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

Buhin, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:404184

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno - matematički fakultet

Biološki odsjek

Katarina Buhin

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

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen u Laboratoriju za biologiju i ekologiju mekušaca i rakova na Zoologijskom zavodu biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom doc. dr. sc. Sandre Hudine i izv. prof. dr. sc. Sandre Radić Brkanac, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra ekologije i zaštite prirode. Ovo istraživanje dio je UKF projekta *Utjecaj zagađenja na invazivni uspjeh strane vrste slatkovodnog raka.*

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

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

Katarina Buhin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Vodeni ekosustavi kontinuirano su ugroženi ispuštanjem sve većih količina tzv. „emerging contaminants“ koji uključuju farmaceutike i proizvode za osobnu njegu. Farmaceutici se u okolišu ne pojavljuju kao individualni spojevi, već kao njihove mješavine. Cilj istraživanja bio je ispitati ima li mješavina tri odabrana prioritetna spoja (antidepresiva citaloprama i nortriptilina te opojne droge amfetamina) utjecaj na fiziologiju i ponašanje najuspješnije invazivne strane vrste europskih slatkovodnih ekosustava – signalnog raka (*Pacifastacus leniusculus*). Rakovi su mješavini spojeva u okolišno relevantnoj koncentraciji bili izloženi sedam dana. U dva navrata – nakon 24 h i nakon sedam dana izlaganja mjereni su fiziološki pokazatelji: koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima, koncentracija glukoze u hemolimfi te koncentracija malondialdehida (MDA) kao biomarkera oksidativnog stresa, te ponašanje: aktivnost u novom prostoru i antagonističke interakcije rakova. Koncentracija serotonina, razina glukoze u hemolimfi, aktivnost i dinamika antagonističkih interakcija nisu se značajno razlikovale između izloženih jedinki i kontrola, no jedinke izložene mješavini spojeva imale su značajno povećanu koncentraciju MDA što pokazuje da mješavina spojeva može uzrokovati oksidativni stres kod ne-ciljanih organizama čak i u okolišno relevantnim koncentracijama. Buduća istraživanja trebalo bi proširiti na utjecaj mješavine spojeva na rast i reprodukciju rakova te produžiti trajanje izlaganja.

(36 stranica, 13 slika, 2 tablice, 50 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: farmaceutici, mješavine, signalni rak, serotonin, antagonističke interakcije

Voditelj rada 1: dr. sc. Sandra Hudina, doc.
Voditelj rada 2: dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.

Ocjenitelji: dr. sc. Sandra Hudina, doc.
dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.
dr. sc. Sofia Ana Blažević, doc.

Rad prihvaćen: 19.02.2020.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Effects of antidepressants and amphetamine mixture on physiology and behaviour of the invasive alien species signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)

Katarina Buhin

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Aquatic ecosystems are continuously threatened by the release of increasing amounts of "emerging contaminants", including pharmaceuticals and personal care products. In the environment, pharmaceuticals are present in mixtures but their effects on non-target organisms are largely unexplored. This study aims to examine whether the mixture of three chosen substances (antidepressant citalopram and nortriptyline and illicit drug amphetamine) influences the behavior and physiology of the most successful crustacean invader of European freshwaters - the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). Crayfish were exposed to environmentally relevant concentrations of mixtures for seven days. We measured the effects on physiology (indicators: serotonin concentration in the brain, glucose level in the hemolymph and concentration of malondialdehyde (MDA) as a biomarker of oxidative stress), and behaviour (parameters: activity and antagonistic interactions) after 24 h and after seven days. There was no significant difference in serotonin and glucose concentrations nor in activity or dynamics of antagonistic interactions between exposed individuals and controls. Exposed individuals had significantly increased MDA concentrations which shows that compound mixture can cause oxidative stress in the non-target organisms even in environmentally relevant concentrations. Future research should include the effect of compound mixtures on growth and reproduction and extend the duration of exposure.

(36 pages, 13 figures, 2 tables, 50 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central biological library.

Key words: pharmaceuticals, mixtures, signal crayfish, serotonin, antagonistic interactions

Supervisor 1: dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.
Supervisor 2: dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.

Reviewers: dr. Sandra Hudina, Asst. Prof.
dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.
dr. Sofia Ana Blažević, Asst. Prof.

Thesis accepted: 19.02.2020.

Sadržaj

1. UVOD 1

1.1. FARMACEUTICI U VODENOM OKOLIŠU 1

2. SIGNALNI RAK (*Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)) 2

3. ANTIDEPRESIVI I AMFETAMIN 4

4. UTJECAJ FARMACEUTIKA NA PONAŠANJE RAKOVA 5

5. UTJECAJ FARMACEUTIKA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA 6

5.1. SEROTONIN 6

5.2. OKSIDATIVNI STRES I LIPIDNA PEROKSIDACIJA 6

6. CILJ ISTRAŽIVANJA 8

7. MATERIJALI I METODE 9

7.1. PRIPREMA RAKOVA ZA EKSPERIMENT 9

7.2. PRIPREMA SPOJEVA 12

7.3. IZLAGANJE RAKOVA MJEŠAVINI SPOJEVA 12

7.4. MJERENJE UTJECAJA MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE RAKOVA 13

7.4.1. UTJECAJ NA AKTIVNOST RAKOVA U NOVOM PROSTORU 13

7.4.2. UTJECAJ NA ANTAGONISTIČKE INTERAKCIJA RAKOVA 14

7.5. MJERENJE UTJECAJA MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA 15

7.5.1. IZOLACIJA ORGANA 15

7.5.2. KONCENTRACIJA SEROTONINA U CEREBRALNIM GANGLIJIMA 16

7.5.3. KONCENTRACIJA GLUKOZE U HEMOLIMFI 17

7.5.4. RAZINA OKSIDATIVNOG STRESA - LIPIDNA PEROKSIDACIJA 17

8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA 18

9. REZULTATI 19

9.1. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE SIGNALNIH RAKOVA 19

9.1.1. AKTIVNOST RAKOVA U NOVOM PROSTORU 19

9.1.2. ANTAGONISTIČKE INTERAKCIJE RAKOVA 21

9.2. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU SIGNALNIH RAKOVA 23

9.2.1. RAZINA SEROTONINA U CEREBRALNIM GANGLIJIMA RAKOVA 23

9.2.2. KONCENTRACIJA GLUKOZE U HEMOLIMFI 24

9.2.3. RAZINA OKSIDATIVNOG STRESA – LIPIDNA PEROKSIDACIJA 25

10. RASPRAVA 26

10.1. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE RAKOVA 26

10.2. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA 28

11. ZAKLJUČAK 30
12. LITERATURA 31
13. ŽIVOTOPIS 37

1. UVOD

1.1. FARMACEUTICI U VODENOM OKOLIŠU

Farmaceutici (antidepresivi, antibiotici, analgetici, stimulansi, hormoni) i proizvodi za osobnu njegu (mirisi, parabeni), uključujući i opojne droge, novija su klasa zagađivala okoliša te im se pridaje sve više pažnje zbog njihove učestalije pojave i zadržavanja u okolišu, težeg uklanjanja (perzistentnosti) te opasnosti za vodene ekosustave (Evgenidou i sur., 2015). Ta zagađivala zajednički se nazivaju eng. „emerging contaminants“ (EC), a u vodene ekosustave dospijevaju na razne načine kao što su ispiranjem odlagališta, kanalizacijom, otpadnim vodama iz industrije, nepravilnim odlaganjima i slično (Archer i sur., 2016). Iako su u vodenom okolišu detektirani u niskim koncentracijama (od ng/L do nekoliko μg/L), znatno manjim od zabilježenih razina toksičnosti, njihov kontinuiran unos može izazvati neurohormonalne utjecaje što dovodi do različitih fizioloških promjena i promjena u ponašanju ne-ciljanih organizama (Ložek i sur., 2019a). Primjerice, izlaganje jedinki riba vrste *Pimephales promelas* antidepresivu fluoksetinu, već pri okolišno relevantnoj koncentraciji, rezultiralo je promjenama u gradnji gnijezda, obrambenom ponašanju i izbjegavanju predatora, dok su veće koncentracije imale direktan utjecaj na preživljavanje i reprodukciju jedinki. (Weinberger i Klaper, 2014).

S obzirom na veliku količinu farmaceutika koja je danas u upotrebi, oni se u okolišu ne pojavljuju kao izolirani, čisti toksikanti, već su prisutni kao višekomponentne mješavine spojeva. Mješavine farmaceutika razlikuju se ovisno o izvoru i načinu širenja te se u okolišu mogu naći kao ishodišni (komercijalni proizvodi farmaceutici sastavljeni od dva ili više aktivnih spojeva), mogu se ispuštati kao aktivni spojevi tijekom procesa proizvodnje ili mogu nastati slučajno, zajedničkom pojavom nepovezanih spojeva na istom području. Toksičnost tih mješavina može biti veća od toksičnosti pojedinačnih spojeva. Čak i u ekstremno niskim koncentracijama koje su daleko ispod 10 % efektivne koncentracije individualnih spojeva, mješavine mogu imati značajan učinak (Di Nica i sur., 2016), a njihov utjecaj može varirati s obzirom na koncentraciju, način primjene, razdoblje i trajanje izlaganja (Di Nica, 2017).

Postojeća istraživanja o štetnim utjecajima farmaceutika uglavnom su bazirana na utjecajima individualnih spojeva, no rijetka su istraživanja o utjecajima njihovih mješavina. Galus i sur. (2013) za svoje su istraživanje izlagali jedinke slatkovodne vrste riba zebrice (*Danio rerio*) mješavini četiri farmaceutika u koncentracijama 0.5 μg/L i 10 μg/L. Rezultat je pokazao smanjenu produkciju embrija nakon šest tjedana izlaganja mješavini. Kod ženki je za obje koncentracije zabilježeno povećanje broja oocita i izmjenjena histologija jajnika koja je direktno utjecala na razvoj jajnika, što objašnjava smanjenu produkciju embrija.

Iako je veći broj istraživanja dokazao negativne učinke na ne-ciljane slatkovodne kralješnjake, manji broj studija pokazao je negativan negativan utjecaj farmaceutika na slatkovodne beskralješnjake. Istraživanje Lazzara i sur. (2012) pokazalo je negativan utjecaj farmaceutika na fekunditet jedinki školjkaša raznolike trokutnjače (*Dreissena polymorpha*). Izlaganje okolišno relevantnim koncentracijama fluoksetina (20 i 200 ng/L) u trajanju od šest dana rezultiralo je smanjenjem broja oocita kod ženki za 40-70% i smanjenje gustoće spermatozoida za 21-25%, što neminovno ima direktan utjecaj na veličinu populacija ovih školjkaša (Lazzara i sur., 2012).

Utjecaj farmaceutika zabilježen je i kod vrste deseteronožnih rakova *Orconectes rusticus* u istraživanju Tierney i sur. (2016). U istraživanju su jedinke izlagane antidepresivu fluoksetinu putem vode u koncentracijama od 0 do 500 μg/L, pri čemu je samo najveća koncentracija (500 μg/L) imala značajan utjecaj na rast jedinki. Isto istraživanje zabilježilo je i značajno smanjeno kretanje jedinki izloženih koncentracijama od 2 μg/L i 500 μg/L fluoksetina u usporedbi s kontrolama.

2. SIGNALNI RAK (*Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852))

Kao modelni organizam za ovo istraživanje odabrana je invazivna strana vrsta deseteronožnih rakova, signalni rak (*Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852)). Deseteronožni rakovi najveći su slatkovodni beskralješnjaci te zbog svoje veličine, dugog životnog vijeka, načina prehrane (omnivori) i agresivnosti predstavljaju ključne vrste slatkovodnih ekosustava (Reynolds i sur., 2013).

Signalni rak je sjevernoamerička vrsta i jedna je od najuspješnijih i najrasprostranjenijih invazivnih stranih vrsta u Europi. Trenutno je prisutan u najmanje 29 europskih zemalja (Kouba i sur., 2014). U Hrvatskoj je prvi puta zabilježen 2008. u rijeci Muri, 2011. godine u rijeci Dravi, a iste godine je zabilježen i u rijeci Korani, u koju je unesen antropogenim putem (Hudina i sur., 2013).

Odgovoran je za značajna smanjenja populacija autohtonih europskih vrsta zbog svojeg brzog rasta, ranijeg sazrijevanja, produkcije velikog broja potomaka te agresivnosti u borbi za hranu i stanište (Hudina i sur., 2009). No, isto tako, prijenosnik je bolesti račje kuge na koju su autohtone vrste rakova izuzetno osjetljive. Signalni rakovi koevoluirali su s uzročnikom ove bolesti, patogenom *Aphanomyces astaci*, otporni su na bolest te su njezini prijenosnici (Johnsen i Taugbøl, 2010).

