

Promjene u imunom odgovoru signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), duž invazivnog areala

Abramović, Lucija

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:217:525453>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Abramović

**Promjene u imunosnom odgovoru signalnog raka,
Pacifastacus leniusculus (Dana, 1852), duž invazivnog
areala u Korani**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Lucija Abramović

**Changes in the immune response of the signal crayfish
Pacifastacus leniusculus (Dana, 1852), along its
invasive range in Korana river**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biologiju i ekologiju mekušaca i rakova na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod voditeljstvom doc. dr. sc. Sandre Hudina, te neposrednim voditeljstvom mag. biol. exp Paule Dragičević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije. Diplomski rad izrađen je u sklopu uspostavnog znanstveno-istraživačkog projekta „Promjene sastava patogena i imunološkog odgovora tijekom širenja areala uspješnih invazivnih vrsta slatkovodnih rakova“ (HRZZUIP-2017-05-1720).

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Sandri Hudina za veliko strpljenje i pomoć pri izradi diplomskog rada. Posebno se zahvaljujem asistentici Pauli Dragičević na velikoj susretljivosti, ustupljenoj literaturi te savjetima i pomoći oko izrade diplomskog rada.

Veliko hvala kolegici Aniti Tarandek uz koju sam odradila praktični dio ovog rada.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Ivani Maguire, asistentici Leoni Lovrenčić, Ljudevitu Luki Boštjančiću i Leni Bonassin na pomoći u laboratoriju.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji i bliskim prijateljima na pruženoj potpori a posebice svojoj najdražoj osobi S.M. koji je uvijek tu za mene.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Promjene u imunom odgovoru signalnog raka, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), duž invazivnog areala u Korani Lucija Abramović

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Imunosni sustav ima izrazito važnu ulogu obrane organizma od ozljeda i patogena, čime je i važan čimbenik invazivnog uspjeha invazivnih stranih vrsta. Signalni rak (*Pacifastacus leniusculus*) je jedna od najuspješnijih invazivnih stranih vrsta u slatkovodnim ekosustavima Europe, a prisutan je u Hrvatskoj u rijekama Muri, Dravi i u rijeci Korani, u kojoj se širi nizvodno i uzvodno. Imunosni odgovor može ovisiti o brojnim abiotičkim i biotičkim čimbenicima, može biti utjecan i samim fiziološkim statusom jedinki koji također može biti određen širenjem jedinki. Ovim istraživanjem usporedili smo jačine imunog odgovora između jedinki signalnog raka iz invazijskog središta i jedinki sa invazijskih fronti rijeke Korane mjereći nekoliko standardnih parametara imunog odgovora: broj hemocita, snagu reakcije inkapsulacije, aktivnost enzima fenoloksidaze, količinu profenoloksidaze. Uz imunost, mjereni su i kondicijski parametri: Fultonov kondicijski faktor i hepatosomatski indeks jer je imunost usko vezan uz kondiciju jedinki. Hepatosomatski indeks i snaga reakcije inkapsulacije bili su značajno veći u jedinki iz invazijske fronte, što ukazuje kako jedinke s invazijskih fronti imaju jači imunost i bolju kondiciju od jedinki sa invazijskih središta.

(32 stranice, 11 slika, 2 tablice, 62 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: invazivne strane vrste, slatkovodni ekosustavi, širenje areala, eko-imunologija

Voditelj: doc. dr. sc. Sandra Hudina

Neposredni voditelj: Paula Dragičević, mag.biol.exp.

Ocjenitelji:

Doc. dr. sc. Sandra Hudina

Prof. dr. sc. Ivana Maguire

Doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

Rad prihvaćen: 10. 2. 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Changes in the immune response of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), along its invasive range in Korana river

Lucija Abramović

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Immune system has an important role in defence of an organism from pathogens and injuries which makes it an important factor of invasion success of invasive alien species. Signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) is among the most successful invaders of European freshwater ecosystems, and is present in Croatia in the Mura, Drava and Korana river. In the Korana river it spreads both upstream and downstream. Immune response can depend upon a number of abiotic and biotic parameters, including individual physiological status, which may be dependent upon the dispersal process. In this thesis I have compared standard immune reaction parameters between signal crayfish individuals from invasion cores and fronts: number of hemocytes, activity of phenoloxidase, quantity of prophenoloxidase and encapsulation response. In addition to immune parameters, I have measured two condition indices: Fulton's condition factor and hepatosomatic index, since immune response and individual physiological condition are tightly connected. Values of hepatosomatic index and encapsulation response were significantly higher in individuals from invasion fronts compared to individuals from invasion cores, indicating that individuals from invasion fronts have stronger immune responses than individuals from invasion cores.

(32 pages, 11 figures, 2 tables, 62 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: invasive alien species, freshwater ecosystems, areal increase, eco-immunology

Supervisor: doc. dr. sc. Sandra Hudina

Assistant Supervisor: Paula Dragičević, mag.biol.exp.

Reviewers:

Dr. Sandra Hudina Asst. Prof.

Dr. Ivana Maguire Full Prof.

Dr. Mirela Sertić Perić Asst. Prof.

Thesis accepted: 10. 2. 2022.

Sadržaj

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1 Signalni rak – invazivna strana vrsta slatkovodnih ekosustava Europe | 1 |
| 1.2 Širenje invazivnog areala..... | 3 |
| 1.3 Imunologija beskralješnjaka | 5 |
| 2. Cilj istraživanja | 9 |
| 3. Materijali i metode | 9 |
| 3.1 Područje istraživanja | 9 |
| 3.2 Analize imunosnog odgovora | 11 |
| 3.2.1 Mjerenje snage reakcije inkapsulacije | 11 |
| 3.2.2 Uzorkovanje hemolimfe | 12 |
| 3.2.3 Mjerenje aktivnosti enzima fenoloksidaze (PO), ukupne aktivnosti profenoloksidaze (proPO) i mjerenje ukupnog proteina u hemolimfi | 14 |
| 3.2.4 Brojanje hemocita..... | 16 |
| 3.3 Izračun kondicijskih parametara | 17 |
| 3.4 Statistička analiza podataka | 17 |
| 4. Rezultati..... | 18 |
| 4.1 Deskriptivna statistika | 18 |
| 4.2 Razlike među spolovima u mjerenim parametrima..... | 19 |
| 4.3 Korelacija veličine jedinice sa parametrima kondicije i imunosnog odgovora | 20 |
| 4.4 Statističke analize imunosnog odgovora između invazijskih središta i fronti | 21 |
| 4.5 Statističke analize kondicijskih faktora između invazijskih središta i fronti | 22 |
| 5. Rasprava | 23 |
| 6. Zaključak | 26 |
| 7. Literatura | 27 |
| 8. Životopis..... | 32 |
| 8.1 Obrazovanje | 32 |
| 8.2 Iskustvo..... | 32 |
| 8.3 Objavljeni radovi..... | 32 |

1. Uvod

1.1 Signalni rak – invazivna strana vrsta slatkovodnih ekosustava Europe

Slatkovodni ekosustavi zauzimaju tek 0.8% Zemljine površine te 0.01% vode na Zemlji a stanište su trećini vrsta kralješnjaka i još neprocijenjenom broju endemičnih vrsta beskralješnjaka. Slatkovodna staništa su pod velikim antropogenim pritiskom zbog brojnih usluga koje pružaju čovječanstvu, a glavni se pritisci mogu svrstati u pet kategorija: prekomjerno iskorištavanje, mijenjanje toka vode, zagađenje vode, uništavanje staništa te invazija stranih vrsta (Dudgeon i sur. 2006). Invazivne strane vrste su alohtone vrste koje u nova staništa najčešće introducira čovjek, a one svojim širenjem u novom području negativno utječu na lokalnu bioraznolikost, funkcije ekosustava, stvaraju ekonomsku štetu ili štete ljudskom zdravlju. Uz ostale globalne probleme poput gubitka staništa, klimatskih promjena, zagađenja i direktnog iskorištavanja divljih vrsta, invazivne strane vrste su jedna od najvećih direktnih prijetnja bioraznolikosti, isto vrijedi i za slatkovodne ekosustave koji imaju veliku raznolikost ali su izrazito osjetljivi i ugroženi (MINGOR).

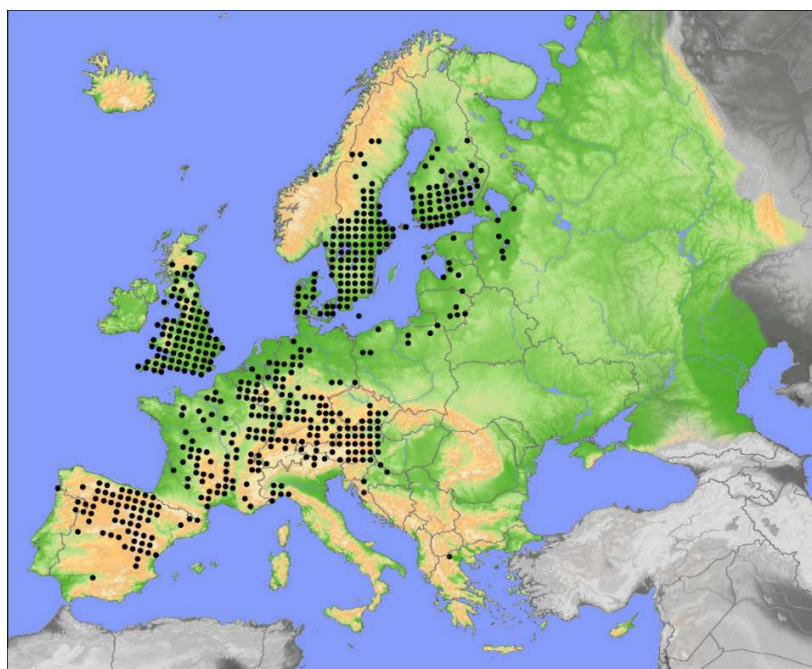
U slatkovodnim sustavima Europe nalazi se pet autohtonih vrsta od kojih su četiri zaštićene na nacionalnoj i međunarodnoj razini zbog pada brojnosti njihovih populacija, te više od deset invazivnih stranih vrsta (Holdich i sur. 2009, Kouba i sur. 2014). Slatkovodni deseteronožni rakovi imaju ekološku ulogu ključnih vrsta jer vrlo dugo žive (ovisno o vrsti: 2-20 godina), omnivori su čime utječu na sastav zajednica drugih beskralješnjaka predacijom, smanjuju algalni obraštaj i opskrbljuju filtratore i sakupljače sitnim organskim česticama usitnjavajući listinac, te utječu na populacije vodozemcaca i riba zbog predacije njihovih jaja (Nyström i sur. 1996, Reynolds i sur. 2013). Rakovi su također plijen većim ribama poput štuke i vidrama. Deseteronožni rakovi su isto tako ekološki inženjeri zbog bioturbacije koju vrše kada se ukopavaju u sediment, te ukopavanjem u obale rijeka mogu utjecati na njihovu stabilnost i dovesti do erozije (Faller i sur. 2016).

Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852), je najrasprostranjenija invazivna slatkovodna vrsta raka u Europi (Holdich i sur. 2009, Kouba i sur. 2014; Slika 1). Vrsta je unesena u Europu uvozom u Švedsku 1959. godine kako bi nadomjestila znatno smanjene populacije autohtone vrste rakova (*Astacus astacus* (Linnaeus 1758)) koje je usmrtila bolest račja kuga. U

Švedskoj, Finskoj i Poljskoj konzumacija riječnih rakova je česta stoga je ova vrsta uvezena zbog svoje otpornosti na bolest račje kuge (Holdich i sur. 2009). U ostatak Europe dospio je uvozom iz Švedske ili SAD-a, te ilegalno, i do 2014. godine je već rasprostranjen po većini Europe i prisutan je u najmanje 29 zemalja Europske Unije (Holdich i sur. 2009, Kouba i sur. 2014; Slika 2).



Slika 1. Signalni rak, *Pacifastacus leniusculus*, prepoznatljiv po svijetlo plavoj mrlji na bazi pomičnog prsta kliješta. Slikala: Sandra Hudina.



Slika 2. Prisutnost signalnog raka u Europi 2014. god. Slika preuzeta iz rada Koube i suradnika 2014.

