



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Matea Brižić

PERIFERNI SEROTONIN U SIMPATRIJSKIH
POPULACIJA *PODARCIS SICULUS* I
PODARCIS MELISELLENSIS

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Matea Brižić

PERIPHERAL SEROTONIN IN SYMPATRIC
POPULATIONS OF *PODARCIS SICULUS* I
PODARCIS MELISELLENSIS

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025.

Ovaj doktorski rad je izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Sofije Ane Blažević u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je napravljen u okviru znanstveno-istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost „Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja u koegzistirajućim populacijama guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR)“ voditeljice izv. prof. dr. sc. Sofije Ane Blažević (HRZZ-UIP-2019-04-8469).

INFORMACIJE O MENTORU

Izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, rođena 30.05.1983. u Buenos Airesu gdje je pohađala osnovnu školu, koju je završila u Puerto Rico kao i srednju školu Baldwin School of Puerto Rico. Studij Biologije je započela 2001. na Sveučilištu u Navarri, Pamplona, Španjolska. U Hrvatsku se doselila 2003. te na Sveučilištu u Zagrebu završava studij molekularne biologije. Diplomski rad izradila je pod vodstvom dr. sc. Sonje Levanat u Laboratoriju za nasljedni rak, Zavoda za molekularnu medicinu Instituta Ruđer Bošković. Godine 2012., magistrirala je Bioetiku na Sveučilištu u Navarri, Španjolska. Godine 2013. doktorirala je na Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović s radom pod naslovom „*Utjecaj perinatalne primjene prekursora sinteze ili inhibitora razgradnje serotoninina na serotoninisku homeostazu u odraslih štakora*“.

Od siječnja 2008. godine zaposlena je u Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu prvo kao znanstvena novakinja-asistent, zatim kao poslijedoktorandica i docent, a od 2024. kao izvanredni profesor.

Istražuje monoaminergičke sustave (osobito serotonin i dopamin) i njihovu ulogu u oblikovanju razvoja, ponašanja i fiziologije. Kombinira neurokemijske i bihevioralne pristupe s epigenetičkim analizama gena uključenih u serotoniniski i glukokortikoidni sustav kako bi razjasnila utjecaj okolišnih čimbenika, razvojnih faza i ekološkog konteksta na neurobiološke i stresne odgovore. U svom radu koristi komparativne modele – guštere roda *Podarcis* za neuroetološka i invazijska istraživanja te štakore i ljudske populacije za translacijska i epigenetička istraživanja. Intenzivno surađuje s istraživačima iz Hrvatske i inozemstva: s Farmaceutsko-biokemijskim i Veterinarskim fakultetom, Institutom za antropologiju, Institutom Ruđer Boškovićem, Hrvatskim institutom za istraživanje mozga, Sveučilištem u Buenos Airesu te Ludwig-Maximilian sveučilištem u Münchenu.

Vodila je Uspostavni istraživački projekt Hrvatske zaklade za znanost „Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*“ i stručni projekt „Provedba i unapređenje stručne prakse na PMF-u - ProSPer PMF“ kojem je uspostavljen Karijerni centar PMFa te manifestaciju *WorkIn' Science*. Pokrenula je i održava tečaj LabAnim za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama.

Koautorica je 23 znanstvena rada u časopisima indeksiranim u bazi Web of Science, a rezultate svojih istraživanja prezentirala je na brojnim međunarodnim kongresima te bila mentor više završnih, diplomskih i doktorskih radova.

Zahvale

Ovaj rad ne bi bio moguć bez onih koji su me pratili, nadahnjivali i nosili na ovom putu.

Prvo, iskreno i najveće hvala mojoj mentorici i prijateljici **izv. prof. dr. sc. Sofiji Ani Blažević**, koja je svojim znanjem, strpljenjem i ljudskošću bila više od mentorice i voditeljice projekta – bila je moj oslonac, savjetnica, iskreni suputnik kroz svaku dvojbu i svaku misao i u istraživanju i u životu. Bez tebe vjerojatno ne bih ni krenula na ovaj put, a sasvim sigurno ga bez tebe ne bih ni završila.

Zahvaljujem **izv. prof. dr. sc. Romani Gračan** na nesebičnoj pomoći, korisnim savjetima i podršci tijekom izrade ove disertacije. Zahvaljujem **prof. dr. sc. Nadi Oršolić**, koja mi je od studentskih dana bila pravi znanstveni putokaz. Imala sam privilegiju biti njena asistentica, a tijekom cijelog poslijediplomskog studija bila mi je dragocjen savjetodavac i poticaj. Zahvaljujem i **prof. dr. sc. Srebreni Nejedli** na pomoći u počecima razvoja ideje za ovu disertaciju te stručnim savjetima prilikom žrtvovanja životinja.

Hvala istraživačkoj **BOLDeR** ekipi –**Duji, Dunji, Tomislavu, Rafaeli, Barbari, Silvestru, Marku, Mateji, Sari.....** na zajedničkom traženju odgovora, izazovima, suradnji i profesionalnoj podršci koja je obogatila ovaj rad. Hvala **Sanji i Jacqueline** što su uvijek bile profesionalne, brze i dobre volje. Uz vašu pomoć sve administrativne obveze u referadi poslijediplomskog studija bile su puno jednostavnije.

Velika zahvalnost pripada i **mojoj “maloj” obitelji – tati, mami, Ivanu, Ani, Luki, Bruni, Eni, Lovri, Noi i onoj “velikoj” obitelji....**, čijoj sam ljubavi, potpori i snazi kroz godine dugovala svoj kontinuitet i mir. Znam da vam je dosta mojeg studiranja. Neću više - bar ne službeno s indeksom.

Hvala **prijateljima** koji su me kroz sve ovo pratili – smijehom, šutnjom i pravim riječima u pravom trenutku. Posebno onima koji su me u zadnjim mjesecima gurali naprijed rečenicom: “Ajde piši, još malo – gotovo.”

Hvala **bivšim i sadašnjim kolegama, ekipi iz Ratne škole** zbog koje sam imala pauzu od doktorata, te **operativcima** iz kriza i stožera s kojima sam dijelila mnoge borbe – zbog vas je i ova borba izgledala lakša.

Zahvaljujem i svim mojim **profesorima i učiteljima** koji su me tijekom obrazovanja oblikovali, a osobito oni koji su me mentorirali, s kojima sam kroz radove učila što znači istraživati, pisati i ostati vjeran istini – akademiku P. Rudan, prof. dr. sc. D. Hranilović, prof. dr. sc. Đ. Horvat, general pukovniku D. Repinc, brigadiru M. Kožić. Svima koji ovo čitaju, a da su na bilo koji način doprinijeli završetku ovoga rada – od srca hvala.

Onima koji su bili moja luka u krizama.

Onima koji su uvijek bili moje sidro u olujama.

Onima koji su bili moja krila u borbama.

Bili ste vjera, ufanje i ljubav u mojim sumnjama.

“A sada ostaje vjera, nada i ljubav – to troje –

a najveća među njima je ljubav.”

Kor 1, 13

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

PERIFERNI SEROTONIN KOD SIMPATRIJSKIH POPULACIJA *PODARCIS*
SICULUS I *PODARCIS MELISELLENSIS*

MATEA BRIŽIĆ, mag. biol. exp.

Serotonin (5HT) je biološki aktivan monoamin s ključnim ulogama u fiziologiji kralježnjaka. Kod amniota, 5HT ima značajne funkcije u mozgu kao neurotransmiter te u periferiji, gdje ima niz uloga u gastrointestinalnom, mišićnom, dišnom i reproduktivnom sustavu o čemu se malo zna. Cilj ovog rada bio je istražiti perifernu homeostazu serotonina na biokemijskoj i histološkoj razini kod guštera *P. siculus* i *P. melisellensis*, u kojih su prethodno već zabilježene razlike u ponašanju pod serotoninergičnom kontrolom. Rezultati pokazuju da *P. melisellensis* ima više razine perifernog 5HT od *P. siculus*, iako razine triptofana nisu različite. Uočene su i međuvrsne i međuspolne razlike u debljini slojeva crijeva, pri čemu *P. siculus* ima deblje slojeve, a mužjaci u obje vrste veće vrijednosti od ženki. Broj enterokromafinih stanica nije se razlikovao među skupinama. Ovi nalazi sugeriraju da razlike u perifernom serotoninu proizlaze iz fizioloških mehanizama te da bi mogle biti povezane s ponašanjem i ekološkom prilagodbom vrsta.

110 stranica, 147 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: serotonin, triptofan, simpatrijske populacije, *P. siculus*, *P. mellisellensis*

Mentor: izv.prof.dr.sc. Sofia Ana Blažević

Ocjenjivači:

1. Prof. dr. sc. Srebrenka Nejedi
2. Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić
3. Doc. dr. sc. Ante Vučemilović

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

PERIPHERAL SEROTONIN IN SYMPATRIC POPULATIONS OF *PODARSIC SICULUS*
AND *PODARCIS MELISELLENSIS*

Matea Brižić, mag. biol. exp.

Serotonin (5HT) is a biologically active monoamine with key roles in vertebrate physiology. In amniotes, 5HT has significant functions in the brain as a neurotransmitter and in the periphery, where it plays various roles in the gastrointestinal, muscular, respiratory, and reproductive systems, although these roles are still not well understood. The aim of this study was to investigate peripheral serotonin homeostasis at the biochemical and histological levels in the lizards *P. siculus* and *P. melisellensis*, in which behavioral differences under serotonergic control had been recorded previously. The results show that *P. melisellensis* has higher levels of peripheral 5HT compared to *P. siculus*, although Tryptophan levels do not differ. Inter-species and inter-sex differences were also observed in the thickness of intestinal layers, with *P. siculus* having thicker layers, and males in both species showing higher values than females. The number of enterochromaffin cells did not differ between the groups. These findings suggest that differences in peripheral serotonin arise from physiological mechanisms and may be linked to behavior and ecological adaptation of the species.

110 pages, 147 references, original in: Croatian

Keywords: serotonin, tryptophan, sympatric populations, *P. siculus*, *P. mellisellensis*

Supervisor: Assoc. Prof. Sofia Ana Blažević, Ph.D.

Reviewers:

1. Prof. Srebrenka Nejekl, Ph.D.
2. Assoc. Prof. Duj Lisičić, Ph.D.
3. Asst. Prof. Ante Vučemilović, Ph.D.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI PREGLED	2
2.1. Serotonin	2
2.2. Metabolizam serotonina	3
2.2.2. Pohrana i otpuštanje serotonina.....	6
2.2.3. Razgradnja serotonina	7
2.3. Serotoninski odjelci u organizmu.....	8
2.3.1. Serotonin u središnjem živčanom sustavu	9
2.3.2. Serotonin na periferiji.....	10
2.4. Gmazovi	13
2.4.1. Primorska gušterica (<i>Podarcis siculus</i> ; Rafinesque-Schmaltz, 1810.)	14
2.4.2. Krška gušterica (<i>Podarcis melisellensis</i> ; Braun, 1877.)	16
2.4.3. Kompetitivna interakcija guštera <i>Podarcis siculus</i> i <i>Podarcis melisellensis</i> na istočnoj obali Jadrana	18
2.5. Morfologija i histologija probavnog sustava guštera	19
2.5.1. Morfologija i histologija probavne cijevi guštera <i>Podarcis</i>	22
2.6. Krv guštera	24
2.7. Serotonin kod gmazova	24
3. MATERIJALI I METODE	26
3.1. Životinje	26
3.2. Žrtvovanje – prikupljanje uzoraka seruma i probavnih organa.....	28
3.3. Kemikalije i pribor	31
3.3.1. Kemikalije potrebne za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).....	31
3.3.2. Tehnička pomagala i pribor za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC).....	31
3.3.3. Kemikalije i pribor korišteni za analizu proteina	32
3.3.4. Kemikalije korištene za fiksaciju i čuvanje tkiva.....	32
3.3.5. Kemikalije i pribor potrebni za histološku obradu tankog crijeva	32
3.3.5.1. Kemikalije korištene za uklop tkiva.....	32
3.3.5.2. Kemikalije korištene za bojanje tkiva	32
3.3.5.3. Pribor korišten za histološku obradu uzorka tankog crijeva	33
3.4. Metode.....	34

3.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	34
3.4.1.1. Priprema standardnih otopina.....	36
3.4.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće.....	36
3.4.1.3. Metoda za kvantifikaciju 5HT i Trp tekućinskom kromatografijom	37
3.4.2. Analiza proteina	42
3.4.3. Histomorfometrijska analiza probavnog sustava	44
3.4.3.1. Dehidracija, uklapanje i rezanje tkiva	44
3.4.3.2. Bojanje	47
3.4.3.3. Histomorfometrija	52
3.4.4. Statistička obrada podataka	54
4. REZULTATI.....	56
4.1. Morfometrija	56
4.1.1. Masa i duljina tijela guštera	56
4.1.2. Duljina probavila i crijeva.....	60
4.1.3. Zihlerov indeks.....	63
4.2. Razina serotonina i triptofana u serumu.....	65
4.3. Histomorfometrija tankog crijeva	68
4.3.1. Kvantitativna analiza sluznice i mišićnog sloja tankog crijeva.....	68
4.3.2. Kvantifikacija enterokromafinih stanica u tankom crijevu	72
4.4. Korelacije	73
5. RASPRAVA.....	77
5.1. Međuvrsne razlike	78
5.1.1. Morfometrijske razlike između vrsta <i>P. siculus</i> i <i>P. melisellensis</i>	78
5.1.2. Razlike među vrstama u razinama perifernog serotonina	80
5.1.3. Razlike među vrstama u histomorfometriji crijeva	83
5.2. Međuspolne razlike	84
5.2.1. Spolne razlike u građi crijeva	84
5.2.2. Spolne razlike u perifernom serotoninu	85
5.2.3. Spolne razlike u histomorfometriji crijeva.....	85
5.3. Povezanost perifernog serotonina i histoloških parametara	86
5.4. Veza perifernog serotonina i ponašanja	87
5.5. Kritički osvrt na pouzdanost i ograničenosti istraživanja	88
6. ZAKLJUČAK	89
7. POPIS LITERATURE	91

8. PRILOZI.....	105
Prilog 1. Rješenje Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja Republike Hrvatske (KLASA: UPI/I-612-07/21-48/202;URBROJ 517-10-1-1-21-4).....	105
Prilog 2. Mišljenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja	106
(KLASA: 643-02/2 4-01/1; URBROJ 251-58-10617-24-335)	106
Prilog 3. Linearnosti kalibracijskih krivulja serotonina	107
Prilog 4. Linearnosti kalibracijskih krivulja triptofana	109
Prilog 5. Usporedba prema vrsti, spolu i lokaciji	111
5.1. Serotonin i triptofan	111
5.2. Sluznica i mišićni sloj tankog crijeva.....	112
5.3. Broj entrokromafinih stanica.....	113
Životopis.....	114

POPIS SKRAĆENICA

5HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina (engl. <i>5-hidroxyindoleacetic acid</i>)
5HT	5-hidroksitriptamin
5HTP	5-hidroksitriptofan
5HTt	5-hidroksitriptaminski prijenosnik (engl. <i>5-hidroxytryptamine transporter</i>)
5MT	5-metoksitriptamin
AAAD	dekarboksilaza aromatskih aminokiselina (engl. <i>aromatic L-amino acid decarboxylase</i>)
Ala	alanin
ANOVA	analiza varijance (engl. <i>analysis of variance</i>)
BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain-barrier</i>)
BCA	bicinkoninskoj kiselini (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
E	eozin
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
H	Hematoksin
HE	bojanje hematoksinom i eozinom
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>High-performance liquid chromatography</i>)
LNAA	velike neutralne aminokiseline (engl. <i>large neutral amino acid</i>)
LAT	prijenosnik velikih neutralnih aminokiselina (engl. <i>large neutral amino acid transporter</i>)
LC	najmanje zabrinjavajući (engl. <i>least concern</i>)
M	srednja vrijednost (engl. <i>mean</i>)
MAO	monoaminooksidaza
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
N	broj životinja (engl. <i>number</i>)
p	razina statističke značajnosti
SEM	standardna pogreška srednje vrijednosti (engl. <i>standard error of means</i>)
SD	standardna devijacija
ST	sobna temperatura
SVL	duljina tijela gmaza od njuške do nečisnice (engl. <i>snout–vent length</i>)
SŽS	središnji živčani sustav

TCP	tranilcipromin
TPH	triptofan-hidroksilaza
Trp	triptofan
VMAT	vezikularni monoaminski prijenosnik (engl. <i>vesicular monoamine transporter</i>)

1. UVOD

Serotonin (5HT) jedan je od ključnih biogenih amina u organizmu kralježnjaka, poznat po svojoj višestrukoj ulozi u fiziologiji, bihevioralnoj regulaciji i homeostazi organizma. Iako je najpoznatiji kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu (SŽS), gdje modulira procese poput raspoloženja, socijalne interakcije, agresije i anksioznosti, više od 90% ukupnog serotonina nalazi se izvan mozga, ponajprije u trombocitima i u enterokromafinim (EC) stanicama gastrointestinalnog sustava. Taj tzv. periferni serotonin sudjeluje u regulaciji pokretljivosti probavnog sustava, apsorpciji nutrijenata, regulaciji glikemije, lipogenezi i lipolizi, kontrakciji glatkih mišića te koordinaciji imunološkog i reproduktivnog odgovora. Unatoč njegovu velikom fiziološkom značaju, periferni serotonin sustav daleko je manje istražen od središnjeg, a posebno je nedovoljno poznat u gmazova. To otvara značajan prostor za istraživanja koja povezuju razine perifernog 5HT-a s prilagodbama na okoliš i obrascima ponašanja.

Gmazovi, a osobito gušteri roda *Podarcis*, predstavljaju izvrsne modelne organizme za ovakva istraživanja jer kombiniraju niz prednosti: jednostavniju neuroanatomiju, jasne morfološke i spolne razlike, te izraženu plastičnost ponašanja i ekologije. S obzirom na to da su ektotermni organizmi, njihove fiziološke funkcije i razina metaboličke aktivnosti uvelike ovise o uvjetima okoliša, što ih čini osjetljivim pokazateljima ekoloških pritisaka. Proučavanje neuroendokrinih sustava u gmazova stoga omogućuje bolje razumijevanje osnovnih fizioloških mehanizama koji stoje iza adaptivnog ponašanja, ali i pruža podatke relevantne za usporedbe s pticama i sisavcima, koji dijele amnionskog pretka.

Na istočnoj obali Jadrana i okolnim otocima dvije sestrinske vrste guštera – primorska gušterica (*Podarcis siculus*) i krška gušterica (*Podarcis melisellensis*) – žive u simpatriji i natječu se za ograničene resurse poput hrane, prostora i mjesta za termoregulaciju. *P. siculus* je veća, robusnija i ekološki fleksibilnija vrsta koja pokazuje izraženo agresivno i teritorijalno ponašanje te veću sposobnost širenja areala, uključujući kolonizaciju novih staništa i urbanih područja. Njena invazivnost i kompetitivna prednost često rezultiraju potiskivanjem autohtonih populacija *P. melisellensis* na manje kvalitetna mikrostaništa. Takve interakcije nisu samo ekološki zanimljive, već imaju i šire implikacije za očuvanje bioraznolikosti budući da *P. siculus* predstavlja invazivnu prijetnju na mnogim europskim i izvaneuropskim lokalitetima.

Uvod

Brojna istraživanja pokazala su da se ove dvije vrste razlikuju ne samo po morfologiji i ekologiji, već i po obrascima ponašanja, uključujući razine agresivnosti, spremnost na istraživanje. Takve razlike vjerojatno imaju neuroendokrinu osnovu, uključujući modulaciju serotoniniskog i dopaminskog sustava. Prethodna istraživanja u okviru projekta BOLDeR pokazala su da se vrste razlikuju u ponašanju pod serotonergičnom kontrolom te imaju razlike u razinama centralnog serotoninina, no podatci o perifernim razinama serotoninina i o histološkoj građi crijeva bili su ograničeni. Pitanje ostaje: je li periferni serotonin samo odraz osnovnih metaboličkih procesa ili može služiti kao fiziološki biljeg koji korelira s ponašanjem i ekološkom prilagodbom?

Upravo zato proučavanje simpatrijskih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis* predstavlja idealan prirodni eksperiment za ispitivanje povezanosti između perifernog serotoninina, morfologije probavnog sustava i adaptivnog ponašanja.

Cilj ovog istraživanja je istražiti perifernu homeostazu serotoninina na biokemijskoj i histološkoj razini u jedinkama simpatrijskih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*, u kojima su zabilježene razlike u ponašanju pod serotonergičnom kontrolom.

Specifični ciljevi:

- Odrediti razine serotoninina i prekursora njegove sinteze – triptofana metodom tekuće kromatografije visoke učinkovitosti u serumu guštera *P. melisellensis* i *P. siculus*
- Analizirati građu tankog crijeva i brojnost enterokromafinih stanica u gušterica *P. melisellensis* i *P. siculus*
- Analizirati korelaciju razine serotoninina u krvi sa histološkom strukturom crijeva na razini jedinke
- Ustanoviti razlike među vrstama i/ili spolova u razinama perifernog serotoninina i građi crijeva.

Metodološki pristup uključuje kombinaciju terenskog uzorkovanja s tri različite lokacije (Knin, Sinj, Pag) gdje vrste žive u simpatriji, laboratorijsku biokemijsku analizu razina serotoninina i triptofana, histološku obradu uzoraka probave te statističku analizu podataka. Korištenjem integrativnog pristupa dobiven je jedinstveni skup podataka koji omogućuje povezivanje biokemijskih, histoloških i ekoloških aspekata.

Uvod

Struktura rada organizirana je tako da slijedi logiku istraživačkog procesa: nakon uvoda slijedi detaljan teorijski pregled serotoninskog sustava i biologije proučavanih vrsta, zatim poglavlje Materijali i metode koje opisuje životinje, eksperimentalni dizajn, korištene materijale i metode te statističku obradu. U poglavlju Rezultati prikazani su glavni nalazi istraživanja, koji su potom u Raspravi objašnjeni u kontekstu postojeće literature i ekoloških značajki.

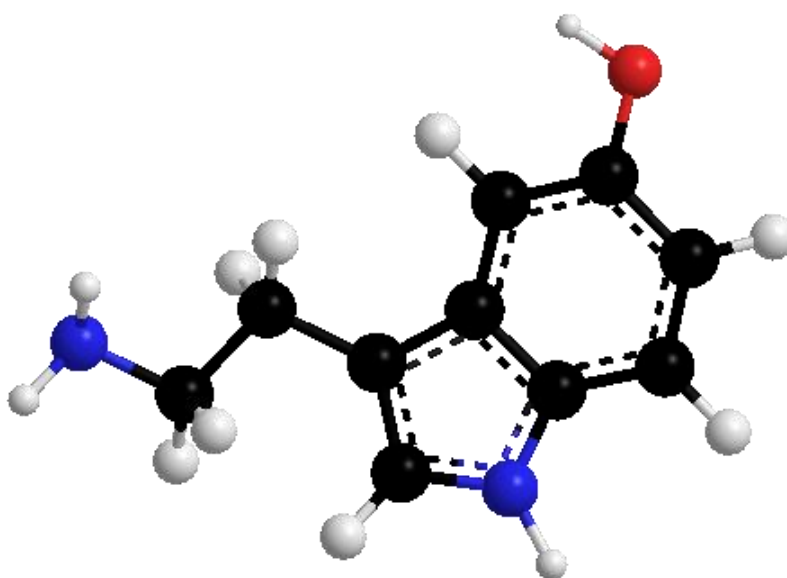
Ovaj rad daje prvi uvid u perifernu homeostazu serotonina kod *Podarcis* guštera na području istočne obale Jadrana. Rezultati mogu biti osnova za daljnja istraživanja i jedan od temelja za nastavak istraživanja upravljanja invazivnim populacijama, očuvanje autohtonih vrsta te razumijevanje adaptivnih mehanizama u promjenjivim okolišnim uvjetima.

2. TEORIJSKI PREGLED

2.1. Serotonin

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan monoamin široko rasprostranjen u biljnom i životinjskom svijetu (Whitaker-Azmitia, 1999.). Ima razne uloge i prisutan je u mnogim različitim vrstama organizama, poput gljiva, biljaka i beskrležnjaka (Turlejski, 1996.), a nalazi se i u većini jednostaničnih organizama (Azmitia, 2007.). Kod kralježnjaka ima slične uloge i podijeljen je na dva odjeljka: središnji (mozak) i periferni odjeljak (El-Merahbi *i sur.*, 2015.; Nonogaki, 2022.).

Već početkom 20. stoljeća O'Connor opisuje supstancu koja "oponaša,, adrenalin i utječe na vazokonstrikciju (O'Connor, 1912.), u 30-im godinama 20. stoljeća Vialli i Erspamer više puta opisuju tvar u enterokromafinim stanicama gastrointestinalnog sustava čije djelovanje danas povezujemo sa serotoninom (Vialli i Erspamer, 1937.), a konačno 1948. Maurice Rapport, Arda Green i Irving Page iz seruma izoliraju serotonin. Godinu kasnije, 1949. Rapport i suradnici definiraju i njegovu strukturu – 5-hidroksitriptamin (Rapport *i sur.*, 1948.; Rapport, 1949.).



IUPAC : 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol

Molekularna formula: $C_{10}H_{12}N_2O$

Molekularna masa: 176,22 g/mol

Slika 1. Strukturna formula serotonina (PerkinElmer Chem3D 16.0)

5-hidroksitriptamin (5HT) u literaturi uz standardni naziv serotonin nalazimo i pod nazivima trombocitin, trombotonin, enteramin. Iako je najpoznatiji kao neurotransmiter koji modulira neuronske aktivnosti i niz neurofizioloških procesa, većina serotonina se nalazi izvan središnjeg živčanog sustava, gdje regulira brojne fiziološke procese u kardiovaskularnom, respiratornom, gastrointestinalnom, urinarnom te reproduktivnom sustavu (Berger *i sur.*, 2009.).

2.2. Metabolizam serotonina

Metabolizam serotonina obuhvaća sve procese – njegovu sintezu, njegovo djelovanje u organizmu, transport te njegovu razgradnju. Koncentracija serotonina u organizmu uvjetovana je njegovom sintezom i razgradnjom. Poremećaji u bilo kojem od ovih procesa mogu uzrokovati brojne promjene na metaboličkoj, imunološkoj, fiziološkoj, neurofiziološkoj ili bihevioralnoj razini što utječe na homeostazu organizma. Filogenetski gledano serotonin je očuvan u širokom rasponu vrsta od nematoda do ljudi.

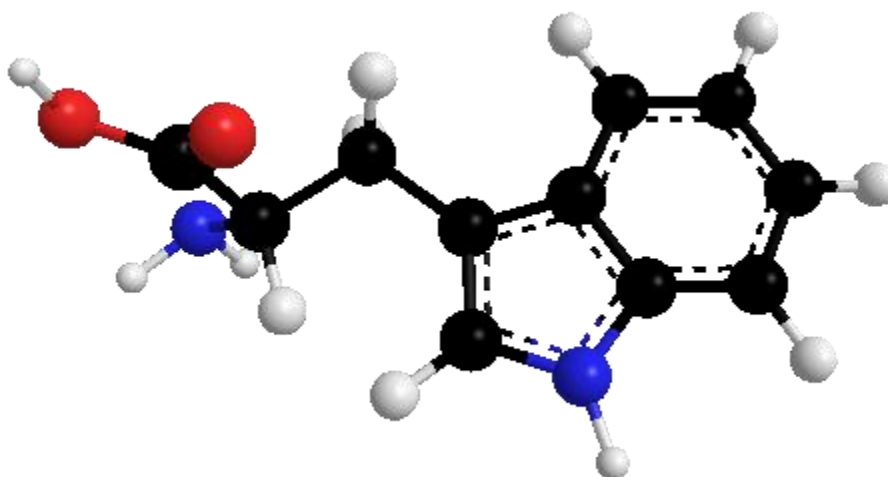
2.2.1. Sinteza serotonina

Sinteza 5HT započinje iz esencijalne aminokiseline triptofana (Trp $C_{11}H_{12}N_2O_2$) (Slika 2.), koju kralježnjaci ne mogu sintetizirati samostalno, već ju unose u organizam putem hrane (Cansev i Wurtman, 2007.). Triptofan, najmanje zastupljena aminokiselina u organizmu, je potreban za normalan rast i razvoj organa. Kralježnjaci unose Trp kroz prehranu, namirnicama bogatim Trp-om poput jaja, pileline, puretine, ribe, mlijeka, jogurta, soje, itd. Većina apsorbiranog Trp-a sudjeluje u sintezi proteina (Sainio *i sur.*, 1996.), dok samo oko 3% sudjeluje u sintezi 5HT-a (Richard *i sur.*, 2009.), dodatni dio Trp-a sudjeluje i u sintezi melatonina te niacina tj. vitamina B3.

Sinteza serotonina koristi samo 3% prehranbenog triptofana, promjene u prehrani mogu mijenjati dostupnost triptofana i utjecati na proizvodnju serotonina (Dougherty *i sur.*, 2009.; Namkung *i sur.*, 2015.). Istraživanje Musumeci *i sur.*, 2014, provedeno na štakorima, pokazalo je da prekomjeren unos triptofana u prehrani majke može dovesti do narušene homeostaze perifernog 5HT, što uzrokuje povećanu proizvodnju serotonina u enterokromafinim stanicama, pri čemu taj višak serotonina remeti crijevnu pokretljivost i imunološke procese a dugoročno može imati posljedice i na ponašanje

Iako je sinteza 5HT u središnjem i perifernom odjeljku slična, u svakom odjeljku se ona odvija neovisno jer je krvo-moždana barijera (BBB engl. *blood-brain barrier*) nepropusna za 5HT (Diksic i Young, 2001.). Budući da 5HT ne može prijeći BBB, središnji živčani sustavi (SŽS) i periferija odvojeni su odjeljci, funkcionalno i regulatorno neovisni. Međutim u sisavaca, tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja mozga, BBB nije formirana do kraja, pa u prenatalnom razdoblju ta dva sustava slobodno komuniciraju (Davies *i sur.*, 1996.).

Lijevi izomer triptofana (L-Trp) ima sposobnost prolaska kroz BBB. Za apsorpciju Trp u SŽS odgovoran je prijenosnik velikih neutralnih aminokiselina (LAT, engl. *large neutral amino acid transporter*) (Boadle-Biber, 1993.). Udio Trp koji se unosi u središnji odjeljak ovisi ne samo o dostupnosti L-Trp u cirkulaciji nego i o koncentraciji ostalih aminokiselina (fenilalanin, tirozin, leucin, izoleucin, histidin, metionin, treonin i valin) koje također koriste LAT, a s kojima se Trp natječe za ulazak u središnji živčani sustav (Fernstrom *i sur.*, 1973.). Stoga je količina Trp koja ulazi u središnji odjeljak u izravnoj korelaciji s novo sintetiziranim serotoninom. Ujedno je to i jedan od ograničavajućih čimbenika sinteze 5HT u središnjem odjeljku.



IUPAC: 2-Amino-3-(1H-indol-3-il)propanska kiselina

Molekularna formula: $C_{11}H_{12}N_2O_2$

Molekularna masa: 204,23 g/mol

Slika 2. Strukturna formula L-Triptofana (PerkinElmer Chem3D 16.0)

Količina serotonina u perifernim tkivima tijela značajno je veća nego u središnjem živčanom sustavu, pri čemu se približno 90% ukupnog serotonina sintetizira u crijevima

(Mohammad-Zadeh *i sur.*, 2008.). Prema brojnim nalazima, 5HT se također proizvodi u manjim količinama u drugim perifernim tkivima, poput masnog tkiva, srca i gušterače, gdje ima različite parakrine ili autokrine funkcije (Oh *i sur.*, 2016.). Enterokromafine stanice u sluznici tankog crijeva proizvode većinu 5HT u tijelu (Erspamer i Asero, 1952.) i otpuštaju ga u krvotok (Racké *i sur.*, 1995.). Nadalje, broj enterokromafinih stanica korelira s razinama 5HT u serumu (Takano *i sur.*, 2014.). Serotonin koji se proizvodi u EC stanicama može djelovati lokalno u crijevu ili se pohraniti u trombocitima i djelovati sustavno (Jenkins *i sur.*, 2016.).

Biokemijske reakcije sinteze iz kojih Trp prelazi u 5HT su iste u oba odjeljka. L-Trp (Slika 2.) procesom hidroksilacije uz prisutnost enzima triptofan hidroksilaze (TPH) prelazi u 5-hidroksitriptofan (5HTP), a ujedno je i ta reakcija i ograničavajući čimbenik sinteze (Lovenberg *i sur.*, 1967.) (Slika 3.).

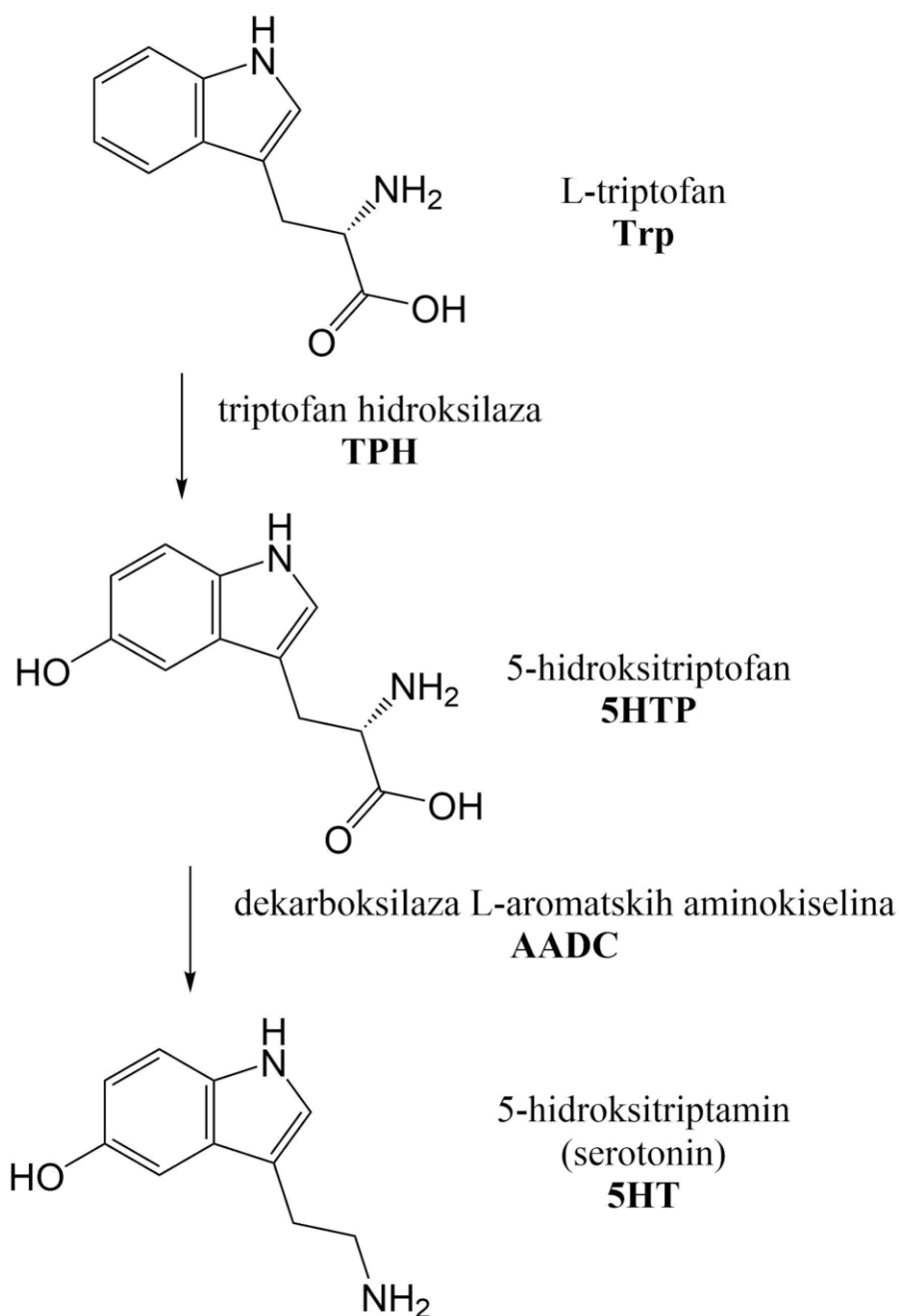
Enzim TPH je monooksidaza koja se u sisavaca javlja u dvije izoforme, TPH1 i TPH2 (Darmon *i sur.*, 1988.). Izoforma TPH2 se javlja u serotonergičnim neuronima središnjeg odjeljka, dok je izoforma TPH1 regulator sinteze 5HT u perifernom odjeljku (Matthes i Bader, 2018.). U prvom koraku sinteze, TPH koristi kisik te tetrahidrobiopterin (BH4) kao kosupstrate reakcije konverzije Trp-a u 5HTPa, dok ion dvovalentnog željeza ima svojstvo kofaktora u reakciji sinteze 5HT. Enzim je ograničavajući čimbenik u procesu sinteze 5HT zbog svoje visoke specifičnosti te slabog afiniteta za druge aminokiseline (Noguchi *i sur.*, 1973.).

5-hidroksitriptofan je u stanici prisutan u malim količinama (Long *i sur.*, 1982.) jer se procesom dekarboksilacije vrlo brzo pretvara u 5HT (Boadle-Biber, 1993.) (Slika 3.). Biološki poluživot 5HTP je relativno kratak od 2,2 do 7,4 h (Westenberg *i sur.*, 1982.). 5HTP dobro se apsorbira u krvotok, djelomično zbog toga što prisutnost drugih aminokiselina ne ometa njegovu apsorpciju, te zato što se ne koristi u sintezi proteina (Magnussen i Nielsen-Kudsk, 1980.). 5HTP prolazi krvno-moždanu barijeru bez posebne molekule prijenosnika (Udenfriend *i sur.*, 1957.), iako se može koristiti i LAT-om. S obzirom na to, razina 5HT u mozgu ovisi o razinama Trp i 5HTP u središnjem živčanom sustavu (Birdsall, 1998.). U SŽS 5HTP prvenstveno povisuje razinu serotonina, ali i razinu melatonina, dopamina, noradrenalina i βendorfina (Guilleminault *i sur.*, 1973.; van Praag i Lemus, 1986.).

Reakcija dekarboksilacije kojom nastaje serotonin katalizirana je dekarboksilazom aromatskih kiselina (engl. *aromatic L-amino acid decarboxylase*, AAAD) (Slika 3.), široko

Teorijski pregled

rasprostranjeni enzim, nisko specifičan te ovisan o piridoksinu. Reakcije hidroksilacije i dekarboksilacije događaju se vrlo brzo, neposredno jedna iza druge, odnosno gotovo istovremeno, u prisutnosti triptofana (Clark i sur., 1954.).



