

Utjecaj antidepresiva i amfetamina na fiziološke pokazatelje u invazivne strane vrste signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

Krsnik, Jelena

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:948848>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Jelena Krsnik

Utjecaj antidepresiva i amfetamina na fiziološke pokazatelje u invazivne
strane vrste signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u Zoologijskom zavodu i Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom docentice dr.sc. Sandre Hudina i docentice dr.sc. Sofie Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra znanosti o okolišu.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ ANTIDEPRESIVA I AMFETAMINA NA FIZIOLOŠKE POKAZATELJE U INVAZIVNE STRANE VRSTE SIGNALNOG RAKA, *PACIFASTACUS LENIUSCULUS* (DANA, 1852)

Jelena Krsnik

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Farmaceutici u slatkovodnim ekosustavima mogu utjecati na ponašanje i fiziologiju vodenih organizama jer su dizajnirani da brzo djeluju u ljudskom tijelu i izlučuju se bez razgradnje, pa u vodu dospijevaju farmakološki aktivni. U ovom radu istražila sam utjecaj farmaceutika prisutnih u rijeci Savi (antidepresivi citalopram i nortriptilin i opojna droga amfetamin) na signalnog raka, najuspješniju invazivnu stranu vrstu raka u Europi. Rakove sam izlagala okolišno relevantnoj (niskoj) ili terapijskoj (visokoj) koncentraciji citaloprama, nortriptilina ili amfetamina tijekom 7 dana. S obzirom da odabrani farmaceutici utječu na metabolizam serotonina koji kod rakova kontrolira otpuštanje hiperglikemijskog hormona, mjerila sam razinu serotonina u cerebralnim ganglijima i razinu glukoze u hemolimfi te malondialdehid kao marker oksidativnog stresa. Rezultate izmjerenih parametara izloženih jedinki usporedila sam s kontrolnima koje nisu bile izložene spojevima. Nortriptilin u visokoj koncentraciji povisio je razinu serotonina u cerebralnim ganglijima u odnosu na grupu izloženu niskoj koncentraciji. Kod rakova izloženih niskoj koncentraciji nortriptilina zabilježeno je povišenje razine glukoze u hemolimfi u odnosu na kontrolne grupe, a izlaganje amfetaminu u obje koncentracije snizilo je razine glukoze u hemolimfi. Nisam zabilježila povišenje markera oksidativnog stresa. U budućim istraživanjima potrebno je produljiti vrijeme izlaganja i istražiti utjecaj na ostale hormone regulirane fiziološke parametre (rast i razmnožavanje).

(34 stranice, 15 slika, 2 tablice, 33 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: farmaceutici, lipidna peroksidacija, hiperglikemija, serotonin

Voditelj rada 1: Dr.sc. Sandra Hudina, doc.

Voditelj rada 2: Dr.sc. Sofia Ana Blažević, doc.

Ocjenitelji: Dr. sc. Sandra Hudina, doc.

Dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

Dr. sc. Mladen Maradin, doc.

Dr.sc. Jasenka Sremac, prof.

Zamjena: Dr. sc. Blanka Cvetko Tešović, prof.

Rad je prihvaćen: 5.9.2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

EFFECTS OF ANTIDEPRESSANTS AND AMPHETAMINE ON PHYSIOLOGICAL PARAMETERS OF THE INVASIVE ALIEN SPECIES SIGNAL CRAYFISH, *PACIFASTACUS LENIUSCULUS* (DANA, 1852)

Jelena Krsnik

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Pharmaceutical pollution can affect behavior and physiology of freshwater organisms since pharmaceuticals act quickly in the human body, excrete without degrading and enter freshwaters still pharmacologically active. This study explores whether pharmaceuticals present in the Sava River (antidepressants Citalopram and Nortriptyline, illicit drug Amphetamine) have an effect on the physiology of the most successful crustacean invader of European freshwaters, the Signal crayfish. I exposed individuals to environmentally relevant (low), or therapeutic (high) concentration of Citalopram, Nortriptyline or Amphetamine dissolved in ambient water for 7 days. Serotonin mediates the release of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) that controls hemolymph glucose concentration, and since these chemicals alter serotonergic metabolism, I measured concentration of serotonin in the brain, concentration of glucose in hemolymph, and malondialdehyde, marker of oxidative stress, and compared the results of exposed individuals to that of control-unexposed groups. High concentration of Nortriptyline elevated serotonin levels in comparison to exposure to low concentrations. Glucose levels were higher than in control group at low concentration of Nortriptyline, and lower than in control group at both concentrations of Amphetamine. There was no influence on levels of oxidative stress biomarker. Future research should include long-term exposure and examine effects of pharmaceuticals on growth and reproduction.

(34 pages, 15 figures, 2 tables, 33 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: pharmaceuticals, lipid peroxidation, hyperglycemia, serotonin

Supervisor 1: Dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.

Supervisor 2: Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Reviewers: Dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.

Dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Dr. Mladen Maradin, Asst. Prof.

Dr. Jasenka Sremac, Prof.

Zamjena: Dr. Blanka Cvetko Tešović, Prof.

Thesis accepted: 5.9.2019.

Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Farmaceutici u vodenim ekosustavima	1
1.2.	Antidepresivi i amfetamin	1
1.3.	Utjecaj farmaceutika na slatkovodne organizme	3
1.4.	Oksidativni stres	4
1.5.	Hiperglikemija.....	6
1.6.	Signalni rak, <i>Pacifastacus leniusculus</i> (Dana, 1852)	7
2.	Cilj istraživanja	9
3.	Materijali i metode	9
3.1.	Odabir farmaceutika za istraživanje	9
3.2.	Prikupljanje rakova i laboratorijsko istraživanje	10
3.4.	Izolacija organa.....	12
3.5.	Analiza razine serotonina u cerebralnim ganglijima	13
3.6.	Analiza razine glukoze u hemolimfi.....	14
3.7.	Lipidna peroksidacija	14
3.8.	Statistička obrada podataka	16
4.	Rezultati.....	17
4.1.	Koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima	17
4.2.	Koncentracija glukoze u hemolimfi	20
4.3.	Stupanj lipidne peroksidacije	23
5.	Rasprava	26
5.2.	Koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima.....	26
5.1.	Koncentracija glukoze u hemolimfi	27
5.3.	Stupanj lipidne peroksidacije	28
6.	Zaključak.....	30
7.	Literatura	31
8.	Životopis	35

1. Uvod

1.1. Farmaceutici u vodenim ekosustavima

Niske koncentracije sintetskih farmaceutika kao što su receptni i bezreceptni lijekovi, opojne droge i lijekovi za životinje, mogu se pronaći u vodenim ekosustavima diljem svijeta zbog njihove široke upotrebe i neučinkovitog uklanjanja iz komunalnih otpadnih voda. Uz životni standard povećava se i očekivana životna dob ljudi koji zbog toga troše sve više lijekova. Također, lijekovi postaju cjenovno dostupniji, pogotovo u zemljama u razvoju, zbog čega se očekuje da će se količina farmaceutika koji završavaju u okolišu u budućnosti nastaviti povećavati (Kummerrer, 2010). U površinskim vodama njihove se koncentracije kreću od ng/L do nekoliko µg/L, a u korelaciji su s gustoćom naseljenosti područja, volumenu vodenog tijela u kojem se nalaze i s tehnologijama korištenim za uklanjanje iz komunalnih otpadnih voda. Na određenim točkama npr. u blizini tvornica lijekova koncentracije farmaceutika u vodi mjere se u mg/L (Brodin i sur. 2014). U sušnim područjima svijeta povremene tekućice često ovise o dotoku otpadnih i industrijskih voda što znači da su vodeni organizmi stalno izloženi visokim dozama farmaceutika (Ford i Fong 2016). Zajednička osobina većini vrsta farmaceutika je da su dizajnirani tako da brzo djeluju i izlučuju se iz ljudskog tijela bez potpune razgradnje pa u vodene ekosustave uz metabolite dopijevaju i farmakološki aktivne komponente, npr. 75% antibiotika korištenih u Njemačkoj izluči se iz tijela nepromijenjeno (Kummerrer, 2010). Zabilježene koncentracije farmaceutika u vodama uglavnom su puno niže od poznatih toksičnih koncentracija, ali mogu imati sub-letalne učinke na vodene organizme pri okolišno relevantnim koncentracijama (Brodin i sur. 2014).

1.2. Antidepresivi i amfetamin

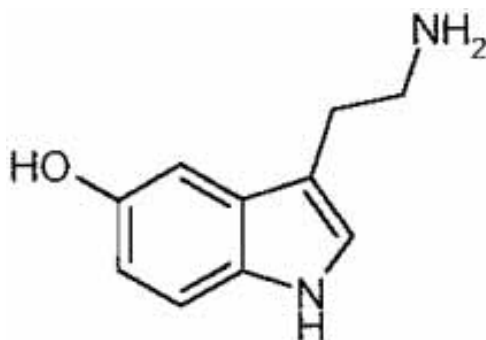
Neki od najčešće korištenih farmaceutika su antidepresivi, grupa lijekova koja se koristi za liječenje stanja kao što su depresija, anksioznost ili bipolarni poremećaj. Prepisuju se sve češće te ih koristi 1 od 10 osoba. U upotrebi je širok raspon antidepresiva podijeljenih prema mehanizmu djelovanja: triciklički antidepresivi, selektivni inhibitori ponovne pohrane

serotonina, selektivni inhibitori ponovne pohrane noradrenalina, selektivni inhibitori monoaminooksidaze. Triciklički antidepresivi bili su prvi učinkoviti antidepresivi, otkriveni u pedesetim godinama, a utječu na metabolizam serotonina i noradrenalina u sinapsama (Ford i Fong, 2016; Taylor, 2005). Nortriptilin koji je korišten u ovom istraživanju spada u ovu skupinu.

Najčešće korištena skupina antidepresiva su selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI; eng. Selective serotonin reuptake inhibitors) koji djeluju putem receptora za ponovnu pohranu serotonina i podižu njegove razine u sinapsama. SSRI u usporedbi s ostalim vrstama antidepresiva imaju poboljšana svojstva jer su selektivniji i uzrokuju manje nuspojave koje mogu nastati zbog djelovanja na više sustava neurotransmitera. Citalopram, korišten za istraživanje u ovom radu spada u ovu skupinu antidepresiva (Ford i Fong, 2016; Šagud, 2002).

Amfetamin je opojna droga koja djeluje na metabolizam dopamina, povećava stopu sinteze i smanjuje razgradnju te inhibira njegovu ponovnu pohranu, što uzrokuje povišene koncentracije dopamina u sinapsama. Postoji i mogućnost djelovanja na serotoninske receptore koja bi u konačnici prouzročila jednake učinke kao nortriptilin i citalopram. U sisavaca je dokazana interakcija amfetamina i serotoninskih receptora, dok kod rakova još ne postoje dokazi takve interakcije (Daberkow i sur. 2013).

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je triptamin građen od indolskog prstena, sa hidroksidnom grupom na 5 C-atomu i postranim karboksil-amid lancem (Slika 1). Široko je rasprostranjen neurotransmiter koji regulira mnoge procese u ponašanju i fiziologiji životinja (Mück-Šeler i Pivac, 2011). U rakova serotonin ima ulogu u kretanju, pokretima probavnog sustava, ponašanju u opasnosti, agresivnom ponašanju i kontroli izlučivanja hiperglikemijskog hormona (Sosa i sur. 2004). Serotoninski sustav je evolucijski očuvan tj. kralješnjaci i beskralješnjaci imaju receptore i transportere serotonina koji dijele zajedničke pretke. Zbog toga lijekovi koji moduliraju razine serotonina u ljudi mogu djelovati i na druge vrste te postoji zabrinutost da SSRI mogu imati utjecaj na ne-ciljane organizme u vodenim ekosustavima (Tierney i sur. 2016).



Slika 1. Struktura serotonina (preuzeto iz Mück-Šeler i Pivac, 2011).