Signalni rak je dolaskom u Europu donio i probleme jer su istraživanja pokazala da signalni rakovi konzumiraju više beskralješnjaka, biljaka i algi od autohtonih vrsta rakova čime je njihov

utjecaj na zajednicu destruktivniji (Crawford i sur. 2006, Nystrom i sur. 1999, Nyström i Strand 1996, Vaeßen i Hollert 2015). Isto tako ova vrsta raste brže, ranije doseže spolnu zrelost i ima veći fekunditet od autohtonih vrsta rakova (Holdich i sur. 2014). Također signalni rak je agresivnija vrsta od autohtonih vrsta rakova što je pokazano laboratorijskim istraživanjima (Hudina i sur. 2016, Soderback 1991), te veća agresivnost daje prednost u kompeticiji s autohtonim vrstama u prirodi gdje je zabilježeno kako populacije signalnog raka koje nisu prenosioci bolesti račje kuge (populacije bez patogena) uspješno istiskuju autohtone populacije rakova kompeticijom (Westman i sur. 2002). Najvažnije, signalni rak se pokazao vektorom prijenosa bolesti račje kuge. On ne obolijeva od račje kuge jer je koevoluirao sa uzročnikom, oomicetom *Aphanomyces astaci* Schikora 1906, na čiju su zarazu autohtone vrste rakova jako osjetljive zbog čega je došlo do pomora nekih populacija autohtonih vrsta u Europi (Cerenius i sur. 2003, Holdich i sur. 2009, Utneštam 1969). Izrazito uspješno rasprostranjenje signalnog raka omogućila je prilagodljivost ove vrste na širok raspon okolišnih uvjeta te do danas signalni rak se nalazi u rijekama, jezerima i bočatim vodama (Reynolds i sur. 2013). Osim što podnosi visok salinitet bočatih voda, signalni rak može živjeti u širokom temperaturnom rasponu od 5-30 °C (Rutledge i Pritchard, 1981).

Signalni rak je prvi put u Hrvatskoj zabilježen 2008. godine u rijeci Muri kamo je dospio nizvodnim koloniziranjem iz Slovenije (Holdich i sur. 2009, Hudina i sur. 2009). U rijeci Korani prvi put je zabilježen 2011. godine, gdje je uveden ilegalno u donjem dijelu toka (Hudina i sur. 2013). Do danas, ova vrsta se rasprostranila duž 30km donjeg dijela toka Korane, a kolonizira podjednako uzvodno 1.3 km/god. i nizvodno 0.3 km/god (Dragičević i sur. 2020). Invazija rijeke Korane tim je više problematična zbog toga što nju i njene pritoke, koji pripadaju crnomorskom slijevu, naseljavaju tri zavičajne vrste: *Astacus astacus*, *Pontastacus leptodactylus* i *Austropotamobius torrentium* (Schränk) (Hudina i sur. 2017). Vrste *Astacus astacus* i *Austropotamobius torrentium* zaštićene su na nacionalnoj razini Zakonom o zaštiti prirode (Narodne novine 127/19) i Pravilnikom o strogo zaštićenim vrstama (Narodne novine 144/13) te na međunarodnoj razini Direktivom o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore (Council Directive 92/43/EEC).

1.2 Širenje invazivnog areala

Kako bi alohtona vrsta postala invazivna, jedinke te vrste prvo moraju biti uvedene u novo područje, zatim se treba uspostaviti populacija alohtonih jedinki nakon čega se uspostavlja

populacija počinje širiti (White i Perkins 2012), te imati negativan ekološki ili ekonomski utjecaj ili negativno utjecati na ljudsko zdravlje. Dolaskom na novo područje, invazivna strana vrsta se potencijalno susreće sa novim kompetitorima, uvjetima u okolišu te predatorima, na što se mora prilagoditi prije širenja (White i Perkins 2012). Širenje je proces koji započinje kada invazivna strana vrsta uspostavi stabilnu i rastuću populaciju u novom okolišu, te zbog rasta gustoće populacije i potrebe za većim životnim prostorom i resursima širi areal i područje rasprostranjenosti (White i Perkins 2012, Burton i sur. 2010). Pri širenju invazivne strane vrste, mlađe rubne populacije sa manjim brojem jedinki tvore invazijske fronte dok se u središtu invazivnog areala nalaze starije populacije sa velikom gustoćom jedinki i tvore invazivno središte (White i Perkins 2012, Phillips 2009). Pošto invazijske fronte nastanjuju samu granicu invazivnog areala, gustoća populacije je vrlo mala i podložna nasumičnom izumiranju te jedinke ove populacije ulažu više energije u razmnožavanje (Burton i sur. 2010, Phillips 2009, White i Perkins 2012).

Kako su invazivne strane vrste u novom području prilično uspješne, može se reći da su translokacijom u novom području izmakle pritisku svojih predatora, kompetitora i velikom dijelu patogena s kojima su živjele u vlastitom arealu (White i Perkins 2012, Phillips i sur. 2010). Kako invazivnoj populaciji zbog širenja potencijalno više ne prijete infekcije patogenima iz izvornog staništa, moguće je kako će s vremenom doći do gubitka prilagodbi imunosnog odgovora na te patogene (White i Perkins 2012, Phillips i sur. 2010). Prema tome novije generacije invazivne vrste potencijalno neće trošiti energiju za održavanje prilagodbe imunosnog odgovora.

Iako se invazivna vrsta na novom području ne susreće sa kompetitorima i predatorima iz izvornog staništa, dio populacije koji je bio introduciran u novo područje mogao je donijeti patogene iz izvornog staništa (Phillips i sur. 2010) ili u novom okolišu biti izložen novim (sličnim) patogenima (Dragičević i sur. 2021). Inficirane jedinke uglavnom pripadaju populaciji invazijskog središta jer infekcija jedinki na invazijskoj fronti je otežana zbog male gustoće populacije (Phillips i sur. 2010). Ukoliko je patogen prisutan u relativno malom udjelu populacije, sama populacija će s vremenom gubiti prilagodbe imunosnog sustava za obranu od tog patogena (White i Perkins 2012, Phillips i sur. 2010). Zbog toga što populacija više ne ulaže energiju u određen imunosni odgovor, moći će energiju uložiti u druge aspekte kao što su brži rast ili veći fekunditet (Schmid-Hempel 2003, White i Perkins 2012). Stoga promjene u imunosnom odgovoru koje nastaju kao posljedica

introdukcije u novo područje ili kao posljedica širenja areala u novom području mogu značajno utjecati na rast populacije i na invazivni uspjeh vrste.

S druge strane iako invazivne strane vrste translokacijom u novo područje više nemaju pritisak vlastitih predatora i velikog dijela patogena, one će se širenjem susresti sa patogenima novog okoliša te će biti inficirane lokalnim generalistima (Kołodziej-Sobocińska i sur. 2018). Invazivna strana vrsta u novom okolišu može biti u kompeticiji sa sličnom autohtonom vrstom te biti dobar domadar za lokalne patogene te bi jači imunosni odgovor na invazijskim frontama bio od koristi, uz to invazivna populacija predstavlja opasnost autohtonoj koja se može ponovo zaraziti vlastitim patogenima (Kelly i sur. 2009). Kako su mlađe populacije invazijskih fronti one koje predvode samo širenje invazivne vrste tako će one biti prve u doticaju s novim lokalnim patogenima te će svoju energiju ulagati u jak i efikasan imunosni odgovor koji je efikasniji od imunosnog odgovora u jedinki iz invazijskog središta (Diagne i sur. 2016). Iz svega navedenog je vidljivo kako jedinke mogu imati koristi i od pojačanog i od smanjenog imunosnog odgovora prilikom širenja areala.

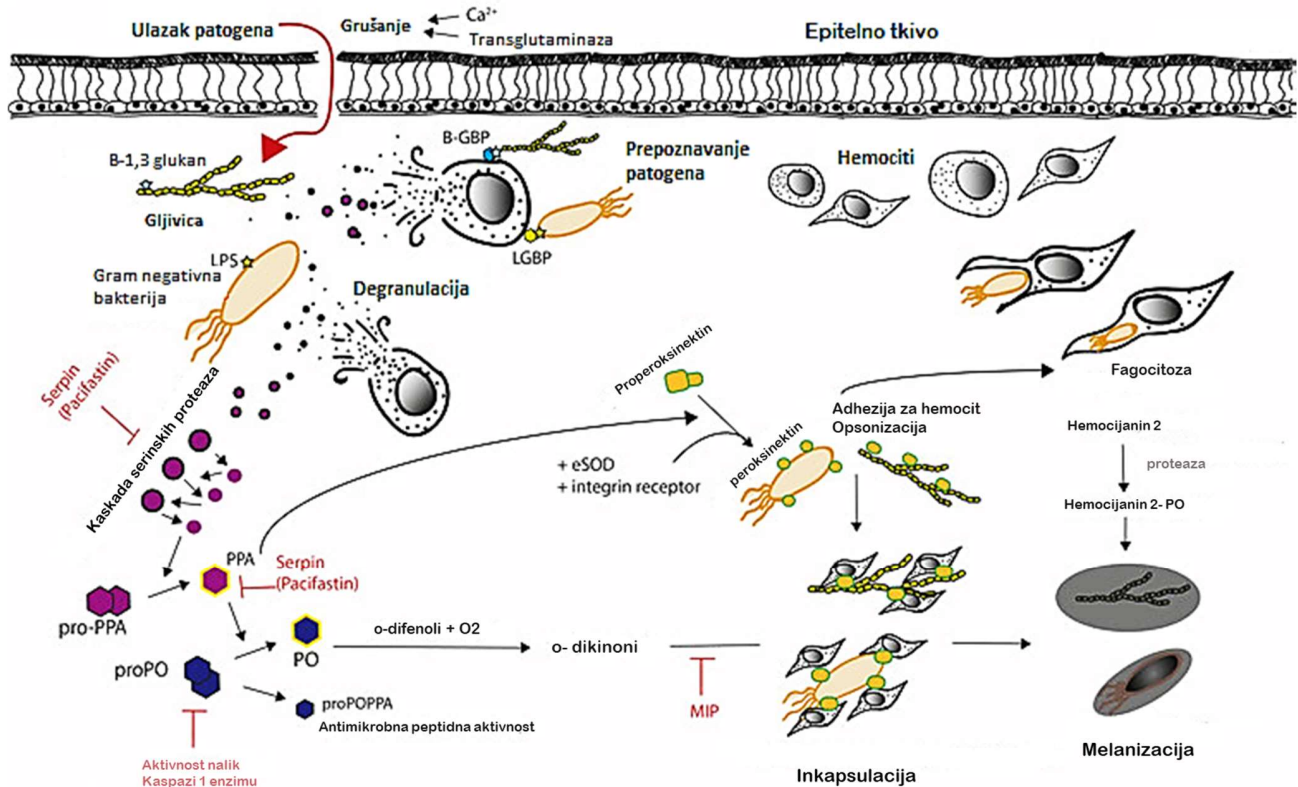
Kao što je ranije spomenuto, signalni rak je invazivna vrsta u rijeci Korani koja širi svoj invazivan areal unutar kojeg postoje populacije invazijskog središta sa velikom gustoćom jedinki i invazijske fronte sa manjom gustoćom jedinki (Dragičević i sur. 2020). Utvrđeno je da su jedinke sa invazijske fronte u boljem kondicijskom statusu od jedinki iz invazijskog središta (Rebrina i sur. 2015). Isto tako je utvrđena prisutnost uzročnika račje kuge u otprilike 7% populacije signalnog raka (Pavić i sur. 2020). Nizvodna invazijska fronta je u doticaju i kompeticiji s uskoškarim rakom što može dovesti do širenja uzročnika račje kuge u populaciji uskoškarog raka (Dragičević i sur. 2020), ali potencijalno i do prijenosa nekih lokalnih patogena sa zavičajne na invazivnu stranu vrstu. Ovim radom želim ispitati hoće li se jačina imunosne reakcije razlikovati između populacija invazijskog središta i invazijske fronte signalnog raka i na koji način. Smatram da će jačina imunosne reakcije biti veća u signalnih rakova sa invazivne fronte jer nailaze na nove potencijalne patogene tokom širenja u novi životni prostor.

