

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Davorka Burić

Usporedba razine serotonina u mozgu gušterica vrsta  
*Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810) i  
*Podarcis melisellensis* (Braun, 1877)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za neurofiziologiju Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dubravki Hranilović, doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević, asistentici Barbari Nikolić i kolegici Pauli Josić za pomoć pri izradi i pisanju ovog diplomskog rada, kao i za sve korisne savjete i upute. Također se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na strpljenju, savjetima i potpori.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

Usporedba razine serotonina u mozgu gušterica vrsta  
*Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810) i *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877)

Davorka Burić

Rooseveltove trg 6, 10000 Zagreb

*Podarcis melisellensis* (krška gušterica) i *Podarcis siculus* (primorska gušterica) srodne su gušterice iz porodice Lacertidae. Terenskim i laboratorijskim istraživanjima pokazano je da *P. siculus* kompeticijom istiskuje *P. melisellensis*, osobito na manjim otocima. Uz razliku u veličini i načinu prehrane, jedan od razloga ugroženosti krške gušterice mogla bi biti i razlika u ponašanju, koje je prvenstveno regulirano monoaminskim neurotransmitorskim sustavima. Cilj ovog diplomskog rada bio je prilagoditi postojeću metodu mjerenja razine serotonina u mozgu štakora HPLC-om za mjerenje u mozgu gušterice te istražiti postoji li razlika u koncentraciji serotonina između ove dvije vrste, kao neurobiološka osnova ranije opaženih razlika u ponašanju. Metoda je uspješno prilagođena za mjerenja u mozgu gušterice pri čemu optimalni pH vodene faze iznosi 2,8, a injekcijski volumen uzorka 30  $\mu$ L, dok je linearnost i selektivnost metode, kao i ponovljivost unutar dana zadovoljavajuća. Koncentracije serotonina u mozgu gušterica *P. melisellensis* i *P. siculus*, nisu se statistički značajno razlikovale, a razlika nije uočena ni između spolova. Stoga pretpostavljamo da su ranije opažene razlike u ponašanju prvenstveno rezultat razlike u razini katekolamina u mozgu ovih dviju vrsta gušterica.

(32 stranice, 8 slika, 6 tablica, 34 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: HPLC, pH, 5-hidroksitriptamin, afektivno ponašanje

Voditelj: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović, izv. prof. dr. sc. Biljana Balen, izv. prof. dr. sc. Renata Matonićkin Kepčija

Rad prihvaćen: 07. 09. 2017.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Division of Biology

Graduation Thesis

Comparison of serotonin levels in the brains of lizard species *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810) and *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877)

Davorka Burić  
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb

*Podarcis melisellensis* (Dalmatian wall lizard) and *Podarcis siculus* (Italian wall lizard) are related lizard species of family Lacertidae. Field and laboratory research have demonstrated that *P. melisellensis* is being competitively excluded by *P. siculus*, especially on small islands. Besides differences in size and diet, one of the reasons for the endangerment of *P. melisellensis* might be a difference in behavior, which is primarily regulated through monoamine neurotransmitter systems. The aim of this thesis was adaptation of the current method for measurement of serotonin concentrations in the rat brain by HPLC for measurements in the lizard brain, and search for the potential difference in serotonin concentrations as a possible neurobiological background of the observed differences in behavior. The method was successfully adapted for measurements in the lizard brain with optimal pH of 2,8, and injection volume of the sample of 30 µL. Linearity and selectivity of the method, as well as daily reproducibility was satisfactory. Serotonin concentrations in the brains of *P. melisellensis* i *P. siculus*, did not significantly differ. Gender difference was also not significant. We can therefore assume that previously observed differences in behavior might be induced primarily by differences in catecholamine levels in the brains of the two lizard species.

(32 pages, 8 figures, 6 tables, 34 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: HPLC, pH, 5-hydroxytryptamine, affective behavior

Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.; Dr. Biljana Balen, Assoc. Prof.; Dr. Renata Matoničkin Kepčija, Assoc. Prof

Thesis accepted: 07.09.2017.

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Gušterice roda <i>Podarcis</i> .....	1
1.1.1. Morfologija i ekologija.....	1
1.1.2. Ponašanje.....	2
1.2. Serotonin .....	3
1.2.1. Metabolizam serotonina .....	3
1.2.2. Serotonin u središnjem živčanom sustavu.....	5
1.2.3. Fiziološke funkcije serotonina u središnjem odjeljku .....	7
1.2.4. Serotonin i agresija .....	7
1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	8
2. CILJ .....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijali .....	12
3.1.1. Uzorci moždanog tkiva.....	12
3.1.2. Uređaji i pribor .....	12
3.1.3. Kemikalije .....	13
3.2. Metode.....	13
3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC .....	13
3.2.2. HPLC – detekcija .....	14
3.2.3. Kvantitativna analiza .....	15
3.2.4. Statistička analiza .....	16
4. REZULTATI.....	17
4.1. Optimizacija metode.....	17
4.1.1. Prilagodavanje pH vodene faze .....	17
4.2. Usporedba 5HT između vrsta i spolova .....	21
5. RASPRAVA.....	24
5.1. Prilagodba metode.....	24
5.2. Usporedba razine 5HT u mozgu gušterica <i>P. melisellensis</i> i <i>P. siculus</i> .....	25
6. ZAKLJUČAK .....	27
7. LITERATURA.....	28
8. ŽIVOTOPIS .....	31

## POPIS KRATICA:

5HT	5-hidroksitriptamin
5HTP	5-hidroksitriptofan
AADC	dekarboksilaza aromatskih aminokiselina
AD (NAD)	NAD-ovisna aldehid dehidrogenaza
DA	dopamin
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
GI	gastrointestinalni sustav
HCl	klorovodična kiselina
HClO <sub>4</sub>	perklorna kiselina
HCOOH	mravlja kiselina
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>high performace liquid chromatography</i> )
MAO	monoamin oksidaza
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	natrijev metabisulfit
OH-THB	hidroksitetrahydrobiopterin
PMF	<i>Podarcis melisellensis</i> ženka (eng. <i>female</i> )
PMM	<i>Podarcis melisellensis</i> mužjak (eng. <i>male</i> )
PSF	<i>Podarcis siculus</i> ženka (eng. <i>female</i> )
PSM	<i>Podarcis siculus</i> mužjak (eng. <i>male</i> )
SERT	serotoninski transporter
SŽS	središnji živčani sustav
THB	tetrahydrobiopterin
TPH	triptofan hidroksilaza
TRP	triptofan
UV	ultraljubičasto (eng. <i>ultraviolet</i> )

# 1. UVOD

## 1.1. Gušterice roda *Podarcis*

### 1.1.1. Morfologija i ekologija

Krška gušterica, *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877), je autohtona vrsta iz porodice Lacertidae koja obitava na područjima Albanije, Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Italije, Srbije, Crne Gore i Slovenije. Njena prirodna staništa su umjerene šume, mediteranski tip grmolike vegetacije, stjenovita područja, kao i pašnjaci, dakle područja do nadmorske visine od 1400 m (Podnar i sur, 2004). Krške gušterice narastu do 6,5 cm duljine od njuške do stražnjeg otvora (kloake), a rep je dvostruko dulji od tijela. Obojenje je varijabilno, no temeljna boja je smeđa ili zelena s uzorkom uzdužnih tamnijih i svjetlijih pruga, a neke jedinke mogu biti i jednolično obojene smeđe-zeleno. Ovi gušteri mogu imati ventralnu (trbušnu) stranu tijela u tri različite boje- narančastoj, žutoj i bijeloj. Također u nekih jedinki su prisutne plave točke na rubovima vanjskog reda trbušnih pločica. Mužjaci narančaste boje su dominantniji i agresivniji od drugih mužjaka. Duži su, imaju veću glavu, a time i veću snagu ugriza što im omogućuje da otjeraju ostale mužjake kako bi se mogli pariti sa ženkom po izboru i kako bi mogli prisvojiti teritorij (Huyghe i sur, 2007). Krška gušterica je oviparna, a ženke polažu 2-8 jaja po leglu (godišnje imaju po nekoliko legla). Mladi, odmah nakon izlijevanja, dugi su oko 2,5 cm i razlikuju se od odraslih još i po stupnju pigmentacije. Odrasli mužjaci mogu se razlikovati od ženki po proširenosti baze repa. Sastav prehrane ove vrste čini veliki udio člankonožaca i mekušaca (Brecko i sur, 2007). Prirodni predatori gušterica su ptice (galebovi i ptice grabljivice), sisavci (domaće mačke, štakori), te zmije. Posebnu prijetnju prvenstveno otočkim populacijama ove vrste predstavlja srodna primorska gušterica (*Podarcis siculus*) za koju je terenskim i laboratorijskim eksperimentima dokazano da kompeticijom istiskuje kršku guštericu, te je na manjim otocima može i u potpunosti istrijebiti (Downes i Bauwens, 2002).

Primorska gušterica, *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810), je vrsta gušterice također iz porodice Lacertidae koja naseljava područja mediteranske regije. Italija te okolna područja (Sicilija, Sardinija, Korzika, sjeverni dijelovi istočne jadranske obale, kao i brojni jadranski otoci) smatraju se područjima porijekla i centrima širenja ove vrste. Osim tih lokaliteta, ova gušterica može se pronaći i u drugim dijelovima Mediterana, primjerice na



području Španjolske, Portugala, Francuske, Crne Gore, Turske, Libije i Tunisa. Zahvaljujući djelovanju čovjeka i raznim prijevoznim sredstvima, njena rasprostranjenost seže sve do Sjedinjenih Američkih Država (Podnar i sur, 2005). Primorska gušterica je stanišni generalist, te stoga može biti pronađena u različitim ekosustavima (do nadmorske visine od 1000 m) - od travnatih, stjenovitih i ruralnih pa sve do urbanih područja gdje žive ljudi, a često će biti viđena i kako se sunča na kamenim zidovima ili drvenim ogradama obližnjih mjesta za skrivanje. Ona je mala, smeđe-zelena i s tijelom veličine između 7,6 i 10 cm i repom koji je jednake ili veće duljine. Trbušna strana je jednolične bijele ili kremaste boje, dok je obojeni uzorak na leđima vrlo varijabilan, a može biti u obliku pruga, točkica ili čvrstih boja. Postoji i spolni dimorfizam; ženke su manje i imaju manje glave od mužjaka, također nemaju proširenu bazu repa i femoralne pore. Ova vrsta je oviparna i ima sezonski reproduktivni ciklus. U njihovom nativnom području, sezona parenja započinje u ožujku i može trajati sve do srpnja. Ženke liježu jaja od svibnja do lipnja u jednom ili više legla, a svako leglo može sadržavati 2-12 jaja. Mladi se legu nakon 5-7 tjedana i dugi su 3-3,5 cm od vrha njuške do otvora kloake. Zrelost jedinke je obično postignuta kada su mladi dugi oko 5 cm od vrha njuške do otvora kloake. Za mužjake je to obično nakon jedne godine, a za ženke može biti nakon jedne do dvije godine. Prehrana ove vrste gušterice ovisi o geografskom položaju, ekološkim uvjetima (kopno ili otok), godišnjem dobu ili sastavu lokalne faune. Glavni sastav čine člankonošci, no osim njih jedu još i male mekušce, rakove, dijelove biljaka, manje gmazove (ponekad se radi i o kanibalizmu), te male sisavce. Iz ovog je vidljivo da je ova vrsta vrlo plastična i sposobna se prilagoditi različitoj prehrani (Arnold, 2003).

