

Ekspresija gena MAO i COMT u mozgu gušterica vrsta *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*

Zvonar, Sara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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:217:435130>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Sara Zvonar

**Ekspresija gena *MAO* i *COMT* u mozgu
gušterica vrsta *Podarcis sicula* i *Podarcis
melisellensis***

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj je rad izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević, u sklopu HRZZ-ovog projekta “Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja guštera *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR)”. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre eksperimentalne biologije.

Hvala genijalnoj ekipi na najboljem (terenskom) putovanju u mom životu, stvorili ste mi uspomenu koju ću pamtiti čitav život.

Hvala mentorici Sofiji na strpljenju, svemu što mi je pružila i čemu me naučila, zbog Vas sam shvatila da volim ovo što radim.

Hvala Dunji na svom smijehu, ugodno provedenim mjesecima u labosu i neizmjernoj pomoći prilikom ispravljanja rada. Toliko ćeš mi nedostajati da brišem suze (v)atikom!

Veliko hvala Keki, gospodarici izračuna, na svoj fizičkoj i psihičkoj pomoći u labosu i izvan njega. Svatko u životu treba jednu Keku da zapali atmosferu.

I najveće hvala mojoj obitelji i bliskim prijateljima jer sam uz vas svoje studentske dane provela na najljepši mogući način!

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija gena *MAO* i *COMT* u mozgu gušterica vrsta *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*

Sara Zvonar

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Agresivnost kao oblik kompetitivnog ponašanja česta je pojava koja uvelike utječe na odnos između jedinki, populacija i/ili vrsta. Primijećena je i u međusobnom odnosu jedinki vrsta *Podarcis sicula* (primorska gušterica) i *Podarcis melisellensis* (krška gušterica) duž jadranske obale, pri čemu *P. sicula* kao agresivnija vrsta aktivno potiskuje *P. melisellensis*, smanjujući njezin areal. Poznato je da se agresivnost javlja kao rezultat djelovanja određenih neurotransmitera u mozgu - dopamina, serotonina i noradrenalina. Cilj ovog rada je analiza ekspresije gena *MAO* (monoamin oksidaza) i *COMT* (katehol-O-metiltransferaza) koji razgrađuju dopamin i tako mogu djelovati na njegovu koncentraciju u mozgu jedinki vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*. U svrhu istraživanja provedeno je terensko uzorkovanje jedinki na tri lokacije (Pag, Sinj, Knin), njihovo žrtvovanje i pohrana moždanog tkiva iz kojeg je izolirana RNA, dizajn početnica specifičnih za vrstu, reverzna transkripcija (RT-PCR) i kvantitativni PCR (qRT-PCR). Nije pronađena razlika u relativnoj ekspresiji gena *MAO* i *COMT* između istraživanih vrsta.

(35 stranica, 14 slika, 4 tablice, 45 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: agresivnost, dopamin, monoamin oksidaza, katehol-O-metiltransferaza

Voditelj: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Izv. prof. dr. sc. Nataša Bauer

Rad prihvaćen: 31.3.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Expression of *MAO* and *COMT* genes in the brain of *Podarcis sicula* and *Podarcis melisellensis* lizards

Sara Zvonar

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Aggression as a form of competitive behavior is a common occurrence that greatly affects the relationship between individuals, populations and/or species. It has also been noted in the relationship between the species *Podarcis sicula* (coastal lizard) and *Podarcis melisellensis* (karst lizard) along the Adriatic coast, where more aggressive *P. sicula* actively suppresses *P. melisellensis* reducing its living area. It is known that aggression occurs as a result of the action of certain neurotransmitters in the brain - dopamine, serotonin and norepinephrine. The aim of this study was to analyze the expression of *MAO* (monoamine oxidase) and *COMT* (catechol-O-methyltransferase) genes that degrade dopamine therefore affecting dopamine levels in the brain of individuals of species *P. sicula* and *P. melisellensis*. Field sampling of individuals at three locations (Pag, Sinj, Knin) was performed, their sacrifice and storage of brain tissue from which RNA was isolated, species specific primers designed and reverse transcription (RT-PCR) and quantitative PCR (qRT-PCR) performed. No difference in the relative expression of *MAO* and *COMT* genes was found between the studied species.

(35 pages, 14 figures, 4 tables, 45 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: aggression, dopamine, monoamine oxidase, catechol-O-methyltransferase

Supervisor: doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević

Reviewers:

Asst. Prof. Sofia Ana Blažević

Assoc. Prof. Duje Lisičić

Assoc. Prof. Nataša Bauer

Thesis accepted: 31.3.2022.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AAH	alantoin amidohidrolaza
ACTB	β -aktin
ANOVA	analiza varijance (eng. <i>analysis of variance</i>)
BLAST	osnovni alat (algoritam) za pretraživanje lokalnog poravnanja (eng. <i>basic local alignment search tool</i>)
cDNA	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina (eng. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i>)
COMT	katehol-O-metiltransferaza
DA	dopamin
FAD	flavin adenin dinukleotid
DAT	dopaminski transporter (eng. <i>dopamine transporter</i>)
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. <i>high performance liquid chromatography</i>)
IDT	<i>Integrated DNA Technologies</i>
MAO	monoamin oksidaza
MB-COMT	katehol-O-metiltransferaza vezana za membranu (eng. <i>membrane-bound</i>)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (eng. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
NA	noradrenalin
NAT	N-acetiltransferaza
NCBI	Nacionalni centar za biotehnoške informacije (eng. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NTC	kontrola bez uzorka (eng. <i>no template control</i>)
pb	parovi baza
qRT-PCR	lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu/kvantitativna lančana reakcija polimeraze (eng. <i>real-time polymerase chain reaction; quantitative polymerase chain reaction</i>)
RT-PCR	lančana reakcija polimeraze za reverznom transkripcijom (eng. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>)
S-COMT	topljivi citosolni oblik katehol-O-metiltransferaze (eng. <i>soluble</i>)
T _m	temperatura taljenja početnica (eng. <i>melting temperature</i>)
VNTR	varijabilne ponavljajuće sekvence (eng. <i>variable number tandem repeats</i>)
VTA	ventralni tegmentum (eng. <i>ventral tegmental area</i>)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. CILJ RADA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1. Uzorkovanje jedinki	8
3.2. Smještaj i čuvanje jedinki.....	9
3.3. Žrtvovanje.....	10
3.4. Homogenizacija uzoraka	10
3.5. Izolacija RNA	11
3.6. Gel elektroforeza.....	11
3.7. Reverzna transkripcija	11
3.8. Dizajn početnica za qRT-PCR.....	12
3.9. Određivanje optimalne temperature hibridizacije početnica i koncentracije cDNA	13
3.10. qRT-PCR uzoraka cDNA gušterica	16
3.11. Relativna ekspresija gena <i>MAO</i> i <i>COMT</i>	16
4. REZULTATI.....	18
4.1. Izolacija RNA	18
4.2. Određivanje optimalne temperature hibridizacije početnica i koncentracije cDNA	18
4.3. Relativna ekspresija gena <i>MAO</i> i <i>COMT</i>	21
5. RASPRAVA	24
6. ZAKLJUČAK	28
7. LITERATURA.....	29
8. ŽIVOTOPIS	
9. PRILOG – PROTOKOLI I TABLICE	35

1. UVOD

Agresivnost i kompetitivnost dva su pojma koja se zbog česte istovremene prisutnosti redovito poistovjećuju. Bez obzira na tu povezanost, agresivnost je tek jedan od različitih oblika kompetitivnog ponašanja (Montagu, 2016). Samo kompetitivno ponašanje označava aktivnu potražnju dvije ili više jedinki iste (intraspecijska kompeticija) ili različitih (interspecijska kompeticija) vrsta koje žive na istoj trofičkoj razini za određenim ograničavajućim resursom (Miller, 1967).

Još je Darwin (1859) u svojoj knjizi „O podrijetlu vrsta posredstvom prirodne selekcije ili očuvanje boljih pasmina u borbi za opstanak“ pisao o načelima kompeticije, pri čemu je istaknuo da je ona češća između jedinki istog roda zbog njihove sličnosti u životnim navikama i tjelesnoj konstituciji. Vođen njegovim radom i radom brojnih drugih znanstvenika poput Wilsona, Bosserta, Conella, Moorea i drugih, Miller (1967) je donio zaključak da vrste istog roda zaista imaju slične ekološke zahtjeve zbog kojih zauzimaju iste ekološke niše i razvijaju oblik kompetitivnog ponašanja koji ne mora nužno uključivati agresivnost. Međutim, postoje istraživanja u kojima je dokazana prisutnost agresivnog ponašanja pri interspecijskoj kompeticiji. U jednom od istraživanja Michelangelia i sur. (2017) primijećeno je da je agresivnost bila ključni čimbenik za uspješnost širenja teritorija invazivne vrste guštera nježni skink (*Lampropholis delicata* De Vis, 1888). Također, rezultati istraživanja Kabelika i sur. (2014) ukazali su na prisutnost katekolaminergičkih neurona duž mozga mužjaka vrste smeđi anolis (*Anolis sagrei* Dumèril i Bibron, 1837) čija aktivnost u sezoni parenja potiče grizenje protivnika u borbi za naklonost ženke. Pojavu agresivnosti u gušterica primijetili su i znanstvenici Downes i Bauwens (2002) u svome istraživanju interspecijske kompeticije između vrsta primorska gušterica (*Podarcis sicula* Rafinesque-Schmaltz, 1810) i krška gušterica (*Podarcis melisellensis* Braun, 1877) u zatočeništvu. Navedeno su istraživanje ovo dvoje znanstvenika proveli na jedinkama s područja hrvatskog dijela jadranske obale nakon što je na istom primijećeno intenzivno širenje areala vrste *P. sicula* uz istovremeno smanjenje areala vrste *P. melisellensis*.

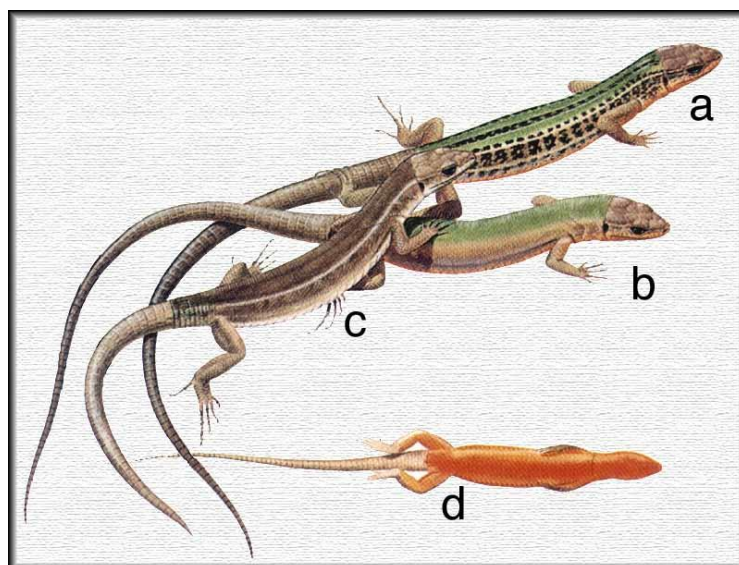
Obje istraživane vrste pripadaju istom rodu porodice Lacertidae, odnosno gušterica, koja broji preko 230 različitih vrsta (Arnold, 1989), od kojih rodu *Podarcis* pripada njih 25 (Integrated Taxonomic Information System, 2021). *P. sicula* je gušterica robusnog tijela i izduljene glave, zelenožutih do maslinasto zelenih leđa i svijetlog sivkastog do zelenkastog trbuha (Slika 1 a i b). Jedinke su duge otprilike devet centimetara, no mogu biti i manje. Ova

je vrsta rasprostranjena na jadranskoj obali, Siciliji, Grčkoj, Turskoj, Francuskoj, Švicarskoj, Velikoj Britaniji, sjevernoj Africi i SAD-u (Rocha, 2022).



Slika 1. a) Mužjak *Podarcis sicula* i **b)** ženka *P. sicula*. Autor fotografija Ana Verbanac.

P. melisellensis je gušterica srednje veličine i smeđezelene boje s redovito prisutnim točkama na tijelu te svijetlom prugom na bokovima. Tijelo jedinki je spljošteno, duljine oko šest i pol centimetara, rep je dvostruko dulji od duljine tijela, a mužjaci često pokazuju jarku obojenost na ventralnoj strani tijela (Slika 2 a, b, c i d). Rasprostranjena je na jadranskoj obali i otocima, jugozapadnoj Sloveniji, Bosni i Hercegovini, Crnoj Gori i Albaniji (Biologer, 2021 i BHHU-ATRA, 2021).

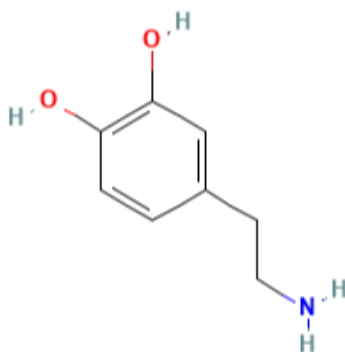


Slika 2. Slikoviti prikaz **a)** mužjaka *Podarcis melisellensis*; **b) i c)** ženke *P. melisellensis* i **d)** ventralne obojenosti mužjaka. Preuzeto sa *Web Museo della Fauna Europea*.

Opisane vrste preferiraju različite krajolike za svoje životno stanište - *P. sicula* preferira otvoreni krajolik s pripadajućom vegetacijom, oportunistička je vrsta, ne smeta joj blizina ljudi te spremno živi u naseljima i gradovima. *P. melisellensis*, s druge strane, preferira skrovitija mjesta poput stijena i suhozida, često obraslih vegetacijom, vinograda, maslinika, kamenitih livada i pašnjaka, konzervativnija je vrsta i uglavnom izbjegava naselja i gradove (Raynor, 1989). Na većim jadranskim otocima, poput Ugljana i Čiova, primijećena je prisutnost obje vrste, dok je na nekim manjim, poput Obrovnja, prisutna samo jedna vrsta - *P. sicula*. Iako zauzimaju različite ekološke niše, zanimljivo je pitanje zbog čega u prisutnosti *P. sicula* na manjim prostorima nema vrste *P. melisellensis* (Raynor, 1989).

Pretpostavlja se da neurofiziološki i endokrini čimbenici uvelike utječu na teritorijalno i agresivno ponašanje jedinki. Na temelju te su pretpostavke Matter i sur. (1998) proveli istraživanje o odnosu aktivacije neurotransmitera i teritorijalnosti u populaciji planinskog bodljikavog guštera (*Sceloporus jarrovi* Cope, 1875). Rezultati njihovog istraživanja pokazali su da tijekom sezone parenja jedinke pokazuju specifične promjene u aktivaciji monoaminergičkih sustava prednjeg mozga (telencephalona i diencephalona). Mladi mužjaci bez vlastitog teritorija pokazali su veću aktivaciju serotoninskog (5-hidroksitriptamin) sustava prednjeg mozga, dok se u odraslih, teritorijalnih mužjaka, aktivirao hidroksitriptaminski (5-hidroksitriptofan, metabolički posrednik u sintezi serotonina), noradrenergički (NA) i dopaminski (DA) sustav (Matter i sur., 1998). Dobiveni su rezultati u skladu s prijašnjim istraživanjima koja ukazuju na pojačanu sintezu serotonina u manje agresivnih životinja te pojačanu sintezu dopamina u onih agresivnijih, u pravilu dominantnih mužjaka, riba, gmazova i sisavaca (Yodyingyuad i sur., 1985; Winberg i Nilsson, 1993; Summers i Greenberg, 1995).