1.3 Imunologija beskralješnjaka

Imunosni sustav beskralješnjaka sastoji se samo od urođene imunosti za razliku od kralješnjaka čiji se imunosni sustav uz urođenu sastoji i od specifične imunosti (Korkut 2018, Söderhäll i Cerenius 1998). Beskralješnjaci nemaju prava antitijela niti limfocite te ne postoji

imunosa memorija (Korkut 2018). Imunološke reakcije beskralješnjaka dijele se na stanične i humoralne. Stanične imunološke reakcije su fagocitoza patogena ili inkapsulacija istog ukoliko je prevelik od strane hemocita, dok humoralne reakcije uključuju grušanje hemolimfe, antimikrobne peptide, kisikove radikale i proteine aktivacijske kaskade enzima profenoloksidaze (proPO) koji u hemolimfu dolaze egzocitozom iz granulocita (Korkut 2018). U hemolimfi deseteronožnih rakova postoje tri vrste hemocita: hijalinociti, semigranulociti i granulociti te svi sudjeluju u imunološkim reakcijama. Semigranulociti i granulociti sadrže granule sa proPO proteinima (Soderhall i Smith 1983). Hijalinociti sudjeluju u fagocitozi manjih patogena. Imunološke reakcije poput inkapsulacije patogena i egzocitoza granula iz granulocita i semigranulocita smanjuju broj hemocita u hemolimfi (Korkut 2018, Johansson i Söderhäll 1985).

Prvu liniju obrane od patogena u beskralješnjaka čini egzoskelet koji svojom tvrdoćom fizički otežava pristup patogenu. Ukoliko neki patogen npr. bakterija ili gljivica uspiju ući u tijelo probivši epitelno tkivo, tada će se pokrenuti imunosna reakcija (Korkut 2018; Slika 3). Proteini za prepoznavanje (PRP- pattern recognition proteins) koji se nalaze slobodni u hemolimfi će se vezati za slijedeće molekule koje se nalaze na površini patogena: lipopolisaharide iz gram negativnih bakterija, β -1,3 glukane iz staničnih stijenki gljivica te peptidoglikane iz staničnih stijenki bakterija. Nakon što proteini za prepoznavanje označe patogen oni će se vezati za semigranulocite i granulocite nakon čega slijedi drgranulacija ovih hemocita (Johansson i Söderhäll 1985, Sritunyalucksana i Soderhall 2000). Unutar vezikula granulocita i semigranulocita rakova i kukaca nalazi se profenoloksidaza (proPO), neaktivna inačica enzima fenoloksidaze (PO) koji sudjeluje u reakcijama inkapsulacije i melanizacije (Johansson i Söderhäll 1985, Korkut 2018). Za nastavak učinkovite obrane od patogena potrebno je proteolitski aktivirati ispušteni proPO u PO što je uloga serinske proteaze čiji je naziv profenoloksidaza aktivirajući enzim (ppA) (Sritunyalucksana i Soderhall 2000, Cerenius i Söderhäll 2004).



Slika 3. Prikaz imunodne reakcije beskralješnjaka na ulaz patogena u tijelo. Pri ulasku patogena poput gljivice ili bakterija u tijelo beskralješnjaka pokreće se imunodna reakcija koja počinje prepoznavanjem patogena od strane proteina za prepoznavanje. Nakon prepoznavanja počinje degranulacija semigranulocita i granulocita čije granule ispuštaju profenoloksidazu te se pokreće aktivacijska kaskada proPO putem različitih serinskih proteaza koje u konačnici aktiviraju profenoloksidazu u fenoloksidazu. Fenoloksidaza sudjeluje u reakcijama inkapsulacije i melanizacije katalizirajući stvaranje melanina dok hemociti sudjeluju u fagocitozi ili inkapsulaciji patogena. Preuzeto i prilagođeno iz: Korkut (2018).

Degranulacijom iz granula u hemolimfu izlazi proPO i pokreće se aktivacijska kaskada fenoloksidaze koja uključuje velik broj molekula, prije nego što ppA aktivira proPO, treba i sam biti aktiviran nakon opsežne kaskade serinskih proteaza (Korkut 2018). Paralelno sa aktivacijom proPO druge imunološke reakcije će se odvijati tako što će se aktivirati faktori koji djeluju antimikrobno, citotoksično, opsonično (Cerenius i Söderhäll 2004, Johansson i Söderhäll 1985). PO enzim katalizira oksidaciju fenola u kinone pri čemu kinoni polimeriziraju u melanin, melanin i kinoni su toksični za patogene (Söderhäll i Cerenius 1998). Nakupljanje melanina tj. melanizacija se odvija paralelno sa inkapsulacijom patogena koju provode semigranulociti nakupljajući se na

sam patogen što ga u konačnici izolira od tijela domaćina te patogen odumire (Cerenius i Söderhäll 2004).

S druge strane melanin, kinoni i različiti slobodni radikali prisutni u hemolimfi tokom imunosne reakcije nisu samo toksični za patogene već oštećuju tkivo vlastitog domaćina, stoga postoje proteini i različiti regulacijski sustavi koji smanjuju količinu aktiviranog PO enzima poput pacifastina koji inhibira aktivnost samog PO enzima i ppA (Söderhäll i Cerenius 1998, Cerenius i Söderhäll 2004). Isto tako polimerizaciju kinona u melanin regulira protein inhibitor melanizacije (MIP) (Korkut 2018). Semigranulociti su osjetljiviji na manje količine lipopolisaharida ili β -1,3 glukana te su spremniji za egzocitozu granula od granulocita u svrhu „doziranja“ konačne količine melanina i ostalih citotoksičnih faktora kako bi se izbjeglo oštećenje vlastitog tkiva (Johansson i Söderhäll 1985).

Sposobnog imunosnog sustava za obranu raka od patogena varira ovisno o dobu godine, uvjetima u staništu te ciklusu presvlačenja raka. Imunosne reakcije u signalnog raka su manje tokom jeseni tj. sezone parenja u odnosu na ostatak godine što dovodi do zaključka da je više energije i resursa uloženo u razmnožavanje nego u snagu imunosnog sustava (Gruber, Vainikka i sur. 2014). Jačina imunosne reakcije ovisi i o temperaturi vode u kojoj rakovi borave, imunosna reakcija na bakterije je pri višim temperaturama (22°C) burnija te je melanizacija vidljivija i smrtnost veća dok je pri nižim temperaturama (6°C) manja, prevladava fagocitoza patogena te je smrtnost jedinki manja (Korkut 2018). Rakovi su osjetljiviji na infekcije tokom perioda presvlačenja (Le Moullac i sur. 1997). Iako je signalni rak koevoluirao sa uzročnikom račje kuge tako što ima konstantno pojačanu ekspresiju gena za proPO što u konačnici dovodi veće količine PO u manjem vremenu i brži imunosni odgovor, otpornost signalnog raka na račju kugu nije bezuvjetna jer patogen ostaje vijabilan unutar melanizirane kapsule te može uzrokovati bolest ukoliko su okolišni uvjeti za jedinku loši, pri presvlačenju ili je izložena velikoj količini stresa nakon čega je zaraza fatalna (Cerenius i Soderhall 1992, Cerenius i sur. 2003). Mehanizam pomoću kojeg je signalni rak otporan na račju kugu jest povećana transkripcija proPO gena što rezultira većom količinom PO i bržom melanizacijom hifa gljivice *A. astaci*. Ukoliko su melanizirane rane vidljive na kutikuli životinje, tada je razina PO u hemolimfi trajno povišena. Uočeno je da *A. astacus* može dulje preživjeti zarazu *A. astaci* ukoliko se umjetno inducira veća ekspresija proPO gena (Cerenius i sur. 2003).

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog rada je ispitati razlike u jačini imunosne reakcije između jedinki signalnog raka iz invazijskog središta i s fronte uspostavljene duž rijeke Korane:

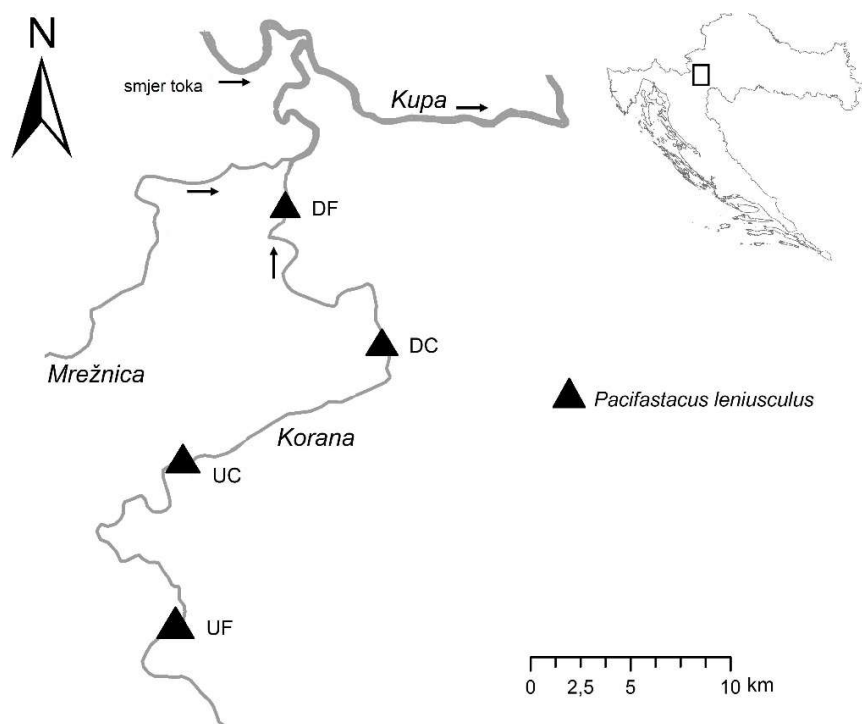
- a) određivanjem broja hemocita
- b) mjerenjem aktivnosti PO i količine proPO
- c) mjerenjem snage reakcije inkapsulacije.

Očekuje se jača imunosna reakcija u jedinki rakova s invazijske fronte od one u jedinki s invazijskog središta.

3. Materijali i metode

3.1 Područje istraživanja

Signalni rakovi uzorkovani su u rijeci Korani. Rijeka Korana je krška rijeka koja izvire na području Plitvičkih jezera i teče sjeverno kroz središnji dio Hrvatske. Korana je najveći prtok rijeke Kupe te pripada Crnomorskom slijevu. Tok Korane dugačak je 134 km a prosječan protok je $29 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Roglić 1974). Vodni režim rijeke mijenja se tokom godine zbog otapanja snijega i padalina tako da je protok veći tokom jeseni i proljeća a manji zimi i ljeti. U rijeci Korani dolaze tri autohtone vrste rakova: *Astacus astacus*, *Austropotamobius torrentium* i *Pontastacus leptodactylus* s kojim je signalni rak u kompeticiji na invazijskim frontama. Signalni rak naseljava 30km donjeg toka rijeke Korane (oko 22% ukupne duljine rijeke). Kako signalni rak kolonizira uzvodno i nizvodno tako su prijašnjim istraživanjem Dragičević i suradnika (2020.) utvrđene nove fronte širenja sa kojih su hvatani rakovi. Signalni rakovi su hvatani na slijedećim lokacijama: Šćulac- uzvodno invazijsko središte (UC; Slika 4), Ladvenjak- nizvodno invazijsko središte (DC; Slika 4), Donja Perjašica- uzvodna invazijska fronta (UF; Slika 4) i Ušće- nizvodna invazijska fronta (DF ; Slika 4) koje su određene prethodnim monitoringom signalnog raka u Korani (Slika 4).



Slika 4. Lokacije uzorkovanja u rijeci Korani: UF- uzvodna fronta, UC- uzvodno središte, DC- nizvodno središte, DF- nizvodna fronta. Slika preuzeta i prilagođena iz: (Bačnik i sur, 2021).

Lov rakova obavljen je tokom rujna i listopada 2020. godine pred sezonu parenja kada su jedinke oba spola izrazito aktivne (Souty-Grosset i sur. 2006). Rakovi su lovljeni LiNi vršama (Westman i sur. 1978) u koje su postavljeni mamci i koje su na svakoj lokaciji postavljane u potezu od 100 m po 20 vrša. Vrše su izvađene iz rijeke nakon 24 sata. Kako bi spriječili prijenos patogena na druge lokacije, vrše su nakon svakog korištenja dezinficirane Chlormax sredstvom (Genera, Hrvatska) jer je uzročnik račje kuge, *Aphanomyces astaci* prisutan u populaciji signalnih rakova (Pavić i sur. 2020). Za potrebe istraživanja ulovljeno je ukupno 138 jedinki, sa svake lokacije je 30-ak (Tablica 1).