Do sada se pokazalo kako su rakovi osjetljivi čak i na niske, okolišno relevantne koncentracije nekih farmaceutika koji mogu utjecati na njihovo ponašanje. Ložek i sur. (2019) izlagali su signalne rakove (*P. leniusculus*) analgetiku tramadolu u okolišno relevantnoj koncentraciji, što je rezultiralo njihovom smanjenom aktivnošću. U ovom istraživanju mjerila sam utjecaje mješavine dva antidepresiva i opojne droge na fiziologiju (koncentraciju serotonina u cerebralnim ganglijima, koncentraciju glukoze u hemolimfi i razinu oksidativnog stresa) i ponašanje (aktivnost i antragonističke interakcije) signalnih rakova.

Slika 1. Signalni rak (*Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852); autor fotografije: Sandra Hudina).

3. ANTIDEPRESIVI I AMFETAMIN

Od svih farmaceutika, u vodenim ekosustavima najčešće su detektirani upravo antidepresivi. Oni se koriste za liječenje depresije, tjeskobe, napadaja panike, opsesivno-kompulzivnog poremećaja, poremećaja u prehrani i socijalnih fobija. Postoji nekoliko tipova antidepresiva: triciklički antidepresivi, selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRIs – eng. selective serotonine reuptake inhibitors), selektivni inhibitori ponovne pohrane noradrenalina i selektivni inhibitori monoaminooksidaze (Ford i Fong, 2016).

Triciklički antidepresivi djeluju tako da blokiraju enzime koji probavljaju neurotransmitere poput serotonina i dopamina. Nortiptilin, koji je korišten u ovom istraživanju pripada tricikličkim antidepresivima. Izlaganje jedinki šarana (*Cyprinus carpio*) u ranim životnim stadijima pojedinačnim tricikličkim antidepresivima i njihovim mješavinama 30 dana, u trima različitim koncentracijama (10, 100 i 500 μg/L) rezultiralo je znatnim povećanjem smrtnosti, zaostatkom u razvoju, morfološkim anomalijama i patološkim promjenama u mozgu, srcu i bubregu te povećanom lipidnom peroksidacijom (Sehonova i sur., 2017).

Najčešće korišteni antidepresivi su selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (SSRI) koji blokiraju ponovnu pohranu serotonina u presinaptičkim krajevima živaca, time podižući njegovu razinu i duže zadržavanje u sinapsama (Fong i Ford, 2014). Citalopram, koji je također korišten u ovom istraživanju, pripada ovoj skupini. Prema nekim istraživanjima, citalopram može djelovati različito na različite vrste. Primjerice, izlaganje mramornog raka (*Procambarus virginalis*) citalopramu u okolišno relevantnoj koncentraciji rezultiralo je smanjenim i usporenim kretanjem (Burič i sur., 2018). Kellner i sur. (2016) su kod koljuške (*Gasterosteus aculeatus*) već pri nižoj okolišnoj koncentraciji citaloprama zabilježili povećanu lokomotornu aktivnost.

Poznato je da opojna droga amfetamin povećava razine serotonina, dopamina i norepinefrina u sinapsama (Rothmann i Baumann, 2006), a dokazan je njegov utjecaj i na rakove. Izlaganje rakova vrste *Orconectus rusticus* visokoj dozi amfetamina rezultiralo je povećanjem kretanja i pomicanja antena te porast vremena provedenog stojeći na zadnjem paru nogu za hodanje (Alcaro i sur., 2011). Isto tako, Ložek i sur. (2019b) izlagali su signalne rakove (*P. leniusculus*) amfetaminu putem vode u okolišno relevantnoj koncentraciji, što je rezultiralo smanjenjem njihove aktivnosti.

4. UTJECAJ FARMACEUTIKA NA PONAŠANJE RAKOVA

Serotonin ima važnu ulogu u ponašanju rakova tako što sudjeluje u kontroli kretanja, odgovora na opasnosti, a povezan je i s ponašanjem nalik tjeskobi (eng. anxiety-like behaviour) (Sosa i sur, 2004). Također, direktno utječe na agresivno ponašanje zbog čega rakovi imaju veću sklonost ulaženja u antagonističke interakcije (Fong i Ford, 2014). Antagonističke interakcije podrazumijevaju agresivne interakcije između jedinki iste vrste u borbi za stanište, partnere i hranu (Moore, 2007). Rakovi su prirodno agresivni i skloni su uspostavljanju dominacije, zbog čega ulaze u interakcije i u odsustvu resursa (Issa i sur., 1999). Antagonističke interakcije rakova vrlo su ritualizirane i obrasci eskalacije sačuvani su između jedinki i različitih vrsta, što omogućuje znanstveno utemeljene komparacije intra- i interspecijske agresivnosti. Uspostava hijerarhije omogućuje dominantnoj jedinki prvenstvo u pristupu limitiranim resursima poput hrane, zaklona i partnera te dulju kontrolu nad njima što može omogućiti bolju kondiciju i veći reproduktivni uspjeh (Moore, 2007).

Osim na antagonističko ponašanje, farmaceutici mogu u okolišno relevantnim koncentracijama utjecati i na aktivnost rakova. Kubec i sur. (2019) za svoje su istraživanje jedinke mramornog raka (*Procambarus virginalis*) izlagali antidepresivu venlafaksinu (VEN) i anksiolitiku oksazepamu (OXA) u okolišno relevantnim koncentracijama. VEN nije pokazao utjecaj na aktivnost rakova, dok su rakovi izlagani OXA prešli veću udaljenost i pokazali veću aktivnost. Isto tako, istraživanja su pokazala kako dodavanje amfetamina kroz hemolimfu (infuzijom) u koncentraciji od 0.5 μg/L dovodi do povećanja aktivnosti rakova (dodatno ih je potaknulo na istraživanje prostora) i pomicanje antena. Direktnim injektiranjem u ganglij, stimulativni učinak amfetamina s bržim vremenom djelovanja pokazao se pri još manjim koncentracijama (Huber i sur., 2011). Ložek i sur. (2019b) signalne su rakove (*P. leniusculus*) izlagali okolišno relevantnoj koncentraciji amfetamina putem vode čime se smanjila njihova aktivnost.

5. UTJECAJ FARMACEUTIKA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA

5.1. SEROTONIN

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5-HT) je monoaminski neurotransmiter koji kod rakova sudjeluje u kontroli reakcije na stres i uzbuđenje potičući brzo izlučivanje hiperglikemijskog hormona (cHH, eng. crustacean hyperglycemic hormone) u hemolimfi raka koji zatim povećava razinu glukoze u krvi (Fossat i sur., 2014).

cHH je metabolički neuropeptid kojeg uglavnom sintetiziraju, pohranjuju i otpuštaju neuroendokrine stanice u meduli terminalis x-organa očne stapke rakova. Aksoni x-organa formiraju neurohemalni organ sinusnu žlijezdu (SG, eng. sinus gland) iz kojeg se cHH egzocitozom spušta u hemolimfu. Glavna funkcija cHH-a je regulacija glukoze u krvi, no sudjeluje i u drugim fiziološkim procesima kao što su reprodukcija i osmoregulatorni odgovori na stres. cHH kod ciljanih organizama uzrokuje pojačano otpuštanje glukoze što dovodi do hiperglikemije (Loredo-Ranjel i sur., 2017). S obzirom da smo u istraživanju koristili antidepresive koji utječu na sustave serotonina, a serotonin indirektno regulira koncentraciju glukoze u hemolimfi, fiziološki parametri koje smo pratili uključivali su koncentraciju serotonina u cerebralnim ganglijima i koncentraciju glukoze u hemolimfi.

5.2. OKSIDATIVNI STRES I LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Oksidativni stres ključna je stanična reakcija kojom organizmi odgovaraju na stresne uvjete kao što je zagađenje okoliša uzrokovano EC i njihovim mješavinama (Birben i sur., 2012). Oksidativni stres nastaje kada stanice ne mogu adekvatno uništiti višak reaktivnih oblika kisika (ROS; eng. reactive oxygen species) pa se oni nakupljaju u tijelu, tj rezultat je neravnoteže između formiranja i neutralizacije ROS-a. Inače, ROS su u niskim ili umjerenim koncentracijama neophodni za proces sazrijevanja staničnih struktura i imaju važnu ulogu u obrambenom sustavu, a uključuju slobodne radikale koji sadrže kisik: hidroksilni, superoksidni, peroksilni, alkoksilni i hidroperoksilni radikal te ne-radikalne oblike kisika: vodikov peroksid, hipokloritnu kiselinu, singletni kisik i ozon (Lobo i sur., 2010).

Oksidativni stres može ozbiljno oštetiti stanične membrane i biološke makromolekule kao što su DNA, proteini, lipidi i lipoproteini te uzrokovati metaboličke poremećaje. Tijelo se protiv oksidacijskog stresa bori produciranjem antioksidansa čija uloga je da neutraliziraju višak slobodnih radikala, štite stanice od njihovih toksičnih učinaka te doprinose prevenciji bolesti (Pham-Huy i sur., 2008).

Hidroksil radikal i peroksinitrit u višku mogu oštetiti stanične membrane i lipoproteine procesom koji se naziva lipidna peroksidacija (Pham-Huy i sur., 2008). Lipidna peroksidacija odvija se u tri stupnja: inicijacija, propagacija i terminacija. Započinje napadom ROS-a koji uklanja atom vodika iz metilenske skupine, čime iz višetruko nezasićenih masnih kiselina nastaju slobodni lipidni radikali, a ugljikovi radikali oblikuju konjugirane diene. Nadalje, u aerobnim uvjetima, spajanjem konjugiranih diena s kisikom formira se peroksil radikal koji napada drugu masnu kiselinu formirajući lipidni hidroperoksid (LOOH, eng. lipid hydroperoxide) i reaktivne ugljikove radikale koji nastavljaju reakciju (faza propagacije). Disocijacijom LOOH u prisutnosti željeza ili bakra nastaju produkti lipidne peroksidacije: aldehidi, ketoni i ugljikohidrati. Jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije je malondialdehid (MDA), čijim mjerenjem se može odrediti oštećenje lipida uzrokovano oksidativnim stresom. U ovom sam radu sadržaj MDA koristila kao pokazatelj lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007, Lobo i sur., 2010).

6. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je eksperimentalno ispitati i analizirati utjecaj mješavine tri odabrana farmaceutika – antidepresiva citaloprama i nortriptilina te opojne droge amfetamina u okolišno relevantnim koncentracijama na fiziologiju i ponašanje signalnih rakova. S obzirom da ti farmaceutici djeluju na metabolizam serotonina, koji kod deseteronožnih rakova stimulira otpuštanje hiperglikemijskog hormona, a isti indirektno kontrolira razinu glukoze u tijelu rakova, mjerila sam sljedeće fiziološke pokazatelje: razinu serotonina u cerebralnim ganglijima, razinu glukoze u hemolimfi te koncentraciju malondialdehida (MDA) kao pokazatelja oksidativnog stresa. Serotonin je ključni mehanizam u kontroli antagonističkog ponašanja i dominacije deseteronožnih rakova, što je među glavnim odrednicama invazivnog uspjeha rakova. Direktno utječe na agresivnost rakova i sudjeluje u kontroli kretanja, stoga sam za analizu i usporedbu parametara ponašanja analizirala aktivnost rakova u novom prostoru i dinamiku antagonističkih interakcija između izloženih i kontrolnih skupina te unutar izloženih skupina signalnih rakova.

7. MATERIJALI I METODE

Spojevi korišteni u eksperimentu izabrani su na temelju podataka dobivenih pretraživanjem javno dostupnih ekotoksikoloških baza o potencijalnim učincima spojeva na modelni organizam (baze ToxCast i ECOTOX) te na temelju podataka dobivenih od Hrvatskih voda o zastupljenosti 546 organskih zagađivala na 10 postaja duž hrvatskog dijela rijeke Save. Na taj način određeni su prioritetni spojevi koji su pokazali najveću biološku aktivnost u rijeci Savi te čija bi mješavina potencijalno mogla pokazati utjecaj na fiziologiju i ponašanje slatkovodnih rakova. Ti prioritetni spojevi spadaju u skupinu psihoaktivnih tvari te su zabilježeni na većini postaja za koje su prikupljeni uzorci, a oni su: antidepresivi citalopram (C) i nortriptilin (N) te opojna droga amfetamin (A), a u rijeci Savi su zabilježeni u sljedećim koncentracijama: C = 1 μg, N = 0.05 μg te A = 0.02 μg. Za potrebe eksperimenta spojevi su nabavljeni od zastupnika koji su ovlašteni za uvoz i distribuciju te su osigurali sve potrebne dozvole.