1.3. Utjecaj farmaceutika na slatkovodne organizme

Nakon 4 tjedna izlaganja sjevernoameričke vrste ribe *Pimephales promelas* SSRI antidepressivu fluoksetinu u rasponu koncentracija od 100 ng/L do 100 µg/L zabilježene su promjene u reproduktivnom ponašanju mužjaka. Već pri okolišno relevantnoj koncentraciji od 1 µg/L dolazi do promjena u gradnji gnijezda, obrambenom ponašanju i izbjegavanju predatora. Pri višim koncentracijama mužjaci pokazuju agresiju i izoliraju se. Pri najvećoj koncentraciji (100 µg/L) smanjena je stopa proizvodnje jaja zbog ugibanja ženki uzrokovano pojačanom agresivnosti mužjaka (Weinberger i Klaper, 2014).

Izlaganjem ranih životnih stadija jedinki šarana (*Cyprinus carpio*) tricikličkim antidepressivima amitriptilinu, nortriptilinu i klomipraminu kroz 30 dana, dolazi do povećanog mortaliteta, morfoloških anomalija, patoloških promjena mozga, srca i bubrega, te pojačane lipidne peroksidacije (Sehonova i sur. 2017).

Izlaganje slatkovodne vrste školjkaša, raznolike trokutnjače (*Dreissena polymorpha*), okolišno relevantnim (20 i 200 ng/L) koncentracijama fluoksetina kroz 6 dana, prouzročilo je smanjenje broja oocita kod ženki za 40-70% i smanjenje gustoće spermatozoida za 21-25%. Ovakav negativni utjecaj na fekunditet može uzrokovati smanjenje veličina populacija u prirodi (Lazzara i sur. 2012).

Deseteronožni rakovi *Oronectes rusticus* izloženi fluoksetinu pokazali su značajne promjene u stopi rasta i u ponašanju. Izvagani i izmjereni rakovi su izlagani fluoksetinu u rasponu od 0-500 µg/L do presvlačenja, te ponovno vagani i mjereni dva tjedna nakon

presvlačenja. Jedinke izložene koncentraciji 500 µg/L pokazale su pojačan rast, veću tjelesnu masu i dužinu karapaksa. Za procjenu utjecaja na ponašanje rakovi su izlagani koncentracijama od 0 µg/L, 2 µg/L, 200 µg/L ili 500 µg/L fluoksetina kroz 10 dana, nakon čega su pokazali značajno smanjenu količinu kretanja u odnosu na kontrole (Tierney i sur. 2016).

SSRI antidepresiv Citalopram pri okolišno relevantnim koncentracijama (1 µg/L) uzrokovao je smanjenu količinu i brzinu kretanja mramornog raka *Procambarus virginalis* (Burič i sur. 2018).

Signalni rakovi izloženi okolišno relevantnoj koncentraciji od 1 µg/L analgetika tramadola kroz 21 dan pokazali su smanjenu količinu i brzinu kretanja u odnosu na kontrolnu grupu kao i pojačane promjene ritma otkucaja srca kod izloženosti stresu (Ložek i sur. 2019).

1.4. Oksidativni stres

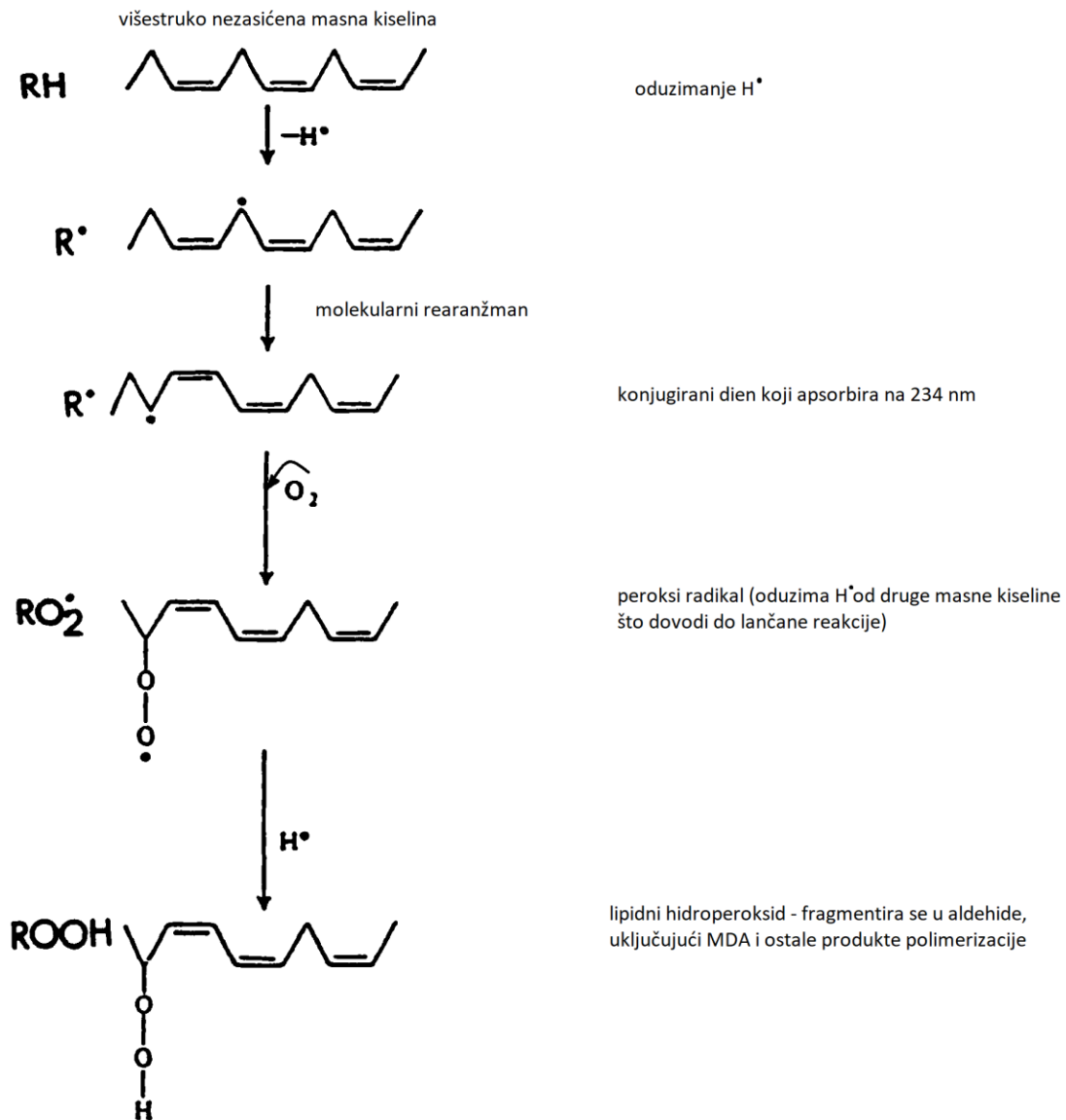
S obzirom da je cilj ovog istraživanja odrediti utjecaj farmaceutika na fiziologiju rakova, jedan od ispitivanih fizioloških pokazatelja je razina oksidativnog stresa. Mjerenjem razine biomarkera oksidativnog stresa nastojimo odrediti uzrokuju li farmaceutici prisutni u vodenim ekosustavima oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima.

Reaktivni oblici kisika (ROS) produkt su normalnog staničnog metabolizma. U malim količinama su uobičajeni i imaju pozitivan utjecaj na stanični odgovor i imunosnu funkciju, dok u velikim količinama u stanici uzrokuju oksidativni stres, proces koji može oštetiti DNA, RNA i ostale makromolekule. U reaktivne oblike kisika spadaju slobodni radikali koji imaju jedan ili više nesparenih elektrona u vanjskoj ljusci zbog čega su nestabilni i reagiraju s makromolekulama, oštećuju njihovu strukturu i mijenjaju prvobitnu funkciju, a to su hidroksilni, superoksidni i peroksidni radikali. Osim slobodnih radikala tu spadaju i ne-radikalni oblici kisika kao što su singletni kisik, vodikov peroksid, ozon itd. koji u organizmu također mogu izazvati reakcije oksidacije (Pham-Huy i sur. 2008).

Organizam se protiv oksidativnog stresa bori pomoću antioksidansa koji neutraliziraju višak slobodnih radikala, štite stanicu i tako sprječavaju nastanak bolesti. Antioksidansi mogu biti proizvedeni u organizmu ili uneseni hranom, a dijele se na enzimatske (superoksid

dizmutaza, katalaza, glutation peroksidaza i glutation reduktaza) i ne-enzimatske antioksidanse (glutation, L-arginin, vitamini C i E, karotenoidi, flavonoidi itd.) Dok se u organizmu zbog stresnih uvjeta poremeti ravnoteža između količine oksidansa i antioksidansa, nastaje oksidativni stres koji se može odrediti mjerenjem biomarkera kao što su vodikov peroksid, superoksidni radikal, karbonili, nitrotirozin, malondialdehid (MDA), iz plazme ili krvi standardiziranim postupcima (Pham-Huy i sur. 2008; Birben 2012).

Lipidna peroksidacija je proces u kojem najčešće hidroksilni radikal uzrokuje oštećenja višestruko nezasićenih masnih kiselina. Odvija se u tri etape: inicijacija, propagacija i terminacija. Započinje napadom reaktivnog oblika kisika (ROS) koji izdvaja atom vodika iz metilenske skupine čime nastaju slobodni lipidni radikali. U aerobnim uvjetima spajanjem lipidnih radikala s kisikom nastaju peroksilni radikali koji uzrokuju lančanu reakciju jer mogu eliminirati vodik iz bilo koje druge molekule, pa tako i ponovno iz višestruko nezasićene masne kiseline čime nastaju lipidni hidroperoksidi i reaktivni ugljikovi radikali koji nastavljaju reakciju (faza propagacije). Razgradnjom lipidnih hidroperoksida nastaju konačni produkti peroksidacije, aldehidi, ketoni i ugljikovodici (Slika 2). Jedan od produkata lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA) koji služi kao biomarker i čiji smo sadržaj mjerili u ovom radu (Štefan i sur. 2007).



Slika 2. Shema lipidne peroksidacije (preuzeto i prilagođeno iz Gutteridge 1995).

1.5. Hiperglikemija

Tipični odgovor mnogih vodenih organizama na štetne fizikalno-kemijske promjene u okolišu je hiperglikemija. Zbog interakcije zagađivača ili nekog njegovog metabolita s biokemijskim procesima važnim za kontrolu homeostaze i fizioloških procesa, taj zagađivač na organizam ima toksični učinak. Kod rakova izloženost stresorima u okolišu može za posljedicu imati povećanu količinu cirkulirajućeg hiperglikemijskog hormona (cHH,

Crustacean hyperglycemic hormone). Utjecaj organskog i anorganskog zagađenja na funkcije regulirane hormonima u rakova puno se istražuje jer takvi slučajevi mogu biti korišteni kao biomarkeri zagađenja u okolišu. Teški metali i organska zagađenja imaju dokazano negativan utjecaj na hormonima regulirane funkcije kao što su razmnožavanje, presvlačenje i nivo glukoze u hemolimfi, koji ćemo i pratiti u ovome radu (Lorenzon i sur. 2005).

Najvažnije komponente neuroendokrinog sustava rakova s očnim stapkama su neurosekretorne strukture u očnim stapkama. Razina glukoze u hemolimfi regulirana je hiperglikemijskim hormonom (cHH) koji se sintetizira u x-organu, klasteru neurona lokaliziranih u meduli terminalis očne stapke. Transportira se i skladišti u završecima aksona koji formiraju neurohemalni organ (sinus gland, SG) iz kojeg se cHH egzocitozom otpušta u hemolimfu. Najvažnija funkcija cHH je regulacija razine glukoze u hemolimfi, a uključen je još i u razmnožavanje, presvlačenje, metabolizam lipida i odgovor na stres. Otpuštanje cHH iz neuroendokrinih tkiva u rakova kontrolirano je serotoninom. Stres u okolišu (npr. hipoksija ili izlaganje zagađivačima) uzrokuje otpuštanje serotonina i cHH iz očnih stapki čime se povisuje njihova razina u hemolimfi. Serotonin dodatno inducira otpuštanje cHH iz neurohemalnog organa u hemolimfu. cHH zatim djeluje na ciljne organe tako da otpuštaju više glukoze nego što je uobičajeno i dolazi do hiperglikemije (Lorenzon i sur. 2005).