Tablica 1. Deskriptivna statistika uhvaćenih jedinki signalnog raka. DC- nizvodno središte, DF- nizvodna fronta, UC- uzvodno središte, UF- uzvodna fronta. Vrijednosti za težinu i duljinu su prikazane: prosječna vrijednost \pm standardna devijacija.

| Lokacija | DF | DC | UF | UC |
|--------------|----|----|----|----|
| Broj jedinki | 32 | 38 | 30 | 38 |
| Ženke | 23 | 24 | 15 | 17 |
| Mušjaci | 9 | 14 | 15 | 21 |

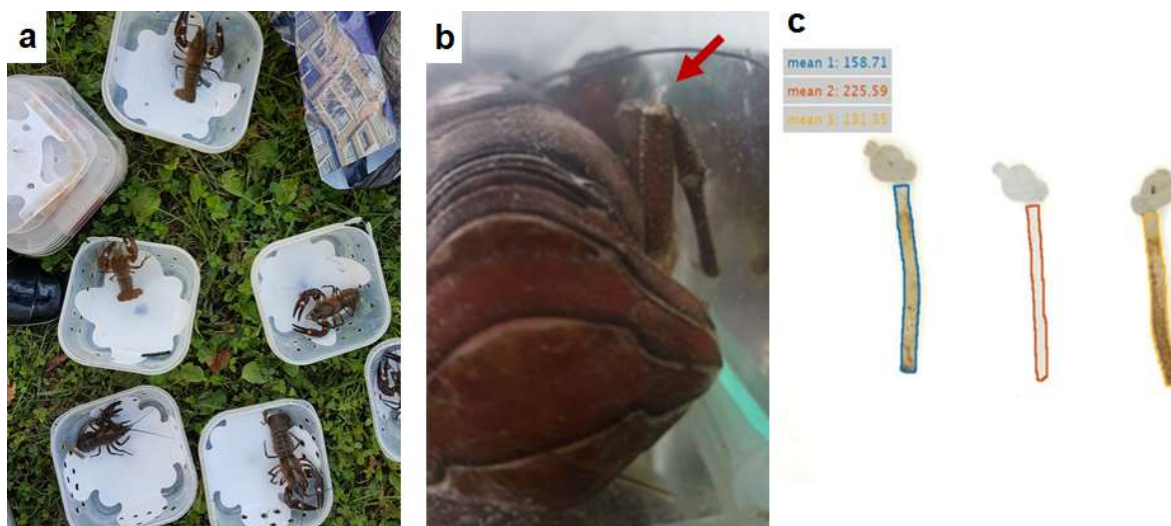
3.2 Analize imunskog odgovora

Kako bih usporedila imunosne reakcije jedinki sa invazijske fronte sa jedinkama iz središta invazije, mjereni su slijedeći parametri: ukupan broj hemocita (Johansson i sur. 2000), snaga reakcije inkapsulacije (Gruber i sur. 2014a, Gruber i sur. 2014b), aktivnost fenoloksidaze enzima (PO) i količina profenoloksidaze (proPO) (Sritunyalucksana i Soderhall 2000). Broj hemocita, snaga reakcije inkapsulacije i aktivnost enzima PO su standardni parametri koji se često koriste kod procjene imunskog odgovora deseteronožnih rakova (Johansson i sur. 2000, Gruber i sur. 2014a). Uz parametre imunskog odgovora, izračunati su i Fultonov kondicijski faktor i hepatosomatski indeks kao mjere kondicije jedinki, jer snaga imunološkog sustava je povezana sa kondicijom i općim zdravljem jedinke (Dragičević i sur. 2021).

3.2.1 Mjerenje snage reakcije inkapsulacije

Snaga reakcije inkapsulacije se proučava upotrebom standardiziranog patogena koji oponaša ulazak patogena u organizam. Na ulazak patogena pokreće se aktivacijska kaskada PO enzima koja izolira i melanizira patogen. Kod člankonožaca se kao standardizirani patogen koristi najlonski filament (Gruber i sur. 2014a, Gruber i sur. 2014b) koji je korišten i u ovom istraživanju. Najlonski filament promjera 0.22 mm narezan je na duljine od 4mm te je na jednom kraju zavezan čvor. Ovako pripremljen filament je pohranjen u 96% alkohol radi očuvanja sterilnosti. Rakovima su na samim lokacijama ulova umetnuta dva najlonska filameta u lijevi i desni zglob petog para nogu hodalica u kojima je prethodno napravljena punkcija pomoću škarica (Slika 5 b). Rakove sam nakon toga stavila svakog pojedinačno u perforirane plastične kutije (dimenzije: 18x18x9 cm, perforacije promjera 0.7 cm) kako bi se omogućio tok vode kroz njih (Slika 5 a). Kutije s rakovima

su bile označene i vraćene na mjesto ulova rakova na 48 sati. Nakon 48 sati rakovi su stavljeni na led i prevezeni u laboratorij gdje su im filamenti uklonjeni pomoću škara i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Filamente izvađene iz nogu hodalica sam stavila pod mikroskop na bijelu podlogu zajedno s čistim filamentom koji je služio kao kontrola te sam ih fotografirala pomoću kamere na lupi (Stemi 305, Zeiss, Njemačka) sa obje strane. Slike filamenata sam prebacila u softver za obradu fotografija (Image J, verzija 1.53f, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) pomoću kojeg sam izmjerila vrijednosti sivih nijansi reflektirajuće svjetlosti svakog od filamenata sa fotografija (Slika 5 c). Od izmjerenih vrijednosti sivih nijansi filamenata iz nogu hodalica oduzela sam vrijednost sivih nijansi kontrolnog filameta. Kako je svaka jedinka imala dva filameta u nogama, snaga reakcije inkapsulacije izračunata je putem prosječne vrijednosti sivih nijansi oba filameta (Gruber i sur. 2014b) te je ova vrijednost korištena za statističku obradu.



Slika 5. Uzorkovanje rakova i umetanje implantata: a rakovi u perforiranim posudama na samoj lokaciji uzorkovanja, b rak sa umetnutim implantatom u nogu hodalicu, c slika implantata s izmjerenim vrijednostima sivih nijansi reflektirajuće svjetlosti. Autori slika: a Anđela Miljanović, b Paula Dragičević, c Lucija Abramović i Anita Tarandek.

3.2.2 Uzorkovanje hemolimfe

Nakon vađenja filamenata rakovima sam odredila spol, izvagala težinu (u gramima) zatim su im izmjerene ukupna duljina (od vrha rostruma do kraja telzona) i duljina karapaksa pomičnom mjerkom (u milimetrima), te im je sterilnom iglom izvađeno minimalno $500\text{ }\mu\text{L}$ hemolimfe iz nogu hodalica (Slika 6 a). Od navedenog volumena, $400\text{ }\mu\text{L}$ hemolimfe razrijeđeno je sa $800\text{ }\mu\text{L}$ račje

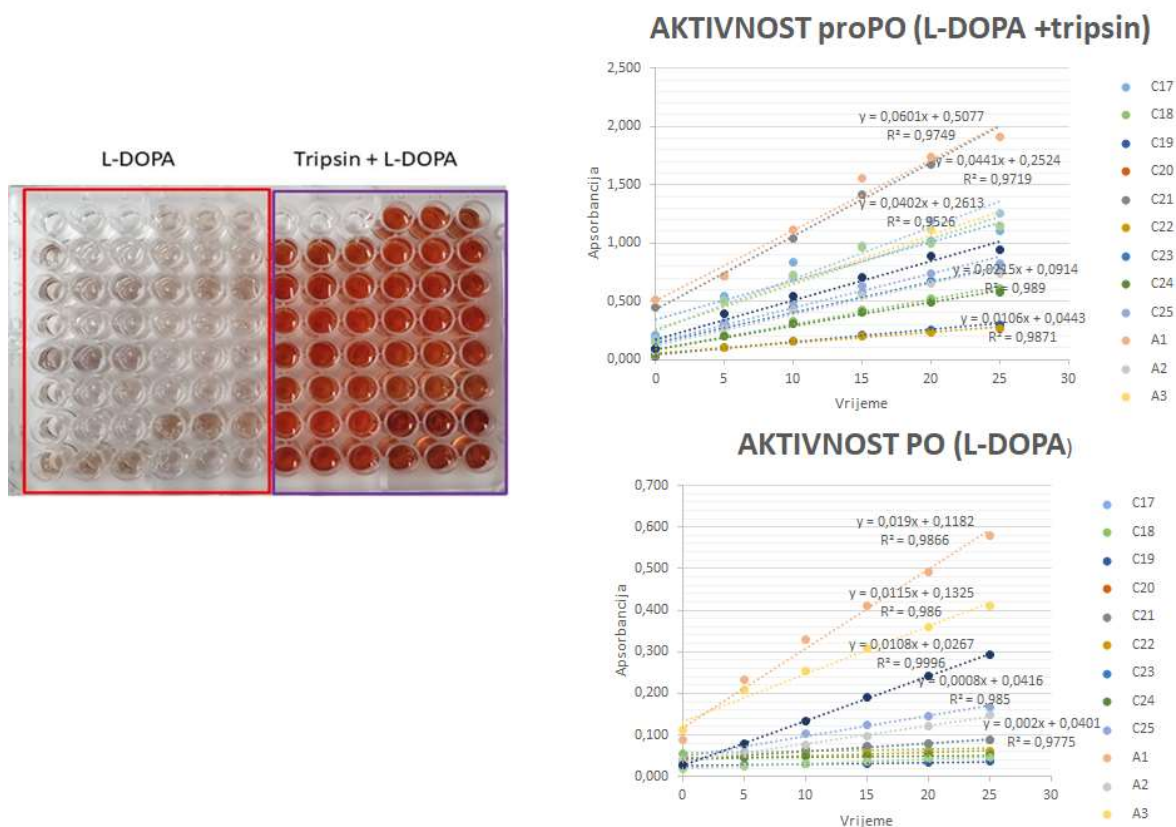
fiziološke otopine (CFS: 0,2 M NaCl, 5,4 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 2,6 mM MgCl₂, 2 mM NaHCO₃, pH 6,8; Johansson i Söderhäll, 1985) u svrhu određivanja aktivnosti PO i mjerenja količine proPO. Odmah nakon razrjeđivanja uzorci su centrifugirani 10 minuta, 10 000 g na 4 °C kako bi se spriječilo grušanje hemolimfe. Nakon centrifugiranja uzorci su stavljeni na led dok sam sonicirala jednog po jednog tokom 10 s povećavajući snagu sonikacije do 50% (Sonoplus HD 2070, Bandelin, Njemačka) kako bi se iz granulocita lizom izbacile granule sa proPO (Slika 6 c). Nakon sonikacije uzorci su centrifugirani 25 minuta, na 15 000 g i 4 °C kako bi se fragmenti hemocita istaložili. Nakon ove centrifuge supernatant je pohranjen na -80 °C do daljnje obrade. Preostalih 100 µL izvađene hemolimfe pomiješano je sa 400 µL 1% formalina i pohranjeno na 4 °C kako bi se hemociti fiksirali u svrhu kasnijeg brojanja. Nakon vađenja uzoraka hemolimfe rakove sam usmrtila brzim prerezom cerebralnog živčanog sustava te sam im izolirala hepatopankreas kojeg sam također izvagala za potrebe određivanja kondicijskih indeksa kasnije (opisano u poglavlju: 3.3 Izračun kondicijskih parametara; Slika 6 b).



Slika 6. Rad u laboratoriju: a vađenje hemolimfe iz raka, b izolirani hepatopankreas raka, c rad na sonikatoru u laboratoriju. Autori slika: a Lucija Abramović, b i c Sandra Hudina.