Znanstvenici Nikolić i sur. (2019) proveli su istraživanje ponašanja vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis* temeljeno na dopaminu - monoaminskom neurotransmiteru (kemijskom prijenosniku informacija) prisutnom u neuronskom krugu ventralnog tegmentuma (eng. *ventral tegmental area*, VTA) zaslužnom za stvaranje osjećaja nagrade (Slika 3).



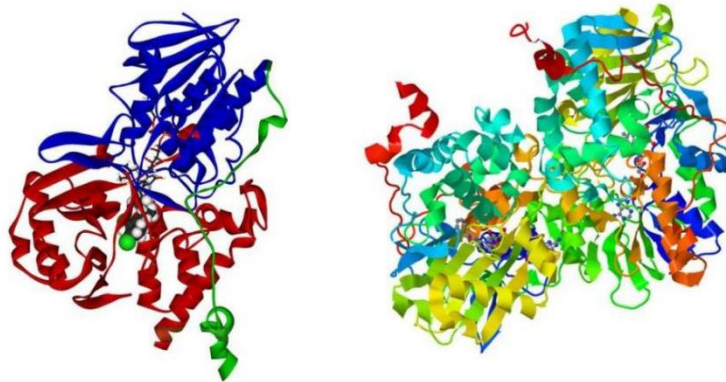
Slika 3. 2D kemijska struktura dopamina. Preuzeto s PubChem (2022).

Dopamin (3,4-dihidroksifenetilamin) je jedan od glavnih neurotransmitera u mozgu, pripada skupini katekolamina i osim stvaranja osjećaja nagrade, važnu ulogu ima i u razvoju motivacije, formiranju pamćenja te lokomociji. Najviše dopamina u mozgu gušterica ima u olfaktornim režnjevima telencephalona, periventrikularnoj jezgri hipotalamusa, *substantii nigri*, *nucleusu accumbensu*, dorzalnem ventrikularnom grebenu, striatumu i amigdali (Smeets i sur., 1989). U svojem su istraživanju Nikolić i sur. (2019) metodom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) dokazali prisutnost dvostruko veće razine dopamina u mozgu mužjaka vrste *P. sicula* u odnosu na *P. melisellensis* što bi moglo ukazivati na razlog njezine dominantnosti i veće razine agresivnosti.

U regulaciji dopamina, serotonina i noradrenalina sudjeluju enzimi monoamin oksidaza (MAO), katehol-O-metiltransferaza (COMT), N-acetiltransferaza (NAT), alantoin amidohidrolaza (AAH) i drugi. Navedeni enzimi djeluju na način da kataboliziraju, odnosno razgrađuju, monoamine sprječavajući njihovu aktivnost. Poznato je da genetska predispozicija za ispoljavanje agresivnog ponašanja unutar članova obitelji nastaje uslijed mutacije na *MAO* genu koja uzrokuje manju aktivnosti enzima (Nilsson i sur., 2007). Vodeći se time, možemo zaključiti da pojačana aktivnost ovih enzima smanjuje razinu dopamina u organizmu što ima utjecaj na smanjenje agresivnosti.

MAO je enzim čije djelovanje ovisi o koenzimu, odnosno pomoćnoj katalitičkoj molekuli, flavin adenin dinukleotidu (FAD). Mehanizam djelovanja ovog enzima je oksidativna deaminacija, odnosno uklanjanje aaminskih (-RNH, -R₂N, -R₃N₂) skupina uz prisutnost kisika kao akceptora elektrona. MAO je integralni protein na vanjskoj membrani mitohondrija čiji se C-kraj nalazi unutar membrane, dok je N-kraj (s FAD i aktivnim mjestom za supstrat - amin) okrenut prema citoplazmi. U sisavaca postoje dvije vrste MAO – MAOA i

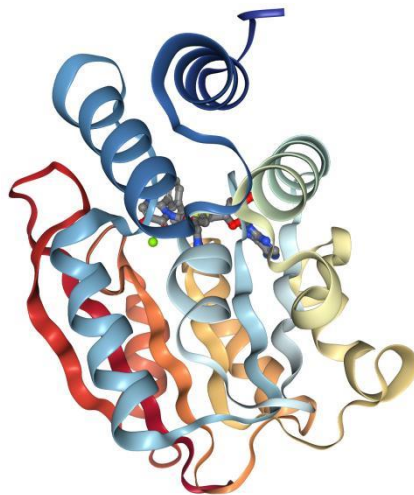
MAOB, koje se eksprimiraju u neuronima i glija stanicama velikog mozga te većini ostalih tkiva, no razina njihove ekspresije varira kako u različitim tkivima, tako i u različitim životinjskim vrstama (Singer, 2018); Slika 4.



Slika 4. 3D struktura monoamin oksidaze A (lijevo) i monoamin oksidaze B (desno).

Preuzeto sa Creative Enzymes (2022).

COMT je enzim koji katalizira premještanje metilne ($-CH_3$) skupine sa S-adenozil-L-metionina na dopamin, što uzrokuje inaktivaciju dopamina i stvaranje 3-metoksitiramina (Slika 5). Široko je rasprostranjen u mozgu sisavaca te se u velikome mozgu nalazi u piramidalnim neuronima svih kortikalnih slojeva prefrontalnog korteksa, neuronima strijatuma, ependimskim stanicama koje oblažu moždane ventrukule, hipokampusu, koroidnom pleksusu i dopaminergičkim neuronima srednjeg mozga. Dokazano je da je uloga COMT-a u razgradnji dopamina značajnija u prefrontalnom korteksu, nego u subkortikalnim regijama poput strijatuma (Matsumoto i sur., 2003).



Slika 5. 3D struktura katehol-O-metiltransferaze. Preuzeto sa SinoBiological (2015).

Sintezu svih, pa tako i dopamin regulirajućih enzima, kodiraju geni. Njihova se transkriptivna aktivnost regulira različitim polimorfizmima, poput varijabilnih ponavljajućih sekvenci (eng. *Variable Number Tandem Repeats*, VNTR) u *MAO* genu i supstitucije metionina valinom u *COMT* genu (Volavka i sur., 2004). U ljudi, VNTR služe kao promotori za transkripciju *MAOA* gena, dok je ekspresija *COMT* gena regulirana dvama promotorima čiji su produkti kratka mRNA transkribirana u topljivi citosolni oblik (S-COMT, eng. *soluble*) i dulja mRNA čiji su transkript S-COMT i protein vezan za membranu (MB-COMT, eng. *membrane-bound*) (Matsumoto i sur., 2003).

2. CILJ RADA

S obzirom na dokazanu razliku u razini dopamina između vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*, cilj ovog diplomskog rada je ustanoviti postoji li razlika u ekspresiji dvaju dopamin regulirajućih gena *MAO* i *COMT* u mozgu jedinki u odnosu na vrstu i spol.

3. MATERIJALI I METODE

Za potrebe istraživanja provedeno je terensko uzorkovanje jedinki, njihovo žrtvovanje i uzorkovanje mozga za daljnju analizu, njegova homogenizacija, izolacija RNA iz homogenizirane desne polutke mozga te mjerenje koncentracije izolirane RNA. Određivanje razine ekspresije gena *MAO* i *COMT* postignuto je metodom reverzne transkripcije (RT-PCR) kako bi se dobila cDNA te, uz pomoć specifičnih početnica, kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (qRT-PCR) i Δ Ct metodom.

Prilikom pokretanja novih istraživanja i korištenja poznatih metoda na novim uzorcima, redovito se ukazuje potreba za optimizacijom. U izradi ovog diplomskog rada bilo je potrebno optimizirati svaki korak, a naročito je zahtjevno bilo dizajnirati i testirati početnice za rod *Podarcis*. Iako sam sekvenciranjem dobila specifičan transkript za naše životinje, nedostatak anotiranog genoma zahtijevao je dodatan trud za dizajn specifičnih početnica za naše uzorke. Iz tog sam razloga dizajnirala dva para početnica za svaki ciljani gen i nakon više optimizacija za svaki odabrala po jedan, koji je imao efikasnost umnažanja unutar standardnog raspona od 90 do 110 % te koeficijent korelacije iznad 0,98.

3.1. Uzorkovanje jedinki

Terensko uzorkovanje provedeno je u rujnu 2020. godine na tri lokacije - Novalji na Pagu te okolici Sinja i Knina. Jedinke su uzorkovane u prijepodnevnim satima nakon što su izašle iz svojih skloništa da bi se ugrijale. Za uzorkovanje je dobivena dozvola za izuzeće iz prirode strogo zaštićenih vrsta (URBROJ: 517-05-1-1-20-6).

Uzorkovačke su skupine bile podijeljene u parove, a pregledavanje terena odvijalo se laganom šetnjom pazeći da se proizvodi što manje buke, kako se gušterice ne bi uplašile i pobjegle. Gušterice su uzorkovane petometarskim štapom na izvlačenje na čijem je kraju metalna kukica s privezanim lanenom omčom (Slika 6). Važno je da osoba koja hvata guštericu stoji na mjestu i polagano izvlači štap dokle god njegova kukica s omčom ne bude iznad tijela gušterice. Nakon što je štap dovoljno izvučen, lanena se omča provlači preko tijela gušterice od glave prema trupu i kada je provučena, naglim se trzajem prema gore omča stisne oko tijela čime je jedinka uhvaćena. Druga osoba iz para zadužena je za oprezno skidanje omče s tijela gušterice, pazeći da je ni na koji način ne ozlijedi.



Slika 6. Uzorkovanje gušterica petometarskim štapom na izvlačenje. Autor fotografije Sara Zvonar.

3.2. Smještaj i čuvanje jedinki

Nakon što smo gušterice skinuli s omče, svaku smo jedinku pohranili u vlastitu platnenu vrećicu označenu nasumičnom kombinacijom slova i brojeva (npr. K1) i u njoj je čuvali do transporta u prostore Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. Na Zavodu su jedinke prebačene u vlastite prozirne plastične kutije s pripadajućim oznakama, tako da odgovaraju oznakama na vrećicama. Kutije su bile ispunjene tresetom i uz njega sadržavale su još plastičnu, na jednom kraju zatvorenu tubicu koja je guštericama služila kao skrovište, kamen i plastičnu posudicu za vodu. Iznad svake je kutije bila postavljena LED žarulja koja je guštericama služila kao izvor topline u razdoblju što sličnijem onim u prirodi (od 11 do 13 sati). Također, postavljene su UV lampe s posebnim valnim duljinama potrebnim guštericama za održavanje normalne fiziološke funkcije koje su radile od 8 do 18 sati. U prostoriju s guštericama postavljen je ovlaživač zraka te su se redovito pratile temperatura i vlažnost zraka, a optimalne su vrijednosti bile između 20 i 25 °C te 40 i 60 %. Gušterice su dva do tri puta tjedno hranjene šturcima (*Gryllus* sp.) i pojene vodom te su im se, kao dodatak prehrani, povremeno davali vitamini i kalcij.

Nakon razdoblja njihove prilagodbe na novo stanište, provedeno je bihevioralno istraživanje u kojem se proučavala međusobna interakcija između jedinki dviju vrsta u kontroliranim uvjetima.

Ulovljeno je 117 jedinki gušterica:

- *P. sicula*: 10 ženki i 10 mužjaka s područja Paga, 10 ženki i 10 mužjaka s područja Sinja te 10 ženki i 10 mužjaka s područja Knina;
- *P. melisellensis*: 10 ženki i 9 mužjaka s područja Paga, 9 ženki i 10 mužjaka s područja Sinja te 9 ženki i 10 mužjaka s područja Knina.

U svrhu jednostavnog razlikovanja jedinki postavljena je nomenklatura temeljena na vrsti i lokalitetu pronalaska jedinki, sastavljena od dvoslovne kratice i pridruženog broja - tako je SP označavalo *P. sicula* s Paga, SS *P. sicula* iz Sinja, SK *P. sicula* iz Knina, MP *P. melisellensis* s Paga, MS *P. melisellensis* iz Sinja te MK *P. melisellensis* iz Knina. Brojevi su pridruženi tako da su onima od 01 do 20 označeni mužjaci, a od 21 do 30 ženke.

3.3. Žrtvovanje

Žrtvovanje jedinki provedeno je u prosincu 2020. godine u prijedpodnevnim satima (od 10 do 14 sati) u laboratoriju Zavoda za animalnu fiziologiju, a protokol prema kojem je izvedeno nalazi se u Prilogu. Prilikom vađenja gušterica iz plastične kutije, nastojalo se što više smanjiti vrijeme rukovanja kako bi gušterice što kraće bile u stresu. Jedinke su žrtvovane dekapitacijom u manje od dvadeset sekundi od trenutka hvatanja do dekapitacije, a trajanje vađenja mozga bilo je u rasponu od 51 sekunde do 3 minute i 12 sekundi. Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Prirodoslovno-matematičkog fakulteta izdalo je pozitivno mišljenje za projekt na životinjama u svrhu korištenja njihovih organa, tkiva i trupa te je istraživanje u skladu s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17), Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te Etičkim kodeksom Sveučilišta u Zagrebu (KL: 641-01/19-01/39, UR. BR: 251-58-10617-19-3; Zagreb, 10. svibanj 2019.).

3.4. Homogenizacija uzoraka

Nakon žrtvovanja, uzorke mozga sam homogenizirala ultrazvučnim uređajem za homogeniziranje te pohranila na -80 °C. Protokol prema kojem je izvedena homogenizacija

nalazi se u Prilogu. Zbog greške prilikom skladištenja u laboratoriju izgubljeno je osam uzoraka, većinom mužjaka *P. melisellensis*.

3.5. Izolacija RNA

Sva su se daljnja istraživanja temeljila na RNA zbog čega je istu bilo potrebno izolirati iz homogeniziranih uzoraka moždanog tkiva. Za izolaciju sam koristila GenElute RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Sigma-Aldrich, SAD). Originalni sam protokol tog kita prilagodila tako da odgovara karakteristikama tkiva za analizu te se isti nalazi u Prilogu. Nakon svake izolacije, uzorke izolirane RNA analizirala sam BioSpec-nano spektrofotometrom (Shimadzu, Japan) kako bih dobila podatke o koncentraciji RNA i čistoći svakog uzorka. Volumen uzorka za mjerenje koncentracije iznosio je 2 μ L. Detekcija onečišćenja uzorka proteinima odvija se na valnim duljinama 260 i 280 λ uz prihvatljivi raspon od 1,6 do 1,9, dok se detekcija onečišćenja uzorka solima odvija na valnim duljinama 260 i 230 λ te prihvatljivi raspon iznosi $\geq 2,0$. Na sekvenciranje u kinesku tvrtku Novogene poslano je 12 uzoraka izolirane RNA.