1.6. Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

Kao modelni organizam za ovo istraživanje izabran je signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*) jer su deseteronožni rakovi najveći beskralješnjaci u slatkovodnim ekosustavima i važna su karika u prehranbenim mrežama. Signalni rak (Slika 3) obitava u rijekama i jezerama umjerenog klimatskog područja. Autohtona je vrsta u sjeverozapadnom SAD-u i jugozapadnom dijelu Kanade, a unesen je u južnije dijelove Amerike i Europu gdje zbog svoje agresivnosti kojom ugrožava zavičajne vrste rakova, predstavlja invazivnu stranu vrstu (Kouba i sur. 2014). Uz to, brzo raste i ima velik fekunditet te je prijenosnik uzročnika račje kuge (*Aphanomyces astaci*) na koju su sjevernoameričke vrste rakova imune, a europske su podložne zarazi. Zbog ovih karakteristika prisutan je u velikom broju zemalja Europe (29) i smatra se najuspješnijom stranom invazivnom vrstom rakova u Europi (Kouba i sur. 2014).

U Hrvatsku je signalni rak ušao iz Slovenije rijekom Murom, iz koje se proširio u Dravu (Hudina i sur. 2009). Od 2012. zabilježen je i u Korani, u koju je ilegalno unesen, te se širi uzvodno i nizvodno (Hudina i sur. 2017). Rijeka Korana krška je rijeka Savskog sliva, čije izvorište se nalazi unutar Nacionalnog parka Plitvička jezera, dok se ušće nalazi na području grada Karlovca. U rijeci Korani i njezinim pritocima prisutne su tri od ukupno četiri zavičajne vrste rakova u Hrvatskoj: *Astacus astacus* (Linnaeus, 1758), *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) i *Austropotamobius torrentium* (Schränk, 1803) (Maguire i Gottstein 2004; Hudina i sur. 2013), te stoga širenje signalnog raka na ovom području predstavlja veliku prijetnju zavičajnoj astakofauni.



Slika 3. Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

autor: Sandra Hudina

2. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je utvrditi imaju li odabrani farmaceutici (antidepresivi citalopram i nortriptilin i opojna droga amfetamin) utjecaj na određene fiziološke pokazatelje u invazivne strane vrste signalnog raka. S obzirom da odabrani farmaceutici djeluju na metabolizam serotonina, a kod deseteronožnih rakova serotonin kontrolira otpuštanje hiperglikemijskog hormona zaduženog za kontrolu razine glukoze u hemolimfi, za istraživanje su izabrani sljedeći fiziološki pokazatelji: razina serotonina u cerebralnim ganglijima i razina glukoze u hemolimfi. Uz to, da bih utvrdila mogu li farmaceutici uzrokovati oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima, mjerila sam i razinu markera oksidativnog stresa: malondialdehida. Dobiveni rezultati pokazat će utječe li zagađenje farmaceuticima na fiziologiju signalnih rakova i tako potencijalno modificira njihov invazivni uspjeh.

3. Materijali i metode

3.1. Odabir farmaceutika za istraživanje

Spojevi za istraživanje izabrani su u sklopu projekta *Utjecaj zagađenja na invazivni uspjeh strane vrste slatkovodnog raka*, prije eksperimentalnog dijela projekta koji je tema ovog rada. Izabrani su na temelju podataka o njihovoj zastupljenosti na 10 mjernih postaja duž hrvatskog dijela toka rijeke Save (podaci o koncentracijama 546 organskih zagađivala dobiveni od Hrvatskih voda), u kombinaciji s podacima o potencijalnim učincima spojeva na modelni organizam. Podaci o potencijalnim učincima prikupljeni su pregledom javno dostupnih ekotoksikoloških baza podataka ToxCast i ECOTOX. Na taj način određeni su prioritetni spojevi koji su prisutni u rijeci Savi i mogu imati potencijalni učinak na fiziologiju signalnog raka, antidepresivi citalopram i nortriptilin i opojna droga amfetamin.

3.2. Prikupljanje rakova i laboratorijsko istraživanje

Rakovi su ulovljeni pomoću LiNi vrša s mamcem na rijeci Korani na postaji Ladvenjak (Slika 4).



Slika 4. Postaja Ladvenjak na rijeci Korani s prikazanim smjerovima širenja signalnog raka i nizvodnom i uzvodnom frontom (označene crvenom bojom)

Za eksperiment korišteni su neozlijeđeni mužjaci u stadiju između presvlačenja. Rakovi su zatim dopremljeni na Zoologijski zavod Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. U laboratoriju su izvagani digitalnom vagom te su im pomičnom mjerkom izmjereni određeni morfometrijski parametri: ukupna dužina tijela, od vrha rostruma do telzona, i

dužina karapaksa, od trna iza oka do kraja karapaksa. Rakovi su zatim smješteni svaki u svoj akvarij, s po 1 litrom vode sobne temperature koja je stalno aerirana (Slika 5). Temperatura je održavana konstantnom (20 °C) kao i režim osvjetljenja (12:12 noć:dan). Akvariji su bili vizualno odijeljeni jedan od drugog čime se sprječava interakcija rakova i stvaranje hijerarhije (Goessmann i sur. 2000) što je bilo važno zbog paralelno provedenih pokusa vezanih uz ponašanje. Hranjeni su svaki drugi dan peletima za pridnene ribe (Nutrafin max). Nakon perioda prilagodbe od 14 dana započeli smo izlaganje rakova farmaceuticima.



Slika 5. Rakovi u akvarijima

Spojevi za analizu nabavljeni su od ovlaštenih zastupnika (Biovit, Medic) koji su ovlaštene za uvoz i distribuciju te su osigurali sve potrebne dozvole. Rakove sam izlagala spojevima (citalopram, nortriptilin ili amfetamin) tijekom 7 dana tako da sam dodavala određenu koncentraciju spoja pipetom u vodu akvarija. Postojale su dvije moguće koncentracije: i) okolišno relevantna (niska) i ii) terapijska (visoka, utvrđena prema postojećim podacima o koncentraciji spojeva u plazmi pacijenata), točne koncentracije pojedinog spoja u vodi prikazane su u tablici 1.

Kako bismo poboljšali topljivost spojeva prema uputama proizvođača prvo smo ih otopili u 96 % etanolu. Te matične otopine držali smo u hladnjaku u bočicama tamnog stakla. Svaki dan smo razrjeđivanjem matičnih otopina vodom visoke čistoće pripremali dnevne otopine, za svaki pojedini spoj i koncentraciju, koje ćemo koristiti taj dan (Tablica 1).

Po 1 ml dnevne otopine dodavali smo u 999 ml vodovodne vode koja je bila aerirana u akvariju na sljedeći način: u menzuri od 1000 ml izmjerili smo 1 l vode, pipetom oduzeli 1 ml i vodu ulili u akvarij. Zatim smo pipetom u vodu akvarija dodali određeni spoj pri čemu smo par puta isprali nastavak pipete u vodu. Svakom od tri spoja bilo je izloženo 8 rakova na nižoj i 8 na višoj koncentraciji. Za svaki spoj i koncentraciju postojao je i jednaki broj kontrolnih jedinki koje su bile držane u istim uvjetima, ali smo im umjesto otopina spojeva u vodu dodavali ekvivalentnu količinu otopine etanola. Svaka izložena grupa ima svoju zasebnu kontrolnu grupu (npr. grupa izložena visokoj koncentraciji citaloprama ima kontrolnu grupu za visoku koncentraciju citaloprama) zbog paralelno provedenog pokusa vezanog uz ponašanje rakova u kojem je bilo važno da svaka jedinka ima svoj određeni par podjednake veličine i mase.

Tablica 1. Koncentracije korištenih spojeva

Ime spoja	Cas broj	Proizvođač	Koncentracija stock otopine u etanolu	Koncentracija dnevne vodene otopine niska/visoka	Koncentracija u akvariju niska/visoka
citalopram hidrobromid	59729-32-7	Sigma-Aldrich	1g/l	1000µg/l / 50000 µg/l	1µg/l / 50µg/l
nortriptilin hidroklorid	894-71-3	Sigma-Aldrich	1g/l	50µg/l / 50000µg/l	50 ng/l / 50 µg/l
d amfetamin sulfat	51-63-8	Lipomed	0,2g/l	20µg/l / 100000 µg/l	20 ng/l / 100µg/l

3.4. Izolacija organa

Nakon 7 dana izlaganja rakovima sam vadila hemolimfu iglama obloženima antikoagulansom heparinom. Hemolimfu sam centrifugirala 2 min na 10 000 g, izdvojila supernatant tj. heparinsku plazmu i pohranila je u ledenicu na -80 °C, da ostane očuvana do

provedbe analize. Rakovi su zatim stavljeni na nekoliko minuta u ledenicu na pothlađivanje što omogućuje čvršću konzistenciju unutarnjih organa i olakšava izolaciju te je u skladu sa smjericama o humanom postupanju s rakovima (RSPCA 2018). Izolirala sam hepatopankreas i cerebralne ganglije svake jedinke i prenijela ih u prethodno označene i izvagane Eppendorf epruvete, koje su zatim ponovno izvagane te je iz razlike u masama izračunata masa organa. Hepatopankreasi i cerebralni gangliji također su pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do provedbe analize.

3.5. Analiza razine serotonina u cerebralnim ganglijima

U mikroeprevete sa smrznutim uzorcima cerebralnih ganglija dodala sam određen volumen deproteinizacijske otopine (Tablica 2) (masa uzorka pomnožena s deset), te sam uzorke homogenizirala ultrazvučnim homogenizatorom (Bandelin, Njemačka). Budući da ultrazvučna sonda prilikom korištenja zagrijava uzorak, što može uzrokovati razgradnju serotonina, koristila sam hladnu deproteinizacijsku otopinu, a mikroeprevetu s uzorkom sam tijekom homogenizacije držala u čaši s ledom. Trajanje homogenizacije pojedinog uzorka variralo je do maksimalno 25 sekundi. Nakon homogenizacije, uzorke sam centrifugirala 20 minuta pri $23390 \times g$ i temperaturi od $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni supernatant stavila sam na led prije analize ELISA-om, a ukoliko ne bih analizirala uzorak odmah nakon pripreme, pospremila bih ga u zamrzivač na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tablica 2. Priprema deproteinizacijske otopine za homogenizaciju mozgova.

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

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

Prije analize eksperimentalnih uzoraka, testirala sam više koncentracija homogenata kako bi odredila pri kojem razrjeđenju je kit najosjetljiviji. Testirali smo razrjeđenje od 250, 500, 750, 1000x i, temeljem dobivene standardne krivulje, odlučili da je 600x razrjeđenje najbolje za analizu pomoću ovog kita. Svi su homogenizirani uzorci razrijeđeni u otopini za razrjeđenje dobivenoj od strane proizvođača kompleta za izolaciju serotonina. Konačno razrjeđenje uzoraka bilo je 2400x.

Razine serotonina u homogeniziranom tkivu cerebralnih ganglija odredila sam pomoću visoko osjetljivog Serotonin ELISA kit-a (Demeditec diagnostics). Nakon pripreme reagensa prema uputama kompleta za kvantifikaciju serotonina, standardi, kontrole i uzorci se aciliraju. Zatim slijedi detekcija serotonina pomoću mikrotitarskih pločica na sljedeći način: u jažice mikrotitarske pločice pipetira se po 100 µl aciliranih standarda, kontrola i uzoraka, a zatim se u sve jažice dodaje po 25 µl serotonin antiseruma. Nakon inkubacije i ispiranja pločice, u jažice se dodaje po 100 µl konjugata (kozji anti-zečji imunoglobulini konjugirani peroksidazom), te nakon ponovne inkubacije i ispiranja, dodaje se supstrat (tetra-metil-benzidin). Ponovno se inkubira pa u svaku jažicu dodaje stop otopina. Promjena boje u jažicama očitava se spektrofotometrijski, apsorbancija se očitava na 450 nm i uspoređuje s standardnom krivuljom čime se određuje koncentracija serotonina u uzorcima.