7.1. PRIPREMA RAKOVA ZA EKSPERIMENT

Rakovi su ulovljeni LiNi vršama s mamcem na postaji Ladvenjak u rijeci Korani, koja se nalazi u slivu rijeke Save. S obzirom da su mužjaci rakova u prosjeku agresivniji od ženki (Bergman i Moore, 2007), zdravi neozlijeđeni mužjaci podjednakih veličina dopremljeni su na Zoologijski zavod Prirodoslovno – matematičkog fakulteta u Zagrebu. U laboratoriju sam rakove izvagala digitalnom vagom te sam im pomičnom mjerkom izmjerila ukupnu dužinu tijela (TL; od vrha rostruma do telzona) i postorbitalnu dužinu karapaksa (POCL; od trna iza oka do kraja karapaksa). Rasporedila sam ih pojedinačno u akvarije zapremine 1 L vode opremljene prozračivačima vode koja je bila sobne temperature (konstantnih 20 °C). S obzirom da vizualni kontakt s drugom jedinkom može utjecati na ponašanje i uspostavu dominacije kod rakova (Mercier i May, 2010) akvariji su bili oblijepljeni folijom koja je onemogućavala vizualni kontakt. Akvarije sam prekrila staklenim poklopcima i učvrstila daskama kako bih spriječila bježanje rakova. U njima su rakovi proveli dva tjedna na aklimatizaciji, a hranila sam ih Nutrifin max peletima za pridnene ribe i beskralješnjake svaki drugi dan. Od Ministarstva zaštite okoliša i energetike dobili smo dozvolu za držanje signalnih rakova (640-01/18-01/41) prema Zakonu o sprječavanju unošenja i širenja stranih te invazivnih stranih vrsta i upravljanju njima (NN 15/2018). Svaki rak dobio je jedinstvenu

oznaku na karapaksu kako bih ih mogla lakše pratiti tijekom snimanja antagonističkih interakcija i aktivnosti u novom okolišu. Odredila sam osam parova u kojima je jedan od rakova u paru bio izložen navedenoj mješavini spojeva u okolišno relevantnoj koncentraciji (MIX parovi), dok je drugi bio kontrola (nije bio izložen mješavini). Poznato je da kod približno jednako velikih rakova borbe traju duže i sporije eskaliraju do jakog intenziteta nego kod približno jednako malih rakova (Bergman i Moore, 2007). Obzirom da veličina jedinki može znatno utjecati na ishod antagonističkih interakcija, parove sam izabrala tako da razlika ukupne veličine (ukupna duljina i masa rakova) ne prelazi 10% (Tablica 1), što je uobičajeno u istraživanjima ponašanja rakova (Hudina i sur., 2011). Odredila sam i osam kontrolnih parova koji nisu bili izloženi mješavini spojeva.

Slika 2. Rakovi raspoređeni u akvarijima

Tablica 1. Odnosi i postotak razlike ukupne duljine i mase kod mješovitih parova (MIX) i kontrolnih parova. U MIX parovima, podebljanim brojevima označene su jedinke izložene mješavini spojeva. *TL – ukupna duljina (eng. total length), POCL – postorbitalna dužina karapaksa (eng. postorbital carapax length), W – masa (eng. weight).

SKUPINA	BR. PARA	OZNAKA	TL	POCL	W	RAZLIKA
MIX	1.	**172**	88.49	35.07	21.08	2.67 %
		196	88.88	34.97	21.66	
MIX	2.	**194**	82.68	33.20	17.20	4.40 %
		188	83.29	34.15	17.99	
MIX	3.	**185**	79.77	33.22	17.31	5.90 %
		171	81.04	31.70	16.29	
MIX	4.	**201**	92.19	36.09	22.30	2.80 %
		183	90.95	35.51	22.94	
MIX	5.	**193**	78.71	30.02	13.77	1.92 %
		186	77.14	30.15	13.51	
MIX	6.	**176**	95.55	38.85	29.55	0.13 %
		207	94.02	38.50	29.51	
MIX	7.	**181**	80.71	32.08	15.32	0.87 %
		190	79.78	31.03	15.46	
MIX	8.	**198**	94.82	38.09	30.33	5.80 %
		203	92.60	38.49	32.19	
Kontrola	1.	173	77.43	30.47	14.48	7.65 %
		184	74.16	29.23	13.37	
Kontrola	2.	182	78.60	29.82	14.15	0.53 %
		187	78.16	31.16	14.08	
Kontrola	3.	175	81.00	32.78	16.68	0.88 %
		191	80.15	31.32	16.53	
Kontrola	4.	189	83.13	32.72	18.23	0.44 %
		199	86.68	34.04	18.31	
Kontrola	5.	174	84.67	34.19	20.59	8.42 %
		195	83.30	33.28	18.85	
Kontrola	6.	204	89.10	36.52	25.75	5.16 %
		205	90.22	36.00	24.43	
Kontrola	7.	197	97.20	38.48	27.73	0.15 %
		200	95.80	37.64	27.77	
Kontrola	8.	198	94.82	38.09	30.33	5.80 %
		203	92.60	38.49	32.19	

7.2. PRIPREMA SPOJEVA

Spojeve sam najprije otopila u 96 % etanolu kako bi se poboljšala njihova topljivost, čime sam dobila matične otopine. Te sam otopine svaki dan nanovo razrjeđivala vodom kako bih dobila dnevnu vodenu otopinu koju sam dodavala rakovima u akvarij. Uz to, pripremala sam i vodene otopine etanola koje sam svaki dan dodavala kontrolama. Koncentracije korištenih spojeva prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Korištene koncentracije spojeva.

IME SPOJA	CAS BROJ	PROIZVOĐAČ	Koncentracija matične otopine u etanolu	Koncentracija dnevne vodene otopine	Koncentracija u akvariju
citalopram hidrobromid	59729-32-7	Sigma-Aldrich	1 g/L	50 µg/L	0.05 µg/L
nortriptilin hidroklorid	894-71-3	Sigma-Aldrich	1 g/L	1000 µg/L	1 µg/L
d-amfetamin sulfat	51-63-8	Lipomed	0,2 g/L	20 µg/L	0.02 µg/L

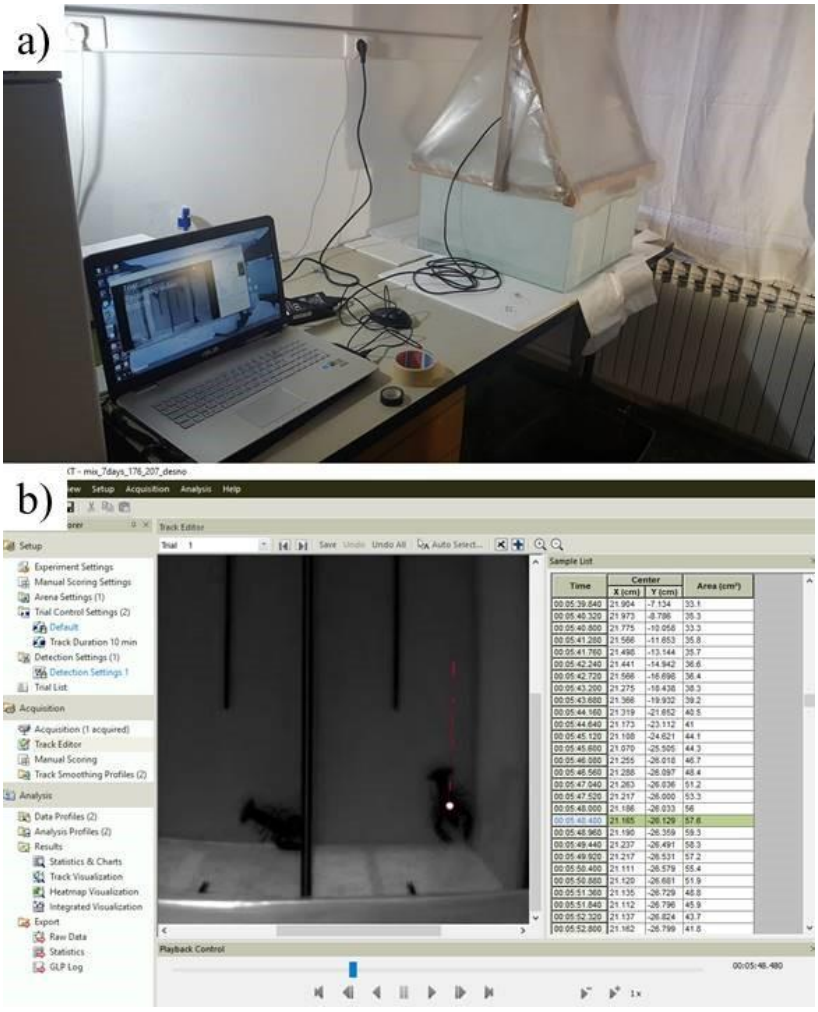
7.3. IZLAGANJE RAKOVA MJEŠAVINI SPOJEVA

Rakovi su izlagani mješavinama spojeva tijekom sedam dana, pri čemu sam im svakodnevno mijenjala vodu i dodavala odgovarajuće koncentracije spojeva. Dodavanje dnevnih otopina u akvarij izvodila sam na sljedeći način: vodom sam napunila menzuru od 1000 mL te sam oduzela 3 mL vode, a preostalih 997 mL ulila sam u akvarij. Zatim sam pipetom u akvarij dodala po 1 mL vodene otopine svakog spoja, pri čemu sam svaki od nastavaka isprala par puta u vodi kako bih bila sigurna da je cijela količina otopine ispuštena u vodu te kako bi se voda u akvariju izmiješala. Rakovima koji nisu bili izloženi mješavini spojeva dodavala sam vodenu otopinu etanola (1 mL u 999 mL vode). S obzirom da je invazivna strana vrsta signalnog raka potencijalni prijenosnik račje kuge, voda iz akvarija najprije je tretirana Izosan G sredstvom za dezinfekciju vode minimalno 24 sata prije upotrebe (da klor ispari).

7.4. MJERENJE UTJECAJA MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE RAKOVA

7.4.1. UTJECAJ NA AKTIVNOST RAKOVA U NOVOM PROSTORU

Aktivnost rakova snimala sam nakon 24 sata te nakon sedam dana izlaganja mješavini. Rakove koji su definirani kao parovi za istraživanje 7.4.2. stavila sam istovremeno u dva vizualno odvojena akvarija te snimala njihovo kretanje u novom prostoru Kameru sam postavila na stalak iznad akvarija (slika 4). Snimala sam kretanje rakova 17 - 18 minuta. Snimke sam analizirala u programu EthoVision XT (Noldus). To je softver koji preko videozapisa prati i analizira ponašanje, kretanje i aktivnosti životinja. Iz svake sam snimke izbacila 1. minutu (kratka aklimatizacija) te analizirala kretanje rakova u trajanju od 15 minuta. Kroz program sam bilježila sljedeće parametre: brzinu kretanja, vrijeme provedeno u kretanju te prijeđeni put, uspoređujući ih između izloženih jedinki i odgovarajućih kontrola.

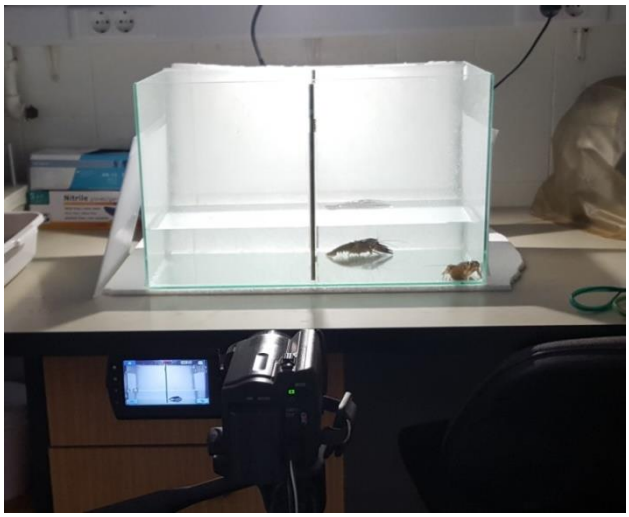


Slika 3. Akvarij s pregradom (a) i prikaz Ethovision XT programa za praćenje aktivnosti rakova (b).

