANI i sur., 2018.). Procjena prisutnosti i aktivnosti probavnih enzima može biti pokazatelj brzine razvoja riba i mogućnosti probave hranjivih tvari. U skladu s tim, enzimska aktivnost korisna je komponenta prilikom predviđanja stope preživljavanja, brzine rasta i procjene adekvatnosti prehrane (GISBERT i sur., 2013.). Osim razumijevanja fiziologije probavnog sustava poznavanje enzimске aktivnosti omogućuje rješavanje problema povezanih s hranidbom, a koji bi mogli imati utjecaj na zdravlje riba (FACCIOLI i sur., 2016.). S obzirom na postojanje mesožderne, biljožderne i svežderne ribe. U riba koje se hrane rakovima hitin predstavlja vrlo bitan izvor energije (do 20 %) (CLEMENTS i RAUBENHEIMER, 2006.).

Slabija sposobnost mnogih vrsta riba da iskoriste ugljikohidrate iz hrane može povećati potrebu za bjelančevinama iznad one u sisavaca (BOWEN, 1987.). Ribe u rastu trebaju između 35 % i 55 % bjelančevina u prehrani za adekvatan rast (TACON i COWEY, 1985.). Iskoristivost bjelančevina u negativnoj je korelaciji s njihovom količinom u hrani (BALLANTYNE, 2014.). Prema tome, mesožderne ribe manje iskorištavaju bjelančevine iz hrane od biljoždernih riba (Slika 6). Kapacitet za apsorpciju aminokiselina u usporedbi s glukozom veći je u mesoždernih riba, a najniži je u biljoždernih riba (BUDDINGTON i sur., 1987.).



Slika 6. Veza između udjela bjelančevina u hrani i njihove iskoristivosti u biljoždernih i mesoždernih riba (prilagođeno prema BALLANTYNE, 2014.).

2.5. Probava u riba

Probavni sustav uključen je u proces probave nizom aktivnosti koje se mogu svesti na mehaničke, kemijske, sekretorne i mikrobiološke (FIJAN, 1963.). Mehaničke aktivnosti probavnog sustava uključuju uzimanje i obradu hrane unutar usne šupljine, gutanje, kao i pokrete želuca i crijeva. Kemijske aktivnosti uključuju lučenje i djelovanje probavnih enzima. Sekretorne aktivnosti uključuju lučenje probavnih žlijezda i mukoznih žlijezda. Mikrobiološke aktivnosti odnose se na mikrofloru i bakterije koje pomažu procesu probave te imaju značajnu ulogu u pojedinim vrsta riba.

2.5.1. Izvanstanična i stanična probava

Probava, prema mjestu djelovanja enzima, može biti izvanstanična i stanična (UGOLEV, 1965). Izvanstaničnu probavu karakterizira razgradnja putem enzima koji su izlučeni iz stanica, a djeluju izvan (dalje od) njih. Enzimi koji sudjeluju u toj tzv. luminalnoj fazi kemijske probave podrijetlom su iz stijenke želuca ili iz gušterače (SJAASTAD i sur., 2017.). Staničnu probavu obilježava razgradnja putem enzima povezanih sa staničnim strukturama. Ona se može podijeliti na unutarstaničnu i membransku probavu. Unutarstanična probava dalje se dijeli na unutarstaničnu probavu u vakuolama, u citoplazmi, unutar specifičnih

granula i probavu na unutrašnjoj površini stanične membrane. Membranska se probava odvija na vanjskoj površini stanične membrane dok se submembranska probava odvija s njezine unutarnje strane. Ako je enzimska aktivnost zabilježena unutar citoplazme stanice, za pretpostaviti je da se radi o staničnoj probavi, iako treba u obzir uzeti nekoliko činjenica, poput mjesta sinteze enzima i vremena inkubacije u korištenom protokolu. Na primjer, enzimi se mogu sintetizirati u stanici, a djelovati izvan nje, kao što je to slučaj s invertazom u želučanim žlijezdama (DAHLQVIST i BRUN, 1962.). U staničnoj probavi, osim enzima, važna je i uloga mikrovila i nabora. S obzirom na to da je udaljenost između susjednih mikrovila mala, prolaz većih molekula kroz njihove pore nije moguć. Upravo zbog toga početna hidroliza odvija se izvan stanice. Nakon što se molekule razgrade na manje komponente, prolaze kroz pore i aktivnim ili pasivnim transportom ulaze u stanicu, gdje se dalje odvija stanična probava. Na intenzitet stanične probave utječu brojni čimbenici, uključujući pokretljivost probavnog sustava, veličinu pora između mikrovila, razvijenost i sastav enzimskog sloja.

2.5.1.1. Probava ugljikohidrata

2.5.1.1.1. Hidroliza polisaharida i oligosaharida

Stanična membrana nije propusna za ugljikohidrate veće molekularne mase i složenije strukture. Hidroliza takvih molekula odvija se kombinacijom izvanstanične i stanične probave. Činjenica da ove molekule vrlo brzo napuštaju crijevni lumen, odnosno da je njihova količina niska u sadržaju, a visoka u crijevnoj sluznici, upućuje na značajnu ulogu stanične probave (UGOLEV, 1965). Probava ugljikohidrata u riba započinje u prednjem dijelu crijeva pod djelovanjem α -amilaze iz sekreta gušterače (KROGDAHL i sur., 2005.). Aktivnost ovog enzima viša je u biljoždernih nego u sveždernih i mesoždernih riba. Pod djelovanjem α -amilaze škrob i glikogen razgrađuju se na kraće oligosaharide poput maltoze, laktoze, saharoze i trehaloze (BALLANTYNE, 2014.). Daljnja probava ovih oligosaharida odvija se uz pomoć disaharidaza. Glavni enzimi koji sudjeluju u staničnoj probavi su: maltaza, laktaza, saharaza i trehalaza. Maltaza razlaže maltozu na dvije molekule glukoze. Laktaza razlaže laktozu u glukozu i galaktozu. Saharaza razlaže saharozu u glukozu i fruktozu. Trehalaza je enzim koji razlaže trehalozu na dvije molekule glukoze. Biljožderne ribe vrlo dobro iskorištavaju ugljikohidrate iz hrane pa su navedeni enzimi u njih prisutni u većim koncentracijama (BALLANTYNE, 2014.). KROGDAHL i sur. (2005.) tvrde da je u mesoždernih riba hitin

podrijetlom iz ljuštura rakova i kutikule mnogočestinaša i mekušaca najčešće zastupljeni ugljikohidrat u hrani. Isti autori navode kako se osim navedenim enzimima razgradnja ugljikohidrata dodatno odvija i uz pomoć mikroflore crijeva.

2.5.1.1.2. Apsorpcija monosaharida

Apsorpcija ugljikohidrata intenzivnija je u prednjem dijelu crijeva dok se prema stražnjim dijelovima smanjuje (KROGDAHL i sur., 2005.). Glukoza i galaktoza prolaze kroz četkastu prevlaku i ulaze u epitelne stanice putem aktivnog transporta (BALLANTYNE, 2014.). Prijenos ovih monosaharida ovisan je o natriju. Aktivnim prijenosom natrijevih iona kroz bazolateralne dijelove epitelnih stanica dolazi do smanjenja koncentracije natrija unutar stanice. Natrij iz crijevnog lumena veže se za prijenosnu bjelančevinu te kroz četkastu prevlaku ulazi u epitelne stanice sekundarnim aktivnim prijenosom (GUYTON i HALL, 2017.). Energija koja se oslobađa tijekom prijenosa dva iona natrija u stanicu koristi se za prienos glukoze ili galaktoze protiv koncentracijskog gradijenta. Membranske masti morskih riba u svom sastavu imaju više nezasićenih masnih kiselina koje povećavaju fluidnost membrane, omogućujući i dodatne mehanizme unosa glukoze koji nisu ovisni o natriju (FERRARIS i DIAMOND, 1997). Nakon ulaska u stanicu monosaharidi napuštaju epitelne stanice prolaskom kroz bazolateralnu membranu olakšanom i jednostavnom difuzijom te ulaze u kapilare u sluznici odakle se prenose u krvotok. Fruktosa se u epitelne stanice prenosi olakšanom difuzijom neovisno o natriju (FERRARIS i DIAMOND, 1997).

2.5.1.2. Probava bjelančevina

2.5.1.2.1. Hidroliza bjelančevina, polipeptida i oligopeptida

Stanična membrana nije propusna za bjelančevine i polipeptide. Hidroliza takvih većih molekula odvija se prvo putem izvanstanične, a zatim stanične probave. Kisela pH-vrijednost želuca utječe na denaturaciju proteina te olakšava djelovanje pepsina (BAKKE i sur., 2011.). Stoga, iako probava bjelančevina započinje u želucu djelovanjem pepsina, velik dio bjelančevina razgrađuje se u crijevu pod djelovanjem proteinaza podrijetlom iz gušterače. Proteinaze iz gušterače su proenzimi koji uključuju tripsin, kimotripsin, karboksipeptidaze A i

B te elastazu. Četkasta prevlaka crijeva sadrži enteropeptidazu koja katalizira pretvorbu tripsinogena u tripsin koji potom autokatalizira promjenu ostalih proenzima u njihove aktivne oblike. Aktivna mjesta na integralnim membranskim bjelančevinama četkaste prevlake okrenuta su prema lumenu crijeva, gdje se nalaze peptidaze. Peptidaze su enzimi koji razgrađuju peptide nastale pod djelovanjem proteinaza iz gušterače na aminokiseline i manje peptide. Aminopeptidaza razlaže aminokiseline s N-kraja peptida. Dipeptidaza razlaže dipeptide na aminokiseline. Dipeptidil-aminopeptidaza razlaže dipeptid s N-kraja peptida. U citosolu enterocita nalaze se peptidaze specifične za preostale veze između aminokiselina (GUYTON i HALL, 2017.). Unatoč svemu, neke bjelančevine i peptidi ostaju nerazgrađeni i dolaze u nepromijenjenom obliku u stražnje dijelove crijeva (BAKKE i sur., 2011.).

2.5.1.2.2. Apsorpcija manjih peptida i aminokiselina

Apsorpcija peptida i aminokiselina odvija se na nekoliko načina. Dipeptidi, tripeptidi i manji broj slobodnih aminokiselina prenose se iz četkaste prevlake u citosol stanice putem prijenosnih bjelančevina u kotransportu s natrijem. Manji broj aminokiselina prenosi se u enterocite putem specifičnih membranskih aminokiselinskih prijenosnih bjelančevina (BAKKE i sur., 2011.). Nakon hidrolize unutar stanica prijenos aminokiselina kroz bazolateralnu membranu enterocita u krvotok odvija se uz pomoć prijenosnih sustava ovisnih i neovisnih o natriju (BALLANTYNE, 2014.).

2.5.1.3. Probava i apsorpcija masti

2.5.1.3.1. Hidroliza estera masnih kiselina

Masti su u riba važan izvor energije. U želucu se masti djelomično odvajaju u uljnu fazu i u tom dijelu probavnog sustava duže se zadržavaju. Ograničavajući faktor za stvaranje emulzija je pH-vrijednost želuca. U nekih vrsta riba, osim lipaza podrijetlom iz gušterače, u probavi masti sudjeluju i lipaze podrijetlom iz želuca i crijeva (BALLANTYNE, 2014.; SJAASTAD i sur., 2017.). Lipaze su u riba manje specifične nego u sisavaca (BALLANTYNE, 2014.). Unatoč tome, sekret gušterače sadrži glavne lipolitičke enzime za probavu masti. S obzirom na to da su probavni enzimi topivi u vodi, dostupne su im samo masti na površini

masnih kapljica. Emulgacijom se višestruko povećava površina djelovanja enzima. U crijevu se masne kapljice emulgiraju putem žučnih kiselina te nastaju micle. Micle su nakupine sastavljene od 20 do 30 molekula koje mogu difundirati kroz pore između mikrovila. Kao rezultat njihovog djelovanja iz triacilglicerola nastaju masne kiseline i glicerol koji su odmah dostupni za apsorpciju (BALLANTYNE, 2014.).

2.5.1.3.2. Apsorpcija micela i slobodnih masnih kiselina

Produkti probave – mast, masne kiseline i glicerol – difuzijom prolaze kroz četkastu prevlaku i ulaze u enterocite. Unutar enterocita transportiraju se u glatku endoplazmatsku mrežicu gdje se ponovno esterificiraju, odnosno ponovno spajaju u triacilglicerole. Triacilgliceroli se pakiraju u hilomikrone, a oni se dalje pakiraju u vezikule u Golgijevom kompleksu. Vezikule hilomikrona napuštaju enterocite putem egzocitoze kroz bazolateralne međustanične prostore (BAKKE i sur., 2011.).

2.5.1.4. Hidroliza estera fosforne kiseline

Hidroliza fosfatnih spojeva, odnosno estera fosforne kiseline, predstavlja važan korak u probavnom procesu. Ovaj proces odvija se pod djelovanjem stanične probave, pri čemu uključeni enzimi obuhvaćaju alkalnu fosfatazu, kiselu fosfatazu, fruktazu i difosfatazu. Povezanost alkalne i kisele fosfataze s ovim probavnim procesom proizlazi iz njihove sposobnosti da hidroliziraju fosfatne skupine iz fosfolipida i nukleinskih kiselina (UGOLEV, 1965).

2.6. Enzimi u probavnom sustavu riba

U organizmu postoje dvije vrste reakcija: nekatalizirane i katalizirane (ŠTRAUS, 2009.). U nekataliziranim reakcijama brzina nastajanja produkta je sporija zbog ograničenog broja reaktantskih molekula koje postižu potrebnu energiju aktivacije. Energija aktivacije može se optimizirati različitim čimbenicima koji utječu na brzinu enzimske reakcije. S obzirom na to kako je većina fizioloških stanja organizma stalna, oscilacije su niske i javlja se potreba za kataliziranim reakcijama. Enzimi su bjelančevine koje kataliziraju kemijske reakcije

smanjujući energiju aktivacije. Sintetiziraju se na poliribosomima gdje preko signalne sekvence vežu na sebe kompleks čestica za prepoznavanje signala (SRP, engl. *signal recognition particle*) (MESCHER, 2018.). Kompleks poliribosom – SRP veže se na prihvatni protein na membrani hrapave endoplazmatske mrežice. SRP se potom odvaja od poliribosoma, a signalna se sekvenca uklanja pomoću signalnih peptidaza. Unutar hrapave endoplazmatske mrežice dolazi do daljnjih strukturalnih i posttranslacijskih izmjena na bjelančevinama. Prijenosnim mjehurićima bjelančevine se prenose do cis-strane (oblikujuće, konveksne) Golgijeva kompleksa te ulaze u njegovu unutrašnjost. Daljnje modifikacije nastavljaju se dok bjelančevine putuju prienosnim mjehurićima do trans-strane (zoridbene, konkavne), gdje se pakiraju i izlaze u citosol kao sekretna zrnca, lizosomi ili bjelančevine namijenjene za ugrađivanje u membrane (MESCHER, 2018.).

Enzimi se, prema mjestu djelovanja, mogu podijeliti na stanične i sekrecijske enzime (ŠTRAUS, 2009.). Stanični enzimi djeluju u stanicama dok sekrecijski enzimi djeluju u probavnom traktu (npr. lipaza, pepsin, tripsin) ili u krvnoj plazmi (npr. koagulacijski faktori).

U probavnom sustavu riba enzimi su ključni za razgradnju hranjivih tvari. Određivanje enzimske aktivnosti važno je u razumijevanju fizioloških procesa probave, što pridonosi boljem razumijevanju metabolizma riba (FACCIOLI i sur., 2016.; HANI i sur., 2018.). Prisutnost odgovarajućih enzima i njihova količina u određenim dijelovima i slojevima probavne cijevi također utječu na probavu hranjivih tvari (KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.).

Raspodjela enzimske aktivnosti ovisi o prehrambenim navikama i anatomskim karakteristikama probavne cijevi (KOLKOVSKI, 2001.; GAWLICKA i sur., 2002.; KUŽIR i sur., 2012.). S enzimima jednostanične mukozne žlijezde također sudjeluju u procesu probave i apsorpcije hranjivih tvari. Osim toga žlijezde obavljaju i obrambenu funkciju u probavnom sustavu (SUN i sur., 2019.). Enzime u probavnom sustavu riba opisali su brojni autori (KOZARIĆ i sur., 2004.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.; FACCIOLI i sur., 2016.; HANI i sur., 2018.; WANG i sur., 2018.; LALLÈS, 2019.; SUN i sur., 2019.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.). Ova istraživanja pružaju važne uvide u probavne procese i metabolizam riba.

Prema enzimskoj klasifikaciji, enzimi se mogu podijeliti u šest glavnih rodova: oksidoreduktaze, transferaze, hidrolaze, liaze, izomeraze te ligaze (sintetaze) (ŠTRAUS, 2009.). Oksidoreduktaze kataliziraju reakcije oksidacija i redukcija. Transferaze su enzimi koji kataliziraju prijenos funkcionalne skupine s jedne molekule na drugu. Hidrolaze (hidrolitički

enzimi) kataliziraju hidrolitičko cijepanje supstrata pri čemu se vodikov ion (atom) iz vode veže na jedan, a hidroksilna skupina na drugi produkt cijepanja. Dije se prema tipu supstrata koji razlažu (ŠTRAUS, 2009.). Liaze kataliziraju cijepanje molekula metodama koje ne uključuju hidrolizu ili oksidaciju. Izomeraze mijenjaju strukturni raspored molekula, a ligaze kataliziraju reakciju spajanja dviju molekula uz istovremenu hidrolizu pirofosfatne veze u adenozin-trifosfatu ili drugom sličnom nukleotidu.

2.6.1. Fosfataze

Fosfataze su hidrolaze koji kataliziraju hidrolizu monoestera fosforne kiseline (ortofosfata). S obzirom na afinitet prema esterskoj vezi fosfataze pokazuju relativno nisku specifičnost. Zbog te karakteristike neki autori ih klasificiraju u podskupine esteraza (SHEEHAN i HRAPCHAK, 1980.). Najčešće proučavani enzimi ove skupine u probavnom sustavu riba su: alkalna fosfataza i kisela fosfataza.

2.6.1.1. Alkalna fosfataza (E. C. 3.1.3.1.)

Alkalna fosfataza obuhvaća skupinu enzima u multimolekularnim oblicima koji kataliziraju hidrolizu monoestera fosforne kiseline pri lužnatoj pH-vrijednosti. Optimum djelovanja enzima je u rasponu pH-vrijednosti od 9,0 do 10,5 (LOJDA i sur., 1979.; ŠTRAUS, 2009.; KIERNAN 2015.). Nakon sinteze enzima na poliribosomima slijedi polimerizacija te se ugradnjom cinka stvara aktivna enzimska molekula koja odlazi prema mjestima u stanici gdje se odvija aktivan prijenos tvari (prema staničnoj membrani). S obzirom na tu lokaciju za očekivati je povećana količina enzima na mjestima u organizmu s intenzivnim metabolizmom. Primjerice, aktivnost alkalne fosfataze opisana je u četkastoj prevlaci enterocita i proksimalnih tubula bubrega, u stereocilijama sjemenovoda, membrani hepatocita, endotelu arteriola, arterijskom dijelu kapilara, endoplazmatskoj mrežici, Golgijevom kompleksu, pinocitotskim mjehurićima i lizosomima enterocita, granulama neutrofila te u staničnoj membrani i pinocitotskim mjehurićima glatkih mišićnih stanica (LOJDA i sur., 1979.).

U probavnom sustavu riba alkalna fosfataza ima ulogu u probavi i apsorpciji nutrijenata (LØKKA i sur., 2013.). Enzimska aktivnost očituje se hidrolizom molekule fosfora s ugljikohidrata, masti i bjelancevina pri lužnatoj pH-vrijednosti (OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI 2019.). Stoga, enzim ima ulogu u probavi navedenih hranjivih tvari (KUŽIR

i sur., 2012.; WANG i sur., 2018.; LALLÈS, 2019.). Osim u probavi alkalna fosfataza u probavnom sustavu ima ulogu i u kontroli metabolizma kalcija, fosfora i masnih kiselina (LALLÈS, 2019.). Nadalje, enzim ima ulogu barijere u probavnom sustavu koju ostvaruje sudjelovanjem u regulaciji pH-vrijednosti enterocita, kontroli nepropusnih spojeva, detoksikaciji upalnih mikrobnih komponenti i moduliranju crijevne mikroflore. Alkalna fosfataza sudjeluje u regulaciji pH-vrijednosti luminalne površine sekrecijom bikarbonatnih iona, održavajući vrijednosti u neutralnom do alkalnom opsegu (LALLÈS, 2010). U riba aktivnost alkalne fosfataze povezana je i s defosforilacijom bakterijskih lipopolisaharida, čime utječe na zaštitu od njihove toksičnosti te djeluje preventivno na nastanak cijevne upale (BATES i sur., 2006.; BATES i sur., 2007.). Crijevna alkalna fosfataza pronađena je na apikalnom dijelu membrane enterocita i vrčastih stanica (VILLANUEVA i sur., 1997.; BATES i sur., 2006.; BATES i sur., 2007.; WU i sur., 2017; LALLÈS, 2019.). Upravo radi toga mnogi autori opisuju je u četkastoj prevlaci epitelnih stanica (KOZARIĆ i sur., 2004.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.; FACCIOLI i sur., 2016.; WANG i sur., 2018.; SUN i sur., 2019.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.). Brojni autori usporedili su intenzitet enzimske aktivnosti alkalne fosfataze u crijevu različitih vrsta riba (REFSTIE i sur., 2006.; WU i sur., 2009.; LIU i sur., 2011.; TAN i sur., 2011.; YUAN i sur., 2014.; ZHAO i sur., 2015.; LI i sur., 2015.; HABTE-TSION i sur., 2015.; JIANG i sur., 2016.; XIAO i sur., 2017.; WEI i sur., 2018.).

2.6.1.2. Kisela fosfataza (E. C. 3.1.3.2.)

Kisela fosfataza obuhvaća skupinu enzima koji kataliziraju hidrolizu monoestera fosforne kiseline pri kiseloj pH-vrijednosti. Optimum djelovanja enzima je u rasponu pH-vrijednosti od 4,0 do 6,0 (LOJDA i sur., 1979.; SHEEHAN i HRAPCHAK, 1980.; ŠTRAUS, 2009.; KIERNAN, 2015.). Nakon pinocitoze i apsorpcije nutrijenata stanična se probava odvija pod djelovanjem lizosomalnih enzima. Kisela fosfataza se, nakon procesa sinteze, polimerizacije i pakiranja, primarno distribuira u lizosome. Unutar lizosoma ovaj enzim s nekoliko drugih enzima katalizira hidrolizu estera i amida. Osim u lizosomima enzim se može pronaći i u endoplazmatskoj mrežici i citosolu. Takva, ekstralizosomalna kisela fosfataza pokazuje različiti afinitet prema supstratima i osjetljivosti na inhibitore u odnosu na lizosomalnu kiselu fosfatazu. Osim u crijevima visoka aktivnost ovog enzima zabilježena je i u slezeni, bubrezima i jetri (LOJDA i sur., 1979.).

Kisela fosfataza u riba je povezana s pinocitozom te time pridonosi metaboličkim procesima unutar stanice. Također, ovaj enzim sudjeluje u razgradnji bjelančevina (KOZARIĆ i sur., 2004.; KUŽIR i sur., 2012.; OSTASZEWSKA i KAMASZEWSKI, 2019.). Kisela fosfataza je povezana s procesom obnove stanica u površinskom sloju epitela (HOPWOOD i sur., 1978.) te sa sekretornim procesima u želučanim žlijezdama (KOZARIĆ i sur., 2004.).

2.6.2. Hidrolaze karboksilnih estera

Hidrolaze karboksilnih estera kataliziraju reakciju hidrolize estera u kojoj nastaje karboksilna kiselina i alkohol. Ovi enzimi pokazuju reverzibilnost u svojoj reakciji, što znači da imaju sposobnost sintetiziranja estera iz prethodno nastalih produkata. Zbog različitih kiselina ili alkohola prisutnih u esterima koje hidroliziraju ovi enzimi se dalje klasificiraju u nekoliko podskupina. Ipak, klasifikacija ovih enzima je složena zbog preklapanja u specifičnosti prema supstratu, kao i brojnih varijacija u kinetici i osjetljivosti na inhibitore unutar ove enzimske skupine.

2.6.2.1. Nespecifična esteraza (E. C. 3.1.1.)

Enzimi koji pripadaju skupini nespecifičnih esteraza uključuju karboksiesteraze (E.C. 3.1.1.1.), arilesteraze (E.C. 3.1.1.2.) i acetilesteraze (E.C. 3.1.1.6.) (LOJDA i sur., 1979.; KIERNAN, 2015.). Karboksiesteraze hidroliziraju aromatske estere dok arilesteraze mogu hidrolizirati alifatske i aromatske estere nižih masnih kiselina. Acetilesteraze hidroliziraju estere octene kiseline. Optimum djelovanja enzima je u pH-vrijednosti od 5 do 8. Osim u crijevima nespecifična esteraza nalazi se i u drugim tkivima, na primjer u želucu, jetri i bubrezima. Produkti metabolizma masnih kiselina apsorbiraju se te se u endoplazmatskoj mrežici formiraju trigliceridi, koji se pakiraju u Golgijevom kompleksu i prenose hilomikronima do limfnih kapilara. S obzirom na to enzim se u stanici nalazi u endoplazmatskoj mrežici, lizosomima te moguće u mitohondrijima i citosolu citoplazme (DEIMLING i BÖCKING, 1976.; LOJDA i sur., 1979.). Enzim sudjeluje u probavi glicerida i nižih masnih kiselina. Nakon emulgacije masti njihova se površina dostupna za djelovanje enzima povećava, što često rezultira povećanjem aktivnosti ovog enzima u probavnoj cijevi nakon ulijevanja enzima gušterače (BASTIANČIĆ i sur., 2023.).

2.6.3. Proteolitički enzimi

Proteolitički enzimi ili peptidaze kataliziraju hidrolizu peptidnih veza između aminokiselina u bjelančevinama i polipeptidima. Ovi enzimi mogu biti klasificirani kao endopeptidaze ili egzopeptidaze, ovisno o mjestu na peptidnoj molekuli gdje djeluju (LOJDA i sur., 1979.; BALLANTYNE, 2014.). Endopeptidaze hidroliziraju peptidne veze unutar molekule supstrata. Obično se izlučuju u neaktivnoj formi i djeluju na manje peptide pri kiseloj pH-vrijednosti. Endopeptidaze uključuju enzime poput pepsina, tripsina, kimotripsina, elastaze i enteropeptidaze. S obzirom na mehanizam katalize endopeptidaze se mogu podijeliti na: aspartatne, glutamatne, cisteinske, metaloendopeptidaze, serinske i treoninske peptidaze. Egzopeptidaze hidroliziraju terminalne aminokiseline ili dipeptide, što omogućuje njihovu apsorpciju. Uključuju enzime poput leucin-aminopeptidaze, dipeptidaze, tripeptidaze, karboksipeptidaze i peptidil-dipeptidaze. Pritom se razlikuju oni koji hidroliziraju samo prvu peptidnu vezu od onih koje otkidaju dipeptide ili tripeptide s polipeptidnog lanca (SANDERINK i sur., 1988.; SANZ, 2007.). Egzopeptidaze koje hidroliziraju samo prvu peptidnu vezu su: aminopeptidaze i karboksipeptidaze. Aminopeptidaze otkidaju aminokiseline s N-kraja peptidnog lanca dok s C-kraja aminokiseline otkidaju karboksipeptidaze.

2.6.3.1. Aminopeptidaze (E. C. 3.4.11.)

Aminopeptidaze su egzopeptidaze koje hidroliziraju peptidne veze na N-kraju peptidnog ili proteinskog supstrata. Klasificiraju se na temelju različitih karakteristika, poput afiniteta za supstrat, katalitičkog mehanizma i molekularne strukture (GONZALES i ROBERT-BAUDOUY, 1996.; RAWLINGS i SALVESEN, 2004.; SANZ, 2008.). Aminopeptidaze se razlikuju prema afinitetu za supstrat. Neke su širokog spektra (poput leucin- ili leucil-aminopeptidaze i membranske alanil-aminopeptidaze) dok su druge usko specifične. Većina aminopeptidaza su metaloenzimi, što znači da njihov mehanizam katalize zahtjeva prisutnost aktivatora u obliku metala. Djeluju u relativno širokoj pH-vrijednosti od 6 do 9. Peptidaze koje u aktivnom mjestu imaju metalne ione nazivaju se metalopeptidazama. Za njihovu aktivnost potreban je metalni ion.

Unutar stanice aminopeptidaze se nalaze u citoplazmi i staničnoj membrani (LOJDA i sur., 1979.; TAYLOR, 1993.; WU i sur., 2008.), ali i u lizosomima (SANZ, 2007.). Osim u

crijevima i bubrezima aminopeptidaze nalaze se i u drugim tkivima, na primjer u mišićima, koži, jetri, plućima, bubrezima te u slezeni (LOJDA i sur., 1979.; SHEEHAN i HRAPCHAK, 1980.; SANDERINK i sur., 1988.). U crijevu se enzim uglavnom nalazi u četkastoj prevlaci enterocita (KUOKAWA i SUZUKI, 1998.; TENGJAROENKUL i sur., 2000.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.).

Uloge aminopeptidaza povezuju se sa sintezom i razgradnjom peptida i bjelančevina. Osim u razgradnji bjelančevina aminopeptidaze su uključene u ostale fiziološke procese, poput regulacije staničnog ciklusa i krvnog tlaka te moduliranju imunskog odgovora. U riba se smatra da aminopeptidaza također ima važnu ulogu u procesu mišićne autolize, gdje nakon djelovanja različitih endopeptidaza, aminopeptidaza nastavlja razlaganje oligopeptida na slobodne aminokiseline (CHEN i sur., 2012.).

2.6.3.1.1. Leucin aminopeptidaza (E. C. 3.4.11.1.)

Leucin- ili leucil-aminopeptidaza je metalopeptidaza koja otkida L-aminokiselinske ostatke s peptida ili bjelančevina. Širokog je raspona djelovanja, što znači da uz tendencije za otkidanje leucina može otkidati i druge aminokiseline (SANZ, 2007.) Leucin-aminopeptidaza uključena je u hidrolizu peptida te se smatra da ima ulogu u metabolizmu glutaciona i razgradnji glutation-S-konjugata (JÖSCH i sur., 2003.; CAPPIELLO i sur., 2004.). Distribuciju i intenzitet aminopeptidaze u probavnom sustavu riba porodice Triglidae istražilo je nekoliko autora (KOZARIĆ i sur., 2011.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.). U ostalih riba enzimska aktivnost opisana je u nekoliko članaka (HIRJI i COURTNEY, 1982.; KUOKAWA i SUZUKI, 1998.; TENGJAROENKUL i sur., 2000.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.; JHAVERI i sur., 2015.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.).

2.7. Vrste riba korištene u istraživanju

2.7.1. Hrskavičnjače

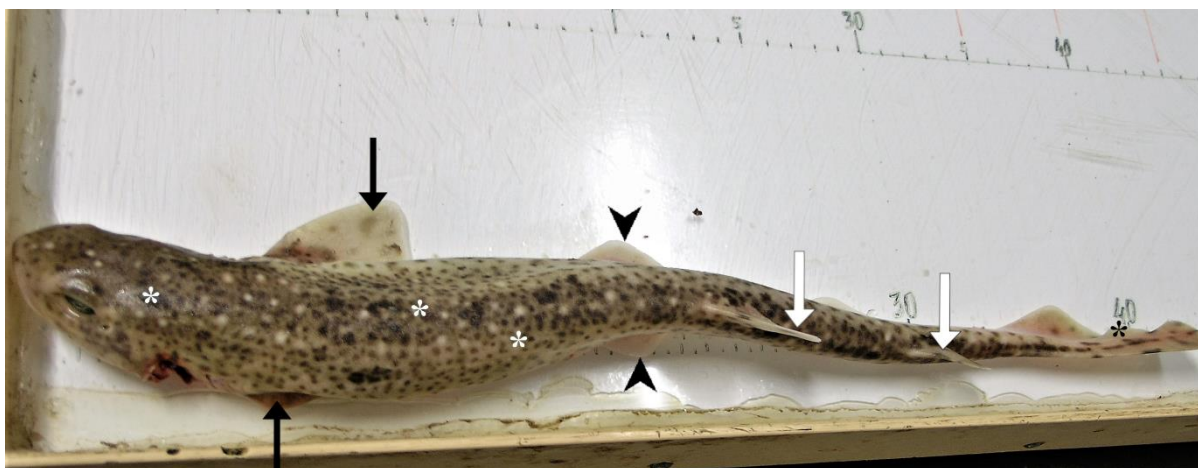
2.7.1.1. Mačka bljedica

Mačka bljedica, *Scyliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758), hrskavičnjača je koja pripada razredu Elasmobranchii (prečnouste), porodici Scyliorhinidae (morske mačke). Morfološke

karakteristike ove vrste opisali su brojni autori (JARDAS, 1996.; BELLO, 1997.; BARRULL i MATE, 2002.; LIPEJ i sur., 2004.; DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Mačka bljedica vretenasta je i izdužena oblika tijela. Boja tijela varira od sivkastožućkaste i sivkastocrvene do smeđe boje s brojnim sitnim sivim i smeđim pjegama. Oblik tijela i izgled pjega prikazan je na Slici 7. Trbuh joj je bijele boje. Usta mačke bljedice položena su ventralno te imaju samo donji usni nabor. U usnoj šupljini ima brojne sitne zube. Na zubima mačke bljedice razlikuje se veći središnji šiljak i do dva para manjih bočnih šiljaka. U mačke bljedice razmak između nosnih zaklopaca uzak je i jedva uočljiv. Na trupu ima parne prsne i trbušne peraje, dvije leđne peraje, podrepnu i repnu peraja (Slika 7). Druga leđna peraja započinje iznad završetka osnovice podrepne peraje (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.).

Mačka bljedica i mačka mrkulja (*Scyliorhinus stellaris*) razlikuju se od mačke crnoust (Galeus melastomus) po nekoliko karakteristika. Mačka bljedica i mrkulja na gornjem obodu repne peraje nemaju greben od plakoidnih ljustica; imaju samo donji usni nabor i unutrašnjost usne šupljine im je bijele boje. Mačka crnosta na gornjem grebenu repne peraje ima greben od povećanih plakoidnih ljustica, ima obje usne bore te joj je unutrašnjost usne šupljine crne boje. Mačka bljedica razlikuje se od mačke mrkulje po veličini tijela, veličini pjega i izgledu nosnih zaklopaca. Mačka bljedica naraste do 100 cm, a mrkulja do 170 cm ukupne dužine tijela. Mačka bljedica ima po tijelu mnogo sitnih smeđih pjega dok su pjege u mrkulje nešto rjeđe, veće i tamnije. Nosni zaklopci mačke mrkulje razmaknuti su širokim razmakom dok je u bljedice razmak između nosnih zaklopaca uzak i jedva uočljiv (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.).

Mačka bljedica demerzalna je, pridnena vrsta koja obitava na različitim dnima najčešće do 200 m dubine. Ženke postižu spolnu zrelost pri ukupnoj dužini tijela od 31 do 40 cm, a mužjaci od 27 do 33 cm (JARDAS, 1996.). Mesožderna je riba. Prehranu morskih mačaka opisali su brojni autori (SERRANO i sur., 2003.; OLASO i sur., 2005.; GRAVINO i sur., 2010.; VALLS i sur., 2011.; MARTINHO i sur., 2012.; KOUTSENI i sur., 2017.a; KOUTSENI i sur., 2017.b). Analizom sadržaja želuca 1200 jedinki ŠANTIĆ i sur. (2012.), donijeli su zaključke su o prehrani mačaka bljedica ulovljenih u središnjem dijelu Jadranskog mora. U želucu morskih mačaka autori su identificirali glavonošce, mnogočetinaše, različite skupine rakova (Stomatopoda, Decapoda, Mysidacea, Euphausiacea, Amphipoda) i ribe koštunjače. U jedinki ukupne dužine tijela do 38 cm dekapodni rakovi najčešće su pronađeni plijen. Kako jedinke rastu, tako se prehrana kreće prema većoj zastupljenosti koštunjača i glavonožaca. U skladu s tim, u jedinki ukupne dužine veće od 38 cm čest su plijen koštunjače.



Slika 7. Morfološke karakteristike tijela mačke bljedice. Na Slici su označeni dijelovi tijela: pjege na dorzalnom dijelu tijela (bijela zvjezdica), parne prsne peraje (crne strelice), parne trbušne peraje (streličasti vrhovi), dvije leđne peraje (bijele strelice) i repna peraja (crna zvjezdica).

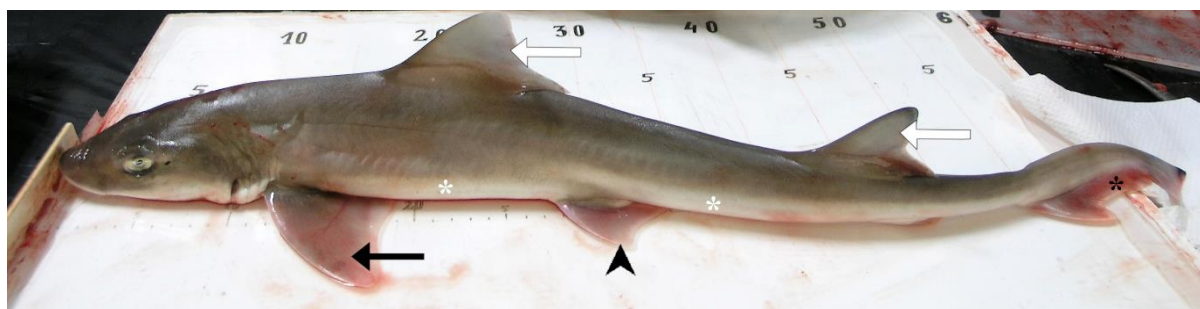
2.7.1.2. Pas mekaš

Pas mekaš, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), hrskavičnjača je koja pripada razredu Elasmobranchii (prečnouste), porodici Triakidae (mekashi). Morfološke karakteristike ove vrste opisali su brojni autori (JARDAS, 1996.; MORTE i sur., 1997.; LIPEJ i sur., 2004.; DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Pas mekaš vretenasta je i izdužena oblika tijela. Jednolično je sive boje tijela i bijelog trbuha (Slika 8). U usnoj šupljini ima brojne guste, sitne zube zrnatog oblika. Na trupu ima parne trbušne i prsne peraje, dvije leđne peraje, podrepnu i repnu peraju (Slika 8). Druga leđna peraja nešto je manja od prve. U porodice mekaša druga leđna peraja malo je manja od prve, a veća od donjeg kraka repne peraje.

Pas mekaš razlikuje se od butora (*Galeorhinus galeus*), psa mekaša pjegavog (*Mustelus punctulatus*) i od psa mekaša zvjezdastog (*Mustelus asterias*) po nekoliko karakteristika. Zubi su u butora trokutasta oblika. Za razliku od psa mekaša, psa mekaša pjegavog i psa mekaša zvjezdastog u butora je druga leđna peraja manja od prve, kao i od donjeg kraka repne peraje. Tri vrste psa mekaša razlikuju se po prisutnosti i boji pjega na dorzalnom dijelu tijela. Pas mekaš jednolično je sive boje i bez pjega dok pas mekaš pjegavi ima crne pjege, a pas mekaš zvjezdasti bijele pjege po dorzalnom dijelu tijela. U psa mekaša pjegavog stražnji obod leđnih peraja crno je obojen (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.).

Pas mekaš pridnena je vrsta koja obitava na različitim dnima najčešće do 220 m dubine. Ženke postižu spolnu zrelost pri ukupnoj dužini tijela oko 80 cm, a mužjaci od 70 do 74 cm (JARDAS, 1996.). Mesožderma je riba. Prehranu psa mekaša opisali su brojni autori (MORTE

i sur., 1997.; CONSTANTINI i sur., 2000.; JARDAS i sur., 2007.; FILIZ, 2009.; SAĀDI i sur., 2009.; SMALE i COMPAGNO, 2010.). Prehranu psa mekaša ulovljenih u srednjem i južnom dijelu Jadranskog mora istražili su JARDAS i sur. (2007.) analizom sadržaja želuca 139 jedinki. U želucu morskih pasa autori su identificirali glavonošce, mnogočetinaše, vrpčare, dvije skupine rakova (Stomatopoda, Decapoda), žiroglavce, plaštenjake i ribe koštunjače. U jedinki ukupne dužine tijela do 110 cm dekapodni rakovi najčešće su pronađeni plijen. Kako jedinke rastu, tako se prehrana kreće prema većoj zastupljenosti koštunjača i glavonožaca. U skladu s tim, u jedinki ukupne dužine veće od 110 cm čest su plijen koštunjače, od kojih su najzastupljenije vrste ribe *Sardina pilchardus* i *Engraulis encrasicolus*. Unatoč tome, a s obzirom na indeks relativne važnosti od 50 %, autori su zaključili da su dekapodni rakovi ipak najučestaliji plijen psa mekaša.



Slika 8. Morfološke karakteristike tijela psa mekaša. Na slici su označeni dijelovi tijela: prsna peraja (crna strelica), bijeli trbuh (bijele zvjezdice), leđne peraje (bijele strelice), trbušna peraja (streličasti vrh) i repna peraja (crna zvjezdica).

2.7.2. Koštunjače

2.7.2.1. Oslić

Oslić, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), koštunjača je koja pripada razredu Actinopteri (zrakoperke), porodici Merlucciidae (oslići). Morfološke karakteristike ove vrste opisali su brojni autori (JARDAS, 1996.; MORALES-NIN i sur., 1998.; PIÑEIRO i SAÍNZ, 2003.; DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Tijelo oslića je valjkastog i izduženog oblika te je najšire u području prsne peraje (Slika 9). Sive je boje tijela i bijelog trbuha. Sluznica usne šupljine oslića crne je boje te sadrži igličaste, višeredne pokretne zube.

Oslić je demerzalna, pridnena vrsta ribe koja obitava na različitim dnima najčešće u dubinskom rasponu od 100 do 400 m. Ženke postižu spolnu zrelost pri ukupnoj dužini tijela od

23 do 33 cm, a mužjaci od 20 do 28 cm (JARDAS, 1996.). Mesožderka je i grabežljiva riba. Prehranu oslića opisali su brojni autori (SERRANO i sur., 2003.; CARPENTIERI i sur., 2005.; STAGIONI i sur., 2011.; PHILIPS, 2012.; RICCIONI i sur., 2018.; CARROZZI i sur., 2019.; ZORICA i sur., 2021.; D'IGLIO i sur., 2022.). U prehrani adultnih oslića dominira riba te u manjem postotku mekušci i rakovi.



Slika 9. Morfološke karakteristike tijela oslića. Na slici su bijelim zvjezdicama označeni najširi dijelovi tijela u području prsne peraje. Vidljiva je sivkasta boja tijela dok je ventralni dio oslića u području trbuha svjetlije boje (crne zvjezdice).

2.7.2.2. Lastavica prasica

Lastavica prasica, *Trigla lyra* (Linnaeus, 1758), koštunjača je koja pripada razredu Actinopteri (zrakoperke), porodici Triglidae (štitoglavke). Morfološke karakteristike ove vrste opisali su brojni autori (JARDAS, 1996.; JARDAS i sur., 2008.; DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Lastavica prasica izdužena je i stožasta oblika tijela (Slika 10). Visina tijela se smanjuje od prednjeg prema stražnjem dijelu. Glava nosi brojne koštane izbočine. Rostralni dio usta izbočuje se te je bočno proširen (Slika 10). U usnoj šupljini te ponegdje na nepcu ima brojne sitne zube. Iznad prsne peraje prisutna je simetrična čvrsta bodlja na obje strane tijela. Vrsna je karakteristika, osim prisutnosti bodlje, i njezina dužina koja seže do polovice dužine prsne

peraje (Slika 10.). Tijelo lastavice prasice na dorzalnom dijelu crvene je do narančaste boje, a na ventralnom srebrno-bijele boje (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.).

U porodici štitoglavki razlikuje se nekoliko rodova riba koje obitavaju u Jadranskom moru. Pritom se razlikuju četiri roda: *Lepidotrigla*, *Eutrigla*, *Chelidonichthys* i *Trigla*. Ribe roda *Trigla* nemaju udubina usječenih u kožu na trupu i repu. Kao što je prije navedeno, iznad prsne peraje ističe se čvrsta bodlja koja seže do polovice dužine prsne peraje (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.).

Lastavica prasica pridnena je vrsta koja obitava na različitim dnima najčešće do 400 m dubine. Ženke i mužjaci postizu spolnu zrelost pri ukupnoj dužini tijela od 28 do 40 cm (JARDAS, 1996.). Mesožderna je riba. Prehranu lastavice prasice opisali su brojni autori (MACPHERSON, 1979.; CARAGITSOU i PAPAConstantinou, 1994.; SERRANO i sur., 2003.; LOPEZ-LOPEZ i sur., 2011.; MONTANINI i sur., 2017.). Adultne jedinke hrane se uglavnom rakovima te u manjoj mjeri zvjezdačama, ribama, bodljikašima, mnogočetinašima i glavonošcima.



Slika 10. Morfološke karakteristike tijela lastavice prasice. Na slici je bijelom strelicom označeno rostralno izbočenje na glavi dok je zvjezdicom označena prsna peraja. Crna strelica prikazuje završnu točku bodlje te je vidljivo da njezina dužina seže do okomice povučene na polovicu dužine prsne peraje.

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Uzimajući u obzir specifičnosti u prehrani raznih vrsta riba, postoje varijacije u građi i funkciji njihovog probavnog sustava. Unatoč dostupnoj literaturi o probavnom sustavu riba, ostaje znatan broj vrsta koje su nedovoljno istražene. Iz toga proizlazi pitanje o varijacijama u građi i funkciji probavnog sustava koje su pronađene u riba koje dijele zajednička obilježja. S ciljem utvrđivanja varijacija ovim istraživanjem obuhvaćene su dvije taksonomske skupine riba: hrskavičnjače i koštunjače. Unutar hrskavičnjača i koštunjača napravljena je daljnja selekcija kojom je odabir sužen na grabežljive ribe sličnih prehrambenih navika i pridnenog staništa. Zatim su odabrana po dva predstavnika iz svake skupine – mačka bljedica (*Scyliorhinus canicula*) i pas mekaš (*Mustelus mustelus*) kao predstavnici hrskavičnjača te oslić (*Merluccius merluccius*) i lastavica prasica (*Trigla lyra*) kao predstavnici koštunjača.

Hipoteza istraživanja je da se u odabranim taksonomskih skupina riba očekuju specifične morfološke razlike probavnog sustava te razlike u lokalizaciji i enzimskoj aktivnosti bez obzira na njihova zajednička obilježja.

Krajnji cilj istraživanja bio je unaprijediti znanstvene spoznaje o novim, do sada nepoznatim podacima koji se odnose na građu i funkciju stražnjeg dijela probavne cijevi u četiriju različitih vrsta riba te, usporedbom dobivenih rezultata, dati osvrt na glavne razlike između vrsta, kao i između taksonomskih skupina.

S obzirom na željeni krajnji cilj istraživanja definirani su sljedeći opći i specifični ciljevi.

Opći cilj bio je istražiti i usporediti građu probavnog sustava u odabranih vrsta riba koje dijele zajednička obilježja (grabežljive, slične prehrane i pridnene vrste), a pripadnici su različitih taksonomskih skupina, hrskavičnjača i koštunjača.

Specifični ciljevi istraživanja bili su:

1. definirati dijelove probavne cijevi u mačke bljedice, psa mekaša, oslića i lastavice prasice
2. uzeti reprezentativne uzorke za istraživanje makroskopske i mikroskopske građe stražnjeg dijela probavne cijevi
3. opisati makroskopsku i mikroskopsku građu stražnjeg dijela probavne cijevi
4. utvrditi lokalizaciju i izmjeriti enzimsku aktivnost u stražnjem dijelu probavne cijevi

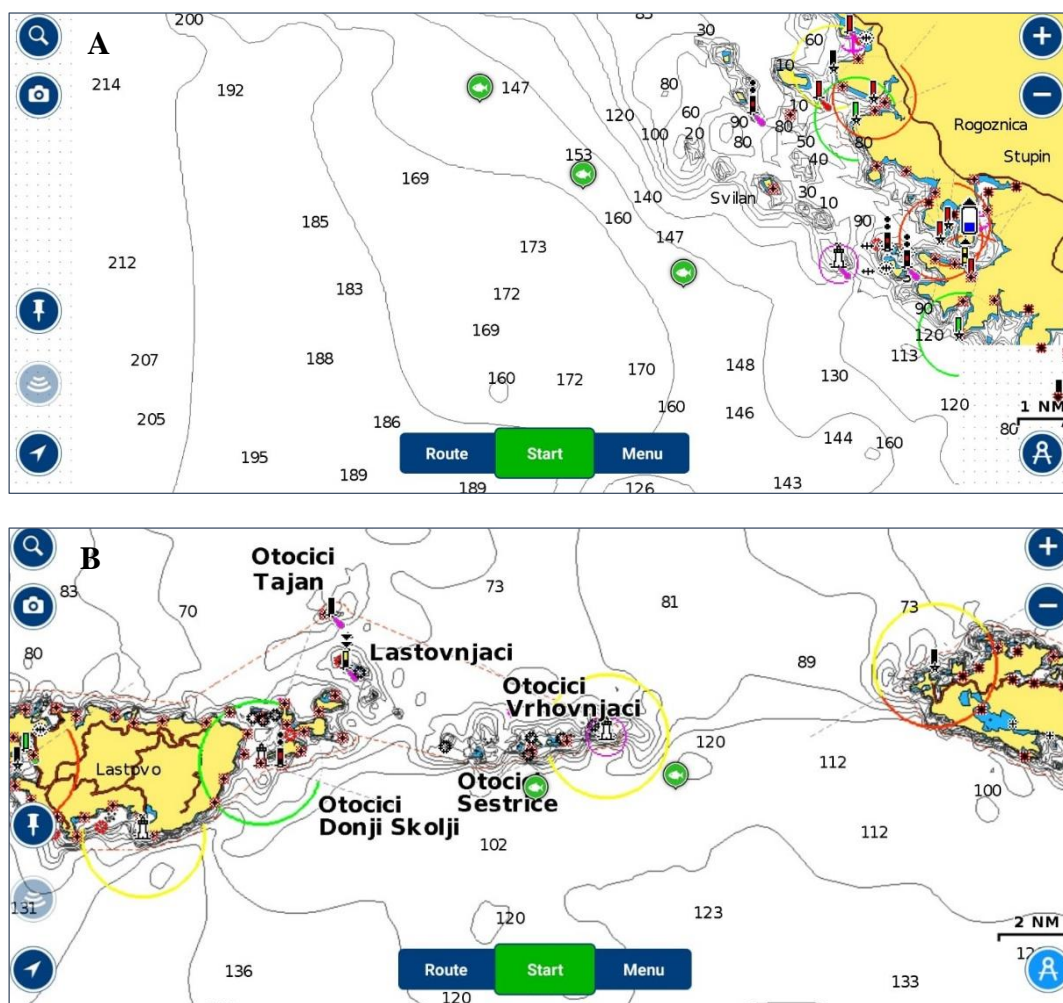
5. usporediti razlike u građi i enzimskoj aktivnosti između pojedinih dijelova probavnog sustava odabranih predstavnika hrskavičnjača i koštunjača

Rezultati istraživanja definirali su temeljne makromorfološke i mikromorfološke osobitosti probavnog sustava u odabranim vrsta riba. Procjena lokalizacije i intenziteta enzimске aktivnosti neophodna je za usporedbu dviju taksonomskih skupina riba, hrskavičnjača i koštunjača te razumijevanje fizioloških procesa probave. Zaključno, istraživanje je rezultiralo novim spoznajama o morfologiji probavnog sustava riba te je unaprijedilo znanstvene spoznaje s takvim podacima u tri vrste riba u kojih ovakav detaljan opis građe probavnog sustava nije dosad opisan.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Podrijetlo uzoraka

Ovim istraživanjem obuhvaćene su dvije taksonomske skupine riba – hrskavičnjače i koštunjače. Kao predstavnici hrskavičnjača odabrani su mačka bljedica i pas mekaš dok su kao predstavnici koštunjača odabrani oslić i lastavica prasica. U doktorskom radu obrađeno je po 30 mačaka bljedica, oslića i lastavica prasica te 29 pasa mekaša (ukupno 119 riba). Riba je ulovljena selektivnim ribolovom stajaćim parangalima (GJURČEVIĆ i sur., 2023.) na nekoliko lokacija u srednjem i južnom dijelu Jadrana (Slika 11A i 11B). Svježa, na ledu ohlađena riba prikupljena je na iskrcajnim mjestima ovlaštenika povlastice za obavljanje gospodarskog ribolova. Istraživanje je odobrilo Povjerenstvo za etiku u veterinarstvu Sveučilišta u Zagrebu Veterinarskog fakulteta (klasa: 640-01/20-17/73; ur. br.: 251-61-02/625-20-01).



Slika 11. Lokacije dijela ulovljenih riba u srednjem dijelu Jadranskog mora (A i B).