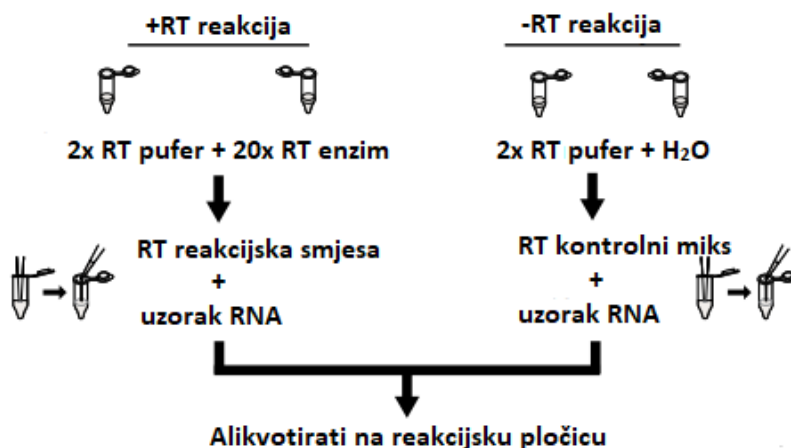
3.6. Gel elektroforeza

Integritet izolirane RNA provjerila sam gel elektroforezom na 1,5 %-tnom agaroznom gelu za čiju sam izradu koristila 0,5x TBE pufer pripremljen od 100 mL 5x TBE otopine (0,45 M Tris-borat, 10 mM EDTA (etilendiaminotetraoctena kiselina)) i 900 mL destilirane vode. Na gel sam nanosila 2 μ L uzorka pomiješana s 2 μ L Blue juice 2x (Takara, Japan) pufera za nanošenje, a za vizualizaciju uzoraka koristila sam boju 10 000x SYBR Safe (Thermo Fisher, SAD). Elektroforeza je trajala 30 minuta pri naponu struje od 80 V.

3.7. Reverzna transkripcija

Nakon uspješne izolacije, RNA uzoraka prepisana je u cDNA MultiScribe MuLV reverznom transkriptazom (Thermo Fisher, SAD) sadržanom u enzimskom miksu. Za pripremu uzoraka koristila sam High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher, SAD), a slikovni prikaz pripreme reakcijske smjese nalazi se na slici 7. Reakcijska je smjesa sadržavala 2x RT pufer i 20x RT enzim pripremljene u omjeru 10:1, a masa RNA dodana u svaku reakcijsku smjesu iznosila je 1 μ g. U svaku sam turu reakcija uključila i kontrolnu reakciju u koju se dodaje uzorak RNA, ali ne i enzim reverzna transkriptaza (-RT kontrola) te kontrolnu reakciju u koju su dodane sve komponente reakcijske smjese osim uzorka RNA (-

RNA kontrola). Na samom početku, RNA se tijekom pet minuta denaturirala na temperaturi od 95 °C. Početna inkubacija uzoraka odvijala se na temperaturi od 37 °C u trajanju od 60 minuta, nakon čega je slijedila inaktivacija reverzne transkriptaze na 95 °C u trajanju od pet minuta, a završna se inkubacija odvijala na 4 °C do gašenja uređaja i vađenja uzoraka. Koncentracija cDNA dobivena nakon RT-PCR-a iznosila je 50 ng/μl.



Slika 7. Slikoviti prikaz protokola pripreme reakcijske smjese za RT-PCR. Preuzeto iz AppliedBiosystems High-Capacity RNA-to-cDNA Kit priručnika (2018).

3.8. Dizajn početnica za qRT-PCR

Prije početka izvođenja qRT-PCR-a, bilo je potrebno dizajnirati početnice specifične za referentni gen i gene od interesa. Njihov sam dizajn izvršila na internetskoj stranici Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (eng. *National Center for Biotechnology Information*, NCBI). Svaki je set početnica (*forward* i *reverse*) dizajniran za određeni klaster, u ovom slučaju skup kontinuiranih sljedova nukleotida koji dijele jedno ili više „čitanja“ s drugim kontinuiranim slijedom nukleotida u istom, takozvanom „superklasteru“. Klaster sam potražila u unigene.fasta transkriptomu sekvenciranih uzoraka mozga gušterica (dobivenom od tvrtke Novogene) te sam za *MAO* odabrala klaster 5174.92206 duljine 1548 parova baza (pb) te klaster 5174.96521 duljine 2062 pb, a za *COMT* klaster 5174.84554 duljine 2820 pb. Uz početnice za *MAO* i *COMT*, bilo je potrebno dizajnirati i početnice za referentni gen po izboru, u ovom slučaju β-aktin (*ACTB*) za dizajn čijih su početnica odabrani klaster 5174.113902 duljine 2143 pb te klaster 5174.90993 duljine 2690 pb (Tablica 1). Dizajn početnica temelji se na BLAST-anju (eng. *Basic Local Alignment Search Tool*), odnosno traženju sličnih regija između bioloških sekvenci, na način da program uspoređuje

nukleotidne sekvence od interesa s već postojećim sekvencama u bazi podataka i daje nam rezultate sličnih sekvenci. Detaljni protokol za dizajn početnica nalazi se u Prilogu.

Tablica 1. Nukleotidni slijed početnica odabranih za umnažanje referentnog (*ACTB*) i gena od interesa (*MAO* i *COMT*) te klasteri na kojima su dizajnirane navedene početnice

Naziv početnice	<i>Forward</i> početnica (5' → 3')	<i>Reverse</i> početnica (5' → 3')	Klaster
ACTB1	AAGTACCCCATTTGAGCACGG	GGCCAGATGCATAGAGGGAC	5174.113902
ACTB2	TCCTGACCCTGAAGTACCCC	GGCCAGATGCATAGAGGGAC	5174.90993
MAO1	CTAGGTGGGACCTACCCAGA	TGGTTTTGGTCCAGCAGTGT	5174.92206
MAO2	ACAGAACCAGAATCAAAGGATCTC	CTCACCCACTCAAGGCCACTTA	5174.96521
COMT1	AGGCTACTCGGCCATCAGGA	GGTAGCCACATTCTTCGAGGAGGA	5174.84554
COMT2	GGCGGATCCTACCATCGCTT	GTACCCACATTCTTCGAGGAGGA	

Odabrane početnice naručene su od proizvođača Integrated DNA Technologies (IDT) te su se originalno nalazile u liofiliziranom obliku. Svaku je tubicu početnica bilo potrebno lagano centrifugirati kako bi liofilizirane početnice pale na dno tubice te ih razrijediti određenim volumenom TE pufera kako bi njihova konačna koncentracija bila 100 μ M (volumen pufera koji je potrebno dodati ovisi o količini početnica i napisan je u informacijskom listu priloženom tubicama početnica). Početnice sam dodatno razdjelila u radne otopine volumena 200 μ L i koncentracije 10 μ M.

3.9. Određivanje optimalne temperature hibridizacije početnica i koncentracije cDNA

Prije izvođenja qRT-PCR-a na svim pokusnim uzorcima bilo je potrebno ispitati temperaturni gradijent umnažanja početnica, odnosno odrediti temperaturu pri kojoj će nastati najviše produkta umnažanja cDNA, provjeriti specifičnost vezanja početnica na cDNA kalup te odrediti optimalnu koncentraciju cDNA koju je potrebno dodati u reakcijsku smjesu.

Prilikom određivanja optimalne temperature koristila sam metodu temperaturnog gradijenta te sam u obzir uzela očekivanu najnižu i najvišu temperaturu taljenja početnica (eng. *melting temperature*, T_m) navedene u informacijskom listu. Na temelju navedenog odredila sam temperaturni gradijent od 53,9 do 64,8 $^{\circ}$ C s razmakom od 1,3 $^{\circ}$ C između svake temperature (za ACTB1, ACTB2 i MAO1), odnosno 54,1 do 64,1 $^{\circ}$ C s razmakom od 1,2 $^{\circ}$ C između svake temperature (za MAO2, COMT1 i COMT2). Protokol za qRT-PCR nalazi se u

Prilogu, a za provođenje eksperimenta pripremila sam reakcijsku smjesu (Tablica 2). Za sve qRT-PCR reakcije eksperimenata koristila sam GoTaq qPCR Master Mix baziran na SYBR Green tehnologiji (Promega, SAD). Početna inkubacija uzoraka odvijala se na 95 °C u trajanju od dvije minute, nakon čega je slijedilo 40 ciklusa inkubacije na temperaturi denaturacije od 95 °C u trajanju od 15 sekundi te inkubacija na 12 različitih temperatura (različita temperatura u svakom stupcu) u rasponu od 53,9 do 64,8 °C, odnosno 54,1 do 64,1 °C u trajanju od jedne minute po petlji. Očitavanje fluorescencije odvijalo se nakon svakog završenog ciklusa. Završna inkubacija potrebna za krivulju taljenja odvijala se u gradijentu temperatura od 60 do 95 °C s promjenom temperature od 1 °C u 15 sekundi te služi za ekvilibraciju svake temperature prije snimanja fluorescencije.

Tablica 2. Reakcijska smjesa za ispitivanje temperaturnog gradijenta qRT-PCR metodom

Reakcijska smjesa	μL
GoTaq MM 2x	10
<i>Reverse</i> početnica	0,5 (10 μM)
<i>Forward</i> početnica	0,5 (10 μM)
diH ₂ O	7
Ukupno	18
+ 2 μL DNA (100 ng)	
UKUPNO	20

Nakon ispitivanja temperaturnog gradijenta, ispitala sam efikasnost odabranih početnica i nastojala odrediti optimalnu količinu cDNA koju ću koristiti u narednim eksperimentima. Za test efikasnosti odabrala sam minimalno četiri serijski razrijeđene koncentracije cDNA u radnoj otopini testirane u triplikatu. Početna koncentracija cDNA dobivena nakon reverzne transkripcije iznosila je 50 ng/μL te sam od nje napravila serijska razrjeđenja (Tablica 3), a za qRT-PCR sam pripremila reakcijsku smjesu (Tablica 4).

Tablica 3. Koncentracije serijskih razrjeđenja cDNA dobivene iz početne koncentracije od 50 ng/ μ L korištene za testiranje efikasnosti početnica i određivanje optimalne koncentracije cDNA

Oznaka koncentracije	Koncentracija radne otopine [ng/ μ L]	Masa [ng] cDNA po reakciji
c1	25	50
c2	12,5	25
c3	6,25	12,5
c4	3,13	6,25
c5	1,56	3,13
c6	0,78	1,56
c7	0,39	0,78

Tablica 4. Reakcijska smjesa za ispitivanje efikasnosti početnica i optimalne koncentracije cDNA prema Tablici 3

Reakcijska smjesa	μ L
GoTaq MM 2x	5
<i>Reverse</i> početnica	0,25 (10 μ M)
<i>Forward</i> početnica	0,25 (10 μ M)
diH ₂ O	2,5
Ukupno	8
+ 2 μ L DNA	
UKUPNO	10

Da bih odabrala optimalnu koncentraciju cDNA izračunala sam efikasnost svih testiranih početnica na temelju nagiba krivulje, odnosno R² koeficijenta pravca između srednjih Ct vrijednosti i logaritma koncentracije cDNA. Efikasnost svake početnice izračunala sam pomoću formule $(10^{(1/nagib)} - 1) * 100$, pri čemu prihvatljivi raspon vrijednosti efikasnosti početnica iznosi između 90 i 110 %. Izračunala sam također i koeficijent korelacije, koji govori o jakosti funkcijske veze između dvije varijable, u ovom slučaju srednjih Ct vrijednosti i logaritma koncentracije cDNA.

3.10. qRT-PCR uzoraka cDNA gušterica

Za određivanje relativne ekspresije gena umnažanjem referentnog i gena od interesa u pokusnim uzorcima gušterica odabrala sam qRT-PCR metodu.

Za ispitivanje sam odabrala sljedeći broj uzoraka:

- *P. sicula*: 5 uzoraka ženki i 5 mužjaka s područja Paga, 5 uzoraka ženki i 5 mužjaka s područja Sinja te 5 uzoraka ženki i 5 mužjaka s područja Knina;
- *P. melisellensis*: 5 uzoraka ženki i 6 mužjaka s područja Paga, 5 uzoraka ženki i 5 mužjaka s područja Sinja te 5 uzoraka ženki i 4 mužjaka s područja Knina.

Kako bi se izbjegle varijacije između pločica, sve sam uzorke testirala za sva tri gena (jedan referentni gen i dva gena od interesa) na istoj pločici. Umnažano je deset uzoraka po qRT-PCR pločici, svaki je uzorak umnažan u tri tehničke replike sa svakim od tri seta početnica te sam za svaku pločicu pripremila tri reakcijske smjese, po jednu za svaki par početnica. Prilikom pripreme uzoraka za testiranje obratila sam pažnju na to da na svaku pločicu stavim uzorke svih skupina, to jest obje vrste, oba spola i sva tri lokaliteta. Reakcijska smjesa za umnažanje uzoraka qRT-PCR metodom pripremljena je prema Tablici 4, a masa korištene DNA iznosila je 12,5 ng.

U svakoj se pločici nalazila i kontrola bez uzorka (eng. *no template control*, NTC), u koju se umjesto uzorka cDNA dodaje ista količina vode te –RT kontrola, koja ukazuje na čistoću RNA uzorka (neprisutnost gDNA).

Početna inkubacija odvijala se na 95 °C u trajanju od dvije minute, nakon čega je slijedila inkubacija na istoj temperaturi u trajanju od 15 sekundi te 39 petlji inkubacije na temperaturi od 63,8 °C, u trajanju od jedne minute po petlji. Završna inkubacija odvijala se u gradijentu temperatura od 60 do 95 °C s promjenom temperature od 1 °C u 15 sekundi.