Slika 3. Sinteza serotonin (PerkinElmer ChemDraw Professional 16.0)

2.2.2. Pohrana i otpuštanje serotonin

Nakon procesa sinteze, novonastali 5HT u središnjem odjeljku pohranjuje se u vezikule u presinaptičkom serotonergičnom neuronu pomoću vezikularnog monoaminskog prijenosnika

(engl. *Vesicular monoamine transporter*, VMAT). Na periferiji novosintetizirani 5HT se iz enterokromafine stanice otpušta u portalni krvotok. Otpuštanje 5HT iz enterokromafine stanice reguliraju dvije vrste receptora. To su ekscitacijski ionotropni receptori iz obitelji 5HT₃ i inhibicijski metabotropni receptori iz obitelji 5HT₄ (Racké *i sur.*, 1995.). Otpušteni 5HT u trombocite ulazi pomoću serotoniniskog transportera (5HTt) koji se nalazi na membrani trombocita. U citoplazmi trombocita, putem VMAT-a, serotonin se pakira u guste granule ili delta granule. Osim 5HTt na membrani trombocita nalaze se i metabotropni serotoniniski receptori, točnije 5HT_{2A}. Vezanje molekule serotoninina na 5HT_{2A} receptor aktivira trombocitni odgovor, to jest dolazi do reakcije otpuštanja 5HT egzocitozom i pojačane agregacije trombocita. Serotonin koji ostaje u krvnoj plazmi uklanja se aktivnošću monoamin oksidaze u endotelnim stanicama pluća i jetre (Stolz, 1985.)(Slika 4.).

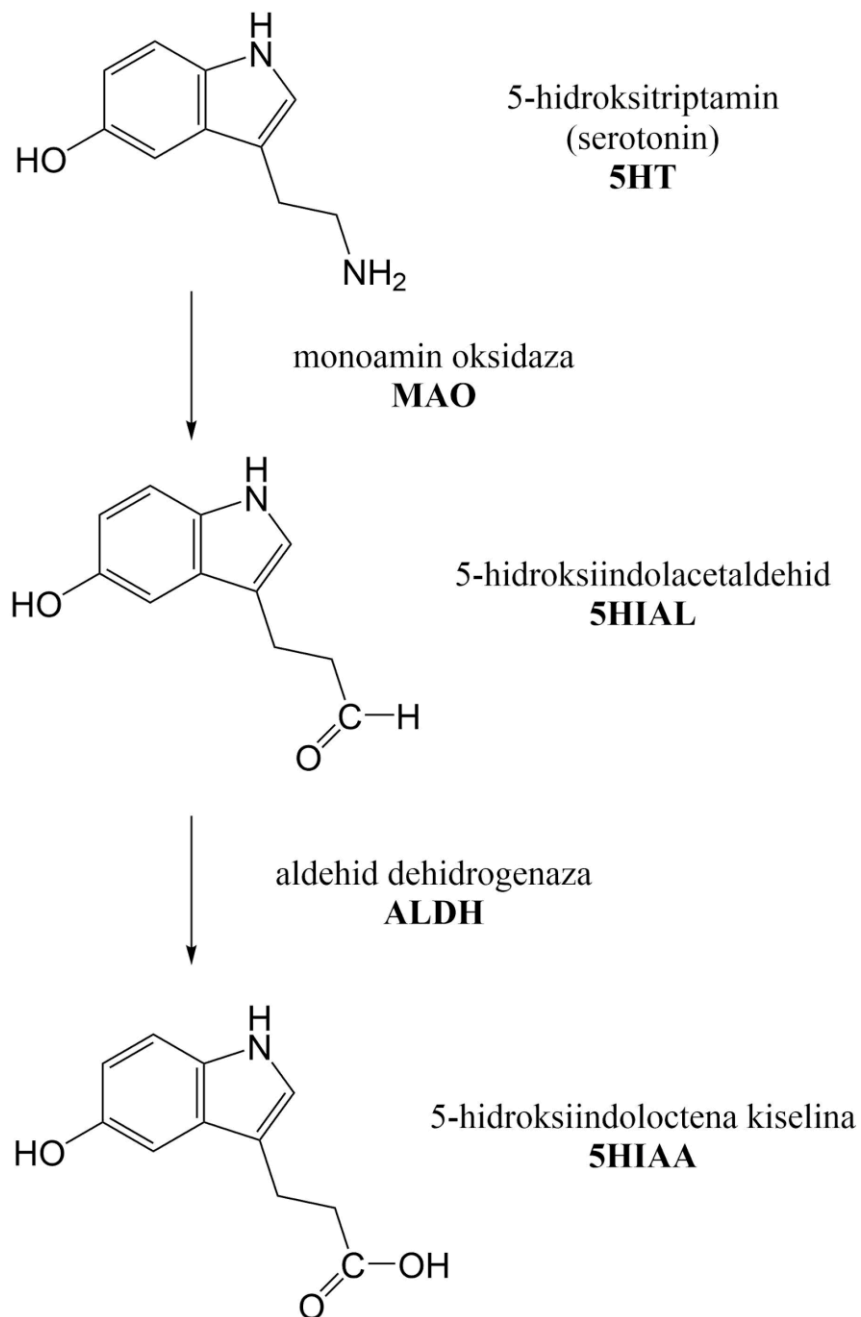
2.2.3. Razgradnja serotoninina

Biokemijski put razgradnje 5HT u središnjem i perifernom odjeljku također je sličan. 5HT se procesom oksidativne deaminacije razgrađuje u 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (engl. *5-hydroxyindoleacetic acid*, 5HIAA). Prvo 5HT kataliziran enzimom monoamin oksidazom (MAO, engl. *monoamine oxidase*) prelazi u 5-hidroksiindolacetataldehid koji se zatim oksidira do 5HIAA pomoću aldehyd-dehidrogenaze (Slika 4.) te se izlučuje urinom (McIsaac *i sur.*, 1959.).

Enzim MAO je flavoprotein koji se nalaze na vanjskoj membrani mitohondrija neurona i perifernih stanica (Shih *i sur.*, 1999.). MAO katalizira oksidativnu deaminaciju raznih amina u mozgu i perifernim tkivima proizvodnjom vodikovog peroksida (H₂O₂) (Thorpe *i sur.*, 1987.; Shih *i sur.*, 1999.). MAO prevodi 5HT u 5- hidroksiindolacetaldehid, koji se zatim oksidira u 5HIAA pomoću aldehyd-dehidrogenaze (Hensler, 2011.) (Slika 4.). Nakon egzogene primjene 5HT, većina se 5HIAA izlučuje unutar 24 h, što ukazuje na brzi metabolizam 5HT-a (Mohammad-Zadeh *i sur.*, 2008.). U kralježnjaka se javlja u dvije izoforme, MAO A i MAO B. Obje izoforme nalaze se u svakom odjeljku te mogu katalizirati sve supstrate, tako da nedostatak ili nefunkcionalnost jedne izoforme može biti kompenzirana s drugom (Billett, 2004.). U normalnim uvjetima MAO A i MAO B imaju različite afinitete prema supstratima, tako da MAO A u središnjem odjeljku primarno oksidira serotonin i noradrenalin (Sandler *i sur.*, 1981.). U središnjem živčanom sustavu su prisutna oba izoenzima, dok je na periferiji

Teorijski pregled

MAO A zastupljeniji u jetri i gastrointestinalnom sustavu, a MAO B u trombocitima (Sandler *i sur.*, 1981.; Tyce, 1990.; Shih *i sur.*, 1999.).



Slika 4. Razgradnja serotonina (PerkinElmer ChemDraw Professional 16.0)

2.3. Serotoninski odjeljci u organizmu

Serotonin funkcionira u dva funkcionalno odvojena sustava u organizmu: središnjem, koji obuhvaća mozak i leđnu moždinu, i perifernom, koji uključuje sve ostale dijelove tijela. Krvno-moždana barijera fizički odvaja ove sustave, ograničavajući slobodnu razmjenu serotonina i

njegovih prekursora, a istovremeno omogućuje selektivnu komunikaciju između mozga i periferije, primjerice putem hormonalnih i živčanih signala (Banks, 2008.). Unatoč ovoj barijeri, promjene u perifernim razinama serotonina mogu utjecati na središnji sustav, osobito tijekom razvoja, što može imati dugoročne učinke na ponašanje i funkciju živčanog sustava (Hanswijk *i sur.*, 2020.). Ova organizacija omogućuje tijelu da regulira lokalne funkcije serotonina u periferiji, dok središnji sustav održava kontrolu nad moždanim procesima, uz suptilnu međusobnu interakciju koja osigurava koordinaciju između oba sustava.

2.3.1. Serotonin u središnjem živčanom sustavu

U središnjem živčanom sustavu, 5HT je odgovoran za razvoj serotonergičkih neurona i ciljnih tkiva tijekom neurogeneze, a kasnije, kao neurotransmiter djeluje posredujući mnoge fiziološke procese, uključujući cirkadijane ritmove, unos hrane i spolno ponašanje (Lucki, 1998.). Uz to ključan je za modulaciju integrativnih funkcija poput raspoloženja, anksioznosti, agresije, hranjenja, kognicije i spolnog ponašanja (Olivier, 2015.). Zbog mnogih funkcija 5HT-u se pripisuje ključna uloga u različitim psihijatrijskim poremećajima kao što su anksioznost, depresija, ovisnosti i autizam (Brawman-Mintzer i Yonkers, 2004.; Johnson, 2004.; Joiner *i sur.*, 2005.). No potpuno razumijevanje serotonergičkih sustava u središnjem živčanom sustavu uključuje genomiku, neurokemiju, elektrofiziologiju i ponašanje te iako su pronađene povezanosti između funkcija na tim različitim razinama, u većini slučajeva uzročni mehanizmi su još uvijek nepoznati ni do kraja razjašnjeni.

Socijalni stres, uključujući agresivne i socijalne interakcije, prepoznat je kao aktivator serotonergičkog sustava (Winberg i Nilsson, 1993.; Summers, 2001.; Summers *i sur.*, 2003.). Iako je paradigma serotonin–agresija prilično složena i s kontradiktornim nalazima iz različitih istraživanja, čini se da povećane razine središnjeg 5HT inhibiraju agresiju u raznim vrstama, uključujući gmazove, ptice i ribe (Larson i Summers, 2001.; Sperry *i sur.*, 2003.; Eisenreich i Szalda-Petree, 2015.). U modelu perinatalne hiperserotoninemije kod štakora (Hranilovic *i sur.*, 2011.), životinje s hiperserotoninemijom pokazale su značajno smanjen broj enterkrmatofinih stanica s manjom količinom sekretornih granula koje pohranjuju serotonin u tankom crijevu, s izraženijim razlikama kod mužjaka (Gračan *i sur.*, 2024.), praćeno smanjenjem tigmotaksije, reakcije na stres i socijalne anksioznosti (Blažević *i sur.*, 2012.). Summers *i sur.*, 2005. proučavali su guštera *Anolis carolinensis* i pokazali lokalne razlike u osnovnoj serotonergičkoj

aktivnosti u određenim moždanim regijama između agresivnih i podređenih mužjaka, pri čemu je kod agresivnijih guštera zabilježena smanjena serotonergična aktivnost u nekim područjima.

2.3.2. Serotonin na periferiji

Dosadašnja istraživanja jasno ukazuju da serotonin, osim što djeluje kao neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu, ima i ključnu perifernu ulogu u ukupnom metabolizmu (Berger *i sur.*, 2009.). Enterokromafine stanice, koje se smatraju osjetilnim jedinicama crijeva, reagiraju na luminalne podražaje otpuštanjem 5HT, čime aktiviraju subepitelne živčane završetke (Grundy i Schemann *i sur.*, 2004.). Njegovo djelovanje obuhvaća regulaciju metabolizma glukoze i lipida te kontrolu funkcija jetre i masnog tkiva, što ga čini važnim čimbenikom u održavanju homeostaze organizma.

U istraživanju provedenom na genetski modificiranim miševima s uklonjenim genom *Tph1*, specifičnim za gastrointestinalni sustav, pokazano je da izostanak serotonina iz crijeva dovodi do smanjene proizvodnje glukoze u jetri te učinkovitijeg perifernog skladištenja glukoze. Na taj je način dokazano da serotonin izravno utječe na jetrenu aktivnost, stimulirajući razgradnju glikogena i potičući glukoneogenezu (El-Merahbi *i sur.*, 2015.).

Osim na metabolizam glukoze, periferni serotonin ima važnu ulogu i u regulaciji metabolizma lipida. Naime, zabilježeno je da putem različitih mehanizama utječe na sintezu i razgradnju lipida, čime posredno regulira i jetrene funkcije (Watanabe *i sur.*, 2010.). Njegov učinak posebno je izražen u adipoznom tkivu: povišene razine perifernog serotonina potiču skladištenje energije posredstvom povećanog unosa lipida, jačanja adipogeneze te inhibicije lipolize (Yabut *i sur.*, 2019.). Time serotonin djeluje kao važan regulator ravnoteže između potrošnje i pohrane energije u organizmu.

Uz pleiotropne učinke, serotonin ostvaruje i lokalne, unutarstanične funkcije u onim stanicama u kojima je sintetiziran. Primjerice, serotonin koji se sintetizira i djeluje u β -stanicama gušterače potiče egzocitozu inzulina putem procesa serotoninilacije, i to neovisno o 5HT podrijetlom iz crijeva (Paulmann *i sur.*, 2009.). Slično tome, u adipoznim stanicama lokalno proizvedeni serotonin sudjeluje u smanjenju termogeneze i potrošnje energije, čime dodatno pridonosi skladištenju energije (El-Merahbi *i sur.*, 2015.).

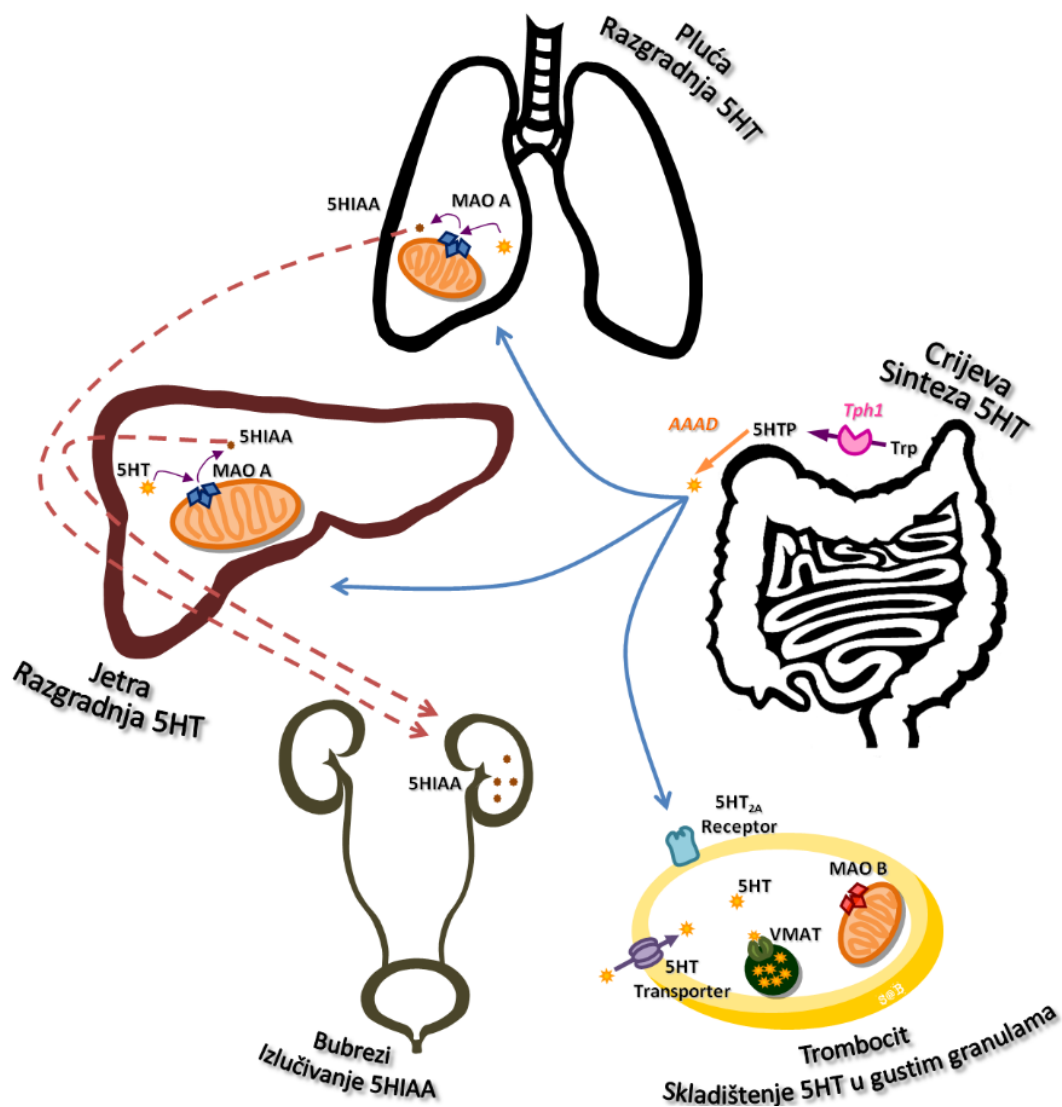
Periferno, serotonin je i snažan stimulator glatkih mišića probavnog sustava, povećavajući njihov tonus i potičući crijevnu peristaltiku, utječući na pražnjenje želuca i

crijeva, inhibirajući žljezdano izlučivanje (Katzung *i sur.*, 2011.). Osim toga, intestinalni serotonin može djelovati kao kontinuirani regulatorni signal sličan hormonu za cijelo tijelo, uključujući mozak. Ova funkcija regulatornog signala posredovana je trombocitima i prvenstveno ovisi o stvarnom zdravstvenom stanju crijeva i odražava ga. Ove spoznaje mogu djelomično objasniti zašto se disbioza crijeva može povezati s različitim ljudskim patološkim stanjima, kao i s neurorazvojnim i neuropsihijatrijskim poremećajima (Szoke-Kovacs *i sur.*, 2020.).

Serotonin također utječe na krvni tlak i mišićni sustav regulirajući mišićne kontrakcije, neizravno utječući na funkciju brojnih unutarnjih organa (Watts *i sur.*, 2012.) te ima ulogu u razvoju srca i regulaciji srčane frekvencije (Berger *i sur.*, 2009). Većina serotonina prisutnog u krvi pohranjena je u trombocitima, gdje ima važnu ulogu u zgrušavanju krvi (Zucker i Borrelli, 1955.; Lopez-Vilchez *i sur.*, 2009.). Serotonin u cirkulaciji djeluje u regulaciji brojnih fizioloških funkcija, između ostalog, utječe na funkciju metaboličkih organa i održavanje energetske homeostaze (Yabut *i sur.*, 2019.).

Dodatno, serotonin smanjuje izlučivanje testosterona, izaziva kontrakcije epididimisa, inhibira ejakulaciju i mokrenje kod mužjaka, dok kod ženki utječe na razvoj mliječnih žlijezda, kontrakciju glatkih mišića maternice, sazrijevanje jajnih stanica i izlučivanje progesterona (Berger *i sur.*, 2009.).

Serotonin na periferiji uklanja se iz plazme u endotelnim stanicama pluća i jetre, gdje se djelovanjem enzima MAO razgrađuje u 5HIAA (Slika 5.) (Stolz, 1985.).



Slika 5. Periferni serotoninski odjeljak
(Hranilovic i Blažević, 2012)

2.4. Gmazovi

Gmazovi (lat. *Reptilia*) najniži su razred pravih kopnenih kralježnjaka, široko rasprostranjeni po čitavoj zemlji izuzev Antarktike. Danas živeći gmazovi, taksonomski svrstavaju se u 4 velika reda sa više od 7000 opisanih vrsta ("Hrvatska enciklopedija," 2013.).

1. Premosnici (lat. *Rhynchocephalia*) – 1 vrsta
2. Kornjače (lat. *Chelonia*) – više od 350 opisanih vrsta
3. Krokodili (lat. *Crocodylia*) – više od 25 opisanih vrsta
4. Ljuskaši (lat. *Squamata*) – više od 6 500 opisanih vrsta zbog čega su jedan od najbogatijih redova unutar cijelog životinjskog carstva, dijele se u dva vrlo poznata i vrstama bogata podreda:
 - 4.1. Gušteri (lat. *Lacertilia*) s više od 3 500 opisanih vrsta
 - 4.2. Zmije (lat. *Ophidia*) s više od 3 000 opisanih vrsta

Gmazovi, posebno gušteri predstavljaju odličan model za proučavanje povezanosti neuroendokrinologije i ponašanja (Kabelik i Hofmann, 2018.) jer oni obuhvaćaju različite fiziološke i morfološke značajke i ponašanja koja su fascinirala ljude kroz povijest. Iako je mnogo istraživanja u posljednjim desetljećima o ekologiji, evoluciji i sistematici gmazova donijelo važne uvide u biologiju gmazova, istraživanja su jako malo pažnje posvetila njihovoj neuroendokrinologiji i ponašanju.

Gmazovi nude poseban skup karakteristika koje olakšavaju usporedbe na različitim razinama, uključujući usporedbe unutar i između jedinki iste vrste, između različitih okolišnih konteksta, kao i među vrstama. Takva istraživanja su važna osobito kada se promatraju u kontekstu drugih kralježnjaka, jer gmazovi, ptice i sisavci dijele amnionskog pretka stoga podjednako mogu pridonijeti komparativnim, evolucijskim, fiziološkim, neurofiziološkim i drugim istraživanjima (Wade, 2005.).

Stoga, iz evolucijske i komparativne perspektive, ovaj veliki nesklad u istraživačkom naporu otkriva propuštenu priliku. Gmazovi, kao i sisavci i ptice, posjeduju visoko razvijenu fiziologiju i kretanje, kao i razvoj i anatomiju živčanog sustava (Karten, 2015; Montiel i sur., 2016; Nomura i Izawa, 2017). Međutim, ogromne promjene u kretanju, prehrani i ponašanju koje vidimo kod sisavaca i ptica povezane su s endotermijom (Lovegrove, 2017.). Gmazovi, nasuprot tome, zadržavaju ektotermiju što ograničava njihov razvoj (Singh i sur., 2020.).

Gušteri imaju jednostavniji mozak pogodan za proučavanje temeljnih mehanizama ponašanja te bi se opaženo potencijalno moglo translahirati i na druge vrste. Iz svih tih razloga Kabelik tvrdi da je došlo vrijeme da gmazovi postanu istaknutiji kao modelni sustavi u bihevioralnoj endokrinologiji (Kabelik i Hofmann, 2018.).

Lacertidae, ili pravi gušteri, najčešća su i najraznovrsnija obitelj gmazova (385 vrsta ("The Reptile Database" 2025.) od kojih 65 vrsta živi u Europi, od kojih je 74% endemsko, a rod *Podarcis* je najbrojniji (Jelić *i sur.*, 2012.). Zahvaljujući geografskom položaju Hrvatske, koja je smještena na razmeđu nekoliko biogeografskih regija, na njenoj maloj površini pronalazimo izuzetno bogatstvo herpetofaune. Na istočnoj strani Jadrana i pripadajućim otocima nalazimo dvije sestrinske kohabitirajuće simpatrijske vrste guštera - Primorsku guštericu (*P. siculus*) i Kršku guštericu (*P. melisellensis*).

Krška i primorska gušterica prizemne su, diurnalne vrste (Grbac i Brnin, 2006.). Svoju tjelesnu temperaturu reguliraju izlaganjem suncu zbog čega pripadaju u skupinu ektotremalnih životinja (Grbac i Brnin, 2006.; Vitt i Caldwell, 2009.).

2.4.1. Primorska gušterica (*Podarcis siculus*; Rafinesque-Schmaltz, 1810.)

Vrsta *Podarcis siculus* pripada porodici *Lacertidae* i u svojem izvornom arealu obuhvaća područja Italije i dijelova duž istočne jadranske obale – Slovenija, Hrvatska, BiH i Crna Gora (Crnobrnja-Isailovic *i sur.*, 2009.), dok je sekundarno rasprostranjena i na brojne lokacije u Europi i izvan nje, uključujući Španjolsku, Tursku i Sjedinjene Američke Države (Jelić *i sur.*, 2012.). U Hrvatskoj se prirodno javlja uzduž jadranske obale i na otocima (Grbac i Brnin, 2006.), dok su nedavna istraživanja zabilježila širenje i prema kontinentalnom dijelu zemlje (Kovačević i Tvrtković, 2025.). Vrsta naseljava širok raspon staništa, od prirodnih šuma, grmlja i travnjaka do urbanih područja - parkova pa sve do poljoprivrednih obradivih površina, što odražava njezinu izuzetnu ekološku fleksibilnost (Jelić *i sur.*, 2012.).

Podarcis siculus može postići veličinu do 9 cm (od vrha njuške do nečisnice), obojenost tijela je vrlo varijabilna. Dorzalno prevladavaju sve nijanse zelene i smeđe boje, vrlo često sa uzdužnim svijetlim ili tamnim prugama ili točkastim uzorkom (Slika 6.), a moguće je i uniformno obojenje. Ventralni dio tijela je uniforman pretežito sivkaste ili bijele boje, dok se na rubnim trbušnim pločicama nalaze plave točke. Spolni dimorfizam je izražen te su ženke

manje od mužjaka, imaju kraći rep i užu glavu (Arnold *i sur.*, 2007.). Predatori su joj ptice, zmije i sisavci (Capula i Aloise, 2011.; Mauro Grano, 2011.).



Slika 6. *Podarcis siculus*; Rafinesque-Schmaltz, 1810.

Izvor: <https://www.eurolizards.com/lizards/podarcis-siculus/>

Podarcis siculus u osnovi je karnivorna, s dominantnim udjelom kukaca i drugih beskralježnjaka (Taverne *i sur.*, 2019.), no u određenim uvjetima populacije pokazuju značajan prijelaz prema biljojedenju (Herrel *i sur.*, 2008.). Najpoznatiji primjer takve promjene zabilježen je na hrvatskom otočiću Pod Mrčaru, gdje je 1971. godine uvedeno nekoliko parova s obližnjeg otočića Pod Kopište. U razdoblju kraćem od četiri desetljeća populacija je razvila izražene morfološke i funkcionalne promjene, uključujući povećanje glave, jači ugriz, prisutnost cekalnih valvi te dulji probavni sustav, što predstavlja adaptacije povezane s povećanim unosom biljne hrane (Herrel *i sur.*, 2008.; Vervust *i sur.*, 2010.). Eksperimentalni pokusi pokazali su da su ove promjene djelomično reverzibilne, što upućuje na visok stupanj fenotipske plastičnosti (Vervust *i sur.*, 2010.).

Osim morfoloških i probavnih prilagodbi, populacija s Pod Mrčara pokazuje i genomske razlike u odnosu na izvorne populacije, pri čemu su identificirani lokusi koji se nalaze pod selekcijskim pritiskom (Sabolić, 2021.). Ovi nalazi potvrđuju da *P. siculus* može u kratkom vremenskom okviru proći kroz značajne adaptivne promjene, kombinirajući fenotipsku plastičnost i genetsku adaptaciju.

U kontekstu širenja areala, nedavno otkriće populacije u Slavonskom Brodu predstavlja najistočniji zabilježeni nalaz ove vrste u kontinentalnoj Hrvatskoj (Kovačević i Tvrtković, 2025.). Pretpostavlja se da je širenje omogućeno kombinacijom antropogenih čimbenika, poput transporta i urbanizacije, te klimatskih promjena koje pogoduju opstanku ovih vrsta u novim područjima. Budući da *P. siculus* pokazuje agresivno teritorijalno ponašanje i potencijal za kompetitivno isključivanje autohtonih vrsta poput *Ablepharus kitaibelii*, ali i *P. melisellensis*, preporučuje se sustavan monitoring i genetsko označavanje populacija u kontinentalnom dijelu zemlje (Kovačević i Tvrtković, 2025.).

Novija istraživanja biologije ove vrste sugeriraju da je *P. siculus* (Slika 6.) pogodan modelni organizam za proučavanje, primjerice, morfoloških i funkcionalnih obrazaca adaptivnih odgovora na promjene staništa (Herrel *i sur.*, 2008.; Biaggini *i sur.*, 2009). Uz to *P. siculus* je dobar model i za proučavanje fenotipske plastičnosti te interakcije između ekologije i genetike, dokazano time što su do sada objavljeni preko 250 znanstvenih radova na *Podarcis siculus* u bazi *Web of Science Core Collection*. Njena sposobnost prilagodbe širokom rasponu staništa, promjena u prehranbenim navikama te širenje izvan izvornog areala potvrđuju da je riječ o vrsti s visokim invazivnim potencijalom, što uključuje potrebu za očuvanjem bioraznolikosti u regijama gdje se pojavljuje zbog čega je ova vrsta i izabrana kao model i u našem istraživanju.

Kao autohtona vrsta, *P. siculus* uvrštena je u Crvenu knjigu vodozemaca i gmazova Republike Hrvatske kao „najmanje zabrinjavajući” (engl. *least concern* - LC). Nalazi se na Dodatku IV Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore Europske unije te na Dodatku II Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa radi brojnih endemskih podvrsta diljem svog areala. U Republici Hrvatskoj, zbog velike gustoće populacije i invazivnosti, nije zaštićena te ne postoje predložene mjere očuvanja (Crnobrnja-Isailović *i sur.*, 2009.). Kao invazivna vrsta, zabilježena u Španjolskoj, Turskoj i Sjedinjenim Američkim Državama, uvrštena je u *Global invasive species database* (Crnobrnja-Isailović *i sur.*, 2009.).

2.4.2. Krška gušterica (*Podarcis melisellensis*; Braun, 1877.)

Podarcis melisellensis je također vrsta gušterice iz porodice *Lacertidae*, rasprostranjena duž istočne obale Jadrana — od sjeveroistočne Italije preko Slovenije, Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore do sjeverne Albanije, uključujući mnoge jadranske otoke (Jelić *i sur.*,

2012.). Nastanjuje različita staništa kao što su mediteranske šikare, stjenoviti tereni, pašnjaci te antropogena područja, na nadmorskim visinama do 1400 m (Gasc *i sur.*, 2004.).



Slika 7. *Podarcis melisellensis*; Braun, 1877.

Izvor : <https://www.eurolizards.com/lizards/podarcis-melisellensis/>

Podarcis melisellensis može narasti do 7,4 cm od vrha njuške do nečisnice. Obojenost ove vrste je također vrlo varijabilna. Dorzalni dio je smeđe ili zelenkaste boje s 12 uzdužnih pruga ili mrežastim uzorkom. Kao i kod *P. siculus* pojavljuje se i uniformno dorzalno obojenje (smeđezelene nijanse) (Slika 7.). Ventralni je dio tijela bijele, žute ili narančaste boje bez dodatnih oznaka, dok se na rubnim trbušnim pločicama nalaze plave točke (Jelić *i sur.*, 2012.). Spolni dimorfizam očituje se kroz kraći rep i udove te manju i užu glavu koje imaju ženke za razliku od mužjaka (Brecko *i sur.*, 2008.).

Točan sastav prehrane ovisi o dostupnosti hrane, ekološkim uvjetima i godišnjem dobu. Ima prehrambene navike slične *P. siculus*, pri čemu primarno lovi svoj plijen, ali prehrana biljnim materijalom (plodovi, sjemenke ili vegetativni organi biljaka) nije rijetka praksa (Herrel *i sur.*, 2008). Istraživanja prehrane pokazala su promjenjivost u sastavu prehrane među otočnim populacijama. Neke otočne populacije pokazuju unos biljnih komponente u prehrani, što upućuje na omnivoriju i ekološku fleksibilnost (Cascio i Pasta, 2006.). Odrasle jedinke većinom se hrane plijenom, a unutar populacija zabilježeni su i primjeri kanibalizma pri čemu odrasle jedinke jedu svoje mlade (Capula i Aloise, 2011.). U usporedbi s *P. siculus*, analize pokazuju

da *P. melisellensis* koristi različite strategije pri iskorištavanju resursa na otocima, pri čemu razlike u prehrambenoj raznolikosti i strukturi odražavaju prilagodbe na konkurentnost i veličinu otoka (Zuffi, 2013.).

Prema *International Union for Conservation of Nature* crvenoj listi, vrsta je kategorizirana kao najmanje zabrinjavajuća (LC - *Least Concern*) zahvaljujući svojoj raširenosti i stabilnoj populaciji. Dodatno je zaštićena EU Direktivom o staništima i Bernskom konvencijom (Jelić *i sur.*, 2012.). Kao endemska vrsta, u Hrvatskoj je zaštićena. Razmjerno manji broj istraživanja je provedeno na *P. melisellensis* u odnosu na *P. siculus*, do sada objavljeni preko 60 znanstvenih radova u bazi *Web of Science Core Collection*.

2.4.3. Kompetitivna interakcija guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* na istočnoj obali Jadrana

Podarcis siculus je dominantna u interspecijskim odnosima s ostalim malim guštericama. Prilagodba različitim uvjetima staništa čini *P. siculus* uspješnom i opasno invazivnom vrstom, na područjima gdje nije autohtona, u slučaju naseljavanja otoka često dolazi do izumiranja autohtonih vrsta (Corti *i sur.*, 2006.). Do sada su i evidentirana tri slučaja prirodne hibridizacije primorske gušterice s drugim vrstama iz roda *Podarcis*: s *P. tiliguerta* na Sardiniji, s *P. raffonei* na Aeolijskom otoku i s *P. wagleriana* na otoku Marettimo (Gorman *i sur.*, 1975.; Capula *i sur.*, 1993., 2002.).

Na obali Jadranskog mora vrsta *Podarcis siculus* ulazi u interakciju s autohtonom krškom guštericom *Podarcis melisellensis*, što posljedično dovodi do njihova međusobnog natjecanja za hranu, stanište, mjesta za sunčanje i ostale ograničavajuće resurse (Jelić *i sur.*, 2012.).

Brojna terenska i eksperimentalna istraživanja pokazala su da susreti navedenih dviju vrsta rezultiraju uspostavljanjem dominantno-podređenih odnosa, pri čemu *Podarcis siculus* kompetitivnim isključivanjem smanjuje rasprostranjenost autohtone vrste *Podarcis melisellensis* (Downes i Bauwens, 2004.). Kompetitivno inferiornija *P. melisellensis* povlači se na siromašnija mikrostaništa, čime se dodatno smanjuje njezina interakcija sa superiornijom simpatrijskom vrstom (Downes i Bauwens, 2004.). Upravo zbog toga ove dvije vrste, unatoč korištenju istih ekoloških niša, uglavnom ne dijele ista staništa (Raynor, 1989.).

Ova kompeticija posebno je izražena na manjim otocima, gdje obitava ili jedna ili druga vrsta, dok simpatrija u potpunosti izostaje (Gorman *i sur.*, 1975.). Nevo *i sur.*, 1972. proveli su istraživanje na hridi Pod Mrčaru, gdje su na lokalitet s *P. melisellensis* unijeli pet parova vrste *P. siculus*, što je rezultiralo potpunim nestankom autohtone vrste s tog područja (Vervust *i sur.*, 2010.). Njihova koegzistencija uglavnom se ostvaruje u kopnenim regijama ili na većim otocima, gdje žive u marginalnoj simpatriji ili parapatriji (Gorman *i sur.*, 1975.).

Uzduž istočne obale Jadranskog mora, od sjeveroistočne Italije do Neretve, gušteri *Podarcis siculus* i *P. melisellensis* zabilježeni su u simpatriji i alopatriji. U područjima alopatrije, *P. siculus* najčešće nastanjuje polja i priobalne zone, dok je *P. melisellensis* povezan s brdskim terenima i makijom (Gojak, 2025.). Gojak potvrđuje da se simpatrija javlja u prijelaznim zonama, a unutar njih jedinke jedne vrste mogu koristiti staništa preferirana za drugu vrstu. Specifična mozaik-staništa koja kombiniraju travu, makiju, kamen i suhozide omogućuju sintopiju, gdje se obje vrste mogu susresti u prostornoj i vremenskoj blizini. Ova istraživanja usmjerena su na identifikaciju sintopičnih populacija unutar šireg područja simpatrije kako bi se proučili ekološki mehanizmi koji omogućuju njihov suživot (Gojak, 2025.).

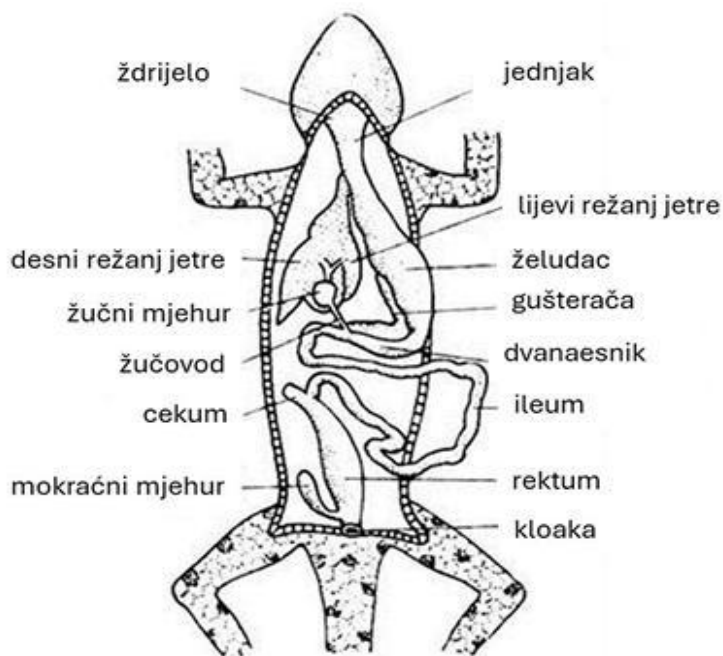
Uvid u fiziološke karakteristike dviju vrsta neophodan je za razumijevanje dinamike njihove interakcije te objašnjenje razloga zbog kojih dominantna vrsta ostvaruje prednost nad ugroženom.

2.5. Morfologija i histologija probavnog sustava guštera

Kao i drugi ljuskari, gušteri roda *Podarcis* imaju tipičnu organizaciju probavila: usnu šupljinu s jezikom i zubalom te žlijezdama slinovnicama, jednjak, jednostavni želudac, tanko crijevo, cekum i debelo crijevo, s jetrom, žučnim mjehurom i gušteračom kao pomoćnim organima (Slika 8.). Histološka građa probavnog sustava gmazova tipično se sastoji od četiri glavna sloja, raspoređena od lumena prema van: sluznice (mukoze – lat. *Tunica mucosa*), podsluznice (submukoze), mišićnog sloja (lat. *Tunica muscularis*) i seroza (Srichairat *i sur.*, 2022.). Sluznica uključuje površinski epitel s pripadajućim žlijezdama (lat. *Lamina epithalis*), a u pojedinim dijelovima probavne cijevi može biti snažno naborana. Vezivno tkivo i mišićni slojevi sluznice razlikuju se ovisno o regiji i veličini životinje (Hamdi *i sur.*, 2014.; Srichairat *i*

sur., 2022.). Ova osnovna organizacija slojeva predstavlja temelj za razumijevanje funkcionalnih razlika duž probavnog sustava.

Želudac guštera ima jajoliki oblik i sastoji se od dviju regija: fundusa i pilorusa. Sluznica želuca je naborana, pri čemu su nabori izraženiji i pravilniji u fundusu nego u pilorusu. Površinu sluznice pokriva jednoslojni cilindrični epitel s vrčastim stanicama, ispod kojega se nalazi vezivno tkivo i dobro razvijen tanki mišićni sloj sluznice. Tubulusne žlijezde fundusa jednostavne su i otvaraju se u žljezdane jamice kroz uzak izlazni kanal, dok su pilorusne žlijezde često razgranate, s duljim vratovima, a ponekad prelaze iz tubulusnog u alveolarni oblik. U pilorusu se nalaze i specijalizirane serozne oksintikopeptičke i mukozne stanice; oksintikopeptičke stanice istodobno luče pepsinogen i klorovodičnu kiselinu (HCl). Podsluznica želuca sastoji se od gušćeg vezivnog tkiva s krvnim žilama, dok je *tunica muscularis* dobro razvijena i građena pretežno od unutarnjeg kružnog sloja glatkih mišića, uz tanji vanjski uzdužni sloj. Vanjsku površinu želuca prekriva tanka seroza (Wang i sur., 2024.). Ovakva građa želuca omogućuje učinkovito mehaničko miješanje i kemijsku razgradnju hrane, što je osobito važno kod vrsta koje konzumiraju raznoliku hranu.