7.4.2. UTJECAJ NA ANTAGONISTIČKE INTERAKCIJA RAKOVA

Neposredno nakon snimanja aktivnosti, rakove sam prebacila u drugi veći akvarij s neprozirnom pregradom na aklimatizaciju od 10 minuta. Zatim sam pregradu maknula te je krenulo snimanje antagonističkih interakcija između rakova u trajanju od 15 minuta. Nakon svakog para promijenila sam vodu i oprala akvarij u slučaju da su ostali potencijalni kemijski signali stresa prethodnih interakcija (Moore i Bergman, 2005) te ponovila postupak za drugi par (snimanje aktivnosti nakon kojeg je uslijedilo snimanje antagonističkih interakcija). Nakon snimanja rakove sam vratila u njihove prvobitne akvarije od 1 L, nahranila te ponovno dodala mješavinu spojeva. Snimanje antagonističkih interakcija na isti sam način ponovila i nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva. Analiza snimki uključivala je bilježenje sljedećih parametara: broj i ukupno trajanje borbi, vrijeme do početka borbe i identitet pobjednika.

Početak borbe označavala je reakcija jednog od rakova na prisutnost drugog (najčešće dizanjem ticala), dok su se nalazili na udaljenosti otprilike jedne dužine tijela. Kada su se rakovi udaljili na udaljenosti većoj od jedne dužine tijela bez ikakve međusobne reakcije duže od 5 sekundi, zabilježila sam završetak borbe. Pobjednik je jedinka koje se nije povukla iz borbe, a gubitnik je bila jedinka koja se povukla iz borbe, pokazala podređeni (subdominantni) položaj (tijelo pritisnuto uz podlogu, s spuštenim ticalima) ili često izbjegavala protivnika (Bergman i Moore, 2003). Ako je borba započela, a nije završila unutar 15 minuta, istu nisam zabilježila. Iz zabilježenih podataka, izračunala sam broj borbi i ukupno trajanje borbi (zbrajanjem trajanja svih pojedinačnih borbi), vrijeme potrebno do početka borbe te identitet pobjednika/gubitnika.



Slika 4. Snimanje antagonističkih interakcija rakova.

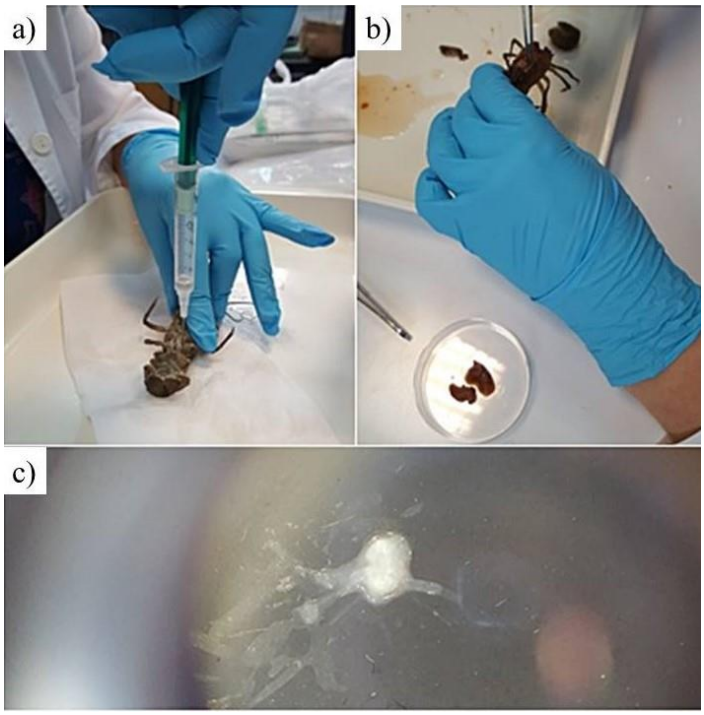
7.5. MJERENJE UTJECAJA MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA

Nakon dovršenog promatranja ponašanja rakova, idući zadatak bio je analizirati učinak mješavine spojeva na fiziologiju rakova. Nakon 7-dnevnog izlaganja mješavini, mjerila sam sljedeće fiziološke pokazatelje: koncentraciju serotonina u cerebralnim ganglijima, koncentraciju glukoze u hemolimfi i marker oksidativnog stresa malondialdehid (MDA).

7.5.1. IZOLACIJA ORGANA

Organe sam izolirala mješovitim parovima rakova (8 izloženih jedinki + 8 odgovarajućih kontrolnih jedinki). Rakovima sam najprije iglama obloženim anti-koagulansom heparinom izvadila 200 µL hemolimfe iz područja pete noge hodalice. Epruvete sa hemolimfom stavila sam u centrifugu (Eppendorf Centrifuge 5415C) na 11 000 x g u trajanju od 2 minute. Nakon centrifugiranja pipetom sam u nove epruvete izdvojila supernatant i te sam epruvete pohranila u zamrzivač na -80 °C do analize. Rakovi su zatim usmrćeni prerezom živčanog sustava nakon čega su im izolirani cerebralni ganglij i hepatopankreas.

Za svakog raka posebno, od ukupne količine hepatopankreasa, izdvojila sam 200 mg hepatopankreasa koji sam prebacila u epruvete te sam ih stavila u zamrzivač na -80 °C do analize. Masu cerebralnih ganglija odredila sam tako da sam prvo izvagala prethodno pripremljene Eppendorf epruvetice bez sadržaja, zatim sam ganglije prebacila u te iste epruvete te ih ponovno izvagala sa sadržajem. Razlika u masi prazne i pune epruvete predstavljala je masu cerebralnih ganglija.



Slika 5. Izolacija organa: a) hemolimfe, b) hepatopankreasa, c) cerebralnih ganglija.

7.5.2. KONCENTRACIJA SEROTONINA U CEREBRALNIM GANGLIJIMA

Sve uzorke cerebralnih ganglija homogenizirala sam pomoću ultrazvučne sonde (Bandelin) u 10 puta većoj količini hladne deproteinizacijske otopine, do maksimalno 25 sekundi po uzorku. Pošto ultrazvučna sonda zagrijava uzorak, mikroepruvete s uzorkom su tijekom homogenizacije bile u čaši s ledom. Nakon homogenizacije, slijedila je centrifuga u trajanju od 20 minuta na 23 390 x g pri temperaturi od 4 °C. Za mjerenje razine serotonina koristila sam visoko osjetljiv Serotonin ELISA kit (Demeditec diagnostics) slijedeći upute za rad. Prije same analize uzoraka, testiranjem više koncentracija homogenata, određeno je da je razrjeđenje od 240 puta najbolje za analizu pomoću ovog kita. Prvo se prema uputama kompleta za kvantifikaciju serotonina pripreme reagensi, a onda slijedi aciliranje standarda, razrijeđenih kontrola i uzoraka uz dodavanje otapala ili pufera u trajanju od 30 minuta na sobnoj temp. (20 – 25 °C) na mješalici. U jažice mikrotitarske pločice pipetira se po 100 µL aciliranih standarda, kontrola i uzoraka. Zatim se u sve jažice dodaje po 25 µL serotonin antiseruma te se inkubira preko noći (15 do 20 h) na temperaturi 2 – 8 °C. Nakon inkubacije, pločice se isperu tri puta dodavanjem 300 µL pufera za ispiranje. U jažice se pipetira po 100 µL enzimskog konjugata (kozji anti-zečji imunoglobulini obilježen peroksidazom) koji se inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi (20 – 25 °C) na mješalici. Slijedi ponovno ispiranje jažica na isti način. Zatim se dodaje supstrat (tetra-metil-benzidin) te se inkubira 20 – 30

minuta na sobnoj temp. na mješalici. Nakon inkubacije reakcija se zaustavlja pomoću otopine za tu svrhu iz Elisa kit-a. Apsorbancija se očitava spektrofotometrijski na 450 nm. Za očitanje rezultata ekstrapoliramo baždarne krivulje nacrtane korištenjem poznatih koncentracija standarda i njihovih rezultata apsorbancije.

7.5.3. KONCENTRACIJA GLUKOZE U HEMOLIMFI

U suradnji s Dr. sc. Blankom Beer - Ljubić sa Veterinarskog fakulteta, koncentracija glukoze u hemolimfi određena je iz odleđene heparinske plazme na biokemijskom analizatoru Architect c4000 (Abbott, Njemačka).

7.5.4. RAZINA OKSIDATIVNOG STRESA - LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Razinu oksidativnog stresa određivala sam mjerenjem biomarkera malondialdehida (MDA) u tkivu hepatopankreasa raka, koji nastaje kao produkt lipidne peroksidacije. Metoda se temelji na reakciji MDA s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) na 100°C u kiselom mediju (1.5 – 3.5 pH) koja rezultira obojenim kompleksom, čiju sam apsorbanciju očitavala spektrofotometrijski na 532 nm (Zeb i Ullah, 2016).

Epruvete, tj sadržaj u njima prvo je trebalo odlediti. Uzorke tkiva hepatopankreasa prebacila sam u epruvete od 2 mL. U svaku epruvetu ubacila sam kuglicu za homogenizaciju pa sam uzorke postavila na nosače, ohladila u tekućem dušiku te homogenizirala na 30 Hz u trajanju od 1 min. Zatim sam u svaku epruvetu dodala 500 µL pufera te ponovno homogenizirala 1 min na 30 Hz. Uzorke sam stavila u centrifugu 15 minuta na 20 000 x g, a nakon toga sam ih prelila u čiste epruvete i dodala još 1 mL pufera.

U staklene semimikroepruvete odpipetirala sam 200 µL supernatanta i na njega dodala 600 µL 10 %-tne trikloroctene kiseline (TCA). Napravila sam i slijepu probu: u 200 µL ekstrakcijskog pufera dodala sam 600 µL 10%-tne TCA. Sve uzorke stavila sam u centrifugu na 3 000 x g u trajanju od 3 minute. Zatim sam u uzorke dodala 500 µL 0,67 %-tne tiobarbituratne kiseline (TBA). Sve uzorke, zajedno sa slijepom probom, zagrijala sam u sušioniku na 95 °C 30 minuta, a nakon toga brzo ohladila u vodenoj kupelji. Apsorbanciju uzoraka mjerila sam spektrofotometrom na valnoj duljini od 532 nm. Koncentracija malondialdehida izražena je u nmol/g svježe tvari, uz molarni ekstinkcijski koeficijent $\varepsilon_{TBARS}532 = 156\ mM^{-1}cm^{-1}$.

8. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

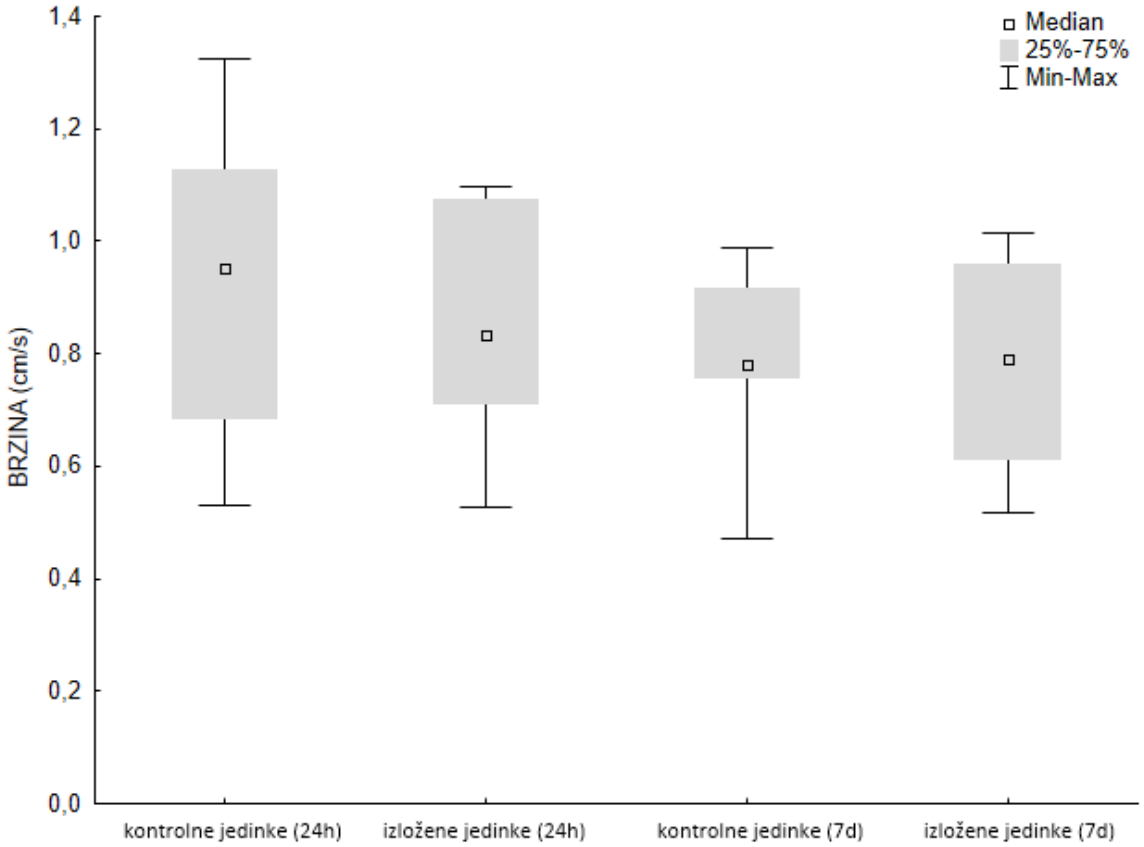
Rezultate sam prvo zabilježila u tablice u Excel programu Microsoft Office paketa, a za njihovu obradu koristila sam program Statistica (TIBCO Software Inc., SAD). Prvo je bilo potrebno provjeriti normalnost raspodjele podataka (Shapiro-Wilk test) i na temelju toga odrediti odgovarajuću statističku metodu za obradu istih. S obzirom da podaci nisu odgovarali normalnoj raspodjeli, koristila sam neparametrijske analize. Parametre aktivnosti (brzina kretanja, vrijeme provedeno u kretanju te prijeđenu udaljenost) i parametre antagonističkih interakcija rakova: broj borbi, vrijeme do početka borbe i ukupno trajanje borbi, osim odnos pobjednik/gubitnik između mješovitih i kontrolnih parova usporedila sam Kruskal-Wallis ANOVA testom. Za provjeru postoji li statistički značajna razlika u odnosu pobjednik/gubitnik koristila sam neparametrijski Wilcoxon matched pairs test. Za fiziološke pokazatelje (razinu glukoze u hemolimfi, koncentraciju serotonina u cerebralnim ganglijima i koncentraciju malondialdehida) koristila sam neparametrijsku analizu varijance, Mann-Whitney U test. Rezultate sam prikazala grafički, Box-Whisker Plot grafovima. Statistički značajni rezultati bili su oni kojima je nivo značajnosti manji od 5 % ($p < 0.05$).