4.2. Kemikalije korištene za potrebe istraživanja

Acros Organics (Geel, Belgija):

Kalijev cijanid, KCN (65,17 g/mol)

Pikrinska kiselina, $C_6N_2(NO_2)_3OH$ (229,10 g/mol)

Živin(II) klorid, $HgCl_2$ (271,49 g/mol)

Alfa Aesar (Haverhill, Massachusetts, SAD):

Aluminij-kalij-sulfat-dodekahidrat, $KAl(SO_4)_2 \times 12 H_2O$ (474,39 g/mol)

Fast Blue BB sol, $C_{34}H_{36}Cl_4N_6O_6Zn$ (831,90 g/mol)

Naftol-AS-acetat, $C_{19}H_{15}NO_3$ (305,33 g/mol)

Natrijev jodat, $NaIO_3$ (197,89 g/mol)

BioGnost (Zagreb, Hrvatska):

Alcian Blue-PAS komplet (AB-100T)

Anilin Blue, $C_{32}H_{25}N_3Na_2O_9S_3$ (737,73 g/mol)

BioMount Aqua

Biowax plus 56/58

Cryofix gel

Demold sprej

Formaldehid, 37 – 38 %, CH_2O (30,03 g/mol)

Histanol 100 %, C_2H_6O (46,07 g/mol)

Kiseli fuksin, $C_{20}H_{17}N_3Na_2O_9S_3$ (585,50 g/mol)

Ksilen, C_8H_{10} (106,17 g/mol)

Retikulin-komplet (RET-100T)

DeltaLab (Rijeka, Hrvatska):

Vitro-Clud, uklopno sredstvo

Fagron (Rotterdam, Nizozemska):

Arapska guma, $C_{12}H_{36}$ (180,41 g/mol)

GramMol (Zagreb, Hrvatska):

Jod, I_2 (253,81 g/mol)

Kalcijev klorid, $CaCl_2$ (110,98 g/mol)

Kalijev jodid, KI (166,01 g/mol)

Limunska kiselina 1-hidrat, $C_6H_8O_7 \times H_2O$ (210,14 g/mol)

Natrijev acetat, bezvodni, $C_2H_3NaO_2$ (82,03 g/mol)

Natrijev sulfat, bezvodni, Na_2SO_4 (142,04 g/mol)

Željezov(III) klorid 6-hidrat, $FeCl_3 \times 6H_2O$ (270,30 g/mol)

Kemika (Zagreb, Hrvatska):

Klorovodična kiselina, HCl (36,46 g/mol)

Merck (Kenilworth, New Jersey, SAD):

Eosin y, $C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$ (647,89 g/mol)

Hematoksilin, $C_{16}H_{14}O_6 \times H_2O$ (320,29 g/mol)

Orange G, $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ (452,38 g/mol)

Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, SAD):

Fast Red Violet LB sol, $C_{14}H_{11}Cl_2N_3O^{1/2}ZnCl_2$ (376,31 g/mol)

Fosfovolframova kiselina hidrat, $\text{H}_3[\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4] \times \text{H}_2\text{O}$ (2880,05 g/mol)

Kloral-hidrat, $\text{C}_2\text{H}_3\text{Cl}_3\text{O}_2$ (165,4 g/mol)

L-leucil-4-metoksi-2-naftil-amid-hidroklorid, $\text{C}_7\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2$ (322,80 g/mol)

Naftol-AS-MX-fosfat-dinatrijeva sol, $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_5\text{PNa}_2$ (415,29 g/mol)

Naftol-AS-TR-fosfat-dinatrijeva sol, $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClNNa}_2\text{O}_5\text{P}$ (435,71 g/mol)

T.T.T. d.o.o. (Sveta Nedelja, Hrvatska):

Octena kiselina, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (60,05 g/mol)

VWR Chemicals – BDH Prolabo (Radnor, Pennsylvania, SAD):

Di-natrijev hidrogenfosfat-dodekahidrat, $\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P} \times 12\text{H}_2\text{O}$ (358,14 g/mol)

Kalijev dikromat, $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (294,18 g/mol)

Kloroform (triklormetan), CHCl_3 (119,38 g/mol)

Ledena octena kiselina, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ (60,05 g/mol)

Manganov(II) klorid tetrahidrat, $\text{Cl}_2\text{Mn} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (197,90 g/mol)

Natrijev azid, NaN_3 (65,01 g/mol)

Natrijev dihidrogen-fosfat-1-hidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (137,99 g/mol)

N, N-dimetilformamid, $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ (73,09 g/mol)

Saharoza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ (342,30 g/mol)

Tris-hidroksimetil-aminometan (TRIS), $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (121,14 g/mol)

4.3. Uređaji i pribor korišteni za potrebe istraživanja

Uređaji:

Analitička vaga (MEUDLER AE 200, 205 g/0,1 mg, Švicarska)

Digitalna vaga (KT 05 GB, Gorenje, Hrvatska)

Kriostat (Thermo Shandon, Tamiko Instruments)

Magnetna mješalica (MSH – 300, BioSan, Latvija)

Miligramska vaga (Techniprot, Poljska)

pH-metar (MetUDer – Toledo MP220, GmbH, Švicarska)

Pipetman (L P10mLL, Gilson, Francuska)

Rotacijski mikrotom (Slee Mainz, CUT 5062, GmbH, Njemačka)

Termostat (Termo Med. aparati Bodalec TMA, BTES-E)

Vodena kupelj za parafinske preparate (Hisbath 4 luxe, Kaltek, Italija)

Pribor:

Anatomske pincete (REDA Instrumente GmbH, Njemačka)

Adhezivna predmetna stakla za mikroskopiju (BioGnost, Vitrognost plus ultra, 26 x 76 mm)

Predmetna stakla za mikroskopiju (BioGnost, Vitrognost super grade, 26 x 76 mm)

Držac za skalpel (REDA Instrumente GmbH, Njemačka)

Laboratorijski pribor

Laboratorijsko staklo

Metalni kalupi za uklop

Noževi za mikrotom i kriostat

Skalpel-nožić (Aesculap, Njemačka)

Plastične kazete za uklop (Bio Cassette, Bio-Optica Milano S.p.A., Italija)

Plastični laboratorijski pribor

Pokrovna stakla za mikroskopiju (BioGnost, 24 x 60 mm)

Škare (REDA Instrumente GmbH, Njemačka)

4.4. Postupak s ribama

Nakon prikupljanja na iskrcajnim mjestima riba je determinirana pomoću ključeva za određivanje vrsta (JARDAS, 1996.; DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Odabranim ribama izmjerena je ukupna dužina tijela (UD) kao dužina od vrha glave do krajnje stražnje točke normalno otvorene repne peraje (DULČIĆ i KOVAČIĆ, 2020.). Na temelju dobivenih mjerenja procijenjeno je jesu li ribe juvenilne ili adultne (spolno zrele). Adultne ribe uvedene su u protokol te im je dodijeljen jedinstveni (protokolni) broj. Svaka riba je zatim izvagana i otvorena joj je tjelesna šupljina. U ovom istraživanju korišteno je 30 mačaka bljedica, 30 oslića i 30 lastavica prasica. Pritom je od svake vrste 10 riba korišteno za deskriptivno (topografsko) istraživanje makroskopske građe, 10 za histološko i histokemijsko istraživanje te 10 za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi. Također, u istraživanju je korišteno 29 pasa mekaša. Pritom je 9 pasa mekaša korišteno za deskriptivno (topografsko) istraživanje makroskopske građe, 10 za histološko i histokemijsko istraživanje te 10 za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi. Dužina crijeva (DC) izmjerena je u svih 119 riba obuhvaćenih ovim istraživanjem.

4.4.1. Istraživanje makroskopske građe probavnog sustava

Istraživanje makroskopske građe probavnog sustava provedeno je na dva načina – deskriptivno (topografski) i morfometrijski. Za potrebe deskriptivnog istraživanja nasumično je odabrano 10 adultnih mačaka bljedica, oslića i lastavica prasica te 9 pasa mekaša (ukupno 39 riba). U tih riba utvrđeni su i opisani pojedini dijelovi organa probavnog sustava. Za potrebe morfometrijskog istraživanja iz tjelesne šupljine riba izvađena je probavna cijev. U lastavica prasica izravnan su zavoji crijeva. Izmjerena je DC od piloričkog sfinktera do analnog otvora. Izračunata je relativna dužina crijeva kao omjer dužine crijeva i ukupne dužine tijela

(KOZARIĆ i sur., 2011.; KOUTSENI i sur., 2017.a). Morfometrijskim istraživanjem obuhvaćeno je svih 119 riba.

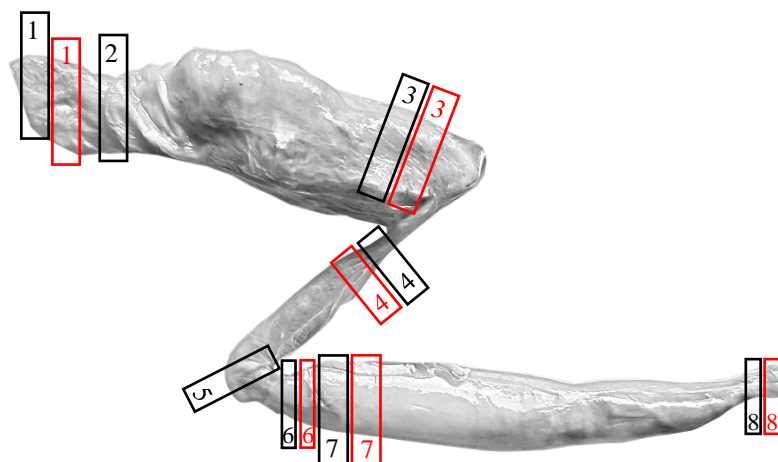
4.4.2. Uzorkovanje, fiksacija i obrada tkiva za istraživanje mikroskopske građe

Uzorkovanje je provedeno u skladu s vrsnim varijacijama u morfologiji probavnog sustava hrskavičnjača (Tablica 1; Slika 12) i koštunjača (Tablica 2; Slike 12 i 13). Za histološko i histokemijsko istraživanje uzeto je 8 uzoraka od 10 mačaka bljedica (ukupno 80 uzoraka), 8 uzoraka od 10 pasa mekaša (ukupno 80 uzoraka), 9 uzoraka od 10 oslića (ukupno 90 uzoraka) i 10 uzoraka od 10 lastavica prasica (ukupno 100 uzoraka). Za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi uzeto je 6 uzoraka od 10 mačaka bljedica (ukupno 60 uzoraka), 6 uzoraka od 10 pasa mekaša (ukupno 60 uzoraka), 7 uzoraka od 10 oslića (ukupno 70 uzoraka) i 8 uzoraka od 10 lastavica prasica (ukupno 80 uzoraka).

Tablica 1. Uzorci organa hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša) uzeti za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja te istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava.

UZORAK	MAČKA BLJEDICA	PAS MEKAŠ
Jednjak		
Prednji dio	X X	X X
Stražnji dio	X -	X -
Želudac		
Prednji dio	X X	X X
Stražnji dio	X X	X X
Pilorički sfinkter	X -	X -
Crijevo		
Prednji dio	X X	X X
Spiralno crijevo	X X	X X
Rektum	X X	X X

X – uzorci uzeti za histološko i histokemijsko istraživanje; X – uzorci uzeti za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava.

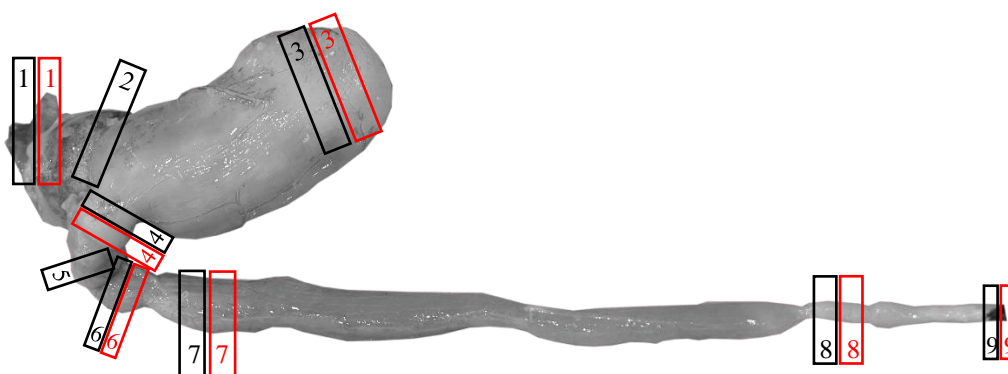


Slika 12. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava hrskavičnjača. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), prednji (6) i spiralni (7) dio crijeva te rektum (8).

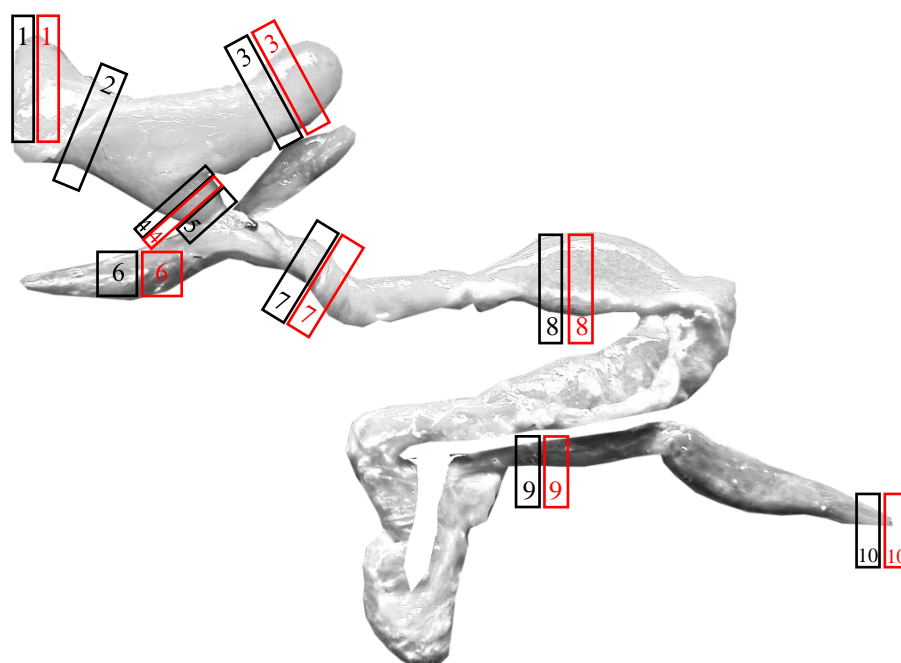
Tablica 2. Uzorci organa koštunjača (oslića i lastavice prasice) uzeti za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja te istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava.

UZORAK	OSLIĆ	LASTAVICA PRASICA
Jednjak		
Prednji dio	X X	X X
Stražnji dio	X -	X -
Želudac		
Prednji dio	X X	X X
Stražnji dio	X X	X X
Pilorički sfinkter	X -	X -
Pilorički nastavci	- -	X X
Crijevo		
Prednji dio	X X	X X
Srednji dio	X X	X X
Stražnji dio	X X	X X
Rektum	X X	X X

X – uzorci uzeti za histološko i histokemijsko istraživanje; X – uzorci uzeti za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava.



Slika 13. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava oslića. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), prednji (6), srednji (7) i stražnji (8) dio crijeva te rektum (9).



Slika 14. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava lastavice prasice. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), pilorički nastavci (6), prednji (7), srednji (8) i stražnji (9) dio crijeva te rektum (10).

Za histološko i histokemijsko istraživanje uzorci organa fiksirani su u otopini 10 %-tnog neutralnog puferiranog formalina pripremljenoj prema SUVARNA i sur. (2019.). Otopina 10 %-tnog neutralnog puferiranog formalina napravljena je miješanjem 900 ml destilirane vode i 100 ml temeljne standardne otopine formalina. Temeljna standardna otopina formalina (pH-vrijednosti 7,0) pripremljena je dodavanjem kiselih i bazičnih komponenta natrijevih fosfata u 37 %-tni formaldehid. Kao kiselna komponenta korišten je natrijev dihidrogen-fosfat-1-hidrat u količini od 4,02 g dok je kao bazična komponenta korišten di-natrijev hidrogenfosfat-dodekahidrat u količini od 16,37 g.

Za istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi, uzorci organa fiksirani su u otopini formol-kalcija tijekom 24 sata na temperaturi od 4 °C. Otopina formol-kalcija pripremljena je miješanjem 150 ml 37 %-tnog formaldehida s 850 ml destilirane vode, uz dodatak 13 g kalcijevog klorida. Nakon 24 sata uzorci su preneseni u ohlađenu otopinu (4 °C) napravljenu od saharoze, arapske gume i destilirane vode (SUVARNA i sur., 2019.). Navedena otopina pripremljena je na magnetnoj miješalici otapanjem 30 g saharoze u 100 ml destilirane vode. Otopini je postupno dodavana arapska guma (do ukupno 1 g) i natrijev azid (u koncentraciji od 0,02 %).

4.4.2.1. Histološko i histokemijsko istraživanje

U ovom radu korištenim histološkim i histokemijskim metodama prikazane su tkivne komponente u organima probavnog sustava hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša) i koštunjača (oslića i lastavice prasice).

Proces pripreme histoloških preparata prilagođen je uvjetima Laboratorija za histologiju, histokemiju i imunohistokemiju (Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju Sveučilište u Zagrebu Veterinarski fakultet) uzimajući u obzir metodologiju iz različitih izvora (BATISTIĆ, 1994.; KOZARIĆ, 1997.; SUVARNA i sur., 2019.).

Procesima dehidracije i bistrenja fiksirano tkivo pripremljeno je za uklop u parafin. Parafin je bezvodni medij koji nije kompatibilan s vodom i s alkoholom. Dehidracija tkiva provedena je postupno, rastućim nizom etilnog alkohola (75 %, 80 %, 96 %, 100 %). U svakoj koncentraciji etilnog alkohola tkivo je bilo uronjeno 24 sata. Nakon dehidracije tkivo je prošlo kroz proces bistrenja koji služi za dealkoholizaciju tkiva prije uklapanja u parafin. U tu svrhu korišten je kloroform. Tkivo je potom uklopljeno korištenjem parafinskog postupka. Održavanje parafina u tekućem obliku postignuto je korištenjem termostata (parafinske peći)

pri temperaturi od 58 °C do 60 °C. Dehidrirano i izbistreno tkivo smješteno je u plastične kazete za uklop koje su zatim stavljene u staklenu posudu smještenu u termostatu. U prvoj posudi tkivo se prožimalo mješavinom parafina i kloroforma u omjeru 50 : 50, a kroz tri iduće samo parafinom. U svakoj posudi tkivo se prožimalo po 30 minuta. Tkivo montirano na dio plastične kazete za uklop utisnuto je u metalne kalupe koji su bili prethodno poprskani Demold - sprejem. Kako bi se parafin vratio u čvrsto stanje, metalni su kalupi držani pri sobnoj temperaturi 24 sata, a potom su pohranjeni u hladnjaku.

Ohlađeni parafinski blokovi izrezani su rotacijskim mikrotomom na debljinu 6 µm. Parafinski rezovi montirani su na adhezivna predmetna stakla. Parafinski tkivni rezovi (u daljnjem tekstu: preparati) izravnan su u vodenoj kupelji. Tkivne komponente u organima probavnog sustava prikazane su putem pet metoda bojenja (hematoksilin-eozinska, Mallory-trikromska, Verhoeff-Van Giesonova, komplet za prikaz retikularnih vlakana i Alcian Blue-PAS komplet). Za prve tri metode bojenja (hematoksilin-eozinska, Mallory-trikromska i Verhoeff-Van Giesonova) deparafinacija je napravljena provođenjem kroz dvije otopine ksilena po 10 minuta, a rehidracija silaznim nizom etilnog alkohola (100 %, 100 %, 96 %, 75 %) do destilirane vode. U svakoj koncentraciji etilnog alkohola preparati su bili uronjeni po 5 minuta. Rehidracija preparata završena je kroz dvije izmjene destilirane vode po 5 minuta. Nakon bojenja preparati su ponovno dehidrirani, koristeći uzlazni niz etilnog alkohola (75 %, 96 %, 100 %, 100 %), a zatim izbistreni u ksilenu. U 75 %-tnoj i 96 %-tnoj koncentraciji etilnog alkohola preparati su uronjeni po 3 minute, u 100 %-tnoj po 5 minuta. Bistrenje se postiglo u dvije izmjene ksilena po 5 minuta. Za metode bojenja koje su rađene gotovim kompletima (komplet za prikaz retikularnih vlakana i Alcian Blue-PAS komplet) procesi deparafinacije i bistrenja provedeni su prema uputama proizvođača te je postupak naveden kod opisa metoda. Dobiveni preparati prekriveni su uklopnim sredstvom Vitro-Clud i poklopljeni pokrovnim staklima za mikroskopiju. Za potrebe opisa mikroskopske građe probavnog sustava izrađeno je i pregledano ukupno 1750 preparata. Preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopima Olympus CX22 (Japan) i Digicyte DX50 (Hrvatska), slikani kamerom Digicyte BigEye (Digicyte, Zagreb, Hrvatska) te su dobivene slike obrađene softverima: Digicyte Capture (Digicyte, Zagreb, Hrvatska), GNU Image Manipulation Program (GIMP; The GIMP Documentation Team, Free Software Foundation, 2.10.34., Boston, USA) i ZEN Microscopy Software (Zeiss Software, Oberkochen, Njemačka).

4.4.2.1.1. Hematoksilin-eozinska metoda bojenja

Hematoksilin-eozinskom metodom bojenja (HE) prikazana je osnovna građa tkiva i organa probavnog sustava riba.

Deparafinirani i rehidrirani rezovi obojeni su rutinskom HE metodom bojenja, a modificiranom prema potrebama Laboratorija za histologiju, histokemiju i imunohistokemiju. Kao priprema za bojenje napravljen je Mayerov kiseli hemalaun i eozin y (AESCHT i sur., 2010.). Mayerov kiseli hemalaun pripremljen je otapanjem 1 g hematoksilina u 1000 ml destilirane vode. Otopini je dodano 0,2 g natrijevog jodata i 50 g aluminijskog klorida i 50 g aluminij-kalij-sulfat-dodekahidrat. Otopina je miješana pri sobnoj temperaturi do promjene boje u plavo-ljubičastu. Otopina je nadopunjena s 50 g kloral-hidrata i 1 g kristalne limunske kiseline te je filtrirana prije upotrebe. Eozin y pripremljen je otapanjem 10 g eosin y u 1000 ml destilirane vode. Otopini je dodano 2 ml ledene octene kiseline. Preparati su obojeni Mayerovim kiselim hemalaunom. Nakon 5 minuta ispirani su u dvije izmjene tekuće vode po 5 minuta, a zatim su bojeni eozinom. Nakon 5 minuta uronjeni su u destiliranu vodu tijekom narednih 5 minuta.

Hemalaun je bazična boja koja bazofilne strukture (kisele) oboji u plavo. Eozin je kisela boja koja acidofilne strukture (bazične) oboji crveno.

4.4.2.1.2. Vezivnotkivna bojenja

Za prikaz komponenti vezivnog tkiva korištene su Mallory-trikromska i Verhoeff-Van Giesonova metoda bojenja te komplet za bojenje retikularnih vlakana.

4.4.2.1.2.1. Mallory-trikromska metoda

Mallory-trikromska metoda bojenja korištena je za prikaz kolagena. Bojenje je provedeno kombinacijom dvije metode (ŠVOB, 1974.; SHEEHAN i HRAPCHAK, 1980.).

Kao priprema za bojenje pripremljena je koncentrirana otopina Zenkerovog fiksativa, otopina 0,5 %-tnog natrijevog tiosulfata, otopina 0,5 %-tnog kiselog fuksina, Anilin Blue-Orange G i Weigartova jodna otopina. Temeljna standardna otopina za Zenkerov fiksativ pripremljena je otapanjem 50 g živinog(II) klorida, 25 g kalijevog dikromata i 10 g natrijevog sulfata u 1000 ml destilirane vode. Neposredno prije upotrebe u 95 ml otopine dodano je 5 ml ledene octene kiseline kako bi spriječila замуćenost i stvaranje tamnosmeđeg precipitata žive.

Vodena otopina natrijevog tiosulfata u koncentraciji od 5 % napravljena je otapanjem 5 g natrijevog tiosulfata u 100 ml destilirane vode. Kiseli fuksin, u koncentraciji od 0,5 %, pripremljen je otapanjem 0,5 g kiselog fuksina u 100 ml destilirane vode. Anilin Blue-Orange G pripremljen je dodavanjem 0,5 g Anilin Blue, 2 g Orange G i 1 g fosfovolframove kiseline u 100 ml destilirane vode. Otopina je pripremljena na magnetnoj miješalici na 100 okretaja u minuti. Weigartova jodna otopina pripremljena je otapanjem 1 g kalijevog jodida u 2 ml destilirane vode. Otopini je dodano 0,5 g joda te je nadopunjena destiliranom vodom do 50 ml.

Deparafinirani i rehidrirani rezovi postfiksirani su Zenkerovim fiksativom tijekom 1 sata i 45 min u termostatu na temperaturi od 37 °C. Preparati su tretirani Weigartovom jodnom otopinom 5 minuta i 0,5 %-tnog natrijevim tiosulfatom 4 minute. Ispirani su u destiliranoj vodi tijekom 18 minuta te tretirani kiselim fuksinom. Nakon 5 minuta premješteni su u Anilin Blue-Orange G otopinu u kojoj su bili uronjeni narednih 30 minuta.

Mallory-trikromska (MT) metoda bojenja korištena je za prikaz kolagena. Kiseli fuksin boji jezgre i mišićno tkivo u crveno. Fosfovolframova kiselina izbacuje molekule kiselog fuksina s kolagenih vlakana te tako omogućava povezivanje Anilin Blue boje. Kao rezultat kolagena vlakna se oboje plavo.

4.4.2.1.2.2. Verhoeff-Van Giesonovo bojenje

Verhoeff-Van Giesonova metoda bojenja korištena je za razlikovanje elastičnih od kolagenih vlakana. Bojenje je provedeno prema SHEEHAN i HRAPCHAK (1980.).

Kao priprema za bojenje napravljena je 5 %-tna temeljna standardna otopina hematoksilina, 10 %-tna vodena otopina željeznog klorida, Weigartova jodna otopina, Verhoeffeova radna otopina, 2 %-tna vodena otopina željeznog klorida, 5 %-tna vodena otopina natrijevog tiosulfata i Van Giesonova otopina. Temeljna standardna otopina 5 %-tnog hematoksilina pripremljena je otapanjem 5 g hematoksilina u 100 ml apsolutnog alkohola uz blago zagrijavanje. Otopina je prije upotrebe filtrirana. Vodena otopina željeznog klorida u koncentraciji od 10 % napravljena je otapanjem 10 g željeznog klorida u 100 ml destilirane vode. Weigartova jodna otopina pripremljena je otapanjem 1 g kalijevog jodida u 2 ml destilirane vode. Nakon što se kalijev jodid, otopio dodano je 0,5 g joda, a nakon što se jod otopio, destilirana voda do 50 ml. Verhoeffeova radna otopina pripremljena je miješanjem 20 ml prethodno pripremljene 5 %-tne temeljne standardne otopine hematoksilina, 8 ml 10 %-tne vodene otopine željeznog klorida i 8 ml Weigartove jodne otopine. Vodena otopina željeznog

klorida u koncentraciji od 2 % napravljena je otapanjem 2 g željeznog klorida u 100 ml destilirane vode. Vodena otopina natrijevog tiosulfata u koncentraciji od 5 % napravljena je otapanjem 5 g natrijevog tiosulfata u 100 ml destilirane vode. Van Giesonova otopina pripremljena je otapanjem 5 ml 1 %-tnog vodenog kiselog fuksina u 100 ml zasićene vodene pikrinske kiseline.

Deparafinirani i rehidrirani rezovi tkiva obojeni su Verhoeffeovom radnom otopinom tijekom 60 minuta. Tako crno obojeni preparati ispirani su u dvije do tri izmjene vodovodne vode. Uslijedio je proces diferencijacije koji je uključivao pomicanje preparata kroz 2 %-tnu otopinu željeznog klorida te ispiranje u nekoliko izmjena vodovodne vode. Preparati su ispirani pod tekućom vodom i nakon toga prebačeni u 5 %-tnu vodenu otopinu natrijevog tiosulfata tijekom naredne minute. Uslijedilo je još jedno ispiranje pod tekućom vodom u trajanju od 5 minuta. Bojenje je završeno primjenom Van Giesonove otopine (kontrastna boja) tijekom 4 minute i ispiranjem u vodovodnoj vodi. Preparati su zatim dehidrirani u rastućim koncentracijama etilnog alkohola, izbistreni u ksilenu i uklopljeni.

Verhoeff-Van Giesonovim (VVG) bojenjem elastična vlakna boje se nijansama od plavoljubičaste do crne boje, kolagen se boji u ružičasto, glatki mišić u oker sivo, a jezgre su plave do crne.

4.4.2.1.2.3. Bojenje retikularnih vlakana

Retikulin-komplet (RK) od devet reagensa za dokazivanje retikularnih vlakna korišten je prema uputama proizvođača. Deparafinacija je napravljena provođenjem kroz tri izmjene ksilena u trajanju od 2 minute, a rehidracija etilnim alkoholom u koncentracijama od 100 % i 95 %. U dvije izmjene 100 %-tnog etilnog alkohola preparati su bili uronjeni po 5 i 3 minute, a u 96 %-tnom 2 minute. Rehidracija je završena u destiliranoj vodi gdje su uronjeni tijekom 2 minute. Na njih je potom nakapano po 5 kapi 0,5 %-tne otopine kalijevog permanganata i 5 kapi 3 %-tne otopine sumporne kiseline. Nakon 5 minuta višak reagensa ispran je u destiliranoj vodi. Nakapano je 5 kapi 1 %-tne otopine oksalne kiseline tijekom 1 minute te je višak reagensa dvaput ispran u destiliranoj vodi. Otopina amonij-željezo-sulfata nakapana je u količini od 5 kapi tijekom 5 minuta te je višak reagensa dvaput ispran u destiliranoj vodi. Nakapano je 5 kapi srebro-amonijeve otopine te je nakon 3 minute višak reagensa ispran u destiliranoj vodi. Nakapano je 5 kapi 4 %-tne alkoholne otopine formaldehida te je nakon 5 minuta višak reagensa dvaput ispran u destiliranoj vodi. Nakapano je 5 kapi 5 %-tne otopine natrijevog

tiosulfata. Nakon 5 minuta višak reagensa ispran je u tekućoj vodi tijekom 5 minuta. Provedena je dehidracija 70 %-tnim i 95 %-tnim etilnim alkoholom (5 urona u svaki) i 100 %-tnim alkoholom tijekom 2 minute. Preparati su izbistreni u dvije izmjene ksilena po 2 minute.

Princip kompleta temelji se na taloženju srebra na retikularna vlakna. Ovim kompletom retikularna se vlakna boje u tamnoljubičastu do crnu boju, kolagena vlakna u žućkastosmeđu, a vezivno tkivo i eritrociti u smeđu boju.

4.4.2.1.3. Alcian Blue – perijodna kiselina, Schiffova reakcija

Alcian Blue – perijodna kiselina, Schiffova reakcija (AB PAS) komplet je koji sadrži sedam reagensa za diferencijaciju neutralnih od kiselih mucina. Komplet je korišten prema uputama proizvođača. Deparafinacija preparata napravljena je provođenjem kroz tri izmjene ksilena u trajanju od 2 minute, a rehidracija etilnim alkoholom u koncentracijama od 100 % i 95 %. U dvije izmjene 100 %-tnog etilnog alkohola preparati su uronjeni tijekom 5 i 3 minute, a u 96 % 2 minute. Rehidracija je završena u destiliranoj vodi gdje su uronjeni tijekom 2 minute. Deparafinacija je napravljena kroz tri izmjene ksilena u trajanju od 2 minute, a rehidracija etilnim alkoholom u koncentracijama od 100 % i 95 %. U dvije izmjene 100 %-tnog etilnog alkohola preparati su bili uronjeni po 5 i 3 minute, a u 96 %-tnom 2 minute. Dodatna rehidracija napravljena je u destiliranoj vodi tijekom 2 minute. U AB otopinu (pH-vrijednosti 2,5) preparati su uronjeni 30 minuta te su zatim bez ispiranja uronjeni u otopinu natrijevog tetraborata. Nakon 10 minuta ispiran je višak reagensa u hladnoj tekućoj vodi tijekom 5 minuta te u destiliranoj vodi tijekom 2 minute. Preparati su uronjeni u 0,8 % otopinu perijodne kiseline. Nakon 8 minuta višak reagensa uklonjen je ispiranjem pod tekućom vodom tijekom 3 minute te dodatnim ispiranjem u destiliranoj vodi. Preparati su uronjeni u BioSchiffov reagens. U međuvremenu je pripremljena sulfitna otopina miješanjem 10 ml natrijevog metabisulfita i 10 ml klorovodičnog reagensa, PAS. Otopini je dodano još 200 ml vodovodne vode. Nakon 13 minuta preparati su bez ispiranja uronjeni u sulfitnu otopinu i to u tri izmjene u trajanju od 2 minute. Višak reagensa ispiran je tekućom vodom tijekom 3 minute. Preparati su uronjeni u Hematoksilin ML-a. Nakon 2 minute višak reagensa ispiran je u tekućoj vodi tijekom 3 minute. Provedena je dehidracija 70 %-tnim i 95 %-tnim etilnim alkoholom (5 urona u svaki) i 100 %-tnim alkoholom tijekom 2 minute. Preparati su izbistreni u dvije izmjene ksilena po 2 minute.

AB boja (pH-vrijednosti 2,5) boji plavo (AB + PAS -) kisele mucine koji postaju netopivi i otporni na preostale reagense PAS postupka bojenja. Oksidirajuće djelovanje periodne kiseline u kombinaciji s BioSchiffovim reagensom omogućuje karakteristično purpurno (magenta) obojenje (AB - PAS +) neutralnih mucina, glikogena i glikoproteina. Mucini koji sadrže i kisele i neutralne mucine oboje se u plavoljubičastu do ljubičastu boju (AB + PAS +).

4.4.2.2. Istraživanje lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi

U ovom radu za prikaz lokalizacije i enzimske aktivnosti u probavnoj cijevi korištene su azotehnike bojenja. Azo-tehnike su precipitacijske tehnike u kojima se simultano apliciraju i supstrat i diazonijeva sol (azo-boja) uz inkubaciju. Tijekom inkubacije odvijaju se dvije reakcije. U prvoj reakciji nastaje primarni produkt reakcije koji je neobojen. Zatim, u drugoj reakciji diazonijeva sol reagira s primarnim produktom te nastaje završni produkt reakcije koji je obojen. Ova boja omogućava vizualizaciju enzimske aktivnosti pod mikroskopom, prikazujući lokalizaciju i intenzitet aktivnosti enzima.

Fiksirani uzorci organa probavne cijevi zamrznuti su na metalnim pločicama unutar kriostata uz pomoć gela Cryofix. Nakon zamrzavanja uzorci su rezani na debljinu od 8 µm te su rezovi montirani na adhezivna predmetna stakla (u daljnjem tekstu: preparati). Za detekciju alkalne fosfataze reagensi su pripremljeni prema LOJDA (1979.). Za detekciju kisele fosfataze i nespecifične esteraze primjenjena je metodologija koju predlaže PEARSE (1968.). Za detekciju aminopeptidaze reagensi su pripremljeni prema SHEEHAN i HRAPCHAK (1980.). Pripremljene su i negativne kontrole bez supstrata.

Pripremljeni preparati za demonstraciju lokalizacije i aktivnosti alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esteraze zahtijevaju uklapanje u medij topljiv u vodi, stoga su prekriveni uklopnim sredstvom BioMount Aqua. Preparati za demonstraciju lokalizacije i aktivnosti aminopeptidaze zahtijevaju uklapanje u medij netopljiv u vodi stoga su nakon dehidracije prekriveni uklopnim sredstvom Vitro-Clud. Lokalizacija svih četiriju enzima utvrđena je kod svake ribe po pojedinim dijelovima probavne cijevi i izražena kao negativna (nema reakcije – odsutnost enzima) ili kao pozitivna (vidljiva reakcija – prisutnost enzima). Za potrebe opisa lokalizacije i mjerenja enzimske aktivnosti probavnog sustava izrađeno je i pregledano ukupno 1080 preparata. Preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopima Olympus CX22 (Japan) i Digicyte DX50 (Hrvatska), slikani kamerom Digicyte BigEye

(Digicyte, Zagreb, Hrvatska) te su dobivene slike obrađene softverima: Digicyte Capture (Digicyte, Zagreb, Hrvatska), GIMP (The GIMP Documentation Team, Free Software Foundation, 2.10.34., Boston, USA) i ZEN Microscopy Software (LSM 700, Zeiss Software, Oberkochen, Njemačka).

4.4.2.2.1. Alkalna fosfataza (E. C. 3.1.3.1.)

Kao pripremu za reakciju napravljena je 0,2 M temeljna standardna otopina za izradu pufera. Otopina je napravljena otapanjem 2,422 g TRIS-a u 100 ml destilirane vode. Temeljno standardnoj otopini u količini od 25 ml dodano je 5,1 ml 0,1 N klorovodične kiseline i destilirane vode do ukupno 100 ml. Uz miješanje na magnetnoj miješalici dodavanjem klorovodične kiseline pH-vrijednost pufera korigirana je na 8,7. Kao supstrat za dokaz alkalne fosfataze korišten je naftol-AS-MX-fosfat-dinatrijeva sol. Pripremljena je otopina od 2 mg supstrata, 12 mg Fast Blue BB soli i 10 ml pufera. Otopina je filtrirana te potom aplicirana na preparate. Inkubacija je provedena tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Mjesta enzimske aktivnosti obojena su u plavu boju.

4.4.2.2.2. Kisela fosfataza (E. C. 3.1.3.2.)

Kao pripremu za reakciju napravljena je 0,2 M temeljna standardna otopina za izradu pufera. Otopina je napravljena otapanjem 3,282 g natrijevog acetata (bezvodnog) u 200 ml destilirane vode. Temeljno standardnoj otopini u količini od 158 ml dodano je 42 ml octene kiseline. Uz miješanje na magnetnoj miješalici dodavanjem octene kiseline pH-vrijednost pufera korigirana je na 5,2. Kao supstrat za dokaz kisele fosfataze korišten je naftol-AS-TR-fosfat-dinatrijeva sol. Pripremljena je otopina od 2 g supstrata (otopljenog u 2 kapi N, N-dimetilformamida), 13 mg Fast Red Violet LB soli, 10 ml pufera i 1 kapi 10 %-tnog manganovog(II) klorid-tetrahidrata. Otopina je filtrirana te potom aplicirana na preparate. Inkubacija je provedena tijekom 60 minuta na sobnoj temperaturi. Mjesta enzimske aktivnosti obojena su u ružičastu boju.

4.4.2.2.3. Nespecifična esteraza (E. C. 3.1.1.)

Kao pripremu za reakciju napravljena je 0,2 M temeljna standardna otopina za izradu pufera. Otopina je napravljena otapanjem 2,4228 g TRIS-a u 100 ml destilirane vode. Temeljnoj standardnoj otopini u količini od 25 ml dodano je 45 ml 0,1 N klorovodične kiseline i destilirane vode do ukupno 100 ml. Dodavanjem klorovodične kiseline pH-vrijednost pufera korigirana je na 7,2. Kao supstrat za dokaz nespecifične esteraze korišten je naftol-AS-acetat. Pripremljena je otopina od 3 mg supstrata (otopljenog u 2 kapi N, N-dimetilformamida), 12 mg Fast Blue BB soli i 10 ml pufera. Otopina je filtrirana te potom aplicirana na preparate. Inkubacija je provedena tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Mjesta enzimske aktivnosti obojena su u plavu boju.

4.4.2.2.4. Aminopeptidaza (E. C. 3.4.11.)

Kao priprema za reakciju napravljena je 0,1 M temeljna standardna otopina za izradu pufera. Otopina je napravljena otapanjem 158 ml natrijevog acetata u 42 ml octene kiseline. Dodavanjem octene kiseline pH-vrijednost pufera korigirana je na 6,5. Kao supstrat za dokaz aminopeptidaze korišten je L-leucil-4-metoksi-2-naftil-amid-hidroklorid. Pripremljena je otopina od 1 ml supstrata, 2,5 ml destilirane vode i 2,5 ml pufera, 3,5 ml 0,85 %-tnog natrijevog klorida, 0,5 ml kalijevog cijanida i 5 mg Fast Blue B soli. Otopina je filtrirana te potom aplicirana na preparate. Inkubacija je provedena tijekom 60 min na temperaturi od 37 °C. Preparati su zatim dehidrirani uzlaznim nizom etilnog alkohola (75 %, 96 %, 100 %, 100 %). U 75 %-tnoj, 96 %-tnoj koncentraciji etilnog alkohola preparati su uronjeni po 3 minute, a u 100 %-tnoj po 5 minuta. Preparati su zatim izbistreni u dvije izmjene ksilena po 5 minuta i prekriveni uklopnim sredstvom Vitro-Clud. Mjesta enzimske aktivnosti obojena su u crvenu boju.

4.4.3. Mjerenje optičke gustoće enzima

Za potrebe mjerenja optičke gustoće (OG) enzima preparati su analizirani svjetlosnim mikroskopom Nikon – Microphot – FXA (Nikon, Tokyo, Japan), slikani kamerom GXCAM – U3 – 18 (GT Vision, Suffolk, UK) u programu GXCapture – T (GT Vision, Suffolk, UK).

Za svaki enzim za koji je reakcija vidljiva (ovisno o vrsti ribe i lokalizaciji u probavnoj cijevi) utvrđena je OG enzima softverom *ImageJ* (USA National Institutes of Health, MD, USA, www.imagej.net). Prije mjerenja napravljena je kalibracija tako da je kalibriranom predlošku programa (step_tablet_epson_8bit.tif) izmjerena srednja vrijednost sive boje za prvih 19 polja. Pod *Analyze/Calibrate* unesene su dobivene vrijednosti sive boje i OG. Odabrana je funkcija *Roadbard*, upisan OD (engl. *optical density*) u jedinicu mjerenja te odabrana opcija *Global Calibration*. Prije mjerenja optičke gustoće enzima boje na slikama su pretvorene u nijanse sive (8 bit). S obzirom na istraživanje povezanosti enzima s procesom probave, izmjeri su napravljeni na reakcijama pronađenim u pokrovnom epitelu i lamini propriji. Na preparatima na kojima lamina muskularis mukoze nije identificirana, izmjeri su napravljeni u sloju vezivnog tkiva do epitela. OG enzima izmjerena je na slikama dobivenim pomoću objektiva povećanja 10 x. Mjerenje je provedeno u svim istraživanim dijelovima probavne cijevi u 10 jedinki svake vrste riba. U svakom dijelu probavne cijevi, gdje je pronađena pozitivna reakcija, izmjeri su napravljeni na pet nasumično odabranih polja pozitivne reakcije. Jedno polje bilo je dimenzija 10,11 px × 3,96 px odnosno ukupne površine 39,995 px. Svi brojevi dobiveni programom su relativni. Zbog dimenzija polja, rijetke reakcije i reakcije pronađene ponegdje opisane su samo deskriptivno.

4.4.4. Statistička obrada podataka

Varijable – relativna dužina crijeva i srednja optička gustoća (SOG) enzima – analizirane su deskriptivnom statističkom obradom. Svi rezultati iskazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($\bar{X} \pm SD$). Testiranje normalnosti raspodjele podataka za SOG po skupinama provedeno je Shapiro-Wilkovim testom.

Prvo je testirana značajnost razlika u SOG alkalne fosfataze, kisele fosfataze, aminopeptidaze i nespecifične esteraze između istih histoloških slojeva u različitim dijelovima probavne cijevi unutar iste vrste riba. Potom je analizirano postoje li statistički značajne razlike u SOG enzima na istim dijelovima probavne cijevi između različitih histoloških slojeva. S obzirom na to da podatci nisu bili normalno raspodijeljeni, razlike između dviju skupina testirane su Mann-Whitneyevim U-testom dok je Kruskal-Wallisova analiza varijance korištena ako je broj skupina bio tri i više.

Nakon toga je analizirano postoje li statistički značajne razlike u SOG unutar istog dijela probavnog trakta i istog histološkog sloja u različitim vrsta riba. Ako je razlika testirana

između dvije vrste, korišten je Studentov t-test dok je za usporedbu više od dvije vrste riba korištena jednosmjerna ANOVA.

Varijabilnost u SOG unutar istog dijela probavnog trakta i istog histološkog sloja u različitim vrsta riba prikazana je kutijastim dijagramima koji obuhvaćaju prikaz aritmetičke sredine, standardne devijacije te minimalne i maksimalne vrijednosti bez izdvojenica.

Sve razlike smatrane su statistički značajnima ako je $P < 0,05$. Za unos, prikaz, analizu i tumačenje podataka korišten je statistički program Statistica v.14.0.0.15 (Statistica, Inc., 2020).

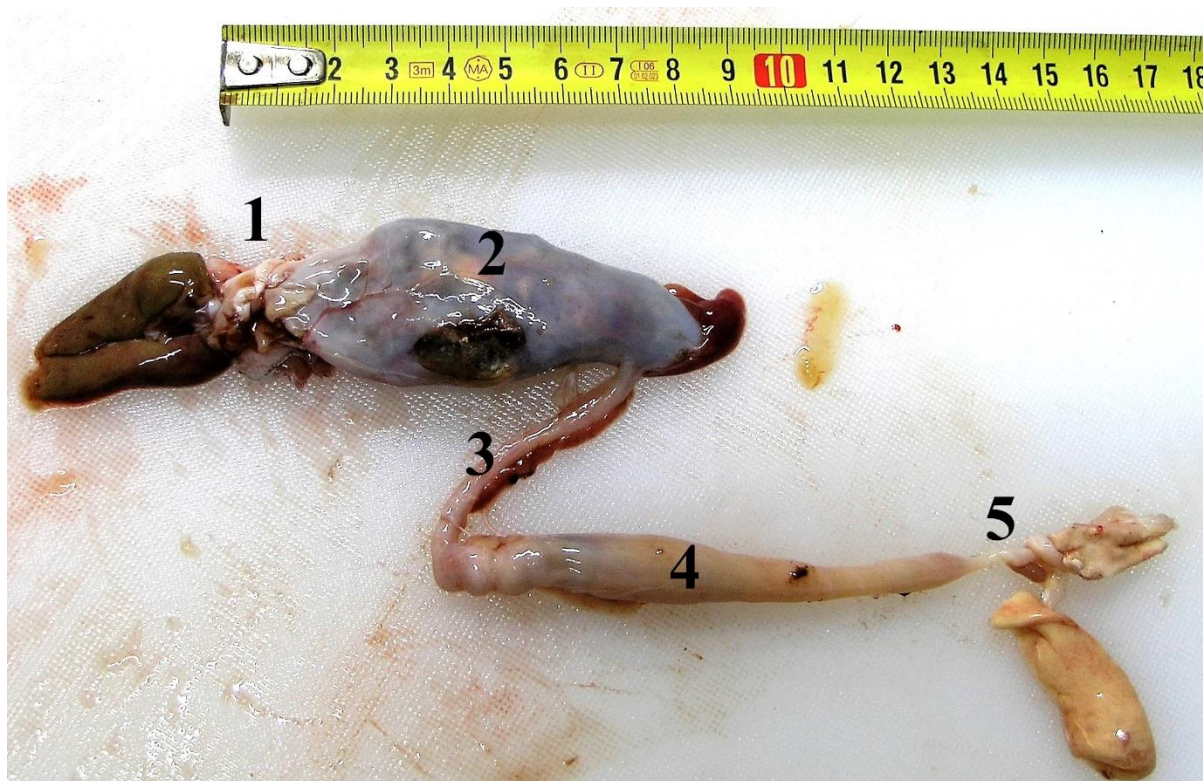
5. REZULTATI

5.1. Rezultati makroskopskog istraživanja probavnog sustava hrskavičnjača

Masa tijela mačke bljedice i psa mekaša, kao i ukupna dužina tijela (UD), dužina crijeva (DC) i relativna dužina crijeva (RDC) prikazane su u Tablici 3.

5.1.1. Makroskopska građa probavnog sustava mačke bljedice

Probavni sustav mačke bljedice prikazan je na Slici 15. Jednjak mačke bljedice kratak je i ravan. Sluznica mu tvori uzdužne nabore koji teku prema želucu. Želudac je sifonskog oblika te se sastoji od dva dijela. Na prednjem dijelu želuca razlikuje se kratki ascedentni dio koji se zatim spušta te završava kratkim slijepim dijelom. Širokog je lumena. Nakon kratkog slijepog dijela želudac prelazi u descedentni stražnji dio koji je usmjeren kranijalno. Za razliku od prednjeg dijela stražnji dio želuca uskog je lumena i završava mišićnim piloričkim sfinkterom. Dužina prednjeg i stražnjeg dijela želuca približno je jednaka. Osim piloričkim sfinkterom izlaz želuca u crijevo karakterizira krivina koja doseže kranijalno do neposredno nakon ulaza jednjaka u prednji dio želuca. Crijevo je u mačke bljedice kratko. Prednji dio crijeva mačke bljedice vrlo je kratak te obuhvaća područje od kaudalnog kraja piloričkog sfinkera do prve pregrade spiralnog crijeva. Spiralno crijevo u sebi nosi brojne nabore (zaliske, pregrade, spirale) stožastog oblika. Prijelaz spiralnog dijela crijeva u rektum karakterizira smanjenje lumena i zadebljanje mišićnih slojeva. Rektum je kratak te završava kloakom nakon ulaska izvodnog kanala rektalne žlijezde.



Slika 15. Probavni sustav mačke bljedice. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, spiralno crijevo (4) i rektum (5).

5.1.2. Makroskopska građa probavnog sustava psa mekaša

Na Slici 16 označeni su dijelovi probavnog sustava psa mekaša. Jednjak psa mekaša kratak je i ravan. Sluznica mu tvori uzdužne nabore koji teku prema želucu. Na jednjaku nisu pronađena stožasta uzdignuća sluznice opisana u nekih vrsta morskih pasa. Želudac je sifonskog oblika te se sastoji od dva dijela. Prednji dio želuca nastavlja se u ravnini jednjaka te završava vrlo kratkim slijepim dijelom. Širokog je lumena. Zatim želudac prelazi u silazni stražnji dio koji je usmjeren kranijalno. Za razliku od prednjeg dijela stražnji dio želuca uskog je lumena i završava mišićnim piloričkim sfinkterom koji doseže kranijalno do prednje trećine želuca. Crijevo je u psa mekaša kratko. Njegov prednji dio crijeva vrlo je kratak te obuhvaća područje od kaudalnog kraja piloričkog sfinkera do prvog nabora spiralnog crijeva. Spiralno crijevo u sebi nosi brojne nabore (zaliske, spirale) stožastog oblika. Prijelaz spiralnog dijela crijeva u rektum karakterizira smanjenje lumena i zadebljanje mišićnih slojeva. Rektum je kratak te završava, nakon utoka izvodnog kanala rektalne žlijezde, kloakom.



Slika 16. Probavni sustav psa mekaša. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, spiralno crijevo (4) i rektum (5).

Tablica 3. Morfometrijsko istraživanje probavnog sustava hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša).

Vrsta ribe	N	masa (g)	UD (cm)	DC (cm)	RDC
Mačka bljedica	30	160,46 ± 68,61	37,05 ± 4,74	9,75 ± 2,01	0,26 ± 0,03
Pas mekaš	29*	2129,31 ± 1136,85	88,40 ± 14,34	24,59 ± 4,55	0,28 ± 0,04

Svi rezultati iskazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($\bar{X} \pm SD$). N – broj riba UD – ukupna dužina tijela ribe; DC – dužina crijeva; RDC – relativna dužina crijeva.

* mjerenja i izračuni temelje se na 29 pasa mekaša

5.2. Rezultati makroskopskog istraživanja probavnog sustava koštunjača

Masa tijela oslića i lastavice prasice, kao i ukupna dužina tijela (UD), dužina crijeva (DC) i relativna dužina crijeva (RDC) prikazane su u Tablici 4.

5.2.1. Makroskopska građa probavnog sustava oslića

Probavni sustav oslića prikazan je na Slici 17. Jednjak oslića kratak je i ravan. Sluznica mu tvori uzdužne nabore koji teku prema želucu. Želudac je oblika slova Y te se sastoji od dva dijela. Prednji dio želuca ubrzo se spaja sa stražnjim dijelom te se izdužuju u dugačku slijepu vreću. Za razliku od prednjeg dijela stražnji dio želuca je kratak, uskog lumena te završava mišićnim piloričkim sfinkterom u visini ulaza jednjaka u želudac. Crijevo je u oslića dugačko te tvori nekoliko zavoja. S obzirom na izgled stijenke može se podijeliti na prednji, srednji i stražnji dio. Prednji dio crijeva nastavlja se u srednji dio koji ima evidentno tanju stijenku i širi lumen u odnosu na prednji. Srednji dio crijeva ujedno je i najduži te oblikuje nekoliko zavoja unutar tjelesne šupljine. Prijelaz srednjeg u stražnji dio crijeva očituje se smanjenjem lumena i zadebljanjem stijenke. Stražnji dio crijeva nastavlja se u rektum čija je stijenka pigmentirana.



Slika 17. Probavni sustav oslića. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, prednji (4), srednji (5) i stražnji (6) dio crijeva te rektum (7).

5.2.2. Makroskopska građa probavnog sustava lastavice prasice

Probavni sustav lastavice prasice prikazan je na Slici 18. Jednjak lastavice prasice kratak je i ravan. Sluznica mu tvori uzdužne nabore koji teku prema želucu. Želudac je oblika slova Y te se sastoji od dva dijela. Prednji dio želuca ubrzo se spaja sa stražnjim dijelom te se izdužuju u dugačku slijepu vreću. Za razliku od prednjeg dijela stražnji dio želuca je kratak, uskog lumena te završava mišićnim piloričkim sfinkterom u visini ulaza jednjaka u želudac. Crijevo je u lastavice prasice dugačko te tvori nekoliko zavoja. S obzirom na izgled stijenke može se podijeliti na prednji, srednji i stražnji dio. U prednji dio crijeva spaja se po nekoliko piloričkih nastavaka (četiri sa svake strane). Prednji dio crijeva nastavlja se u srednji dio koji ima vidljivo tanju stijenku i širi lumen u odnosu na njega. Srednji dio crijeva ujedno je i najduži te oblikuje nekoliko zavoja unutar tjelesne šupljine. Prije prvog zavoja crijevo ide prema stražnjem dijelu ribe, zatim zavija kranijalno pa opet radi zavoja prema stražnjem dijelu crijeva. Prijelaz srednjeg u stražnji dio očituje se smanjenjem lumena. Stražnji dio crijeva nastavlja se u rektum.