### 1.1.2. Ponašanje

Uz razliku u veličini i načinu prehrane, jedan od razloga ugroženosti krške gušterice mogla bi biti i razlika u ponašanju. Testovi ponašanja u zatočeništvu ukazali su na razlike u afektivnom ponašanju između ove dvije vrste. Testovima u otvorenom polju, uočeno je da se vrsta *P. siculus* kreće više, brže i uz manje krivudanja od vrste *P. melisellensis*. Kako istočnopacifičke zelene kornjače koriste krivudanje da bi izbjegle mreže i izlov (Senko i sur, 2010), pretpostavlja se da i gušteri koriste krivudanje kako bi izbjegli potencijalne predatore. Također se primijetilo da su ženke obje vrste odvažnije od mužjaka i uspješnije u nastanjivanju što se poklapa s istraživanjem Rodríguez-Prieto i sur (2010) na jedinkama vrste *Podarcis hispanica* Steindachner, 1870 i s istraživanjem na glodavcima koje je provodio

Keely (2015), a kojim se pokazalo da su ženke štakora bolje u zadacima vezanim za strah. Osim razlika između spolova, postojala je i razlika između vrsta pri čemu se vrsta *P. melisellensis* pokazala odvažnijom, a *P. siculus* opreznijom (Gajšek, 2017). Testovi vezani za učenje i pamćenje pokazali su da životinja pamti lokacije i povezuje ih s pozitivnim ili negativnim događajima vezanim za tu lokaciju. Tako je, primjerice, vrsta *P. siculus* bolje pamtila one lokacije gdje je pronašla hranu i na taj način pojela puno više hrane od *P. melisellensis* (Gajšek, 2017) što podupire istraživanje o hranidbenim navikama *P. siculus* (Capula, 2011) u kojem stoji da su gušterice te vrste vrlo agresivne prilikom hranjenja, te su primijećeni napadi na manje vrste guštera, mlade jedinke iste vrste pa čak i na male glodavce.

Mnogi aspekti ponašanja kralješnjaka regulirani su monoaminskim neurotransmitorskim sustavima od kojih je najvažniji serotoninski (Lucki, 1998).

## 1.2. Serotonin

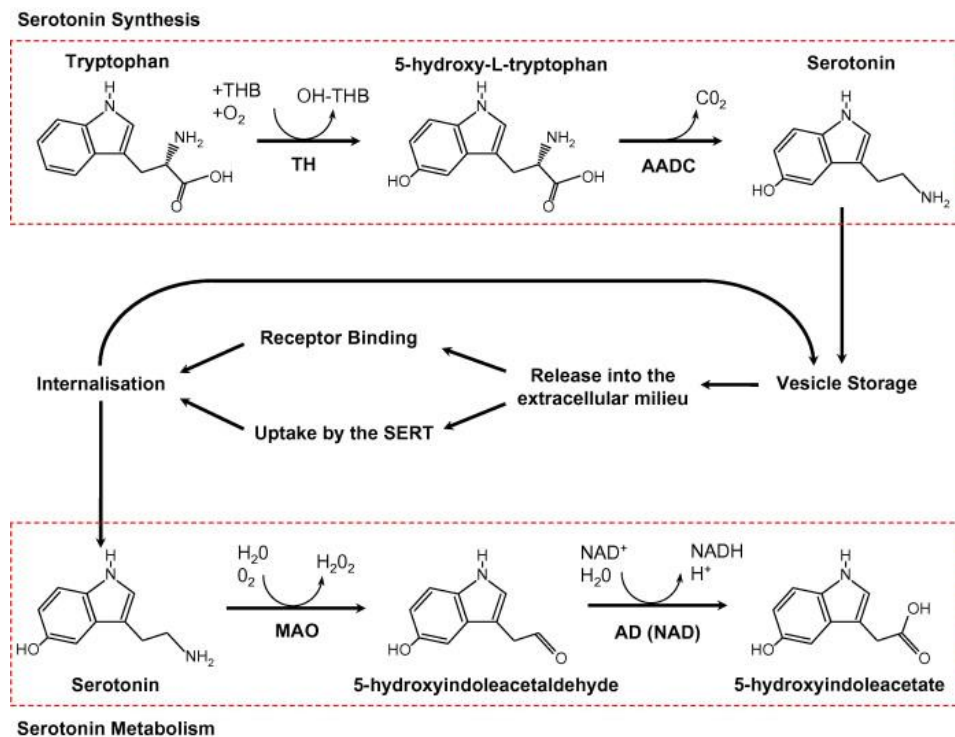
Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) je amin koji se sastoji od heterocikličkog indolskog prstena na koji su vezane amino i hidroksilna skupina, a primarno ga nalazimo u gastrointestinalnom (GI) traktu, trombocitima i središnjem živčanom sustavu (SŽS). U sisavaca se oko 95% serotonina sintetizira u enterokromafinim stanicama sluznice tankog crijeva, a ostatak u serotoninskim neuronima središnjeg živčanog sustava. Upravo na enterokromafinim stanicama je Vittorio Erspamer sa suradnicima provodio istraživanje od 1933 do 1937., te u konačnici 1937. godine prvi put izolirao serotonin kojemu je tada nadjenio ime enteramin. U periodu od 1946. - 1949. godine, Irvine Page, Maurice Rapport i Arda Green provodili su zajedničko istraživanje tijekom kojeg su otkrili tvar vazokonstriksijske prirode u serumu, kao i njenu strukturu, te ju nazvali serotonin. Tek 1952. godine utvrdilo se da su enteramin i serotonin iste tvari, a kao preferabilno farmakološko ime počinje se koristiti 5-hidroksitriptamin (Keppel Hesselink, 1992).

### 1.2.1. Metabolizam serotonina

Serotonin se sintetizira iz aminokiseline L-triptofan koja uz pomoć enzima triptofan hidroksilaze prelazi u 5-hidroksitriptofan (5-HTP). Postoje dvije vrste triptofan hidroksilaze. Ona koju nalazimo u enterokromafinim stanicama tankog crijeva ima oznaku TPH1, a druga, koju nalazimo u serotonergičnim neuronima jezgara rafe moždanog debla, ima oznaku TPH2.

5-hidroksitriptofan zatim uz piridoksal-fosfat i djelovanje dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (eng. *aromatic amino acid decarboxylase*, AADC) prelazi u serotonin (Slika 1.). Metabolizam serotonina se odvija pomoću enzima vanjske membrane mitohondrija, monoaminooksidaze (MAO). Djelovanje MAO pretvara serotonin u 5-hidroksiindol acetaldehid kojeg aldehyd dehidrogenaza ovisna o NAD-u (AD (NAD)) pretvara u 5-hidroksiindol octenu kiselinu (Upadhyay, 2003).

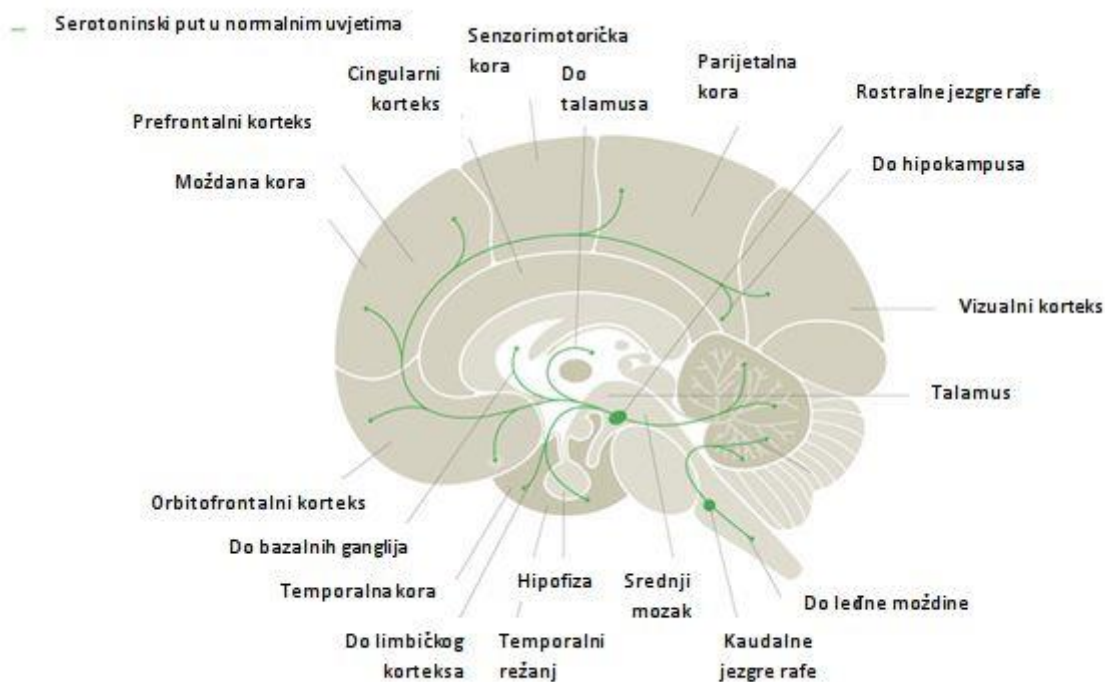
U sisavaca su sinteza i funkcija serotonina podijeljeni u dva odjeljka: središnji, kojeg čini središnji živčani sustav i periferni, kojeg čine tjelesna tkiva, a koji su međusobno odijeljeni krvno-moždanom barijerom. Postojanje analogne barijere pokazano je i kod gušterice (Lazzari i Franceschini, 2000).



Slika 1. Sinteza i metabolizam serotonina. AADC – dekarboksilaza aromatskih aminokiselina, AD (NAD) – NAD-ovisna aldehyd dehidrogenaza, MAO – monoaminooksidaza, OH-THB – hidroksitetrahydrobiopterin, TH – triptofan hidroksilaza, THB – tetrahydrobiopterin. Preuzeto od Ruddell i sur (2008).