3.11. Relativna ekspresija gena MAO i COMT

Za statističku analizu bilo je potrebno izračunati ΔCt vrijednost koja je dobivena oduzimanjem srednje Ct vrijednosti triplikata uzorka umnažanog ACTB2 setom početnica od srednje vrijednosti istih umnažanih MAO1, odnosno COMT1 setom početnica ($\Delta Ct =$ srednja vrijednost Ct triplikata MAO1 ili COMT1 – srednja vrijednost Ct triplikata ACTB2). Relativnu ekspresiju gena utvrdila sam formulom $efikasnost^{-(\Delta Ct)}$ te sam dobivene vrijednosti koristila za daljnju statističku obradu. Također, iz izračuna sam izbacila sve stršeće vrijednosti (eng. *outliers*) koje su od srednje vrijednosti odstupale +/- dvije standardne

devijacije (MAO: SS21; COMT: SK05, MK10 i MK28). Za statističku obradu podataka koristila sam GraphPad Prism 9 softver. Skupine nisu pokazale normalnu distribuciju Kolmogorov-Smirnovim testom, zbog čega sam za daljnje testiranje odabrala neparametrijski Kruskal-Wallis test s Dunnovom mnogostrukom usporedbom kojim sam ispitala utjecaj vrste i spola na razinu ekspresije gena *MAO* i *COMT*. Za svaku analizu razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

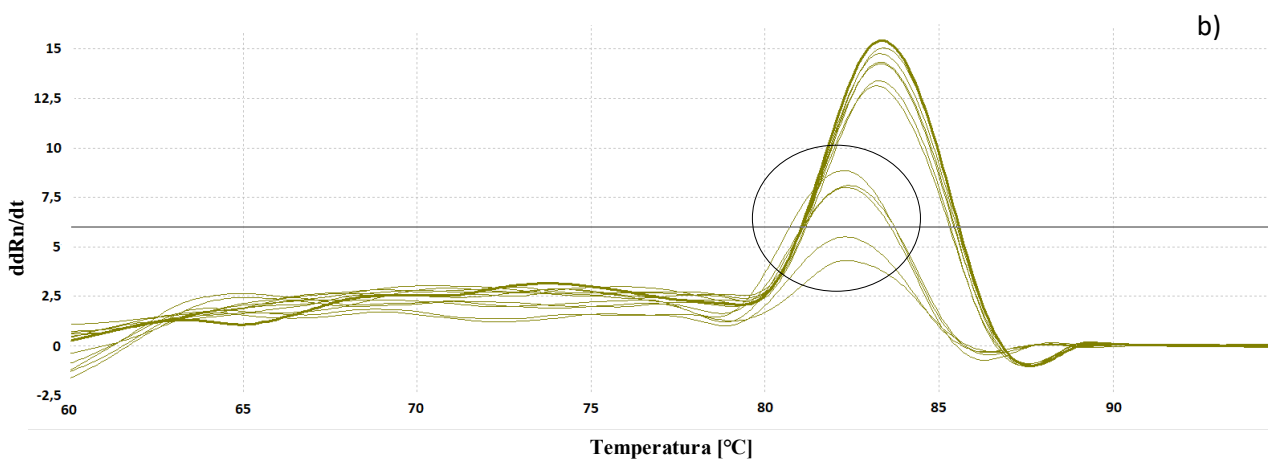
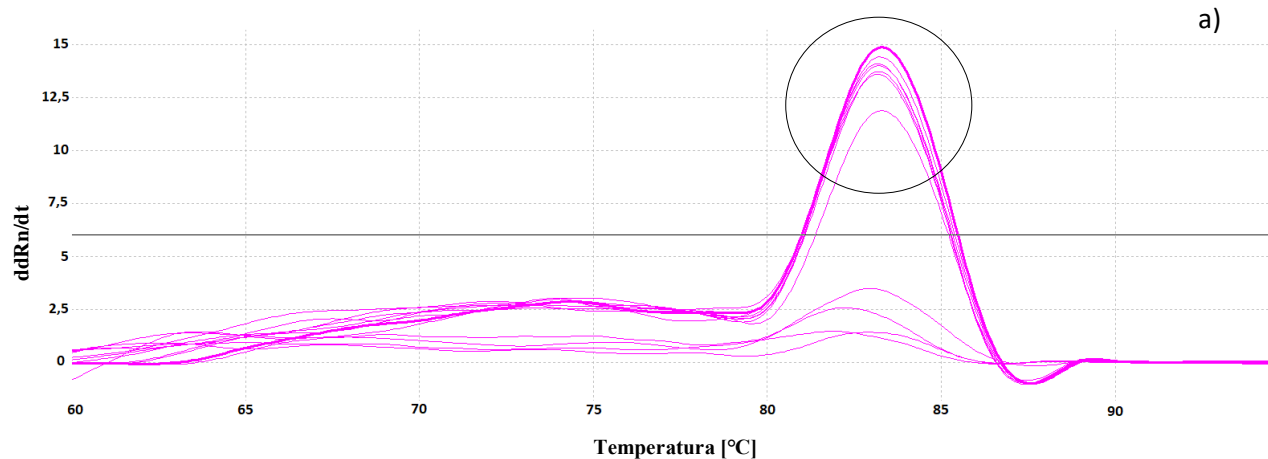
4.1. Izolacija RNA

Analizom uzoraka BioSpec-nano spektrofotometrom dobivene su vrijednosti koncentracije RNA i čistoće uzorka izražene prosjekom svih mjerenja svakog pojedinačnog uzorka. Čistoća uzoraka nije pretjerano odstupala od prihvatljivog raspona vrijednosti. Rezultati mjerenja koncentracije RNA i čistoće uzoraka prikazani su u tablici P1 (Prilog), a izgled nekih od uzoraka na gelu vidljiv je na slici P4 (Prilog) na kojoj su vidljive pruge ribosomalne mRNA, gdje je gornja pruga (28S) veća od donje pruge (18S) što ukazuje na uspješnost izolacije RNA. U procesu ekstrakcije izgubljeno je 12 uzoraka.

Na sekvenciranje u kinesku tvrtku Novogene poslano je 12 uzoraka izolirane RNA gušterica te je povratno dobivena unigene.fasta datoteka koja sadržava sve klastere ukupne RNA uzoraka gušterica. Na temelju povratne informacije iz tvrtke Novogene, uzorke izolirane RNA nije bilo potrebno dodatno pročišćavati DNaznim tretmanom što provedenu izolaciju čini izrazito uspješnom.

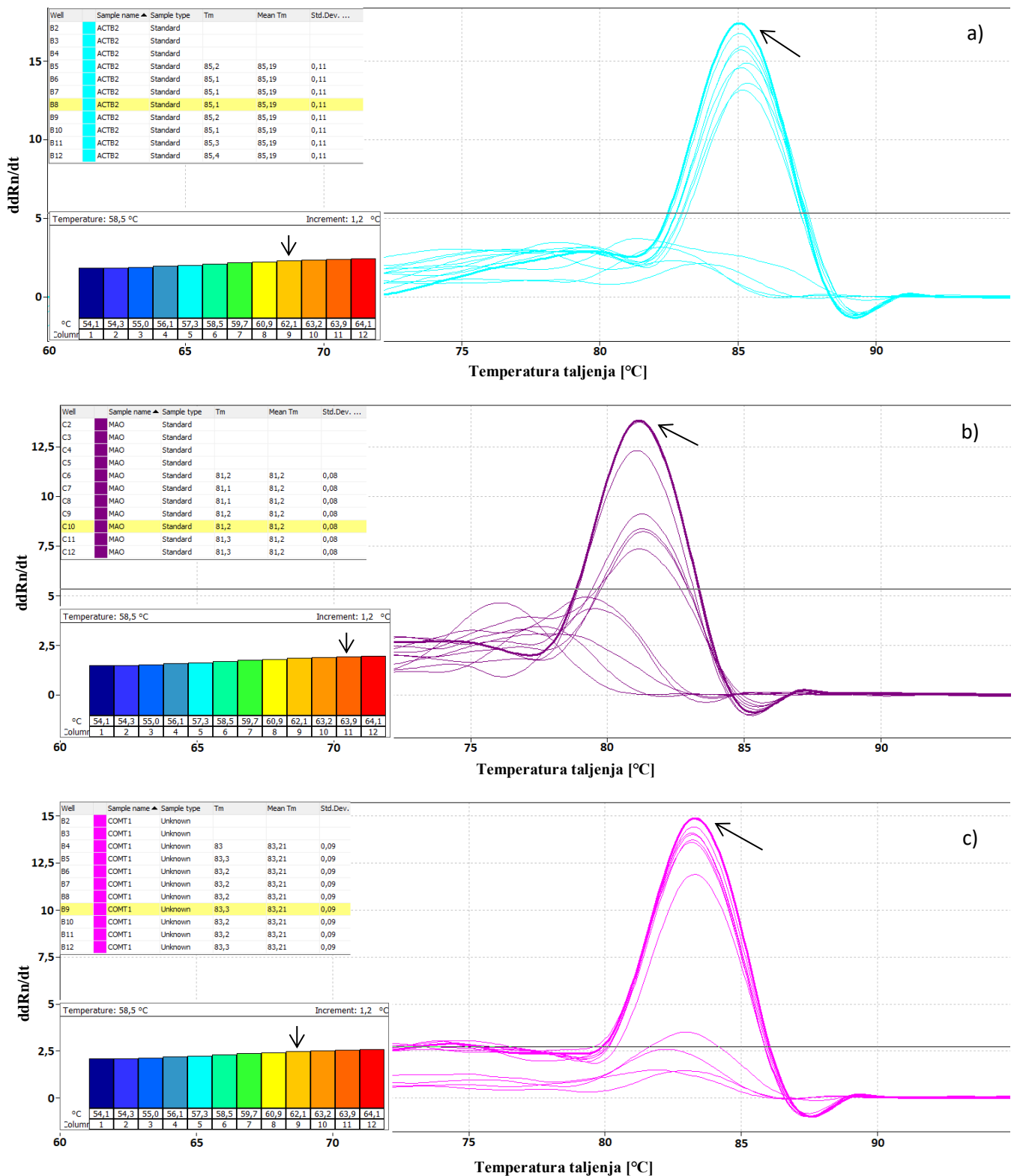
4.2. Određivanje optimalne temperature hibridizacije početnica i koncentracije cDNA

Prema krivulji taljenja i rezultatu gel elektroforeze nakon gradijentnog qRT-PCR-a, izabrala sam optimalnu temperaturu hibridizacije, a za daljnje sam eksperimente odabrala početnice ACTB2, MAO1 i COMT1. Da bi set početnica bio prikladan za korištenje potrebno je imati što jasnije i ujednačenije krivulje taljenja (Slika 8 a), dok zbog svih nepravilno raspoređenih krivulja takav set početnica ne valja uzeti u obzir (Slika 8 b).



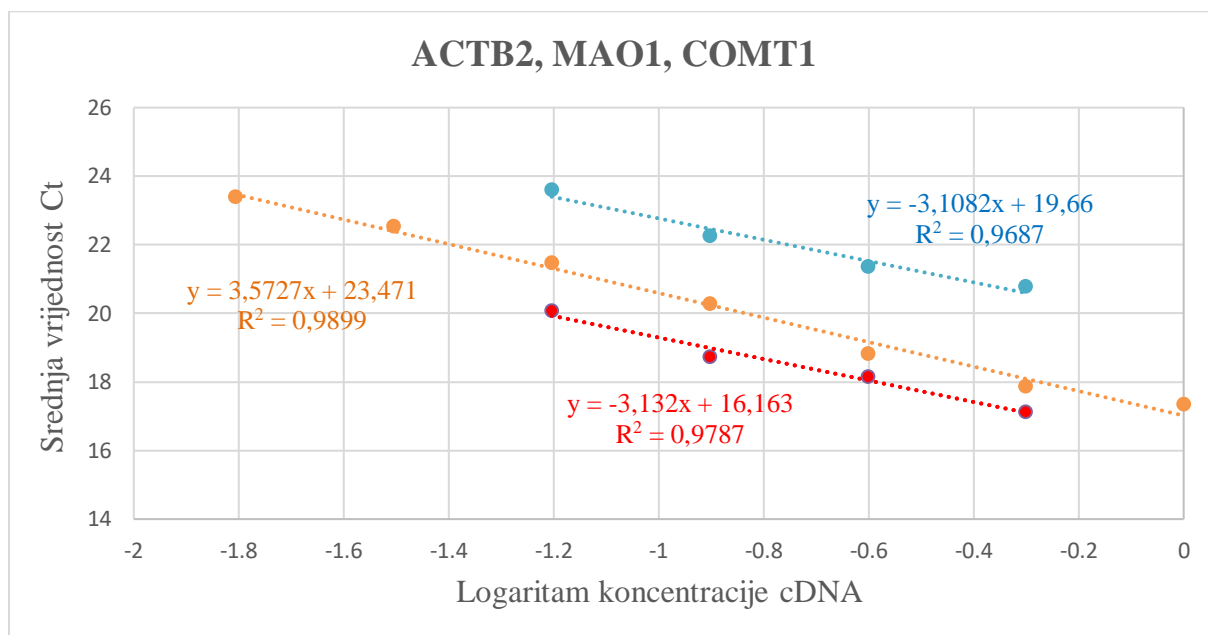
Slika 8. a) Primjer dobre krivulje taljenja cDNA (COMT1) **b)** primjer loše krivulje taljenja cDNA (COMT2). Zaokruženi su dijelovi krivulje važni za ocjenu prikladnosti. Na slici b (zaokruženo) je vidljivo da set početnica, uz gen od interesa, umnaža i još neki lokus/gen.

Temperaturna vrijednost pri kojoj je nastalo najviše produkta umnažanja iznosila je za ACTB2 i COMT1 62,1 °C te za MAO1 63,9 °C, a amplifikacija je provedena u temperaturnom gradijentu navedenom u poglavlju 3.9. (Slika 9 a, b i c). Temperatura koju sam odabrala za provođenje qRT-PCR metode na svim uzorcima iznosila je 63,8 °C.



Slika 9. a) Prikaz temperaturnog gradijenta i optimalne temperature umnažanja cDNA ACTB2 b) MAO1 i c) COMT1 setom početnica. Strelicom je označena optimalna temperaturna vrijednost i pridružena krivulja taljenja. U donjem lijevom dijelu svake slike prikazan je temperaturni gradijent amplifikacije svakog seta početnica, dok su u gornjem lijevom dijelu prikazane brojčane vrijednosti vezane uz temperaturu taljenja (Tm).

Efikasnost ACTB2 iznosila je 108,6 %, MAO1 109,8 % te COMT1 90,5 % (Tablica P2, Prilog). Koeficijent korelacije, koji govori o jakosti funkcijske veze između dvije varijable, u ovom slučaju srednjih Ct vrijednosti i logaritma koncentracije cDNA, iznosio je za ACTB2 0,98, za MAO1 0,97, a za COMT1 0,99 (Slika 10). Optimalna koncentracija cDNA koju sam odabrala za daljnje eksperimente je 6,25 ng/μL (12,5 ng) po reakciji.

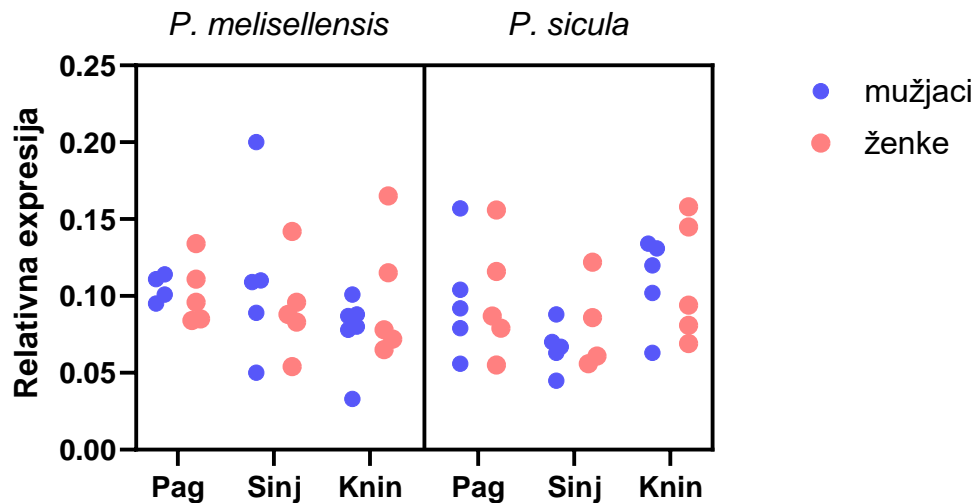


Slika 10. Grafički prikaz efikasnosti umnažanja cDNA ACTB2, MAO1 i COMT1 setom početnica s pripadajućom linijom trenda i R^2 vrijednošću (koeficijentom korelacije). Crvenom je bojom prikazana linija trenda za ACTB2, plavom za MAO1 te žutom za COMT1.