9. REZULTATI

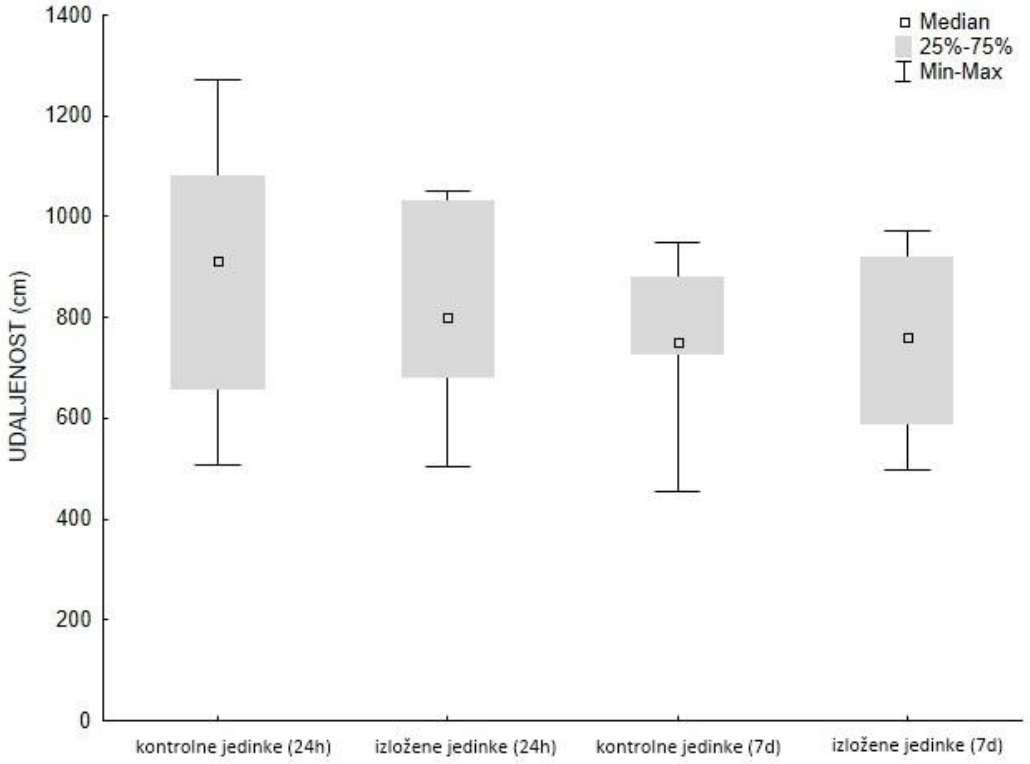
9.1.UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE SIGNALNIH RAKOVA

9.1.1. AKTIVNOST RAKOVA U NOVOM PROSTORU

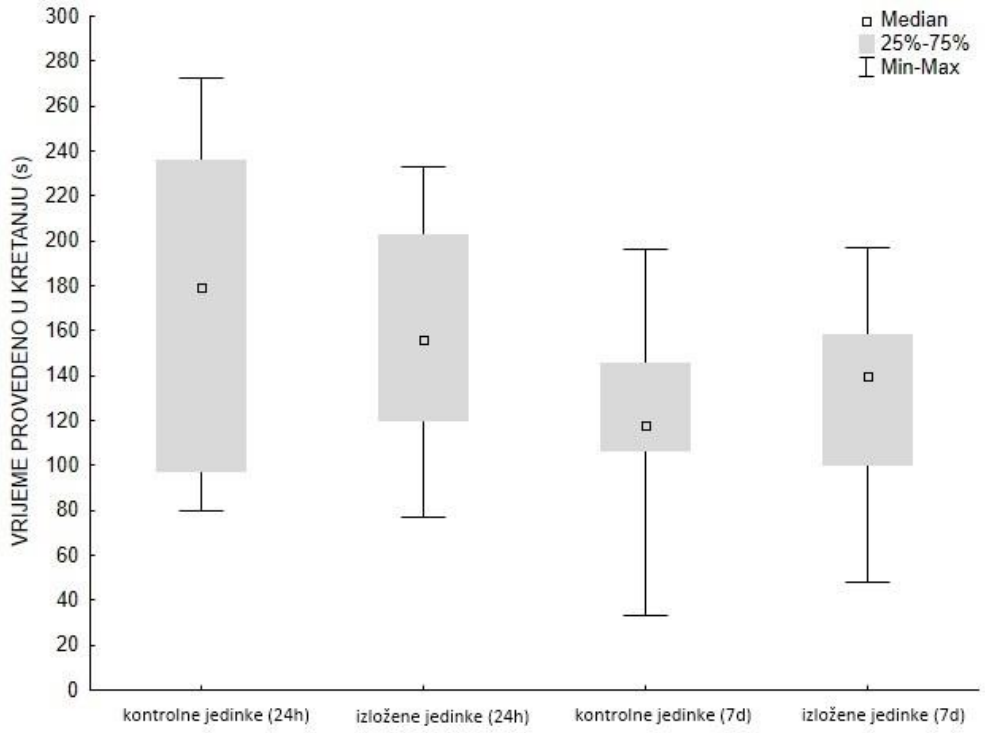
Aktivnost u novom prostoru snimala sam i analizirala samo za mješovite parove. Između jedinki izloženih mješavini spojeva i kontrolnih jedinki nije bilo statistički značajne razlike ni u jednom mjerenom parametru aktivnosti u novom prostoru (brzina kretanja, prijeđena udaljenost, vrijeme provedeno u kretanju).



Slika 6. Brzina kretanja izloženih jedinki (8) i odgovarajućih kontrolnih jedinki (8) signalnih rakova (*P. leniusculus*) nakon 24 h i nakon sedam dana izlaganja mješavini.



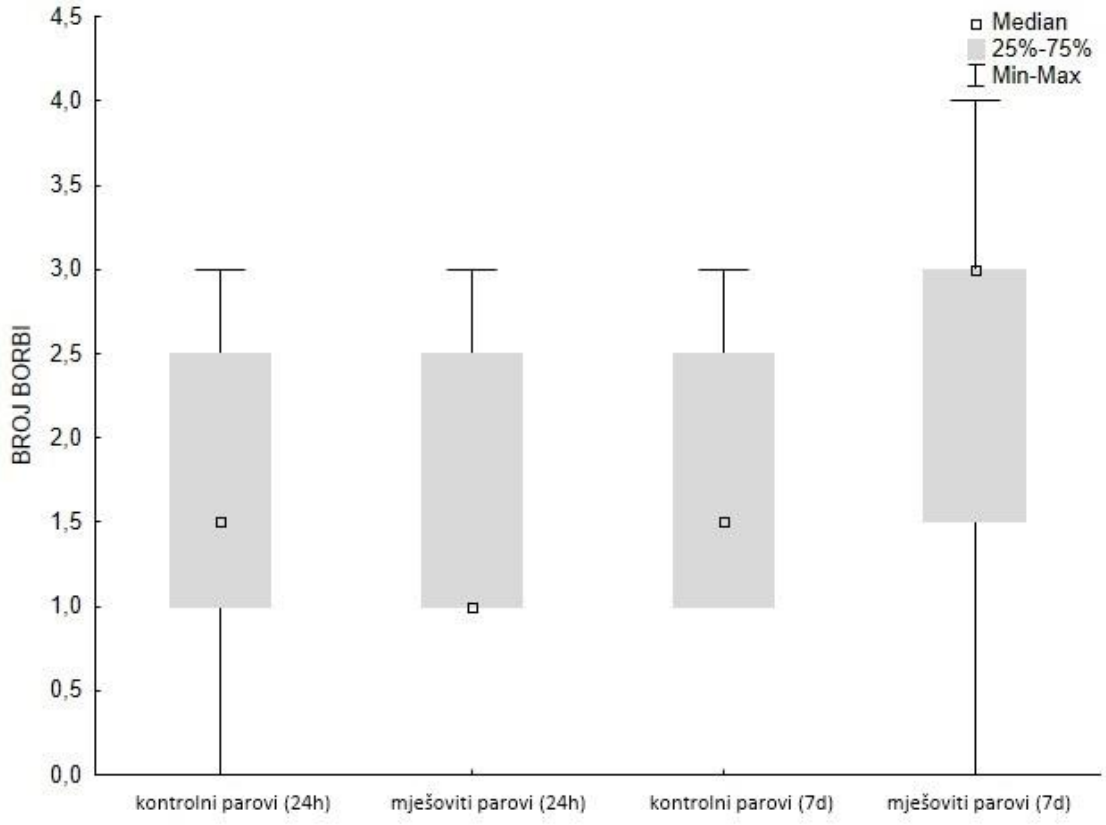
Slika 7. Prijeđena udaljenost izloženih jedinki (8) i odgovarajućih kontrolnih jedinki (8) signalnih rakova (*P. leniusculus*) izloženih tijekom 24 h i sedam dana mješavini spojeva.



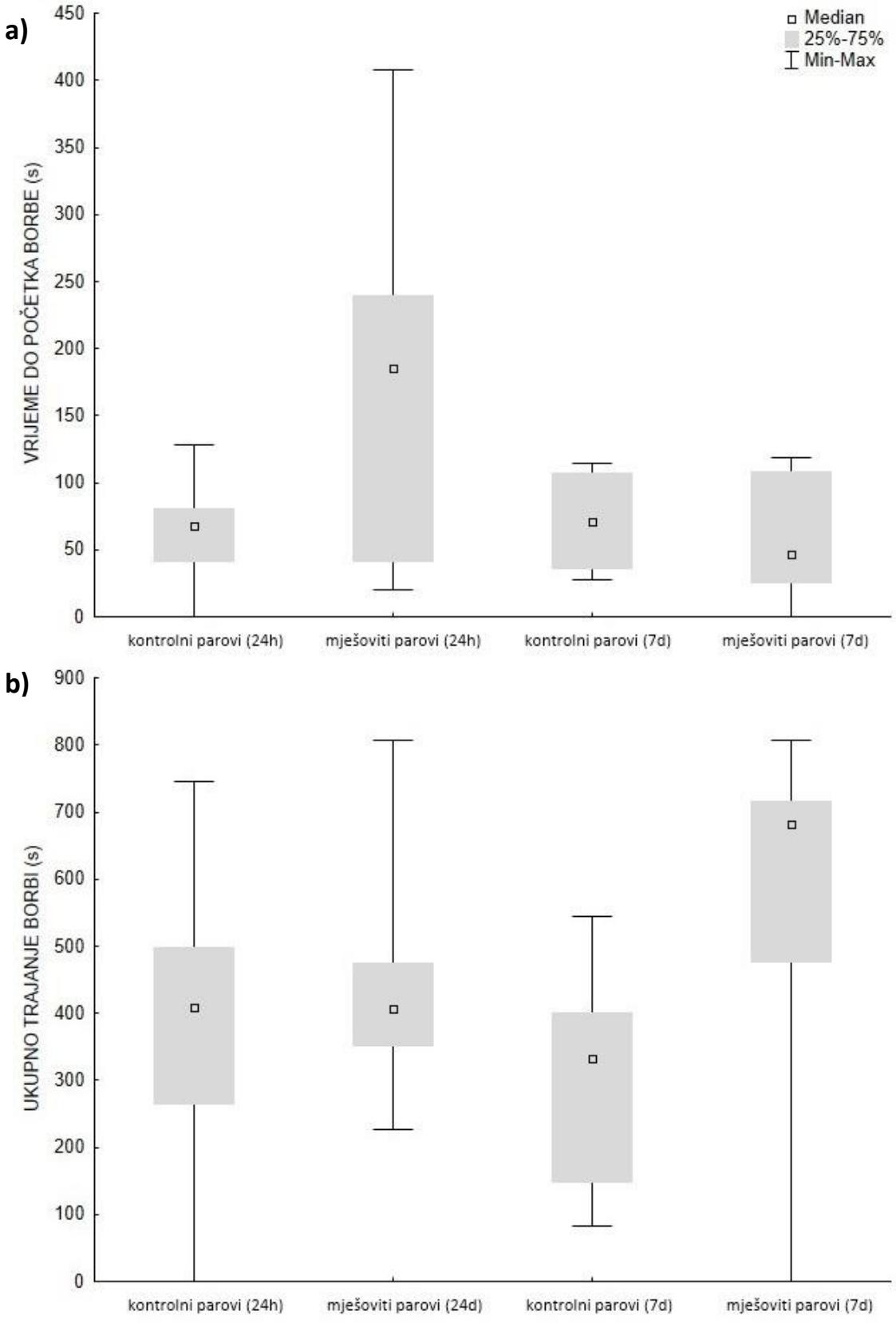
Slika 8. Prikaz vremena koje su izložene jedinke (8) i odgovarajuće kontrolne jedinke (8) signalnih rakova (*P. leniusculus)* proveli u kretanju nakon izlaganja mješavini spojeva 24 h i nakon sedam dana.