### 1.2.2. Serotonin u središnjem živčanom sustavu

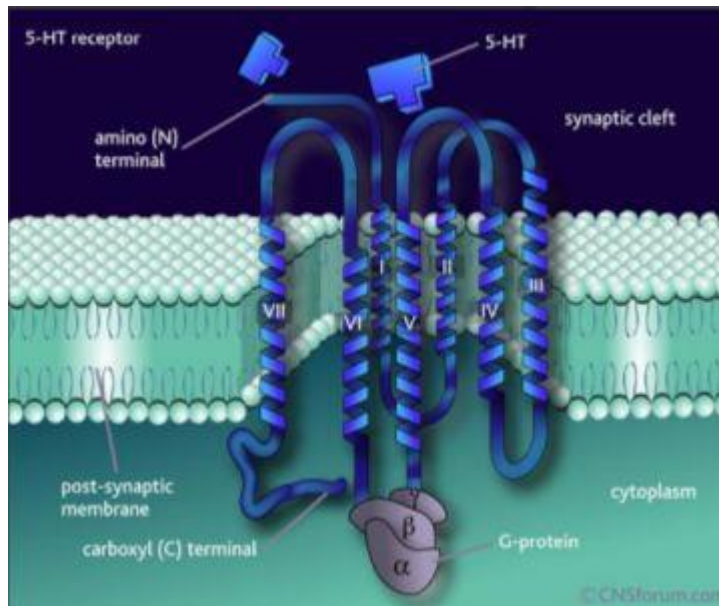
Tijela serotonergičnih neurona smještena su u moždanom deblu u devet skupina jezgara rafe (B1-B9) u retikularnoj formaciji mezencefalona, ponsa i produljene moždine. Tih devet skupina raspoređeno je u dvije veće nakupine serotoninskih neurona (Slika 2.), kaudalnu skupinu (B1-B5) i rostralnu skupinu (B6-B9), koje projiciraju svoje aksone u razne dijelove mozga (Upadhyay, 2003).



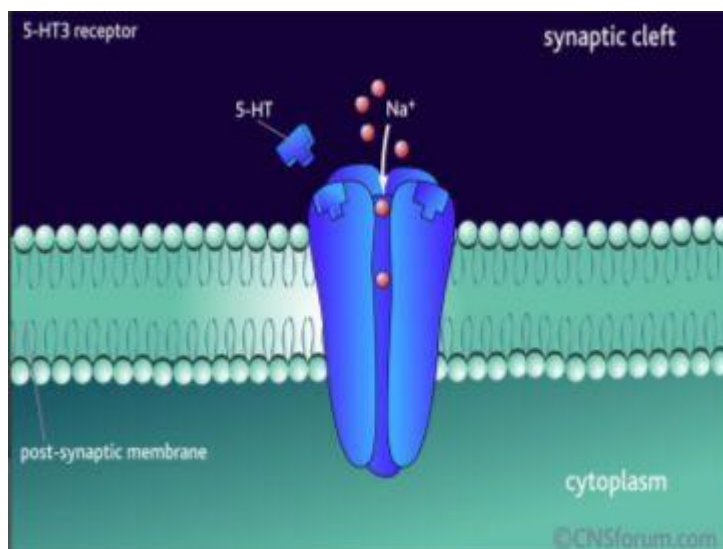
Slika 2. Smještaj serotonergičnih neurona i pružanje njihovih aksona u mozgu čovjeka. Preuzeto s: <http://institute.progress.im>.

Serotonin iz središnjeg odjeljka je uključen u regulaciju razvoja mozga, a kasnije preuzima ulogu neurotransmitera. Serotonin koji se sintetizira u serotonergičnim neuronima pohranjuje se u sinaptičkim mjehurićima, te depolarizacijom živčane stanice dolazi do njegovog oslobađanja u sinaptičku pukotinu gdje djeluje na serotoninske receptore. Vezanjem za postsinaptičke receptore dolazi do promjene električnog stanja stanice koje može ili podražiti stanicu i tako prenijeti kemijsku informaciju, ili ju inhibirati. Višak serotonina iz sinaptičke pukotine se uklanja ponovnim unosom u presinaptički završetak uz pomoć serotoninskog prijenosnika (transportera), SERT. Serotoninski receptori su podijeljeni u 7

skupina (5-HT-1 do 5-HT-7) s pripadajućim podskupinama. Većinom su to metabotropni receptori sa sedam hidrofobnih transmembranskih domena, tri unutarstanične i tri izvanstanične petlje, vezani uz G proteine (Slika 3.). Amino kraj orijentiran je prema izvanstaničnom prostoru, dok je karboksilni kraj orijentiran prema citoplazmi. Izuzetak su 5-HT3 (3A, 3B) receptori (Slika 4.) koji su ionotropni, vezani uz ionski kanalić (Upadhyay, 2003).



Slika 3. Serotoninski metabotropni receptor vezan uz G protein. Preuzeto s: [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com).



Slika 4. Ionotropni 5-HT3 receptor, vezan za ionski kanalić. Preuzeto s: [www.cnsforum.com](http://www.cnsforum.com).

### 1.2.3. Fiziološke funkcije serotonina u središnjem odjeljku

Serotonin je uključen u regulaciju aktivnosti neuroendokrinog, kardiovaskularnog i autonomnog živčanog sustava. Također sudjeluje u kontroli brojnih fizioloških procesa - apetita, tjelesne težine, ciklusa budnosti i spavanja, motorike, termoregulacije i spolne aktivnosti. U spolnom ponašanju, uloga serotonina je nešto kompleksnija i ovisi o spolu, serotoninском receptoru za taj proces i bihevioralnom parametru koji se testira. Tako povećana razina 5HT ima inhibitornu ulogu u oba spola posredovanjem 5HT<sub>1A</sub> receptora, dok smanjena razina 5HT potiče spolno ponašanje. Povećani unos hrane rezultira smanjenom razinom serotonina, odnosno 5HT djeluje na osjećaj gladi. Suprotno, povećana razina serotonina u medijalnim jezgrama hipotalamusa daje osjećaj sitosti i prekida hranjenje.

Sudjeluje još i u kontroli raspoloženja, te u učenju i afektivnom ponašanju. Tako mu se pripisuje sudjelovanje u regulaciji agresije, anksioznosti i impulzivnog ponašanja, Smanjene razine 5HT povećavaju agresivno ponašanje, a smanjuju anksioznost zbog čega često dolazi do impulzivne reakcije i pojačanog averzivnog odgovora na emotivne podražaje u trenucima kada je poželjnija njihova odgoda. To se u najvećem postotku može vidjeti u socijalnom ponašanju budući da je zbog smanjene koncentracije serotonina smanjena i bihevioralna inhibicija, odnosno mehanizam koji nam omogućava da spregnemo neželjene i prepotentne reakcije. Također, smanjene razine 5HT uzrokuju općenito smanjenu pažnju i njeno usmjeravanje prema negativnim podražajima, dok povećanjem razina 5HT dolazi do povećanja pažnje i njenog usmjeravanja prema pozitivnim emotivnim podražajima (Blažević, 2013). S obzirom na ulogu koju 5HT ima u afektivnom ponašanju nije iznenađujuće što se poremećaji u serotoninскоj homeostazi smatraju neurobiološkom podlogom psihičkih poremećaja poput depresije, anksioznosti, anoreksije ili shizofrenije (Lesch i Möessner, 1998).

### 1.2.4. Serotonin i agresija

Serotonin je jedan od neurotransmitera koji je vrlo blisko vezan uz neurobiološke mehanizme socijalnog i agresivnog ponašanja. Najsnažniji dokaz koji povezuje 5HT sa životinjskom agresijom dolazi iz neurofarmakološkog istraživanja predatorske agresije u laboratorijskih štakora prema miševima. To istraživanje je pokazalo da su štakori nakon

deplecije 5HT sposobni ubiti miša te da se lijekovima koji potiču serotoninsku transmisiju takva predatorska agresija potiskuje (Miczek i sur, 1994). Ramboz i sur (1995) pokazali su da miš, nakon inaktivacije gena za 5HT<sub>1B</sub> receptor, pokazuje pojačano borbena ponašanje i agresiju prema uljezu– napadao je uljeza brže i intenzivnije od miša divljeg tipa. Tijekom evolucije, agresija je pomagala u uspostavi i održavanju socijalne dominacije unutar vrste, ali i između različitih vrsta. U guštera, slično kao u primata i ljudi, agresija i dominacija su negativno korelirane s razinom serotonergične aktivnosti. Iz toga proizlazi da kronično podignute razine serotonina inhibiraju agresivne interakcije. Pokazalo se da agresivni, a time i dominantni, mužjaci guštera imaju nižu razinu serotonergične aktivnosti u nekoliko područja mozga: septumu, *nucleus accumbens*-u, striatumu, središnjoj amigdali, anteriornom hipotalamusu, jezgrama rafe i *locus coeruleus*-u. Kad su takvi dominantni gušteri tretirani sa sertralinom, vrstom antidepresiva koji blokira ponovni unos serotonina u presinaptički završetak, agresivno ponašanje i napadi su se smanjili, a njihov socijalni status je bio promijenjen u podređeni (Behrendt, 2011).

Stoga se može pretpostaviti da serotoninska regulacija ranije navedenih funkcija, kako u sisavaca, tako i u guštera, ovisi o njegovim koncentracijama u mozgu. Koncentracija serotonina u mozgovima guštera analizirana je metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *High performance liquid chromatography*, HPLC).

### 1.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

HPLC je tehnika koja omogućuje razdvajanje spojeva na temelju njihove interakcije između mobilne i stacionarne faze. Migracija topivih tvari se može dogoditi samo ako su otopljene u mobilnoj fazi. Stoga, topive tvari koje stvaraju povoljnije interakcije sa stacionarnom fazom će se eluirati puno sporije, to jest imat će dulje vrijeme zadržavanja u koloni (retencijsko vrijeme), od onih koje se bolje otapaju, i s povoljnijim interakcijama, u mobilnoj fazi pa će tako doći do kromatografskog odvajanja tvari (Gray i Lawrence, 2008).

Razdvajanje tvari HPLC-om se temelji na injekciji malog volumena tekućeg uzorka (analita) u kolonu pakiranu česticama promjera 3-5 μm (stacionarna faza) gdje se pojedine komponente uzorka kreću niz kolonu s tekućinom (mobilnom fazom) pod utjecajem visokog tlaka kojeg stvara pumpa HPLC – uređaja. Te komponente se međusobno razdvajaju pomoću kemijskih i/ili fizičkih interakcija s česticama kolone, a zatim su detektirane po izlazu iz

kolone detektorom (Gray i Lawrence, 2008). Postoji više vrsta detektora, a ovdje ću spomenuti samo njih nekoliko.

UV i VIS detektori rade na principu da analit od interesa apsorbira svjetlo u UV ili vidljivoj regiji elektromagnetskog spektra. Tijekom analize uzorak ide kroz staklenu pločicu (eng. *flow cell*) pa kada ju svjetlost ozrači, analit apsorbira dio tog zračenja. Budući da je s njima lako raditi, te pružaju dobru stabilnost, često su u uporabi. Standardni UV detektor dozvoljava korisniku biranje valne duljine između 195 i 370 nm (najčešće birana je oko 254 nm), dok VIS detektor koristi valne duljine vidljive svjetlosti (400-700 nm). Postoje i detektori koji obuhvaćaju oba spektra (195-700 nm valne duljine), a zovu se UV/VIS detektori (Saunders i Venn, 2008).

PDA (eng. *Photo Diode Array*) detektori detektiraju cijeli spektar istovremeno. UV i VIS detektori vizualiziraju rezultate u dvije dimenzije (intenzitet svjetlosti i vrijeme), dok PDA dodaje i treću dimenziju (valnu duljinu) (Saunders i Venn, 2008).