3.2.3 Mjerenje aktivnosti enzima fenoloksidaze (PO), ukupne aktivnosti profenoloksidaze (proPO) i mjerenje ukupnog proteina u hemolimfi

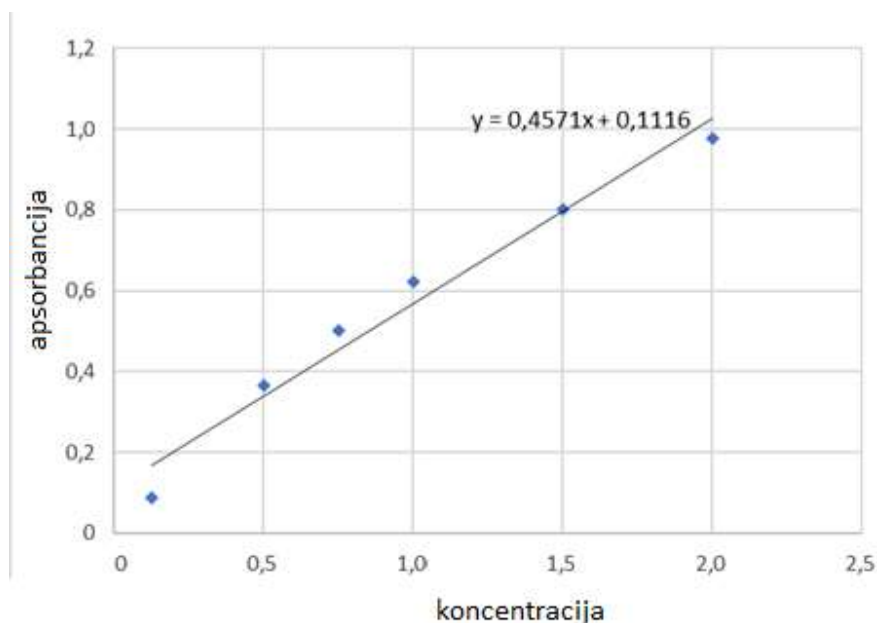
Uzorci namijenjeni za mjerenje aktivnosti enzima PO i ukupne aktivnosti proPO obrađeni su prema prilagođenom protokolu Gollas-Galván i suradnika (1999). Za mjerenje aktivnosti PO i proPO korištene su mikrotitarske ploče a svaki uzorak nanesen je u triplikatu (Slika 7). Za mjerenje aktivnosti PO pomiješano je 50 μ L uzorka s 50 μ L L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA, otopljen u Milli-Q vodi, 3 mg/mL). Apsorbancija je mjerena na 490 nm tokom 30 min. PO pretvara DOPA u DOPA kinon. Iz dobivenih apsorbancija triplikata izračunat je prosjek triplikata od kojega je onda oduzeta prosječna vrijednost apsorbancije kontrole (ista reakcijska smjesa ali bez PO) jer kontrola predstavlja apsorbanciju ostatka reakcijske smjese. Iz ovog rezultata sam onda odredila nagib pravca koji predstavlja promjenu apsorbancije PO u minuti (Slika 7). Aktivnost proPO mjerena je tako da je 50 μ L uzorka pomiješano sa 50 μ L tripsina (1 mg/mL otopljen u Milli-Q vodi) koji djeluje kao aktivator koji proPO pretvara u PO te je ta smjesa inkubirana 3 min na sobnoj temperaturi. Nakon toga na mikroploču je dodano još 50 μ L L-DOPA te je mjerena apsorbancija na 490 nm tokom 25 min. Iz dobivenih apsorbancija triplikata izračunat je prosjek triplikata od kojega je onda oduzeta prosječna vrijednost apsorbancije kontrole. Iz ovog rezultata sam onda odredila nagib pravca koji predstavlja promjenu apsorbancije ukupne aktivirane PO u minuti (Slika 7). Kako bih dobila količinu proPO u minuti, ukupno aktiviranoj PO sam oduzela prethodno izračunatu aktivnost PO u minuti (Gollas-Galván i sur. 1999). Kako bi aktivnosti PO i koncentracija proPO među različitim uzorcima bila usporediva potrebno je izmjeriti udio aktivnosti PO i udio koncentracije proPO unutar kompletne količine proteina prisutne u hemolimfi.



Slika 7. mjerenje aktivnosti proPO i PO, lijevo: uzorci na mikrotitarskim pločama, desno: grafovi dobiveni mjerenjem apsorbancije uzoraka kroz vrijeme (u minutama), svaka točka na grafu je prosječna apsorbancija triplikata, a nagib pravca je aktivnost po minuti ($\Delta A/\text{min}$).

Za mjerenje ukupne koncentracije proteina u hemolimfi rakova korištena je metoda po Bradfordu. Metoda po Bradfordu koloristička je metoda kojom se Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka) boja veže na proteine te biva plave boje (Bradford, 1976). Upotrijebljeni su slijedeći standardi poznate koncentracije albumina iz goveđeg seruma (BSA-bovine serum albumine) (Serva, Feinbiochemia, Njemačka): 0.125, 0.250, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 i 2.0 mg/mL razrijeđenih u CFS puferu. Standardi su na mikrotitarsku ploču dodani u triplikatima te su pomiješani s 250 μL CBB reagensa (0,01 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 4,7 % etanol; 8,5 % H_3PO_4). Korištena je i kontrola od CFS pufera. Na mikroploču nanosena je slijedeća reakcijska smjesa: 5 μL uzorka/kontrole sa 250 μL Coomassie Brilliant Blue reagensom, također u triplikatima (reagens se veže za NH_3 krajeve proteina i tada plavi). Pripremljena mikroploča sa uzorcima i reagensom je bila protresena 5 sekundi kako bi se reakcijska smjesa dobro promiješala nakon čega je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije se ponovo protresla te

je inkubirana još dvije minute nakon čega je izmjerena apsorbancija na 595 nm. Izmjerene vrijednosti apsorbancije standarda i uzoraka zabilježene su u Excel-u. Apsorbanciju standarda i poznatu koncentraciju albumina prikazala sam na linearnom grafičkom prikazu (Slika 8) iz kojeg sam izračunala jednadžbu pravca. Pomoću jednadžbe pravca dobivene iz linijskog grafa standarda izmjerila sam koncentracije ukupnog proteina u hemolimfi uvrštavanjem apsorbancije uzoraka u jednadžbu pravca. Iz triplikata apsorbancija uzoraka izračunala sam prosječnu vrijednost. Nakon toga sam od prosječne vrijednosti apsorbancije uzorka oduzela prosječnu vrijednost apsorbancije kontrole te sam taj rezultat koristila za uvrštavanje u jednadžbu pravca kako bih dobila koncentraciju ukupnog proteina. Aktivnosti enzima PO i proPO izražene su kao promjene u apsorbanciji pri 490 nm po minuti i miligramu proteina ($\Delta A_{490}/\text{min}/\text{mg}$ proteina).



Slika 8. Linearni grafički prikaz za korištene standarde; x- os: koncentracije albumina u mg/mL, y-os : apsorbancija

3.2.4 Brojanje hemocita

Iz hemolimfe sa fiksiranim hemocitima (100 μL u 400 μL formalina) na 4 °C brojala sam hemocite. Hemocite sam brojala u Bürker-Türk komorici koristeći svjetlosni mikroskop Zeiss Standard RA Light Microscope i to dva tipa hemocita: granulocite i hijalinocite. Granulociti imaju granule u citoplazmi a hijalinociti nemaju. Hemociti su brojani dva puta. Nakon toga sam u Excelu

izračunala prosječan broj granulocita i hijalinocita iz oba brojanja a konačno i ukupan broj oba tipa hemocita po mililitru uzimajući u obzir razrjeđenje uzorka, prema formuli: N (prosječan broj hemocita) $\times 5 \times 10^4$. Ovaj broj korišten je nadalje u statističkim analizama.

3.3 Izračun kondicijskih parametara

Kondicijski parametri koriste se u statističkoj analizi te su opći pokazatelj zdravlja jedinke raka (Maguire i Klobučar 2011). Izračunala sam slijedeće kondicijske parametre: Fultonov kondicijski faktor i hepatosomatski indeks, koji se često koristi kao pokazatelj energetske rezerve i uhranjenosti životinje (Rodríguez-González i sur. 2009).

Fultonov kondicijski faktor izračunala sam po formuli: $FCF = (W/TL^3) \times 100$ gdje je FCF Fultonov kondicijski faktor, W je težina raka (g) i TL je ukupna duljina raka (mm; Ricker 1975).

Hepatosomatski indeks sam izračunala po slijedećoj formuli: $HSI = HW/W$ gdje je HSI hepatosomatski indeks, HW je težina hepatopankreasa (g) a W je težina raka (g; Rodríguez-Gutiérrez 1992). Ovi kondicijski parametri su korišteni u statističkoj obradi podataka.

3.4 Statistička analiza podataka

Prethodno izračunate vrijednosti kondicijskih faktora, aktivnosti PO, količine proPO, izbrojanih hemocita, izmjerenih nijansi sive reflektirajuće svjetlosti te duljina i težina jedinki korištene su u statističkoj analizi u programu Statistica (verzija 13.5.017. TIBCO software inc.). Najprije sam testirala normalnost distribucije podataka izračunatih parametara: duljine jedinke, težine jedinke, težine hepatopankreasa, broja hemocita, aktivnosti PO, aktivnosti ukupne proPO, reakcije inkapsulacije, Fultonovog kondicijskog faktora i hepatosomatskog indeksa Shapiro – Wilk testom. Shapiro Wilk test normalnosti raspodjele podataka smatra se pouzdanijim u odnosu na druge testove normalnosti (Shapiro, Wilk i Chen 1968, Zar 1999). Parametre koji nisu imali normalnu raspodjelu sam transformirala: diskretne podatke sam transformirala korjenujući ih a parametre s kontinuiranim tipom podataka sam transformirala logaritamski (Zar 1999). One podatke koji nakon transformacije nisu imali normalnu raspodjelu sam koristila netransformirane u neparametrijskim analizama, dok sam podatke koji su pokazali normalnu raspodjelu analizirala parametrijskim testovima (Zar 1999). Prvo sam analizirala parametre po spolu, parametre s normalnom raspodjelom testirala sam t-testom a parametre koji ne prate normalnu raspodjelu

analizirala sam Mann-Whitney U testom. Nakon toga sam analizirala parametre imunskog odgovora u odnosu na veličinu (ukupnu duljinu) jedinki jer je poznato kako se imunski odgovor rakova mijenja s obzirom na starost jedinki (Baxter i sur. 2017) , za što sam koristila parametrijsku i neparametrijsku korelaciju. Nakon toga sam analizirala parametre u odnosu na lokaciju uzorkovanja (4 lokacije ukupno: dvije iz invazijskog središta i dvije s fronti invazije), parametri s normalnom raspodjelom analizirani su ANOVA testom. Parametre koji su pokazali statistički značajnu razliku nadalje sam analizirala Tukey HSD testom. Parametre koji su se značajno razlikovali po spolu analizirala sam ANOVA testom zasebno za mužjake i ženke te nakon toga i Tukey HSD testom zasebno za svaki spol. Neparametrijsku inačicu analize parametara po lokaciji uzorkovanja analizirala sam Kruskal-Wallis ANOVA testom kojeg sam odradila zasebno za svaki spol za parametre koji se značajno razlikuju po spolu, te sam koristila Dunn post hoc-test. Razina značajnosti koju sam koristila u svim statističkim testovima je 5% tj. $p < 0,05$.

4. Rezultati

4.1 Deskriptivna statistika

Za potrebe ovog istraživanja uhvaćeno je ukupno 138 jedinki signalnog raka, sa nizvodne fronte 32, sa nizvodnog središta 38, sa uzvodne fronte 30 i sa uzvodnog središta 38 (Tablica 2).