Slika 18. Probavni sustav lastavice prasice. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, pilorički nastavci (4), prednji (5), srednji (6) i stražnji (7) dio crijeva te rektum (8).

Tablica 4. Morfometrijsko istraživanje probavnog sustava koštunjača (oslića i lastavice prasice).

Vrsta ribe	N	masa (g)	UD (cm)	DC (cm)	UD:DC
Oslić	30	470,37 ± 627,50	35,81 ± 11,44	15,06 ± 4,48	0,433 ± 0,16
Lastavica prasica	30	703,83 ± 364,12	42,18 ± 7,15	37,15 ± 8,27	0,88 ± 0,13

Svi rezultati iskazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija ($\bar{X} \pm SD$). N – broj riba UD – ukupna dužina tijela ribe; DC – dužina crijeva; RDC – relativna dužina crijeva.

5.3. Mikroskopska građa dijelova probavnog sustava hrskavičnjača

Stijenka probavne cijevi mačke bljedice i psa mekaša sastoji se od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja i adventicije ili seroze. Histologija jednjaka različita je s obzirom na prisutnost Leydigovog organa u podsluznici. U jednjaku su uočeni svi slojevi probavne cijevi s iznimkom muskularis mukoze koja je u mačke bljedice prisutna samo u obliku izoliranih glatkih mišićnih stanica dok u psa mekaša nije razvijena. U želucu istraženih hrskavičnjača uočeni su svi slojevi probavne cijevi. U prednjem dijelu želuca pokrovni epitel utiskuje se u laminu propriju čineći želučane jamice. Želučane jamice vidljive su kao plitke udubine te čine otvore želučanih žlijezda. U stražnjem dijelu žlijezde su mukoznog tipa. S obzirom na to da je izvodni kanal žučovoda na nekoliko preparata utvrđen na dijelu crijeva gdje već započinje spiralni nabor, prednji dio crijeva teško je razgraničiti od spiralnog crijeva, stoga će rezultati biti prikazani kao opis građe spiralnog crijeva. U stijenci crijeva uočeni su svi slojevi probavne cijevi s iznimkom da se mišićni sloj sastoji samo od kružno poredanih mišićnih stanica. Spiralni nabor crijeva sastoji se od sluznice i podsluznice. U stijenci rektuma muskularis mukoze nije diferencirana. Seroza svih dijelova probavne cijevi građena je od vezivnog tkiva i mezotela. Unutar vezivnog tkiva seroze diferencirana su kolagena, retikularna i elastična vlakna.

5.3.1. Mikroskopska građa probavnog sustava mačke bljedice

5.3.1.1. Jednjak

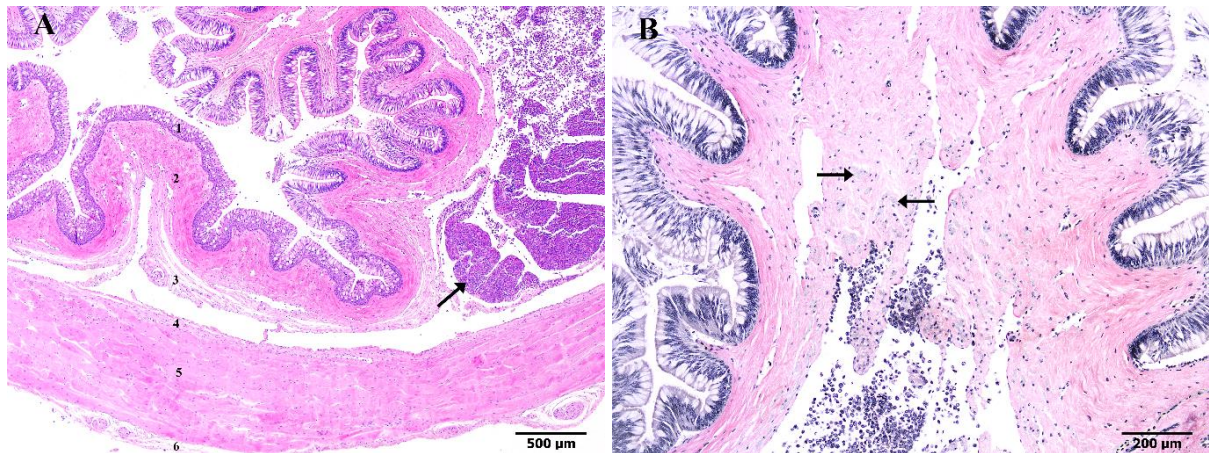
5.3.1.1.1. Mikroskopska građa dijela jednjaka s Leydigovim organom

Slojevi jednjaka mačke bljedice označeni su na Slici 19A. Sluznicu jednjaka ispod Leydigovog organa oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog s izdancima na površini stanica (Slika 20A). Između epitelnih stanica smještene su AB + PAS - jednostanične mukozne žlijezde. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. PAS + bazalna membrana odvaja epitel od vezivnog tkiva. Na epitel se nastavlja sloj vezivnog tkiva za koji je za pretpostaviti da predstavlja laminu propriju. Ostatak lamine proprije građen je dominantno od kolagena unutar kojeg je diferenciran manji broj elastičnih vlakana i glatke mišićne stanice. Glatke mišićne stanice predstavljaju muskularis mukoze koja je u jednjaku mačke bljedice prisutna samo u obliku izoliranih glatkih mišićnih stanica (Slika 19B). Leydigov organ ispunjava podsluznicu dijela jednjaka te je omeđen tankim slojem vezivnog tkiva (Slika 19A). Mišićni sloj jednjaka sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja. Unutrašnji mišićni sloj građen je od glatkih mišićnih stanica koje teku kružno u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. Vanjski mišićni sloj građen je od poprečno ispruganih mišićnih vlakna koja teku kružno u odnosu uzdužnu os probavne cijevi. Oko mišićnih stanica i vlakana prisutan je endomizij. Endomizij, kao i vezivno tkivo između unutrašnjeg i vanjskog mišićnog sloja građeni su od kolagenih, elastičnih i retikularnih vlakana. Na pregledanim preparatima jednjaka mačke bljedice vanjska površina jednjaka prekrivena je dobro prokrvljenom adventicijom građenom od vezivnog tkiva. Unutar vezivnog tkiva diferencirana su kolagena i elastična vlakna.

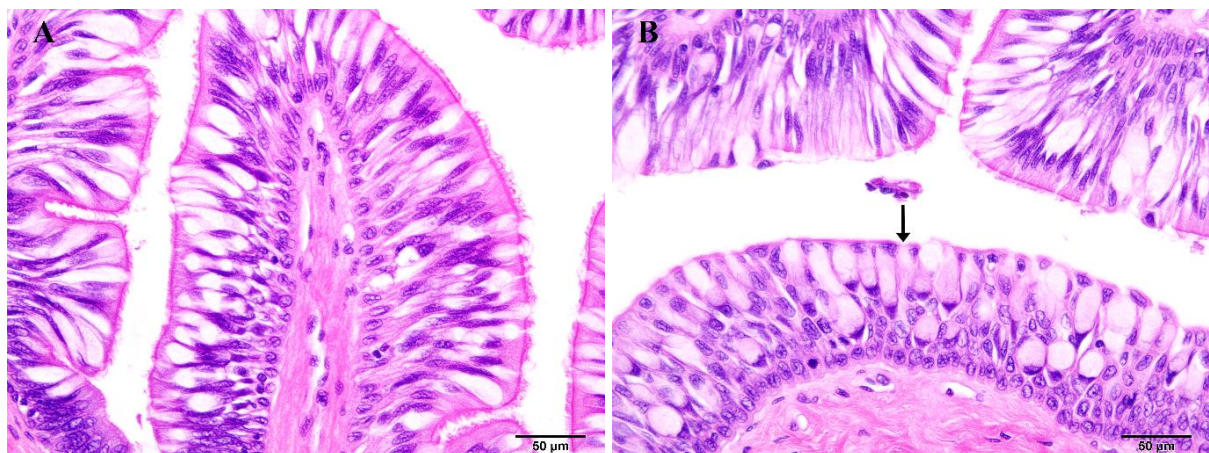
5.3.1.1.2. Histologija dijela jednjaka bez Leydigovog organa

Slojevi jednjaka označeni su na Slici 19A. U dijelovima jednjaka u kojima Leydigov organ nije prisutan, sluznicu jednjaka oblaže mnogoslojni kubični neoroženi epitel (Slika 20B). Između epitelnih stanica uklopljene su većinom AB - PAS + i AB + PAS + te manjim dijelom AB + PAS - jednostanične mukozne žlijezde. Ispod epitela vidljiva je PAS + bazalna

membrana. Lamina proprija građom je slična onoj u dijelu jednjaka s Leydigovim organom s tim da je uočen nešto veći broj retikularnih vlakana. Muskularis mukoze nije razvijena. Podsluznica je građena od rahlijeg vezivnog tkiva u odnosu na laminu propriju. Mišićni sloj i adventicija građeni su jednako kao u dijelu jednjaka s Leydigovim organom.



Slika 19. Histologija jednjaka mačke bljedice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi jednjaka: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj i adventicija (6) te je strelicom označen Leydigov organ (HE). Na Slici B strelicama su označene glatke mišićne stanice (VVG).

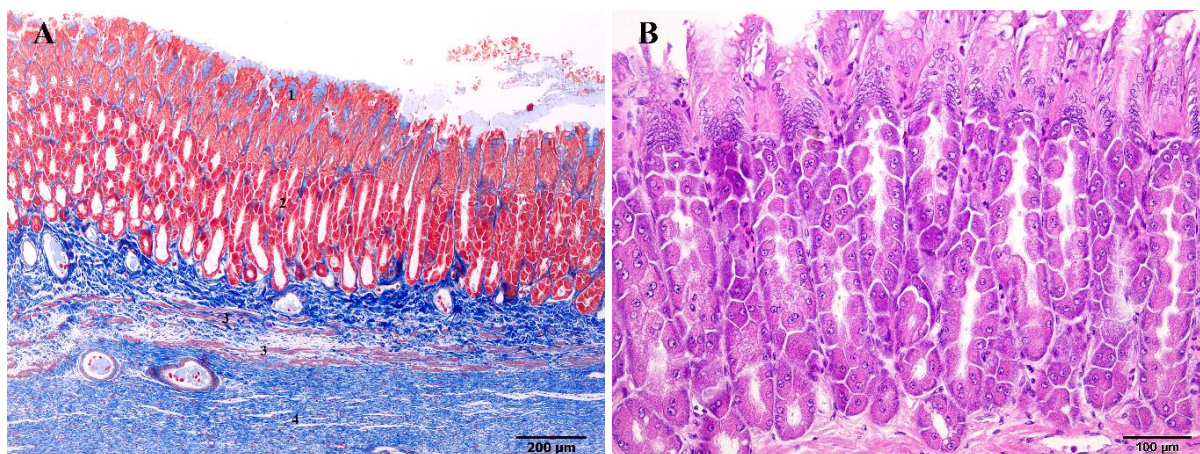


Slika 20. Epitel jednjaka mačke bljedice (A i B). Na Slici A prikazan je pokrovni epitel u dijelu s Leydigovim organom (HE). Na Slici B strelicom je prikazan pokrovni epitel u dijelu bez Leydigovog organa (HE).

5.3.1.2. Želudac

5.3.1.2.1. Prednji dio želuca

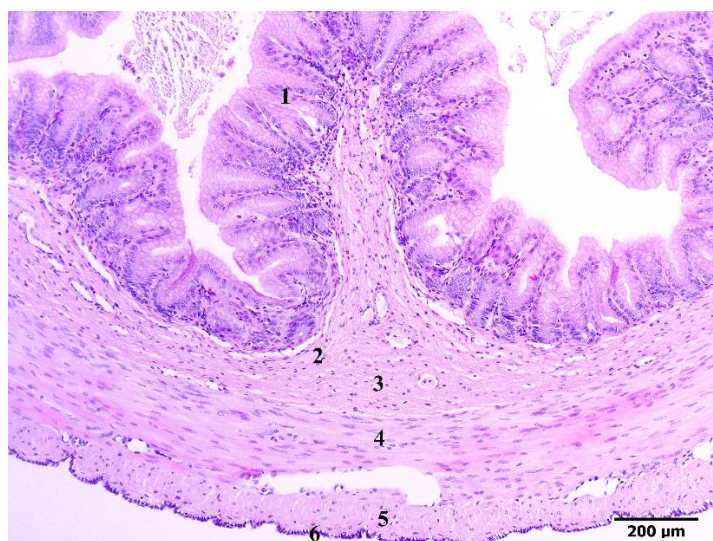
Sluznicu prednjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima (Slika 21A i 21B). Apikalni dio epitelnih stanica sadrži proširenja ispunjena mukoznim AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + sekretom. Ispod epitela vidljiva je PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od kolagena s dodatno diferenciranim retikularnim vlaknima u dijelu vezivnog tkiva između žlijezda. Želučane žlijezde sastavljene su od jednog tipa žljezdanih stanica. Bazalni dio stanica bazofilno je obojen dok je ostatak citoplazme eozinofilan i ispunjen brojnim granulama (Slika 21B). Jezgre žljezdanih stanica su svijetle, okrugle i smještene u sredini. Na ponekim mjestima stanice su binuklearne. Ispod žlijezda nalazi se tkivo lamine proprije građeno dominantno od kolagenih vlakna. Muskularis mukoze građena je od glatkih mišićnih stanica. Podsluznica želuca građena je od kolagenih vlakana te su u njoj prisutni elementi krvožilnog sustava. Mišićni sloj želuca sastoji se od debljeg unutrašnjeg kružnog i tanjeg vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između glatkih mišićnih stanica nalazi se mreža kolagenih vlakana unutar koje su dodatno diferencirana retikularna i elastična vlakna. Vanjska površina želuca prekrivena je serozom.



Slika 21. Histologija prednjeg dijela želuca mačke bljedice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (MT). Na Slici B prikazane su želučane žlijezde (HE).

5.3.1.2.2. Stražnji dio želuca

Građa stražnjeg dijela želuca prikazana je na Slici 22. Sluznicu stražnjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Apikalni dio epitelnih stanica sadrži proširenja ispunjena AB + PAS - i AB + PAS + mukoznim sekretom. Epitel se nastavlja u tubulusne mukozne žlijezde. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od vezivnog tkiva odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od vezivnog tkiva. Muskularis mukoze građom je jednaka kao u prednjem dijelu s tim da je u stražnjem dijelu deblja. Podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela građom su slični navedenim slojevima u prednjem dijelu želuca. U dijelu piloričkog sfinktera proprija i muskularis mukoze nisu razvijene. Na navedenom dijelu preparata dominira vezivno tkivo između kojeg su uklopljene glatke mišićne stanice koje se vide u različitim presjecima. Mišićni su slojevi izrazito zadebljali.

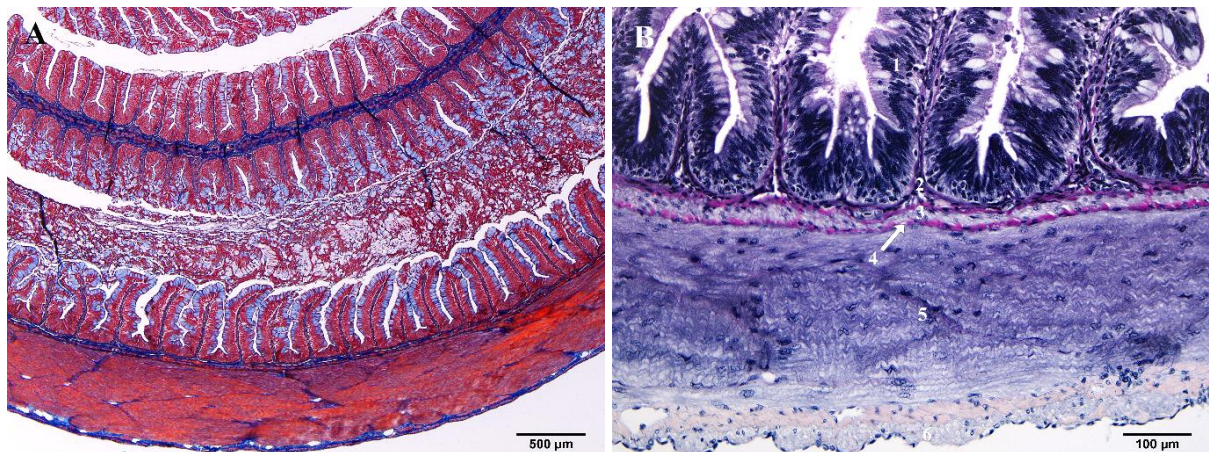


Slika 22. Histologija stražnjeg dijela želuca mačke bljedice. Na Slici su označeni dijelovi: pokrovni epitel koji se utiskuje u laminu propriju (1), muskularis mukoze (2), podsluznica (3) unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj i seroza (6) (HE).

5.3.1.3. Spiralno crijevo

Slojevi spiralnog crijeva mačke bljedice označeni su na Slici 23B. Sluznicu spiralnog crijeva oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Između epitelnih stanica smještene su vrčaste stanice s AB + PAS -, AB + PAS + te AB - PAS + sekretom. Neposredno

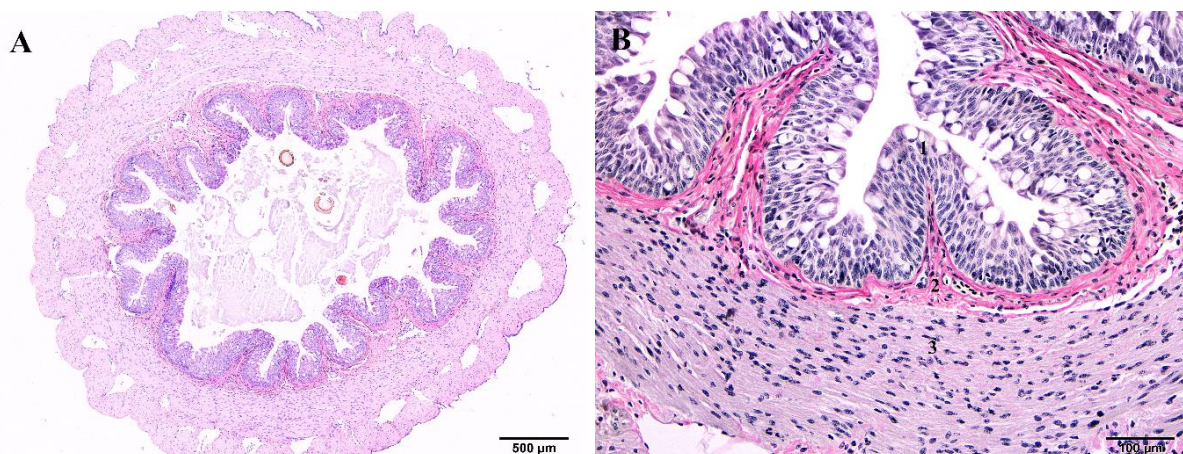
ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva. Muskularis mukoze građena je od glatkih mišićnih stanica. Podsluznica je građena od gušćeg vezivnog tkiva. Mišićni sloj spiralnog dijela crijeva sastoji se većinom samo od kružnog sloja glatkih mišićnih stanica. Unutrašnji mišićni sloj nije jednoliko razvijen na svim dijelovima. Između glatkih mišićnih stanica nalazi se vezivno tkivo građeno od kolagenih, retikularnih i elastičnih vlakna. Vanjska površina prekrivena je serozom. Nabori spiralnog crijeva sastoje se od sluznice i podsluznice (Slika 23A).



Slika 23. Histologija spiralnog crijeva mačke bljedice (A i B). Slika A prikazuje generalnu građu stijenke i spiralnog nabora (MT). Na Slici B označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3), podsluznica (brojka 4, strelica), unutrašnji mišićni sloj (5) i seroza (6) (VVG).

5.3.1.4. Rektum

Slojevi rektuma označeni su na Slici 24B. Sluznicu rektuma oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog. Između epitelnih stanica smještene su jednostanične mukozne žlijezde s AB + PAS - sekretom. Muskularis mukoze nije vidljiva, stoga lamina proprija i podsluznica čine jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Unutar tog sloja vezivnog tkiva diferencirana su kolagena, elastična i retikularna vlakna te je vidljiva pokoja mišićna stanica. Mišićni sloj rektuma sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između mišićnih stanica nalaze se kolagena, retikularna i elastična vlakna. Na pregledanim preparatima rektuma mačke bljedice vanjska je površina prekrivena serozom.



Slika 24. Histologija rektuma mačke bljedice (A i B). Slika A prikazuje generalnu građu stijenke rektuma (HE). Na Slici B označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), proprija – podsluznica (2), unutrašnji mišićni sloj (3) (VVG).

5.3.2. Mikroskopska građa probavnog sustava psa mekaša

5.3.2.1. Jednjak

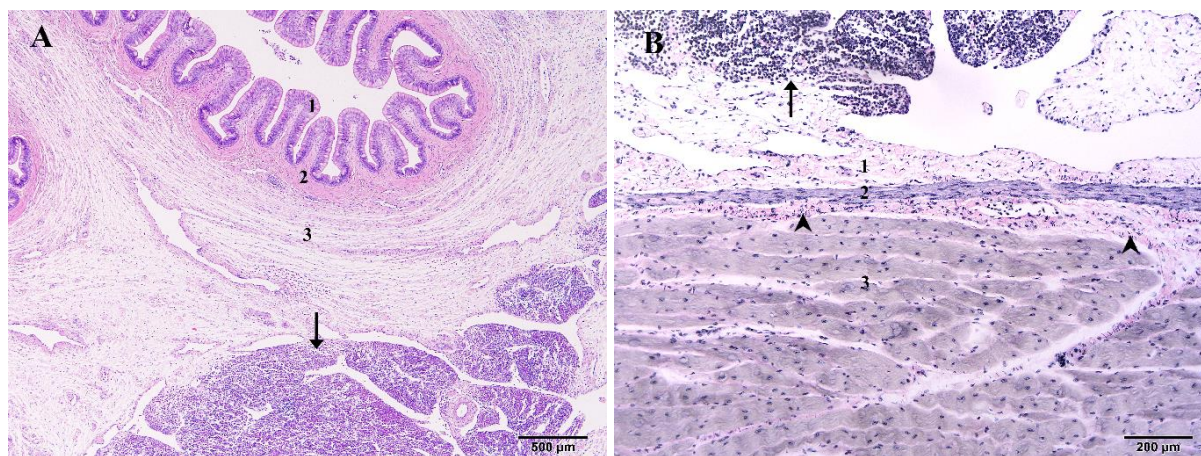
5.3.2.1.1. Mikroskopska građa dijela jednjaka s Leydigovim organom

Slojevi jednjaka psa mekaša označeni su na Slici 25. Sluznicu jednjaka ispod Leydigovog organa oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog s izdancima na površini stanica (Slika 26A). Između stanica epitela vidljive su jednostanične mukozne žlijezde s AB + PAS - sekretom. Manji dio žlijezda sadrži AB + PAS + i AB - PAS + sekret. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Epitel završnog dijela jednjaka prema želucu snižava se prema jednoslojnom visokoprizmatičnom te u tom dijelu nedostaju mukozne žlijezde. Na pokrovni epitel nastavlja se sloj vezivnog tkiva, za koji je za pretpostaviti da predstavlja laminu propriju. Lamina proprija građena je dominantno od snopova kolagenih vlakna. Glatke mišićne stanice muskularis mukoze nisu uočene. Podsluznica jednjaka građena je od rahlijeg vezivnog tkiva u odnosu na laminu propriju. Omeđen krvnim žilama u podsluznici se nalazi Leydigov organ. Mišićni sloj jednjaka sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja mišićnog tkiva. Unutrašnji mišićni sloj građen je od glatkih mišićnih stanica koje teku kružno u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. Vanjski mišićni sloj građen je od poprečno ispruganih mišićnih vlakana koja teku uzdužno u odnosu na istu os probavne cijevi. Endomizij,

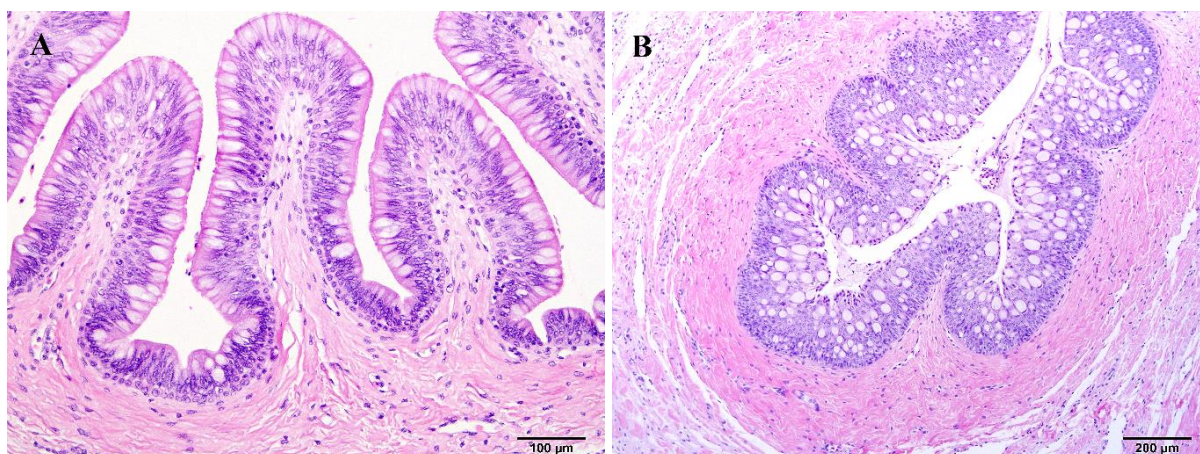
kao i vezivno tkivo između unutrašnjeg i vanjskog mišićnog sloja građeni su od kolagenih, elastičnih i retikularnih vlakana. Na pregledanim preparatima vanjska površina jednjaka prekrivena je serozom.

5.3.2.1.2. Histologija dijela jednjaka bez Leydigovog organa

Sluznicu jednjaka bez Leydigovog organa oblaže mnogoslojni kubični neuroženi epitel (Slika 26B). Između epitelnih stanica vidljive su brojne jednostanične mukozne žlijezde s AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + i AB - PAS - sekretom. Ispod epitela vidljiva je PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena slično onoj u dijelu jednjaka s Leydigovim organom. Muskularis mukoze nije razvijena. Podsluznica je građena od vezivnog tkiva (kolagena i elastična vlakna). Mišićni sloj i seroza građeni su jednako kao u dijelu s Leydigovim organom.



Slika 25. Histologija jednjaka psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi jednjaka: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3) te je strelicom označen Leydigov organ (HE). Na Slici B označena je podsluznica (1), unutrašnji (2) i vanjski (3) mišićni sloj; crnom je strelicom označen Leydigov organ, a streličastim vrhovima elastična vlakna (VVG).

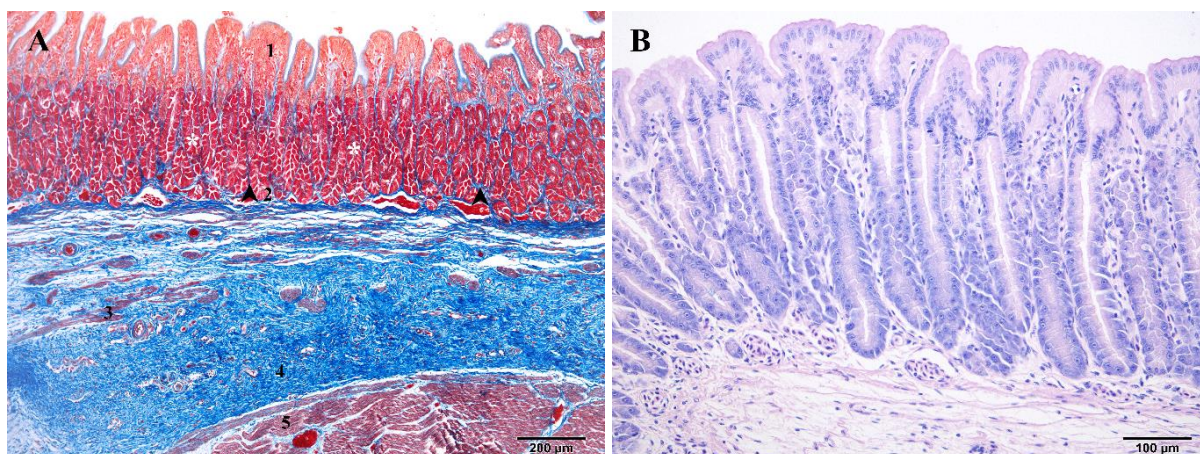


Slika 26. Epitel jednaka psa mekaša (A i B). Na Slici A prikazan je pokrovni epitel u dijelu s Leydigovim organom, a na Slici B epitel dijela bez Leydigovog organa (HE).

5.3.2.2. Želudac

5.3.2.2.1. Prednji dio želuca

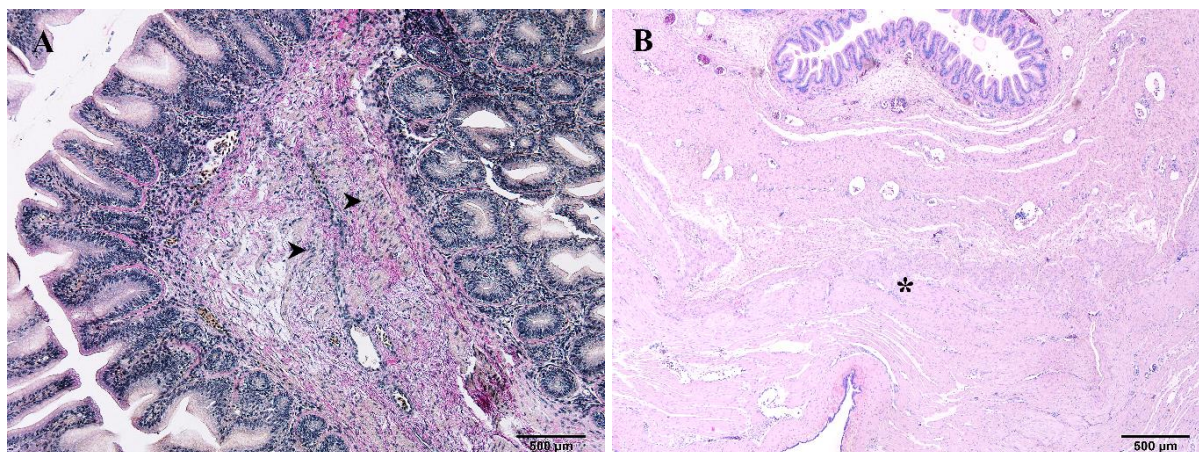
Građa prednjeg dijela želuca psa mekaša prikazana je na Slici 27. Sluznicu prednjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Apikalni dio epitelnih stanica sadrži proširenja ispunjena mukoznim AB + PAS - te manjim dijelom AB - PAS + te AB + PAS + sekretom. Lamina proprija je građena od kolagena s dodatno diferenciranim retikularnim vlaknima u dijelu vezivnog tkiva između žlijezda. Želučane žlijezde sastavljene su od jednog tipa žljezdanih stanica koje su bipolarno obojene. Bazalni dio stanica bazofilno je obojen dok je vršni dio citoplazme stanice obojen eozinofilno (Slika 27B). Jezgre žljezdanih stanica su svijetle, okrugle i smještene u sredini stanica. Unutar jezgri izražene su jezgrice. Na ponekim mjestima stanice su binuklearne. Ispod žlijezda nalazi se tkivo lamine proprije građeno dominantno od kolagenih vlakna. Muskularis mukoze dobro je razvijena te je građena od glatkih mišićnih stanica koje su raspoređene u nekoliko slojeva. Podsluznica želuca građena je od kolagenih vlakna te se u njoj prisutne krvne žile. U dijelu podsluznice prema mišićnom sloju diferencirana je veća količina elastičnih vlakna. Mišićni sloj sastoji se od debljeg unutrašnjeg sloja i tanjeg vanjskog sloja glatkih mišićnih stanica. Unutrašnji mišićni sloj smješten je kružno, a vanjski uzdužno u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. Između glatkih mišićnih stanica nalazi se mreža kolagenih vlakana u kojoj su dodatno diferencirana elastična i retikularna vlakna. Vanjska površina želuca prekrivena je serozom.



Slika 27. Histologija prednjeg dijela želuca psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina propria (2), tračci vezivnog tkiva između žlijezda (streličasti vrhovi), muskularis mukoze (3), podsluznica (4), unutrašnji mišićni sloj (5) (MT). Na Slici B prikazane su želučane žlijezde (HE).

5.3.2.2.2. Stražnji dio želuca

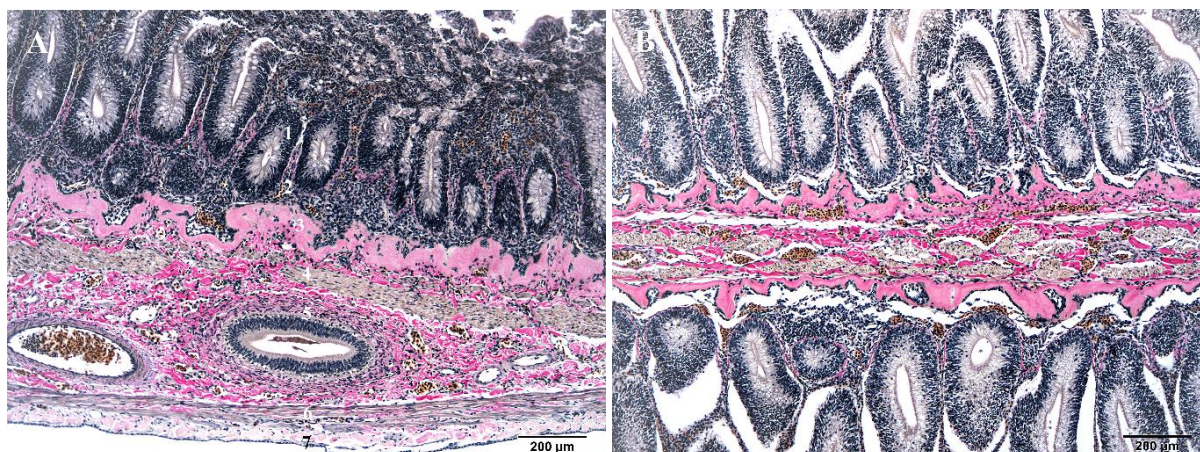
Građa stražnjeg dijela želuca prikazana je na Slici 28. Sluznicu stražnjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Apikalni dio epitelnih stanica sadrži proširenja ispunjena AB + PAS - i AB + PAS + mucinima. Epitel se nastavlja u tubulusne mukozne žlijezde. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina propria je tanka i građena od kolagenih vlakana. Odvojena je od podsluznice dobro razvijenom muskularis mukozom (Slika 28A). Podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela građom su slični istim slojevima u prednjem dijelu želuca. U dijelu piloričkog sfinktera u slojevima vezivnog tkiva vidljive su glatke mišićne stanice i elastična vlakna. Veća pojavnost elastičnih vlakana uočena je i u unutrašnjem dijelu mišićnog sloja koji je valovit i izrazito zadebljao.



Slika 28. Histologija stražnjeg dijela želuca psa mekaša (A i B). Na Slici A streličastim vrhovima označena je muskularis mukoze (VVG). Na Slici B zvjezdicom je naznačen unutrašnji mišićni sloj piloričkog sfinktera (HE).

5.3.2.3. Spiralno crijevo

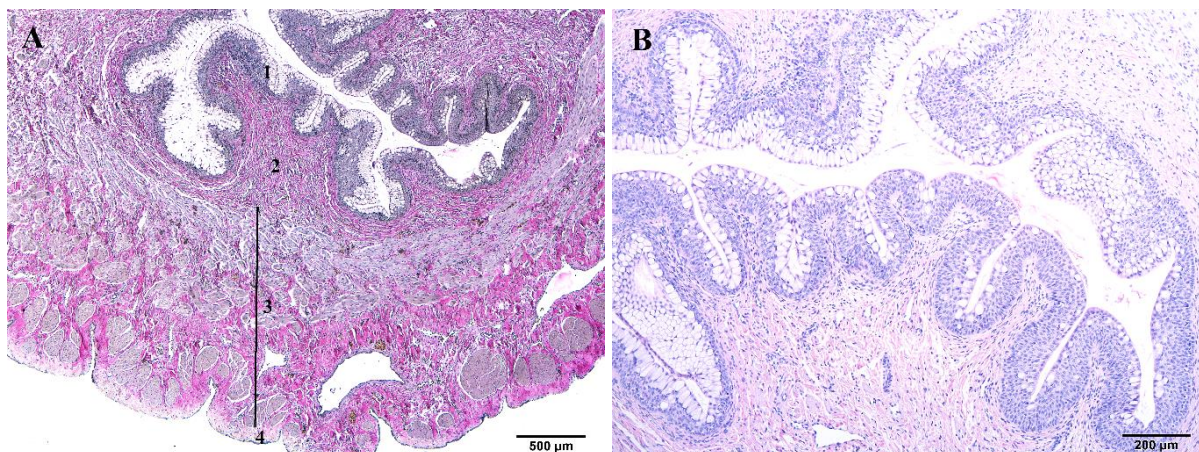
Slojevi spiralnog crijeva označeni su na Slici 29A. Sluznicu crijeva oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Između epitelnih stanica smještene su jednostanične mukozne žlijezde s AB + PAS - i AB + PAS + te manjim dijelom AB - PAS + sekretom. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva u kojem dominiraju brojni stanični elementi. U crijevu psa mekaša ispod lamine proprije uočen je gusti fibrozni sloj (*stratum compactum*) građen od snopova kolagenih vlakna. Muskularis mukoze vrlo je dobro razvijena te je građena od nekoliko slojeva glatkih mišićnih stanica. Podsluznica je građena od kolagenih vlakana i dobro je prokrvljena. Mišićni sloj crijeva većinom se sastoji samo od kružnog sloja glatkih mišićnih stanica. Unutrašnji mišićni sloj nije jednoliko razvijen na svim dijelovima. Između glatkih mišićnih stanica diferencirana su kolagena i elastična vlakna. Vanjska površina crijeva prekrivena je serozom. Nabori spiralnog crijeva sastoje se od sluznice i podsluznice (Slika 29B).



Slika 29. Histologija spiralnog crijeva psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), *stratum compactum* (3), muskularis mukoze (4), žučovod u podsluznici (5), unutrašnji mišićni sloj (6) i seroza (7) (VVG). Na Slici B prikazana je građa nabora (VVG).

5.3.2.4. Rektum

Slojevi rektuma označeni su na Slici 30A. Sluznicu rektuma oblaže epitel u tipu mnogoslojnog pločastog neuroženog epitela (Slika 30B). Između površinskih slojeva stanica nalaze se jednostanične mukozne žlijezde i kubične stanice. Mukozne žlijezde sadrže većim dijelom AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + i AB - PAS + sekret. Muskularis mukoze nije vidljiva, stoga lamina proprija i podsluznica čine jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Unutar tog sloja vezivnog tkiva diferencirana su kolagena, elastična i retikularna vlakna te je vidljiva pokoja mišićna stanica. Mišićni sloj rektuma sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između mišićnih stanica nalazi se vezivno tkivo u kojem su diferencirana kolagena, retikularna i elastična vlakna. Na pregledanim preparatima rektuma psa mekaša vanjska površina prekrivena je serozom.



Slika 30. Histologija rektuma psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija – podsluznica (2), mišićni slojevi (3) i seroza (4) (VVG). Na Slici B prikazan je epitel rektuma (HE).

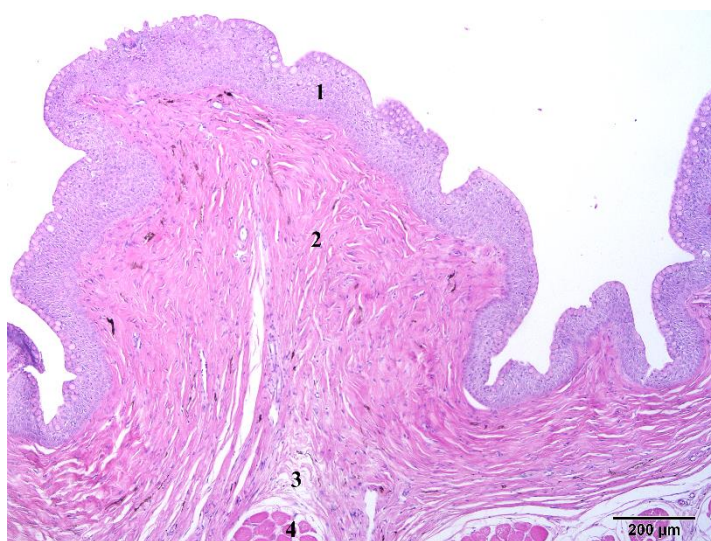
5.4. Mikroskopska građa dijelova probavnog sustava koštunjača

Stijenka probavne cijevi oslića i lastavice prasice sastoji se od sluznice, podsluznice, mišićnog sloja i adventicije ili seroze. U stijenci jednjaka uočeni su svi slojevi probavne cijevi s iznimkom muskularis mukoze. U stijenci želuca istraženih koštunjača uočeni su svi slojevi probavne cijevi. Sluznica želuca sastoji se od pokrovnog epitela, lamine proprije i muskularis mukoze. U prednjem dijelu želuca pokrovni epitel utiskuje se u laminu propriju čineći želučane jamice. Želučane jamice vidljive su kao plitke udubine te čine otvore želučanih žlijezda. U stražnjem dijelu žlijezde su mukoznog tipa. U stijenci crijeva uočeni su svi slojevi probavne cijevi s iznimkom muskularis mukoze koja nedostaje. S obzirom na lokaciju, promjer lumena i histologiju crijevo je podijeljeno na prednji, srednji i stražnji dio. U stijenci rektuma također izostaje muskularis mukoze. U oslića se lamina proprija razlikuje od podsluznice s obzirom na tip vezivnog tkiva dok su u lastavice prasice spojene u jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Seroza svih dijelova probavne cijevi građena je od vezivnog tkiva i mezotela. Unutar vezivnog tkiva seroze diferencirana su kolagena, retikularna i elastična vlakna. U lastavice prasice u svim dijelovima probavnog sustava građenih od vezivnog tkiva uočene su brojne stanice čije se granule VVG metodom bojenja boje ljubičasto-crno.

5.4.1. Mikroskopska građa probavnog sustava oslića

5.4.1.1. Jednjak

Slojevi jednjaka oslića označeni su na Slici 31. Sluznicu jednjaka oblaže mnogoslojni pločasti neuroženi epitel. Između površinski smještenih epitelnih stanica prisutne su brojne jednostanične mukozne žlijezde s AB + PAS - sekretom. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od gustog vezivnog tkiva. Unutar gustog vezivnog tkiva dominiraju kolagena vlakna te je uočljivo pokoje elastično vlakno. Iako muskularis mukoze nije uočena, lamina proprija i podsluznica razlikuju se prema tipu vezivnog tkiva u užem smislu od kojeg su građene. Podsluznica jednjaka građena je od rahlijeg vezivnog tkiva u odnosu na laminu propriju i dobro je prokrvljena. Mišićni sloj jednjaka sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja mišićnog tkiva. Unutrašnji i vanjski mišićni sloj građeni su od poprečno ispruganih mišićnih vlakana. Vlakna unutrašnjeg mišićnog sloja teku kružno, a vanjskog mišićnog sloja uzdužno u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. Endomizij, kao i vezivno tkivo između unutrašnjeg i vanjskog mišićnog sloja građeni su od kolagenih i retikularnih vlakana. Na pregledanim preparatima jednjaka oslića vanjska površina prekrivena je serozom.

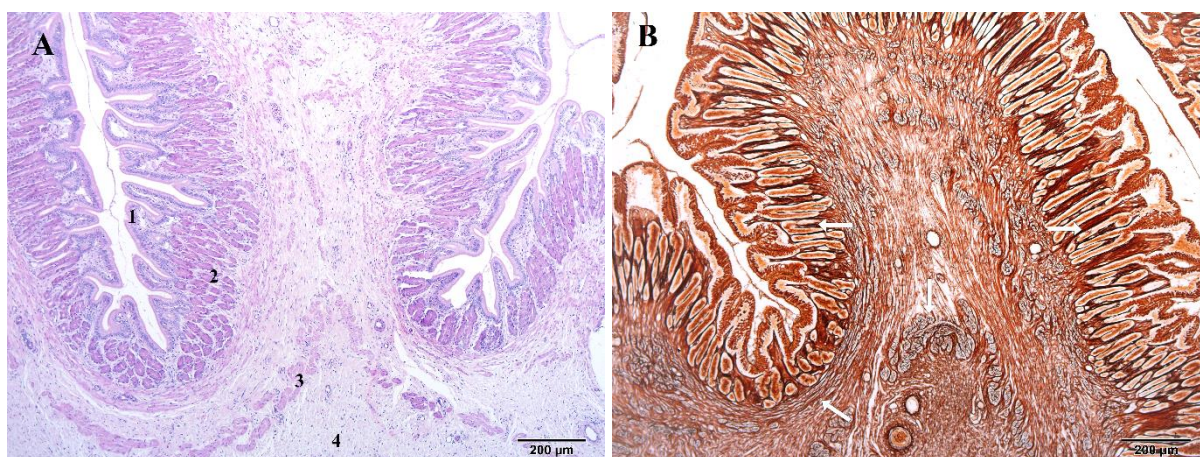


Slika 31. Histologija jednjaka oslića. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3) i unutrašnji mišićni sloj (4) (HE).

5.4.1.2. Želudac

5.4.1.2.1. Prednji dio želuca

Slojevi stijenke prednjeg dijela želuca oslića prikazani su na Slici 32A. Nabori prednjeg dijela želuca sastavljeni su od sluznice i podsluznice. Sluznicu prednjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. U nekih jedinki u vršnom dijelu epitelnih stanica uočen je AB - PAS + sekret. Lamina proprija je građena od kolagenih s dodatno diferenciranim retikularnim vlaknima između želučanih žlijezda (Slika 32B). Želučane žlijezde sastavljene su od jednog tipa žljezdanih stanica. Jezgra žljezdanih stanica je svijetla, okrugla i smještena bliže bazalnom dijelu stanice. Ispod žlijezda nalazi se tkivo lamine proprije građeno dominantno od kolagenih vlakana. Muskularis mukoze građena je od glatkih mišićnih stanica. Podsluznica želuca građena je od kolagenih vlakana te se u njoj prisutni elementi krvožilnog sustava. Mišićni sloj želuca sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja glatkih mišićnih stanica. Unutrašnji sloj je deblji i u njemu stanice teku kružno, a vanjski je tanji te se sastoji od uzdužno poredanih mišićnih stanica. Vezivno tkivo između mišićnih stanica te ono koje odvaja unutrašnji od vanjskog mišićnog sloja građeno je od kolagenih i retikularnih vlakna. Vanjska površina želuca prekrivena je serozom. U većine riba u serozi nalaze se melanosomi. U jedne ribe melanosomi su također utvrđeni u podsluznici, kao i u vezivnom tkivu između mišićnih slojeva.



Slika 32. Histologija prednjeg dijela želuca oslića (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (HE). Na Slici B strelicama su označena crno obojena retikularna vlakna između želučanih žlijezda i u endomiziju glatkih mišićnih stanica (RK).

5.4.1.2.2. Stražnji dio želuca

Građa stražnjeg dijela želuca prikazana je na Slici 33. Sluznicu stražnjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Epitel se nastavlja u tubulusne mukozne žlijedze. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Glatke mišićne stanice lamine muskularis mukoze odvajaju vezivno tkivo lamine proprije od vezivnog tkiva podsluznice. Podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela građom su slični istim slojevima u prednjem dijelu želuca. U dijelu piloričkog sfinktera lamina proprija i muskularis mukoze nisu uočene. Na navedenom dijelu dominira vezivno tkivo između kojeg su uklopljene glatke mišićne stanice koje se vide u različitim presjecima. Mišićni su slojevi izrazito zadebljali.



Slika 33. Histologija stražnjeg dijela želuca oslića. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (HE).

5.4.1.3. Crijevo

5.4.1.3.1. Prednji dio crijeva

Građa prednjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 34A. Prednji dio crijeva užeg je lumena te se histološki uočavaju prošireni i niži nabori. Sluznicu prednjeg dijela crijeva oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Između epitelnih stanica prisutne su

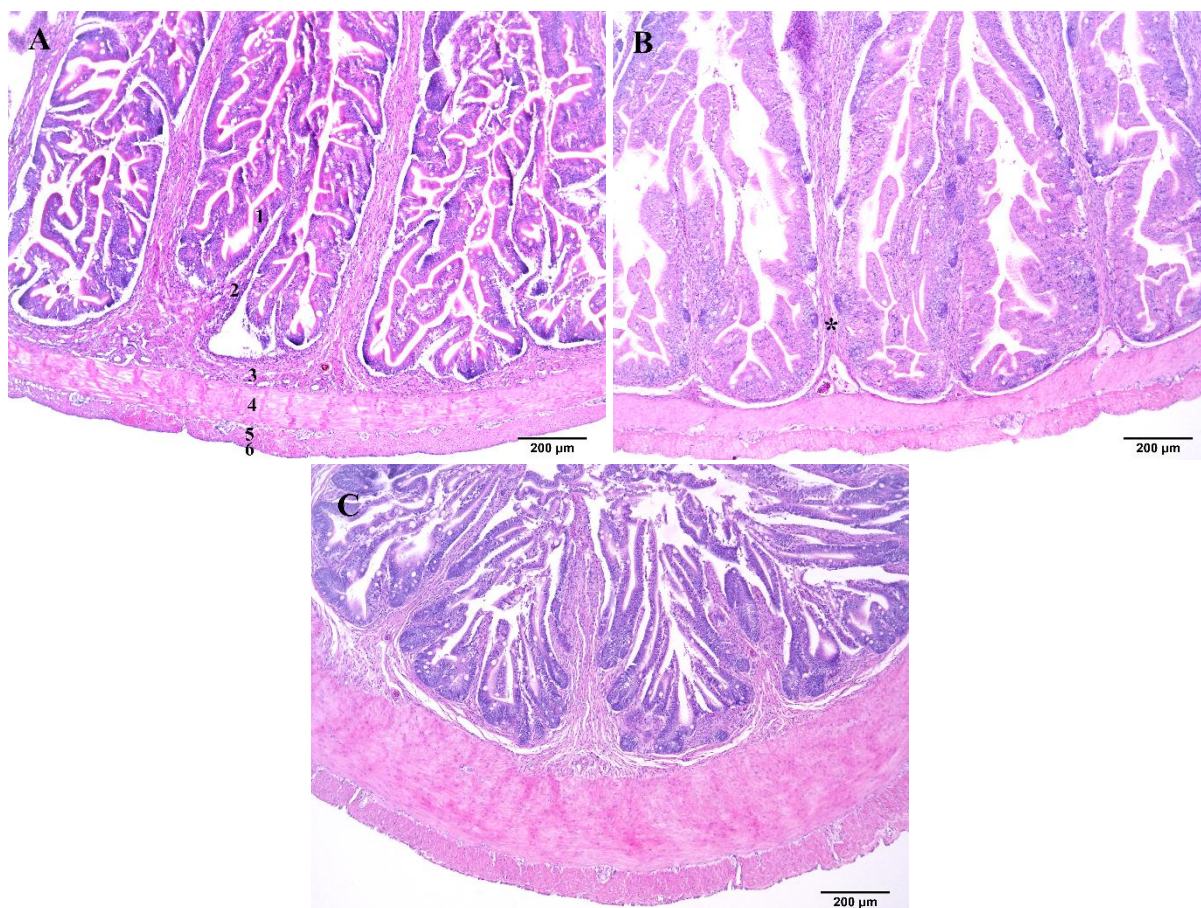
jednostanične mukozne žlijezde koje sadrže AB + PAS - sekret. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva. U njoj dominiraju brojne stanice s malom količinom kolagenih vlakana među njima. Muskularis mukoze nije prisutna, stoga gusto vezivno tkivo podsluznice naliježe direktno na rahlo vezivno tkivo proprije. Slojevi vezivnog tkiva bolje su razvijeni u odnosu na ostale dijelove crijeva. Mišićni sloj prednjeg crijeva dobro je razvijen te se sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između glatkih mišićnih stanica prisutna su kolagena i retikularna vlakna. Vanjska površina prekrivena je serozom.

5.4.1.3.2. Srednji dio crijeva

Građa srednjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 34B. Srednji dio crijeva debljeg je lumena te se histološki vide nabori koji su nekoliko puta viši od onih u prednjem i stražnjem dijelu. Sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza građeni su jednako kao u prednjem dijelu crijeva. Uočeno je nekoliko razlika. Slojevi vezivnog tkiva tanji su u odnosu na prednji dio crijeva. U mišićnom sloju diferencirana su elastična vlakna te je unutrašnji sloj tanji u odnosu na unutrašnji mišićni sloj prednjeg dijela crijeva.

5.4.1.3.3. Stražnji dio crijeva

Građa stražnjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 34C. Stražnji dio crijeva ima promjer lumena sličan prednjem dijelu, ali su nabori visinom između prednjeg i stražnjeg dijela. Sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela crijeva građeni su jednako kao u prednjem dijelu. Jedine uočene razlike su da je muskularis mukoze identificirana u nekih riba te da su mišićni slojevi bolje razvijeni.