RI (eng. *Refractive-Index*) detektori mjere promjene u indeksu refleksije. Staklena pločica podijeljena je u dvije komorice, jedna je ispunjena mobilnom fazom i naziva se referentna komorica, a kroz drugu prolazi uzorak s kolone. U slučaju kada efluent sadrži još neke komponente osim mobilne faze, lomljenje ulazne zrake događa se zbog razlike indeksa refleksije između dva otapala, a mjerenjem te promjene može se uočiti prisutnost tih komponenti. Ovaj detektor ima manju osjetljivost od UV detektora, ali je pogodan za detekciju tvari bilo kakve prirode i daje direktnu vezu između intenziteta i koncentracije analita (Saunders i Venn, 2008).

ELSD detektor (eng. *Evaporative light scattering detector*) ima dobru osjetljivost za ne-volatilne analite u nanogramskim količinama. Efluent iz kolone se nebulizira i evaporira kako bi nastale sitne čestice, koje se ozrače laserom i detektira se razasuta radijacija. Ciljni uzorci uključuju lipide, šećere i analite velike molekulske mase (Saunders i Venn, 2008).

Masenom spektrometrijom, analiti su detektirani na temelju njihove molekularne mase, a dobivena informacija je osobito korisna za identifikaciju strukture spoja. Međutim, njegova upotreba nije ograničena samo na identifikaciju strukture spoja, već može biti korištena za mjerenje vrlo niske koncentracije elementarnih i molekularnih komponenti (Saunders i Venn, 2008).

Fluorescentni detektor koristeći specifičnu valnu duljinu, ekscitira atome analita koji tada emitiraju svjetlosni signal (fluoresciraju). Intenzitet emitirane svjetlosti se koristi za kvantifikaciju koncentracije analita. Prednost fluorescentne metode je njena visoka osjetljivost za selektivne grupe spojeva pri femtogramskim količinama. Većina farmaceutskih



i prirodnih proizvoda, kliničkih uzoraka i produkata petroleja imaju fluorescentnu apsorbanciju (Saunders i Venn, 2008).

Postoji nekoliko različitih tipova elektrokemijskih detektora. Detekcija se temelji na amperometriji, polarografiji, koulometriji i konduktometriji. Njihova prednost je visoka osjetljivost, jednostavnost, prikladnost i široka primijenjivost.

U ovom radu koristi se UV detektor koji mjeri njihovu koncentraciju na temelju apsorbancije UV svjetla. Rezultat ovakvog načina odvajanja tvari u koloni HPLC-a je kromatogram – krivulja čiji vrhovi predstavljaju odgovor (UV) detektora na pojedinu tvar u smjesi uzorka (Saunders i Venn, 2008).

Uz HPLC postoje i druge tehnike kojima je moguće mjeriti određene parametre. Obična tekućinska kromatografija je također tehnika razdvajanja koja zahtjeva injekciju malog volumena tekućeg uzorka u kolonu koja je pakirana s poroznim česticama, a tekući uzorak putuje kolonom pomoću gravitacije. Komponente uzorka su sakupljene po izlasku iz kolone i identificirane vanjskim uređajem, najčešće spektrofotometrom. U principu, obična tekućinska kromatografija i HPLC funkcioniraju isto, ali je brzina, učinkovitost, osjetljivost i lakoća rada HPLC-a daleko bolja (Agilent Technologies, 2016). ELISA je, ukratko, imunotest koji se temelji na reakcijama antigen-antitijelo i promjeni boje za identifikaciju tvari. Uzorci koji sadrže, primjerice amine (antigen), su inkubirani s enzimima koji su kemijski vezani na antitijela specifična za amine od interesa. Nedostatak ELISA-e je taj što je potrebno imati antigen koji je čist, odnosno slobodan od bilo kakvih vanjskih nečistoća koje mogu zaustaviti interakciju između antigena i antitijela zbog čega se ne dobije rezultat isti onom koji je dobiven HPLC-om (Luecken i Gallo, 2007).

## 2. CILJ

U Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta je nedavno razvijena metoda mjerenja razine monoamina u mozgu štakora pomoću HPLC-a (Peršić, 2017) te su istraživane razlike u ponašanju između vrsta *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* (Gajšek, 2017).

S obzirom na dobivene rezultate navedenih diplomskih radova, cilj ovog diplomskog rada bio je:

- Prilagoditi postojeću metodu mjerenja koncentracije serotonina u mozgu štakora na način da se može primijeniti na mozak guštera
- Izmjeriti koncentraciju serotonina u moždanom tkivu jedinki dviju vrsta gušterica (*P. siculus* i *P. melisellensis*)
- Utvrditi postoji li razlika u koncentracijama serotonina između ove dvije vrste kao moguća neurobiološka podloga opaženih razlika u afektivnom ponašanju.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Uzorci moždanog tkiva

Za izradu ovog diplomskog rada koristila sam mozgove gušterica vrsta *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* oba spola, koji su bili pohranjeni na -80 °C. U svakoj podskupini analizirala sam 8 mozgova (ukupno 32).

#### 3.1.2. Uređaji i pribor

- autoklav
- centrifuga, Eppendorf 5702 (Eppendorf AG, Njemačka)
- hladnjak (+4 °C)
- kromatografska kolona reverzne faze Kromasil 100-5-C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm) (AkzoNobel, Švedska)
- magnetska miješalica (Elektrosanitarij, Hrvatska)
- mikropipete (Transferpette S, Brand, Njemačka)
- pH metar (Schott Instruments, Njemačka)
- stolna mini centrifuga, Cat. No. 05-090-129 (Fisher Scientific, Koreja)
- sustav HPLC Perkin Elmers Series200 (SAD) sljedećih komponenata:
  - kvarterna pumpa
  - otplinjač
  - ubrizgavač uzorka
  - automatski uzorkovač
  - UV-detektor (spojen na računalo)
- ultrazvučna sonda (Bandelin Sonopuls, Njemačka)
- vaga (Kern&Sohn, Njemačka)
- vakuum-pumpa
- vibracijska miješalica, EV-100 (Tehnica, Slovenija)
- staklene bočice i inserti za HPLC
- zamrzivači (-20 °C, -80 °C)

### 3.1.3. Kemikalije

- Za pripremu deproteinizacijske otopine:
  - 70% perklorna kiselina, HClO<sub>4</sub> (Sigma Aldrich, Njemačka)
  - etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka)
  - natrijev metabisulfit, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (Sigma Aldrich, Njemačka)
  
- Za pripremu standarada:
  - 0,5 M HCl
  - 70% etanol
  - serotonin, analitički standard (Sigma Aldrich, Njemačka)
  
- Za pripremu mobilne faze za HPLC:
  - 89-91% mravlja kiselina, HCOOH (Sigma Aldrich, Njemačka)
  - acetonitril, HPLC čistoće (Fisher Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo)
  - metanol, HPLC čistoće (Avantor Performance Materials, Poljska)

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Priprema uzoraka za HPLC

U mikroeprovete sa smrznutim uzorcima dodala sam određen volumen deproteinizacijske otopine (masa uzorka pomnožena s četiri), te sam uzorke homogenizirala ultrazvučnim homogenizatorom. Deproteinizacijsku otopinu pripremila sam prema protokolu kojeg je sastavila Peršić (2017) (Tablica 1). Budući da ultrazvučna sonda prilikom korištenja zagrijava uzorak, što je loše za njega, koristila sam hladnu deproteinizacijsku otopinu, a mikroeprovetu s uzorkom sam tijekom homogenizacije držala u čaši s ledom. Homogenizacija pojedinog uzorka varirala je do maksimalno 25 sekundi. Nakon homogenizacije, uzorke sam centrifugirala 20 minuta pri 23390 x g i temperaturi od 4 °C. Nakon prvog centrifugiranja, supernatant sam pipetom odvojila u čistu mikroeprovetu i ponovila postupak pri istim uvjetima. Dobiveni, konačni supernatant stavila sam na led prije analize HPLC-om, a ukoliko ne bih analizirala uzorak odmah nakon pripreme, pospremila bih ga u zamrzivač na -80 °C.

Tablica 1. Priprema deproteinizacijske otopine za homogenizaciju mozгова.

<b>Komponenta smjese*</b>	<b>Mr (g/mol)</b>	<b>Početa koncentracija</b>	<b>Dodan volumen (mL)</b>	<b>Dodana masa (mg)</b>	<b>Konačna koncentracija (mM)</b>
<b>HClO<sub>4</sub></b>	100,46	70%	0,431	-	0,1 M
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	190,11	-	-	3,80	0,4 mM
<b>EDTA</b>	292,24	-	-	2,92	0,2 mM

\* Ova količina komponenata smjese dostatna je za 50 mL otopine.

### 3.2.2. HPLC – detekcija

Prije pokretanja analize uzoraka, HPLC uređaj i kolona se moraju isprati i uravnotežiti mobilnom fazom kako bi se uklonile nečistoće. Kako bih još dodatno spriječila nakupljanje nečistoća u koloni, za pripremu mobilne faze koristila sam deioniziranu vodu koju sam autoklavirala 20 minuta pri temperaturi od 121 °C. Nakon autoklaviranja, vodu sam još dodatno profiltrirala vakuum – pumpom. Osim toga, na kraju svakog dana ispirala sam kolonu 30 minuta 85% metanolom.

Kako bih bila sigurna koji se vrh krivulje na kromatogramu uzorka odnosi na serotonin, pri HPLC-detekciji sam koristila metodu dodavanja vanjskog standarda (eng. *spiking*) i pratila koja se površina vrha krivulje na kromatogramu se povećala. Kako bih to utvrdila, napravila sam dva alikvota uzorka, od kojih je jedan bio bez dodanog vanjskog standarda (serotonina) i služio je kao kontrola, a drugi s dodanim vanjskim standardom. Kao pufer za razrjeđivanje uzorka koristila sam, već ranije spomenutu, deproteinizacijsku otopinu. Uz ova dva uzorka, dodala sam i treći koji je zapravo bio sam vanjski standard serotonina pripremljen u deproteinizacijskoj otopini. Ta tri analita (Tablica 2.), alikvot mozga razrijeđen u deproteinizacijskoj otopini, alikvot mozga s vanjskim standardom serotonina, te čisti serotonin analizirala sam HPLC-om prema modificiranoj metodi koju je koristila Peršić (2017). Detekcija analita odvija se pomoću apsorpcije ultraljubičastog (UV) svjetla, odnosno UV detektora koji uočava koliko je određena tvar apsorbirala UV svjetlosti. Valna duljina pri kojoj su uzorci bili detektirani bila je 280 nm, a onaj vrh krivulje uzorka s dodanim

serotoninom, čija se površina povećala u odnosu na kontrolni uzorak, a da je odgovarao retencijskom vremenu standarda serotonina, smatrala sam potvrđnim.

Tablica 2. Analiti pripremljeni za analizu HPLC-om i identifikaciju vrha krivulje serotonina pomoću retencijskog vremena metodom dodatka vanjskog standarda.

