



Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Dunja Vlašić

**MONOAMINSKI PROFIL MOZGA
SIMPATRIJSKIH POPULACIJA *PODARCIS
SICULUS* I *PODARCIS MELISELLENSIS***

DOKTORSKI RAD

Mentori: izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, dr. sc. Olga Malev

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

Faculty of Science

Department of Biology

Dunja Vlašić

**MONOAMINERGIC BRAIN PROFILE OF
SYMPATRIC POPULATIONS OF *PODARCIS
SICULUS* AND *PODARCIS MELISELLENSIS***

DOCTORAL THESIS

Supervisors: izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, dr. sc. Olga

Malev

Zagreb, 2026.

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 i dr. sc. Olge Malev u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog dokorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Rad je izrađen 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) i „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanost“ (DOK-2020-01-4938).

Izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, rođena 30.05.1983. u Buenos Airesu gdje je pohađala osnovnu školu, koju je završila u Puerto Ricu 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 serotonina na serotoninsku 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 docentica, a od 2024. kao izvanredna profesorica.

Istražuje monoaminske sustave i njihovu ulogu u oblikovanju razvoja, ponašanja i fiziologije. Kombinira neurokemijske i bihevioralne pristupe s analizama gena uključenih u monoaminski 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 istraživanja. Intenzivno surađuje s istraživačima iz Hrvatske i inozemstva: s Farmaceutsko-biokemijskim i Veterinarskim fakultetom, Institutom za antropologiju, Institutom Ruđer Bošković, Hrvatskim institutom za istraživanje mozga, Sveučilištem u Buenos Airesu te Sveučilištem Ludwig-Maximilian u Münchenu.

Sudjelovala je u provedbi više nacionalnih i međunarodnih projekata (MZOŠ, HrZZ, MZOŠ-DAAD). 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“ kojim 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. Do sada je bila (su)nositeljica kolegija Laboratorijske životinje u biološkim istraživanjima i Kronike znanstvenih istraživanja u fiziologiji na prijediplomskom studiju, kolegija Bioetika, Laboratorijske životinje u znanosti, Neuroimunologija, Primijenjena animalna fiziologija, Stručna praksa i Zdravstveni odgoj na diplomskom studiju pri Biološkom odsjeku, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Bila je mentorica 8 završnih radova, 22 diplomska rada i dvije doktorske disertacije. Članica je Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, *International society of education in animal sciences* te institucionalnog povjerenstva za bioetiku i dobrobit životinja. Tečno govori španjolski, engleski i hrvatski jezik.

INFORMACIJE O MENTORU 2

Dr. sc. Olga Malev, rođena je 28. svibnja 1983. godine u Montebelluni, Italija. Studij biologije upisala je na Sveučilištu u Trstu, Italija, gdje je diplomirala 2009. godine na Odsjeku za biologiju (smjer Bioraznolikost i zaštita zemaljskih ekosustava; magistar biologije - MSc). Doktorirala je 2013. godine na Fakultetu za zaštitu okoliša, Sveučilište Nova Gorica, Slovenija pod vodstvom prof. dr. sc. Polonce Trebše i dr. sc. Else Fabbretti, obranivši disertaciju pod naslovom "Toxic effects of selected neonicotinoids through different organisational levels: *in vitro* and *in vivo* studies".

Dr. sc. Malev stjecala je raznoliko profesionalno iskustvo u međunarodnom akademskom okruženju te u javnom i privatnom sektoru u Hrvatskoj. Nakon završenog studija u Italiji, provela je godinu dana (2013. – 2014.) na Sveučilištu u Udinama u okviru poslijedoktorskog usavršavanja na Odsjeku za poljoprivredu i zaštitu okoliša, gdje se bavila istraživanjem utjecaja teških metala na tlo. Po povratku u Hrvatsku, radila je u Dječjoj bolnici Srebrnjak (Odjel za translacijsku medicinu) u Zagrebu (2014. – 2015.; 2018. – 2020.) kao istraživač na EU FP7 projektu i u sklopu Znanstvenog centra izvrsnosti ZCI PersonHealth i Centra kompetencija CEKOM-MD, fokusirajući se na područje dječje alergologije i kliničke imunologije. Svoje iskustvo dodatno je obogatila radom u privatnom farmaceutskom sektoru u tvrtki Pliva Hrvatska d.o.o./TEVA Group (2015. – 2018.) u razvoju farmaceutskih aktivnih supstanci. Od 2020. godine zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković - znanstveni put na Institutu Ruđer Bošković je započela kao viša asistentica u Zavodu za istraživanje mora i okoliša (Laboratorij za Biološku raznolikost), a od prosinca 2023. godine zaposlena je kao znanstvena suradnica u Laboratoriju za biotehnologiju u akvakulturi, unutar Zavoda za kemiju materijala. Njezin znanstveni interes u posljednjih 13 godina usmjeren je na ekotoksikologiju, kemiju i analitiku okoliša s ciljem razvoja metodologije detekcije prioriternih zagađivala i utvrđivanja razine negativnog antropogenog djelovanja na vodene ekosustave i tlo. Njezin istraživački fokus trenutno je usmjeren na novije istraživačke pravce koji uključuju bioprospekciju špiljskih gljiva i morskih organizama (npr. makroalgi, morskih gljiva) te istraživanjem mikrobioma morskih cvjetnica za daljnju procjenu njihovog biološkog potencijala i biotehnološku valorizaciju.

Sudjelovala je u provedbi više od 10 međunarodnih i nacionalnih znanstvenih projekata (FP7, INTERREG, HRZZ) te u radu Znanstvenih centara izvrsnosti (BioProCro, Personalizirana briga o zdravlju - PersonHealth). Autorica je i koautorica 32 znanstvene publikacije u časopisima indeksiranim u bazi Web of Science i poglavlja u stručnim knjigama, a rezultate svojih istraživanja prezentirala je na brojnim međunarodnim konferencijama te bila mentor diplomskih i doktorskih radova.

Aktivna je članica Hrvatskog mikrobiološkog društva i ForBio škole za biosistematiku. Tečno govori talijanski, engleski i hrvatski jezik.

ZAHVALE

Sveučilište u Zagrebu

Doktorski rad

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

**MONOAMINSKI PROFIL MOZGA SIMPATRIJSKIH POPULACIJA *PODARCIS SICULUS* I
*PODARCIS MELISELLENSIS***

Dunja Vlašić

Monoaminski sustavi ključni su u regulaciji ponašanja, fizioloških i neuroendokrinih procesa, no njihova regulacija još je nedovoljno istražena. Cilj istraživanja bio je razjasniti neurokemijsku i molekularnu podlogu razlika u ponašanju dviju simpatrijskih vrsta guštera, *Podarcis siculus* (PS) i *Podarcis melisellensis* (PM), primjenom novorazvijene metode tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti spregnute sa spektrometrijom masa (HPLC-MS/MS) za kvantifikaciju 11 analita u mozgu: monoamina, njihovih prekursora i metabolita. Značajne razlike uočene su za više analita (DA, NA, 5HT, TRP, 5-HIAA), no jedino je za serotoninski sustav obuhvaćen cijeli metabolički slijed, zbog čega je daljnja interpretacija bila usmjerena na taj sustav. Vrsta PS pokazala je više razine triptofana (TRP) i 5-hidroksiindolactene kiseline (5-HIAA), dok su mužjaci PS imali više razine serotonina (5HT) u odnosu na ženke iste vrste. Analiza ekspresije gena serotoninskog sustava ukazala je da razlike nisu povezane sa sintezom, već s razgradnjom i signalizacijom: PM je pokazala višu ekspresiju *MaoA* i *5htr2b*, a PS *5htr1a*, što može pridonositi etološkoj divergenciji i ekološkoj prilagodbi u simpatriji.

170 stranica, 33 slike, 22 tablice, 209 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: serotoninski sustav, razvoj metode, HPLC-MS/MS, ekspresija gena, neuroendokrini regulacija

Mentori: izv. prof. dr. sc. Sofia Ana Blažević, dr. sc. Olga Malev

Ocjenjivači: prof. dr. sc. Dubravka Hranilović

nasl. izv. prof. dr. sc. Dubravka Švob Štrac

prof. dr. sc. Jasna Aladrović

izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**MONOAMINERGIC BRAIN PROFILE OF SYMPATRIC POPULATIONS OF *PODARCIS SICULUS* AND
*PODARCIS MELISELLENSIS***

Dunja Vlašić

Monoaminergic systems are key to regulating behavioral, physiological, and neuroendocrine processes, yet their regulation remains understudied. This study aimed to elucidate the neurochemical and molecular basis of behavioral differences between two sympatric lizard species, *Podarcis siculus* (PS) and *Podarcis melisellensis* (PM), using a newly developed high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the quantification of 11 analytes in brain: monoamines, precursors, and metabolites. Significant differences were detected in many analytes (DA, NA, 5HT, TRP, 5-HIAA), however, as only the serotonergic system included the precursor, neurotransmitter, and metabolite, further interpretation was primarily focused on this metabolic pathway. PS showed higher levels of tryptophan (TRP) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), while serotonin (5HT) was dependent on species-sex interaction, peaking in PS males. Serotonergic gene expression analysis indicated that differences relate to degradation and signaling rather than synthesis - PM showed higher *MaoA* and *5htr2b* expression and PS higher *5htr1a* expression, potentially contributing to ethological divergence and ecological adaptation in sympatry.

170 pages, 33 figures, 22 tables, 209 references, original in: Croatian
Keywords: serotonergic system, method development, HPLC-MS/MS, gene expression, neuroendocrine regulation

Supervisors: Assoc. Prof. Sofia Ana Blažević, Ph.D., Olga Malev, Ph.D.

Reviewers: Prof. Dubravka Hranilović, Ph.D.

Assoc. Prof. Dubravka Švob Štrac, Ph.D.

Prof. Jasna Aladrović, Ph.D.

Assoc. Prof. Duje Lisičić, Ph.D.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Ciljevi istraživanja	3
2	LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1	Monoamini kao neuromodulatori ponašanja	4
2.2	Biosinteza i metabolizam monoamina	5
2.2.1	Katekolaminski put.....	6
2.2.2	Serotoninski put	9
2.3	Evolucijska konzerviranost monoaminskih sustava	12
2.4	Gmazovi kao model u neurobiologiji.....	14
2.5	Rod <i>Podarcis</i> kao model za proučavanje monoaminske regulacije ponašanja.....	15
2.5.1	Značajke vrste <i>Podarcis siculus</i>	16
2.5.2	Značajke vrste <i>Podarcis melisellensis</i>	19
2.5.3	Bihevioralni i neurobiološki aspekti kompeticije između <i>Podarcis siculus</i> i <i>Podarcis melisellensis</i>	21
2.6	Kromatografske analize monoamina i njihovih metabolita	24
2.6.1	Metodološki izazovi u kvantifikaciji monoamina	24
2.6.2	Metodološki pristupi u kvantifikaciji monoamina	25
2.6.3	Princip HPLC-MS/MS detekcije i kvantifikacije	26
2.6.4	Primjena HPLC-MS/MS metoda u detektiranju monoamina.....	28
3	MATERIJALI I METODE.....	30
3.1	Materijali.....	30
3.1.1	Životinje.....	30
3.1.2	Kemikalije	33

3.1.3	Tehnička pomagala i pribor	35
3.2	Metode	37
3.2.1	Kromatografske metode za analizu razina monoamina	37
3.2.2	Analiza ekspresije gena	50
4	REZULTATI	60
4.1	Prikupljanje životinja i uzoraka tkiva	60
4.2	Razvoj kromatografskih metoda za razdvajanje katekolamina.....	61
4.2.1	HPLC-DAD-FLD metoda	61
4.2.2	Transfer metode na HPLC-MS/MS uređaj.....	67
4.2.3	Validacija HPLC-MS/MS metode	68
4.3	Razine monoamina u uzorcima mozga guštera izmjerene HPLC-MS/MS metodom	76
4.3.1	Procjena učinkovitosti biosinteze i razgradnje serotonina	85
4.4	Molekularne analize	88
4.4.1	Izolacija RNA.....	88
4.4.2	Sekvenciranje RNA	88
4.4.3	Odabir gena i dizajn početnica za qPCR analizu	89
4.4.4	Validacija i optimizacija parametara qPCR reakcije	90
4.4.5	Analiza ekspresije gena	93
4.4.6	Korelacije između ekspresije gena i razine neurokemijskih analita.....	99
5	RASPRAVA	101
5.1	Razvoj i optimizacija HPLC-MS/MS metode za analizu monoamina i njihovih metabolita	101
5.1.1	Optimizacija predanalitičke pripreme uzorka	102
5.1.2	Optimizacija ekstrakcijskog postupka	103

5.1.3	Optimizacija kromatografskih uvjeta i masene detekcije	105
5.1.4	Analitičke prednosti i ograničenja metode	107
5.2	Razine monoamina u simpatrijskih populacija <i>Podarcis siculus</i> i <i>Podarcis melisellensis</i> 109	
5.2.1	Katekolaminski sustav	110
5.2.2	Serotoninski sustav	112
5.2.3	Metodološki pristupi i razlike u eksperimentalnom dizajnu.....	115
5.2.4	Ekspresija gena uključenih u regulaciju serotonergičkog sustava	117
5.2.5	Integrativna analiza serotoninskog sustava	123
5.2.6	Analiza ciljeva istraživanja u kontekstu dobivenih rezultata	128
6	ZAKLJUČAK.....	131
7	LITERATURA.....	135
8	PRILOZI	161
8.1	Protokol za žrtvovanje	161
8.2	Protokol pripreme kalibracijskih otopina analita i unutarnjeg standarda	163
8.3	Krivulje taljenja korištenih referentnih gena i gena od interesa.....	165
9	ŽIVOTOPIS.....	167

1 UVOD

Ponašanje je jedna od najfleksibilnijih prilagodbi na okolišne promjene i prva linija adaptacije na nove uvjete (Tuomainen i Candolin, 2011). Regulacija ponašanja rezultat je složene interakcije neuronskih, hormonalnih i okolišnih čimbenika, gdje ključnu ulogu imaju neuromodulatorni sustavi koji, bez promjene osnovne anatomske strukture mozga, dinamički mijenjaju funkcionalna svojstva neuronskih krugova (Marder, 2012; Saggu i sur., 2025). Među najvažnije neuromodule u kralježnjaka ubrajaju se monoamini – dopamin, noradrenalin, adrenalin i serotonin. Dopamin (DA) ima središnju ulogu u sustavu nagrade, motivaciji i agresiji (Korzan i sur., 2000; Miczek i sur., 2002), dok noradrenalin (NA) i adrenalin (A) moduliraju pažnju i odgovor na stres (Tank i Wong, 2015; Stanford, 2020). Serotonin (5HT) se smatra ključnim regulatorom emocionalnih stanja, uključujući anksioznost i socijalnu dominaciju (Olivier, 2015; Negoitza i sur., 2025). Stoga, promjene u njihovim koncentracijama i međusobnim odnosima mogu značajno utjecati na ponašanje jedinki, uključujući motivaciju, učenje, memoriju, socijalne interakcije i agresiju.

Zbog duboke evolucijske konzerviranosti monoaminskih putova, koja se prati unatrag 550 milijuna godina (Lewis i sur., 2025), monoaminski sustavi pružaju idealnu osnovu za komparativna istraživanja na različitim taksonomskim skupinama (Libersat i Pflueger, 2004; Strausfeld i Hirth, 2013; Moroz i sur., 2021; Lewis i sur., 2025). Unatoč značajnom napretku molekularnih metoda, bioinformatičkih alata i neuroznanosti, većina istraživanja i dalje se temelji na relativno ograničenom broju modelnih organizama, prvenstveno laboratorijskim sisavcima (Chan i sur., 2009). Iako takvi dobro opisani i detaljno proučeni modeli imaju prednosti, njihova ekološka homogenost i filogenetska bliskost ograničava razumijevanje funkcionalne raznolikosti neuromodulatornih sustava (Carlson, 2012; Mathuru i sur., 2020). Gušteri predstavljaju posebno zanimljiv model u neuroetološkim istraživanjima zbog složenih i plastičnih socijalnih obrazaca koje je moguće relativno jednostavno promatrati u prirodnim, ali i laboratorijskim uvjetima. Za razliku od uvriježenih modelnih organizama, gušteri su diurnalne životinje, što omogućuje korelaciju neurokemije s dnevnim aktivnostima (Shine, 2013; Naumann i sur., 2015). Također, pokazuju

izražen spolni dimorfizam i kompleksne socijalne strukture (Kaliontzopoulou i sur., 2007), što ih čini pogodnim modelima za proučavanje spolnih razlika u neuroendokrinoj regulaciji ponašanja (Woodley i sur., 2000).

Na području istočnog Jadrana koegzistiraju dvije filogenetski bliske vrste – generalitička primorska gušterica (*Podarcis siculus*) i autohtona krška gušterica (*Podarcis melisellensis*) (Herrel i sur., 2008; Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Ove dvije vrste dijele slična staništa i ekološke niše, ali pokazuju izražene razlike u ponašanju i kompetitivnoj sposobnosti (Downes i Bauwens, 2002; Jelić i sur., 2015). U zonama simpatrije često dolazi do kompetitivnih interakcija između ovih vrsta, pri čemu *P. siculus* pokazuje višu razinu agresivnosti i dominantnosti (Downes i Bauwens, 2002; Limnios i sur., 2022). Preliminarna istraživanja upućuju na to da bi neurokemijska podloga ove razlike mogla ležati u dopaminskom sustavu. Naime, zabilježeno je da mužjaci *P. siculus* imaju dvostruko više razine dopamina u mozgu u odnosu na *P. melisellensis* (Nikolic i sur., 2019). Međutim, za cjelovito razumijevanje ove dinamike potrebno je analizirati širi neurokemijski profil, uključujući dinamiku prekursora i metabolita, te ekspresiju gena uključenih u metaboličke putove monoamina.

Unatoč sve većem interesu za neurokemijske mehanizme ponašanja, analize monoamina u biološkim uzorcima i dalje predstavljaju značajan analitički izazov zbog njihove niske fiziološke koncentracije, kemijske nestabilnosti i podložnosti brzom oksidaciji, a kompleksnost biološkog matriksa dodatno otežava njihovu pouzdanu kvantifikaciju (Bicker i sur., 2013; Xie i sur., 2018). Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC), posebno u kombinaciji sa spektrometrijom masa (LC-MS/MS), danas se smatra jednom od najpouzdanijih metoda za simultanu detekciju i kvantifikaciju monoamina i njihovih metabolita u biološkim uzorcima (Bicker i sur., 2013; Bosse i sur., 2017; Shi i sur., 2022), no primjena takvih metoda u istraživanjima gmazova, posebice guštera, i dalje je relativno ograničena.

S obzirom na izražene razlike u ponašanju između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*, njihovu blisku filogenetsku povezanost te ograničeno razumijevanje neurokemijske osnove tih razlika, ovaj sustav predstavlja iznimno zanimljiv model za istraživanje povezanosti monoaminskih sustava i

agresivnog ponašanja. Razumijevanje monoaminskog profila mozga ovih vrsta, zajedno s analizom ekspresije gena uključenih u monoaminske metaboličke puteve, može doprinijeti boljem razumijevanju neurobioloških mehanizama koji oblikuju kompetitivne interakcije i socijalno ponašanje u prirodnim populacijama.

Svrha ovoga rada jest po prvi put razviti, validirati i primijeniti analitički pristup za istodobnu analizu više monoamina, njihovih prekursora i metabolita u malim količinama tkiva mozga guštera. Razvijeni analitički pristup, osim u herpetologiji, bit će primjenjiv i na druge životinjske modele, pružajući time vrijedan alat za širu neuroznanstvenu zajednicu. Dobiveni rezultati pružit će prvi cjelovitiji uvid u monoaminski profil mozga obaju spolova vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis* i u ekspresiju gena uključenih u monoaminske puteve, čime će se doprinijeti razumijevanju neurokemijske podloge njihove kompeticije, a potencijalno i širem razumijevanju invazivnosti vrste *P. siculus* i zaštite vrste *P. melisellensis*.

1.1 Ciljevi istraživanja

Opći cilj ovoga istraživanja jest razjasniti monoaminski profil mozga jedinki vrste *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* iz populacije u simpatriji, za koje su prethodno zabilježene razlike u ponašanju te analizirati ekspresiju gena uključenih u metabolički put monoamina.

Specifični ciljevi:

1. Razviti i uspostaviti kromatografsku metodu primjenom spregnutog sustava tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti i spektrometrije mase (LC-MS/MS) za analizu monoamina, njihovih prekursora i metabolita u mozgu guštera.
2. Istražiti razlike u razini monoamina, njihovih prekursora i metabolita u mozgu ove dvije vrste guštera.
3. Istražiti razlike između ove dvije vrste guštera na razini ekspresije odabranih gena uključenih u monoaminske puteve, za koje se ustanove različite razine u mozgu.

2 LITERATURNI PREGLED

2.1 Monoamini kao neuromodulatori ponašanja

Svi živčani sustavi podložni su neuromodulaciji, dinamičkom procesu u kojem specifične kemijske tvari mijenjaju funkcionalna svojstva neurona i učinkovitost sinaptičkog prijenosa. Time omogućavaju funkcionalnu prilagodbu neuronskih krugova bez promjene njihove osnovne anatomske organizacije (Marder, 2012; Saggu i sur., 2025). Dok anatomska organizacija čini strukturnu osnovu mozga, upravo neuromodulatorni okoliš određuje koji će se funkcionalni krugovi aktivirati te kakav će bihevioralni ishod iz toga proizaći (Marder, 2012). Neuronska komunikacija posredovana je različitim skupinama neuroaktivnih tvari: neurotransmitterima, neuromodulatorima i neurohormonima, koje se razlikuju ovisno o mehanizmu i vremenu djelovanja. Dok se klasični neurotransmiteri otpuštaju u sinaptičku pukotinu te u vrlo kratkom vremenskom intervalu (milisekunde) izravno aktiviraju ionske kanale, uzrokujući brze promjene membranskog potencijala neurona, neuromodulatori djeluju sporije i imaju šire područje djelovanja. Njihovi učinci na membranski potencijal neurona su dugotrajniji (sekunde, sati, dani, tjedni). Za razliku od neurotransmitera i neuromodulatora, koji djeluju lokalno, neurohormoni se otpuštaju u cirkulaciju te ostvaruju učinke na razini čitavog organizma (Libersat i Pflueger, 2004).

Među najvažnijim neuromodulatorima i neurotransmitterima u kralježnjaka nalaze se monoamini — ponajprije serotonin (5HT), dopamin (DA), noradrenalin (NA) i adrenalin (A)— koji koordiniraju širok raspon neurofizioloških i homeostatskih procesa (Kandel i sur., 2021). Iako sastavljeni od relativno malog broja neurona, monoaminski sustavi imaju posebnu strukturnu organizaciju koju karakterizira razgranata mreža projekcija kroz središnji živčani sustav, što im omogućuje usklađivanje signalizacije između različitih dijelova mozga (Bosse i sur., 2017). Stoga promjene u koncentracijama monoamina i međusobnim odnosima značajno utječu na neuralnu funkciju i ravnotežu odgovora na podražaje, čime monoamini predstavljaju ključnu poveznicu između neuronske aktivnosti i ponašanja (Marder i sur., 2012; Kandel i sur., 2021).

Iako djeluju unutar snažno isprepletene neuromodulatorne mreže, pojedini monoamini povezani su s relativno specifičnim funkcionalnim ulogama. Serotonin ima širok utjecaj na regulaciju

raspoloženja, anksioznosti i agresije, kognitivnih procesa poput učenja i pamćenja, motivacije i sustava nagrade, kao i u kontroli hranjenja, seksualnog ponašanja, ciklusa budnost–spavanje, termoregulacije, lokomotorne aktivnosti i autonomnih funkcija (Whitaker-Azmitia, 1999; Olivier, 2015; Negoitǎ i sur., 2025). Dopamin ima središnju ulogu u neuralnim krugovima nagrade te regulira motivaciju, lokomociju, učenje, agresiju i ponašanja povezana s preživljavanjem (Schultz, 2015). Noradrenalin sudjeluje u modulaciji pažnje, stjecanja pamćenja te odgovora na stres i prijetnju (Tank i Wong, 2015), dok adrenalin, zajedno s noradrenalinom, regulira razine pobuđenosti, budnosti i opće spremnosti organizma (Stanford, 2020). Ključno je naglasiti da monoamini ne sudjeluju u primarnom prijenosu informacija, već moduliraju sinaptičke i izvanstanične uvjete neuronske signalizacije, povećavajući ili smanjujući vjerojatnost aktivacije ciljnih neuronskih skupina (Azizi, 2022). Takva modulacija omogućuje fleksibilno prebacivanje između različitih funkcionalnih i bihevioralnih stanja, primjerice između eksploracije i opreza ili socijalne tolerancije i agresije (Azizi, 2022; Marder, 2012; Goulty i sur., 2023).

2.2 Biosinteza i metabolizam monoamina

Razumijevanje biosinteze i metaboličke razgradnje monoamina ključno je za pravilnu interpretaciju dinamike monoaminskih sustava, te čini temelj za razumijevanje i istraživanje njihove funkcionalne organizacije.

Većina monoamina nastaje iz dviju aromatskih aminokiselina - tirozina i triptofana, kroz niz enzimskih reakcija koje su visoko očuvane među kralježnjacima (Yamamoto i Vernier, 2011). Na temelju kemijske strukture, primarno se dijele na katekolamine i indolamine (Kandel i sur., 2021).

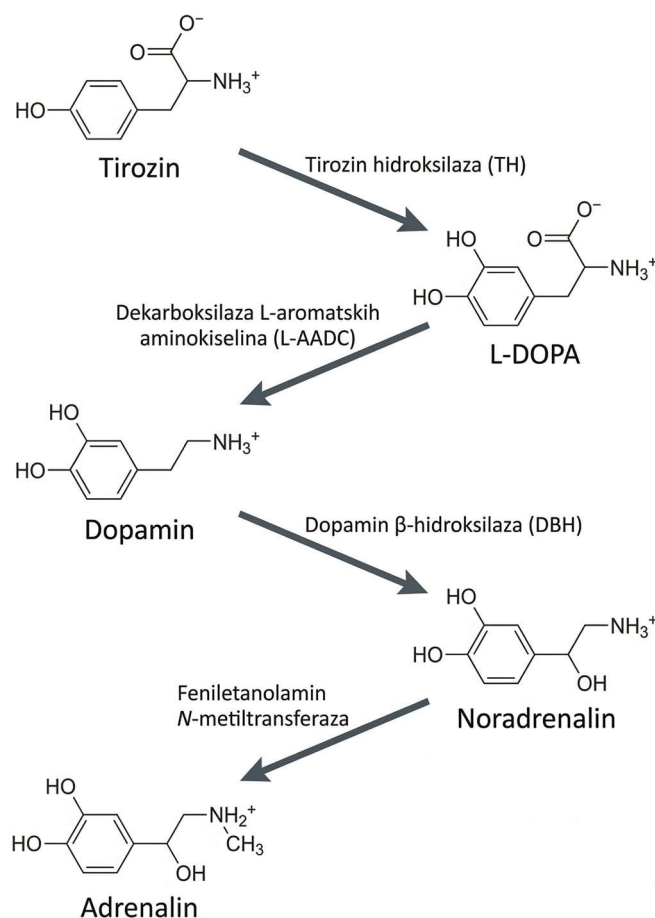
U katekolamine ubrajamo dopamin (3,4-dihidroksifeniletamin, DA), noradrenalin (3,4-dihidroksifenil- β -etanolamin, NA) i adrenalin (3,4-dihidroksi- α -(metilamino)etanol, A), monoamine koji sadrže katekolnu skupinu (benzenski prsten s dvije susjedne hidroksilne skupine), na koju je vezan etilni lanac s amino skupinom. Svi se katekolamini sintetiziraju iz aminokiseline L-tirozina (TYR) kroz zajednički metabolički put (Smeets i González, 2000; Goldstein, 2012; Bosse i sur., 2017; Fernandez i sur., 2023). Nasuprot njima, serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT),

najznačajniji predstavnik indolamina, sadrži indolnu skupinu – biciklički sustav benzenskog i pirolnog prstena. Serotonin se sintetizira iz aminokiseline L-triptofana (Trp) (Richard i sur. 2009; Kandel i sur., 2021; Holeček, 2026).

2.2.1 Katekolaminski put

2.2.1.1 Biosinteza, transport i metabolizam katekolamina

Biosinteza katekolamina u središnjem živčanom sustavu visoko je očuvan enzimski proces koji započinje dopremom tirozina u neurone. Prvi i ključni korak, koji ograničava brzinu cijelog procesa, jest hidroksilacija tirozina u L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) posredstvom enzima tirozin-hidroksilaze (TH) (Goridis i Rohrer, 2002; Goldstein, 2021; Azizi, 2022). Nakon inicijalne hidroksilacije, prekursor L-DOPA se dekarboksilira u DA djelovanjem enzima dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (AADC) (Goldstein, 2021; Azizi, 2022). Potom se, u dopaminergičnim neuronima, DA putem vezikularnog transportera monoamina (VMAT) pohranjuje u sinaptičke vezikule, čime je proces biosinteze završen. Ovo pakiranje je ključno za zaštitu molekula od enzimske degradacije u citoplazmi te za njihovo kontrolirano otpuštanje u sinaptičku pukotinu (Wimalasena, 2010). Nasuprot tome, u noradrenergičnim i adrenergičnim neuronima, DA se unutar vezikula pod djelovanjem enzima dopamin β -hidroksilaze (DBH) hidroksilira u noradrenalin (NA). Naposljetku, u adrenergičnim neuronima, NA može biti ponovno otpušten u citoplazmu kako bi se pomoću enzima feniletanolamin-N-metiltransferaze (PNMT) konvertirao u adrenalin (A) (Kandel i sur., 2021; James i sur., 2023) (Slika 1.).



Slika 1. Sinteza katekolamina. Preuzeto i prilagođeno prema Goridis i Rohrer (2002).

Jednom otpušteni, katekolamini u središnjem živčanom sustavu ostvaruju svoje učinke vezanjem na specifične metabotropne receptore (G-proteinom spregnute receptore), koji su podijeljeni u različite obitelji: D1 i D2 obitelji za DA te α i β adrenergički receptori za NA i A (Smeets i González, 2000; Yamamoto i Vernier, 2011). Prekid neurokemijske signalizacije odvija se putem dvaju glavnih mehanizama. Prvi uključuje ponovni unos (eng. *reuptake*) neurotransmitera u presinaptički neuron putem specifičnih transportera za dopamin (DAT) i noradrenalin (NET). Nakon povratnog unosa, monoamin-oksidaze (MAOA i MAOB) mogu razgraditi neurotransmiter unutar presinaptičkog neurona kao alternativu njegovu recikliranju u vezikule, pri čemu je ovaj mehanizam dominantan u strijatumu. Drugi mehanizam uključuje enzimsku razgradnju

posredstvom katekol-O-metiltransferaze (COMT), koja djeluje neovisno o transporterima, u sinaptičkoj pukotini ili postsinaptički, te je posebno izražena u frontalnom korteksu. Krajnji mjerljivi produkti ovih metaboličkih puteva su homovanilična kiselina (HVA), koja nastaje razgradnjom DA, te vanililmandelična kiselina (VMA), kao glavni produkt metabolizma NA i A (Eisenhofer i sur., 2004; James i sur., 2023).