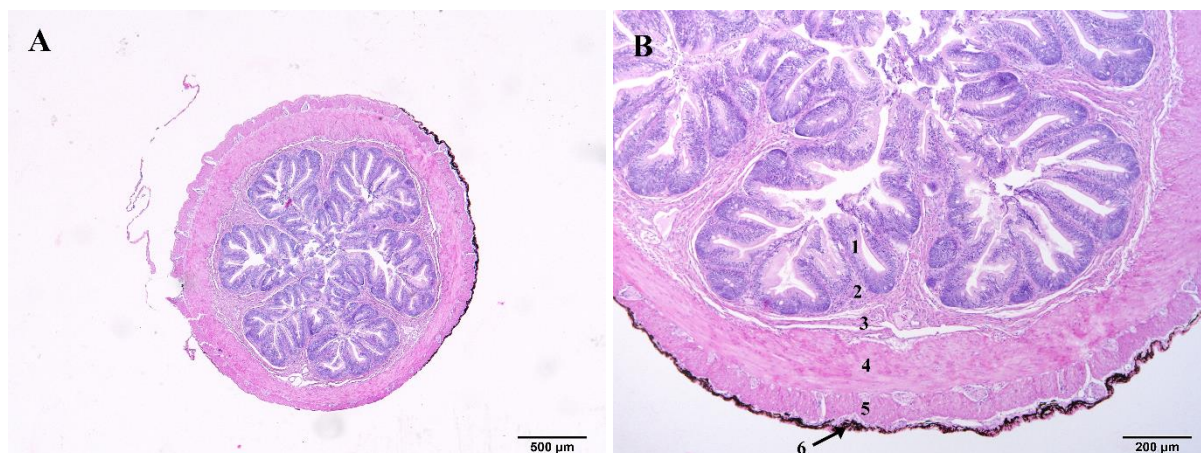


Slika 34. Histologija crijeva oslića (A, B i C). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke prednjeg dijela crijeva: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni slojevi i seroza (6) (HE). Na Slici B zvjezdicom je označen tanji sloj vezivnog tkiva srednjeg dijela crijeva (HE). Na Slici C prikazana je građa stražnjeg dijela crijeva (HE).

5.4.1.4. Rektum

Građa rektuma prikazana je na slikama 35A i 35B. Sluznicu rektuma oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog s mikrovilima. Jednostanične mukozne žlijezde rektuma brojnije su u odnosu na one u drugim dijelovima crijeva te su ispunjene AB + PAS - sekretom. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Epitel od lamine proprije odvaja PAS + bazalna membrana. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva. U njoj dominiraju brojne stanice s manjom količinom kolagenih vlakana. Muskularis mukoze nije prisutna, stoga gusto vezivno tkivo podsluznice direktno naliježe na rahlo vezivno tkivo lamine proprije. Slojevi vezivnog tkiva bolje su razvijeni u odnosu na ostale dijelove crijeva. Između glatkih mišićnih stanica nalazi se vezivno

tkivo (kolagena i retikularna vlakna). Na pregledanim preparatima probavnog sustava oslića vanjska površina rektuma prekrivena je serozom. Seroza rektuma je pigmentirana.



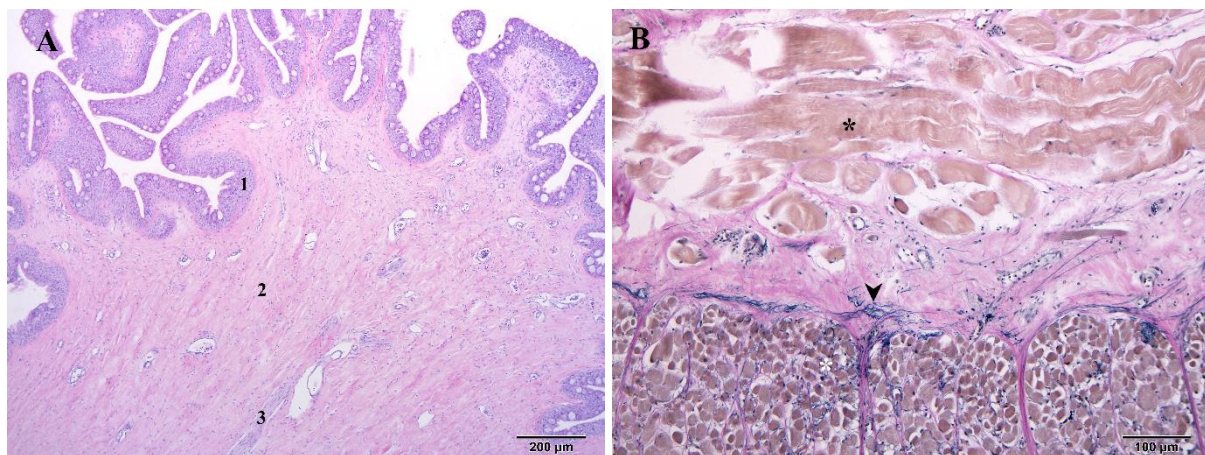
Slika 35. Histologija rektuma oslića (A i B). Slika A prikazuje poprečni presjek rektuma (HE). Na Slici B označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj, seroza (6) (HE).

5.4.2. Mikroskopska građa probavnog sustava lastavice prasice

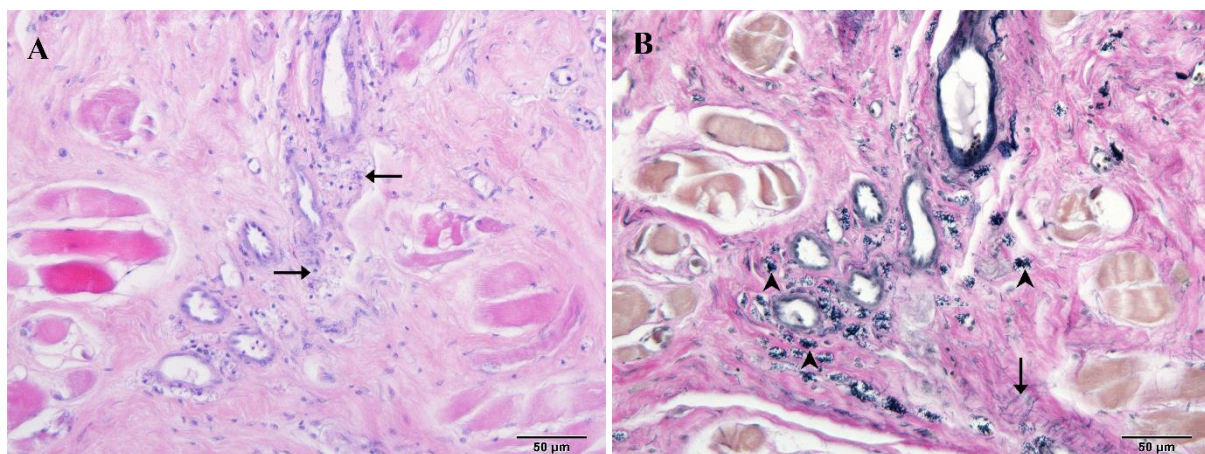
5.4.2.1. Jednjak

Građa jednjaka lastavice prasice prikazana je na Slikama 36A i 36B. Nabori jednjaka sastavljeni su od epitela i vezivnog tkiva. Sluznicu jednjaka do spoja s prednjim dijelom želuca oblaže mnogoslojni pločasti neoroženi epitel. Između površinski smještenih epitelnih stanica prisutne su brojne jednostanične mukozne žlijezde koje sadrže AB + PAS - te ponegdje AB + PAS + sekret. Ispod epitela jednjaka vidljiva je PAS + bazalna membrana. Iako su na pojedinim mjestima vidljive glatke mišićne stanice za koje je za pretpostaviti da pripadaju muskularis mukozi, razlika u građi vezivnog tkiva lamine proprije i vezivnog tkiva podsluznice nije vidljiva. Taj sloj vezivnog tkiva građen je od kolagenih i retikularnih vlakana te mnogo elastičnih vlakana. U dijelu vezivnog tkiva prema mišićnom sloju nalaze se brojne stanice čije su se granule VVG metodom bojenja obojile ljubičasto. Mišićni sloj jednjaka sastoji se od unutrašnjeg i vanjskog sloja mišićnog tkiva. Unutrašnji i vanjski mišićni slojevi građeni su od poprečno ispruganih mišićnih vlakna. Vlakna unutrašnjeg mišićnog sloja teku kružno, a

vanjskog uzdužno u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. Endomizij, kao i vezivno tkivo između vlakna te ono između mišićnih slojeva građeno je od kolagenih i retikularnih vlakana. Na pregledanim preparatima probavnog sustava lastavice prasice vanjska površina prednjeg dijela jednjaka prekrivena je adventicijom. Unutar vezivnog tkiva diferencirana su kolagena, elastična i retikularna vlakna te brojne stanice čije su se granule VVG metodom bojenja obojile ljubičasto (Slika 37A i 37B). Na pregledanim preparatima sluznica stražnjeg dijela jednjaka građena je od jednoslojnog visokoprizmatičnog epitela bez jednostaničnih mukoznih žlijezda te je izvana prekrivena serozom.



Slika 36. Histologija jednjaka lastavice prasice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina propria – podsluznica (2), glatke mišićne stanice (3) (HE). Na Slici B zvjezdicom je označen unutrašnji mišićni sloj, a streličastim vrhom elastična vlakna (VVG).

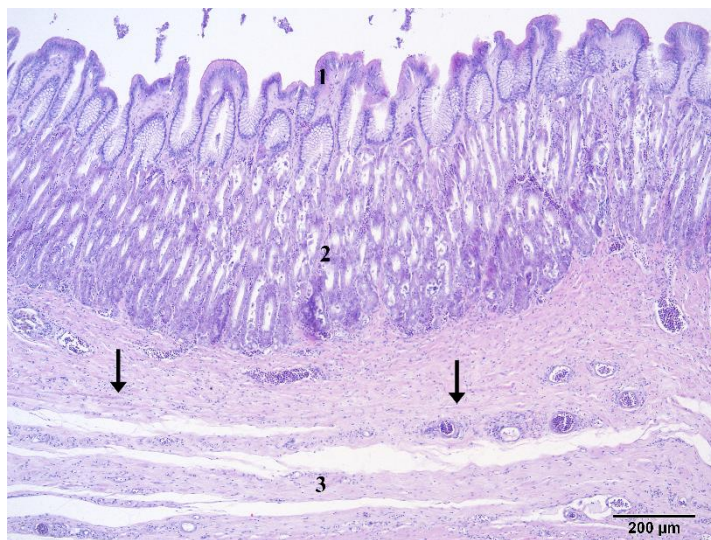


Slika 37. Prikaz stanica u vezivnom tkivu jednjaka lastavice prasice (A i B). Na Slici A strelicama su označene pronađene stanice u jednjaku (HE). Na Slici B streličastim vrhovima označene su iste stanice prikazane drugom metodom bojenja, dok su strelicom označena elastična vlakna (VVG).

5.4.2.2. Želudac

5.4.2.2.1. Prednji dio želuca

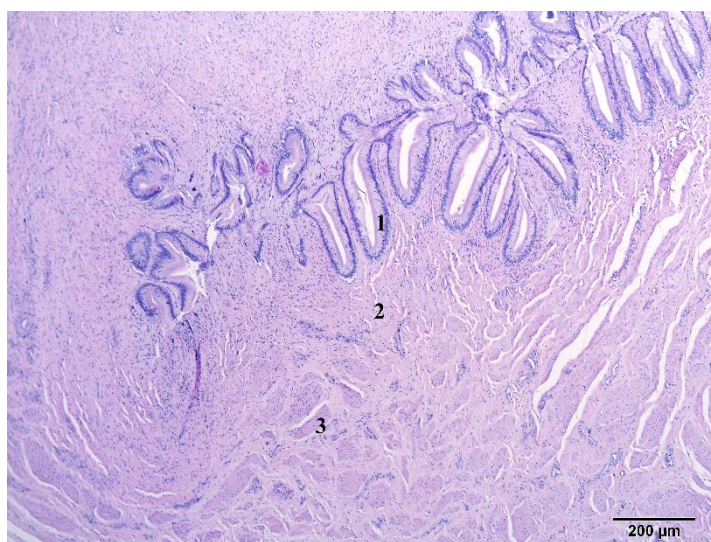
Građa prednjeg dijela želuca prikazana je na Slici 38. Sluznicu prednjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. U citoplazmi epitelnih stanica uočene su PAS + granule. Lamina proprija građena je od kolagenih i retikularnih vlakna te je ispunjena želučanim žlijezdama. Mukozne stanice ispunjene su AB + PAS - sekretom. Na prijelazu prema tijelu žlijezde stanice sadrže AB + PAS + sekret. Muskularis mukoze građena je od glatkih mišićnih stanica. Podsluznica želuca građena je od kolagenih i elastičnih vlakana te je dobro prokrvljena. U podsluznici se nalaze brojne stanice čije su se granule VVG metodom obojile ljubičasto. Mišićni sloj želuca (osim na spoju s jednjakom) sastoji se od debljeg unutrašnjeg i tanjeg vanjskog sloja glatkih mišićnih stanica. Vezivno tkivo između glatkih mišićnih stanica te ono koje odvaja unutrašnji od vanjskog mišićnog sloja građeno je od kolagenih, retikularnih i elastičnih vlakana. Vanjska površina želuca prekrivena je serozom. Unutar vezivnog tkiva seroze također se nalaze stanice čije su se granule VVG metodom obojile ljubičasto.



Slika 38. Histologija prednjeg dijela želuca oslića. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (strelice) i podsluznica (3) (HE).

5.4.2.2.2. Stražnji dio želuca

Građa stražnjeg dijela želuca prikazana je na Slici 39. Sluznicu stražnjeg dijela želuca oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Epitel se nastavlja u tubulusne mukozne žlijezde. Neposredno ispod bazalne lamine epitela, osim kolagenih, diferencirana su i retikularna vlakna. Lamina proprija je tanka dok je muskularis mukoze dobro razvijena. Podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela želuca nemaju posebnosti i građom su slični istim slojevima u prednjem dijelu želuca. Unutar vezivnog tkiva nalaze se stanice čije su se granule VVG metodom obojile ljubičasto. U mišićnom sloju uočeno je poneko elastično vlakno. Mišićni sloj je zadebljao te se sastoji od mišićnih stanica orijentiranih koso u odnosu na uzdužnu os probavne cijevi. U dijelu piloričkog sfinktera manje je uočljiva razlika između slojeva građenih od vezivnog tkiva, svi mišićni slojevi su dodatno zadebljali te su uočena brojnija elastična vlakna i živčani ogranci. Vezivno tkivo seroze pojačane je celularnosti.

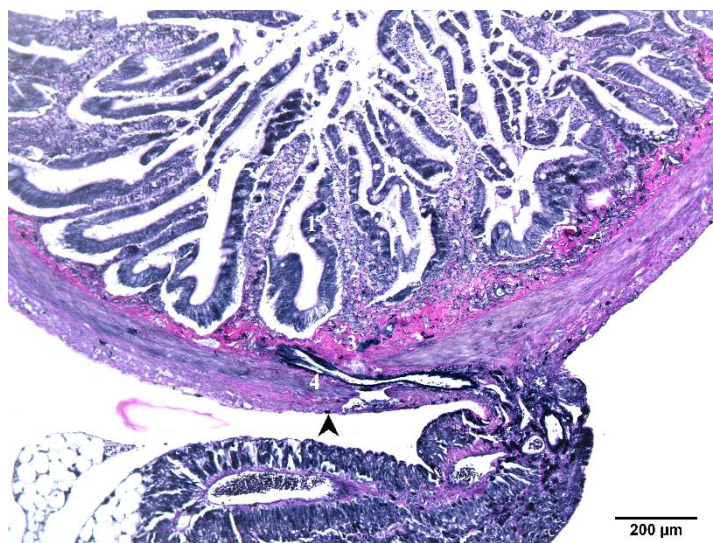


Slika 39. Histologija stražnjeg dijela želuca lastavice prasice. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) (HE).

5.4.2.3. Pilorički nastavci

Građa piloričkih nastavaka prikazana je na Slici 40. Sluznicu prednjeg dijela piloričkih nastavaka oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Između epitelnih stanica prisutne su malobrojne jednostanične mukozne žlijezde koje sadrže AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + sekret. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva. U njoj

dominiraju brojne stanice s manjom količinom kolagenih i retikularnih vlakana. Muskularis mukoze nije prisutna, stoga podsluznica direktno naliježe na laminu propriju. Podsluznica je građena od gustog vezivnog tkiva. Unutar tog gustog vezivnog tkiva diferencirana su kolagena i retikularna vlakna. Mišićni sloj sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između glatkih mišićnih stanica nalazi se vezivno tkivo građeno od kolagenih, retikularnih i elastičnih vlakana. Vanjska površina prekrivena je serozom. Unutar vezivnog tkiva nalaze se stanice čije su se granule VVG metodom obojile ljubičasto.



Slika 40. Histologija piloričkih nastavaka lastavice prasice. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), mišićni slojevi (4) te je streličastim vrhom označena seroza (VVG).

5.4.2.4. Crijevo

S obzirom na anatomsku lokaciju, promjer lumena i histologiju crijevo je podijeljeno na prednji, srednji i stražnji dio.

5.4.2.4.1. Prednji dio crijeva

Građa prednjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 41A. Prednji dio crijeva užeg je lumena te se histološki vide tanki nabori. Sluznicu prednjeg dijela crijeva oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s mikrovilima. Između epitelnih stanica prisutne su jednostanične

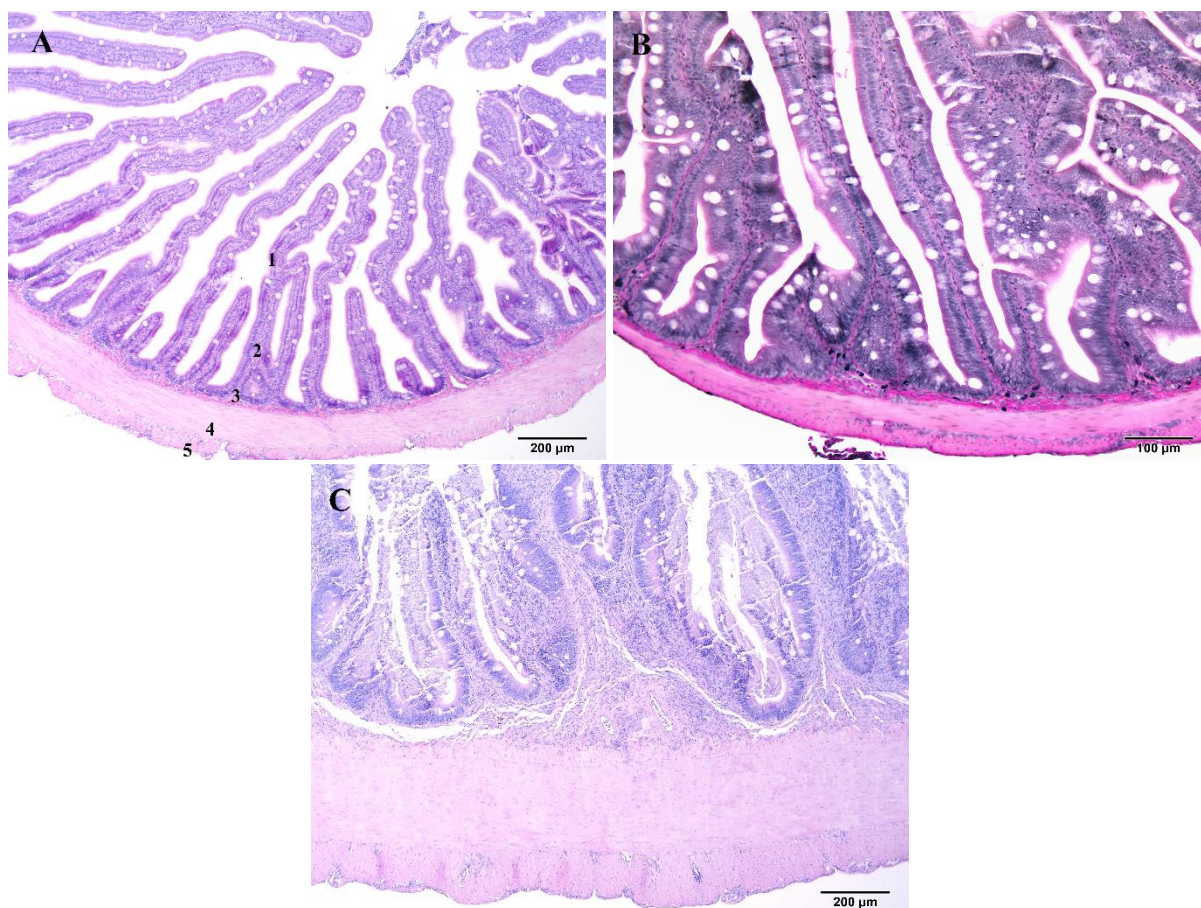
mukozne žlijezde koje sadrže AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + i AB - PAS + sekret. Lamina proprija je građena od rahlog vezivnog tkiva. U njoj dominiraju brojne stanice s manjom malom količinom kolagena. Muskularis mukoze nije prisutna, stoga gusto vezivno tkivo podsluznice direktno naliježe na rahlo vezivno tkivo proprije. U slojevima vezivnog tkiva osim kolagena dodatno su diferencirana i retikularna vlakna. Mišićni sloj dobro je razvijen te se sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između glatkih mišićnih stanica nalaze se brojna kolagena, retikularna i elastična vlakna. Vanjska površina prekrivena je serozom. Unutar vezivnog tkiva prednjeg dijela crijeva nalaze se stanice čije su se granule VVG metodom obojile ljubičasto.

5.4.2.4.2. Srednji dio crijeva

Građa srednjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 41B. Srednji dio crijeva debljeg je lumena te ima nabore koji su nešto širi od onih u prednjem dijelu. Slojevi vezivnog tkiva i mišićni slojevi deblji su u odnosu na prednji dio crijeva. Sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza srednjeg dijela crijeva građeni su uglavnom jednako kao u prednjem dijelu. Mukozne žlijezde srednjeg dijela, za razliku od onih u prednjem dijelu, većinom sadrže AB + PAS + te manjim dijelom AB + PAS - i AB - PAS + sekret.

5.4.2.4.3. Stražnji dio crijeva

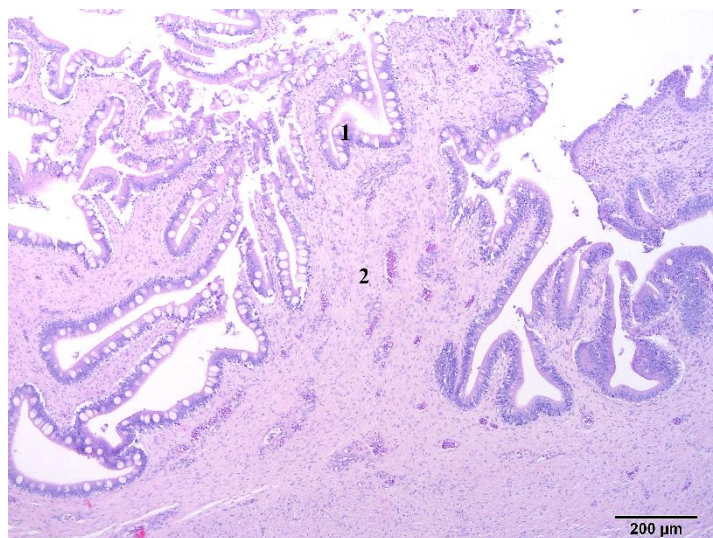
Građa stražnjeg dijela crijeva prikazana je na Slici 41C. Stražnji dio crijeva sličan je srednjem po promjeru lumena i širini nabora dok su debljine slojeva vezivnog i mišićnog tkiva sličnije prednjem dijelu. Sluznica, podsluznica, mišićni sloj i seroza stražnjeg dijela crijeva građeni su jednako kao u prednjem dijelu. U pojedinim jedinki vidljive su glatke mišićne stanice koje pripadaju muskularis mukozi. Mukozne žlijezde, kao i u prednjem dijelu crijeva, većinom sadrže AB + PAS - te manjim dijelom AB + PAS + i AB - PAS + sekret.



Slika 41. Histologija crijeva lastavice prasice (A, B i C). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke prednjeg dijela crijeva: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji i vanjski mišićni sloj (4) i seroza (5) (HE). Na Slici B prikazana je građa srednjeg dijela srednjeg segmenta crijeva (VVG). Na Slici C prikazana je građa stražnjeg dijela crijeva (HE).

5.4.2.5. Rektum

Građa rektuma lastavice prasice prikazana je na Slici 42. Sluznicu rektuma oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog s mikrovilima. Jednostanične mukozne žlijezde rektuma prevladavaju u odnosu na druge dijelove crijeva. Mukozne žlijezde sadrže AB + PAS -, AB + PAS + te AB + PAS + sekret. Muskularis mukoze nije prisutna, stoga se ispod epitela nalazi jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Taj sloj vezivnog tkiva građen je od kolagenih, retikularnih i elastičnih vlakana. Mišićni sloj sastoji se od unutrašnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja glatkih mišićnih stanica. Između glatkih mišićnih stanica nalaze se brojna kolagena, retikularna i elastična vlakna. Na pregledanim preparatima rektuma lastavice prasice vanjska površina rektuma prekrivena je serozom.



Slika 42. Histologija rektuma lastavice prasice. Na slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1) i lamina propria – podsluznica (2) (HE).

5.5. Lokalizacija enzimske aktivnosti u dijelovima probavnog sustava hrskavičnjača

5.5.1. Lokalizacija enzimske aktivnosti u mačke bljedice

5.5.1.1. Jednjak

Reakcije kisele fosfataze (Slika 44A) i nespecifične esteraze (Slika 45A) uočene su u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka. Unutar slojeva vezivnog tkiva utvrđene su pojedinačne granularne reakcije spomenutih enzima. Stanice Leydigova organa pokazale su prisutnost alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esteraze. Dodatno, u vezivnom tkivu između mišićnih slojeva i vezivnom tkivu adventicije zabilježena je aktivnost alkalne fosfataze.

5.5.1.2. Želudac

5.5.1.2.1. Prednji dio želuca

Reakcije kisele fosfataze (Slika 44B) i nespecifične esteraze (Slika 45B) uočene su u bazalnom i perinuklearnom dijelu epitelnih stanica prednjeg dijela želuca. Reakcije obaju

enzima pronađene su i u vezivnom tkivu lamine proprije, želučanim žlijezdama, vezivnom tkivu podsluznice, kao i onom između mišićnih slojeva te u serozi.

5.5.1.2.2. Stražnji dio želuca

Reakcije kisele fosfataze (Slika 44C) i nespecifične esteraze (Slika 45C) uočene su u perinuklearnom i bazalnom dijelu epitelnih stanica stražnjeg dijela želuca. Granularne reakcije obaju enzima zabilježene su i u vezivnom tkivu lamine proprije. U lamini propriji, koja ulazi u sastav nabora, zamijećeno je više granularnih reakcija jačeg inteziteta. Granularne reakcije nespecifične esteraze uočene su unutar vezivnog tkiva podsluznice, između mišićnih stanica i slojeva te u serozi.

5.5.1.3. Spiralno crijevo

Reakcije alkalne fosfataze (Slike 43A i 43B), kisele fosfaze (Slika 44D) i aminopeptidaze (Slika 46) uočene su u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva. Reakcije kisele fosfataze i nespecifične esteraze (Slika 45D) zabilježene su u apikalnom (češće i intenzivnije) te ponegdje u bazalnom dijelu epitelnih stanica. Granularne reakcije obaju enzima pronađene su u lamini propriji, podsluznici i u serozi.

5.5.1.4. Rektum

Reakcija aminopeptidaze uočena je u četkastoj prevlaci rektuma. U epitelu rektuma zabilježene su granularne reakcije kisele fosfataze (Slika 44E) i nespecifične esteraze. U slojevima vezivnog tkiva pronađene su pojedinačne reakcije. Reakcija nespecifične esteraze u serozi je posebno jaka.

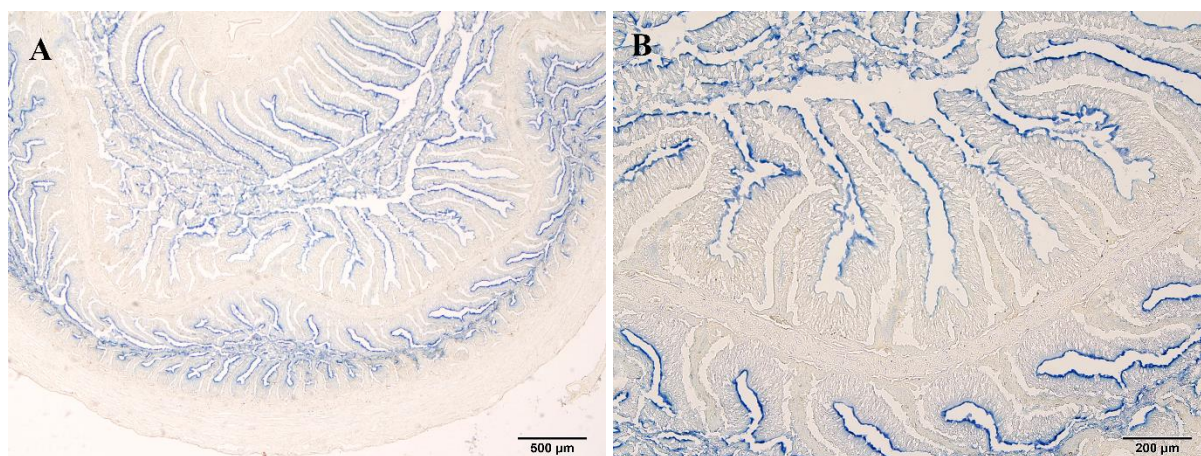
5.5.2. Statistička analiza enzimske aktivnosti u mačke bljedice

5.5.2.1. Alkalna fosfataza

U probavnoj cijevi mačke bljedice, OG alkalne fosfataze izmjerena je u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva (Tablica 5).

Tablica 5. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel
	Četkasta prevlaka
Spiralno crijevo	$0,261 \pm 0,119$



Slika 43. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u spiralnom crijevu mačke bljedice (A i B).

5.5.2.2. Kisela fosfataza

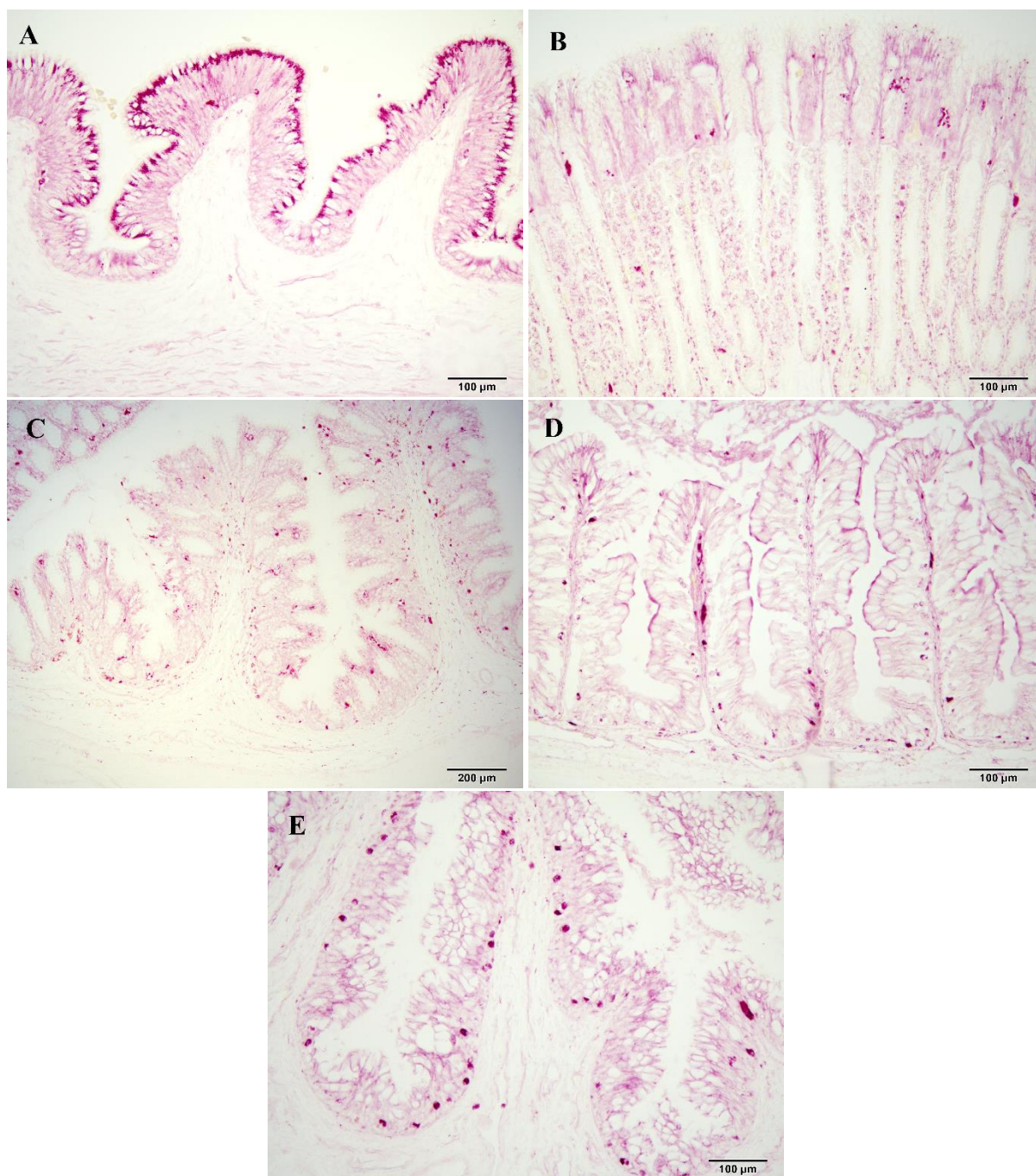
SOG kisele fosfataze prikazana je u Tablici 6. U probavnoj cijevi mačke bljedice OG kisele fosfataze izmjerena je u četkastoj prevlaci epitelnih stanica spiralnog crijeva te u citoplazmi epitela jednjaka, prednjeg i stražnjeg dijela želuca, spiralnog crijeva i rektuma. Najviša vrijednost izmjerena je u epitelnim stanicama jednjaka dok je najniža izmjerena u citoplazmi epitelnih stanica spiralnog crijeva. Zabilježena je statistički značajna razlika između SOG enzima u jednjaku od one u ostatku probavne cijevi. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi OG je izmjerena u prednjem i stražnjem dijelu želuca te u spiralnom crijevu i rektumu.

Najviša vrijednost izmjerena je u stražnjem dijelu, a najniža u prednjem dijelu želuca. Utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti u želucu i spiralnom crijevu te između stražnjeg dijela želuca i rektuma. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi pronađeno je nekoliko statistički značajnih razlika. U prednjem dijelu želuca utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti izmjerene u citoplazmi epitelnih stanica i želučanim žlijezdama i vrijednosti izmjerene u vezivnom tkivu. U spiralnom crijevu utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti u četkastoj prevlaci i one u citoplazmi epitelnih stanica te u vezivnom tkivu. U rektumu je utvrđena statistički značajna razlika između vrijednosti izmjerene u epitelu i one izmjerene u vezivnom tkivu.

Tablica 6. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel		Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
	Četkasta prevlaka	Citoplazma		
Jednjak	/	0,283 ^a ± 0,047	/	/
Želudac				
Prednji dio	/	0,109 ^{bA} ± 0,032	0,042 ^{cB} ± 0,034	0,097 ^A ± 0,028
Stražnji dio	/	0,146 ^b ± 0,067	0,116 ^a ± 0,045	/
Spiralno crijevo	0,227 ^A ± 0,117	0,097 ^{bB} ± 0,027	0,100 ^{abB} ± 0,026	/
Rektum	/	0,146 ^{bA} ± 0,025	0,073 ^{bcB} ± 0,030	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 44. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu mačke bljedice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, spiralnom crijevu (D) i rektumu (E).

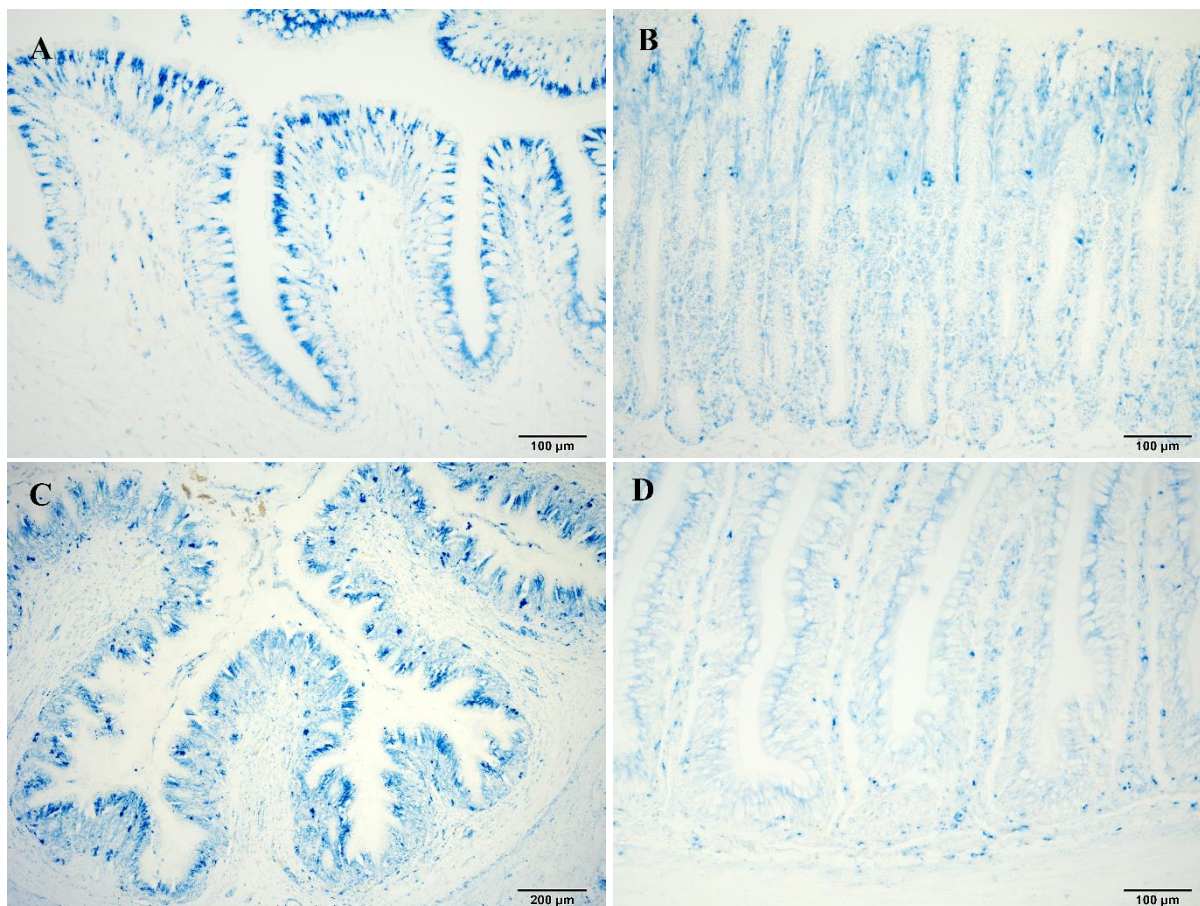
5.5.2.3. Nespecifična esteraza

SOG nespecifične esterase prikazana je u Tablici 7. U probavnoj cijevi mačke bljedice, OG nespecifične esterase izmjerena je u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka, prednjeg i stražnjeg dijela želuca, spiralnog crijeva i rektuma. Pritom je najviša vrijednost izmjerena u epitelnim stanicama želuca dok je najniža izmjerena u epitelnim stanicama spiralnog crijeva. U skladu s tim zabilježeno je nekoliko statistički značajnih razlika. Statistički značajna razlika uočena je između vrijednosti u jednjaku i one izmjerene u želucu i u spiralnom crijevu. Općenito, statistički značajna razlika utvrđena je između vrijednosti u prednjem i stražnjem dijelu želuca i u ostalim dijelova probavne cijevi. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi OG je izmjerena u želucu i spiralnom crijevu. Najviša vrijednost izmjerena je u stražnjem dijelu želuca, a najniža u prednjem dijelu želuca te je između te dvije vrijednosti utvrđena i statistički značajna razlika. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između SOG enzima u epitelu prednjeg dijela želuca i onih u vezivnom tkivu i želučanim žlijezdama.

Tablica 7. Vrijednosti nespecifične esterase u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
Jednjak	0,146 ^b ± 0,056	/	/
Želudac			
Prednji dio	0,250 ^{aA} ± 0,085	0,034 ^{bB} ± 0,031	0,074 ^B ± 0,028
Stražnji dio	0,247 ^a ± 0,092	0,067 ^a ± 0,027	/
Spiralno crijevo	0,055 ^c ± 0,036	0,042 ^{ab} ± 0,017	/
Rektum	0,093 ^{bc} ± 0,066	/	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



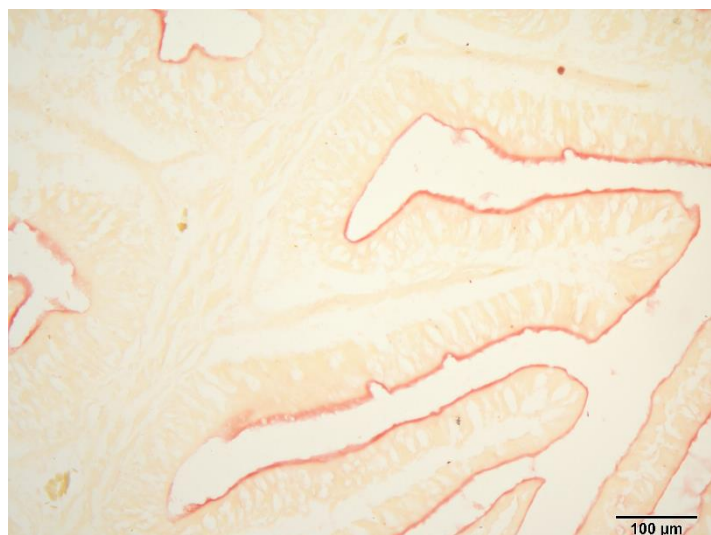
Slika 45. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu mačke bljedice (A – D). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca te spiralnom crijevu (D).

5.5.2.4. Aminopeptidaza

U probavnoj cijevi mačke bljedice, OG aminopeptidaze izmjerena je u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva (Tablica 8).

Tablica 8. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel
	Četkasta prevlaka
Spiralno crijevo	$0,074 \pm 0,011$



Slika 46. Pozitivna reakcija aminopeptidaze u spiralnom crijevu mačke bljedice.

5.5.3. Lokalizacija enzimske aktivnosti u psa mekaša

5.5.3.1. Jednjak

Unutar epitela jednjaka uočene su reakcije alkalne fosfataze (Slika 47A), kisele fosfataze (Slika 48A) i nespecifične esteraze. Reakcije nespecifične esteraze zabilježene su u različitim visinama epitela. Pojačana aktivnost ovog enzima zabilježena je u dijelu epitela koji oblaže nasuprotne nabore jednjaka. Reakcije kisele fosfataze zabilježene su perinuklearno dok je reakcija alkalne fosfataze zabilježena u bazalnom sloju epitela. U lamini propriji pronađene su granularne reakcije kisele fosfataze. Oko krvnih kapilara unutar istog sloja zabilježene su reakcije alkalne fosfataze. Stanice Leydigova organa pokazale su prisutnost alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esteraze. U vezivnom tkivu između mišićnih slojeva i vezivnom tkivu seroze zabilježena je aktivnost kisele fosfataze.

5.5.3.2. Želudac

5.5.3.2.1. Prednji dio želuca

U prednjem dijelu želuca aktivnost kisele fosfataze (Slika 48B) i nespecifične esteraze (Slika 49A) zabilježena je u epitelnim stanicama od supranuklearnog do bazalnog dijela

stanice. Pozitivne reakcije obaju enzima pronađene su i u vezivnom tkivu lamine proprije, želučanim žlijezdama, vezivnom tkivu podsluznice, kao i u onom između mišićnih slojeva te u serozi.

5.5.3.2.2. Stražnji dio želuca

U stražnjem dijelu želuca aktivnost kisele fosfataze (Slika 48C) i nespecifične esteraze (Slika 49B) zabilježena je u epitelnim stanicama od supranuklearnog do bazalnog dijela stanice. Oko krvnih kapilara unutar lamine proprije zabilježene su reakcije alkalne fosfataze. U slojevima vezivnog tkiva (lamini propriji, podsluznici, tkivu između mišićnih stanica te u serozi) uočene su brojne granularne reakcije kisele fosfataze te pokoja reakcija nespecifične esteraze.

5.5.3.3. Spiralno crijevo

Pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slika 47B) i aminopeptidaze (Slika 50) pronađene su u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva. U supranuklearnom te ponegdje u bazalnom dijelu epitelnih stanica zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slika 48D) i nespecifične esteraze (Slika 49C). Nadalje, pozitivne granularne reakcije obaju enzima pronađene su u lamini propriji i podsluznici. Brojne granularne reakcije kisele fosfataze pronađene su i u vezivnom tkivu između mišićnih stanica.

5.5.3.4. Rektum

Unutar epitela rektuma, pronađene su pozitivne reakcije kisele fosfataze (Slika 48E) i nespecifične esteraze. Reakcije tih enzima pronađene su u čitavom epitelu s tendencijom jačih reakcija u površinskim slojevima. Blaga reakcija alkalne fosfataze uočena je oko kapilara u vezivnom tkivu. Brojne granularne reakcije kisele fosfataze pronađene su u svim slojevima koji su građeni od vezivnog tkiva. U tim slojevima, reakcije nespecifične esteraze pronađene su tek ponegdje.

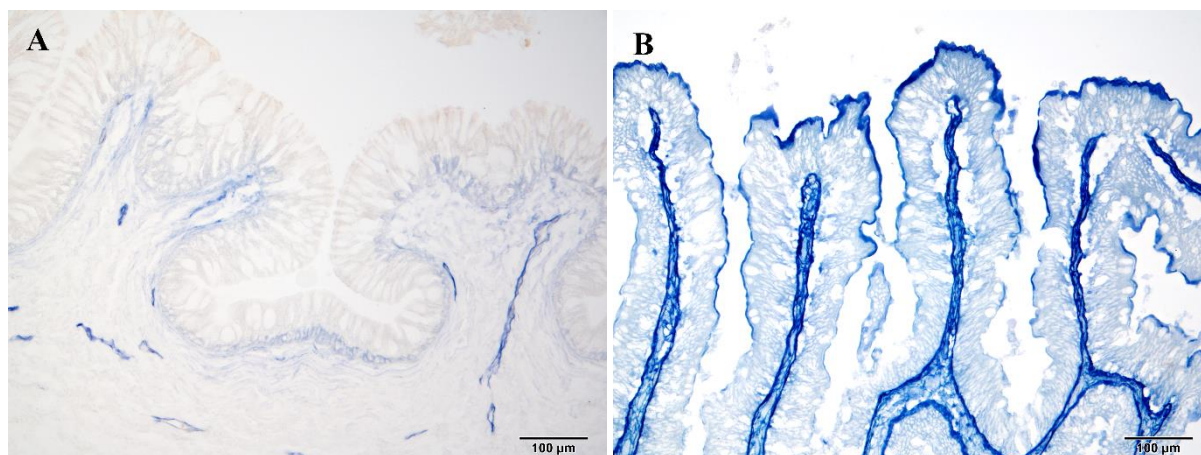
5.5.4. Statistička analiza enzimske aktivnosti u psa mekaša

5.5.4.1. Alkalna fosfataza

U probavnoj cijevi psa mekaša OG alkalne fosfataze izmjerena je u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka i u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva (Tablica 9).

Tablica 9. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	
	Četkasta prevlaka	Citoplazma
Jednjak	/	$0,047 \pm 0,012$
Spiralno crijevo	$0,188 \pm 0,076$	/



Slika 47. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu psa mekaša (A i B). Na Slici A su prikazane reakcije u jednjaku, a na Slici B reakcije u spiralnom crijevu.

5.5.4.2. Kisela fosfataza

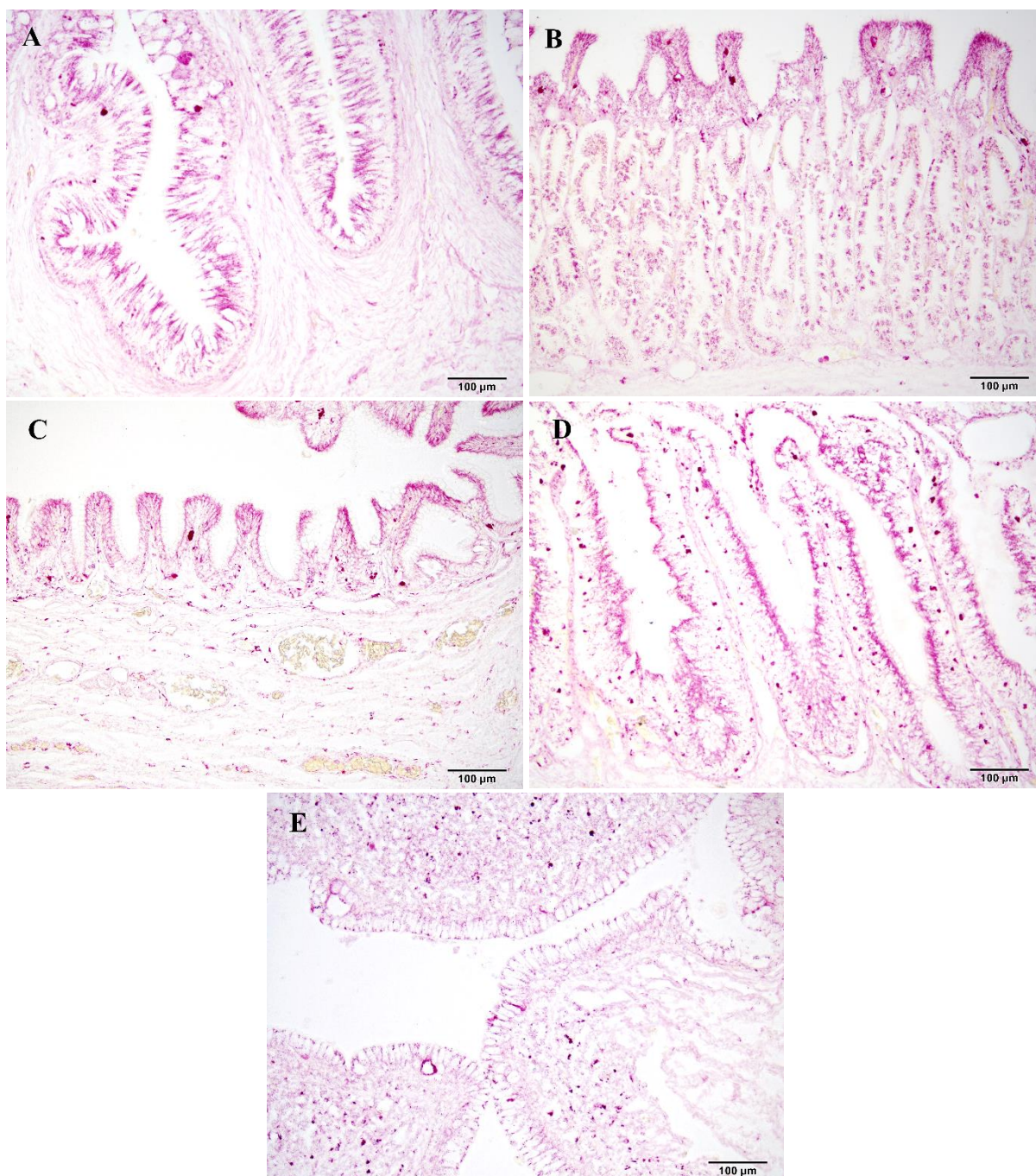
SOG kisele fosfataze prikazana je u Tablici 10. U probavnoj cijevi psa mekaša OG kisele fosfataze izmjerena je u epitelu i vezivnom tkivu jednjaka, želuca, spiralnog crijeva i rektuma te u želučanim žlijezdama. U epitelu spiralnog crijeva izmjerena je najviša SOG dok je najniža izmjerena u epitelu jednjaka. Zabilježena je statistički značajna razlika između SOG enzima u jednjaku od one izmjerene u želucu i spiralnom crijevu te između spiralnog crijeva i

rektuma. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi najviša vrijednost izmjerena je u stražnjem dijelu želuca i spiralnom crijevu, a najniža u jednjaku. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u epitelu i želučanim žlijezdama i one u vezivnom tkivu prednjeg dijela želuca.

Tablica 10. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
Jednjak	0,074 ^c ± 0,010	0,024 ± 0,009	/
Želudac			
Prednji dio	0,170 ^{abA} ± 0,061	0,056 ^B ± 0,020	0,130 ^A ± 0,037
Stražnji dio	0,181 ^{ab} ± 0,076	0,126 ± 0,039	/
Spiralno crijevo	0,194 ^a ± 0,078	0,126 ± 0,058	/
Rektum	0,110 ^{bc} ± 0,044	0,059 ± 0,022	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 48. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu psa mekaša (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, spiralnom crijevu (D) i rektumu (E).