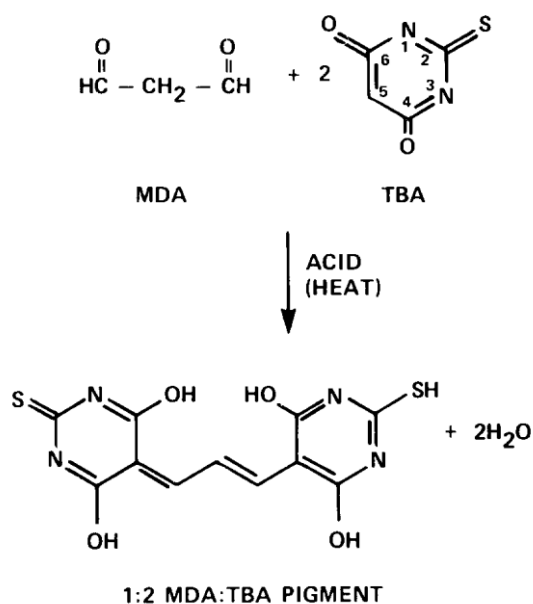
3.6. Analiza razine glukoze u hemolimfi

Koncentracija glukoze u hemolimfi određena je u suradnji s Veterinarskim fakultetom. Dr. sc. Blanka Beer-Ljubić odredila je koncentraciju iz odmrznute heparinske plazme na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, Njemačka) reagensima tvrtke Abbott.

3.7. Lipidna peroksidacija

Kao pokazatelj intenziteta lipidne peroksidacije koristila sam metodu određivanja koncentracije malondialdehida (MDA) u tkivu hepatopankreasa raka. Metoda se temelji na reakciji malondialdehida nastalog lipidnom peroksidacijom s tiobarbituratnom kiselinom

(TBA), pri niskom pH i visokoj temperaturi, čime nastaje obojeni kompleks MDA-(TBA)₂ (Slika 6) i čija se apsorbancija očitava spektrofotometrijski pri 532 nm (Janero, 1990).



Slika 6. Reakcija malondialdehida i tiobarbituratne kiseline (preuzeto iz: Janero, 1990).

Po 200 mg tkiva izvagala sam u Eppendorf epruvete, u svaku dodala kuglicu za homogenizaciju i homogenizirala uzorke 1 min na 30 Hz. Na uzorke sam dodala 1ml pufera, te još jednom ponovila postupak homogenizacije. Uzorke sam zatim centrifugirala 15 min na 20 000 g, pretila u čiste Eppendorf epruvete i dodala još 1 ml pufera.

U staklene semimikroeprovete pipetirala sam 300 μ l supernatanta i dodala 700 μ l 10%-tne trikloroctene kiseline (TCA). Izradila sam i slijepu probu: 300 μ l pufera + 700 μ l 10%-tne trikloroctene kiseline. Sve uzorke centrifugirala sam 3 min na 3000 g pa dodala 600 μ l 0,67%-tne tiobarbituratne kiseline (TBA). Sve uzorke i slijepu probu zagrijavala sam u sušioniku na 95 °C 30 min te ih nakon toga brzo ohladila u vodenoj kupelji. Apsorbanciju uzoraka mjerila sam spektrofotometrom pri valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija malondialdehida izražena je u nmol/g svježe tvari, uz ekstinkcijski koeficijent $\epsilon_{532} = 156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.8. Statistička obrada podataka

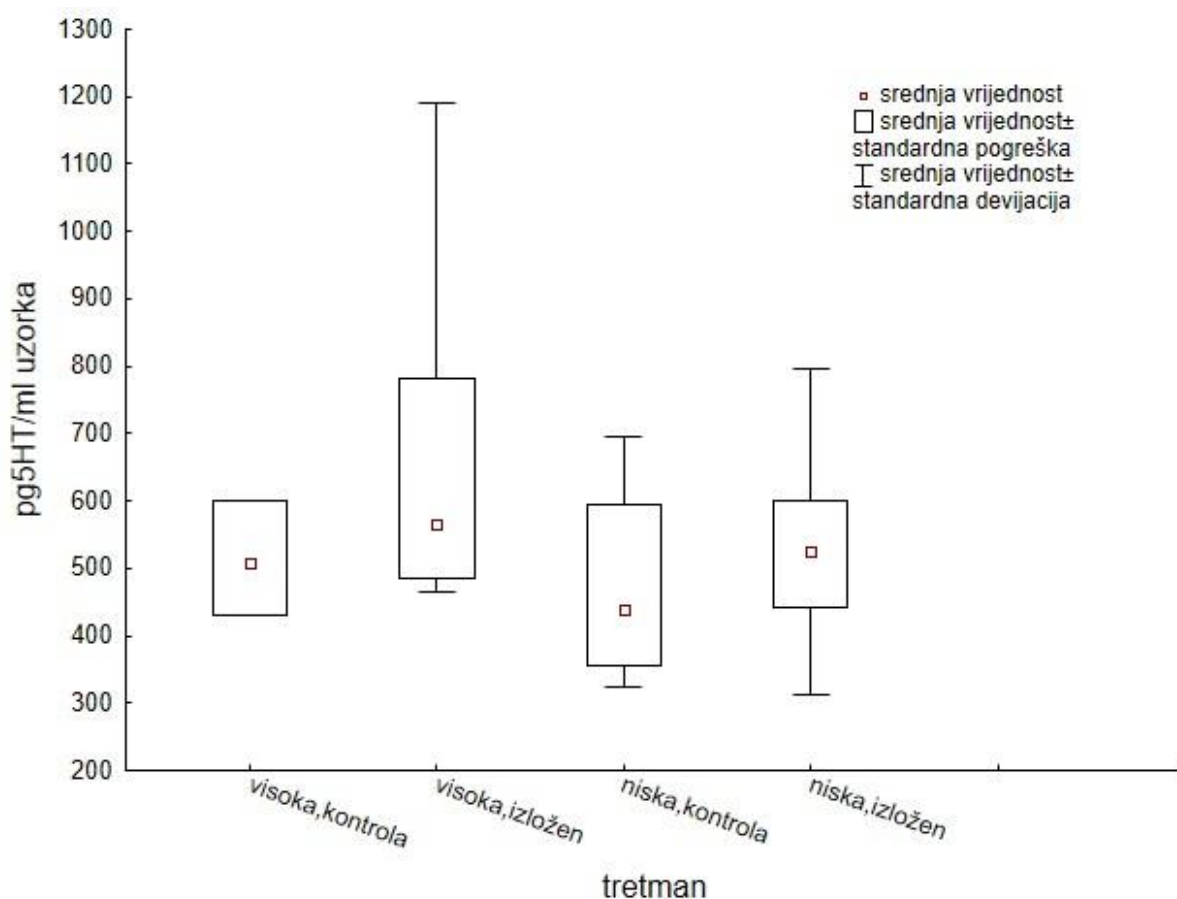
Statističku analizu podataka provela sam koristeći Excel program iz Microsoft Office paketa i program Statistica (TIBCO Software Inc., SAD). Rezultate svih izmjerenih parametara izloženih jedinki usporedila sam s rezultatima kontrolnih grupa. Shapiro-Wilk testom provjerila sam normalnost raspodjele podataka za sve mjerene parametre. Ovisno o tome je li raspodjela normalna ili nije, koriste se parametrijske ili neparametrijske metode analize varijance. Zbog malog broja uzoraka za svaku pojedinu koncentraciju spoja, distribucija podataka nije bila normalna te sam koristila isključivo neparametrijsku analizu varijance, Mann-Whitney U test. Statistički značajnim rezultatima smatramo one koji se razlikuju na razini značajnosti $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1. Koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima

8 signalnih rakova izlagano je citalopramu u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/L}$ i 8 rakova koncentraciji od 50 $\mu\text{g/L}$ kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija serotonina u tkivima cerebralnih ganglija, i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

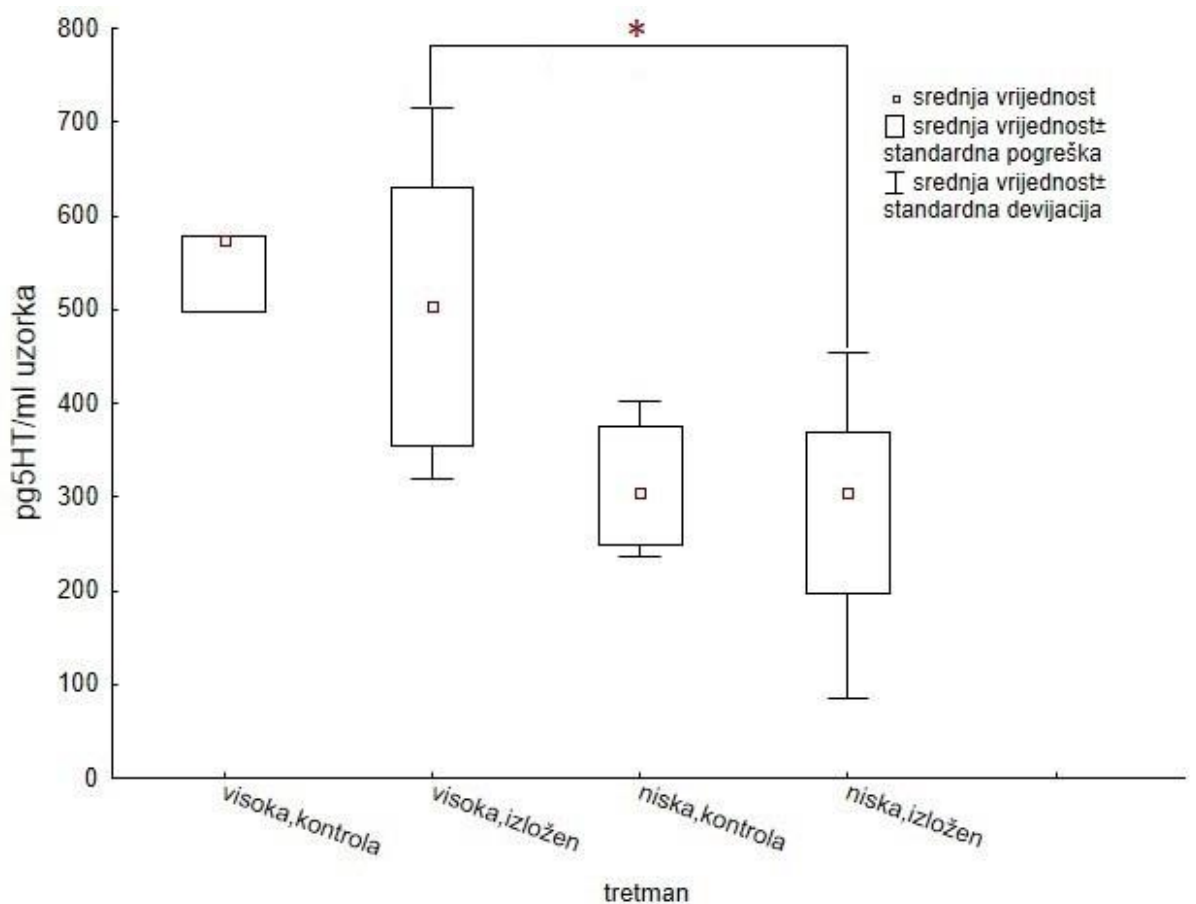
Na slici 7 vidljivo je kako se koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima rakova izloženih visokim i niskim koncentracijama citaloprama u odnosu na kontrolne grupe statistički značajno ne razlikuje. Isto tako, ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji serotonina između rakova izloženih niskoj i visokoj koncentraciji citaloprama.