9.1.2. ANTAGONISTIČKE INTERAKCIJE RAKOVA

Broj borbi, trajanje borbi i vrijeme do početka prve borbe nisu se statistički značajno razlikovali između mješovitih i kontrolnih parova nakon 24 h ni nakon sedam dana izlaganja. Međutim, vidljivo je da se kod mješovitih parova nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva broj borbi i njihovo trajanje ipak povećalo, no ne značajno.



Slika 9. Broj borbi u mješovitim (8) i kontrolnim parovima (8) signalnih rakova (*P. leniusculus*) nakon 24 h i nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva.

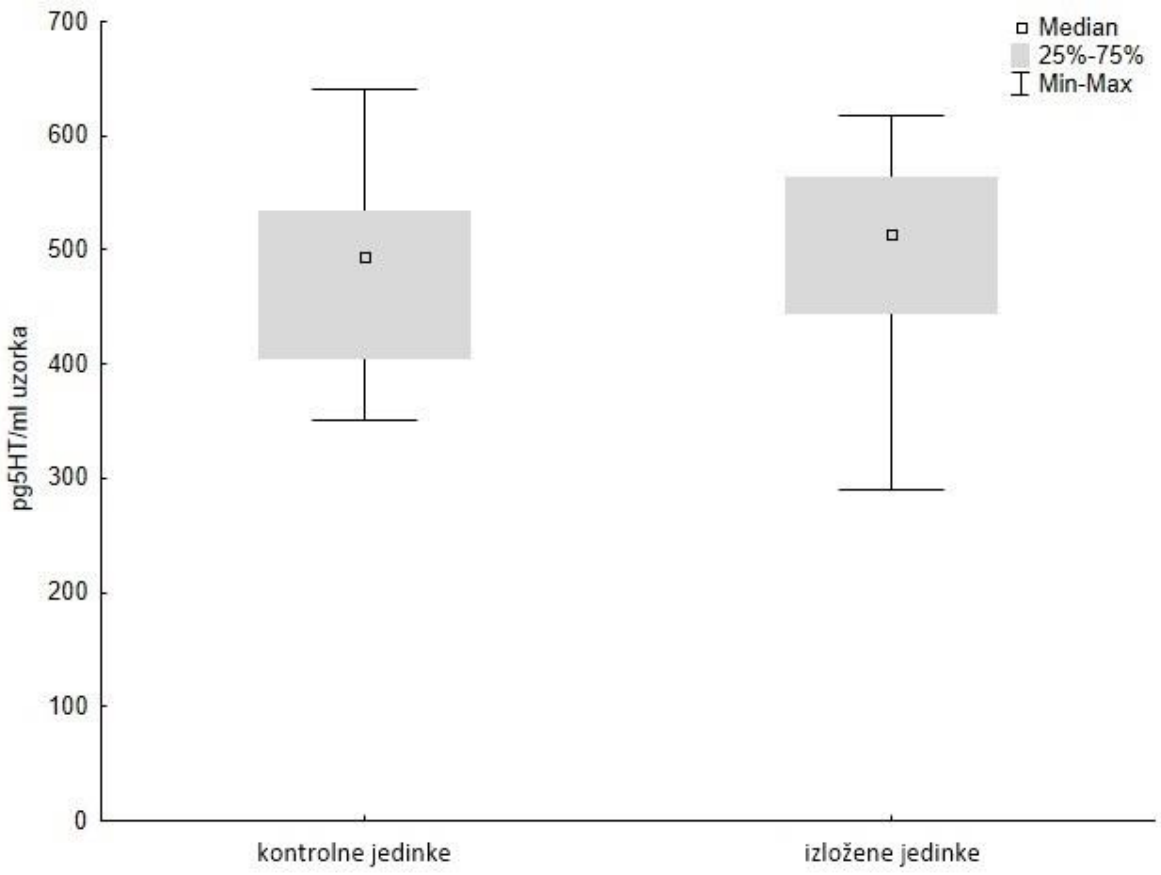


Slika 10. Vrijeme do početka borbe (a) i ukupno trajanje borbi (b) u mješovitim (8) i kontrolnim parovima (8) signalnih rakova (*P. leniusculus*) nakon 24 h i sedam dana izlaganja mješavini spojeva.

9.2. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU SIGNALNIH RAKOVA

9.2.1. RAZINA SEROTONINA U CEREBRALNIM GANGLIJIMA RAKOVA

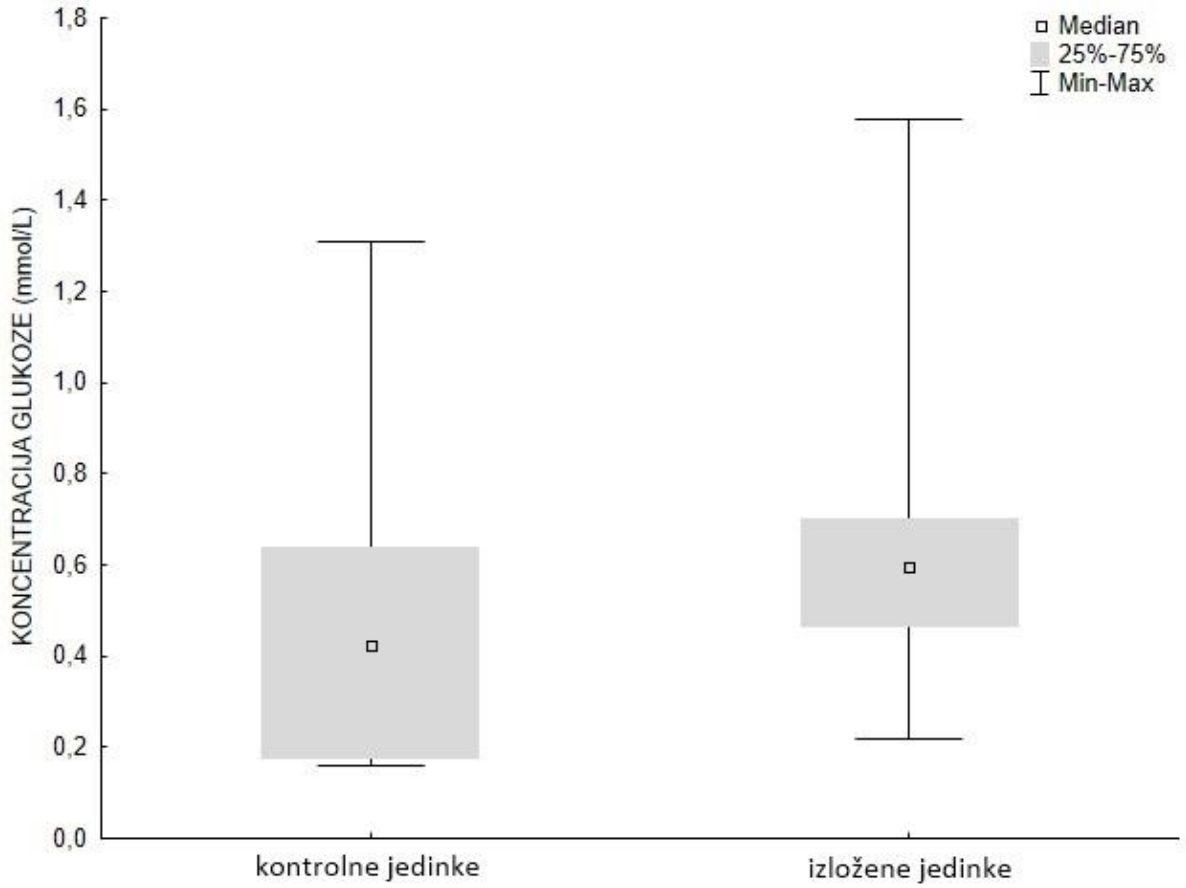
Razina serotonina u cerebralnim ganglijima rakova izloženih mješavini spojeva nakon sedam dana izlaganja nije se statistički značajno razlikovala od razine serotonina kod kontrolnih jedinki, što je prikazano na slici 11.



Slika 11. Koncentracije serotonina (pg 5HT/ml) u cerebralnim ganglijima jedinki signalnih rakova (*P. leniusculus*) izloženih mješavini spojeva (8) tijekom sedam dana i odgovarajućih kontrolnih jedinki (8).

9.2.2. KONCENTRACIJA GLUKOZE U HEMOLIMFI

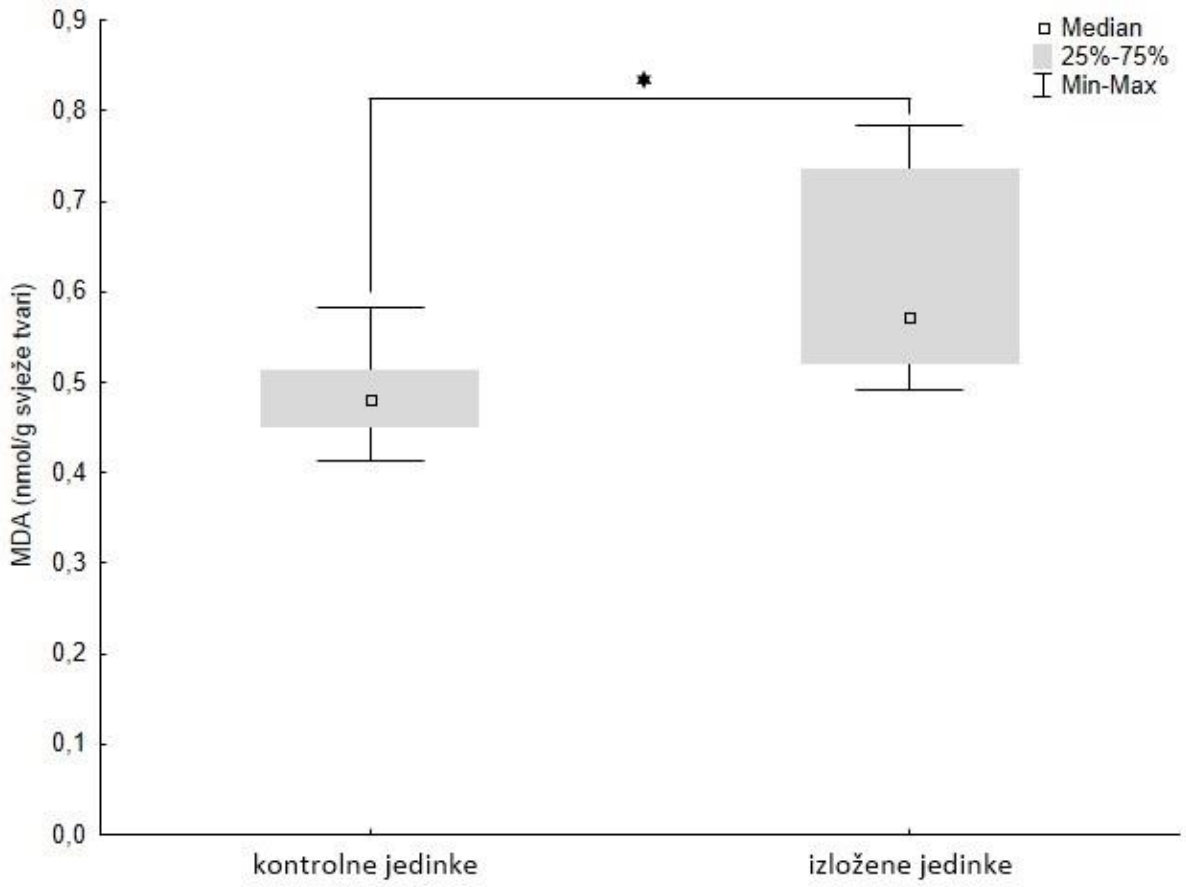
Koncentracija glukoze u hemolimfi rakova izloženih mješavini spojeva nakon sedam dana izlaganja nije se statistički značajno razlikovala od koncentracije glukoze u hemolimfi kontrolnih rakova, što je vidljivo na slici 12.