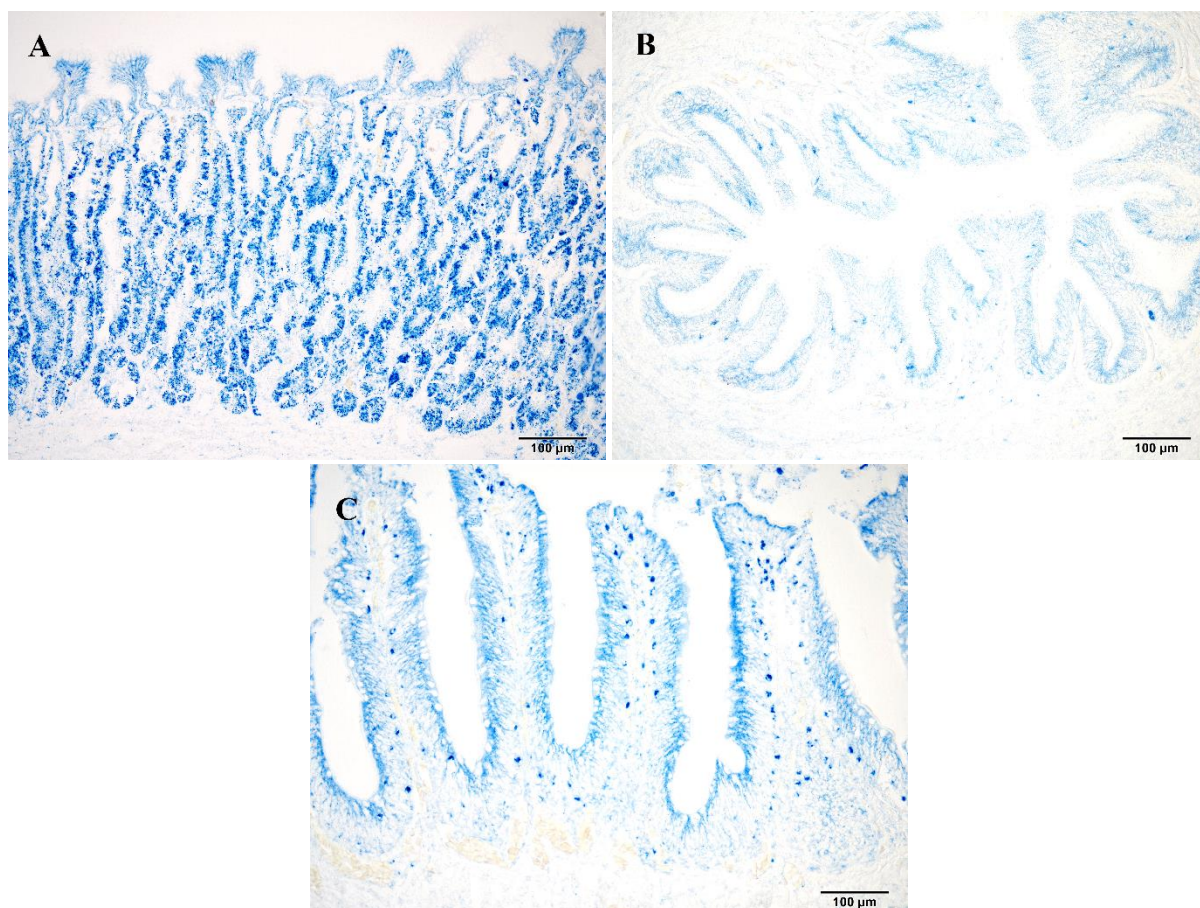
5.5.4.3. Nespecifična esteraza

SOG nespecifične esteraze prikazana je u Tablici 11. U probavnoj cijevi psa mekaša OG nespecifične esteraze izmjerena je u epitelu jednjaka, želuca, spiralnog crijeva i rektuma. Najviša vrijednost izmjerena je u epitelnim stanicama spiralnog crijeva, a najniža u stražnjem dijelu želuca. Zabilježeno je nekoliko statistički značajnih razlika. Statistički značajna razlika uočena je između SOG enzima u jednjaku od one u spiralnom crijevu. Statistički značajna razlika utvrđena je i između vrijednosti u prednjem dijelu želuca i one u stražnjem dijelu želuca i spiralnom crijevu. Vrijednost izmjerena u spiralnom crijevu statistički je značajna u odnosu na one u ostatku probavne cijevi. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi vrijednost je izmjerena u prednjem dijelu želuca i spiralnom crijevu. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u epitelu i one u vezivnom tkivu spiralnog crijeva.

Tablica 11. Vrijednosti nespecifične esteraze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
Jednjak	0,057 ^{bc} ± 0,033	/	/
Želudac			
Prednji dio	0,086 ^b ± 0,044	0,043 ± 0,029	0,076 ± 0,044
Stražnji dio	0,033 ^c ± 0,017	/	/
Spiralno crijevo	0,132 ^{aA} ± 0,039	0,034 ^B ± 0,017	/
Rektum	0,044 ^{bc} ± 0,023	/	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



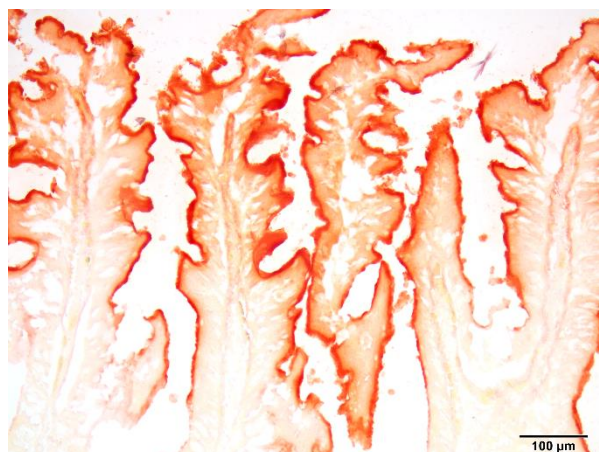
Slika 49. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu psa mekaša (A – C). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u prednjem (A) i stražnjem (B) dijelu želuca te u spiralnom crijevu (C).

5.5.4.4. Aminopeptidaza

U probavnoj cijevi psa mekaša OG aminopeptidaze izmjerena je u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva (Tablica 12).

Tablica 12. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel
	Četkasta prevlaka
Spiralno crijevo	$0,128 \pm 0,075$



Slika 50. Pozitivna reakcija aminopeptidaze u spiralnom crijevu psa mekaša.

5.6. Lokalizacija enzimske aktivnosti u dijelovima probavnog sustava koštunjača

5.6.1. Lokalizacija enzimske aktivnosti u oslića

5.6.1.1. Jednjak

U epitelnim stanicama jednjaka zabilježene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slika 51A), kisele fosfataze (Slika 52A) i nespecifične esteraze. Reakcije alkalne fosfataze i nespecifične esteraze (rijetke) uočene su po čitavom epitelu dok su reakcije kisele fosfataze uočene perinuklearno. U lamini propriji i podsluznici zabilježene su granularne reakcije kisele fosfataze. Oko krvnih kapilara unutar istih slojeva zabilježene su reakcije alkalne fosfataze. U vezivnom tkivu između mišićnih slojeva, u endomiziju i adventiciji zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze i nespecifične esteraze.

5.6.1.2. Želudac

5.6.1.2.1. Prednji dio želuca

U epitelnim stanicama prednjeg dijela želuca zabilježena je aktivnost kisele fosfataze u području od supranuklearnog do srednjeg dijela stanica. Ponegdje je reakcija uočena i u apikalnom dijelu. U vezivnom tkivu lamine proprije pronađene su brojne reakcije kisele

fosfataze te blage reakcije alkalne fosfataze i nespecifične esteraze oko krvnih žila. U podsluznici i vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i između mišićnih slojeva pronađene su brojne granularne reakcije kisele fosfataze. U sloju vezivnog tkiva seroze uočene su pozitivne reakcije alkalne i kisele fosfataze.

5.6.1.2.2. Stražnji dio želuca

U epitelnim stanicama stražnjeg dijela želuca zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slika 52B) i nespecifične esteraze. Brojne reakcije kisele fosfataze vidljive su supranuklearno i perinuklearno. Suprotno tome, reakcije alkalne fosfataze i nespecifične fosfataze uočene su kao veoma rijetke. U lamini propriji uočena je reakcija vezivnog tkiva oko kapilara na alkalnu fosfatazu i nespecifičnu esterazu te reakcije stanica na kiselu fosfatazu. Rjeđe granularne reakcije kisele fosfataze pronađene su u podsluznici te između mišićnih stanica. Seroza stražnjeg dijela želuca pozitivne je reakcije na alkalnu fosfatazu i kiselu fosfatazu.

5.6.1.3. Crijevo

5.6.1.3.1. Prednji, srednji i stražnji dio

U četkastoj prevlaci enterocita prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela crijeva utvrđene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slike 51B – 51D) i aminopeptidaze (Slike 54A – 54C). U apikalnom dijelu stanica zabilježene su reakcije kisele fosfataze (Slike 52C – 52E) i nespecifične esteraze (Slike 53A – 53C). U citoplazmi epitelnih stanica zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze. U slojevima vezivnog tkiva utvrđene su pojedinačne reakcije alkalne fosfataze, kao i granularne reakcije kisele fosfataze. Seroza crijeva pozitivne je reakcije na alkalnu fosfatazu i kiselu fosfatazu.

5.6.1.4. Rektum

U četkastoj prevlaci epitelnih stanica rektuma pronađene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slika 51E) i aminopeptidaze (Slika 54D). Reakcije kisele fosfataze (Slika 52F) uočene su kao intenzivne u površinskim slojevima i pojedinačne u ostatku epitela. Reakcije alkalne fosfataze uočene su kao pojedinačne po čitavom epitelu. U slojevima vezivnog tkiva i serozi pronađene su reakcije alkalne fosfataze i kisele fosfataze.

5.6.2. Statistička analiza enzimske aktivnosti u oslića

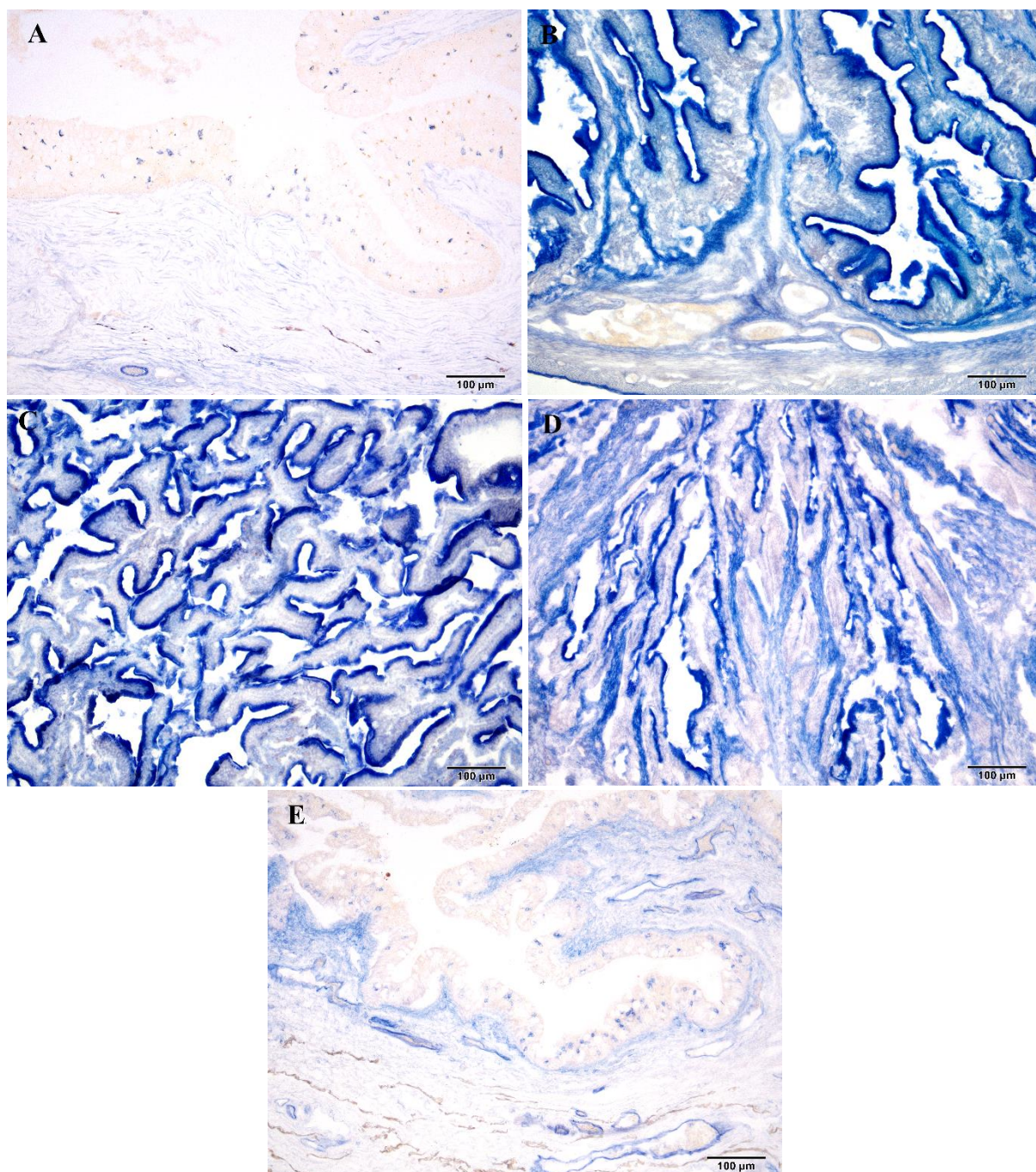
5.6.2.1. Alkalna fosfataza

U probavnoj cijevi oslića OG alkalne fosfataze izmjerena je u četkastoj prevlaci crijeva i rektuma, citoplazmi epitelnih stanica jednjaka i rektuma te u vezivnom tkivu rektuma (Tablica 13). U četkastoj prevlaci, najviša OG izmjerena je u prednjem dijelu crijeva te se nakon toga smanjuje prema stražnjim dijelovima crijeva. U skladu s tim, utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u četkastoj prevlaci u prednjem dijelu crijeva od onih izmjerenih u stražnjem dijelu crijeva i rektumu. Također, utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u četkastoj prevlaci srednjeg i stražnjeg dijela crijeva od one u rektumu. Pozitivne reakcije na alkalnu fosfatazu pronađene su i u citoplazmi epitelnih jednjaka i rektuma te se vrijednosti njihovih SOG statistički značajno razlikuju.

Tablica 13. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel		Vezivno tkivo
	Četkasta prevlaka	Citoplazma	
Jednjak	/	0,062 ^b ± 0,005	/
Crijevo			
Prednji dio	0,565 ^a ± 0,124	/	/
Srednji dio	0,493 ^{ab} ± 0,118	/	/
Stražnji dio	0,380 ^b ± 0,080	/	/
Rektum	0,159 ^c ± 0,116	0,158 ^a ± 0,022	0,131 ± 0,035

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim slovima (^a, ^b, ^c) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 51. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu oslića (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B), srednjem (C) i stražnjem (D) dijelu crijeva te u rektumu (E).

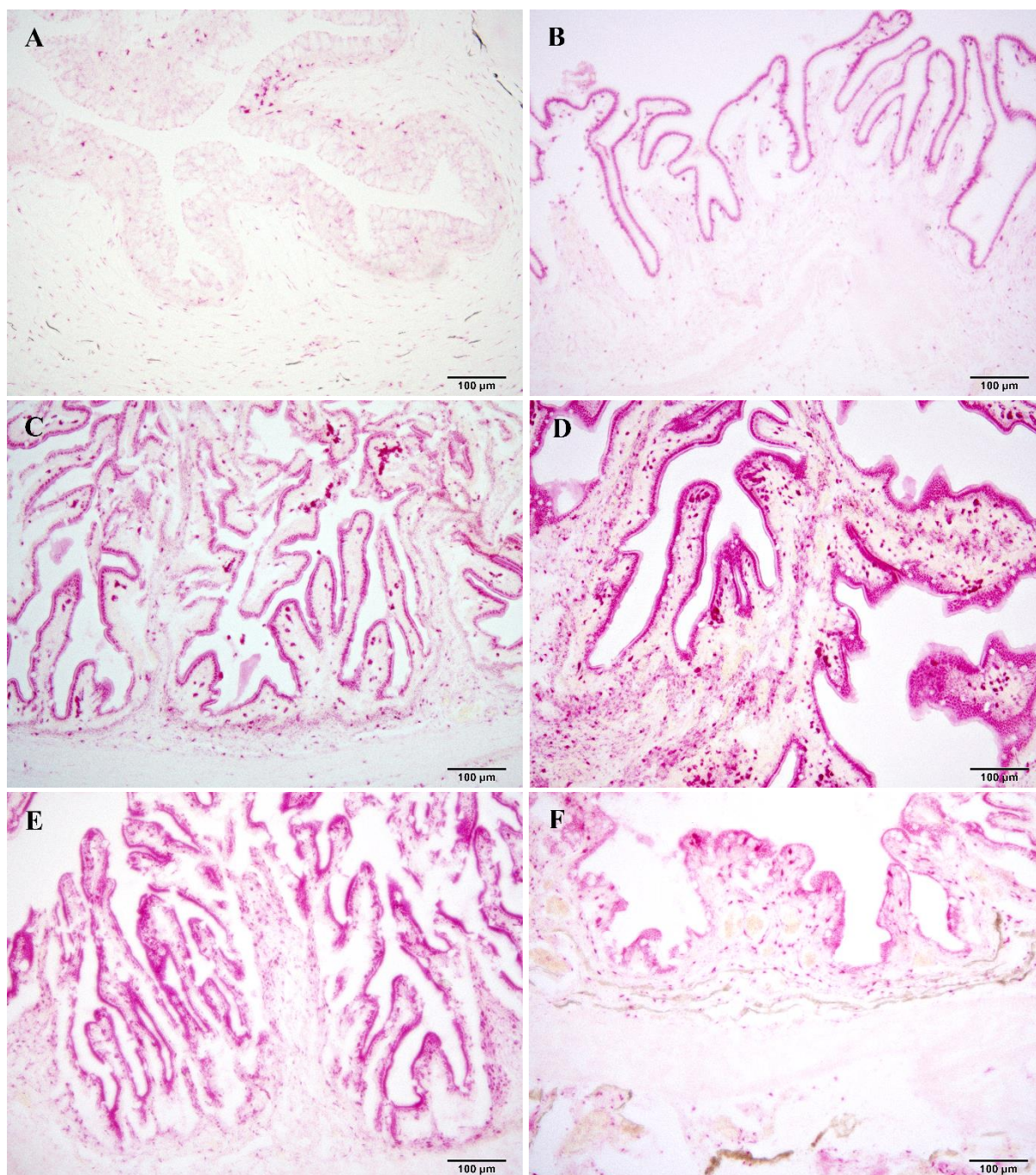
5.6.2.2. Kisela fosfataza

SOG kisele fosfataze prikazana je u Tablici 14. U probavnoj cijevi oslića OG kisele fosfataze izmjerena je u epitelu i vezivnom tkivu svih dijelova probavne cijevi te u želučanim žlijezdama. U epitelu prednjeg i stražnjeg dijela crijeva izmjerena je najviša OG, dok je najniža aktivnost izmjerena u epitelu jednjaka. Zabilježena je statistički značajna razlika između SOG enzima u jednjaku i one izmjerene stražnjim dijelovima probavne cijevi. Utvrđena je i statistički značajna razlika između vrijednosti izmjerenih u epitelu prednjeg i stražnjeg dijela crijeva u odnosu na one izmjerene u jednjaku i rektumu. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi najviša vrijednost izmjerena je u stražnjem dijelu želuca, a najniža u jednjaku. Utvrđeno je nekoliko statistički značajnih razlika koje su prikazane u Tablici 14. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između svih SOG u epitelu i onih u vezivnom tkivu te u želučanim žlijezdama u prednjem dijelu želuca.

Tablica 14. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
Jednjak	0,138 ^{cA} ± 0,018	0,049 ^{dB} ± 0,019	/
Želudac			
Prednji dio	0,268 ^{adA} ± 0,072	0,078 ^{bdC} ± 0,035	0,156 ^B ± 0,039
Stražnji dio	0,287 ^{adA} ± 0,044	0,182 ^{aB} ± 0,039	/
Crijevo			
Prednji dio	0,327 ^{aA} ± 0,079	0,173 ^{acB} ± 0,044	/
Srednji dio	0,288 ^{adA} ± 0,123	0,155 ^{acB} ± 0,065	/
Stražnji dio	0,327 ^{aA} ± 0,063	0,159 ^{acB} ± 0,034	/
Rektum	0,212 ^{bcdA} ± 0,096	0,113 ^{bcB} ± 0,063	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c, d}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B, C}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 52. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu oslića (A – F). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), stražnjem dijelu želuca (B), prednjem (C), srednjem (D) i stražnjem (E) dijelu crijeva te u rektumu (F).

5.6.2.3. Nespecifična esteraza

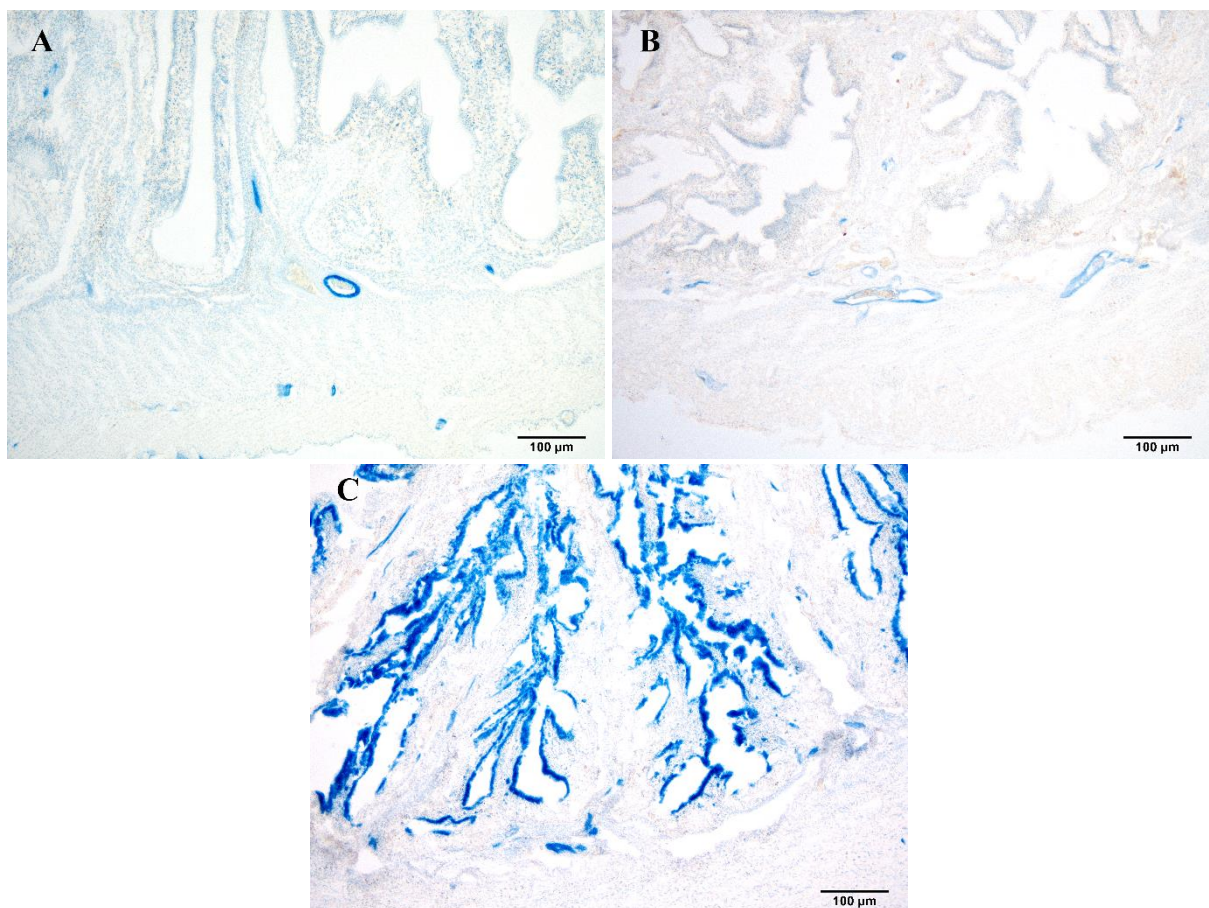
SOG nespecifične esteraze prikazana je u Tablici 15. U probavnoj cijevi oslića OG nespecifične esteraze izmjerena je u epitelu prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela crijeva.

Najviša vrijednost izmjerena je u epitelnim stanicama stražnjeg dijela crijeva. U skladu s tim, zabilježena je statistički značajna razlika između te vrijednosti i onih izmjerenih u prednjem i srednjem dijelu crijeva.

Tablica 15. Vrijednosti nespecifične esteraze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel
Crijevo	
Prednji dio	$0,111^b \pm 0,060$
Srednji dio	$0,106^b \pm 0,054$
Stražnji dio	$0,269^a \pm 0,087$

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^a, ^b) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 53. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu oslića (A – C). Na slikama su prikazane reakcije u prednjem (A), srednjem (B) i stražnjem (C) dijelu crijeva.

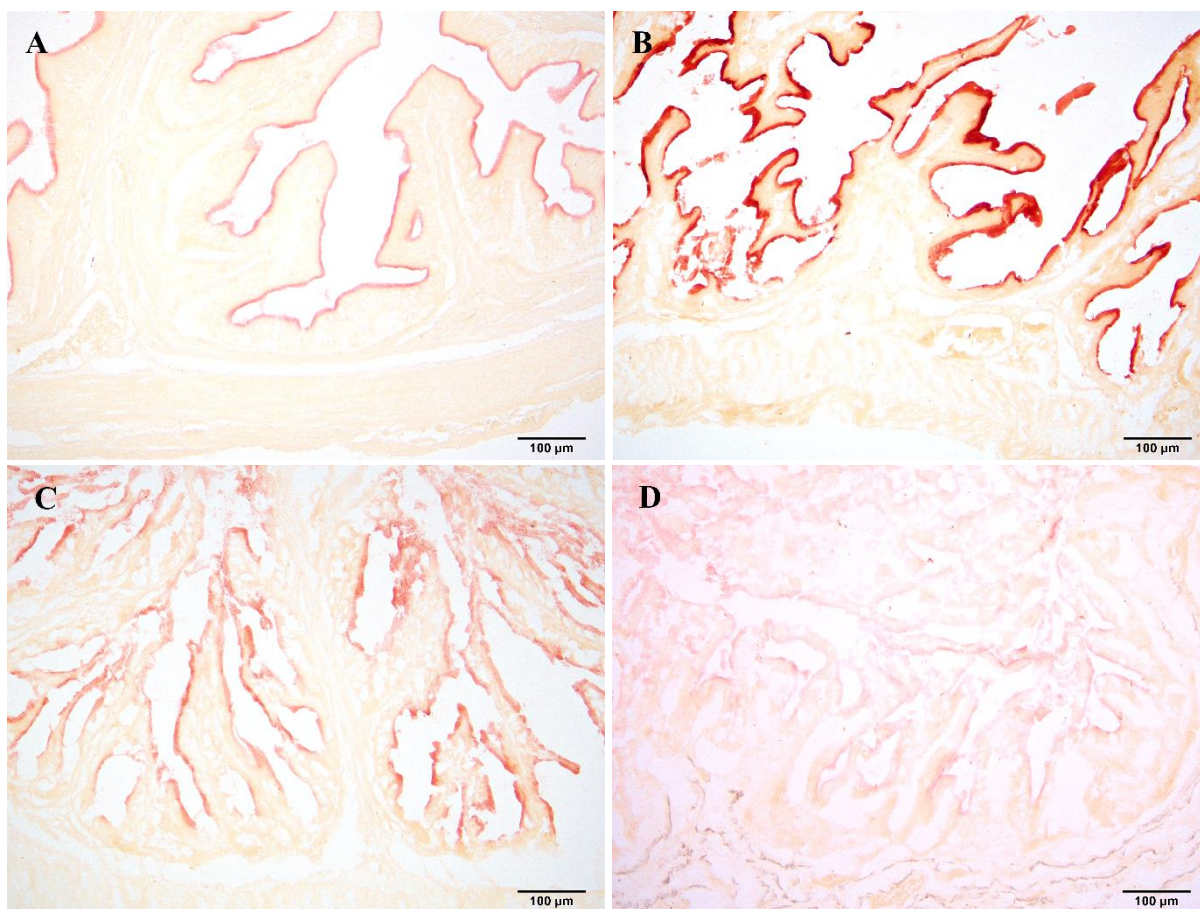
5.6.2.4. Aminopeptidaza

U probavnoj cijevi oslića OG aminopeptidaze utvrđena je i izmjerena u četkastoj prevlaci crijeva i rektuma (Tablica 16). Najviša SOG zabilježena je u epitelu srednjeg dijela crijeva, a najniža u epitelu rektuma. Utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti u prednjem i stražnjem dijelu crijeva i onih izmjerenih u rektumu.

Tablica 16. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Dio probavne cijevi	Četkasta prevlaka
Crijevo	
Prednji dio	$0,290^a \pm 0,050$
Srednji dio	$0,314^a \pm 0,093$
Stražnji dio	$0,280^{ab} \pm 0,147$
Rektum	$0,168^b \pm 0,056$

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 54. Pozitivne reakcije aminopeptidaze u probavnom sustavu oslića (A – D). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u prednjem (A), srednjem (B) i stražnjem (C) dijelu crijeva te u rektumu (D).

5.6.3. Lokalizacija enzimske aktivnosti u lastavice prasice

5.6.3.1. Jednjak

Unutar epitelnih stanica jednjaka zabilježene su pozitivne reakcije svih četiriju istraživanih enzima. Granularne reakcije kisele fosfataze (Slika 56A) i nespecifične esterase (Slika 57A) uočene su u čitavom epitelu dok su reakcije alkalne fosfataze (Slika 55A) i aminopeptidaze (Slika 58) uočene u bazalnom dijelu epitela. Poneke jezgre vrčastih stanica odreagirale su pozitivno na prisutnost kisele fosfataze. U sloju vezivnog tkiva zabilježene su reakcije kisele fosfataze te poneke reakcije nespecifične esterase. U istom sloju oko kapilara

zabilježene su reakcije na alkalnu fosfatazu. U vezivnom tkivu svih slojeva zabilježene su aktivnosti alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esterase (rijetke).

5.6.3.2. Želudac

5.6.3.2.1. Prednji dio želuca

U supranuklearnom dijelu epitelnih stanica prednjeg dijela želuca zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze i nespecifične esterase (Slika 57B). U vezivnom tkivu lamine proprije pronađene su pozitivne reakcije kisele fosfataze te oko krvnih žila reakcije alkalne fosfataze. Reakcije nespecifične esterase zamijećene su kao rijetke. U želučanim žlijezdama zabilježene su granularne reakcije kisele fosfataze. U podsluznici, vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i onom između mišićnih slojeva te u serozi pronađene su brojne granularne reakcije kisele fosfataze i nespecifične esterase.

5.6.3.2.2. Stražnji dio želuca

U apikalnom dijelu epitelnih stanica stražnjeg dijela želuca zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slika 56B) i nespecifične esterase (Slika 57C). Poneka reakcija alkalne fosfataze zabilježena je u bazalnom dijelu epitelnih stanica. U vezivnom tkivu lamine proprije pronađene su pozitivne reakcije kisele fosfataze te oko krvnih žila reakcije alkalne fosfataze. Također, pronađene su rijetke granularne reakcije nespecifične esterase. U podsluznici, vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i onom između mišićnih slojeva te u serozi pronađene su granularne reakcije kisele fosfataze i nespecifične esterase.

5.6.3.3. Pilorički nastavci

U četkastoj prevlaci epitelnih stanica piloričkih nastavaka pronađene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slika 55B) i aminopeptidaze (Slika 58B). U apikalnom dijelu epitelnih stanica zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slika 56C) i nespecifične esterase

(Slika 57D) dok su u bazalnom dijelu uočene reakcije alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esteraze. U vezivnom tkivu lamine proprije i podsluznice pronađene su reakcije kisele fosfataze i nespecifične esteraze te oko krvnih žila reakcije alkalne fosfataze. U vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i onom između mišićnih slojeva te u serozi pronađene su reakcije kisele fosfataze i nespecifične esteraze.

5.6.3.4. Crijevo

5.6.3.4.1. Prednji, srednji i stražnji dio

U četkastoj prevlaci epitelnih stanica crijeva pronađene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slike 55C i 55D) i aminopeptidaze (Slike 58C i 58E). U apikalnom dijelu epitelnih stanica zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slike 56D i 56F) i nespecifične esteraze (Slike 57E – 57G) dok su u bazalnom dijelu uočene rijetke reakcije alkalne fosfataze, kisele fosfataze i nespecifične esteraze. U srednjem dijelu crijeva dodatno su uočene i reakcije kisele fosfataze u supranuklearnom, a u stražnjem dijelu u perinuklearnom dijelu. U vezivnom tkivu lamine proprije oko krvnih žila pronađene su ponegdje reakcije alkalne fosfataze. U vezivnom tkivu lamine proprije i podsluznice pronađene su granularne reakcije kisele fosfataze i reakcije nespecifične esteraze. U prednjem dijelu crijeva reakcije su rjeđe u odnosu na srednji i stražnji dio. U vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i onom između mišićnih slojeva te u serozi pronađene su reakcije kisele fosfataze i nespecifične esteraze.

5.6.3.5. Rektum

U supranuklearnom dijelu epitelnih stanica zabilježene su aktivnosti kisele fosfataze (Slika 56G) i nespecifične esteraze (Slika 57H) te poneka reakcija alkalne fosfataze. U bazalnom dijelu epitela uočene su pozitivne reakcije alkalne fosfataze (Slika 55E), kisele fosfataze i nespecifične esteraze. U vezivnom tkivu pronađene su česte reakcije kisele fosfataze i rijetke reakcije nespecifične esteraze. U vezivnom tkivu oko mišićnih stanica i onom između mišićnih slojeva pronađene su pozitivne reakcije kisele fosfataze dok su u serozi pronađene reakcije kisele fosfataze i nespecifične esteraze.

5.6.4. Statistička analiza enzimske aktivnosti u lastavice prasice

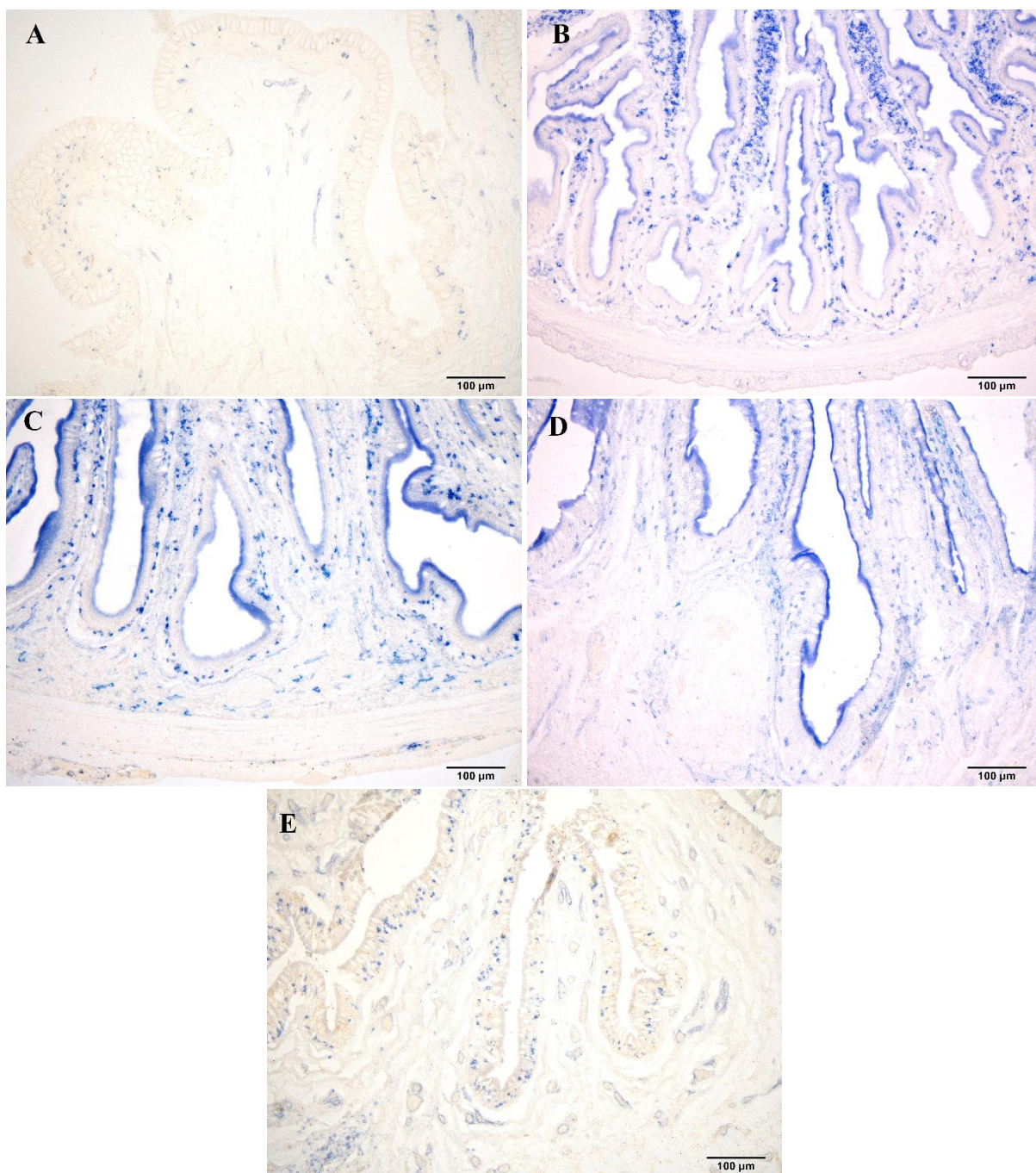
5.6.4.1. Alkalna fosfataza

U probavnoj cijevi lastavice prasice OG alkalne fosfataze izmjerena je u četkastoj prevlaci piloričkih nastavaka i srednjeg crijeva te u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka i rektuma (Tablica 17). U četkastoj prevlaci najviša SOG utvrđena je u srednjem dijelu crijeva. U skladu s tim, utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u četkastoj prevlaci u srednjem dijelu crijeva od onih izmjerenih u ostatku probavne cijevi. Vrijednosti izmjerene u citoplazmi epitelnih stanica približno su sličnog intenziteta.

Tablica 17. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	
	Četkasta prevlaka	Citoplazma
Jednjak	/	0,079 ± 0,024
Pilorički nastavci	0,162 ^b ± 0,033	/
Crijevo		
Prednji dio	0,136 ^b ± 0,056	/
Srednji dio	0,243 ^a ± 0,105	/
Stražnji dio	0,158 ^b ± 0,017	/
Rektum	/	0,072 ± 0,014

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim slovima (^a, ^b) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 55. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), piloričkim nastavcima (B), prednjem (C) i srednjem (D) dijelu crijeva te u rektumu (E).

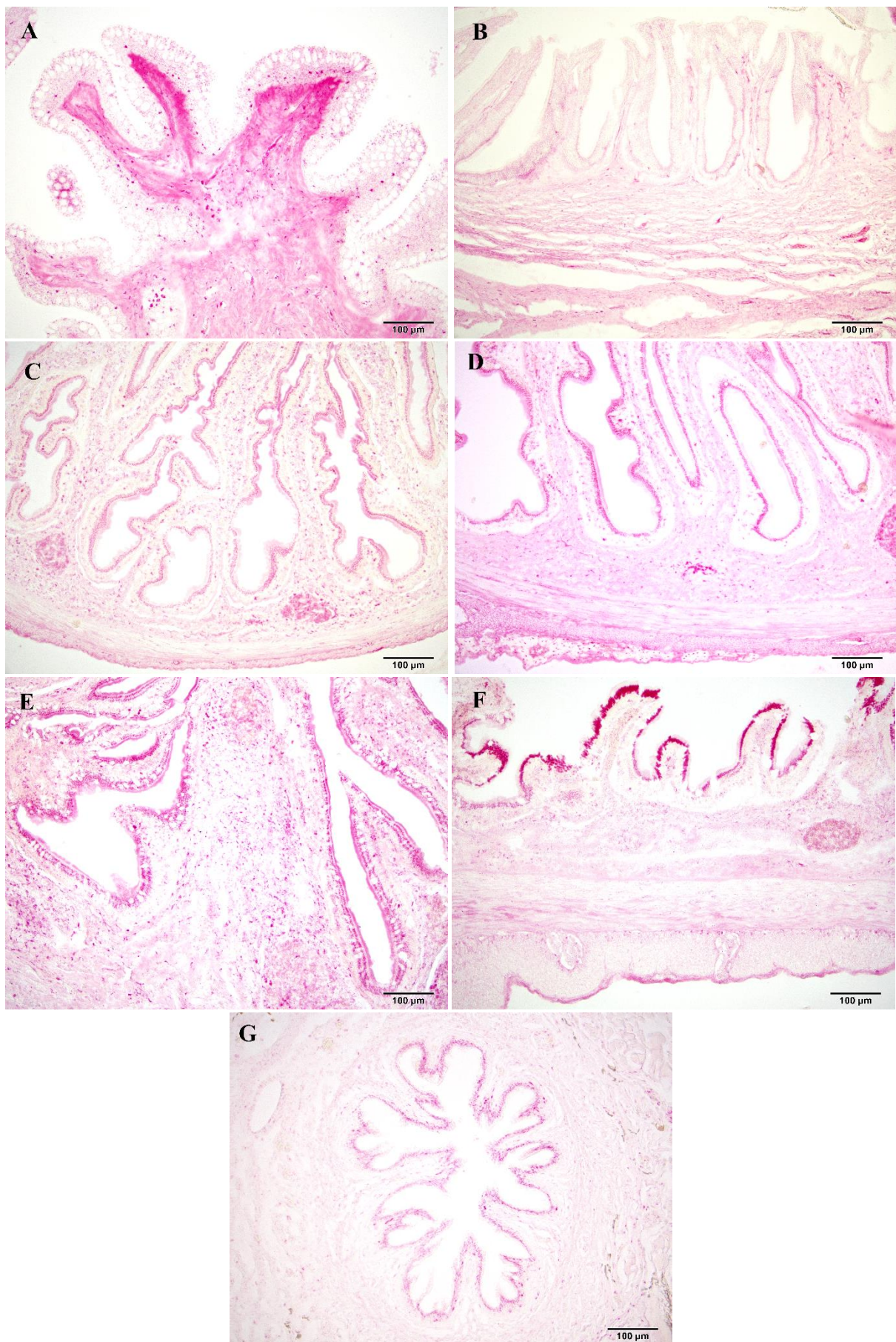
5.6.4.2. Kisela fosfataza

SOG kisele fosfataze prikazana je u Tablici 18. U probavnoj cijevi lastavice prasice OG kisele fosfataze izmjerena je u epitelu i vezivnom tkivu svih dijelova probavne cijevi te u želučanim žlijezdama. U epitelu stražnjeg dijela crijeva izmjerena je najviša vrijednost dok je najniža izmjerena u epitelu prednjeg dijela želuca. Zabilježena je statistički značajna razlika između SOG enzima u jednaku i u prednjem dijelu želuca od onih u piloričkim nastavcima i u crijevu. Utvrđena je i statistički značajna razlika između vrijednosti u epitelu stražnjeg dijela želuca u odnosu na one u piloričkim nastavcima, srednjem i stražnjem dijelu crijeva. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi intenzitet izmjerenih SOG je sličan te statistički značajne razlike nisu utvrđene. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između svih SOG u epitelu i onih u vezivnom tkivu od piloričkih nastavaka do završetka probavne cijevi.

Tablica 18. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo	Želučane žlijezde
Jednjak	0,055 ^b ± 0,020	0,070 ± 0,043	/
Želudac			
Prednji dio	0,051 ^b ± 0,012	0,065 ± 0,020	0,052 ± 0,018
Stražnji dio	0,065 ^{bd} ± 0,024	0,048 ± 0,018	/
Pilorički nastavci	0,109 ^{cA} ± 0,015	0,077 ^B ± 0,021	/
Crijevo			
Prednji dio	0,098 ^{cdA} ± 0,086	0,055 ^B ± 0,013	/
Srednji dio	0,100 ^{cA} ± 0,037	0,060 ^B ± 0,016	/
Stražnji dio	0,123 ^{acA} ± 0,023	0,065 ^B ± 0,017	/
Rektum	0,079 ^{bcA} ± 0,011	0,047 ^B ± 0,023	/

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (^{a, b, c, d}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (^{A, B}) statistički se značajno razlikuju na razini $P < 0,05$.



Slika 56. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – G). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), stražnjem dijelu želuca (B), piloričkim nastavcima (C), prednjem (D), srednjem (E) i stražnjem (F) dijelu crijeva te u rektumu (G).

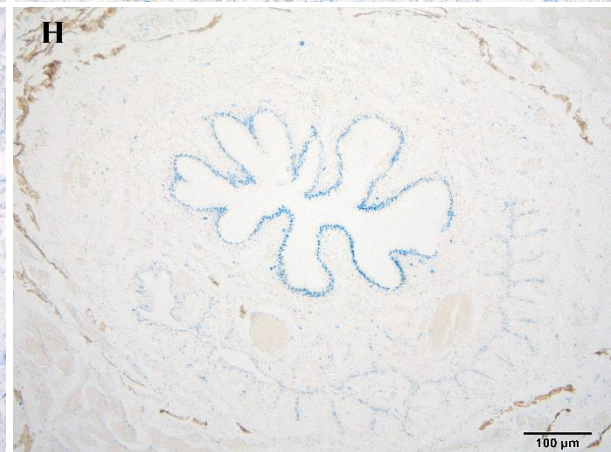
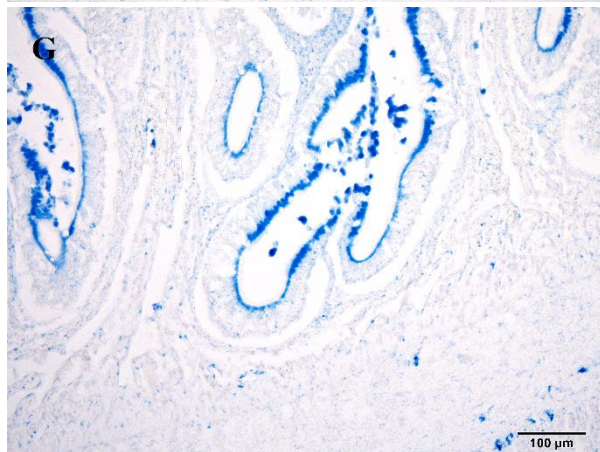
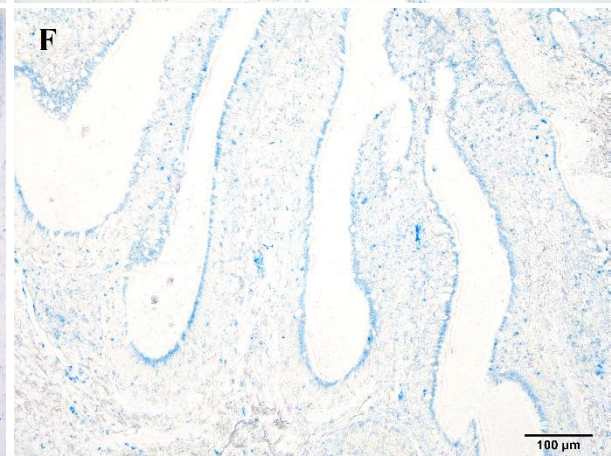
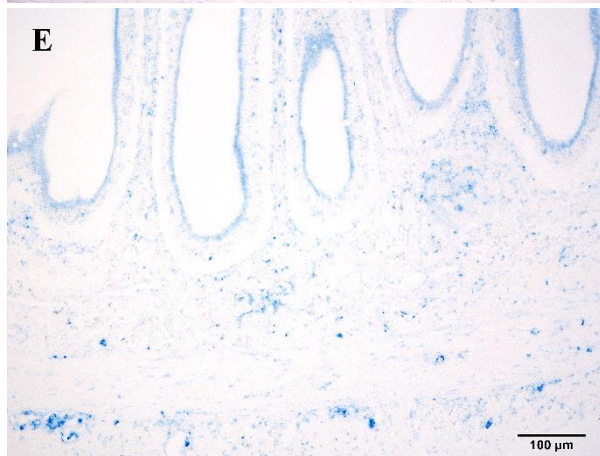
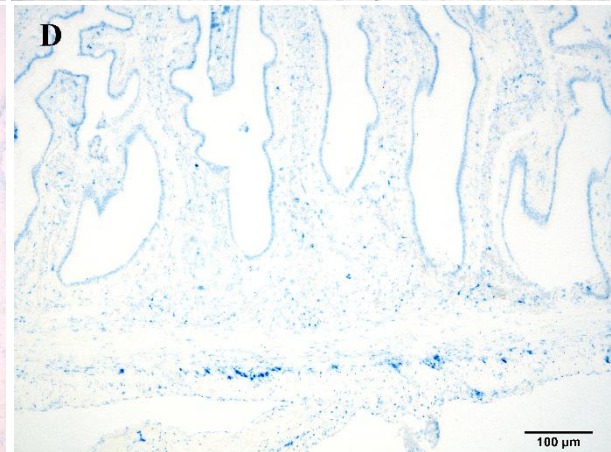
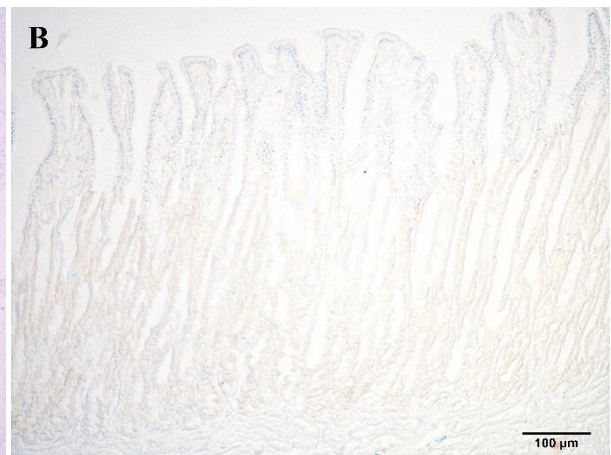
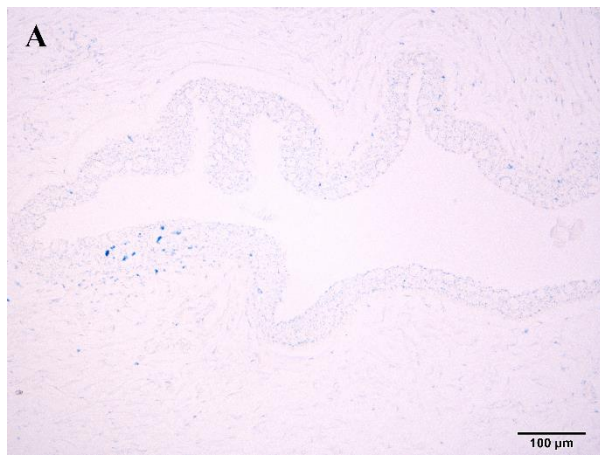
5.6.4.3. Nespecifična esteraza

SOG nespecifične esteraze prikazana je u Tablici 19. U probavnoj cijevi lastavice prasice OG nespecifične esteraze izmjerena je u epitelu svih dijelova probavne cijevi. Najviša aktivnost izmjerena je u epitelnim stanicama stražnjeg dijela crijeva. Vrijednost SOG uglavnom raste od jednjaka do stražnjeg dijela crijeva. U skladu s tim, zabilježena je statistički značajna razlika između SOG u stražnjem dijelu crijeva od onih u jednjaku, želucu, piloričkim nastavcima i rektumu. Utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti u prednjem i srednjem dijelu crijeva i vrijednosti utvrđenih u jednjaku, želucu i rektumu. Utvrđena je statistički značajna razlika između SOG u prednjem i srednjem dijelu crijeva i SOG izmjerenih u jednjaku, prednjem dijelu želuca, piloričkim nastavcima i dijelovima crijeva. Unutar vezivnog tkiva probavne cijevi intenzitet izmjerenih vrijednosti je sličan te statistički značajne razlike nisu utvrđene. Usporedbom pojedinih slojeva unutar istog dijela probavne cijevi utvrđena je statistički značajna razlika između svih SOG u epitelu i onih u vezivnom tkivu unutar crijeva.

Tablica 19. Vrijednosti nespecifične esteraze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Dio probavne cijevi	Epitel	Vezivno tkivo
Jednjak	0,025 ^c ± 0,013	/
Želudac		
Prednji dio	0,037 ^{bc} ± 0,008	/
Stražnji dio	0,036 ^{bc} ± 0,007	/
Pilorički nastavci	0,063 ^{bd} ± 0,029	0,048 ± 0,014
Crijevo		
Prednji dio	0,083 ^{adA} ± 0,026	0,047 ^B ± 0,015
Srednji dio	0,092 ^{adA} ± 0,035	0,046 ^B ± 0,015
Stražnji dio	0,112 ^{aA} ± 0,039	0,040 ^B ± 0,011
Rektum	0,048 ^{bc} ± 0,016	0,032 ± 0,023

Vrijednosti su prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Aritmetičke sredine unutar istog stupca označene različitim malim slovima (a, b, c, d) statistički se značajno razlikuju na razini P < 0,05. Aritmetičke sredine unutar istog retka označene različitim velikim slovima (A, B) statistički se značajno razlikuju na razini P < 0,05.