2.2.1.2 Anatomija i fiziološka funkcija katekolamskog sustava

Katekolamini djeluju kao svestrani neuromodulatori koji, ovisno o mjestu otpuštanja i ciljnim receptorima, mogu imati ulogu neurotransmitera ili hormona u sistemske cirkulaciji. Njihova fiziološka funkcija usko je povezana s anatomske raspodjelom, što omogućuje specifično i koordinirano djelovanje unutar središnjeg i perifernog živčanog sustava. Dok noradrenalin (NA) i adrenalin (A) primarno posreduju u simpatičkom odgovoru i homeostatskoj prilagodbi na stres, dopamin (DA) modulira kompleksne kognitivne i motoričke funkcije (Eisenhofer i sur., 2004; Kandel i sur., 2021; James i sur., 2023).

Dopamin se primarno sintetizira u dopaminergičnim neuronima središnjeg živčanog sustava, osobito u crnoj tvari (*substantia nigra*) i ventralnom tegmentalnom području (VTA, eng. *ventral tegmental area*), gdje primarno djeluje kao neurotransmiter (Judaš i Kostović, 2013). Prisutan je i u hipotalamusu, dok se periferno proizvodi u enteričkom živčanom sustavu gastrointestinalnog trakta (Li i sur., 2004). Ovakva anatomska organizacija dopaminskog sustava neposredno određuje i njegove funkcionalne domene, koje se manifestiraju kroz četiri glavna projekcijska puta: nigrostrijatalni, mezolimbčki, mezokortikalni i tuberoinfundibularni. Nigrostrijatalni put ključan je za kontrolu motoričkih funkcija, točnije, voljnih pokreta i fine motorike. Mezolimbčki regulira procese motivacije, emocija i učenja potkrepljivanjem te se često opisuje kao sustav nagrade. Mezokortikalni je uključen u više kognitivne funkcije poput usmjeravanja pažnje, planiranja i radnog pamćenja. Tuberoinfundibularni put ima važnu ulogu u endokrinološkoj regulaciji jer kontrolira lučenje prolaktina iz hipofize (Judaš i Kostović, 2013; Kandel i sur., 2021).

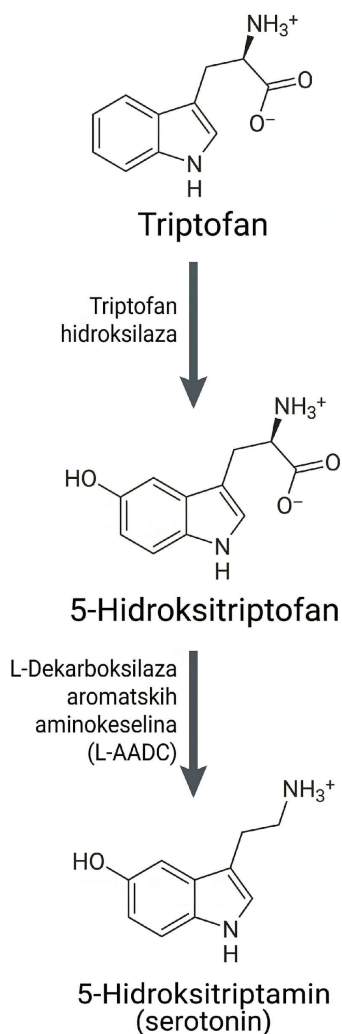
Noradrenalin se sintetizira u simpatičkim neuronima perifernog živčanog sustava, kromafinskim stanicama srži nadbubrežne žlijezde te u specifičnim jezgrama moždanog debla, prvenstveno *locus coeruleus* moždanog debla (Goridis i Rohrer, 2002; Judaš i Kostović, 2013). Adrenalin se, s druge strane, primarno sintetizira u kromafinskim stanicama srži nadbubrežne žlijezde. Zahvaljujući svojoj anatomske rasprostranjenosti, noradrenalinski i adrenalinski sustavi funkcioniraju kao integrativni neuromodulatorni mehanizmi autonomne regulacije – kao neurotransmiteri u simpatičkim živčanim završecima, a otpuštanjem u krvotok, kao hormoni (Stanford, 2020). Ova dva sustava funkcioniraju kao integrativni mehanizmi autonomne regulacije. Njihova glavna fiziološka uloga očituje se kroz aktivaciju simpatičkog živčanog sustava u sklopu odgovora na opasnost (eng. *fight or flight*). Koordinirano djelovanje NA i A potiče niz promjena: proširenje zjenica, ubrzanje srčanog ritma uz povišenje krvnog tlaka, vazokonstrikciju žila kože, bubrega i probavnog sustava, uz istodobno proširenje krvnih žila skeletnih mišića te pojačano i produbljeno disanje. Ove prilagodbe omogućuju usmjeren protok dobro oksigenirane krvi bogate nutrijentima prema tkivima s povećanim metaboličkim zahtjevima, prvenstveno aktivnim skeletnim mišićima, uz istodobno povećanje razine glukoze u krvi i mišićne napetosti, čime se osiguravaju energetske resursi za motorički odgovor (McCorry, 2007; Judaš i Kostović, 2013; Kandel i sur., 2021). Takva koordinirana aktivacija ne osigurava samo fizičku spremnost organizma, već istodobno pridonosi i povećanoj mentalnoj budnosti (eng. *arousal*) i usmjeravanju kognitivnih resursa na izvor prijetnje (Aston-Jones i Cohen, 2005).

2.2.2 Serotoninski put

2.2.2.1 Biosinteza, transport i metabolizam

Biosinteza serotonina (5-hidroksitriptamina, 5HT) započinje aktivnim transportom esencijalne aminokiseline L-triptofana (Trp) u serotonergične neurone. Prvi i ograničavajući korak predstavlja hidroksilacija triptofana u 5-hidroksitriptofan (5HTP), katalizirana enzimom triptofan-hidroksilazom (TPH). Naknadno se 5HTP dekarboksilira u aktivni serotonin (5HT) djelovanjem

dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (AADC) (Judaš i Kostović, 2013; Kandel i sur., 2021) (Slika 2.).



Slika 2. Sinteza serotonina. Preuzeto i prilagođeno prema Goridis i Rohrer (2002).

Poput katekolamina, serotonin se u sinaptičke vezikule pohranjuje putem VMAT-a (Alwindi i Bizanti, 2023). Nakon otpuštanja u sinaptičku pukotinu, serotonin ostvaruje svoje učinke vezanjem na širok spektar receptora (5HT1–5HT7) s najmanje 14 podtipova, od kojih su gotovo svi metabotropni, odnosno spregnuti G-proteinima, s iznimkom ionotropnog 5HT3 receptora (Hoyer i sur., 2002; Berger i sur., 2009; Judaš i Kostović, 2013). Različiti podtipovi serotonininskih

receptora moduliraju neuronsku podražljivost i funkcionalnu dinamiku moždanih mreža, posredujući širok raspon fizioloških i bihevioralnih odgovora. U kontekstu ovog istraživanja, od posebnog su značaja receptori 5HT1A i 5HT2B, koji predstavljaju funkcionalno oprečne komponente. Aktivacija receptora skupine 5HT1 općenito je povezana s inhibicijom agresivnog ponašanja, dok aktivacija skupine 5HT2 (napose 5HT2A i 5HT2B) često korelira s potenciranjem impulzivnih i agresivnih odgovora (Takahashi i sur., 2010). Signalizacija serotonina prekida se ponovnim unosom u presinaptički neuron putem specifičnog serotoninskog transportera (SERT), zatim se ponovno pohranjuje u vezikule pomoću VMAT-a ili razgradi. Metabolička razgradnja se odvija primarno djelovanjem enzima monoamin-oksidaze (MAO), pri čemu nastaje 5-hidroksiindolacetaldehid koji se zatim pretvara u glavni metabolit, 5-hidroksiindolactenu kiselinu (5-HIAA) (Mohammad-Zadeh i sur. 2008; Kandel i sur., 2021). MAO se pojavljuje u dvije varijante - MAOA i MAOB, smještene na vanjskoj mitohondrijskoj membrani, koji imaju djelomično preklapajuću, ali funkcionalno različitu, ulogu u metabolizmu monoamina. Dok MAOA preferencijalno metabolizira serotonin, MAOB ima važnu ulogu u održavanju monoaminske homeostaze u serotonergičnim neuronima sprječavanjem akumulacije drugih monoamina (Frazer i Hensler, 1999; Goldstein, 2021).

2.2.2.2 Anatomija i fiziološka funkcija serotoninskog sustava

Serotonin djeluje kao klasični neurotransmiter, široko rasprostranjen neuromodulator te hormon. Dok se periferni serotonin sintetizira pretežito u enterokromafinskim stanicama crijevnog epitela, serotonin prisutan u središnjem živčanom sustavu potječe isključivo iz serotonergičnih neurona. Uslijed nepropusnosti krvno-moždane barijere, ova dva sustava funkcionalno su odvojena (O'Mahony i sur., 2015; Kandel i sur., 2021).

U sisavaca, anatomska organizacija središnjeg serotoninskog sustava obuhvaća neurone smještene u jezgrama rafe duž medijalne linije moždanog debla, grupirane u jezgre B1–B9. Ove jezgre dijele se na rostralnu skupinu (B5–B9), čiji neuroni šalju uzlazne projekcije prema prednjem mozgu, i kaudalnu skupinu (B1–B3), koja ostvaruje silazne projekcije prema moždanom deblu i

leđnoj moždini (Jacobs i Azmitia, 1992; Judaš i Kostović, 2013; Jacob i Nienborg, 2018). Posebno se ističe dorzalna jezgra rafe (DRN; B6 i B7), koja predstavlja glavni izvor serotonergične inervacije moždane kore te ostvaruje projekcije prema drugim subkortikalnim strukturama, uključujući hipokampus, amigdalnu, talamus i hipotalamus (Negoiță i sur., 2025). Osim izravnog djelovanja, serotoninski krugovi iz jezgara rafe neizravno moduliraju gotovo sve ostale neurotransmitterske mreže, uključujući dopaminski sustav u ventralnom tegmentalnom području i noradrenalinški sustav u kompleksima nazvanim *locus coeruleus*. Ovakva široka, difuzna projekcijska mreža omogućuje serotoninu da istodobno koordinira aktivnost velikog broja funkcionalno različitih moždanih regija (Hale i Lowry, 2011; Judaš i Kostović, 2013; Kandel i sur., 2021).

Serotonin koordinira brojne procese ključne za bihevioralnu ekologiju jedinke, kao što su temeljni obrasci ponašanja – odvažnost-plahost (eng. *boldness-shyness*), izbjegavanje-istraživanje (eng. *avoidance-exploration*), razina aktivnosti, socijalnost i agresivnost (Berger i sur., 2009; Bacqué-Cazenave i sur., 2020). U kontekstu socijalnih interakcija, djeluje kao snažan modulator agresije, potičući ili inhibirajući agresivno ponašanje, ovisno o motivacijskom stanju organizma (Krakowski, 2003). Nadalje, serotonin ima središnju ulogu u emocionalnoj regulaciji, osobito u kontroli anksioznosti i odgovora na stres (Berger i sur., 2009; Kandel i sur., 2021). Uz to, serotoninski sustav značajno doprinosi održavanju homeostaze sudjelujući u regulaciji ciklusa spavanja i budnosti, termoregulacije te kardiovaskularne funkcije (Negoiță i sur., 2025).

2.3 Evolucijska konzerviranost monoaminskih sustava

Monoaminski sustav predstavlja jedan od evolucijski najkonzerviranijih neuromodulatornih sustava u kralježnjaka. Organizirani skupovi monoaminergičnih neurona u prednjem i stražnjem mozgu prisutni su u svim dosad istraženim skupinama kralježnjaka (Yamamoto i Vernier, 2011; Lewis i sur., 2025), a koncept duboke homologije (eng. *deep homology*) upućuje da osnovni neuromodulatorni mehanizmi potječu još od zajedničkih bilateralnih predaka (Strausfeld & Hirth, 2013). Razvoj monoaminergičnih neurona reguliran je duboko konzerviranim transkripcijskim mehanizmima koji su očuvani kroz približno 550 milijuna godina evolucije bilaterija (Lewis i sur.,

2025). Postojanje takve zajedničke regulatorne osnove koja određuje monoaminergične neurone pruža čvrst temelj za komparativna istraživanja i upućuje na to da su osnovni principi formiranja ovih neurona postojali prije nastanka složenih neuroanatomskih struktura (Strausfeld i Hirth, 2013; Lewis i sur., 2025). Ova visoka razina konzerviranosti upućuje na to da su monoamini vrlo rano preuzeli ključnu ulogu u regulaciji neuronske aktivnosti (Libersat i Pflueger, 2004), pri čemu je očuvana ne samo njihova anatomska raspodjela (Yamamoto i Vernier, 2011), već i temeljna načela projekcijske organizacije (Goultly i sur., 2023).

Na molekularnoj razini, monoamini, pripadajući biosintetski enzimi i receptori pokazuju visok stupanj sličnosti među različitim taksonomskim skupinama (Moroz i sur., 2021). Visoka razina konzerviranosti njihovih struktura i uloga u sinaptičkom prijenosu predstavlja temelj za proučavanje obrazaca ponašanja i pratećih neurokemijskih procesa na evolucijski jednostavnijim organizmima (Libersat i Pflueger, 2004). Takav pristup dodatno je osnažen razvojem suvremenih molekularnih metoda, uključujući tehnologije sekvenciranja nove generacije i napredne bioinformatičke alate, koji omogućuju istraživanje genske ekspresije, regulacije i funkcije u vrstama koje tradicionalno nisu korištene kao modelni organizmi. Veliki broj gena ima očuvanu ekspresiju koja se može pratiti do zajedničkog evolucijskog podrijetla, a usporedne analize njihove ekspresije u različitim tkivima i taksonomskim kategorijama (riba, žaba, kokoš, miš, čovjek) pokazale su najveću sličnost ekspresije gena uključenih u neuromodulaciju (Chan i sur., 2009). Njihova široka rasprostranjenost u životinjskom carstvu, potvrđena biokemijskim te histokemijskim analizama, također upućuje na visok stupanj filogenetske očuvanosti monoaminskih sustava (Gargaglioni i sur., 2008). Iako su ovi biokemijski putevi u velikoj mjeri očuvani, promjene u načinu korištenja neurotransmitera unutar homolognih neurona mogu predstavljati ključne pokretače evolucijskih prilagodbi živčanih krugova kroz filogeniju (Loer i sur., 2025). Kao ključne točke integracije signala, oni moduliraju rad neuronskih krugova djelujući izvan okvira fiksne anatomske povezanosti (Bargmann, 2012; Nicastro i Greenwood, 2016) čime omogućuju stvaranje različitih bihevioralnih ishoda iz iste anatomske osnove, ovisno o fiziološkom stanju i ekološkim zahtjevima organizma (Harris-Warrick, 2011). Prvenstveno zbog duboke evolucijske konzerviranosti monoaminskih sustava, kao i uloge u prilagodbi ponašanja različitim

fiziološkim i ekološkim uvjetima, njihovo proučavanje zahtijeva komparativni pristup koji nadilazi ograničen skup uvriježenih modelnih organizama. Proučavanje ovih sustava na evolucijski "jednostavnijim" modelima poput guštera roda *Podarcis* pruža ključan uvid u temeljne principe neuronske prilagodbe bez kompleksnosti koju donosi ekstremna složenost neokorteksa sisavaca.

2.4 Gmazovi kao model u neurobiologiji

Suvremena neuroznanost u velikoj se mjeri oslanja na ograničen broj modelnih organizama, ponajprije sisavaca uzgojenih i održanih u laboratorijskim uvjetima. Iako su takvi modeli od iznimne vrijednosti te se smatraju metodološkim standardom, njihova ekološka uniformnost i filogenetska bliskost mogu ograničiti potpuno razumijevanje evolucijske i funkcionalne raznolikosti neuromodulatornih sustava. Zajedničko amniotsko podrijetlo gmazova, ptica i sisavaca pozicionira gmazove kao ključnu kariku za komparativna i evolucijska istraživanja živčanog sustava. Unatoč tom strateškom položaju, gmazovi su i dalje nedovoljno zastupljeni u neurobiološkim istraživanjima (Kabelik i Hofmann, 2018). Upravo zbog ovog strateškog filogenetskog položaja i konzerviranosti monoaminskih sustava, gušteri mogu poslužiti kao vrijedan model za proučavanja temeljnih mehanizama ponašanja i monoaminske modulacije, s potencijalnom primjenom na druge amniote (Naumann i sur., 2015; Güntürkün i sur., 2016).

Za razliku od noćnih i fosorijalnih laboratorijskih glodavaca, mnoge vrste guštera su dnevno aktivne (diurnalne) te ispoljavaju kompleksna socijalna ponašanja koja su izravno usporediva s onima u ptica i sisavaca (Shine, 2013; Naumann i sur., 2015). Uz to, gušteri predstavljaju i izvrsne modele za istraživanje spolnog dimorfizma u neuroendokrinoj regulaciji ponašanja (Woodley i sur., 2000), zbog jasno izraženih i lako prepoznatljivih fenotipskih razlika između mužjaka i ženki (Kaliontzopoulou i sur., 2007). Iako su se neuroetološka i molekularna istraživanja, uključujući ona usmjerena na agresiju i socijalnu dominaciju, tradicionalno u velikoj mjeri oslanjala na mužjake kao modelne organizme, agresivno ponašanje ženki u kompeticiji za resurse, teritorij ili partnere jednako je učestalo i biološki relevantno (Woodley i sur., 2000). Budući da se reproduktivna

fiziologija i evolucijski pritisci često razlikuju između spolova, ne može se pretpostaviti da isti fiziološki mehanizmi upravljaju ponašanjem mužjaka i ženki. U skladu s time, u različitim životinjskim vrstama zabilježene su razlike među spolovima u razinama monoamina, uključujući serotonin, dopamin i noradrenalin (Choleris i sur., 2018). Gmazovi u tom kontekstu predstavljaju osobito prikladan modeli jer oba spola često pokazuju jasno izražene i lako mjerljive obrasce ponašanja, što omogućuje izravnu usporedbu neuroendokrinih mehanizama unutar iste vrste (Woodley i sur., 2000).

Posebna vrijednost gmazova kao modelnih organizama proizlazi iz činjenice da se njihove fiziološke i bihevioralne reakcije na okolišne promjene i stresore, uključujući i one povezane s predacijom, mogu istraživati i mjeriti kako u prirodnom staništu, tako i u kontroliranim laboratorijskim uvjetima. Iako se gmazovi često percipiraju kao zahtjevni za laboratorijski rad zbog duljeg generacijskog vremena, ograničenog reproduktivnog učinka u kratkim vremenskim razdobljima te složenih uvjeta držanja i razmnožavanja u zatočeništvu, upravo te osobine predstavljaju prednost u razvoju novih, ekološki smislenih eksperimentalnih paradigmi koje bolje odražavaju prirodnu varijabilnost i adaptivnu vrijednost ponašanja (Poletta i sur., 2013). Proučavanje jedinki iz divljine pritom smanjuje pristranosti povezane sa stalnim laboratorijskim uvjetima te omogućuje razumijevanje djelovanja neuromodulatornih sustava, poput monoaminskih, u stvarnim okolišnim i socijalnim uvjetima (Manger i sur., 2008; Carlson, 2012; Mathuru i sur., 2020), no takva su istraživanja i dalje vrlo ograničena na gmazovima. Iako su u neurobiološkim istraživanjima još uvijek nedovoljno zastupljeni, gmazovi se sve više prepoznaju kao vrijedni eksperimentalni modeli za proučavanje temeljnih fizioloških i regulatornih mehanizama (Silva i sur., 2024).

2.5 Rod *Podarcis* kao model za proučavanje monoaminske regulacije ponašanja

Gušteri (Sauria) obuhvaćaju iznimno raznoliku skupinu kralježnjaka s više od 5500 opisanih vrsta diljem svijeta. Unutar europske herpetofaune, ističe se porodica Lacertidae, koja u Hrvatskoj čini čak 20 % ukupnog broja vrsta gmazova (Jelić i sur., 2015). Unutar ove porodice, rod *Podarcis*

(Wagler, 1830) je najbrojnija i najraširenija skupina guštera mediteranske regije, s više od 25 trenutno priznatih vrsta (Arnold i sur., 2007; Senczuk i sur., 2019).

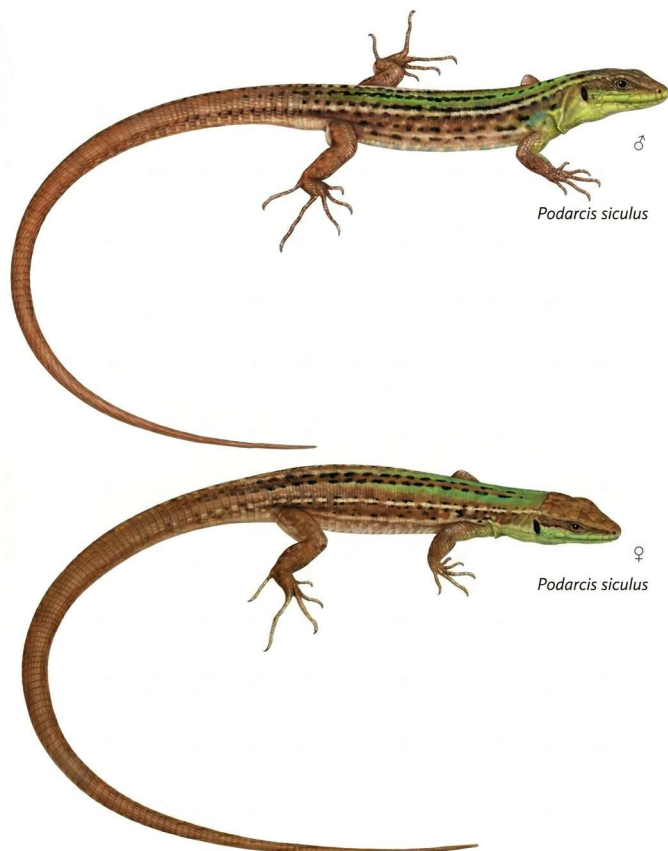
Na istočnom Jadranu, ovaj rod predstavlja izuzetan sustav za proučavanje evolucijske i bihevioralne plastičnosti, prvenstveno uslijed intenzivnih kompetitivnih interakcija između dviju, ekološki bliskih, vrsta – endemske krške gušterice (*Podarcis melisellensis*) i generalističke primorske gušterice (*Podarcis siculus*) (Herrel i sur., 2008; Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Obje vrste održavaju sličan raspon tjelesne temperature (32–36 °C) (Downes i Bauwens, 2002), hrane se prvenstveno beskralježnjacima (Speybroeck i sur., 2016), a hranu aktivno traže na travnjacima, suhozidima, u maslinicima i vinogradima (Grbac i Bauwens, 2001). Također, obje vrste ispoljavaju izraženo teritorijalno ponašanje (Downes i Bauwens, 2004). Upravo zbog toga, na području istočnog Jadrana gdje im se areali preklapaju, dolazi do izravne kompeticije koja, na nekim mjestima rezultira potiskivanjem autohtone *P. melisellensis* (Jelić i sur., 2015). Iako dijele niz morfoloških i ekoloških obilježja, bitno se razlikuju u razini agresivnosti, istraživačkom ponašanju, kompetitivnoj sposobnosti i invazivnom potencijalu (Grbac i Bauwens, 2001; Downes i Bauwens, 2004; Damas-Moreira i sur., 2024; Glogoški i sur., 2024). Unatoč evolucijskoj divergenciji (Podnar i sur., 2004; Sherpa i sur., 2023), činjenica da ove koegzistirajuće vrste mogu hibridizirati u prirodi (Gorman i sur., 1975; Capula, 1992) potvrđuje njihovu blisku genetsku i fiziološku srodnost, čineći ih pogodnim modelom za razjašnjavanje kako suptilne razlike u monoaminskim profilima mogu rezultirati drastično različitim bihevioralnim ishodima.

2.5.1 Značajke vrste *Podarcis siculus*

Podarcis siculus (Rafinesque-Schmaltz, 1810), primorska gušterica, vrsta je izvorno rasprostranjena duž Apeninskog poluotoka – u kontinentalnom dijelu Italije, na Siciliji i Sardiniji (Mo i Mo, 2021; Valerioti i Sperone, 2024). Van teritorija Italije prirodno je prisutna duž istočne jadranske obale (Slovenija, Hrvatska, Bosna i Hercegovina, Crna Gora) (Jelić i sur., 2015). Uslijed iznimne prilagodljivosti, uspješno je unesena u mnogim područjima van prirodnog areala, uključujući SAD, Sjevernu Afriku, brojne mediteranske zemlje (Pirinejski poluotok, Turska,

Francuska) i Rusiju, što ju uvrštava među gmazove s najistaknutijim globalnim invazivnim potencijalom (Silva-Rocha i sur., 2012; Ortega i sur., 2016; Speybroeck i sur., 2016). Vrsta naseljava širok spektar staništa - od stjenovitih obala, kamenjara, šikara, livada i rubnih dijelova šuma do suhozida, rubova prometnica, poljoprivrednih zemljišta, urbanih parkova i zgrada (Silva-Rocha i sur., 2012; Jelić i sur., 2015; Ortega i sur., 2016; Speybroeck i sur., 2016; Valerioti i Sperone, 2024). Okomita raspodjela seže od razine mora pa sve do 1000 m nadmorske visine, vrlo rijetko i do 2200 m (Etna, Sicilija) (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). U urbanim područjima često koristi građevine i zasađena stabla kao zaklon, što uvelike pogoduje slučajnom prenošenju posredstvom ljudi i daljnjem širenju areala (Silva-Rocha i sur., 2012). Kao heliotermna vrsta, *P. siculus* preferira otvorena staništa s visokom insolacijom (Ortega i sur., 2016).

Dužina tijela jedinki doseže 9 cm od vrha njuške do nečisnice (eng. *snout-vent length*, SVL) (Arnold i sur., 2007; Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016), a zajedno s dužinom repa (eng. *total length*, TL) može doseći 26 cm (Speybroeck i sur., 2016). Leđna strana tijela najčešće je zelene, maslinaste ili svijetlosmeđe boje s uzdužnim prugastim uzorkom svjetlijih i tamnijih linija ili točaka, dok je u nekim populacijama prisutan mrežasti ili točkasti uzorak, a zabilježene su i uniformno obojane jedinke, bez šara. Trbušna strana obično je bijele ili sive boje, a na bočnim stranama su često izražene karakteristične plave točke (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Vrsta pokazuje izraženi spolni dimorfizam, gdje su mužjaci znatno veći (prosječni SVL mužjaka iznosi 73 mm naspram 65 mm kod ženki) i teži od ženki, s primjetno širim glavama i dužim repovima (Slika 3.) (Jelić i sur., 2015; Ortega i sur., 2016).



Slika 3. Prikaz fenotipa mužjaka i ženke vrste *Podarcis siculus*. Preuzeto i prilagođeno prema Speybroeck (2016).

Prehrana primorske gušterice primarno se temelji na beskralježnjacima, osobito člankonošcima, no njezina široka prilagodljivost očituje se i u varijabilnom sastavu prehrane, ovisno o dostupnosti resursa (Zuffi i Giannelli, 2013). Tako je primijećeno da pojedine populacije kao izvor prehrane koriste biljni materijal, uključujući nektar i plodove, kao i male kralježnjake poput macaklina i patuljastih rovki (Taverne i sur., 2019). Zabilježeni su i rijetki slučajevi kanibalizma nad mladim jedinkama, ali i oportunističkog hranjenja antropogenim otpadom (Capula i Aloise, 2011; Mo i Mo, 2021).

Aktivna je u razdoblju od veljače do studenog, a sezona parenja traje od travnja do lipnja (Speybroeck i sur., 2016). Kao oviparna vrsta, *P. siculus* pokazuje iznimno visok reproduktivni

potencijal - ženke mogu položiti 5 legala godišnje, pri čemu svako leglo može sadržavati između 2 i 12 jaja (Arnold i sur., 2007; Jelić i sur., 2015). Spolna zrelost kod mužjaka nastupa u prosjeku nakon jedne godine, a kod ženki između prve i druge godine života, nakon što jedinke dosegnu 5 cm od vrha njuške do nečisnice. U zatočeništvu mogu živjeti do 13 godina (Jelić i sur., 2015).

2.5.2 Značajke vrste *Podarcis melisellensis*

Podarcis melisellensis (Braun, 1877), krška gušterica, endemska je vrsta istočnog Jadrana, strogo zaštićena Zakonom o zaštiti prirode (NN 70/05; 139/08; 57/11). Nalazi se na Dodatku IV Direktive o zaštiti prirodnih staništa i divlje faune i flore Europske unije (Direktiva o staništima) te na Dodatku II Konvencije o zaštiti europskih divljih vrsta i prirodnih staništa (Ajtici i sur., 2009; Jelić i sur., 2015). Prema kriterijima Međunarodnog saveza za očuvanje prirode, vrsta je uvrštena na Crveni popis ugroženih vrsta (IUCN Red List) u kategoriju najmanje zabrinjavajućih vrsta (Bowles, 2024). Njezin areal proteže se od sjeveroistočne Italije, preko obalnog pojasa Slovenije, Hrvatske (uključujući brojne otoke), Bosne i Hercegovine, Crne Gore pa sve do sjeverozapadne Albanije (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016).

Preferira sunčana i suha staništa s barem nešto grmovite i zeljaste vegetacije (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Prisutna je u rijetkim šumama s niskim grmljem, šikarama, rubovima makije, na otvorenim, travnatim obroncima, kamenitim livadama, pašnjacima, liticama te na obalnom kamenjaru i šljunkovitim žalima. Antropogena staništa uključuju vinograde, maslinike, rubove putova, nasipe uz ceste, povrtnjake i druge ruderalne zajednice. Sklonište uglavnom pronalazi u rupama i vegetaciji, rjeđe u pukotinama i procjepima stijena (Tiedemann i Henle, 1986; Arnold, 1987). Okomita raspodjela seže od razine mora do oko 1400 m nadmorske visine (Speybroeck i sur., 2016), no većina populacija nalazi se u područjima do 1000 m nadmorske visine (Gasc i sur., 1997; Ajtici i sur., 2009; Jelić i sur., 2015). Iako je izuzetno prilagođena na teške krške uvjete, u zonama gdje dolazi u kontakt s *P. siculus*, krška gušterica često biva potisnuta u suboptimalna mikrostaništa. Ekološka istraživanja upućuju na to da glavni uzrok ovog povlačenja

leži u nižoj razini interspecijske agresivnosti ove vrste (Downes i Bauwens, 2002; Vervust i sur., 2009).