Slika 12. Koncentracije glukoze (mmol/L) u hemolimfi izloženih jedinki (8) signalnih rakova (*P. leniusculus*) i odgovarajućih kontrola (8) nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva.

9.2.3. RAZINA OKSIDATIVNOG STRESA – LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Usporedbom koncentracija malondialdehida (MDA) u tkivima hepatopankreasa utvrdila sam da je koncentracija MDA bila statistički značajno veća u izloženim jedinkama nego kod kontrola ($U = 8$, $n_1 = n_2 = 8$, $p = 0.0135$).



Slika 13. Koncentracija malondialdehida (MDA) (nmol/g) u tkivima hepatopankreasa jedinki signalnih rakova (*P. leniusculus*) izloženih mješavini (8) i odgovarajućih kontrola (8). Zvjezdica označava statistički značajnu razliku.

10. RASPRAVA

Vodeni ekosustavi kontinuirano su ugroženi ispuštanjem sve većih količina novih onečišćujućih tvari (EC), među koje spadaju farmaceutici i proizvodi za osobnu njegu (PPCP, eng. pharmaceuticals and personal care products) za koje je dokazano da mogu imati utjecaj i na ne-ciljane organizme (Nilsen i sur., 2018). Oni se u okolišu ne pojavljuju kao individualni spojevi, već kao višekomponentne mješavine. Većina prijašnjih istraživanja usredotočena je na utjecaj pojedinačnih spojeva, no vrlo malo pažnje pridaje se utjecaju mješavine farmaceutika, koje su realan prikaz stanja u okolišu. Pomati i sur. (2006) proveli je istraživanje utjecaja mješavine 13 lijekova u okolišno niskoj koncentraciji na ljudske embrionalne stanice, a rezultati su pokazali da je mješavina inhibirala rast embrionalne stanice HEK_{293} (eng. human embryonic cell), aktivirala signalni protein kinazu (protein koji se javlja kao odgovor na stres) te izazvala prekomjernu ekspresiju glutation-S-transferaze P1 gena. Istraživanje je pokazalo da mješavina farmaceutika može štetno utjecati na fiziologiju i morfologiju stanica (u ovom slučaju potaknula je umnožavanje stanica).

Cilj ovog istraživanja bio je eksperimentalno ispitati potencijalni utjecaj mješavine odabranih farmaceutika, antidepresiva citaloprama i nortriprilina te opojne droge amfetamina na fiziologiju (mjerenjem fizioloških pokazatelja: koncentracija serotonina u cerebralnim ganglijima, razina glukoze u hemolimfi i intenzitet oksidativnog stresa) i ponašanje (mjerenjem parametara aktivnosti u novom prostoru i antagonističkih interakcija) invazivne strane vrste signalnog raka (*P. leniusculus* (Dana 1852)).

10.1. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA PONAŠANJE RAKOVA

Prijašnja istraživanja pokazala su da farmaceutici u okolišno relevantnim koncentracijama imaju utjecaj na lokomotornu aktivnost rakova. Povećano ili smanjeno aktivno kretanje mijenja izloženost predatorima i potrošnju energije te direktno utječe na kondiciju i preživljavanje jedinki (Kubec i sur, 2019). Izlaganje jedinki mramornog raka (*Procambarus virginalis*) citalopramu u okolišno relevantnoj koncentraciji (1μg/L) 21 dan rezultiralo je smanjenim kretanjem izloženih jedinki u odnosu na njihove kontrole. (Burič i sur., 2018). Amfetamin, s druge strane, može djelovati oprečno. U okolišno relevantnoj koncentraciji, amfetamin unesen vodom kod signalnih rakova (*P. leniusculus*) smanjio je njihovu aktivnost (Ložek i sur., 2019b). Alcaro i sur. (2011) u svojem su istraživanju

injektirali visoku koncentraciju amfetamina u jedinke rakova vrste *O. rusticus* što je rezultiralo njihovom povećanom aktivnošću. Kod parametara aktivnosti koje sam mjerila (brzina kretanja, vrijeme provedeno u kretanju i prijeđena udaljenost) nije bilo statistički značajne razlike između jedinki izloženih mješavini spojeva i odgovarajućih kontrola ni nakon 24 h ni nakon sedam dana, što može značiti kako mješavina ovih spojeva u okolišno relevantnoj koncentraciji nema utjecaj na aktivnost rakova. No, prije donošenja takvih zaljučaka trebalo bi proširiti ova istraživanja produživanjem vremena izlaganja jedinki.

Agresivnost je glavna odrednica uspjeha u antagonističkim interakcijama deseteronožnih rakova, s obzirom da pobjeda u antagonističkim interakcijama donosi kompetitivnu prednost u pristupu limitiranim resursima poput hrane, partnera i zaklona (Moore, 2007), što direktno utječe na kondiciju jedinki. Kao što je ranije navedeno, djelovanjem odabranih farmaceutika očekivalo se povećanje koncentracije serotonina, koje bi, na temelju prethodnih istraživanja, moglo dovesti do povećanja agresivnosti kod jedinki rakova izloženih mješavini spojeva. U istraživanju Huber i sur. (1997) injektiranje serotonina u manje, subdominantne jedinke riječnih rakova (*Astacus astacus*) rezultiralo je ponovnim interakcijama s većim, dominantnim jedinkama te povećanjem trajanja i intenziteta borbi.

U našem istraživanju, ni kod jednog parametra antagonističkih interakcija nije bilo statistički značajne razlike, što znači da nije došlo do promjena u dinamici interakcija. Doduše, vidljiv je blagi porast u broju i ukupnom trajanju borbi kod mješovitih parova nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva, što odgovara istraživanju Huber i Delago (1998) koji su direktnim injektiranjem serotonina povećali motivaciju riječnih rakova (*A. astacus*) za ostajanje u borbi i ukupno trajanje borbi..

Mješavina spojeva također nije imala nikakav utjecaj na vrijeme do početka borbe ni na identitet pobjednika, što znači da nije ni povećala ni smanjila mogućnost dominacije u interakcijama. Ovakvi rezultati vjerojatno su povezani i s rezultatima mjerenja fizioloških parametara. S obzirom da izlaganje mješavini nije dovelo do promjene u koncentraciji serotonina u cerebralnim ganglijima, a serotonin regulira agresivno ponašanje, logično je da neće biti ni promjene u ponašanju rakova uslijed djelovanja mješavine. Pretpostavlja se da je razlog tomu kratko vrijeme izlaganja mješavini spojeva.

10.2. UTJECAJ MJEŠAVINE SPOJEVA NA FIZIOLOGIJU RAKOVA

Antidepresivi citalopram i nortriptilin djeluju na način da povećavaju količinu serotonina i omogućavaju njegovo duže zadržavanje u sinapsama. Amfetamin kod sisavaca povećava razinu serotonina i dopamina (Rothmann i Baumann, 2006), a isto je dokazano i kod rakova. Injektiranje amfetamina u mozgove rakova vrste *O. rusticus* rezultiralo je povišenjem razina dopamina i serotonina u lateralnim režnjevima (Datta i sur., 2018). Također, serotonin potiče izlučivanje hiperglikemijskog hormona koji regulira razinu glukoze u krvi, a otpuštanje glukoze u neuobičajeno velikim količinama moglo bi dovesti do hiperglikemije (Loredo-Ranjel i sur., 2017).

Uzevši u obzir opisana djelovanja pojedinačnih spojeva, nakon izlaganja rakova mješavini tih spojeva, očekivao se porast koncentracije serotonina u cerebralnim ganglijima, a time i porast razine glukoze u hemolimfi izloženih jedinki u odnosu na njihove kontrolne jedinke. Međutim, rezultati istraživanja nakon sedam dana pokazuju da do povećanja koncentracije serotonina u cerebralnim ganglijima niti koncentracije glukoze u hemolimfi kod izloženih jedinki nije došlo. Može se pretpostaviti da su korištene koncentracije spojeva bile preniske ili da vrijeme izlaganja nije bilo dovoljno dugo. Provedeno je istraživanje u kojem je dokazan utjecaj fluoksetina na fiziologiju jedinki rakova vrste *O. rusticus* tek pri koncentraciji od 500 μg/L (Tierney i sur., 2016), znatno većoj od koncentracija korištenih u ovom istraživanju. Također, faktor može biti i način ubrizgavanja spojeva. Direktnim injektiranjem spojeva u hemolimfu rakova vjerojatno bi se ubrzao proces djelovanja farmaceutika, s obzirom da je određenim antidepresivima, kao npr. citalopramu, potrebno od sedam dana do dva tjedna da se njegova koncentracija u plazmi ustabili (Burič i sur., 2018). Međutim, korištenjem većih koncentracija ili promjenom načina primjene spojeva ne bi ostvarili realne uvjete iz okoliša. Nadalje, duže izlaganje mješavini spojeva vjerojatno bi pokazalo značajnije rezultate. Ložek i sur. (2019) izlagali su jedinke signalnih rakova (*P. leniusculus*) analgetiku tramadolu 21 dan u okolišno relevantnoj koncentraciji (1 μg/L) te su zabilježili značajan porast brzine otkucaja srca kao posljedicu stresa.

Zagađenje farmaceuticima može za ne-ciljane organizme - rakove predstavljati stres. Stoga se ovim se istraživanjem nastojalo ispitati uzrokuju li odabrani farmaceutici oksidativni stres kod rakova. U ovom je radu, kao biomarker oksidativnog stresa, mjerena koncentracija malondialdehida (MDA) koji nastaje kao produkt lipidne peroksidacije. Rezultati istraživanja pokazali su da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji MDA između izloženih

jedinki signalnih rakova i odgovarajućih kontrola nakon sedam dana izlaganja mješavini spojeva. Kod izloženih jedinki zabilježena je značajno veća razina MDA što je bilo očekivano, s obzirom na to da se u stresnim uvjetima proizvodi više reaktivnih oblika kisika koji oštećuju DNA i ostale makromolekule, a postupnom razgradnjom višestruko nezasićenih masnih kiselina oslobađa se MDA. U radu El-Bassat i sur. (2012) istraživan je utjecaj razmjerno visokih koncentracija eritromicina, gemfibrozila, naproksena i fluoksetina na organizme iz različitih trofičkih skupina, između ostalog i na vodenbuhu (*Daphnia longispina*) i rotifera (*Brachionus calyciflorus*) tijekom 24 h. Rezultati tog istraživanja pokazali su porast koncentracije MDA i inhibiciju aktivnosti antioksidacijskih enzima nakon izlaganja organizama spomenutim farmaceuticima, što je u skladu s našim istraživanjima i pokazuje kako mješavine ovih spojeva mogu uzrokovati oksidativni stres čak i pri tako niskim koncentracijama.

Kako bi dobili cjelokupnu sliku o utjecaju farmaceutika u okolišno relevantnim koncentracijama na fiziologiju i ponašanje signalnog raka, u budućim istraživanjima trebalo bi produžiti trajanje izlaganja rakova mješavini spojeva, povećati broj uzoraka te ispitati utjecaj na ostale fiziološke procese kao što su rast i reprodukcija.

11. ZAKLJUČAK

- Nakon sedam dana izlaganja signalnih rakova mješavini farmaceutika (antidepresiva i amfetamina) nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentracijama serotonina i glukoze između izloženih jedinki i odgovarajućih kontrola.

- Izlaganje signalnih rakova mješavini farmaceutika u okolišno relevantnim koncentracijama rezultiralo je povećanjem koncentracije malondialdehida (MDA) što znači da je nastao oksidativni stres u ne-ciljanim organizmima (rakovima).