Slika 7. Koncentracija serotonina (pg 5HT/ml) u cerebralnim ganglijima signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih citalopramu tijekom 7 dana u niskoj (1 $\mu\text{g/L}$) i visokoj (50 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

8 signalnih rakova izlagano je nortriptilinu u koncentraciji od 50 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 50 $\mu\text{g/L}$ kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija serotonina u tkivima cerebralnih ganglija, i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

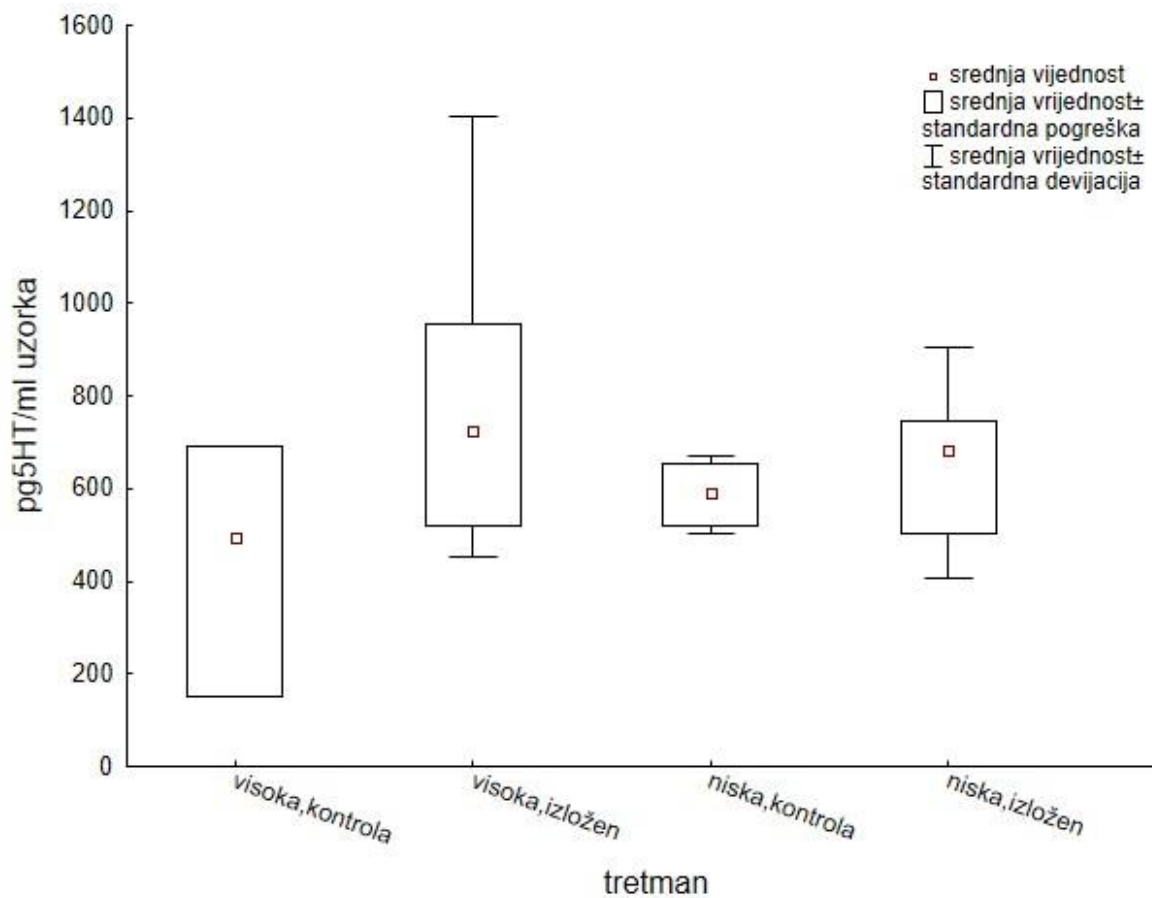
Razlika u koncentraciji serotonina u cerebralnim ganglijima rakova izloženih visokoj i niskoj koncentraciji nortriptilina u odnosu na njihove kontrolne grupe nije značajna (Slika 8). Ipak, zabilježena je značajna razlika u koncentraciji serotonina između jedinki izloženih visokoj i niskoj dozi nortriptilina pri čemu je koncentracija serotonina bila značajno veća kod jedinki izloženih visokim dozama.



Slika 8. Koncentracija serotonina (pg 5 HT/ml) u cerebralnim ganglijima signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih nortriptilinu tijekom 7 dana u niskoj (50 ng/L) i visokoj (50 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

8 signalnih rakova izlagano je amfetaminu u koncentraciji od 20 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 100 $\mu\text{g/L}$ kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija serotonina u tkivima cerebralnih ganglija, i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

Na slici 9 vidljivo je kako se koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima rakova izloženih visokim i niskim koncentracijama citaloprama u odnosu na kontrolne grupe statistički značajno ne razlikuje. Isto tako, ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji serotonina između rakova izloženih niskoj i visokoj koncentraciji amfetamina.

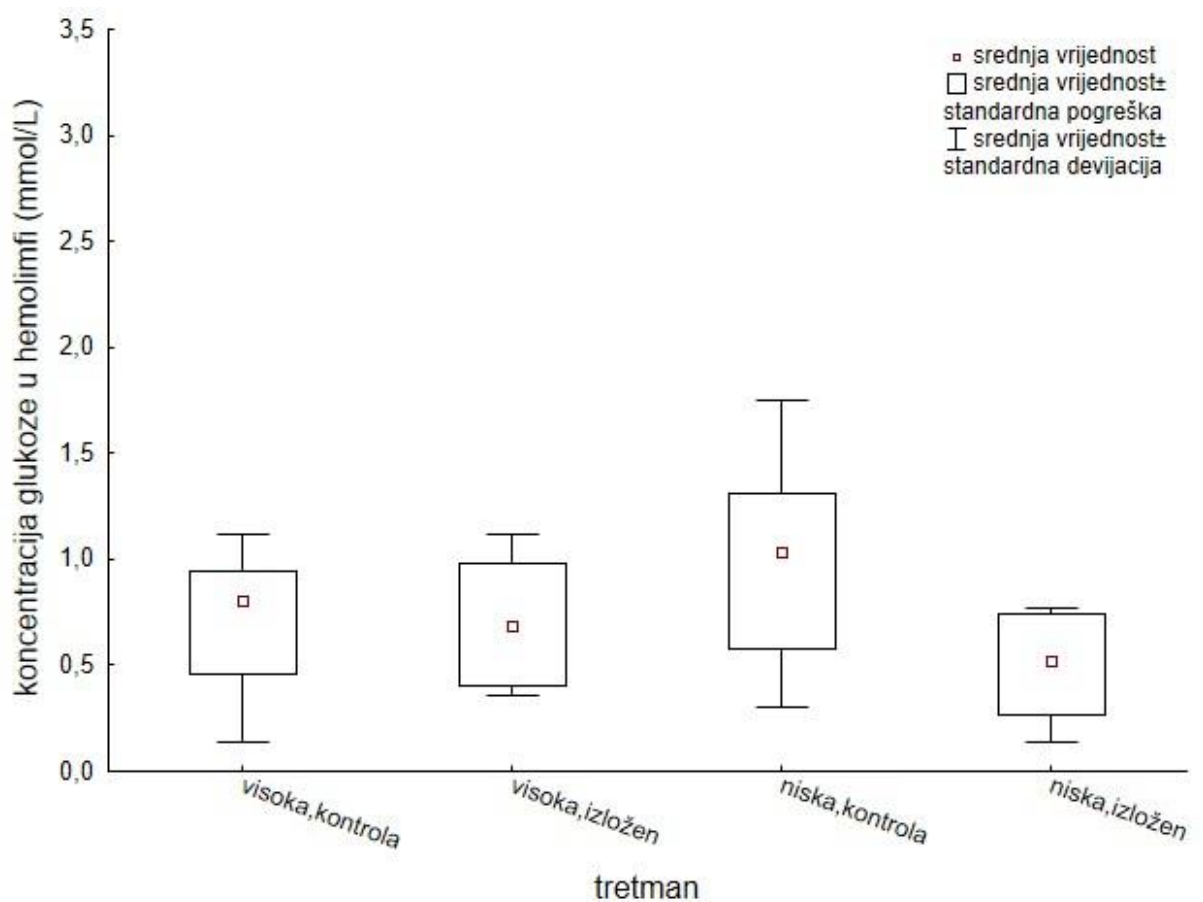


Slika 9. Koncentracija serotonina (pg 5 HT/ml) u cerebralnim ganglijima signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih amfetaminu tijekom 7 dana u niskoj (20 ng/L) i visokoj (100 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

4.2. Koncentracija glukoze u hemolimfi

8 signalnih rakova izlagano je citalopramu u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/L}$ i 8 rakova koncentraciji od 50 $\mu\text{g/L}$ kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija glukoze u hemolimfi i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

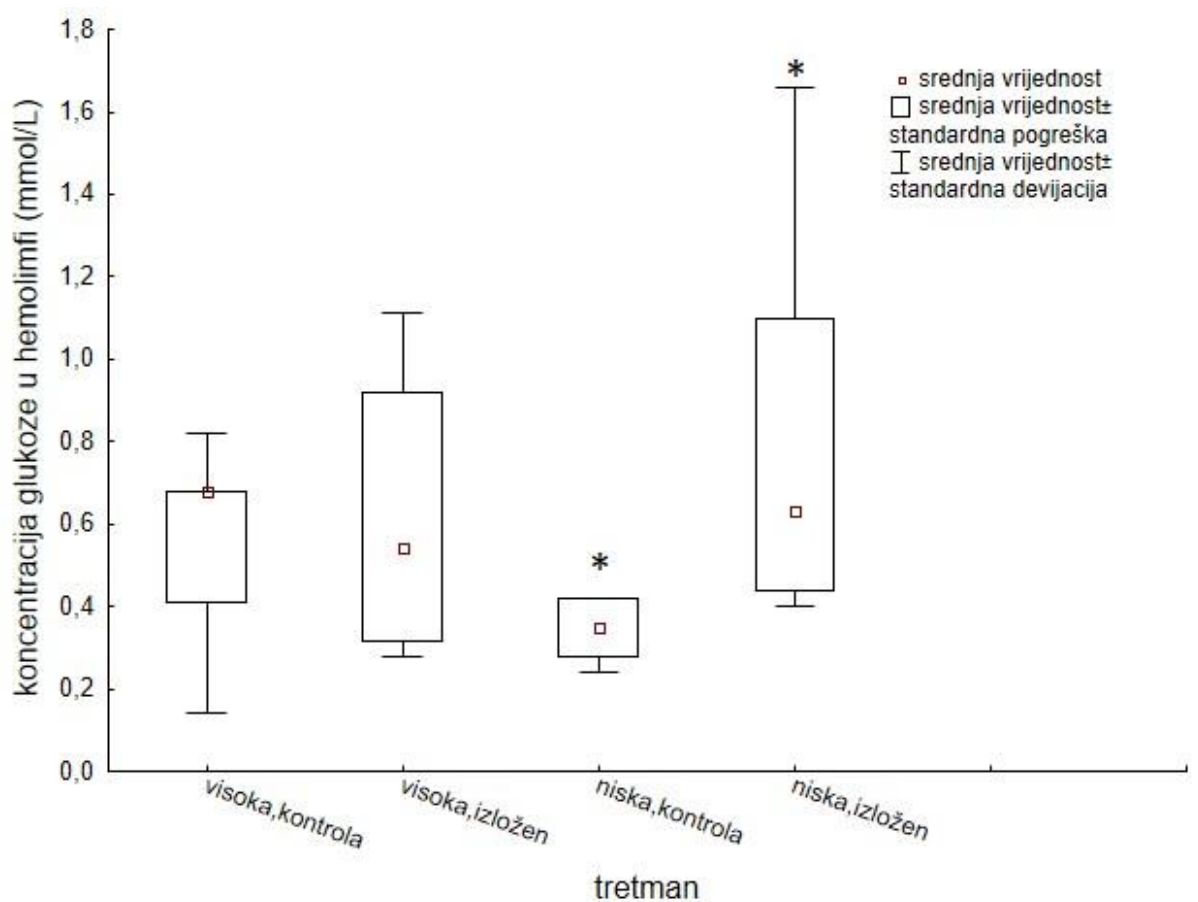
Na slici 10 vidljivo je kako se koncentracija glukoze u hemolimfi rakova izloženih niskim i visokim koncentracijama citaloprama nije statistički značajno razlikovala od kontrolnih skupina. Isto tako nije bilo razlike između koncentracije glukoze u hemolimfi rakova izloženih niskim i visokim koncentracijama citaloprama.



