

Razine katekolamina kod špiljske i potočne populacije kapelske svijetlice (*Telestes karsticus*)

Matković, Matea

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:217:968798>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-20**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Matea Matković

**Razine katekolamina kod špiljske i
potočne populacije kapelske svijetlice
(*Telestes karsticus*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu u sklopu projekta „Evolucija u tami (Evodark)“ koji je financiran u okviru „Programa izvrsnosti u visokom obrazovanju – Tenure Track Pilot Programme“ Hrvatske zaklade za znanost i École Polytechnique Fédérale de Lausanne putem sredstava Švicarsko-hrvatskog programa suradnje pod voditeljstvom dr. sc. Helene Bilanžije te Laboratoriju za neurofiziologiju Zavoda za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu u sklopu projekta „Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja u kohabitirajućim populacijama guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR)“ Hrvatske zaklade za znanost pod voditeljstvom doc. dr. sc. Sofije Ane Blažević. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre ekologije i zaštite prirode.

Zahvale:

Za izradu ovog rada bilo je potrebno nekoliko kantica živaca i mnoštvo propalih eksperimenata te je puno ljudi kojima zbog toga dugujem zahvalu.

Veliko hvala dr. sc. Heleni Bilandžiji koja mi je pružila priliku, nesebično dijelila svoje znanje sa mnom i usmjeravala me. Hvala na svojoj pomoći i prijateljskim savjetima!

Veliko hvala doc. dr. sc. Sofiji Ani Blažević na susretljivosti, strpljivosti i svemu što ste me naučili! Hvala za svaku riječ utjehe i ohrabrenja kad mi je najviše trebalo.

Veliko hvala dr. sc. Olgi Malev, na njezinoj iskrenosti, stručnosti, svim savjetima, odgovorima na sva moja pitanja (koliko god blesava bila) i svemu novonaučenome!

Također, hvala zaposlenicima Laboratorija za molekularnu genetiku na Zavodu za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković, a posebno Mateu, koji su uvijek priskočili u pomoć kad god je trebalo.

Hvala i svim ljudima sa Zavoda za animalnu fiziologiju koji su barem na trenutak bili uključeni u ovaj proces. Ali posebno veliko hvala mojim najdražim asistenticama godine iz labosa 2: Barbari, bez čije bezuvjetne podrške (iako ponekad ni sama nije znala što radim) i savjeta ovaj rad ne bi bio to što jest i Dunji, uz koju je ovaj naš zajednički posao bio užitak, kao i sva druženja i razgovori izvan njega. Hvala i ABBA-i na glazbi jer bez nje još dan danas ne bismo uspjele namjestiti pH!

Mislím da ne postoji dovoljno veliko hvala mojoj Adriani, mojoj prijateljici koja mi je uljepšala studiranje i život na čemu joj se zahvaljujem svaki dan. Hvala ti što me trpiš iako znam da ponekad nije lako!

Najveće hvala mojoj mami koja me podržavala u svakom mom koraku i vjerovala u mene kada ja nisam, a činiti to neprestano cijeli život nikako nije lako. Hvala i ostatku obitelji, mojoj baki Ivanki i bratu. Bez vaše ljubavi i podrške ništa ne bi bilo. Hvala beskonačno mnogo puta.

I za kraj, Dunja, ovim putem ti ostavljam skrbništvo nad Dejvidom. Dobro nam čuvaj malog.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Razine katekolamina kod špiljske i potočne populacije kapelske svijetlice (*Telestes karsticus*)

Matea Matković

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Kapelska svijetlica (*Telestes karsticus* Marčić i Mrakovčić, 2011) stenoendemska je vrsta dunavskog slijeva koja živi u ponoru i u potoku Sušik. Vrsta *Telestes karsticus* ima stalnu špiljsku populaciju, a prisutnost specifične površinske populacije čini je potencijalno važnim modelnim sustavom za razumijevanje početnih adaptivnih procesa koji nastaju tijekom kolonizacije špilja. Općenito, ribe koje žive u špiljama razvile su razlike u ponašanju koje su pod kontrolom katekolamina. Cilj ovog diplomskog rada bio je prilagoditi i validirati postojeću HPLC metodu mjerenja razine monoamina, izmjeriti koncentracije katekolamina u uzorcima kapelske svijetlice, utvrditi postoji li razlika u njihovim koncentracijama između špiljskih i potočnih populacija, dolazi li do promjene u njihovim razinama u eksperimentalnim uvjetima (život u mraku/uvjeti normalnog dnevno-noćnog ritma) te uzrokuju li spomenuti uvjeti drugačije odgovore kod špiljske i potočne populacije. Za postizanje navedenog cilja bilo je neophodno pročišćavanje uzoraka ekstrakcijom na čvrstoj fazi, stoga je razvijena i validirana RP-HPLC metoda za analizu spojeva s katekolnom skupinom. Špiljska populacija kapelske svijetlice pokazuje indikativno veću koncentraciju dopamina u mozgu od potočne populacije, što ukazuje na to da bi promjene u neurotransmiterima mogle imati značajnu ulogu već u inicijalnim koracima naseljavanja podzemlja.

(53 stranice, 17 slika, 7 tablica, 64 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: HPLC, neurotransmiteri, dopamin, kolonizacija špilja, modelni sustav

Voditelj 1: dr. sc. Helena Bilandžija

Voditelj 2: doc. dr. sc. Sofía Ana Blažević

Ocjenitelji:

doc. dr. sc. Sofía Ana Blažević

doc. dr. sc. Zoran Marčić

prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Rad prihvaćen: 8.9.2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Catecholamine concentrations in the cave and creek population of the Karst dace (*Telestes karsticus*)

Matea Matković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Karst Dace (*Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić, 2011) is a stenoendemic species of the Danube basin that lives in the Sušik Sinkhole and in the Sušik Creek. *Telestes karsticus* forms a permanent cave population and the presence of a specific surface population makes it a potentially important model system for understanding the initial adaptive processes that occur during the colonization of caves. In addition, cavefish have evolved differences in behavior which are under the control of the catecholamine systems. The aims of this thesis was to adapt and validate the current method for measurement of monoamine concentrations by HPLC, to quantify catecholamine concentrations in samples of brain and body tissue of the Karst Dace, to determine whether there is a difference in catecholamine concentrations between cave and surface populations, to determine whether there is a change in catecholamine concentrations in individuals exposed to completely dark conditions vs. light/dark conditions and whether these conditions lead to different responses in cave and surface populations. To achieve this goal, it was necessary to purify samples by solid phase extraction. Therefore, the RP-HPLC method for the analysis of compounds containing catechol moiety was developed and validated. The cave population of the Karst Dace shows a trend of higher concentration of dopamine in the brain compared to the surface population, indicating that changes in neurotransmitters could play an important role already in the initial adaptive processes that occur during cave colonization.

(53 pages, 17 figures, 7 tables, 64 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: HPLC, neurotransmitters, dopamine, cave colonization, model system

Supervisor 1: Helena Bilandžija, PhD

Supervisor 2: Sofia Ana Blažević, PhD, Assist. Prof.

Reviewers:

Sofia Ana Blažević, PhD, Assist. Prof.

Zoran Marčić, PhD, Assist. Prof.

Željka Vidaković-Cifrek, PhD, Prof.

Thesis accepted: 8.9.2022.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Katekolamini	1
1.1.1. Biokemija i sinteza katekolamina	1
1.1.2. Katekolamini u mozgu riba	3
1.2. Kapelska svijetlica.....	4
1.2.1. Opća obilježja i rasprostranjenost	4
1.3. Špiljski način života	6
1.3.1. Meksička tetra	7
1.3.1.1. Razlike u ponašanju površinskih i špiljskih oblika	7
1.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza katekolamina	9
1.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	9
1.4.1.1. Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)	10
1.4.1.2. Priprema uzoraka za analizu	11
1.4.1.2.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE).....	11
1.4.1.3. Kvalitativna analiza.....	12
1.4.1.4. Kvantitativna analiza.....	13
1.4.1.4.1. Kalibracija	13
1.4.1.4.1.1. Metoda unutarnjeg (internog) standarda	13
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Uzorci	15
3.1.2. Kemikalije	15
3.1.3. Komercijalni kompleti.....	16
3.1.4. Tehnička pomagala i pribor.....	17

3.2.	Metode.....	18
3.2.1.	Priprema uzoraka.....	18
3.2.1.1.	Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE).....	19
3.2.2.	Priprema standardnih otopina.....	19
3.2.3.	Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)	20
3.2.3.1.	Razvoj metode RP-HPLC	21
3.2.3.2.	Validacija metode.....	22
3.2.3.2.1.	Selektivnost	22
3.2.3.2.2.	Linearnost.....	22
3.2.3.2.3.	Preciznost	22
3.2.4.	Određivanje koncentracije katekolamina	23
3.2.4.1.	Određivanje koncentracije proteina metodom BCA	23
3.2.4.1.1.	Priprema standarada i radnog reagensa	23
3.2.4.1.1.1.	Priprema razrijeđenih standarada albumina iz goveđeg seruma (BSA)..	23
3.2.4.1.1.2.	Priprema BCA radnog reagensa	24
3.2.4.1.2.	Prostupak na mikrotitarskoj pločici.....	25
3.2.5.	Statistička obrada podataka.....	25
4.	REZULTATI.....	26
4.1.	Razvoj kromatografske metode za razdvajanje katekolamina	26
4.1.1.	Promjena organske mobilne faze	28
4.1.2.	Promjena pH mobilne faze	29
4.1.3.	Promjena vodene mobilne faze	30
4.1.4.	Metoda prilagođena ekstrakciji katekolamina.....	33
4.1.5.	Validacija metode.....	34
4.1.5.1.	Selektivnost	34
4.1.5.2.	Linearnost.....	34
4.1.5.3.	Preciznost	35
4.2.	Koncentracije katekolamina u mozgu špiljske i potočne populacije	37
4.3.	Koncentracije katekolamina u eksperimentalnim uvjetima	38

5.	RASPRAVA.....	40
5.1.	Prilagodba i razvoj RP-HPLC metode	40
5.2.	Usporedba koncentracije katekolamina u mozgu špiljske i potočne populacije	42
5.3.	Usporedba koncentracije katekolamina u eksperimentalnim uvjetima.....	43
6.	ZAKLJUČAK	45
7.	LITERATURA.....	46
8.	ŽIVOTOPIS	53

Popis kratica:

5HIAA	5-hidroksiindol-octena kiselina
5-HT	5-hidroksitriptamin, serotonin
5-HTP	5-hidroksil-L-triptofan
A	adrenalin
AAAD	dekarboksilaza aromatskih aminokiselina
CF	špiljska populacija (engl. <i>cavefish</i>)
COMT	katekol-o-metiltransferaza
DA	dopamin
DBH	dopamin- β -hidroksilaza
DD	jedinke držane u uvjetima konstantnog mraka (engl. <i>dark/dark</i> , DD)
DHBA	3,4-dihidroksibenzilamin
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HVA	homovanilična kiselina
IS	interni (unutarnji) standard
LD	jedinke držane na svjetlu i u mraku (engl. <i>light/dark</i> , LD)
L-DOPA	3,4-dihidroksifenilalanin
MAO	monoamin oksidaza
NA	noradrenalin
OA	oktopamin
PNMT	feniletanolamin-N-metiltransferaza
RP-HPLC	tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. <i>reverse-phase high performance liquid chromatography</i>)
SF	potočna populacija (engl. <i>surface fish</i>)
SPE	ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. <i>solid phase extraction</i>)
TH	tirozin hidroksilaza
TRP	triptofan
TYR	tirozin
UV	ultraljubičasto
VMA	vanililmandelična kiselina

1. UVOD

1.1. Katekolamini

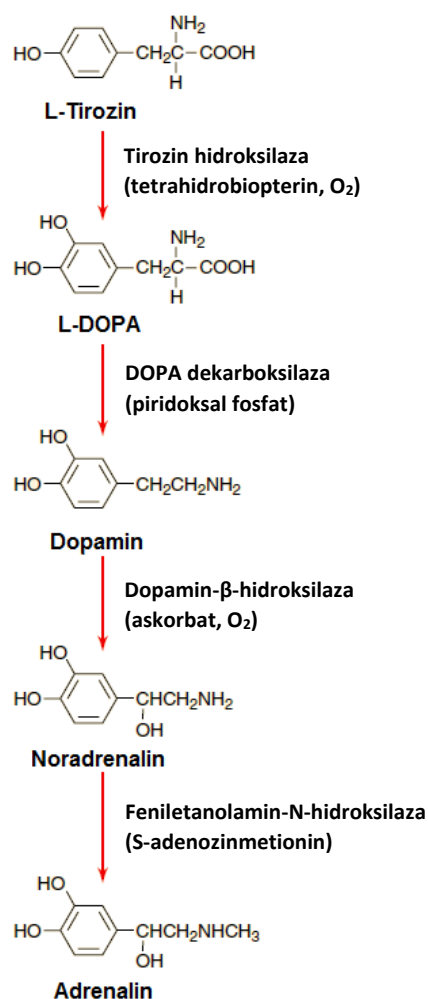
Osim njihove uloge kao sastojaka proteina, druge poznate funkcije aromatskih aminokiselina (triptofan i tirozin) u mozgu su prekursori serotonina (5-HT) i katekolamina (Fernstrom i Fernstrom 2007). Katekolamini pripadaju u višu kategoriju intercelularnih transmitera, monoamina, koji su definirani na temelju razgradnje monoaminskim oksidazama (engl. *monoamine oxidase*, MAO). U monoamine se također ubrajaju i indolamini (serotonin, melatonin) te amini u tragovima (tiramin, oktopamin), a potonji su prisutni u malim količinama u kralježnjaka (Yamamoto i Vernier 2011). Iako se u mozgu nalaze u niskim (mikromolarnim) koncentracijama, imaju značajnu ulogu u regulaciji više aspekata funkcije središnjeg živčanog sustava (Gnegy 2012).

Katekolamini su organski spojevi s visokom fiziološkom aktivnošću koji su ime dobili po katekolu, skupini koja je sastavljena od benzenskog prstena s dvije susjedne hidroksilne skupine, a čini jezgru ovih spojeva (Blanco i Blanco 2017; Deutch 2013; Gnegy 2012; Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019). Fiziološki postoje tri katekolamina: dopamin (DA), noradrenalin (NA) i adrenalin (A). Ova tri neurotransmitera dobivena iz istog prekursora (L-tirozin) stvaraju se uzastopnim enzimskim koracima kataliziranim odvojenim enzimima. Skupine neurona razlikuju se prema prisutnosti ovih specifičnih enzima, stoga ih dijelimo na dopaminergičke, noradrenergičke i adrenergičke (Deutch 2013).

1.1.1. Biokemija i sinteza katekolamina

Stope sinteze i oslobađanja monoaminskih neurotransmitera izravno su modificirane koncentracijama njihovih prekursora u mozgu, na koje pak utječe njihova dostupnost iz krvi (Fernstrom i Fernstrom 2007). Sinteza katekolamina započinje ulaskom L-tirozina u mozak (Slika 1). Enzim tirozin hidroksilaza (TH) uvodi drugu hidroksilnu skupinu na benzenski prsten tirozina tako da tvori 3,4-dihidroksifenilalanin, poznatiji kao L-DOPA (Blanco i Blanco 2017; Deutch 2013). To je najvažniji enzim u sintezi katekolamina jer je početni i ograničavajući korak u njihovom sintetskom putu (Gnegy 2012). L-DOPA se potom dekarboksilira do DA posredstvom enzima dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (AAAD) koji se ponekad naziva DOPA dekarboksilaza. AAAD ima nisku specifičnost supstrata te dekarboksilira triptofan kao i tirozin.

U nekim neuronima središnjeg živčanog sustava, koji koriste DA kao neurotransmiter, metabolički put završava proizvodnjom DA te je AAAD konačni enzim sintetičkog puta, a u drugim neuronima se nastavlja te nastaju drugi katekolamini. Neuroni koji koriste NA kao neurotransmiter sadrže dodatni enzim, dopamin- β -hidroksilazu (DBH), koji pretvara DA u NA. Kod noradrenergičkih neurona ovo je posljednji korak u sintezi katekolamina. DBH također ima nisku specifičnost supstrata pa tako osim što formira NA iz DA, pretvara i tiramin u oktopamin (OA). U drugim neuronima, kod kojih je A neurotransmiter, NA se transmetilacijom može pretvoriti u A. Reakcija se katalizira enzimom feniletanolamin-*N*-metiltransferazom (PNMT) koji se nalazi u srži nadbubrežne žlijezde (Blanco i Blanco 2017; Deutch 2013; Fernstrom i Fernstrom 2007).