Analiti	Volumeni komponente (μL) u vijalici za HPLC			Ukupan volumen (μL) u vijalici za HPLC
	Mozak	5HT	Pufer	
1) <b>Mozak</b>	30	-	20	50
2) <b>Mozak+ 5HT*</b>	30	20	-	50
3) <b>5HT*</b>	-	60	-	60

\* Početna koncentracija pripremljenog vanjskog standarda serotonina iznosila je 1 μM.

### 3.2.3. Kvantitativna analiza

Kako bih osigurala da dobivene vrijednosti koncentracija u uzorku budu unutar linearnog raspona ovisnosti površine vrha krivulje o koncentraciji, odredila sam površine vrhova krivulje serotonina u nekoliko probnih uzoraka. Pomoću njih sam procijenila potrebne koncentracije standarda za izradu baždarnih krivulja čije će krajnje točke biti najmanje 50% veće, odnosno manje od očekivane koncentracije u uzorcima (Tablica 3).

Tablica 3. Koncentracije standarda serotonina korištene za izradu baždarnih krivulja za određivanje koncentracija serotonina u uzorcima mozgova.

Smjese standarda	Koncentracija (nM)
	<b>5HT</b>
1	500
2	250
3	125
4	62,5
5	31,3

Nakon što sam u programu TotalChrom dobila površine vrhova krivulje serotonina, izračunala sam njihove koncentracije pomoću jednadžbe pravca (baždarni pravac ovisnosti površine vrha krivulje o koncentraciji). Rezultate koje sam dobila u mjernim jedinicama nmol/L, preračunala sam u masu (ng) serotonina po gramu uzorka mozga prema sljedećoj formuli:

$$\text{ng 5HT/} \quad \text{Koncentracija 5HT (nmol/l) x volumen injekcije (\mu\text{l}) x Mr 5HT (g/mol) x R}$$

---

$$\text{g mozga=} \quad \text{masa mozga (g)}$$

gdje Mr označava molarnu masu serotonina, a R predstavlja faktor razrjeđenja dobiven iz omjera volumena deproteinizacijske otopine korištene u homogenizaciji pojedinog uzorka i volumena injektiranja.

#### 3.2.4. Statistička analiza

Za statističku analizu podataka koristila sam programe InStat GraphPad i JMPIn. Nakon testiranja normalnosti distribucije izmjerenih vrijednosti u programu, utjecaj vrste i spola na koncentraciju serotonina u mozgu ispitala sam dvosmjernom analizom varijanci (2-way ANOVA). Podaci u radu su izraženi kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija ( $M \pm SD$ ), granica značajnosti postavljena je na  $p < 0.05$ .

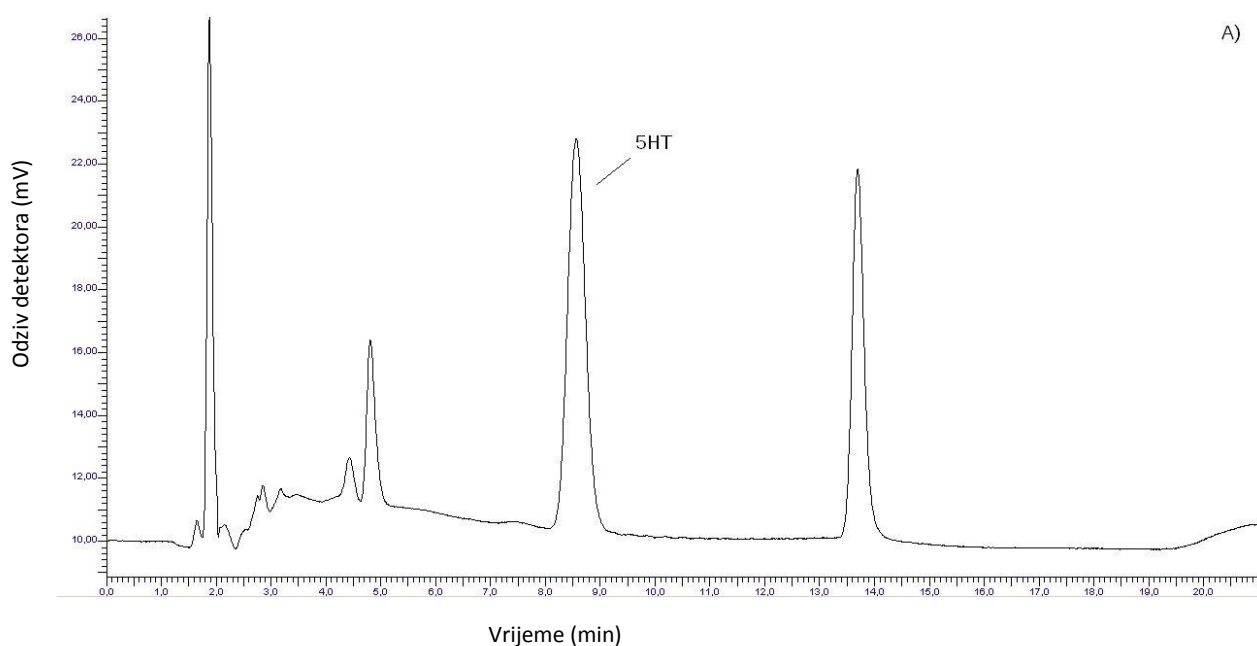
## 4. REZULTATI

### 4.1. Optimizacija metode

Metoda kojom sam započela ovaj rad i koju sam trebala prilagoditi je gradijentna metoda, što znači da dolazi do promjene udjela organske faze. Tako maksimalni udio organske faze u ovoj metodi iznosi 12,5% volumen injiciranja 20  $\mu$ L, pH vodene faze 3,2, a protok 0,7 ml/min.

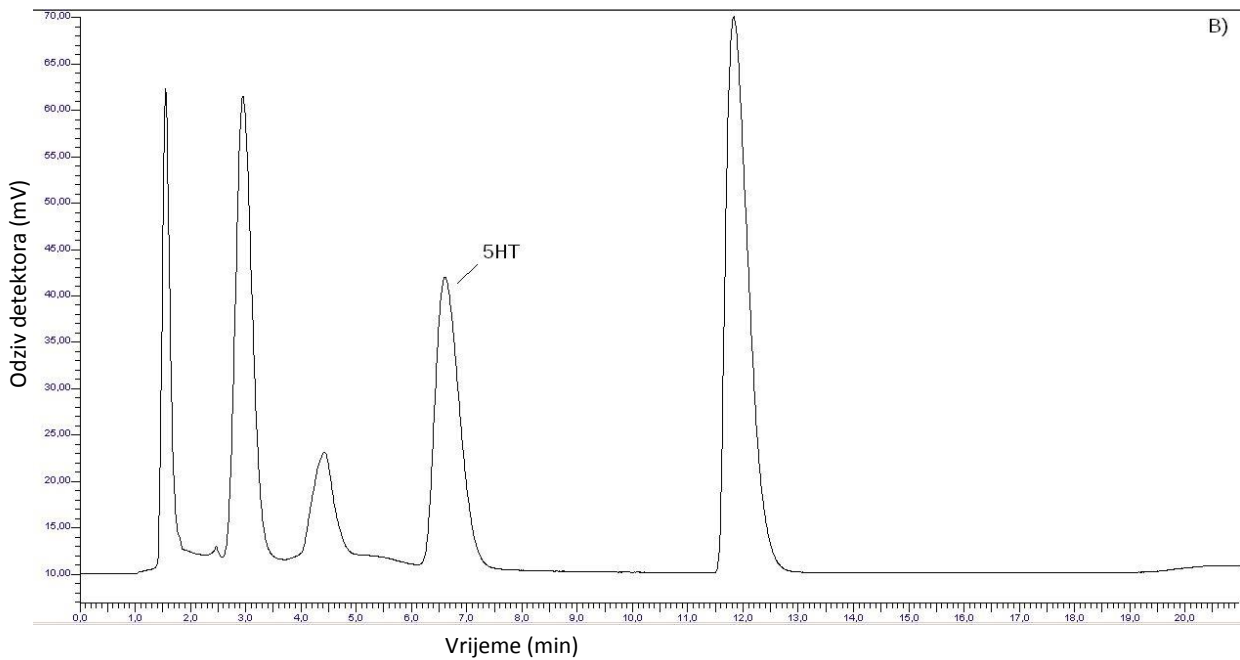
#### 4.1.1. Prilagođavanje pH vodene faze

Budući da kemijski sastav, kao i struktura, mozga štakora i mozga guštera nije jednaka, metodu za mjerenje koncentracije serotonina koju je razvila Peršić (2017) bilo je potrebno prilagoditi. Glavni parametar koji sam prilagođavala bio je pH vodene faze. Kao vodenu fazu koristila sam u početku 0,05% mravlju kiselinu pH 3,2. Ona zajedno s acetonitrilom HPLC-čistoće (organska faza) čini mobilnu fazu. Kako je bilo bitno da su vrhovi krivulja oštri i simetrični te dobro odijeljeni od okolnih, postepeno sam spuštala pH vodene faze s 0,5 M HCl sve dok nisam dobila vrhove krivulja odgovarajućih karakteristika (Slika 5. A, B, C, D).



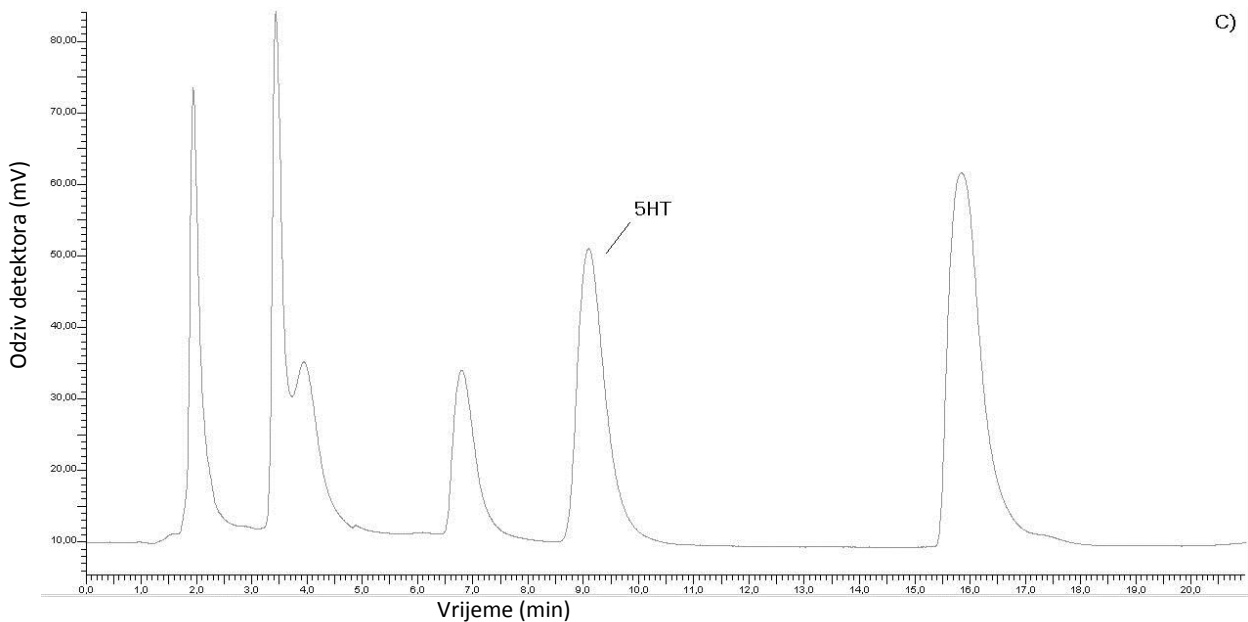
Slika 5. A) Kromatogram smjese standarda pri pH vodene faze 3,2.