Slika 10. Koncentracija glukoze (mmol/L) u hemolimfi signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih citalopramu tijekom 7 dana u niskoj (1 $\mu\text{g/L}$) i visokoj (50 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

8 signalnih rakova izlagano je nortriptilinu u koncentraciji od 50 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 50 μ g/L kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija glukoze u hemolimfi i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

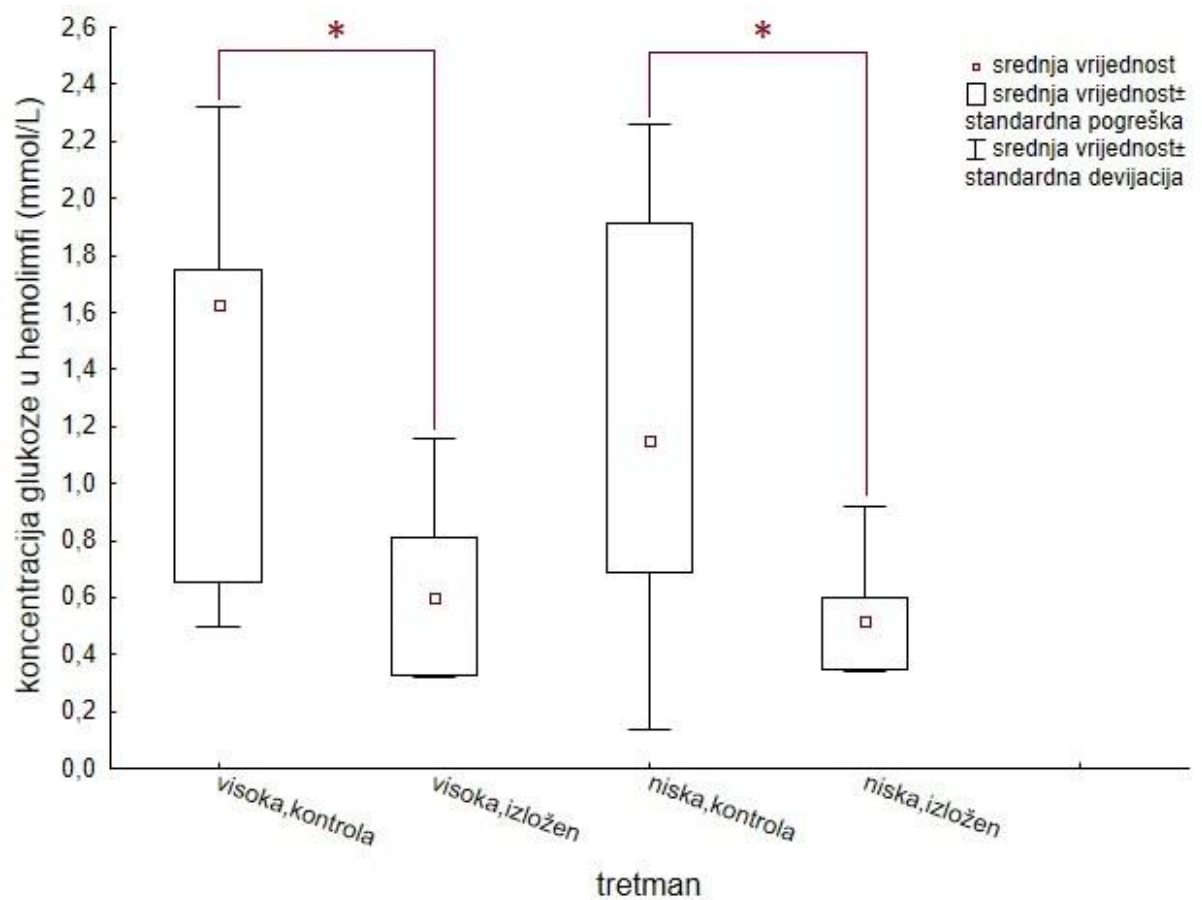
Koncentracija glukoze u hemolimfi jedinki izloženih visokim koncentracijama nortriptilina nije se razlikovala značajno od kontrolne skupine. Statistički značajna razlika postojala je između jedinki izloženih niskoj koncentraciji nortriptilina i kontrolne skupine. Izložene jedinice imale su statistički značajno povišenu razinu glukoze u hemolimfi (Slika 11).



Slika 11. Koncentracija glukoze (mmol/L) u hemolimfi signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih nortriptilinu tijekom 7 dana u niskoj (50 ng/L) i visokoj (50 μ g/L) koncentraciji i u kontrolnim grupama. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

8 signalnih rakova izlagano je amfetaminu u koncentraciji od 20 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 100 µg/L kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija glukoze u hemolimfi i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

Koncentracija glukoze u hemolimfi značajno se razlikovala između izloženih skupina i njihovih kontrolnih grupa, i kod niske i visoke koncentracije amfetamina (Slika 12). Pri obje koncentracije amfetamina, razina je glukoze značajno smanjena kod izloženih skupina.

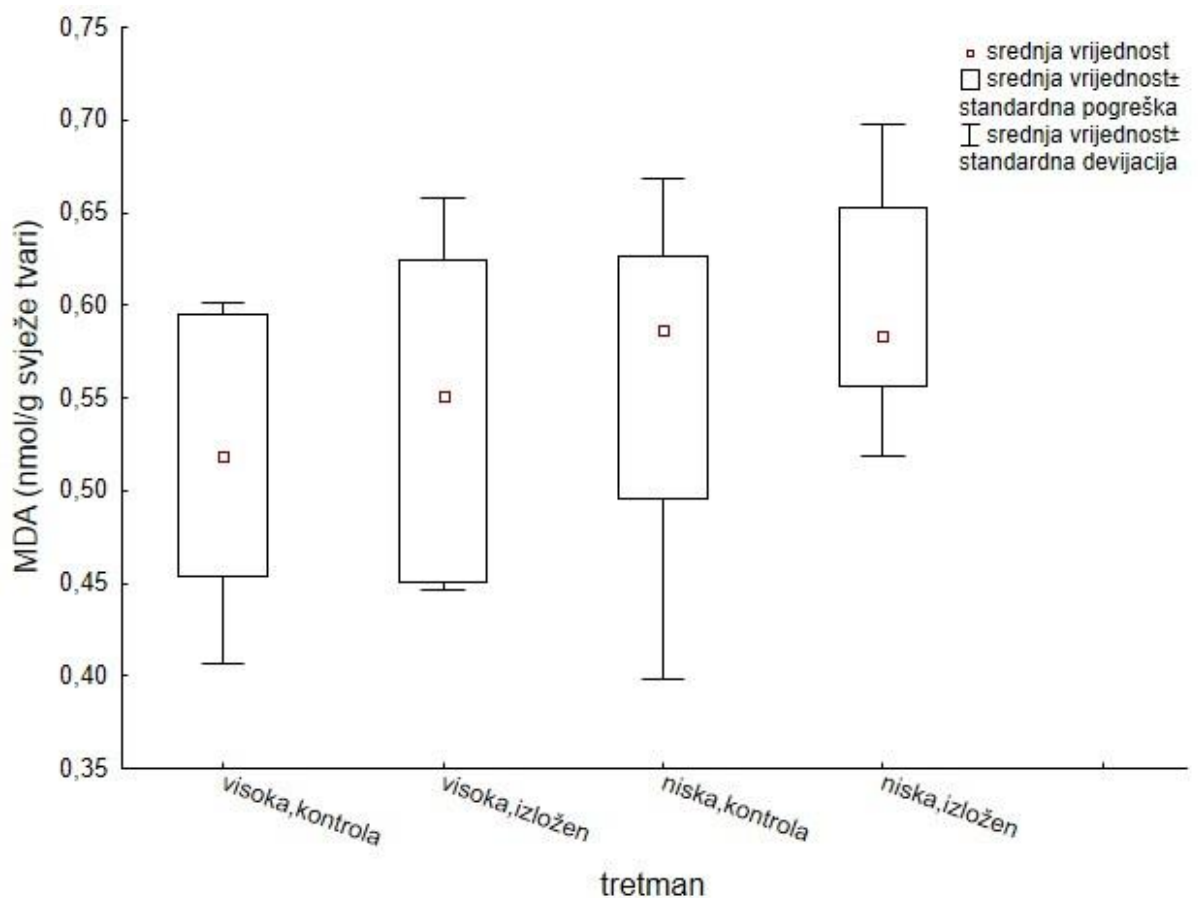


Slika 12. Koncentracija glukoze (mmol/L) u hemolimfi signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih amfetaminu tijekom 7 dana u niskoj (20 ng/L) i visokoj (100 µg/L) koncentraciji i u kontrolnim grupama. Stupci označeni zvjezdicom statistički se značajno razlikuju ($p < 0,05$).

4.3. Stupanj lipidne peroksidacije

8 signalnih rakova izlagano je citalopramu u koncentraciji od 1 $\mu\text{g/L}$ i 8 rakova koncentraciji od 50 $\mu\text{g/L}$ kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija malondialdehida u tkivima hepatopankreasa i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

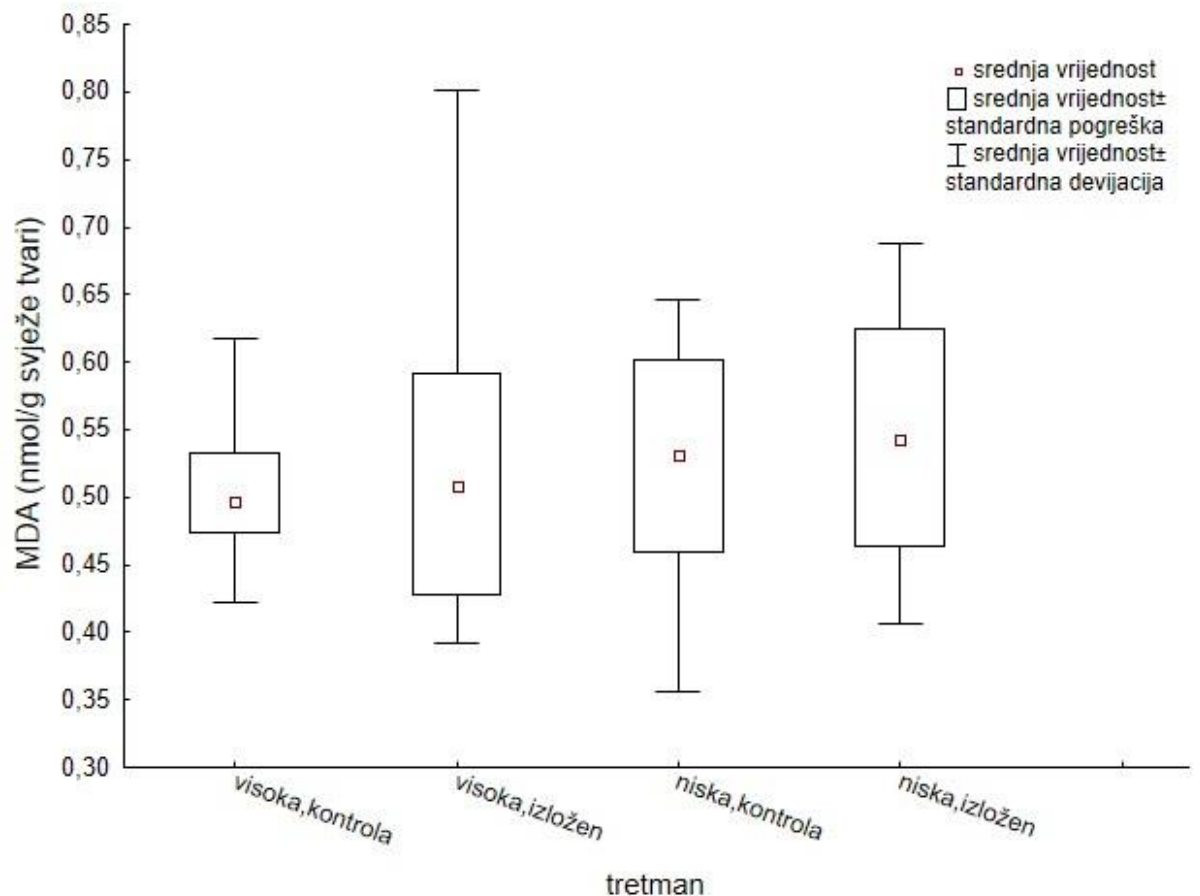
Koncentracija malondialdehida u tkivu hepatopankreasa nije bila značajno različita između jedinki izloženih visokim i niskim koncentracijama citaloprama i njihovih kontrolnih skupina (Slika 13).