- Nije uočen statistički značajan utjecaj izlaganja mješavini na aktivnost niti na ponašanje, iako je broj i ukupno trajanje borbi bio nešto veći u parovima s izloženim jedinkama. Izlaganje nije utjecalo na dominaciju u interakcijama.

- U budućnosti treba produžiti trajanje izlaganja mješavini spojeva, povećati broj uzoraka te ispitati utjecaj na ostale fiziološke procese kao što su rast i reprodukcija za cjelokupnu sliku stanja okoliša.

12. LITERATURA

[1] Alcaro A., Panksepp J., Huber R. (2011): D-amphetamine stimulates unconditioned exploration/approach behaviors in crayfish: Towards a conserved evolutionary function of ancestral drug reward. Pharmacology, Biochemistry and Behavior **99**, 75-80.

[2] Archer E., Petrie B., Kasprzyk-Hordern B., Wolfaardt G. M. (2017): The fate od pharmaceuticals and personal care products (PPCPs), endocrine disrupting contaminants (EDCs), metabolites and illicit drugs in a WWTW and environmental waters. Chemosphere **174**, 437-446.

[3] Bergman D. A., Moore P. (2003): Field Observations of Intraspecific Agonistic Behavior of Two Crayfish Species, *Orconectes rusticus* and *Orconectes virilis*, in Different Habitats. *Biol. Bull.* **205**, 26-35.

[4] Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. (2012): Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*. **5 (1)**, 9–19.

[5] 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 B Biological Sciences **369**, 1-10.

[6] Bubb D. H., Thom T. J., Lucas M. C. (2004): Movement and dispersal of the invasive signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* in upland rivers. *Freshwater Biology* **49**, 357-368.

[7] Buřič M., Grabicová K., Kubec J., KoubaI 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.

[8] Datta U., van Staaden M., Huber R. (2018): Crayfish Self-Administer Amphetamine in a Spatially Contingent Task. Front. Physiol. **9:433**.

[9] Di Nica V. (2017): Studies of mixture effects of emerging contaminants in the environment (Doktorski rad, Sveučilište u Milanu - Bicocca).

[10] Di Nica V., Villa S., Finizio A. (2016): Toxicity of individual pharmaceuticals and their mixtures to *Aliivibrio fischeri*: Experimental results for single compounds and considerations

of their mechanisms of action and potential acute effects on aquatic organisms. Environmental Toxicology and Chemistry, **36(3)**, 807–81.

[11] El-Bassat R. A., Touliabah H. E., Harisa G. I. (2012): Toxicity of four pharmaceuticals from different classes to isolated plankton species. African Journal of Aquatic Science **37**, 71-80.

[12] Evgenidou E. N., Konstantinou I. K., Lambropoulou D. A. (2015): Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review. Science of The Total Environment **505**, 905-926.

[13] Fong P. P., Ford A. T. (2014): The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: a review. Aquatic Toxicology **151**, 4–13.

[14] 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 (4)**, 794-798.

[15] Fossat P., Bacqué-Cazenave J., De Deurwaerdére P., Delbecque J. –P., Cattaert D. (2014): Anxiety-like behavior in crayfish is controlled by serotonin. *Science* **344.**

[16] Galus M., Jeyaranjaan J., Smith E., Li H., Metcalfe C., Wilson J. Y. (2013): Chronic effects of exposure to a pharmaceutical mixture and municipal wastewater in zebrafish. Aquatic Toxicology **132-133**, 212-222.

[17] Holdich D. M., James J., Jackson C., Peay S. (2014): The North American signal crayfish, with particular reference to its success as an invasive species in Great Britain. Ethology Ecology & Evolution **26**, 232-262.

[18] Holway D. A., Suarez A. V. (1999): Animal behavior: An essential component of invasion biology. Trends in Ecology and Evolution **14 (8)**, 328-330.

[19] Huber R., Delago A. 1998. Serotonin alters decisions to withdraw in fighting crayfish, Astacus astacus: the motivational concept revisited. Journal of Comparative Physiology **182 (5)**, 573-583.

[20] Huber R., Kravitz E. A. (1995): A Quantitative Analysis of Agonistic Behavior in Juvenile American Lobsters (*Homarus americanus* L.). Brain Behavior and Evolution **46 (2)**, 72-83.

[21] Huber R., Panksepp J. B., Nathaniel T., Alcaro A., Panksepp J. (2011): Drug–sensitive reward in crayfish: An invertebrate model system for the study of SEEKING, reward, addiction, and withdrawal. *Neurosci Biobehav Rev.* **35 (9)**, 1847–1853.

[22] Huber R., Smith K., Delago A., Isaksson K., Krawitz E. A. (1997): Serotonin and aggressive motivation in crustaceans: Altering the decision to retreat. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5939–5942.

[23] 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)**, 1-11.

[24] Hudina S., Galić N., Roessink I., Hock K. (2011): Competitive interactions between co-occurring invaders: identifying asymmetries between two invasive crayfish species. Biological Invasions **13 (8)**, 1791-1803.

[25] Hudina S., Žganec K., Lucić A., Trgovčić K., Maguire I. (2013): Recent Invasion of the Karstic River Systems in Croatia Through Illegal Introductions of the Signal Crayfish. Freshwater Crayfish **19 (1)**, 21-27.

[26] Johnsen S. I., Taugbøl T. (2010): NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Pacifastacus leniusculus*.

[27] Kellner M., Porseryd T., Hallgren S., Porsch Hällström I., Hansen S., Olsén H. (2016): Waterborne citalopram has anxiolytic effects and increases locomotor activity in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Aquatic Toxicology **173**, 19-28.

[28] 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 (5)**.

[29] Kubec J., Hossain M. S., Grabicová K., Randák T., Kouba A., Grabic R., Roje S., Buřič M. (2019): Oxazepam Alters the Behavior of Crayfish at Diluted Concentrations, Venlafaxine Does Not. *Water* **11 (2)**, 196-206.

[30] 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.

[31] Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010): Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews **4**, 118-126.

[32] Loredo-Ranjel R., Fanjul-Moles M. L., Escamilla-Chimal E. G. (2017): Crustacean hyperglycemic hormone is synthesized in the eyestalk and brain of the crayfish Procambarus clarkii. PloS ONE **12 (4)**.

[33] Ložek F., Kuklina I., Císař P., Kubec J., Grabicová K., Randák T., Buřič M., Kozák P. (2019a): Book of abstracts, Symposium for European Freshwater Sciences: June 30-July 5, Zagreb, Croatia, 77.

[34] Ložek F., Kuklina I., Grabicová K., Kubec J., Buřič M., Grabic R., Randák T., Císař P., Kozák P. (2019b): Behaviour and cardiac response to stress in signal crayfish exposed to environmental concentrations of tramadol. Aquatic Toxicology **213,** 105217.

[35] Mercier A. J., May H. Y. (2010): Recording Behavioral Responses to Reflection in Crayfish. JoVE **39**.

[36] Moore P. A. (2007): Agonistic Behavior in Freshwater Crayfish: The Influence of Intrinsic and Extrinsic Factors on Aggressive Encounters and Dominance. U: Duffy J. E., Thiel M. (ur.) Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems: Crustaceans as Model Organisms, Oxford University Press, 90-114.

[37] Moore P. A., Bergman D. A. (2005): The Smell of Success and Failure: the Role of Intrinsic and Extrinsic Chemical Signals on the Social Behavior of Crayfish. Integr.Comp.Biol. **45**, 650–657.

[38] Nilsen E., Smalling K. L., Ahrens L., Gros M., Miglioranza K. S. B., Picó Y., Schoenfuss H. L. (2018): Critical Review: Grand Challenges in Assessing the Adverse Effects on Contaminants of Emerging Concern on Aquatic Food Webs. *Environmental Toxicology and Chemistry* **38**, 46–60.

[39] Panksepp J. B., Huber R. (2002): Chronic Alterations in Serotonin Function: Dynamic Neurochemical Properties in Agonistic Behavior of the Crayfish, *Orconectes rusticus*. *J Neurobiol*. **50 (4)**, 276–290.

[40] 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.

[41] Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rosetti C., Calamari D. (2006): Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 2442-2447.

[42] Reynolds J., Souty-Grosset C., Richardson A. (2013): Ecological Roles of Crayfish in Freshwater and Terrestrial Habitats. Freshwater crayfish **19:2**, 197-218.

[43] Rothmann R. B., Baumann M. H. (2006): Balance between Dopamine andSerotonin Release Modulates Behavioral Effects of Amphetamine-Type Drugs. Ann. N.Y. Acad. Sci. **1074**, 245–260.

[44] 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.

[45] 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.

[46] Štefan L., Tepšić T., Zavidić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina **43**, 84-93.

[47] 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.

[48] 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.

[49] Zeb A., Ullah F. (2016): A Simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. Journal of Analytical Methods in Chemistry.

[50] Zulandt T., Zulandt-Schneider R. A., Moore P. A. (2008): Observing agonistic interactionsalters subsequent fighting dynamics in the crayfish, *Orconectes rusticus*. Animal Behaviour **75**, 13-20.

13. ŽIVOTOPIS

OBRAZOVANJE

- **Diplomski studij Ekologije i zaštite prirode | Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (PMF) →** LISTOPAD 2017. – TRENUTNO
  - 5.godina redovnog studija, modul: Kopnene vode
  - sudjelovanje na 3. Simpoziju o biologiji slatkih voda (SOBS 2019, poster izlaganje)
- **Sveučilišna prvostupnica inženjerka urbanog šumarstva, zaštite prirode i okoliša (*univ.bacc.ing.silv.*) | Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu →**
  LISTOPAD 2012. – RUJAN 2017.
  - Preddiplomski studij Urbano šumarstvo, zaštita prirode i okoliša
- **Srednja škola| Prirodoslovno-matematička gimnazija (V.gimnazija), Zagreb →**
  RUJAN 2008. – SVIBANJ 2012

RADNO ISKUSTVO

- **Salvia d.o.o.** → LISTOPAD/STUDENI 2019.
  - Ljepljenje deklaracija na prehrambene i neprehrambene proizvode
- **Arbofield d.o.o.** → OŽUJAK 2019.
  - Izrada elaborata za procjenu statike i zdravstvenog stanja stabala
- **Bershka Hrvatska d.o.o.** → SIJEČANJ 2017. – OŽUJAK 2019.
  - Rad na kabini, rad u skladištu, slaganje dućana, usluge kupcima
- **Nacionalni centar za vanjsko vrednovanje obrazovanja (NCVVO), Zagreb →**
  LIPANJ/SRPANJ 2014., LIPANJ/SRPANJ 2015., LIPANJ/SRPANJ 2016., LIPANJ/SRPANJ 2017., LIPANJ/SRPANJ 2018., LIPANJ/SRPANJ 2019.
  - Poslovi nakon provedbe državne mature (administrativni poslovi)
  → OŽUJAK – LIPANJ 2019**.**
  - Sudjelovanje u projektu TIMSS (Međunarodno istraživanje trendova u znanju matematike i prirodoslovlja)
  → OŽUJAK/TRAVANJ 2018.
  - Sudjelovanje u provedbi PISA istraživanja (Programme for International Student Assessment)
- **Nine West (trgovina cipelama), Zagreb** → LISTOPAD 2015. – TRAVANJ 2016.
  - Prodavač

- **Volonterka | Gradsko društvo Crvenog križa (GDCK), Zagreb**
  → OŽUJAK 2010. – TRAVANJ 2016.
  - Sudjelovanje na Državnom natjecanju prve pomoći (2010., osvojeno 4.mjesto)
  - U sklopu volontiranja u Klubu mladih, položila sam ispit iz pružanja prve pomoći, te prošla edukaciju za predavača prve pomoći u osnovnim i srednjim školama

- Uz navedene poslove radila sam još i promocije proizvoda (čajeva, piva), radove u skladištu (AWT International, Zagreb) i arhivu (FINA – Financijska agencija) te inventure za revizijsku firmu LeitnerLeitner Consulting d.o.o.

VJEŠTINE I STRANI JEZICI

- Organizacijske vještine → Sudjelovanje u organizaciji 3. Hrvatskog simpozija invazivnih vrsta
- Vozačka dozvola B kategorije
- GIS programi (ArcGis, QGis) – osnovno znanje, aktivno korištenje paketa MS Office, Statistica
- Izrazito komunikativna, sklona timskom radu
- Pedantna, odgovorna, organizirana

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C1	C1	C1	C1	C1
Njemački	B1	B1	A2	A2	B1
	*Stupnjevi: A1/A2: početnik, B1/B2: Samostalni korisnik, C1/C2: Iskusni korisnik				

AKTIVNOSTI

- Aktivno se bavim sportom (futsal, rekreativno trčanje, planinarenje). Predstavnica sam ženske futsal ekipe na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. U slobodno vrijeme samostalno učim njemački i španjolski jezik.