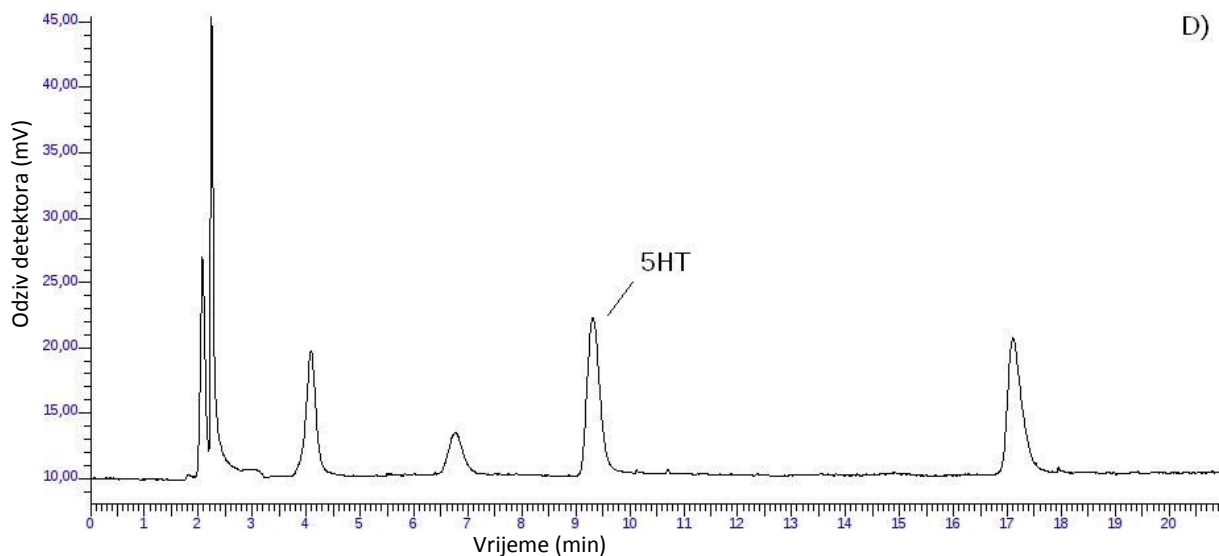


Slika 5. B) Kromatogram vrhova krivulja smjese standarda pri pH vodene faze 3,05. Opaska: široka površina vrhova krivulja.

Kako pri prvom spuštanju pH vodene faze na 3,05 (Slika 5. B) vrhovi krivulja i dalje nisu imali željene karakteristike, odlučila sam nastaviti snižavati pH (Slika 5. C).



Slika 5. C) Kromatogram smjese standarda pri pH vodene faze 2,95.



Slika 5. D) Kromatogram smjese standarda pri pH vodene faze 2,80. Najbolje postignuto razdvajanje vrhova krivulja, kao i njihova oština i simetričnost.

Budući da je pri 2,80 pH vodene faze postignuto najbolje razdvajanje vrhova krivulja, njihova oština i simetričnost, odlučila sam stati sa snižavanjem pH i za HPLC analizu mozгова koristiti upravo takvu vodenu fazu (Slika 5. D). U tablici 4. nalazi se prikaz konačno odabranih parametara:

Tablica 4. Tablični prikaz modificirane metode koju je koristila Peršić (2017) s promijenjenim pH vodene faze, to jest mravlje kiseline.

Udio vodene ili organske faze (%)						
Korak	Trajanje (min)	Protok	0,043% HCOOH, pH 2,8	Acetonitril	Način elucije	Nagib gradijenta*
0**	5	0,7	98	2	Izokratni	-
1	10	0,7	90	10	Gradijentni	0,8
2	5	0,7	87,5	12,5	Gradijentni	0,5
3	1	0,7	98	2	Gradijentni	-10,5
4	5	0,7	98	2	izokratni	-

\* Nagib gradijenta izračunat je kao promjena u udjelu organske faze kroz vremenski period trajanja koraka.

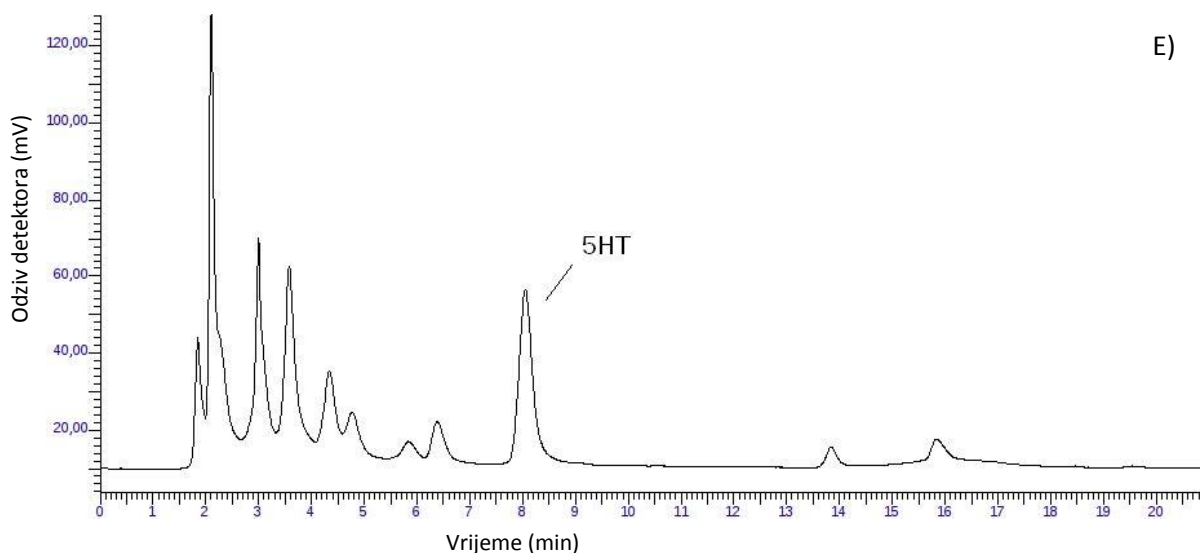
\*\* Nulti korak metode predstavlja ispiranje kolone između uzastopnih ispitivanja i nije prikazan na kromatogramima.

Odabrana metoda pokazala je vrlo dobru linearnost (svi  $R^2 > 0,99$ ) kroz sve dane (Tablica 5.). Ponovljivosti metode unutar istog dana također je bila dobra s maksimalnim odstupanjem od 2,22%.

Tablica 5. Tablični prikaz linearnosti ( $R^2$ ) po danima.

DAN	$R^2$
27.6.2017.	0,9997
29.6.2017.	0,9998
30.6.2017.	0,9992
3.7.2017.	0,999
4.7.2017.	0,9999
5.7.2017.	1
12.7.2017.	0,9936

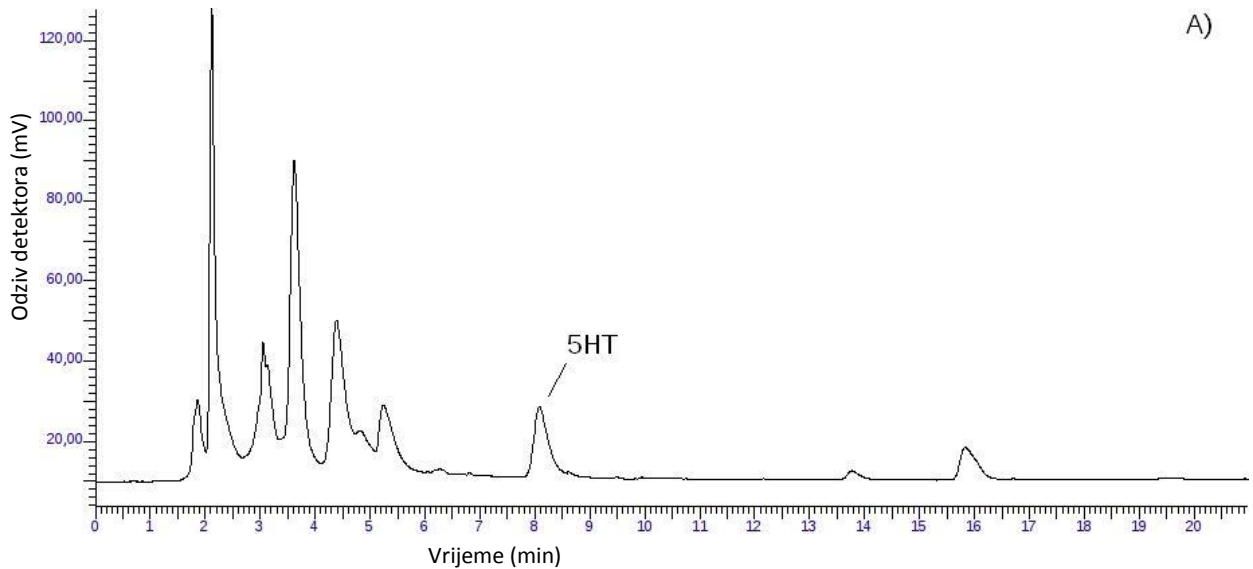
Nakon što smo utvrdili parametre analize na standardima, kroz HPLC smo propustili uzorke mozga. Slika 5. E prikazuje tipičan primjer kromatograma, koji pokazuje jako dobru selektivnost, odnosno razlučivanje vrhova krivulje smjese standarda i mozga guštera.