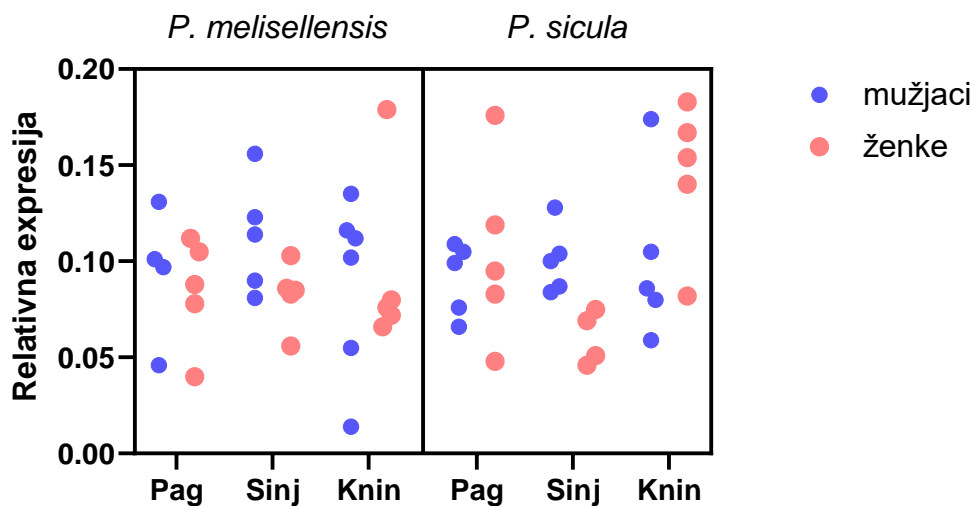
4.3. Relativna ekspresija gena *MAO* i *COMT*

Nakon što su ispitani parametri iz poglavlja 3.9., odabrala sam 60 uzoraka gušterica za ispitivanje postoji li razlika u ekspresiji gena *MAO* i *COMT* na temelju vrste i spola. Uzorke sam odabrala na temelju najboljih značajki (najveća čistoća i najveća količina produkta dobivenog RT-PCR metodom) te je od svake skupine (prema vrsti, lokalitetu i spolu) odabrano minimalno četiri, a maksimalno šest uzoraka. Ciljani je broj bio pet mužjaka i pet ženki po skupini (prema vrsti, lokalitetu i spolu), no zbog nedostatka uzoraka nekih skupina izgubljenih prilikom skladištenja ili izolacije, primjerice mužjaka *P. melisellensis* s područja Knina gdje sam imala samo četiri uzorka, odlučila sam koristiti manji broj sličnih skupina s dovoljnim brojem uzoraka potrebnim za statističku obradu.

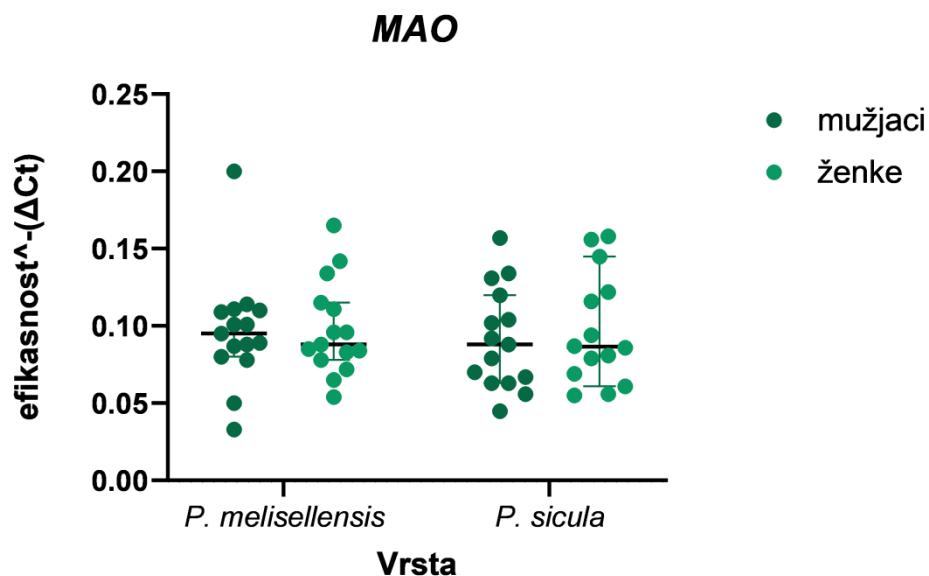
Izračun relativne ekspresije gena za svaki uzorak prikazan je u tablici P3 (Prilog), na slikama 11 i 12 vidljiva je raspodjela ekspresije gena prema vrsti, lokalitetu i spolu, a na slikama 13 i 14 raspodjela ekspresije gena prema vrsti i spolu. Skupine nisu imale normalnu distribuciju te sam Kruskal-Wallis testom ustanovila da ne postoji značajna razlika niti za relativnu ekspresiju gena *MAO* (KW=0,3701; p=0,9463), niti za onu gena *COMT* (KW=2,329; p=0,5070).



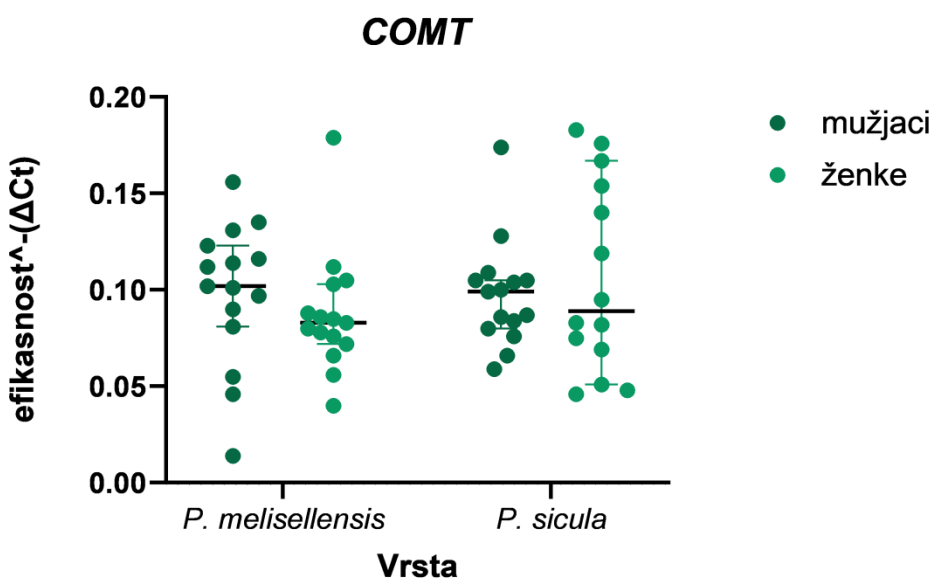
Slika 11. Raspodjela relativne ekspresije gena *MAO* prema lokalitetu, spolu i vrstama *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*.



Slika 12. Raspodjela relativne ekspresije gena *COMT* prema lokalitetu, spolu i vrstama *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*.



Slika 13. Raspodjela relativne ekspresije gena *MAO* prema spolu i vrstama *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*. Na grafu je prikazana vrijednost medijana i 95 %-tni interval pouzdanosti. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis testom.



Slika 14. Raspodjela ekspresije gena *COMT* prema spolu i vrstama *Podarcis sicula* i *Podarcis melisellensis*. Na grafu je prikazana vrijednost medijana i 95 %-tni interval pouzdanosti. Podaci su analizirani neparametrijskim Kruskal-Wallis testom.

5. RASPRAVA

Metodološki aspekti

Da bih ispitala sve komponente početnica specifičnih za umnažanje gena od interesa te istima umnožila uzorke cDNA gušterica odabrala sam qRT-PCR metodu. Za razliku od standardnog PCR-a koji količinu nastalog produkta detektira tek u krajnjoj točki, qRT-PCR detekciju obavlja nakon svakog reakcijskog ciklusa dajući sliku umnažanja u stvarnom vremenu. Kao dodatne komponente qRT-PCR sadrži fluorescentnu boju koja se veže na nastalu dvolančanu DNA i služi kao fluorometar za mjerenje razine fluorescencije. Boja koju sam odabrala je SYBR Green, fluorescentna boja koja vezana za dvolančanu DNA povećava njezinu fluorescenciju do 100 puta. Nedostatak ove boje je nespecifično vezanje, odnosno vezanje na svaku dvolančanu DNA, neovisno je li to DNA od interesa, dimeri početnica ili druge dvolančane strukture. Prednosti korištenja SYBR Greena su mogućnost dobivanja krivulje taljenja i financijska isplativost, što joj daje prednost nad korištenjem fluorescentnom bojom obilježene TaqMan sonde.

Optimalne temperaturne vrijednosti pri kojima je nastalo najviše produkta umnažanja razlikovale su se od temperatura taljenja početnica navedenih na informacijskom listu priloženom tubicama početnica (T_m ACTB2 F = 58,3 °C, T_m ACTB2 R = 59,1 °C; T_m MAO1 F = 57,8 °C, T_m MAO1 R = 57,3 °C; T_m COMT1 F = 60,4 °C, T_m COMT1 R = 60,1 °C) te su od navedenih temperatura odstupale do 6,5 °C. Bez obzira na razliku između eksperimentalno dobivenih temperaturnih vrijednosti i T_m vrijednosti navedenih na informacijskom listu, optimalne se temperaturne vrijednosti nalaze u uskom rasponu od 1,3 °C. Zbog tako uskog raspona, temperatura od 63,8 °C koju sam odabrala za provođenje qRT-PCR metode na svim uzorcima bila je zadovoljavajuća jer se na njoj svim odabranim parovima početnica umnoži isključivo cDNA od interesa.

Provjera efikasnosti važan je čimbenik uspješnosti eksperimenta i provodi se u vidu standardne krivulje dobivene na temelju C_t vrijednosti serijski razrijeđenih uzoraka. Efikasnost qRT-PCR reakcije uvelike ovisi o komponentama reakcijske smjese i vrlo je važno da se svaka provjera efikasnosti, u ovom slučaju provjera efikasnosti umnažanja cDNA specifičnim početnicama, odvija u jednakim uvjetima i jednakom sastavu reakcijskih smjesa. Također, efikasnost umnažanja mora biti neovisna o koncentraciji cDNA i potencijalnom zagađenju uzorka, a za što vjerodostojnije rezultate i ponovljivost eksperimenta, testiranje svih uzoraka poželjno je provesti u triplicatima čije bi C_t vrijednosti trebale imati vrijednost

standardne devijacije ispod 0,2. Efikasnost svih testiranih početnica nalazila se u prihvatljivom rasponu od 90 do 110%, koeficijent korelacije ACTB2 i COMT1 bio je iznad prihvatljive vrijednosti od 0,98, dok je onaj za MAO1 bio neznatno ispod nje (0,97). Za buduće poboljšanje eksperimenta bilo bi poželjno dizajnirati novi set specifičnih početnica za *COMT* čija bi efikasnost bila što sličnija efikasnosti početnica koje umnažaju *MAO* i referentni *ACTB*, kako bi konačna količina produkta nastalog umnažanjem svim početnicama bila otprilike jednaka što bi dobivenim rezultatima dalo dodatnu vjerodostojnost.

Ekspresija gena *MAO* i *COMT*

Trend istraživanja roda *Podarcis* nalazi se u eksponencijalnom rastu. Rod *Podarcis* zanimljiv je model: pripada skupini kralježnjaka, ali ne sisavaca, te obuhvaća veliki broj vrsta koje međusobno razvijaju dominantan odnos. Iz neurofiziološke perspektive, gušterice imaju konzervirane regije mozga, bazalne ganglije, uključene u veliki broj obrazaca ponašanja pod kontrolom katekolamina (Grillner and Robertson 2016), među kojima je zanimljiv odnos između jedinki vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*. *P. sicula* se redovito ponaša dominantno prema većem broju drugih vrsta iste porodice (Limnios i sur., 2022) pa tako i prema *P. melisellensis* te se pretpostavlja da je ta dominantnost posljedica veće agresivnosti u *P. sicula* (Downes i Bauwens, 2002).

Već su spomenuti Nikolić i sur. (2019) HPLC metodom dokazali prisutnost dvostruko veće razine dopamina u mozgu mužjaka vrste *P. sicula* u odnosu na *P. melisellensis*, međutim, razlog navedene razlike još nije poznat. Istraživanje ovih znanstvenika temeljilo se na istraživanju samo jedne populacije svake vrste (deset mužjaka i osam ženki obje vrste s područja Sinjskog polja), čime dobivene rezultate možemo primijeniti samo na toj populaciji. U ovom sam istraživanju odlučila proučavati jedinke obje vrste triju različitih populacija, s područja Paga, Sinja i Knina. Prednost ovog pristupa leži u tome da, ukoliko se pojedina varijabla ponavlja unutar vrste, bez obzira na lokalitet jedinki, možemo reći da se ta značajka odnosi na vrstu te da lokalitet na nju nema utjecaj. Analiziranjem većeg broja populacija iste vrste možemo donijeti zaključak o karakteristikama vrste te dobivene razlike među vrstama dobivaju na značajnosti. Međutim, zbog malog broja jedinki po lokalitetu i spolu, uspoređivala sam podatke samo prema vrsti i spolu te nisam bila u mogućnosti raditi trostruku usporedbu i uključiti varijablu lokaliteta, što predstavlja manu mojeg pristupa. Povećanje broja uzoraka moglo bi rasvijetliti moguće međupopulacijske razlike.

Hipoteza ovog diplomskog rada bila je da utjecaj na razinu dopamina u mozgu jedinki navedenih vrsta imaju dopamin regulirajući geni *MAO* i *COMT*, što dosad nije istraživano na

jedinkama porodice Lacertidae. U gušterica roda *Anolis* dokazana je izravna povezanost agresivnog ponašanja s razinom dopamina (Watt i sur., 2007; Kabelik i sur., 2014). U zebrica, dominantnost je popraćena smanjenom ekspresijom *COMT* gena (Pavlidis i sur., 2011), dok je u svinja agresivnost povezana sa smanjenom ekspresijom *MAOA* gena (Poletto i sur., 2011). U glodavaca i ljudi, povećana razina dopamina i agresivnog ponašanja povezana je sa smanjenom ekspresijom gena *MAO* i *COMT* (Volavka i sur., 2004) te je zabilježena u modelima *MAO* (Shih, 2004) i *COMT knock-out* miševa (Volavka i sur., 2004). S druge strane, smanjena razina dopamina u mišjem modelu parkinsonove bolesti nije bila popraćena promjenama u ekspresiji gena *MAO* i *COMT* (Xu i sur., 2005).