Slika 8. Anatomska građa probavnog sustava guštera

(<https://www.notesonzoology.com/phylum-chordata/garden-lizard/digestive-system-of-garden-lizard-with-diagram-chordata-zoology/8411>, prilagodila S. Keretić 2025.)

Tanko crijevo gmazova može biti zavijeno ili relativno ravno, a njegova unutarnja površina često oblikuje uzdužne ili poprečne nabore. Sluznica stvara brojne resice – prstolike izdanke koji strše u lumen – a građena je od apsorpcijskog cilindričnog epitela i vrčastih stanica, uz rahlo vezivno tkivo i male mišićne snopove u unutrašnjosti resica (Ya *i sur.*, 2009.). Posebno su zanimljive enterokromafine stanice koje luče serotonin (vidi poglavlje 2.3.2) Uz njih su prisutne i enteroendokrine stanice raspoređene duž probavnog sustava (Ya *i sur.*, 2009.; Serra-Campos *i sur.*, 2021.; Srichairat *i sur.*, 2022.; Wang *i sur.*, 2024.). Podsluznica, bogata krvnim žilama, uža je blizu pilorusa, a šira prema cekumu. Mišićni sloj je slabije razvijen nego u jednjaku i želucu te sadrži slojeve gustog vlaknastog vezivnog tkiva. Cijeli segment obavijen je tankom serozom (Hamdi *i sur.*, 2014.; Srichairat *i sur.*, 2022.; Wang *i sur.*, 2024.). Osim dvanaesnika, pojedini dijelovi tankog crijeva teško se histološki razlikuju (Ya *i sur.*, 2009.). Ova sličnost između segmenata sugerira da je većina apsorpcije raspodijeljena duž cijelog tankog crijeva, a ne koncentrirana samo u jednom dijelu, kao što je slučaj kod sisavaca.

Cekum je vrećasto proširenje između tankog i debelog crijeva (Hamdi *i sur.*, 2014.). Njegova veličina i složenost ovise o prehrani – kod vrsta koje konzumiraju biljnu hranu cekum je dobro razvijen, dok je kod striktnih karnivora smanjen ili izostaje. Sluznica cekuma može biti više ili manje naborana, a čine je cilindrični epitel, rahlo vezivno tkivo i tanak sloj mišića. Podsluznica je dobro prokrvljena, dok unutarnji kružni sloj glatkih mišića dominira nad vanjskim uzdužnim slojem. S vanjske strane prisutna je seroza (Srichairat *i sur.*, 2022.). Ova regija predstavlja ključnu točku za mikrobiološku fermentaciju, osobito kod vrsta s povećanim unosom biljne hrane.

Debelo crijevo pokazuje morfološke varijacije među skupinama guštera, koje se često povezuju s njihovom prehranom. Sluznica je različito naborana i sastoji se od cilindričnog epitela s velikim brojem vrčastih stanica, rahlog vezivnog tkiva i tankog sloja glatkih mišića (Benchaya *i sur.*, 2024.). Podsluznica se sastoji od gustog vezivnog tkiva bogatog krvnim i limfoidnim strukturama. *Tunica muscularis* građena je od unutarnjeg kružnog i vanjskog uzdužnog sloja, izvan kojih se nalazi seroza (Benchaya *i sur.*, 2024.). Završni dio debelog crijeva, rektum, otvara se u kloaku – zajednički izlazni put probavnog, mokraćnog i spolnog sustava. Ova završna dionica probavne cijevi važna je za reapsorpciju vode i formiranje fecesa, čime pridonosi očuvanju vode – ključnog resursa u suhim mediteranskim staništima.

2.5.1. Morfologija i histologija probavne cijevi guštera *Podarcis*

Gušteri iz roda *Podarcis* su pretežito insektivorni lovci, ali pokazuju znatnu fleksibilnost u prehrani, osobito u otočnim ekosustavima (Herrel i sur., 2008.; Capula i Aloise, 2011.; Taverne i sur., 2019.). Struktura probavne cijevi kod roda *Podarcis* slična je većini ljuskara, a histološke razlike odražavaju njihove prehrambene navike i eventualne adaptacije na promijenjene izvore hrane. Ovakva fleksibilnost prehrane čini ih iznimno zanimljivim modelom za istraživanje povezanosti ekologije i fiziologije probave. Rod *Podarcis* obuhvaća mediteranske „zidne“ guštere prepoznate u znanstvenoj literaturi kao dobar istraživački model za ekološku plastičnost, uključujući promjenjive prehrambene niše i povezane promjene probavnog sustava. Drugim riječima, promjene u duljini crijeva, prisutnosti cekalnih valvi ili histološkim karakteristikama često su izravno povezane s promjenom prehrane, što omogućuje proučavanje brze adaptacije.

Među njima, *P. siculus* i *P. melisellensis* predstavljaju bliske, ali ekološki raznolike vrste, s brojnim populacijama na istočnim jadranskim otočićima koje su omogućile „prirodne eksperimente“ u evoluciji probave i prehrane (Taverne i sur., 2019.). Ovi prirodni eksperimenti pružaju izvanrednu priliku za usporedbu populacija u različitim ekološkim uvjetima, čime se može bolje razumjeti kako okolišni pritisci oblikuju morfologiju probavnog sustava.

Organizacija probavnog sustava jasno pokazuje homologiju gmazova s drugim kralježnjacima, premda uz specifične prilagodbe koje odgovaraju njihovom načinu prehrane. Kod tipično insektivornih populacija (*P. melisellensis*, kopnene populacije *P. siculus*) crijevo je relativno kraće, lumen jednostavniji i bez velikih pregrada (Vervust i sur., 2010.). Kod populacija *P. siculus* koje su prešle na prehranu bogatiju biljnim materijalom (npr. Pod Mrčaru) razvijaju se cekalne valve, što produžuje vrijeme prolaska hrane i omogućuje fermentaciju (Herrel i sur., 2008). Ova anatomska prilagodba ima ključnu ulogu u učinkovitijoj razgradnji biljnog materijala i iskorištavanju energije iz celuloze.

Taverne i sur. (2019.) analizirali su 18 otočnih populacija dviju blisko srodnih vrsta (*P. siculus* i *P. melisellensis*) i pokazali da, unatoč velikoj varijabilnosti sastava plijena i udjela biljne hrane među otocima, raznolikost nije izravno uvjetovana veličinom otoka. Umjesto toga, prehrambeni obrasci odražavaju kompleksnu interakciju čimbenika – dostupnosti resursa, gustoće populacije i intenziteta predacije – što je tipično za otočne ekosustave. Takvi uvjeti potiču oportunizam, sezonsko povećanje biljne komponente i divergenciju strategija među

Teorijski pregled

populacijama obiju vrsta. Rezultati dodatno potvrđuju povezanost između prehrane, ugrizne sile i crijevne morfologije, osobito kod otočkih populacija *P. siculus* na Pod Mrčaru, gdje su opažene značajne morfološke promjene probavnog sustava.

2.6. Krv guštera

Gmazovi, kao ektotermni organizmi, pripadaju eurivalentnoj skupini životinja koje pokazuju visoku toleranciju na promjene i oscilacije abiotičkih čimbenika okoliša. Takve promjene, da bi bile uspješno podnesene, zahtijevaju složene fiziološke prilagodbe koje imaju dalekosežne posljedice na čitav organizam. Posebno je osjetljiv krvožilni sustav, koji predstavlja jedan od ključnih mehanizama u održavanju homeostaze, jer omogućuje učinkovitu termoregulaciju, raspodjelu hranjivih tvari te uklanjanje metaboličkih produkata u uvjetima promjenjivih temperatura i dostupnosti resursa.

Hematološke karakteristike unutar skupina pa čak i unutar vrste znatno se razlikuju, značajno više nego što je to uočeno u ptica i sisavaca. Filogenetska udaljenost između skupina gmazova, razlike vezane uz spol, starost, doba godine, fiziološko stanje jedinke (prehrana, bolest, reproduktivna aktivnost) te okolišni uvjeti (temperatura, vlaga) bitno doprinose razlikama i širokom spektru rezultata u hematološkim istraživanjima zbog čega je vrlo teško standardizirati osnovne hematološke parametre i referentne vrijednosti.

Krv gmazova čini krvna plazma te krvne stanice. Krvne stanice čine 20-40% volumena krvi (Sodeinde i Ogunjobi, 1994.), što je niže nego u sisavaca i ptica i ukazuje na smanjeni kapacitet prijenosa kisika (Stacy *i sur.*, 2011.). Opetovano i taj postotak ovisi o vanjskim uvjetima i stanju organizma. Općenito vrijednosti hematokrita i hemoglobina niže su u ektotermnih nego u endotermnih životinja (Campbell, 2015.). Smanjenje temperature u okolišu rezultira padom vrijednosti hematokrita, hemoglobina i volumena plazme (Wojtaszek, 1992).

Krvni serum od krvne plazme razlikuje se u tome što plazma sadržava čimbenike zgrušavanja od kojih je najvažniji fibrinogen i krvne stanice. Krvna plazma je tekući dio krvi koji preostaje nakon centrifugiranja krvi s antikoagulansom i volumenom čini oko 60% krvi, dok serum je defibrinizirana plazma (Medicinski leksikon, 1992.). Kod svih gmazova limfne žile često prate krvne žile te je stoga najčešći problem prilikom vađenja krvi gmazova miješanje krvi s limfom (Belić *i sur.*, 2017.).

2.7. Serotonin kod gmazova

Unatoč značajnim naporima u proučavanju uloge i značaja serotonina u sisavaca i ptica, razumijevanje uloge serotonina kod gmazova ostaje fragmentarno i nedovoljno sistematizirano. Dosadašnja istraživanja sugeriraju da je serotonin kod gmazova razmjerno istražen u

anatomskom, ali ne i funkcionalno-komparativnom smislu. Glavne zapažene funkcije – raspodjela u središnjem i perifernom serotoninском odjeljku te modulacija socijalnog ponašanja – ukazuju na potencijalno važne evolucijske paralele s pticama i sisavcima (Bacqué-cazenave *i sur.*, 2020.).

Serotonin u kralježnjaka djeluje kao modulator ponašanja, što je potvrđeno i kod beskralježnjaka i riba. Iako su gmazovi dio te evolucijske linije, sustavni pregled koji bi povezoao dinamičke funkcije serotoninina kroz različite vrste još nije dostupan (Bacqué-cazenave *i sur.*, 2020.). Općenito se smatra da serotonin vrši inhibitornu kontrolu nad agresivnim ponašanjem, posebno kod mužjaka. Gušteri važni su modeli za testiranje predloženog utjecaja neurohormona na agresiju (Baird, 2013.). Istraživanja na gušterici *Anolis sangrei* pokazala su da su kod agresivnih jedinki frekvencija i intenzitet ponašanja povezana sa smanjenom serotonergičnom aktivnošću (Hartline *i sur.*, 2017.), dok je kod gušterica *Anolis carolinensis*, pokazano da je, i kod dominantnih i kod podređenih mužjaka, serotonergička aktivnost stimulirana agresivnom društvenom interakcijom (Summers *i sur.*, 2005.). U tijeku su i istraživanja koeksistirajućih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*, na kojima je *P. siculus* pokazao veću razinu dopamina u mozgu, veću istraživačku sklonost i agresivnost (Nikolic *i sur.*, 2019.; Glogoški *i sur.*, 2024.;). Capaldo *i sur.*, 2003 pokazali su prisutnost serotoninina u nadbubrežnoj žlijezdi *P. siculus* te sugerirali da serotonin ima regulatornu funkciju na os hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda.

Imunološka istraživanja otkrila su serotoninске stanice raspoređene u plućima više vrsta gmazova, poput *Testudo graeca* i *Pseudemys scripta elegans*, prisutne u interseptalnim međuprostorima i intramuralnim ganglijima (Pastor *i sur.*, 1987.). Što je još jedna evolucijska paralela u istraživanju serotoninina.

Recentna istraživanja ukazuju da serotonin ima utjecaja na taloženje više masti u lipidnim rezervama kod vrste *P. siculus* što je u direktnoj poveznici s njihovom većom stopom rasta, većom proizvodnjom energije i većom reprodukcijom (Aladrović *i sur.*, 2023). Stoga je potrebno istražiti razine perifernog serotoninina kao mogućeg modifikatora metabolizma gmazova i jednog od faktora koji utječe na biološku prednost vrste *P. siculus* u odnosu na endemičnu *P. melisellensis*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinje

Prvi zapisi o pokusima na životinjama datiraju iz 5. stoljeća prije Krista koje je izvodio Alkemenon. Dva stoljeća kasnije predstavnici Aleksandrijske škole opisuju pokuse na živim životinjama i pišu da je takav tip istraživanja ključan za tumačenje vitalnih funkcija organizma. Galenova anatomsko-fiziološko istraživanje već u razdoblju od 129.-210. godine postavlja temelje eksperimentalne fiziologije zapadnog svijeta te animalni model stavlja u centar mnogih istraživanja sve do danas (Belicza, 2000.).

Složenost pojma animalnog modela pokušalo je objasniti Američko nacionalno istraživačko povjerenstvo za animalne modele definirajući animalni model kao „životinjski model u kojem normativna biologija ili ponašanje, spontani ili inducirani patološki procesi mogu biti istraživani kao jedan ili više fenomena koji nalikuju u istom fenomenu kod ljudi ili životinja“. Stoga je većina pokusnih animalnih modela razvijena da bi se istražili uzorci, priroda i načini liječenja poremećaja/bolesti u ljudi (Ambriović Ristov, 2007.). Iako se razvojem tehnologije svakog dana otkrivaju nove metode kojima se zamjenjuje upotreba živih organizama, nažalost još uvijek nije moguće u potpunosti ukinuti upotrebu animalnih modela. Pri svakom istraživanju, pa tako i ovom našem vodili smo se takozvanim konceptom 3R (*refine* – poboljšati, *replace* – zamijeniti, *reduce* - smanjiti) kojeg su opisali Russel i Burch 1959. (Russell i Burch, 1992.).

Nakon detaljnog proučavanja dosad postojeće literature definirano je da će cilj doktorskog rada biti istražiti perifernu homeostazu serotonina na biokemijskoj i histološkoj razini u jedinkama simpatrijskih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*, u okviru Hrvatske zaklade za znanost projekta „Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja u koegzistirajućim populacijama guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR)“, voditeljice izv. prof. dr. sc. Sofije Ane Blažević (HRZZ-UIP-2019-04-8469), kod kojih su prethodno zabilježene razlike u ponašanju pod serotonergičnom kontrolom. Doktorska disertacija dio je šireg istraživačkog projekta koji ima za cilj proučiti ovaj jedinstveni model kohabitirajućih vrsta guštera kako bi razjasnili odnos između razlika u razinama neurotransmitera u mozgu i ekološku isključenost ovih vrsta. Istraživanje prikazano u ovoj

disertaciji provedeno je na istim životinjama koje su uključene u druge segmente projekta, što posljedično omogućuje integrativnu interpretaciju rezultata na više razina.

S tim ciljem 2021. uzorkovane su tri koegzistirajuće simpatrijske populacije gušterica – *Podarcis siculus* (PS) i *P. melisellensis* (PM) na različitim lokacijama u Hrvatskoj – Pag, Knin i Sinj. Uzorkovanje se provodilo u razdoblju od kolovoza do listopada, nakon završetka reproduktivne sezone za obje ove vrste. Ukupno je uhvaćeno 120 životinja, razdioba uhvaćenih jedinki po vrsti, po lokaciji i po spolu prikazana je u Tablici 1. Mužjaci su identificirani po bedrenim porama i natečenoj bazi repa (Brečko *i sur.*, 2008.). Gušteri čiji je spol bio nejasan, mladi ili neodrasli gušteri odmah su pušteni i nisu uključeni u istraživanje. Broj guštera po skupini određen je kao minimalni broj koji se pojavljuje u sličnim istraživanjima (Downes i Bauwens, 2004.). Tijekom terenskog uzorkovanja svaka jedinka je spremljena u označenu platnenu vreću i transportirana na Zavod za animalnu fiziologiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagreb.

Tablica 1. Broj jedinki *Podarcis melisellensis* i *P. siculus* uključenih u istraživanje

	<i>Podarcis melisellensis</i>		<i>Podarcis siculus</i>		
	mužjaci (n)	ženke (n)	mužjaci (n)	ženke (n)	
Knin	11	8	11	8	38
Sinj	10	9	6	10	35
Pag	11	11	12	12	46
Ukupno	32	28	29	30	119

U nastambi za gmazove unaprijed su pripremljeni plastični terariji (30X40cm) s tresetnom podlogom te pripadajućom grijaćom LED lampom i UV lampom u koje su životinje prebačene (Slika 8.). U terarijima su im osigurani optimalni uvjeti za život –12 sati dan/12 sati noć, temperatura 20-25 °C, vlažnost od 40-60%, slobodan pristup vodi i 3 puta tjedno hranjenje živim šturcima (*Gryllus assimilis*; Insektarij, Obrt za uzgoj insekata, vl. Aleksandar Gavrilović), koji su prethodno posuti prahom kalcija s vitaminom D3. Period od uzorkovanja pa do žrtvovanja (sredina prosinca 2021.) iskorišten je za prilagodbu životinja i bihevioralna testiranja koje su dio drugih istraživanja na Zavodu. Kao što je bilo i predviđeno dizajnom pokusa, sve životinje su zadnjih 3 mjeseca proveli u istim strogo kontroliranim uvjetima.

Materijali i metode

Tijekom razdoblja zatočeništva jedna jedinka je uginula – *Podarcis siculus* – mužjak – Sinj zbog čega je ukupan broj uključenih jedinki u istraživanje bio 119 (Tablica 1).



Slika 8. Plastični terariji na Zavodu za animalnu fiziologiju, PMF-a (lijevi panel); gušter u terariju (desni panel) (foto Brižić 2021.)

Dozvole za uzorkovanje guštera na lokacijama Knin, Sinj i otok Pag u okviru projekta dobivene su od Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja Republike Hrvatske (KLASA: UPI/I-612-07/21-48/202 ; URBROJ 517-10-1-1-21-4, prilog 8.1.). Istraživanje je usklađeno s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17 i 32/19) te Pravilnikom o zaštiti životinja koji se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13i 116/19) te smjernicama koje je izradio ASAB/ABS (ASAB Etički odbor/ABS odbor za skrb o životinjama, 2023.) i Etičkim kodeksom Sveučilišta u Zagrebu na osnovu kojih je podnesena i Zamolba te ishodovano pozitivno mišljenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja za ovaj dio istraživanja (KLASA: 643-02/24-01/1; URBROJ 251-58-10617-24-335) (Prilog 8.2.). Sredstva za ovaj rad osigurala je Hrvatska zaklada za znanost projektom #UIP-2019-04-8469 (voditeljice Sofije Ane Blažević) i potpore Sveučilišta u Zagrebu broj 20285828 (voditelj Duje Lisičić).

3.2. Žrtvovanje – prikupljanje uzoraka seruma i probavnih organa

Žrtvovanje životinja bilo je minimalno tjedan dana nakon posljednjeg testiranja ponašanja kako bi se smanjio utjecaj stresa. Prije samog žrtvovanja životinjama je mjerena masa

Materijali i metode

tijela (g) te duljina tijela koja se označava kao SVL (engl.) "*snout-vent length*" — mjerenje od vrha njuške (engl. *snout*) do otvora kloake (engl. *vent*). To je standardna morfometrijska mjera u herpetologiji jer je neovisna o duljini repa, koji se kod mnogih vrsta lako ošteti ili regenerira, pa nije pouzdan za usporedbe.

Životinje su eutanazirane dekapitacijom (Husak *i sur.*, 2015.; Pierozan *i sur.*, 2017.) uvijek u istom vremenskom periodu – od 10 do 14 h. Trajanje rukovanja guštera od hvatanja u terariju pa do odrubljivanja glave, svedeno je na minimum kako bi se što više smanjio stres životinje, a cijeli proces nije trajao duže od 20 sekundi. Po dekapitaciji jedan tim se bavio glavom te izolacijom mozga, a drugi tim je radio na prikupljanju maksimalnog volumena seruma iz vratnih žila, a potom i izolacijom probavnog sustava (Slika 9.).



Slika 9. Prikupljanje seruma nakon dekapitacije guštera (foto Brižić, 2021.)

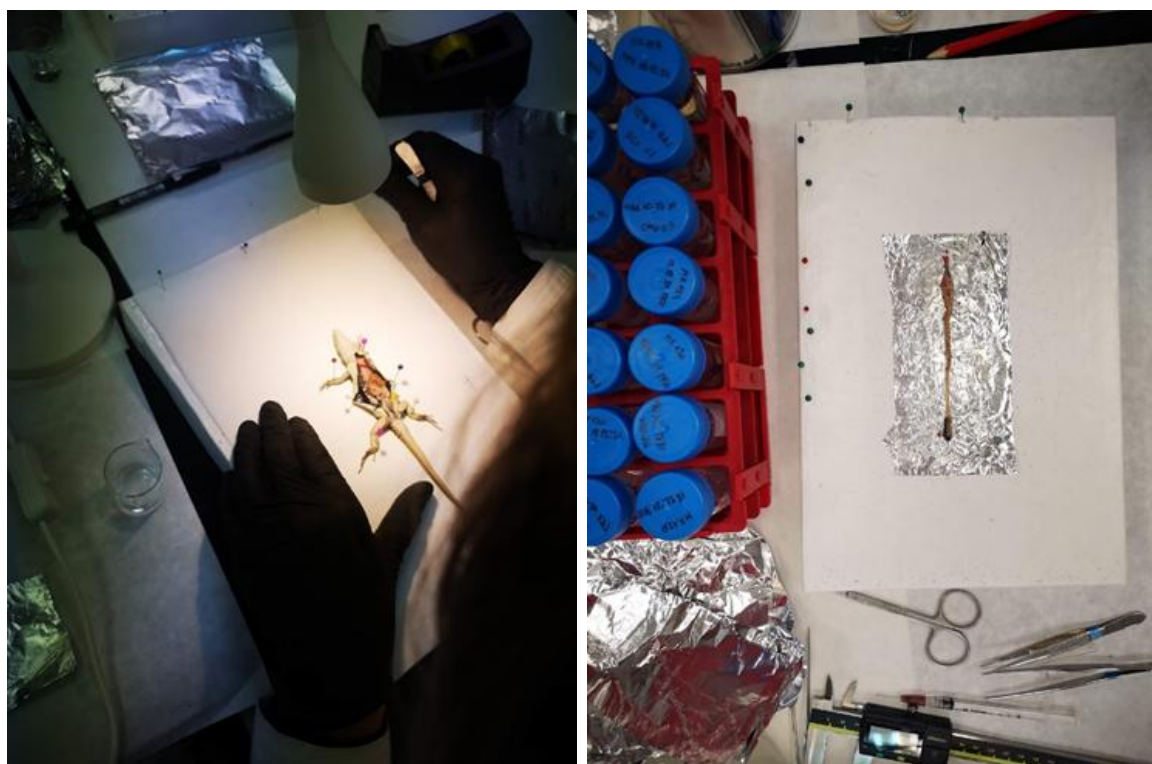
Serum je nakon prikupljanja spremljen u označene mikroepruvete te zaleđen na -80°C , nakon čega smo pristupili prikupljanju uzoraka probavnih organa. Izdvojen je probavni sustav van tijela guštera (želudac, crijevo i cekum) (Slika 10.) te je isti izmjeren pomoću digitalnog kalipera. Potom je probavni sustav podijeljen te je svaki dio probavnog sustava odvojeno spremljen u mikroepruvete.

Želudac i tanko crijevo svaki zasebno prvobitno su pohranjeni u hladni fiksativ Formol-kalcij na 4°C na 24 h, a nakon toga su prebačeni u hladnu otopinu 30% saharoze, arapske gume

Materijali i metode

i destilirane vode te pohranjeni na 4 °C, kako bi se očuvala morfologija tkiva iz kojih smo kasnije izradili trajne histološke preparate.

Otopinu saharoze i arapske gume pripremili smo tako da smo u 100 mL destilirane vode dodali 30 grama saharoze. Otopinu smo cijelo vrijeme miješali magnetnom miješalicom te postupno dodavali 1 g arapske gume. Nakon pripreme otopina je stajala u hladnjaku i hladna se dodavala u mikroeprovete kako bi što uspješnije sačuvala uzorke.



Slika 10. Uzorkovanje probavnog sustava guštera (lijevi panel) te izolirano probavilo guštera (desni panel) (foto Brižić, 2021.).

3.3. Kemikalije i pribor

3.3.1. Kemikalije potrebne za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

Kemikalije korištene za pripremu mobilne faze:

- kloroform (Honeywell Riedel-de HaënTM, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- acetonitril (Honeywell Riedel-de HaënTM, Njemačka)

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)
- L-triptofan, HPLC čistoće (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 4-hidroksi-3-metoksifeniloktena (homovanilična) kiselina (Sigma Aldrich, Njemačka)

Kemikalije korištene za ekstrakciju:

- natrij hidroksid (NaOH) u granulama (Merck)
- metanol MeOH (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- diklormetan (DCM) (Honeywell, Njemačka)
- dušik (Messer)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

3.3.2. Tehnička pomagala i pribor za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (HPLC)

- sustav HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, SAD):
 - kvaterna pumpa Agilent G7111B
 - injektorski modul Agilent Q7129A s petljom za ubrizgavanje od 100 µL
 - UV-DAD detektor Agilent Q7115A
- analitička kolona Kromasil 100-5-C18 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm) s pretkolonom Kromasil 100-5-C18 (12.5 mm × 4.6 mm, 5 µm)
- centrifuga Micro 21 R (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- vortex genius 3 (IKA, Njemačka)
- vortex LLG labware (uniTEXER, Njemačka)

Materijali i metode

- mješalica IKA®KS 130 basic (IKA, Njemačka)
- digitalna vaga, EG 220-3NM, d = 0,001 g: 220 g (Kern, Njemačka)
- uparivač sa strujom dušika REACTI-THERM I#TS-18822 (Thermo Scientific, Velika Britanija)
- automatska pipeta (HandyStep electronic, BRAND, Njemačka)

3.3.3. Kemikalije i pribor korišteni za analizu proteina

- Pierce BCA Protein kit (23225-23227; ThermoFisher Scientific)
- SPECTROstar Nano čitač mikrotitarskih pločica (BMG Labtech, Njemačka)
- epruvete
- mikropločice

3.3.4. Kemikalije korištene za fiksaciju i čuvanje tkiva

- Fiziološka otopina (Braun)
- Formol kalcij (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Saharoza (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Arapska guma (Sigma Aldrich, Njemačka)
- Destilirana voda

3.3.5. Kemikalije i pribor potrebni za histološku obradu tankog crijeva

3.3.5.1. Kemikalije korištene za uklop tkiva

- agaroz (Sigma)
- alkohol – etanol apsolutni (Grammol)
- kloroform (Carlo Erba Reagents S.A.S)
- Paraplast, Sakura Tissue-Tek Paraffin Wax ® (Processing Systems)

3.3.5.2. Kemikalije korištene za bojanje tkiva

- Ksilen (Biocen, BioGnost)
- alkohol 100% – etanol apsolutni (Grammol)
- dH₂O
- Hematoksilin H (BioGnost)

Materijali i metode

- Eozin 0,5% (BioGnost)
- Srebro-nitrat (SigmaAldrich)
- Amonijak (Grammol)
- Kanada balsam (BioMount C Biognost)

3.3.5.3. Pribor korišten za histološku obradu uzorka tankog crijeva

Tijekom svih faza izrade trajnih histoloških preparata korištena je standardna laboratorijska oprema: lateks rukavice, termo rukavice, pincete, skalpel, aluminijska folija, mikroeprovete raznih volumena, mikrotom (Shandon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific, USA), kistovi, vodena kupelj (GFL Typ 1052, Njemačka), predmetna i pokrovna stakalca, stalci za sušenje, staklenke za bojanja, elenmayerove tikvice, mješalica IKA®KS 130 basic (IKA, Njemačka), digitalna vaga, EG 220-3NM, d = 0,001 g: 220 g (Kern, Njemačka).

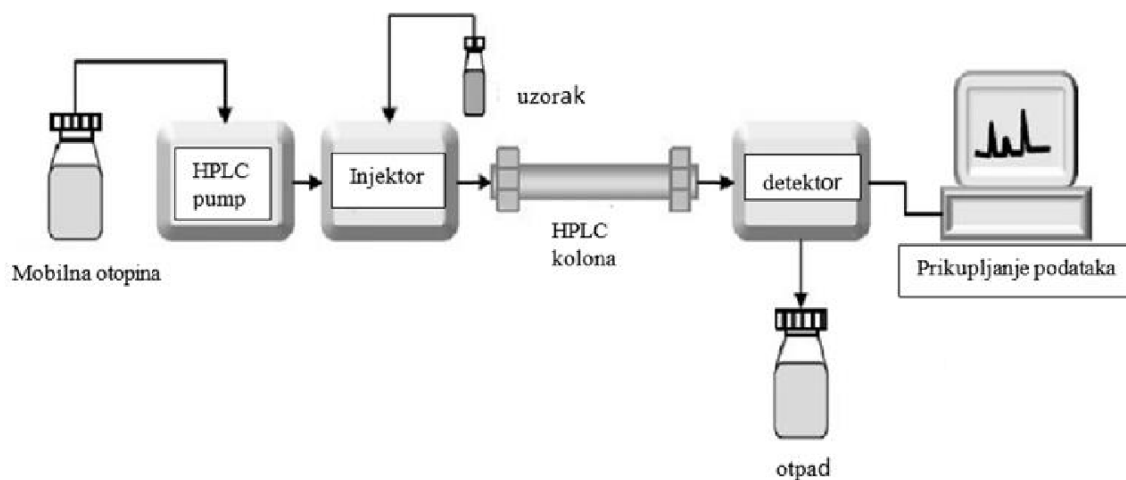
3.4. Metode

3.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Ruski botaničar Michail Semjonowitch Tswett početkom 20. stoljeća prvi je primijenio i opisao tehniku separacije otopine biljnih pigmenata, klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu kalcijevim karbonatom. Rezultat pokusa bio je uspješno odijeljeni sastojci na koloni u obliku vrpce zbog čega je ova metoda dobila ime kromatografija (grč. *chroma* = boja i *graphein* = pisati) (Altova i sur. 2022.). Važnost kromatografije 1952. prepoznata je i od strane odbora za Nobelovu nagradu. Zbog razvoja papirne kromatografije britanski botaničari A.J.P. Martin i R. L. M. Synger dobili su Nobelovu nagradu za kemiju. Tom tehnikom omogućeno je odjeljivanje sličnih kemijskih spojeva (npr. aminokiselina) iz smjese. Razvojem suvremene znanosti i tehnologije stvoreni su preduvjeti za odvajanje, analizu i pročišćavanje vrlo složenih smjesa s visokom osjetljivošću, jakom selektivnošću te visokom pouzdanosti.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High-performance liquid chromatography* - HPLC) temelji se na sistemu koji se sastoji od visokotlačne pumpe koja potiskuje mobilnu fazu (otapalo) s uzorkom preko stacionarne faze na kojoj se tvari razdvajaju i izlaze u različitim retencijskim vremenima, a njihov izlazak bilježi detektor. Kemijska interakcija stacionarne faze, uzorka i mobilne faze odredit će brzinu migracije i odjeljivanje tvari koje su sadržane u uzorku (Ambriović Ristov, 2007.).

Glavne prednosti HPLC metode su što ona istovremeno identificira tvari i određuje njenu količinu. U HPLC sustavu razlikuju se tri osnovna koraka: razdvajanje, identifikacija i kvantifikacija komponenata. Postupak započinje ubrizgavanjem uzorka (analita) otopljenog u odgovarajućem otapalu u struju mobilne faze. Korištena otapala moraju biti vrlo visoke čistoće kako bi se izbjegla kontaminacija i šum u mjerenju.



Slika 11. Shematski prikaz principa rada HPLC kromatografa. Preuzeto i prilagođeno iz Ali AH, 2022. (Mrdjen-Hodžić, 2024.) .

Visokotlačna pumpa osigurava konstantan i precizno kontroliran protok mobilne faze kroz sustav. Prije ulaska u glavnu kolonu, uzorak prolazi kroz pretkolonu koja zadržava eventualne nečistoće. Sama kolona stvara stabilno okruženje u kojem dolazi do interakcije između stacionarne i mobilne faze. Sastav mobilne faze, dimenzije kolone i gustoća pakiranja čestica stacionarne faze ključni su čimbenici koji određuju kvalitetu i učinkovitost separacije. Odvajanje se temelji na različitoj jačini interakcije pojedinih komponenti s fazom koja je nepokretna (Mrdjen-Hodžić, 2024.).

Za razdvajanje u tekućinskoj kromatografiji primijenjena je kromatografija obrnutih faza visoke djelotvornosti (engl. *reverse-phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). U ovakvom sustavu mobilna faza je polarna i sastoji se od vode ili pufera u kombinaciji s jednim ili više organskih otapala, dok je stacionarna faza nepolarna. Najčešće je stacionarna faza oblikovana od silikagela na čiju je površinu kemijski vezana nepolarna skupina. Budući da je sustav tako konfiguriran, iz kolone će najprije izaći najpolarniji sastojci uzorka, a zatim oni manje polarni. Zadržavanje polarnih komponenti je izraženije što je udio organskih otapala u mobilnoj fazi manji (Skoog *i sur.*, 2014.). Postupak razdvajanja može biti izokratan ili gradijentan. Kod gradijentnog razdvajanja omjer otapala u mobilnoj fazi se postupno mijenja tijekom analize, dok se kod jednostavnije izokrate metode koristi samo jedno otapalo ili stalna smjesa otapala.

3.4.1.1. Priprema standardnih otopina

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

Tablica 1. Priprema otopina standarda serotonina (5HT), triptofana (TRP), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5HIAA), 5-hidroksil-L-triptofan hidrata (5HTP).

Standard	Mr (g/mol)	Masa (mg)	Konačni volumen (mL)	konačna koncentracija (μM)	otapalo (prema SDS)
5HT	176,22	1,8	10	1000	0,5 M HCl
TRP	204,23	2,0	10	1000	0,5 M HCl
5HIAA	191,18	1,9	10	1000	70% EtOH
5HTP	220,22	2,2	10	1000	0,5 M HCl

3.4.1.2. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Prvi korak pripreme uzorka za HPLC analizu bio je delipidacija, koja je provedena tekućinsko-tekućinskom ekstrakcijom s kloroformom. 10-20 μL seruma i 40-30 μL HPLC vode (Honeywell Riedel-de HaënTM, Njemačka) (kako bi se olakšalo prikupljanje vodenih faza) pomiješano je s 300 μL kloroforma (Honeywell Riedel-de HaënTM, Njemačka), vorteksirano 10 sekundi i centrifugirano pri 5.000 x g na 4 °C tijekom 10 minuta kako bi se odvojile faze. Gornja vodena faza prikupljena je u novu epruvetu u koju je zatim dodano 300 μL acetonitrila (Honeywell Riedel-de HaënTM, Njemačka) za korak deproteinizacije. Uzorci su vorteksirani 10 sekundi, a zatim centrifugirani pod istim uvjetima kako bi se odvojio precipitat proteina. Supernatant je prenesen u bočice, evaporiran pod strujom dušika na 45 °C i rekonstituiran u 100 μL HPLC vode. Otopina je vorteksirana i prenesena u umetke za HPLC analizu. Precipitat proteina koji je ostao u epici, korišten je kasnije za analizu proteina u istom tom uzorku.

3.4.1.3. Metoda za kvantifikaciju 5HT i Trp tekućinskom kromatografijom

Koncentracija 5HT i Trp određena je pomoću HPLC uređaja Agilent 1260 Infinity II, povezanog s detektorom dijodnog niza (DAD). Kromatografske separacije provedene su na Kromasil 100-5-C18 koloni (150 mm × 4,6 mm, 5 µm) s predkolonom Kromasil 100-5-C18 (12,5 mm × 4,6 mm, 5 µm) na temperaturi od 22 °C. Mobilna faza sastojala se od 0,1% trifluorooctene kiseline (TFA) (Sigma-Aldrich, Njemačka) i acetonitrila s gradijentnim elucijskim sustavom (Tablica 3.) pri protoku od 1,5 mL/min.