Slika 1. Biosinteza katekolamina. Preuzeto i prilagođeno prema Gnegy (2012).

Katekolamini se skladište u specijaliziranim unutarstaničnim organelima zvanim vezikule. Sukladno tome, potreban je specijalizirani vezikularni monoaminski transporter (VMAT2) kako bi DA i drugi neurotransmiteri koji se sintetiziraju u citosolu ušli u sinaptičke vezikule i tako se zaštitili od razgradnje (Deutch 2013; Yamamoto i Vernier 2011).

Kao tvari velike biološke aktivnosti katekolamini se brzo razgrađuju i eliminiraju iz tijela te im je poluvijek 15-30 s. Dva enzima doprinose katabolizmu katekolamina, ranije spomenuti MAO i katekol-o-metiltransferaza (engl. *catechol-o-methyltransferase*, COMT). MAO je odgovoran za oksidativnu deaminaciju katekolamina i drugih bioloških amina, kao što su tiramin, triptamin i serotonin dok COMT katalizira metilaciju jedne od hidroksilnih skupina katekolamina. Ovi enzimi mogu djelovati neovisno ili mogu djelovati na produkte koje generira drugi enzim, što dovodi do metabolita katekolamina koji su deaminirani, O-metilirani ili oboje (Blanco i Blanco 2017; Deutch 2013; Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019). Kombiniranim djelovanjem MAO i COMT na DA nastaje njegov glavni metabolit, homovanilična kiselina (HVA) (Yamamoto i Vernier 2011).

1.1.2. Katekolamini u mozgu riba

Široka neuromodulatorna kontrola koju provode monoamini u mozgu kralježnjaka objašnjava zašto su uključeni u različite funkcije i procese kao što su pažnja i uzbuđenje (NA), obrana i anksioznost (DA, 5-HT), stres i emocije (DA, NA, 5-HT), nagrada (DA), raspoloženje (5-HT), apetit i potrošnja energije, spavanje/budnost (5-HT, NA, melatonin) ili motorička kontrola (DA, 5-HT). Naime, monoaminergički sustavi su evolucijski dobro očuvani i čini se da imaju iste funkcije kod riba i sisavaca, uz neke iznimke (Maximino i Herculano 2010; Panula i sur. 2010) poput prisustva 5-HT (Elipot i sur. 2013; Lillesaar 2011) i DA (Panula i sur. 2010; Yamamoto i sur. 2010, 2011) neurona u prednjem mozgu riba. Kako su monoaminergički sustavi kod riba privukli zanimanje znanstvenika, proučeni su i na zebrici (*Danio rerio*) kao modelnom organizmu u svrhu modeliranja nekih aspekata složenog ponašanja (Norton i Bally-Cuif 2010) te za proučavanje neuroaktivnih molekula (Kokel i sur. 2010; Kokel i Peterson 2011).

1.2. Kapelska svijetlica

1.2.1. Opća obilježja i rasprostranjenost

Rod *Telestes* endemski je rod Euromediteranske podregije (Ketmaier i sur. 1998). Vrste ovog roda obitavaju isključivo u slatkim vodama. Prilagođene su na život u uvjetima hladne vode te primarno obitavaju u gornjim tokovima rijeka ili u manjim potocima, odnosno moglo bi ih se svrstati u zonu lipljena (Ketmaier i sur. 1998, 2004). Većina vrsta ovoga roda rasprostranjena je u rijekama koje se slijevaju u istočni Jadran (Kottelat i Freyhof 2007). Do sada je opisano 14 vrsta roda *Telestes*, od kojih 8 vrsta dolazi na području Hrvatske (Marčić i sur. 2017). Jedna od njih je i kapelska svijetlica (*Telestes karsticus* Marčić i Mrakovčić, 2011), stenoendemska vrsta dunavskog slijeva (Slika 2).



Slika 2. Kapelska svijetlica (*Telestes karsticus*) – potok Sušik. Autor: Perica Mustafić.

Rasprostranjena je na samo četiri lokaliteta s jugozapadne strane planina Velike i Male Kapele u krškim poljima: Stajničko polje, polje Lug, Drežničko polje te Jasenačko polje (Ćaleta i sur. 2015; Marčić i sur. 2011). Potok Sušik ponornica je koja protječe krškim poljem Lug na nadmorskoj visini od 463 m i čija duljina toka iznosi oko 5 km, dok širina potoka varira od 2 do 10 m. Nadalje, vodostaj potoka nije stalan te potok teče tek kada je vodostaj veći od 20 cm, a ljeti djelomično presušuje (Marčić i sur. 2021).

S druge strane, na kontaktima manje i više vodopropusnih stijena na rubovima polja stvorili su se preduvjeti za nastanak ponora. Ponor Sušik, horizontalan objekt s hidrološki aktivnim glavnim kanalom i većinom fosilnim bočnim kanalima, smješten je u podnožju stijene Vučjak visoke oko 30 m. Kako bi se ušlo u ponor, potrebno se provući ispod i preko veće količine odronjenih kamenih blokova koji se nalaze pred samim ulazom (Slika 3). Budući da je Sušik aktivni ponor istoimenog potoka, u vodi je moguće pronaći raznoliku nadzemnu i podzemnu faunu (Butorac i Hanžek 2019).



Slika 3. Ulaz u ponor Sušik. Autor: Branko Jalžić.

Iako se navodi da ova vrsta nepovoljan dio godine provodi u podzemlju povlačeći se u ponore ili izvore obzirom da živi u vodotocima koji presušuju (Ćaleta i sur. 2015), novija istraživanja pokazuju da kapelska svjetlica obitava u ponoru Sušik tijekom cijele godine (Bilandžija i sur. 2022). Špiljska populacija procjenjuje se na nekoliko stotina jedinki, a pronađene su morfološke i fiziološke karakteristike koje ih jasno razlikuju od susjedne površinske populacije (Slika 4).



Slika 4. Kapelska svijetlica (*Telestes karsticus*) u ponoru Sušik. Autor: Branko Jalžić.

1.3. Špiljski način života

Općenito gledano, podzemni sustavi su sustavi ekološki stabilnih uvjeta koje obilježava konstantno odsustvo svjetlosti. Stoga su životinje prilagođene špiljskom životu razvile niz neobičnih i specijaliziranih osobina koje se često nazivaju troglomorfnim osobinama, a omogućuju im preživljavanje u izazovnim uvjetima podzemlja. Kako žive u uvjetima konstantne tame, špiljskim životinjama vizualna osjetila te zaštita od utjecaja sunčeve svjetlosti nisu potrebni. Posljedično tome, oči i pigmentacija su reducirani ili potpuno odsutni. Nadalje, kako fotosintetski organizmi nisu prisutni u špiljama, primarna produktivnost je odsutna te je dostupnost hranjivih tvari ograničena. U takvim uvjetima smanjenih resursa hrane došlo je do adaptivnih metaboličkih promjena (Bilandžija i sur. 2020; Culver i Pipan 2019; Pipan i Culver 2012).

Preci špiljskih životinja izvorno su živjeli na površini pa prijelaz na tamna podzemna staništa predstavlja značajne izazove. Bez obzira na to jesu li pionirske životinje ušle u podzemlje slučajno ili namjerno, iznenada su bile izložene uvjetima potpunog mraka (Bilandžija i sur. 2020).

1.3.1. Meksička tetra

Meksička tetra (*Astyanax mexicanus* De Filippi, 1853) ima populacije koje obitavaju u rijekama i potocima (SF, engl. *surface fish*) te one koje su potpuno prilagođene na špilje (CF, engl. *cavefish*) i koristi se kao modelni sustav za razumijevanje adaptacija na podzemni način života. Pokazano je da špiljska riba ima niz promjena u razinama i/ili aktivnostima katekolamina (Bilandžija i sur. 2013, 2018, 2020) te da je dio tih promjena evoluirao genetičkom asimilacijom plastičnih odgovora površinske ribe na uvjete konstantne tame (Bilandžija i sur. 2020).

1.3.1.1. Razlike u ponašanju površinskih i špiljskih oblika

Ribe koje žive u špiljama razvile su razlike u ponašanju u odnosu na njihove površinske oblike pa ih tako pojačano privlače vibracije (Yoshizawa i sur. 2010) i aktivnije su u istraživanju okoliša (Pottin i sur. 2010; Windsor i sur. 2008, 2010a, 2010b, 2011). To se ponekad naziva „biheioralni sindrom špiljskih riba“ (Elipot i sur. 2014). U odabir odgovora ponašanja na podražaje iz okoline prvenstveno su uključeni katekolamini, kao što su DA i NA (Gallman i sur. 2020).

Hranjenje i spavanje, među mnogim drugim ključnim fiziološkim procesima, kontrolira katekolaminski sustav (Fernstrom i Fernstrom 2007; Ouyang i sur. 2004). Kako se u hipotalamusu nalaze centri koji reguliraju hranjenje (Stricker i Zigmond 1984), povećane razine katekolamina mogu imati utjecaj na poboljšano hranjenje (Bilandžija i sur. 2013, 2018). Ponašanje prilikom traganja za hranom kao i izbjegavanje predatora također je regulirano katekolaminskim sustavima u mozgu (Björklund i Dunnett 2007; Deslauriers i sur. 2019; Duboué i sur. 2011). Kako su špiljska staništa općenito siromašna hranjivim tvarima i imaju malo predatora (Fernandes i sur. 2016; Howarth 1993; Jeffery 2005), životinje koje obitavaju u špiljama provode više vremena u potrazi za hranom i imaju smanjenu osjetljivost na predatorske znakove (Duboué i sur. 2011; Howarth 1993; Yoshizawa i sur. 2010). Tako je slijepa špiljska tetra (CF) kontinuirano u potrazi za hranom, dok SF (vanjska meksička tetra) pokazuje dnevne promjene u aktivnostima traganja za hranom te koristi strategiju sjedenja i čekanja u kojoj se kretanje dramatično povećava u prisutnosti znakova hrane (Jaggard i sur. 2017; Romero i sur. 2003; Salin i sur. 2010). Ova svojevrsna „ovisnost“ o hrani u CF može biti povezana s DA (Elipot i sur. 2014). Osim toga, SF kao mehanizam za izbjegavanje predacije koristi bijeg, dok CF aktivno istražuje nove podražaje (Keene i sur. 2015; Yoshizawa i sur. 2010). Uz to, važno je naglasiti da su špiljske ribe efikasnije u pronalaženju hrane

od površinskih riba u uvjetima koji repliciraju špiljsko okruženje (Hüppop 1987) te da se kod špiljskih riba razvilo nekoliko različitih promjena u ponašanju prilikom hranjenja kao što je različit položaj tijela, odnosno CF se hrani pod manjim kutom od SF (Kowalko i sur. 2013; Yoshizawa i sur. 2010). Nadalje, špiljske ribe nakupljaju zalihe masti, što može biti važna prilagodba za razdoblja niskog unosa hrane u špiljskim sustavima. Evolucija ovih metaboličkih promjena i promjena u ponašanju mogla je imati veliki utjecaj na sposobnost tetre da se prilagodi špiljskom okolišu osiromašenom hranom uslijed nedostatka primarne produkcije (Bilandžija i sur. 2013).

Smanjenje trajanja sna u špiljskih riba u odnosu na površinske (Duboué i sur. 2011) također bi moglo pridonijeti njihovom efikasnijem hranjenju (Hüppop 1987). NA sustav u kralježnjaka ima ulogu u kontroli trajanja sna i budnosti (Ouyang i sur. 2004), što upućuje na mogućnost da povišene razine NA mogu biti uključene u redukciju spavanja kod špiljskih riba, odnosno manje spavanja znači više vremena provedenog u budnom, alertnom stanju (Bilandžija i sur. 2013). Također, NA igra ključnu ulogu u moduliranju trenutnih i dugoročnih odgovora na određene podražaje relevantne za ponašanje i može potaknuti promjene u homeostazi (O'Donnell i sur. 2012).

Nadalje, kod nekih vrsta dolazi i do smanjenja ili potpunog gubitka pigmentacije. Do prekida sinteze melanina kod meksičke tetre dolazi već u prvom koraku biosintetskog puta, a radi se o mutaciji u genu *oca2* čija je posljedica nastanak nefunkcionalnog proteina OCA2 (Protas i sur. 2006). Pretpostavlja se da su mutacije u *oca2* ili drugom genu uključenom u prvi korak sinteze melanina mete prirodne selekcije temeljene na pleiotropnoj izmjeni između putova sinteze melanina i katekolamina. Naime, iako se metabolički putovi melanina i katekolamina razlikuju, oba počinju istim prekursorom, odnosno L-tirozinom. Blokiranjem prvog koraka sinteze melanina, dolazi do akumulacije L-tirozina koji se onda može koristiti u sintezi katekolamina (Bilandžija i sur. 2013, 2018). Kod meksičke tetre, ovoj hipotezi u prilog idu više razine DA i NA u špiljskih riba u odnosu na površinske (Bilandžija i sur. 2013; Elipot i sur. 2014), kao i povišena razina L-tirozina i DA u jedinkama koje žive izvan špilja kojima je inaktiviran gen *oca2* (Bilandžija i sur. 2013).

Uzimajući u obzir sve navedeno, ovi podaci sugeriraju da su povećane razine katekolamina važan faktor koji može doprinijeti uspješnoj kolonizaciji i opstanku u špiljskim staništima (Bilandžija i sur. 2013, 2018).

1.4. Kvalitativna i kvantitativna analiza katekolamina

Kvantifikacija i analiza katekolamina i njihovih metabolita u biološkim uzorcima još uvijek je analitički zahtjevna zbog vrlo malih količina u samim uzorcima te njihove velike sklonosti oksidaciji. Osim toga, postupci pročišćavanja uzoraka još uvijek su vrlo kompleksni zbog prisutnosti interferirajućih spojeva u uzorcima i složenosti analizirane matrice.

Za katekolamine cjelovitost (integritet) uzorka uvelike ovisi o niskim pH vrijednostima, posebno za dugotrajno skladištenje. Standardna metoda razdvajanja i kvantifikacije katekolamina je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) s fluorescencijskim (FLD), elektrokemijskim (ECD) ili maseno-spektrometrijskim (MS) detektorom (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019). Međutim, najrasprostranjeniji detektori za tekućinsku kromatografiju temelje se na apsorpciji ultraljubičastog (UV) ili vidljivog zračenja. Ovo je najčešće korišteni tip detektora jer može biti prilično osjetljiv, ima širok linearni raspon, na njega ne utječu osobito temperaturne fluktuacije te je prikladan za gradijentno eluiranje (Meyer 2004; Skoog i sur. 2014).

1.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Kromatografija je široko korištena metoda za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih spojeva prisutnih u složenim smjesama. Pojam kromatografija teško je definirati jer je naziv primijenjen na nekoliko sustava i tehnika, međutim, svima je zajedničko korištenje stacionarne i mobilne faze. Komponente smjese odvajaju se na temelju razlika u brzinama kojima se prenose strujanjem mobilne faze kroz stacionarnu fazu. Stacionarna faza u kromatografiji je faza koja je fiksirana (u koloni ili na ravnoj površini) dok se mobilna faza kreće preko ili kroz stacionarnu fazu noseći sa sobom smjesu analita.

Kromatografske metode dijele se u kategorije na temelju prirode mobilne faze pa tako postoje tekućinska i plinska kromatografija. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) najraširenija je vrsta kromatografije čiji je temelj interakcija analita (komponenta smjese) s mobilnom i stacionarnom fazom (Skoog i sur. 2014).

1.4.1.1. Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)

Postoji nekoliko načina odjeljivanja u tekućinskoj kromatografiji, a za kromatografsku separaciju katekolamina najčešće se koristi tekućinska kromatografija obrnutih faza (engl. *reverse-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). RP-HPLC karakterizira nepolarna stacionarna faza, najčešće silikagel s kemijski vezanom fazom, dok je mobilna faza polarna i obično je sačinjena od jednog ili više organskih otapala te vode, odnosno pufera. Na ovakvom kromatografskom sustavu redosljed izlazaka analita s kolone ide od najpolarnije komponente do one najmanje polarne, odnosno zadržavanje analita jače je što je udio organskog otapala u mobilnoj fazi manji (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019; Skoog i sur. 2014).

Eluiranje s jednim otapalom ili smjesom otapala konstantnog sastava naziva se izokratna elucija. U gradijentnoj eluciji koriste se dva (a ponekad i više) sustava otapala koji se značajno razlikuju po polarosti i koji variraju u sastavu tijekom odvajanja. Omjer dvaju otapala mijenja se na unaprijed programiran način, ponekad kontinuirano, a ponekad u nizu koraka (Skoog i sur. 2014). Uspoređujući različite metode opisane u literaturi, izokratna elucija češće se koristi od gradijentne, vjerojatno zbog činjenice da je ova metoda jednostavnija i ne ovisi o dodatnom vremenu za ponovnu ekvibraciju sustava između dvije analize. Ipak, ako je rezolucija pika slaba pri izokranim uvjetima, gradijenta metoda može biti rješenje (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019).