Dužina tijela (SVL) obično iznosi između 6,5 cm, dok ukupna dužina s repom može doseći 22 cm. Leđna strana je najčešće smeđa, siva ili maslinasto zelena, s izraženim svijetlim uzdužnim prugama, a u mužjaka vanjske trbušne ljuske mogu biti plave boje (Arnold i sur., 2007). Nerijetko se pojavljuju i jednolično obojene jedinke (Speybroeck i sur., 2016). Karakteristično obilježje vrste je izraženi intraspecijski polimorfizam obojenosti trbuha u mužjaka (bijeli, žuti ili narančasti), koji korelira s različitim bihevioralnim strategijama (Huyghe i sur., 2007). Narančasti mužjaci u pravilu su krupniji i dominantniji, dok žuti i bijeli pokazuju smanjene razine teritorijalnosti i agresivnosti (Huyghe i sur., 2009) (Slika 4.).



Slika 4. Prikaz fenotipa mužjaka i ženke vrste *Podarcis melisellensis*. Preuzeto i prilagođeno prema Speybroeck (2016).

Prehrana se primarno temelji na beskralježnjacima, uz manji udio biljne hrane, a točan sastav ovisi o dostupnosti resursa unutar staništa (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Postoji korelacija

između veličine jedinke i plijena, pri čemu se odrasli mužjaci hrane krupnijim beskralježnjacima u odnosu na ženke i mladunce, a zabilježeni su i rijetki slučajevi kanibalizma (Tiedemann i Henle 1986).

Diurnalna je vrsta aktivna od veljače do studenoga, dok je na nekim otocima aktivna cijelu godinu (Jelić i sur., 2015; Speybroeck i sur., 2016). Sezona parenja započinje u proljeće, nakon hibernacije, agresivnom obranom teritorija i udvaranjem mužjaka. Parenje se odvija u travnju i svibnju, a ženke polažu 1 do 3 legla godišnje, obično s 2 do 8 jaja (Bejaković i sur., 1995; Arnold i sur., 2007). Mladunci se izliježu u srpnju s duljinom tijela do 4 cm, što ih čini vrlo podložnima napadima predatora (Jelić i sur., 2015). Iako visok, reproduktivni potencijal krške gušterice u prosjeku je manji nego onaj *P. siculus*, što je još jedan od bitnih čimbenika u njezinu potiskivanju tijekom interspecijske kompeticije.

2.5.3 Bihevioralni i neurobiološki aspekti kompeticije između *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*

Istraživanje odnosa *P. siculus* i *P. melisellensis* na istočnom Jadranu već je sredinom prošlog stoljeća proveo Radovanović (1956) i opisao ga kao klasičan primjer kompetitivnog isključenja. Na većini manjih otoka jadranskog arhipelaga obitava samo jedna od ovih dviju vrsta, dok se na većim otocima pojavljuju obrasci parapatrije ili tek marginalne simpatrije, a potpuna je simpatrija rijetka i prostorno ograničena (Gorman i sur., 1975). Takav način raspodjele upućuje na snažan utjecaj interspecijske kompeticije pri oblikovanju njihovog areala. Ovu pojavu empirijski su potvrdili Nevo i sur. (1972), eksperimentalno uvodeći pet odraslih parova *P. siculus* s otočića Pod Kopište na Pod Mrčaru, otočić do tada isključivo naseljen vrstom *P. melisellensis*. Dugoročno praćenje populacija pokazalo je da je u svega 36 godina *P. siculus* u potpunosti potisnula autohtonu populaciju *P. melisellensis*, a genetičke analize mitohondrijske DNA potvrdile su da današnju populaciju na Pod Mrčari čine isključivo potomci izvorno uvedene populacije (Herrel i sur., 2008). Ovaj dokumentirani proces predstavlja reprezentativni primjer kompetitivnog potiskivanja uslijed

bihevioralne i ekološke superiornosti uvedene vrste te čini temelj za daljnja neuroetološka istraživanja.

Razjašnjavanje mehanizama kompetitivnog potiskivanja nastavljeno je nizom suvremenih studija koje su detaljno analizirale bihevioralne razlike između *P. siculus* i *P. melisellensis*, pri čemu rezultati upućuju da se kompetitivna nadmoć vrste *P. siculus* temelji na tri ključna aspekta: asimetričnoj agresiji, većoj eksploatacijskoj učinkovitosti iskorištavanja resursa, metaboličkoj učinkovitosti te specifičnim bihevioralnim strategijama.

Eksperimenti u kontroliranim uvjetima na mladuncima pokazali su postojanje asimetrične interakcije između ovih dviju vrsta. U interspecijskim susretima, *P. siculus* je bila agresivnija i dominantnija, koristila je optimalna toplinska mikrostaništa te brže rasla, dok je *P. melisellensis* pokazala sporiji rast i pristup suboptimalnim toplinskim mikrostaništima. Dobiveni podaci idu u prilog tezi da je upravo agresivno ponašanje *P. siculus* ključni čimbenik koji određuje ishod kompeticije između ovih dviju vrsta (Downes i Bauwens, 2002).

Osim izravne agresije, invazivni potencijal *P. siculus* temelji se i na njezinoj bihevioralnoj i metaboličkoj učinkovitosti iskorištavanja resursa. Istraživanja u kontroliranim uvjetima pokazala su da jedinke ove vrste redovito prve pronalaze hranu, brže je konzumiraju te posljedično brže dobivaju na tjelesnoj masi u usporedbi s autohtonim srodnim vrstama. Pretpostavlja se da ovakva učinkovitost u eksploatacijskoj kompeticiji olakšava *P. siculus* uspješnu uspostavu populacija na novim staništima i postupno istiskivanje nativnih guštera (Limnios i sur., 2022; Damas-Moreira i sur., 2024).

Glogoški i sur. (2024) su primjenom testova otvorenog polja i radijalnog labirinta analizirali asocijalna ponašanja u *P. siculus* i *P. melisellensis*, povezana s kompeticijom. *P. siculus* pokazala je izraženije istraživačko ponašanje, veći unos hrane, ali i manju sklonost rizičnom ponašanju na nepoznatom teritoriju u odnosu na *P. melisellensis*. Upravo kombinacija istraživačke učinkovitosti i opreza upućuje na postojanje intrinzičnih bihevioralnih osobina koje pridonose kompetitivnoj nadmoći i invazivnom potencijalu vrste *P. siculus*.

Utvrđene razlike u agresivnosti, socijalnoj dominaciji i eksploatacijskoj kompeticiji između ovih vrsta upućuju na razmatranje njihove moguće neurobiološke osnove. Recentna literatura naglašava važnost roda *Podarcis* kao izvrsnog modela u translacijskim istraživanjima, zbog činjenice da su molekularni i biokemijski odgovori zabilježeni kod ovih guštera često usporedivi s onima u sisavaca (Scudiero i sur., 2025). Iako su neuroetološka istraživanja na rodu *Podarcis* još uvijek nedovoljno zastupljena u literaturi, studije na drugim vrstama guštera jasno su pokazale da serotoninski i katekolaminski sustavi imaju ključnu ulogu u regulaciji socijalnog statusa i agresivnih interakcija. Primjerice, u mozgu vrste *Anolis carolinensis* utvrđene su značajne razlike u serotoninskoj (5HT, 5-HIAA) i dopaminskoj aktivnosti (DA, HVA) između dominantnih i podređenih jedinki (Summers i sur., 1997; Summers i sur., 2005). U drugoj vrsti guštera, *Agama stellio stellio*, Michaelidis i sur. (2002) kvantificirali su koncentracije monoamina i njihovih metabolita (5HT, 5-HIAA, DA, DOPAC, HVA, NA) u mozgu te potvrdili njihovu uključenost u neurokemijsku regulaciju fizioloških stanja gmazova. Nikolic i sur. (2019) su odredili koncentracije 5HT, DA i NA u mozgu vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*. Utvrđena je statistički značajna razlika u razini DA, pri čemu je *P. siculus* imala približno dvostruko višu koncentraciju DA u mozgu u odnosu na *P. melisellensis*. S obzirom na prethodno dokumentiranu dominantnost i višu razinu agresivnosti *P. siculus*, rezultati ove studije upućuju na moguću povezanost monoaminske aktivnosti i kompetitivne dinamike između ovih vrsta te dodatno potvrđuju vrijednost roda *Podarcis* kao izvrsnog modela u translacijskoj neuroznanosti uslijed visoke konzerviranosti biokemijskih odgovora u usporedbi sa sisavcima.

2.6 Kromatografske analize monoamina i njihovih metabolita

2.6.1 Metodološki izazovi u kvantifikaciji monoamina

Praćenje razina monoamina od presudne je važnosti s obzirom da su upravo monoamini ključni biokemijski pokazatelji homeostatskih promjena u različitim fiziološkim i bihevioralnim stanjima. Iako predstavljaju analite od tako velikog značaja, njihova kvantifikacija u biološkim uzorcima izuzetno je zahtjevna i predstavlja značajan analitički izazov zbog iznimno niskih fizioloških koncentracija, kemijske nestabilnosti te kompleksnosti biološkog matriksa (Bicker i sur., 2013; Nikolic i ostali, 2019). Monoamini su, zbog prisutnosti fenolnih skupina, podložni spontanoj oksidaciji i degradaciji, posebice pri višim pH vrijednostima i povišenim temperaturama. Termolabilnost ovih spojeva zahtjeva rad pri niskim temperaturama (na ledu ili 4 °C) i ograničava trajanje skladištenja. Uz to što su temperaturno osjetljivi, fotosenzibilni su, što također zahtijeva posebne uvjete rada i zaštitu od svjetla (Bicker i sur., 2013).

Složenost biološke matrice, poput mozga, često uzrokuje kromatografske interferencije s drugim spojevima iz istog tkiva i supresiju signala analita od interesa. Upravo je iz tog razloga, odabir učinkovitog, a dovoljno nježnog postupka homogenizacije i pročišćavanja uzorka izuzetno zahtjevan. Konvencionalne metode ekstrakcije, poput ekstrakcije na čvrstoj fazi (eng. *solid phase extraction*, SPE), iako učinkovite u pročišćavanju, često rezultiraju niskim iskorištenjem (eng. *recovery*) analita zbog gubitaka u višestrukim koracima ispiranja. Stoga postupci predpripreme moraju biti maksimalno pojednostavljeni kako bi se osigurala niska granica kvantifikacije (eng. *limit of quantification*, LOQ) neophodna za detekciju analita prisutnih u tragovima. Dodatni izazov u analizi monoamina predstavlja optimizacija kromatografskih uvjeta, posebice izbor stacionarne faze i sastava mobilne faze, budući da se radi o visoko polarnim spojevima slične kemijske strukture za koje je potrebno optimizirati vrijeme retencije na analitičkoj koloni. Jedan od razloga tome jest što retencija i razdvajanje monoamina ovise o pH vrijednosti mobilne faze i udjelu organskog otapala. Iako je izokratna elucija (elucija otapalom ili smjesom otapala konstantnog sastava) jednostavnija, za sveobuhvatno neurokemijsko profiliranje nužna je gradijentna elucija, koja omogućava zadovoljavajuću rezoluciju analita različite polarosti tijekom kromatografske

analize. Međutim, važno je napomenuti da značajno produljuje vrijeme stabilizacije sustava i rezultira potencijalnim pomacima u retencijskim vremenima u toku višestrukih uzastopnih analiza (Bicker i sur., 2013).

2.6.2 Metodološki pristupi u kvantifikaciji monoamina

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) smatra se uvriježenom metodom za razdvajanje i kvantifikaciju monoamina, pri čemu se najčešće koriste elektrokemijski (ECD), fluorescencijski (FLD), UV-Vis, kemiluminiscencijski (CLD) detektori ili maseni spektrometar (MS) (Bicker i sur., 2013; Bosse i sur., 2017; Shi i sur., 2022). Razlog zbog kojeg su upravo HPLC metode uobičajen izbor u laboratorijskoj praksi jest isplativ omjer specifičnosti, osjetljivosti i ponovljivosti metode naspram operativnih troškova i zahtjeva održavanja sustava. Visokoučinkovita tekućinska kromatografija (HPLC) u kombinaciji s elektrokemijskom (ECD) ili fluorescentnom detekcijom (FLD), tradicionalno je najzastupljenija metoda za separaciju i kvantifikaciju monoamina, prvenstveno zbog visoke osjetljivosti (Bicker i sur., 2013; Xie i sur., 2018; Shi i sur., 2022). Unatoč širokoj primjeni, ove tehnike pokazuju značajne operativne nedostatke (Bicker i sur., 2013; Hori i sur., 2026). Iako se dugo smatrala zlatnim standardom za detekciju monoamina, HPLC-ECD metoda ograničena je uslijed postupnog onečišćenja elektroda, što utječe na stabilnost signala i reproduktivnost mjerenja. S druge strane, HPLC-FLD zahtjeva prethodnu derivatizaciju analita kako bi se omogućila fluorescencijska detekcija, a time se bitno produljuje analitički postupak (Bicker i sur., 2013). Iako se u literaturi navode i metode UV detekcije, njihova je primjena ograničena jer su validirane tek na manji broj spojeva, poput noradrenalina i serotonina (Thomas i sur., 2015). Upravo iz navedenih razloga, suvremeni analitički trendovi najpogodniju metodu za kvantifikaciju ovih analita temelje na sinergiji tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa (HPLC-MS/MS). Primjena tandemске spektrometrije masa osigurava veću selektivnost i specifičnost te pruža vrijedne strukturne informacije o analitima (Bicker i sur., 2013; Bosse i sur., 2017; Xie i sur., 2018; Hori i sur., 2026). Upravo zato se ova metoda pokazala ključnom za simultanu analizu širokog spektra analita različitih kemijskih svojstava u jednom kromatografskom ciklusu, što je bio

osnovni preduvjet za sveobuhvatno profiliranje monoaminskog sastava iz volumno oskudnih uzoraka mozga guštera u ovom istraživanju.

2.6.3 Princip HPLC-MS/MS detekcije i kvantifikacije

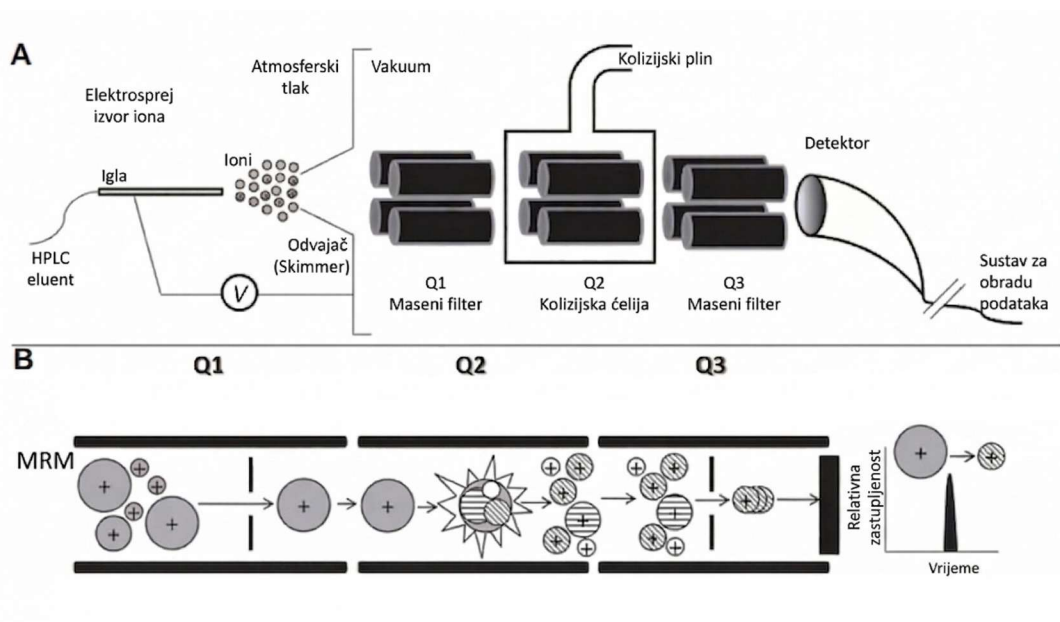
Suvremena analitička kemija temelji se na sprezi dviju moćnih tehnika - tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) i spektrometrije masa (MS). Dok tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti omogućuje fizičko razdvajanje komponenti na temelju njihove interakcije sa stacionarnom fazom (najčešće obrnutih faza (eng. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC) (Skoog i sur., 2014; Klawitter i Hübschmann, 2019), masena spektrometrija (MS) omogućuje njihovu nedvosmislenu identifikaciju mjerenjem omjera mase i naboja (m/z) ioniziranih molekula (Watson i Sparkman, 2008; Pitt, 2009; Skoog i sur., 2014).

Sustav LC-MS/MS predstavlja cjelinu u kojoj svaka komponenta ima specifičnu ulogu u analitičkom procesu. Ciklus započinje radom pumpe i injektora, koji osiguravaju stalni protok mobilne faze pod visokim tlakom te uvođenje uzorka u sustav. Upravo visoki tlak, kao ključna karakteristika HPLC-a, omogućuje korištenje stacionarnih faza ispunjenih vrlo malim česticama, što rezultira visokom moći razdvajanja i bržom analizom. Po injektiranju, uzorak prolazi kroz analitičku kolonu, u kojoj se analiti razdvajaju. Eluirani spojevi potom se ioniziraju u sučelju izvora iona, što je preduvjet za njihovu daljnju analizu u spektrometru masa. U tom procesu ključnu ulogu igra nebulizator (eng. *nebulizer*), koji pomoću struje plina (najčešće dušika) raspršuje eluent iz kolone u fini aerosol. Unutar ionizacijskog izvora, komponente uzorka se pod utjecajem dovedene toplinske ili električne energije (npr. ionizacija elektroraspršenjem; eng. *electrospray ionization*, ESI) prevode u struju plinovitih iona. Ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, detekcija se provodi primjenom dvaju glavnih načina ionizacije: pozitivnog (ESI+), u kojem analiti primaju proton i prelaze u pozitivno nabijene ione, ili negativnog (ESI-), koji se koristi za spojeve sklone gubitku protona. Iako se u analizi monoamina najčešće koristi pozitivni način ionizacije, oba su načina ključna za obuhvaćanje šireg spektra spojeva različitih kemijskih struktura. Tek nakon što su molekule uspješno ionizirane u ovom vakuumskom okruženju, mogu biti usmjerene prema masenom analizatoru (Slika 5A.). Maseni analizator zatim razvrstava nastale ione prema njihovom

omjeru mase i naboja (eng. *mass-to-charge ratio*; m/z). LC-MS/MS sustav, posebice u konfiguraciji trostrukog kvadrupola (QqQ), pruža dvostruku selektivnost kroz proces praćenja odabranih reakcija (eng. *multiple reaction monitoring*, MRM). Kvadrupol je vrsta masenog analizatora koji koristi oscilirajuća električna polja za selektivno propuštanje iona određenog omjera mase i naboja (m/z). Sustav trostrukog kvadrupola sastoji se od tri takva analizatora (Watson i Sparkman, 2008; Pitt, 2009; Skoog i sur., 2014):

1. Prvi kvadrupol (Q1): selektira specifični prekursorski ion.
2. Čelija za koliziju (Q2): inducira fragmentaciju iona pomoću inertnog plina.
3. Treći kvadrupol (Q3): propušta samo karakteristične produktne ione prema detektoru.

U završnoj fazi, ioni se detektiraju elektronskim multiplikatorom, pri čemu nastaje električni signal razmjernan njihovom broju. Detektirani električni signali prenose se u sustav za obradu podataka (eng. *data processing system*). Specijalizirani softver generira kromatogram – u kojem površina vrha (eng. *peak area*) odgovara intenzitetu struje detektiranih iona pri specifičnom retencijskom vremenu (eng. *retention time*, RT) za svaki analit (Slika 5B.) (Watson i Sparkman, 2008; Skoog i sur., 2014).



Slika 5. Ionizacija elektroraspršenjem (A) i trostruki kvadrupol (B). Preuzeto i prilagođeno prema Wooding i sur., 2013.

U kvantitativnoj analizi, površina vrha proporcionalna je količini analita u uzorku. Kako bi se osigurala preciznost, rezultati se očitavaju usporedbom s kalibracijskom krivuljom dobivenom analizom standardnih otopina poznatih koncentracija, tzv. eksternim standardom (ES). Uz ES, radi povećanja točnosti i preciznosti mjerenja, najčešće se koristi metoda internog standarda (IS). IS je tvar kemijski i fizikalno slična analitu, ali prirodno nije prisutna u uzorku. Dodaje se u poznatoj koncentraciji u prvom koraku predanalitičke pripreme, kako bi se omogućila korekcija za eventualne gubitke analita tijekom ekstrakcije i obrade uzorka te varijacije u ionizaciji (Watson i Sparkman, 2008; Skoog i sur., 2014).

Ovakva konfiguracija omogućuje preciznu identifikaciju i kvantifikaciju analita od interesa, što je od iznimnog značaja u analizama kompleksnih bioloških uzoraka (Watson i Sparkman, 2008; Pitt, 2009; Bosse i sur., 2017). Zahvaljujući opisanoj dvostrukoj selektivnosti i preciznosti mjerenja, LC-MS/MS sustav predstavlja metodološki temelj za karakterizaciju neurokemijskog profila monoamina u specifičnim matricama poput mozga gmazova.

2.6.4 Primjena HPLC-MS/MS metoda u detektiranju monoamina

Iako su razvijene i opisane mnogobrojne LC-MS/MS metode za identifikaciju i kvantifikaciju monoamina, većina ih obuhvaća tek ograničen broj analita (Helmschrodt i sur., 2020). Brojni, uvriježeni protokoli baziraju se na istovremenoj identifikaciji i kvantifikaciji dva (El-Beqqali i sur., 2007) do tri analita (Moriarty i sur., 2011), pri čemu su serotoninski i dopaminski put najčešće u fokusu istraživanja (Davla i sur., 2023). Suvremeni razvoj analitičkih metoda usmjeren je na povećanje osjetljivosti s ciljem praćenja dinamičkih promjena većeg broja neurotransmitera istovremeno. Istraživanja nastoje obuhvatiti više klasa spojeva, uključujući aminokiseline i biogene amine, kako bi se omogućilo cjelovitije razumijevanje složene kemijske komunikacije neurona (Bosse i sur., 2017). U skladu s tim, razvijeni su sveobuhvatniji pristupi koji omogućavaju kvantifikaciju većeg broja spojeva, primjerice 16 (Becker i sur., 2023) ili 19 analita istodobno (Ma i sur., 2021). Opisani su i protokoli koji detektiraju čak i više od 20 različitih spojeva, uključujući

monoamine, njihove prekursore i pripadajuće metabolite (Bourcier i sur., 2006). Ipak, značajan broj recentnih studija koje implementiraju LC-MS/MS metode primarno je razvijen u svrhu analize humanih uzoraka te uzoraka standardnih laboratorijskih modela poput miševa i štakora (Bicker i sur., 2013; Helmschrodt i sur., 2020; Becker i sur., 2023; Kumar i sur., 2024). Kako je većina postojećih metodoloških pristupa usmjerena na sisavce, primjena HPLC-MS/MS metoda na gmazovima, posebice gušterima, vrlo je ograničena i nedovoljno istražena. Analize profila mozgovog guštera postavljaju jedinstvene analitičke izazove, prvenstveno zbog iznimno male mase dostupnog tkiva, što onemogućuje korištenje metoda s niskom osjetljivošću ili zahtjevnim postupcima derivatizacije (Greco i sur., 2013; Bergmann i Schmedes, 2020). Ipak, novija istraživanja u području analitičke neurokemije pokazuju da optimizirane LC-MS/MS metode mogu nadvladati ograničenja povezana s malom količinom uzorka u modela koji nisu sisavci. Hori i sur. (2026) nedavno su u svojoj studiji na vinskih mušicama (*Drosophila melanogaster*) potvrdili da je upravo ovaj metodološki pristup ključan za precizno profiliranje monoamina na razini pojedinačnih jedinki, eliminirajući potrebu za udruživanjem (eng. *pool*) uzoraka ili kompleksnom predobradom. Uzevši sve navedeno u obzir, jasna je potreba za razvojem prilagođenog analitičkog pristupa koji će omogućiti pouzdanu i istovremenu kvantifikaciju šireg spektra monoamina u moždanom tkivu guštera, uz što jednostavniju pripremu uzorka, a visoku osjetljivost detekcije. U okviru ovoga rada, upravo takav pristup predstavlja temelj za razvoj metode monoaminskog profiliranja mozga guštera.

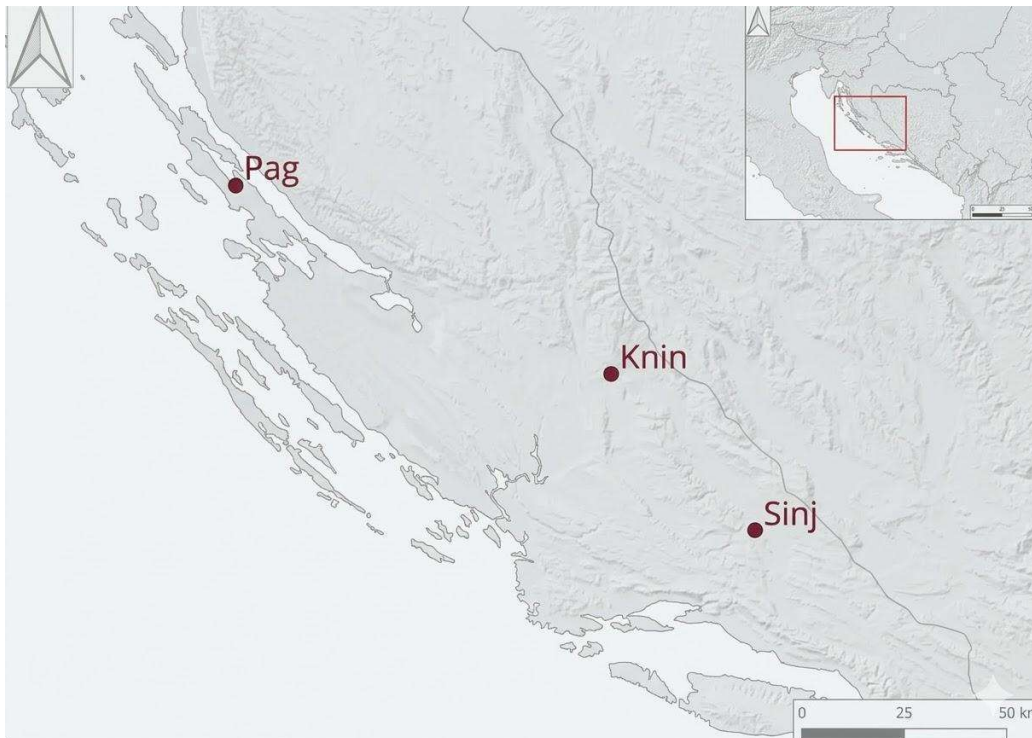
3 MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Životinje

3.1.1.1 Terensko uzorkovanje

Obje vrste guštera – *P. siculus* i *P. melisellensis* uzorkovane su na tri lokacije u Republici Hrvatskoj: okolica Novalje na otoku Pagu te u okolini Sinja i Knina (Slika 6.). Navedene lokacije odabrane su zbog međusobne udaljenosti od najmanje 50 km, kako bi se osiguralo uzorkovanje različitih populacija, ali na sličnim strukturama staništa. Odabrane lokacije usporedive su te uključuju poljoprivredna polja, pašnjake i livade isprepletene brdovitim terenom s makijom i šumarcima. Sinj i Knin karakterizira submediteranska klima i slična vegetacija, dok se Pag nalazi u području prijelazne submediteranske i mediteranske klime s više mediteranskih biljnih vrsta, no fauna kralježnjaka, uključujući potencijalne predatore guštera, slična je na svim lokalitetima.



Slika 6. Karta s ucrtanim lokacijama terenskih istraživanja. Preuzeto i prilagođeno iz Gojak i sur. (2026).

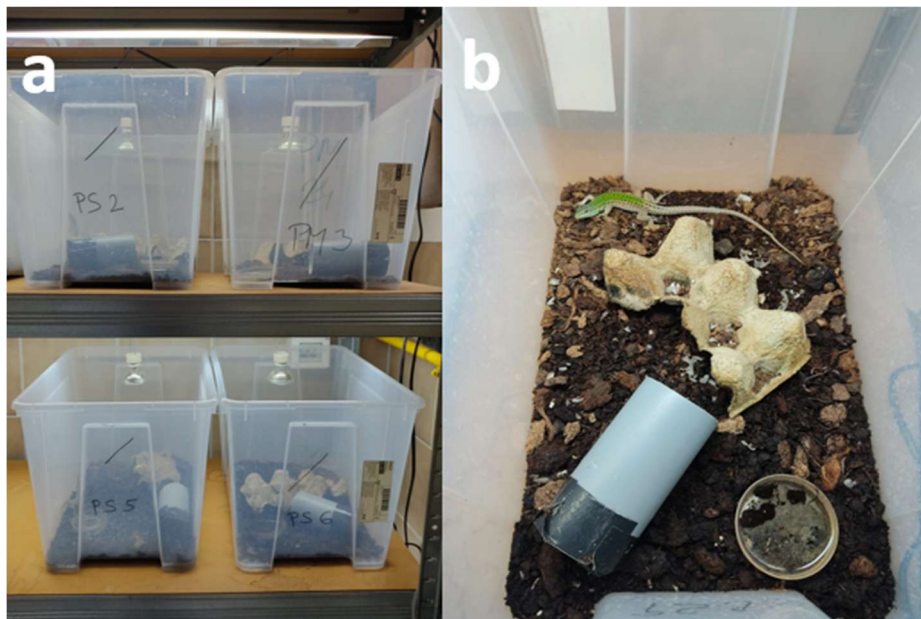
Uzorkovanje je provedeno dvije uzastopne godine (2020., 2021.) u vremenskom razdoblju od kolovoza do listopada, kako bi se izbjegao lov u vrijeme reproduktivne sezone obje vrste. Uzorkovane su pomoću teleskopskog štapa duljine do 5 m, na čijem se kraju nalazila pomična omča od flaksa (Slika 7.). Ukupno je ulovljeno 240 jedinki – 10 mužjaka i 10 ženki svake vrste na svakoj od tri navedene lokacije u svakoj godini. Nakon ulova, svaka životinja bila je evidentirana (vrsta, spol, mjesto ulova, datum i jedinstvena oznaka) te privremeno premještena u platnenu vrećicu označenu odgovarajućom individualnom oznakom ulovljene jedinice. Dozvole za uzorkovanje guštera na lokacijama Knin, Sinj i Pag dobivene su od Ministarstva gospodarstva i održivog razvoja Republike Hrvatske (KLASA: UPI/I-612-07/20-48/121; URBROJ 517-05-1-1-20-6 te KLASA: UPI/I-612-07/21-48/202; URBROJ 517-10-1-1-21-4). Istraživanje je usklađeno s važećim Zakonom o zaštiti životinja (NN 102/17 i 32/19), Pravilnikom o zaštiti životinja koji se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13i 116/19), smjernicama koje je izradio ASAB/ABS (ASAB Etički odbor/ABS odbor za skrb o životinjama, 2023.) te 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 251-58-10617-24-168). Sredstva za ovaj rad osigurala je Hrvatska zaklada za znanost projektom UIP-2019-04-8469 (voditelj: Sofija Ana Blažević).