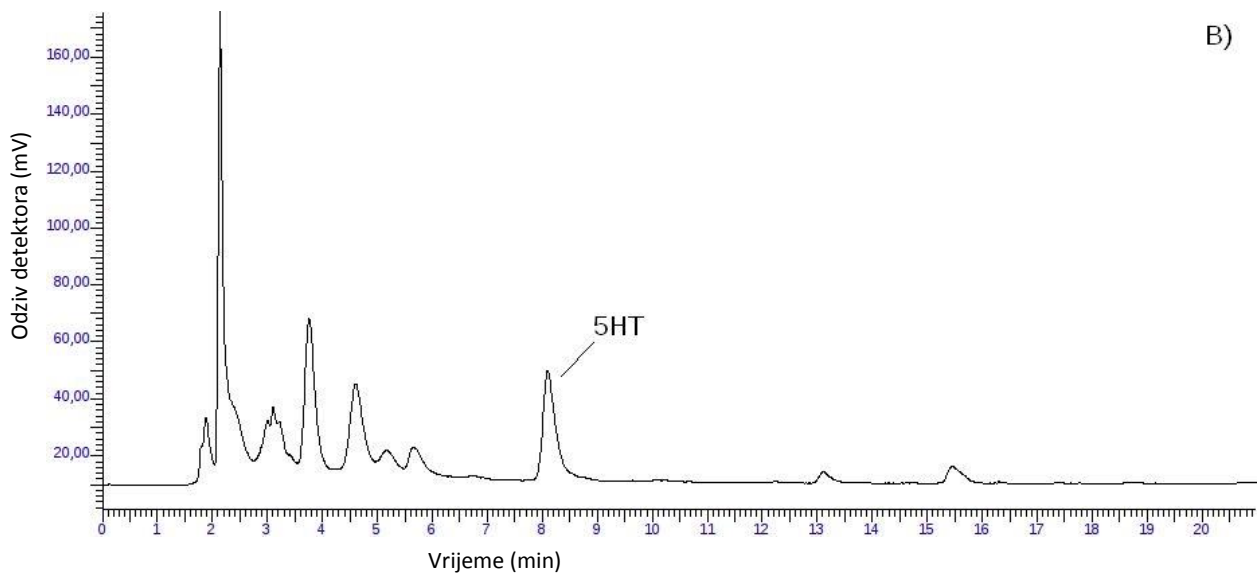
Slika 5. E) Kromatogram mozga guštera pri pH vodene faze 2,80.

## 4.2. Usporedba 5HT između vrsta i spolova

Kromatogrami dobiveni nakon analize uzoraka mozgova gušterica poslužili su za usporedbu koncentracija serotonina između ove dvije vrste (Slika 7. A i B).



Slika 7. A) Primjer kromatograma mozga ženke gušterice vrste *Podarcis melisellensis*.



Slika 7. B) Primjer kromatograma mozga ženke gušterice vrste *Podarcis siculus*.

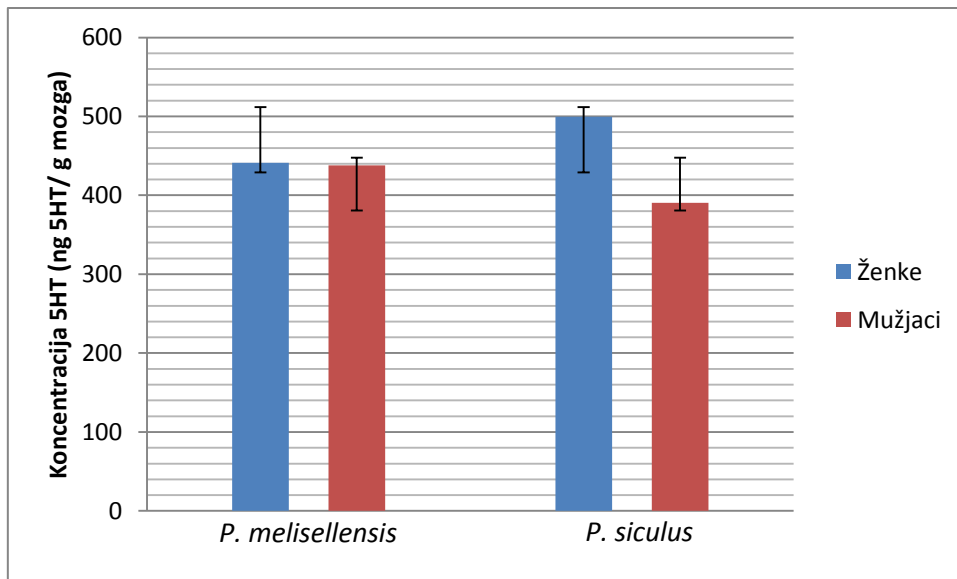
Koristeći matematičku formulu navedenu u podpoglavlju 3.2.3., iz površine serotoninskih pikova dobili smo koncentracije serotonina u mozgu (ng 5HT/g tkiva) koje su za sve podskupine prikazane u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracije serotonina u mozgovima gušterica izražene u obliku ng 5HT/ g mozga.

<i>P. melisellensis</i>				<i>P. siculus</i>			
ženke		mužjaci		ženke		mužjaci	
PMF3	122	PMM8	582	PSF1	556	PSM8*	1079
PMF4	263	PMM13	219	PSF2	212	PSM9	287
PMF2	194	PMM6	425	PSF8	169	PSM3	398
PMF1	263	PMM14	502	PSF12	512	PSM12	540
PMF11	615	PMM3	507	PSF7	636	PSM11	496
PMF7	586	PMM7	365	PSF3	720	PSM14	483
PMF8	724	PMM9	758	PSF13	824	PSM6	160
PMF12	762	PMM12	144	PSF5	368	PSM7	369
<b>M</b>	441	<b>M</b>	438	<b>M</b>	499	<b>M</b>	390
<b>SD</b>	257	<b>SD</b>	197	<b>SD</b>	235	<b>SD</b>	133

\* vrijednost uzorka odstupa više od dvije standardne devijacije od prosjeka skupine stoga nije uključen u usporedbu.

Usporedba srednjih vrijednosti podskupina prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Utjecaj vrste i spola na razinu serotonina u mozgu.

Promatrajući Sliku 8. mogli bismo zaključiti da je razina 5HT u ženki vrste *Podarcis siculus* nešto viša od one u mužjaka, dok se srednje vrijednosti razine 5HT vrste *Podarcis melisellensis* ne razlikuju između spolova i padaju između srednjih vrijednosti za ženke i mužjake vrste *P. siculus*. Ipak, dvosmjerna analiza varijanci nije pokazala značajan utjecaj niti vrste ( $F_{(1, 27)}=0,0054$ ,  $p=0,942$ ), niti spola ( $F_{(1, 27)}=0,0539$ ,  $p=0,469$ ), niti njihove interakcije ( $F_{(1, 27)}=0,0480$ ,  $p=0,494$ ) na mjereni parametar.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Prilagodba metode

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je prilagoditi postojeću metodu mjerenja serotonina u mozgu štakora mozgu gušterice. Prilagođena metoda pokazala je uspješno razdvajanje vrhova krivulja kao i poboljšanu oštrinu, te njihovu simetričnost.

Postojeća metoda (Peršić, 2017) je gradijentna i uključivala je mobilnu fazu koja se sastojala od 0,05 % mravlje kiseline (vodena faza) s pH 3,2 i acetonitrila HPLC čistoće (organska faza) u omjeru 87,5% : 12,5% ; protok u svim koracima je bio 0,7 ml/min, injekcijski volumen 20  $\mu$ L, a valna duljina detekcije 280 nm. Kromatogram smjese standarda dobiven tom metodom prikazan je na Slici 5. A. Budući da serotonin ima jednu hidroksilnu skupinu, te je slabije polaran, njegovo retencijsko vrijeme pri ovom pH bilo je oko 8,5 minuta. Kako su pri tom pH vrhovi krivulje imali nešto lošije karakteristike (Sigma-Aldrich, 2009), odlučila sam prilagođavati upravo taj parametar, pH mravlje kiseline. Postepnim snižavanjem pH pomoću 0,5 M HCl, dobivala sam kromatograme (Slike 5. B i C) s još uvijek lošim karakteristikama (oštrina, širina vrha krivulje, njegova simetričnost, te faktor simetrije) pri pH mravlje kiseline od 3,05 i 2,95. Najbolje karakteristike i razdvajanje vrhova krivulja pokazale su se pri pH vodene faze od 2,80 stoga sam ga prestala snižavati (Slika 5. D). Tijekom prilagođavanja metode, imala sam priliku testirati Accucore HILIC termokolonu koja se zagrije do 40 °C i pogodna je za razdvajanje katekolamina za manje od 10 minuta što omogućuje analizu velikog broja uzoraka za kratko vrijeme. Mobilna faza za takvu kolonu sastoji se od 100 mM amonijevog formijata i acetonitrila u omjeru 15% : 85% s ukupnim pH od 3,2. Standardi su također morali biti otopljeni u takvoj mobilnoj fazi (Freeke, 2011). Za serotonin ta kolona nažalost nije bila pogodna.

Za validaciju prilagođene metode koristila sam selektivnost, linearnost i ponovljivost unutar dana. Budući da su pri pH 2,80 vrhovi krivulje pokazivali dobru razlučenost i simetričnost, znači da je selektivnost metode jako dobra. Svakog dana su rađene nove baždarnе krivulje i svakog dana je  $R^2 > 0,99$  što znači da je linearnost metode također jako dobra (Tablici 6.). Ponovljivost unutar dana također je bila dobra, s maksimalnim odstupanjem od 2,22%. Nakon uspostave metode na standardima, kroz HPLC sam počela puštati uzorke mozgova gušterica koji su prethodno homogenizirani u deproteinizacijskoj

otopini (sastav prikazan u Tablici 1.). Kako su mozgovi gušterica manji od mozgova štakora (Paredes, 2015), povećala sam injekcijski volumen na 30  $\mu$ L.

Ovako prilagođena metoda bila je prikladna za sljedeći cilj ovog diplomskog rada a to je odgovor na pitanje ima li serotonin neurobiološku ulogu u afektivnom ponašanju primjećenom i ove dvije vrste gušterica (*P. melisellensis* i *P. siculus*).

## 5.2. Usporedba razine 5HT u mozgu gušterica *P. melisellensis* i *P. siculus*

Od svih neurotransmitora, serotonin ima najraznolikiju ulogu u kontroli ponašanja, vjerojatno zbog velikog broja receptora koji omogućuju raznovrsne efekte, ne samo unutar serotonergičnih neurona, nego i putem modulacije aktivnosti ostalih neurotransmitorskih sustava. U beskralješnjaka serotonin posreduje obrambeno ponašanje poput bijega i izbjegavanja predatora u mekušaca ili dominantne tjelesne poze u jastoga. 5HT djeluje kao regulator unutar pojedine neuronske mreže ili usklađivač aktivnosti nekoliko neuronskih mreža. Za razliku od beskralješnjaka u kojih su 5HT neuroni smješteni unutar neuronskih mreža čiju aktivnost reguliraju, u kralješnjaka su oni koncentrirani u diskretnim jezgrama moždanog debla i pružaju projekcije u razne dijelove mozga. Glavni učinak serotonina je bihevioralna inhibicija kao rezultat predviđanja averzivnih (odbojnih) događaja. Pokazano je da povišene razine 5HT imaju analgezijski učinak, da suprimiraju panični bijeg od averzivnog podražaja i pojačavaju osjetljivost na kaznu, dok niske razine smanjuju bihevioralnu inhibiciju vezanu uz očekivanje averzivnog podražaja, ali se i povezuju s reaktivnom agresijom u sisavaca. Serotonin također ima jaki utjecaj na socijalno ponašanje. Bihevioralnom inhibicijom suprimira se reaktivna agresija i promovira afilijativno ponašanje što utječe na socijalni status i kooperaciju u primata. U ljudi se disregulacija serotoninske ravnoteže smatra podlogom za psihijatrijske poremećaje stoga su brojni lijekovi korišteni u liječenju afektivnih i bihevioralnih poremećaja usmjereni na elemente 5HT sustava (Dayan i Huys, 2009).