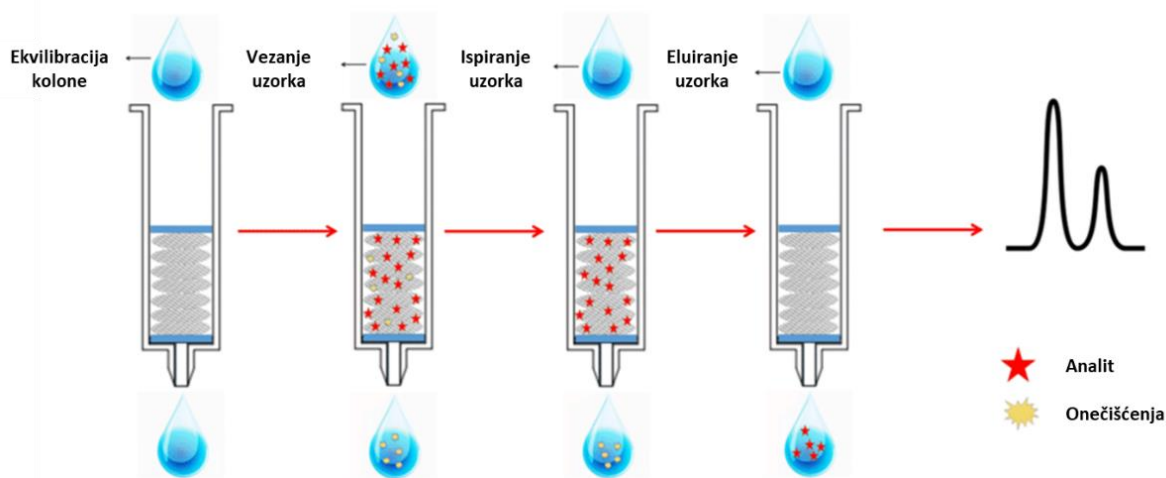
Također, osim odabira odgovarajuće analitičke kolone na temelju prirode analita od interesa, prilikom analize poželjno je u kromatografskom sustavu imati i pretkolonu. Pretkolona je zaštitna kolona smještena između injektora i analitičke kolone. To je kratka kolona napunjena istom ili sličnom stacionarnom fazom kao i analitička kolona koja ne utječe na učinkovitost razdvajanja. Svrha pretkolone je spriječiti nečistoće da kontaminiraju analitičku kolonu što je posebno važno kod analize bioloških uzoraka te služi za produžavanje vijeka trajanja analitičke kolone. Pretkolonu je potrebno redovito mijenjati (u redovitim vremenskim intervalima ili nakon određenog broja injektiranja) kako bi se osigurao maksimalni vijek trajanja analitičke kolone (Meyer 2004; Skoog i sur. 2014).

1.4.1.2. Priprema uzorka za analizu

Općenito, priprema uzorka uvelike ovisi o korištenom sustavu detekcije. Nadalje, kvantifikacija katekolamina i njihovih metabolita iz uzoraka tkiva i staničnih kultura rjeđa je od uzimanja uzoraka tekućine. Većina dostupnih protokola za ekstrakciju katekolamina iz tkiva i stanica temelji se na uzorcima mozga i nadbubrežne žlijezde. Ekstrakcija katekolamina iz tkiva i stanica zahtijeva homogenizaciju tkiva ili sonikaciju u prisutnosti otopine pufera. Obično se upotrebljavaju puferi na bazi fosfata ili natrijeva fosfata, dok se perklorna kiselina koristi za razgradnju tkiva. Dodatno, homogeniziranom tkivu obično se dodaju konzervansi kao što su askorbinska kiselina, 1,4-ditiotreitol (DTT) ili natrijev bisulfit, dok se u nekim publikacijama navodi se da je dodatak EDTA ili natrijeva metabisulfita dovoljan za stabilizaciju katekolamina. Svi postupci provode se pri niskim temperaturama (4 °C) ili na ledu, a krajnji produkt ekstrakcije potrebno je filtrirati prije ubrizgavanja u kromatografski sustav (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019).

1.4.1.2.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

Ukoliko sonikacija tkiva u prisutnosti pufera i konzervansa nije dovoljna za pročišćavanje uzorka, konvencionalna metoda koja se koristi za pročišćavanje bioloških uzoraka je ekstrakcija na čvrstoj fazi (engl. *solid phase extraction*, SPE). Ovaj postupak je vrlo selektivan i rezultira uklanjanjem interferirajućih spojeva pri čemu se izoliraju analiti od interesa iz složenih bioloških uzoraka. Temelji se na principima kromatografije pri čemu se većina komponenti adsorbira na stacionarnu fazu te se katekolamini nakon ispiranja eluiraju odgovarajućim otapalom (Slika 5).



Slika 5. Shematski prikaz SPE. Preuzeto i prilagođeno prema Amiri i sur. (2020).

Ekstrakcija katekolamina pomoću aluminijevog oksida (alumina) kao stacionarne faze jedna je od najstarijih opisanih metoda. Alumina tvori cikličke komplekse s katekolnom skupinom čime se izoliraju svi spojevi iz složenih smjesa koji ju sadrže. Nadalje, alumina mora prvo biti aktivirana pomoću klorovodične kiseline (*acid washed alumina*), a zatim uz pomoć ekvibracijskog pufera dovesti do pH vrijednosti od 8,6 kako bi kolona bila kondicionirana i spremna za ekstrakciju. Također, nakon vezanja uzorka, alumina se mora dobro isprati kako bi se uklonile sve interferirajuće tvari, odnosno onečišćenja. Desorpcija katekolamina obično se provodi dodavanjem kiseline, kao što su perklorna, fosforna, mravlja ili octena kiselina (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019).

1.4.1.3. Kvalitativna analiza

Kvalitativna analiza podrazumijeva identifikaciju analita od interesa pri čemu je najvažniji parametar retencijsko vrijeme. To je zapravo vrijeme koje prođe od injektiranja uzorka u kolonu do pojave maksimuma pika na kromatogramu za svaku tvar u uzorku, a mjeri se u minutama. Nadalje, pri identifikaciji analita potreban je i referentni vanjski standard, odnosno odvojeno od uzorka pripremi se serija standardnih otopina analita od interesa. Zatim se uspoređuju retencijska vremena analita od interesa i vanjskog standarda. Ukoliko retencijska vremena imaju isti raspon, dolazi se do zaključka da su analit i standard isti spoj. Često se kao dodatna provjera koristi metoda dodavanja vanjskog standarda u uzorak, odnosno dodaje mu se poznata koncentracija standardne otopine (engl. *spike*). Prvi korak je mjerenje signala analita iz uzorka, a drugi mjerenje signala istog uzorka u koji je dodana poznata koncentracija analita, pri čemu se prati kod kojeg pika u uzorku dolazi do povećanja površine nakon dodavanja vanjskog standarda (Skoog i sur. 2014).

1.4.1.4. Kvantitativna analiza

1.4.1.4.1. Kalibracija

Vrlo važan dio svih analitičkih postupaka prilikom kvantitativnog određivanja sastava uzorka je proces kalibracije i standardizacije. Kalibracija određuje odnos između analitičkog odgovora i koncentracije analita. Taj se odnos obično određuje upotrebom analitičkih standarada poznate koncentracije (kalibratora) te se prikazuje matematički ili grafički kako bi se iz toga mogla izračunati nepoznata koncentracija analita. Općenito, dijagram odziva instrumenta u odnosu na poznate koncentracije analitičkih standarada koristi se za izradu kalibracijske krivulje za koju je poželjno da bude linearna, barem u rasponu koncentracija analita. U procesu kalibracije potrebno je imati barem 3 različite koncentracije, a poželjno je i više. Najčešće korištene kalibracijske metode su metoda vanjskog standarda, metoda standardnog dodatka te metoda unutarnjeg (internog) standarda (Skoog i sur. 2014). Preporučljivo je koristiti potonju metodu, ukoliko postoji spoj koji se može koristiti kao interni standard za analit od interesa, obzirom da je preciznija od one temeljene na vanjskom standardu zbog korekcije za dio analita koji je izgubljen prilikom pripreme uzorka.

1.4.1.4.1.1. Metoda unutarnjeg (internog) standarda

U ovoj metodi kalibracije uzorku, slijepoj probi i svim standardnim otopinama (kalibratorima) dodaje se unutarnji, odnosno interni standard (IS), čija koncentracija je konstantna i poznata. IS je u pravilu tvar koja je kemijski i fizikalno slična analitu od interesa, ali ne smije biti prirodno prisutna u analiziranom uzorku te se mora dobro razdvajati od traženog analita. Također, IS se u uzorak dodaje prije bilo kakvog predtretmana kao što je postupak pročišćavanja kojim se uklanjaju interferirajući spojevi koji mogu ometati razdvajanje analita od interesa. Kvantifikacija analita temelji se na omjeru površine ili visine pika analita u uzorku i površine ili visine pika IS. Iz ovisnosti ovog omjera o koncentraciji kalibratora izrađuje se kalibracijska krivulja iz koje se može odrediti koncentracija traženog spoja. Kalibracijska krivulja na y-osi sadrži vrijednosti omjera površine/visine analita i IS dok se na x-osi nalaze vrijednosti koncentracije kalibratora (Skoog i sur. 2014).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kako su istraživanja na meksičkoj tetri pokazala niz promjena u razinama katekolamina (Bilandžija i sur. 2013, 2018, 2020), nameće se pitanje pokazuju li svijetlice koje žive u konstantom mraku ponora Sušik također promjene u katekolaminima u odnosu na potočnu populaciju, kao i jesu li promjene u katekolaminima evoluirale preko fenotipske plastičnosti uslijed izlaganja potočnih jedinki svijetlica uvjetima konstantnog mraka kao što je to slučaj kod meksičke tetre.

Iz tog razloga ciljevi ovog diplomskog rada su:

- (1) prilagoditi postojeću HPLC metodu mjerenja razine monoamina u mozgu guštera (Nikolic i sur. 2019) na način da se može primijeniti na mozak kao i homogenat cijele ribe;
- (2) izmjeriti koncentracije katekolamina u moždanom tkivu te homogeniziranom tkivu jedinki *Telestes karsticus* uzorkovanih na dva lokaliteta u prirodi: u ponoru Sušik (špilja) i potoku Sušik, polje Lug, Drežnica te jedinki s ista dva lokaliteta koje su 7 mjeseci držane u uvjetima konstantnog mraka (engl. *dark/dark*, DD) i kontrolne grupe držane na svjetlu i u mraku (engl. *light/dark*, LD);
- (3) utvrditi postoji li razlika u koncentracijama katekolamina između jedinki koje obitavaju u špilji (ponor) i jedinki koje obitavaju na površini, odnosno u potoku, dolazi li do promjene u razinama katekolamina u eksperimentalnim uvjetima života u mraku u usporedbi s uvjetima normalnog dnevno-noćnog ritma te uzrokuju li spomenuti eksperimentalni uvjeti drugačije odgovore kod špiljske i potočne populacije.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Uzorci

Prilikom izrade ovog rada analizirala sam uzorke mozga te homogenate čitavog organizma kapelske svijetlice. Uzorkovanje je provedeno tijekom srpnja 2020. godine te rujna 2021. godine od strane djelatnika Instituta Ruđer Bošković i Prirodoslovno-matematičkog fakulteta. Uzorci su prikupljeni leđnim elektroagregatom u ponoru i u potoku Sušik, polje Lug, Drežnica. Uhvaćene jedinke usmrćene su prevelikom dozom anestetika ili uranjanjem u tekući dušik. Jedinke (s oba lokaliteta) iz tekućeg dušika homogenizirane su cijele pomoću tarionika i tučka pri čemu je cijelo vrijeme korišten tekući dušik u svrhu očuvanja uzorka, dok je iz drugog dijela uzoraka izoliran mozak. Homogenati i mozgovi pohranjeni su na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dio jedinki skupljenih u srpnju 2020. godine, prevezen je na Institut Ruđer Bošković. Jedinke iz svakog od dva lokaliteta su nasumično podijeljene na dvije grupe, jednu koja je držana u uvjetima konstantnog mraka (DD) i drugu koja je držana u uvjetima izmjene dnevnog svjetla i noćne tame (LD). Svi su drugi životni uvjeti među pojedinim grupama držani konstantnima.

3.1.2. Kemikalije

Kemikalije korištene za pripremu deproteinizacijske otopine:

- ❖ 70% perklorna kiselina, HClO_4 (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ natrijev metabisulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu mobilne faze:

- ❖ 88-91% mravlja kiselina, HCOOH (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ $\geq 99\%$ trifluoroctena kiselina, TFA (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 85% fosforna kiselina, H_3PO_4 (J.T. Baker, Švicarska)
- ❖ acetonitril (Fisher Chemical, UK)
- ❖ metanol (Honeywell, Francuska)

Kemikalije korištene za pripremu standardnih otopina:

- ❖ 0,5 M HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- ❖ 70% etanol
- ❖ voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- ❖ serotonin, analitički standard (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ dopamin hidroklorid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ L-norepinefrin hidroklorid, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ epinefrin bitartrat analitički standard (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ L-triptofan, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ L-tirozin hidroklorid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 5-hidroksiindol-3-octena kiselina, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ DL-4-hidroksi-3-metoksimandelična (vanililmandelična) kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 4-hidroksi-3-metoksifeniloctena (homovanilična) kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 5-hidroksil-L-triptofan hidrat (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ oktopamin hidroklorid (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (Sigma Aldrich, Njemačka)
- ❖ 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromid (Acros Organics, Ukrajina)

Kemikalije korištene za SPE:

- ❖ alumina CF-8010 (Bioanalytical Systems, SAD)
- ❖ ultra čisti tris (Invitrogen, SAD)
- ❖ voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- ❖ 5 M HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- ❖ fosfatni pufer pH 7
- ❖ 70% perklorna kiselina, HClO₄ (Sigma Aldrich, Njemačka)

3.1.3. Komercijalni kompleti

- ❖ komplet za određivanje koncentracije proteina: Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)

3.1.4. Tehnička pomagala i pribor

- ❖ sustav HPLC Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies, SAD)
- ❖ kromatografska kolona reverzne faze Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 150 mm x 4,6 mm) s pretkolumnom Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 10 mm x 3,0-4,6 mm) (AkzoNobel, Švedska)
- ❖ kromatografska kolona reverzne faze ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (5 µm; 150 mm x 4,6 mm) s pretkolumnom ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (5 µm; 12,5 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, SAD)
- ❖ vakuumski uređaj Agilent Vac Elut 20 Position Manifold (Agilent Technologies, SAD)
- ❖ KNF N96 vakuum pumpa (LABOPORT, Njemačka)
- ❖ centrifuga 5702 (Eppendorf, Njemačka)
- ❖ Bio RS-24 Mini rotator (Biosan, Latvija)
- ❖ centrifuga SL 8R (Thermo Scientific, Njemačka)
- ❖ uređaj za mjerenje pH CG842 (Schott Instruments, Njemačka)
- ❖ magnetska miješalica (Elektrosanitarij, Hrvatska)
- ❖ ultrazvučni homogenizator (Bandelin Sonopuls, Njemačka)
- ❖ SPECTROstar Nano čitač mikrotitarskih pločica (BMG Labtech, Njemačka)

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka

Za pripremu uzoraka modificirala sam protokol koji su koristili Nikolic i sur. (2019). Pripremila sam deproteinizacijsku otopinu (Tablica 1) otapanjem potrebnih masa krutina u manjem volumenu ultračiste HPLC vode te zatim staklenom pipetom dodala potreban volumen perklorne kiseline (HClO_4). Podesila sam pH otopine na 3,1 pomoću različitih koncentracija NaOH (10 M; 5 M; 2,5 M; 1 M). Uzorke tkiva mozga i homogenate čitavog organizma homogenizirala sam pomoću Bandelin ultrazvučnog homogenizatora. U mikroeprevete sa smrznutim uzorcima dodala sam određen volumen (masa uzorka pomnožena s deset u μL) hladne deproteinizacijske otopine obzirom da ultrazvučna sonda prilikom korištenja zagrijava uzorak. Vrijeme homogenizacije pojedinog uzorka variralo je do maksimalno 20 sekundi, a tijekom homogenizacije mikroeprevetu s uzorkom držala sam u čaši s ledom. Nakon homogenizacije, uzorke sam centrifugirala 20 min pri 30000 x g na temperaturi od 4 °C. Supernatant nakon prvog centrifugiranja odvojila sam pipetom u čistu mikroeprevetu te ponovila postupak pri istim uvjetima kao u prethodnom koraku. Zatim sam supernatant prebacila u mikroeprevetu s filterom 0,22 μm te centrifugirala 15 min pri 17000 x g na temperaturi od 4 °C. Mikroeprevetu s konačnim supernatantom prije postupka ekstrakcije držala sam na ledu. Ukoliko uzorak nisam ekstrahirala odmah nakon pripreme, pospremila sam ga u zamrzivač na -80 °C.