Slika 7. Terensko uzorkovanje guštera teleskopskim štapom. Autor: Duje Lisičić.

3.1.1.2 Smještaj i briga o životinjama

Životinje su u zasebnim, individualno označenim platnenim vrećicama transportirane u nastambu za životinje Zavoda za animalnu fiziologiju pri Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (HR-POK-027), gdje su bile pojedinačno smještene u plastične, prozirne kutije dimenzija 40 x 30 cm, kojima je dodijeljena ista identifikacijska oznaka kao i ona s platnene vrećice (Slika 8a.). Dno svakog terarija bilo je ispunjeno tresetom. U terarije su, u svrhu obogaćivanja okoliša (osiguravanja mjesta za skrivanje i omogućavanje termoregulacije), bili postavljeni kamen i plastična cijev (Slika 8b.). Iznad svakog terarija nalazila se LED žarulja kao izvor topline te UV lampa nužna za održavanje normalnih fizioloških funkcija guštera. U nastambi je simuliran prirodni ciklus svjetlosti (12 sati svjetla/12 sati tame) te su održavane optimalne vrijednosti temperature (20-25 °C) i vlažnosti zraka (40-60 %). Životinje su tri puta tjedno bile hranjene živim šturcima (*Gryllus assimilis*), uz dodatnu suplementaciju kalcijem i vitaminima svakog drugog tjedna. U terarije su, radi osiguravanja slobodnog pristupa vodi, bile postavljene plastične posudice, koje su punjene svježom vodom tri puta tjedno. Nakon razdoblja prilagodbe u trajanju od 30 dana, provedena su bihevioralna testiranja. Po završetku bihevioralnih testiranja životinje su bile žrtvovane.



Slika 8. Terariji s individualnim oznakama životinja (a) i obogaćenim okolišem (b). Autor: Dunja Vlašić.

3.1.1.3 *Žrtvovanje i prikupljanje uzoraka moždanog tkiva*

Životinje su bile eutanazirane dekapitacijom (Prilog 9.1) najmanje dva tjedna od završetka bihevioralnih testiranja. Redoslijed žrtvovanja bio je nasumično određen pomoću online alata (<https://www.randomizer.org>). Žrtvovanje se dosljedno provodilo u istom vremenskom razdoblju – između 10:00 i 14:00 h, u prosincu 2020. i 2021. godine. Kako bi se izbjegao stres u životinja i smanjila varijabilnost podataka, vrijeme rukovanja, od trenutka ulova u terariju do dekapitacije, bilo je mjereno za svaku jedinku guštera i maksimalno skraćeno (ne duže od 20 s). Dodatno, životinje je lovila i dekapitirala uvijek ista osoba. Po dekapitaciji, mozak je bio brzo izoliran (unutar 3 min) na ledenoj podlozi, potom prebačen na suhi led, kako bi se brzo i u potpunosti smrznuo. Pomoću skalpela odvojene su, a zatim i pojedinačno izvagane, lijeva i desna polutka mozga. Lijeva polutka koristila se za kemijske analize te je bila pohranjena na -80°C do homogenizacije. Desna polutka koristila se za molekularne analize te je prije homogenizacije i izolacije RNA, DNA i proteina bila kratko pohranjena u tekućem dušiku.

3.1.2 *Kemikalije*

3.1.2.1 *Kemikalije korištene za HPLC*

Kemikalije korištene za pripremu deproteinizacijske otopine:

- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka)
- natrijev metabisulfit, Na₂S₂O₅ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 70% perklorna kiselina, HClO₄ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu standardnih otopina:

- 0,5M klorovodična kiselina, HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- 70% etanol
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- serotonin (5HT; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)

- dopamin hidroklorid (DA; ≥98%) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-norepinefrin hidroklorid (NA; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- epinefrin bitartrat (A; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-triptofan (TRP; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- L-tirozin hidroklorid (TYR; ≥98%, TLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 5-hidroksiindol-3-octena kiselina (5-HIAA; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- DL-4-hidroksi-3-metoksimandelična (vanililmandelična) kiselina (VMA; ≥98.0%, HPLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 4-hidroksi-3-metoksifeniloctena (homovanilična) kiselina (HVA; >99%, TLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 5-hidroksi-L-triptofan hidrat (5HTP; ≥98%, TLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA; ≥98%, TLC) (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromid (DHBA; 98%) (Acros Organics, Ukrajina)
- oktopamin hidroklorid (OA; ≥98.0%, GC) (Sigma Aldrich, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu mobilnih faza:

- acetonitril (Fisher Chemical, UK)
- metanol (Honeywell, Francuska)
- ≥99% trifluoroctena kiselina, TFA (Sigma Aldrich, Njemačka)
- 85% fosforna kiselina, H₃PO₄ (J.T. Baker, Švicarska)
- 88-91% mravlja kiselina, HCOOH (Sigma Aldrich, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

3.1.2.2 Kemikalije korištene za HPLC-MS/MS

Kemikalije korištene za pripremu standardnih otopina:

- 0,01M HCl (Gram-Mol, Hrvatska)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu mobilnih faza:

- acetonitril (Honeywell, Francuska)

- amonijev formijat ($\geq 99,0\%$) (Honeywell, Francuska)
- 88-91% mravlja kiselina, HCOOH (Sigma Aldrich, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

Kemikalije korištene za pripremu uzorka

- kloroform stabiliziran amilenom ($\geq 99,8\%$) (Honeywell, Njemačka)
- voda, HPLC čistoće (Honeywell, Njemačka)

3.1.2.3 Kemikalije korištene za molekularne analize

- agaroza (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Njemačka)
- BlueJuice™ pufer za nanošenje na gel (10x) (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Litva)
- 0,5x Tris-borat-EDTA (TBE) pufer
- SYBR™ Safe boja za gel (Thermo Fisher, SAD)
- AmpliTaq™ DNA polimeraza (250 U, 5 U/ μ L) (Applied Biosystems, SAD)
- dNTP Mix (10 mM) (Applied Biosystems, SAD)
- MgCl₂ (25 mM) (Applied Biosystems, SAD)
- 10x PCR pufer II (Applied Biosystems, SAD)
- H₂O bez nukleaza (Thermo Fisher, SAD)
- MultiScribe MuLV reverzna transkriptaza (Thermo Fisher, SAD)
- Tris-EDTA (TE) pufer pH 8.0 (Ambion, SAD)

3.1.2.4 Komercijalni kompleti

- GenElute™ RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Sigma-Aldrich, SAD)
- High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher, SAD)
- GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, SAD)

3.1.3 Tehnička pomagala i pribor

- sustav HPLC Agilent 1260 Infinity II LC (Agilent Technologies, SAD), konfiguracija: kvaterna pumpa Agilent G7111B; injektorski modul Agilent Q7129A s petljom za ubrizgavanje od 100 μ L; UV-DAD detektor Agilent Q7115A

- sustav Agilent 1260 Infinity II HPLC (Agilent Technologies, SAD), konfiguracija: binarna pumpa Agilent G7112B; automatski uzorkivač (eng. *valsampler*) Agilent G7129A; MCT eng. *multicolumn thermostat*) Agilent G7116A; UV-DAD detektor Agilent G7115A; Ultivo trostruki kvadrupolni maseni spektrometar (LC/TQ) Agilent G6465B
- kromatografska kolona reverzne faze Kromasil 100 5 C18 (5 μm ; 150 mm x 4,6 mm) s pretkolumnom Kromasil 100 5 C18 (5 μm ; 10 mm x 3,0 4,6 mm) (AkzoNobel, Švedska)
- kromatografska kolona reverzne faze ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (5 μm ; 150 mm x 4,6 mm) s pretkolumnom ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl (5 μm ; 12,5 mm x 4,6 mm) (Agilent Technologies, SAD)
- kromatografska kolona reverzne faze Purospher[®] STAR RP 18 endcapped (3 μm ; 55 mm x 4 mm) (Merck KGaA, Njemačka)
- digitalna vaga, EG 220-3NM, d = 0,001 g: 220 g (Kern, Njemačka)
- digitalna vaga, HM 125SM-FR, d = 0,001 mg: 61 g – 125 g (Precisa, Njemačka)
- miješalica LLG labware (uniTEXER, Njemačka)
- mikrocentrifuga, Quickspin (Cleaver Scientific, Velika Britanija)
- uređaj za mjerenje pH CG842 (Schott Instruments, Njemačka)
- magnetska miješalica (Elektrosanitarij, Hrvatska)
- ultrazvučni homogenizator (Bandelin Sonopuls, Njemačka)
- centrifuga SL 8R (Thermo Scientific, Njemačka)
- centrifuga 5425/5425 R (Eppendorf, Njemačka)
- membranski filteri – celulozni acetat, 0.22 μm (Thermo Scientific™, United States)
- spektrofotometar, BioSpec-nano (Shimadzu, Japan)
- PCR uređaj, GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD)
- qPCR uređaj, qTower3 (Analytik Jena, Njemačka)
- automatska pipeta, HandyStep electronic (BRAND, Njemačka)
- uređaj za elektroforezu, Power pac 300, Bio-Rad s kadicom Sub-Cell[®] GT Basic (Bio-Rad, SAD)

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode za analizu razina monoamina

U svrhu separacije i kvantifikacije monoamina, njihovih prekursora i metabolita, korištena je tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC). Analize su provedene na dva različita sustava: prvi dio istraživanja, koji je obuhvaćao razvoj i optimizaciju metode na standardnim otopinama i preliminarnim uzorcima, proveden je na sustavu HPLC-DAD-FLD, koji koristi detektor s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD) i fluorescencijski detektor (eng. *fluorescence detector*, FLD), a drugi, koji je obuhvaćao konačnu kvantifikaciju analita, tekućinskom kromatografijom spregnutom s tandemskom spektrometrijom masa (eng. *high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, HPLC-MS/MS).

3.2.1.1 HPLC-DAD-FLD metoda

3.2.1.1.1 Priprema standardnih otopina

U svrhu uspostavljanja kalibracijske krivulje, bilo je potrebno pripremiti početne standardne otopine (eng. *stock solution*) koncentracije 1000 μM . Pripremljeni su standardi 11 analita (A, DA, 5-HIAA, 5HT, 5HTP, L-DOPA, NA, TRP, TYR, VMA) te dva unutarnja standarda (IS; DHBA i OA). 3,4-dihidroksibenzojeva kiselina (DHBA) korištena je kao unutarnji standard za uzorke mozga guštera, dok je oktopamin (OA) uključen u fazi razvoja metode, s obzirom na potencijalnu primjenu metode i na uzorke drugih životinjskih vrsta. Svaki standard analita zasebno je izvagan u aluminijskom šeširiću. U šeširić je pipetom na odvagu dodano 100 μL otapala, prema preporuci proizvođača (Tablica 1.).

Tablica 1. Priprema otopina standarda adrenalina (A), dopamina (DA), 3,4 dihidroksi L fenilalanina (L-DOPA), 5-hidroksiindol-octene kiseline (5-HIAA), serotoninina (5HT), 5-hidroksil-L-triptofan hidrata (5HTP), homovanilične kiseline (HVA), noradrenalina (NA), triptofana (TRP), tirozina (TYR), vanililmandelične kiseline (VMA) te unutarnjih standarada 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromida (DHBA) i oktopamin hidroklorid (OA); STL-specifikacijsko-tehnički list.

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

Aluminijski šeširić sa standardom i otapalom je prenesen u staklenu tikvicu te je dodana deproteinizacijska otopina (Tablica 2.) do konačnog volumena od 10 mL. Tako pripremljene početne standardne otopine pojedinih analita i IS-a korištene su za pripremu kalibracijskih otopina (kalibratora), koje sadržavaju sve analite razrijeđene u željenom rasponu poznatih koncentracija (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 i 100 μ M).

Tablica 2. Priprema 50 mL deproteinizacijske otopine.

komponenta smjese	Mr (g/mol)	početna koncentracij a	dodan volumen (mL)	dodana masa (mg)	konačna koncentracij a (mM)
HClO ₄	100,46	70%	0,431	/	0,1 M
Na ₂ S ₂ O ₅	190,11	/	/	3,80	0,4 mM
EDTA	372,24	/	/	3,72	0,2 mM

3.2.1.1.2 Priprema uzorka

Uzorci su pripremani prema prilagođenom protokolu opisanom u radu Nikolic i sur. (2019). Deproteinizacijska otopina (Tablica 2.) pripremljena je u ultračistoj vodi prikladnoj za primjenu na HPLC-u, a pH joj je podešen na 3,1 korištenjem vodenih otopina NaOH različitih koncentracija (10 M, 5 M, 2,5 M, 1 M).

Smrznuta lijeva polutka mozga bila je homogenizirana u deproteinizacijskoj otopini (μ L, omjer 10:1 u odnosu na masu uzorka) u trajanju do 10 s pri 20% nominalne snage, pomoću ultrazvučnog homogenizatora. Homogenizacija je provođena na ledu, kako bi se spriječila degradacija analita uzrokovana zagrijavanjem uzorka. Homogenizirani uzorci centrifugirani su 20 min pri 30000 x g i 4 °C. Nakon centrifugiranja, supernatant je pažljivo odvojen u čistu mikroeprevetu te je postupak centrifugiranja ponovljen pri istim uvjetima. Supernatant odvojen drugim centrifugiranjem

pipetom je prenesen u mikroeprovete s filterom (0,22 μm ; Thermo Scientific™, SAD) te je uslijedilo završno centrifugiranje, u trajanju od 15 min pri 17000 x g i 4 °C. Dobiveni filtrat je pipetom prenesen u staklene bočice (eng. *vials*) koje su potom bile postavljene u uređaj za daljnje analize. Uzorci su pripremljeni svaki dan neposredno prije analize.

3.2.1.1.3 Razvoj metode

Kromatografsko razdvajanje analita postignuto je primjenom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC) uz UV detekciju pomoću detektora s nizom dioda (DAD) te fluorescencijsku detekciju (FLD). Detekcija je provedena pri 280 nm (DAD) te 270/320 nm (FLD). Kromatografski parametri razvijene metode objedinjeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Kromatografski uvjeti novorazvijene metode za razdvajanje analita uz dodatak IS.

Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5 μ m; 150mmx4,6mm)		
Pretkolona	Kromasil 100-5-C18 (5 μ m; 10mmx3,0-4,6mm)		
Mobilna faza A	0,1% trifluoroctena kiselina (TFA); pH \approx 2,0		
Mobilna faza B	100% acetonitril		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
	0	100	0
	8	97	3
	10	93	7
	17	86	14
	21	94	6
Volumen injektiranja	100 μ L		
Protok	1,5 mL/min		
Vrijeme analize	21 min		
Ekvilibracija kolone (post run)	1 min		
Detekcija (UV/ViS)	280 nm		
Temperatura kolone	22 $^{\circ}$ C		

1.1.1.1

3.2.1.2 HPLC-MS/MS metoda

3.2.1.2.1 Priprema standardnih otopina

Početne standardne otopine (eng. *stock solution*) analita (A, DA, 5-HIAA, 5HT, 5HTP, L-DOPA, NA, TRP, TYR, VMA) pripremljene su u koncentraciji od 40 µg/mL. Odvage standarada pripremljene su na isti način kao što je opisano u poglavlju 3.1.1.7.2. *Priprema standardnih otopina*, pri čemu se za razrjeđivanje do konačnog volumena korištena je ultračista voda. Deproteinizacijska otopina (sadrži HClO₄, Na₂S₂O₅ i EDTA) korištena u HPLC-DAD-FLD metodi nije korištena jer njezine komponente nisu kompatibilne s MS detekcijom pošto prisutnost nehlapljivih soli i jakih kiselina može uzrokovati supresiju ionizacije u ESI izvoru te kontaminaciju LC-MS/MS sustava. Od početnih standardnih otopina pripremljene su dvije radne otopine koncentracija 1 µg/mL i 0,125 µg/mL iz kojih su serijskim razrjeđenjima dobivene kalibracijske otopine u 11 različitih koncentracija (0,005; 0,01; 0,03; 0,04; 0,0625; 0,125; 0,25; 0,35; 0,5; 0,75; 1,0 µg/mL). U ultračistoj vodi pripremljena je i početna otopina unutarnjeg standarda DHBA (50 µg/mL), iz koje je zatim pripremljena radna otopina (2 µg/mL). Detaljan protokol pripreme početnih standardnih, radnih i kalibracijskih otopina nalazi se u Prilogu 9.2. Sve otopine pohranjene su pri 4 °C u mraku kako bi se spriječila razgradnja analita.

3.2.1.2.2 Priprema uzorka

Smrznute polutke mozga homogenizirane su ultrazvučnim homogenizatorom (Bandelin, Sonopuls) do 10 s pri 20 % nominalne snage, na ledu, u 135 µL ultračiste vode s dodatkom unutarnjeg standarda DHBA u koncentraciji 0,125 µg mL⁻¹. Homogenati su potom centrifugirani 25 min pri 21300 x g i 4 °C. Supernatant izdvojen centrifugiranjem prebačen je u mikroepruvetu te mu je dodano 300 µL kloroforma. Smjesa uzorka i kloroforma potom je miješana tijekom 10 sekundi pomoću vrtložne mješalice, nakon čega je uslijedilo centrifugiranje pri 1500 x g u trajanju od 10 min pri 4 °C. Vodena faza odvojena je i prebačena u mikroepruvetu koja je sadržala kolonicu s membranskim filterom (0,22 µm; Thermo Scientific™, SAD) te centrifugirana 15 min pri 17000 x g i 4 °C. Filtrat je potom prikupljen i prebačen u umetak za bočice neposredno prije analize koja se provodila pri temperaturi 4 °C. Uzorci su svaki dan pripremljeni neposredno prije analize.

3.2.1.2.3 Razvoj metode

Analiza je provedena pomoću sustava za tekućinsku kromatografiju HPLC Agilent 1260 Infinity II, spregnutog s trostrukim kvadrupolnim masenim spektrometrom Ultivo G6465B, opremljenim izvorom ionizacije elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization*, ESI). Kromatografska separacija analita od interesa provedena je na koloni Kromasil 100-5-C18 (5 µm, 150 mm × 4,6 mm) s pripadajućom zaštitnom kolonom (5 µm, 12,5 mm × 4,6 mm; Agilent Technologies). Gradijent eluiranja uspostavljen je korištenjem dviju mobilnih faza: otapala A (0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu u vodi) i otapala B (0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu u acetonitrilu/vodi u omjeru 95:5). Brzina protoka bila je 0,8 mL/min. Temperatura kolone održavana je na 22 °C, dok je temperatura u automatskom uzorkivaču održavana na 4 °C (Tablica 4.).

Uvjeti ESI-MS analize bili su sljedeći: temperatura plina 350 °C, protok plina 11 L/min, tlak raspršivača 40 psi te kapilarni napon od 3500 V u pozitivnom i negativnom ESI modu. Vrijeme zadržavanja (eng. *dwel time*) za svaki analit bilo je postavljeno na 20 ms (Tablica 4.), a specifične prijelazne mase i parametri navedeni su u Tablici 5. Ukupno trajanje analize po uzorku iznosilo je 40 minuta, uključujući 5 minuta kondicioniranja na početne uvjete (eng. *post-run*).

Tablica 4. Kromatografski i MS/MS uvjeti novorazvijene metode.

Analitička kolona	Kromasil 100-5-C18 (5µm; 150mmx4,6mm)		
Pretkolona	Kromasil 100-5-C18 (5µm; 10mmx3,0-4,6mm)		
Mobilna faza A	0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu u vodi		
Mobilna faza B	0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu u acetonitrilu/vodi u omjeru 95:5		
Gradijent	Vrijeme (min)	Mobilna faza A (%)	Mobilna faza B (%)
	0	100	0
	15	97	3
	18,75	93	7
	31,87	86	14
	39,37	94	6
	39,50		0
Volumen injektiranja	20 µL		
Protok	0,8 mL/min		
Vrijeme analize	40 min		
Ekvilibracija kolone (<i>post run</i>)	5 min		
Temperatura plina	350 °C		
Protok plina	11 L/min		
Tlak raspršivača	40 psi		
Kapilarni napon	3500 V		
Vrijeme zadržavanja (<i>dwel time</i>)	20 ms		
Temperatura kolone	22°C		

Tablica 5. Optimizirani MS/MS prijelazi za svaki od analita.

Analit	Prekursorski ion, m/z	Ionski produkt, m/z	Energija sudara (CE), eV	Fragmentor, V	Polarnost
A	184,1	166,0; 107,0	8; 24	46	+
DA	154,1	137,0; 91,0	8; 24	64	+
DHBA	123,0	77,1; 51,0	20; 36	122	+
L-DOPA	198,1	107,0; 77,1	28; 52	84	+
5-HIAA	192,1	146,0; 91,1	16; 44	86	+
5HT	177,1	160,1; 115,1	8; 32	46	+
5HTP	221,1	162,1; 134,0	16; 28	84	+
HVA	137,1	122,1; 93,8	16; 24	160	+
NA	152,1	106,9; 79,0	16; 28	102	+
TRP	205,1	188,0; 118,0	8; 28	46	+
TYR	182,1	91,1; 77,0	32; 44	84	+
VMA	197,1	137,2; 107,9	24; 52	66	-

Analiza ESI-MS provedena je u načinu višestrukog praćenja reakcija (eng. *multiple reaction monitoring*, MRM), a podaci su prikupljeni i kvantificirani pomoću softvera MassHunter Workstation (Agilent). Koncentracija svakog analita u uzorku izračunata je na temelju površine vrhova (eng. *area under the curve*, AUC) karakterističnih produktnih iona, prema jednadžbi (1). Standardna otopina koja je sadržavala sve analite (0,125 µg/mL) i IS (0,125 µg/mL), korištena je

kao vanjski standard (eng. *external standard*; ES) i analiziran unutar istog analitičkog ciklusa kao i uzorci moždanog tkiva guštera. Izmjerene količine analita normalizirane su prema masi pojedinačne moždane polutke, a konačne količine izražene su u arbitrarnim jedinicama.

$$količina = \frac{\left(\frac{AUC_{analit}}{AUC_{IS}}\right)_{uzorak}}{\left(\frac{AUC_{analit}}{AUC_{IS}}\right)_{ES}}$$

(1)

3.2.1.2.4 Validacija metode

Metoda za analizu monoamina i njihovih metabolita u uzorcima mozga guštera validirana je prema smjernicama za validaciju bioanalitičkih metoda ICH M10 i EMA (EMA 2011; ICH M10 2022). Ispitivani su slijedeći parametri: selektivnost, prijenos analita (eng. *carry-over*), učinak matrice, linearnost, točnost, preciznost, stabilnost i ekstrakcijski prinos.

3.2.1.2.4.1 Selektivnost

Prema smjernicama, selektivnost se ispituje korištenjem praznih (eng. *blank*) uzoraka matrice ili evaluacijom omjerom kvantifikacijskih i kvalifikacijskih prijelaza u MRM načinu snimanja, pri čemu relativna standardna devijacija (RSD) svih analita ne smije prelaziti 15 %. Budući da ne postoji uzorak mozga bez endogenih monoamina i njihovih metabolita, selektivnost se ispitala usporedbom omjera površine kvantifikacijskih i kvalifikacijskih prijelaza u MRM načinu snimanja

3.2.1.2.4.2 Prijenos analita

Prema smjernicama, prijenos analita ne smije prelaziti 20 % signala donje granice kvantifikacije (eng. *lower limit of quantitation*, LLOQ) za svaki pojedini analit, odnosno 5 % signala za unutarnji standard (IS). U svrhu ispitivanja prijenosa analita iz prethodnog uzorka, korištena je standardna otopina s najvišim koncentracijama analita i prazan (*blank*) uzorak (ultračista voda). Nakon

injiciranja uzorka standardne otopine najviše koncentracije, neposredno je injektiran prazan uzorak te su praćeni eventualni signali na karakterističnim vremenima zadržavanja i MRM-prijelazima svih analita od interesa i unutarnjeg standarda.

3.2.1.2.4.3 Učinak matrice

S obzirom da ne postoji biološka matrica mozga bez prisutnih monoamina i njihovih metabolita, za procjenu učinka matrice testiran je utjecaj matrice na ionizaciju IS-a. Apsolutni učinak matrice izračunat je kao postotno odstupanje površine vrha IS-a u uzorku obogaćenom (eng. *spiked*) dodatkom IS-a nakon postupka ekstrakcije, u odnosu na standardnu otopinu iste koncentracije. Prema smjernicama, preciznost odgovora u različitim serijama matrice ne bi trebala prelaziti 15%. S obzirom na kompleksnost biološkog matriksa i potencijalnih varijacija u MS-signalu te instrumentalnih odstupanja između različitih dana provođenja analiza, uz standardnu upotrebu IS-a uvedena je i dodatna standardizacija pomoću vanjskog standarda (ES). ES poznate koncentracije, analiziran unutar svakog analitičkog niza, služio je kao dodatna kontrola stabilnosti sustava i instrumentalnog odstupanja unutar i između analitičkih nizova, čime je osigurana maksimalna preciznost kvantifikacije.

3.2.1.2.4.4 Linearnost i granica kvantifikacije

Linearnost je procijenjena na 11 koncentracijskih razina (0,005–1 µg/mL), a prema smjernicama, kriterij prihvatljivosti temeljio se na koeficijentu determinacije ($R^2 > 0,99$). Granica kvantifikacija (eng. *limit of quantification*; LOQ) za svaki analit definirana je kao najniža točka kalibracijske krivulje uz omjer signal-šum (eng. *signal to noise*, S/N) ≥ 10 .

3.2.1.2.4.5 Točnost

Točnost metode ispitana je primjenom metode standardnog dodavanja, kojom se uzorak poznate matrice obogaćuje (eng. *spike*) poznatim količinama analita. Nakon analize obogaćenih uzoraka, dobivene vrijednosti signala (površine vrhova) koristile su se za konstrukciju kalibracijske krivulje i izračunavanje razine analita. Točnost je izražena kao postotno odstupanje izmjerene koncentracije od nominalne vrijednosti (eng. *bias*, %), izračunato prema formuli:

$$Bias (\%) = \frac{\text{izmjerena koncentracija} - \text{nominalna koncentracija}}{\text{nominalna koncentracija}} \times 100 \quad (2)$$

Točnost je procijenjena za tri modela kvantifikacije: bez korekcije, korekcijom pomoću IS te kombiniranom korekcijom IS i ES, kako bi se utvrdio doprinos svake korekcije ukupnoj točnosti metode. Točnost se smatra zadovoljavajućom uz odstupanje unutar $\pm 15\%$.

3.2.1.2.4.6 Preciznost

Preciznost metode, definirana kao podudaranje između ponovljenih mjerenja i izražena kao relativna standardna devijacija (RSD, %), procijenjena je na dvije razine: preciznost unutar i između dana (bez korekcije, IS korekcija, IS i ES korekcija) te preciznost vanjskog standarda (ES). Prihvatljivim kriterijem za preciznost smatrana je vrijednost RSD manja od 15 %.

Preciznosti unutar (eng. *intra-day*) i između dana (eng. *inter-day*) procijenjene su analizom zbirnog uzorka (eng. *pool*) triju različitih uzoraka mozga guštera, pri čemu je zbirni uzorak analiziran u tri tehnička ponavljanja tijekom dva uzastopna dana. Dodatno, preciznost vanjskog standarda (ES) provjerena je analizom odgovarajućih kalibracijskih uzoraka u tri tehnička ponavljanja unutar jednog dana te tijekom tri uzastopna dana. Analiti koji nisu zadovoljili kriterije prihvatljivosti isključeni su iz daljnje analize.

3.2.1.2.4.7 Stabilnost

Stabilnost analita u uzorcima tkiva mozga guštera ispitana je ponovnim injektiranjem triju prethodno analiziranih uzoraka nakon jednog ciklusa smrzavanja i odmrzavanja. Dobiveni rezultati uspoređeni su s početnim vrijednostima, kako bi se procijenio utjecaj ciklusa zamrzavanja/odmrzavanja na stabilnost analita u pripremljenim biološkim matricama.

Stabilnost otopine ES-a ispitana je usporedbom otopina pohranjenih na automatskom uzorkivaču (eng. *autosampler*) pri 4 °C tijekom sedam dana sa svježije pripremljenim uzorkom otopine

vanjskog standarda. Usporedba je napravljena na temelju površina vrhova analita i IS-a te izračunatih koncentracija.

Prema smjernicama, analiti se smatraju stabilnima ako izmjerena koncentracija nakon testiranja iznosi $\pm 15\%$ u odnosu na početnu (svježe pripremljenu) vrijednost.

3.2.1.2.4.8 Ekstrakcijski prinos

Ekstrakcijski prinos (iskorištenje) testiran je pomoću standardnih otopina analita na tri koncentracijske razine (0,01; 0,125; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Signali ekstrahiranih standardnih otopina uspoređeni su s onima u ne-ekstrahiranim standardnim otopinama istih koncentracija, koje su predstavljale 100 % prinosa. Sukladno smjernicama, ekstrakcijski prinos ne mora biti stopostotan, ali mora biti konzistentan i ponovljiv na svim ispitivanim razinama.

3.2.2 Analiza ekspresije gena

3.2.2.1 Homogenizacija uzoraka

Smrznuta desna polutka mozga guštera homogenizirana je ultrazvučnim homogenizatorom 300 μ L odgovarajućeg pufera (SK Buffer) iz komercijalnog kompleta GenElute™ RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit. Homogenizacija se provodila na ledu u trajanju do 10 s pri 10 % nominalne snage uređaja. Homogenizirani uzorci su pohranjeni na -80 °C do daljnje analize.

3.2.2.2 Izolacija i kontrola kvalitete RNA

Za izolaciju RNA, DNA i proteina korišten je GenElute RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit, prema protokolu proizvođača. Uzorci DNA i proteina su neposredno nakon izolacije pohranjene na -20 °C. Koncentracija i čistoća izolirane RNA određene su spektrofotometrijski (BioSpec-nano) nanošenjem 2 μ L uzorka na mjernu površinu, a apsorbancije su mjerene pri valnim duljinama 230, 260 i 280 nm. Onečišćenje uzorka proteinima procijenjeno je omjerom apsorbancija A260/280 (prihvatljivi raspon: 1,6–1,9), dok je onečišćenje uzorka solima procijenjeno omjerom apsorbancija A260/230 (prihvatljivi raspon: \geq 2,0). Integritet izolirane RNA provjeren je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu (60 mL 0,5x TBE pufera, 0,9 g agaroze i 6 μ L boje SYBR Safe). Prilikom nanošenja uzorka na gel, 2 μ L izolirane RNA pomiješano je s 2 μ L pufera za nanošenje (BlueJuice 2x). Elektroforeza je provedena 30 min pri naponu od 80 V. Vizualizacija uzoraka je izvršena pod UV svjetlom, korištena je boja 10 000x SYBR Safe, pri čemu su jasno definirane trake ribosomske RNA: 28S (veća podjedinica, cca 4.8 kb) i 18S (manja podjedinica, cca 2.0 kb) približnog omjera intenziteta 2:1 koje su služile kao pokazatelj očuvanog integriteta RNA.