Tablica 3. Kromatografski uvjeti korišteni za RP-HPLC analizu uzoraka seruma guštera

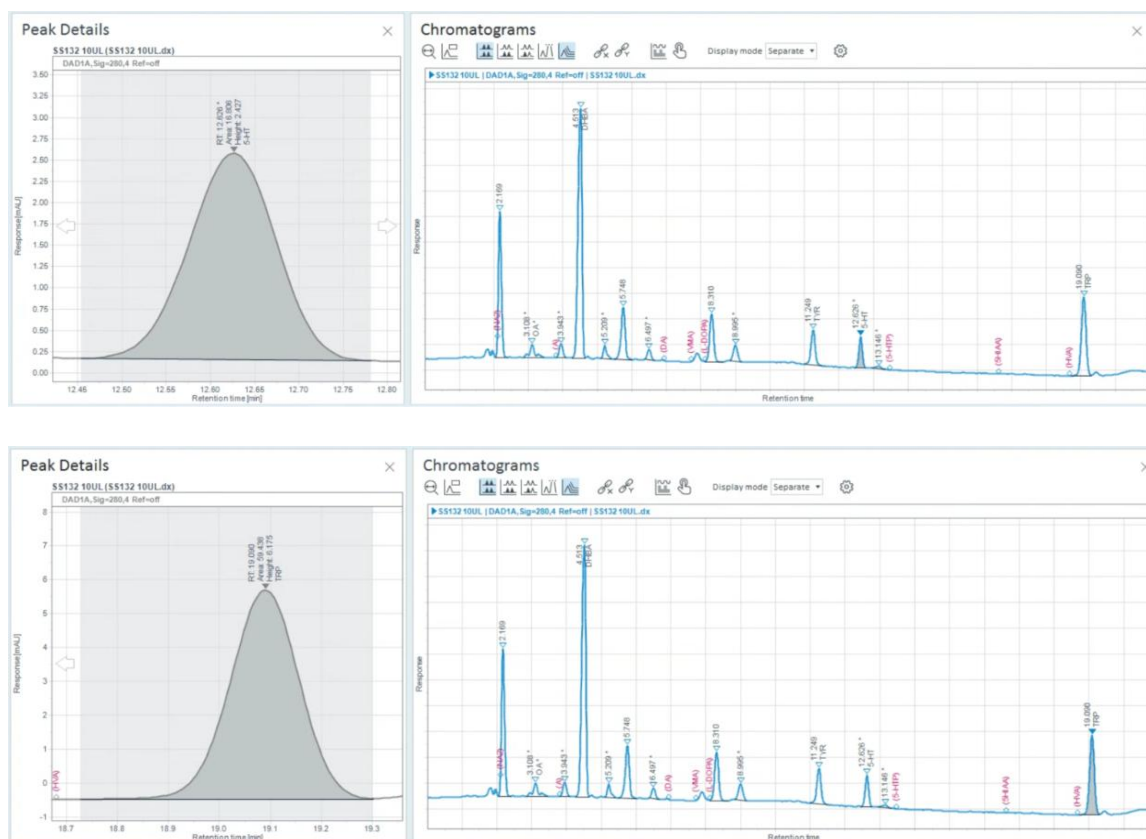
Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 150 mm x 4,6 mm)		
Pretkolona	Kromasil 100-5-C18 (5 µm; 10 mm x 3,0-4,6 mm)		
Mobilna faza A	0,1% trifluorooctena kiselina (TFA): pH ≈ 2,0		
Mobilna faza B	100% acetonitril		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A – 0,1 TFA (%)	Mobilna faza B Acetonitril (%)
	0	100	0
	8,00	97	3
	10,00	93	7
	17,00	86	14
	21,00	94	6
Volumen injektiranja	100,0 µL		
Protok	1,0 mL/min		
Vrijeme analize	21 min		
Ekvilibracija kolone (post run)	1 min		
Detekcija (UV/ViS)	280 nm		
Temperatura kolone	22 °C		

Materijali i metode

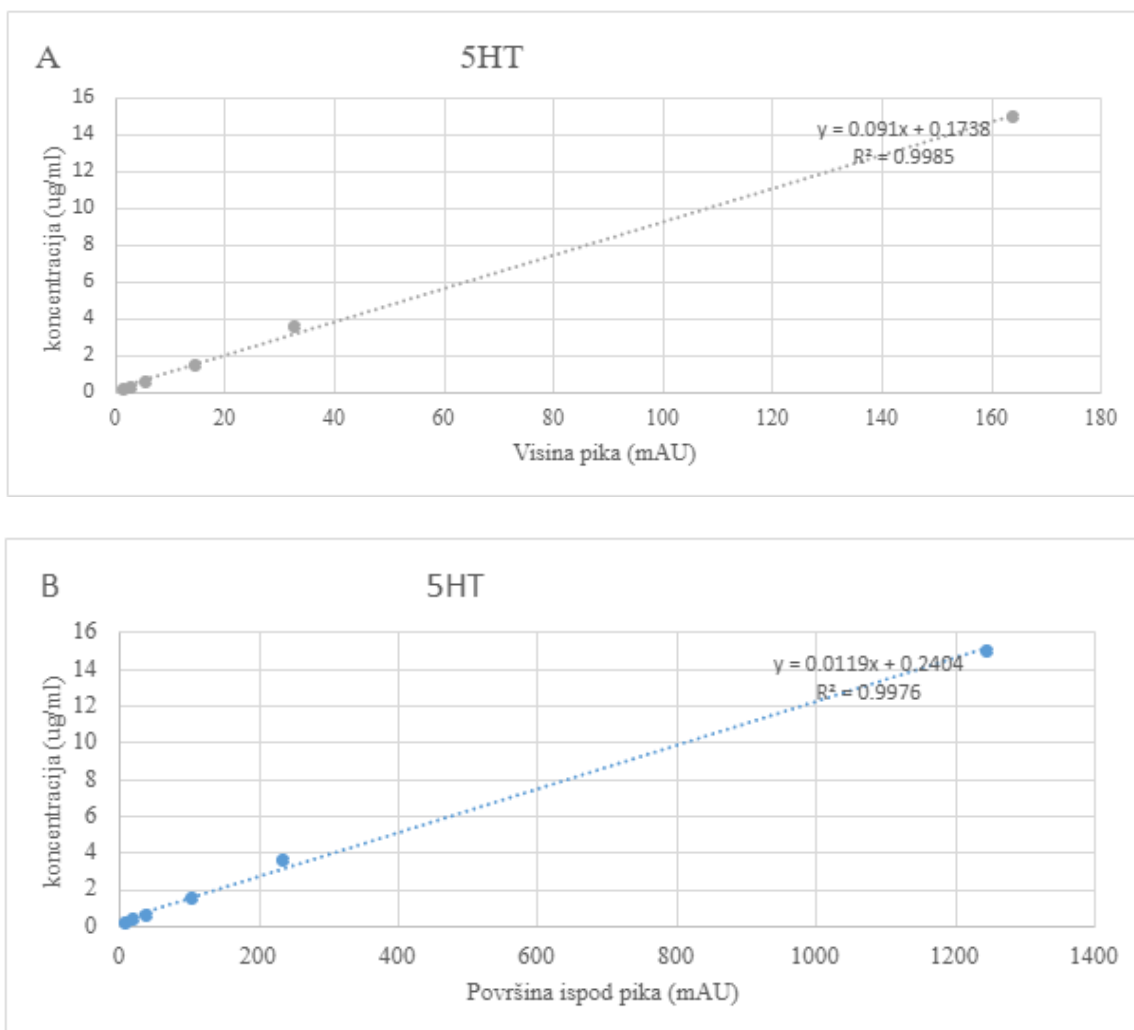
Volumen ubrizgavanja uzorka bio je 1000 μL , a pikovi su detektirani na 280 nm. Vrijeme trajanja metode bilo je 21 minuta. Površine vrhova analizirane su pomoću Agilent OpenLab CDS softvera. Krivulje kalibracije, koje opisuju ovisnost površine vrha o koncentraciji analita, napravljene su sa šest mješavina standardnih otopina (K1-K6) 5HT i Trp u koncentracijama: 15 $\mu\text{g/mL}$, 3,6 $\mu\text{g/mL}$, 1,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,6 $\mu\text{g/mL}$, 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 0,18 $\mu\text{g/mL}$. Koncentracije u uzorcima izračunate su kao μg analita po mL seruma, a kasnije normalizirane prema sadržaju proteina u serumu, koji je izmjeren s Pierce BCA Protein Assay Kit s Dilution-Free BSA Protein Standards (Thermo Scientific, SAD).

Metoda je validirana korištenjem kriterija selektivnosti, linearnosti i ponovljivosti. Selektivnost je definirana kao simetričan izgled i dobra separacija vrhova na kromatogramima (Slika 12.), bez preklapanja s pikovima drugih analita. Linearnost je određena izračunavanjem koeficijenta korelacije iz kalibracijskih krivulja šest standardnih otopina. Dobra linearnost definirana je kao koeficijent korelacije (R^2) $> 0,99$ (Slika 13. i 14.). Ponovljivost ili međudnevna varijabilnost testirana je usporedbom standarda između različitih dana i izražena kao relativna standardna devijacija (RSD) (Prilog 8.3. i 8.4.).

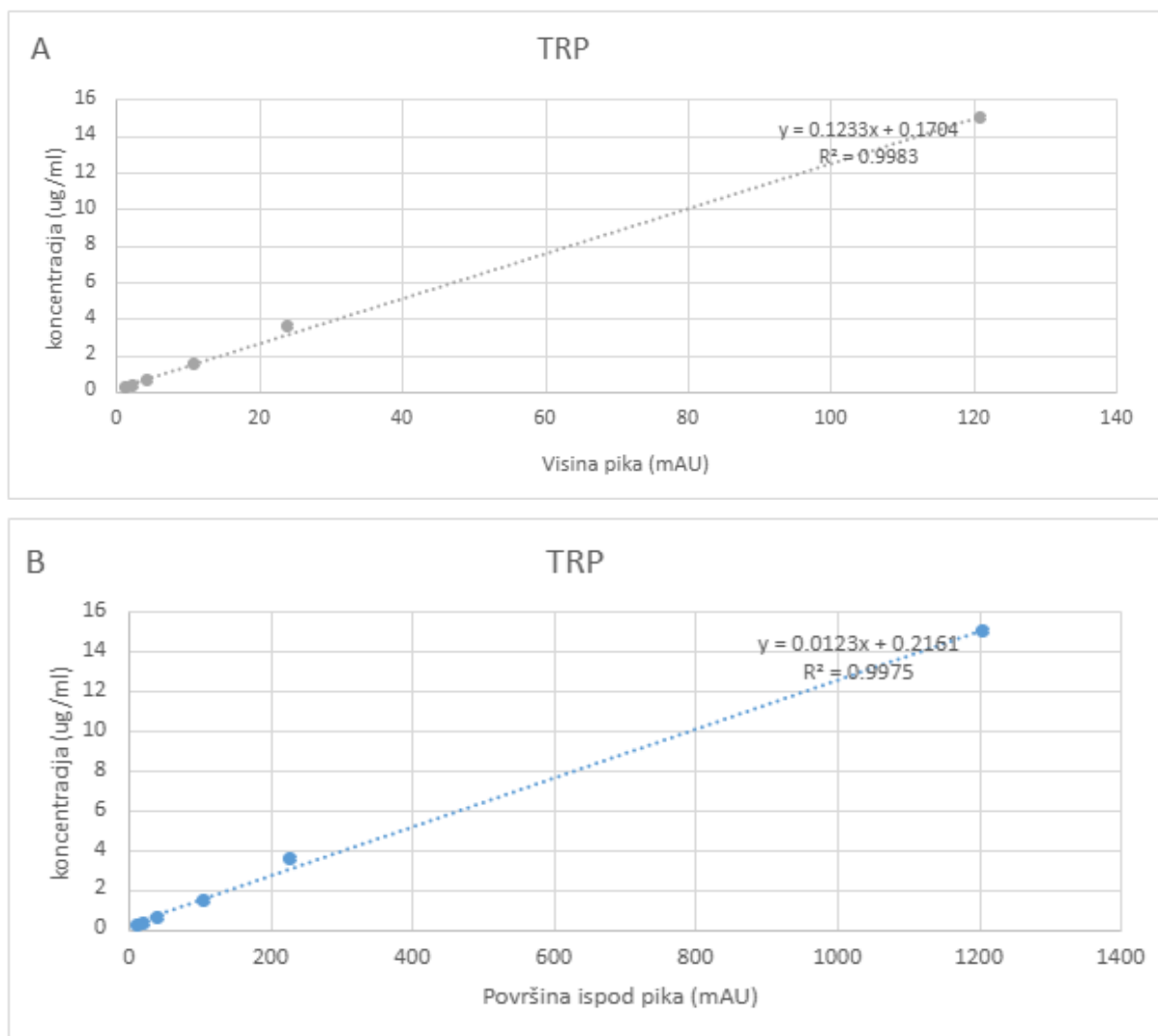
Materijali i metode



Slika 12. Kromatogram seruma – *Podarcis siculus* - ženka - Sinj – laboratorijske oznake **SS132 A**. Serotonin pik ; **B**. Triptofan pik.



Slika 13. Linearnost izračunata iz kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti visine pika (Slika A) i površine pika (Slika B) serotonina o koncentraciji standardnih otopina u koncentracijama 15 µg/mL, 3,6 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,18 µg/mL

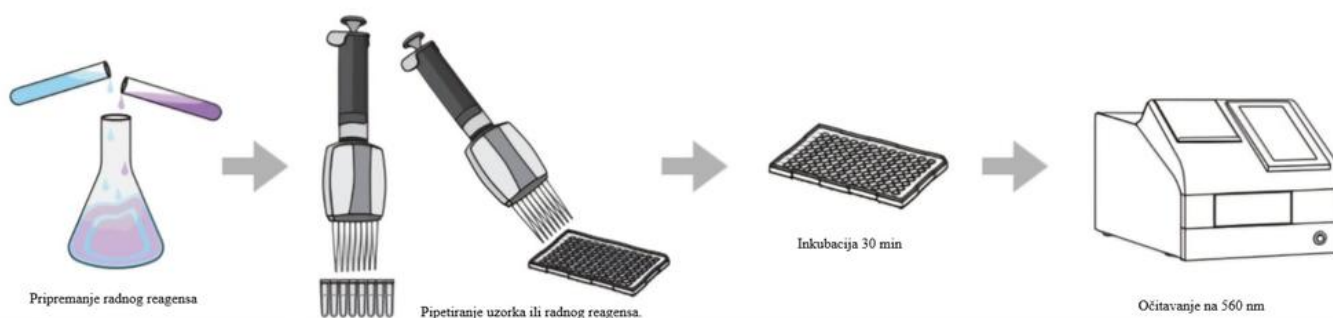


Slika 14. Linearnost izračunata iz kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti visine pika (Slika A) i površine pika (Slika B) triptofana o koncentraciji standardnih otopina u koncentracijama 15 µg/mL, 3,6 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,18 µg/mL

3.4.2. Analiza proteina

Analizu proteina izvršila sam na osnovi kolorimetrije pomoću kita Pierce BCA Protein Assay (23225-23227; ThermoFisher Scientific) koji se temelji na bicinoninskoj kiselini (BCA), a za cilj ima detekciju i kvantifikaciju ukupnog broja proteina. Ova metoda bazira se na kemijskoj redukciji $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^{1+}$ pomoću proteina u alkalnom mediju (biuretska reakcija) s vrlo osjetljivim i selektivnim kolorimetrijskim bojanjem. Ljubičasta boja koja nastane označava da je došlo do reakcije između kationa bakra Cu^{1+} sa dvije molekule BCA kiseline. Taj novonastali kompleks topljiv je u vodi i pokazuje snažnu apsorbciju na 562 nm koja je gotovo linearno rastuća s koncentracijama proteina unutar širokog raspona (20-2000 μL).

Početak pripreme uzoraka za analizu proteina u prvih nekoliko koraka je zajednički s pripremom uzorka za HPLC. Kada sam dobila nataložene proteine u epici, njih sam nastavila koristiti za analizu proteina, a vodena faza je korištena za HPLC kako je to i prethodno opisano. Na proteine kao otapalo dodajemo 200 μL H_2O te 2 μL NaOH 1 mol, vorteksiramo otopinu te je grijemo 5 min na 37 °C te ponovno vorteksiramo. Nakon toga pripremila sam standarde i radne otopine prema protokolu (Tablica 4.) Zatim sam pripremila master mix u omjeru 50:1 A:B otopine iz kita. Kada sam završila s pripremom svih otopina, započela sam pipetiranje u mikropločicu. U svaku jažicu dodajemo standardne otopine (A-I) i uzorke (10 μL), a zatim i 200 μL master Mixa u svaku jažicu. Po završetku popunjavanja mikroploče, mikroploču sam stavila 30 minuta na inkubaciju na 37 °C (Slika 15). Nakon inkubacije, mikroploču očitavam na spektrofotometar na apsorbciji od 560 nm.



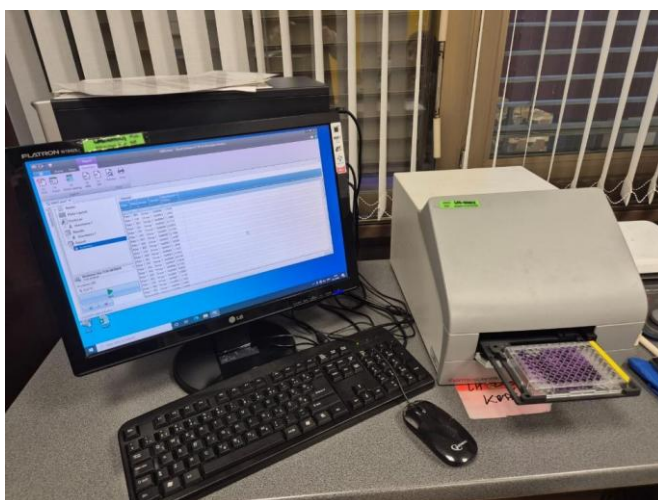
Slika 15. Shematski prikaz principa rada prilikom određivanja ukupne razine proteina. Prilagođeno prema fotografiji iz službenog protokola iz kita (Mrdjen-Hodžić, 2024.)

Materijali i metode

Tablica 4. Priprema standarda i radnih otopina za analizu proteina i koncentracija BSA prema kojoj je utvrđena standardna krivulja.

Viala	Volumen diluenta	Volumen BSA	Finalna BSA konc.
A	0	300 μL početne koncentracije	2000 $\mu\text{L/mL}$
B	125	375 μL početne koncentracije	1500 $\mu\text{L/mL}$
C	325 μL	325 μL početne koncentracije	1000 $\mu\text{L/mL}$
D	175 μL	175 μL stoka B diluenta	750 $\mu\text{L/mL}$
E	325 μL	325 μL stoka C diluenta	500 $\mu\text{L/mL}$
F	325 μL	325 μL stoka E diluenta	250 $\mu\text{L/mL}$
G	325 μL	325 μL stoka F diluenta	125 $\mu\text{L/mL}$
H	400 μL	100 μL stoka G diluenta	25 $\mu\text{L/mL}$
I	400 μL	0	0

Na osnovi serije razrjeđenja poznate koncentracije proteina iz kita odredila sam standardnu krivulju prema kojoj sam kvantificirala nepoznatu ukupnu koncentraciju proteina u uzorku.



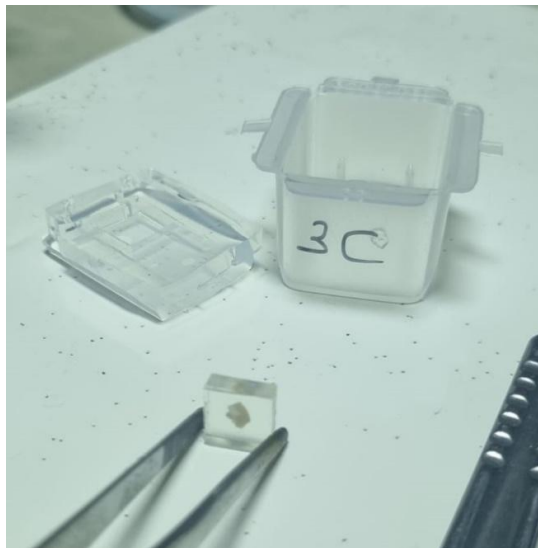
Slika 16. Očitavanje apsorbancije proteina (foto Brižić 2024.)

3.4.3. Histomorfometrijska analiza probavnog sustava

3.4.3.1. Dehidracija, uklapanje i rezanje tkiva

Za potrebe histološke analize tankog crijeva, odabrani su fragmenti crijeva koji su podvrgnuti procesu pripreme za izradu trajnih histoloških preparata korištenjem parafinske tehnike. Ova metoda omogućuje uklopiti fiksirano tkivo u blok parafina koji se može tanko narezati i obojiti histološkim bojama koje ističu građevne strukture tkiva koje promatramo pod svjetlosnim mikroskopom.

S obzirom da se radi o vrlo malim, izuzetno sitnim komadićima tkiva, kako bi preparati bili što bolje napravljeni i postavljeni u prikladnoj orijentaciji, preparati su preduklapani u 1% otopinu agaroze. U plastične jažice stavljeno je nekoliko kapi otopine 1% agaroze temperature 50 °C, te je nakon toga komadić crijeva okomito postavljen na dno jažice. Zatim je dodano još 1% otopine agaroze u plastičnu jažicu što ima za zadaću pozicionirati svaki uzorak na isti način (Slika 17.), a to kasnije omogućuje lakše manevriranje sa sitnim uzorkom u nastavku procesa (Santana *i sur.*, 2023.).



Slika 17. Fotografija uklopljenog dijela tankog crijeva u agaroznom bloku (foto Brižić 2024.)

Nakon skrućivanja agaroze na sobnoj temperaturi oko tkiva tankog crijeva, agarozni blokovi stavljeni su u seriju rastućih koncentracija etanola (Tablica 5.), kako bi se postupno provodila dehidracija tkiva, čime se smanjuje oštećenje tkiva (Mescher, 2013.).

Tkiva držim u kloroformu preko noći, dok istovremeno paraplast stavljam na taljenje u termostat na 60 °C. Za sve ukope korišten je Sakura Tissue-Tek Paraffin Wax ® (Processing Systems, Njemačka). U posljednje vrijeme kao uklopni medij češće se koristi paraplast, umjesto parafina. Paraplast je smjesa parafina i plastičnih polimera koji nije topljiv u vodi ni alkoholu te ima precizniju točku taljenja, što diže kvalitetu trajnog histološkog preparata. Paraplast djeluje kao privremeni medij čija je zadaća stabilizacija tkiva radi uspješnog preciznog rezanja preparata. Kako bi paraplast mogao ući u tkivo i prožeti ga, prethodno sam ga provela postupak dehidracije, prema gore opisanom postupku.

Tablica 5. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u postupku dehidracije tkiva

KEMIKALIJA	Trajanje
70%-tni alkohol 1	Min.48 h
70%-tni alkohol 2	1 h
80%-tni alkohol	1 h
96%-tni alkohol	1 h
100%-tni alkohol 1	1 h
100%-tni alkohol 2	1 h
kloroform	Min.12 h

Cijeli postupak uklanjanja u paraplast provodimo u termostatu na 60 °C kako bi spriječili hlađenje, a time i stvrdnjavanje paraplata. Ova temperatura također omogućuje isparavanje kloroforma, što omogućava paraplastu da prožme cijelo tkivo (Mescher, 2013.). Koraci uklanjanja u paraplast prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Postupak uklapanja tkiva u paraplast.

KEMIKA LIJA	Trajanje
Kloroform : paraplast (1:1)	45-60 min
Paraplast 1	45-60 min
Paraplast 2	45-60 min
Čisti paraplast iz dispenzera	Ulijeva se u lađice i ostavlja na sobnoj temperaturi do stvrdnjavanja

Tkiva uklopljena u blokove ostavljam da se hlade na sobnoj temperaturi preko noći, nakon čega slijedi proces rezanja parafinskih blokova na rotacijskom mikrotomu (Shandon Finesse 325, Thermo Fisher Scientific, USA; (Slika 18). Blokovi se režu na debljinu od 6-7 mikrona, a dobiveni rezovi se kistom prenose na vodenu kupelju zagrijanu na 40 °C na izravnavanje.

Rezove zatim stavljamo na predmetno stakalce te ostavljam na sobnoj temperaturi kako bi se osušili. Na svako predmetno stakalce nanosim 3 ili 4 reza, te za svaki uzorak radim minimalno 5 stakalaca, koje ću bojati u dvije tehnike bojanja.



Slika 18. Rezanje tkiva tankog crijeva uklopljenog u parafinski blok na rotacijskom mikrotomu (lijevi panel); izravnavanje histoloških rezova na vodenoj kupelji (desni panel) (foto Brižić 2024.)

3.4.3.2. Bojanje

3.4.4.3.1. Deparafiniranje i rehidracija

Za istraživanje sam koristila dvije tehnike bojanja, prilagođene vrsti tkiva i analizi. Prije samog provođenja bojanja, tkivo sam deparafinizirala i rehidrirala. Proces deparaplastiranja i bojanja radi se u digestoru radi zaštite od hlapljivih i/ili opasnih kemikalija u staklenim posudicama koji imaju ugrađen stalak za umetanje uspravno postavljениh predmetnih stakalaca. Proces deparaplastiranja izvodi se uranjanjem predmetnih stakalaca u niz otopina na određeno vrijeme (Tablice 7. i 8.) kako bi se iz tkiva uklonio paraplast.

Tablica 7. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu deparafiniranja i rehidracija uzoraka za HE bojanje

KEMIKA LIJA	Trajanje za HE bojanje
Ksilen 1	2 min
Ksilen 2	2 min
Ksilen 3	2 min
100%-tni alkohol 1	5 min
100%-tni alkohol 2	3 min
96%-tni alkohol	2 min
Destilirana voda	2 min

Tablica 8. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu deparafiranja i rehidracije uzoraka za Masson Fontana bojanje

KEMIKA LIJA	Trajanje za HE bojanje
Ksilen 1	15 min
Ksilen 2	15 min
100%-tni alkohol	5 min
96%-tni alkohol	5 min
80%-tni alkohol	5 min
70%-tni alkohol	5 min
deH ₂ O 1	5min
de H ₂ O 2	5 min

3.4.4.3.2. Bojanje hematoksilinom i eozinom (HE)

Kao rutinsko histološko bojanje radili smo bojanje hematoksilinom i eozinom s ciljem utvrđivanja histološke građe te što boljeg razlučivanja različitih struktura i tkiva koje smo koristili u histomorfometrijskoj analizi.

Hematoksilin (H) se oksidira u anionski hematein, koji se zatim veže na metalni kation ili drugi fiksator, dobivajući pozitivan naboj i vežući se za anionska područja u stanici. Različite boje postizemo ovisno o vrsti soli metala koja se koristi kao fiksator hematoksilina (Suvarna *i sur.*, 2013.). Koristila sam Mayerov hemalaun (HEMH-OT, BioGnost) s aluminijevim solima, koji daje crvenu boju jezgrama, a nakon izlaganja alkalnoj otopini prelazi u plavu do crnu boju. Eozin (E), kao anionska boja, veže se za pozitivno nabijene molekule, stvarajući različite nijanse od roze do crvene boje u citoplazmi i vlaknima vezivnog tkiva (Suvarna *i sur.*, 2013.). Korištene kemikalije uključuju: ksilen, etanol (različitih koncentracija), destiliranu vodu, Hematoksilin H (BioGnost) te Eozin Y 0,5%-tni alkoholni (BioGnost). Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu HE bojanja prikazane su u Tablici 9.

Tablica 9. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu HE bojanja

KEMIKA LIJA	Trajanje
Hematoksicilin H	3 min
Kratki uron u destiliranu vodu	-
Tekuća voda	3 min
Kratki uron u destiliranu vodu	-
96%-tni alkohol	30 sek
Eozin 0,5%	20 sec

Nakon kratkog ispiranja boja u vodi, tkivo smo ponovno dehidrirali u rastućim koncentracijama alkohola, posvjetljuje se u ksilolu (Tablica 10.) i na koncu uklopi u kanadski balzam te ostavi na sušenje u digestoru minimalno 2 dana. Nakon toga preparati su spremni za mikroskopiranje.

Tablica 10. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu dehidracije, prosvjetljivanja i uklopa tkiva

KEMIKA LIJA	Trajanje
96%-tni alkohol 1	10-15 urona
96%-tni alkohol 2	10-15 urona
100%-tni alkohol 1	10-15 urona
100%-tni alkohol 2	10-15 urona
100%-tni alkohol 3	10-15 urona
Ksilen 3	2 min
Ksilen 4	2 min

3.4.4.3.3. Bojanje Masson Fontana

Metode koje se koriste u istraživanju neuroendokrinih stanica probavnog sustava su visoko specifične i osjetljive radioimunološke, imunocitokemijske i fluorescencijsko-histokemijske jer daju pouzdane podatke o rasodjeli stanica i lokalizaciji staničnih produkata (Lacković-Venturin, 1992.).

U vrijeme otkrivanja, neuroendokrine stanice ne dobivaju nazive po izlučenim hormonima već po svojstvima bojenja te su nazvane: enterokromafine, argenta fine i argirofilne stanice. Razlika između potonje dvije nije vidljiva svjetlosnim mikroskopom već samo histokemijskim postupcima (Forssmann *i sur.*, 1969.). Za razliku od HE bojanja, Masson Fontana metoda bojanja jasno prikazuje razliku enteroendokrinih stanica od ostalih stanica sluznice tankog crijeva i zbog tog je to druga metoda koju smo odabrali za bojanje u ovom istraživanju. Cilj je vidjeti enterokromafine stanice jer su one glavni izvor perifernog serotonina u probavnom sustavu. Praćenje broja enterokromafinih stanica omogućuje nam uvid u potencijalne promjene u serotoninskom sustavu koje mogu biti povezane s fiziološkim stanjima, spolom, vrstom ili okolišnim čimbenicima. U ovom istraživanju kvantifikacija enterkromafinih stanica poslužila

Materijali i metode

je kao pokazatelj periferne serotoninske aktivnosti i potencijalne razlike u funkcionalnoj organizaciji probavnog sustava između analiziranih populacija.

Masson Fontana metoda bojanja temelji se na reakciji srebra (Grimelius, 2004.). Najprije je potrebno otopiti 5 g srebrnog nitrata u 100 mL destilirane vode. Srebrni nitrat je u obliku blijedih sitnih kristalića te se brzo otapa u predviđenom volumenu destilirane vode. Zatim se u Erlenmeyerovu tikvicu odvoji 95 mL otopine srebrnog nitrata i u nju postepeno dokapava koncentrirana otopina amonijaka (Kemika) dok ne nastane smeđi talog. Prilikom dokapavanja tikvica je postavljena na magnetsku miješalicu radi jednostavnosti postupka. Nakon što je nastao smeđi talog dokapavao se preostali volumen otopine srebrnog nitrata (5 mL) sve dok nije nestao smeđi talog i pojavilo se zamućenje otopine. Tako svježe pripremljena otopina spremna je za korištenje narednih tjedan dana. Pritom je važno držati otopinu u hladnjaku (Grimelius, 2004.).

Otopina srebrnog nitrata zagrijana je prije samog bojanja (sat vremena u termostatu na 60 °C). Stakalca koja su prethodno deparafinirana i rehidrirana po postupku opisanom u poglavlju 3.4.4.2.1. slažemo u staklene posudice za bojanje i držimo u termostatu 90 minuta na 60 °C. Vrijeme impregnacije po potrebi se može produžiti, ovisno o jačini žuto smeđe boje tkiva. Nakon impregnacije srebrom, stakalca idu u proces ispiranja, dehidracije u seriji alkohola rastućih koncentracija te na kraju uranjanja u ksilol (Tablica 11.). Na kraju postupka radimo uklop u kanadski balzam te ostavimo na sušenje u digestoru minimalno 2 dana. Nakon čega su preparati spremni za mikroskopiranje.

Tablica 11. Vremensko trajanje i kemikalije korištene u procesu dehidracije, posvjetljivanja

KEMIKALIJA	Trajanje
deH ₂ O	5 min
deH ₂ O	5 min
70%-tni alkohol	5 min
80%-tni alkohol	5 min
96%-tni alkohol	5min

Materijali i metode

100%-tni alkohol	5 min
Ksilen 3	5 min
Ksilen 4	5 min

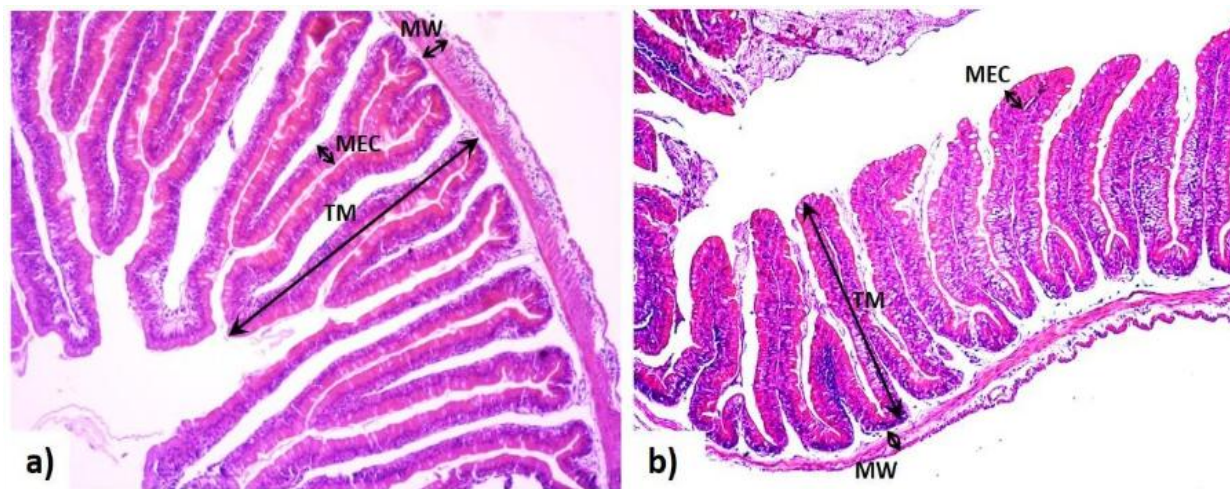
3.4.3.3. Histomorfometrija

Histomorfometrijska mjerenja izvedena su pomoću svjetlosnog mikroskopa (*Nikon Eclipse E600*) s povećanjima 10x, 20x, 100x, 200x i računalnog sustava za analizu slike koji se sastoji od digitalne kamere (*AxioCamErc 5s, Zeiss*) i ZENlite 2.1 softvera (*Carl Zeiss Microscopy, GmbH, Jena, Njemačka*) (Slika 19.). Sva histološka mjerenja i brojanja provedena su slijepo, bez prethodnog znanja o vrsti, spolu ili mjestu ulova. Ispitani uzorci bili su optimalni za morfometrijsku analizu, s očuvanim epitelom sluznice i dobro sačuvanom staničnom cjelovitošću.



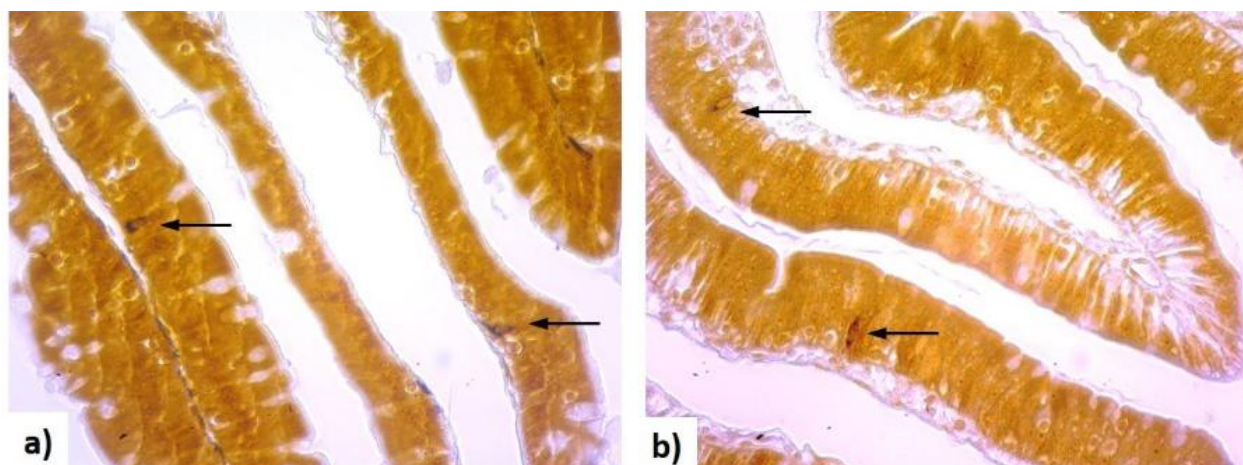
Slika 19. Mikroskop s kamerom i računalo na kojem su trajni histološki preparati fotografirani i morfometrijski obrađeni (foto Brižić 2024.)

Kako bismo istražili moguće razlike u histološkim strukturama crijeva, pri povećanju 100x na poprečnom presjeku, mjerili smo debljinu *tunica mucosa* (TM), visinu epitelnih stanica sluznice (LE; *lamina epithelialis*) te debljinu vanjskog mišićnog sloja (MW; *tunica muscularis*) na HE preparatima u 3 nasumično odabrana ispitna polja pri povećanju za svaku jedinku (Slika 20.). Zatim za svaki uzorak izračunala sam srednju vrijednost po uzorku.



Slika 20. Poprečni rezovi jejunuma guštera obojan HE metodom - tri histomorfometrijske mjere (TM – mukozni sloj lat. *tunica mucosa*; LE – epitelne stanice sluznice lat. *lamina epithelialis*; MW – mišićni sloj lat. *tunica muscularis*) zabilježene u središnjem dijelu tankog crijeva (jejunum) za dvije analizirane vrste guštera a) *Podarcis melisellensis*, mužjak; b) *P. siculus*, mužjak (povećanje: 100×) (foto Brižić 2024.).

Masson Fontana bojanje iskorišteni su za ispitivanje mogućih razlika između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis* te spolnog dimorfizma, u broju enterkromafinih stanica u sloju crijeвне sluznice. Analizirali smo dva nasumično odabrana, ali međusobno udaljena presjeka crijeva, izmjerili površinu jedne četvrtine svakog presjeka sluznice crijeva (referentni prostor) i prebrojali broj pozitivno obojenih stanica specifičnom histokemijskom Masson–Fontana metodom (Slika 21.). Te su vrijednosti izražene kao prosječan broj MF pozitivnih stanica po mm² referentnog prostora. U slučaju pozitivne reakcije u limfocitima i eritrocitima, takve stanice nisu uključene u brojanje.



Slika 21. Histološki presjeci središnjeg dijela tankog crijeva (jejunum) bojani Masson – Fontana tehnikom, sa strelicama koje označavaju enterokromafine (stanice koje proizvode serotonin) raspršene među epitelne stanice koje oblažu lumen probavnog sustava: a) *Podarcis melisellensis*, mužjak; b) *P. siculus*, mužjak (povećanje: 400×).

Budući da relativne duljine unutar probavnog sustava mogu biti nepouzdana zbog različitih tjelesnih oblika i veličina, a ove se dvije vrste razlikuju i po duljini i po tjelesnoj masi, koristili smo Zihlerov indeks (ZI), koji uzima u obzir i duljinu crijeva i tjelesnu masu (Zihler, 1981).

$$ZI = \frac{\text{duljina crijeva}}{\sqrt[3]{10 \times \text{tjelesna masa}}}$$

Sve datoteke pohranjene su na kompjuteru u Carl Zeiss Image (.dzi) formatu, dok su sva mjerenja i vrijednosti spremljene u Carl Zeiss (.cz) i unesena u zajedničku Excel tablicu.

3.4.4. Statistička obrada podataka

Podaci su obrađeni pomoću softvera GraphPad Prism 10.4.2 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, SAD) i R verzije 4.3.2 (R Core Team, 2023). Za sve podatke normalnost distribucije provjerena je Shapiro-Wilkovim testom. Originalne ili transformirane vrijednosti analizirane su pomoću dvosmjernog ANOVA testa s vrstom i spolom kao glavne kategorije. Za *post hoc* analize korišten je Šidákov test višestrukih usporedbi. Analize trostrukog ANOVA testa uključivale su vrstu, spol i lokaciju kao kategorije. Razina značajnosti postavljena je na 0,05 (dvosmjerna *p* vrijednost). Tijekom obrade neki uzorci su izgubljeni, dodatno neke su vrijednosti prilikom statističke analize isključeni (metodom ROUT), a konačan broj uzoraka na

kojima su provedene statističke analize naveden je u Tablici 12. Vrijednosti su prikazane u slikama kao medijan s interkvartilnim rasponom, a u tekstu kao srednja vrijednost i standardna devijacija.

Korelacija je statistička mjera koja opisuje jačinu i smjer povezanosti između dviju varijabli. Ako se vrijednosti jedne varijable povećavaju dok se i druge povećavaju, korelacija je pozitivna, a ako jedna raste dok druga pada, korelacija je negativna. Spearmanov koeficijent korelacije (Spearmanov rho) koristi se kada podaci nisu nužno normalno raspodijeljeni ili kada radimo s ordinalnim podacima. On se temelji na rangovima vrijednosti, a ne na njihovim stvarnim numeričkim vrijednostima, što ga čini otpornijim na odstupanja i nelinearne odnose. Vrijednosti rho kreću se od -1 (savršena negativna korelacija) do +1 (savršena pozitivna korelacija), dok vrijednost 0 označava odsustvo monotone povezanosti.