Tablica 1. Priprema deproteinizacijske otopine za homogenizaciju mozgova.

komponenta smjese*	Mr (g/mol)	početna koncentracija	dodan volumen (mL)	dodana masa (mg)	konačna koncentracija (mM)
HClO_4	100,46	70%	0,431	-	0,1 M
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$	190,11	-	-	3,80	0,4 mM
EDTA	372,24	-	-	3,72	0,2 mM

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

3.2.1.1. Ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE)

Homogenizirane i filtrirane uzorke mozga i homogenata čitavog organizma kapelske svijetlice pročistila sam modificiranim postupkom SPE prema literaturnom izvoru Ronca i sur. (2006). Za ekstrakciju sam koristila jednokratne plastične kolonice s polietilenskim diskovima zapremine 2 mL u koje sam prvo izvagala 50 mg aktivirane alumine. Zatim sam dodala 120 μ L uzorka ili standarda i 10 μ L internog standarda (DHBA; $c=100 \mu$ M). Odmah nakon toga sam staklenom pipetom dodala 2 mL tris-pufera (1 M; pH 8,6), umetnula gornji disk, začepila kolonicu, resuspendirala 30 sekundi pomoću vorteks miješalice te stavila na rotator 20 min. Kolonice sam zatim postavila na vakuumski uređaj kako bih aspirirala pufer te sam ispirala uzorke 5 puta s po 1 mL ultra čiste HPLC vode koja sadrži mali volumen pufera pH 7 (voda pri pH 7 prevenira desorpciji katekolamina prilikom ispiranja). Prilikom svakog ispiranja pazila sam da se alumina osuši skoro do suhoga, a nakon zadnjeg ispiranja zaostalu tekućinu uklonila sam centrifugiranjem kolonice u epruveti 3 min pri 1500 x g. U kolonicu sam zatim dodala 120 μ L 0,2 M HClO₄ kako bi katekolamini eluirali s alumine, resuspendirala 30 sekundi pomoću vorteks miješalice, ostavila da odstoji 3-5 min, a zatim ponovno resuspendirala. U epruvetu sam postavila mikroeprevetu (500 μ L) u koju sam skupila eluat iz kolonice centrifugiranjem 3 min pri 1500 x g. Eluat sam prije injektiranja u HPLC uređaj prebacila u mikroeprevetu s filterom 0,22 μ m te centrifugirala 15 min pri 17000 x g na temperaturi od 4 °C.

3.2.2. Priprema standardnih otopina

Za kreiranje kalibracijske krivulje pripremila sam standardne otopine početne koncentracije 1000 μ M. Prvo sam izvagala potrebnu masu svakog standarda u aluminijskom šeširiću za vaganje. Odvagu standarda otopila sam prvo u 100 μ L (zapremina šeširića) otapala preporučenog od strane proizvođača (Tablica 2), a zatim u deproteinizacijskoj otopini do konačnog volumena od 10 mL.

Tablica 2. Priprema otopina standarda serotonina (5-HT), dopamina (DA), noradrenalina (NA), adrenalina (A), triptofana (TRP), tirozina (TYR), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5HIAA), vanililmandelične kiseline (VMA), homovanilične kiseline (HVA), 5-hidroksil-L-triptofan hidrata (5-HTP), oktopamina (OA), 3,4-dihidroksi-L-fenilalanina (L-DOPA) i 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromida (DHBA).

standard	Mr (g/mol)	izvagana masa (mg)	konačni volumen (mL)	konačna koncentracija (μM)	otapalo (prema SDS)
5-HT	176,22	1,8	10	1000	0,5 M HCl
DA	189,64	1,9	10	1000	H ₂ O
NA	205,64	2,1	10	1000	0,5 M HCl
A	333,33	3,3	10	1000	H ₂ O
TRP	204,23	2,0	10	1000	0,5 M HCl
TYR	217,65	2,2	10	1000	0,5 M HCl
5HIAA	191,18	1,9	10	1000	70% EtOH
VMA	198,17	2,0	10	1000	H ₂ O
HVA	182,17	1,8	10	1000	70% EtOH
5-HTP	220,22	2,2	10	1000	0,5 M HCl
OA	189,64	1,9	10	1000	H ₂ O
L-DOPA	197,19	2,0	10	1000	0,5 M HCl
DHBA	220,06	2,2	10	1000	H ₂ O

3.2.3. Tekućinska kromatografija obrnutih faza (RP-HPLC)

Homogenizirane uzorke tkiva mozga i homogenata kapelske svijetlice analizirala sam tekućinskom kromatografijom obrnutih faza (RP-HPLC). Za identifikaciju analita u uzorcima koristila sam metodu dodavanja vanjskog standarda (engl. *spiking*) kako bih potvrdila prisutnost traženih

spojeva. Prilikom kvantifikacije katekolamina koristila sam metodu internog standarda gdje sam kao IS koristila DHBA. Postupak pročišćavanja SPE provela sam jednako za otopine standarda kao i za uzorke tkiva.

3.2.3.1. Razvoj metode RP-HPLC

Za razvoj metode RP-HPLC koristila sam smjese svih standarda kako bih odredila odnos između njihovih retencijskih vremena. Korištenu RP-HPLC metodu razvila sam i prilagodila prema Nikolic i sur. (2019), a kromatografski uvjeti korišteni za razdvajanje katekolamina iz otopina standarda, kao i iz uzoraka kapelske svjetlice prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Kromatografski uvjeti korišteni za RP-HPLC analizu uzoraka tkiva mozga i čitavog organizma kapelske svjetlice.

Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 150 mm x 4,6 mm)		
Pretkolona	Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 10 mm x 3,0-4,6 mm)		
Mobilna faza A	0,1% trifluoroctena kiselina (TFA); pH ≈ 2,0		
Mobilna faza B	100% acetonitril		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
	0	100	0
	12	92	8
Volumen injektiranja	100,0 µL		
Protok	1,0 mL/min		
Vrijeme analize	12 min		
Ekvilibracija kolone (post run)	1 min		
Detekcija (UV/Vis)	280 nm		
Temperatura kolone	22 °C		

3.2.3.2. Validacija metode

Kako bi se provjerila pouzdanost novorazvijene metode neophodno je provesti postupak validacije. Prilikom validacije analitičke metode obično se provjeravaju parametri selektivnosti, linearnosti, limita detekcije i kvantifikacije, preciznosti i ponovljivosti. Stoga sam nakon prilagodbe kromatografskih parametara provela validaciju metode HPLC određivanjem njihove selektivnosti, linearnosti i preciznosti pri čemu sam se vodila kriterijima International Conference on Harmonisation (ICH) Q2(R1) (2005).

3.2.3.2.1. Selektivnost

Selektivnost modificirane metode HPLC odredila sam dobrim razdvajanjem pikova na kromatogramima mješavine standardnih otopina DA, L-DOPA, NA i A uz korištenje internog standarda (DHBA). Također, kao pokazatelj dobre selektivnosti uzela sam i simetričnost pikova analita.

3.2.3.2.2. Linearnost

Linearnost metode određuje se analizom najmanje 5 različitih koncentracija standardnih otopina te se kreira kalibracijska krivulja ovisnosti površine o koncentraciji. Za svaki analit iz smjese standardnih otopina napravila sam kalibracijsku krivulju te sam linearnom metodom najmanjih kvadrata odredila nagib i presjek pravca kao i koeficijent korelacije.

3.2.3.2.3. Preciznost

Usporedbom rezultata analiziranih otopina standarada dobivenih između 3 različita dana mjerenja odredila sam preciznost metode. Mjeru preciznosti, odnosno postotak relativne standardne devijacije (engl. *relative standard deviation*, RSD), izračunala sam kao omjer standardne devijacije (σ) i aritmetičke sredine (\bar{x}), pomnožen sa 100.

Preciznost sam testirala propuštanjem iste smjese standarada tijekom 3 različita dana. Ovaj postupak ponovila sam za 7 međusobno različitih koncentracija analita (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μM), stoga je u rezultatima prikazan prosjek % RSD 7 smjesa različitih koncentracija. Što je % RSD manji, preciznost je bolja, a HPLC metode u pravilu imaju preciznost $\leq 5\%$.

3.2.4. Određivanje koncentracije katekolamina

Nakon provedene HPLC analize, kreirala sam kalibracijsku krivulju ovisnosti omjera visine pika analita u uzorku i visine pika IS o koncentraciji standardnih otopina. Zatim sam pomoću jednadžbe pravca određivala koncentracije katekolamina u uzorcima tkiva mozga špiljske i potodne populacije kapelske svijetlice kao i homogenatima čitavog organizma. Tako izračunate koncentracije pomnožila sam faktorom razrjeđenja kako bi se izračun odnosio na čitav uzorak. Koncentracije sam u konačnici normalizirala kao omjer pg katekolamina prema μg proteina.

3.2.4.1. Određivanje koncentracije proteina metodom BCA

Određivanje koncentracije proteina u uzorcima kapelske svijetlice provela sam upotrebom komercijalno dostupnog kompleta Pierce™ BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific 2020). Metoda se koristi svojstvima bicinkoninske kiseline (engl. *bicinchoninic acid*, BCA) za kolorimetrijsku detekciju i kvantitativno određivanje ukupnog broja proteina. Prvi korak u ovom testu je redukcija Cu^{2+} u Cu^{1+} proteinima u lužnatom mediju (biuretska reakcija). U drugom koraku ioni Cu^{1+} reagiraju sa specifičnim reagensom koji sadrži BCA i daju ljubičasto obojeni produkt. Ljubičasto obojenje produkta reakcije nastaje kao rezultat formiranja helata između iona bakra i dvije molekule BCA. Ovaj kompleks koji je topiv u vodi pokazuje snažnu apsorbciju pri 562 nm koja je gotovo linearna s povećanjem koncentracija proteina u širokom rasponu rada (20-2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.4.1.1. Priprema standarada i radnog reagensa

3.2.4.1.1.1. Priprema razrijeđenih standarada albumina iz goveđeg seruma (BSA)

Za određivanje koncentracije koristila sam standard albumina iz goveđeg seruma (BSA), pri čemu sam pripremila niz razrijeđenih otopina poznate koncentracije (Tablica 4). Kao početnu otopinu koristila sam 2 mg/mL otopinu BSA, a kao diluent deproteinizacijsku otopinu.

Tablica 4. Priprema otopina standarada.

otopina	volumen diluenta (μL)	volumen otopine potreban za dobivanje konačne koncentracije BSA (μL)	konačna koncentracija BSA (μg/mL)
A	0	300 (početne otopine BSA)	2000
B	125	375 (početne otopine BSA)	1500
C	325	325 (početne otopine BSA)	1000
D	175	175 (otopine B)	750
E	325	325 (otopine C)	500
F	325	325 (otopine E)	250
G	325	325 (otopine F)	125
H	400	100 (otopine G)	25
I	400	0	0 = slijepa proba

3.2.4.1.1.2. Priprema BCA radnog reagensa

Potrebno je izračunati potrebni volumen BCA radnog reagensa koji se dobije miješanjem BCA reagensa A s BCA reagensom B u omjeru 50:1. Ukupni volumen radnog reagensa računa se prema sljedećoj formuli:

$$(\text{broj standarada} + \text{broj uzoraka nepoznate koncentracije}) \times (\text{broj replika}) \times (\text{volumen radnog reagensa potreban za jedan uzorak})$$

U slučaju kada se BCA primjenjuje na mikrotitarske pločice, volumen radnog reagensa potreban za jedan uzorak je 200 μL.

3.2.4.1.2. Prostupak na mikrotitarskoj pločici

U sve jažice sam prvo dodala 200 μL prethodno pripremljenog radnog reagensa. Zatim sam dodala po 25 μL prethodno pripremljenih standarada i uzoraka homogeniziranog tkiva mozga te čitavog organizma kapelske svijetlice,. Pločicu sam kratko inkubirala na tresilici 30 sekundi. Nakon toga sam pločicu poklopila predviđenim poklopcem i stavila inkubirati 30 min na 37 °C. Kada se pločica ohladila na sobnu temperaturu, očitala sam vrijednosti apsorbancije pri 562 nm na SPECTROstar Nano čitaču mikrotitarskih pločica. Prilikom izračuna koncentracije od apsorbancija uzoraka oduzima se apsorbancija slijepe probe. Konstruirala sam baždarni pravac ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda ($\mu\text{g}/\text{mL}$), iz kojeg sam odredila koncentracije proteina u uzorcima pomoću očitanih apsorbancija.

3.2.5. Statistička obrada podataka

Statističku obradu podataka radila sam u programu GraphPad Prism 9. Vrijednosti katekolamina po proteinu ($\text{pg}/\mu\text{g}$) u mozgovima kapelske svijetlice špiljske (CF) i potočne (SF) populacije testirala sam za normalnost raspodjele Shapiro-Wilk testom. Kako analizirane skupine nisu zadovoljile kriterije normalne distribucije, koristila sam neparametrijski Mann-Whitney test. Utjecaj lokaliteta i eksperimentalnih uvjeta konstantnog mraka (DD) ili uvjeta dnevno-noćnih izmjena (LD) na koncentraciju katekolamina homogenata čitavog organizma kapelske svijetlice ispitala sam dvosmjernom analizom varijanci (2-way ANOVA) na log konvertiranim podacima. Stupanj značajnosti postavljen je na $p < 0,05$. Podaci su prikazani kao medijan s 95% interval pouzdanosti.

4. REZULTATI

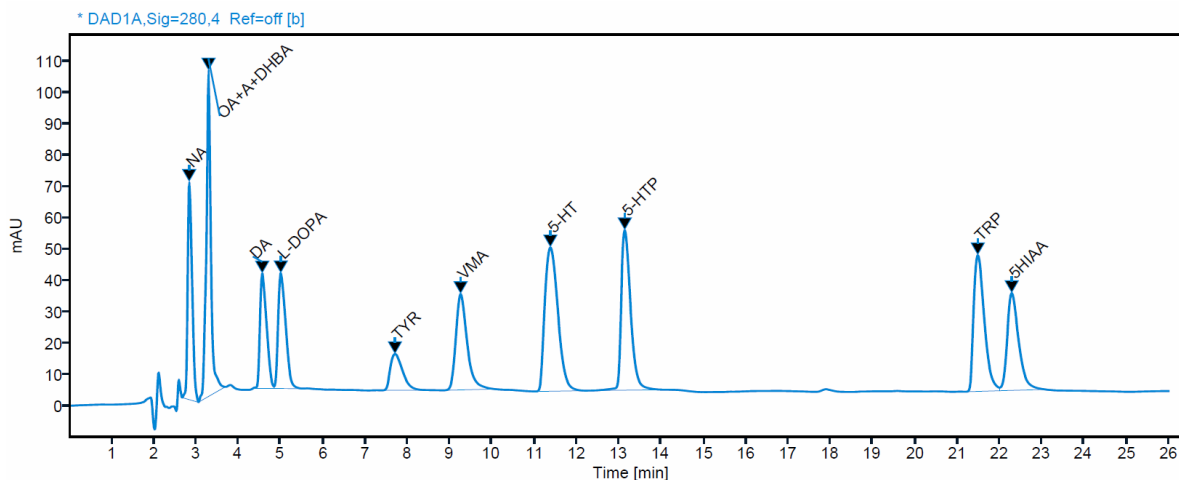
4.1. Razvoj kromatografske metode za razdvajanje katekolamina

Kao polaznu točku za razvoj kromatografske metode za razdvajanje katekolamina, njihovih prekursora i metabolita uzela sam literaturni izvor Nikolic i sur. (2019). Početni uvjeti u razvoju metode prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Kromatografski uvjeti prema Nikolic i sur. (2019).

Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5 μ m; 150 mm x 4,6 mm)		
Mobilna faza A	0,043% mravlja kiselina; pH 2,8		
Mobilna faza B	100% acetonitril		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
	0	98,0	2,0
	5	98,0	2,0
	15	90,0	10,0
	20	87,5	12,5
	21	98,0	2,0
	26	98,0	2,0
Volumen injektiranja	30,0 μ L		
Protok	0,7 mL/min		
Vrijeme analize	26 min		
Ekvilibracija kolone (post run)	1 min		
Detekcija (UV/ViS)	280 nm		
Temperatura kolone	sobna temperatura		

Kromatogram smjese standarada DA, NA, A, 5-HT, 5-HTP, TRP, TYR, VMA, 5HIAA, HVA, OA i L-DOPA (s konačnom koncentracijom svake komponente od 83,33 μM) testirane prema opisanoj metodi prikazan je na Slici 6. Na kromatogramu je vidljivo da su se OA, A i DHBA spojili u jedan pik, dok HVA nije prikazan na kromatogramu obzirom da pri ovim uvjetima ima retencijsko vrijeme dulje od trajanja analize.



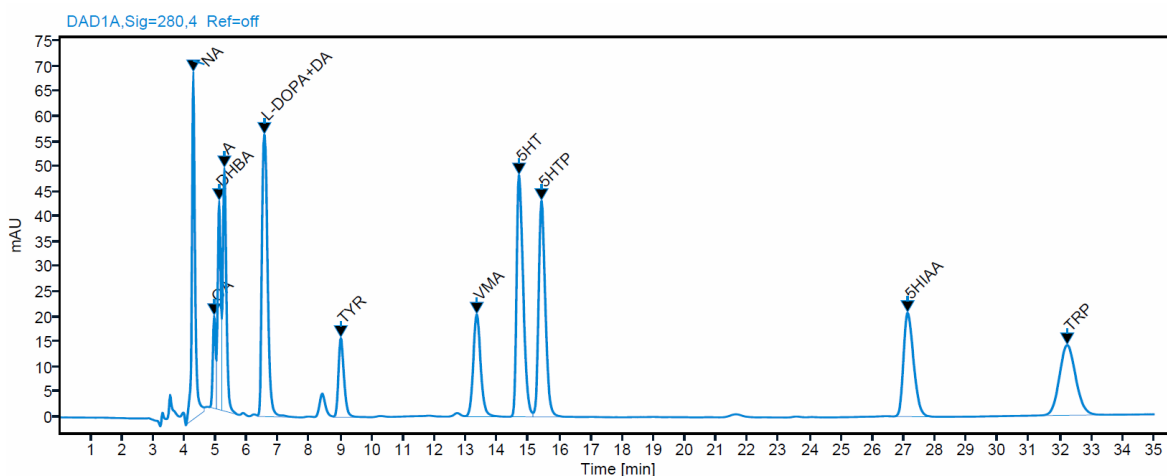
Slika 6. Kromatogram smjese standarada DA, NA, A, 5-HT, 5-HTP, TRP, TYR, VMA, 5HIAA, HVA, OA, L-DOPA i DHBA razdvojene prema početnoj metodi.

Budući da metoda nije optimalno razdvojila standarde u smjesi, modificirala sam kromatografske parametre poput sastava te udjela organske i vodene mobilne faze, pH mobilne faze, temperature kolone, protoka, volumena injektiranja uzorka koji su svi međusobno ovisni.

Također, isprobala sam analitičke kolone napunjene različitim stacionarnim fazama pa sam tako osim alkilne kolone (Kromasil 100-5-C18) koristila i fenilnu kolonu (ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl) obzirom da fenilne kolone mogu biti dobar izbor za korištenje 100% vodene mobilne faze (Long i sur. 2009). Međutim, tijekom daljnjeg modificiranja kromatografskih parametara (rezultati nisu prikazani u radu), alkilna kolona Kromasil 100-5-C18 pokazala se robusnijom te sam razvoj metode nastavila na njoj.

4.1.1. Promjena organske mobilne faze

Prilikom razvoja i optimiziranja HPLC metode, kao organska faza najčešće se koriste metanol, acetonitril i tetrahidrofuran (THF). Kako sam kao početnu organsku mobilnu fazu koristila 100% acetonitril, u svrhu boljeg razdvajanja analita odlučila sam testirati 100% metanol. Reprezentativni kromatogram prikazan je na Slici 7, a vidljivo je da dolazi do potpunog spajanja DA i L-DOPA dok HVA nije prikazan jer ima retencijsko vrijeme duže od trajanja analize.

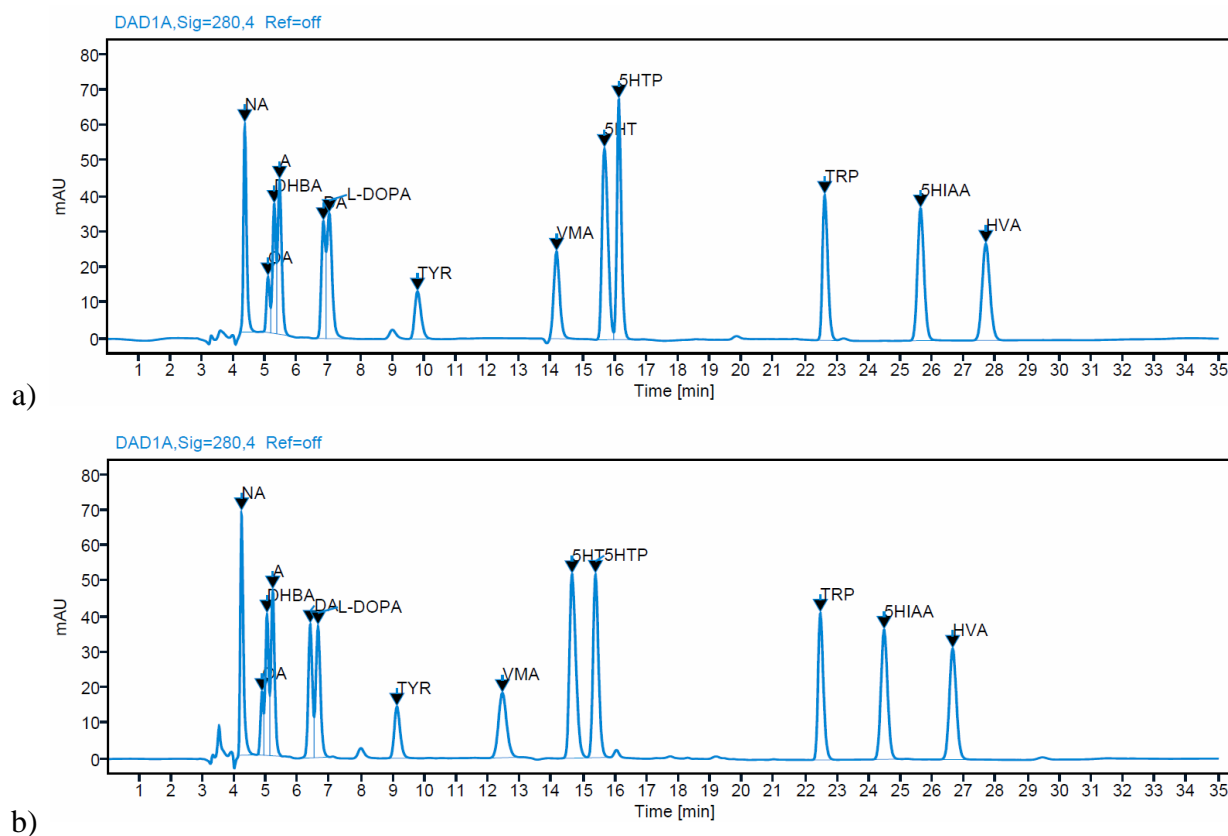


Slika 7. Kromatogram smjese standarada DA, NA, A, 5-HT, 5-HTP, TRP, TYR, VMA, 5HIAA, HVA, OA, L-DOPA i DHBA pri korištenju 100% metanola kao organske mobilne faze.

Budući da ova metoda nije zadovoljila kriterij selektivnosti, izabrala sam korištenje acetonitrila kao organske mobilne faze.

4.1.2. Promjena pH mobilne faze

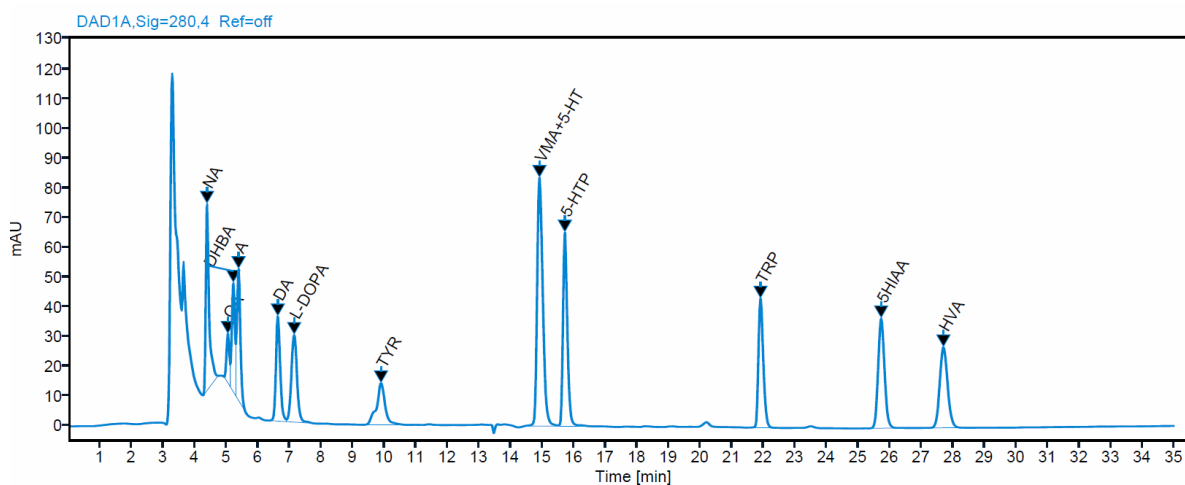
Kada uzorci sadrže ionizirajuće spojeve, pH mobilne faze može biti jedna od najvažnijih varijabli u kontroli zadržavanja u separaciji RP-HPLC. Budući da većina spojeva koje analizira RP-HPLC sadrži jednu ili više kiselih ili lužnatih funkcionalnih skupina, većina mobilnih faza zahtijeva kontrolu pH. Ako je pH mobilne faze blizu pKa vrijednosti analita, čak i male promjene pH mogu napraviti velike promjene u retenciji (Dolan 2012). To je prikazano na Slici 8 koja pokazuje izrazitu osjetljivost nekih spojeva na vrlo male promjene pH. Ovdje dolazi do promjene pH vrijednosti za samo 0,1 pH jedinice (Slika 8 a) pH 2,1; Slika 8 b) pH 2,0), pri čemu su svi ostali kromatografski parametri jednaki.



Slika 8. Kromatogrami smjese standarada DA, NA, A, 5-HT, 5-HTP, TRP, TYR, VMA, 5HIAA, HVA, OA, L-DOPA i DHBA: a) pri pH mobilne faze 2,1; b) pri pH mobilne faze 2,0.

4.1.3. Promjena vodene mobilne faze

Obzirom da se pH 2,0 pokazao kao bolji od pH 2,8; odlučila sam isprobati jaču kiselinu kao vodenu mobilnu fazu te sam koristila 0,1% fosfornu kiselinu (H_3PO_4), no to se nije pokazalo zadovoljavajućim kao što je vidljivo na kromatogramu (Slika 9).



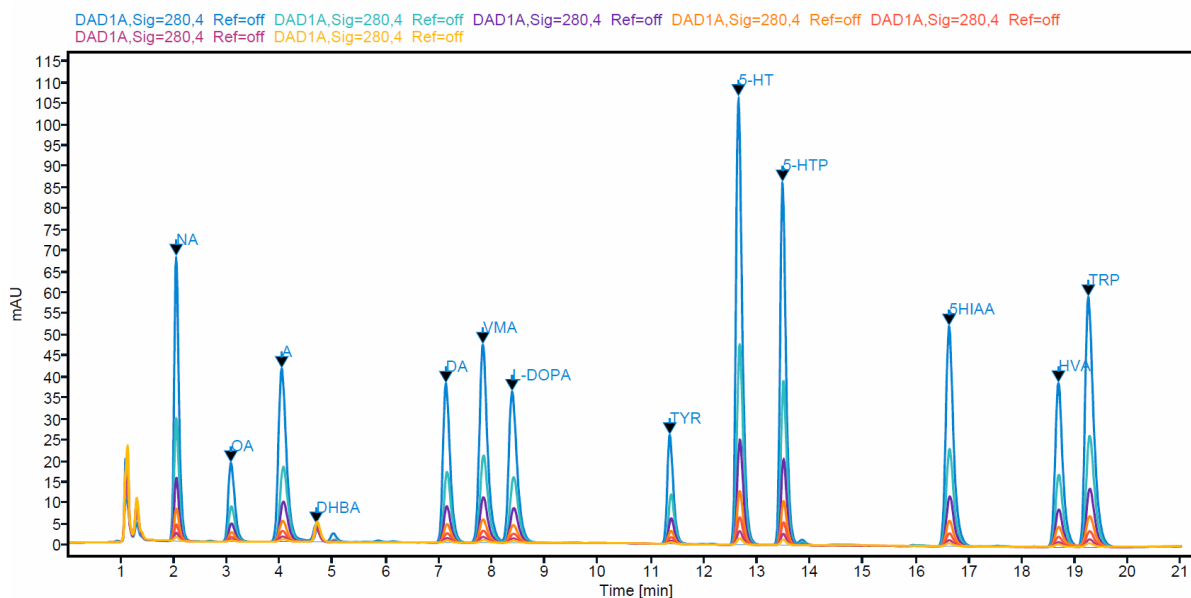
Slika 9. Kromatogram smjese standarada DA, NA, A, 5-HT, 5-HTP, TRP, TYR, VMA, 5HIAA, HVA, OA, L-DOPA i DHBA pri korištenju 0,1% H_3PO_4 kao vodene mobilne faze.

Zatim sam odlučila isprobati 0,1% trifluoroctenu kiselinu (TFA) što se pokazalo boljim te sam tome prilagodila ostale kromatografske parametre (gradijent, protok, vrijeme analize, volumen injektiranja, temperatura kolone).

Najbolje razdvajanje pokazala je metoda čiji su kromatografski parametri navedeni u Tablici 6, a preklopljeni kromatogrami smjese svih 12 standarada u 7 različitih koncentracija (1,30; 2,60; 5,21; 10,42; 20,83; 41,67 i 83,33 μM) uz dodatak IS prikazan je na Slici 10.

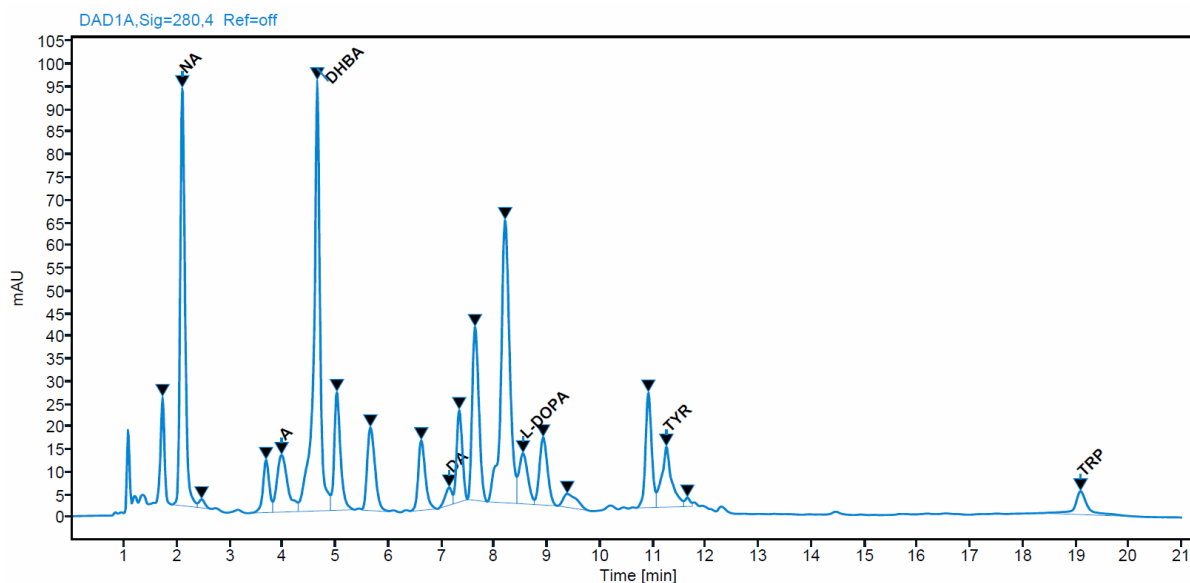
Tablica 6. Kromatografski uvjeti novorazvijene RP-HPLC metode za razdvajanje 12 analita uz dodatak IS.

Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5 μm ; 150 mm x 4,6 mm)		
Pretkolona	Kromasil 100-5-C18 (5 μm ; 10 mm x 3,0-4,6 mm)		
Mobilna faza A	0,1% trifluoroctena kiselina (TFA); pH \approx 2,0		
Mobilna faza B	100% acetonitril		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
	0	100	0
	8	97	3
	10	93	7
	17	86	14
	21	94	6
Volumen injektiranja	50,0 μL		
Protok	1,5 mL/min		
Vrijeme analize	21 min		
Ekvilibracija kolone (post run)	1 min		
Detekcija (UV/Vis)	280 nm		
Temperatura kolone	22 $^{\circ}\text{C}$		



Slika 10. Preklopljeni kromatogrami smjese standardnih otopina u 7 različitim koncentracija razdvojene prema RP-HPLC metodi za razdvajanje 12 analita uz dodatak IS (Tablica 6).

Iako je novorazvijena metoda RP-HPLC pokazala dobru selektivnost, linearnost i preciznost, kada sam na njoj analizirala homogenizirane uzorke kapelske svijetlice, kromatogrami nisu izgledali zadovoljavajuće. Primjer kromatograma prikazan je na Slici 11.

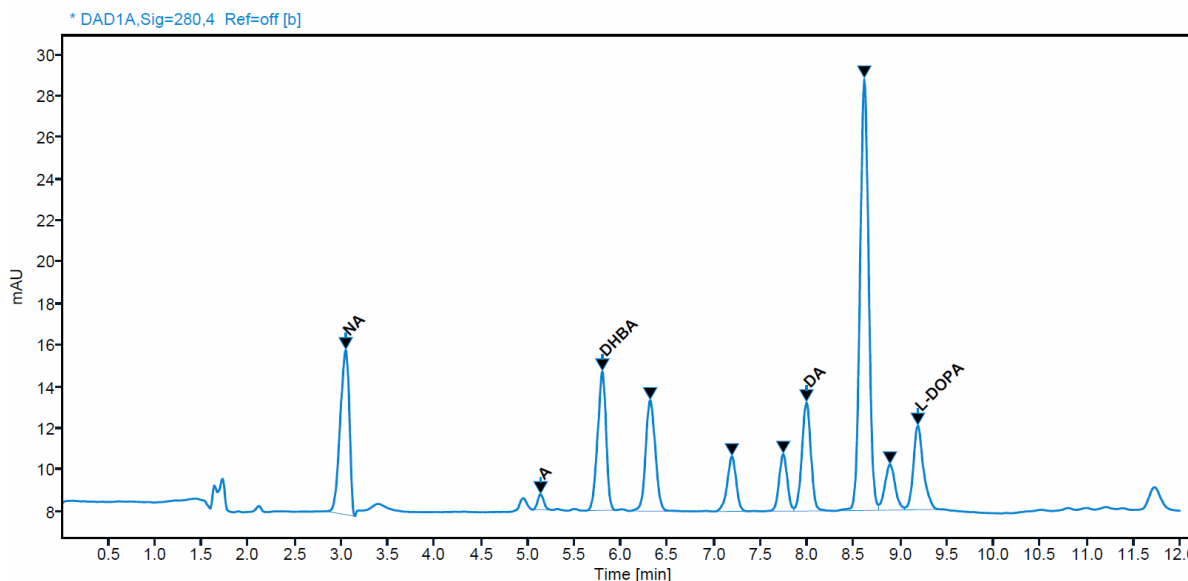


Slika 11. Kromatogram homogeniziranog uzorka čitavog organizma kapelske svijetlice analiziranog prema RP-HPLC metodi za razdvajanje 12 analita uz dodatak IS (Tablica 6).

Kako je biološki uzorak kompleksna matrica za analizu, bila je potrebna dodatna preanalitička obrada uzoraka. Stoga sam uzorke tkiva mozga i homogenata čitavog organizma prije HPLC analize dodatno pročistila pomoću prilagođene metode SPE.

4.1.4. Metoda prilagođena ekstrakciji katekolamina

Obzirom da alumina ekstrahira samo spojeve koji sadrže katekolnu skupinu (NA, A, DA i L-DOPA), bilo je potrebno skratiti vrijeme analize kao i dodatno prilagoditi metodu. U konačnici su se kromatografski uvjeti (Tablica 3) korišteni u ovom diplomskom radu pokazali kao zadovoljavajući jer su rezultirali boljim razlučivanjem pikova katekolamina u uzorcima kapelske svjetlice što je vidljivo na primjeru kromatograma na Slici 12.

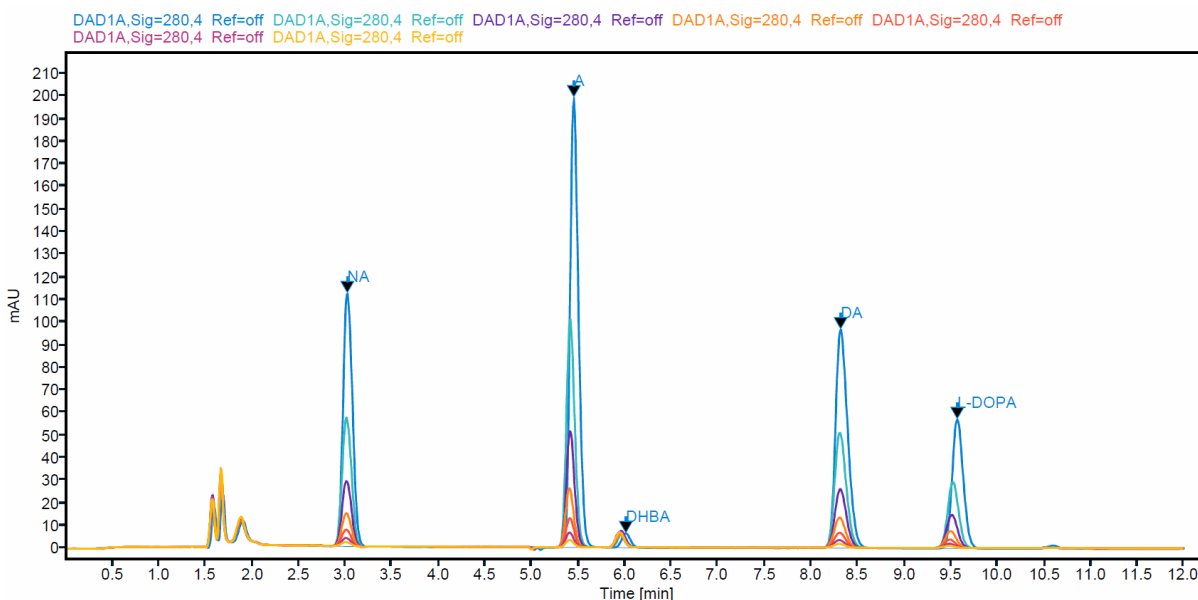


Slika 12. Kromatogram homogeniziranog uzorka čitavog organizma kapelske svjetlice pročišćenog pomoću prilagođene metode SPE, analiziranog prema RP-HPLC metodi (Tablica 3).

4.1.5. Validacija metode

4.1.5.1. Selektivnost

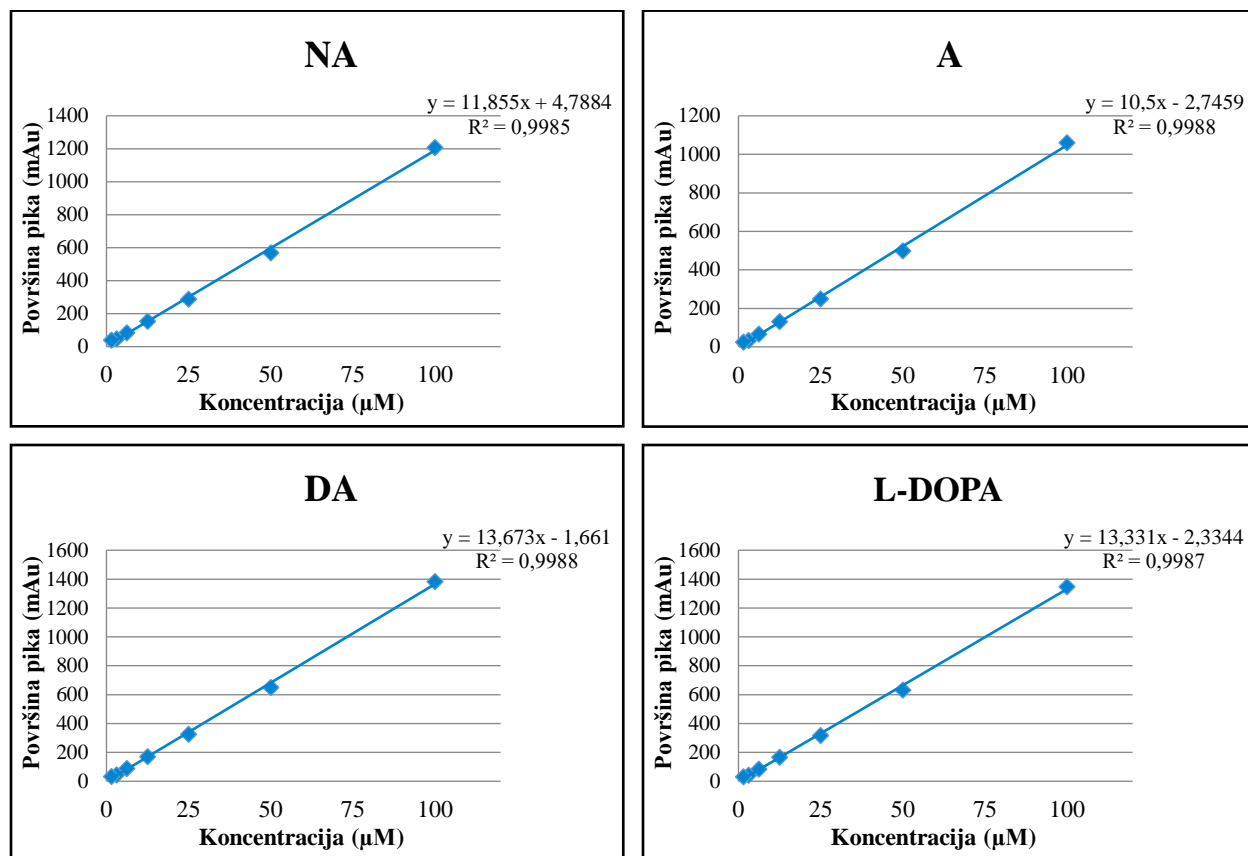
Dobro razlučivanje i simetrija pikova spojeva NA, A, DHBA, DA i L-DOPA u smjesi standardnih otopina ukazuje na zadovoljavajuću selektivnost metode. To je vidljivo i iz Slike 13 koja prikazuje preklapljene kromatograme smjesa 7 različitih koncentracija standardnih otopina NA, A, DA i L-DOPA uz dodatak IS (DHBA).



Slika 13. Preklapljeni kromatogrami standardnih otopina NA, A, DA i L-DOPA uz dodatak IS (DHBA) gdje su korištene koncentracije od 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μ M.

4.1.5.2. Linearnost

Podatke o linearnosti dobila sam pomoću kalibracijskih krivulja ovisnosti površine pika pojedinog analita o odgovarajućoj koncentraciji (Slika 14). Krivulje sam konstruirala tako da sam standardne otopine za svaki analit analizirala u triplicatima te se uzela srednju vrijednost površine pika za svaku koncentraciju. Koeficijent korelacije, nagib i presjek pravca odredila sam linearnom metodom najmanjih kvadrata. Budući da sve ispitivane komponente imaju vrijednosti $R^2 > 0,99$; kalibracijske krivulje prikazuju dobru linearnost metode za ispitane analite.



Slika 14. Kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti površine pika o koncentraciji standardnih otopina NA, A, DA i L-DOPA u koncentraciji od 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μM. Svaka od navedenih koncentracija analizirana je u triplikatu s % RSD ≤ 1 za A i DA te % RSD ≤ 4 za NA i L-DOPA.

4.1.5.3. Preciznost

Preciznost metode odredila sam pomoću uzastopne analize smjese standardnih otopina NA, A, DA i L-DOPA uz dodatak IS u različitim koncentracijama unutar između 3 različita dana. Rezultati preciznosti prikazani su u Tablici 7, a kako je % RSD svih standarada ≤ 5%, metoda pokazuje dobru preciznost.

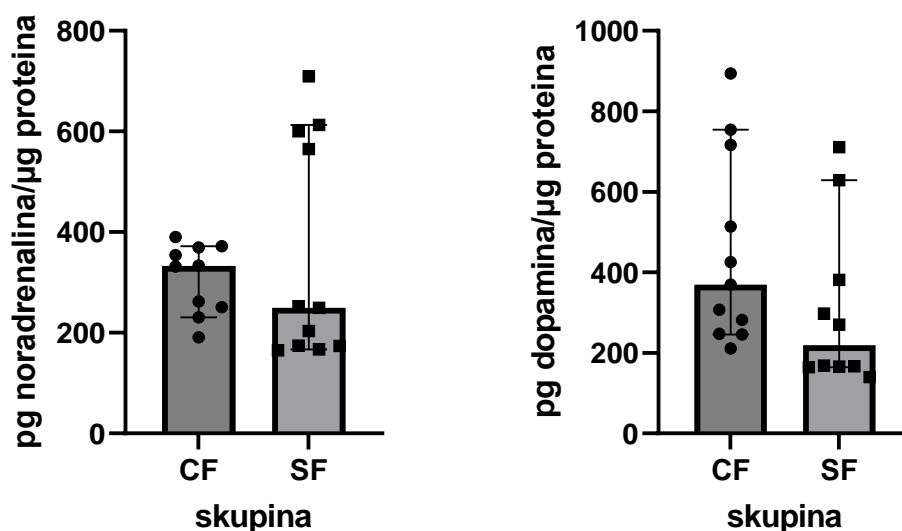
Tablica 7. Preciznost rezultata analize istih otopina standarada NA, A, DA i L-DOPA u koncentracijama od 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μM s dodatkom 10 μL IS ($c=100 \mu\text{M}$) metodom HPLC između 3 različita dana analize. Rezultat preciznosti izražen je kao prosjek postotaka relativne standardne devijacije (% RSD) za svih 7 koncentracija analita.

standard	% RSD između 3 različita dana
NA	2,26
A	0,73
DHBA (IS)	0,56
DA	0,63
L-DOPA	1,21

4.2. Koncentracije katekolamina u mozgu špiljske i potočne populacije

Izmjerila sam koncentracije katekolamina (NA, A i DA) u moždanom tkivu 11 jedinki kapelske svijetlice uzorkovanih u ponoru Sušik (špilja) i 11 jedinki u potoku Sušik. Međutim, zbog okolnih interferirajućih pikova u većini uzoraka špiljske (CF) i potočne populacije (SF) nije bilo moguće kvantificirati adrenalin pa sam ga izuzela iz statističke obrade podataka. Također, iz istog razloga nisam kvantificirala niti L-DOPA.

Iz grafičkog prikaza usporedbe koncentracija NA i DA između potočne i špiljske populacije kapelske svijetlice (Slika 15) mogli bismo zaključiti da špiljska populacija (CF) ima nešto više koncentracije NA i DA od potočne (SF). Ipak, neparametrijski Mann-Whitney test pokazao je da razine NA ($U=46$; $p=0,5573$) i DA ($U=29$; $p=0,0720$) u mozgu svijetlice ne pokazuju značajne razlike.

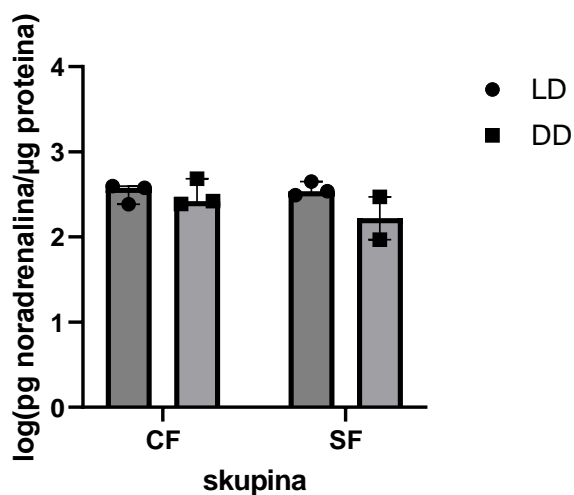


Slika 15. Grafički prikaz usporedbe koncentracija NA i DA između špiljske (CF) i potočne populacije (SF) kapelske svijetlice. Na grafu je prikazana vrijednost medijana i 95%-tni interval pouzdanosti.