Prethodno navedene publikacije povezuju razlike u razini dopamina s promjenama u ekspresiji gena *MAO* i *COMT*. Međutim, analizom rezultata relativne ekspresije *MAO* i *COMT* u vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*, pokazala sam da nema statistički značajne razlike u ekspresiji ovih gena ni na jednoj od dvije razine – vrste i spola. Zbog dobivenih rezultata pretpostavljam da utjecaj na razliku u razini dopamina u roda *Podarcis* potencijalno imaju neki drugi dopamin regulirajući geni koji reguliraju aktivnost pripadajućih enzima. Jedan je od tih enzima tirozin hidroksilaza, limitirajući faktor u sintezi dopamina, prisutna u populacijama dopaminergičkih neurona živčanog sustava jedinki vrste *A. sagrei*. U agresivnih jedinki dokazana je smanjena prisutnost ovog enzima, čime je potvrđena izravna povezanost sinteze dopamina i agresivnog ponašanja (Kabelik i sur., 2014). U opisanom se istraživanju pratila aktivnost i distribucija tirozin hidroksilaznih imunoreaktivnih neurona te je pretpostavljen utjecaj ovih neurona na sintezu, odnosno oslobađanje dopamina, a ne izravno na razliku u razinama dopamina. Također, u *knock-out DAT* miševa, odnosno miševa s utišanim genom za ekspresiju dopaminskog transportera DAT (eng. *dopamine transporter*), odgovornog za regulaciju izvanstanične razine dopamina, primijećena je veća ekspresija D1 i D2 dopaminskih receptora, veća razina izvanstaničnog dopamina i veća agresivnost jedinki (Rodríguez i sur., 2004, Efimova i sur., 2016). DAT transporter nedostaje u mnogih vrsta ptica i gušterica te ga zamjenjuje NAT, što ukazuje na to da bi i NAT mogao imati važnu ulogu u regulaciji razine dopamina u gušterica ovog roda (Lovell i sur., 2015).

Bez obzira na rezultate istraživanja navedenih u prethodnom odlomku, u istraživanih populacija nije proučavana, utvrđena ili potvrđena razlika u dopaminu. Mogući utjecajni čimbenik na razinu dopamina je onaj sezonskog i cirkadijanog ritma. U mužjaka vrste *P. sicula* dokazana je sezonska promjena reproduktivne funkcije, točnije, povećanje testisa i pojačana spermatogeneza i endokrina aktivnost u razdoblju od travnja do sredine srpnja, odnosno smanjenje testisa krajem srpnja po završetku reproduktivnog razdoblja (Angelini i

Botte, 1992; Della Ragione i sur., 2005). Također, na jedinkama *P. sicula* proučavan je i utjecaj temperature i cirkadijanog ritma na ekspresiju gena *IPer2* i *IClock*, smještenih u jetri, koji reguliraju psihološke procese tijekom 24-satnog razdoblja. Dokazano je da izloženost jedinki temperaturi od 6 °C kao posljedicu ima utišavanje mRNA navedenih gena što rezultira njihovom smanjenom ekspresijom. Nakon trodnevne izloženosti jedinki navedenoj temperaturi proteini IPER2 i ICLOCK su i dalje bili prisutni u stanicama jetre, no na njima su primijećene određene modifikacije (Malatesta i sur., 2007). Malim je brojem istraživanja proučavana cirkadijana fluktuacija u ekspresiji gena *MAO*, međutim, ona je dokazana u kokoši (Chustecka i sur., 2019), riba (Huang i sur., 2015) i paukova (Wilson i sur., 2020). Još je manji broj takvih istraživanja za *COMT* u kojeg je dokazana cirkadijana varijacija ovisno o funkcionalnom *COMT* polimorfizmu rs4680 u ljudi (Ojeda i sur., 2014). Uzevši u obzir navedene rezultate, pretpostavljam da sezonski i cirkadijani ritam te temperatura potencijalno utječu na ekspresiju dopamin regulirajućih gena, pa tako i *MAO* i *COMT*, u jedinki vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*, što ima utjecaj na rezultat istraživanja mogjeg diplomskog rada.

Također, potencijalni učinak na razinu dopamina moglo bi imati bihevioralno istraživanje provedeno na jedinkama prije njihovog žrtvovanja i daljnje obrade njihovih uzoraka molekularnim metodama. Bihevioralno se istraživanje temeljilo na proučavanju inter- i intraspecijskog odnosa između jedinki s ciljem ispitivanja agresivnosti. Iako se navedeni dio istraživanja ne odnosi izravno na predmet istraživanja mogjeg diplomskog rada, važno ga je spomenuti jer ima potencijalni utjecaj na ispitivane jedinke. U istraživanju znanstvenika Summersa i Greenberga (1995) proučavan je utjecaj agresivnosti na kemijski sastav mozga mužjaka vrste *A. carolinensis* na način da je ispitivano uspostavljanje dominacije između parova mužjaka. Rezultati tog istraživanja pokazali su s vremenom smanjenu aktivaciju dopaminergičkog sustava u podređenih mužjaka. Na temelju opisanog istraživanja mogla bih pretpostaviti da bi bihevioralno istraživanje provedeno na pokusnim jedinkama možda moglo imati utjecaj na dopaminergički sustav određenih mužjaka te da bi se rezultati molekularnog istraživanja relativne ekspresije gena *MAO* i *COMT* možda razlikovali da bihevioralno istraživanje nije provedeno.

Kako bi se potvrdila razlika u razini dopamina i da bi se ustanovili uzroci te razlike u vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis*, potrebna su daljnja istraživanja koja bi potvrdila rezultate istraživanja Nikolić i sur. (2019) testiranjem razine dopamina u mozgu ovih jedinki te je potrebno ispitati ekspresiju većeg broja gena koji reguliraju razinu katekolamina u mozgu (na razini mRNA i proteina).

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata dobivenih u ovom diplomskom radu zaključujem da:

- 1) nema statistički značajne razlike u ekspresiji gena *MAO* i *COMT* u odnosu na spol i vrstu *P. sicula* i *P. melisellenis*, što je potvrđeno Kruskal-Wallis testom s Dunnovom mnogostrukom usporedbom;
- 2) zbog malog broja uzoraka nisam bila u mogućnosti raditi usporedbu na temelju lokaliteta;
- 3) na ranije dokazanu razliku u razini dopamina između vrsta *P. sicula* i *P. melisellenis* najvjerojatnije utječu drugi dopamin regulirajući geni.

7. LITERATURA

Angelini, F., Botte, V. (1992) 'Spermatogenesis in reptiles, dynamic and regulatory aspect in sex origin and evolution'. U: Dallai, R. (Ed.), Mucchi Selected Symposia and Monographs UZI, vol. 6, pp. 211–230.

Arnold, E. N. (1989) 'Towards a phylogeny and biogeography of the Lacertidae: relationships within an Old-World family of lizards derived from morphology'. Bulletin of the British Museum (Natural History) Zoology 55, 209–257.

Bandelin (2004) Short operating instructions, SONOPULS Ultrasonic homogenizers HD 2070, HD 2200, Pub. No. 5756

BHHUATRA (2020) Dalmatinski zidni (krški) gušter: *Podarcis melisellensis*. Dostupno na: <https://www.bhhuatra.com/species/reptiles/podarcis-melisellensis-1> Bosansko-Hercegovačko Herpetološko Udruženje Atra [7. kolovoza 2021.]

Biologer – *Podarcis melisellensis*. Dostupno na: <https://biologer.hr/hr/groups/13/species/227> [7. Kolovoza 2021.]

Chustecka, M., Owczarek, A., Winiarska, K., Adamska, I., Markowska, M. (2019) 'Circadian changes of the monoamine oxidase in the pineal gland of chicken *Gallus gallus domesticus* L.'. FEBS Open Bio9 (Suppl. 1) pp.185. doi: 10.1002/2211-5463.12675.

Creative Enzymes - Monoamine oxidase. Dostupno na: https://www.creative-enzymes.com/similar/monoamine-oxidase_436.html [5. siječnja 2022.]

Darwin, C. (1859) 'On the Origin of Species by means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life'. London: John Murray. Dostupno na: <http://darwin-online.org.uk/content/frameset?itemID=F373&viewtype=text&pageseq=1> [16. srpnja 2021.]

Della Ragione, F., Comitato, R., Angelini, F., D'Esposito, M., Cardone, A. (2005) 'Molecular cloning and characterization of the clock gene *period2* in the testis of lizard *Podarcis sicula*

and its expression during seasonal reproductive cycle', *Gene*, 363(1–2), pp. 105–112. doi: 10.1016/j.gene.2005.08.018.

Downes, S., Bauwens, D. (2002) 'An experimental demonstration of direct behavioural interference in two Mediterranean lacertid lizard species', *Animal Behaviour*, 63(6), pp. 1037–1046. doi: 10.1006/anbe.2002.3022.

Efimova, E., V., Gainetdinov, R., R., Evgeny, A., B., Sotnikova, T., D. (2016) 'Dopamine transporter mutant animals: a translational perspective', *Journal of Neurogenetics*, 30(1), pp. 5–15. doi:10.3109/01677063.2016.1144751.

Grillner, S., Robertson, B. (2016) 'The Basal Ganglia Over 500 Million Years', *Current Biology*, 26, pp. 1088–1100. doi: 10.1016/2016.06.041.

High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (2018). ThermoFisher Scientific, Pub. No. 4387949

Huang, J. Zhaomin, Z., Mingyong, W., Chen, X., Yicheng, T., Zhang, S., He, W., He, X., Huang, G., Lu, H., Wu, P., Che, Y., Yan, Y., Postlethwait, J., Chen, W., Wang, H. (2015) 'Circadian modulation of dopamine levels and dopaminergic neuron development contributes to attention deficiency and hyperactive behavior', *Journal of Neuroscience*, 35(6), pp. 2572–2587. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2551-14.2015.

Integrated Taxonomic Information System – Report: *Podarcis* Wagler (2021). Dostupno na: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=564544#null [7. kolovoza 2021.]

Ittiofauna.org - *Web Museo della Fauna Europea, La lucertola adriatica, Podarcis melisellensis* (Braun, 1877). Dostupno na: <http://www.ittiofauna.org/index.htm> [5. travnja 2022.]

Kabelik, D., Alix, V. C., Singh, L. J., Johnson, A. L., Choudhury, S. C., Elbaum, C. C., Scott, M. R. (2014) 'Neural activity in catecholaminergic populations following sexual and aggressive interactions in the brown anole, *Anolis sagrei*', *Brain Research*, 1553, pp. 41–58.

doi: 10.1016/j.brainres.2014.01.026.

Limnios, A., Adamopoulou, C., Carretero, M. A., Pafilis, P. (2022) 'Invasive Italian wall lizards outcompete native congeneric species in finding food in a Y-maze', *Acta Ethologica*, 25(1), pp. 43–55. doi: 10.1007/s10211-021-00385-8.

Lovell, P., V., Kasimi, B., Carleton, J., Velho, T., A., Mello, C., V. (2015) 'Living without DAT: Loss and compensation of the dopamine transporter gene in sauropsids (birds and reptiles)', *Scientific Reports*, 5, pp. 1-12. doi: 10.1038/srep14093

Malatesta, M., Frigato, E., Baldelli, B., Battistelli, S., Foa, A., Bertolucci, C. (2007) 'Influence of temperature on the liver circadian clock in the ruin lizard *Podarcis sicula*', *Microscopy Research and Technique*, 70(7), pp. 578–584. doi: 10.1002/jemt.20437.

Matsumoto, M., Weickert, C. S., Akil, M., Lipska, B. K., Hyde, T. M., Herman, M. M., Kleinman, J. E., Weinberger, D. R. (2003) 'Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: Evidence for a role in cortical neuronal function', *Neuroscience*, 116(1), pp. 127–137. doi: 10.1016/S0306-4522(02)00556-0.

Matter, J. M., Ronan, P. J., Summers, C. H. (1998) 'Central Monoamines in Free-Ranging Lizards: Differences Associated with Social Roles and Territoriality', *Brain, Behavior and Evolution*, 51(1), pp. 23–32. doi: 10.1159/000006526.

Miller, R. S. (1967) 'Pattern and Process in Competition', *Advances in Ecological Research*, 4(C), pp. 1–74. doi: 10.1016/S0065-2504(08)60319-0.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 681, Dopamine. Dostupno na: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dopamine> [5. siječnja 2022.]

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [16. ožujka 2022.]

Nikolic, B., Josic, P., Buric, D., Tkalec, M., Lisicic, D., Blazevic, S. A., Hranilovic, D. (2019)

‘Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations’, *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 205(4), pp. 451–456. doi: 10.1007/s00359-019-01335-3.

Nilsson, K. W., Sjöberg, R. L., Wargelius, H. L., Leppert, J., Lindström, L., Oreland, L. (2007) ‘The monoamine oxidase A (MAO-A) gene, family function and maltreatment as predictors of destructive behaviour during male adolescent alcohol consumption’, *Addiction*, 102(3), pp. 389–398. doi: 10.1111/j.1360-0443.2006.01702.x.

Ojeda, D. A., Perea, C. S., Suarez, A., Nino, C. L., Gutierrez, R. M., Lopez-Leon, S., Adan, A., Arboleda, H., Camargo, A., Forero, D. A. (2014) ‘Common functional polymorphisms in SLC6A4 and COMT genes are associated with circadian phenotypes in a South American sample’, *Neurological Sciences*, 35(1), pp. 41–47. doi: 10.1007/s10072-013-1466-x.

Pavlidis, M., Sundvik, M., Chen, Y. C., Panula, P. (2011) ‘Adaptive changes in zebrafish brain in dominant-subordinate behavioral context’, *Behavioural Brain Research*, 225(2), pp. 529–537. doi: 10.1016/j.bbr.2011.08.022.

Poletto, R., Cheng, H. W., Meisel, R. L., Richert, B. T., Marchant-Forde, J. N. (2011) ‘Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a β -adrenoreceptor agonist’, *Brain Research*, 1381, pp. 11–20. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.035.

Raynor, R. G. (1989) ‘Ecological segregation between *Podarcis sicula* and *Podarcis melisellensis* in Yugoslavia’, *Herpetological journal*, 1, pp. 418–420.

Rocha, I. (2022) ‘*Podarcis sicula* (Italian wall lizard)’. U: Invasive Species Compendium. Wallingford, UK: CAB International. Dostupno na: <https://www.cabi.org/isc> [7. Kolovoza 2021.]

Rodriguez, R. M., Chu, R., Caron, M. G., & Wetsel, W. C. (2004). ‘Aberrant responses in social interaction of dopamine transporter knockout mice’. *Behavioural Brain Research*, 148, pp. 185-198.

Shih, J. C. (2004) 'Cloning, after Cloning, Knock-out Mice, and Physiological Functions of MAO A and B', *NeuroToxicology*, 25(1–2), pp. 21–30. doi: 10.1016/S0161-813X(03)00112-8.

Singer, T. P. (2018) 'Monoamine oxidases', *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes*, 2(1971), pp. 437–470. doi: 10.1201/9781351070584.

SinoBiological - COMT Protein Overview: Sequence, Structure, Function and Protein Interaction. Dostupno na: <https://www.sinobiological.com/resource/comt/proteins> [8. siječnja 2022.]

Smeets, W. J. A. J., Pérez-Clausell, J., Geneser, F. A. (1989) 'The distribution of zinc in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko* - A histochemical study', *Anatomy and Embryology*, 180(1), pp. 45–56. doi: 10.1007/BF00321899.

Summers, C. H., Greenberg, N. (1995) 'Activation of central biogenic amines following aggressive interaction in male lizards, *Anolis carolinensis*', *Brain, behavior and evolution*, 45(6), pp. 339–349. doi: 10.1159/000113561.