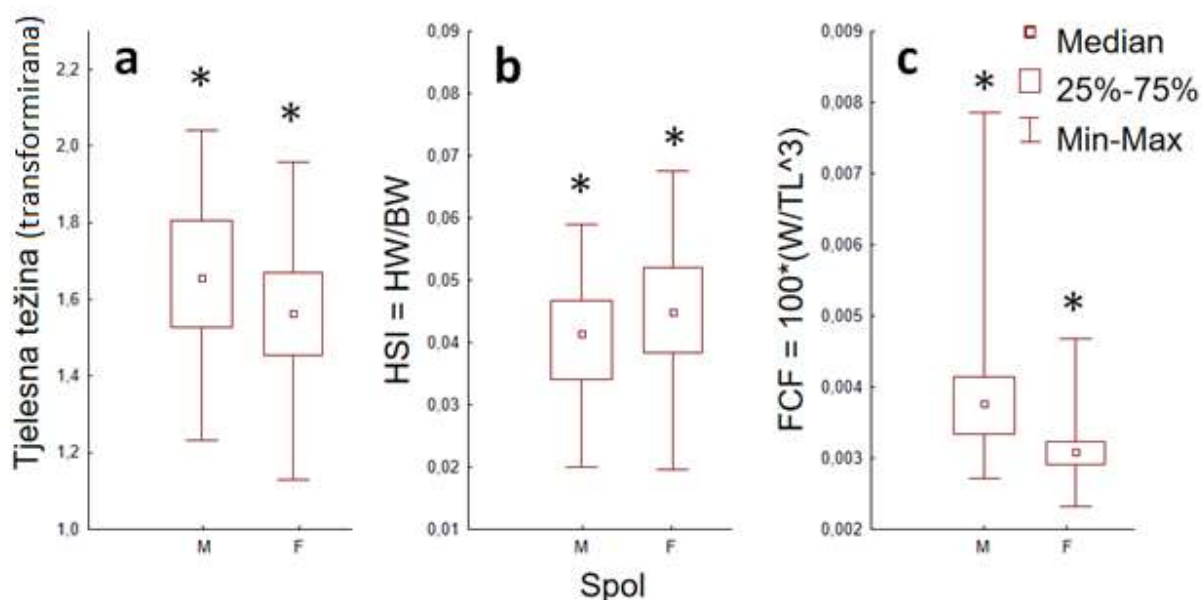
Tablica 2. Deskriptivna statistika za uhvaćene jedinke signalnog raka po lokacijama. DF- nizvodna fronta, DC- nizvodno središte, UF- uzvodna fronta i UC- uzvodno središte. Vrijednosti u tablici prikazuju prosječnu vrijednost \pm standardnu devijaciju.

| Lokacija | DF | DC | UF | UC |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Broj jedinki | 32 | 38 | 30 | 38 |
| Tjelesna težina (g) | 32,80 \pm 15,26 | 43,15 \pm 13,39 | 55,13 \pm 19,36 | 44,33 \pm 18,85 |
| Duljina jedinke (mm) | 98,23 \pm 11,85 | 108,07 \pm 9,54 | 114,84 \pm 11,32 | 106,51 \pm 12,15 |
| Težina hepatopankreasa (g) | 1,5139 \pm 0,8357 | 1,5419 \pm 0,4871 | 2,5408 \pm 0,9554 | 1,8526 \pm 0,7359 |
| Hepatosomatski indeks (HSI) | 0,0457 \pm 0,0117 | 0,0373 \pm 0,0105 | 0,0463 \pm 0,0065 | 0,0428 \pm 0,0093 |
| Fultonov kondicijski faktor (FCF) | 0,0032 \pm 0,0005 | 0,0034 \pm 0,006 | 0,0035 \pm 0,0006 | 0,0035 \pm 0,0009 |
| Broj hemocita u mL | 786523,44 \pm 432345,38 | 676182,43 \pm 335103,82 | 1124895,83 \pm 582052,12 | 773108,55 \pm 340656,02 |
| Snaga reakcije inkapsulacije (nijanse sive reflektirajuće svjetlosti) | 55,07 \pm 6,61 | 47,88 \pm 10,36 | 45,54 \pm 8,87 | 31,03 \pm 7,45 |
| Aktivnost enzima fenoloksidaze (PO A/min/mg prot) | 0,0020 \pm 0,0019 | 0,0016 \pm 0,0014 | 0,0011 \pm 0,0006 | 0,0013 \pm 0,0011 |
| Aktivnost enzima profenoloksidaze (proPO A/min/mg prot) | 0,1447 \pm 0,0817 | 0,2288 \pm 0,1196 | 0,2392 \pm 0,2083 | 0,2621 \pm 0,2123 |

4.2 Razlike među spolovima u mjerenim parametrima

Težine jedinki su se značajno razlikovale po spolu, mužjaci su bili teži od ženki (t-test; $N_M= 59$; $N_F= 79$; $t= 3,0776$; $p= 0,0025$; Slika 9a). Fultonov kondicijski faktor se također značajno razlikuje po spolu te je veći u mužjaka nego ženki (Mann – Whitney U test; $N_M= 59$; $N_F= 76$; $U=555,000$; $p= 0,0000$; Slika 9c). Hepatosomatski indeks je bio statistički značajno veći u ženki nego mužjaka (t-test; $N_M= 55$; $N_F= 79$; $t= -2,2300$; $p= 0,0261$; Slika 9b). S druge strane, nije bilo statistički

značajne razlike imunskog odgovora (snaga reakcije inkapsulacije, aktivnost PO, količina proPO i broj hemocita) između jedinki različitog spola.

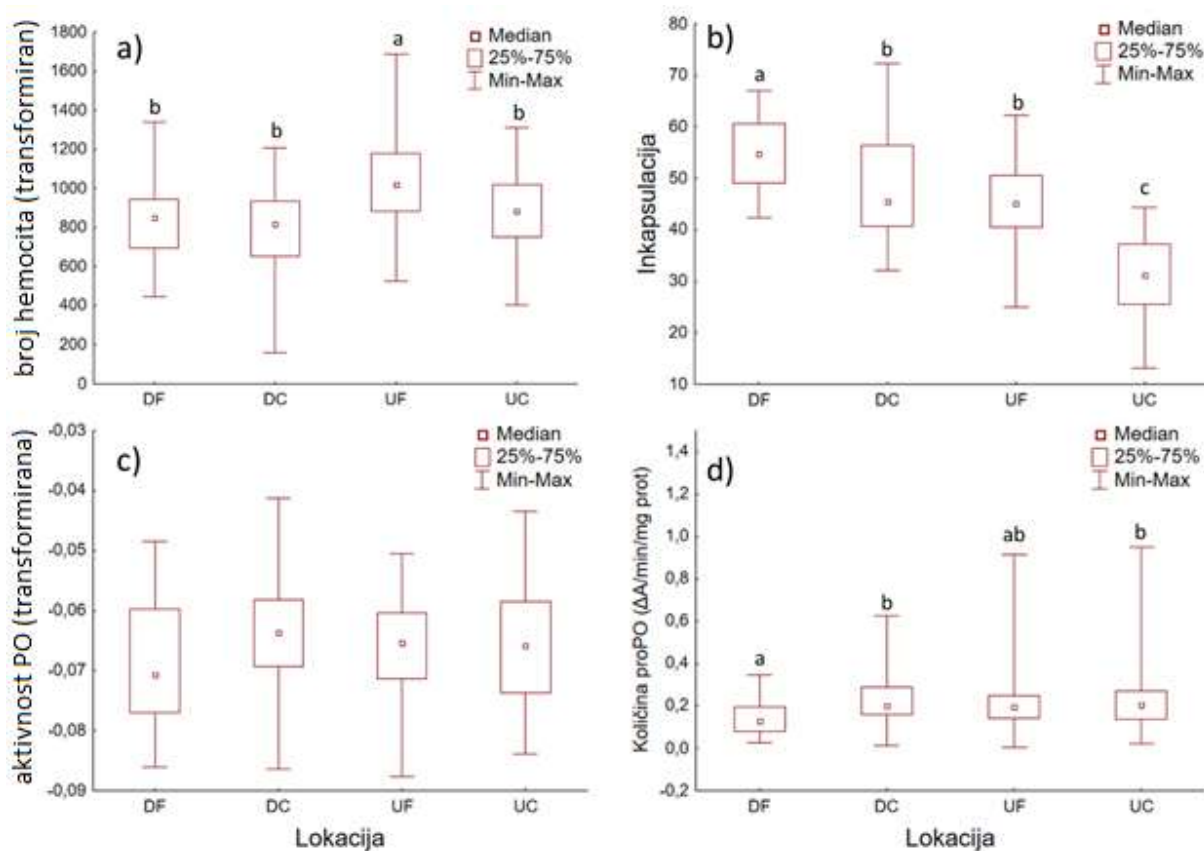


Slika 9. Grafički prikaz razlika parametara po spolu: a tjelesne težine jedinki, b hepatosomatski indeks, c Fultonov kondicijski faktor. *-statistički značajne razlike, M- mužjaci, F-ženke

4.3 Korelacija veličine jedinke sa parametrima kondicije i imunskog odgovora

Parametri kondicije (FCF i HSI) nisu bili statistički značajno korelirani s veličinom tj. ukupnom duljinom jedinki (korelacija; $N=115$; $p>0,05$). Dobivena je statistički značajna negativna korelacija između veličine jedinke i aktivnosti PO ($r_p = -0,2602$; $N=115$; $p= 0,05$) Također većina parametara imunskog odgovora (snaga reakcije inkapsulacije, broj hemocita i količina proPO) nisu bili značajno korelirani s veličinom jedinki ($p>0,05$)

4.4 Statističke analize imunskog odgovora između invazijskih središta i fronti



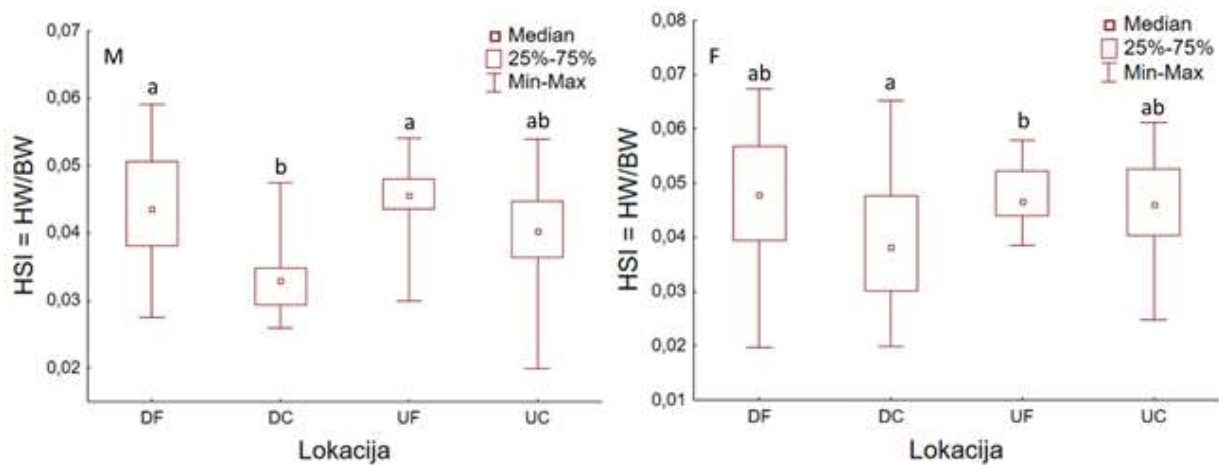
Slika 10. Grafički prikaz vrijedosti imunskih parametara u odnosu na lokaciju uzorkovanja: a) broja hemocita, b) snage reakcije inkapsulacije, c) aktivnosti fenoloksidaze i d) količine profenoloksidaze. a,b i c- statistički značajna razlika, DF- nizvodna invazijska fronta, DC- nizvodno invazijsko središte, UF- uzvodna invazijska fronta, UC- uzvodno invazijsko središte.

Broj hemocita se značajno razlikovao između lokacija uzorkovanja (invazijskih fronti i središta) (ANOVA; $F_{(137,3)} = 5,9494$, $p = 0,0008$). Broj hemocita je bio statistički značajno veći kod jedinki sa uzvodne fronte u usporedbi sa jedinkama iz ostalih lokacija (Tukey HSD post hoc analiza; Slika 10a). Snaga reakcije inkapsulacije se statistički značajno razlikovala između lokacija uzorkovanja (ANOVA; $F_{(123,3)} = 43,1143$, $p = 0,0000$). Snaga reakcije inkapsulacije se značajno razlikovala između pripadajućih uzvodnih fronti i središta te nizvodnih fronti i središta (Tukey HSD post hoc analiza; Slika 10 b). Aktivnost PO se nije razlikovala statistički značajno u jedinki između lokacija uzorkovanja (ANOVA; $F_{(134,3)} = 1,3618$, $p = 0,25737$; Slika 10c). Količina proPO u jedinki se statistički značajno razlikovala između lokacija uzorkovanja. Nizvodna fronta se statistički

značajno razlikovala od uzvodnog i nizvodnog središta (Kruskal-Wallis ANOVA; $H_{(136,3)}=11,8236$; $p=0,0080$; Slika 10 d).