4.3. Koncentracije katekolamina u eksperimentalnim uvjetima

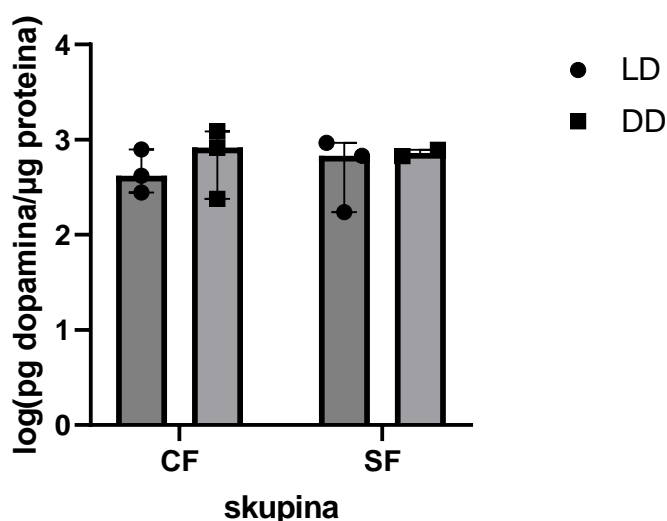
Kako bih utvrdila dolazi li do promjene u razinama katekolamina u eksperimentalnim uvjetima života u mraku (DD) u usporedbi s uvjetima normalnog dnevno-noćnog ritma (LD) te uzrokuju li spomenuti eksperimentalni uvjeti drugačije odgovore kod špiljske (CF) i potočne populacije (SF), analizirala sam po 3 jedinke iz svake od 4 grupe (LDCF, DDCF, LDSF, LDCF). Međutim, za jedan uzorak iz DDSF skupine nije bilo moguće izračunati koncentracije obzirom da je prilikom pročišćavanja postupkom SPE došlo do njegovog gubitka. Također, nije bilo moguće kvantificirati adrenalin i L-DOPA u većini uzoraka zbog okolnih interferirajućih pikova te sam ih izuzela iz statističke obrade podataka.

Iz Slike 16 vidljivo je da je srednja vrijednost NA u eksperimentalnim uvjetima u špiljskoj populaciji koja je bila izložena konstantnom mraku (DDCF) nešto malo niža od one u istoj populaciji koja je bila izložena izmjenama normalnog dnevno-noćnog ritma (LDCF), kao i u potočnoj populaciji koja je bila u konstantnoj tami (DDSF) u odnosu na istu populaciju izloženu izmjenama dnevnog svjetla i noćne tame (LDSF). Dvosmjerna analiza varijanci nije pokazala značajan utjecaj niti lokaliteta [$F_{(1, 7)}=1,205$; $p=0,3086$], niti eksperimentalnih uvjeta [$F_{(1, 7)}=2,778$; $p=0,1395$], niti njihove interakcije [$F_{(1, 7)}=2,156$; $p=0,1855$] na mjereni parametar.



Slika 16. Utjecaj lokaliteta (špilja – CF i potok – SF) i eksperimentalnih uvjeta konstantnog mraka (DD) ili uvjeta izmjene svjetla i tame (LD) na koncentraciju NA homogenata čitavog organizma kapelske svijetlice. Na grafu je prikazana vrijednost medijana i 95%-tni interval pouzdanosti.

Promatrajući Sliku 17 mogli bismo zaključiti da je razina DA u eksperimentalnim uvjetima u špiljskoj populaciji koja je izložena konstantnoj tami (DDCF) nešto viša od one špiljskoj populaciji koja je izložena izmjenama dnevno-noćnog ritma (LDCF) te da u potočnoj populaciji koja je bila u konstantnom mraku (DDSF) potencijalno dolazi do tendencije povećanja koncentracija DA u odnosu na potočnu populaciju izloženu izmjenama dnevnog svjetla i noćne tame (LDCF). Međutim, dvosmjerna analiza varijanci nije pokazala značajan utjecaj niti lokaliteta [$F_{(1,7)}=0,05638$; $p=0,9204$], niti eksperimentalnih uvjeta [$F_{(1,7)}=0,7051$; $p=0,4288$], niti njihove interakcije [$F_{(1,7)}=0,01072$; $p=0,9204$] na mjereni parametar.



Slika 17. Utjecaj lokaliteta (špilja – CF i potok – SF) i eksperimentalnih uvjeta konstantnog mraka (DD) ili uvjeta izmjene svjetla i tame (LD) na koncentraciju DA homogenata čitavog organizma kapelske svijetlice. Na grafu je prikazana vrijednost medijana i 95%-tni interval pouzdanosti.

5. RASPRAVA

5.1. Prilagodba i razvoj RP-HPLC metode

Jedan od ciljeva ovog diplomskog rada bio je razviti i validirati RP-HPLC metodu za određivanje razina monoamina tako da se može primijeniti na mozak i homogenat ribe.

Početni kromatografski uvjeti odabrani su prema Nikolic i sur. (2019), koji su koristili gradijentnu metodu elucije opisanu u Tablici 5, pri čemu su koristili 0,43% mravlju kiselinu (pH 2,8) kao mobilnu fazu A i 100% acetonitril kao mobilnu fazu B dok je volumen injektiranja bio 30 μ L, a protok 0,7 mL/min. Nakon pokušaja razdvajanja smjese standardnih otopina prema ovim kromatografskim uvjetima, kromatogram (Slika 6) nije pokazao zadovoljavajuće razdvajanje pikova analita što ukazuje na lošu selektivnost metode, ali uobičajena je posljedica korištenja različitih uređaja HPLC. Pikovi molekula OA, A i DHBA (IS) bili su spojeni, stoga je bilo potrebno modificirati RP-HPLC metodu razdvajanja.

Polarni spojevi, kao što su kiseline i lužine, općenito se teško odvajaju primjenom RP-HPLC metode (Long i sur. 2009). Svojstva kolone i uzoraka općenito dovode do preporuke za početak razvoja metode s mobilnom fazom u rasponu pH 2-3 (Dolan 2012), kao što su Nikolic i sur. (2019) učinili. Obično se radi s neioniziranim oblicima analita obzirom da su manje polarni i snažnije se zadržavaju u sustavu. Međutim, pri niskim pH vrijednostima spojevi lužnatog karaktera (kao što su katekolamini) su ionizirani, stoga će biti kraće zadržani na koloni, odnosno imat će manje retencijsko vrijeme (Dolan 2012). Također, kako je potrebno zadržati i razdvojiti polarne analite nepolarnom stacionarnom fazom, to često zahtijeva visoki udio vodene ili puferirane mobilne faze kako bi se postiglo željeno odvajanje. Kako je jedna od manje poznatih značajki ZORBAX fenilnih kolona njihova sposobnost rada uz korištenje 100% vodene mobilne faze (Long i sur. 2009), odlučila sam se za promjenu analitičke kolone. Međutim, iako su pikovi pokazali bolje razdvajanje, oštrinu i simetričnost na fenilnoj koloni, u konačnici se alkilna kolona Kromasil pokazala robusnijom te sam razvoj metode nastavila na njoj.

U svrhu boljeg odjeljivanja analita od interesa, mijenjala sam sastav mobilne faze. Kako se promjena organske mobilne faze iz 100% acetonitrila u 100% metanol nije pokazala dobrom, taj parametar više nisam prilagođavala. Međutim, daljnjim eksperimentom postiže se bolje

razdvajanje pri nižoj pH vrijednosti (2,0 umjesto 2,8) mobilne faze pri čemu su molekule s katekolnom skupinom i dalje pozitivno nabijene (Jung-Klawitter i Kuseyri Hübschmann 2019). Budući da jače kiseline 0,1% H₃PO₄ i 0,1% TFA imaju odgovarajuću pH vrijednost, odlučila sam se na promjenu sastava vodene mobilne faze. Pri tome se 0,1% TFA (pH 2,0) pokazala kao bolji izbor te ni taj parametar više nisam modificirala. Nadalje, osim sastava mobilne faze, na razdvajanje analita utječu odnos organske i vodene mobilne faze, ali i nagib gradijenta pa je prilagođavanje ovih parametara bio zahtjevan i dugotrajan proces.

Kako se pokazala potreba za dodatnom predanalitičkom obradom uzoraka, modificirala sam SPE protokol koji su koristili Ronca i sur. (2006) što se pokazalo vrlo važnim u uspostavi metode. U konačnici je gradijentan način elucije s postepenom promjenom udjela organske faze s 0 na 8% omogućio spojevima da postepeno eluiraju ovisno o njihovom polarnom karakteru. Nadalje, povećala sam i protok mobilne faze s 0,7 mL/min na brzinu od 1 mL/min te je nova gradijentna metoda (Tablica 3), omogućila razdvajanje pikova analita NA, A, DA i L-DOPA uz dodatak IS (DHBA). Najkraće retencijsko vrijeme imala je molekula NA (2,98 min), zatim A (5,35 min), DA (8,18 min) te L-DOPA (9,31 min). Ukupno vrijeme analize modificirane gradijentne HPLC metode iznosilo je 12 minuta. Nakon svakog injektiranja u program sam uključila i ekvilibraciju kolone (*post run*) početnim sastavom vodene mobilne faze u trajanju od 1 min prije injektiranja sljedećeg uzorka. U suprotnom bi zaostala količina acetonitrila uzrokovala neujednačeno i neponovljivo kromatografsko razdvajanje uz lošu simetriju kromatografskih pikova, stoga je dodavanje ovog koraka omogućilo ponovljivost metode.

Pouzdanost RP-HPLC metode utvrđena je validacijom metode, odnosno određivanjem selektivnosti, linearnosti i preciznosti. Svaki korak validacije proveden je na smjesi standardnih otopina DA, L-DOPA, NA i A uz dodatak DHBA kao IS.

Selektivnost je određena promatranjem dva susjedna kromatografska pika od interesa pri čemu je novorazvijena RP-HPLC metoda pokazala zadovoljavajuću selektivnost, što je vidljivo iz kromatograma (Slika 13) obzirom da su pikovi analita od interesa u potpunosti razdvojeni. Visoka simetrija promatranih pikova ukazuje na dobru kvantitativnu RP-HPLC metodu kojom se pouzdano može odrediti koncentracija pojedinog analita. Nadalje, trajanje analize (12 min) kraće je nego što je to kod Nikolic i sur. (2019) što je čini pogodnom za analizu velikog broja uzoraka.

Linearnost kromatografske metode određena je iz koncentracijskih krivulja ovisnosti površine pika o koncentraciji standarda. Koeficijent korelacije (R^2) bio je veći od 0,99 za sve analite od interesa, stoga je linearnost metode izrazito dobra, kao i kod Thomas i sur. (2015) te Nikolic i sur. (2019).

Preciznost metode prikazana je kao postotak relativne standardne devijacije. Vrijednosti % RSD između tri različita dana analize otopine standarda bile su u rasponu od 0,63% do 2,26%. Niske vrijednosti % RSD ukazuju na to da su uzastopnom analizom iste otopine standarda dobivene jednake vrijednosti površine pikova. Drugim riječima, dobivene vrijednosti % RSD ≤ 5 ukazuju na bolju preciznost i ponovljivost od metoda Thomas i sur. (2015) te Nikolic i sur. (2019), čije su vrijednosti % RSD ≤ 10 za iste analite.

5.2. Usporedba koncentracije katekolamina u mozgu špiljske i potočne populacije

Promjene u sustavu monoamina (katekolamina i serotonina) povezane su s evolucijom ponašanja, čemu u prilog idu povećane razine DA i NA u CF meksičke tetre (Bilandžija i sur. 2013, 2018; Elipot i sur. 2014). Kako je pokazano da katekolamini sudjeluju u evoluciji niza ponašanja CF meksičke tetre (Gallman i sur. 2020), u ovom istraživanju usporedila sam koncentracije NA i DA kod špiljske i potočne populacije kapelske svijetlice. Kapelske svijetlice u ponoru Sušik pokazuju brojne razlike u odnosu na potočnu populaciju kao što su svjetlija pigmentacija, manji promjer očiju, povećano nakupljanje masti (Bilandžija i sur. 2022), ali nisu potpuno adaptirane na špiljski način života kao što je to meksička tetra, što može imati dvostruko značenje: ili da su nedavno naselile špilju ili da je imigracija riba s površine u ponor velika. Proučavanje populacija životinja u kojima se promjene u ponašanju mogu povezati s ekologijom tih organizama ključno je za razumijevanje evolucije ponašanja. Iako su desetljeća istraživanja dokumentirala varijacije u ponašanju u prirodnim populacijama, neurološki i molekularni mehanizmi na kojima se temelji ta varijacija u ponašanju još uvijek su slabo istraženi. U svakom slučaju, prisutnost ancestralne površinske i odvedene špiljske populacije unutar iste vrste, moguća nedavna kolonizacija podzemlja i jasno definirani selekcijski pritisci u špilji čini kapelsku svijetlicu potencijalnim modelnim sustavom za razumijevanje inicijalnih koraka prilagodbe na špiljski način života i evolucije ponašanja. Razlike u razini dopamina između SF i CF izmjerene u ovom radu su tek indikativne ($p=0,0720$), što je vjerojatno rezultat malog broja uzoraka. Indikacija promjena u razinama katekolamina dolazi i iz rezultata sekvenciranja transkriptoma špiljske i potočne

populacije kapelske svjetlice gdje gen uključen u regulaciju transporta neurotransmitera ima značajno smanjenu ekspresiju u jedinkama iz špilje (nepublicirano). Također, zanimljivo je da su povišene koncentracije DA i NA u špiljskoj populaciji kapelske svjetlice u skladu s razinama katekolamina kod meksičke tetre. Naime, nekoliko špiljskih populacija meksičke tetre konvergentno je evoluiralo povišene koncentracije DA i NA u usporedbi s riječnim populacijama. Kod špiljskih populacija pokazano je da su povišene razine katekolamina odgovorne za niz adaptivnih etoloških promjena uključujući redukciju spavanja, rezistenciju na anestetike i slično (Bilandžija i sur. 2018; Duboué i sur. 2012).

5.3. Usporedba koncentracije katekolamina u eksperimentalnim uvjetima

Veliki problem u modernoj biologiji je razumijevanje načina na koji se organizmi u prirodi prilagođavaju na promijenjene okolišne uvjete. Kolonizacija podzemlja vrlo je drastična promjena okoliša gdje se organizmi iznenadno nađu u potpunoj tami i s limitiranim izvorima hrane. Tijekom kolonizacije podzemlja nastaje niz plastičnih promjena uključujući fiziološke, morfološke i bihevioralne koje omogućuju kolonizatorima prvo preživjeti, a na kraju i potpuno se prilagoditi novom okolišu (Bilandžija i sur. 2020).

Kako su promjene u neurotransmiterima kod meksičke tetre evoluirale preko fenotipske plastičnosti uslijed izlaganja SF uvjetima konstantnog mraka (Bilandžija i sur. 2020), u ovom istraživanju usporedila sam koncentracije NA i DA u potočnim jedinkama kapelske svjetlice izloženim uvjetima konstantnog mraka (DDSF). Također, usporedila sam i koncentracije ovih katekolamina u špiljskim jedinkama koje su bile izložene uvjetima izmjene svjetla i mraka (LDCF). Iako razlike između eksperimentalnih uvjeta i lokaliteta nisu bile statistički značajne, ipak postoji blagi trend povećanja razine DA izlaganjem potočnih jedinki kapelske svjetlice uvjetima konstantnog mraka (DDSF). Također, postoji trend smanjenja razine DA izlaganjem špiljskih jedinki uvjetima izmjene dnevnog svjetla i noćne tame (LDCF). Rezultati sekvenciranja transkriptoma (nepublicirano) ukazuju na promjene na neurokemijskoj razini kod špiljske i potočne populacije kapelskih svjetlica jer su geni uključeni u procese poput transporta neurotransmitera i signalnog puta dopaminergičnih receptora diferencijalno eksprimirani kod obje populacije držane u eksperimentalnim uvjetima konstantnog mraka, odnosno dnevno-noćne izmjene svjetla i mraka.

Čini se da bi promjene u neurotransmiterima mogle igrati značajnu ulogu već u inicijalnim koracima naseljavanja podzemlja i da bi, sukladno hipotezi, mogli utjecati na promjene ponašanja koje omogućuju preživljavanje kolonizatora u njima negostoljubivom okolišu. Treba naglasiti da osim kod modelnog organizma meksičke tetre, ne postoje druga istraživanja koja ispituju katekolaminski sustav iste vrste s dva vrlo različita fenotipska obilježja ovisno o staništu koje naseljavaju. Stoga je svakako potrebno povećanje broja analiziranih uzoraka kojima bismo dobili jasniju sliku o razinama katekolamina u ovoj vrsti.