Volavka, J., Bilder, R., Nolan, K. (2004) 'Catecholamines and aggression: The role of *COMT* and *MAO* polymorphisms', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1036, pp. 393–398. doi: 10.1196/annals.1330.023.

Watt, M. J., Forster, G. L., Korzan, W. J., Renner, K. J., Summers, C. H. (2007) 'Rapid neuroendocrine responses evoked at the onset of social challenge', *Physiology and Behavior*, 90(4), pp. 567–575. doi: 10.1016/j.physbeh.2006.11.006.Rapid.

Wilson E. O. (1970) 'Competitive and aggressive behavior'. *Social Science Information* 9(6): 123-154

Wilson, R. J., Ahmed, T. H., Rahman, M. M., Cartwright, B. M., Jones, T. C. (2020) 'Identification and activity of monoamine oxidase in the orb-weaving spider *Larinioides cornutus*', *General and Comparative Endocrinology*, 299 (October 2019), p. 113580. doi: 10.1016/j.ygcen.2020.113580.

Winberg, S., Nilsson, G. E. (1993) 'Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish', *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Comparative*, 106(3), pp. 597–614. doi: 10.1016/0742-8413(93)90216-8.

Xu, Z., Cawthon, D., McCastlain, K. A., Slikker, W., Ali, S. F. (2005) 'Selective alterations of gene expression in mice induced by MPTP', *Synapse*, 55(1), pp. 45–51. doi: 10.1002/syn.20089.

Yodyingyuad, U., de la Riva, C., Abbott, D. H., Herbert, J., Keverne, E. B. (1985) 'Relationship between dominance hierarchy, cerebrospinal fluid levels of amine transmitter metabolites (5-hydroxyindole acetic acid and homovanillic acid) and plasma cortisol in monkeys', *Neuroscience*, 16(4), pp. 851–858. doi: 10.1016/0306-4522(85)90099-5.

8. ŽIVOTOPIS

Sara Zvonar rođena je 13.02.1998. godine u Zagrebu kao dijete Brune i Melite Zvonar. Završila je Osnovnu školu Đurđevac te opću gimnaziju dr. Ivana Kranjčeva u Đurđevcu. Krajem osnovnoškolskog te cijelog srednjoškolskog obrazovanja bila je član Kulturno umjetničkog društva Petar Preradović u Đurđevcu i djevojačkog zbora Gimnazije dr. Ivana Kranjčeva.

Preddiplomski je studij biologije na Sveučilištu Josip Juraj Strossmayer, Odjel za biologiju u Osijeku upisala 2016. godine te ga završila 2019. godine završnim radom na temu „Zimovanje male ušare (*Asio otus* L. 1758) u Osijeku i okolici“ pod mentorstvom doc. dr. sc. Alme Mikuške. Za vrijeme trajanja preddiplomskog studija dvije je godine sudjelovala u projektu popularizacije znanosti „Biolog i ja“ Odjela za biologiju u sklopu kojeg je vodila radionice izrade sapuna te edukacije o razredu ptica (*Aves*). Bila je demonstratorica na kolegiju Anatomija i histologija čovjeka i kolegiju Kralježnjaci te jedne godine članica Udruge studenata biologije ZOA. Radom na terenu 2019. godine sudjelovala je u prikupljanju podataka o broju kolonija gačaca (*Corvus frugilegus* L. 1758) na području grada Đurđevca.

Diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija u Zagrebu upisala je 2019. godine. Za vrijeme trajanja diplomskog studija sudjelovala je na nekoliko predavanja Sekcije za ptice Udruge studenata BIUS, a izvan studiranja obavljala je studentski posao u trgovini Zara.

9. PRILOG – PROTOKOLI I TABLICE

- 1) Protokol za žrtvovanje
- 2) Protokol za homogenizaciju
- 3) Protokol za izolaciju RNA
- 4) Protokol za dizajn početnica
- 5) Protokol za qRT-PCR
- 6) Slika P4
- 7) Tablica P1
- 8) Tablica P2
- 9) Tablica P3

PROTOKOLI

1) Protokol za žrtvovanje

Materijali

Postolje za žrtvovanje
Filter papir
Laboratorijske škare
Mikropipeta (20 – 200 μ L)
Obični tipsevi
Pinceta
Igllice
Laboratorijska špatula
Skalpel
Eppendorf epruvete (1 i 2 mL)
Falcon epruvete
Stalak za falcon epruvete
Led
Suhi led
Kutije od stiropora
Postolje za vađenje mozga (Petrijeva zdjelica bez poklopca i spužvica → smrznuto)

Lampa
Aluminijska folija
Markeri
Predmetna stakalca
Kapaljka
Papirnati ubrusi
Vatice
Plamenik
Analitička vaga
Rukavice
Parafilm

Otopine

70 i 96 %-tni etanol (C_2H_5OH)
Natrijev citrat ($C_6H_5Na_3O_7$)
Paraformaldehid ($OH(CH_2O)_nH$ (n=8-1000))

Postupak

1. Izvaditi guštericu iz kutije.
2. Glavu gušterice odrezati laboratorijskim škarama. Krv iz glave ispustiti na predmetno stakalce za krvni razmaz, a ispuštenu krv iz tijela ispustiti na parafilm i sakupiti pipetom namještenom na 200 μ L te prebaciti u eppendorf epruvetu od 1 mL. Tips pipete prethodno isprati natrijevim citratom. Tubicu pohraniti na ledu.
3. Glavu staviti na postolje za vađenje mozga pokriveno aluminijskom folijom. Laboratorijskim škarama napraviti dva bočna reza lubanje, podignuti svod lubanje i laboratorijskom špatulom izvaditi mozak. Staviti ga na aluminijsku foliju i pohraniti pohraniti

u kutiji od stiropora ispunjenoj suhim ledom (-80°C). Nakon nekoliko minuta izvaditi mozak iz suhog leda i skalpelom odvojiti hemisfere. Desnu hemisferu laboratorijskom špatulom prebaciti u prethodno izvaganu tubicu od 2 mL za RNA analizu, a lijevu hemisferu u prethodno izvaganu tubicu od 2 mL za HPLC. Tubice pohraniti na -80°C do ponovnog vaganja.

4. Prerezati rep na tri dijela. Vrh repa baciti, a ostala dva dijela prebaciti u posebne tubice i napuniti ih 96 %-tnim etanolom tako da je cijeli dio repa uronjen u njega.

5. Laboratorijskim škarama napraviti ventralni medijalni rez od kaudalnog dijela trupa do vrata. Tijelo i glavu guštera prebaciti u falcon epruvetu i napuniti ju paraformaldehidom tako da su cijelo tijelo i glava uronjeni u njega.

6. Korišteni pribor prebrisati papirnatim ubrusom/vaticom natopljenim/om vodom, a potom flambirati uranjanjem u 70 %-tni etanol i paljenjem.

2) Protokol za homogenizaciju

Materijali

Ultrazvučni uređaj za homogeniziranje

Mikropipeta

Kutija od stiropora

Suhi led

Plastična čaša

Papirnati ubrusi

Otopine

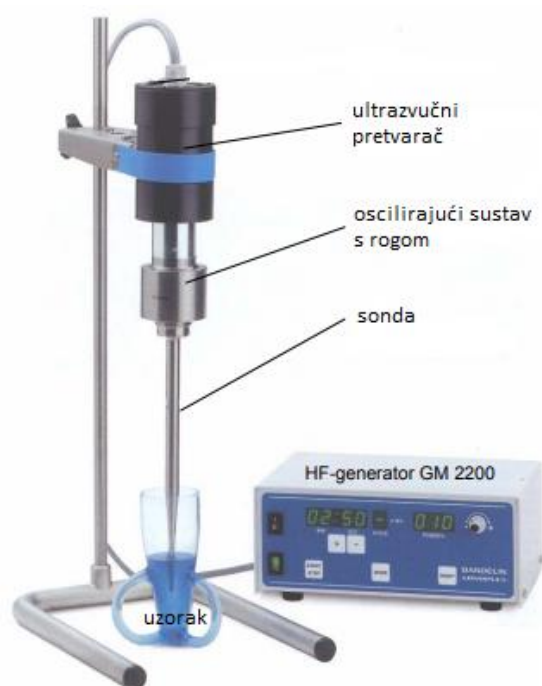
SK Buffer (pufer)

Destilirana voda (H₂O)

70 %-tni etanol (C₂H₅OH)

Postupak

1. Sastaviti ultrazvučni uređaj za homogeniziranje (Slika P1) i namjestiti snagu generatora na 10 %.
2. U eppendorf epruvetu s pohranjenim mozgom mikropipetom dodati 300 μL SK Buffera.
3. Uroniti sondu do dna eppendorf epruvete (spustiti tkivo što više na dno), pritisnuti start na generatoru i homogenizirati otprilike šest sekundi (po potrebi i dulje – ne preporuča se dulje od 10 sekundi). Na kraju homogeniziranja pritisnuti stop, a zatim dva puta reset.
4. Homogenizirani uzorak staviti u kutiju od stiropora ispunjenu suhim ledom, a zatim pohraniti na -80°C.
5. Isprati sondu destiliranom vodom i 70 %-tnim etanolom (tim redoslijedom) te prebrisati papirnatim ubrusom.



Slika P1. Ultrazvučni uređaj za homogeniziranje. Prilagođeno prema Bandelin (2004).

3) Protokol za izolaciju RNA

Priprema uzoraka

Nakon homogenizacije i prije izolacije kratko centrifugirati uzorke.

POČETNI KORACI IZOLACIJE DNA (*koristimo obične tipseve)

a) vezanje DNA za kolonicu

1. Staviti gDNA kolonicu u eppendorf epruvetu.
2. Prebaciti željeni volumen supernatanta homogenata (do 600 μ l) na kolonicu i centrifugirati 1 minutu na 14 000 x g.
→ Ukoliko cijeli volumen supernatanta nije prošao kroz kolonicu, centrifugirati još 1 minutu.
3. „Filtrirani“ supernatant koristiti za nastavak protokola za izolaciju RNA te pohraniti na ledu ili -20°C do završetka pročišćavanja DNA.

IZOLACIJA RNA (*koristimo RNase - free tipseve)

a) vezanje RNA na kolonicu

1. U eppendorf epruvetu s "filtriranim" supernatantom iz DNAA3 koraka dodati 180 μ l 96 %-tnog etanola. Vorteksirati. Pipetom izvući cijeli volumen otopine.
2. Staviti RNA/protein kolonicu u istu eppendorf epruvetu iz koje je izvučena otopina.
3. Dodati otopinu na kolonicu i centrifugirati 1 minutu na ≥ 3500 x g.
→ Ukoliko cijeli volumen otopine nije prošao kroz kolonicu, centrifugirati još 1 minutu na 14 000 x g.
4. SVU „filtriranu“ otopinu koristiti za nastavak protokola za izolaciju proteina te pohraniti na ledu ili -20°C do završetka pročišćavanja RNA.

b) ispiranje RNA

1. Dodati 400 μ L Wash solution A na kolonicu i centrifugirati 1 minutu na 14 000 x g.
→ Ukoliko cijela otopina nije prošla kroz kolonicu, centrifugirati još 1 minutu. **Baciti „filtriranu“ otopinu.**
2. Dodati 400 μ L Wash solution A na kolonicu i centrifugirati 1 minutu na 14 000 x g. **Baciti „filtriranu“ otopinu.**

3. Dodati 400 μ L Wash solution A na kolonicu i centrifugirati 1 minutu na 14 000 x g. **Baciti „filtriranu“ otopinu.**

4. Centrifugirati 2 minute na 14 000 x g da bi se kolonica osušila. **Sačuvati kolonicu.**

c) elucija RNA

1. Kolonicu staviti u tubicu za eluciju od 1,7 mL.

2. Dodati 50 μ L Elution solution A na kolonicu.

3. Centrifugirati 2 minute na 200 x g.

4. Centrifugirati 1 minutu na 14 000 x g. Zabilježiti volumen eluirane otopine ($v = 50 \mu$ L).

→ Ukoliko cijeli volumen otopine nije eluiran, centrifugirati još 1 minutu na 14 000 x g. Sačuvati kolonicu za izolaciju proteina.

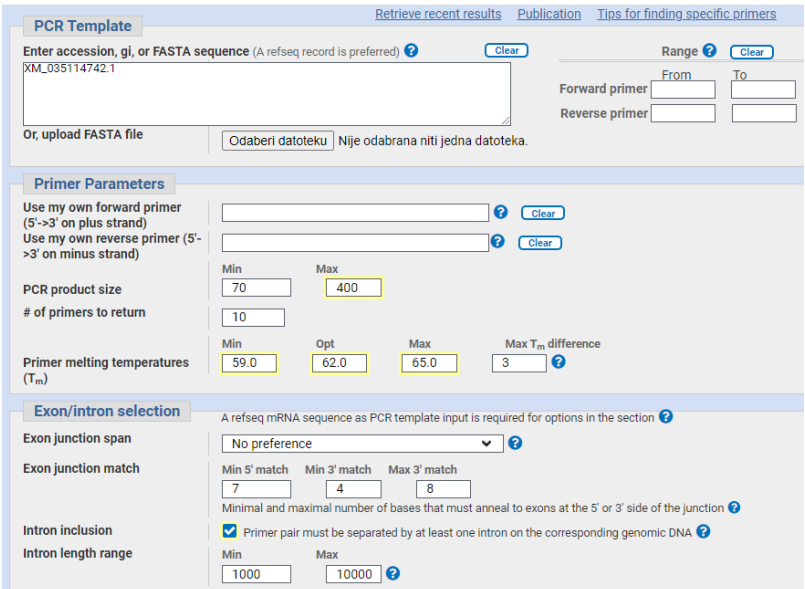
d) pohrana RNA

Pročišćenu RNA pohraniti na -20°C do par dana. Za dugotrajnu pohranu čuvati na -70°C .