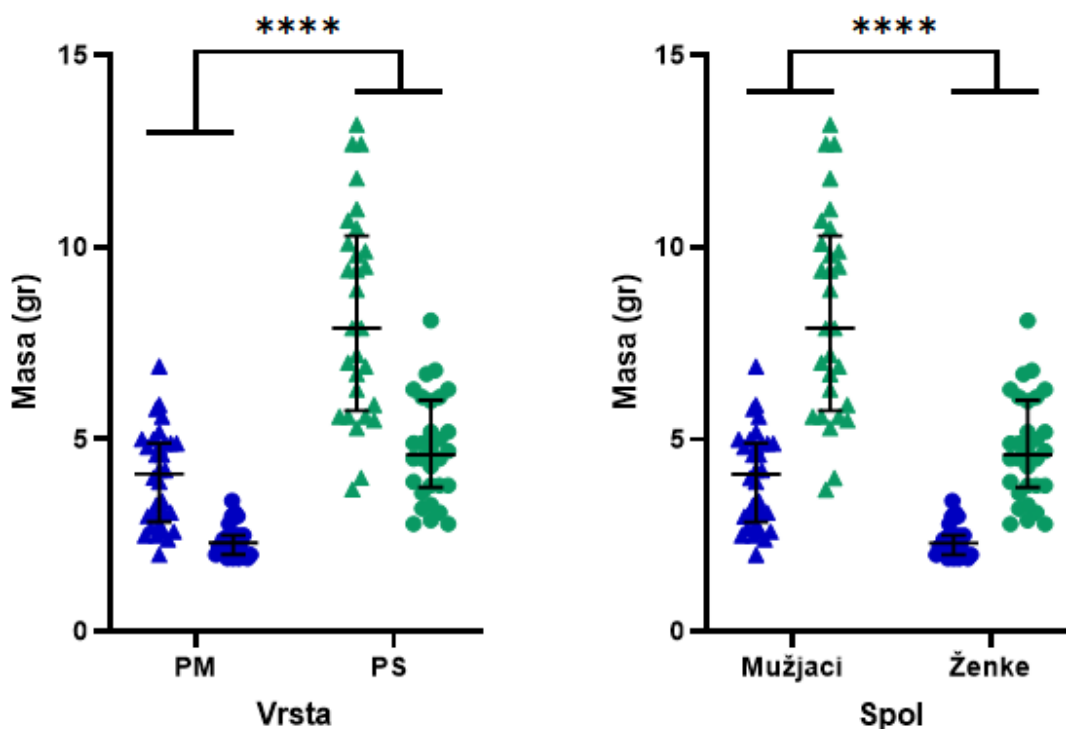
Parametri za koje je izračunat Spearmanov koeficijent korelacije obuhvaćaju: morfometrijske karakteristike (masa, SVL, duljina probavila, duljina crijeva) s razinama triptofana i serotonina u serumu te histomorfometrijskim mjerama (mukozni sloj (*Tunica mucosa*; TM), epitelni sloj (*Lamina epithelialis*; LE), mišićnog sloja (*Tunica muscularis*; MW) i brojem enterokromafinih stanica).

4. REZULTATI

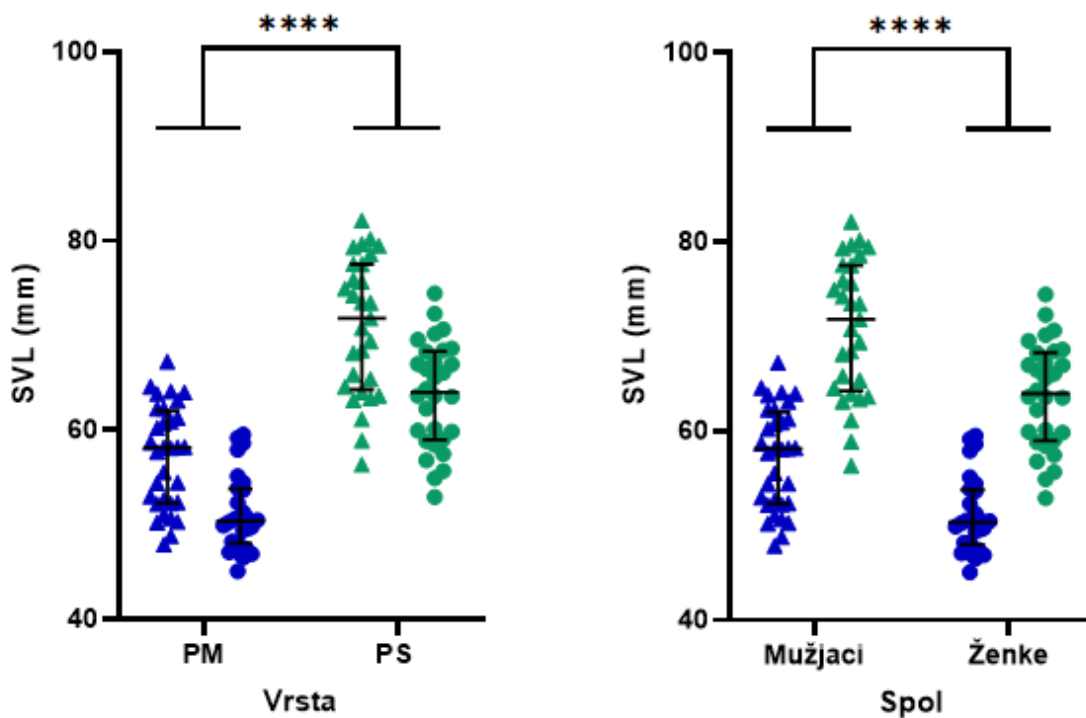
4.1. Morfometrija

4.1.1. Masa i duljina tijela guštera

Vrste i spolovi razlikovali su se u morfološkim mjerama, kako je prethodno opisano za ove dvije vrste (Grbac i Bauwens, 2001.). Jedinke vrste *Podarcis siculus* bile su veće od jedinki vrste *P. melisellensis*, a mušjaci od ženki, u svim mjerenim parametrima (Tablica 11.). Konkretno, mušjaci *P. siculus* imali su veću masu tijela i veći SVL ($8,3 \pm 2,7$ g i $70,9 \pm 7,2$ mm) u odnosu na ženke iste vrste ($4,7 \pm 1,4$ g i $63,8 \pm 5,6$ mm); dok su mušjaci *P. melisellensis* ($4,0 \pm 1,2$ g i $57,2 \pm 5,4$ mm) bili slični ženkama *P. siculus*, ali veći od ženki *P. melisellensis* ($2,4 \pm 0,4$ g i $51,1 \pm 4,0$ mm) (Slika 22. i 23.).

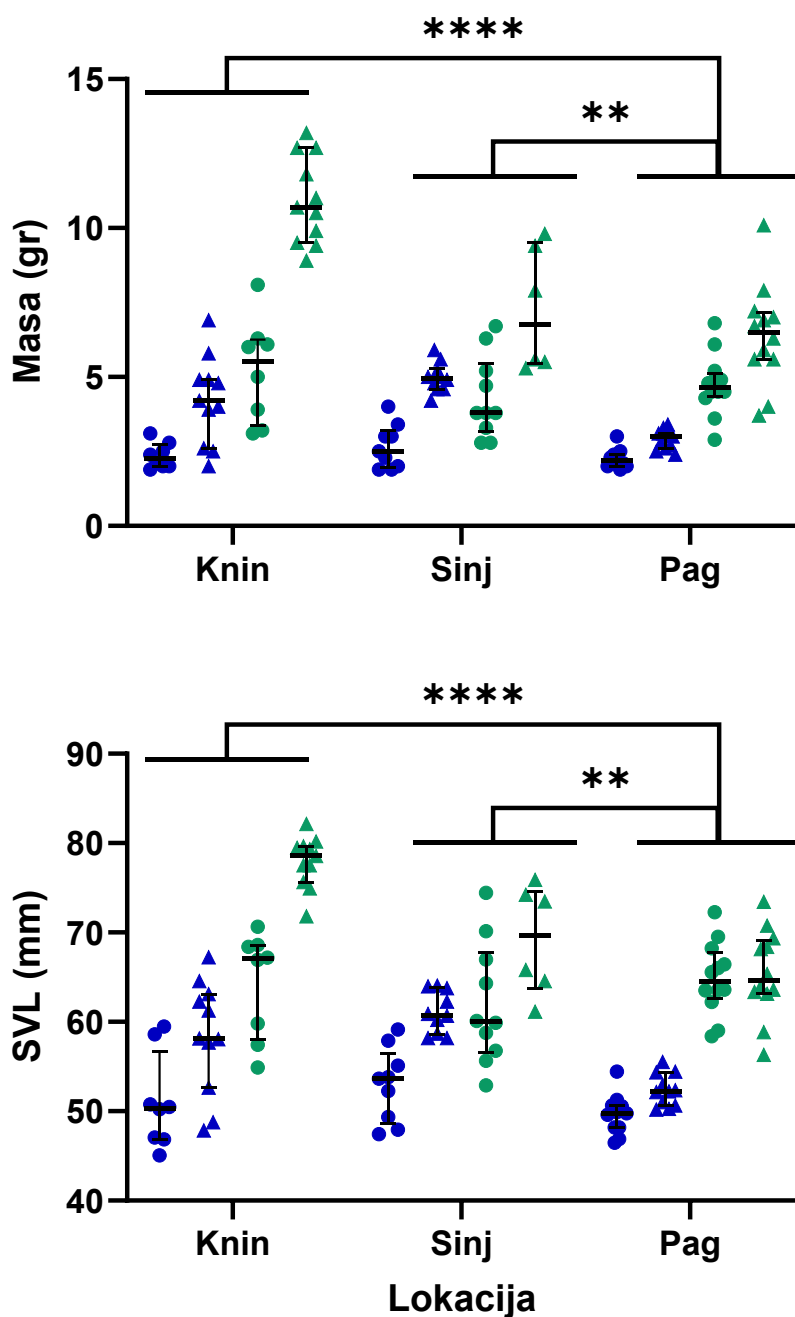


Slika 22. Masa (g) jedinke guštera uspoređivane po vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) te spolu. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mušjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; **** $p < 0,0001$.



Slika 23. Duljina tijela jedinke guštera od njuške do nečisnice SVL (mm; engl. *snout–vent length*) uspoređivane po vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) te spolu. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; **** $p < 0,0001$.

Dodatno, trofaktorske ANOVA analize provedene na temelju triju različitih lokacija s kojih su gušteri prikupljeni (Knin-Sinj-Pag) pokazale su da lokacija ima značajan utjecaj na morfometriju guštera (masa i duljina tijela (SLV)). Kopnene populacije (Knin i Sinj) su imale značajno veću masu i duljinu tijela (SLV) od otočke populacije s Paga kod obje vrste (Slika 24.).



Slika 24. Masa (g) i duljina tijela guštera od njuške do nečisnice SLV (mm) razvrstane po lokaciji. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena), mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; $p^{**}<0,01$; $p^{****}<0,0001$.

Rezultati

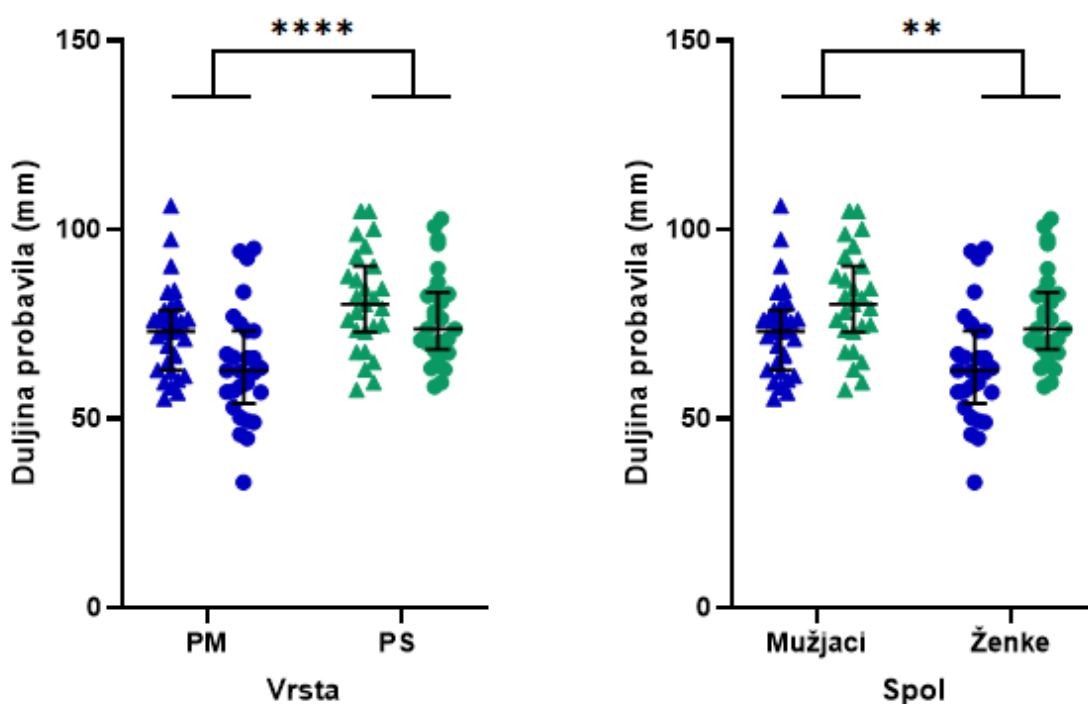
Tablica 12. Deskriptivna statistika izmjerenih parametara kod *Podarcis siculus* i *P. melisellensis*: morfometrija, analiza seruma i histomorfometrija - tankog crijeva

	Podarcis melisellensis				Podarcis siculus			
	mužjaci		ženke		mužjaci		ženke	
Morfometrija	Medijan (Q1; Q3)	N	Medijan (Q1; Q3)	N	Medijan (Q1; Q3)	N	Medijan (Q1; Q3)	N
masa (g)	4,10 (2,85; 4,90)	32	2,30 (2,00; 2,50)	27	7,90 (5,75; 10,30)	29	4,60 (3,75; 6,03)	30
duljina tijela (SVL, mm)	58,11 (52,27; 62,01)		50,35 (47,99; 53,77)		71,80 (64,26; 77,53)		63,97 (58,96; 68,28)	
duljina probavila (mm)	73,12 (62,88; 78,73)	31	62,72 (54,03; 73,22)	28	80,25 (72,96; 90,38)	27	73,74 (68,38; 83,36)	29
duljina tankog crijeva (mm)	38,47 (31,68; 44,10)	32	32,15 (25,86; 40,75)		43,65 (36,48; 48,92)	29	41,24 (34,78; 45,81)	
Zihlerov index	2,57 (1,95; 2,94)		2,44 (1,98; 3,07)		2,14 (1,88; 2,78)		2,56 (2,03; 2,83)	
HPLC - serum								
5HT (ng/μL seruma/mg proteina)	33,17 (19,58; 41,50)	27	27,85 (18,41; 37,81)	15	16,24 (14,18; 21,78)	24	21,60 (15,01; 32,57)	26
TRP	50,52 (38,88; 67,14)	24	68,59 (43,23; 77,64)	14	42,75 (30,25; 61,65)	27	47,12 (39,87; 61,55)	27
Histologija - tanko crijevo								
mukozni sloj - <i>Tunica mucosa</i> (μm)	430,6 (374,9; 588,0)	21	413,0 (324,5; 460,9)	21	586,4 (506,9; 664,4)	22	464,0 (404,3; 542,7)	21
epitelni sloj - <i>Lamina epithelialis</i> (μm)	36,93 (33,09; 41,10)		34,81 (31,66; 41,27)		44,38(37,22; 51,09)		40,15 (36,62; 45,48)	
mišićni sloj - <i>Tunica muscularis</i> (μm)	26,20 (19,46; 33,80)		21,74 (20,14; 26,62)		29,69 (26,29; 38,62)		27,31 (22,74; 34,54)	
Broj enterokromafinih stanica/mm2	18,19 (13,30; 30,15)	20	18,47 (10,29; 27,57)		16,74 (9,27; 23,06)	20	14,04 (8,02; 24,70)	20

Rezultati

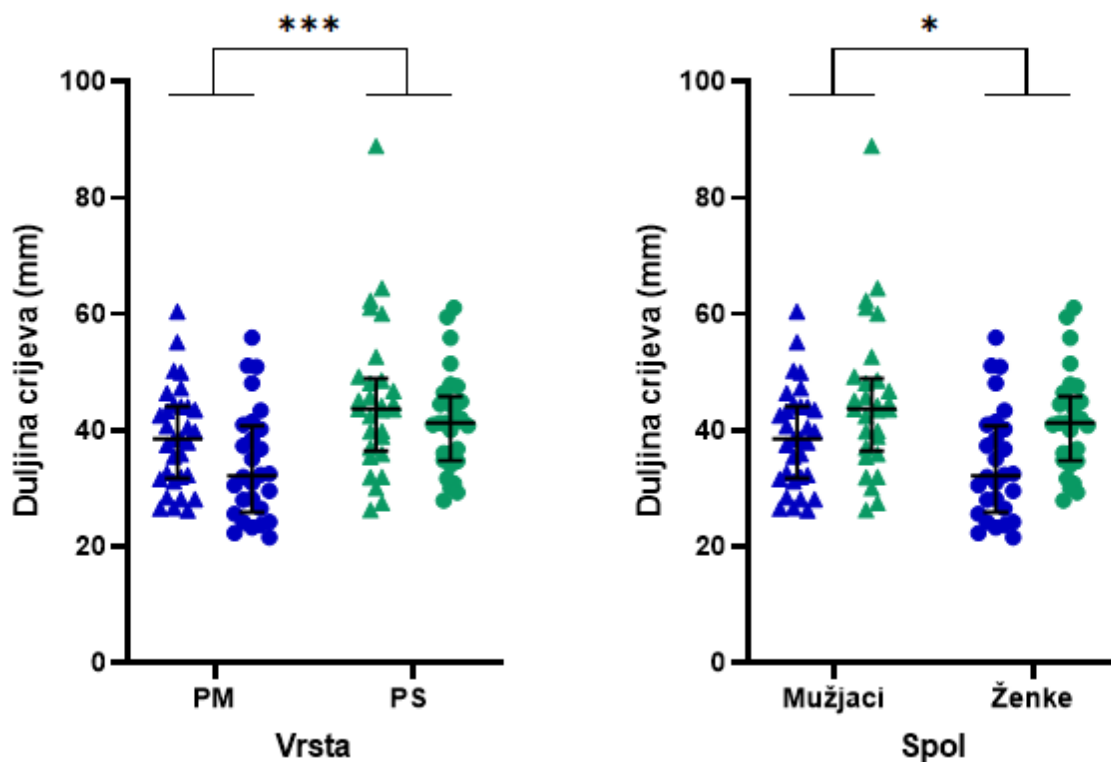
4.1.2. Duljina probavila i crijeva

Mjerenjem i analizom duljine probavila utvrđeno je da postoji statistička značajnost između vrsta i spola, ali da nema interakcije ($F(1, 111) = 1,023$, $p = 0,3141$). Točnije veća statistička značajnost utvrđena je između vrsta ($F(1, 111) = 17,95$, $p < 0,0001$), nego li kod spola ($F(1, 111) = 7,115$, $p = 0,008$) (Slika 25.).



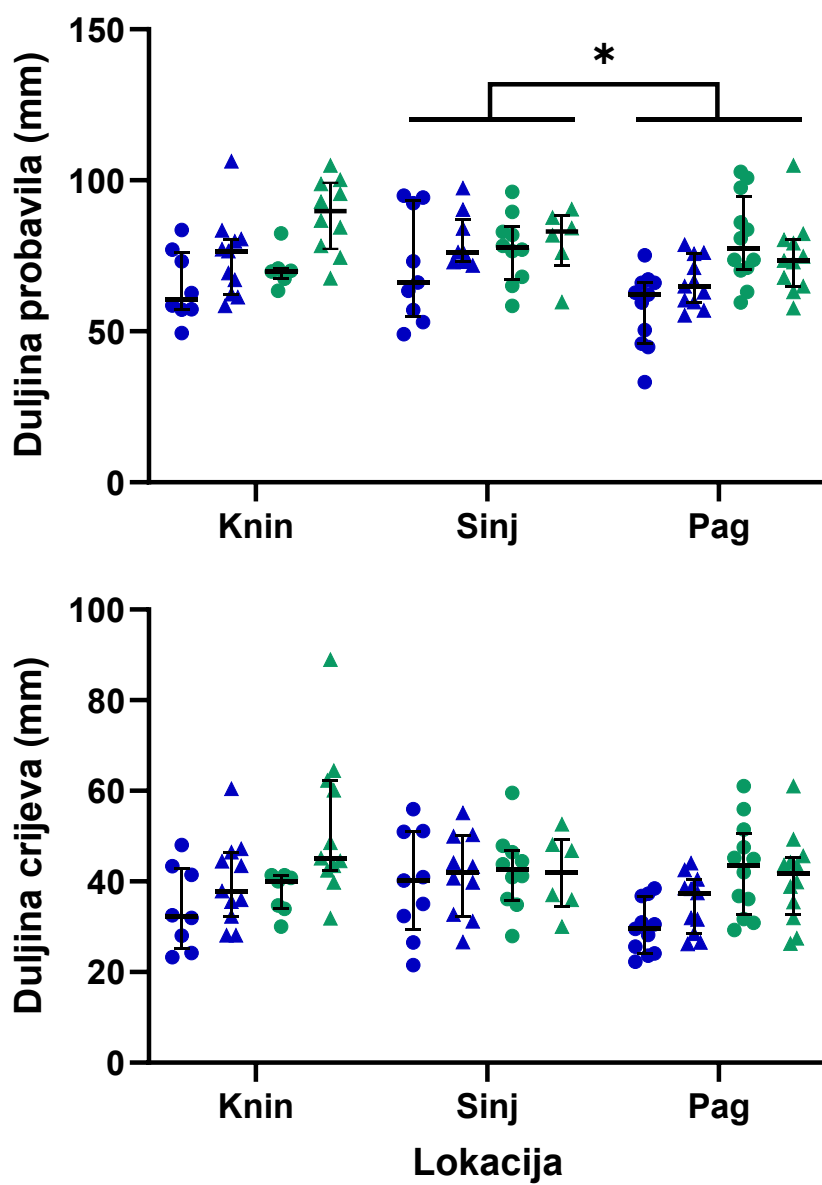
Slika 25. Duljina probavnog sustava analiziran po vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) i po spolu. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

Slično, mjere duljine crijeva pokazala su postojanje razlika statističke značajnosti unutar vrste ($F(1, 114) = 15,14$, $p = 0,0002$) i spola ($F(1, 114) = 5,615$, $p = 0,0195$), bez interakcije spol x vrsta ($F(1, 114) = 0,5573$, $p = 0,4569$) (Slika 26.).



Slika 26. Duljina probavila po vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) i po spolu. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mušjaci su označeni trokutima, a Źenke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; * $p < 0,1$; *** $p < 0,001$.

Nastavno na ove podatke, trofaktorske ANOVA analize provedene na temelju triju različitih lokacija s kojih su gušteri prikupljeni (Knin-Sinj-Pag) pokazale su da lokacija nema značajan utjecaj na duljinu probavnog sustava kao ni na duljinu crijeva (Slika 27.).



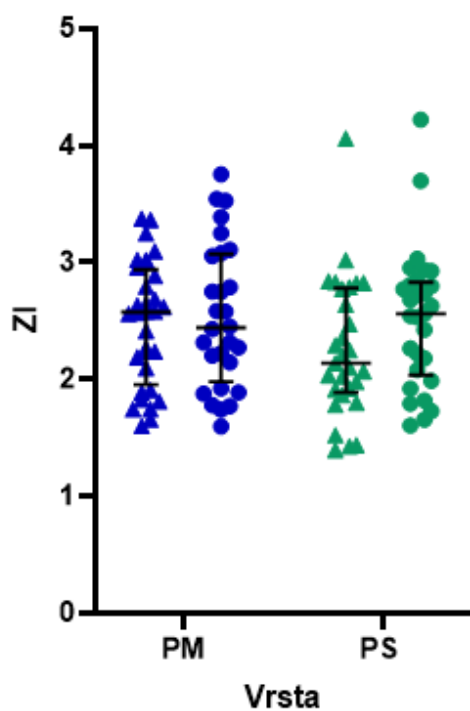
Slika 27. Duljina probavila i crijeva razvrstano po lokaciji. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena), mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima *p <0,1

Rezultati

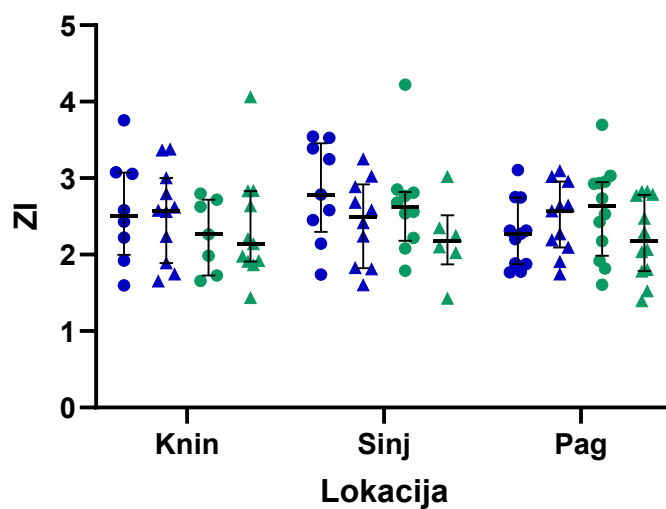
4.1.3. Zihlerov indeks

Analiza Zihlerovog indeksa (ZI) pokazala je da između vrsta ($F(1, 114) = 1,214$, $p = 0,2728$) i spolova ($F(1, 114) = 2,261$, $p = 0,1354$) nema statistički značajnih razlika, niti postoji interakcija spol x vrsta ($F(1, 114) = 0,8509$, $p = 0,3583$ (Slika 28.).

Trofaktorska ANOVA također nije pokazala značajan utjecaj lokacije na vrijednosti ZI kod nijedne vrste (Slika 29.). Ovi rezultati upućuju na to da, unatoč jasno izraženim razlikama u tjelesnoj masi i duljini tijela između vrsta, spolova i lokacija, relativna duljina probavnog sustava izražena Zihlerovim indeksom ostaje proporcionalna veličini tijela.



Slika 28. Zihlerov indeks (ZI) prema vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima.

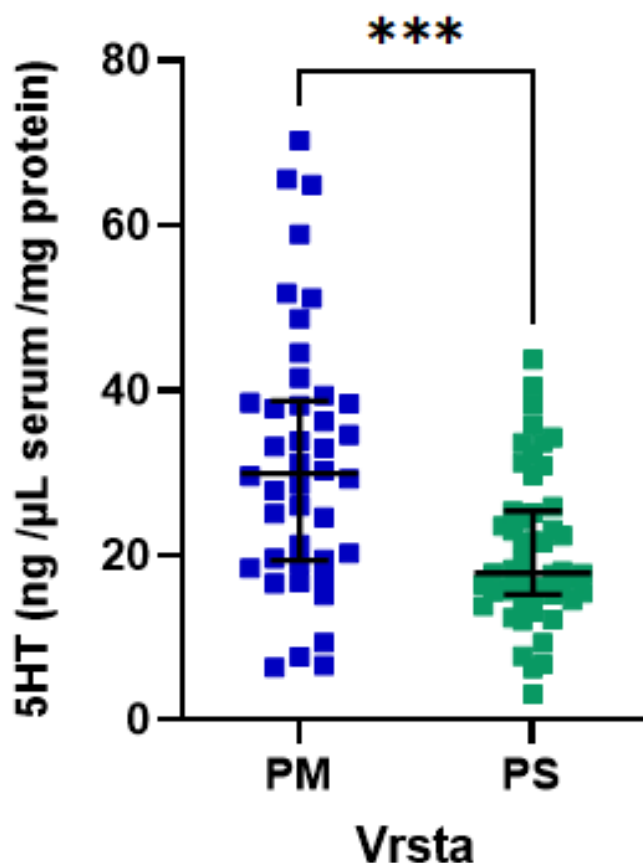


Slika 29. Zihlerov indeks (ZI) prema lokaciji. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena), mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima.

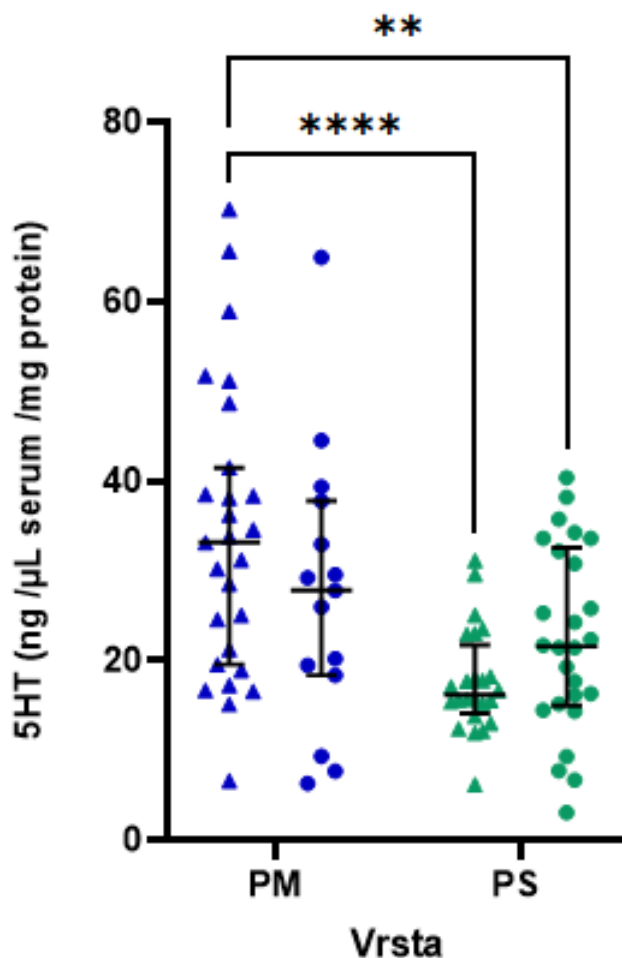
4.2. Razina serotonina i triptofana u serumu

Kvantitativne vrijednosti razine 5HT i Trp u serumu dobivenih metodom HPLC prikazani su u Tablici 11. i na Slikama 30., 31. i 32.

Dvosmjerna ANOVA analiza 5HT u serumu pokazala je da i vrsta ($F(1, 88) = 16,23$, $p = 0,0001$) i interakcija spol $\times$ vrsta ($F(1, 88) = 4,251$, $p = 0,0422$) imaju značajan učinak na razine 5HT (Slika 30.), dok spol sam po sebi nema utjecaja ($F(1, 88) = 0,07945$, $p = 0,7787$). Šidákov test višestrukih usporedbi otkrio je vrlo značajnu razliku među mužjacima obje vrste ($t = 4,654$, $DF = 88$, $p < 0,0001$) te između *P. melisellensis* mužjaka i *P. siculus* ženke ($t = 3,363$, $D = 88$, $p = 0,0068$) (Slika 31.).



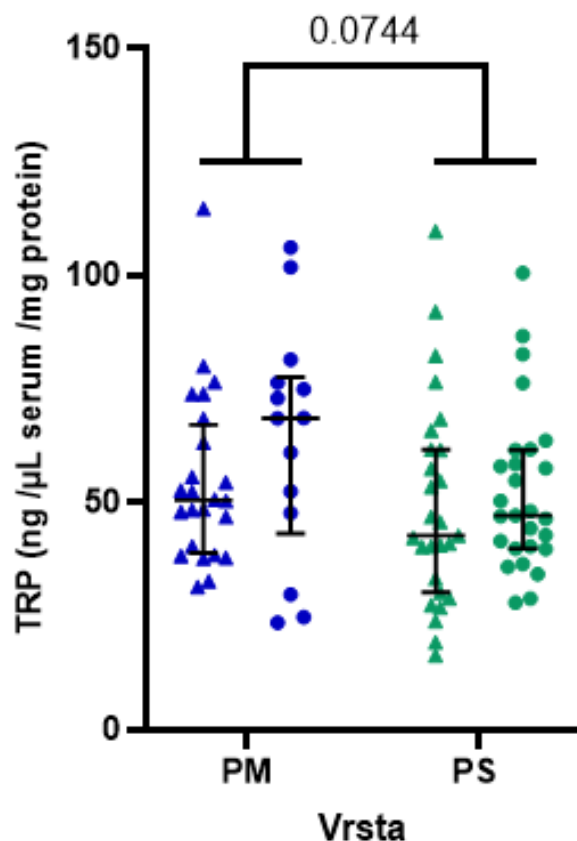
Slika 30. Vrijednosti razine serotonina (5HT) u serumu *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) analizirane metodom HPLC. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom. Dvosmjerna ANOVA; *** $p < 0,001$.



Slika 31. Vrijednosti razine serotonina (5HT) u serumu oba spola i obje vrste - *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) analizirane metodom HPLC. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA, nakon koje je primijenjen Šidákov test višestrukih usporedbi; ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$.

Rezultati

Dvosmjerna ANOVA analiza učinka spola, vrste i njihove interakcije $\text{pol} \times \text{vrsta}$ nije pokazala značajan učinak na razine Trp u serumu ($F(1, 88) = 1,584, p = 0,2115$; $F(1, 88) = 3,261, p = 0,0744$; $F(1, 88) = 0,003334, p = 0,9541$; redom) (Slika 32.).



Slika 32. Vrijednosti razine triptofana (Trp) u serumu *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) analizirane metodom HPLC. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA.

Dodatno, trofaktorske ANOVA analize provedene na temelju triju različitih lokacija s kojih su gušteri prikupljeni pokazale su da lokacija nema značajan utjecaj ni na vrijednosti 5HT ni na vrijednosti Trp u serumu (Prilog 8.5.1.).

4.3. Histomorfometrija tankog crijeva

Histološki presjeci promatrani svjetlosnim mikroskopom pokazali su normalnu arhitekturu u svim slojevima crijeva. Sluznica crijeva bila je organizirana u izdužene resice različitih visina, obložene jednostavnim cilindričnim epitelom s vrčastim stanicama. Ispod površinskog epitela jasno se uočavao sloj vezivnog tkiva koji je osiguravao krvne i limfne žile te uzak mišićni sloj sluznice. U submukozi je bio prisutan tanak sloj rahlog vezivnog tkiva. Mišićni sloj bio je građen od glatkih mišićnih stanica, podijeljenih na unutarnji kružni i vanjski uzdužni sloj. Histomorfometrijske značajke slojeva probavnog sustava za obje vrste prikazane su u Tablici 11.

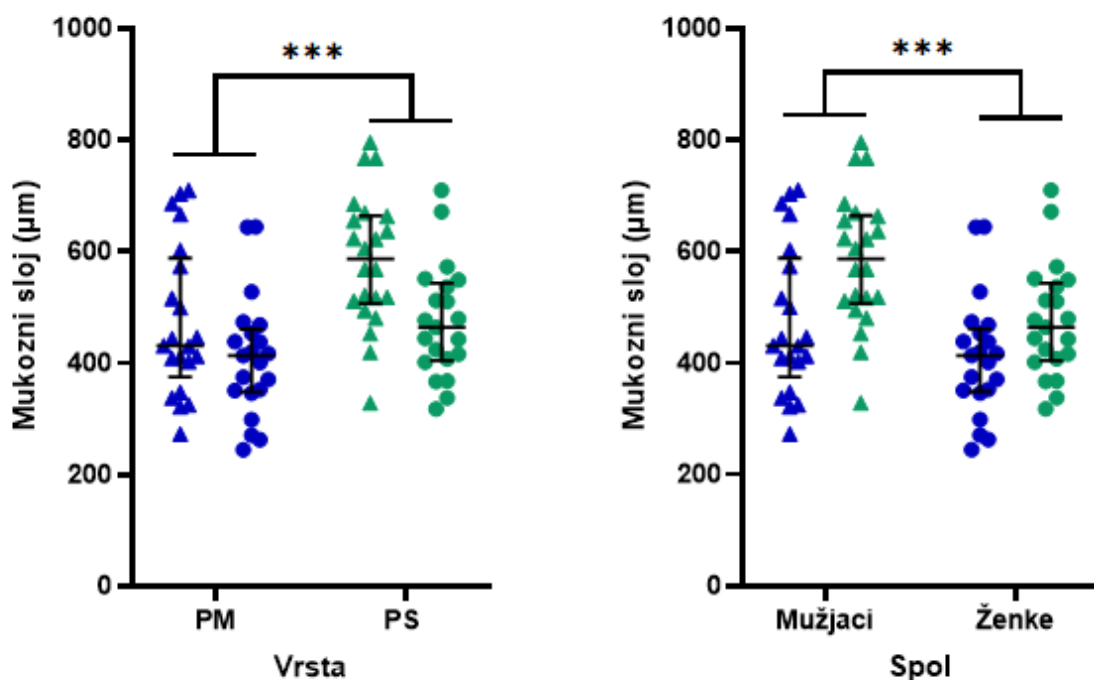
4.3.1. Kvantitativna analiza sluznice i mišićnog sloja tankog crijeva

Za sva tri mjerenja, oba sloja sluznice i mišićnog sloja tankog crijeva, odabir modela temeljen na Akaikeovom informacijskom kriteriju (AIC) pokazao je da je model glavnih učinaka bez interakcija najbolji za podatke. Kovarianca tjelesne veličine (ZI) nije bila značajan prediktor ni u jednom od konačnih modela ($p > 0,05$ za sve).

Mukozni sloj (*Tunica mucosa*; TM) bila je značajno pod utjecajem i vrste i spola. Konkretno, TM je bila značajno deblja kod *P. siculus* u usporedbi s *P. melisellensis* ($F(1, 81) = 12,14, p = 0,0008$); te kod mužjaka u usporedbi sa ženkama ($F(1, 81) = 11,98, p = 0,0009$) (Slika 33.), ali nije bilo interakcije između spola i vrste ($F(1,81) = 0,8688, p = 0,3540$).

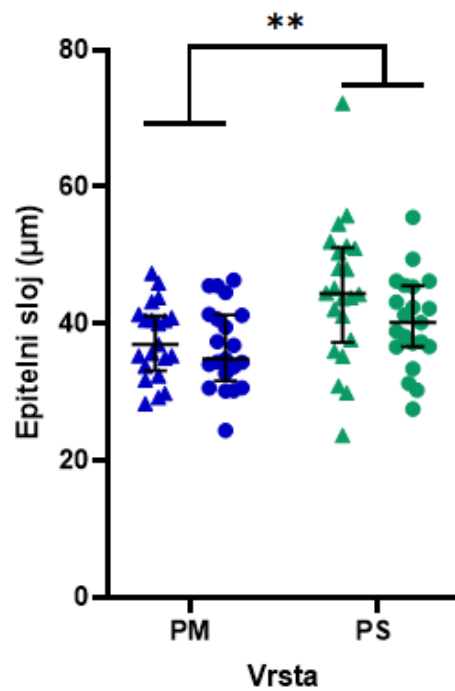
Za visinu sloja stanica crijevnog epitela (*Lamina epithelialis*; LE) analiza je pokazala značajan učinak vrste. LE je bio značajno viši kod *P. siculus* nego kod *P. melisellensis* ($F(1, 81) = 11,01, p = 0,0014$; (Slika 34.), dok nije bilo značajnog učinka spola ($F(1, 81) = 2,652, p = 0,1073$) ni interakcije spola x vrsta ($F(1, 81) = 1,165, p = 0,2835$)).

Statistička značajnost zabilježena je i u debljini mišićnog sloja (*Tunica muscularis*; MW) pod utjecajem vrste i spola. Mišićni sloj je bio značajno deblji kod *P. siculus* u usporedbi s *P. melisellensis* ($F(1, 81) = 6,880, p = 0,0104$) te kod mužjaka u usporedbi sa ženkama ($F(1, 81) = 5,405, p = 0,0226$). Interakcija spola x vrste u debljini mišićnog sloja nije potvrđena ($F(1, 81) = 0,0003, p = 0,9862$) (Slika 35.).