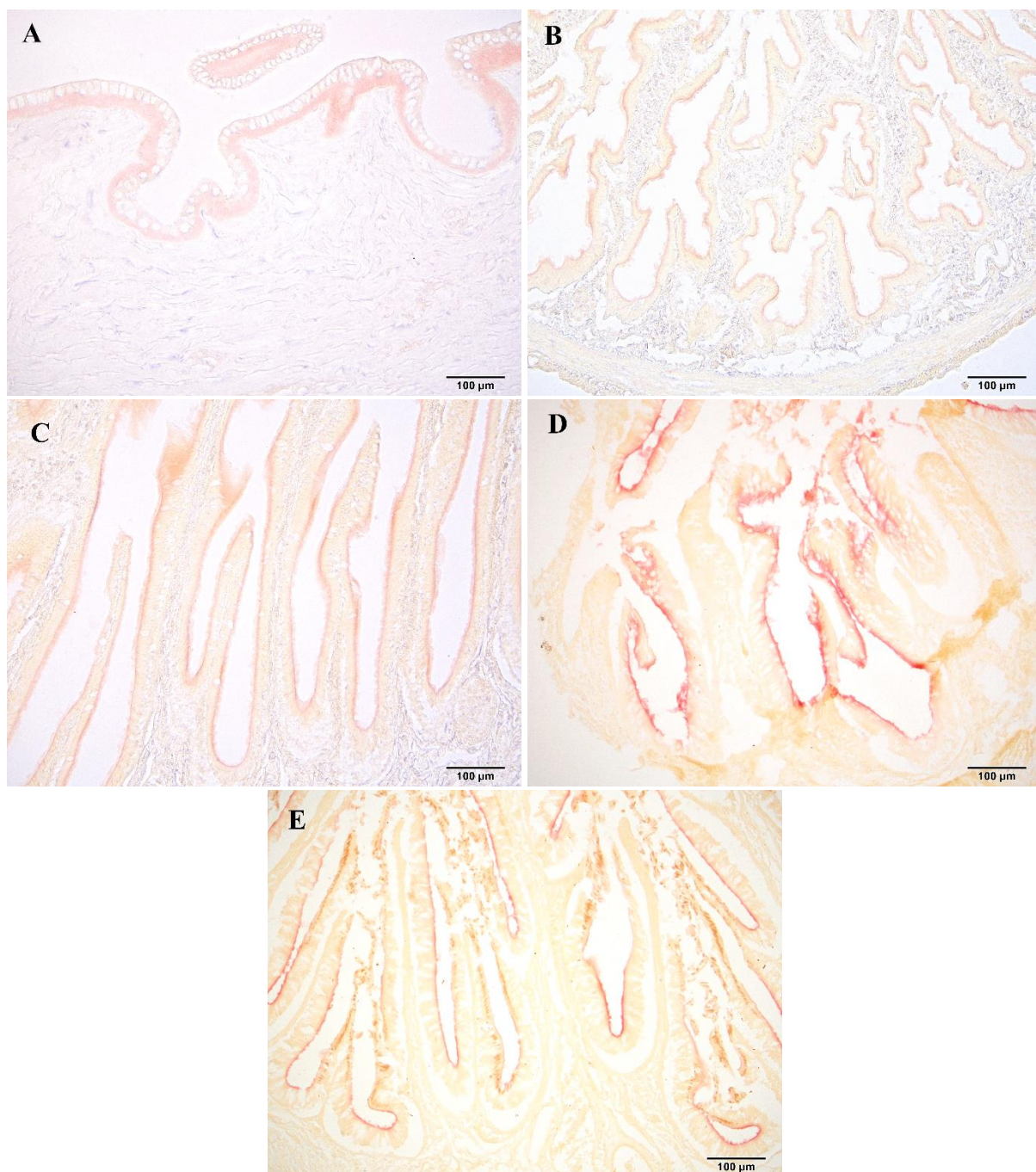
Slika 57. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – H). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, piloričkim nastavcima (D), prednjem (E), srednjem (F) i stražnjem (G) dijelu te u rektumu (H).

5.6.4.4. Aminopeptidaza

U probavnoj cijevi lastavice prasice OG aminopeptidaze izmjerena je u četkastoj prevlaci piloričkih nastavaka i crijeva te u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka (Tablica 20). Intenzitet SOG je sličan te statistički značajne razlike nisu utvrđene.

Tablica 20. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

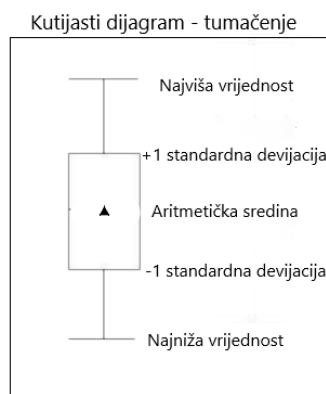
Dio probavne cijevi	Epitel	
	Četkasta prevlaka	Citoplazma
Jednjak	/	0,042 ± 0,012
Pilorički nastavci	0,118 ± 0,032	/
Crijevo		
Prednji dio	0,095 ± 0,019	/
Srednji dio	0,124 ± 0,031	/
Stražnji dio	0,117 ± 0,035	/



Slika 58. Pozitivne reakcije aminopeptidaze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), piloričkim nastavcima (B), prednjem (C), srednjem (D) i stražnjem (E) dijelu crijeva.

5.7. Usporedba enzimske aktivnosti između istraženih vrsta riba

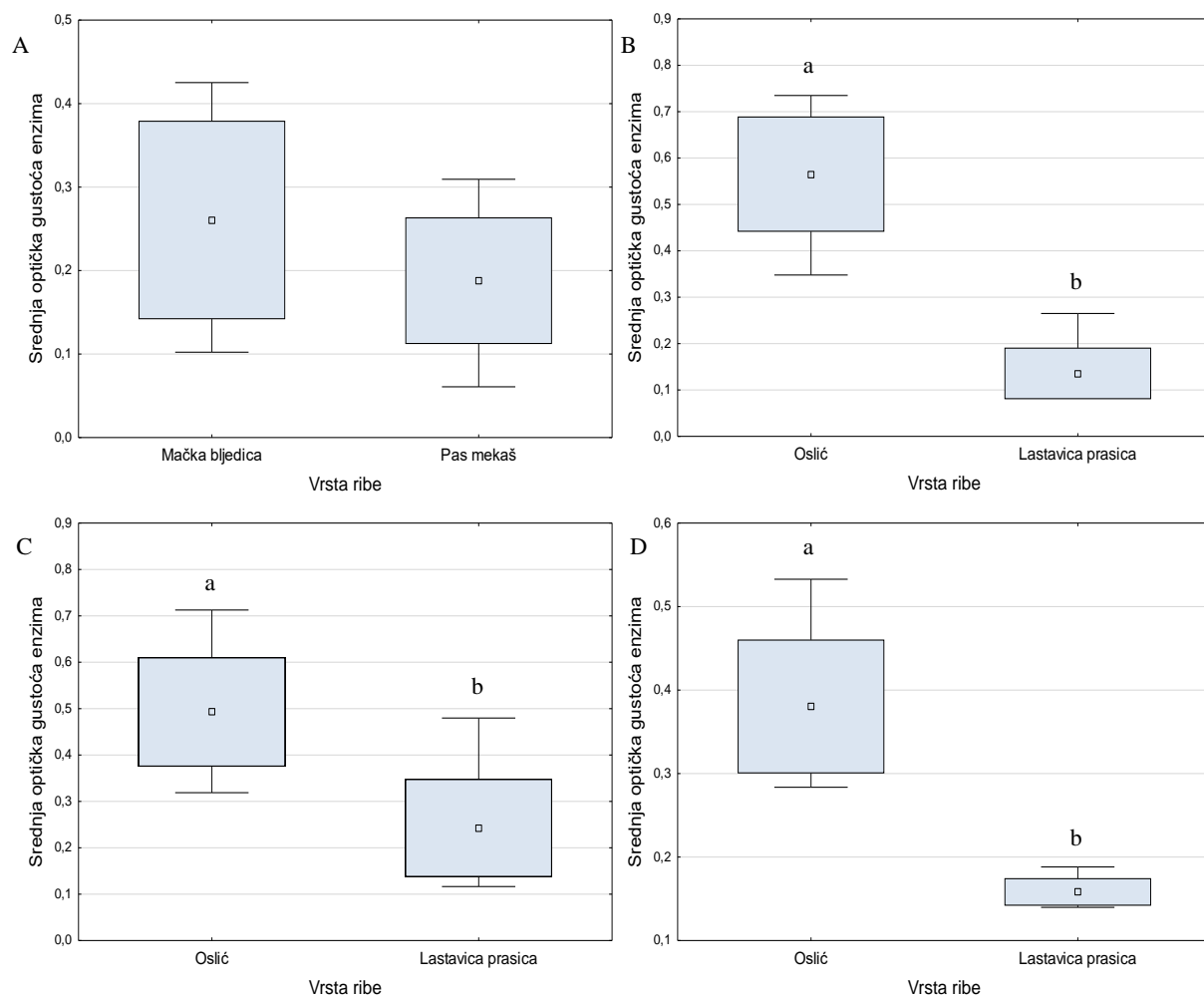
SOG enzima uspoređena je u slojevima stijenke probavne cijevi istraženih vrsta riba te je izražena kutijastim dijagramima čiji je tumač prikazan na Slici 59.



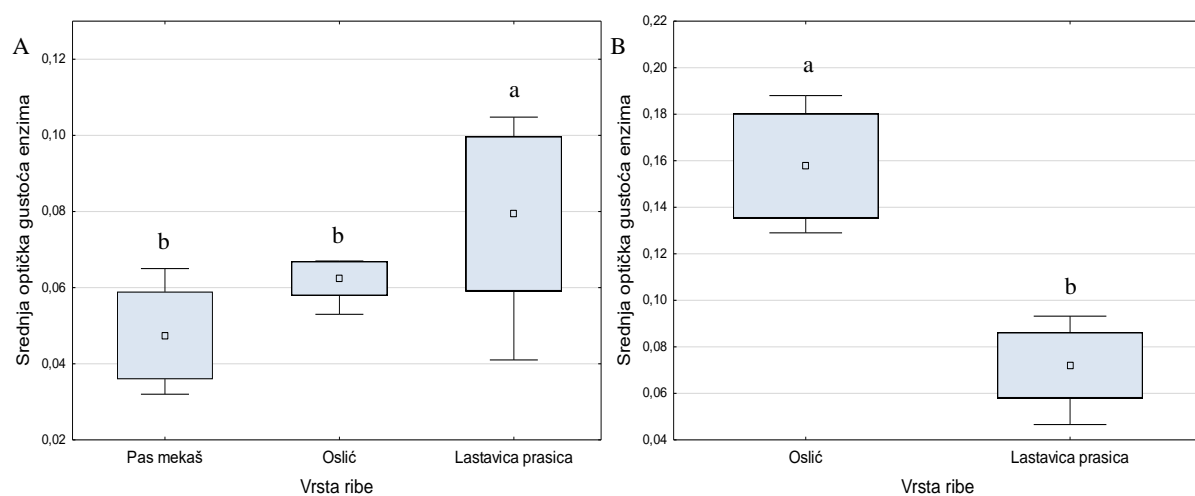
Slika 59. Tumač kutijastih dijagrama. U središtu pravokutnika naznačena je aritmetička sredina SOG enzima dok nasuprotne stranice označavaju vrijednosti standardnih devijacija. Crtama iznad pravokutnika naznačene su najviše i najniže SOG enzima. Duži pravokutnik predstavlja veću varijabilnost.

5.7.1. Alkalna fosfataza

Varijabilnosti SOG alkalne fosfataze prikazane su na Slikama 60 i 61. Slika 60 prikazuje varijabilnosti SOG u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (60A) te u dijelovima crijeva koštunjača (60B – 60D). Utvrđena je statistički značajna razlika između distribucija u prednjem (60B), srednjem (60C) i stražnjem (60D) dijelu crijeva koštunjača. Slika 61 prikazuje varijabilnosti SOG u epitelu jednjaka i rektumu. Utvrđena je statistički značajna razlika između distribucije u epitelu jednjaka psa mekaša i lastavice prasice (61A). Također, statistički značajna razlika utvrđena je između SOG epitela jednjaka i rektuma oslića i lastavice prasice (61A i 61B).



Slika 60. Grafički prikaz varijabilnosti SOG alkalne fosfataze u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (A) te četkastoj prevlaci prednjeg (B), srednjeg (C) i stražnjeg (D) dijela crijeva koštunjača. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

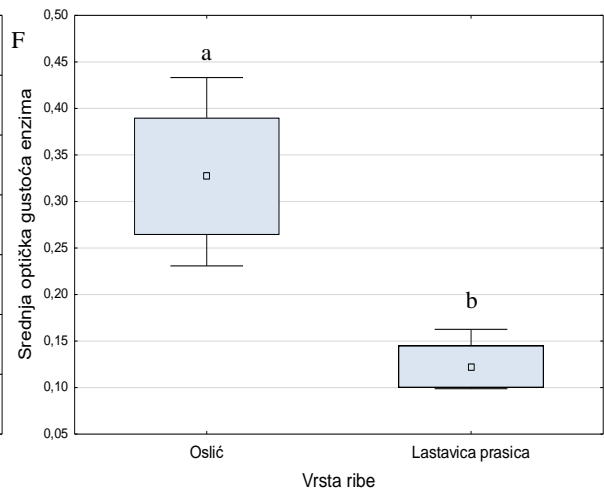
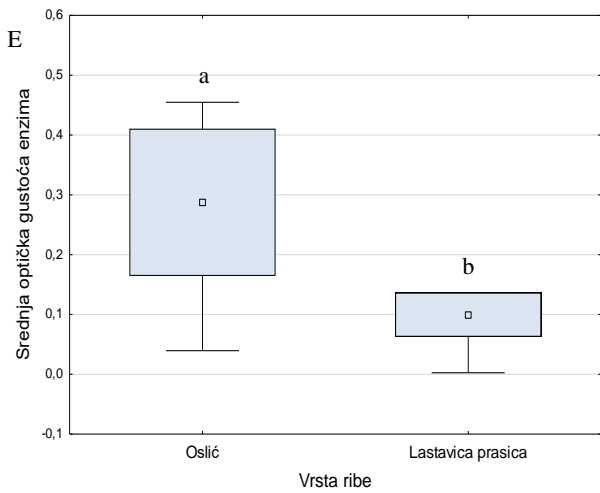
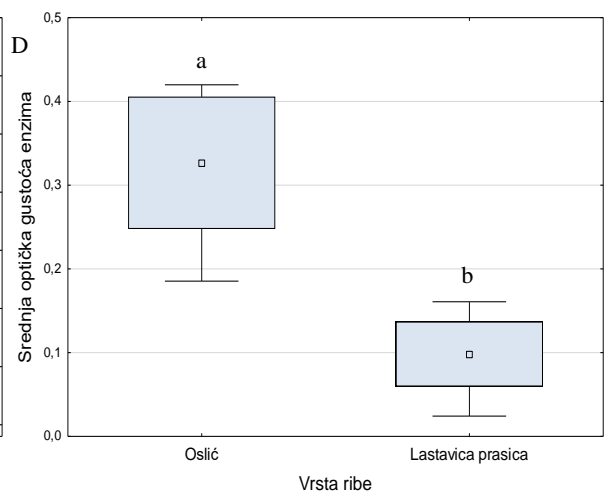
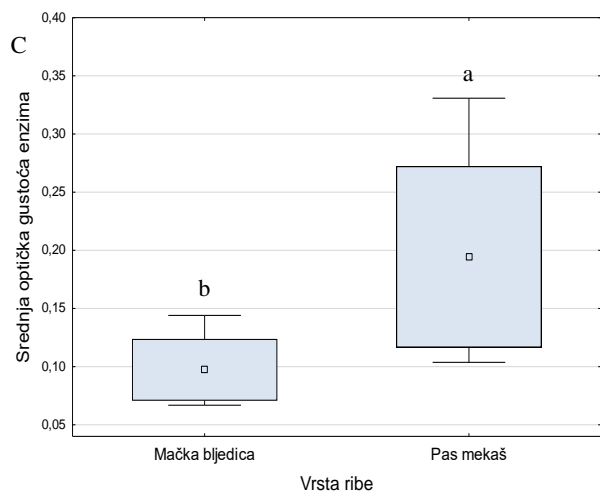
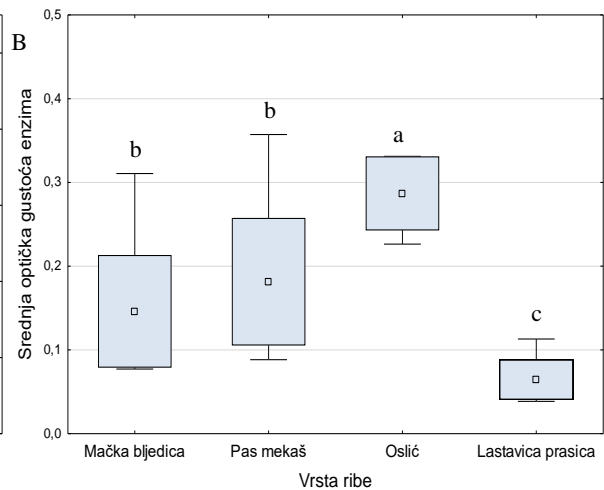
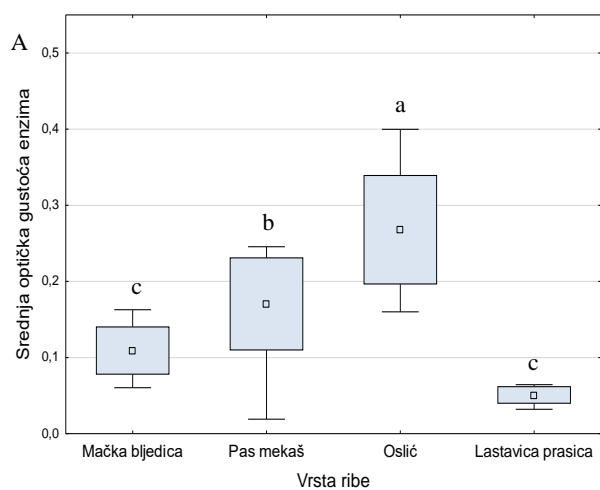


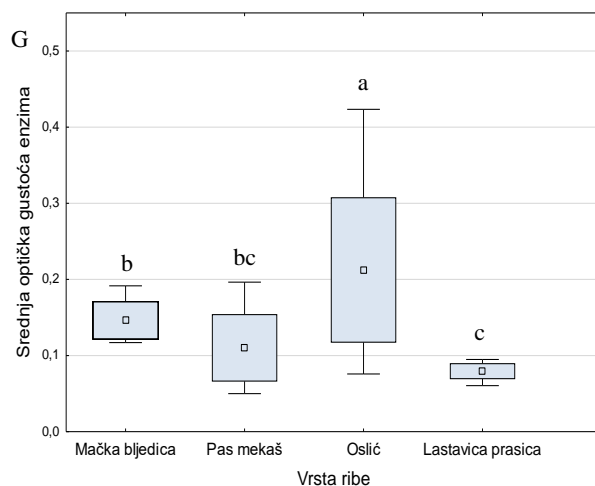
Slika 61. Grafički prikaz varijabilnosti SOG alkalne fosfataze u epitelu jednjaka (A) i rektuma (B). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

5.7.2. Kisela fosfataza

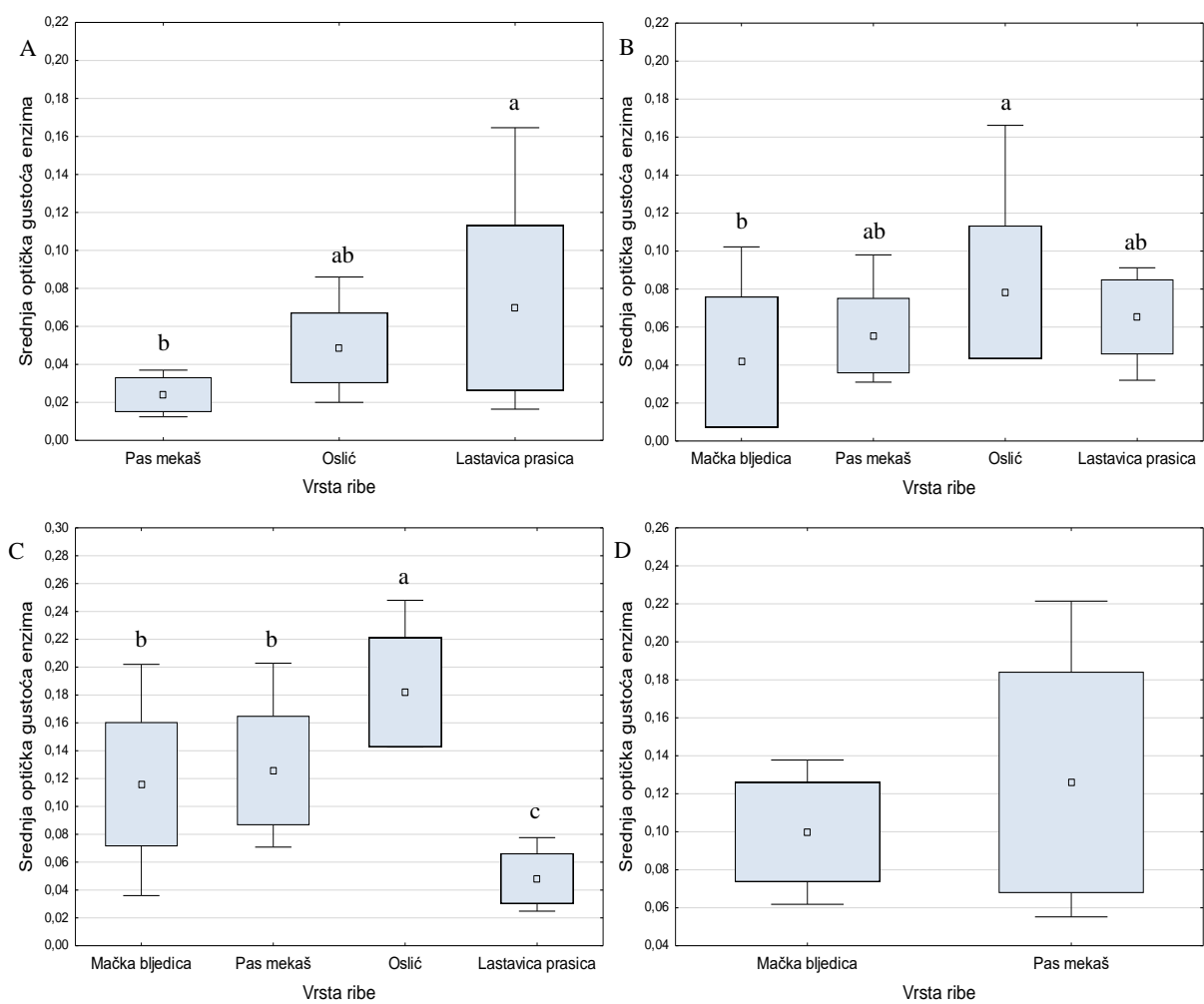
Varijabilnosti SOG kisele fosfataze prikazane su na Slikama 62 i 63. Slika 62 prikazuje varijabilnosti SOG u epitelu prednjeg (62A) i stražnjeg (62B) dijela želuca, spiralnog crijeva (62C), prednjeg (62D), srednjeg (62E) i stražnjeg (62F) dijela crijeva te epitelu rektuma (62G). Utvrđena je statistički značajna razlika između distribucija u epitelu prednjeg dijela želuca mačke bljedice u odnosu na psa mekaša i oslića, psa mekaša i svih ostalih riba te između SOG u oslića i lastavice prasice (Slika 62A). U epitelu stražnjeg dijela želuca utvrđene su statistički značajne razlike između hrskavičnjača i koštunjača te dodatno između oslića i lastavice prasice (Slika 62B). Statistički značajne razlike pronađene su u epitelu (Slike 62D – 62F) i lamini propriji (Slike 63E – 63G) svih dijelova crijeva oslića i lastavice prasice. U epitelu spiralnog crijeva utvrđene su statistički značajne razlike između SOG u hrskavičnjača (Slika 62C). Statistički značajne razlike pronađene su u epitelu rektuma mačke bljedice u odnosu na koštunjače, psa mekaša u odnosu na oslića, oslića u odnosu na sve ribe te lastavice prasice u odnosu na mačku bljedicu i oslića (Slika 62G).

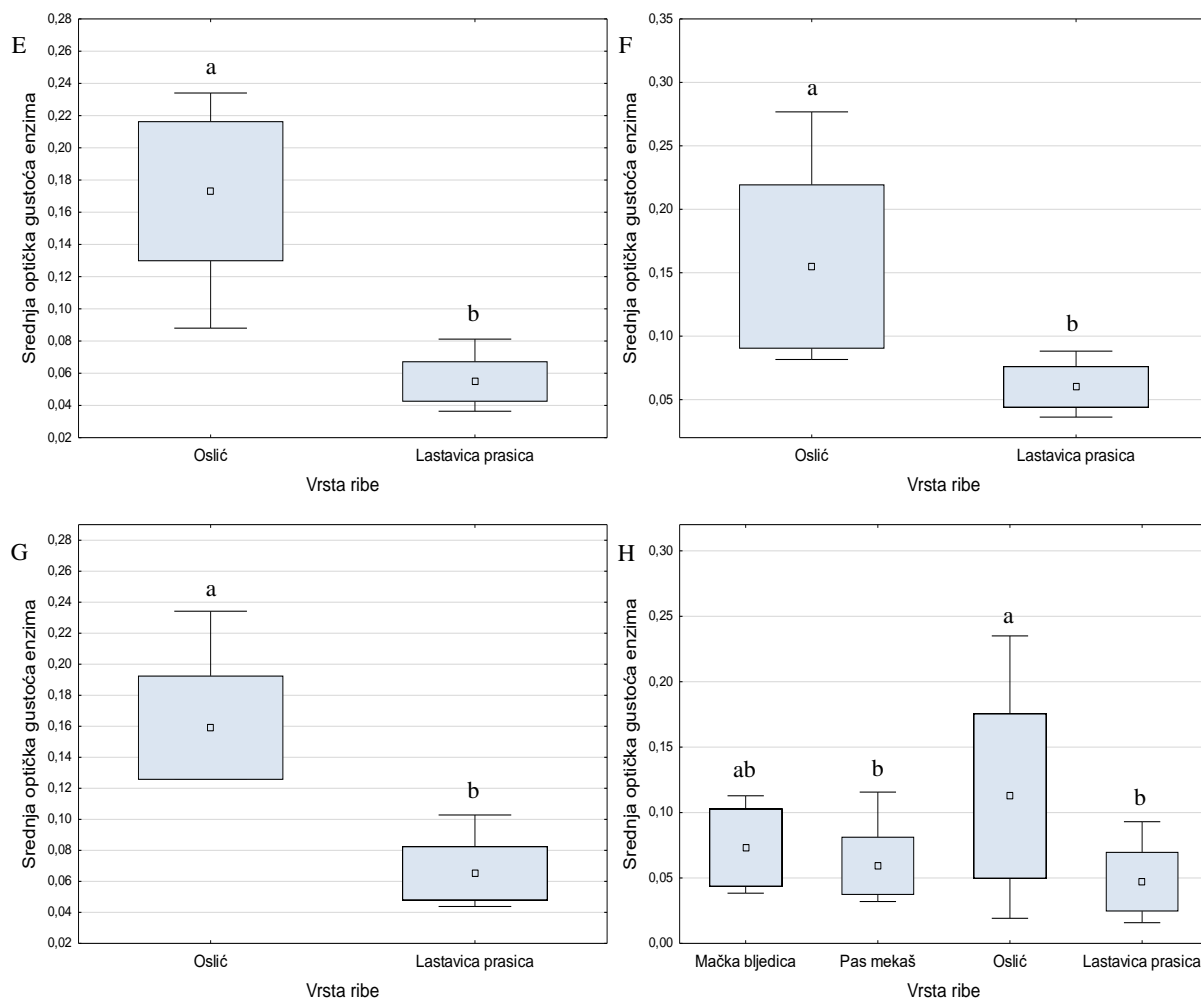
Osim prethodno navedenih značajki o varijabilnosti SOG u lamini propriji crijeva koštunjača statistički značajne razlike pronađene su i u vezivnom tkivu jednjaka, prednjeg i stražnjeg dijela želuca i rektuma. U jednjaku je utvrđena statistički značajna razlika između vrijednosti enzima u psa mekaša i lastavice prasice (Slika 63A). U prednjem dijelu želuca utvrđena je statistički značajna razlika između vrijednosti enzima u mačke bljedice i oslića (Slika 63B). U lamini propriji stražnjeg dijela želuca utvrđene su statistički značajne razlike između hrskavičnjača i koštunjača te dodatno između oslića i lastavice prasice (Slika 63C). U vezivnom tkivu rektuma pronađene su statistički značajne razlike između psa mekaša i oslića te dodatno između oslića i lastavice prasice (Slika 63H). Statistički značajne razlike pronađene su i u SOG kisele fosfataze u želučanim žlijezdama mačke bljedice u odnosu na oslića i lastavicu prasicu te dodatno lastavice prasice u odnosu na psa mekaša (Slika 64).



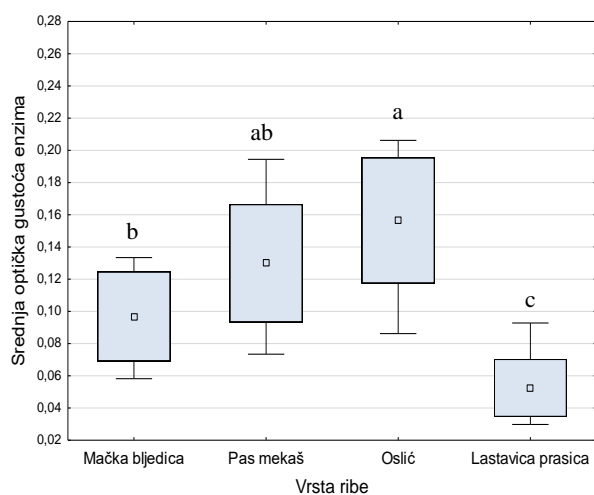


Slika 62. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u epitelu prednjeg (A) i stražnjeg (B) dijela želuca, spiralnog crijeva (C), prednjeg (D), srednjeg (E) i stražnjeg (F) dijela crijeva te u epitelu rektuma (G). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).





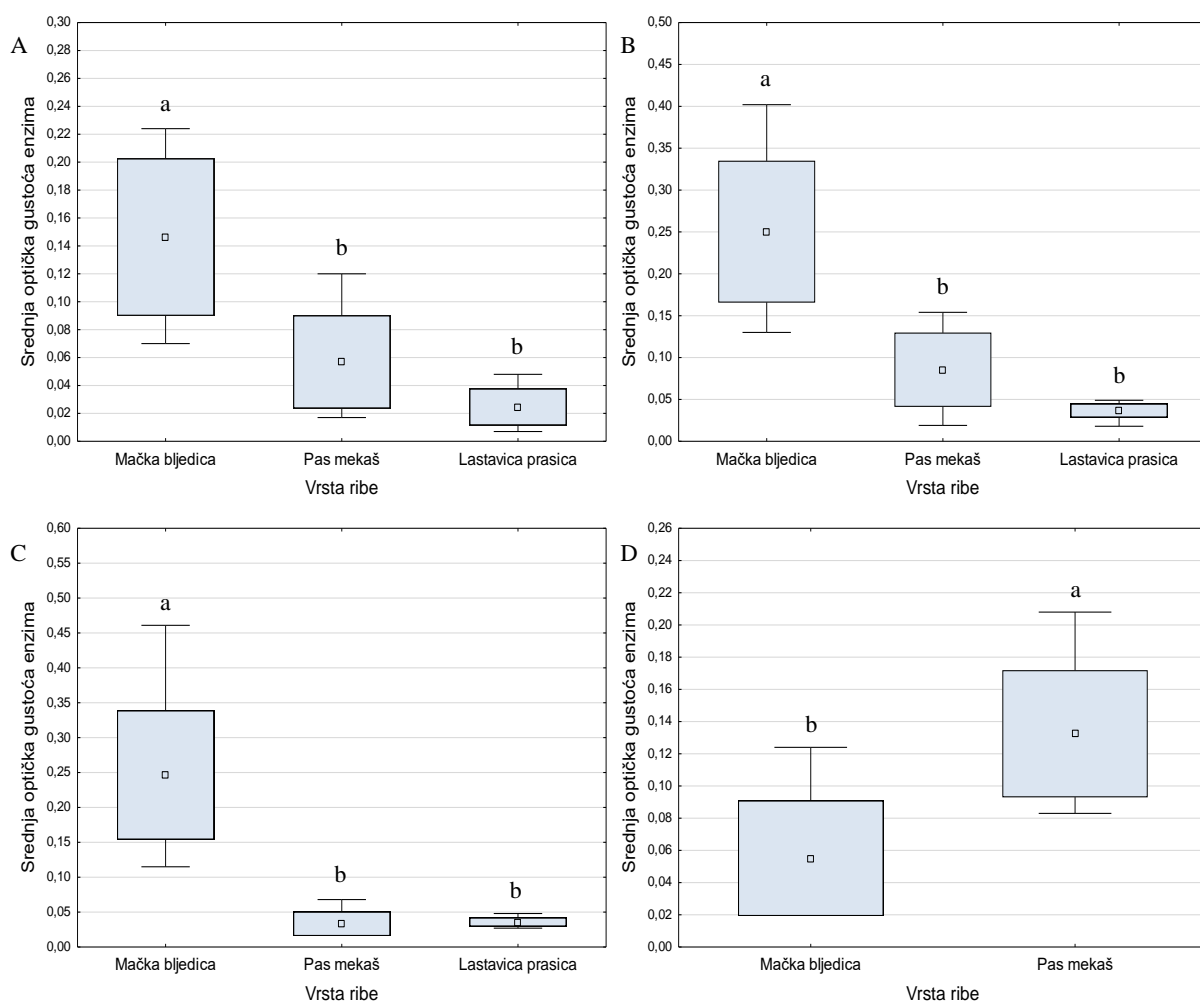
Slika 63. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u lamini propriji jednjaka (A), prednjeg (B) i stražnjeg dijela želuca (C), spiralnog crijeva (D), prednjeg (E), srednjeg (F) i stražnjeg (G) dijela crijeva te u vezivnom tkivu rektuma (H). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).

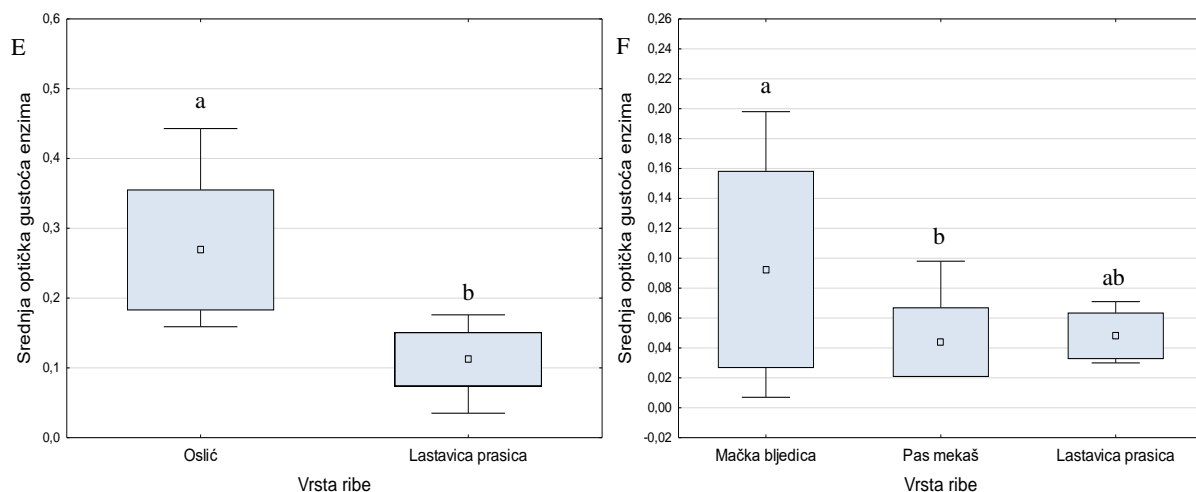


Slika 64. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u želučanim žlijezdama. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).

5.7.3. Nespecifična esteraza

Slika 65 prikazuje varijabilnosti SOG u epitelu jednjaka (65A), prednjeg (65B) i stražnjeg (65C) dijela želuca, spiralnog crijeva (65D), stražnjeg dijela crijeva (65E) te epitela rektuma (65F). Utvrđena je statistički značajna razlika između distribucija u epitelu jednjaka (65A) i želuca (65B i 65C) mačke bljedice u odnosu na psa mekaša i lastavicu prasicu. U epitelu spiralnog crijeva i rektuma statistički je značajna razlika pronađena između hrskavičnjača (65D i 65F). Između koštunjača dodatno je pronađena statistički značajna razlika u epitelu stražnjeg dijela crijeva (65E). U epitelu prednjeg i stražnjeg dijela crijeva koštunjača statistički značajna razlika SOG nije uočena. Također, statistički značajne razlike nisu uočene među vrstama riba u lamini propriji/vezivnom tkivu.

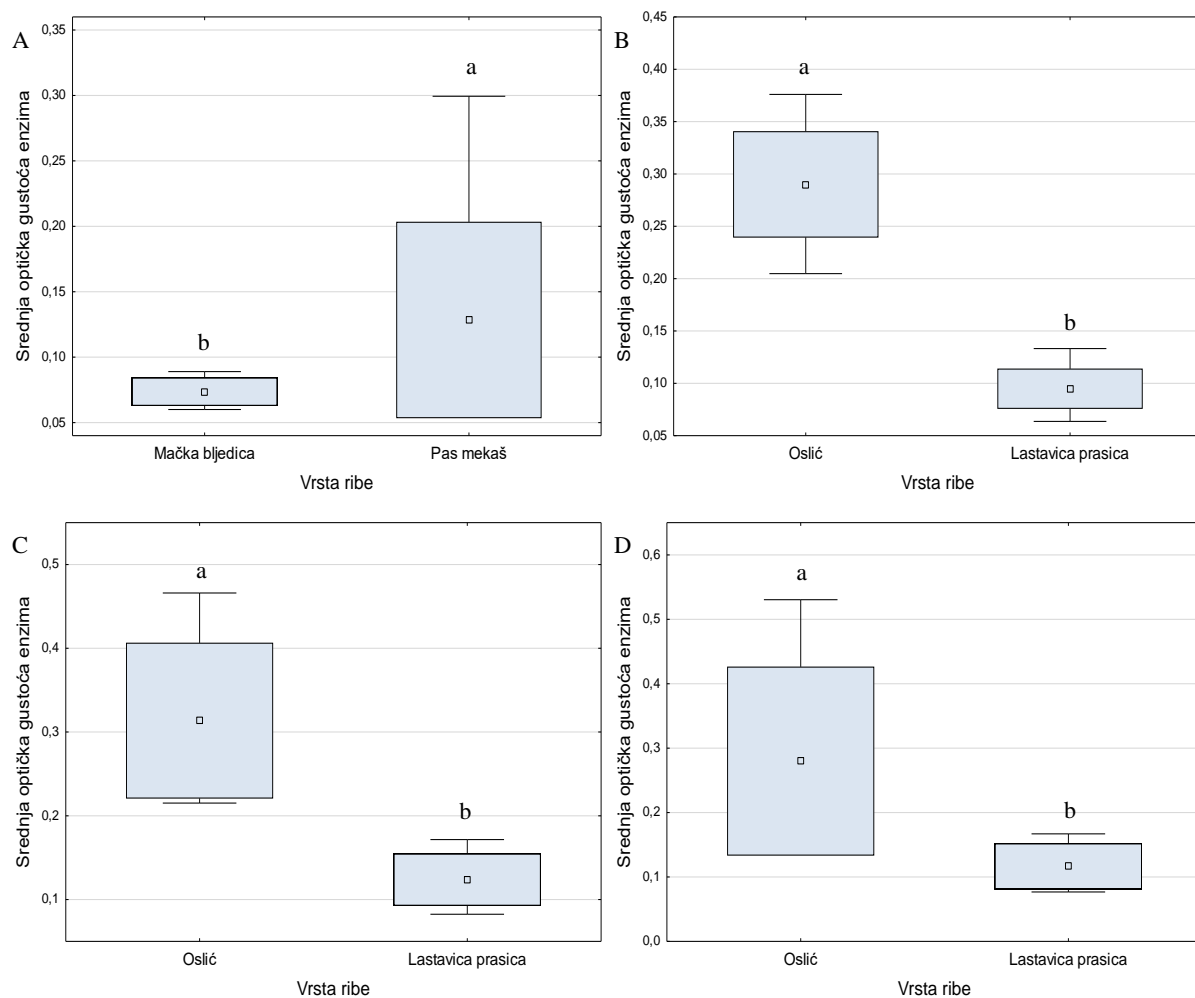




Slika 65. Grafički prikaz varijabilnosti SOG nespecifične esteraze u epitelu jednjaka (A), prednjeg (B) i stražnjeg (C) dijela želuca, spiralnog crijeva (D), stražnjeg dijela crijeva (E) te epitela rektuma (F). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

5.7.4. Aminopeptidaza

Slika 66 prikazuje varijabilnosti SOG u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (66A) te u dijelovima crijeva koštunjača (66B – 66D). Utvrđena je statistički značajna razlika između distribucija u spiralnom crijevu hrskavičnjača (66A) te u prednjem (66B), srednjem (66C) i stražnjem (66D) dijelu crijeva u koštunjača.



Slika 66. Grafički prikaz varijabilnosti SOG aminopeptidaze u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (A) te četkastoj prevlaci prednjeg (B), srednjeg (C) i stražnjeg (D) dijela crijeva koštunjača. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

6. RASPRAVA

6.1. Makroskopska građa probavnog sustava

Probavni sustav riba sastoji se od prednjeg i stražnjeg dijela probavne cijevi te od pridruženih (probavnih) žlijezda. U ovom istraživanju opisana je makroskopska građa stražnjeg dijela probavne cijevi (od jednjaka do rektuma) u dvije vrste hrskavičnjača i dvije vrste koštunjača.

Stražnji dijelovi probavne cijevi hrskavičnjača, mačke bljedice i psa mekaša, dijele mnoge sličnosti: kratki jednjak, dvodijelni želudac oblika slova „U“, kratko spiralno crijevo i rektum koji završava kloakom.

U koštunjača, oslića i lastavice prasice jednjak i želudac također dijele sličnosti (kratki jednjak i dvodijelni želudac oblika slova „Y“) dok su glavne razlike u makroskopskoj građi uočene u dijelu probavnog sustava od piloričkih nastavaka do rektuma (prisutnost piloričkih nastavaka u lastavice prasice i veća relativna dužina crijeva u odnosu na oslića).

U istraženih hrskavičnjača, mačke bljedice i psa mekaša, jednjak je kratka i ravna cijev koja se ulijeva u želudac. Nasuprot opisima jednjaka u prečnousta (FÄNGE i GROVE, 1979.; HOLMGREN i NILSSON, 1999.; WILSON i CASTRO, 2011.) u mačke bljedice i psa mekaša ni na jednom primjerku nisu uočene kaudalno orijentirane izbočine sluznice jednjaka.

U istraženih koštunjača, oslića i lastavice prasice, jednjak je također kratka i ravna cijev koja se ulijeva u želudac.

Na temelju usporedbe makroskopske građe jednjaka istraženih vrsta hrskavičnjača i koštunjača može se zaključiti da u obje skupine riba jednjak predstavlja kratku i ravnu cjevastu strukturu. U obje skupine riba sluznica jednjaka posjeduje uzdužne nabore usmjerene prema želucu. Takav se nalaz slaže s opisom u literaturi (BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.; FERGUSON, 2006.; WILSON i CASTRO, 2011.; RAHMAN i sur., 2013.). Temeljem svega navedenog može se zaključiti da je u obje skupine istraženih riba makroskopska građa jednjaka slična. Izravnavanje nabora sluznice jednjaka doprinosi olakšavanju akta gutanja putem izravnavanja nabora i povećanja promjera jednjaka prilikom prolaženja hrane.

U istraženih hrskavičnjača, mačke bljedice i psa mekaša, želudac je oblika slova „U“ te je slične makroskopske građe. Prednji dio želuca završava kratkim slijepim dijelom te zatim prelazi u silazni stražnji dio koji je usmjeren kranijalno. U mačke bljedice stražnji dio doseže gotovo do ravnine ulaska jednjaka u želudac dok u psa mekaša doseže do prednje trećine želuca.

U istraženih koštunjača, oslića i lastavice prasice, želudac je oblika slova „Y“ te je slične makroskopske građe. U navedenih vrsta prednji se dio vrlo brzo spaja sa stražnjim te se izdužuju u dugačku slijepu vreću. Stražnji dio doseže gotovo do ravnine ulaska jednjaka u želudac.

Iako je opisano da čak 15 % svih vrsta adultnih riba nema želudac (FERGUSON, 2006.), sve istražene vrste riba u ovom radu imaju razvijen želudac čija se morfologija razlikuje. U hrskavičnjača želudac je oblika slova „U“, a u koštunjača oblika slova „Y“. U obje skupine riba želudac se sastoji od dva dijela: prednjeg koji se proteže do kaudalnog zavoja te stražnjeg koji završava piloričkim sfinkterom. U odnosu na prednji dio stražnji dio deblje je stijenke i posljedično manjeg lumena. Suprotno rezultatu koji su iznijeli CHATCHAVALVANICH i sur. (2006.) u istraživanju na slatkovodnoj raži (*Himantura signifer*), nalazi dobiveni ovim istraživanjem sugeriraju kako je stražnji dio želuca u hrskavičnjača mnogo duži od samo jedne trećine njegove ukupne dužine dok u koštunjača ta proporcija odgovara upravo jednoj trećini. Na temelju navedenog može se zaključiti da je izduženi oblik želuca u istraženih vrsta riba funkcionalno prilagođen kako za ingestiju dugačkog plijena, tako i za veću učinkovitost djelovanja probavnih enzima.

U istraženih hrskavičnjača, mačke bljedice i psa mekaša, crijevo se sastoji od prednjeg i spiralnog dijela. Karakteristična značajka spiralnog crijeva je prisutnost nabora (zalistaka). Uloga nabora je usporavanje prolaska sadržaja kroz crijevo i povećavanje dodirne površine za djelovanje enzima. Time se unaprijeđuje razgradnja i apsorpcija hranjivih tvari, povećavajući samu funkcionalnost crijeva hrskavičnjača. U istraženih hrskavičnjača rektum je kratak i ravan te se u njega otvara izvodni kanal rektalne žlijezde. Srednja vrijednost relativne dužine crijeva između mačke bljedice i psa mekaša je slična.

U istraženih koštunjača, oslića i lastavice prasice, s obzirom na makroskopski izgled stijenke, crijevo se sastoji od prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela. U lastavice prasice dodatno se u prednji dio crijeva ulijevaju pilorički nastavci. U istraženih koštunjača rektum je kratak i ravan. Dodatno je u oslića vidljiva pigmentacija stijenke. Srednja vrijednost relativne dužine crijeva lastavice prasice dvostruko je veća od one u oslića.

Uzimajući u obzir specifičnosti u prehrani raznih vrsta riba, postoje varijacije u njihovom probavnom sustavu. Jedna od očitijih varijacija je u relativnoj dužini probavnog sustava koja može ukazivati na prilagodbe vrste u vezi s dobi, dostupnošću hrane, prehrambenim navikama i drugim ekološkim čimbenicima (RIBBLE i SMITH, 1983.; KRAMER i BRYANT, 1995.; KOZARIĆ, 2001.; WAGNER i sur., 2009.; RAY i RINGØ,

2014.). U svojem istraživanju WAGNER i sur. (2009.) iznose podatak da bi dužina crijeva trebala biti ona minimalno potrebna za adekvatnu apsorpciju hranjivih tvari.

Biljožderne ribe imaju veću relativnu dužinu crijeva u usporedbi sa sveždernim i mesoždernim ribama (KRAMER i BRYANT, 1995.; KOZARIĆ, 2001.; RINGØ i sur., 2003.; BALLANTYNE, 2014.; RAY i RINGØ, 2014.; AKIN i sur., 2016.; MOKHTAR, 2017.). U biljoždernih riba želučane proteinaze ne mogu probaviti celulozu i škrob iz biljaka. Uloga želuca u njih više je usmjerena na antimikrobno djelovanje klorovodične kiseline i maceraciju hrane. Tako macerirana biljna hrana pogodnija je za djelovanje karbohidraza podrijetlom iz gušterače i crijeva. Stoga se smatra da u biljoždernih riba probava biljnog materijala započinje u prednjem, a apsorpcija se odvija u stražnjem dijelu crijeva (ZIHLE, 1982.). Veća dužina crijeva u biljoždernih riba proizlazi iz teže probavljivosti vlakana u biljnoj hrani te posljedično razvijenih mehanizama u svrhu povećanja površine za probavljivost i apsorpciju hranjivih tvari.

Mesožderne ribe konzumiraju više bjelančevina u prehrani. Bjelančevine se probavljaju putem proteinaza iz želuca, gušterače i crijeva. S obzirom na veliku aktivnost proteinaza u želucu u mesoždernih riba u crijevu se većinom odvijaju procesi apsorpcije (ZIHLE, 1982.). Posljedično, mesožderne ribe imaju kraći probavni sustav od biljoždernih te im je potrebno manje vremena za probavu (VIDAL i sur., 2022.). NIKOLSKY (1963.) zaključuje da je u mesoždernih riba dužina crijeva manja od ukupne dužine tijela riba. Taj je rezultat u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Specifičnost se javlja u mesoždernih riba koje konzumiraju hranu s više teže probavljivih ugljikohidrata kao što je hitin (KROGDAHL i sur., 2005.).

Varijacije u dužini crijeva uočene su među istraženim vrstama riba unatoč sličnim prehranbenim navikama. U odnosu na ukupnu dužinu tijela dužina crijeva u hrskavičnjača relativno je kratka, a srednja vrijednost relativne dužine crijeva između mačke bljedice i psa mekaša je slična. U istraživanju koje su proveli KOUTSENI i sur. (2017.a) na 432 mačke bljedice zaključeno je kako relativna dužina crijeva ulovljenih riba iznosi $0,34 \pm 0,03$ ($0,25 - 0,41$). Rezultati ovog istraživanja u skladu su s gore navedenim rasponom, s tim da je nešto niži rezultat moguća posljedica manjeg broja uzoraka. U dostupnoj literaturi nema podataka o relativnoj dužini crijeva psa mekaša, stoga komparaciju rezultata nije moguće napraviti.

Posebnost prehrane lastavice prasice, u usporedbi s ostalim istraženim vrstama, izražena je u dominaciji rakova kao ključnog elementa prehrane u adultnih jedinki. Zbog teže probavljive hitinske ljuštore rakova u lastavice prasice razvili su se dodatni mehanizmi u probavnom sustavu koji omogućavaju razgradnju ovog materijala i apsorpciju hranjivih tvari. Prvi takav mehanizam uključuje piloričke nastavke. U prednji dio crijeva lastavice prasice

otvaraju se sa svake strane po četiri pilorička nastavka, koji značajno povećavaju površinu crijeva. Zahvaljujući tom povećanju površine, pilorički nastavci omogućuju intenziviranu apsorpciju hranjivih tvari (EGERTON i sur., 2018.). Drugi mehanizam koji omogućuje produženje kontakta s enzimima te posljedičnu efikasniju probavu je dužina i zavojitost crijeva. Relativna dužina crijeva veća je u lastavice prasice nego u oslića. U pretraženoj literaturi nema podataka o relativnoj dužini crijeva oslića i lastavice prasice. KOZARIĆ i sur. (2011.) u istraživanju provedenom na kokotiću oštruljiću (*Lepidotrigla cavillone*) utvrđuju da je dužina crijeva gotovo jednaka dužini ribe. Rezultati ovog istraživanja pokazali su sličan nalaz u lastavice prasice, gdje je relativna dužina crijeva $0,88 \pm 0,13$. Nasuprot tome, u oslića je relativna dužina crijeva znatno manja, odnosno $0,433 \pm 0,16$.

U ovom istraživanju primijećene su blage varijacije u dužini crijeva čak i unutar riba sa sličnom ukupnom dužinom tijela. WAGNER i sur. (2009.) navode da razlike u dužini crijeva unutar iste vrste mogu biti posljedica sposobnosti organizma da mijenja svoje tjelesne karakteristike u odgovoru na promjene u okolišu. Dodatno, autori zaključuju kako dužina crijeva ne raste linearno s veličinom ribe. Sagledavajući informacije iz literature i komparirajući ih s rezultatima ovog istraživanja, može se zaključiti da dužina crijeva u riba nije samo u korelaciji s ukupnom dužinom tijela, već je podložna varijacijama koje mogu biti odraz adaptivnih mehanizama na promjene u okolišu.

Pojedini autori u potpunosti isključuju povezanost između dužine crijeva i načina prehrane (HARDER, 1975.; HORN, 1998.). S obzirom na sličnost prehrane riba korištenih u ovom istraživanju potrebno je u budućnosti istražiti iste parametre u biljoždernih morskih riba.

6.2. Mikroskopska građa probavnog sustava

U ovom istraživanju opisana su histološka i histokemijska obilježja stražnjeg dijela probavne cijevi (od jednjaka do rektuma) u dvije vrste hrskavičnjača i dvije vrste koštunjača.

Probavni sustavi hrskavičnjača, mačke bljedice i psa mekaša, dijele mnoge sličnosti: isti tip pokrovnog epitela u jednjaku, želucu i spiralnom crijevu, jednostanične mukozne žlijezde u epitelu svih dijelova osim u želucu, žlijezde u lamini propriji želuca, dobro razvijena muskularis mukoze u želucu i spiralnom crijevu, jedinstveni sloj vezivnog tkiva u rektumu, slično razvijeni mišićni dijelovi stijenke probavne cijevi. Razlike u mikroskopskoj građi uočene su u tipu epitela koji oblaže rektum, sadržaju mukoznih žlijezdi te u prisutnosti muskularis mukoze u dijelu jednjaka ispod Leydigovog organa.

Probavni sustavi koštunjača, oslića i lastavice prasice, dijele mnoge sličnosti: isti tip pokrovnog epitela u svim segmentima stražnjeg dijela probavne cijevi, jednostanične mukozne žlijezde u epitelu svih dijelova osim u želucu, žlijezde u lamini propriji želuca, dobro razvijena muskularis mukoze u želucu te njezin nedostatak u prednjem i srednjem dijelu crijeva, slično razvijeni mišićni dijelovi stijenke pojedinih organa te seroza kao vanjski sloj probavne cijevi. Razlike u mikroskopskoj građi uočene su u sadržaju mukoznih žlijezdi te u pojavnosti muskularis mukoze jednjaka.

Jednostanične mukozne žlijezde nalaze se između stanica pokrovnog epitela u svim dijelovima probavnog sustava, s iznimkom želuca. Osim u zaštiti sekret mukoznih žlijezda potpomaže prolazak hrane, ima antibakterijski učinak te također ima uloge u obrane protiv virusa i u osmoregulaciji (GENTEN i sur., 2009.; KIM i HO, 2010.; WILSON i CASTRO, 2011.). Mukozne žlijezde dijele se prema sastavu sekreta na one koje sadrže dominantno kisele ili neutralne mucine, te one miješanog sastava.