Slika 13. Koncentracija malondialdehida (nm/g) u uzorcima hepatopankreasa signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih citalopramu tijekom 7 dana u niskoj (1 $\mu\text{g/L}$) i visokoj (50 $\mu\text{g/L}$) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

8 signalnih rakova izlagano je nortriptilinu u koncentraciji od 50 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 50 µg/L kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija malondialdehida u tkivima hepatopankreasa i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

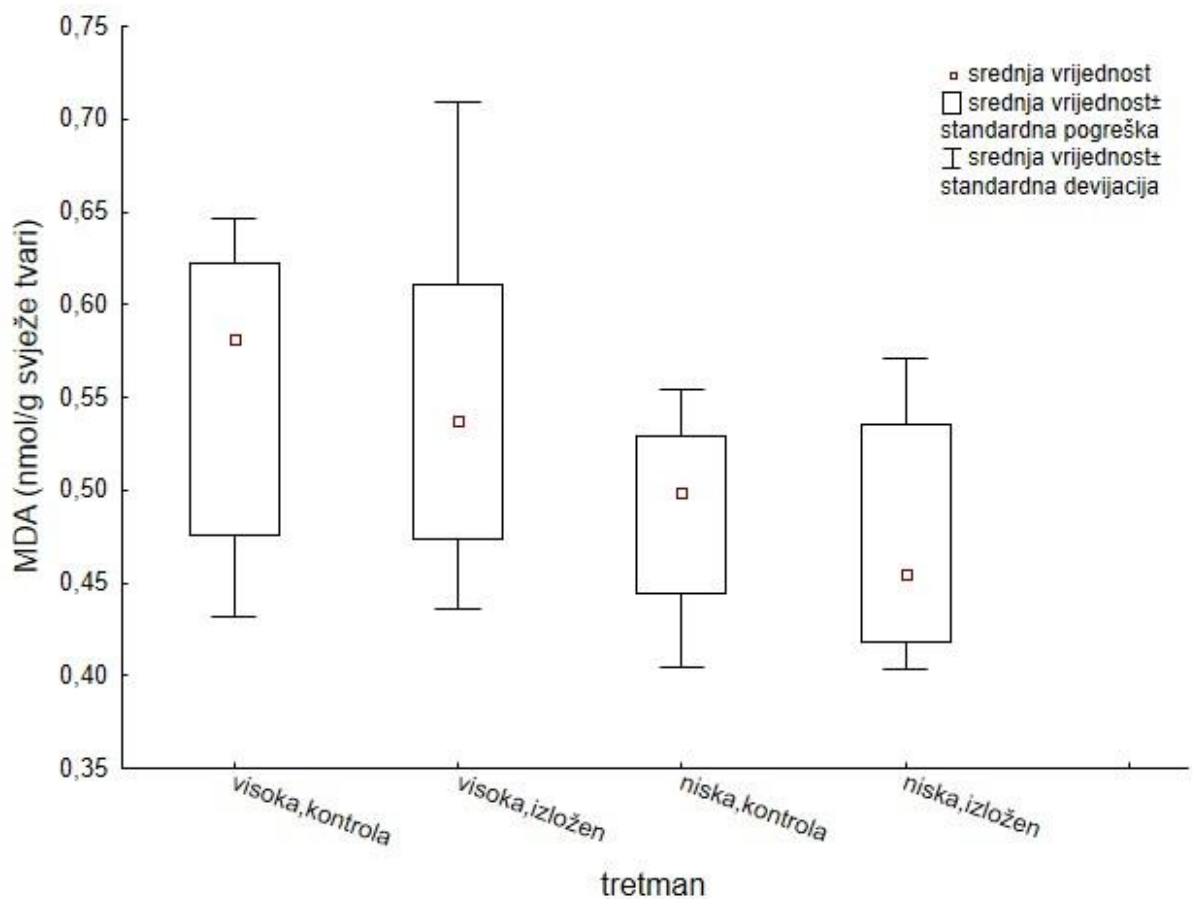
Na slici 14 prikazano je kako se koncentracija MDA u tkivu hepatopankreasa raka nije značajno razlikovala između skupina izloženi visokim i niskim koncentracijama nortriptilina i njihovih kontrolnih grupa.



Slika 14. Koncentracija malondialdehida (nm/g) u uzorcima hepatopankreasa signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih nortriptilinu tijekom 7 dana u niskoj (50 ng/L) i visokoj (50 µg/L) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

8 signalnih rakova izlagano je amfetaminu u koncentraciji od 20 ng/L i 8 rakova koncentraciji od 100 µg/L kroz 7 dana. Analizirana je koncentracija malondialdehida u tkivima hepatopankreasa i uspoređena s rezultatima kontrolnih grupa koje nisu bile izložene.

Izlaganje rakova niskim i visokim dozama amfetamina nije uzrokovalo statistički značajne razlike u količini MDA u odnosu na kontrolne grupe (Slika 15).



Slika 15. Koncentracija malondialdehida (nm/g) u uzorcima hepatopankreasa signalnih rakova (*Pacifastacus leniusculus*) izloženih amfetaminu tijekom 7 dana u niskoj (20 ng/L) i visokoj (100 µg/L) koncentraciji i u kontrolnim grupama.

5. Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj antidepresiva citaloprama i nortriptilina i opojne droge amfetamina na određene fiziološke pokazatelje u signalnog raka: razinu glukoze u hemolimfi, razinu serotonina u cerebralnim ganglijima i intenzitet oksidativnog stresa. Ne postoji puno podataka o utjecaju navedenih spojeva na deseteronožne rakove. Ranija istraživanja na slatkovodnim rakovima uglavnom su usmjerena na promjene u ponašanju (Burič i sur. 2018; Ložek i sur. 2019). Isto tako, podaci koji postoje većinom se odnose na puno veće koncentracije spojeva od okolišno relevantnih te su rakovi često direktno inicirani spojevima, a ne izloženi kroz vodu. U ovom istraživanju uspjeli smo utvrditi značajne utjecaje odabranih farmaceutika na neke fiziološke pokazatelje čak i u okolišnim koncentracijama. Ranija istraživanja koja su koristila okolišno relevantne koncentracije farmaceutika bila su usmjerena na parametre ponašanja, te u radu Ložek i sur. 2019. na otkucaje srca kao pokazatelj stresa, ali sustavno praćenje većeg broja fizioloških pokazatelja do sad nije rađeno.

5.2. Koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima

Citalopram i nortriptilin su antidepresivi koji djeluju na metabolizam serotonina tako da mu povećavaju količinu u sinapsama, zbog čega smo očekivali povišene razine serotonina u tkivu cerebralnih ganglija u odnosu na kontrolne grupe (Šagud, 2002).

Rakovi izloženi citalopramu koji spada u SSRI (selektivni inhibitor ponovne pohrane serotonina) skupinu antidepresiva imali su lagano povišenu razinu serotonina u odnosu na kontrolne grupe i na višoj i nižoj koncentraciji, ali razlike nisu statistički značajne. Utjecaj citaloprama na razinu serotonina potencijalno bi se mogao dokazati duljim izlaganjem.

Nortriptilin, triciklički antidepresiv, isto tako nije uzrokovao povišenje razina serotonina izloženih jedinki u odnosu na odgovarajuće kontrolne grupe. Statistički značajna razlika u koncentraciji serotonina vidljiva je između jedinki izloženih visokim koncentracijama nortriptilina i između rakova izloženih niskoj, okolišnoj koncentraciji nortriptilina: rakovi izloženi višoj koncentraciji imaju više razine serotonina u tkivu cerebralnih ganglija.

Koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima rakova izloženih visokoj i niskoj koncentraciji amfetamina blago je povišena u odnosu na kontrolne grupe, ali ta razlika nije značajna. Kao što je već spomenuto, amfetamin primarno djeluje na metabolizam dopamina, a djelovanje na serotoninske receptore u rakova nije dokazano, pa nedostatak značajnog rezultata ne iznenađuje (Daberkow i sur. 2013).

5.1. Koncentracija glukoze u hemolimfi

Koncentracija glukoze u hemolimfi regulirana je hiperglikemijskim hormonom (cHH) sintetiziranim u x-organu. Otpuštanje cHH iz neuroendokrinih tkiva regulira serotonin. Izlaganje rakova stresu u okolišu, u ovom slučaju antidepresivima i amfetaminu, trebalo bi uzrokovati povećanje razina serotonina koje bi onda trebale uzrokovati pojačano otpuštanje cHH i dovesti do povišene razine glukoze u hemolimfi (Lorenzon i sur. 2005).

Rezultati istraživanja pokazali su da izlaganje citalopramu u niskoj i visokoj koncentraciji nije imalo utjecaj na razinu glukoze u hemolimfi što je i očekivano jer isto tako nisam zabilježila ni povećanje razine serotonina. Nortriptilin u niskoj koncentraciji (50 ng/L) uzrokovao je povišenu razinu glukoze u hemolimfi izloženih jedinki u odnosu na njihovu kontrolnu skupinu koja nije bila izložena. Zanimljivo je da viša koncentracija nortriptilina (50 µg/L) nije pokazala isti trend. Potencijalno objašnjenje je kako određeni lijekovi kod optimalne koncentracije izazivaju željeni utjecaj, a kod nižih ili viših koncentracija ne djeluju na željeni način. Tako Linares i sur. u radu iz 2019. pokazuju da doza kanabidiola (CBD) od 300 mg smanjuje anksioznost kod javnog govora, a doze od 150 mg i 600 mg ne pokazuju takav učinak.

Amfetamin je značajno utjecao na razinu glukoze u hemolimfi, i to suprotno očekivanjima, razine glukoze u hemolimfi bile su značajno manje kod jedinki izloženih višoj i nižoj koncentraciji amfetamina naspram kontrola. Amfetamin djeluje na metabolizam dopamina tako da mu povisuje razine u sinapsama. Djelovanje amfetamina moguće je i na serotoninske receptore, ali dokazano je samo za sisavce, kod rakova ne postoje dokazi (Daberkow i sur. 2013). Rezultati utjecaja dopamina na razine glukoze su oprečni, u

istraživanju Zou i sur. 2003. injekcije dopamina su uzrokovale povišenje razine glukoze u hemolimfi deseteronožnog raka *Procambarus clarkii*, dok je prije provedeno istraživanje na istom organizmu (Sarojini i sur. 1995) pokazalo da injekcije dopamina u raka uzrokuju hipoglikemiju. Potrebno je naglasiti da je u prijašnjim istraživanjima amfetamin bio unesen u rakove injekcijski, dok je naše istraživanje nastojalo prikazati realne uvjete u kojima bi rak bio izložen farmaceuticima putem vode u kojoj živi.