3.2.2.3 Sekvenciranje RNA (RNA-Seq)

S obzirom na to da genomi vrsta *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* nisu zabilježeni, za potrebe istraživanja genske ekspresije, odnosno dizajna specifičnih početnica, bilo je nužno provesti *de novo* analizu transkriptoma. U tu svrhu odabran je reprezentativni set od 12 uzoraka

(oba spola obje vrste sa svih terenskih lokacija: Pag, Sinj, Knin) te je poslan na sekvenciranje (RNA-Seq) u tvrtku Novogene (UK) Co., Ltd. Uzorci ukupne RNA pripremljeni su za sekvenciranje razrjeđivanjem u puferu za eluciju (Elution Solution A) iz komercijalnog kompleta za izolaciju RNA, do finalnog volumena od 24 μ L. Kako bi se postigla ujednačena količina RNA, uzorci su razrijeđeni u omjeru 1:6 (4 μ L originalne RNA i 20 μ L pufera). Finalne koncentracije poslanih uzoraka kretale su se u rasponu od 40,99 do 79,72 ng/ μ L. Analiza je obuhvaćala kontrolu kvalitete RNA uzoraka, pročišćavanje RNA, pripremu mRNA biblioteke metodom poliA-obogaćivanja (eng. *polyA enrichment*), sekvenciranje na platformi NovaSeq 600 PE150 uređaja, poravnavanje i standardnu bioinformatičku analizu. Sekvenciranje je provedeno u formatu uparenih očitavanja duljine 150 bp (eng. *paired-end 150*, PE150), uz postizanje visoke gustoće očitavanja od minimalno 50 milijuna očitavanja po pojedinačnom uzorku. Standardna bioinformatička analiza uključivala je sastavljanje *de novo* transkriptoma, kvantifikaciju ekspresije transkripata te analizu diferencijalne genske ekspresije. Iz dobivenog transkriptoma, prema klasterima naših uzoraka pomoću platforme Galaxy identificirane su sekvence od interesa koje su služile kao predložak za dizajn početnica za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (eng. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) i uspješnu analizu genske ekspresije.

3.2.2.4 Dizajn početnica

Budući da gušteri roda *Podarcis* ne pripadaju standardnim laboratorijskim modelima, dizajnirane su specifične početnice za referentne gene i gene od interesa. Odabir referentnih gena temeljio se na literaturi o evolucijski konzerviranim genima u amniota, s naglaskom na reptile i ptice te je detaljno opisan u diplomskom radu (Petrović, 2023), izrađenom u sklopu ovog istraživanja.

Pomoću alata na internetskoj stranici Nacionalnog centra za biotehnoške informacije (NCBI) - NucleotideBLAST i PrimerBLAST dizajniran je minimalno po jedan set početnica (uzvodna i nizvodna) za svaki od referentnih gena i gena od interesa. Dizajn svakog seta početnica temeljen je na klasterima iz unigene.fasta datoteke transkriptoma mozga guštera, generirane u sklopu

RNA-Seq analize (vidi 3.2.2.1.2.). Pri dizajnu početnica su primijenjeni sljedeći kriteriji koji zadovoljavaju MIQE smjernice (Bustin i sur., 2009):

- duljina početnica: 18-24 nukleotida
- temperatura taljenja (T_m): 59-62 °C
- udio GC parova: 40-60%
- duljina produkta 70-200 bp
- vrijednosti samosparivanja (eng. *self-complementarity*): što niže
- međusobne komplementarnosti 3' krajeva para početnica (eng. *3' self-complementarity*): što niže

Liofilizirane početnice (IDT, SAD) otopljene su u TE puferu do koncentracije 100 μ M (matična otopina) te razrijeđene na radnu koncentraciju od 10 μ M.

3.2.2.5 Reverzna transkripcija i provjera uspješnosti PCR metodom

Sinteza komplementarne DNA (cDNA) provedena je pomoću High-Capacity RNA-to-cDNA Kit s MultiScribe™ MuLV reverznom transkriptazom. Reakcijska smjesa pripravljena je dodavanjem 2 \times RT pufera i 20 \times RT enzima u omjeru 10:1, pri čemu je masa dodane RNA u svaku reakciju iznosila 1 μ g. Denaturacija se odvijala pri temperaturi od 95 °C tijekom 5 min, inkubacija pri 37 °C u ukupnom trajanju od 60 min, inaktivacija enzima pri 95 °C tijekom 5 min, a završna inkubacija pri 4 °C. Koncentracija dobivene cDNA iznosila je 50 ng/ μ l. U svaku seriju reverzne transkripcije bile su uključene i dvije kontrole: prva kontrolna reakcija u koju se dodaje uzorak RNA, ali ne i reverzna transkriptaza te druga kontrolna reakcija koja sadrži sve komponente reakcijske smjese, ali ne i uzorak RNA.

Uspješnost reverzne transkripcije provjerena je amplifikacijskom PCR-metodom umnožavajući referetni gen *Actb*. Sastav reakcijske smjese nalazi se u Tablici 6., a uvjeti reakcije u Tablici 7. U svaku seriju reakcija PCR-a bila je uključena i kontrolna reakcija bez cDNA-kalupa (NTC; eng. *no template control*).

Tablica 6. Korišteni reagensi za PCR metodu provjere uspješnosti reverzne transkripcije.

Reagensi za PCR	Volumen (μL)	Koncentracija
H ₂ O bez nukleaza	9,04	
MgCl ₂	0,9	25 mM
PCR pufer II	1,5	
dNTP mješavina	1,2	10 mM
početnice	0,75	10 μM
AmpliTaq™ DNA polimeraza	0,11	5 U/ μL
cDNA	1,5	50 ng/ μL
ukupno	15	

Tablica 7. Uvjeti PCR reakcije za provjeru uspješnosti reverzne transkripcije.

	denaturacija	PCR (35 ciklusa)			završna elongacija
		denaturacija	vezanje početnica	elongacija	
temperatura	95 °C	95°C	59,9 °C	72 °C	72 °C
vrijeme	1 min	28 s	30 s	30 s	5 min

Nakon provedene PCR-reakcije, prisutnost produkata provjerena je elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu, za čiju pripremu je korišteno 0,9 g agaroze, 60 mL TBE pufera i 6 μL SYBR Safe boje. Za nanošenje na gel, 2 μL PCR-produkta pomiješano je s 2 μL 2x BlueJuice pufera za

nanošenje. Elektroforeza se odvijala u trajanju od 30 min pri naponu struje od 80 V. Gel je vizualiziran i fotografiran pod UV svjetlom, gdje jednostruka vrpca na gelu (361 pb) upućuje na uspješno umnažanje cDNA.

3.2.2.6 Optimizacija i validacija parametara qPCR-reakcije

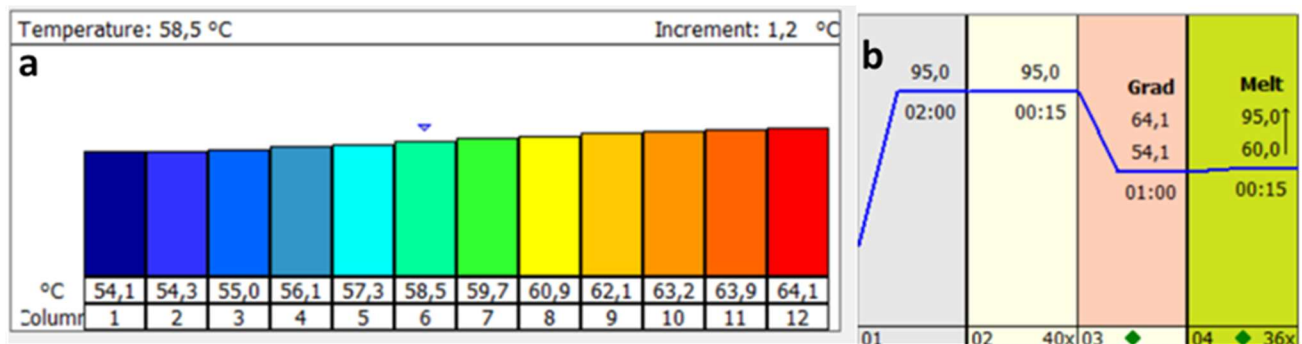
U svrhu uspješnog i pouzdanog provođenja opsežnih qRT-PCR-analiza, redom je testirano i određeno: 1. optimalna temperatura taljenja (T_m), odnosno temperatura pri kojoj se postiže maksimalna specifičnost umnažanja (vidi 3.2.2.6.1.); 2. prag detekcije; 3. učinkovitost umnažanja ciljnih sekvenci pomoću pojedinih parova početnica (vidi 3.2.2.6.2.). U svrhu ujednačavanja eksperimentalnih uvjeta prilikom testiranja navedenih parametara, pripremljena je zajednička radna otopina (eng. *pool*) cDNA koja je korištena u svim reakcijama. Analize su provedene na qPCR uređaju (qTOWER3 touch) koristeći GoTaq® qPCR Master Mix s BRYT® Green I tehnologijom, a priprema reakcijske smjese prikazana je u Tablici 8. Radi verifikacije odsutnosti nespecifične umnažanja ili kontaminacije, za svaki qPCR-eksperiment provedena je i negativna kontrola (NTC).

Tablica 8. Komponente reakcijske smjese za qRT-PCR metodu.

Reagensi za PCR	Volumen (μL)	Koncentracija
GoTaq MasterMix 2x	5	
uzvodna početnica	0,25	10 μM
nizvodna početnica	0,25	10 μM
H ₂ O bez nukleaza	2,5	
cDNA	2	50 ng/ μL
ukupno	10	

3.2.2.6.1 Određivanje optimalne temperature taljenja početnica

Metodom temperaturnog gradijenta, odnosno stupnjevitim porastom temperature u svakoj od jažica istog reda, određivane su optimalne temperature taljenja za svaki od dizajniranih parova početnica. Korišteni raspon temperatura bio je od 54,1 °C do 64,1 °C, s prosječnim porastom temperature za ~1,2 °C u svakoj idućoj jažici (Slika 9a.). Početna inkubacija uzoraka odvijala se 2 min pri 95 °C, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa umnažanja koji su započinjali s 15 sekundi denaturacije pri 95 °C, potom jednominutna inkubacija na 12 različitih temperatura (54,1 °C - 64,1 °C), a po svakom završenom ciklusu očitavala se fluorescencija. Nakon završenog procesa umnažanja, u svrhu potvrde specifičnosti dobivenih produkata, provedena je analiza krivulje taljenja, odnosno mjerenje temperature pri kojoj dvolančana DNA disocira u jednolančanu. Postupak se odvijao u temperaturnom rasponu od 60 °C do 95 °C, uz postupni porast temperature za 1 °C u svakom koraku. Svaki je korak trajao 15 sekundi, čime je omogućena ekvilibracija uzorka i kontinuirano bilježenje fluorescencijskog signala (Slika 9b.).



Slika 9. Uvjeti testiranja temperaturnog gradijenta (a); parametri qPCR metode za određivanje optimalne temperature taljenja (b).

3.2.2.6.2 Određivanje granice detekcije (LOD) i učinkovitosti detekcije

Granica detekcije (LOD) i učinkovitost umnažanja određeni su unutar istog qPCR-eksperimenta korištenjem serije razrjeđenja zbirnog uzorka cDNA (*pool*) početne koncentracije 25 ng/μL.

Razrjeđenja su pripremljena kombinacijom serijskih deseterostrukih razrjeđenja i dodatnih koncentracijskih točaka, kako bi se obuhvatio širi raspon koncentracija relevantan za procjenu učinkovitosti početnica (Tablica 9.).

Tablica 9. Koncentracije cDNA korištene za određivanje granice detekcije (LOD) i procjenu učinkovitosti umnažanja (E).

Oznaka	m_{cDNA} [ng]	c_{cDNA} (radna otopina) [ng/ μ L]	c_{cDNA} (reakcija) [ng/ μ L]	Primjena
C ₁	50	25	5	LOD, E
C ₂	25	12,5	2,5	E
C ₃	5	2,5	0,5	LOD, E
C ₄	2,5	1,25	0,25	E
C ₅	0,5	0,25	0,05	LOD, E
C ₆	0,05	0,025	0,005	LOD
C ₇	0,005	0,0025	0,0005	LOD
C ₈	0,0005	0,00025	0,00005	LOD

*Navedene su masa cDNA po reakciji, koncentracija u radnoj otopini te konačna koncentracija u reakcijskoj smjesi

volumena 10 μ L.

Granica detekcije određena je korištenjem serije deseterostrukih razrjeđenja (C₁, C₃, C₅-C₈) matične otopine cDNA. Serijska razrjeđenja pripremljena su dodavanjem 5 μ L prethodne otopine u 45 μ L vode bez nukleaza, uz kratko vorteksiranje i centrifugiranje nakon svakog koraka. Dodatne koncentracijske točke (C₂ i C₄) pripremljene su razrjeđivanjem 25 μ L radne otopine cDNA u 25 μ L vode bez nukleaza (C₂) te daljnjim razrjeđivanjem 5 μ L dobivene smjese u 45 μ L vode bez nukleaza

(C_4), a služile su za precizniju procjenu linearnosti standardne krivulje u području viših koncentracija. Sve koncentracije analizirane su u triplicatu qPCR metodom, uz uključene negativne kontrole (NTC), pri eksperimentalno određenoj optimalnoj temperaturi taljenja za svaki par početnica. Sastav reakcijske smjese za reakciju qPCR-a naveden je u Tablici 8. Dobivene C_q -vrijednosti (eng. *quantification cycle*; broj ciklusa u kojem se signal prvi put detektira iznad pozadinskog šuma) ucrtane su u odnosu na logaritam koncentracije cDNA te je konstruirana standardna krivulja, čiji je nagib korišten za izračun učinkovitosti umnažanja.

Učinkovitost umnažanja (E) izračunata je na temelju nagiba standardne krivulje i izražena u postocima prema formuli:

$$E = \left(10^{\frac{-1}{\text{nagib}}} - 1 \right) \times 100$$

(2)

Koeficijent determinacije (r^2) korišten je za procjenu linearnosti reakcije te kvantificira povezanost između srednjih vrijednosti C_q i logaritma koncentracije cDNA.

Prema MIQE smjernicama (Bustin i sur., 2009), prihvatljiv raspon učinkovitosti definiran je između 90 % i 110 %, uz $r^2 \geq 0,99$ kao kriterij pouzdane kvantifikacije. Učinkovitost umnažanja smatra se svojstvom pojedinog para početnica te je korištena za validaciju qPCR-sustava. Na temelju dobivene standardne krivulje određen je dinamički raspon reakcije, unutar kojeg je odabrana optimalna količina cDNA za daljnja ispitivanja genske ekspresije, vodeći računa o linearnosti i izbjegavanju inhibicije reakcije pri višim koncentracijama. Granica detekcije definirana je kao najniža koncentracija ciljnog transkripta detektirana u ≥ 95 % tehničkih ponavljanja, u skladu s MIQE smjernicama (Bustin i sur., 2009).

3.2.2.7 Odabir referentnih gena za normalizaciju ekspresije

Odabir referentnih gena za normalizaciju genske ekspresije proveden je na temelju prethodne evaluacije stabilnosti ekspresije potencijalnih gena, detaljno opisane u diplomskom radu

(Petrović, 2023), izrađenom u sklopu ovog istraživanja. U navedenom radu analizirana je stabilnost ukupno deset referentnih gena korištenjem standardnih algoritama za procjenu ekspresijske stabilnosti (NormFinder, qbase+, RefFinder). U svrhu postizanja maksimalne točnosti i pouzdanosti rezultata, a u skladu s MIQE smjernicama koje preporučuju korištenje minimalno tri referentna gena (Bustin i sur., 2010), relativna ekspresija gena od interesa normalizirana je na geometrijsku sredinu triju prethodno validiranih referentnih gena: *Ywhaz*, *Gapdh* i *Pgk1*.

3.2.2.8 qRT-PCR uzoraka guštera

U svrhu relativne ekspresije gena analizirano je ukupno 5 gena od interesa: *5Htr1a*, *5Htr2b*, *MaoA*, *MaoB* i *Tph2*, uz 3 referentna gena: *Ywhaz*, *Pgk1* i *Gapdh*. Uzorci su testirani u triplikatima, kao i zbirni uzorak za normalizaciju te NTC kontrola u svakoj od pločica. Kako bi se izbjegla pristranost i kako bi se uključili uzorci obiju vrsta, oba spola, sa svake lokacije iz obje godine uzorkovanja, nasumičnim odabirom uzorci su raspoređeni u 5 ustaljenih grupa (po jedna grupa za svaku pločicu) i tim redoslijedom bili analizirani za svaki od navedenih gena. Za svaku pločicu pripremljena je reakcijska smjesa koja je uključivala par početnica za testirani gen, uz dodatak 12,5 ng cDNA, odnosno 2,5 ng/ μ L cDNA po reakciji (Tablica 8.). Početna inkubacija odvijala se pri 95 °C tijekom 2 min, nakon čega je uslijedilo 40 ciklusa denaturacije pri 95 °C kroz 15 s te vezanja i umnažanja pri optimalnoj temperaturi za pojedini par početnica tijekom 1 min, nakon čega se očitavala fluorescencija. Po završenom ciklusu umnažanja, mjerena je krivulja taljenja u rasponu temperatura od 60 °C do 95 °C, gdje je svakih 15 sekundi temperatura porasla za 1 °C.

3.2.2.9 Statistička obrada rezultata

Podaci analiza HPLC-MS/MS prikupljeni su pomoću softvera Agilent ChemStation 10 (Santa Clara, CA, SAD) te analizirani u programima Microsoft Excel 365 (Redmond, WA, SAD), R programom (verzija 4.2; R Core Team, Beč, Austrija) i GraphPad Prism 10.4.1 (San Diego, CA, SAD). Podaci genske ekspresije dobiveni qPCR-mjerenjima prikupljeni su i obrađeni pomoću softvera qPCRsoft

4.1 (Analytik Jena AG, Jena, Njemačka) te analizirani u programima Microsoft Excel 365 (Redmond, WA, SAD) i GraphPad Prism 10.4.1 (San Diego, CA, SAD).

U programu R, izmjerene razine analita inicijalno su testirane za normalnost raspodjele, a prema potrebi primijenjene su Box-Cox transformacije. Učinci vrste, spola, lokacije i njihovih interakcija preliminarno su ispitani multivarijatnom analizom varijance (MANOVA). Budući da nije utvrđen statistički značajan učinak lokacije, daljnje analize razina monoamina, a potom i genske ekspresije, provedene su dvosmjernom analizom varijance (ANOVA) u programu GraphPad Prism 10.4.1, bez uključivanja tog čimbenika. Prije provedbe statističkih analiza, odstupajuće vrijednosti (eng. *outliers*) identificirane su primjenom ROUT testa (Q=1%) te isključene iz daljnjih analiza. Raspodjela podataka testirana je Kolmogorov-Smirnovljevim testom, a radi postizanja normalne raspodjele, a podaci o razinama monoamina, njihovih prekursora i metabolita te relativnoj ekspresiji gena log-transformirani su radi postizanja normalne raspodjele. Učinci vrste i spola te njihove interakcije na razine monoamina, njihovih prekursora metabolita te na relativnu ekspresiju analiziranih gena procijenjeni su dvosmjernom analizom varijance u programu GraphPad Prism 10.4.1. Za naknadne usporedbe (*post-hoc*) korišten je Tukeyjev test. Povezanost između vrijednosti varijabli razina monoamina i ekspresije gena testirana je Spearmanovim koeficijentom korelacije. Rezultati su bili prihvaćeni kao statistički značajni pri vrijednosti $p < 0,05$.

4 REZULTATI

4.1 Prikupljanje životinja i uzoraka tkiva

U dvije uzastopne godine uspješno je prikupljeno ukupno 240 jedinki guštera (120 po godini). Sukladno planu istraživanja, svake godine je ulovljeno po 10 mužjaka i 10 ženki vrste *Podracis siculus* (PS) te po 10 mužjaka i 10 ženki vrste *Podarcis melisellensis* (PM) na svakoj od lokacija (Knin, Pag, Sinj). Životinje su nakon ulova uspješno transportirane i održavane u kontroliranim uvjetima nastambe Zavoda za animalnu fiziologiju. U tromjesečnom razdoblju koje je uslijedilo, inicijalnih mjesec dana bilo je predviđeno za aklimatizaciju na nove uvjete nastambe, nakon čega su uslijedili testovi ponašanja. Kako bi se izbjegao utjecaj akutnog stresa na fiziološke parametre, bihevioralna testiranja dovršena su najkasnije dva tjedna prije žrtvovanja jedinki. U obje godine prikupljanja tkivnih uzoraka uspješno su prikupljeni svi uzorci mozga guštera. S obzirom na to da je 7 jedinki uginulo prirodnom smrću prije planiranog uzorkovanja, ukupno su izolirana 233 mozga. Dio uzoraka moždanog tkiva koristio se za optimizaciju i razvoj kromatografskih metoda, a dio za histološku analizu (nije uključeno u ovo istraživanje). Za potrebe kromatografskih analiza korišteno je 137 uzoraka lijeve polutke mozga (prosječna masa 20.07 ± 4.86 mg). Za potrebe molekularnih analiza korišteni su uzorci u kojima je prethodno izmjerena razina monoamina metodom HPLC-MS/MS; ukupno 131 uzorak desne moždane polutke (prosječna masa $19,9 \pm 5,42$ mg). Zbog pogreške u skladištenju, točnije isparavanja tekućeg dušika u kojem su izdvojene moždane polutke bile pohranjene prije izolacije RNA, za šest uzoraka analiziranih metodom HPLC-MS/MS nije bio dostupan materijal za molekularne analize. Nakon kromatografskih analiza, pet uzoraka identificirano je kao odstupajuće vrijednosti (eng. *outliers*) jer su za sve analizirane spojeve pokazivali izrazito više ili niže vrijednosti u odnosu na ostale uzorke. Navedene jedinice isključene su iz daljnje statističke obrade, što je rezultiralo konačnim brojem od 132 analizirana uzorka: 28 ženki i 39 mužjaka vrste PM te 30 ženki i 35 mužjaka vrste PS. U molekularnim analizama identificirani su dva uzorka s odstupajućim mjerenjima, te za daljnje statističke analize korišteno je ukupno 129 uzoraka (PM: 29 ženki, 34 mužjaka; PS: 29 ženki, 37 mužjaka).

4.2 Razvoj kromatografskih metoda za razdvajanje katekolamina

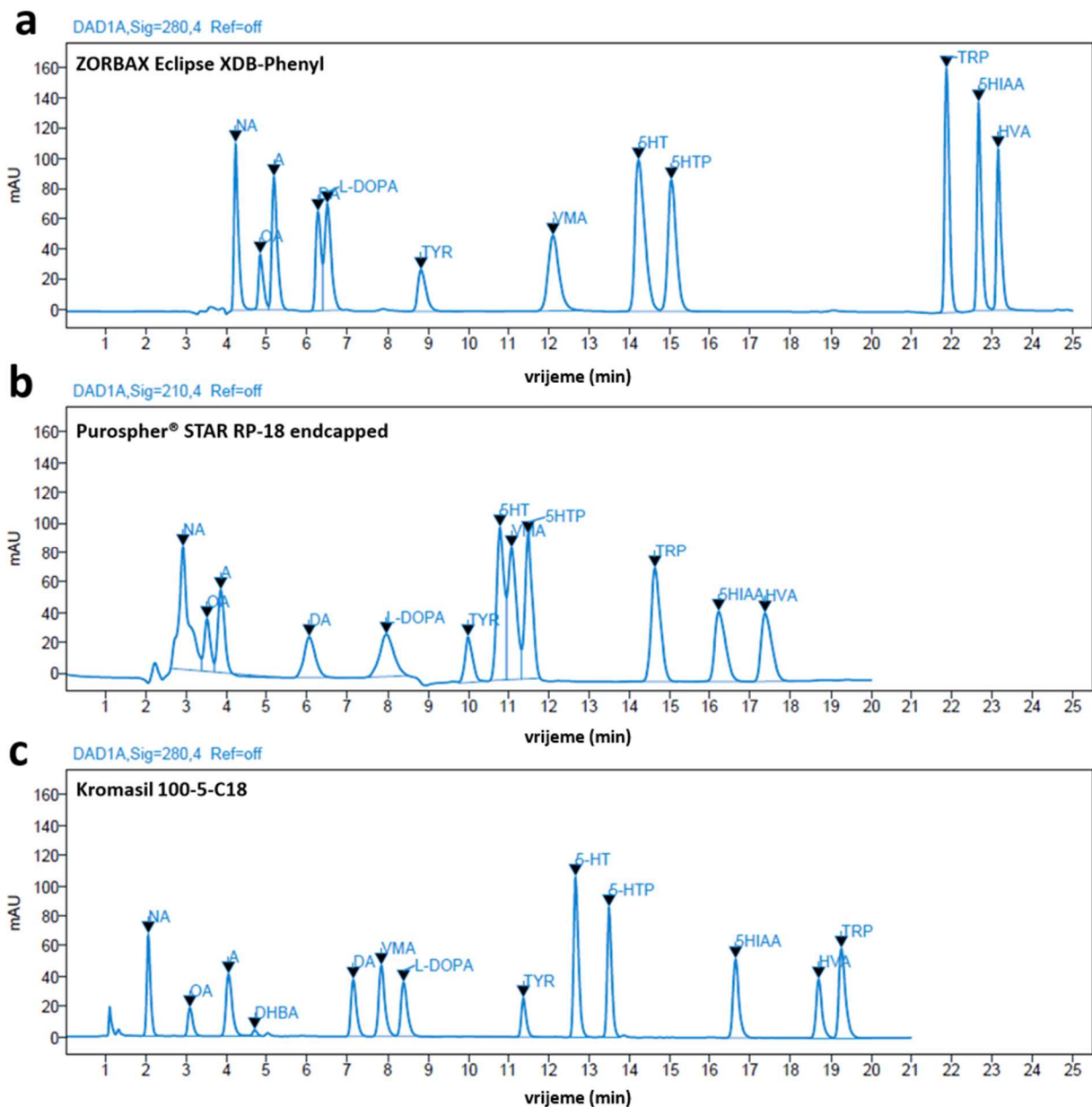
4.2.1 HPLC-DAD-FLD metoda

U cilju razvoja HPLC-DAD-FLD metode za učinkovito razdvajanje katekolamina i pripadajućih metabolita ispitani su različiti kromatografski uvjeti koji su ključni za dobivanje visoke osjetljivosti, dobre rezolucije i pouzdanosti, s obzirom na njihovu polarnost i niske koncentracije u kompleksnim biološkim uzorcima. Ispitani kromatografski uvjeti uključivali su:

- Vrsta kolone i separacije:
 - ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm) sa ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (5 μ m, 12.5 mm \times 4.6 mm) pretkolonom (Slika 10a.)
 - Purospher® STAR RP-18 endcapped (3 μ m, 55 mm \times 4 mm) kolona (Slika 10b.)
 - Kromasil 100-5-C18 (5 μ m 150 mm \times 4.6 mm) s Kromasil 100-5-C18 (5 μ m, 12.5 mm \times 4.6 mm) pretkolonom (Slika 10c.)
- Sastav mobilne faze:
 - Organski modifikatori: ispitan je utjecaj 100% acetonitrila (Slika 11a.) i 100% metanola (Slika 11b.).
 - Vodena faza i pH: za postizanje optimalne ionizacije i retencije ispitane su mravlja kiselina (HCOOH), fosforna kiselina (H₃PO₄) i trifluorooctena kiselina (TFA) u pH rasponu od 2,0 do 3,0; organska faza sastojala se od 100% acetonitrila (Slika 12.).
- Ostali uvjeti: Protok mobilne faze (0,20–1,5 mL/min), volumen injektiranja (10–100 μ L) i temperatura kolone (sobna ili 22°C) su optimizirani radi postizanja bolje učinkovitosti.

Prva testirana kolona bila je ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (5 μ m, 150 mm \times 4.6 mm), sa ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (5 μ m, 12.5 mm \times 4.6 mm) pretkolonom (Slika 10a.). Ova kolona nije se pokazala pogodnom pošto su vrhovii DA i L-DOPA na kromatogramu koeluirali pa učinkovita separacija analita od interesa niti odgovarajuća rezolucija nisu bile postignute. Kako bi se razriješio problem koelucije vrhova DA i L-DOPA, testirana je Purospher® STAR RP-18 endcapped (3 μ m, 55

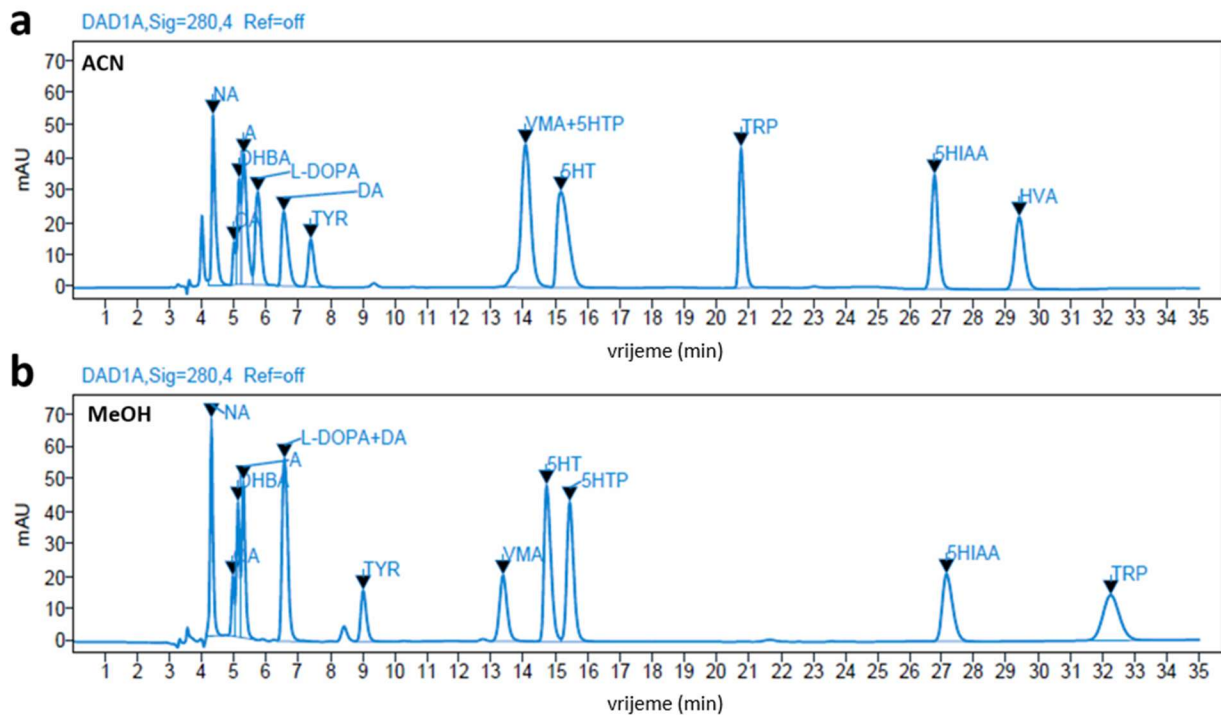
mm × 4 mm) kolona pogodna upravo za eluciju dva navedena spoja (Slika 10b.). Iako su korištenjem ove kolone DA i L-DOPA uspješno razdvojeni, došlo je do koelucije triju drugih spojeva – 5HT, VMA i 5HTP. Kako bi se izbjegla potreba za primjenom dviju različitih kromatografskih kolona i metoda za analizu istog uzorka, testirana je i treća kolona, Kromasil 100-5-C18 (5 µm 150 mm × 4.6 mm) s pripadajućom Kromasil 100-5-C18 (5 µm, 12.5 mm x 4.6 mm) pretkolonom, kojom su uspješno razdvojeni i detektirani vrhovi svih 11 analita i internih standarada (Slika 10c.).