Kiseli mucini (AB + PAS -) sastoje se od sulfomucina, sialomucina, proteoglikana i hijaluronske kiseline. Sastav kiselih mucina povezuje se s maceracijom hrane čime doprinose zaštiti sluznice prilikom prolaska ingesta (DÍAZ i sur., 2003.; PETRINEC i sur., 2005.). Zbog visoke viskoznosti njihova sadržaja omogućuju vezivanje čestica za enzimsku površinu (VIEIRA-LOPES i sur., 2013.) te time imaju ulogu u imunskoj obrani organizma.

AB - PAS + mucini sastoje se od mucina neutralna sastava. Neutralni mucini su niske viskoznosti. Njihova uloga očituje se u zaštiti sluznice od mehaničkih ozljeda, olakšavaju apsorpciju lako probavljivih molekula i razgradnju velikih čestica hrane (PETRINEC i sur., 2005.; DÍAZ i sur., 2008.; CARDOSO i sur., 2015.). Navedeno se, kao i njihovo svojstvo da doprinose regulaciji kiselosti sekreta, povezuje s probavom prije želuca (FACCIOLI i sur., 2016.; COHEN i sur., 2020.).

AB + PAS + mucini sastoje se i od kiselih i od neutralnih mucina te imaju karakteristike oba tipa.

U istraženih hrskavičnjača mikroskopska građa jednjaka različita je s obzirom na prisutnost Leydigovog organa u podsluznici. Sluznicu jednjaka ispod Leydigovog organa oblaže epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog s izdancima na apikalnom dijelu. U dijelu jednjaka koji ne sadrži Leydigov organ prisutan je mnogoslojni kubični neoroženi epitel. Mnogoslojni neoroženi epitel najčešći je primjer epitela koji se pojavljuje u jednjaku. Nalaz mnogoslojnog epitela u jednjaku mačke bljedice opisali su MATTISSON i FÄNGE (1982.) dok LEAKE (1975.) tvrdi da je jednjak mačke bljedice obložen mnogoslojnim visokoprizmatičnim epitelom s trepetljikama. Nadalje, CHATCHAVALVANICH i sur.

(2006.) opisuju epitel u jednjaku slatkovodne raže kao mnogoslojni pločasti neoroženi epitel bez specijaliziranih struktura na staničnoj površini.

U istraženih koštunjača, oslića i lastavice prasice, u jednjaku je utvrđen mnogoslojni pločasti neoroženi epitel. Takav tip pokrovnog epitela tipičan je za jednjak u koštunjača te se slaže s opisom u literaturi (HARDER, 1975.; LEAKE, 1975.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; BOČINA i sur., 2016.).

U dostupnoj literaturi nema opisa specifičnih razlika u građi jednjaka s obzirom na prisutnost Leydigova organa. MATTISSON i FÄNGE (1982.) opisuju postojanje dorzalnog i ventralnog dijela Leydigova organa u mačke bljedice. Leydigov organ predstavlja nakupine limfomijeloidnog tkiva koje se nalaze u jednjaku određenih vrsta hrskavičnjača. Uzimajući u obzir činjenice o opisu makroskopske lokacije Leydigova organa, može se zaključiti kako različita mikroskopska građa dvaju dijelova sluznice jednjaka hrskavičnjača proizlazi iz specifičnih funkcija pokrovnog epitela povezanih s prisutnošću ili odsutnošću Leydigova organa. Na apikalnom dijelu epitelnih stanica jednjaka u hrskavičnjača pronađene su specijalizirane stanične tvorbe. Za pretpostaviti je da uz nabore sluznice ti izdanci na apikalnom dijelu epitela iznad Leydigova organa mogu imati ulogu u poticanju pomicanja hrane prema želucu. Dodatno, uloga apikalnih izdanaka stanica u ovom dijelu može biti povezana s povećanjem apsorpcijske površine epitela i sudjelovanjem u imunosnoj obrani organizma, omogućavajući veći kontakt antigena iz sadržaja jednjaka s limfomijeloidnim tkivom Leydigova organa. U riba su opisani mikrovili koji mogu doseći dužinu i od 7,5 μm , a njihova dužina dodatno varira s obzirom na dio probavnog sustava (CHENG i sur., 2016.). FÄNGE i GROVE (1979.) tvrde da je u riba osnovnom metodologijom teško razlikovati radi li se o dugačkim mikrovilima ili trepetljikama. Za zaključak o tome radi li se o trepetljikama ili mikrovilima potrebna je posebna metodologija pripreme uzoraka, kao i dodatna oprema poput elektronskog mikroskopa (CHENG i sur., 2016.).

U istraživanju provedenom na kostelju (*Squalus acanthias*), žutuzi (*Dasyatis pastinaca*) i raži kamenici (*Raja clavata*) KUZ'MINA i sur. (2019.) definiraju kako debljina glikokaliksa iznosi 0,1 μm te dodatno ističu njegove važne uloge. Glikokaliks sudjeluje u probavi hranjivih tvari tako da razdvaja molekule prema veličini i naboju, doprinosi kretanju hranjivih tvari prema apikalnoj membrani enterocita te obavlja receptorske funkcije. Također, osim u probavi glikokaliks sudjeluje u imunosnoj obrani organizma tako da sprječava dublje prodiranje bakterija.

Mnogoslojni neoroženi epiteli s jednostaničnim mukoznim žlijezdama, koji se nalaze u dijelu jednjaka istraženih hrskavičnjača te u jednjaku koštunjača, imaju višestruku ulogu. Zbog

debljine slojeva i sekreta mukoznih žlijezda može se zaključiti da ovaj epitel sprječava mehanička oštećenja stijenke koja bi mogla biti povezana s gutanjem riba i rakova koji dominiraju u prehrani navedenih riba.

U jednjaku istraženih riba mukozne stanice uglavnom sadrže kiseli sekret koji ima ulogu u maceraciji hrane i može biti povezan s pripremom sluznice jednjaka za prolaz zalogaja. Osim toga, prisutnost ovog tipa stanica u jednjaku može biti povezana s održavanjem imunosne barijere sluznice putem sposobnosti vezivanja čestica za njihovu površinu. U jednjaku hrskavičnjača, pronađeni su i neutralni mucini, kao i mucini mješovitog sastava. U njih različiti tipovi mucina u jednjaku mogu odražavati utjecaj Leydigova organa u podsluznici, ali i specifičnosti kratkog probavnog sustava hrskavičnjača. Sagledavajući dobivene rezultate, može se iznijeti zaključak da je zaštitna funkcija epitela djelomično usmjerena na obrambenu ulogu (karakteristična za mucine s obilježjima oba tipa), ali i većim dijelom na mehaničku zaštitu i pomoć u razgradnji hrane prije nego što dopije u želudac (neutralni mucini).

U svih istraženih jedinki želudac je obložen jednoslojnim visokoprizmatičnim epitelom čiji je apikalni dio stanice ispunjen mucinima. Specifičnost ovog tipa epitela u odnosu na epitel ostalih dijelova probavne cijevi je da ovdje želučane visokoprizmatične stanice izlučuju mucine (WILSON i CASTRO, 2011.). Nalaz ovog tipa epitela u skladu je s opisima u literaturi (HART i sur., 1986.; PETRINEC i sur., 2005.; DÍAZ i sur., 2008.; GENTEN i sur., 2009.; WILSON i CASTRO, 2011.; 2008.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; CARDOSO i sur., 2015.; BOČINA i sur., 2016.).

U istraženih hrskavičnjača želudac je obložen jednoslojnim visokoprizmatičnim epitelom čiji je apikalni dio stanice ispunjen mucinima. Dokazani mucini sadrže sekret mješovitog sastava.

U istraženih koštunjača, želudac je također obložen jednoslojnim visokoprizmatičnim epitelom čiji je apikalni dio stanice ispunjen mucinima. Sastav mukoznog sekreta u apikalnom dijelu visokoprizmatičnih epitelnih stanica želuca razlikuje se u oslića i lastavice prasice. U želucu oslića prevladava nalaz mucina neutralna sastava dok u lastavice prasice prevladava nalaz kiselih mucina koji prema tijelu želučanih žlijezda prelaze u mucine miješanog sastava.

CHATCHAVALVANICH i sur. (2006.) navode da u hrskavičnjača nije prepoznata apsorpcijska uloga mucina koja je opisana u koštunjača. Također, opisali su prisutnost neutralnih mucina u želucu slatkovodne raže, što samo djelomično odgovara nalazima u mačke bljedice i psa mekaša. ALLEN i FLEMSTRÖM (2005.) naglašavaju da je glavna uloga mukoznog sekreta u želucu zaštita sluznice od kisele pH-vrijednosti želučanog soka, što se dovodi u vezu s funkcijom mucina neutralna sastava. Također, štite sluznicu želuca od

mehaničkih ozljeda, olakšavaju apsorpciju lako probavljivih molekula, kao i razgradnju velikih čestica hrane. Razbijanje većih čestica hrane na manje pospješuje njihovo miješanje s probavnim enzimima te olakšava apsorpciju lako probavljivih molekula poput disaharida i kratkolančanih masnih kiselina. U želucu funkcija kiselih mucina povezuje se s maceracijom hrane čime se dodatno štiti sluznica prilikom prolaska većeg i grubljeg sadržaja. Zbog visoke viskoznosti njihova sadržaja kiseli mucini potiču vezivanje čestica za enzimsku površinu. Tako potpomažu probavu hranjivih tvari te time poboljšavaju obrambeni sustav riba. Zaključno, u želucu riba mucini imaju ne samo ključnu ulogu u zaštiti želučane sluznice od mehaničkih oštećenja i kisele pH-vrijednosti želučanog soka već značajno sudjeluju u procesima probave i apsorpcije hranjivih tvari.

Pilorički nastavci u istraženih vrsta riba uočeni su samo u lastavice prasice. Histološki, pilorički nastavci građeni su slično kao i crijevo. Njihova sluznica obložena je jednoslojnim visokoprizmatičnim epitelom s vrčastim stanicama.

U svih istraženih jedinki sluznicu crijeva oblaže jednoslojni visokoprizmatični epitel s vrčastim stanicama. Na apikalnoj površini epitela nalazi se četkasta prevlaka. Stanični izdanci epitelnih stanica vrlo su dugački. Pronalazak tzv. „bazalnih stanica“ opisan je u različitim vrsta riba (MOKHTAR, 2017.; LAURIANO i sur., 2019.). LAURIANO i sur. (2019.) u istraživanju na mački bljedici različitom metodologijom potvrdili su da se radi o intraepitelijalnim limfocitima koji imaju važnu ulogu u imunosnom odgovoru organizma. Između epitelnih stanica nalazi se velik broj jednostaničnih mukoznih žlijezda. Njihova reakcija otkriva prisutnost kiselih i neutralnih mucina koji imaju važnu funkciju u crijevima. Broj vrčastih stanica postupno se povećava prema stražnjem dijelu crijeva s najvećom pojavnosti u rektumu. Prema MOKHTARU (2017.) postoji nekoliko razloga za ovu povećanu brojnost. Kiseli mucini u stražnjem dijelu crijeva podmazuju sluznicu, olakšavajući tako prolazak neprobavljenih dijelova hrane prema rektumu. Sluz ima zaštitnu ulogu i sprječava mehanička oštećenja mikrovila. Također, sluz formira difuzijsku barijeru za ione i tekućine te omogućuje njihovu apsorpciju. Tako djeluje kao fizička barijera između enzima u lumenu i ima ulogu kofaktora za enzimsku hidrolizu. Nakon izlučivanja enzima iz stanice kiseli mucini sprječavaju degradaciju glikoproteina te tako sudjeluju u probavi bjelancevina (WANG i sur., 2018.).

U istraženih hrskavičnjača rektum oblaže različit tip pokrovnog epitela. U rektumu mačke bljedice utvrđen je epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog, dok je u psa mekaša epitel mnogoslojan, pločast i neorožen. CHATCHAVALVANICH i sur. (2006.) u stražnjem dijelu crijeva slatkovodne raže opisuju mnogoslojni visokoprizmatični epitel.

U rektumu oslića i lastavice prasice utvrđen je epitel u tipu pseudovišeslojnog visokoprizmatičnog. Za potrebe istraživanja morfologije probavnog sustava oslića BOČINA i sur. (2016.) uzeli su uzorke od kranijalnog dijela jednjaka do kaudalnog kraja rektuma. Prilikom opisa najkaudalnijeg dijela probavnog sustava, koji nazivaju posteriornim dijelom crijeva, autori pronalaze jednoslojni visokoprizmatični epitel s mirovilima. Na temelju rezultata ovog istraživanja može se zaključiti da neslaganje s nalazima istraživanja koji su proveli BOČINA i sur. (2016) proizlazi iz pretpostavke da je njihov opis kaudalnog kraja rektuma ipak bio fokusiran na stražnji dio crijeva, a ne na rektum. To dodatno ističe važnost točnog definiranja mjesta uzimanja uzorka za histološke i histokemijske analize, a s ciljem ponovljivosti istraživanja i izbjegavanja grešaka u tumačenju.

Vrčaste stanice rektuma izlučuju sekret mješovitog sastava, pri čemu su dominantni kiseli mucini. Ovakav se nalaz slaže s podacima koji su opisani u oslića (BOČINA i sur., 2016.). Kiseli mucini u rektumu podmazuju sluznicu, čime olakšavaju izlučivanje neprobavljenih dijelova hrane te imaju zaštitnu ulogu. Kiseli mucini u rektumu obavljaju dvostruku ulogu: olakšavaju eliminaciju neprobavljenih dijelova hrane i štite sluznicu.

Ispod epitela se nalazi bazalna membrana koja se sastoji od bazalne lamine epitela i retikularne lamine vezivnog tkiva. S obzirom na prisutnost muskularis mukoze, kao i razliku u tipu vezivnog tkiva koji izgrađuje laminu propriju i podsluznicu, ispod epitela se nalazi ili lamina proprija ili jedinstveni vezivnotkivni sloj. Upravo radi toga prvo će biti analizirana prisutnost muskularis mukoze u dijelovima probavnog sustava komparativno u hrskavičnjača i koštunjača. Muskularis mukoze kao jasan sloj utvrđena je u želucu svih istraženih riba te u spiralnom crijevu hrskavičnjača. Izolirane glatke mišićne stanice prisutne su u jednjaku mačke bljedice i lastavice prasice te ponekad u stražnjem dijelu crijeva oslića i lastavice prasice. Muskularis mukoze nije razvijena u jednjaku oslića, u crijevu koštunjača te u rektumu svih četiriju istraženih vrsta riba. Odsutnost muskularis mukoze u rektumu potvrđena je i kod drugih autora (KOZARIĆ, 2001. BOČINA i sur., 2016.). U istraživanju na slatkovodnoj raži nije zabilježena prisutnost muskularis mukoze u jednjaku (CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.).

Uloga muskularis mukoze je pomicanje lamine proprije i pokrovnog epitela neovisno o gibanju ostatka probavne cijevi, što olakšava pomicanje sadržaja i potpomaže sekreciju žlijezda. Osvrćući se na rezultate ovog istraživanja, može se zaključiti da je razlog slabije razvijenosti muskularis mukoze u jednjaku povezan s prisutnošću skeletnog mišića koji pomaže u procesu gutanja. U crijevu koštunjača smanjena pokretljivost lamine proprije i pokrovnog epitela omogućuje produženo vrijeme za enzimsku razgradnju i apsorpciju hranjivih tvari, što je kod hrskavičnjača postignuto zahvaljujući naborima u spiralnom crijevu.

Odsutnost muskularis mukoze u rektumu riba može se dovesti u vezu s relativno slabijom probavom u usporedbi s ostalim dijelovima crijeva te prvenstveno usmjerenošću na eliminaciju sadržaja, što potpomažu dobro razvijeni mišićni slojevi.

U dijelu jednjaka hrskavičnjača bez Leydigova organa lamina proprija je građena od gustog, a podsluznica od rahlog vezivnog tkiva. U dijelu jednjaka s Leydigovim organom ispod epitela se nalazi jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Sličan sloj vezivnog tkiva prisutan je i u rektumu mačke bljedice i psa mekaša.

U jednjaku oslića lamina proprija je građena od gustog, a podsluznica od rahlog vezivnog tkiva. U jednjaku lastavice prasice ispod epitela se nalazi jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Sličan sloj vezivnog tkiva prisutan je i u rektumu lastavice prasice, ali ne i u oslića.

Dakle, u dijelu jednjaka hrskavičnjača bez Leydigova organa i jednjaku oslića lamina proprija je građena od gustog, a podsluznica od rahlog vezivnog tkiva. Ovi rezultati se poklapaju s onima koje je MOKHTAR (2017.) opisao u jednjaku afričkog soma. U jednjaku lastavice prasice i u dijelu jednjaka s Leydigovim organom u hrskavičnjača ispod epitela se nalazi jedinstveni sloj vezivnog tkiva. Sličan sloj vezivnog tkiva prisutan je i u rektumu svih istraženih riba osim u oslića. U svim ostalim dijelovima probavnog sustava lamina proprija je građena od rahlog, a podsluznica od gustog vezivnog tkiva. Razlika u vezivnom tkivu proprije od podsluznice u jednjaku i crijevu nije uočena (CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; SAYYAF DEZFULI i sur., 2018.b).

Unatoč rezultatu koji su objavili CHATCHAVALVANICH i sur. (2006.) o prisutnosti *stratum compactum* u želucu slatkovodne raže, navedeni sloj nije utvrđen u želucu istraženih riba. Unutar vezivnog tkiva proprije nalaze se brojne žile, živci i stanice vezivnog tkiva. U prednjem dijelu želuca lamina proprija sadrži žlijezde građene od jednog tipa stanica. Za dio želuca koji je najbliži srcu jedna skupina autora (KAPOOR i sur., 1975.; WILSON i CASTRO, 2011.) koristi termin kardija. Prema njima, kardija se sastoji od želučanih ili glavnih žlijezda koje svojim sekretom odgovaraju žlijezdama koje se nalaze u fundusu sisavaca. Druga skupina autora (FÄNGE i GROVE, 1979.; KOZARIĆ, 2001.) naziva ovaj dio fundusom. Klasična nomenklatura želuca, gdje se želudac dijeli na kardiju, fundus i pilorus, nije u potpunosti primjenjiva u riba korištenih u ovom istraživanju. RAY i RINGØ (2014.) predlažu termin – prednji dio želuca. S obzirom na razlike u lokaciji i histološkom izgledu stijenke u ovom radu primijenjena je takva terminologija prema kojoj se želudac sastoji od prednjeg i stražnjeg dijela. U stražnjem dijelu želuca postoji neslaganje među autorima u vezi s prisutnošću mukoznih žlijezda. Neki autori tvrde da mukozne žlijezde uglavnom izostaju u tom dijelu

(WILSON i CASTRO, 2011.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.; MOKHTAR, 2017.), dok ih drugi opisuju (RAY i RINGØ, 2014.). U svih istraženih vrsta riba u ovom radu u stražnjem dijelu želuca nalaze se tubulusne mukozne žlijezde koje izlučuju nespecifičan sekret.

HOLMGREN i NILSSON (1999.) smatraju kako je prednji dio crijeva hrskavičnjača istovjetan duodenumu, a spiralni dio crijeva ileumu u sisavaca. Međutim, u ovom istraživanju ni u jedne vrste riba nisu pronađene *gll. submucosae intestinales* (koje su prisutne u duodenumu sisavaca), kao ni združeni limfni čvorići u podsluznici ileuma. Na temelju tih nalaza smatra se kako ta nomenklatura nije prikladna u kontekstu istraživanja provedenog u ovom radu.

U svim slojevima vezivnog tkiva lastavice prasice identificirane su stanice čije su se granule obojile blijedo eozinofilno HE metodom, plavo MT metodom te intenzivno ljubičasto VVG metodom bojenja. Koristeći AB PAS metodu granule su odreagirale AB + PAS -. Za pretpostaviti je da se radi o mastocitima koji se nalaze u vezivnom tkivu različitih organa riba (LAURIANO i sur., 2012.; SAYYAF DEZFULI i sur., 2013.; SFACTERIA i sur., 2014.; DA SILVA i sur., 2016.; SAYYAF DEZFULI i sur., 2018.a; ALESCI i sur., 2022.). Za potvrdu ovih stanica potrebna je dodatna metodologija poput imunohistokemije ili dodatnih posebnih bojenja koja u ovom istraživanju nisu predviđena.

Mišićni sloj se sastoji od unutrašnjeg i vanjskog dijela. Vanjski dio jednjaka hrskavičnjača te u oba dijela mišićnog sloja jednjaka koštunjača građen je od skeletnog mišićnog tkiva. U ostalim dijelovima probavnog sustava mišićni su slojevi građeni od glatkog mišićnog tkiva. Ovaj je nalaz u skladu s podacima iz literature (CHATCHAVALVANICH i sur., 2006.; VIEIRA-LOPES i sur., 2013.). Adventicija je potvrđena u jednjaku lastavice prasice i morske mačke dok je u drugim dijelovima prisutna seroza. Ovaj nalaz može biti povezan ili s lokacijom uzimanja uzorka ili s kasnijim prelaskom adventicije u serozu u tim dvjema vrstama riba.

6.3. Usporedba enzimske aktivnosti probavnog sustava

U ovom istraživanju opisana je lokalizacija alkalne fosfataze, kisele fosfataze, nespecifične esteraze i aminopeptidaze u pojedinim slojevima stražnjeg dijela probavne cijevi hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša) i koštunjača (oslića i lastavice prasice). Izmjerena je SOG enzima te su dobiveni rezultati analizirani.

6.3.1. Usporedba lokalizacije i intenziteta alkalne fosfataze

U ovom istraživanju OG alkalne fosfataze izmjerena je u četkastoj prevlaci crijeva svih riba. Prema podacima iz literature, enzimska reakcija na istoj lokaciji utvrđena je u oslića (KOZARIĆ i sur., 2004.) i u drugih vrsta poput kokotića oštruljića (KOZARIĆ i sur., 2011.), *Hemisorubium platyrhynchos* (FACCIOLI i sur., 2016.), *Cynoglossus semilaevis* (porodica Soleidae, listovi) (WANG i sur., 2018.), koi šarana (*Cyprinus carpio* var. *koi*) (SUN i sur., 2019.) i lastavice balavice (*Chelidonichthys lucerna*) (BASTIANČIĆ i sur., 2023.). U radu na jegulji (*Anguilla anguilla*), KUŽIR i sur. (2012.) pronalaze aktivnost samo u četkastoj prevlaci srednjeg i stražnjeg dijela crijeva. Dodatno, aktivnost enzima pronađena je u četkastoj prevlaci rektuma oslića. KOZARIĆ i sur. (2004.) u radu na osliću ne opisuju aktivnost enzima u tom dijelu probavnog sustava.

Enzimska reakcija utvrđena je u epitelu jednjaka psa mekaša, oslića i lastavice prasice te u epitelu rektuma lastavice prasice. Većina ranije navedenih istraživanja orijentirana je na crijevo u užem smislu pa u tim radovima enzimska lokalizacija u drugim dijelovima probavnog sustava nije opisana. U radovima koji sadrže navedene podatke pronalazak enzimske aktivnosti u jednjaku i rektumu opisan je u salpe (*Sarpa salpa*) (KOZARIĆ i sur., 2006.) i lastavice balavice (BASTIANČIĆ i sur., 2023.), a različit je od lokacija opisanih u oslića (KOZARIĆ i sur., 2004.) i *H. platyrhynchos* (FACCIOLI i sur., 2016.). S obzirom na anatomske pozicije bližu tjelesnim otvorima pronalazak enzima na ovim lokacijama može se povezati sa zaštitom od štetnih vanjskih čimbenika.

Također, u istraženim riba u slojevima vezivnog tkiva i oko krvnih žila pronađena je aktivnost enzima. Nalaz reakcija u vezivnom tkivu slaže se s rezultatima opisanim u oslića (KOZARIĆ i sur., 2004.), salpe (KOZARIĆ i sur., 2006.) i lastavice balavice (BASTIANČIĆ i sur., 2023.). Takva enzimska reakcija nije zabilježena u kokotića oštruljića (KOZARIĆ i sur.,

2012.), *H. platyrhynchos* (FACCIOLI i sur., 2016.) i *C. semilaevis* (WANG i sur., 2018.). S obzirom na to da se enzim nalazi na lokacijama u organizmu s intenzivnim metabolizmom za očekivati je njegov pronalazak u blizini krvnih žila.

Uspoređujući rezultate u istraženih hrskavičnjača i koštunjača, u jednaku je enzimska aktivnost viša u koštunjača, a između koštunjača u lastavice prasice. U rektumu je aktivnost pronađena samo u koštunjača te je veća u oslića. Iako je jača enzimska aktivnost utvrđena u mačke bljedice, razlika SOG alkalne fosfataze u spiralnom crijevu hrskavičnjača nije statistički značajna. U crijevu koštunjača SOG alkalne fosfataze viša je u oslića nego u lastavice prasice. Različiti autori navode kako se aktivnost enzima smanjuje od prednjeg prema stražnjem dijelu crijeva (KOZARIĆ i sur., 2004.; LIU i sur., 2011.; TAN i sur., 2011.; YUAN i sur., 2014.; HABTE-TSION i sur., 2015.; LI i sur., 2015.; XIAO i sur., 2017.; WEI i sur., 2018.). Ti se rezultati slažu s opisom aktivnosti enzima u istraženih oslića gdje je najviša SOG izmjerena u prednjem dijelu te potom pada prema stražnjim dijelovima crijeva. Drugi autori opisuju rast aktivnosti do srednjeg crijeva te nižu aktivnost u stražnjem dijelu crijeva (REFSTIE i sur., 2006.; WU i sur., 2009.; ZHAO i sur., 2015.; JIANG i sur., 2016.; XIAO i sur., 2017.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.). Ti se rezultati slažu s opisom aktivnosti enzima u istraženih lastavica prasica gdje je vrijednost SOG najviša u srednjem dijelu crijeva te onda pada. S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti kako veća aktivnost pronađena u oslića može biti posljedica kraćeg probavnog sustava te posljedične potrebe za većom koncentracijom enzima. U lastavice prasice pilorički su nastavci dodatno mjesto gdje započinje intenzivnija probava hranjivih tvari, a enzim nastavlja svoje djelovanje i u rektumu.

Alkalna fosfataza je enzim koji katalizira hidrolizu monoestera fosforne kiseline pri lužnatoj pH-vrijednosti. S obzirom na to da hidrolizira molekule fosfora s ugljikohidrata, masti i bjelančevina pri lužnatoj pH-vrijednosti, pronađena je očekivano visoka enzimska reakcija u crijevima hrskavičnjača i koštunjača. Pritom, a moguće radi potrebe intenzivnijeg metabolizma zbog kratkoće crijeva, najviši intenzitet enzima pronađen je u crijevu oslića. U hrskavičnjača spiralno crijevo usporava prolazak sadržaja te na svojoj površini ima brojne nabore u kojima je omogućen dodatni doticaj enzima s hranjivim tvarima. Osim u probavi alkalna fosfataza u probavnom sustavu ima ulogu i u kontroli metabolizma kalcija, fosfora i masnih kiselina (LALLÈS, 2019.). Enzim ima funkciju barijere te sudjeluje u regulaciji pH-vrijednosti crijeva, kontroli nepropusnih spojeva, detoksikaciji upalnih mikrobnih komponenti i moduliranju crijeвне mikroflore. Nalaz enzimске reakcije u navedenim dijelovima probavnog sustava može se povezati upravo s ovim funkcijama.

6.3.2. Usporedba lokalizacije i intenziteta kisele fosfataze

U četkastoj prevlaci reakcija kisele fosfataze pronađena je samo u spiralnom crijevu mačke bljedice. Enzimski reakcija na istoj lokaciji utvrđena je u srednjem dijelu crijeva jegulje (KUŽIR i sur., 2012.) i koi šarana (SUN i sur., 2019.).

U ovom istraživanju aktivnost kisele fosfataze pronađena je u epitelu i vezivnom tkivu svih dijelova probavnog sustava. Sličan rezultat utvrđen je u probavnom sustavu oslića (KOZARIĆ i sur., 2004.), *H. platyrhynchos* (FACCIOLI i sur., 2016.) i u lastavice balavice (BASTIANČIĆ i sur., 2023.).

U istraženih hrskavičnjača najviša SOG kisele fosfataze utvrđena je u epitelu jednjaka mačke bljedice. U psa mekaša aktivnost raste do spiralnog crijeva, gdje je najviša te zatim pada.

U istraženih koštunjača SOG kisele fosfataze u oslića pokazuje više vrijednosti nego u lastavice prasice. Pritom, u oslića najviše vrijednosti SOG izmjerene su u epitelu prednjeg i stražnjeg dijela crijeva. U lastavice prasice SOG raste do piloričkih nastavaka, zatim se snižava te postepeno raste dužinom crijeva. Kao i u ovom radu i u dostupnoj literaturi podaci o intenzitetu ovog enzima variraju među različitim vrstama riba (KUŽIR i sur., 2012.; WANG i sur., 2018.; SUN i sur., 2019.).

Intenzitet reakcija kisele fosfataze u vezivnom tkivu uglavnom prati porast SOG u epitelu.

Kisela fosfataza je enzim koji katalizira hidrolizu monoestera fosforne kiseline pri kiseloj pH-vrijednosti. Nakon sinteze uglavnom se smješta u lizosomima, ali i ekstralizosomalno. Upravo radi toga je enzim široko rasprostranjen unutar stanice te vjerojatno opis njegove lokalizacije ovisi o trenutku metabolizma u kojem se stanica nalazi. Pronalazak visoke SOG enzima u jednjaku i u rektumu morske mačke povezuje se s njegovom zaštitnom ulogom. Sličan nalaz opisuju i BASTIANČIĆ i sur. (2023.). Također, ti dijelovi imaju sličnu ulogu i u koštunjača. Pronalazak enzima u želučanim žlijezdama povezuje se s razgradnjom molekula uključenih u metabolizam (FACCIOLI i sur., 2016.). U mačke bljedice visoka vrijednost pronađena u jednjaku, stražnjem dijelu želuca i rektumu može upućivati na bitnu ulogu ovih dijelova probavnog sustava u metabolizmu bjelančevina. U psa mekaša glavna mjesta razgradnje i apsorpcije bjelančevina su stražnji dio želuca i spiralno crijevo. U oslića je čitav probavni sustav aktivan u sintezi bjelančevina dok su u lastavice prasice to pilorički nastavci i crijevo.

6.3.3. Usporedba lokalizacije i intenziteta nespecifične esteraze

U istraženih hrskavičnjača aktivnost nespecifične esteraze utvrđena je duž epitela čitavog stražnjeg dijela probavne cijevi. Također, takva enzimska distribucija utvrđena je i u lastavice prasice. U istraživanju lokalizacije i enzimske aktivnosti duž probavnog sustava lastavice balavice BASTIANČIĆ i sur. (2023.) također utvrđuju jednaku enzimsku distribuciju. Za razliku od enzimske lokalizacije u hrskavičnjača i lastavice prasice aktivnost enzima u oslića utvrđena je samo u epitelu prednjeg, srednjeg i stražnjeg dijela crijeva. KOZARIĆ i sur. (2004.) utvrdili su aktivnost nespecifične esteraze u citoplazmi epitelnih stanica jednjaka i crijeva. Navedeni autori dodatno opisuju enzimsku reakciju i u četkastoj prevlaci. Kako se u literaturi često navodi da je srednji segment crijeva mjesto najviše enzimske aktivnosti probavnog sustava, većina istraživanja probavnog sustava usmjerena su samo na njegove dijelove. Unatoč tome, rezultati ovog istraživanja pokazuju da i prednji dio probavne cijevi i rektum imaju bitnu ulogu u razgradnji glicerida i nižih masnih kiselina u mačke bljedice, psa mekaša i lastavice prasice.

Lokalizacija nespecifične esteraze različita je u vezivnom tkivu probavne cijevi hrskavičnjača od one u koštunjača. U istraženih hrskavičnjača aktivnost nespecifične esteraze pronađena je u vezivnom tkivu želuca i spiralnog crijeva. U lastavice prasice, enzimska aktivnost utvrđena je duž vezivnog tkiva od želuca do rektuma. Suprotno tome, enzimska aktivnost nije pronađena u vezivnom tkivu probavne cijevi oslića.

Više vrijednosti SOG nespecifične esteraze uočene su u mačke bljedice nego u psa mekaša. Pritom je najviša vrijednost u mačke bljedice izmjerena u želucu, a u psa mekaša u spiralnom crijevu. U koštunjača je enzim znatno aktivniji duž probavnog sustava lastavice prasice. Unatoč tome, više su vrijednosti izmjerene u crijevu oslića. U obje vrste koštunjača aktivnost enzima raste do stražnjeg dijela crijeva gdje je najviša. Sličan intenzitet rasta opisuju i drugi autori (KOZARIĆ i sur., 2004.; KOZARIĆ i sur., 2011.; WANG i sur., 2018.; SUN i sur., 2019.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.).

Nespecifična esteraza obuhvaća niz enzima koji sudjeluju u probavi glicerida i nižih masnih kiselina. Masti su hidrofobne tvari koje se ne miješaju s vodom. Emulgatori su molekule koje imaju hidrofilne i hidrofobne dijelove. Funkcija emulgatora je potpomoći emulgaciju te time omogućiti proces miješanja masti i vode. Putem razgradnje masti na manje čestice emulgacija u probavnom sustavu omogućuje enzimima potpunu hidrolizu i apsorpciju hranjivih tvari. Emulgacija masti u probavnom sustavu postiže se pomoću žuči koja se ulijeva

u prednji dio crijeva. Stoga je za zaključiti da je viša SOG ovog enzima u crijevu psa mekaša i koštunjača posljedica pojačane aktivnosti nakon emulgacije masti. U mačke bljedice glavno mjesto probave masti je želudac, a u ostalih istraženih riba crijevo.

6.3.4. Usporedba lokalizacije i intenziteta aminopeptidaze

U ovom istraživanju aktivnost aminopeptidaze izmjerena je u četkastoj prevlaci crijeva svih riba. Aktivnost je također pronađena u epitelu jednjaka, četkastoj prevlaci piloričkih nastavaka lastavice prasice te u rektumu oslića.

U hrskavičnjača vrijednost SOG aminopeptidaze veća je i varijabilnija u psa mekaša. Enzimska distribucija ukazuje kako je u ovih riba glavno mjesto probave i apsorpcije bjelančevina spiralno crijevo. Takav nalaz u skladu je s opisom u *Sphyrna tiburo* (porodica: Sphyrnidae, mlatovi) (JHAVERI i sur., 2015.). U psa mekaša aktivnost aminopeptidaze izmjerena je i u bazalnom dijelu epitela jednjaka.

U koštunjača u svim dijelovima crijeva utvrđena je viša SOG aminopeptidaze u četkastoj prevlaci oslića nego u lastavice prasice. Pritom je najviša vrijednost izmjerena u četkastoj prevlaci srednjeg dijela crijeva. Dodatno je aktivnost pronađena i u bazalnom dijelu epitela jednjaka, u četkastoj prevlaci piloričkih nastavaka lastavice prasice te u rektumu oslića. Dokaz aktivnosti aminopeptidaze u četkastoj prevlaci crijeva riba u skladu je s literaturnim navodima (KUROKAWA i SUZUKI, 1998.; TENGJAROENKUL i sur., 2000.; KOZARIĆ i sur., 2011.; KUŽIR i sur., 2012.). Također, pronalazak enzima u bazalnom dijelu epitela opisan je u literaturi (HIRJI i COURTNEY, 1982.; TENGJAROENKUL i sur., 2000.). U oslića enzimska aktivnost raste do srednjeg crijeva gdje ima najvišu vrijednost te onda pada. U riba porodice Triglidae provedeno je nekoliko istraživanja enzimске aktivnosti probavnog sustava (KOZARIĆ i sur., 2011.; BASTIANČIĆ i sur., 2023.). KOZARIĆ i sur. (2011.) opisali su aktivnost aminopeptidaze u crijevu kokotića oštruljića. BASTIANČIĆ i sur. (2023.) izmjerili su aktivnost aminopeptidaze u probavnom sustavu lastavice balavice. Opisana enzimska aktivnost u ovih riba iz porodice štitoglavki razlikuje se od one izmjerene u lastavice prasice po distribuciji intenziteta u probavnom sustavu. U ovom istraživanju u lastavice prasice, iako je slična aktivnost izmjerena duž čitavog crijeva, najviša je aktivnost izmjerena u srednjem dijelu crijeva. Najviša aktivnost aminopeptidaze u četkastoj prevlaci srednjeg crijeva također je zabilježena u grgeča (*Perca fluviatilis*) (HIRJI i COURTNEY, 1982.) i jegulje (KUŽIR i sur., 2012.). Slabiji intenzitet enzimске reakcije u rektumu može se dovesti u vezu sa slabijom

razgradnjom bjelančevina koja je posljedica promjene pH-vrijednosti i resorpcije enzima duž probavnog sustava (TENGJAROENKUL i sur., 2000.).

Aminopeptidaza je egzopeptidaza koja katalizira hidrolizu peptidne veze na N-kraju proteinskog supstrata. Ekstracelularna faza razgradnje bjelančevina potpomognuta je pepsinom i enzimima gušterače (BASTIANČIĆ i sur., 2023.). Intracelularna razgradnja povezuje se s bjelančevinama četkaste prevlake. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na to da se u hrskavičnjača intracelularna razgradnja bjelančevina odvija u spiralnom crijevu, a u psa mekaša dodatno i u epitelu jednjaka. U koštunjača glavni dio probave bjelančevina odvija se duž čitavog crijeva. S obzirom na utvrđenu aktivnost u jednjaku za pretpostaviti je da se, kao i u psa mekaša, manji peptidi ili aminokiseline dodatno apsorbiraju, neovisno o ekstracelularnoj razgradnji.

7. ZAKLJUČCI

Na temelju prvog sveobuhvatnog istraživanja makromorfoloških i mikromorfoloških osobitosti probavnog sustava u mačke bljedice, psa mekaša, oslića i lastavice prasice izvedeni su sljedeći zaključci:

1. Makroskopska građa stražnjeg dijela probavne cijevi pokazuje sličnosti između mačke bljedice i psa mekaša te razlike između oslića i lastavice prasice. Pritom se makroskopska građa u hrskavičnjača znatno razlikuje od one utvrđene u koštunjača.
2. Unatoč sličnim prehranbenim navikama, varijacije u dužini crijeva uočene su među pojedinim jedinkama unutar iste vrste, kao i između istraženih vrsta riba. Pritom je u svih istraženih riba, dužina crijeva manja od ukupne dužine tijela.
3. U lastavice prasice razvili su se dodatni mehanizmi koji potpomažu proces probave i apsorpcije hranjivih tvari zbog teže probavljive hitinske ljuštore rakova koji dominiraju u njezinoj prehrani.
4. Mikroskopska građa stražnjeg dijela probavne cijevi razlikuje se u istraženih vrsta riba. Pritom posebno treba istaknuti razlike u građi pokrovnog epitela jednjaka i rektuma te one koje proizlaze iz različite razvijenosti muskularis mukoze među pojedinim dijelovima probavne cijevi.
5. Mukozne žlijezde utvrđene su u svim dijelovima probavne cijevi, osim u želucu. Pritom se sastav sekreta u istraženih vrsta riba u pojedinim dijelovima razlikuje.
6. U svih istraženih riba crijeva su mjesta najintenzivnijeg metabolizma.
7. U mačke bljedice glavno mjesto probave masti je želudac, a u ostalih istraženih riba crijevo.
8. Iako su razgradnja i apsorpcija bjelančevina intenzivne u crijevu, odvijaju se i u drugim dijelovima probavne cijevi.

8. LITERATURA

AESCHT, E., S. BÜCHL-ZIMMERMANN, A. BURMESTER, S. DÄNHARDT-PFEIFFER, C. DESEL, C. HAMERS, G. JACH, M. KÄSSENS, J. MAKOVITZKY, M. MULISCH, B. NIXDORF-BERGWEILER, D. PÜTZ, B. RIEDELSHEIMER, F. VAN DEN BOOM, R. WEGERHOFF, U. WELSCH (2010): Färbungen. U: Romeis - Mikroskopische Technik. (Mulisch, M., U. Welsch, Ur.), Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, str. 183-297.

AKIN, S., H. TURAN, N. KAYMAK (2016): Does diet variation determine the digestive tract length of *Capoeta banarescui* Turan, Kottelat, Ekmekci and Imamoglu, 2006? J. Appl. Ichthyol. 32, 883-892.
DOI: 10.1111/jai.13104

ALESCI, A., S. PERGOLIZZI, A. FUMIA, C. CALABRÒ, P. LO CASCIO, E. R. LAURIANO (2022): Mast cells in goldfish (*Carassius auratus*) gut: Immunohistochemical characterization. Acta. Zool. 00, 1-14.
DOI: 10.1111/azo.12417

ALLEN, A., G. FLEMSTRÖM (2005): Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 288, 1-19.
DOI: 10.1152/ajpcell.00102.2004.

BAKKE, A. M., C. GLOVER, Å. KROGDAHL (2011): Feeding, Digestion and Absorption of Nutrients. U: The multifunctional gut of fish. (Grosell, M., A. P. Farrell, C. J. Brauner, Ur.), Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, Oxford, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 57-112.
DOI: 10.1016/S1546-5098(10)03001-3

BALLANTYNE, J. S. (2014): Membranes and Metabolism. U: The Physiology of Fishes. (Evans, D. H., J. B. Clairborne, S. Currie, Ur.), CRC Press, Boca Raton, London, New York, str. 81-147.

BARRULL, J., I. MATE (2002): Tiburones del Mediterraneo. Llibreria El Set-ciències, Arenys de Mar, str. 292.

BASTIANČIĆ, L., I. VLAHEK, V. BENKO, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2023): Histochemical research of enzymes involved in cellular digestion in the digestive tract of tub gurnard, *Chelidonichthys lucerna*. Fish Physiol. Biochem. Special Issue: Regulation of Nutrient Metabolism in Fish.

DOI: 10.1007/s10695-023-01188-3

BATES, J. M., E. MITTGE, J. KUHLMAN, K. N. BADEN, S. E. CHEESMAN, K. GUILLEMIN (2006): Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. Dev. Biol. 297, 374-386.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.05.006

BATES, J. M., J. AKERLUND, E. MITTGE, K. GUILLEMIN (2007): Intestinal alkaline phosphatase detoxifies lipopolysaccharide and prevents inflammation in zebrafish in response to the gut microbiota. Cell Host Microbe 2, 371-382.

DOI: 10.1016/j.chom.2007.10.010

BATISTIĆ, B. (1994): Mikroskop i histološka tehnika. Medicinski fakultet, Rijeka, str. 37-115.

BELLO, G. (1997): Cephalopods from the stomach contents of demersal chondrichthyans caught in the Adriatic Sea. Vie Milieu 47, 221-227.

BOČINA, I., S. RUŽIĆ, I. RESTOVIĆ, A. PALADIN (2016): Histological features of the digestive tract of the adult European hake *Merluccius merluccius* (Pisces: Merlucciidae). Ital. J. Zool. 83, 26-33.

DOI: 10.1080/11250003.2015.1113311.

BOWEN, S. H. (1987): Dietary protein requirements of fishes - A reassessment. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 1995-2001.

DOI: 10.1139/f87-244

BUDDINGTON, R. K., J. M. DIAMOND (1987): Pyloric ceca of fish: a "new" absorptive organ. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 252, 65-76.

DOI: 10.1152/ajpgi.1987.252.1.G65

BUDDINGTON, R. K., J. W. CHEN, J. DIAMOND (1987): Genetic and phenotypic adaptation of intestinal nutrient transport to diet in fish. *J. Physiol.* 393, 261-281.

DOI: 10.1113/jphysiol.1987.sp016823

BUDDINGTON, R. K., V. KUZ'MINA (2000): Digestive system. U: Laboratory fish. (Ostrander, G. K., G. Bullock, T. E. Bunton, Ur.), str. 174-180.

CAPPIELLO, M., A. LAZZAROTTI, F. BUONO, A. SCALONI, C. D'AMBROSIO, P. AMODEO, B.L. MÉNDEZ, P. PELOSI, A. DEL CORSO, U. MURA (2004): New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochem. J.* 378, 35-44.

CARAGITSOU, E., C. PAPACONSTANTINO (1994): Feeding habits of piper (*Trigla lyra*) in the Saronikos Gulf (Greece). *J. Appl. Ichthyol.* 10, 104-113.

DOI: 10.1111/j.1439-0426.1994.tb00149.x

CARDOSO, N., E. M. FIMIRIANO, I. D. GOMES, A. A. DO NASCIMENTO, A. SALES, F. G. ARAÚJO (2015): Histochemical and immunohistochemical study on endocrine cells (5HT, GAS, and SST) of the gastrointestinal tract of a teleost, the characin *Astyanax bimaculatus*. *Acta Histochem.* 117, 595-604.

DOI: 10.1016/j.acthis.2015.05.007.

CARPENTIERI, P., F. COLLOCA, M. CARDINALE, A. BELLUSCIO, G. D. ARDIZZONE (2005): Feeding habits of European hake (*Merluccius merluccius*) in the central Mediterranean Sea. *Fish. Bull.*, 103, 411-416.

CARROZZI, V., M. DI LORENZO, D. MASSI, A. TITONE, G. ARDIZZONE, F. COLLOCA (2019): Prey preferences and ontogenetic diet shift of European hake *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) in the central Mediterranean Sea. *Reg. Stud. Mar. Sci.* 25, 100440.

DOI:10.1016/j.rsma.2018.100440

CHATCHAVALVANICH, K., R. MARCOS, J. POONPIROM, A. THONGPAN, E. ROCHA (2006): Histology of the digestive tract of the freshwater stingray *Himantura signifer* Compagno and Roberts, 1982 (Elasmobranchii, Dasyatidae). *Anat. Embryol.* 211, 507-518.

CHEN, X., G. P. WU, Q. F. CAI, G. M. LIU, K. OSATOMI, W. J. SU, M. J. CAO (2012): Biochemical characterisation of an aminopeptidase with highest preference for lysine from Japanese flounder skeletal muscle. Food Chem. 130, 679-686.

DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.109

CHENG, D., G. J. SHAMI, M. MORSCH, R. S. CHUNG, F. BRAET (2016): Ultrastructural Mapping of the Zebrafish Gastrointestinal System as a Basis for Experimental Drug Studies. Biomed. Res. Int. 2016, 8758460.

DOI: 10.1155/2016/8758460

CLEMENTS, K. D., D. RAUBENHEIMER (2006): Endocrinology. U: The Physiology of Fishes. (Evans, D. H., J. B. Clairborne, Ur.), CRC Press, Boca Raton, str. 47-82.

COHEN, S., M. V. DIAZ, A. O. DÍAZ (2020): Development of the digestive system of Argentine hake, *Merluccius hubbsi*, larvae. J. Morphol. 281, 578-590.

DOI: 10.1002/jmor.21122

CONSTANTINI, M., M. BERNARDINI, P. CORDONE, P. G. GIULIANNI, G. OREL (2000): Observations on fishery, feeding habits and reproductive biology of *Mustelus mustelus* Chondrichtyes, Triakidae in northern Adriatic Sea. Biol. Mar. Mediterr. 7, 427-432.

DAHLQVIST, A., A. BRUN. A method for the histochemical demonstration of disaccharidase activities: application to invertase and trehalase in some animal tissues. J. Histochem. Cytochem. 10, 294-302.

DOI: 10.1177/10.3.294

DA SILVA, W. F., M. J. SIMOES, R. C. GUTIERRE, M. I. EGAMI, A. A. SANTOS, M. M. ANTONIAZZI, G. R. SASSO, M. J. T. RANZANI-PAIVA (2016): Special dyeing, histochemistry, immunohistochemistry and ultrastructure: A study of mast cells eosinophilic granules cells (MCs/ EGC) from centropomus parallelus intestine. Fish Shellfish Immun. 60, 502-508.

DOI: 10.1016/j.fsi.2016.11.022

DEIMLING, O. V., A. BÖCKING (1976): Esterases in histochemistry and ultrahistochemistry. Histochem. J. 8, 215-252.

DOI: 10.1007/BF01003814

DENSTADLI, V., A. VEGUSDAL, Å. KROGDAHL, A. M. BAKKE-MCKELLEN, G. M. BERGE, H. HOLM, M. HILLESTAD, B. RUYTER (2004): Lipid absorption in different segments of the gastrointestinal tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) Aquaculture 240, 385-398.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.030

DÍAZ, A. O., A. M. GARCÍA, C. V. DEVINCENTI, A. L. GOLDEMBERG (2003): Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini 1935). Anat. Histol. Embryol. 32, 341-346.

DOI: 10.1111/j.1439-0264.2003.00490.x

DÍAZ, A. O., A. M. GARCÍA, A. L. GOLDEMBERG (2008): Glycoconjugates in the mucosa of the digestive tract of *Cynoscion guatucupa*: a histochemical study. Acta Histochem. 110, 76-85.

DOI: 10.1016/j.acthis.2007.08.002

D'IGLIO, C., S. FAMULARI, M. ALBANO, D. GIORDANO, P. RINELLI, G. CAPILLO, N. SPANO, S. SAVOCA (2022): Time-Scale Analysis of Prey Preferences and Ontogenetic Shift in the Diet of European Hake *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) in Southern and Central Tyrrhenian Sea. Fishes 7, 167.

DOI: 10.3390/fishes7040167

DULČIĆ, J., M. KOVAČIĆ (2020): Ihtiofauna Jadranskoga mora. Golden marketing - Tehnička knjiga, Zagreb.

EGERTON, S., S. CULLOTY, J. WHOOLEY, C. STANTON, R. P. ROSS (2018): The Gut Microbiota of Marine Fish. Front. Microbiol. 9, 873.

DOI: 10.3389/fmicb.2018.00873

FACCIOLI, C. K., R. A. CHEDID, R. H. MORI, A. C. AMARAL, R. A. F. BELMONT, I. B. F. VICENTINI, C. A. VICENTINI (2016): Organogenesis of the digestive system in Neotropical carnivorous freshwater catfish *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes: Pimelodidae). *Aquaculture* 451, 205-212.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2015.09.009

FÄNGE, R., D. GROVE (1979): Digestion. U: *Fish Physiology*. (Hoar, W. S., D. J. Randall, J.R. Brett, Ur.), Academic Press, New York, San Francisco, London, str. 162-241.

FERGUSON, H. W. (2006): Gastrointestinal Tract, Swimbladder, Pancreas and Peritoneum. U: *Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Normal Tissues in Teleosts and their Responses in Disease*. (Lumsden, J. D., Ed.), Scotian Press, London, str. 168-171.

FERRARIS, R. P., J. DIAMOND (1997): Regulation of intestinal sugar transport. *Physiol. Rev.* 77, 257-302.

DOI: 10.1152/physrev.1997.77.1.257

FIJAN, N. (1963): IX Probavni sustav. U: *Anatomija, histologija, fiziologija i embriologija riba*, Predavanja III. stupanj iz predmeta „Ribogojstvo i bolesti riba“. Zagreb, str. 179-223.

FILIZ, H. (2009): Diet composition of smooth-hound, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), in Aegean Sea, Turkey. *Belg. J. Zool.* 139, 81-84.

GAWLICKA, A., M. A. HEROLD, F. T. BARROWS, J. DE LA NOÛE, S. S. O. HUNG (2002): Effects of dietary lipids on growth, fatty acid composition, intestinal absorption and hepatic storage in white sturgeon (*Acipenser transmontanus* R.) larvae. *J. Appl. Ichthyol.* 18, 673-681.

DOI: 10.1046/j.1439-0426.2002.00371.x

GENTEN, F., E. TERWINGHE, A. DANGUY (2009): Digestive system. U: *Atlas of Fish Histology*. Science Publishers, Enfield, Jersey, Plymouth, str. 75-99.

GISBERT, E., S. MORAIS, F. J. MOYANO (2013): Feeding and Digestion. U: *Larval Fish Aquaculture*. (Qin J. G., Ur.). Nova Publishers, New York, str. 73-124.

GJURČEVIĆ, E., K. MATANOVIĆ, V. BENKO, D. STANIN, H. CAPAK, D. MATAIĆ, K. KURI, M. MANDIĆ (2023): Istraživanje poremećaja rasta i razvoja i praćenje pojavnosti tumora u nekih vrsta morskih riba u srednjem Jadranu. Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.

GONZALES, T., J. ROBERT-BAUDOUY (1996) Bacterial aminopeptidases: properties and functions. FEMS Microbiol. 18, 319-344.

GRAVINO, F., M. DIMECH, P. J. SCHEMBRI (2010): Feeding habits of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* (L., 1758) in the central Mediterranean. Rapport Commission International de la Mer Mediterranee 39, 538.

GUYTON, A. C., J. E. HALL (2017): Probava i apsorpcija u probavnom sustavu. U: Medicinska fiziologija. (Andreis, I., S. Kukolja Taradi, M. Taradi, Ur.). Medicinska naklada, Zagreb, str. 833-843.

HABTE-TSION , H. M., M. REN, B. LIU, J. XIE, X. GE, R. CHEN, Q. ZHOU, L. PAN (2015): Threonine influences the absorption capacity and brush-border enzyme gene expression in the intestine of juvenile blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*). Aquaculture 448, 436-444.

DOI: 10.1017/S0007114515002196

HANI, Y. M. I., A. MARCHAND, C. TURIES, E. KERAMBRUN, O. PALLUEL, A. BADO-NILLES, R. BEAUDOUIN, J. PORCHER, A. GEFFARD, O. DEDOURGE-GEFFARD (2018): Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. Plos One 13, 29614133.

DOI: 10.1371/journal.pone.0194932

HARDER, W. (1975): Anatomy of fishes. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.

HART, S., A. WRATHMELL, J. E. HARRIS (1986): Gut associated lymphoid tissue in the dogfish *Scyliorhinus canicula*: A light microscopic study. J. Mar. Biol. Ass. UK 66, 721-729.

HELFMAN, G. S., B. B. COLLETTE, D. E. FACEY, B. W. BOWEN (2009): Soft Anatomy. U: The Diversity of Fishes: Biology, Evolution, and Ecology. Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, str. 48-50.

HIRJI, K. N., W. A. M. COURTNEY (1982): Leucine aminopeptidase activity in the digestive tract of perch, *Perca fluviatilis* L. J. Fish Biol. 21, 615-622.