4) Protokol za dizajn početnica

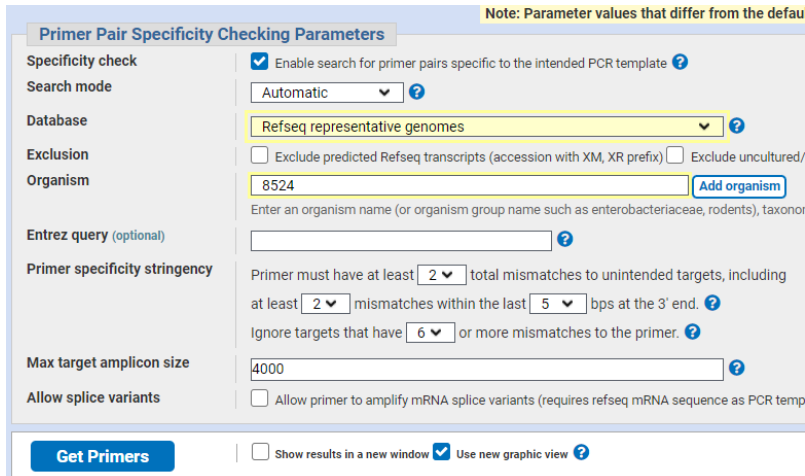
1. Na web stranici NCBI-a odabrati alat “Nucleotide BLAST” te u “Enter Query Sequence” kopirati nukleotidni slijed klastera od interesa. Bazu podataka namjestiti na “Nucleotide collection (nr/nt)”, program optimizirati za “Highly similar sequences (megablast)” te pokrenuti program (BLAST-ati).
2. Nakon što program pretraži sve sekvence koje se podudaraju sa traženom, odabrati željenu (u ovom slučaju vrstu *Zootoca vivipara*, budući da sekvence genoma vrsta *P. sicula* i *P. melisellensis* još nisu u sustavu).
3. Odabrati “Graphics” i zatim “Pick primers”.
4. Namjestiti parametre (Slika P2 a i b) i zatim “Get primers”.

a)



The screenshot shows the 'PCR Template' section with the accession number 'XM_035114742.1' entered. The 'Primer Parameters' section includes fields for 'PCR product size' (Min: 70, Max: 400), '# of primers to return' (10), and 'Primer melting temperatures (T_m)' (Min: 59.0, Opt: 62.0, Max: 65.0, Max T_m difference: 3). The 'Exon/intron selection' section has 'Exon junction span' set to 'No preference', 'Exon junction match' (Min 5' match: 7, Min 3' match: 4, Max 3' match: 8), and 'Intron inclusion' checked.

b)



The screenshot shows the 'Primer Pair Specificity Checking Parameters' section. It includes a 'Specificity check' checkbox (checked), 'Search mode' set to 'Automatic', 'Database' set to 'Refseq representative genomes', and 'Organism' set to '8524'. The 'Primer specificity stringency' section has 'Primer must have at least 2 total mismatches to unintended targets, including at least 2 mismatches within the last 5 bps at the 3' end' and 'Ignore targets that have 6 or more mismatches to the primer'. The 'Max target amplicon size' is set to 4000. A 'Get Primers' button is visible at the bottom.

Slika P2. a) i b) Prikaz parametara za određivanje adekvatnih početnica za klaster od interesa.

Preuzeto sa NCBI.

5. Nakon što dobijemo rezultat, treba provjeriti umnaža li odabrani par početnica klaster od našeg interesa (Slika P3 a i b).

a)

b)

Slika P3. a) i b) Prikaz parametara za provjeru komplementarnosti odabranih početnica s klasterom od interesa. Preuzeto sa NCBI.

6. Rezultat je ove provjere popis produkata umnažanja na određenim klasterima. Ukoliko se na tom popisu nađe i klaster od interesa provjera je uspješna i odabrane će početnice umnožiti, odnosno amplificirati isti. Ponekad se produkt umnažanja razlikuje u ponekoj nukleotidnoj bazi (adeninu, citozinu, tirozinu ili gvaninu) od nukleotidnog slijeda početnica od interesa te je u tom slučaju potrebno zamijeniti nepripadajuće početnice ispravnima i dobit ćemo 100 % komplementarnost.

5) Protokol za qRT-PCR

1. Pripremiti reakcijsku smjesu (bez cDNA) i lagano je vorteksirati da bi se svi njezini sastojci pomiješali.

Originalna reakcijska smjesa navedena u Promeginom priručniku za korištenje GoTaq qPCR Master Mixa (prema kojoj sam prilagodila reakcijsku smjesu za qRT-PCR pokusnih uzoraka):

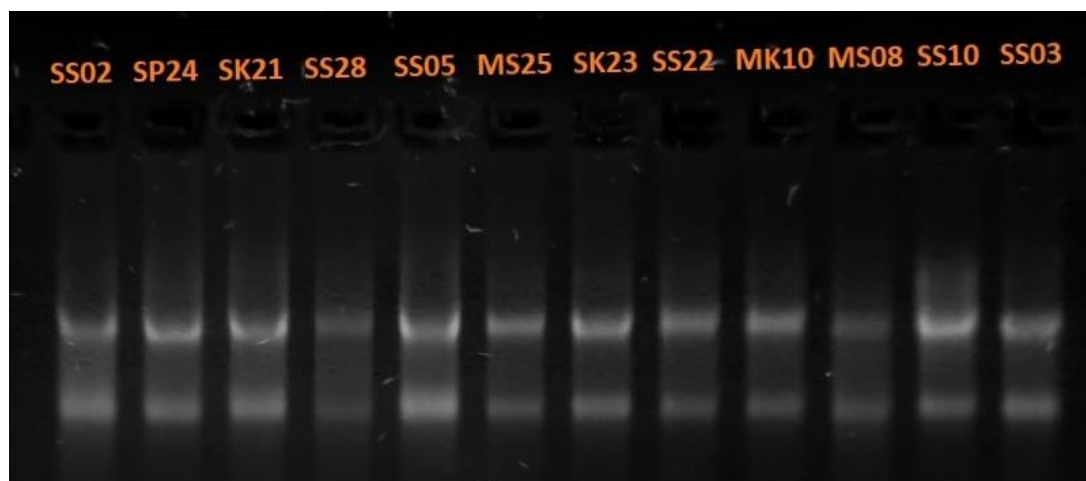
- 10 μL GoTaq MM 2x
- 1 μL (10 μM) *reverse* početnica
- 1 μL (10 μM) *forward* početnica
- do 18 μL H_2O

2. Dodati odabrani volumen reakcijske smjese u svaku jažicu qRT-PCR pločice.

3. Dodati 2 μL cDNA (ili vode - kontrola) u određenu jažicu qRT-PCR pločice. Svaki uzorak raditi u triplikatu.

4. Zatvoriti qRT-PCR pločicu i lagano centrifugirati da bi se svi sastojci reakcijske smjese spustili na dno jažice.

SLIKE I TABLICE



Slika P4. Uzorci na gelu. Vidljive su veća gornja (28S) te manja donja pruga (18S) ribosomske RNA. Autor fotografije Dunja Šikić.

Tablica P1. Rezultati mjerenja koncentracije RNA i čistoće uzoraka (N=110)

Naziv uzorka	Prosjek OD 260/280	Prosjek OD 260/230	Prosjek koncentracija
SP01	2,23	1,57	408,52
SP02	2,18	2,17	351,68
SP03	2,16	2,21	269,98
SP04	2,19	2,56	222,76
SP05	2,19	2,16	387,63
SP06	2,20	1,68	320,16
SP07	2,17	1,92	346,62
SP08	2,19	2,32	349,12
SP09	2,19	2,02	317,05
SP10	2,23	1,91	261,58
SP21	2,20	1,52	241,03
SP22	2,2	2,11	328,48
SP23	2,18	1,98	224,84
SP24	1,89	0,48	163,34
SP25	2,19	1,59	318,19
SP26	2,19	2,04	337,45
SP27	2,15	2,25	415,59
SP28	2,05	2,52	375,8
SP29	2,16	2,25	274,39

SP30	2,22	1,76	265,89
SS01	2,13	2,29	249,87
SS02	2,1	2,2	280,53
SS03	2,16	2,18	319,64
SS04	2,09	1,9	350,55
SS05	2,19	2,07	355,74
SS06	2,2	2,01	321,7
SS07	2,15	2,45	358,01
SS08	2,18	2,08	322,76
SS09	2,27	2,01	444,67
SS10	2,14	2,02	353,34
SS21	2,01	1,12	216,93
SS22	2,14	2,22	227,9
SS23	2,05	2,45	369,38
SS24	2,02	2,31	320,91
SS25	2,02	1,97	320,98
SS26	2,08	2,18	232,78
SS27	2,30	1,08	204,05
SS28	2,14	1,88	116,45
SS29	2,26	1,47	314,35
SS30	2,02	2,12	204,99
SK01	2,2	2,1	394,75
SK02	2,21	1,08	204,48
SK03	2,11	1,52	347,98
SK04	2,02	1,17	344,44
SK05	2,19	1,64	391,63
SK06	2,19	2,01	478,29
SK07	2,21	1,8	402,56
SK08	2,21	2,11	421,68
SK09	2,17	2,24	361,02
SK10	2,21	2,09	430,70
SK21	2,14	2,11	284,22
SK22	1,94	1,81	209,97
SK23	2,15	2,16	315,73
SK24	2,21	2,07	418,27
SK25	2,21	1,50	175,67
SK26	2,22	2,03	274,59
SK27	2,22	1,78	185,6

SK28	2,15	2,07	345,36
SK29	2,21	2,8	208,31
SK30	2,07	1,59	339,96
MP02	2,13	1,94	251,63
MP03	2,13	2,10	290,94
MP06	2,21	2,68	182,74
MP07	2,15	2,5	298,48
MP09	2,19	2,08	277,67
MP10	2,17	2,18	333,56
MP21	2,18	2,14	227,05
MP22	2,2	2,56	248,72
MP23	2,09	1,26	242,38
MP24	2,18	2,32	230,23
MP25	2,14	2,29	257,14
MP26	2,14	1,73	179,91
MP27	2,15	1,31	264,28
MP28	2,18	1,82	226,08
MP29	2,2	2,53	202,03
MP30	2,13	2,27	256,86
MS01	2,17	1,18	222,32
MS02	2,02	2,57	321,36
MS03	2,03	2,28	323,29
MS05	2,14	1,70	281,21
MS06	2,16	2,08	396,55
MS07	2,29	2,16	160,37
MS08	2,15	2,25	249,8
MS09	2,03	2,54	309,32
MS21	2,16	1,81	211,09
MS22	1,88	1,01	206,7
MS23	2,19	1,91	260,15
MS25	2,15	1,67	263,68
MS26	2,10	1,67	321,07
MS27	2,18	2,12	297,32
MS28	1,96	2,44	245,91
MS29	2,11	2,31	241,2
MS30	2,20	2,73	230,55
MK01	2,19	1,79	237,42
MK02	2,23	2,16	224,83

MK03	2,17	2,18	305,94
MK05	2,15	2,40	272,88
MK06	2,18	1,90	294,41
MK07	1,92	1,65	185,91
MK08	2,20	1,14	255,35
MK09	2,14	1,37	168,42
MK10	2,16	2,11	264,18
MK21	2,07	1,57	229,25
MK22	2,15	1,98	355,74
MK23	2,26	1,97	236,64
MK24	2,01	1,99	286,31
MK25	2,17	2,15	299,18
MK28	2,02	1,27	186,21
MK29	2,08	1,51	187,19
MK30	2,24	2,07	287,63

Tablica P2. Ct vrijednosti testa efikasnosti ACTB2, MAO1, COMT1 i različite koncentracije cDNA

Oznaka	Koncentracija [ng/ μ L]	Logaritam koncentracije cDNA u radnoj otopini	ACTB2		MAO1		COMT1	
			Ct	Srednja vrijednost Ct	Ct	Srednja vrijednost Ct	Ct	Srednja vrijednost Ct
c1	1	0					16,82	17,35
							18	
							17,24	
c2	0,5	-0,30	17,12	17,12	20,68	20,78	17,61	17,87
			17,12		20,96		17,71	
			17,5		20,69		18,29	
c3	0,25	-0,60	18,08	18,16	22,36	21,36	18,51	18,82
			18,23		20,68		19,21	
			16,93		21,03		18,74	
c4	0,125	-0,90	18,77	18,73	21,91	22,26	20,29	20,27
			18,72		22,16		20,24	
			18,71		22,36		20,28	
c5	0,063	-1,2	20,06	20,07	24,24	23,60	21,41	21,47
			20,09		23,42		21,4	
			20,06		23,13		21,59	
c6	0,031	-1,51					22,6	22,53
							22,72	
							22,28	
c7	0,016	-1,81					23,28	23,4
							23,23	
							23,69	
Nagib			-3,13		-3,11		-3,57	
Efikasnost			108,6		109,8		90,5	

*kurzivom su označene vrijednosti izbačene iz izračuna

Tablica P3. Relativna ekspresija gena *MAO* i *COMT* za oba spola obje vrste svih lokaliteta te medijana (MED) i standardne pogreške (SEM)

Naziv uzorka	Lokalitet	Spol	Relativna ekspresija <i>MAO</i>	Relativna ekspresija <i>COMT</i>
SP01	PAG	M	0,157	0,105
SP04			0,056	0,099
SP05			0,092	0,109
SP07			0,079	0,066
SP10			0,104	0,076
		MED	0,092	0,099
		SEM	0,017	0,009
SP21	PAG	Ž	0,055	0,048
SP24			0,116	0,095
SP25			0,079	0,083
SP27			0,156	0,176
SP28			0,087	0,119
		MED	0,087	0,095
		SEM	0,017	0,021
		MED (lokalitet)	0,090	0,097
		SEM (lokalitet)	0,011	0,011
SS01	SINJ	M	0,067	0,100
SS03			0,063	0,084
SS05			0,070	0,087
SS08			0,088	0,128
SS10			0,045	0,104
		MED	0,067	0,100
		SEM	0,007	0,008
SS21	SINJ	Ž	0,494	0,550
SS25			0,086	0,051
SS26			0,061	0,046
SS27			0,122	0,075
SS30			0,056	0,069
		MED	0,074	0,060
		SEM	0,015	0,007
		MED (lokalitet)	0,067	0,084
		SEM (lokalitet)	0,008	0,009
SK01	KNIN	M	0,120	0,086
SK02			0,131	0,105

SK04			0,063	0,059
SK05			0,134	0,174
SK09			0,102	0,080
		MED	0,120	0,083
		SEM	0,016	0,010
SK21	KNIN	Ž	0,145	0,183
SK23			0,094	0,167
SK24			0,158	0,154
SK26			0,081	0,140
SK27			0,069	0,082
		MED	0,094	0,154
		SD	0,018	0,017
		MED (lokalitet)	0,120	0,105
		SEM (lokalitet)	0,012	0,015
MP02	PAG	M	0,095	0,101
MP03			0,111	0,097
MP07			0,114	0,046
MP10			0,101	0,131
		MED	0,106	0,099
		SEM	0,004	0,018
MP24	PAG	Ž	0,096	0,088
MP26			0,084	0,112
MP27			0,134	0,078
MP29			0,111	0,040
MP30			0,085	0,105
		MED	0,096	0,088
		SEM	0,009	0,013
		MED (lokalitet)	0,101	0,097
		SEM (lokalitet)	0,005	0,010
MS02	SINJ	M	0,050	0,081
MS05			0,200	0,090
MS07			0,109	0,156
MS08			0,110	0,123
MS09			0,089	0,114
		MED	0,109	0,114
		SEM	0,025	0,013
MS22	SINJ	Ž	0,142	0,085
MS25			0,083	0,083

MS26			0,088	0,086
MS27			0,096	0,103
MS28			0,054	0,056
		MED	0,088	0,085
		SEM	0,014	0,008
		MED (lokalitet)	0,093	0,088
		SEM (lokalitet)	0,014	0,009
MK01	KNIN	M	0,088	0,116
MK02			0,080	0,112
MK03			0,101	0,055
MK06			0,078	0,135
MK07			0,087	0,102
MK10			0,033	0,014
		MED	0,083	0,112
		SEM	0,010	0,013
MK21	KNIN	Ž	0,115	0,066
MK22			0,065	0,076
MK23			0,078	0,072
MK24			0,072	0,080
MK28			0,165	0,179
		MED	0,078	0,074
		SEM	0,019	0,003
		MED (lokalitet)	0,080	0,080
		SEM (lokalitet)	0,005	0,009

*kurzivom su označene stršeće vrijednosti