Moguć razlog smanjenja razine glukoze kod izloženih rakova je povećanje aktivnosti uzrokovano amfetaminom. U paralelnom istraživanju utjecaja farmaceutika na ponašanje rakova dokazano je kako su rakovi izloženi amfetaminu značajno više vremena provodili u kretanju (Tarandek i sur. 2019). Smanjenje razine glukoze u hemolimfi vjerojatno je posljedica povećane aktivnosti izloženih životinja.

5.3. Stupanj lipidne peroksidacije

Mjerila sam razinu biomarkera oksidativnog stresa (MDA) u tkivu hepatopankreasa kako bih utvrdila mogu li farmaceutici, koji za ne-ciljane organizme rakove predstavljaju zagađenje i stres u okolišu, uzrokovati oksidativni stres. Ni jedan od istraživanih spojeva, u visokoj ili niskoj koncentraciji nije uzrokovao oksidativni stres te izmjerene razine MDA nisu bile statistički značajno različite od onih kontrolnih grupa.

Henry i sur. 2004. zabilježili su toksično djelovanje 5 SSRI antidepressiva (fluoksetin, fluvoxamin, paroxetin, sertalin i citalopram) na vrstu *Ceriodaphnia dubia* u koncentracijama od 0,12 do 3,9 mg/L, a najmanje toksično djelovanje pokazao je citalopram. Navedene koncentracije su i do 78 puta veće od korištenih u ovom istraživanju i veće od koncentracija koje se pojavljuju u okolišu. Zbog toga postoji mogućnost da bismo mogli dokazati da farmaceutici u okolišu uzrokuju oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima koristeći veće koncentracije spojeva za istraživanje, ali to onda ne bi odgovaralo realnoj situaciji u okolišu. Također, naš je cilj bio ispitati mogu li okolišno relevantne i terapijske doze za ljude uzrokovati oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima i pokazalo se da to nije slučaj.

Isto tako, Tierney i sur. 2016. u svojem istraživanju dokazali su utjecaj izlaganja fluoksetinu putem vode na fiziologiju, konkretno stopu rasta deseteronožnog raka *Oronectes rusticus* tek pri koncentraciji od 500 µg/L, koja je također 10 puta veća od koncentracija korištenih u ovom istraživanju.

U budućim istraživanjima potrebno je produžiti vrijeme izlaganja rakova spojevima, te povećati uzorak za svaki pojedini spoj i koncentraciju, kao i istražiti utjecaj na ostale hormone regulirane fiziološke parametre kao što su rast i razmnožavanje kako bismo dobili potpunu sliku o utjecaju okolišno relevantnih doza farmaceutika na fiziologiju signalnog raka.

6. Zaključak

- Kod signalnih rakova izloženih visokoj koncentraciji (50 µg/L) tricikličkog antidepressiva nortriptilina kroz 7 dana, zabilježila sam statistički značajno povišenje koncentracije serotonina u cerebralnim ganglijima u odnosu na grupu izloženu niskoj koncentraciji (50 ng/L).
- Kod rakova izloženih okolišno relevantnoj koncentraciji nortriptilina (50 ng/L) zabilježila sam povišenje razine glukoze u hemolimfi u odnosu na kontrolne grupe.
- Suprotno očekivanjima, izlaganje amfetaminu u niskoj (20 ng/L) i visokoj (100 µg/L) koncentraciji snizilo je razine glukoze u hemolimfi u odnosu na kontrolne grupe. Moguć razlog je povećanje razine dopamina u sinapsama što uzrokuje pojačano kretanje i aktivnost rakova i za posljedicu ima smanjenje razine glukoze u hemolimfi.
- Izlaganje okolišno relevantnoj dozi farmaceutika nije prouzročilo oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima-rakovima.

7. Literatura

Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal* **5**, 9-19

Brodin T., Piovano S., Fick J., Klaminder J., Heynen M., Jonsson M. 2014. Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems—impacts through behavioural alterations. *Philosophical Transactions of The Royal Society Biological Sciences* **369**

Burič M., Grabicová K., Kubec J., Koubal A., Kuklina I., Kozák P., Grabic R., Randák T. 2018. Environmentally relevant concentrations of tramadol and citalopram alter behaviour of an aquatic invertebrate. *Aquatic Toxicology* **200**, 226-232

Daberkow D. P., Brown H. D., Bunner K. D., Kraniotis S. A., Doellman M. A., Ragozzino M. E., Garris P. A., Roitman M. F. 2013. Amphetamine Paradoxically Augments Exocytotic Dopamine Release and Phasic Dopamine Signals. *Journal of neuroscience* **33**, 452-463

Ford A. T., Fong P. P. 2016. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **35**, 794-798

Garris P. A., Roitman M. F. 2013. Amphetamine paradoxically augments exocytotic dopamine release and phasic dopamine signals. *Journal of Neuroscience* **33**, 452-463

Goessmann C., Hemelrijk C., Huber R. 2000. The Formation and Maintenance of Crayfish Hierarchies: Behavioral and Self-Structuring Properties. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **48**, 418-428

Gutteridge J.M.C. 1995. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical chemistry* **41**, 1819-1828

Henry T. B., Kwon J-W., Armbrust K.L., Black M. C. 2004. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 2229–2233

- Hudina S., Kutleša P., Trgovčić K., Duplić A. 2017. Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. *Aquatic Invasions* **12**, 67–75
- Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. 2013. Recent invasion of the karstic river system in Croatia through illegal introductions of the signal crayfish. *Freshwater crayfish* **19**, 21-27
- Hudina S., Faller M., Lucić A., Klobučar G., Maguire I. 2009. Distribution and dispersal of two invasive crayfish species in the Drava River basin, Croatia. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **394-395**, 09
- Janero D. R. 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine* **9**, 515-540
- Kouba A., Petrusek A., Kozák P. 2014. Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* **413**, 05
- Kummerer K. 2010. Pharmaceuticals in the Environment. *Annual Review of Environment and Resources* **35**, 57-75
- Lazzara R.; Blazquez M.; Porte C.; Barata C. 2012. Low environmental levels of fluoxetine induce spawning and changes in endogenous estradiol levels in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Toxicology* **106–107**, 123–130
- Linares I. M., Zuardi A.W. Pereira L.C., Queiroz R.H., Mechoulam R., Guimaraes F.S., Crippa J.A. 2019. Cannabidiol presents an inverted U-shaped dose-response curve in a simulated public speaking test. *Brazilian Journal of Psychiatry* **41**, 9–14
- Lorenzon S., Edomi P., Giulianini P.G., Mettullo R., Ferrero E.A. 2005. Role of biogenic amines and cHH in the crustacean hyperglycemic stress response. *The Journal of Experimental Biology* **208**, 3341-3347
- Ložek F., Kuklina I., Grabicová K., Kubec J., Buřič M., Grabic R., Randák T., Císař P., Kozák P. 2019. Behaviour and cardiac response to stress in signal crayfish exposed to environmental concentrations of tramadol. *Aquatic Toxicology* **213**, 105217

- Maguire, I., Gottstein S. 2004. The Distribution Pattern of Freshwater Crayfish in Croatia. *Crustaceana* **77**, 25-47
- Mück-Šeler D., Pivac N. 2011. Serotonin. *Periodicum biologorum* **113**, 29-41
- Pham–Huy L. A., He H., Pham-Huy C. 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International journal of Biomedical science* **4**, 89-96
- RSPCA AU. 2018. Humane killing and processing of crustaceans for human consumption. Rspca.org.au
- Sarojini R., Nagabhushanam R., Fingerman M. 1995. Dopaminergic and enkephalinergic involvement in the regulation of blood glucose in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *General and Comparative Endocrinology* **97**, 160–170
- Sehonova P., Plhalova L., Blahova J., Doubkova V., Marsalek P., Prokes M., Tichy F., Skladana M., Fiorino E., Mikula P., Vecerek V., Faggio C., Svobodova Z. 2017. Effects of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* **185**, 1072-1080
- Sosa M. A., Spitzer N., Edwards D.H., Baro D. J. 2004. A Crustacean Serotonin Receptor: Cloning and Distribution in the Thoracic Ganglia of Crayfish and Freshwater Prawn. *The journal of comparative neurology* **473**, 526–537
- Šagud M. Mihaljević-Peješ A., Jakovljević M. 2002. Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina. *Medicus* **11**, 165-170
- Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. 2007. Lipidna peroksidacija-uzroci i posljedice. *Medicina* **43**, 84-93
- Tarandek A., Topić M., Krsnik J., Razić M., Klobučar G., Martinović-Weigelt D., Hudina S. The effects of three psychoactive compounds on behavior of the invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). 3. Simpozij o biologiji slatkih voda, Zagreb 15.02.2019.
- Taylor C., Fricker A. D., Devi L. A., Gomes I. 2005. Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell signal* **17**, 549–557

Tierney A. J., Hanzlik K.N., Hathaway R.M., Powers C., Roy M. 2016. Effects of fluoxetine on growth and behavior in the crayfish *Orconectes rusticus*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, **49:2**, 133-145

Weinberger J., Klaper R. 2014. Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic toxicology* **151**, 77-83

Zou H-S., Juan C-C., Chen S-C., Wang H-Y., Lee C-Y. 2003. Dopaminergic Regulation of Crustacean Hyperglycemic Hormone and Glucose Levels in the Hemolymph of the Crayfish *Procambarus clarkii*. *Journal of experimental zoology* **298**, 44–52

Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekta Utjecaj zagađenja na invazivni uspjeh strane vrste slatkovodnog raka, financiranog od strane Fonda Jedinstvo uz pomoć znanja (UKF): *My First Collaboration Grant*

8. Životopis

OBRAZOVANJE

- 2017.- trenutno **Magistra struke znanosti o okolišu** (očekivan datum diplome: rujan 2019.)
Prirodoslovno- matematički fakultet, Zagreb
- 2014.- 2017. **Sveučilišna prvostupnica struke znanosti o okolišu**
Završni rad: Helicikultura-uzgoj kopnenih puževa (Mollusca, Gastropoda)
Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb
- 2010.- 2014. **Farmaceutska tehničarka**
Zdravstveno učilište, Zagreb

RADNO ISKUSTVO

Radno mjesto: **Prodavačica**

- Rad na blagajni
- Savjetovanje kupaca

Poslodavac: Yves Rocher, V.I.Z. trgovina d.o.o.

Razdoblje: Travanj 2019.- trenutno

Radno mjesto: **Studentski posao čišćenja**

- Čišćenje poslovnih prostora, stubišta i stanova

Poslodavac: PS Facility Concept, Zagreb

Razdoblje: Rujan 2018.

Radno mjesto: **Arriva promotorica**

- Podjela promotivnih materijala i informiranje o pogodnostima

Poslodavac: Arriva Hrvatska, Zagreb

Razdoblje: Kolovoz 2018.

Radno mjesto: **Animatorica i promotorica**

- Dijeljenje promotivnog materijala i nagrada
- Informiranje o posebnim ponudama
- Kreativna radionica s djecom

Poslodavac: Masterplan d.o.o.

Razdoblje: 31.8 – 10.9. 2017.

STRANI JEZIK

Engleski

RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
SLUŠANJE	ČITANJE	GOVORNA INTERAKCIJA	GOVORNA PRODUKCIJA	
C1	C1	B1	B1	B2

RAČUNALNE VJEŠTINE

- Aktivno korištenje MS Office paketa, poznavanje rada u GIS-u, statistički software Statistica

OSTALE VJEŠTINE

- Komunikacijske vještine stečene poslovima promocija i prodaje, aktivnim sudjelovanjem u manifestaciji Noć biologije i demonstraturom na kolegiju Osnove biologije
- Prezentacijske vještine stečene izlaganjem plakata na 3. Hrvatskom simpoziju o invazivnim vrstama i predavanjem na 3. Simpoziju o biologiji slatkih voda (SOBS)