Slika 10. Reprezentativni kromatogrami smjese standarada dobiveni na različitim analitičkim kolonama: ZORBAX Eclipse XDB Phenyl (a), Purospher® STAR RP-18 endcapped (b) i Kromasil 100-5-C18 (c).

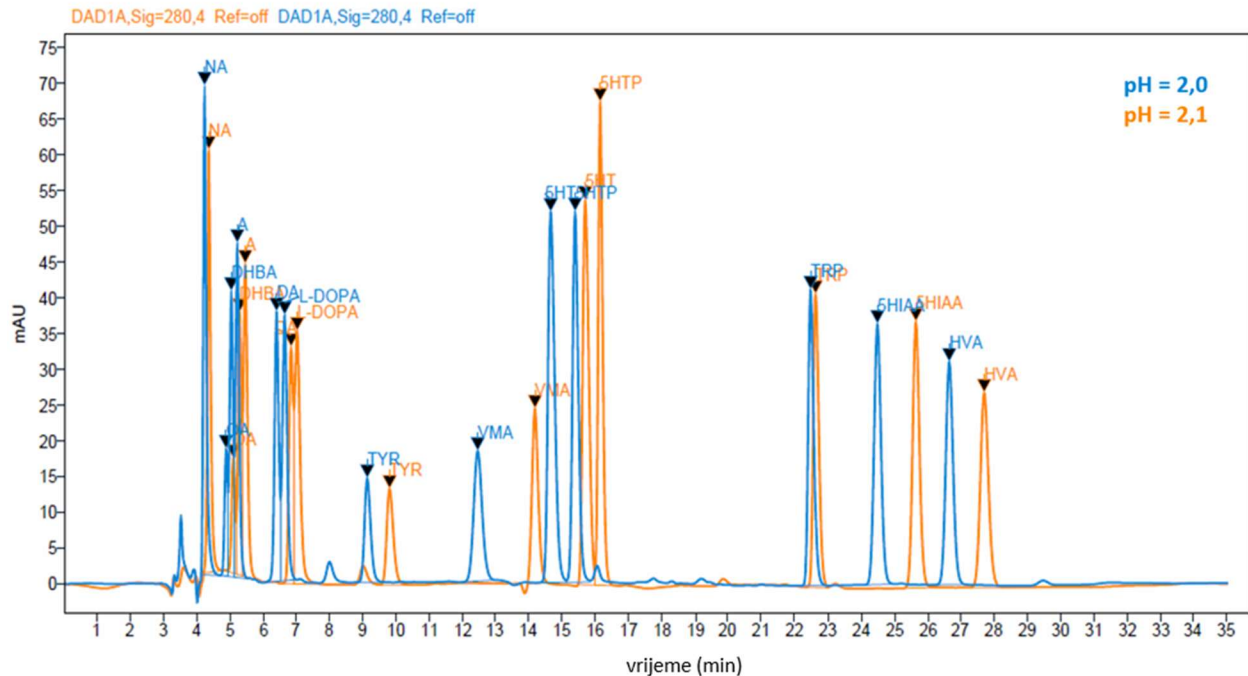
Tijekom razvoja metode, mijenjan je i sastav mobilne faze. Testirane su različite organske faze – acetonitril (ACN; Slika 11a.) i metanol (MeOH; Slika 11b.), pri čemu se primjenom ACN-a postiglo bolje razdvajanje vrhova. Kao vodena faza, testirane su mravlja kiselina (HCOOH), fosforna

kiselina (H_3PO_4) i trifluorooctena kiselina (TFA) u različitim postotcima (0,043-1,35%). Najbolje razdvajanje postignuto je s 0,1% TFA.



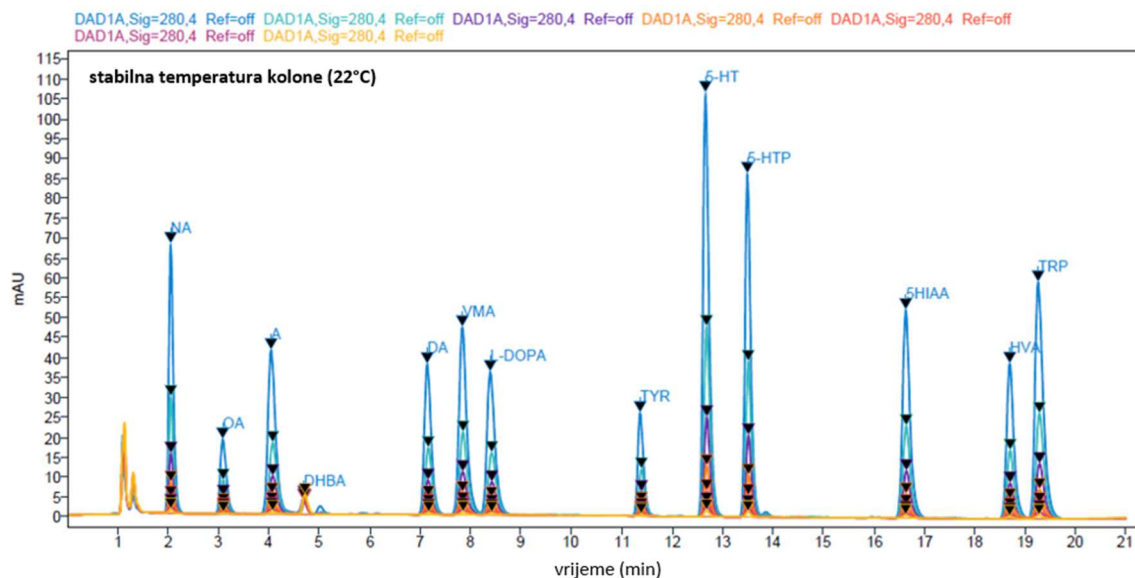
Slika 11. Reprezentativni kromatogrami smjese standarada dobiveni korištenjem različitih organskih faza: acetonitrilom, ACN (a) i metanolom (MeOH) (b).

Ispitivanje pH vrijednosti mobilne faze (2,0–3,0) pokazalo je da čak i minimalne promjene pH (razlika od 0,1) drastično mijenjaju vrijeme zadržavanja analita na koloni. Najpovoljnijom se pokazala vrijednost pH 2,0 (Slika 12.). Pri ovoj vrijednosti, analiti se nalaze u obliku koji je manje topljiv u vodi pa se posljedično jače vežu za nepolarnu stacionarnu fazu kolone (C18). Zbog te jače povezanosti, spojevi se sporije ispiru (veća retencija), što je ključno za njihovo potpuno razdvajanje i veću kemijsku stabilnost tijekom same analize.



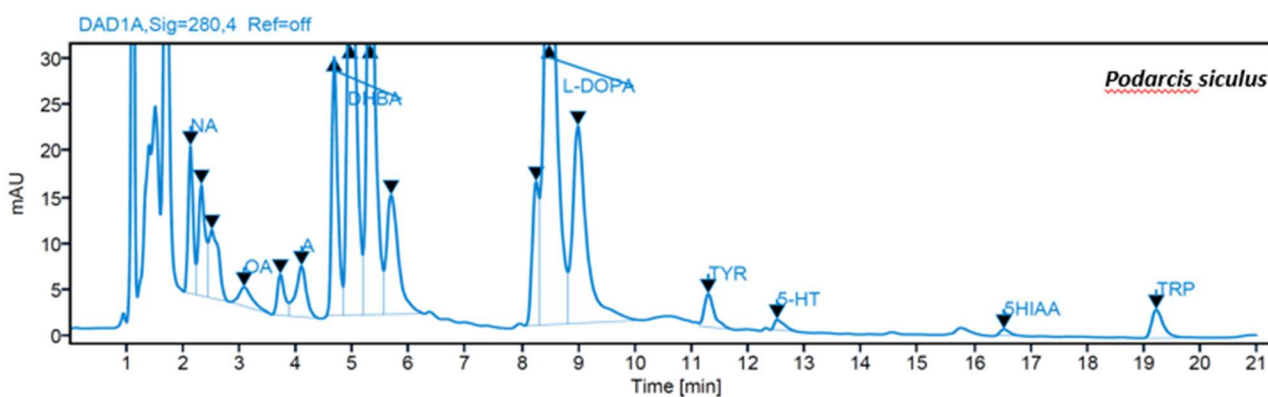
Slika 12. Preklopljeni kromatogrami smjese standarada analiziranih pri različitim pH vrijednostima mobilne faze (plavo: pH =2,0; narančasto: pH = 2,1).

Promjene temperature kolone također su utjecale na retenciju i selektivnost, a najbolja stabilnost postignuta je pri 22°C. U ispitanom rasponu protoka (0,20-1,5 mL/min), najboljom se pokazala brzina 1,5 mL/min. Među različitim testiranim volumenima injektiranja (10-100 µL), ono od 100 µL omogućilo je najbolje detektiranje vrhova analita. Mijenjanjem omjera organske faze, razvijena je gradijentna metoda s trajanjem analize od 21 min (+1 min *post run*). Odabrani kromatografski parametri, odnosno uvjeti pod kojima je rezolucija i izgled vrhova bio zadovoljavajući prema kriterijima za validaciju analitičke metode, nalaze se u Tablici 3. Učinkovitost optimizirane metode i separacija ciljnih analita kroz raspon koncentracija vidljiva je na reprezentativnom kromatogramu standardnih otopina (Slika 13.).



Slika 13. Preklapljeni kromatogrami smjesa standardnih otopina analita 7 različitih koncentracija (1,56-100 μ M) razdvojenih prema metodi iz Tablice 3. Preuzeto iz Šikić i sur. (2022).

Iako su optimizirani uvjeti omogućili uspješno razdvajanje analita od interesa i IS, HPLC-DAD-FLD metoda ipak se nije pokazala prikladnom za analizu uzoraka tkiva mozga guštera – razdvajanje eluenta koji imaju kraće zadržavanje na koloni (0-5 min) pokazalo se nedovoljno učinkovitim, u regiji 5-7 min vidljivo je preklapanje vrhova, pri čemu se pretpostavlja da su DA i L-DOPA ponovo koeluirali (Slika 14.).



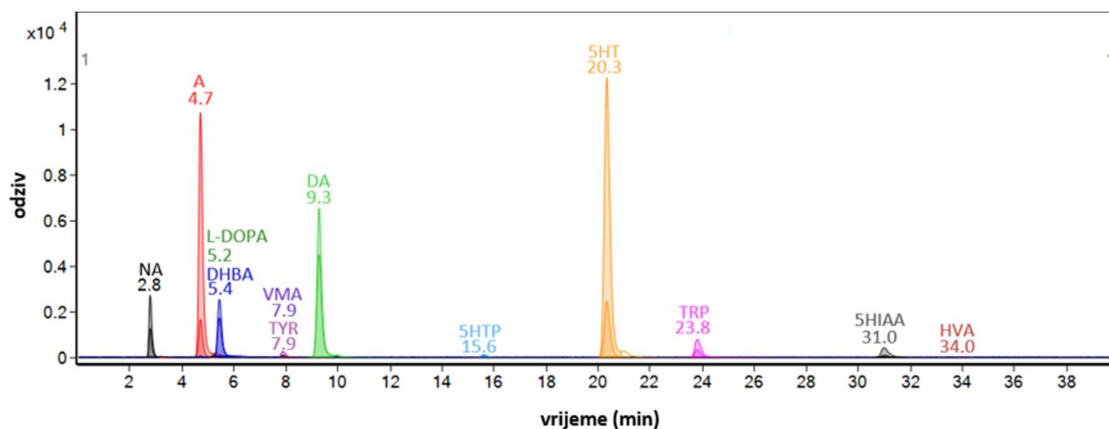
Slika 14. Reprezentativni kromatogram uzorka tkiva mozga guštera *P. siculus*.

Zbog premalog ukupnog volumena uzorka (<150 μL) i općenito vrlo niske koncentracije ovih analita u biološkim matricama (mozak), razvijena HPLC-DAD-FLD metoda zahtijevala je prijenos na osjetljiviji spregnuti kromatografski sustav (HPLC-MS/MS).

4.2.2 Transfer metode na HPLC-MS/MS uređaj

S obzirom na to da su koncentracije pojedinih analita u biološkim uzorcima bile izvan linearnog (validiranog) raspona te ispod granice kvantifikacije (LOQ) i detekcije (LOD) prethodno razvijene HPLC-FLD-DAD metode, bilo je nužno provesti optimizaciju i transfer metode na spregnuti kromatografski sustav veće osjetljivosti - tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti spregnutu s masenom spektrometrijom (HPLC-MS/MS). Tijekom transfera metode, sastav mobilne faze prilagođen je zahtjevima MS detektora kako bi se osigurala optimalna ionizacija analita i kompatibilnost s izvorom iona (eng. *ion source*). Odabran je sljedeći sastav mobilnih faza: mobilna faza A - 5 mM amonijev formijat u ultra čistoj H_2O , uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline (v/v); mobilna faza B - 5 mM amonijev formijat u ACN/ H_2O (95:5; v/v), uz dodatak 0,1 % mravlje kiseline (v/v). MRM prijelazi i optimizirani parametri korišteni u analizi prikazani su u Tablici 4.

Kromatografski uvjeti su dodatno optimizirani radi postizanja bolje rezolucije analita i stabilnosti signala. Protok mobilne faze smanjen je s izvornih 1,5 mL/min na 0,8 mL/min. Sukladno smanjenju protoka, vrijeme analize produženo je s 21 min (+1 min *post run*) na ukupno 40 min (+5 min *post run*). Volumen injektiranja smanjen je sa 100 μL na 20 μL , kako bi se izbjeglo preopterećenje kolone i ionizacijskog izvora. Opisanim promjenama kromatografskih uvjeta postignuti su uvjeti za pouzdanu detekciju i kvantifikaciju svih ciljanih monoamina i njihovih metabolita. Na Slici 15. prikazan je reprezentativni kromatogram sa svih 11 analita i IS-om.



Slika 15. Reprezentativni kromatogram koji prikazuje preklopljene kvantifikacijske i kvalifikacijske prijelazne mase (MRM), te vremena zadržavanja svih analita: noradrenalin (NA), adrenalin (A), L-3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA), vanililmandelska kiselina (VMA), tirozin (TYR), dopamin (DA), 5-hidroksitriptofan (5HTP), serotonin (5HT), L-triptofan (TRP), 5-hidroksiindoleacetatna kiselina (5-HIAA), homovanilinska kiselina (HVA) i 3,4-dihidroksibenzilamin hidrobromid (DHBA) kao unutarnji standard (IS) u standardnoj smjesi ($c=0,125 \mu\text{g/mL}$).

4.2.3 Validacija HPLC-MS/MS metode

Validacija analitičke metode za određivanje monoamina u uzorcima mozga guštera provedena je u skladu sa smjernicama ICH M10 i EMA za validaciju bioanalitičkih metoda (EMA, 2011; ICH M10, 2022). Procijenjeni su parametri selektivnosti, prijenosa analita (eng. *carry-over*), učinka matrice, linearnosti, točnosti, preciznosti, ekstrakcijskog prinosa i stabilnosti metode. Budući da su pojedini validacijski parametri procjenjivani u standardnim otopinama, a pojedini u stvarnim biološkim uzorcima mozga guštera, dio rezultata procjenjivan u uzorcima standardnih otopina prikazan je za 11 ciljanih analita, dok su parametri koji uključuju analizu biološkog matriksa prikazani za 7 kvantificiranih analita.

4.2.3.1 Selektivnost

Metoda je pokazala visoku razinu selektivnosti, što je potvrđeno stabilnim omjerom površina kvantifikacijskih i kvalifikacijskih MRM (eng. *multiple reaction monitoring*) prijelaza u analiziranim uzorcima. Relativna standardna devijacija (RSD) za sve analite iznosila je $\leq 14,9\%$ (N=42), što u potpunosti zadovoljava kriterij prihvatljive varijabilnosti od RSD $< 15\%$ za biološke matrice.

4.2.3.2 Prijenos analita

Prijenos ciljnih spojeva (eng. *carry-over*) nije zabilježen. Analizom prazanih (*blank*) uzorka, injektiranog neposredno nakon standardne otopine najviše koncentracije, potvrđeno je odsustvo signala na karakterističnim retencijskim vremenima analita i unutarnjeg standarda (IS).

4.2.3.3 Učinak matrice

Učinak matrice procijenjen je kao zanemariv (odstupanje površine vrha-3,9%). Varijabilnost površine vrhova IS-a u uzorcima moždanog tkiva guštera (n=137; RSD=28,0%) u usporedbi sa standardnim otopinama (n=22; RSD=9,2%), upućuje na određenu varijabilnost ionske signalizacije u biološkim uzorcima tkiva. Stvarna osjetljivost analita na učinak matrice može se razlikovati od one na IS zbog različitih retencijskih vremena i osjetljivosti na ionske smetnje. Stoga je uočena nestabilnost MS signala između različitih dana provođenja analiza, korigirana primjenom vanjskog standarda (ES), odnosno otopine svih analita poznate koncentracije analizirane unutar istog analitičkog niza kao i uzorci, čime su rezultati dodatno standardizirani. Na ovaj način korigirano je i instrumentalno odstupanje između analiza.

4.2.3.4 Linearnost i granice kvantifikacije

Linearnost metode potvrđena je za sve analite u rasponu $0,005\text{--}1,000\ \mu\text{g mL}^{-1}$, s koeficijentom determinacije $R^2 > 0,99$. Granice kvantifikacije (LOQ) određene su pri omjeru signal/šum ($S/N \geq 10$). Detaljan pregled LOQ vrijednosti i izmjerenih koncentracijskih raspona u 12 reprezentativnih uzoraka mozga guštera, prikazani su u Tablici 10.

Tablica 10. Rezultati linearnosti metode.

Analit	Linearni raspon (LLOQ-ULOQ), $\mu\text{g mL}^{-1}$	LOQ, $\mu\text{g mL}^{-1}$; S/N	Koncentracija u uzorcima (N = 12), $\mu\text{g mL}^{-1}$
A	0.005 – 0.500	<0.005; 436.4	0.044 – 0.457
DA	0.005 – 1.000	<0.005; 152.6	0.011 – 0.075
L-DOPA	0.005 – 0.750	<0.005; 24.7	<0.005
5-HIAA	0.005 – 0.750	<0.005; 54.4	0.160 – 0.792
5HT	0.005 – 1.000	<0.005; 654.3	0.024 – 0.289
5HTP	0.005 – 1.000	<0.005; 41.4	<0.005
HVA	0.125 – 0.750	0.125; 14.0	<0.005
NA	0.005 – 0.500	<0.005; 111.3	<0.005 – 0.015
TRP	0.005 – 0.750	<0.005; 41.3	0.314 – >1.000
TYR	0.005 – 1.000	<0.005; 26.8	>1.000
VMA	0.005 – 1.000	<0.005; 31.3	<0.005

LLOQ – donja granica kvantifikacije (eng. *lower limit of quantitation*); **ULOQ** – gornja granica kvantifikacije (eng. *upper limit*

of quantitation); **LOQ** – granica kvantifikacije (eng. *limit of quantitation*); **S/N** – omjer signal/šum (eng. *signal-to-noise*)

4.2.3.5 Točnost i preciznost

Kako bi se smanjio utjecaj varijabilnosti analitičkog postupka, primijenjene su korekcije pomoću internog (IS) i vanjskog standarda (ES), uz primjenu metode dodatka standarda. Rezultati potvrđuju da je nakon korekcije pomoću IS i ES postignuta zadovoljavajuća točnost (Tablica 11.), uz odstupanje od nominalne koncentracije unutar $\pm 15\%$.

Tablica 11. Odstupanje izmjerene razine (%) u odnosu na nominalnu vrijednost primjenom različitih modela korekcije unutarnjim i vanjskim standardom.

Analit	Odstupanje, %			
	Dodatak standarda, IS-korigiran	Dodatak standarda, IS i ES-korigiran	Kalibracija, bez korekcije	Kalibracija, IS-korigirana
A	-10.563	-10.558	-26.021	12.824
DA	0.438	0.427	-25.720	-6.093
5-HIAA	1.778	1.785	-0.631	24.418
5HT	-8.281	-8.282	-8.044	29.340
NA	1.384	1.389	-29.971	-10.858
TRP	6.680	6.675	51.847	84.564
TYR	14.944	14.943	915.696	1035.832

IS – unutarnji standard; ES – vanjski standard

Korekcija IS i ES nije značajno utjecala na preciznost metode (RSD<15%; Tablica 12.), što potvrđuje da korekcije nisu uvele dodatnu pogrešku. Na temelju opisanih rezultata, IS i ES-korekcija usvojene su kao standardni postupak za kvantifikaciju odabranih analita u uzorcima mozga guštera.

Tablica 12. Rezultati preciznosti metode (RSD, %) dobiveni analizom smijese tri različita uzorka mozga guštera u tri tehnička ponavljanja unutar jednog (N=9) i između dva dana (N=18).

Analit	Bez korekcije			IS-korigirano			IS i ES-korigirano		
	dan 1	dan 2	između dana	dan 1	dan 2	između dana	dan 1	dan 2	između dana
A	10.9	10.8	10.5	8.8	9.1	8.7	9.0	8.5	8.5
DA	7.8	8.2	7.8	8.3	8.9	8.3	7.8	10.5	9.1
5-HIAA	1.5	1.4	1.4	3.6	3.9	3.6	4.8	6.6	5.7
5HT	3.7	3.7	3.6	4.1	4.2	4.0	3.3	4.2	3.9
NA	4.6	4.6	4.5	5.3	5.5	5.2	4.6	4.6	4.6
TRP	3.6	3.6	3.5	6.0	6.2	5.9	4.8	6.3	5.5
TYR	7.7	7.7	7.4	10.3	10.4	10.1	7.2	8.5	7.7

Točnost i preciznost vanjskih standarada analiziranih unutar jednog dana (eng. *intra-day precision*) i između različitih dana (eng. *inter-day precision*) bile su unutar prihvatljivih granica za

većinu analita od interesa (RSD<15%, odstupanje unutar $\pm 15\%$), osim za HVA i VMA (Tablica 13.). Iako su se L-DOPA i 5HTP u ovom slučaju nalazili unutar prihvatljivih granica, u biološkim uzorcima mjerenja ovih spojeva bila su ispod granice kvantifikacije (LOQ) (Tablica 10.). Iz navedenih razloga HVA, VMA, L-DOPA i 5HTP nisu uključeni u statističku obradu i interpretaciju.

Tablica 13. Preciznost i točnost ES analiziranog unutar jednog dana (N=3) i između 3 dana (N=9).

Analit	Unutar dana		Među danima	
	odstupanje, %	RSD, %	odstupanje, %	RSD, %
A	3.6	2.5	9.2	7.1
DA	9.5	3.5	13.9	4.1
L-DOPA	10.1	11.8	12.4	9.4
5-HIAA	4.5	6.4	6.2	5.3
5HT	11.3	0.6	9.6	3.3
5HTP	10.3	4.8	14.6	4.7
HVA	5.5	16.4	13.5	20.2
NA	3.3	1.8	6.1	3.5
TRP	10.3	3.3	8.0	3.5
TYR	5.3	4.7	2.7	5.4
VMA	4.7	15.8	21.0	13.6

RSD – relativna standardna devijacija

4.2.3.6 Stabilnost i ekstrakcijski prinos

Prinos svih analita u uzorku ES pohranjenom u automatskom uzorkivaču pri 4 °C tijekom sedam dana bio je iznad 91,0%, što ukazuje na stabilnost otopine u opisanim uvjetima pohrane. Slični rezultati dobiveni su i za uzorke tkiva mozga; nakon jednog ciklusa smrzavanja i odmrzavanja (sobna temperatura, 3 h), prinos analita bio je iznad 92,7 %, što potvrđuje stabilnost ciljnih spojeva u biološkoj matrici. Ekstrakcijski prinos (iskorištenje) svih analita, osim 5-HIAA, bio je iznad 90% uz prihvatljivu ponovljivost (RSD<12,6%) (Tablica 14.). Unatoč potvrđenoj stabilnosti, preporučeno je provođenje analize neposredno nakon pripreme uzoraka, zbog poznate kemijske osjetljivosti monoamina (Bicker i sur., 2013).

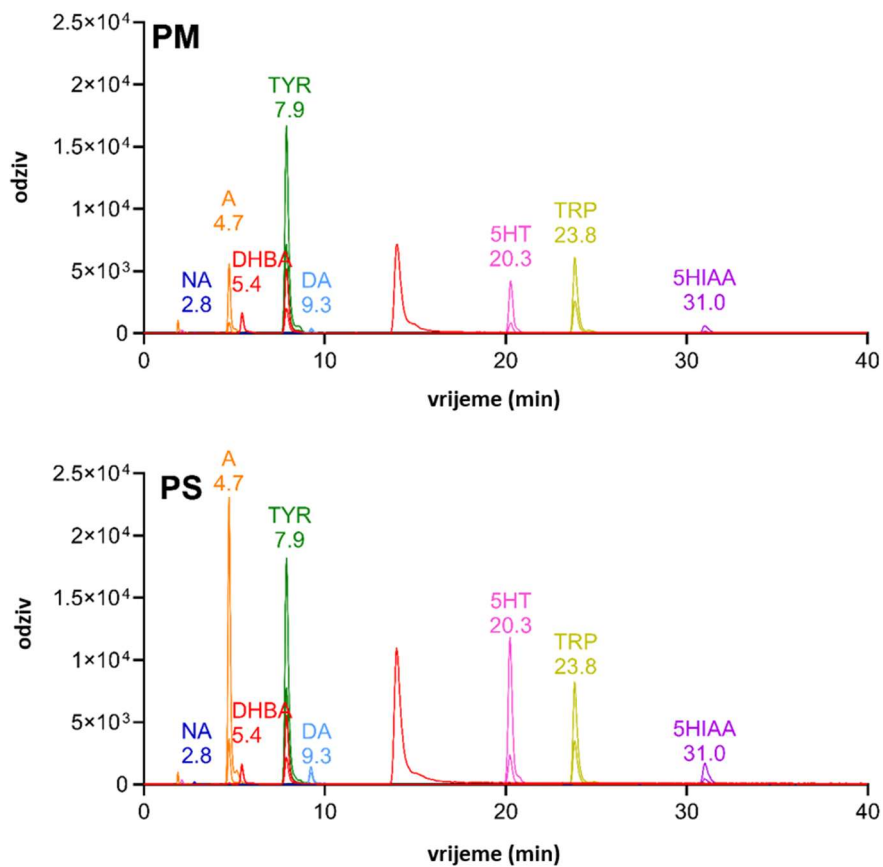
Tablica 14. Srednje vrijednosti ekstrakcijskog prinosa svih analita pri različitim razinama koncentracije.

Analit	Niska koncentracija		Srednja koncentracija		Visoka koncentracija	
	ER, %	RSD, %	ER, %	RSD, %	ER, %	RSD, %
	A	109.5	4.3	84.0	11.5	94.4
DA	92.4	6.4	93.1	0.2	99.5	0.2
DHBA	86.5	3.6	92.5	3.2	96.3	4.2
L-DOPA	86.2	2.9	92.5	5.6	98.8	0.2
5-HIAA	64.6	0.9	79.3	2.8	71.4	1.5
5HT	95.8	4.7	93.4	1.3	99.0	0.8
5HTP	80.9	6.3	98.4	1.9	98.3	0.8
HVA	ND	ND	105.1	8.9	92.9	6.5
NA	92.1	4.0	92.0	4.8	99.9	0.6
TRP	110.3	5.4	98.2	1.7	98.8	0.8
TYR	113.3	3.4	100.1	2.3	98.8	1.3
VMA	116.8	17.3	101.1	6.8	100.5	2.3

ER – ekstrakcijski prinos (eng. *extraction recovery*); RSD – relativna standardna devijacija

4.3 Razine monoamina u uzorcima mozga guštera izmjerene HPLC-MS/MS metodom

Novorazvijena HPLC-MS/MS metoda uspješno je primijenjena za kvantifikaciju spojeva uključenih u biosintetske i metaboličke puteve monoamina u uzorku tkiva mozga guštera vrsta PS i PM. Svi uzorci lijeve polutke mozga uspješno su obrađeni prema razvijenom i optimiziranom protokolu za ekstrakciju. Identifikacija pojedinih spojeva, točnije površine vrhova, temeljila se na usporedbi retencijskog vremena i karakterističnih MRM prijelaza specifičnih za svaki analit. Uspješno su detektirani i izmjereni A, DA, 5-HIAA, 5HT, NA, TRP, TYR i DHBA (IS) (Slika 16.). Srednje vrijednosti razina analita s obzirom na vrstu i spol prikazane su u Tablici 15., dok su u nastavku detaljno opisane utvrđene statistički značajne razlike i interakcije.



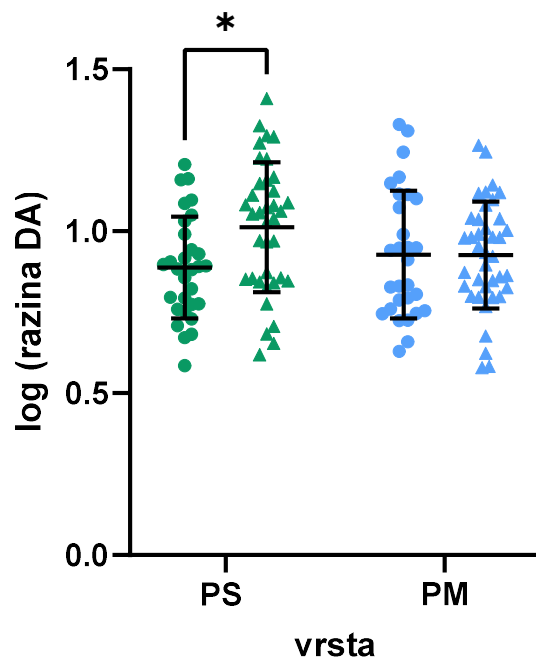
Slika 16. Reprezentativni kromatogrami preklopljenih kvantifikacijskih i kvalifikacijskih prijelaza te vremena zadržavanja (min) detektiranih analita u uzorcima mozga guštera vrsta *Podarcis melisellensis* (PM) i *Podarcis siculus* (PS). Označeni vrhovi predstavljaju ciljane analite, dok neoznačeni vrhovi predstavljaju nespecifične signale matriksa koji nisu uključeni u kvantifikaciju.