4.5 Statističke analize kondicijskih faktora između invazijskih središta i fronti

Pošto su se vrijednosti kondicijskih faktora značajno razlikovale ovisno o spolu, analize istih po lokacijama uzorkovanja napravljene su zasebno po spolu. Fultonov kondicijski faktor se nije razlikovao statistički značajno po lokacijama uzorkovanja ni za jedan od spolova. Hepatosomatski indeks se statistički značajno razlikovao za mužjake (ANOVA; $F_{(55,3)}=4,2996$; $p=0,0086$) i ženke po lokacijama (ANOVA; $F_{(79,3)}=3,5467$; $p=0,0184$). Za mužjake vrijednosti hepatosomatskog indeksa su bile više na frontama nego u središtima a statistički značajne razlike su bile zabilježene između obje fronte i nizvodnog središta (Tukey HSD post hoc analiza; Slika 11 M). Vrijednosti hepatosomatskog indeksa za ženke su također bile više na frontama nego u središtima dok su statistički značajne razlike zabilježene jedino između uzvodne fronte i nizvodnog središta (Tukey HSD post hoc analiza; Slika 11 F).



Slika 11. Grafički prikaz vrijednosti hepatosomatskog indeksa za jedinke rakova po lokacijama prema spolu: M-graf HSI po lokacijama za mužjake, F- graf HSI po lokacijama za ženke. Statistički značajne razlike između lokacija su prikazane s: a i b; DF- nizvodna invazijska fronta, DC- nizvodno invazijsko središte, UF- uzvodna invazijska fronta, UC- uzvodno invazijsko središte.

5. Rasprava

Uspješnom širenju signalnog raka u Europi pomažu različite fiziološke prilagodbe na nove okolišne uvjete od kojih je snaga imunskog odgovora od velike važnosti, posebice na invazijskim frontama koje su u susretu sa novim okolišnim uvjetima (Diagne i sur. 2016, Rutledge i Pritchard 1981, Kouba, Petrusek i Kozák 2014). S druge strane, za uspješno širenje invazijskog areala koje predvode invazivne fronte s malom gustoćom jedinki potrebno je uložiti više energije u razmnožavanje jer su fronte podložnije nasumičnom izumiranju (Burton i sur. 2010, Schmid-Hempel 2003, White i Perkins 2012).

U ovom radu očekivala sam da će jedinke signalnog raka sa invazijske fronte imati jači imunski odgovor od jedinki sa invazijskog središta zbog toga što fronte ulaze na nova područja i potencijalne se susreću s novim patogenima (Diagne i sur. 2016), Isto tako rakovi sa invazijskih fronti su bili u boljoj kondiciji od rakova sa invazijskih središta prema ranijem istraživanju (Rebrina i sur. 2015). Mjereni imunski parametri u skladu su sa imunskim odgovorom pri ulasku patogena u tijelo životinje, imunski sustav se pokreće te degranulacijom iz hemocita izlazi profenoloksidaza koja se putem reakcijske kaskade aktivira u fenoloksidazu. Tokom ove reakcije broj hemocita se smanjuje zbog degranulacije kako bi se oslobodila proPO koja se aktivira u PO koja sudjeluje u melanizaciji i inkapsulaciji (opisano u uvodu: 1.3 Imunologija beskralješnjaka).

U ovom radu sam uz imunski parametre mjerila i kondicijske indekse jedinki signalnih rakova jer su snaga imunskog obrane i kondicija jedinki povezane (Schmid-Hempel 2003). Kroz kondicijske indekse može se na jednostavan način pretpostaviti opće zdravlje jedinki. Što se tiče kondicijskih faktora mužjaci su imali značajno veći Fultonov kondicijski faktor (FCF) i tjelesnu težinu od ženki što je očekivano zbog spolnog dimorfizma pri čemu su mužjaci veći i imaju veća klijesta od ženki slične dobi što im služi za parenje i borbu sa drugim mužjacima (Fero i sur. 2007; Fero i Moore 2008). Iz istog razloga je hepatosomatski indeks (HSI) je veći u ženki jer su rakovi sakupljani pred sezonu parenja (Souty-Grosset i sur. 2006) te je hepatopankreas ženki aktivniji jer producira nutrijente za jajašca ali nije bilo značajne razlike u imunskim parametrima (aktivnost PO, količina proPO, br hemocita i reakcija inkapsulacije) po spolu kao što smo očekivali (Souty-Grosset i sur. 2006) postoji mogućnost da se populacija rakova nije u potpunosti fiziološki pripremila za sezonu parenja te da su zbog toga izostale očekivane razlike u imunskom odgovoru.

U našem istraživanju FCF se nije značajno razlikovao između lokacija protivno prethodnom istraživanju (Rebrina i sur. 2015), vjerojatno zato što se rakovi fiziološki pripremaju za sezonu parenja čime im kondicija raste u svrhu razmnožavanja. Što se tiče HSI, u mužjaka je bio statistički značajno viši kod jedinki s fronti naspram središta invazije te je isti trend zabilježen i za ženke kod kojih je HSI viši na frontama, te je ovaj podatak u skladu s prethodnim istraživanjem (Rebrina i sur. 2015). Rakovi s uzvodne fronte su imali daleko veći broj hemocita od ostalih rakova: općenito broj hemocita je bio veći u rakova s fronti u usporedbi sa rakovima iz središta. Hemociti imaju važnu ulogu u imunom sustavu i obrani od patogena jer vrše fagocitozu patogena i sadrže granule s profenoloksidazom te upravo od njih kreće aktivacijska kaskada proPO sustava (Korkut 2018), moguće da rakovi sa fronte imaju veći broj hemocita zbog toga što se nisu svi hemociti degranulirali ili im je broj u jedinki sa uzvodne fronte bio povišen uslijed stresa pri ulasku u novi okoliš sa novim potencijalnim patogenima kao odgovor na nove okolišne uvjete.

Reakcija inkapsulacije je značajno jača kod jedinki na uzvodnoj i nizvodnoj fronti u odnosu na vlastita invazivna središta što je očekivano i odgovara rezultatima vezanim uz brojnost hemocita jer se u granulama hemocita nalazi proPO sustav koji se aktivira ulaskom patogena u tijelo te veći broj hemocita potencijalno znači jaču imunostnu reakciju (Korkut 2018), ali suprotno očekivanjima, uzvodna fronta nije imala najveću snagu inkapsulacije iako su rakovi sa te lokacije imali najveći broj hemocita. Ipak, gledajući obje fronte, zabilježena je veća snaga inkapsulacije na frontama u odnosu na središta, što je također u skladu s ranijim istraživanjem ove populacije koje je pokazalo da su rakovi sa invazijske fronte u boljoj kondiciji od rakova iz središta (Rebrina i sur. 2015) što vrlo vjerojatno doprinosi jačim imunostnim reakcijama (Schmid-Hempel 2003). S druge strane burna reakcija inkapsulacije i melanizacije nije uvijek najbolji imunostni odgovor, te se javlja pri višim okolišnim temperaturama dok pri nižim temperaturama jedinka uništava većinu patogena fagocitozom (Korkut 2018). Smatram da je u ovom istraživanju jaka reakcija inkapsulacije izrazito prikladan odgovor na najlonski filament (standardiziran patogen) čija je duljina 4mm prevelika za fagocitozu.

Što se tiče količine proPO po lokacijama, jedino jedinke sa nizvodne fronte imaju manju količinu proPO od oba središta, fronte općenito iako ne nužno statistički značajno, imaju manju količinu proPO od središta. Ovo objašnjavam činjenicom da je snaga reakcije inkapsulacije na frontama bila jača od snage reakcija inkapsulacija za jedinke iz središta jer se pri inkapsulaciji i

melanizaciji proPO aktivira u PO te se dostupne rezerve zimogena troše (Cerenius i Söderhäll 2004). To što jedinke sa nizvodne fronte imaju značajno manje proPO u odnosu na središta može se objasniti njihovom najvećom snagom reakcije inkapsulacije naspram jedinki sa svih drugih lokacija. Isto tako uzorci hemolimfe su iz rakova uzimani nakon izazivanja imunosne reakcije najlonskim filamentom što znači da količina proPO u ovom slučaju ne predstavlja rezervu enzima za imunološku reakciju već ostatak te iste rezerve nakon reakcije. Što se tiče aktivnosti PO ne postoji značajna razlika između lokacija ali postoji blagi trend prema kojem jedinke s fronti invazije imaju manju količinu PO od središta što se može objasniti time što su uzorci hemolimfe uzeti nakon izazivanja imunosnog odgovora te je većina PO enzima već sudjelovala u reakcijama inkapsulacije i melanizacije što znači da će nakon jače reakcije inkapsulacije ostati manja količina PO enzima. Postoji statistički značajna negativna korelacija između aktivnosti PO i veličine jedinke. Pretpostavljam da je to zato što aktivnost PO stvara melanin i druge toksične među-prodrukte poput kinona koji su, kako za patogene (Söderhäll i Cerenius 1998), tako i za samu jedinku toksični te je ova negativna korelacija vjerojatno rezultat regulacije aktivnosti ovog enzima koji je možda učinkovitiji u većih jedinki i pomaže pri lokalizaciji upalnog procesa iako nisam naišla na literaturu koja objašnjava ovakvu korelaciju zabilježeno je da se imunosni odgovor mijenja u odnosu na dob člankonožaca (Baxter i sur. 2017).

Iako su imunosni odgovori beskralješnjaka nespecifični oni su izrazito učinkoviti (Cerenius i Söderhäll 2018) i radovi o funkciji enzima fenoloksidaze postoje no znanja o mehanizmima proteinskoe kaskade aktivacije fenoloksidaze manjkaju iako je poznato da se radi o vrlo kompleksnom procesu kojeg je još uvijek potrebno proučavati jer aktivacijska kaskada se odvija nakon degranulacije hemocita a prije reakcije inkapsulacije kao što je primjećeno da su jedinke sa invazijske fronte imale najviše hemocita ali ne i najjaču reakciju inkapsulacije. S druge strane što se tiče eko-imunologije i širenja invazivnih stranih vrsta, većina znanja prikupljena je istraživanjem kralješnjaka a rezultati tih istraživanja su oprečni u nekim slučajevima, dok su beskralješnjaci slabije zastupljeni u ovakvim istraživanjima koja bi bilo dobro provesti.

6. Zaključak

Provedeno istraživanje pokazalo je da su imunosne reakcije jedinki signalnih rakova sa invazijske fronte jače od jedinki sa invazijskog središta. Mjereni su slijedeći imunosni parametri: broj hemocita, aktivnost PO, količina proPO i snaga reakcije inkapsulacije. Najjasnija statistički značajna razlika uočena je u mjerenju snage reakcije inkapsulacije koja je jača i izraženija u jedinki s fronte nego u jedinki iz središta. Uz mjerenje imunosnih parametara mjereni su Fultonov kondicijski faktor i hepatosomatski indeks zato što su imunosne reakcije i kondicija jedinki povezani. Hepatosomatski indeks je očekivano veći u jedinki sa invazijske fronte. Ovo istraživanje potvrdilo je hipotezu da jedinke sa invazijske fronte imaju jači imunosni odgovor od jedinki sa invazijskih središta.