HOFER, R. (1979): The adaptation of digestive enzymes to temperature, season and diet in roach, *Rutilus rutilus* L. and rudd *Scardinius erythrophthalmus* L. 1. Amylase. J. Fish Biol. 14, 565-572.

DOI: 10.1111/j.1095-8649.1979.tb03556.x

HOPWOOD, D., K. R. LOGAN, G. MILNE (1978): The light and electron microscopic distribution of acid phosphatase activity in human normal oesophageal epithelium. Histochem. J. 10, 159-170.

DOI: 10.1007/BF01003301

HOLMGREN, S., S. NILSSON (1999): Digestive System. U: Sharks, Skates, and Rays: The Biology of Elasmobranch Fishes. (Hamlett, W. C. Ur.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore, London, str. 144-174.

HORN, M. H. (1998): Feeding and digestion. U: The Physiology of Fishes (Evans, D. H., J. B. Claiborne, Ur.), CRC press, Boca Raton, str. 43-63.

JARDAS, I. (1996): Jadranska ihtiohafuna. Školska knjiga, Zagreb.

JARDAS, I., A. PALLAORO, N. VRGOČ, S. JUKIĆ-PELADIĆ, V. DADIĆ (2008): Crvena knjiga morskih riba Hrvatske. Ministarstvo kulture, Državni zavod za zaštitu prirode, Republika Hrvatska, Zagreb, str. 396.

JARDAS, I., M. ANTI, V. NERLOVI, A. PALLAORO (2007): Diet of the smooth-hound, *Mustelus mustelus* (Chondrichthyes: Triakidae), in the eastern Adriatic Sea. Cybium 31, 459-464.

JHAVERI, P., Y. P. PAPASTAMATIOU, D. P. GERMAN (2015): Digestive enzyme activities in the guts of bonnethead sharks (*Sphyrna tiburo*) provide insight into their digestive strategy and evidence for microbial digestion in their hindguts. *Comp. Biochem. Physiol. A* 189, 76-83.

DOI: 10.1016/j.cbpa.2015.07.013

JIANG, J., X. Y. WU, X. Q. ZHOU, L. FENG, Y. LIU, W. D. JIANG, P. WU, Y. ZHAO (2016): Effects of dietary curcumin supplementation on growth performance, intestinal digestive enzyme activities and antioxidant capacity of crucian carp *Carassius auratus*. *Aquaculture* 463, 174-180.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2016.05.040

JOHNSON, K. S., K. D. CLEMENTS (2022): Histology and ultrastructure of the gastrointestinal tract in four temperate marine herbivorous fishes. *J. Morphol.* 283, 16-34.

DOI: 10.1002/jmor.21424.

JÖSCH, C., L. O. KLOTZ, H. SIES (2003): Identification of cytosolic leucyl aminopeptidase (EC 3.4.11.1) as the major cysteinylglycine hydrolysing activity in rat liver. *Biol. Chem.* 384, 213-218.

DOI: 10.1515/BC.2003.023

KAPOOR, B. G., H. SMIT, I. A. VERIGHINA (1975): The Alimentary Canal and Digestion in Teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13, 109-239.

DOI: 10.1016/S0065-2881(08)60281-3

KIERNAN, J. A. (2015): *Histological and Histochemical Methods*. 5. izdanje, Scion Publishing Limited, United Kingdom, str. 342-406.

KIM, Y. S., S. B. HO (2010): Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 12, 319-330.

DOI: 10.1007/s11894-010-0131-2

KOLKOVSKI, S. (2001): Digestive Enzymes in Fish Larvae and Juveniles-Implications and Applications To Formulated Diets. *Aquaculture* 200, 181–201.

DOI: 10.1016/S0044-8486(01)00700-1

KOUTSENI, V., P. K. KARACHLE, P. MEGALOFONOU (2017a): Diet of the small-spotted catshark *Scyliorhinus canicula* in the Aegean Sea (eastern Mediterranean). Mar. Biol. Res. 13, 161-173.

DOI: 10.1080/17451000.2016.1239019

KOUTSENI, V., P. K. KARACHLE, P. MEGALOFONOU, E. LEFKADITOU (2017b): Cephalopod prey of two demersal sharks caught in the Aegean Sea (eastern Mediterranean). J. Mar. Biol. Assoc. UK 98, 1-8.

DOI: 10.1017/S002531541700159X

KOZARIĆ, Z. (1997): Veterinarska histologija. Naklada Karolina, Zagreb.

KOZARIĆ, Z. (2001): Morfologija riba. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

KOZARIĆ, Z., S. KUŽIR, S. NEJEDLI, Z. PETRINEC, E. SREBOČAN (2004): Histochemical distribution of digestive enzymes hake, *Merluccius merluccius* L. 1758. Vet. Arhiv. 74, 299-308.

KOZARIĆ, Z., S. KUŽIR, Z. PETRINEC, E. GJURČEVIĆ, A. OPAČAK (2006): Histochemical distribution of digestive enzymes in intestine of goldline, *Sarpa salpa* L. 1758. J. Appl. Ichthyol. 22, 43-48.

DOI: 10.1111/j.1439-0426.2006.00694.x

KOZARIĆ, Z., S. KUŽIR, Z. PETRINEC, E. GJURČEVIĆ, M. BOŽIĆ (2008): The Development of the Digestive Tract in Larval European Catfish (*Silurus glanis* L.). Anat. Histol. Embryol. 37, 141-146.

DOI: 10.1111/j.1439-0264.2007.00812.x

KOZARIĆ, Z., Z. PETRINEC, S. KUŽIR, E. GJURČEVIĆ, B. BAŽDARIĆ (2011): Histochemical Analyses of Digestive Enzymes in the Intestine of Adult Large-Scaled Gurnard (*Lepidotrigla cavillone*, Lacepède, 1801). Anat. Histo. Embryol. 40, 314-320.

DOI: 10.1111/j.1439-0264.2011.01074.x

KRAMER, D. L., M. J. BRYANT (1995): Intestine length in the fishes of a tropical stream: 2. Relationships to diet – the long and short of a convoluted issue. *Environ. Biol. Fish* 42, 129-141.

DOI: 10.1007/BF00001991

KROGDAHL, Å., G.-I. HEMRE, T. P. MOMMSEN (2005): Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquacult. Nutr.* 11, 103-122.

DOI: 10.1111/j.1365-2095.2004.00327.x

KUROKAWA, T., T. SUZUKI (1998): Development of intestinal brush border aminopeptidase in the larval japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 162, 113-124.

DOI: 10.1016/S0044-8486(98)00171-9

KUZ'MINA, V. V., L. B. BALABANOVA, A. K. SMIRNOV (2019): Ultrastructure of Intestinal Epithelium in Cartilaginous Fish. *J. Ichthyol.* 59, 90-96.

DOI: 10.1134/S0032945219010041

KUŽIR, S., E. GJURČEVIĆ, S. NEJEDLI, B. BAŽDARIĆ, Z. KOZARIĆ (2012): Morphological and histochemical study of intestine in wild and reared European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 38, 625-633.

DOI: 10.1007/s10695-011-9543-7

LALLÈS, J. P. (2010): Intestinal alkaline phosphatase: multiple biological roles in maintenance of intestinal homeostasis and modulation by diet. *Nutr. Rev.* 68, 323-332.

DOI: 10.1111/j.1753-4887.2010.00292.x

LALLÈS, J. P. (2019): Intestinal alkaline phosphatase in the gastrointestinal tract of fish: biology, ontogeny, and environmental and nutritional modulation. *Rev. Aquacult.* 12, 555-581.

DOI: 10.1111/raq.12340

LAURIANO, E. R, M. CALÒ, G. SILVESTRI, D. ZACCONE, S. PERGOLIZZI, P. LO CASCIO (2012): Mast cells in the intestine and gills of the sea bream, *Sparus aurata*, exposed to a polychlorinated biphenyl, PCB 126. *Acta Histochem.* 114, 166-171.

DOI: 10.1016/j.acthis.2011.04.004

LAURIANO, E. R., S. PERGOLIZZI, M. ARAGONA, G. MONTALBANO, M. C. GUERRERA, R. CRUPI, C. FAGGIO, G. CAPILLO (2019): Intestinal immunity of dogfish *Scyliorhinus canicula* spiral valve: A histochemical, immunohistochemical and confocal study. *Fish Shellfish Immunol.* 87, 490-498.

DOI: 10.1016/j.fsi.2019.01.049

LEAKE, L. D. (1975): Class Chondrichthyes. Class Osteichthyes. U: Comparative histology: an introduction to the microscopic structure of animals. Academic Press, London, New York str. 498-551.

LEIGH, S. C., Y. PAPASTAMATIOU, D. P. GERMAN (2017): The nutritional physiology of sharks. *Rev. Fish. Biol. Fisheries* 27, 561-585.

DOI: 10.1007/s11160-017-9481-2

LIEBICH, H. G. (2019): Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds. 5th ed., 5M Publishing Ltd, UK.

LIPEJ, L., A. DE MADDALENA, A. SOLDI, F. JANŽEKOVIČ (2004): Sharks of the Adriatic Sea. Knjižnica Annales Majora, Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče Koper, Koper.

LI, S. Q., L. FENG, W. D. JIANG, Y. LIU, P. WU, J. ZHAO, S. Y. KUANG, J. JIANG, L. TANG, W. N. TANG, Y. A. ZHANG, X. Q. ZHOU (2015): Deficiency of dietary niacin decreases digestion and absorption capacities via declining the digestive and brush border enzyme activities and downregulating those enzyme gene transcription related to TOR pathway of the hepatopancreas and intestine in young grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Aquacult. Nutr.* 22, 1267-1282.

DOI: 10.1111/anu.12333

LIU, Y., L. CHI, L. FENG, J. JIANG, W. D. JIANG, K. HU, S. H. LI, X. Q. ZHOU (2011): Effects of graded levels of dietary vitamin C on the growth, digestive capacity and intestinal microflora of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). *Aquacult. Res.* 42, 534-548.

DOI: 10.1111/j.1365-2109.2010.02649.x

LOJDA, Z., R. GOSSRAU, T. H. SCHIEBLER (1979): Enzyme Histochemistry. A laboratory manual. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

DOI: 10.1007/978-3-642-67234-7

LØKKA, G., L. AUSTBØ, K. FALK, I. BJERKÅS, E. O. KOPPANG (2013): Intestinal Morphology of the Wild Atlantic Salmon (*Salmo salar*). J. Morphol. 274, 859–876.

DOI: 10.1002/jmor.20142

LOPEZ-LOPEZ, L., I. PRECIADO, F. VELASCO, I. OLASO, J. L. GUTIÉRREZ-ZABALA (2011): Resource partitioning amongst five coexisting species of gurnards (Scorpaeniforme: Triglidae): Role of trophic and habitat segregation. J. Sea Res. 66, 58-68.

DOI: 10.1016/j.seares.2011.04.012

MACPHERSON, E. (1979): Estudio sobre el regimen alimentario de algunos peces en el Mediterraneo occidental. Miscelània Zoològica 5, 93-107.

MARTINHO, F., C. SÀ, J. FÃLCAO, H. N. CABRAL, M. Â. PARDAL (2012): Comparative feeding ecology of two elasmobranch species, *Squalus blainville* and *Scyliorhinus canicula*, off the coast of Portugal. Fish. Bull. 110, 71-84.

MATTISSON, A., R. FÄNGE (1982): The Cellular Structure of the Leydig Organ in the Shark, *Etmopterus spinax* (L.). Biol. Bull. 162, 182-194.

DOI: 10.2307/1540813.

MESCHER, A. L. (2018): Junqueira's Basic Histology. 15. izdanje, McGraw Hill Education, New York, Chicago, San Francisco, Athens, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, Singapore, Sydney, Toronto.

MOKHTAR, D. M. (2017): The digestive system. U: Fish histology: from cells to organs. Apple Academic Press, New Jersey, str. 108-172.

MONTANINI, S., M. STAGIONI, E. BENNI, M. VALLISNERI (2017): Feeding strategy and ontogenetic changes in diet of gurnards (Teleostea: Scorpaeniformes: Triglidae) from the Adriatic Sea. Eur. Zool. J. 84, 356-367.

DOI: 10.1080/24750263.2017.1335357

MORALES-NIN , B., G. J. TORES, A. LOMBARTE, L. RECASENS (1998) Otolith growth and age estimation in the European hake. J. Fish Biol. 53, 1155-1168.

DOI: 10.1111/j.1095-8649.1998.tb00239.x

MORTE, S., M. J. REDON, A. SANZ-BRAU (1997): Feeding habits of juvenile *Mustelus mustelus* (Carcharhiniformes, Triakidae) in the western Mediterranean. Cah. Biol. Mar. 38, 103-107.

NGUYEN, C. D. H., G. AMOROSO, T. VENTURA, A. ELIZUR (2020): Assessing the Pyloric Caeca and Distal Gut Microbiota Correlation with Flesh Color in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L., 1758). Microorganisms 8, 1244.

DOI: 10.3390/microorganisms8081244

NIKOLSKY, G. V. (1963): The Ecology of Fishes. Academic Press, London, str. 352.

OLASO, I., F. VELASCO, F. SÁNCHEZ, A. SERRANO, C. RODRIGUEZ-CABELLO, O. CENDERERO (2005): Trophic relation of Lesser-Spotted Catshark (*Scyliorhinus canicula*) and Blackmouth Catshark (*Galeus melastomus*) in the Cantabrian Sea. J. Northw. Atl. Fish. Sci. 35, 481-494.

DOI: 10.2960/J.v35.m494

OSTASZEWSKA, T., M. KAMASZEWSKI (2019): Digestive System. U: The Histology of Fishes (Kirschbaum, F., K. Formicki, Ur.), CRC Press, Boca Raton, London, New York, str. 88-100.

PEARSE, A. G. E. (1968): Histochemistry, Theoretical and Applied. 3rd ed., J. & A. Churchill Ltd., London.

PETRINEC, Z., S. NEJEDLI, S. KUŽIR, A. OPAČAK (2005): Mucosubstances of the digestive tract mucosa in northern pike (*Esox lucius* L.) and european catfish (*Silurus glanis* L.). Vet. Arhiv 75, 317-327.

PHILIPS, A. E. (2012): Feeding behavior of the European hake *Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758 (Family: Gadidae) from Egyptian Mediterranean waters off Alexandria. Egypt. J. Aquat. Res. 38, 39-44.

DOI: 10.1016/j.ejar.2012.09.002

PIÑEIRO, C., M. SAÍNZA (2003) Age estimation, growth and maturity of the European hake (*Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758)) from Iberian Atlantic waters. ICES J. Mar. Sci. 60, 1086-1102.

DOI: 10.1016/S1054-3139(03)00086-9

RAHMAN, M., M. ALAM, T. ZAMAN (2013): Relationship between Total Length and Digestive Tract of Different Carnivorous Fishes. Prog. Agr. 23, 39-49.

DOI: 10.3329/pa.v23i1-2.16564

RAY, A. K., E. RINGØ (2014): The Gastrointestinal Tract of Fish. U: Aquacult. Nutr.: Gut Health, Probiotics and Prebiotics. (Merrifield, D., E. Ringø, Ur.), John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, str. 1-10.

RAWLINGS, N. D., G. SALVESEN (2004): Metallopeptidases. U: Handbook of proteolytic enzymes. 3. izdanje, Elsevier Academic Press, Oxford, UK.

REFSTIE, S., A. M. BAKKE-MCKELLEP, M. H. PENN, A. SUNDBY, K. D. SHEARER, A. KROGDAHL (2006): Capacity for digestive hydrolysis and amino acid absorption in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with soybean meal or inulin with or without addition of antibiotics. Aquaculture 261, 392-406.

DOI:10.1016/j.aquaculture.2006.08.005

REIFEL, C. W., A. A. TRAVILL (1979): Structure and carbohydrate histochemistry of the intestine in ten teleostean species. J. Morphol. 162, 343-360.

DOI: 10.1002/jmor.1051620305

RIBBLE, D. O., M. H. SMITH (1983): Relative intestine length and feeding ecology of freshwater fishes. *Growth* 47, 292-300.

RICCIONI, G., M. STAGIONI, C. PICCINETTI, S. LIBRALATO (2018): A metabarcoding approach for the feeding habits of European hake in the Adriatic Sea. *Ecol. Evol.* 8, 10435-10447.

DOI: 10.1002/ece3.4500

RINGØ, E., R. E. OLSEN, T. M. MAYHEW, R. MYKLEBUST (2003): Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture* 227, 395-415.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2003.05.001

SAÏDI, B., S. ENAJJAR, M. N. BRADAÏ, A. BOUAÏN (2009): Diet composition of smooth-hound shark, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758), in the Gulf of Gabès, southern Tunisia. *J. Appl. Ichthyol.* 25, 113-118.

DOI: 10.1111/j.1439-0426.2006.01306.x

SANDERINK, G. J., Y. ARTUR, G. SIEST (1988): Human aminopeptidases: a review of the literature. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 795-807.

DOI: 10.1515/cclm.1988.26.12.795

SANO, Y., H. KANBE, M. KIHARA (2021): Morphological changes of pyloric caeca and their relevancy to motility in laboratory-reared Kurosoi rockfish (*Sebastes schlegelii* Hilgendorf), using an in vitro assay method. *Aquaculture* 539, 736604.

DOI: 10.1016/j.aquaculture.2021.736604

SANZ, Y. (2007): Aminopeptidases. U: *Industrial Enzymes*. (Polaina, J., A. P. Maccabe, Ur.), Springer Dordrecht, str. 243-260.

DOI: 10.1007/1-4020-5377-0

SAYYAF DEZFULI, B. S., A. LUI, L. GIARI, F. PIRONI, M. MANERA, M. LORENZONI, E. J. NOGA (2013): Piscidins in the intestine of European perch, *Perca fluviatilis*, naturally infected with an enteric worm. *Fish Shellfish Immun.* 35, 1539-1546.

DOI: 10.1016/j.fsi.2013.08.023

SAYYAF DEZFULI, B. S., L. GIARI, M. LORENZONI, A. CAROSI, M. MANERA, G. BOSI (2018a): Pike intestinal reaction to *Acanthocephalus lucii* (Acanthocephala): immunohistochemical and ultrastructural surveys. *Parasite. Vector.* 11, 424.

DOI: 10.1186/s13071-018-3002-6

SAYYAF DEZFULI, B. S., M. MANERA, G. BOSI, P. MERELLA, J. A. DePASQUALE, L. GIARI (2018b): Description of epithelial granular cell in catshark spiral intestine: Immunohistochemistry and ultrastructure. *J. Morphol.* 1-9.

DOI: 10.1002/jmor.20932

SERRANO, A., F. VELASCO, I. OLASO, F. SÁNCHEZ (2003): Macrobenthic crustaceans in the diet of demersal fish in the Bay of Biscay in relation to abundance in the environment. *Sarsia* 88, 36-48.

DOI: 10.1080/00364820308469

SFACTERIA, A., M. BRINES, U. BLANK (2014): The mast cell plays a central role in the immune system of teleost fish. *Mol. Immunol.* 63, 3-8.

DOI: 10.1016/j.molimm.2014.02.007

SHEEHAN, D. C., B. B. HRAPCHAK (1980): Theory and practice of Histotechnology. 2. izdanje, Battelle Press, Columbus, Ohio.

SJAASTAD, Ø. V., O. SAND, K. HOVE (2017): Probavni sustav. U: Fiziologija domaćih životinja. (Milinković Tur, S., M. Šimpraga, Ur.), Naklada Slap, Zagreb, str. 533-616.

SMALE, M. J., L.J. V. COMPAGNO (2010): Life history and diet of two southern African smoothhound sharks, *Mustelus mustelus* (Linnaeus, 1758) and *Mustelus palumbes* Smith, 1957 (Pisces: Triakidae). *S. Afr. J. Marine Sci.* 18, 229-248.

DOI: 10.2989/025776197784160992

SOLOVYEV, M., E. GISBERT (2016): Influence of time, storage temperature and freeze/thaw cycles on the activity of digestive enzymes from gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Fish Physiol. Biochem.* 42, 1383-1894.

DOI: 10.1007/s10695-016-0226-2

STAGIONI, M., S. MONTANINI, M. VALLISNERI (2011): Feeding habits of European hake, *Merluccius merluccius* (Actinopterygii: Gadiformes: Merlucciidae), from the northeastern Mediterranean Sea. *Acta Ichthyol. Piscat.* 41, 277-284.

DOI: 10.3750/AIP2011.41.4.03

SUN, J., Y. WANG, A. LV, J.-A. XIAN, Q. WANG, S. ZHANG, Y. GUO, K. XING (2019): Histochemical distribution of four types of enzymes and mucous cells in the intestine of koi carp (*Cyprinus carpio* var. *koi*). *Fish Physiol. Biochem.* 45, 1367-1376.

DOI: 10.1007/s10695-019-00673-y

SUVARNA, S. K., C. LAYTON, J. D. BANCROFT (2019): Bancroft's theory and practice of histological techniques. 8. izdanje, Elsevier, Scotland.

ŠANTIĆ, M., B. RAĐA, A. PALLAORO (2012): Feeding habits of small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula* Linnaeus, 1758) from the eastern central Adriatic Sea. *Marine Biology Research* 8, 1003-1011.

DOI: 10.1080/17451000.2012.702912

ŠTRAUS, B. (2009): Enzimi. U: Štrausova Medicinska biokemija. (Čvorišćec, D, I. Čepelak, Ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 245-312.

ŠVOB, M. (1974): Histološke i histokemijske metode. Svjetlost, Sarajevo.

TACON, A. G. J., C. B. COWEY (1985): Protein and amino acid requirements. U: *Fish Energetics: New Perspectives*. (Tytler, P., P. Calow, Ur.), The Johns Hopkins University Press, Baltimore, str. 155-183.

TAN, L. N., L. FENG, Y. LIU, J. JIANG, W. D. JIANG, K. HU, S. H. LI, X. Q. ZHOU (2011): Growth, body composition and intestinal enzyme activities of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *Jian*) fed graded levels of dietary zinc. *Aquacult. Nutr.* 17, 338-345.

DOI: 10.1111/j.1365-2095.2010.00793.x

TAYLOR, A. (1993): Aminopeptidase: structure and function. *Faseb. J.* 7, 290-298.

DOI: 10.1096/fasebj.7.2.8440407

TENGJAROENKUL, B., B. J. SMITH, T. CACECI, S. A. SMITH (2000): Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. *Aquaculture* 182, 317-327.

DOI: 10.1016/s0044-8486(99)00270-7

UGOLEV, A. M. (1965): Membrane (contact) digestion. *Physiol. Rev.* 45, 555-595.

VAJHI, A. R., O. ZEHTABVAR, M. MASOUDIFARD, M. MOGHIM, M. AKHTARZADE (2013): Digestive system anatomy of the *Acipenser persicus*: New features. *Iranian J. Fish. Sci.* 12, 939-946.

DOI: 10.22092/ijfs.2018.114332

VALLS, M., A. QUETGLAS, F. ORDINES, J. MORANTA (2011): Feeding ecology of demersal elasmobranches from the shelf and slope off the Balearic Sea (western Mediterranean). *Sci. Mar.* 75, 633-639.

DOI: 10.3989/scimar.2011.75n4633

VERDILE, N., R. PASQUARIELLO, M. SCOLARI, G. SCIRÈ, T. A. L. BREVINI, F. GANDOLFI (2020): A Detailed Study of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Intestine Revealed That Digestive and Absorptive Functions Are Not Linearly Distributed along Its Length. *Animals* 10, 745.

DOI: 10.3390/ani10040745

VIDAL, N., A. D'ANATRO, I. GONZALEZ-BERGONZONI, F. T. DE MELLO, D. E. NAYA (2022): Morphological variation of the digestive tract: a feeding behaviour response in a freshwater fish species. *Environ Biol Fish*, 105, 717-727.

DOI: 10.1007/s10641-022-01283-z

VIEIRA-LOPES, D. A., N. L. PINHEIRO, A. SALES, A. VENTURA, F. G. ARAÚJO, I. D. GOMES, A. A. NASCIMENTO (2013): Immunohistochemical study of the digestive tract of *Oligosarcus hepsetus*. *World J. Gastroenterol.* 19, 1919-1929.

DOI: 10.3748/wjg.v19.i12.1919

VILLANUEVA, J., R. VANACORE, O. GOICOECHEA, R. AMTHAUER (1997) Intestinal alkaline phosphatase of the fish *Cyprinus carpio*: Regional distribution and membrane association. J. Exp. Zool. 279, 347-355.

DOI: 10.1002/(SICI)1097-010X(19971101)279:4<347::AID-JEZ4>3.0.CO;2-O

WAGNER, C. E., P. B. MCINTYRE, K. S. BUELS, D. M. GILBERT, E. MICHEL (2009): Diet predicts intestine length in Lake Tanganyika's cichlid fishes. Funct. Ecol. 23, 1122-1131.

DOI: j.1365-2435.2009.01589.x

WANG, Y. Z., J. F. SUN, A. J. LV, S. L. ZHANG, Y. Y. SUNG, H. Y. SHI, X. C. HU, S. J. CHEN, K. Z. XING (2018): Histochemical distribution of four types of enzymes and mucous cells in the gastrointestinal tract of reared half-smooth tongue sole *Cynoglossus semilaevis*. J. Fish Biol. 92, 3-16.

DOI: 10.1111/jfb.13469

WEI, S. P., W. D. JIANG, P. WU, Y. LIU, Y. Y. ZENG, J. JIANG, S. Y. KUANG, L. TANG, Y. A. ZHANG, X. Q. ZHOU, L. FENG (2018): Dietary magnesium deficiency impaired intestinal structural integrity in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Sci. Rep. 8, 12705.

WILSON, J. M., L. F. C. CASTRO (2011): Morphological Diversity of the Gastrointestinal Tract in Fishes. U: The multifunctional gut of fish. (Grosell, M., A. P. Farrell, C. J. Brauner, Ur.), Elsevier, Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, Oxford, New York, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo, str. 2-56.

DOI: 10.1016/S1546-5098(10)03001-3

WU, G.-P., M.-J. CAO, Y. CHEN, B.-X. LIU, W.-J. SUN (2008): Leucine Aminopeptidase from Red Sea Bream (*Pagrus major*) Skeletal Muscle: Purification, Characterization, Cellular Location, and Tissue Distribution. J. Agric. Food Chem. 56, 9653-9660.

DOI: 10.1021/jf801477r

WU, M., J. WANG, Z. WANG, J. ZHAO, Y. HU, X. CHEN (2017): Sequence and functional analysis of intestinal alkaline phosphatase from *Lateolabrax maculatus*. Fish Physiol. Biochem. 43, 1463-1476.

DOI: 10.1007/s10695-017-0385-9

WU, R. X., W. S. HONG, Q. Y. ZHANG, S. X. CHEN (2009): Comparative enzyme activities of the intestinal brush border membranes of the herbivorous mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* and the carnivorous Chinese black sleeper *Bostrichthys sinensis*. J. Appl. Ichthyol. 25, 571-575.

DOI: 10.1111/j.1439-0426.2009.01302.x

XIAO, W., W. JIANG, L. FENG, Y. LIU, P. WU, J. JIANG, Y. ZHANG, X. ZHOU (2017): Supplementation of enzyme-treated soy protein saves dietary protein and promotes digestive and absorptive ability referring to TOR signaling in juvenile fish. Fish Physiol. Biochem. 43, 1657-1675.

DOI: 10.1007/s10695-017-0400-1

YUAN, J., L. FENG, W. D. JIANG, Y. LIU, J. JIANG, S. H. LI, S. Y. KUANG, L. TANG, X. Q. ZHOU (2014): Effects of dietary vitamin K levels on growth performance, enzyme activities and antioxidant status in the hepatopancreas and intestine of juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian). Aquacult. Nutr. 22, 352-366.

DOI: 10.1111/anu.12264

ZHAO, Y., Y. HU, X. Q. ZHOU, X. Y. ZENG, L. FENG, Y. LIU, W. D. JIANG, S. H. LI, D. B. LI, X. Q. WU, C. M. WU, J. JIANG (2015): Effects of dietary glutamate supplementation on growth performance, digestive enzyme activities and antioxidant capacity in intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Aquacult. Nutr. 21, 935-941.

DOI: 10.1111/anu.12215

ZIHLER, F. (1982): Gross morphology and configuration of digestive tracts of Cichlidae (Teleostei, Perciformes): Phylogenetic and functional significance. Neth. J. Zool. 32, 544-571.

DOI: 10.1163/002829682x00210

ZORICA, B., D. EZGETA-BALIĆ, O. VIDJAK, V. VULETIN, M. ŠESTANOVIĆ, I. ISAJLOVIĆ, V. ČIKEŠ KEČ, N. VRGOČ, C. HARROD (2021): Diet Composition and Isotopic Analysis of Nine Important Fisheries Resources in the Eastern Adriatic Sea (Mediterranean). Front. Mar. Sci. 8, 609432.

DOI: 10.3389/fmars.2021.609432

9. PRILOZI

POPIS SLIKA I TABLICA

Slike

Slika 1. Podjela probavnog sustava korištena u ovom radu. Dijelovi probavnog sustava otisnuti zadebljano predmet su istraživanja.

Slika 2. Podjela probavnog sustava u različitim morskih vrsta riba (prilagođeno prema EGERTON i sur., 2018.).

Slika 3. Prikaz različitih oblika želuca u riba: ravni želuci (1 i 2), želudac sifonskog oblika (3) i cekalni tipovi želuca (4 i 5) (preuzeto iz BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.).

Slika 4. Prikaz različitih oblika nabora u spiralnom crijevu hrskavičnjača (preuzeto iz HOLMGREN i NILSSON, 1999.).

Slika 5. Prikaz različitih pojavnosti crijeva u riba (preuzeto iz BUDDINGTON i KUZ'MINA, 2000.).

Slika 6. Veza između udjela bjelančevina u hrani i njihove iskoristivosti u biljoždernih i mesoždernih riba (prilagođeno prema BALLANTYNE, 2014.).

Slika 7. Morfološke karakteristike tijela mačke bljedice. Na slici su označeni dijelovi tijela: pjege na dorzalnom dijelu tijela (bijela zvjezdica), parne prsne peraje (crne strelice), parne trbušne peraje (streličasti vrhovi), dvije leđne peraje (bijeke strelice) i repna peraja (crna zvjezdica).

Slika 8. Morfološke karakteristike tijela psa mekaša. Na slici su označeni dijelovi tijela: prsna peraja (crna strelica), bijeli trbuh (bijeke zvjezdice), leđne peraje (bijeke strelice), trbušna peraja (streličasti vrh) i repna peraja (crna zvjezdica).

Slika 9. Morfološke karakteristike tijela oslića. Na slici su bijelim zvjezdicama označeni najširi dijelovi tijela u području prsne peraje. Vidljiva je sivkasta boja tijela dok je ventralni dio oslića u području trbuha svjetlije boje (crne zvjezdice).

Slika 10. Morfološke karakteristike tijela lastavice prasice. Na slici je bijelom strelicom označeno rostralno izbočenje na glavi dok je zvjezdicom označena prsna peraja. Crna strelica prikazuje završnu točku bodlje te je vidljivo da njezina dužina seže do okomice povučene na polovicu dužine prsne peraje.

Slika 11. Lokacije dijela ulovljenih riba u srednjem dijelu Jadranskog mora (A i B).

Slika 12. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava hrskavičnjača. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i

histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), prednji (6) i spiralni (7) dio crijeva te rektum (8).

Slika 13. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava oslića. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), prednji (6), srednji (7) i stražnji (8) dio crijeva te rektum (9).

Slika 14. Shema uzorkovanja dijelova probavnog sustava lastavice prasice. Crnim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta uzorkovanja organa za potrebe istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava. Na slici je prikazan prednji (1) i stražnji (2) dio jednjaka, prednji (3) i stražnji (4) dio želuca, pilorički sfinkter (5), pilorički nastavci (6), prednji (7), srednji (8) i stražnji (9) dio crijeva te rektum (10).

Slika 15. Probavni sustav mačke bljedice. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, spiralno crijevo (4) i rektum (5).

Slika 16. Probavni sustav psa mekaša. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, spiralno crijevo (4) i rektum (5).

Slika 17. Probavni sustav oslića. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, prednji (4), srednji (5) i stražnji (6) dio crijeva te rektum (7).

Slika 18. Probavni sustav lastavice prasice. Na slici su prikazani: jednjak (1), prednji (2) i stražnji (3) dio želuca, pilorički nastavci (4), prednji (5), srednji (6) i stražnji (7) dio crijeva te rektum (8).

Slika 19. Histologija jednjaka mačke bljedice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi jednjaka: pokrovni epitel (1), lamina propria (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj i adventicija (6) te je strelicom označen Leydigov organ (HE). Na Slici B strelicama su označene glatke mišićne stanice (VVG).

Slika 20. Epitel jednjaka mačke bljedice (A i B). Na Slici A prikazan je pokrovni epitel u dijelu s Leydigovim organom (HE). Na Slici B strelicom je prikazan pokrovni epitel u dijelu bez Leydigovog organa (HE).

Slika 21. Histologija prednjeg dijela želuca mačke bljedice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (MT). Na Slici B prikazane su želučane žlijezde (HE).

Slika 22. Histologija stražnjeg dijela želuca mačke bljedice. Na Slici su označeni dijelovi: pokrovni epitel koji se utiskuje u laminu propriju (1), muskularis mukoze (2), podsluznica (3) unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj i seroza (6) (HE).

Slika 23. Histologija spiralnog crijeva mačke bljedice (A i B). Slika A prikazuje generalnu građu stijenke i spiralnog nabora (MT). Na Slici B označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3), podsluznica (4, strelica), unutrašnji mišićni sloj (5) i seroza (6) (VVG).

Slika 24. Histologija rektuma mačke bljedice (A i B). Slika A prikazuje generalnu građu stijenke rektuma (HE). Na Slici B označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), proprija – podsluznica (2), unutrašnji mišićni sloj (3) (VVG).

Slika 25. Histologija jednjaka psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi jednjaka: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3) te je strelicom označen Leydigov organ (HE). Na Slici B označena je podsluznica (1), unutrašnji (2) i vanjski (3) mišićni sloj; crnom je strelicom označen Leydigov organ, a streličastim vrhovima elastična vlakna (VVG).

Slika 26. Epitel jednjaka psa mekaša (A i B). Na Slici A prikazan je pokrovni epitel u dijelu s Leydigovim organom, a na Slici B epitel dijela bez Leydigovog organa (HE).

Slika 27. Histologija prednjeg dijela želuca psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), tračci vezivnog tkiva između žlijezda (streličasti vrhovi), muskularis mukoze (3), podsluznica (4), unutrašnji mišićni sloj (5) (MT). Na Slici B prikazane su želučane žlijezde (HE).

Slika 28. Histologija stražnjeg dijela želuca psa mekaša (A i B). Na Slici A streličastim vrhovima označena je muskularis mukoze (VVG). Na Slici B zvjezdicom je naznačen unutrašnji mišićni sloj piloričkog sfinktera (HE).

Slika 29. Histologija spiralnog crijeva psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), *stratum compactum* (3), muskularis mukoze (4), žučovod u podsluznici (5), unutrašnji mišićni sloj (6) i seroza (7) (VVG). Na Slici B prikazana je građa nabora (VVG).

Slika 30. Histologija rektuma psa mekaša (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi: pokrovni epitel (1), lamina proprija – podsluznica (2), mišićni slojevi (3) i seroza (4) (VVG). Na Slici B prikazan je epitel rektuma (HE).

Slika 31. Histologija jednjaka oslića. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3) i unutrašnji mišićni sloj (4) (HE).

Slika 32. Histologija prednjeg dijela želuca oslića (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (HE). Na Slici B strelicama su označena crno obojena retikularna vlakna između želučanih žlijezda i u endomiziju glatkih mišićnih stanica (RK).

Slika 33. Histologija stražnjeg dijela želuca oslića. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) i podsluznica (4) (HE).

Slika 34. Histologija crijeva oslića (A, B i C). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke prednjeg dijela crijeva: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni slojevi i seroza (6) (HE). Na Slici B zvjezdicom je označen tanji sloj vezivnog tkiva srednjeg dijela crijeva (HE). Na Slici C prikazana je građa stražnjeg dijela crijeva (HE).

Slika 35. Histologija rektuma oslića (A i B). Slika A prikazuje poprečni presjek rektuma (HE). Na Slici B označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji (4) i vanjski (5) mišićni sloj, seroza (6) (HE).

Slika 36. Histologija jednjaka lastavice prasice (A i B). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija – podsluznica (2), glatke mišićne stanice (3) (HE). Na Slici B zvjezdicom je označen unutrašnji mišićni sloj, a streličastim vrhom elastična vlakna (VVG).

Slika 37. Prikaz stanica u vezivnom tkivu jednjaka lastavice prasice (A i B). Na Slici A strelicama su označene pronađene stanice u jednjaku (HE). Na Slici B streličastim vrhovima označene su iste stanice prikazane drugom metodom bojenja, dok su strelicom označena elastična vlakna (VVG).

Slika 38. Histologija prednjeg dijela želuca oslića. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (strelice) i podsluznica (3) (HE).

Slika 39. Histologija stražnjeg dijela želuca lastavice prasice. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), muskularis mukoze (3) (HE).

Slika 40. Histologija piloričkih nastavaka lastavice prasice. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), mišićni slojevi (4) te je streličastim vrhom označena seroza (VVG).

Slika 41. Histologija crijeva lastavice prasice (A, B i C). Na Slici A označeni su dijelovi stijenke prednjeg dijela crijeva: pokrovni epitel (1), lamina proprija (2), podsluznica (3), unutrašnji i vanjski mišićni sloj (4) i seroza (5) (HE). Na Slici B prikazana je građa srednjeg dijela srednjeg segmenta crijeva (VVG). Na Slici C prikazana je građa stražnjeg dijela crijeva (HE).

Slika 42. Histologija rektuma lastavice prasice. Na Slici su označeni dijelovi stijenke: pokrovni epitel (1) i lamina proprija – podsluznica (2) (HE).

Slika 43. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u spiralnom crijevu mačke bljedice (A i B).

Slika 44. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu mačke bljedice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, spiralnom crijevu (D) i rektumu (E).

Slika 45. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu mačke bljedice (A – D). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca te spiralnom crijevu (D).

Slika 46. Pozitivna reakcija aminopeptidaze u spiralnom crijevu mačke bljedice.

Slika 47. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu psa mekaša (A i B). Na Slici A su prikazane reakcije u jednjaku, a na Slici B reakcije u spiralnom crijevu.

Slika 48. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu psa mekaša (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, spiralnom crijevu (D) i rektumu (E).

Slika 49. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu psa mekaša (A – C). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u prednjem (A) i stražnjem (B) dijelu želuca, te u spiralnom crijevu (C).

Slika 50. Pozitivna reakcija aminopeptidaze u spiralnom crijevu psa mekaša.

Slika 51. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu oslića (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B), srednjem (C) i stražnjem (D) dijelu crijeva te u rektumu (E).

Slika 52. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu oslića (A – F). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), stražnjem dijelu želuca (B), prednjem (C), srednjem (D) i stražnjem (E) dijelu crijeva te u rektumu (F).

Slika 53. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu oslića (A – C). Na slikama su prikazane reakcije u prednjem (A), srednjem (B) i stražnjem (C) dijelu crijeva.

Slika 54. Pozitivne reakcije aminopeptidaze u probavnom sustavu oslića (A – D). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u prednjem (A), srednjem (B) i stražnjem (C) dijelu crijeva te u rektumu (D).

Slika 55. Pozitivne reakcije alkalne fosfataze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), piloričkim nastavcima (B), prednjem (C) i srednjem (D) dijelu crijeva te u rektumu (E).

Slika 56. Pozitivne reakcije kisele fosfataze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – G). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), stražnjem dijelu želuca (B), piloričkim nastavcima (C), prednjem (D), srednjem (E) i stražnjem (F) dijelu crijeva te u rektumu (G).

Slika 57. Pozitivne reakcije nespecifične esteraze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – H). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), prednjem (B) i stražnjem (C) dijelu želuca, piloričkim nastavcima (D), prednjem (E), srednjem (F) i stražnjem (G) dijelu te u rektumu (H).

Slika 58. Pozitivne reakcije aminopeptidaze u probavnom sustavu lastavice prasice (A – E). Na slikama su prikazane reakcije u sljedećim dijelovima probavnog sustava: u jednjaku (A), piloričkim nastavcima (B), prednjem (C), srednjem (D) i stražnjem (E) dijelu crijeva.

Slika 59. Tumač kutijastih dijagrama. U središtu pravokutnika naznačena je aritmetička sredina SOG enzima dok nasuprotne stranice označavaju vrijednosti standardnih devijacija. Crtama iznad pravokutnika naznačene su najviše i najniže SOG enzima. Duži pravokutnik predstavlja veću varijabilnost.

Slika 60. Grafički prikaz varijabilnosti SOG alkalne fosfataze u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (A), te četkastoj prevlaci prednjeg (B), srednjeg (C) i stražnjeg (D) dijela crijeva koštunjača. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

Slika 61. Grafički prikaz varijabilnosti SOG alkalne fosfataze u epitelu jednjaka (A) i rektuma (B). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

Slika 62. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u epitelu prednjeg (A) i stražnjeg dijela želuca (B), spiralnog crijeva (C), prednjeg (D), srednjeg (E) i stražnjeg (F) dijela crijeva te u epitelu rektuma (G). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).

Slika 63. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u lamini propriji jednjaka (A), prednjeg (B) i stražnjeg dijela želuca (C), spiralnog crijeva (D), prednjeg (E), srednjeg (F) i stražnjeg (G) dijela crijeva te u vezivnom tkivu rektuma (H). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).

Slika 64. Grafički prikaz varijabilnosti SOG kisele fosfataze u želučanim žlijezdama. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b, c).

Slika 65. Grafički prikaz varijabilnosti SOG nespecifične esteraze u epitelu jednjaka (A), prednjeg (B) i stražnjeg (C) dijela želuca, spiralnog crijeva (D), stražnjeg dijela crijeva (E) te epitela rektuma (F). Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

Slika 66. Grafički prikaz varijabilnosti SOG aminopeptidaze u četkastoj prevlaci spiralnog crijeva hrskavičnjača (A) te četkastoj prevlaci prednjeg (B), srednjeg (C) i stražnjeg (D) dijela crijeva koštunjača. Statistički značajne razlike označene su različitim malim slovima (a, b).

Tablice

Tablica 1. Uzorci organa hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša) uzeti za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja (oznaka X) te istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava (oznaka X).

Tablica 2. Uzorci organa koštunjača (oslića i lastavice prasice) uzeti za potrebe histološkog i histokemijskog istraživanja (oznaka X) te istraživanja lokalizacije i enzimske aktivnosti probavnog sustava (oznaka X).

Tablica 3. Morfometrijsko istraživanje probavnog sustava hrskavičnjača (mačke bljedice i psa mekaša).

Tablica 4. Morfometrijsko istraživanje probavnog sustava koštunjača (oslića i lastavice prasice).

Tablica 5. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Tablica 6. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Tablica 7. Vrijednosti nespecifične esteraze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Tablica 8. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi mačke bljedice (SOG).

Tablica 9. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Tablica 10. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Tablica 11. Vrijednosti nespecifične esteraze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Tablica 12. Vrijednosti aminopeptidaze u probavnoj cijevi psa mekaša (SOG).

Tablica 13. Vrijednosti alkalne fosfataze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Tablica 14. Vrijednosti kisele fosfataze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Tablica 15. Reakcija nespecifične esteraze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Tablica 16. Reakcija aminopeptidaze u probavnoj cijevi oslića (SOG).

Tablica 17. Reakcija alkalne fosfataze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Tablica 18. Reakcija kisele fosfataze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Tablica 19. Reakcija nespecifične esteraze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

Tablica 20. Reakcija aminopeptidaze u probavnoj cijevi lastavice prasice (SOG).

10. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Lucija Bastiančić, dr. med. vet. rođena je 24. travnja 1992. u Puli. Nakon završene Opće gimnazije u Puli 2011. upisala je Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija dobila je dvije Dekanove nagrade za izvrstan uspjeh, tri stipendije Sveučilišta u Zagrebu u kategoriji za izvrsnost te jednu stipendiju Istarske županije, također u kategoriji za izvrsnost. Diplomirala je 2017. te stekla akademski naziv doktorice veterinarske medicine.

Od 10. travnja 2018. zaposlena je kao asistentica na Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Poslijediplomski doktorski studij Veterinarske znanosti upisala je 2019. Aktivno sudjeluje u izvođenju nastave iz predmeta Histologija i opća embriologija, Histology with General Embryology, Morfologija riba te Fish Morphology.

Od zaposlenja do danas sudjelovala je u većem broju međunarodnih kongresa, simpozija i radionica te u provođenju aktivnosti četiriju projekata. Usavršavala se u Laboratoriju za histopatologiju i citopatologiju Zavoda za veterinarsku patologiju i Laboratoriju za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Laboratoriju za matične stanice Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, Veterinarskom fakultetu, Sveučilišta u Ljubljani te u Aquariumu Pula. U ljetnom semestru ak. god. 2022./2023. boravila je u sklopu stipendije CEEPUS na Veterinarskom fakultetu u Brnu, Češka, s ciljem upoznavanja s načinom izvedbe predmeta Histology and Embryology I i II, dodatnog educiranja iz područja embriologije, upoznavanja s organizacijom znanstveno-istraživačkog rada te nadogradnje znanja o metodologiji pripreme i izrade histoloških i histokemijskih preparata. Članica je European Association of Veterinary Anatomists, International Society of Education in Animal Sciences, Hrvatske veterinarske komore, Hrvatskog morfološkog društva, Hrvatskog mikroskopijskog društva te Hrvatske udruge žena u veterinarskoj struci.

Do sada je kao autorica ili koautorica objavila četiri znanstvena i pet popularizacijskih članaka te je prezentirala 16 radova na međunarodnim znanstvenim skupovima.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA:

BASTIANČIĆ, L. (2020): Što je ljubimac bez brkova? Njuškica 13, 44-45.

BASTIANČIĆ, L. (2020): The First Hundred Years of the Department of Anatomy, Histology and Embryology of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Zagreb. Veterinar 1, 57-59.

BASTIANČIĆ, L. (2020): Zašto mačke imaju hrapav jezik? Njuškica 12, 80-81.

BASTIANČIĆ, L., D. HUBER, N. ŠKVORC, S. KUŽIR (2023): Variations in the histological methods of processing samples in histology and histopathology. Proceedings Book of the III International Congress of Education in Animal Sciences, 15. – 16. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 53.

BASTIANČIĆ, L., D. LEINER, M. KOLENC, G. KOVAČ, K. KORPES (2019): Put od Savske do Heinzelove ulice - osvrt na nastavu Zavoda. Izlaganja povodom obljetnice pod nazivom Prvih sto godina Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, str. 4-24.

BASTIANČIĆ, L., I. VLAHEK, V. BENKO, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2023): Histochemical research of enzymes involved in cellular digestion in the digestive tract of tub gurnard, *Chelidonichthys lucerna*. Fish Physiol. Biochem. Special Issue: Regulation of Nutrient Metabolism in Fish.

DOI: 10.1007/s10695-023-01188-3

BASTIANČIĆ, L., K. MATANOVIĆ, E. GJURČEVIĆ, N. ŠKVORC, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2022): Histological characteristics of the posterior part of digestive tract in small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*). Proceedings of the 11th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2022, 20. – 22. srpnja, Zürich, Švicarska, str. 17.

BASTIANČIĆ, L., K. MATANOVIĆ, E. GJURČEVIĆ, N. ŠKVORC, V. BENKO, M. LOVRIĆ, D. VALIĆ, S. KUŽIR (2022): Histology of the digestive tract in European hake (*Merluccius merluccius*). Book of abstracts of the 9th International Scientific Meeting “DAYS OF VETERINARY MEDICINE – 2022”, 22. – 25. rujna, Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 136.

BASTIANČIĆ, L., M. KOLENC, K. KORPES, S. KUŽIR (2019): Correlation of methods of histological sample preparation and success of their usage in teaching. Proceedings of the 10th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2019, 24 – 26 srpnja, Bukurešt, Rumunjska, str. 66-67.

BASTIANČIĆ, L., N. ŠKVORC, S. KUŽIR (2021): Morphological characteristics of lizard skin (Lacertilia, Squamata). Proceedings of 2nd International Scientific and Professional Meeting on Reptiles and Exotic Animals “REPTILIA”, 21. – 22. svibnja, Zagreb, str. 37-41.

BASTIANČIĆ, L., N. ŠKVORC, V. KUBALE DVOJMOČ, M. LUKAČ, S. KUŽIR (2022): Histological study of the skin in yellow-headed water monitor (*Varanus cumingi*). Anat. Histol. Embryol. 51, 6-7.

DOI: 10.1111/ahe.12759

BASTIANČIĆ L., S. ĆURKOVIĆ, D. MIHELIĆ, M. PAVIĆ, S. VUKOVIĆ, H. LUCIĆ (2018): Testis structure of the striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) from the Adriatic Sea. Book of abstracts of the 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine – 2018”, 23. – 27. rujna, Ohrid, Sjeverna Makedonija, str.144.

BASTIANČIĆ, L., S. KUŽIR, K. DRAŠNER, K. MATANOVIĆ, I. VLAHEK, E. GJURČEVIĆ (2019): Early detection of *Thelohanellus nikolskii* infection by Alcian Blue-Alizarin Red S double staining technique. Proceedings of the 8th International Congress “Veterinary Science and Profession”, 10. – 12. lipnja, Zagreb, Hrvatska, str. 136.

BENKO, V., L. BASTIANČIĆ, M. TORTI, S. FARAGUNA (2022): A comparative study of classical smear examination and cell block method in the diagnosis of effusions in the body

cavities of dogs and cats – preliminary results. Book of abstracts of the 9th International Scientific Meeting “DAYS OF VETERINARY MEDICINE – 2022”, 22. – 25. rujna, Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 145.

KORPES, K., T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, **L. BASTIANČIĆ**, M. KOLENC, I. KOUTIS, M. ĐURAS (2019): Durable anatomical specimens as a replacement for formalin-fixed specimens in the anatomy courses. Proceedings of the 10th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2019, 24 – 26 srpnja 2019., Bukurešt, Rumunjska, 46-47.

KUŽIR, S., K. DRAŠNER, K. MATANOVIĆ, **L. BASTIANČIĆ**, I. VLAHEK, S. SAVOCA, E. GJURČEVIĆ (2020): Trade-off between fast growth and the ossification process in common carp (*Cyprinus carpio*). Vet. Arhiv 90, 485-492.

DOI: 10.24099/vet.arhiv.1166

KUŽIR, S., K. MATANOVIĆ, T. TRBOJEVIĆ VUKIČEVIĆ, **L. BASTIANČIĆ**, K. DRAŠNER, E. GJURČEVIĆ (2018): Early Detection of Bone deformities in Fish. Book of abstracts of the 5th International Vet-Istanbul Group Congress & 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine – 2018”, 23. – 27. rujna 2018., Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 41.

KUŽIR, S., **L. BASTIANČIĆ** (2019): Boje histologije. Izlaganja povodom obljetnice pod nazivom Prvih sto godina Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, str. 25-32.

KUŽIR, S., **L. BASTIANČIĆ**, N. ŠKVORC (2021): Bone Remains from Archaeological Sites in the Podravina Area with Traces of Metallurgical Activity. U: Interdisciplinary Research into Iron Metallurgy along the Drava River in Croatia: The TransFER Project. (Sekelj Ivančan, T., T. Karavidović, Ur.), Archaeopress Publishing Ltd, Summertown, Oxford, str. 227-232.

PAVIĆ M., M. LJUBOJEVIĆ, M. GRČEVIĆ, M. ĐIDARA, H. LUCIĆ, D. MIHELIĆ, S. VUKOVIĆ, S. ĆURKOVIĆ, I. ŽURA ŽAJA, **L. BASTIANČIĆ**, H. BRZICA, M. ŠPERANDA (2018): Distribution of Sodium-Glucose Cotransporter 1 (SGLT1) along the Porcine Small Intestine. Book of abstracts of the 5th International Vet-Istanbul Group Congress

& 8th International Scientific Meeting Days of veterinary medicine – 2018”, 23. – 27. rujna 2018., Ohrid, Sjeverna Makedonija, str. 32-33.

ŠKVORC, N., **L. BASTIANČIĆ**, M. BUJANIĆ, D. KONJEVIĆ, S. KUŽIR (2022): Macroscopic and microscopic structure of the adrenal glands in the Eurasian badger (*Meles meles*) – case study. Proceedings of the 11th Meeting of the Young Generation of Veterinary Anatomists – YGVA 2022, 20. – 22. srpnja 2022., Zürich, Švicarska, str. 31.

ŠKVORC, N., **L. BASTIANČIĆ**, M. POLETTO, S. KUŽIR (2023): Exploring modern learning preferences: the impact of computerization on younger generation students. Proceedings Book of the III International Congress of Education in Animal Sciences, 15. – 16. lipnja 2023., Zagreb, Hrvatska, str. 64.

ŠKVORC, N., **L. BASTIANČIĆ**, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ, N. ŠPREM, M. BUJANIĆ, (2022): Cytomorphological characteristics of European mouflon (*Ovis aries musimon*) blood cells. Anat. Histol. Embryol. 51, 53-54.
DOI: 10.1111/ahe.12759

ŠKVORC, N., M. BUJANIĆ, A. MUTVAR, L. TARLE, **L. BASTIANČIĆ**, S. KUŽIR, D. KONJEVIĆ (2022): Mineral density of red deer (*Cervus elaphus*) antlers up to two and half months after velvet shedding – preliminary results. Book of Abstracts of the 10th International Deer Biology Congress, 4. – 9. rujna 2022., Osijek, Hrvatska, str. 144.

TOMIČIĆ, L., D. VIDUŠIN, E. GJURČEVIĆ, **L. BASTIANČIĆ**, S. KUŽIR (2020): Histološke osobitosti oka određenih vrsta riba Jadranskog mora. Veterinar, 1, 2-6.