Tablica 15. Razine (srednja vrijednost \pm SD) monoamina izražena u arbitrarnim jedinicama, prekursora i metabolita u tkivu mozga vrsta *Podarcis melisellensis* i *Podarcis siculus* ovisno o spolu, uključujući broj uzoraka (N).

analit	<i>Podarcis melisellensis</i>				<i>Podarcis siculus</i>			
	ženke	N	mužjaci	N	ženke	N	mužjaci	N
TYR	4876 \pm 1576	29	5010 \pm 1773	39	4776 \pm 2057	30	5470 \pm 1546	38
TRP	492,8 \pm 172,0	29	494,5 \pm 172,9	39	532,1 \pm 195,1	30	658,1 \pm 164,7	38
DA	9,409 \pm 4,688	29	9,041 \pm 3,416	39	8,239 \pm 3,154	30	11,37 \pm 5,159	37
NA	3,517 \pm 2,054	27	3,319 \pm 1,239	37	3,292 \pm 1,595	28	4,641 \pm 2,466	36
A	97,86 \pm 46,44	29	96,39 \pm 51,38	39	73,14 \pm 30,60	30	91,41 \pm 43,10	38
5HT	27,97 \pm 18,47	28	26,06 \pm 12,88	39	25,09 \pm 15,25	30	38,29 \pm 20,88	37
5-HIAA	122,4 \pm 41,51	29	123,5 \pm 39,34	39	155,2 \pm 72,86	30	157,5 \pm 58,10	37

Multivarijatna analiza varijance (MANOVA), koja je uključivala sve analite, pokazala je značajan utjecaj čimbenika vrste ($p < 0,001$), dok glavni učinci spola ($p = 0,111$), lokacije ($p = 0,154$) te interakcije vrste i spola ($p = 0,102$) nisu značajno utjecali na multivarijatni odgovor. Budući da učinak lokacije nije bio statistički značajan, taj čimbenik nije uključen u daljnje pojedinačne analize. S druge strane, spol je zadržan kao čimbenik u daljnjim statističkim analizama zbog njegove biološke relevantnosti i mogućeg utjecaja na pojedinačne analite. Naknadne dvofaktorske analize varijance (ANOVA), provedene su zasebno za svaki analit te su pokazale specifične obrasce.

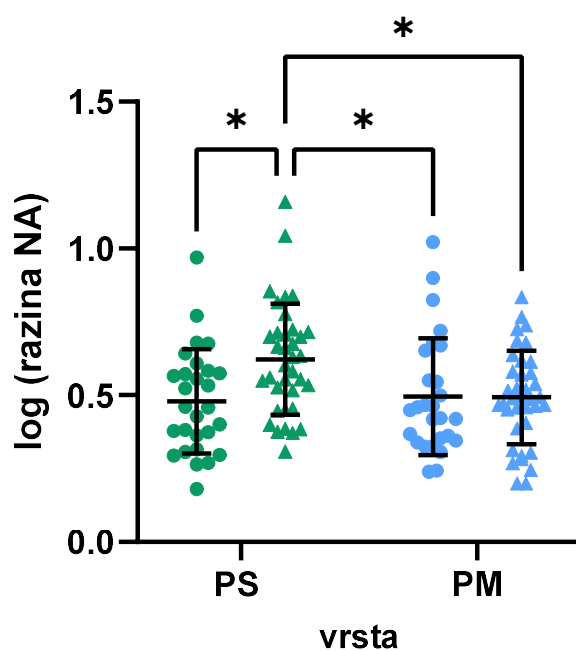
Za razinu dopamina (DA), dvofaktorska analiza varijance dosegla je statističku značajnost za interakciju između vrste i spola ($F(1,131)=4,041$; $p=0,0465$), dok je glavni učinak vrste bio neznačajan ($F(1,131)=0,5236$; $p=0,4706$), a spola indikativan ($F(1,131)=3,837$; $p=0,0523$). *Post-hoc* analiza (Tukey) pokazala je da mužjaci vrste *Podarcis siculus* imaju statistički značajno više razine DA u odnosu na ženke iste vrste ($p=0,0294$), dok između ostalih skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike (Slika 17.).



Slika 17. Log-transformirane razine dopamina (DA) prikazane su u odnosu na vrstu *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance uz *post-hoc* Tukey test;

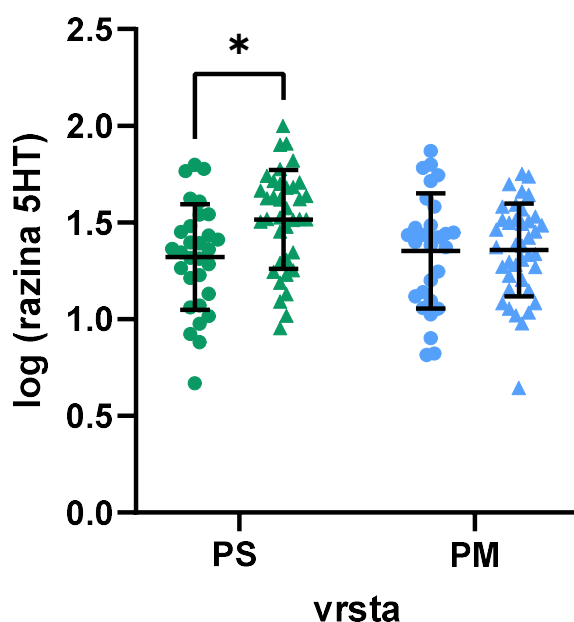
* $p<0,05$.

Za razine noradrenalina (NA), dvofaktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,124)=5,083$, $p=0,0259$) i statistički značajan učinak spola ($F(1,124)=4,743$, $p=0,0313$), dok učinak vrste nije bio statistički značajan ($F(1,124)=3,129$, $p=0,0794$). *Post-hoc* analiza (Tukey) pokazala je da mužjaci vrste *P. siculus* imaju više razine NA u odnosu na ženke iste vrste ($p=0,0112$), kao i u odnosu na ženke ($p=0,0325$) i mužjake ($p=0,0139$) vrste *P. melisellensis* (Slika 18.).



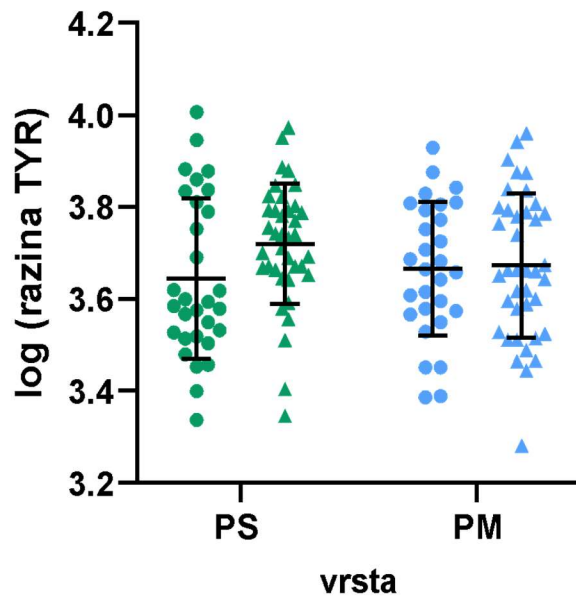
Slika 18. Log-transformirane razine noradrenalina (NA) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance uz *post-hoc* Tukey test; * $p<0,05$.

Za razine serotonina (5HT), dvofaktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,130)=4,218$, $p=0,0420$) te značajan glavni učinak spola ($F(1,130)=4,642$; $p=0,0331$), dok glavni učinak vrste nije bio statistički značajan ($F(1,130)=1,863$; $p=0,1746$). *Post-hoc* analiza (Tukey) provedena radi interpretacije značajne interakcije pokazala je da mužjaci vrste *P. siculus* imaju statistički značajno više razine 5HT u odnosu na ženke iste vrste ($p=0,0175$), dok ostale usporedbe nisu dosegle statističku značajnost ($p>0,05$), iako su zabilježene vrijednosti vrlo bliske pragu statističke značajnosti između mužjaka vrste *P. siculus* i jedinki vrste *P. melisellensis*, kako za usporedbu sa ženkama ($p=0,0727$), tako i s mužjacima ($p=0,0505$), što upućuje na izražen trend razlika između navedenih skupina (Slika 19.).



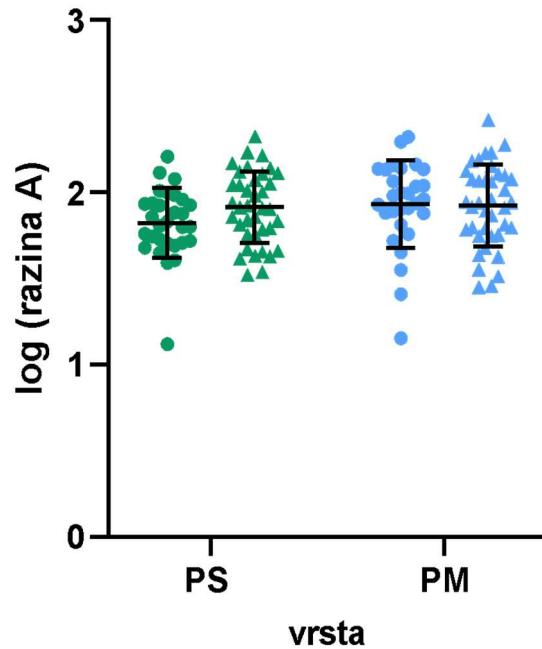
Slika 19. Log-transformirane razine serotonina (5HT) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance uz post-hoc Tukey test; * $p<0,05$.

Za razinu tirozina (TYR), dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,132)=1,700$, $p=0,1945$), kao ni statistički značajan glavni učinak vrste ($F(1,132)=0,2341$, $p=0,6293$) ili spola ($F(1,132)=2,531$, $p=0,1140$) (Slika 20.).



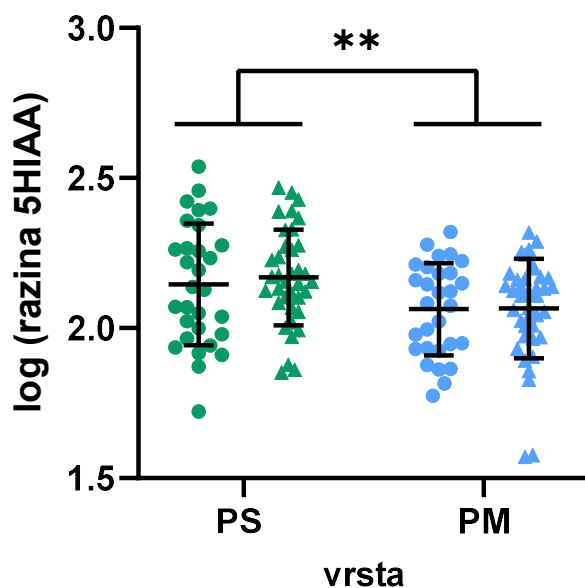
Slika 20. Log-transformirane razine tirozina (TYR) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mušjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance.

Za razinu adrenalina (A), dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,132)=1,552$, $p=0,2151$), niti statistički značajan glavni učinak vrste ($F(1,132)=2,262$, $p=0,1349$) ili spola ($F(1,132)=1,096$, $p=0,2971$) (Slika 21.).



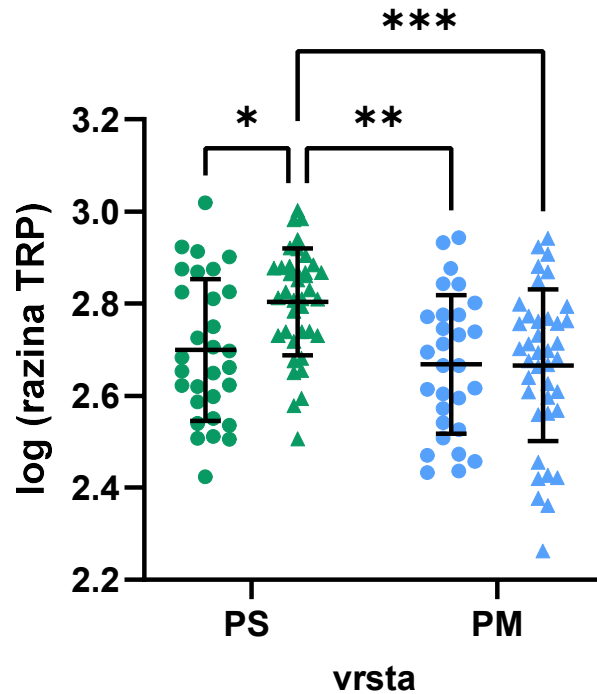
Slika 21. Log-transformirane razine adrenalina (A) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance.

Za razinu 5-hidroksiindoleoctene kiseline (5-HIAA), dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,131)=0,1245$, $p=0,7247$), niti statistički značajan učinak spola ($F(1,131)=0,1899$, $p=0,6637$), međutim, utvrđen je statistički značajan glavni učinak vrste ($F(1,131)=10,04$, $p=0,0019$), pri čemu je vrsta *P. siculus* pokazala više razine 5-HIAA u odnosu na *P. melisellensis* (Slika 22.).



Slika 22. Log-transformirane razine 5-hidroksiindoleoctene kiseline (5-HIAA) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance; ** $p<0,01$.

Za razine triptofana (TRP), dvofaktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,132)=4,391$, $p=0,0380$), kao i statistički značajan glavni učinak vrste ($F(1,132)=11,19$, $p=0,0011$) te granično značajan učinak spola ($F(1,132)=4,112$, $p=0,0446$). *Post-hoc* Tukeyjev test pokazao je da mušjaci vrste *P. siculus* imaju značajno više razine TRP u odnosu na ženke *P. siculus* te mušjake i ženke vrste *P. melisellensis* (Slika 23.).



Slika 23. Log-transformirane razine triptofana (TRP) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mušjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance uz *post-hoc* Tukey test; * $p<0,05$;

** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

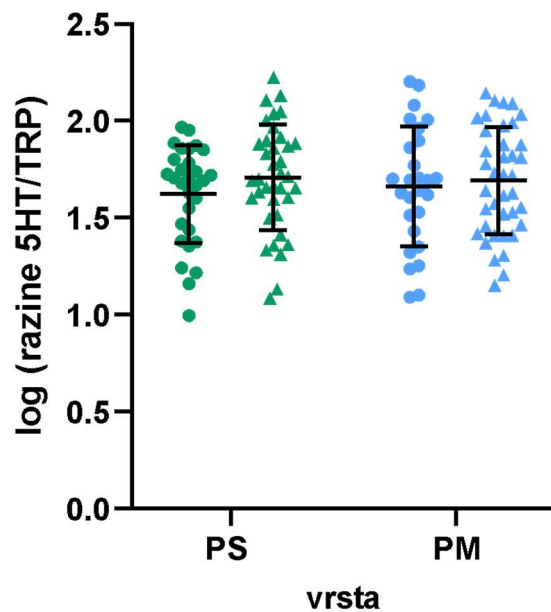
4.3.1 Procjena učinkovitosti biosinteze i razgradnje serotonina

Kako bi se dobio dodatni uvid u funkcionalne odnose unutar serotoninskog metaboličkog puta, analizirani su omjeri između uključenih metabolita. Omjer 5HT/TRP služi kao pokazatelj relativne učinkovitosti pretvorbe prekursora u neurotransmiter, dok omjer 5-HIAA/5HT odražava relativnu brzinu metabolizma serotonina u njegov glavni razgradni produkt, stoga analiza ovih omjera omogućuje procjenu dinamike serotoninskog sustava. Srednje vrijednosti izračunatih omjera razina tvari s obzirom na vrstu i spol prikazane su u Tablici 16.

Tablica 16. Deskriptivna statistika (srednja vrijednost \pm SD) izračunatih omjera 5HT/TRP i 5-HIAA/5HT s obzirom na spol, uključujući broj uzoraka (N).

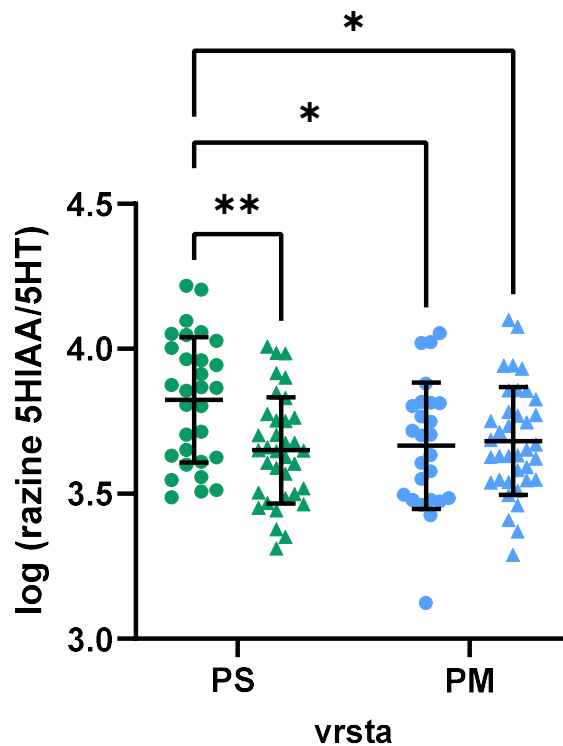
analiti	<i>Podarcis melisellensis</i>				<i>Podarcis siculus</i>			
	ženke	N	mužjaci	N	ženke	N	mužjaci	N
5HT/TRP	57,85 \pm 40,62	27	59,48 \pm 36,13	39	48,11 \pm 22,73	30	61,09 \pm 36,45	37
5-HIAA/5HT	5042 \pm 2712	26	5276 \pm 2442	37	7505 \pm 3719	30	4759 \pm 2264	36

Za omjer 5HT/TRP dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,129)=0,3171$, $p=0,5743$), kao ni statistički značajan učinak vrste ($F(1,129)=0,05280$, $p=0,8186$) ili spola ($F(1,129)=1,458$, $p=0,2295$) (Slika 24.).



Slika 24. Log-transformirane vrijednosti omjera serotonina i njegova prekursora triptofana (5HT/TRP) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance.

Za omjer 5-HIAA/5HT dvofaktorska analiza varijance pokazala je statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,123)=7,296$; $p=0,0079$), kao i statistički značajan učinak spola ($F(1,123)=6,679$; $p=0,0109$), dok je učinak vrste bio samo statistički indikativan ($F(1,123)=3,638$; $p=0,0588$). *Post-hoc* analiza pokazala je da ženke vrste *P. siculus* imaju statistički značajno više vrijednosti omjera 5-HIAA/5HT u odnosu na mužjake iste vrste ($p=0,0012$), kao i u odnosu na ženke ($p=0,0145$) i mužjake ($p=0,0072$) vrste *P. melisellensis* (Slika 25.).

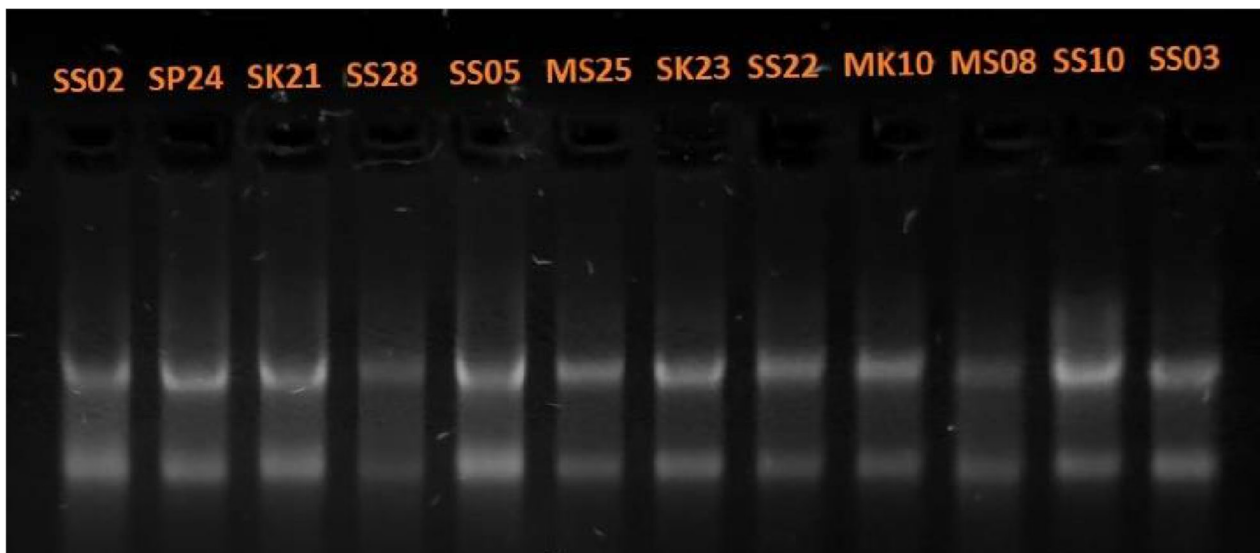


Slika 25. Vrijednosti omjera metabolita serotonina i serotonina (5-HIAA/5HT) prikazane su za vrste *P. siculus* (PS; zeleno) i *P. melisellensis* (PM; plavo). Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance uz *post-hoc* Tukey test; * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.4 Molekularne analize

4.4.1 Izolacija RNA

Svi uzorci RNA uspješno su izolirani komercijalnim kompletom GenElute™ RNA/DNA/Protein Purification Plus Kit (Sigma-Aldrich, SAD), što je potvrđeno spektrofotometrijskim mjerenjima čistoće i koncentracije izolirane RNA te elektroforezom i vizualizacijom na 1,5% agaroznom gelu. Integritet RNA verificiran je jasnom vizualizacijom 28S i 18S ribosomskih podjedinica bez prisutnosti vidljive kontaminacije genomskom DNA (gDNA) u jažicama (Slika 26.). Prosječna koncentracija izolirane RNA u analiziranim uzorcima iznosila je $291,55 \pm 75,59$ ng/ μ L.



Slika 26. Uzorci izolirane RNA na 1,5% agaroznom gelu. Autor fotografije: Dunja Vlašić.

4.4.2 Sekvenciranje RNA

Za potrebe provođenja molekularnih analiza, odnosno dizajna početnica za referentne gene i gene od interesa, u tvrtku Novogene poslano je 12 uzoraka izolirane RNA. Nakon provedene kontrole kvalitete (QC), svi zaprimljeni uzorci RNA pokazali su zadovoljavajuću čistoću i integritet te su uključeni u postupak izrade knjižnice i RNA sekvenciranja. *De novo* sastavljanjem transkriptoma dobiveno je ukupno 600 357 transkripata, odnosno 255 189 unigena (eng. *unigene*), odnosno jedinstvenih sekvenci koje predstavljaju skup transkripata jednog gena.

Prosječna duljina transkripata iznosila je 1105 bp, dok je prosječna duljina unigena bila 915 bp. Dobivena baza podataka (datoteka unigene.fasta) poslužila je kao predložak za dizajn specifičnih parova početnica za ciljne gene i gene od interesa.

4.4.3 Odabir gena i dizajn početnica za qPCR analizu

Početnice za qPCR-analizu dizajnirane su korištenjem baze NCBI, prema klasterima dobivenima RNA-sekvenciranjem. Na temelju rezultata HPLC-MS/MS analiza, koje su pokazale statistički značajne razlike u serotoninskom metabolizmu, odabrani su geni koji kodiraju enzime uključene u sintezu i razgradnju serotonina te pripadajuće receptore. U skladu s time dizajnirane su početnice za sintetski enzim triptofan hidroksilazu (TPH), razgradne enzime monoamin oksidazu A i B (MAOA i MAOB) te serotoninske receptore 5HTR1A i 5HTR2B. Nukleotidni sljedovi dizajniranih početnica za gene od interesa, kao i za tri odabrana referentna gena (*Gapdh*, *Pgk1*, *Ywhaz*), zajedno s pripadajućim klasterima prikazani su u Tablici 17.

Tablica 17. Nukleotidni sljedovi početnica referentnih gena i gena od interesa te pripadajući klasteri korišteni pri njihovom dizajniranju.

Gen	Uzvodna početnica	Nizvodna početnica	Klaster
<i>Gapdh</i>	5'-TGTAATCTCTGCCCCATCAGC-3'	5'-GCAAGAAGCATTGCTGACGAT-3'	5174.88484
<i>Pgk1</i>	5'-CCTGATGGGGTTCCTATGCC-3'	5'-TCAGGAACATGACATCCCTGCTT-3'	5174.92889
<i>Ywhaz</i>	5'-TGGCCCGAGAATACAGAGAGA-3'	5'-ACTTTTCCAACAGAGACAGCAC-3'	5174.91429
<i>Tph2</i>	5'-GGACAATGTGTATCGGCAGAGAA-3'	5'-CTCGACAGGCGTGAGTAGGA-3'	5174.130445
<i>MaoA</i>	5'-CTAGGTGGGACCTACCCAGA-3'	5'-TGGTTTTGGTCCAGCAGTGT-3'	5174.92206
<i>MaoB</i>	5'-GACACTAAACCCGATGGAAGTTTT-3'	5'-CTCGGTGCCTGCAAAGAAGATT-3'	5174.62841
<i>5Htr1a</i>	5'-CGACTACGTCAACAAGCGGA-3'	5'-TTCTTGACGGTCTTGC GGAT-3'	5174.73858
<i>5Htr2b</i>	5'-CTCCAGCAGGCTCTCGTTCA-3'	5'-GTATGGCCGACGGAGACTGG-3'	5174.67359

4.4.4 Validacija i optimizacija parametara qPCR reakcije

Optimalna temperatura taljenja za svaki par početnica određena je analizom krivulji taljenja dobivenih qPCR metodom uz primjenu temperaturnog gradijenta u rasponu od 54,1 °C do 64,1 °C, kako je opisano u potpoglavlju 3.2.2.6.1 (Slika 9.). Prikaz svih krivulji taljenja, dobivenih analizom uzorka smjese cDNA pri 12 različitih temperatura taljenja, nalazi se u Prilogu 9.3.

Eksperimentalno određene optimalne temperature taljenja odstupale su od deklariranih vrijednosti dobavljača, što opravdava nužnost ispitivanja temperaturnog gradijenta radi postizanja maksimalne specifičnosti umnažanja. Usporedba eksperimentalno dobivenih i deklariranih temperatura taljenja prikazana je u Tablici 18.

Tablica 18. Optimalne temperature taljenja eksperimentalno određene za svaki par početnica i usporedba temperatura taljenja navedenih u specifikacijskom listu.

Gen	Početnica	T _m dobavljača (°C)	T _m eksperimentalni (°C)
<i>Gapdh</i>	uzvodna	56,9	59,7
	nizvodna	56,3	
<i>Pgk1</i>	uzvodna	57,7	59,7
	nizvodna	58,4	
<i>Ywhaz</i>	uzvodna	57,3	59,7
	nizvodna	55,4	
<i>Tph2</i>	uzvodna	56,9	63,2
	nizvodna	58,4	
<i>MaoA</i>	uzvodna	57,9	63,9
	nizvodna	57,3	
<i>MaoB</i>	uzvodna	55,4	63,2
	nizvodna	57,9	
<i>5Htr1a</i>	uzvodna	57,2	63,2
	nizvodna	56,7	
<i>5Htr2b</i>	uzvodna	59,3	59,7
	nizvodna	59,9	

Pri eksperimentalno određenim temperaturama taljenja za svaki par početnica određena je učinkovitost umnažanja pomoću standardne krivulje, konstruirane ucrtavanjem logaritma početne masene koncentracije cDNA u odnosu na dobivene vrijednosti C_q . Jednadžbe pravca linearne regresije i pripadajući koeficijenti determinacije (r^2) korišteni su za evaluaciju linearnosti qPCR reakcija (Tablica 19.). Prema MIQE smjernicama, prihvatljiv raspon učinkovitosti qPCR umnažanja iznosi 90–110%. Koeficijenti determinacije ($r^2 > 0,98$) potvrdili su visoku linearnost svih qPCR reakcija. Učinkovitost umnažanja kretala se u rasponu od 79,9 % (*Tph2*) do 110,7 % (*5Htr1a*). Iako je učinkovitost za *Tph2* i *5htr2b* bila niža od idealnih 90 %, s obzirom na to da su linearnost (r^2), senzitivnost (LOD) i reproducibilnost bile zadovoljavajuće te da smo prilikom analize ekspresije svih gena uzeli u obzir učinkovitost, odlučili smo nastaviti analizu ekspresije gena *Tph2* i *5htr2b*. Ostali geni zadovoljili su stroge kriterije validacije prema MIQE smjernicama (90–110 %). Referentni geni (*Gapdh*, *Pgk1*, *Ywhaz*) pokazali su niže vrijednosti granice detekcije (LOD) u usporedbi s genima od interesa, pri čemu je LOD definiran kao najniža koncentracija ciljnog transkripta detektirana u ≥ 95 % tehničkih ponavljanja (Tablica 19.). Najniži LOD zabilježen je za *GAPDH* (0,00005 ng/ μ L), dok su geni *Tph2*, *MaoB* i *5Htr2b* pokazali višu granicu detekcije (0,05 ng/ μ L).

Tablica 19. Vrijednosti učinkovitosti umnažanja (E, %), nagiba standardne krivulje, koeficijenta determinacije (r^2) te granice detekcije (LOD, ng/ μ L) za svaki analizirani gen.