Jedan od važnih motivacijskih mehanizama, koji posreduje adaptivno ponašanje u životinja, je izbjegavanje ponašanja čiji se rezultat doživljava kao kazna te ponavljanje/produljenje ponašanja čiji se rezultat doživljava kao nagrada. Smatra se da serotonin i dopamin (DA) igraju oprečnu ulogu u kontroli ponašanja s obzirom na doživljaj nagrade i kazne. Pretpostavlja se da DA moderira reakcije na ugodne podražaje, a 5HT na



neugodne. Kako su nagrade su u životinjskom carstvu rijetke i obično su rezultat aktivnosti same jedinke, dok su kazne relativno česte i rezultat su djelovanja okoline, serotonin u ovoj regulaciji ima dominantnu ulogu (Dayan i Huys, 2009).

U istraživanju ponašanja u zatočeništvu gušterica dviju spomenutih vrsta, bihevioralni testovi pokazali su da u odnosu na *P. melisellensis*, *P. siculus* ima povećanu razinu anksioznosti (vjerojatno povezanu s povećanim oprezom), povećanu lokomotornu aktivnost, bolju sposobnost učenja i veću bihevioralnu fleksibilnost. Sve ove karakteristike mogu predstavljati prednost *P. siculus* nad *P. melisellensis* u prirodnom staništu, a sve su moderirane međudjelovanjem serotonina i dopamina. Izbjegavanje boravka na otvorenim prostorima moglo bi se pripisati povišenim koncentracijama 5HT. Naime, pokazano je da štakori s konstitucijski povišenom razinom serotonina u mozgu pokazuju povećano, a štakori s farmakološki induciranom nižom razinom serotonina u mozgu smanjeno anksiozno ponašanje (Hranilović, 2005; Blažević, 2012). Povećana lokomotorna aktivnost i brže učenje mogli bi se pripisati povećanim koncentracijama dopamina (Xu, 2002). Na bihevioralnu fleksibilnost pak utječu i serotonin i dopamin (Blažević, 2012).

Unatoč opisanoj razlici u ponašanja između *P. melisellensis* i *P. siculus* i optimiziranoj metodi za mjerenje serotonina u mozgu gušterice, nisam uočila značajne razlike u razini serotonina između ove dvije vrste. Pretpostavljam stoga, da su opažene razlike u ponašanju prvenstveno rezultat razlike u razini katekolamina (dopamina i/ili noradrenalina), što će biti ispitano u sljedećem diplomskom radu.

## 6. ZAKLJUČAK

- Metoda za mjerenje koncentracije serotonina u moždanom tkivu štakora HPLC-om uspješno je prilagođena za mjerenja u mozgu gušterice:
  - optimalni pH iznosi 2,8, a injekcijski volumen uzorka 30  $\mu$ L.
  - linearnost i selektivnost metode, kao i ponovljivost unutar dana je zadovoljavajuća
- Koncentracije serotonina u mozgu gušterica *P. melisellensis* i *P. siculus*, nisu se statistički značajno razlikovale. Razlika u razini serotonina nije uočena ni između spolova.
- Pretpostavljam da su ranije opažene razlike u ponašanju prvenstveno rezultat razlike u razini katekolamina u mozgu ovih dviju vrsta gušterica.

## 7. LITERATURA

- Agilent Technologies (2016). The LC Handbook. Agilent Technologies Inc., Santa Clara, Kalifornija. 1-163.
- Arnold, EN (2003). Reptiles and amphibians of Europe. Princeton University Press. Princeton and Oxford.
- Behrendt R-P (2011): *Neuroanatomy of Social Behaviour. An Evolutionary and Psychoanalytic Perspective*. Karnac Books Ltd. London.
- Blažević, S (2013). Utjecaj perinatalne primjene prekursora sinteze ili inhibitora razgradnje serotonina na serotoninsku homeostazu u odraslih štakora. Doktorski rad. 19-20.
- Blažević S, Čolić L, Čulig L, Hranilović D (2012). Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behav Brain Res* **230**: 175-181.
- Brecko J, Huyghe K, Vanhooydonck B, Herrel A, Grbac I, Damme R Van (2008). Functional and ecological relevance of intraspecific variation in body size and shape in the lizard *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Biol J Linn Soc* **94**: 251–264.
- Capula M, Aloise G (2011). Extreme feeding behaviours in the Italian wall lizard, *Podarcis siculus*. *Acta Herpetologica* **6**(1): 11-14.
- Dayan P, Huys QJM (2009). Serotonin in Affective Control. *Annu Rev Neurosci* **32**: 95–126.
- Downes S, Bauwens D (2002). An experimental demonstration of direct behavioural interference in two Mediterranean lacertid lizard species. *Anim Behav* **63**: 1037–1046.
- Freeke J (2011). Application Note : Analysis of Artesunate and Dihydroartemisinin Using a Core Enhanced Technology Accucore HPLC Column. *Thermo Fish Sci* **40**: 1–2.
- Gajšek T (2017). Behaviour profile and habituation in open field test of two species of lizard, the Italian wall lizard, *Podarcis siculus* and the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellesis*. Diplomski rad. 1-59.

- Gray A, Lawrence P (2008): Basic HPLC theory and practice. U: Venn R.F. (ur.) Principles and Practice of Bioanalysis, Second Edition. CRC Press New York, str. 41-68
- Hranilović D, Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2005). Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. *Behav Brain Res* **165**: 271–277.
- Huyghe K, Vanhooydonck B, Herrel A, Tadić Z, Damme R Van (2007). Morphology, performance, behavior and ecology of three color morphs in males of the lizard *Podarcis melisellensis*. *Integr Comp Biol* **47**: 211–220.
- Keeley RJ, Trow CBJ, McDonald RJ (2015): Strain and sex differences in brain and behaviour of adult rats: Learning and memory, anxiety and volumetric estimates. *Behavioural Brain Research* **288**: 118-131.
- Keppel Hesselink JM (1992): The history of serotonin. U: Stahl S.M. (ur.), Gastpar M. (ur.), Keppel Hesselink J.M. (ur.), Traber J. (ur.). Serotonin 1a Receptors in Depression and Anxiety, First Edition. Raven Press, New York. str. 23-33.
- Lazzari M, Franceschini V (2000). Structural and spatial organisation of brain parenchymal vessels in the lizard, *Podarcis sicula*: a light, transmission and scanning electron microscopy study. *J Anat* **197**: 167–175.
- Lesch K-P, Mössner R (1998). Genetically driven variation in serotonin uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? *Biol Psychiatry* **44**: 179–192.
- Lucki I (1998). The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biol Psychiatry* **44**: 151–162.
- Luecken, LJ, Gallo, LC (2007). Handbook of Physiological Research Methods in Health Psychology. SAGE Publications. Thousand Oaks, California.
- Miczek KA, Haney M, Tidey J, Vivian J, Weerts E (1994): Neurochemistry and pharmacotherapeutic management of aggression and violence. U: Reiss AJ (ur.), Miczek KA (ur.). Roth JA (ur.). Understanding and Preventing Violence, vol 2: Biobehavioral Influences. National Academy Press. Washington, DC str. 245–513.
- Paredes MF, Sorrells SF, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2016). Brain size and limits to adult neurogenesis. *J Comp Neurol* **524**: 646–664.
- Podnar M, Mayer W, Tvrtković N (2004). Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Org Divers Evol* **4**:

307–317.

- Podnar M, Mayer W, Tvrtković N (2005). Phylogeography of the Italian wall lizard, *Podarcis sicula*, as revealed by mitochondrial DNA sequences. *Mol Ecol* **14**: 575–588.
- Peršić D (2017). Razvoj metode HPLC za određivanje serotonina, dopamina i noradrenalina u tkivu mozga štakora. Diplomski rad. 1-68.
- Ramboz S, Saudou F, Amara DA, Belzung C, Segu L, Misslin R, Buhot M-C, Hen R (1996). 5-HT<sub>1B</sub> receptor knock out--behavioral consequences. *Behav Brain Res* **73**: 305–312.
- Rodríguez-Prieto I, Martín J, Fernández-Juricic E (2011). Individual variation in behavioural plasticity: direct and indirect effects of boldness, exploration and sociability on habituation to predators in lizards. *Proceedings of the Royal Society B, Biological Sciences* **276**: 266–273
- Ruddell RG, Mann DA, Ramm GA (2008). The function of serotonin within the liver. *J Hepatol* **48**: 666–675.
- Saunders, KC, Venn, RF (2008). HPLC Detectors. U: Venn R.F. (ur.) Principles and Practice of Bioanalysis, Second Edition. CRC Press New York, str. 99-123.
- Senko J, Kochb V, Megillc WM, Carthya RR, Templetonc R P, Nicholsd WJ (2010). Fine scale daily movements and habitat use of East Pacific green turtles at a shallow coastal lagoon in Baja California Sur, Mexico. *J. of Experimental Marine Biology and Ecology* **1-2**: 92-100.
- Sigma-Aldrich (2009). HPLC Troubleshooting Guide. How to identify, isolate, and correct the most common HPLC problems. Sigma-Aldrich Co., Bellefonte, Pennsylvania. 1-20.
- Upadhyay SN (2003). Serotonin Receptors, Agonists and Antagonists. *Biochemistry* **18**: 1–11.
- Xu R, Hranilović D, Fetsko LA, Bucan M, Wang Y (2002). Dopamine D2S and D2L receptors may differentially contribute to the actions of antipsychotic and psychotic agents in mice. *Mol Psychiatry* **7**: 1075–1082.
- <http://institute.progress.im/en/content/serotonin-pathways-under-normal-conditions>

## 8. ŽIVOTOPIS

### **Osobni podaci:**

---

Ime i prezime: Davorka Burić  
Datum i mjesto rođenja: 19.07.1993., Bjelovar  
Adresa prebivališta: Sasovac 78, 43272 Nova Rača  
Telefon: +385 91 928 4807  
E-mail: davorka.buric93@hotmail.com

### **Završeno obrazovanje:**

---

2012. – 2015. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, Preddiplomski studij biologije (sveučilišna prvostupnica biologije)  
2008. – 2012. Opća gimnazija, Bjelovar

### **Prakse i sudjelovanja:**

---

2015. i 2016. Smotra Sveučilišta u Zagrebu  
2015. Laboratorijska stručna praksa pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Kovačevića, poster „Determining the most favorable conditions for breeding of green (*Hydra viridissima*) and brown hydra (*Hydra oligactis*)“  
Sudjelovanje na godišnjem sastanku Hrvatskog mikroskopijskog društva u Rijeci s posterom „Determining the most favorable conditions for breeding of green (*Hydra viridissima*) and brown hydra (*Hydra oligactis*)“ pod vodstvom prof. dr. sc. Gorana Kovačevića

### **Znanja i vještine:**

---

Rad na računalu: dobre računalne sposobnosti u operacijskim sustavima Windows i Linux (Ubuntu), poznavanje rada u paketu MS Office, Mendeley, pretraživanje Interneta i stručne literature.

Strani jezici: Engleski – vrlo dobro  
Njemački – položena A1 razina u školi stranih jezika  
studentskog centra u Zagrebu

Vozačka dozvola: B – kategorije