7. Literatura

- Bačnik, K., Kutnjak, D., Černi, S., Bielen, A., i Hudina, S. (2021). Virome analysis of signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) along its invasion range reveals diverse and divergent rna viruses. *Viruses*, 13(11). <https://doi.org/10.3390/v13112259>
- Baxter, R. H. G., Contet, A., i Krueger, K. (2017). Arthropod Innate Immune Systems and Vector-Borne Diseases. *Biochemistry*, 56(7), 907–918. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00870>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Burton, O. J., Phillips, B. L., i Travis, J. M. J. (2010). Trade-offs and the evolution of life-histories during range expansion. *Ecology Letters*, 13(10), 1210–1220. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01505.x>
- Cerenius, L., Bangyeekhun, E., Keyser, P., Söderhäll, I., i Söderhäll, K. (2003). Host prophenoloxidase expression in freshwater crayfish is linked to increased resistance to the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*. *Cellular Microbiology*, 5(5), 353–357. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.00282.x>
- Cerenius, L., i Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198, 116–126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Cerenius, L., i Söderhäll, K. (2018). Crayfish immunity – Recent findings. *Developmental and Comparative Immunology*, 80, 94–98.
- Crawford, L., Yeomans, W. E., i Adams, C. E. (2006). The impact of introduced signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* on stream invertebrate communities. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 16(6), 611–621. <https://doi.org/10.1002/aqc.761>
- Diagne, C., Gilot-Fromont, E., Cornet, S., Husse, L., Doucouré, S., Dalecky, A., Bâ, K., Kane, M., Niang, Y., Diallo, M., Sow, A., Fossati-Gaschignard, O., Piry, S., Artige, E., Sembène, M., Brouat, C., & Charbonnel, N. (2016). Contemporary variations of immune responsiveness during range expansion of two invasive rodents in Senegal. *Oikos*, 126(3), 435–446. <https://doi.org/10.1111/oik.03470>
- Direktiva o očuvanju prirodnih staništa i divlje faune i flore (Council Directive 92/43/EEC)
- Dragičević, P., Faller, M., Kutleša, P., i Hudina, S. (2020). Update on the signal crayfish, *pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852) range expansion in Croatia: A 10-year report. *BioInvasions Records*, 9(4), 793–807. <https://doi.org/10.3391/bir.2020.9.4.13>
- Dragičević, P., Grbin, D., Maguire, I., Blažević, S. A., Abramović, L., Tarandek, A., i Hudina, S. (2021). Immune response in crayfish is species-specific and exhibits changes along invasion range of a successful invader. *Biology*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/biology10111102>

- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 81(2), 163–182. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>
- Faller, M., Harvey, G. L., Henshaw, A. J., Bertoldi, W., Bruno, M. C., & England, J. (2016). River bank burrowing by invasive crayfish: Spatial distribution, biophysical controls and biogeomorphic significance. *Science of the Total Environment*, 569–570, 1190–1200. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.06.194>
- Fero, K., & Moore, P. A. (2008). Social spacing of crayfish in natural habitats: What role does dominance play? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 62(7), 1119–1125. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0540-x>
- Fero, K., Simon, J. L., Jourdie, V., & Moore, P. A. (2007). Consequences of social dominance on crayfish resource use. *Behaviour*, 144(1), 61–82. <https://doi.org/10.1163/156853907779947418>
- Gollas-Galván, T., Hernández-Lopez, J., & Vargas-Albores, F. (1999). Prophenoloxidase from brown shrimp (*Penaeus californiensis*) hemocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 122(1), 77–82. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10143-8](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10143-8)
- Gruber, C., Kortet, R., Vainikka, A., Hyvärinen, P., Rantala, M. J., Pikkarainen, A., Jussila, J., Makkonen, J., Kokko, H., & Hirvonen, H. (2014). Variation in resistance to the invasive crayfish plague and immune defence in the native noble crayfish. *U Annales Zoologici Fennici* (Sv. 51, Izdanje 4, str. 371–389). <https://doi.org/10.5735/086.051.0403>
- Gruber, C., Vainikka, A., Hirvonen, H., Rantala, M. J., & Kortet, R. (2014). Endogenous seasonal variation in the encapsulation response of the noble crayfish (*Astacus astacus*). *Annales Zoologici Fennici*, 51(5), 433–444. <https://doi.org/10.5735/086.051.0504>
- 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 and Evolution*, 26(2–3), 232–262. <https://doi.org/10.1080/03949370.2014.903380>
- Holdich, D. M., Reynolds, J. D., Souty-Grosset, C., & Sibley, P. J. (2009). A review of the ever increasing threat to European crayfish from non-indigenous crayfish species. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 2009(394–395), 394–395. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009025>
- 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, 394–395. <https://doi.org/10.1051/kmae/2009023>

- Hudina, Sandra, Hock, K., Radović, A., Klobučar, G., Petković, J., Jelić, M., i Maguire, I. (2016). Species-specific differences in dynamics of agonistic interactions may contribute to the competitive advantage of the invasive signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) over the native narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 49(3), 147–157. <https://doi.org/10.1080/10236244.2016.1146448>
- Hudina, Sandra, Kutleša, P., Trgovčić, K., i Duplić, A. (2017). Dynamics of range expansion of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region in Croatia. *Aquatic Invasions*, 12(1), 67–75. <https://doi.org/10.3391/ai.2017.12.1.07>
- Hudina, Sandra, Žganec, K., Lucić, A., Trgovčić, K., i 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. <https://doi.org/10.5869/fc.2013.v19.021>
- Johansson, M. W., Keyser, P., Sritunyalucksana, K., i Söderhäll, K. (2000). Crustacean haemocytes and haematopoiesis. *Aquaculture*, 191(1–3), 45–52. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00418-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00418-X)
- Johansson, M. W., i Söderhäll, K. (1985). Exocytosis of the prophenoloxidase activating system from crayfish haemocytes. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(2), 175–181. <https://doi.org/10.1007/BF00695771>
- Kelly, D. W., Paterson, R. A., Townsend, C. R., Poulin, R., i Tompkins, D. M. (2009). Parasite spillback: A neglected concept in invasion ecology? *Ecology*, 90(8), 2047–2056.
- Kołodziej-Sobocińska, M., Brzeziński, M., Niemczynowicz, A., i Zalewski, A. (2018). High parasite infection level in non-native invasive species: it is just a matter of time. *Ecography*, 41(8), 1283–1294. <https://doi.org/10.1111/ecog.03362>
- Korkut, G. G. (2018). Interaction between crayfish and some microorganisms; Effect of temperature.
- Kouba, A., Petrusek, A., i Kozák, P. (2014). Continental-wide distribution of crayfish species in Europe: Update and maps. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 413. <https://doi.org/10.1051/kmae/2014007>
- Le Moullac, G., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., i Levy, P. (1997). Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*, 7(4), 227–234. <https://doi.org/10.1006/fsim.1996.0077>
- Maguire, I., i Klobučar, G. (2011). Structure en taille, taille à la maturité, croissance et indice de condition de l'écrevisse des torrents (*Austropotamobius torrentium*) dans le nord-ouest de la Croatie. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 401. <https://doi.org/10.1051/kmae/2011026>
- NN 127/19 Zakon o zaštiti prirode Republike Hrvatske, Narodne novine 127, 2019.
- NN 144/2013 Pravilnik o strogo zaštićenim vrstama, Narodne novine 80, 2013.

- Nyström, P., Brönmark, C., i Granéli, W. (1999). Nordic Society Oikos Influence of an Exotic and a Native Crayfish Species on a Littoral Benthic Community Authors (s): Per Nyström , Christer Brönmark and Wilhelm Granéli Published by : Wiley on behalf of Nordic Society Oikos Stable URL : <http://www.jst. OIKOS>, 85(3), 545–553.
- Nyström, P., Brönmark, C., i Granéli, W. (1996). Patterns in benthic food webs: A role for omnivorous crayfish? *Freshwater Biology*, 36(3), 631–646. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.d01-528.x>
- Nyström, P., i Strand, J. A. (1996). Grazing by a native and an exotic crayfish on aquatic macrophytes. *Freshwater Biology*, 36(3), 673–682. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.1996.d01-508.x>
- Pavić, D., Čanković, M., Petrić, I., Makkonen, J., Hudina, S., Maguire, I., Vladušić, T., Šver, L., Hrašćan, R., Orlić, K., Dragičević, P., i Bielen, A. (2020). Non-destructive method for detecting *Aphanomyces astaci*, the causative agent of crayfish plague, on the individual level. *Journal of Invertebrate Pathology*, 169, 107274. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107274>
- Phillips, B. L. (2009). The evolution of growth rates on an expanding range edge. *Biology Letters*, 5(6), 802–804. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0367>
- Phillips, B. L., Kelehear, C., Pizzatto, L., Brown, G. P., Barton, D., i Shine, R. (2010). Parasites and pathogens lag behind their host during periods of host range advance. *Ecology*, 91(3), 872–881. <https://doi.org/10.1890/09-0530.1>
- Rebrina, F., Skejo, J., Lucić, A., i Hudina, S. (2015). Trait variability of the signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) in a recently invaded region reflects potential benefits and trade-offs during dispersal. *Aquatic Invasions*, 10(1), 41–50. <https://doi.org/10.3391/ai.2015.10.1.04>
- Reynolds, J., Souty-Grosset, C., i Richardson, A. (2013). Ecological roles of crayfish in freshwater and terrestrial habitats. *Freshwater Crayfish*, 19(2), 197–218. <https://doi.org/10.5869/fc.2013.v19-2.197>
- Ricker, W. E. (1975). Computation and interpretation of biological statistics of fish populations. *Bulletin of the Fisheries Research, Board of Canada* 191:1-382.
- Rodríguez-González, H., Villarreal, H., García-Ulloa, M., i Hernández-Llamas, A. (2009). Evaluation of practical diets containing different protein levels on gonad development of female redclaw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Aquaculture Nutrition*, 15(4), 347–355. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00599.x>
- Rodríguez-Gutiérrez, M. (1992). Techniques for quantitative assessment of gonadal maturity in fish p: 79.
- Roglić J (1974). Unique morphological features of Plitvice Lakes National Park. *In: Gušić B and Mrakovičić M (eds.), Plitvice Lakes – man and nature. Plitvice Lakes National Park, Croatia.*

- Rutledge, P. S., i Pritchard, A. W. (1981). Scope for activity in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *The American journal of physiology*, 240(1).
<https://doi.org/10.1152/ajpregu.1981.240.1.r87>
- Schmid-Hempel, P. (2003). Variation in immune defence as a question of evolutionary ecology. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270(1513), 357–366.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2265>
- Shapiro, S. S., Wilk, M. B., i Chen, H. J. (1968). A Comparative Study of Various Tests for Normality. *Journal of the American Statistical Association*, 63(324), 1343–1372.
<https://doi.org/10.1198/016214503000000440>
- Soderback, B. (1991). Interspecific dominance relationship and aggressive interactions in the freshwater crayfishes *Astacus astacus* (L.) and *Pacifastacus leniusculus* (Dana). *Canadian Journal of Zoology*, 69(5), 1321–1325. <https://doi.org/10.1139/z91-186>
- Söderhäll, K., and Cerenius, L. (1992). Crustacean immunity. *Ann Rev Fish Dis* 2, 3–23.
- Söderhäll, K., i Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 10(1), 23–28.
[https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(98\)80026-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(98)80026-5)
- Soderhall, K., i Smith, V. J. (1983). Separation of the Haemocyte Populations of. *Developmental and Comparative Immunology*, 7, 229–239.
- Souty-Grosset, C., Holdich, D., Noel, P., Reynolds, J. D., i Haffner, P. (2006). *Atlas of crayfish in Europe* (p. 188). Muséum national d'Histoire naturelle.
- Sritunyalucksana, K., i Soderhall, K. (2000). The proPO and clotting system in crustaceans. *Aquaculture*, 191(1–3), 53–69. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(00\)00411-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00411-7)
- Vaeßen, S., i Hollert, H. (2015). Impacts of the North American signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) on European ecosystems. *Environmental Sciences Europe*, 27(1), 1–6.
<https://doi.org/10.1186/s12302-015-0065-2>
- Westman, K., Pursiainen, M., i Vilkmann, R. (1978). A new folding trap model which prevents crayfish from escaping. *Freshwater crayfish*, 4(1), 235-242.
- Westman, K., Savolainen, R., i Julkunen, M. (2002). Replacement of the native crayfish *Astacus astacus* by the introduced species *Pacifastacus leniusculus* in a small, enclosed Finnish lake: a 30-year study. *Ecography*, 25(1), 53–73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1995.tb01168.x>
- White, T. A., i Perkins, S. E. (2012). The ecoimmunology of invasive species. *Functional Ecology*, 26(6), 1313–1323. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12012>
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical analysis*. Pearson Education India.
- <https://mingor.gov.hr/o-ministarstvu-1065/djelokrug/uprava-za-zastitu-prirode-1180/strane-i-invazivne-strane-vrste/5477> (pristupljeno: 3.2.2022.)

8. Životopis

8.1 Obrazovanje

Diplomski studij Eksperimentalne biologije – Zoologija, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet

Preddiplomski studij Biologije, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek

Opća gimnazija Gospić

8.2 Iskustvo

2017-2018- „Noć biologije“

2016-2019- član Udruge studenata biologije- BIUS, sekcija za ravnokrilce

2017- „Znanstveni piknik“

8.3 Objavljeni radovi

Dragičević, P., Grbin, D., Maguire, I., Blažević, S. A., Abramović, L., Tarandek, A., i Hudina, S. (2021). Immune response in crayfish is species-specific and exhibits changes along invasion range of a successful invader. *Biology*, 10(11).

Lovrenčić, L., Pavić, V., Majnarić, S., Abramović, L., Jelić, M., i Maguire, I. (2020). Morphological diversity of the stone crayfish-traditional and geometric morphometric approach. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems*, 421, 1–10.