6. ZAKLJUČAK

Razvijena RP-HPLC metoda za odvajanje katekolamina (NA, A, DA) u mozgu riba kao i homogenata čitavog organizma uspješno je razdvojila pikove svih analita. Metoda je validirana, a kriteriji selektivnosti, linearnosti i preciznosti ukazuju na uspješno razvijenu metodu čije su glavne prednosti kratko trajanje analize od samo 12 min, poboljšana ekstrakcija i veća specifičnost za katekolamine.

Koncentracije katekolamina (NA i DA) u mozgu špiljske i potočne populacije kapelske svijetlice nisu se statistički značajno razlikovale. Postoji indikacija povećanja koncentracije noradrenalina i dopamina u špiljskoj populaciji, potrebno je povećati broj ispitivanih jedinki kako bi se ustvrdilo postoje li zaista značajne razlike između koncentracija NA i DA špiljske te potočne populacije.

Nadalje, niti razine analiziranih katekolamina (NA i DA) kapelskih svijetlica držanih u eksperimentalnim uvjetima života u mraku, odnosno uvjetima dnevno-noćnog ritma nisu se statistički značajno razlikovale. Međutim, postoji trend povećanja koncentracije DA uslijed izlaganja potočne populacije konstantnoj tami (DDSF), odnosno smanjenja koncentracije DA uslijed izlaganja špiljske populacije izmjeni dnevnog svjetla i noćne tame (LDCF).

7. LITERATURA

- Amiri A., Baghayeri M., Karimabadi F., Ghaemi F., Maleki B. (2020): Graphene oxide/polydimethylsiloxane-coated stainless steel mesh for use in solid-phase extraction cartridges and extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Microchim. Acta* **187**: 213.
- Bilandžija H., Abraham L., Ma L., Renner K.J., Jeffery W.R. (2018): Behavioural changes controlled by catecholaminergic systems explain recurrent loss of pigmentation in cavefish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **285**: 1-10.
- Bilandžija H., Čupić M., Lukić M., Gračan R., Marčić Z. (2022): *Telestes karsticus* – a cave adapted fish in the Dinaric Karst. 3rd Dinaric Symp. Subterr. Biol. Abstr. B. 20.
- Bilandžija H., Hollifield B., Steck M., Meng G., Ng M., Koch A.D., Gračan R., Četković H., Porter M.L., Renner K.J., Jeffery W. (2020): Phenotypic plasticity as a mechanism of cave colonization and adaptation. *Elife* **9**: 1-27.
- Bilandžija H., Ma L., Parkhurst A., Jeffery W.R. (2013): A potential benefit of albinism in *Astyanax* cavefish: Downregulation of the *oca2* gene increases tyrosine and catecholamine levels as an alternative to melanin synthesis. *PLoS One* **8**: 1-14.
- Björklund A., Dunnett S.B. (2007): Fifty years of dopamine research. *Trends Neurosci.* **30**: 185-187.
- Blanco A., Blanco G. (2017): Amino Acid Metabolism. U: Blanco A., Blanco G. (ur.) *Med. Biochem.* Elsevier Inc. 367-399.
- Butorac V., Hanžek N. (2019): Istraživanja u ponoru Sušiku. *Speleolog* **67**: 8-21.
- Culver D.C., Pipan T. (2019). *The Biology of Caves and Other Subterranean Habitats*. Oxford Univ. Press Inc., New York.
- Čaleta M., Buj I., Mrakovčić M., Mustafić P., Zanella D., Marčić Z., Duplić A., Mihinjač T., Katavić I. (2015). *Hrvatske endemske ribe*. Agencija za zaštitu okoliša, Zagreb.

- Deslauriers J., Toth M., Zhou X., Risbrough V.B. (2019): Heritable differences in catecholamine signaling modulate susceptibility to trauma and response to methylphenidate treatment: Relevance for PTSD. *Front. Behav. Neurosci.* **13**: 1-13.
- Deutch A.Y. (2013): Neurotransmitters. U: Squire L., Berg D, Bloom F.E., Lac S., Ghosh A., Spitzer N.C. (ur.) *Fundam. Neurosci.* Fourth Ed. Elsevier Inc. 117-138.
- Dolan J. (2012): A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. [Www.Ace-Hplc.Com](http://www.Ace-Hplc.Com).
- Duboué E.R., Borowsky R.L., Keene A.C. (2012): B-Adrenergic Signaling Regulates Evolutionarily Derived Sleep Loss in the Mexican Cavefish. *Brain. Behav. Evol.* **80**: 233-243.
- Duboué E.R., Keene A.C., Borowsky R.L. (2011): Evolutionary convergence on sleep loss in cavefish populations. *Curr. Biol.* **21**: 671-676.
- Elipot Y., Hinaux H., Callebert J., Launay J.M., Blin M., Rétaux S. (2014): A mutation in the enzyme monoamine oxidase explains part of the *Astyanax* cavefish behavioural syndrome. *Nat. Commun.* **5**: 1-11.
- Elipot Y., Hinaux H., Callebert J., Rétaux S. (2013): Evolutionary shift from fighting to foraging in blind cavefish through changes in the serotonin network. *Curr. Biol.* **23**: 1-10.
- Fernandes C.S., Batalha M.A., Bichuette M.E. (2016): Does the cave environment reduce functional diversity? *PLoS One* **11**: 1-14.
- Fernstrom J.D., Fernstrom M.H. (2007): Tyrosine, Phenylalanine, and Catecholamine Synthesis and Function in the Brain. *J. Nutr.* **137**: 1539S-1547S.
- Gallman K., Fortune E., Rivera D., Soares D. (2020): Differences in behavior between surface and cave *Astyanax mexicanus* may be mediated by changes in catecholamine signaling. *J. Comp. Neurol.* **528**: 2639-2653.
- Gnegy M.E. (2012): Catecholamines. U: Brady S., Siegel G., Albers R.W., Price D.L. (ur.) *Basic Neurochem.* Eighth Ed. Elsevier Inc. 283-299.

- Howarth F.G. (1993): High-stress subterranean habitats and evolutionary change in cave-inhabiting arthropods. *Am. Nat.* **142**: 65-77.
- Hüppop K. (1987): Food-finding ability in cave fish (*Astyanax fasciatus*). *Int. J. Speleol.* **16**: 59-66.
- International Conference on Harmonisation (ICH) (2005): Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology Q2(R1). <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.
- Jaggard J., Robinson B.G., Stahl B.A., Oh I., Masek P., Yoshizawa M., Keene A.C. (2017): The lateral line confers evolutionarily derived sleep loss in the Mexican cavefish. *J. Exp. Biol.* **220**: 284-293.
- Jeffery W.R. (2005): Adaptive evolution of eye degeneration in the Mexican blind cavefish. *J. Hered.* **96**: 185-196.
- Jung-Klawitter S., Kuseyri Hübschmann O. (2019): Analysis of Catecholamines and Pterins in Inborn Errors of Monoamine Neurotransmitter Metabolism-From Past to Future. *Cells* **8**: 1-45.
- Keene A.C., Yoshizawa M., McGaugh S.E. (2015). *Biology and Evolution of the Mexican Cavefish*. Elsevier Inc.
- Ketmaier V., Bianco P.G., Cobolli M., Krivokapic M., Caniglia R., Matthaeis E. De (2004): Molecular phylogeny of two lineages of Leuciscinae cyprinids (Telestes and Scardinius) from the peri-Mediterranean area based on cytochrome b data. **32**: 1061-1071.
- Ketmaier V., Cobolli M., Matthaeis E. De, Bianco P.G. (1998): Allozymic variability and biogeographic relationships in two Leuciscus species complexes (Cyprinidae) from southern Europe , with the rehabilitation of the genus Telestes Bonaparte. *Ital. J. Zool.* **65**: 41-48.
- Kokel D., Bryan J., Laggner C., White R., Cheung C.Y.J., Mateus R., Healey D., Kim S., Werdich A.A., Haggarty S.J., MacRae C.A., Shoichet B., Peterson R.T. (2010): Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nat. Chem. Biol.* **6**: 231-237.

- Kokel D., Peterson R.T. (2011): Using the Zebrafish Photomotor Response for Psychotropic Drug Screening. *Methods Cell Biol.* **105**: 517-524.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Kottelat, Cornol & Freyhof Publ. Berlin.
- Kowalko J.E., Rohner N., Linden T.A., Rompani S.B., Warren W.C., Borowsky R., Tabin C.J., Jeffery W.R., Yoshizawa M. (2013): Convergence in feeding posture occurs through different genetic loci in independently evolved cave populations of *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 16933-16938.
- Lillesaar C. (2011): The serotonergic system in fish. *J. Chem. Neuroanat.* **41**: 294-308.
- Long W.J., Brooks A.E., Biazzo W. (2009): Analysis of Polar Compounds Using 100% Aqueous Mobile Phases with Agilent ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl and Other ZORBAX Phenyl Columns. *Agil. Technol. Publ.* **5990-3616E**: 1-8.
- Marčić Z., Abramović A., Čaleta M., Buj I., Zanella D., Horvatić S., Mustafić P. (2021): Early development of the endemic dace *Telestes karsticus* (Leuciscidae, Cypriniformes) in a Dinaric karst stream in Croatia. *J. Appl. Ichthyol.* **37**: 99-105.
- Marčić Z., Buj I., Duplić A., Čaleta M., Mustafić P., Zanella D., Zupančič P., Mrakovčić M. (2011): A new endemic cyprinid species from the Danube drainage. *J. Fish Biol.* **79**: 418-430.
- Marčić Z., Sučić I., Čaleta M., Buj I., Mustafić P., Zanella D. (2017): Seasonal profile of the diet of the dace *Telestes karsticus* Marčić & Mrakovčić, 2011 (Cyprinidae, Leuciscinae) endemic to Sušik Creek, Croatia. *J. Appl. Ichthyol.* **33**: 943-949.
- Maximino C., Herculano A.M. (2010): A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish* **7**: 359-378.
- Meyer V.R. (2004). *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons, Ltd.

- Nikolic B., Josic P., Buric D., Tkalec M., Lisicic D., Blazevic S.A., Hranilovic D. (2019): Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **205**: 451-456.
- Norton W., Bally-Cuif L. (2010): Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neurosci.* **11**: 1-11.
- O'Donnell J., Zeppenfeld D., McConnell E., Pena S., Nedergaard M. (2012): Norepinephrine: A neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance. *Neurochem. Res.* **37**: 2496-2512.
- Ouyang M., Hellman K., Abel T., Thomas S.A. (2004): Adrenergic signaling plays a critical role in the maintenance of waking and in the regulation of REM sleep. *J. Neurophysiol.* **92**: 2071-2082.
- Panula P., Chen Y.C., Priyadarshini M., Kudo H., Semenova S., Sundvik M., Sallinen V. (2010): The comparative neuroanatomy and neurochemistry of zebrafish CNS systems of relevance to human neuropsychiatric diseases. *Neurobiol. Dis.* **40**: 46-57.
- Pipan T., Culver D.C. (2012): Convergence and divergence in the subterranean realm: a reassessment. *Biol. J. Linn. Soc.* **107**: 1-14.
- Pottin K., Hyacinthe C., Rétaux S. (2010): Conservation, development, and function of a cement gland-like structure in the fish *Astyanax mexicanus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 17256-17261.
- Protas M.E., Hersey C., Kochanek D., Zhou Y., Wilkens H., Jeffery W.R., Zon L.I., Borowsky R., Tabin C.J. (2006): Genetic analysis of cavefish reveals molecular convergence in the evolution of albinism. *Nat. Genet.* **38**: 107-111.
- Romero A., Green S.M., Romero A., Lelonek M.M., Stropnický K.C. (2003): One Eye But No Vision: Cave Fish With Induced Eyes Do Not Respond to Light. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* **300**: 72-79.

- Ronca A.E., Abel R.A., Ronan P.J., Renner K.J., Alberts J.R. (2006): Effects of labor contractions on catecholamine release and breathing frequency in newborn rats. *Behav. Neurosci.* **120**(6): 1308-1314.
- Salin K., Voituron Y., Mourin J., Hervant F. (2010): Cave colonization without fasting capacities: An example with the fish *Astyanax fasciatus mexicanus*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **156**: 451-457.
- Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Crouch S.R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry, 9th ed.* Brooks/Cole, Belmont, CA.
- Stricker E.M., Zigmond M.J. (1984): Brain catecholamines and the central control of food intake. *Int. J. Obes.* **8 Suppl 1**: 39-50.
- ThermoFisher Scientific (2020). *Pierce BCA Protein Assay Kit User Guide*. 1-4.
- Thomas J., Khanam R., Vohora D. (2015): A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharm. Biol.* **53**: 1539-1544.
- Windsor S., Paris J., Perera T.B. de (2011): No role for direct touch using the pectoral fins, as an information gathering strategy in a blind fish. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **197**: 321-327.
- Windsor S.P., Norris S.E., Cameron S.M., Mallinson G.D., Montgomery J.C. (2010a): The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part I: Open water and heading towards a wall. *J. Exp. Biol.* **213**: 3819-3831.
- Windsor S.P., Norris S.E., Cameron S.M., Mallinson G.D., Montgomery J.C. (2010b): The flow fields involved in hydrodynamic imaging by blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). Part II: Gliding parallel to a wall. *J. Exp. Biol.* **213**: 3832-3842.
- Windsor S.P., Tan D., Montgomery J.C. (2008): Swimming kinematics and hydrodynamic imaging in the blind Mexican cave fish (*Astyanax fasciatus*). *J. Exp. Biol.* **211**: 2950-2959.

- Yamamoto K., Ruuskanen J.O., Wullimann M.F., Vernier P. (2010): Two tyrosine hydroxylase genes in vertebrates. New dopaminergic territories revealed in the zebrafish brain. *Mol. Cell. Neurosci.* **43**: 394-402.
- Yamamoto K., Ruuskanen J.O., Wullimann M.F., Vernier P. (2011): Differential expression of dopaminergic cell markers in the adult zebrafish forebrain. *J. Comp. Neurol.* **519**: 576-598.
- Yamamoto K., Vernier P. (2011): The evolution of dopamine systems in chordates. *Front. Neuroanat.* **5**: 1-21.
- Yoshizawa M., Gorički Š., Soares D., Jeffery W.R. (2010): Evolution of a behavioral shift mediated by superficial neuromasts helps cavefish find food in darkness. *Curr. Biol.* **20**: 1631-1636.

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu, a osnovnu i srednju školu (program opća gimnazija) završila sam u Grubišnom Polju. Preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2015. godine, a završila 2019. godine te sam stekla akademsko zvanje sveučilišnog prvostupnika (univ. bacc). Te iste godine upisala sam diplomski studij Ekologija i zaštita prirode, modul Kopnene vode na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Tijekom studija na PMF-u u Zagrebu sudjelovala sam na VII. Tjednu botaničkih vrtova, arboretuma i botaničkih zbirki 2017. godine kao jedan od voditelja zoologijske radionice za školsku djecu „Što se to u vodi krije, a riba nije?“. Također, dvije godine (2018. i 2019.) sudjelovala sam na manifestaciji Dan i noć na PMF-u u sklopu Otvorenog dana kemije demonstrirajući pokuse za školsku djecu i vodeći radionicu iz anorganske kemije „Kučaj, melji, tresi“. Aktivno sam predstavljala Biološki odsjek Prirodoslovno-matematičkog fakulteta na Smotri Sveučilišta 2018. i 2019. godine. Dio rezultata ovog diplomskog rada predstavljen je u obliku posterskog priopćenja na međunarodnoj znanstvenoj konferenciji FENS Forum 2022 u Parizu od 9. do 13.7.2022. godine čija se referenca nalazi u nastavku.

- Šikić, Dunja; Matković, Matea; Gojak, Tomislav; Malev, Olga; Blažević, Sofia Ana **Development of a HPLC-UV-FLD method for monoamine determination in lizard brain tissue samples** // FENS Forum 2022 : E-Book of Abstracts. Pariz: Federation of European Neuroscience Societies, 2022. str. 6249-6249 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni)

Tijekom preddiplomskog studija obavljala sam Laboratorijsku stručnu praksu (u trajanju od jednog semestra) na Zoologijskom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na kojoj sam se pobliže upoznala sa znanstvenim radom, pogotovo radom s uzorcima makrozoobentosa.

Aktivno se koristim engleskim jezikom u govoru i pismu te posjedujem osnovno poznavanje njemačkog jezika. Također, posjedujem znanje u korištenju Microsoft Office programa te posjedujem osnovno poznavanje ArcGIS i QGIS programa.