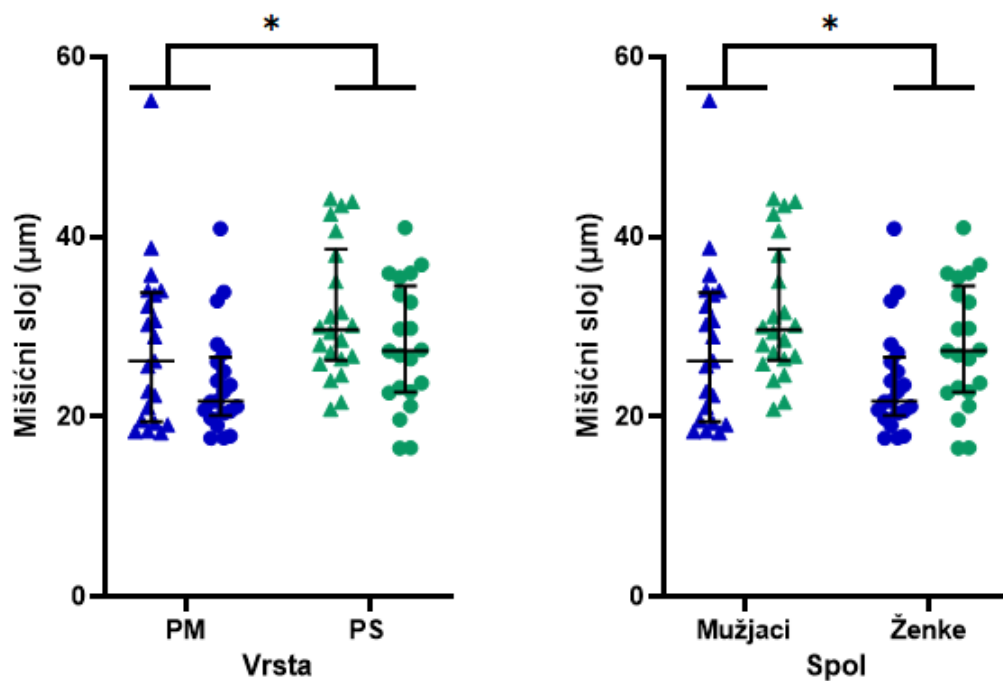


Slika 33. Debljina mukoznog sloja (*Tunica mucosa*; TM) u simpatrijskim populacijama *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvostruka ANOVA; *** $p < 0,001$.

Trofaktorska ANOVA provedena za dvije vrste guštera (*P. melisellensis* i *P. siculus*) na tri različite lokacije uzorkovanja (Knin, Sinj i Pag) na triju slojeva tankog crijeva: *tunica mucosa*, *lamina epithelialis* i *tunica muscularis* nije utvrdila statistički značajan učinak lokacije na debljinu nijednog sloja crijevne stijenke (Prilog 5.2.).



Slika 34. Debljina epitelnog sloja (*Lamina epithelialis*; LE) u populacijama *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; ** $p < 0,01$.

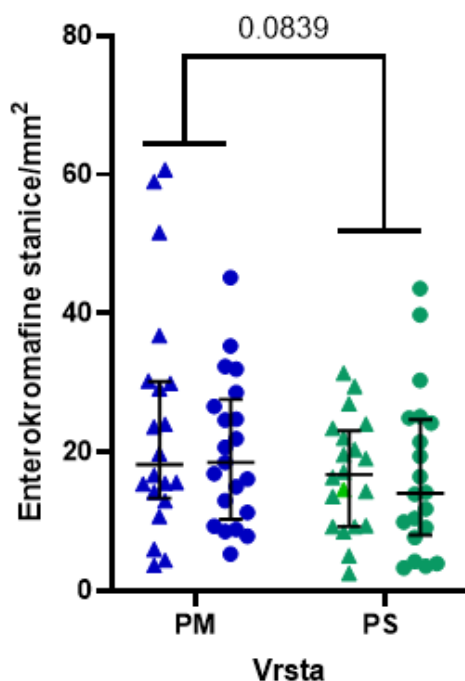


Slika 35. Debljina mišićnog sloja (*Tunica muscularis*; MW) kod populacija *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA; * $p < 0,05$.

4.3.2. Kvantifikacija enterokromafinih stanica u tankom crijevu

U analizi parametra specifičnog za periferni serotonin – broja enterokromafinih stanica/mm² crijeva – nije utvrđena značajna razlika s obzirom na spol ($F(1, 77) = 0,3223$, $p = 0,5719$), vrstu ($F(1, 77) = 3,067$, $p = 0,0839$) ni interakciju spol $\times$ vrsta ($F(1, 77) = 0,02017$, $p = 0,8874$) (Slika 36.).

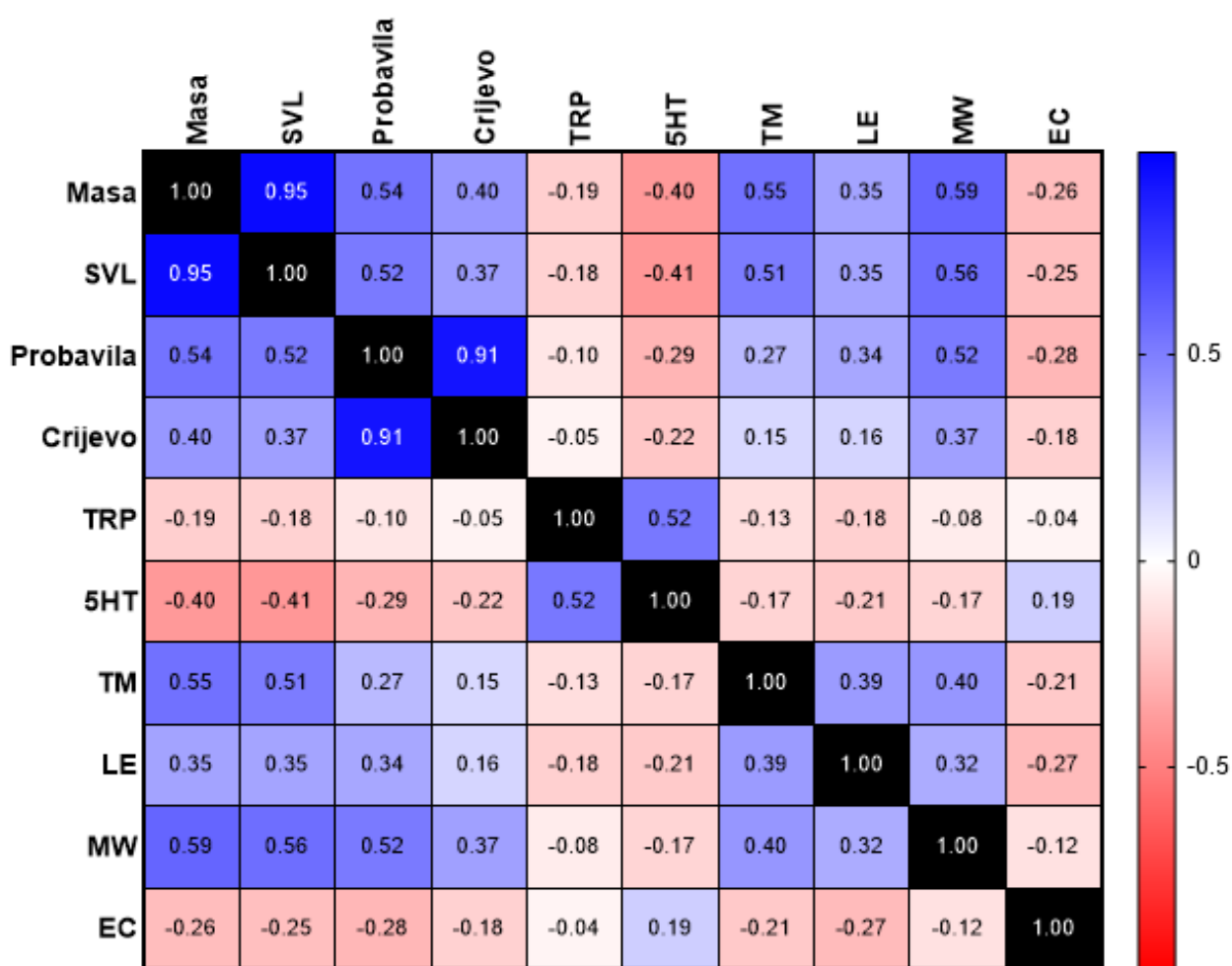
Trofaktorska ANOVA provedena na podacima o broju enterokromafinih stanica, uzimajući u obzir lokaciju uzorkovanja (Knin, Sinj – kopnene populacije; Pag – otočka populacija), pokazala je da lokacija nema statistički značajan učinak na ovaj parametar. Drugim riječima, broj enterokromafinih stanica bio je sličan u svim analiziranim populacijama, bez obzira na geografsko podrijetlo (Prilog 5.3.).



Slika 36. Broj enterokromafinih stanica/mm² analiziran po vrsti – *Podarcis melisellensis* (PM, plava) i *P. siculus* (PS, zelena). Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima. Dvosmjerna ANOVA.

4.4. Korelacije

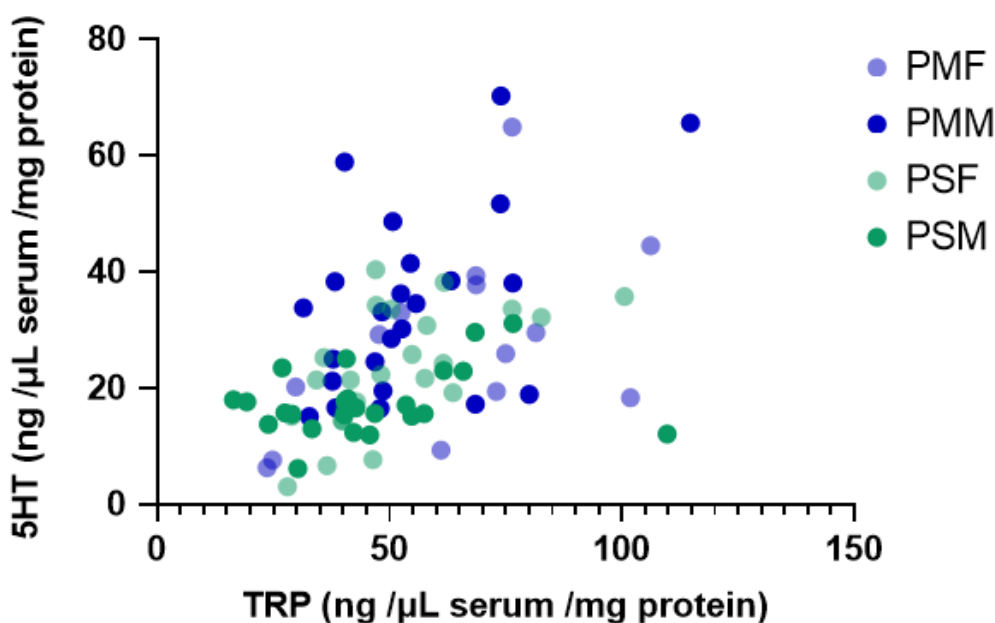
Uspoređujući morfometrijske karakteristike (masa, SVL, duljina probavila, duljina crijeva), razine triptofana i serotonina u serumu te histomorfometrijske mjere (mukozni sloj (*Tunica mucosa*; TM), epitelni sloj (*Lamina epithelialis*; LE), mišićnog sloja (*Tunica muscularis*; MW) i brojem enterokromafinih stanica) odredila sam korelacije Spermanovim koeficijentom (Slika 37.).



Slika 37. Korelacije morfometrijske karakteristike (masa, SVL, duljina probavila, duljina crijeva), razine triptofana (TRP) i serotonina (5HT) u serumu te histomorfometrijske mjere: mukozni sloj (*Tunica mucosa*; TM), epitelni sloj (*Lamina epithelialis*; LE), mišićni sloj (*Tunica muscularis*; MW) i brojem enterokromafinih (EC) stanica. Plava boja označava pozitivnu, a

crvena negativnu korelaciju uz graduiranje boje ovisno o vrijednostima. Prikazane su vrijednosti Spearmanovog koeficijenta korelacije.

Serotonin i triptofan imali su pozitivnu korelaciju, preciznije dobru povezanosti ($\rho = 0,52$ $p < 0,0001$) (Slika 38.) To što je Spearmanov koeficijent korelacije (ρ) iznosio 0,52 ukazuje na umjerenu do dobru pozitivnu povezanost između serotonina i triptofana – dakle, kako se koncentracija triptofana povećava, tako se u pravilu povećava i koncentracija serotonina. Vrlo niska vrijednost $p < 0,0001$ znači da je vjerojatnost da je ova povezanost nastala slučajno iznimno mala, pa se rezultat smatra statistički visoko značajnim. Ovakav nalaz može upućivati na to da je periferna razina serotonina, poput razinama u središnjem odjeljku, uže povezan s razinama triptofana nego što je do sad utvrđeno.



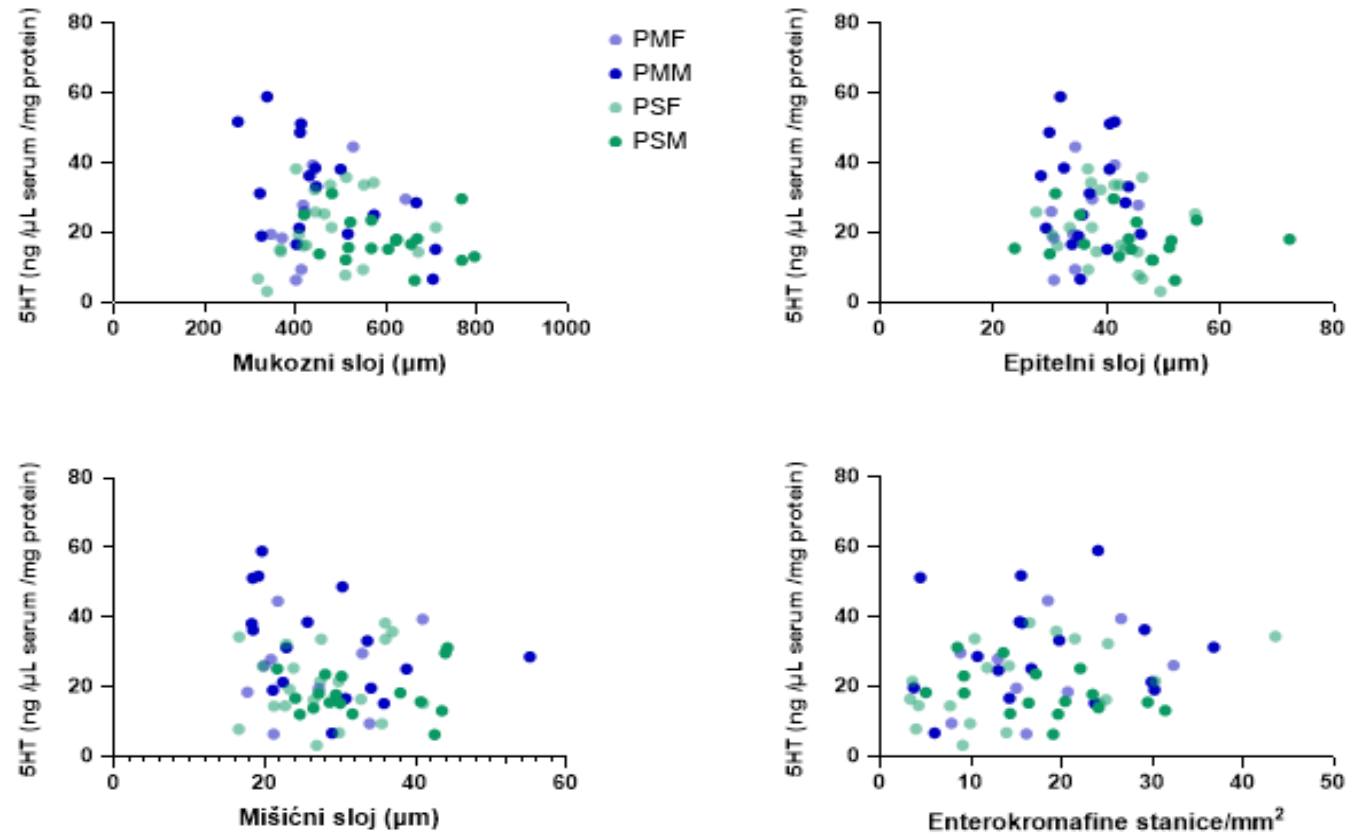
Slika 38. Korelacija serotonina i triptofana. Svaka točka predstavlja jednu jedinku guštera: *Podarcis melisellensis* (PM) označene su plavom i *P. siculus* (PS) zelenom bojom pri čemu svijetla boja označava ženke, a tamnija mužjake, $\rho = 0,52$ $p < 0,0001$.

Nije utvrđena značajna korelacija između serotonina i histomorfometrijskih parametara. Konkretno, korelacija serotonina s debljinom mukoznog sloja (TM) iznosila je $\rho = -0,17$ ($p = 0,1895$), s epitelnim slojem (LE) $\rho = -0,21$ ($p = 0,0993$), s mišićnim slojem (MW) $\rho = -0,17$

Rezultati

($p = 0,1956$) te s brojem enterokromafinih stanica (EC) $\rho = 0,19$ ($p = 0,1497$). Nijedna od navedenih usporedbi nisu dosegle razinu statističke značajnosti (Slika 38.) .

Rezultati



Slika 39. Korelacija serotonina i histomorfometrijskih parametara (mukozni sloj, epitelni sloj, mišićni sloj i broj enterokromafinih stanica). Svaka točka predstavlja jednu jedinku guštera *Podarcis melisellensis* (PM) označene su plavom i *P. siculus* (PS) zelenom bojom, pri čemu svijetla boja označava ženke, a tamnija mužjake.

5. RASPRAVA

Razumijevanje fizioloških mehanizama koji oblikuju ponašanje i uspješnost u ekološkoj kompeticiji jedan je od ključnih izazova bihevioralne ekologije i evolucijske fiziologije. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) ima središnju ulogu u regulaciji niza ponašanja, uključujući istraživačko ponašanje, agresiju i reakcije na novost, a njegova je funkcija rezultat složene interakcije središnjih i perifernih serotonergičnih odjeljaka. U simpatrijskim populacijama guštera *Podarcis siculus* (PS) i *P. melisellensis* (PM) ranije su zabilježene značajne razlike u ponašanju pod serotonergičnom kontrolom: mužjaci *P. siculus* pokazuju pojačano istraživačko ponašanje i traženje noviteta u odnosu na mužjake *P. melisellensis* (Gojak i sur., u recenziji). Također, utvrđene su i više koncentracije središnjeg serotonina u mozgu mužjaka *P. siculus* u odnosu na *P. melisellensis* (Šikić i sur., 2025).

Međutim, serotoninški sustav nije ograničen na središnji živčani sustav. Većina ukupnog 5HT u organizmu nalazi se u perifernim tkivima, gdje regulira pokretljivost i sekreciju probavnog sustava, krvožilni tonus te imunološke odgovore. Usprkos tome, varijabilnost perifernog serotonina među blisko srodnim vrstama i njegova povezanost s ponašanjem rijetko je istraživana. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati perifernu homeostazu serotonina na biokemijskoj i histološkoj razini u simpatrijskim populacijama *P. siculus* i *P. melisellensis*.

Kako bismo odgovorili na to pitanje, odredili smo razine 5HT i njegovog prekursora triptofana (Trp) u serumu pomoću HPLC metode, analizirali histološku građu tankog crijeva (epitelne, sluzničke i mišićne slojeve) te kvantificirali broj enterokromafinih stanica u sluznici tankog crijeva. Nadalje, istražili smo korelaciju između razina 5HT i histomorfometrijskih parametara na razini jedinke, kao i razlike među vrstama, spolovima i lokacijama.

Rezultati su pokazali značajne međuvrsne i spolne razlike u razinama 5HT u serumu, koje nisu bili praćene s razlikama u razini Trp. Histomorfometrijska analiza otkrila je deblje crijevnih slojeve kod *P. siculus* u odnosu na *P. melisellensis* te spolne razlike u izmjenjenim slojevima, pri čemu su ženke u obje vrste imale niže vrijednosti u svim parametrima u usporedbi s mužjacima. Lokacija uzorkovanja (Knin, Sinj, Pag) pokazala je utjecaj samo na morfometriju tijela, gdje su utvrđene razlike između kopnenih populacija (Knin i Sinj) u masi i SVL u odnosu na otočnu populaciju (Pag). U ostalim mjerenim parametrima lokacija nije imala značajan učinak, što sugerira da uočene međuvrsne razlike nisu uvjetovane lokacijom već su intrinzične

samim vrstama. Isto tako broj enterokromafinih stanica se nije razlikovao među skupinama. Ovi nalazi pružaju osnovu za dublje razmatranje uloge perifernog serotonina u oblikovanju ponašanja i fizioloških osobitosti ovih dviju vrsta.

5.1. Međuvrsne razlike

U simpatrijskim populacijama *Podarcis siculus* i *P. melisellensis* zabilježene su značajne međuvrsne razlike u većini morfometrijskih i histoloških parametara, kao i u koncentracijama perifernog serotonina u serumu. Analiza dvostruke varijance pokazala je da je vrsta jedan od glavnih izvora varijabilnosti za masu tijela, duljinu tijela (SVL), duljinu probavila, duljinu tankog crijeva i debljinu histoloških slojeva crijevnog stijenke. Lokacija uzorkovanja nije imala značajan učinak na većinu analiziranih varijabli izuzev morfometrijskih parametara, što ukazuje da su uočene razlike stabilne među populacijama i vjerojatno intrinzične samim vrstama.

5.1.1. Morfometrijske razlike između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*

Rezultati pokazuju jasne i konzistentne razlike u morfometrijskim parametrima između *Podarcis siculus* i *P. melisellensis*. Jedinke *P. siculus* bile su značajno veće – kako po tjelesnoj masi, tako i po duljini tijela (SVL) – u usporedbi s jedinkama *P. melisellensis*. Ova veća tjelesna veličina u skladu je s ranijim nalazima koji opisuju *P. siculus* kao robusniju i morfološki dominantnu vrstu u područjima gdje koegzistira s drugim vrstama guštera (Downes i Bauwens, 2004.). Veličina tijela je važan ekološki i bihevioralni čimbenik, budući da veće jedinke imaju prednost u agonističkim interakcijama i u pristupu resursima, što im može omogućiti veći reproduktivni uspjeh i prostornu ekspanziju (Carretero, 2004).

Osim ukupne veličine tijela, jedinke *P. siculus* imale su značajno duže probavilo i dulje tanko crijevo u odnosu na *P. melisellensis*. Duža probavna cijev općenito je povezana s većom sposobnošću iskorištavanja hrane, što omogućava učinkovitiju apsorpciju nutrijenata i potencijalno veću energetska dobit po obroku (Pough *i sur.*, 2016). Kod guštera, duljina crijeva često odražava prehrambenu strategiju i širinu prehrambene niše (Herrel *i sur.*, 2008). Naši rezultati stoga sugeriraju da *P. siculus* može imati širu prehrambenu nišu i veću fiziološku fleksibilnost u odnosu na *P. melisellensis*. Ova interpretacija je u skladu s ekološkim podacima koji pokazuju da *P. siculus* pokazuje veću plastičnost u prehrambenim navikama i lakše kolonizira nova staništa što pridonosi njezinu invazivnom potencijalu (Taverne *i sur.*, 2019.).

Tuniyev i sur., 2020. u svom radu *P. siculus* opisuje kao novu stranu vrstu u ruskoj herpetofauni i opisuje ga kao jednu od najživazivnijih gmazova.

Veća duljina probavnog sustava kod *P. siculus* može imati dodatnu funkcionalnu implikaciju u kontekstu energetske ravnoteže: veći volumen crijeva omogućuje dulje zadržavanje hrane i učinkovitiju razgradnju složenih sastojaka. Time bi *P. siculus* mogla ostvarivati veći unos energije u usporedbi s *P. melisellensis*, što je važan preduvjet za održavanje većeg tijela i energetske troškova povezanih s većom aktivnošću, istraživačkim ponašanjem i teritorijalnošću (Crnobrnja-Isailovic i sur., 2009.)

Analiza Zihlerove mjere među ispitivanim vrstama nije pokazala statistički značajne razlike, što upućuje na visoku konzerviranost ovog morfometrijskog parametra unutar proučavanih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*. Takva stabilnost Zihlerovog indeksa sugerira da je duljina probavnog sustava kod ovih guštera morfološki konzervirana i neovisna o ekološkim varijacijama, što može reflektirati slične probavne zahtjeve i strategije iskorištavanja hrane među analiziranim skupinama. Ova homogenost u morfometriji probavnog sustava može biti rezultat evolucijske stabilizacije funkcionalnih karakteristika, pri čemu selekcijski pritisci očito favoriziraju optimalnu duljinu probavnog sustava za učinkovitu obradu hrane u sličnim ekološkim nišama.

Nadalje, rezultati pokazuju da tjelesna masa, ukupna duljina tijela (SVL) i duljina probavila međuvrsto variraju ovisno o lokaciji, pri čemu je kopnena populacija iz Knina najveća i najteža, slijedi populacija iz Sinja s najdužim probavilom, dok je otočna populacija s Paga najmanja, najlakša te ima najkraće probavilo. Nasuprot tome, duljina tankog crijeva i Zihlerov indeks između vrsta nisu pokazali značajne razlike među lokacijama. Takva stabilnost Zihlerovog indeksa sugerira da su ove morfološke značajke konzervirane i neovisne o lokalnim ekološkim uvjetima, što može upućivati na slične probavne zahtjeve i strategije iskorištavanja hrane među analiziranim populacijama. Obzirom da Zihlerov index zapravo pokazuje procjenu kondicije životinje tj. koliko je životinja “uhranjenija” ili “mršavija” u odnosu na svoju duljinu tijela, mi iz ovih podataka vidimo da su sve životinje prilikom žrtvovanja bile u dobroj kondiciji što može biti i posljedica dizajna pokusa, zbog ujednačene prehrane i optimalnih uvjeta života 3 mjeseca prije žrtvovanja životinja.

5.1.2. Razlike među vrstama u razinama perifernog serotonina

Naši rezultati pokazuju da *P. melisellensis* ima značajno više koncentracije perifernog serotonina u serumu nego *P. siculus*, unatoč samo skoro značajno većem broju enterokromafinih stanica i bez razlika u razinama triptofana, prekursora sinteze serotonina. Iako su enterokromafine stanice glavni proizvođači serotonina u periferiji (Racké *i sur.*, 1995.), ova razlika između gustoće stanica i koncentracije 5HT sugerira da mehanizmi različiti od same brojnosti stanica mogu pridonositi serotoninskoj homeostazi u perifernom odjeljku kod ovih guštera. Štakori s perinatalno induciranom hiperserotoninemijom, nisu u odrasloj dobi pokazali dugotrajne značajne razlike u razinama 5HT u plazmi, no broj enterokromafinih stanica bio je različit (Blazevic *i sur.*, 2011.; Gračan *i sur.*, 2024.). U tom slučaju, prekomjerne razine 5HT tijekom razvoja mogle su izazvati negativnu povratnu spregu koja je trajno smanjila broj enterokromafinih stanica. U ovom slučaju ne vidimo razlike u broju enterokromafinih stanica, ali postoji porast razina 5HT kod mužjaka PM. Potrebno je dodatno napomenuti da su ove razlike u razinama perifernog serotonina postojane usprkos velikog perioda hranjenja jedinki obje vrste istom hranom (više od tri mjeseca). Ovo ukazuje na to da *P. melisellensis* vjerojatno ima trajno povišene razine perifernog serotonina u krvi te da koristi drugačiju fiziološku strategiju od samog povećanja broj enterokromafinih stanica za održavanje iste. Fiziološke prilagodbe koje bi mogle uzrokovati razlike u razinama perifernog serotonina su: razlike u prehrani, povećana učinkovitost sinteze unutar pojedinih enterokromafinih stanica (Gračan *i sur.*, 2024.), povećana sinteza TPH1-om, smanjena razgradnja putem monoamin oksidaze (MAO) (Stolz, 1985.) promijenjena aktivnost transportera serotonina (SERT) u trombocitima ili crijevnom tkivu (Gershon i Tack, 2007.), ili različita dinamika otpuštanja u krvotok (Berger *i sur.*, 2009.).

Periferna i središnja sinteza serotonina može biti ovisna o unosu hrane i dostupnošću prekursora sinteze - triptofana, što su pokazali Sánchez Mateos *i sur.* (2009.) oralnim davanjem Trp štakorima čime su povećali razine 5HT u plazmi i mozgu. Xue *i sur.* (2024.) dobili su slične rezultate korištenjem prehrane bogate triptofanom kod miševa, povećavši razine 5HT u kolonu i perifernoj krvi. Što se tiče mozga, ta veza je više puta dokazana jer triptofan konkurira s drugim velikim neutralnim aminokiselinama (LNAA) za prijenos kroz krvno-moždanu barijeru, a omjer Trp/LNAA izravno utječe na ulazak Trp u mozak i konačno sintezu središnjeg serotonina (Richard *i sur.*, 2009.). Povećanim unosom Trp hranom, povećava se udio Trp u krvi i posljedično količina Trp-a koji se prenosi u mozak preko prijenosnika velikih neutralnih

aminokiselina (engl. *large neutral amino acid transporter*, LAT), izravno utječući na razinama centralnog serotonina (Udenfreid, 1957). Nedostatak Trp, kao što je ispitano u drugim prehranbenim eksperimentima, također utječe na metaboličke ishode i može imati negativne posljedice na sintezu serotonina — put koji je poznat da utječe na ponašanje hranjenja i energetska homeostazu (Nonogaki, 2022.). Stoga je moguće da gušteri, ovisno o prehrani, imaju različitu dostupnost Trp, što zauzvrat može utjecati na signalizaciju posredovanu serotoninom i druge metaboličke procese poput sinteze mišićnih proteina (Dukes *i sur.*, 2015.). Iako smo dokazali slične razine Trp u obje vrste, to potencijalno može biti rezultat našeg eksperimentalnog dizajna – uzorci seruma guštera uzimani su nakon 3 mjeseca laboratorijskih uvjeta tijekom kojih su sve životinje jele istu vrstu i količinu hrane. Postoje dokazi o prehranbenim razlikama između *P. melisellensis* i *P. siculus*, što vjerojatno utječe na njihovu dostupnost Trp. *P. siculus* pokazuje visoku prehranbenu raznolikost (Zuffi, 2013.; Patharkar *i sur.*, 2022.). To je potvrđeno na jadranskim otocima, gdje je biljna hrana češća u prehrani *P. siculus* u odnosu na *P. melisellensis*, što sugerira da *P. siculus* može iskoristiti širi raspon izvora hrane kada je dostupnost hrane ograničena, u rasponu od isključivo kukcojeda do gotovo potpuno biljojeda populacija (Taverne *i sur.*, 2019.). Nadalje, istraživanje Taverne *i sur.* (2019.) pokazalo je dosljedne razlike u prehrani mužjaka *P. melisellensis* u usporedbi s ostale tri skupine, s većom raznolikošću plijena. Prehrana koja se temelji pretežito na plijenu, a ne na biljkama, mogla bi povećati dostupnost Trp kod *P. melisellensis*, što može utjecati na sintezu serotonina u probavnom sustavu. Dostupnost Trp mogla se promijeniti tijekom razdoblja držanja životinja u laboratoriju u našem istraživanju u usporedbi s njihovom prehranom u divljini. Ako je prehrana ista, tj. dostupnost Trp, moglo bi se pretpostaviti da će i razine 5HT biti usporedive. Kako bi se ustanovilo da su razlike u razinama perifernog serotonina posljedica različite prehrane, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo postoje li razlike u prehrani analiziranih populacija (Richard *i sur.*, 2009.).

Nadalje, varijacije u razinama serotonina mogu biti rezultat razlika u sintezi ili metabolizmu perifernog serotonina. U periferiji se serotonin sintetizira iz triptofana hidroksilacijom pomoću triptofan hidroksilaze 1 (TPH1), što je ograničavajući korak, nakon čega slijedi dekarboksilacija pomoću aromatske aminokiselinske dekarboksilaze (AADC) (Keszthelyi *i sur.*, 2009.). Serotonin se razgrađuje različitim metaboličkim putevima, ali većinom oksidativnom deaminacijom pomoću mitohondrijskog enzima monoamin oksidaze (MAO), pri čemu izoform MAO-A ima najveći afinitet za serotonin (Keszthelyi *i sur.*, 2009.).

Na temelju rezultata ove studije, *P. melisellensis* bi mogao imati veću aktivnost ili ekspresiju *Tph1* ili manju aktivnost/ekspresiju *Mao*, što bi rezultiralo višim razinama serotonina u serumu. Ekspresija i aktivnost TPH1 u enterkromafinim stanicama kontrolirana je signalima iz hranjivih tvari i susjednih stanica. Glukoza, fruktoza i saharoza su ugljikohidrati za koje je pokazano da povećavaju lučenje serotonina u kolonskim enterkromafinim stanicama, uspostavljajući izravnu vezu između serotoninske proizvodnje i dostupnosti hranjivih tvari (Yabut *i sur.*, 2019.). Također je pokazano da proizvodnja kratkolančanih masnih kiselina (acetat i butirat) od strane crijevnog mikrobioma kod glodavaca regulira ekspresiju *Tph1* i sintezu serotonina u EC stanicama, povećavajući razine serotonina u krvi (Yabut *i sur.*, 2019.). Kombinacija prehrane i sastava mikrobioma može stoga značajno utjecati na perifernu proizvodnju 5HT putem ekspresije i aktivnosti TPH1, što bi moglo biti razlog viših razina perifernog 5HT kod *P. melisellensis* u ovom istraživanju. Istraživanja na *Tph1* knock-out štakorima, gdje su razine perifernog serotonina bile drastično smanjene unatoč nepromijenjenim središnjim 5HT, ukazuju na ključnu ulogu TPH1 u perifernoj sintezi serotonina (Sbrini *i sur.*, 2022.). Naši rezultati s razlikama u perifernim razinama 5HT među vrstama, unatoč konstantnim razinama Trp, govore u prilog povećanoj ekspresiji ili aktivnosti TPH1. Istraživanja na miševima s izbačenim genom za MAO-A i modeli farmakološke inhibicije pokazale su da blokiranje MAO-A aktivnosti dovodi do značajno povišenih razina perifernog serotonina zbog smanjene razgradnje (Bortolato *i sur.*, 2013.; Fox *i sur.*, 2013.). Zbog nedostatka detekcije 5HIAA, nismo mogli procijeniti brzinu razgradnje 5HT, što je neizravna mjera MAO aktivnosti. Buduća istraživanja trebalo bi usmjeriti na analizu genske ekspresije TPH1 i MAO-A kako bi se utvrdio uzrok ovih razlika.

Promijenjena aktivnost prijenosnika serotonina (SERT) u trombocitima ima važnu ulogu u regulaciji homeostaze serotonina u plazmi. Mercado i suradnici (2010.) pokazali su da površinska ekspresija SERT-a na trombocitima dinamički reagira na koncentraciju serotonina u cirkulaciji – pri povišenim razinama dolazi do inicijalnog povećanja unosa, dok dugotrajnija izloženost vodi do internalizacije transportera i smanjenja njegove aktivnosti (Mercado *i sur.*, 2010). Ovaj povratni mehanizam regulacije upućuje na to da trombociti aktivno sudjeluju u očuvanju ravnoteže serotonina i da promjene u membranskom prometu SERT-a imaju ključnu ulogu u modulaciji njegove funkcionalne dostupnosti.

5.1.3. Razlike među vrstama u histomorfometriji crijeva

Obje vrste pokazuju dobro očuvanu staničnu cjelovitost i netaknut epitelni sloj crijevne sluznice, što ukazuje na slične histološke strukture. Histomorfometrijska analiza otkrila je značajne vrsne- i spolno-specifične razlike u strukturi probavnog sustava – konkretno u debljini sluzničkog, epitelnog i mišićnog sloja. Razlike među vrstama u veličini tijela, prehrani, staništu i metaboličkim stopama mogu dovesti do adaptivnih varijacija u morfologiji probavnog sustava (Karasov i Douglas, 2013.). Nedostatak interakcije između spola i vrste ukazuje na to da, iako svaki od tih čimbenika ima značajan učinak na uočene razlike u analiziranim slojevima, njihovi kombinirani učinci ne stvaraju aditivne niti sinergističke promjene.

Podarcis siculus imao je veću debljinu epitelnog, mukoznog i mišićnog sloja crijeva u odnosu na *P. melisellensi*. Te razlike među vrstama mogle bi biti povezane s veličinom tijela, fiziološkim i ekološkim razlikama između *Podarcis melisellensis* i *P. siculus*, poput razlika u prehrani ili staništu (Taverne *i sur.*, 2019.). Slične razlike u morfologiji i histologiji probavnog sustava zabilježene su i kod triju simpatrijskih vrsta guštera (*T. roborowskii*, *P. axillaris* i *E. roborowskii*), gdje su varijacije povezane s prehranbenim navikama, fiziološkim svojstvima i ekološkim prilagodbama na ekstremne okolišne uvjete (Wang *i sur.*, 2024.).

U radu Wang *i sur.*, 2024. uspoređene su dvije vrste ekstremnih pustinjskih guštera, *Eremias roborowskii* i *Phrynocephalus axillaris*, koje pokazuju različite termalne i lokomotorne adaptacije u odgovoru na varijacije temperature. Oni pokazuju da *P. axillaris* bolje održava performanse sprinta i pokret pri višim temperaturama, dok *E. roborowskii* ima veću izdržljivost i stabilnost kretanja pri rastućim temperaturama.

Poznata uloga serotonina u modulaciji aktivnosti glatkih mišića i funkcije epitela (Katzung *i sur.*, 2011.; Watts *i sur.*, 2012.) podupire ideju da povišene razine 5HT u *P. melisellensis* mogu povećati učinkovitost gastrointestinalnog sustava. Enterokromafine stanice reagiraju na luminalne podražaje otpuštanjem 5HT, čime aktiviraju subepitelne živčane završetke (Grundy i Schemann, 2004.). Promjene u serotoninskoj signalizaciji također mogu utjecati na sastav i funkciju mukoznog sloja moduliranjem epitelnih sekreta i imunoloških odgovora sluznice (Linden *i sur.*, 2009.), dodatno ističući funkcionalnu povezanost između razina 5HT i morfologije crijeva. Nadalje, pojačanje serotonergične signalizacije kod miševa dovodi do rasta sluznice tankog crijeva bez promjena u sastavu staničnih resica (Tackett *i sur.*, 2017.).

5.2. Međuspolne razlike

Analiza rezultata pokazala je prisutnost određenih međuspolnih razlika u ispitivanim parametrima. Općenito, mušjaci i ženke razlikovali su se u nekoliko mjernih vrijednosti, što ukazuje na potencijalnu ulogu spola u modulaciji promatranih bioloških i morfometrijskih karakteristika.

5.2.1. Spolne razlike u građi crijeva

Analiza morfometrijskih podataka jasno je pokazala prisutnost spolnog dimorfizma u ispitivanim vrstama. Mušjaci su imali značajno veću tjelesnu masu i duže tijelo (SLV) u usporedbi sa ženkama, što upućuje na veću ukupnu tjelesnu konstituciju. Uz to, duljina probavila i duljina tankog crijeva također bile su značajno veće kod muškaka, što potvrđuje očekivano da povećana tjelesna masa kod muškaka dolazi uz proporcionalno veći probavni sustav. S druge strane, analiza ZI pokazala je da nema statistički značajne razlike između muškaka i ženki, što sugerira da omjeri duljine probavila i masa tijela ostaju konzistentni bez obzira na spol.

Dobiveni nalazi u skladu su s radom (Cruz-Elizalde *i sur.*, 2020.) koji su analizirali spolni dimorfizam u veličini i obliku kod tri populacije guštera *Sceloporus variabilis* iz različitih okoliša u Meksiku. U 10 različitih parametara su pokazali da *S. variabilis* ima izraženi spolni dimorfizam u morfologiji, mušjaci imaju veće tjelesne dimenzije. Autori su zaključili da povećana veličina tijela muškaka može imati ekološke i funkcionalne posljedice, uključujući povećanu dužinu probavnog sustava i time veću sposobnost obrade hrane (Cruz-Elizalde *i sur.*, 2020.). Naši rezultati podupiru tu interpretaciju jer povećana masa i duže probavilo kod muškaka mogu predstavljati adaptaciju koja omogućuje veći unos i iskorištavanje hranjivih tvari (Taverne *i sur.* 2019.).

Spolne razlike u duljini probavila i tankog crijeva mogle bi se također povezati s različitim energetske potrebama muškaka i ženki. Mušjaci često imaju veću potrošnju energije zbog teritorijalnog ponašanja ili natjecanja za partnerice, što može zahtijevati povećanu površinu za apsorpciju hranjivih tvari. Ovi nalazi sugeriraju da morfometrijske razlike nisu samo pasivna posljedica većeg tijela, već i funkcionalna prilagodba.

Hoppe *i sur.*, 2021. u velikoj komparativnoj analizi vrsta pokazali su da duljina crijeva varira ne samo među vrstama, već i unutar njih, te da su te varijacije povezane s različitim

funkcionalnim zahtjevima. Autori naglašavaju da ove razlike postoje i u drugim životinja, iako slabije izražene nego kod sisavaca, te da su dovoljno konzistentne da upućuju na selekcijski pritisak vezan uz prehranu i energetske bilancu, što otvara prostor i za tumačenje međuspolnih razlika. Ovi nalazi snažno podupiru ideju da spolne razlike u duljini probavnog sustava nisu neutralan produkt rasta tijela, nego ciljane funkcionalne prilagodbe usklađene s različitim životnim i reproduktivnim strategijama mužjaka i ženki (Hoppe *i sur.*, 2021.).

5.2.2. Spolne razlike u perifernom serotoninu

Analiza razina serotonina (5HT) nije pokazala spolne razlike. Vrijednosti 5HT bile su usporedive između mužjaka i ženki, bez statistički značajnih razlika. Sličan obrazac uočen je i kod koncentracija triptofana, prekursora u biosintezi serotonina, što dodatno potvrđuje da spol ne utječe na osnovne metaboličke putove serotonergičkog sustava u ispitivanoj populaciji. Ovo je u skladu i s našim prethodnim istraživanjima na štakoru, kada smo utjecali na prekursor sinteze i inhibitor razgradnje, nakon kojeg smo mjerili periferni serotonin, te niti tada nismo uočili međuspolne razlike u razini serotonina (Gračan *i sur.*, 2024.).

Također, kvantifikacija enterokromafinih stanica tankog crijeva nije pokazala razlike među spolovima, što je u skladu s biokemijskom analizom 5HT. Ovi rezultati zajedno upućuju na to da serotoninški sustav u crijevu djeluje konzistentno neovisno o spolu, usporediv rezultat samo na značajnije manjem broju uzorka, pokazan je i kod štakora, kada broj pozitivno obojanih enterokromafinih stanica u sluznici tankog crijeva nije imao statistički značajnih odstupanja među spolovima (Gračan *i sur.*, 2024.).

5.2.3. Spolne razlike u histomorfometriji crijeva

Rezultati istraživanja ukazuju na to da spol ima utjecaj na histomorfologiju tankog crijeva, da značajno utječe na debljinu pojedinih slojeva crijevnog stijenke. Mužjaci su imali značajno deblji mukozni sloj i mišićni sloj u usporedbi sa ženkama, što može upućivati na funkcionalne razlike u apsorpcijskom kapacitetu i pokretljivosti crijeva. Ove razlike mogu biti povezane s većom ukupnom tjelesnom masom i duljim probavilom kod mužjaka, što smo također uočili u morfometrijskoj analizi, te bi mogle predstavljati morfološku prilagodbu na povećane metaboličke potrebe mužjaka.

Moguće je da deblji mišićni sloj kod mužjaka doprinosi učinkovitijoj propulziji hrane kroz probavni sustav, dok povećani mukozni sloj može povećati apsorpcijsku površinu, čime se osigurava zadovoljenje većih energetske potrebe.

S druge strane, epitelni sloj nije pokazao značajne spolne razlike, što ukazuje na to da osnovna arhitektura apsorpcijske površine ostaje konzistentna neovisno o spolu. Time se sugerira da je regulacija debljine epitela strože kontrolirana i manje podložna spolnim utjecajima, dok su mukozni i mišićni sloj fleksibilniji i podložniji adaptaciji.

Prethodna istraživanja dokumentirala su kako hormoni — osobito spolni steroidi — imaju ključnu ulogu u rastu i funkciji organa (Meinhardt i Ho, 2006.). Konkretno, estrogen i testosteron utječu na morfologiju probavnog sustava: staničnu proliferaciju, diferencijaciju i ukupnu arhitekturu tkiva (Liu *i sur.*, 2023.). Sve više istraživanja pokazuje da interakcije između estrogena, testosterona i serotoninske signalizacije unutar gastrointestinalnog sustava značajno pridonose razlikama u fiziologiji crijeva, metabolizmu i povezanim ponašanjima (Xu *i sur.*, 2025.). Estrogen je impliciran u modulaciji sinteze serotonina utjecajem na gensku ekspresiju *Tph1* u enterokromafinim stanicama, utječući na lokalnu proizvodnju 5HT, glavnog posrednika pokretljivost i sekrecije u crijevima (Xu *i sur.*, 2025.). Nadalje, istraživanja osovine mozak–crijeva–mikrobiom naglašavaju da su spolno-specifična hormonska okruženja ključna u regulaciji metabolizma triptofana i lokalne dostupnosti serotonina u crijevima (Xu *i sur.*, 2025.). Ostali čimbenici, osim hormonskih razlika, također bi mogli utjecati na strukturu crijeva, ali su još uvijek nedovoljno istraženi.

5.3. Povezanost perifernog serotonina i histoloških parametara

Odsutnost statistički značajne povezanosti između serotonina i analiziranih histomorfometrijskih parametara sugerira da varijacije u debljini crijevnih slojeva i broju enterokromafinih stanica nisu izravno povezane s koncentracijom serotonina. Iako su neke korelacije pokazivale negativan ili pozitivan trend, niske vrijednosti koeficijenata i *p*-vrijednosti iznad praga značajnosti upućuju na to da ti odnosi nisu dovoljno izraženi da bi imali biološki značaj u ispitivanim uvjetima.

Moguće objašnjenje za ovakav nalaz leži u činjenici da razina serotonina u crijevu odražava prvenstveno trenutnu funkcionalnu aktivnost enterkromafinih stanica, a ne njihovu brojnost ili morfološke karakteristike crijevne stijenke. Serotonin djeluje uglavnom lokalno i parakrino, pa njegove koncentracije mogu znatno varirati ovisno o podražajima, sastavu hrane i neurohumoralnim signalima, neovisno o debljini slojeva crijeva. Osim toga, broj enterkromatofinih stanica ne mora nužno odražavati njihovu sekrecijsku sposobnost – moguće je da su mehanizmi regulacije lučenja 5HT funkcionalni i dinamični, dok je histološka građa relativno stabilna. Na ovaj način se održava homeostaza serotoniniskog sustava čak i uz morfološke razlike, što objašnjava izostanak značajnih korelacija u našem istraživanju.

5.4. Veza perifernog serotonina i ponašanja

Središnji serotonin ima važnu ulogu u modulaciji ponašanja, tipično povezan s inhibicijom agresije kod kralježnjaka (Larson i Summers, 2001.; Summers *i sur.*, 2005.). Periferni serotonin uključen je u razne fiziološke funkcije, od pokretljivosti crijeva i metaboličke regulacije do kardiovaskularne i reproduktivne modulacije (Mohammad-Zadeh *i sur.*, 2008.; Berger *i sur.*, 2009.), a neka istraživanja pokazala su da periferni serotonin također može utjecati na određene aspekte ponašanja kroz još nepoznate mehanizme. Razlike među vrstama u razinama perifernog serotonina (5HT) u serumu i promijenjene histološke karakteristike mogu ukazivati na fiziološke prilagodbe povezane s ponašanjem, metabolizmom i/ili ekologijom u ovim dvjema vrstama. Promjene u perifernoj i središnjoj funkciji 5HT, izazvane perinatalnom hiperserotoninemijom (Hranilovic *i sur.*, 2011.), uzrokovale su izražene razlike u broju enterokromafinih stanica (Gračan *i sur.*, 2024.), popraćene smanjenom anksioznošću i većom kognitivnom fleksibilnošću (Blažević *i sur.*, 2012.). Smanjenje perifernog serotonina izazvano *Tph1*-deficijencijom dovelo je do promjena u dinamici hoda i deficita u ponašanju podizanja kod miševa (Suidan *i sur.*, 2013.) te do smanjenja ponašanja nalik anksioznosti kod štakora (Sbrini *i sur.*, 2022.). Kod guštera, iako ne postoje izravna istraživanja o perifernom serotoninu, poznato je da razlike u razinama središnjih neurotransmitera, uključujući serotonin, mogu biti povezane s promjenama u ponašanju i uspjehom invazije kod *P. siculus* (Nikolic *i sur.*, 2019.). U slučaju ove dvije vrste, viša središnja (Šikić *i sur.*, 2025.), ali niža periferna razina 5HT kod *Podarcis siculus* mogla bi biti jedan od čimbenika koji utječe na pojačano istraživačko i ponašanje traženja noviteta (Gojak *i sur.*, u recenziji) koje omogućava veću sklonost preuzimanju rizika i pruža prednost u osvajanju teritorija, što je zabilježeno u istraživanju (Glogoški *i sur.*, 2024.).

5.5. Kritički osvrt na pouzdanost i ograničenosti istraživanja

Snage našeg istraživanja uključuju nekoliko ključnih aspekata koji povećavaju njezinu znanstvenu vrijednost. Istraživanje je provedeno na simpatrijskim populacijama dviju vrsta guštera (*P. siculus* i *P. melisellensis*), uključujući mužjake i ženke, uzorkovane na tri različite lokacije (Knin, Sinj, Pag), što nam omogućava da utvrdimo stabilne međuvrsne i međuspolne razlike. Dodatna snaga leži u modelu simpatrije i sintopije, koji omogućuje istraživanje međuvrsnih interakcija u prirodnim uvjetima uz smanjeni utjecaj varijabilnosti okoliša. Nadalje, istraživanje na divljim populacijama (za razliku od laboratorijski uzgojenih životinja) daje uvid u prirodno prisutne razlike između vrsta. Paralelna kvantifikacija serotonina (5HT) i triptofana (Trp) iz istog uzorka seruma korištenjem vrlo osjetljive HPLC metodologije – uz minimalnu količinu uzorka – predstavlja tehnički napredak. Histološke i histomorfometrijske analize dodatno obogaćuju interpretaciju pružanjem strukturnog konteksta za biokemijske podatke.

Unatoč brojnim snagama, istraživanje također ima nekoliko ograničenja. Zbog male veličine tijela i količine tjelesne tekućine, uzimanje krvi moguće je jedino dekapitacijom, što onemogućuje longitudinalna mjerenja ili praćenje istih jedinki tijekom vremena. Nadalje, iako su i serotonin i triptofan mjereni paralelno, istraživanja ne uključuje analizu enzima uključenih u njihovu konverziju, što bi pružilo dublje razumijevanje serotoninске homeostaze. Navedeno je otežano zbog nedostatka anotiranog transkriptoma za ciljane vrste guštera, što ograničava mogućnost pouzdanog identificiranja i kvantificiranja relevantnih gena.

6. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem postignut je cilj analize periferne homeostaze serotonina na biokemijskoj i histološkoj razini u jedinkama simpatrijskih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*, u kojima su zabilježene razlike u ponašanju pod serotonergičnom kontrolom. Uspješno su određene razine serotonina i triptofana, prekursora njegove sinteze, metodom tekuće kromatografije visoke učinkovitosti u serumu guštera te analizirana građa tankog crijeva i brojnost enterokromafinih stanica. Nadalje, definirane su korelacije razine serotonina u krvi sa histološkom strukturom crijeva na razinu jedinke. Ustanovljene su razlike među vrstama i spolova u razinama perifernog serotonina i građi crijeva. Potvrđena je hipoteza da se razina perifernog serotonina razlikuje između simpatrijskih populacija *P. melisellensis* i *P. siculus*, na biokemijskoj i histološkoj razini.

Rezultati ovoga istraživanja pružili su uvid u periferni serotoninski sustav kod simpatrijskih populacija *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* te otkrili niz značajnih međuvrskih i međuspolnih razlika. Korištenjem integriranog pristupa koji je obuhvatio biokemijsku analizu razina serotonina (5HT) i triptofana (Trp), histomorfometriju tankog crijeva i kvantifikaciju enterokromafinih stanica, po prvi puta je na ovim vrstama dobiven uvid u periferni serotoninski sustav.

Najvažniji nalaz odnosi se na značajno više razine perifernog serotonina kod *P. melisellensis* u usporedbi s *P. siculus*, dok razine prekursora triptofana nisu pokazale razliku među vrstama. Ovaj rezultat posebno je zanimljiv jer dolazi unatoč činjenici da su jedinke obje vrste bile pod istim laboratorijskim uvjetima i hranjene istom hranom, što upućuje na postojanje ustavnih, fiziološki utemeljenih razlika u serotoninskoj homeostazi. Više razine perifernog 5HT-a kod *P. melisellensis* mogle bi se tumačiti kao odraz povećane aktivnosti serotoninskog sustava u crijevu ili smanjene razgradnje serotonina na periferiji. S obzirom na to da se broj enterokromafinih stanica nije razlikovao među vrstama, moguće je da ključnu ulogu imaju razlike u ekspresiji enzima triptofan-hidroksilaze (TPH1) ili monoamin-oksidade (MAO), što bi trebalo provjeriti u budućim molekularnim istraživanjima.

Histomorfometrijska analiza pokazala je da *P. siculus* ima deblje slojeve tankog crijeva, što je u skladu s njezinom većom tjelesnom veličinom, duljim probavilom i poznatom sposobnošću učinkovitije iskorištavanja širokog spektra hrane. Ovakva morfološka prilagodba

Zaključak

vjerojatno doprinosi njezinoj kompetitivnoj prednosti u simpatiji, jer omogućuje bolju apsorpciju nutrijenata i veći energetske prinos. Uočene su i spolne razlike – mužjaci obje vrste imali su deblje slojeve crijeva od ženki, što može biti povezano s njihovim povećanim energetske potrebama i hormonski uvjetovanim metaboličkim razlikama.

Ovim istraživanjem ostvareno je unaprjeđenje spoznaja o perifernoj homeostazi serotonina u jedinkama simpatijskih populacija *P. siculus* i *P. melisellensis*. Prvi put su utvrđene koncentracije serotonina i njegovih metabolita u serumu gušterica, čime je otvoreno novo područje istraživanja serotonergičnih mehanizama u ovih vrsta. Uključivanje oba spola omogućilo je identifikaciju spolno specifičnih obrazaca u serotonergičnoj transmisiji, a razjašnjavanje uloge serotonina na periferiji pridonijelo je dubljem razumijevanju interakcija između ovih dviju vrsta, koje se razlikuju u razini agresivnosti i koncentracijama monoamina u mozgu. Dobiveni rezultati predstavljaju vrijedan doprinos znanstvenoj osnovi za daljnja istraživanja te mogu poslužiti kao temelj za razvoj učinkovitijih strategija očuvanja endemske vrste *P. melisellensis* i za razumijevanje invazivnog potencijala vrste *P. siculus*.

7. POPIS LITERATURE

Aladrovic, J., Miljkovic, J., Shek Vugrovecki, A., Blazevic, S.A., Lisicic, D., Gojak, T., Sikic, D., Beer Ljubic, B. i Pađen, L. (2023) Lipid indices in abdominal fat and ovaries in *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis*. 16th Annual Meeting of Croatian Physiological Society, 28–30.

Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Hranilović, D., Herak Bosnar, M., Katušić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S. i Slde, N. (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Zagreb: Institut Ruđer Bošković, 1: 135–138.

Arnold, E.N., Arribas, O. i Carranza, S. (2007) Systematics of the Palearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. *Zootaxa*. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1430.1.1>

Azmitia, E.C. (2007) Serotonin and brain: Evolution, neuroplasticity, and homeostasis. *International Review of Neurobiology*, 77: 31–56.

Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J.P., Bouguiyoud, N., Di Giovanni, G., i sur. (2020) Serotonin in animal cognition and behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.

Baird, T.A. (2013) Lizards and other reptiles as model systems for the study of contest behaviour. *U: Animal Contests*, 258–286. <https://doi.org/10.1017/CBO9781139051248.014>

Banks, W.A. (2008) The blood–brain barrier: Connecting the gut and the brain. *Regulatory Peptides*, 149: 11–14.

Belić, M., Turk, R., Lukač, M., Veršec, I. i Robić, M. (2017) Hematologija gmazova. *Veterinarska stanica*, 48.

Benchaya, G.A., Ramires, A.C., Picelli, A.M. i Santos Magalhães, M. dos (2024) Morphological description of the digestive tract of the Amazonian diving lizard *Uranoscodon superciliosus* (Linnaeus, 1758) and its associations to the diet and foraging mode. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 96.

Berger, M., Gray, J.A. i Roth, B.L. (2009) The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60: 355–366.

Biaggini, M., Berti, R. i Corti, C. (2009) Different habitats, different pressures? Analysis of escape behaviour and ectoparasite load in *Podarcis sicula* (Lacertidae) populations in different agricultural habitats. *Amphibia-Reptilia*, 30: 453–461.

Billett, E. (2004) Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology*, 25: 139–148.

Blažević, S., Čolić, L., Čulić, L. i Hranilović, D. (2012) Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behavioural Brain Research*, 230: 175–181.

Blažević, S., Dolenc, P. i Hranilović, D. (2011) Physiological consequences of perinatal treatment of rats with 5-hydroxytryptophan. *Periodicum biologorum*, 113: 81–86.

Boadle-Biber, M.C. (1993) Regulation of serotonin synthesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology*, 60.

Bortolato, M., Godar, S.C., Tambaro, S., Li, F.G., Devoto, P., Coba, M.P., i sur. (2013) Early postnatal inhibition of serotonin synthesis results in long-term reductions of perseverative behaviors, but not aggression, in MAO A-deficient mice. *Neuropharmacology*, 75: 223–232.

Brawman-Mintzer, O. i Yonkers, K.A. (2004) New trends in the treatment of anxiety disorders. *CNS Spectrums*, 9: 19–27.

Brecko, J., Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Herrel, A., Grbac, I. i Van Damme, R. (2008) Functional and ecological relevance of intraspecific variation in body size and shape in the lizard *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 94: 251–264.

Campbell, T.W. (2015) *Exotic Animal Hematology and Cytology: Fourth Edition*. 1–402. <https://doi.org/10.1002/9781118993705>

Cansev, M. i Wurtman, R.J. (2007) Aromatic amino acids in the brain. *U: Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, 60–97.

Capaldo, A., Laforgia, V., Sciarrillo, R., Valiante, S., Gay, F. i Varano, L. (2003) Localization and role of serotonin in the adrenal gland of *Podarcis sicula* (Reptilia, Lacertidae). *General and Comparative Endocrinology*, 132: 66–75.

- Capula, M. i Aloise, G. (2011) Extreme feeding behaviours in the Italian wall lizard, *Podarcis siculus*. *Acta Herpetologica*, 6: 11–14.
- Capula, M., Luiselli, L., Bologna, M.A. i Ceccarelli, A. (2002) The decline of the Aeolian wall lizard, *Podarcis raffonei*: causes and conservation proposals. *Oryx*, 36: 66–72.
- Capula, M., Luiselli, L. i Rugiero, L. (1993) Comparative ecology in sympatric *Podarcis muralis* and *P. sicula* (Reptilia: Lacertidae) from the historical centre of Rome: competition and niche segregation in an urban habitat? *Bollettino di Zoologia*, 60: 287–291.
- Lo Cascio, P. i Pasta, S. (2006) Preliminary data on the biometry and the diet of a microinsular population of *Podarcis wagleriana* (Reptilia: Lacertidae). *Acta Herpetologica*, 1: 147–152.
- Crnobrnja-Isailovic, J., Vogrin, M., Corti, C., Pérez Mellado, V., Sá-Sousa, P., Cheylan, M., i sur. (2009) *Podarcis siculus* – Italian Wall Lizard. The IUCN Red List of Threatened Species 2009, e.T61553A86151752.
<https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T61553A12515189.en>
- Cruz-Elizalde, R., Ramírez-Bautista, A., Rosas Pacheco, L.F., Lozano, A. i Rodríguez-Romero, F.J. (2020) Sexual dimorphism in size and shape among populations of the lizard *Sceloporus variabilis* (Squamata: Phrynosomatidae). *Zoology*, 140: 125781.
- Darmon, M.C., Guibert, B., Leviel, V., Ehret, M., Maitre, M. i Mallet, J. (1988) Sequence of two mRNAs encoding active rat tryptophan hydroxylase. *Journal of Neurochemistry*, 51: 312–316.
- Davies, K.R., Richardson, G., Akmentin, W., Acuff, V. i Fenstermacher, J.D. (1996) The microarchitecture of cerebral vessels. U: *Biology and Physiology of the Blood–Brain Barrier: Transport, Cellular Interactions, and Brain Pathologies*, 83–91. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9489-2_15
- Diksic, M. i Young, S.N. (2001) Study of the brain serotonergic system with labeled α -methyl-L-tryptophan. *Journal of Neurochemistry*, 78: 1185–1200.
- Dougherty, D.M., Richard, D.M., Dawes, M.A., Mathias, C.W., Acheson, A. i Hill-Kapturczak, N. (2009) L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, 2.

- Downes, S. i Bauwens, D. (2004) Associations between first encounters and ensuing social relations within dyads of two species of lacertid lizards. *Behavioral Ecology*, 15: 938–945.
- Dukes, A., Davis, C., El Refaey, M., Upadhyay, S., Mork, S., Arounleut, P., i sur. (2015) The aromatic amino acid tryptophan stimulates skeletal muscle IGF1/p70s6k/mTOR signaling in vivo and the expression of myogenic genes in vitro. *Nutrition*, 31: 1018–1024.
- Eisenreich, B.R. i Szalda-Petree, A. (2015) Behavioral effects of fluoxetine on aggression and associative learning in Siamese fighting fish (*Betta splendens*). *Behavioural Processes*, 121: 37–42.
- El-Merahbi, R., Löffler, M., Mayer, A. i Sumara, G. (2015) The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis. *FEBS Letters*, 589: 1728–1734.
- Erspamer, V. i Asero, B. (1952) Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. *Nature*, 169: 800–801.
- Fernstrom, J.D., Larin, F. i Wurtman, R.J. (1973) Correlations between brain tryptophan and plasma neutral amino acid levels following food consumption in rats. *Life Sciences*, 13: 517–524.
- Forssmann, W.G., Orci, L., Pictet, R., Renold, A.E. i Rouiller, C. (1969) The endocrine cells in the epithelium of the gastrointestinal mucosa of the rat: An electron microscope study. *Journal of Cell Biology*, 40: 692–715.
- Fox, M.A., Panessiti, M.G., Moya, P.R., Tolliver, T.J., Chen, K., Shih, J.C., i sur. (2013) Mutations in monoamine oxidase (MAO) genes in mice lead to hypersensitivity to serotonin-enhancing drugs: Implications for drug side effects in humans. *Pharmacogenomics Journal*, 13: 551–557.
- Gasc, J-P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailovic, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., i sur. (2004) Atlas of Amphibians and Reptiles in Europe. Paris: Muséum national d'Histoire naturelle (Collection Patrimoines Naturels 29).
- Gershon, M.D. i Tack, J.A.N. (2007) The serotonin signaling system: From basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology*, 132: 397–414.

- Glogoški, M., Hocenski, K., Gojak, T., Blažević, S.A. i Hranilović, D., Lisičić, D. (2024) Behavioural traits for success: comparison between two sympatric lacertid lizard species. *Animal Behaviour*, 218: 263–273.
- Gorman, G.C., Soulé, M., Yang, S.Y. i Nevo, E. (1975) Evolutionary genetics of insular Adriatic lizards. *Evolution*, 29: 52–71.
- Gračan, R., Blažević, S.A., Brižić, M. i Hranilović, D. (2024) Beyond the brain: Perinatal exposure of rats to serotonin enhancers induces long-term changes in the jejunum and liver. *Biomedicines*, 12.
- Grbac, I. i Bauwens, D. (2001) Constraints on temperature regulation in two sympatric *Podarcis* lizards during autumn. *Copeia*, 2001: 178–186.
- Grbac, I. i Brnin, K. (2006) Habitat use of sympatric populations of *Podarcis sicula* and *P. melisellensis* on a small Adriatic island. *Periodicum biologorum*, 108: 177–182.
- Grimelius, L. (2004) Silver stains demonstrating neuroendocrine cells. *Biotechnic & Histochemistry*, 79: 37–44.
- Grundy, D. i Schemann, M. (2004) Serotonin in the gut: pretty when it gets down to the nitty gritty. *Neurogastroenterology & Motility*, 16: 507–509.
- Hamdi, H., El-Ghareeb, A.W., Zaher, M., Essa, A. i Lahsik, S. (2014) Anatomical, histological and histochemical adaptations of the reptilian alimentary canal to their food habits: II – *Chamaeleon africanus*. *World Applied Sciences Journal*, 30: 1306–1316.
- Hanswijk, S.I., Spoelder, M., Shan, L., Verheij, M.M.M., Muilwijk, O.G., Li, W., i sur. (2020) Gestational factors throughout fetal neurodevelopment: The serotonin link. *International Journal of Molecular Sciences*, 21.
- Hartline, J.T., Smith, A.N. i Kabelik, D. (2017) Serotonergic activation during courtship and aggression in the brown anole, *Anolis sagrei*. *PeerJ*, 5: e3331.
- Hensler, J.G. (2011) Serotonin. U: *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular and Medical Neurobiology*, 300–322.
- Herrel, A., Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Backeljau, T., Breugelmans, K., Grbac, I., i sur. (2008a) Rapid large-scale evolutionary divergence in morphology and performance associated

with exploitation of a different dietary resource. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 4792–4795.

Herrel, A., Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Backeljau, T., Breugelmans, K., Grbac, I., i sur. (2008b) Rapid large-scale evolutionary divergence in morphology and performance associated with exploitation of a different dietary resource. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 4792.

Hoppe, M.I., Meloro, C., Edwards, M.S., Codron, D., Clauss, M. i Duque-Correa, M.J. (2021) Less need for differentiation? Intestinal length of reptiles as compared to mammals. *PLoS ONE*, 16.

Hranilović, D., Blažević, S., Ivica, N., Cicin-Sain, L., Oresković, D. i Hranilović, D. (2011) The effects of perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranlycypromine on peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International*, 59: 202–207.

Husak, J.F., Keith, A.R. i Wittry, B.N. (2015) Making Olympic lizards: The effects of specialised exercise training on performance. *Journal of Experimental Biology*, 218: 899–906.

Jelić, D., Kuljerić, M., Koren, T., Treer, D., Šalamon, D., Lončar, M., i sur. (2012) Red book of Amphibians and Reptiles of Croatia. Zagreb: Ministry of Environmental and Nature Protection; State Institute for Nature Protection.

Jenkins, T.A., Nguyen, J.C.D., Polglaze, K.E. i Bertrand, P.P. (2016) Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients*, 8.

Johnson, B.A. (2004) Role of the serotonergic system in the neurobiology of alcoholism: Implications for treatment. *CNS Drugs*, 18: 1105–1118.

Joiner, T.E., Brown, J.S. i Wingate, L.R. (2005) The psychology and neurobiology of suicidal behavior. *Annual Review of Psychology*, 56: 287–314.

Kabelik, D. i Hofmann, H.A. (2018) Comparative neuroendocrinology: A call for more study of reptiles! *Hormones and Behavior*, 106: 189–192.

Karasov, W.H. i Douglas, A.E. (2013) Comparative digestive physiology. *Comprehensive Physiology*, 3: 741–783.

Katzung, B.G., Masters, S.B. i Trevor, A.J. (2011) Temeljna i klinička farmakologija. Zagreb: Medicinska naklada.

Keszthelyi, D., Troost, F.J. i Masclee, A.A.M. (2009) Understanding the role of tryptophan and serotonin metabolism in gastrointestinal function. *Neurogastroenterology & Motility*, 21: 1239–1249.

Kovačević, M. i Tvrtković, N. (2025) First evidence of the expansion of *Podarcis siculus* (Reptilia: Squamata: Lacertidae) in the Pannonian Plain. *Natura Croatica*, 21.

Lacković-Venturin, G. (1992) Imunohistokemijska i stereološka istraživanja neuroendokrinih stanica u antrumu i duodenumu fetusa štakora i čovjeka.

Larson, E.T. i Summers, C.H. (2001) Serotonin reverses dominant social status. *Behavioural Brain Research*, 121: 95–102.

Linden, D.R., White, S.L., Brooks, E.M. i Mawe, G.M. (2009) Novel promoter and alternate transcription start site of the human serotonin reuptake transporter in intestinal mucosa. *Neurogastroenterology & Motility*, 21: 534.

Liu, L., Zhang, L., Li, C., Qiu, Z., Kuang, T., Wu, Z., i sur. (2023) Effects of hormones on intestinal stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 14: 105.

Lopez-Vilchez, I., Diaz-Ricart, M., White, J.G., Escolar, G. i Galan, A.M. (2009) Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced during platelet tissue factor uptake. *Cardiovascular Research*, 84: 309–316.

Lovegrove, B.G. (2017) A phenology of the evolution of endothermy in birds and mammals. *Biological Reviews*, 92: 1213–1240.

Lovenberg, W., Jequier, E. i Sjoerdsma, A. (1967) Tryptophan hydroxylation: Measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 155: 217–219.

Lucki, I. (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. *Biological Psychiatry*, 44: 151–162.

Whitaker-Azmitia, P.M. (1999) The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuroscientist*, 5: 154–165.

Popis literature

- Matthes, S. i Bader, M. (2018) Peripheral serotonin synthesis as a new drug target. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39: 560–572.
- Mauro Grano, C.C. (2011) A case of cannibalism in *Podarcis siculus campestris* De Betta, 1857 (Reptilia, Lacertidae). *Acta Herpetologica*, 2: 151–152.
- McIsaac, W.M., Page, I.H. i Page, H. (1959) The metabolism of serotonin. *Journal of Biological Chemistry*, 234: 858–864.
- Meinhardt, U.J. i Ho, K.K.Y. (2006) Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 65: 413–422.
- Mescher, A.L. (2013) *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas*. 17th ed. McGraw Hill Medical.
- Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L. i Gwaltney-Brant, S.M. (2008) Serotonin: A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31: 187–199.
- Mrdjen-Hodžić, R. (2024) Epigenetičke značajke gena NR3C1 i razina kortizola u populaciji trudnica na otocima i kopnu. <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:545262>
- Musumeci, G., Loreto, C., Trovato, F.M., Giunta, S., Imbesi, R. i Castrogiovanni, P. (2014) Serotonin (5-HT) expression in rat pups treated with high-tryptophan diet during fetal and early postnatal development. *Acta Histochemica*, 116: 335–343.
- Namkung, J., Kim, H. i Park, S. (2015) Peripheral serotonin: A new player in systemic energy homeostasis. *Molecules and Cells*, 38: 1023–1028.
- Nevo, E., Gorman, G.C., Soulé, M., Yang, S.Y., Clover, R. i Jovanović, V. (1972) Competitive exclusion between insular *Lacerta* species (Sauria, Lacertidae) – Notes on experimental introductions. *Oecologia*, 10: 183–190.
- Nikolić, B., Josić, P., Burić, D., Tkalec, M., Lisičić, D., Blažević, S.A., i sur. (2019) Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations. *Journal of Comparative Physiology A*, 205: 451–456.
- Noguchi, T., Nishino, M. i Kido, R. (1973) Tryptophan 5-hydroxylase in rat intestine. *Biochemical Journal*, 131: 375–380.

Popis literature

- Nonogaki, K. (2022) The regulatory role of the central and peripheral serotonin network on feeding signals in metabolic diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23.
- O'Connor, J.M. (1912) Über den Adrenalingehalt des Blutes. *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 67: 195–232.
- Oh, C.M., Park, S. i Kim, H. (2016) Serotonin as a new therapeutic target for diabetes mellitus and obesity. *Diabetes & Metabolism Journal*, 40: 89–98.
- Olivier, B. (2015) Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753: 2–18.
- Pastor, L.M., Ballesta, J., Perez-Tomas, R., Marin, J.A., Hernandez, F. i Madrid, J.F. (1987) Immunocytochemical localization of serotonin in the reptilian lung. *Cell and Tissue Research*, 248: 713–715.
- Patharkar, T., Van Passel, L. i Brock, K.M. (2022) Eat or be eaten? An observation of *Podarcis erhardii* consuming *Scolopendra cingulata* from Andros Island, Cyclades, Greece. *Herpetozoa*, 35: 209–212.
- Paulmann, N., Grohmann, M., Voigt, J.P., Bert, B., Vowinckel, J., Bader, M., i sur. (2009) Intracellular serotonin modulates insulin secretion from pancreatic β -cells by protein serotonylation. *PLoS Biology*, 7: e1000229.
- Pierozan, P., Jernerén, F., Ransome, Y. i Karlsson, O. (2017) The choice of euthanasia method affects metabolic serum biomarkers. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 121: 113–118.
- Racké, K., Reimann, A., Schwörer, H. i Kilbinger, H. (1995) Regulation of 5-HT release from enterochromaffin cells. *Behavioural Brain Research*, 73: 83–87.
- Rapport, M.M. (1949) Serum vasoconstrictor (serotonin) V. The presence of creatinine in the complex; a proposed structure of the vasoconstrictor principle. *Journal of Biological Chemistry*, 180: 961–969.
- Rapport, M.M., Green, A.A. i Page, I. (1948) Serum vasoconstrictor (serotonin). IV. Isolation and characterization. *Journal of Biological Chemistry*, 176: 1243–1251.

Popis literature

Raynor, R.G. (1989) Ecological segregation between *Podarcis sicula* and *P. melisellensis* (Sauria: Lacertidae) in Yugoslavia. *Herpetological Journal*, 1: 418–420.

Richard, D.M., Dawes, M.A., Mathias, C.W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N. i Dougherty, D.M. (2009) L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, 2: 45–60.

Russell, W.M.S. i Burch, R.L. (1992) *The Principles of Humane Experimental Technique*. UFAW.

Sabolić, I. (2021) Genomic patterns of phenotypic adaptation in Italian wall lizard *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810).

Sainio, E.L., Pulkki, K. i Young, S.N. (1996) L-Tryptophan: Biochemical, nutritional and pharmacological aspects. *Amino Acids*, 10: 21–47.

Sánchez Mateos, S., Sánchez, C.L., Paredes, S.D., Barriga, C. i Rodríguez, A.B. (2009) Circadian levels of serotonin in plasma and brain after oral administration of tryptophan in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104: 52–59.

Sandler, M., Reveley, M.A. i Glover, V. (1981) Human platelet monoamine oxidase activity in health and disease: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 34: 292–302.

Santana, L.M.B.M., Damasceno, É.P., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Pousão-Ferreira, P., Abessa, D.M.S., i sur. (2023) An easy-to-use histological technique for small biological samples of Senegalese sole larvae. *Applied Sciences*, 13: 2346.

Sbrini, G., Hanswijk, S.I., Brivio, P., Middelmann, A., Bader, M., Fumagalli, F., i sur. (2022) Peripheral serotonin deficiency affects anxiety-like behavior and the molecular response to an acute challenge in rats. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 4941.

Shih, J.C., Chen, K. i Ridd, M.J. (1999) Monoamine oxidase: From genes to behavior. *Annual Review of Neuroscience*, 22: 197–217.

Šikić, D., Turković, L., Malev, O., Gojak, T., Lisičić, D., Sertić, M., i sur. (2025) An LC-MS/MS-based approach for monitoring monoaminergic status in lizard brains: Method development and real-samples application. *Journal of Comparative Physiology A*. <https://doi.org/10.1007/s00359-025-01753-6>

Popis literature

Singh, S.K., Das, D. i Rhen, T. (2020) Embryonic temperature programs phenotype in reptiles. *Frontiers in Physiology*, 11: 35.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. i Crouch, S.R. (2014) *Fundamentals of Analytical Chemistry*. Brooks/Cole, Cengage Learning.

Sodeinde, O.A. i Ogunjobi, A.A. (1994) Haematological values of the rainbow lizard *Agama agama* L. *Herpetological Journal*, 4: 86–90.

Sperry, T.S., Thompson, C.K. i Wingfield, J.C. (2003) Effects of acute treatment with 8-OH-DPAT and fluoxetine on aggressive behaviour in male song sparrows (*Melospiza melodia morphna*). *Journal of Neuroendocrinology*, 15: 150–160.

Srichairat, N., Taksintum, W. i Chumnannpuen, P. (2022) Histological and histochemical studies of the gastrointestinal tract in the water monitor lizard (*Varanus salvator*). *Acta Zoologica*, 103: 376–387.

Stacy, N.I., Alleman, A.R. i Sayler, K.A. (2011) Diagnostic hematology of reptiles. *Clinics in Laboratory Medicine*, 31: 87–108.

Stolz, J.F. (1985) Uptake and storage of serotonin by platelets. U: *Serotonin and the Cardiovascular System*, 38–42.

Suidan, G.L., Duerschmied, D., Dillon, G.M., Vanderhorst, V., Hampton, T.G., Wong, S.L., i sur. (2013) Correction: Lack of tryptophan hydroxylase-1 in mice results in gait abnormalities. *PLoS ONE*, 8.

Summers, C.H. (2001) Mechanisms for quick and variable responses. *Brain, Behavior and Evolution*, 57: 283–292.

Summers, C.H., Korzan, W.J., Lukkes, J.L., Watt, M.J., Forster, G.L., Øverli, Ø., i sur. (2005) Does serotonin influence aggression? Comparing regional activity before and during social interaction. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78: 679–694.

Summers, T.R., Matter, J.M., McKay, J.M., Ronan, P.J., Larson, E.T., Renner, K.J., i sur. (2003) Rapid glucocorticoid stimulation and GABAergic inhibition of hippocampal serotonergic response: In vivo dialysis in the lizard *Anolis carolinensis*. *Hormones and Behavior*, 43: 245–253.

Suvarna, K.S., Layton, C. i Bancroft, J.D. (2013) Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. VetBooks.

Szoke-Kovacs, Z., More, C., Szoke-Kovacs, R., Mathe, E. i Frecska, E. (2020) Selective inhibition of the serotonin transporter in the treatment of depression: Sertraline, fluoxetine and citalopram. *Neuropsychopharmacol Hung.*, 22.

Tackett, J.J., Gandotra, N., Bamdad, M.C., Muise, E.D. i Cowles, R.A. (2017) Enhanced serotonin signaling stimulates ordered intestinal mucosal growth. *Journal of Surgical Research*, 208: 198–203.

Takano, Y., Machida, T., Obara, Y., Hirano, M., Kudo, S., Takagi, M., i sur. (2014) Methotrexate causes a change in intestinal 5-hydroxytryptamine metabolism in rats. *European Journal of Pharmacology*, 740: 496–503.

Taverne, M., Fabre, A.C., King-Gillies, N., Krajnović, M., Lisičić, D., Martin, L., i sur. (2019) Diet variability among insular populations of *Podarcis* lizards reveals diverse strategies to face resource-limited environments. *Ecology and Evolution*, 9: 12408–12420.

Thorpe, L.W., Westlund, K.N., Kochersperger, L.M., Abell, C.W. i Denney, R.M. (1987) Immunocytochemical localization of monoamine oxidases A and B in human peripheral tissues and brain. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 35: 23–32.

Tuniyev, B.S., Shagarov, L.M. i Arribas, O.J. (2020) *Podarcis siculus* (Reptilia: Sauria: Lacertidae), a new alien species for Russian fauna. *Proceedings of the Zoological Institute RAS*, 324: 364–370.

Turlejski, K. (1996) Evolutionary ancient roles of serotonin: long-lasting regulation of activity and development. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 56: 619–636.

Tyce, G.M. (1990) Origin and metabolism of serotonin. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 16: S1–S7.

Udenfriend, S., Weissbach, H., Bogdanski, D.F. (1957) Biochemical findings relating to the action of serotonin *The New York Academy of Science* <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1957.tb40750.x>

Vervust, B., Pafilis, P., Valakos, E.D. i Van Damme, R. (2010) Anatomical and physiological changes associated with a recent dietary shift in the lizard *Podarcis sicula*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 83: 632–642.

Vialli, M. i Erspamer, V. (1937) Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Cell and Tissue Research*, 51: 81–99.

Vitt, L.J. i Caldwell, J.P. (2009) Thermoregulation, performance, and energetics. *U: Herpetology*, 191–213. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374346-6.00007-9>

Wade, J. (2005) Current research on the behavioral neuroendocrinology of reptiles. *Hormones and Behavior*, 48: 451–460.

Wang, Z., Chen, S., Zheng, Y., Wu, R. i Yang, Y. (2024) Digestive tract morphology and argyrophil cell distribution of three sympatric lizard species. *The European Zoological Journal*, 91: 649–661.

Watanabe, H., Akasaka, D., Ogasawara, H., Sato, K., Miyake, M., Saito, K., i sur. (2010) Peripheral serotonin enhances lipid metabolism by accelerating bile acid turnover. *Endocrinology*, 151: 4776–4786.

Watts, S.W., Morrison, S.F., Davis, R.P. i Barman, S.M. (2012) Serotonin and blood pressure regulation. *Pharmacological Reviews*, 64: 359–388.

Winberg, S. i Nilsson, G.E. (1993) Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 106.

Xu, M., Zhou, E.Y. i Shi, H. (2025) Tryptophan and its metabolite serotonin impact metabolic and mental disorders via the brain–gut–microbiome axis: A focus on sex differences. *Cells*, 14: 384.

Xue, D., Guo, X., Liu, J., Li, Y., Liu, L., Liao, G., i sur. (2024) Tryptophan-rich diet and its effects on Htr7⁺ Tregs in alleviating neuroinflammation and cognitive impairment induced by lipopolysaccharide. *Journal of Neuroinflammation*, 21.

Ya, A., Aae, E-H. i Ae, Z. (2009) Histological and histochemical studies on the esophagus, stomach and small intestines of *Varanus niloticus*. *Journal of Veterinary Anatomy*, 2: 35–48.

Popis literature

Yabut, J.M., Crane, J.D., Green, A.E., Keating, D.J., Khan, W.I. i Steinberg, G.R. (2019) Emerging roles for serotonin in regulating metabolism: New implications for an ancient molecule. *Endocrine Reviews*, 40: 1092–1107.

Zucker, M.B. i Borrelli, J. (1955) Relationship of some blood clotting factors to serotonin release from washed platelets. *Journal of Applied Physiology*, 7: 432–442.

Zuffi, M.A.L. (2013) Trophic niche and feeding biology of the Italian wall lizard, *Podarcis siculus campestris* (De Betta, 1857) along western Mediterranean coast. *Acta Herpetologica*, 8: 35–39.

Hrvatska enciklopedija. Dostupno na: <https://www.enciklopedija.hr/clanak/gmazovi>

The Reptile Database. Dostupno na: <https://reptile-database.reptarium.cz/>

8. PRILOZI

Prilog 1. Rješenje Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja Republike Hrvatske (KLASA: UPI/I-612-07/21-48/202; URBROJ 517-10-1-1-21-4)

	
REPUBLIKA HRVATSKA MINISTARSTVO GOSPODARSTVA I ODRŽIVOG RAZVOJA	
KLASA: UPI/I-612-07/21-48/202 URBROJ: 517-10-1-1-21-4 Zagreb, 6. listopada 2021.	
Ministarstvo gospodarstva i održivog razvoja, na temelju članka 155. Zakona o zaštiti prirode („Narodne novine“, br. 80/13, 15/18, 14/19 i 127/19), povodom zahtjeva Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (OIB 28163265527), Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, HR-10000 Zagreb, za izuzeće od zabranjenih radnji sa strogo zaštićenim vrstama donosi sljedeće	
RJEŠENJE	
Dopušta se Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (OIB 28163265527), Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, HR-10000 Zagreb, istraživanje krške gušterice (<i>Podarcis melisellensis</i>), koje uključuje namjerno uznemiravanje, hvatanje i izuzimanje jedinki iz prirode na području okolice Knina, Sinjskog polja i otoka Paga. - Odgovorna osoba za provođenje ovog rješenja je doc. dr. sc. Sofia Ana Blažević, a sudionici istraživanja su još doc. dr. sc. Duje Lisičić, Marko Glogoški, Tomislav Gojak, Dunja Šikić i doc. dr. sc. Zoran Marčić. - Dopuštenje se daje uz sljedeće uvjete: - dopušteno je jedinke gušterice hvatati rukama i omčicom, - dopušteno je uhvatiti najviše 72 odrasle jedinke i to na način da se na svakoj od ukupno 3 lokacija uhvati najviše 12 ženki i 12 mužjaka, - dopušteno je držati u zatočeništvu izuzete jedinke, - dopušteno je uzeti uzorak krvi iz orbitalnog sinusa, - dopušteno je izuzete jedinke eutanazirati u okviru provođenja istraživanja, - o terminu izlaska na teren potrebno je pravovremeno obavijestiti javnu ustanovu koja upravlja područjem na kojem se provodi istraživanje. - Nositelj rješenja dužan je ovom Ministarstvu podnijeti izvješće u digitalnom obliku na službenom obrascu Ministarstva najkasnije do 31. listopada 2021. godine. - Dopuštenje vrijedi do 31. listopada 2021. godine. - U slučaju nepridržavanja propisanih uvjeta, ili u slučaju nastanka nepredviđenih događaja s negativnim učincima na prirodu, Ministarstvo može ukinuti izdano rješenje.	
Obrazloženje	
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu (OIB 28163265527), Biološki odsjek, Rooseveltov trg 6, HR-10000 Zagreb, uputio je ovom Ministarstvu zahtjev za istraživanje krške gušterice (<i>Podarcis melisellensis</i>), koje uključuje namjerno uznemiravanje, hvatanje i	
stranica 1 od 2	

*Prilog 2. Mišljenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja
(KLASA: 643-02/2 4-01/1; URBROJ 251-58-10617-24-335)*



KLASA: 643-02/24-01/1
URBROJ: 251-58-10617-24-335
U Zagrebu, 29.8.2024 10:40
8BC45D0B-7983-4543-A765-22B95129DA33

PREDMET: Mišljenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja

Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pregledalo je zamolbu za odobrenje pokusa na životinjama koju je podnijela **Matea Brižić** studentica doktorskog studija Biologije PMF-a Sveučilišta u Zagrebu.

Mišljenje Povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja

Povjerenstvo za bioetiku i dobrobit životinja Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta pregledalo je zamolbu za odobrenje pokusa na životinjama za potrebe izrade doktorskog rada studentice doktorskog studija biologije **Matee Brižić** pod predloženim naslovom: „**Periferni serotonin u simpatrijskih populacija *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis***“. Voditeljica doktorskog rada je izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević.

Predloženo istraživanje u skladu je s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17) te Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te Etičkim kodeksom Sveučilišta u Zagrebu i kao takvo etički prihvatljivo za provedbu.

Članovi povjerenstva:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Prof. dr. sc. Inga Urlić

izuzeta

Izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević

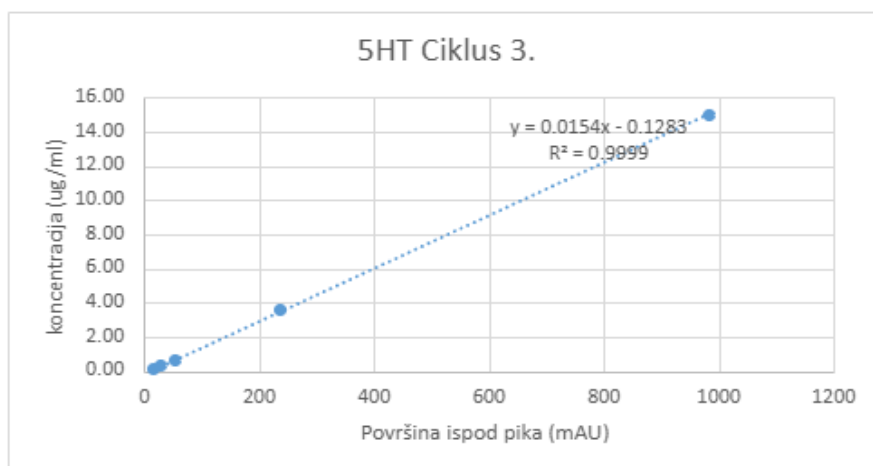
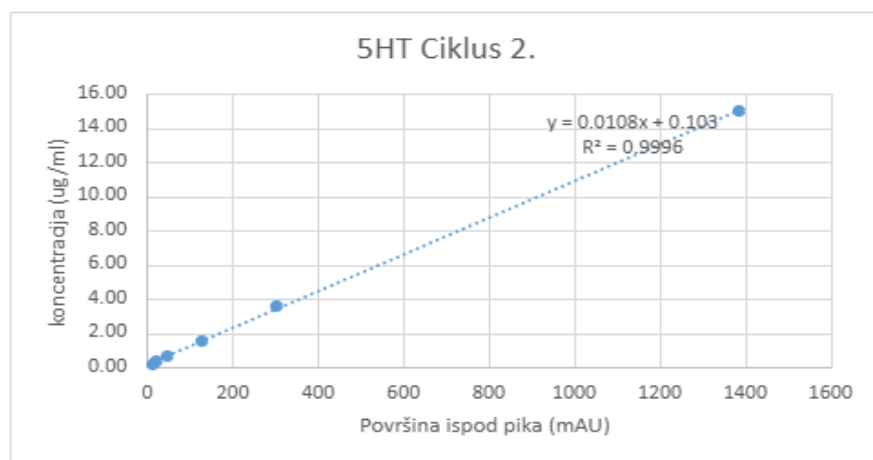
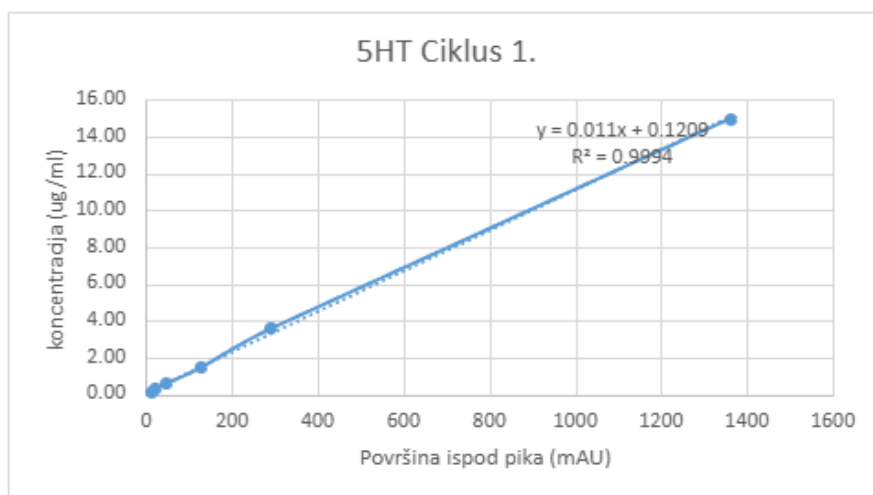
Prof. dr. sc. Davor Zanella

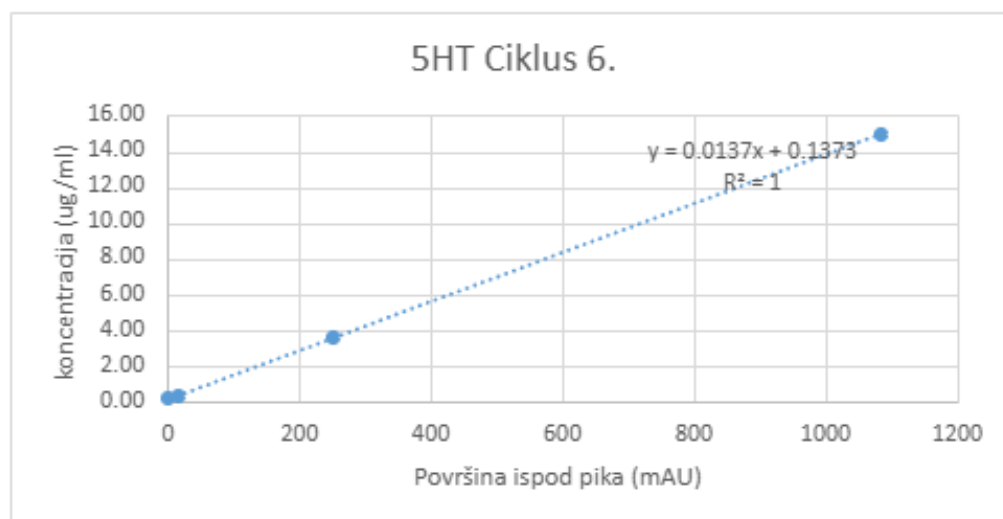
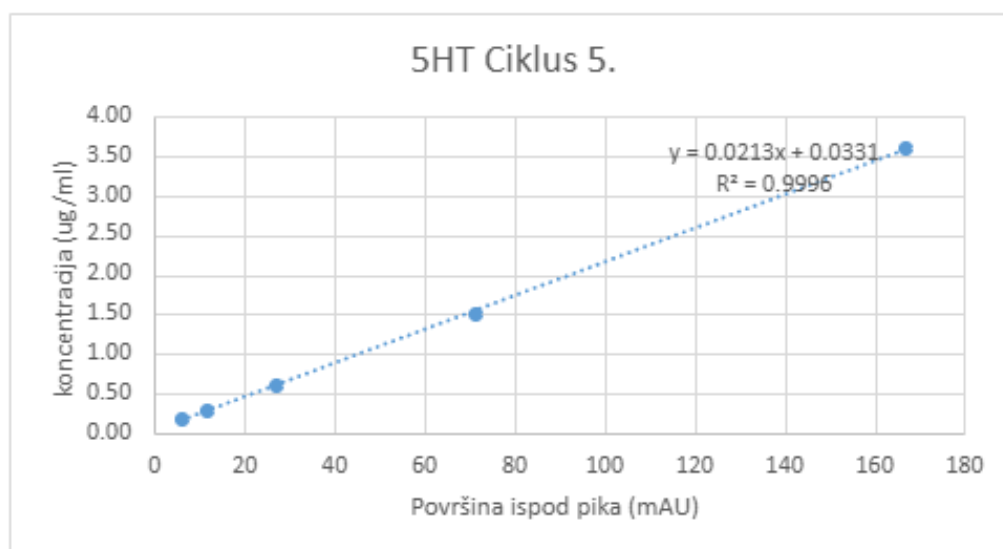
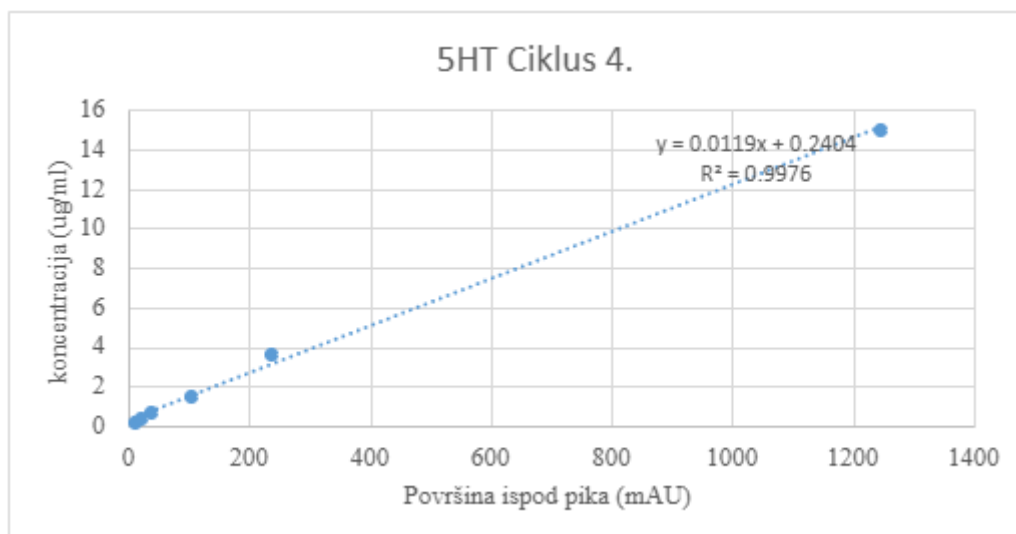
Prof. dr. sc. Perica Mustafić



Prilog 3. Linearnosti kalibracijskih krivulja serotonina

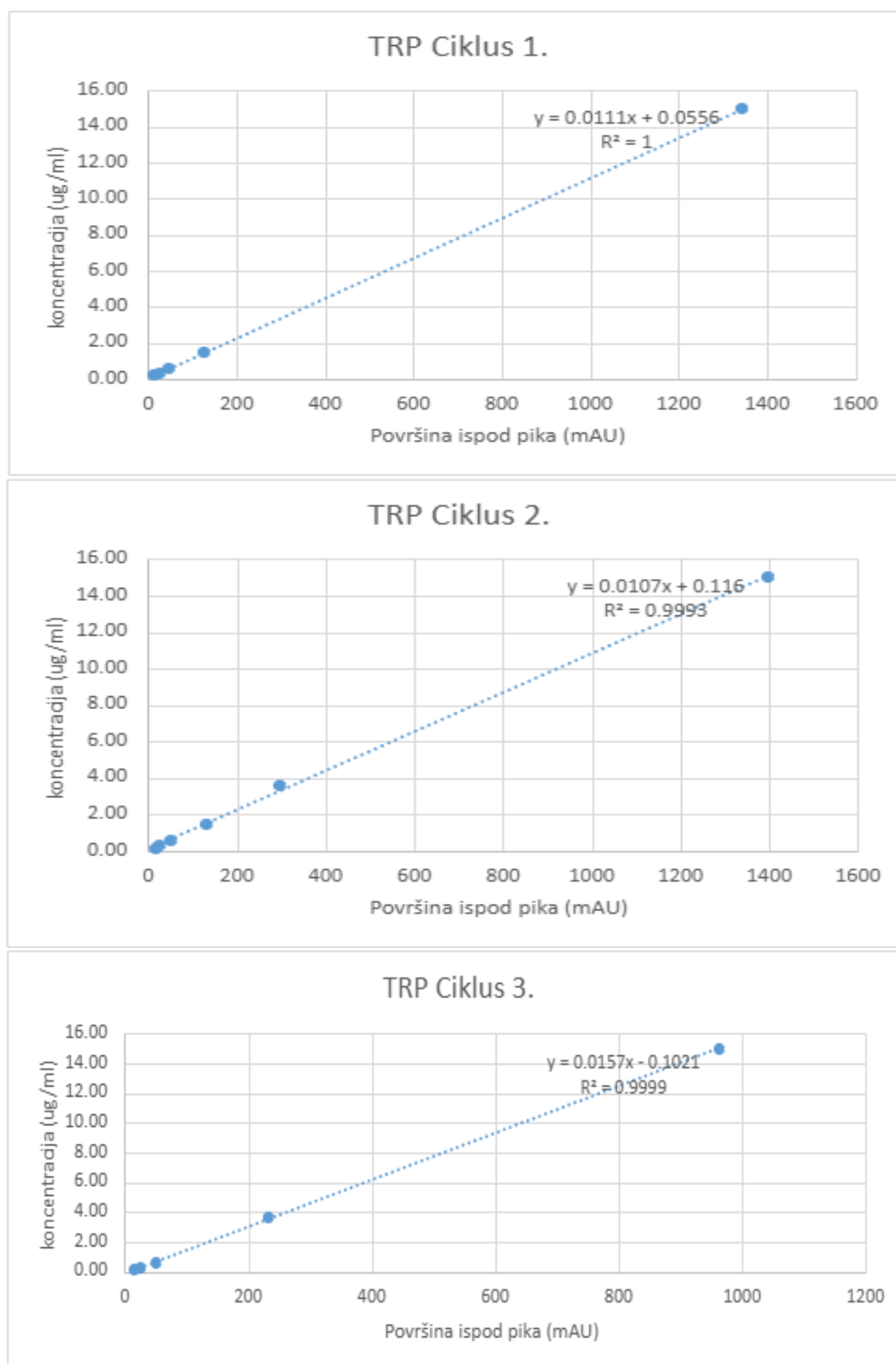
Linearnost izračunata iz kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti površine pika serotonina o koncentraciji standardnih otopina u koncentracijama 15 µg/mL, 3,6 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,18 µg/mL u 6 ciklusa.

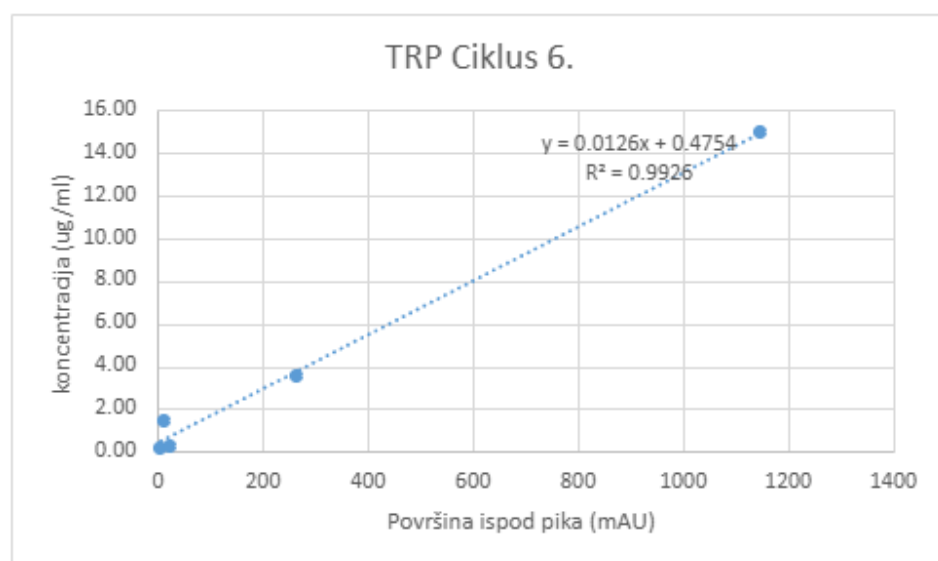
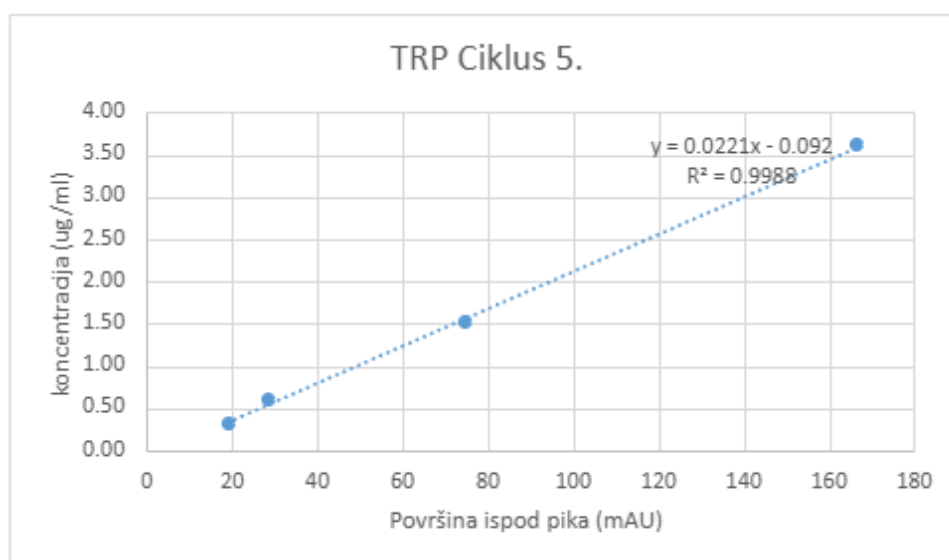
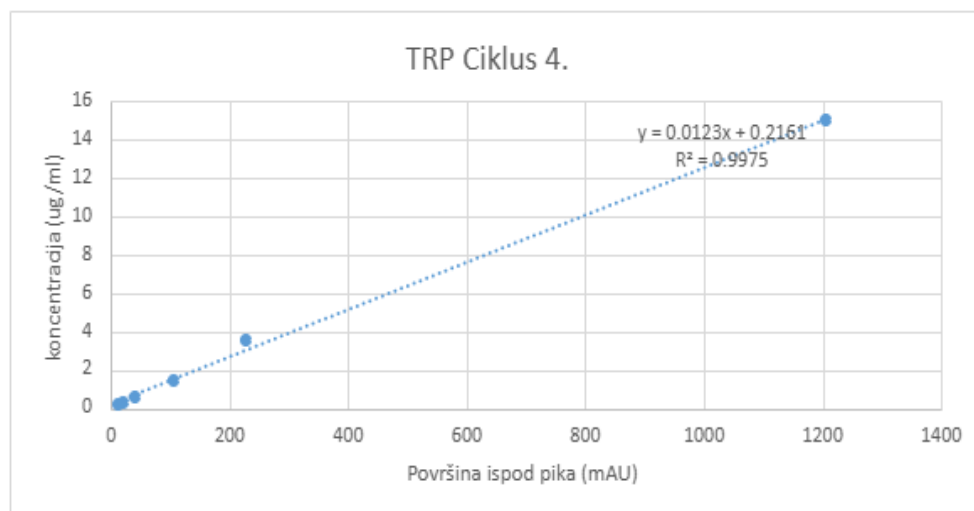




Prilog 4. Linearnosti kalibracijskih krivulja triptofana

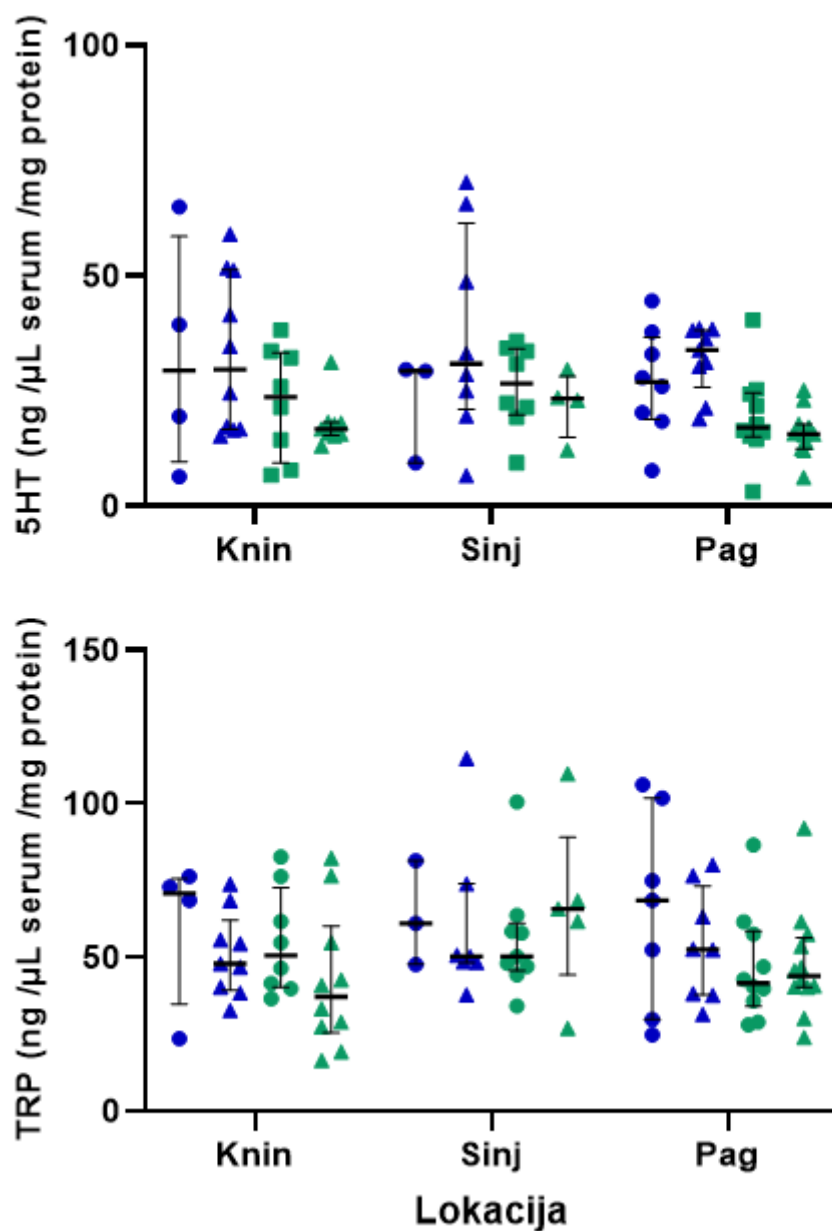
Linearnost izračunata iz kalibracijske krivulje ovisnosti srednje vrijednosti površine pika triptofana o koncentraciji standardnih otopina u koncentracijama 15 µg/mL, 3,6 µg/mL, 1,5 µg/mL, 0,6 µg/mL, 0,3 µg/mL, 0,18 µg/mL u 6 ciklisa





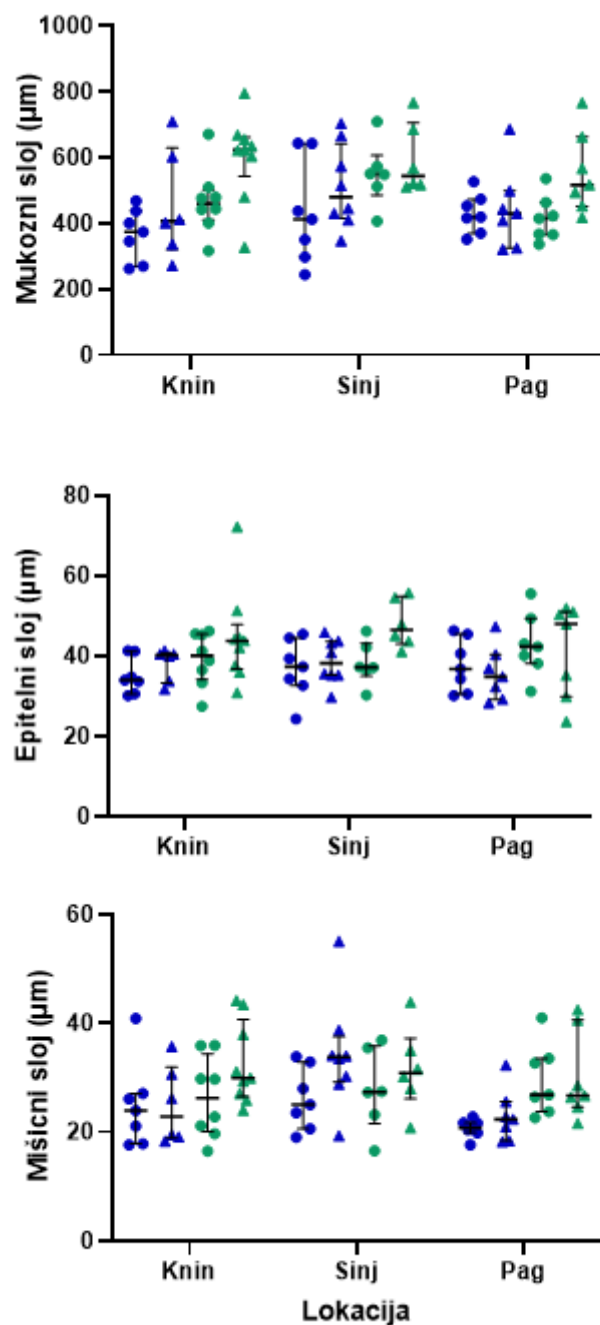
Prilog 5. Usporedba prema vrsti, spolu i lokaciji

5.1. Serotonin i triptofan



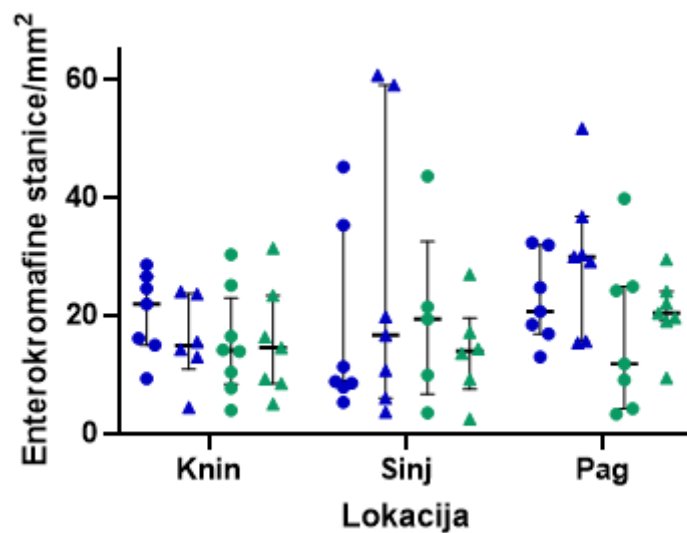
Vrijednosti razine serotonina (5HT) i triptofana (Trp) u serumu *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) analizirane metodom HPLC obzirom na lokaciju. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima.

5.2. Sluznica i mišićni sloj tankog crijeva



Debljina mukoznog (*Tunica mucosa*; TM), epitelnog (*Lamina epithelialis*; LE) i mišićnog sloja (*tunica muscularis*; MW) u simpatrijskim populacijama *Podarcis melisellensis* (PM; plava) i *P. siculus* (PS; zelena) prema lokaciji. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima.

5.3. Broj enterokromafinih stanica



Broj enterokromafinih stanica/mm² sluznice tankog crijeva *Podarcis melisellensis* (PM, plava) i *P. siculus* (PS; zelena) uspoređen prema lokaciji. Rezultati su prikazani kao medijan s interkvartilnim rasponom; mužjaci su označeni trokutima, a ženke krugovima.

Životopis

Matea Brižić rođena je 30.05.1989. godine u Požegi. Završila je Osnovnu školu „Vladimir Nazor“ Trenkovo i Opću gimnaziju Požega. Preddiplomski studij biologije završila je na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu (PMF) u Zagrebu. Na PMF-u u Zagrebu nastavlja i diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija. Tijekom pete godine studija odlazi na Erasmus stručnu praksu na Medizinische Hochschule Hannover (MHH), Institut za transfuzijsku medicinu. Diplomskim radom „Utjecaj perinatalne promjene metabolizma serotonina na ekspresiju gena uključenih u regulaciju perifernog serotonina u odraslih štakora“, pod vodstvom prof. dr. sc. Dubravke Hranilović i dr. sc. Sofie Anne Blažević, 2014. stječe naslov magistre eksperimentalne biologije.

Tijekom studija bavila se plivanjem, a od 2011. posjeduje licencu „Spasilac na otvorenim vodama“, međunarodnu licencu instruktora spašavanja te licencu Outward Bound instruktora. Od 2011. do 2018. dodatno se educira i radi u međunarodnoj školi Outward Bound, najstarijoj školi za iskustveno učenje u svijetu. 2013. postaje voditeljica prvog hrvatskog Edukacijskog centra OBC Veliki Žitnik. Godine 2016. upisuje Poslijediplomski specijalistički studij Marketing posebnih područja, na Ekonomskom fakultetu u Osijeku, koji 2019. pod mentorstvo doc.dr.sc. Đure Horvata, obranom rada „Brendiranje Republika Hrvatske kao zemlje vina“, i završava. Godine 2018. započinje raditi u privatnoj tvrtki Trešnja d.o.o. na poziciji voditelja projekta, a nakon toga i kratak period u Ministarstvo poljoprivrede - Uprava za ribarstvo. Paralelno s tim upisuje Poslijediplomski doktorski studij Biologije na PMF-u u Zagrebu, na kojem 2020. dodatno uz posao je i asistent na dva predmeta pod vodstvom prof.dr.sc. Nade Oršolić– „Molekularna onkologija“ i „Komparativna imunologija“.

U listopadu 2020. godine, nakon 10 godina volontiranja u Hrvatskom Crvenom križu, započinje raditi kao profesionalni djelatnik na poziciji voditeljice Službe za djelovanje u kriznim situacijama. 2023.godine završava Ratnu školu „Ban Josip Jelačić“ u 25.naraštaju na Hrvatskom vojnom učilištu. Od srpnja 2025. godine zaposlena je na Sveučilištu obrane i sigurnosti kao voditeljica Ureda za znanost, projekte i izdavaštvo.

Za svoj dosadašnji rad dobila je niz nagrada i priznanja od kojih vrijedi izdvojiti Medalju časti Ukrajinskog ureda za krizne situacije te nagradu : „Utjecajne Hrvatske žene“ u kategoriji vodstvo i inovacije koju dodjeljuje Međunarodna mreža hrvatskih žena.

OBJAVLJENI RADOVI :

Brižić M., Gračan R., Nikolić B., Blažević S. A. (2025). Baseline peripheral serotonin levels in two sympatric Podarcis lizard species. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2025.111924>.

Gračan, R., Blažević, S. A., **Brižić, M.**, & Hranilovic, D. (2024). Beyond the Brain: Perinatal Exposure of Rats to Serotonin Enhancers Induces Long-Term Changes in the Jejunum and Liver. Biomedicines, 12(2), 357. <https://doi.org/10.3390/biomedicines12020357>

Brižić, M. (2024) Croatian Red Cross in the Homeland Security System. Strategos, 8(1) 2024, 81-103 UDK 614.885(497.5) UDK 355.02 Professional paper <https://strategos.morh.hr/wp-content/uploads/2024/11/strategos-15.pdf>

Blažević, S., Erjavec, I., **Brižić, M.**, Vukičević, S., Hranilović, D. (2015), Molecular Background And Physiological Consequences Of Altered Peripheral Serotonin Homeostasis In Adult Rats Perinatally Treated With Tranylcypromine. Journal of physiology and pharmacology, 66 (2015), 4; 529-537