Gen	E (%)	Nagib	r^2	LOD (ng/μL)
<i>Gapdh</i>	90,21	-3,58	0,99	0,00005
<i>Pgk1</i>	90,44	-3,57	0,99	0,0005
<i>Ywhaz</i>	97,42	-3,38	0,99	0,0005
<i>Tph2</i>	79,09	-3,95	0,99	0,005
<i>MaoA</i>	90,06	-3,59	0,99	0,005
<i>MaoB</i>	93,20	-3,50	0,99	0,005
<i>5Htr1a</i>	110,70	-3,09	0,99	0,005
<i>5Htr2b</i>	80,75	-3,89	0,99	0,005

4.4.5 Analiza ekspresije gena

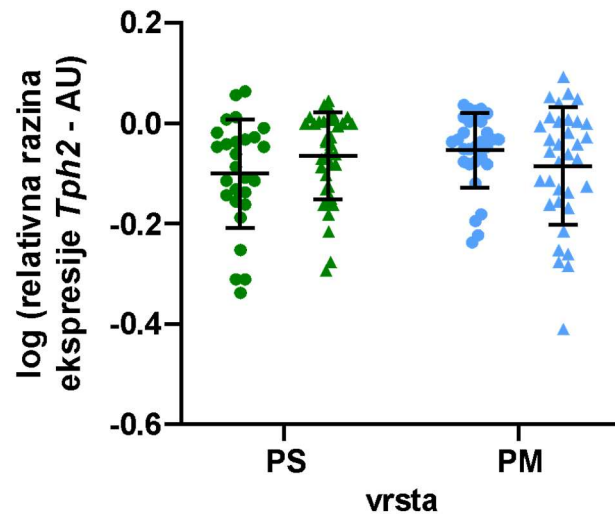
Nakon optimizacije parametara qPCR reakcije, uključujući određivanje optimalne temperature taljenja početnica, provjeru učinkovitosti umnažanja i granica detekcije za svaki gen, uspješno su provedena eksperimentalna qPCR mjerenja u svrhu analize ekspresije gena *Tph2*, *MaoA*, *MaoB*, *5Htr1a* i *5Htr2b*. Relativna ekspresija gena ispitana je qRT-PCR metodom na ukupno 129 uzoraka - 29 ženki i 34 mužjaka vrste PM te 29 ženki i 37 mužjaka vrste PS. Dobivene C_q vrijednosti, normalizirane prema geometrijskoj sredini tri referentna gena, korištene su za statističku analizu učinaka vrste i spola na ekspresiju gena. Srednje vrijednosti i standardne devijacije za svaki gen po spolu i vrsti prikazane su u Tablici 20.

Tablica 20. Deskriptivna statistika (srednja vrijednost \pm SD) ekspresije gena *Tph2*, *MaoA*, *MaoB*, *5Htr1a* i *5Htr2b* po spolu i vrsti, uključujući broj uzoraka (N).

Gen	<i>Podarcis melisellensis</i>				<i>Podarcis siculus</i>			
	Ženke	N	Mužjaci	N	Ženke	N	Mužjaci	N
<i>Tph2</i>	0,895 \pm 0,140	29	0,849 \pm 0,208	34	0,816 \pm 0,187	27	0,877 \pm 0,161	37
<i>MaoA</i>	1,036 \pm 0,038	29	1,028 \pm 0,024	32	1,012 \pm 0,025	26	1,019 \pm 0,022	36
<i>MaoB</i>	0,893 \pm 0,095	29	0,915 \pm 0,078	32	0,908 \pm 0,095	26	0,944 \pm 0,068	34
<i>5Htr1a</i>	0,141 \pm 0,108	29	0,163 \pm 0,178	33	0,166 \pm 0,135	29	0,289 \pm 0,197	36
<i>5Htr2b</i>	1,015 \pm 0,066	28	1,028 \pm 0,069	33	0,916 \pm 0,063	29	0,946 \pm 0,041	34

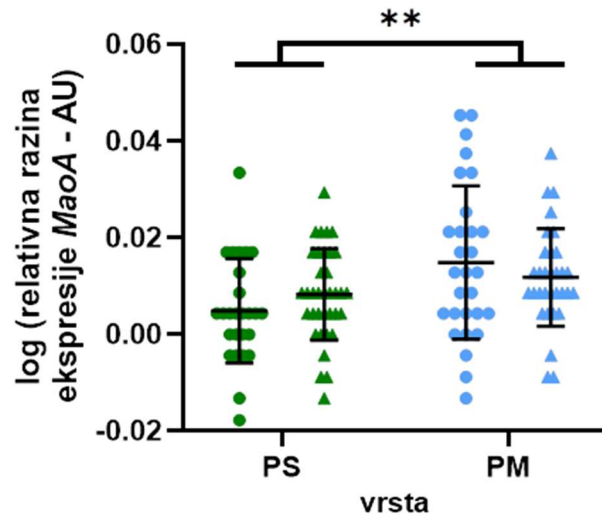
Dvofaktorska analiza varijance provedena je kako bi se ispitaio učinak vrste i spola te njihove interakcije na razine ekspresije svakog od promatranih gena (*Tph2*, *MaoA*, *MaoB*, *5Htr1a* i *5Htr2b*).

Dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola za ekspresiju gena *Tph2* ($F(1,123)=3,626$, $p=0,0592$), iako je uočen trend prema značajnosti, niti značajan glavni učinak vrste ($F(1,123)=0,5765$, $p=0,4491$) ili spola ($F(1,123)=0,0142$, $p=0,9053$) (Slika 27.).



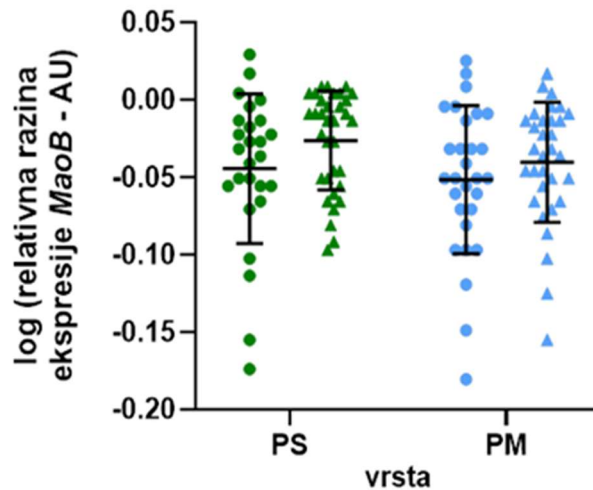
Slika 27. Relativna razina ekspresije gena *Tph2* prikazana je u odnosu na vrstu u populacijama *Podarcis siculus* (PS; zeleno) i *Podarcis melisellensis* (PM; plavo). Rezultati su izraženi kao log-transformirane vrijednosti relativne ekspresije u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance.

Za gen *MaoA*, dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,119)=2,335$, $p=0,1292$), međutim, utvrđen je statistički značajan učinak vrste na razinu ekspresije gena ($F(1,119)=10,21$, $p=0,0018$), dok učinak spola nije bio statistički značajan ($F(1,119)=0,006239$, $p=0,9372$) (Slika 28.).



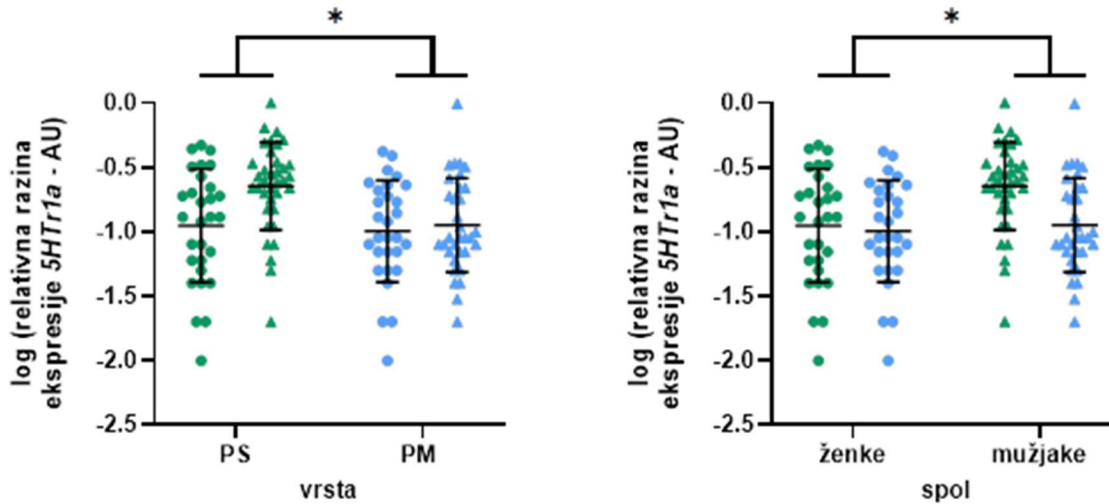
Slika 28. Relativna razina ekspresije gena *MaoA* prikazana je u odnosu na vrstu u populacijama *Podarcis siculus* (PS; zeleno) i *Podarcis melisellensis* (PM; plavo). Rezultati su izraženi kao log-transformirane vrijednosti relativne ekspresije u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mušjaci trokutima. ** $p<0,01$; dvofaktorska analiza varijance.

Za gen *MaoB*, dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,117)=0,1975$, $p=0,6576$), kao ni statistički značajan učinak vrste ($F(1,117)=1,939$, $p=0,1664$), dok je za učinak spola uočen trend prema značajnosti ($F(1,117)=3,756$, $p=0,0550$) (Slika 29.).



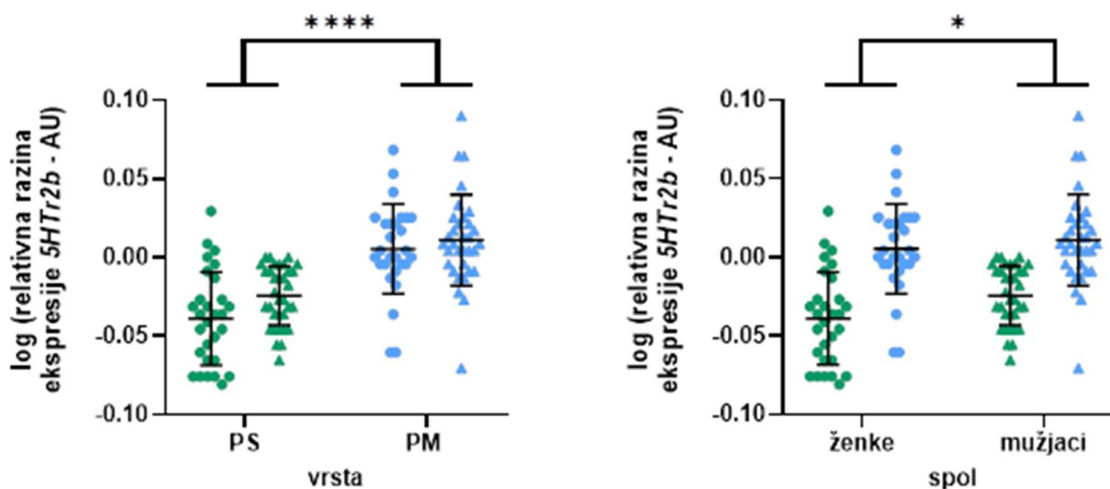
Slika 29. Relativna razina ekspresije gena *MaoB* prikazana je u odnosu na vrstu u populacijama *Podarcis siculus* (PS; zeleno) i *Podarcis melisellensis* (PM; plavo). Rezultati su izraženi kao log-transformirane vrijednosti relativne ekspresije u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mušjaci trokutima. Statistička analiza provedena je dvofaktorskom analizom varijance.

Dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola za ekspresiju gena *5HTr1a* ($F(1,123)=3,650$, $p=0,0584$), dok su utvrđeni statistički značajni glavni učinci vrste ($F(1,123)=6,360$, $p=0,0130$) i spola ($F(1,123)=6,737$, $p=0,0106$) (Slika 30.).



Slika 30. Relativna razina ekspresije gena *5Htr1a* prikazana je u odnosu na vrstu u populacijama *Podarcis siculus* (PS; zeleno) i *Podarcis melisellensis* (PM; plavo) te u odnosu na spol. Rezultati su izraženi kao log-transformirane vrijednosti relativne ekspresije u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. * $p<0,05$; dvofaktorska analiza varijance.

Za gen *5Htr2b*, dvofaktorska analiza varijance nije pokazala statistički značajnu interakciju između vrste i spola ($F(1,120)=0,8999$, $p=0,3447$), no utvrđen je statistički vrlo značajan učinak vrste ($F(1,120)=68,89$, $p<0,0001$), kao i statistički značajan učinak spola ($F(1,120)=4,347$, $p=0,0392$) (Slika 31.).



Slika 31. Relativna razina ekspresije gena *5Htr2b* prikazana je u odnosu na vrstu u populacijama *Podarcis siculus* (PS; zeleno) i *Podarcis melisellensis* (PM; plavo) te u odnosu na spol. Rezultati su izraženi kao log-transformirane vrijednosti relativne ekspresije u arbitrarnim jedinicama (AU) i prikazani kao srednja vrijednost i standardna devijacija, uz prikaz pojedinačnih vrijednosti. Ženke su označene krugovima, a mužjaci trokutima. * $p<0,05$, **** $p<0,0001$; dvofaktorska analiza varijance.

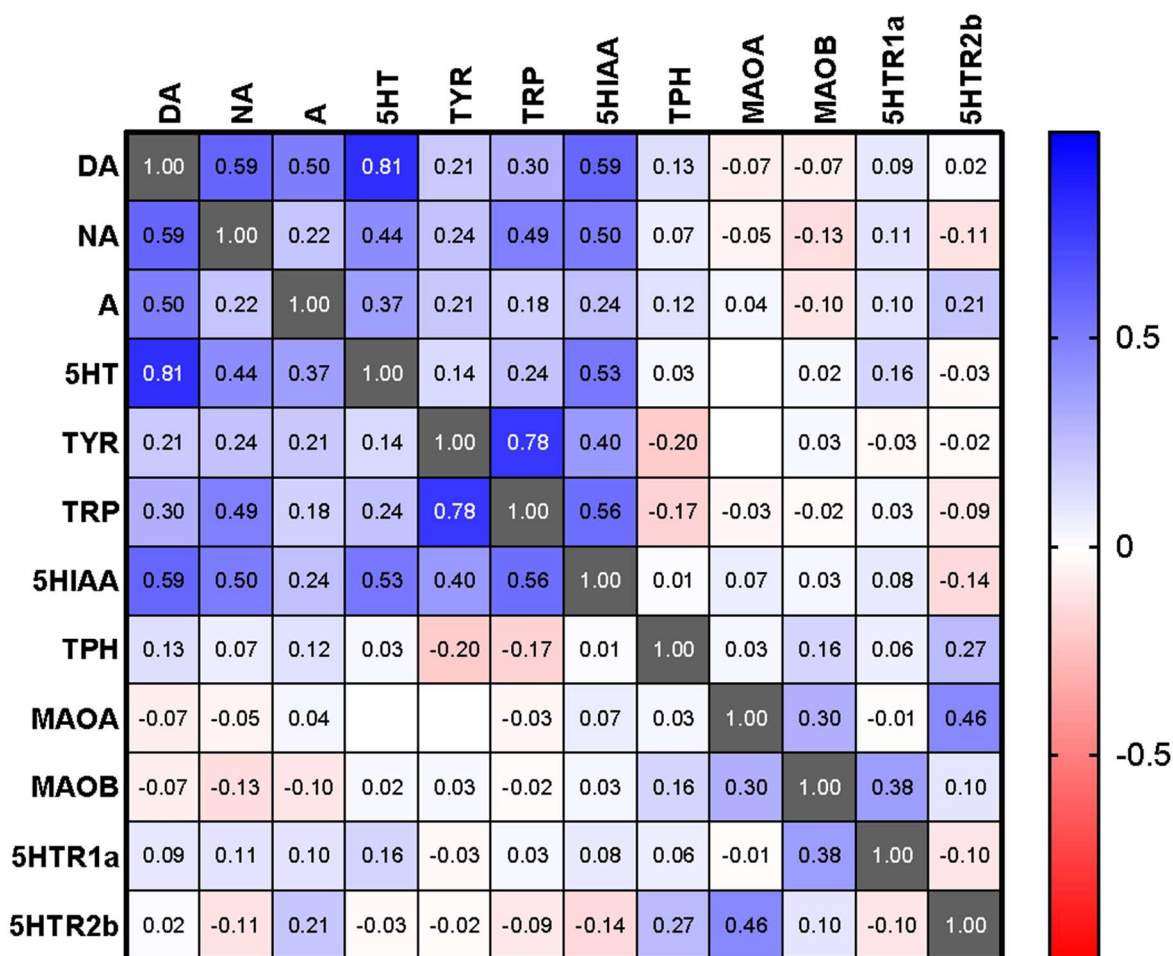
4.4.6 Korelacije između ekspresije gena i razine neurokemijskih analita

Korelacije između izmjerenih razina monoamina i njihovih metabolita i ekspresije gena testirane su Spearmanovim koeficijentom korelacije (ρ). Analiza je pokazala izraženiju međusobnu povezanost neurokemijskih analita u odnosu na ekspresiju gena.

Izmjerene razine monoamina i njihovih metabolita pokazale su snažnu međusobnu povezanost, pri čemu je vrlo jaka korelacija zabilježena između DA i 5HT ($\rho=0,81$; $p<0,0001$), kao i između TYR i TRP ($\rho=0,78$; $p<0,0001$). Umjerene korelacije uočene su između DA i NA ($\rho=0,59$), DA i 5-HIAA ($\rho=0,59$) te između 5HT i 5-HIAA ($\rho=0,53$; sve $p<0,0001$).

Unutar skupine gena zabilježena je umjerena pozitivna korelacija između ekspresije *5Htr2b* i *MaoA* ($\rho=0,46$; $p<0,0001$), i slaba pozitivna korelacija između ekspresije *MaoA* i *MaoB* ($\rho=0,30$; $p<0,0001$) i *5Htr1a* i *MaoB* ($\rho=0,38$; $p<0,0001$). Korelacije među ostalim genima nisu dosegle prag statističke značajnosti.

Korelacije između ekspresije gena i razine neurokemijskih analita bile su uglavnom slabe te nisu dosegle prag statističke značajnosti (Slika 32.).



Slika 32. Korelacije ekspresije gena (*5Htr1a*, *5Htr2b*, *MaoA*, *MaoB*, *Tph2*) i razina monoamina te njihovih metabolita (DA, NA, 5HT, TYR, A, 5-HIAA i TRP) izmjerenih u uzorcima moždanog tkiva guštera PM i PS. Prikazane su vrijednosti Spearmanova koeficijenta korelacije (ρ); crvena boja označava negativnu, a plava pozitivnu korelaciju, uz gradaciju boje ovisno o jačini korelacije. Radi veće preglednosti prikaza, korelacije s vrijednostima manjima od 0,01 nisu numerički prikazane (prazna polja).

5 RASPRAVA

5.1 Razvoj i optimizacija HPLC-MS/MS metode za analizu monoamina i njihovih metabolita

Iako su se HPLC metode s elektrokemijskom (ECD) ili fluorescencijskom (FLD) detekcijom s vremenom nametnule kao standard u neurokemijskim istraživanjima (Bicker i sur., 2013; Xie i sur., 2018; Shen i sur., 2019; Shi i sur., 2022), njihova primjena na kompleksne i ograničene biološke uzorke, poput mozga guštera, nosi značajne analitičke rizike. Dok ECD često karakterizira nestabilnost signala uslijed zagađenja elektroda, a FLD zahtijeva radno intenzivnu derivatizaciju, koja može unijeti dodatnu varijabilnost (Bicker i sur., 2013; Shen i sur., 2019), naš metodološki pristup bazirao se na tandemskoj spektrometriji masa (LC-MS/MS), kao robusnijoj, suvremenijoj alternativni. Za razliku od UV detekcije, koja je u ranijim studijama na rodu *Podarcis* bila ograničena na uži spektar analita (Nikolic i sur., 2019), MS/MS detekcija omogućila nam je razvoj metode za istodobno praćenje 11 ciljanih analita (A, DA, 5-HIAA, 5HT, 5HTP, L-DOPA, NA, TRP, TYR, VMA) u standardnim otopinama. Nemogućnost pouzdane kvantifikacije preostalih analita ne upućuje nužno na to da nisu prisutni u metabolizmu, već sugerira da su njihove endogene koncentracije u analiziranom biološkom matriksu bile ispod granica detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) razvijene LC-MS/MS metode. S obzirom na iznimno malu masu analiziranog tkiva te vrlo niske fiziološke koncentracije pojedinih intermedijera, osobito kemijski labilnih spojeva poput L-DOPA i 5-HTP koji se brzo metaboliziraju, signal tih analita vjerojatno je ostao ispod praga instrumentalne osjetljivosti. Unatoč tim ograničenjima, metoda je omogućila znatno širi uvid u monoaminski profil mozga guštera u odnosu na prethodne pristupe.

Ovakav pomak prema suvremenim analitičkim trendovima (Bosse i sur., 2017; Xie i sur., 2018; Shen i sur., 2019; Hori i sur., 2026) bio je ključan preduvjet za sveobuhvatno profiliranje mozga guštera. Primjena MS/MS detekcije osigurala je visoku selektivnost bez potrebe za kompleksnom pripremom uzorka koja bi mogla uzrokovati degradaciju termolabilnih analita (Hori i sur., 2026). Razvoj nove metode stoga je bio nužan za pouzdanu analizu monoamina, njihovih prekursora i metabolita u našem specifičnom uzorku. Budući da je riječ o izuzetno malom volumenu konačnog ekstrakta koji ne dopušta višestruka ponavljanja analize, metodološki cilj bio je omogućiti

simultanu kvantifikaciju 11 analita od interesa. Osim izuzetno niske koncentracije, kemijska labilnost monoamina i njihovih metabolita također predstavlja velik analitički izazov u svim koracima razvoja metode, od predpripreme uzorka i ekstrakcijskog postupka pa sve do same optimizacije kromatografskih uvjeta. Upravo je detaljna optimizacija svih koraka unutar ovog LC-MS/MS protokola omogućila precizan uvid u neurokemijski sastav mozga guštera, što ranijim metodama nije bilo moguće. Važno je pritom razlikovati analitički kapacitet novorazvijene metode od njezine praktične primjene na biološke uzorke mozga guštera. Iako novorazvijena metoda u otopinama stanadarada uspješno i istovremeno detektira 11 ciljanih analita, u homogenatima jedne polutke mozga guštera pouzdano je kvantificirano njih 7. Ovakav rezultat najvjerojatnije je posljedica male dostupne količine tkiva mozga, uslijed čega su endogene koncentracije preostala četiri analita u konačnom ekstraktu bile ispod granice kvantifikacije (LOQ). Pritom pojedini metaboliti u mozgu prirodno dolaze u vrlo niskim fiziološkim koncentracijama zbog brzog metaboličkog obrtaja (eng. *turnover*) pa kada se takav, masom ograničen biološki matriks podvrgne nužnom razrjeđenju tijekom postupka ekstrakcije, signali tih analita padaju ispod praga osjetljivosti instrumenta, odnosno unutar omjera signala i šuma koji ne zadovoljava kriterije kvantifikacije ($S/N < 10$). Unatoč tome, metoda je omogućila uspješnu kvantifikaciju 7 analita u izrazito ograničenoj količini moždanog tkiva, što predstavlja značaj analitički napredak u o analitički i pruža dosad najiscrpniji uvid u neurokemijski neg profil roda *Podarcis*.

5.1.1 Optimizacija predanalitičke pripreme uzorka

Razvoj metode za kvantifikaciju monoamina u mozgu guštera podrazumijevao je nadilaženje niza analitičkih prepreka koje proizlaze iz same kemijske prirode ovih spojeva, kao i njihove niske koncentracije te ograničene dostupnosti u specifičnom matriksu moždanog tkiva (Bicker i sur., 2013; Xie i sur., 2018). Jedan od ključnih izazova u predpripremi predstavlja podložnost bioloških uzoraka, po uzorkovanju, rezidualnoj enzimskoj aktivnosti, koja može značajno izmijeniti neurokemijski profil tkiva. Upravo iz tog razloga učinkovita inaktivacija ili supresija enzima

predstavlja prvi kritični korak u pripremi uzoraka za daljnje analize (Lee i sur., 2018). Dodatni izazov predstavlja izražena kemijska nestabilnost monoamina. Zbog prisutnosti fenolnih hidroksilnih skupina, osobito kod katekolamina, skloni su spontanoj oksidaciji u kinonske derivate, pri čemu se proces značajno ubrzava pri povišenim temperaturama i bazičnim uvjetima (pH>7) (Bicker i sur., 2013). Nadalje, dokazano je da su monoamini osjetljivi i na vrijeme pohrane te izlaganje svjetlosti, koje može katalizirati fotooksidaciju i dodatnu degradaciju (Nalewajko i sur., 2007; Bicker i sur., 2013; Lee i sur., 2018). U našem protokolu, enzimska aktivnost i procesi degradacije minimizirani su trenutačnim zamrzavanjem uzoraka na suhom ledu, odmah po izdvajanju mozga iz lubanje. Do homogenizacije, polutke mozga čuvane su na -80 °C, a sama homogenizacija je provođena na ledu. Za postupak homogenizacije korištena je ultračista voda HPLC kvalitete (pH oko 5,5–6,0), čime je osigurano blago kiselo okruženje, koje smanjuje mogućnost oksidacije monoamina. U ovom koraku nisu dodavane dodatne kiseline, kako bi se izbjegle potencijalne analitičke interferencije te kontaminacija izvora ionizacije u MS detektoru. Stabilnost analita dodatno je osigurana brzim procesiranjem uzoraka pri niskim temperaturama, čime je vrijeme izloženosti potencijalnim degradacijskim procesima svedeno na minimum. Slijedom toga, svi daljnji koraci centrifugiranja, kao i pohrana uzoraka u *autosampleru* tijekom LC–MS/MS analiza, odvijali su se pri 4 °C. Kako bi se spriječila mogućnost fotooksidacije, korištene su zatamnjene bočice (viale), a početne standardne otopine (eng. *stock solutions*) čuvane su pri -20 °C u staklenim tikvicama zaštićenima od svjetla, omotanim aluminijskom folijom.

5.1.2 Optimizacija ekstrakcijskog postupka

Nakon stabilizacije uzorka, idući ključni korak u razvoju analitičke metode jest istovremena izolacija metabolita od interesa iz složenog biološkog matriksa uz uklanjanje interferirajućih spojeva. Zbog složenosti bioloških uzoraka, posebice tkiva, često je nužno uklanjanje makromolekula, poput proteina i lipida, koje mogu uzrokovati interferencije tijekom kromatografske separacije i/ili dovesti do kontaminacije LC kolone i MS izvora (Bicker i sur. 2013; Młynarczyk i sur., 2024). Najčešće metode za ekstrakciju metabolita uključuju precipitaciju proteina, ekstrakciju tekuće-tekuće (eng. *liquid-liquid extraction*, LLE) ili ekstrakciju na čvrstoj fazi

(eng. *solid-phase extraction*, SPE) (Młynarczyk i sur., 2024). Svaka od ovih metoda ima specifične prednosti i ograničenja, a njihov izbor ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, složenosti matriksa te cilju analize. Iako se u suvremenim istraživanjima favorizira selektivnija SPE, ponajviše zbog učinkovitijeg uklanjanja interferencija iz matriksa, takvi su postupci često radno intenzivni – uključuju veći broj manipulacijskih koraka, duže vrijeme pripreme uzorka te veći rizik od gubitka analita, osobito kod kemijski nestabilnih spojeva poput monoamina (Bicker i sur., 2013; Hori i sur., 2026). Unatoč tome što LLE može biti manje selektivna od SPE i ponekad rezultirati koekstrakcijom komponenti matriksa, prednost LLE pristupa je relativno učinkovita ekstrakcija metabolita različite polarosti, čime se izbjegava potreba za višestrukim i selektivnim elucijama koje karakteriziraju SPE (Bicker i sur. 2013, Młynarczyk i sur., 2024). Kako je naš ciljani monoaminski profil obuhvaćao 11 analita različitih polarosti iz male količine dostupnog uzorka (prosječna masa polutke mozga iznosi 20.07 ± 4.86 mg), upravo je primjena modificirane LLE i filtracije omogućila izolaciju te simultano praćenje svih spojeva od interesa u jednom analitičkom ciklusu.

Suvremeni pristupi, potkrijepljeni najnovijim istraživanjima, naglašavaju važnost maksimalne redukcije koraka pripreme kako bi se osigurala visoka ponovljivost i očuvao integritet osjetljivih analita (Hori i sur., 2026; Młynarczyk i sur., 2024). S obzirom na osjetljivost monoamina na oksidaciju i degradaciju, u ovom istraživanju razvijen je i primijenjen pojednostavljeni pristup pripreme uzoraka s minimalnim brojem koraka, kako bi se maksimalno očuvao integritet analita. Nakon homogenizacije moždanog tkiva, uzorci su centrifugirani pri maksimalnom broju okretaja (21300 xg) tijekom 25 min, s ciljem odvajanja i uklanjanja staničnih ostataka. Odvojeni supernatant potom je podvrgnut modificiranoj LLE, odnosno kratkoj ekstrakciji u kloroformu. Ovaj korak omogućio je uklanjanje lipofilnih komponenti matriksa u odvojenu, organsku fazu, dok su polarni monoamini i njihovi metaboliti ostali u vodenoj fazi. Kako bi se osiguralo potpuno otklanjanje eventualno zaostalih čestica, vodena faza po separaciji je filtrirana kroz $0,22 \mu\text{m}$ celulozno-acetatne membranske filtere, čime je osiguran čist ekstrakt, koji ne predstavlja rizik za kontaminaciju HPLC-MS/MS sustava. Sličan koncept pripreme uzoraka u što manjem broju koraka za LC-MS/MS analize monoamina pokazali su Hori i sur. (2026). Primjenom vrlo jednostavnog

ekstrakcijskog postupka koji je podrazumijevao ekstrakciju metanolom, centrifugiranje i izravno injektiranje, postigli su pouzdanu kvantifikaciju monoamina iz izuzetno male količine dostupnog biološkog uzoraka – glave samo jedne jedinke vinske mušice (*Drosophila*). Ovakav pristup naglašava prednosti smanjenja broja manipulacijskih koraka tijekom pripreme uzoraka, u svrhu što manjeg gubitka i degradacije analita od interesa te omogućuje analize vrlo ograničene količine biološkog materijala. Tako je, izbjegavanjem kompleksnih SPE protokola i derivatizacije, koji prema Bicker i sur. (2013), Młynarczyk i sur. (2024) i Hori i sur. (2026) povećavaju rizik od gubitka analita uslijed adsorpcije ili nepotpune elucije, naš pristup osigurao izravnu detekciju monoamina i njihovih metabolita iz jedne polutke mozga u samo jednom analitičkom ciklusu. Izbjegavanjem kompleksnih postupaka derivatizacije i višestrukih koraka pročišćavanja, (eng. *clean-up*) smanjeni su gubici analita i postignut je zadovoljavajući analitički povrat ciljanih spojeva unutar jednog analitičkog ciklusa. Optimizacija ovih koraka bila je temeljni preduvjet za uspješnu analizu pojedinačnih uzoraka bez potrebe za njihovim udruživanjem (eng. *pooling*). Primjenom ovako konfigurirane metode na ekstremno male volumene – konkretno, na pojedinačne polutke mozga guštera – uspješno je kvantificirano 7 analita. Ovakav analitički pristup omogućio je precizan uvid u interindividualnu varijabilnost (razlike među jedinkama), koja bi se udruživanjem uzoraka nepovratno izgubila. Detekcija i kvantifikacija te varijabilnosti na razini pojedinačnog organizma ključne su za dublje razumijevanje neurokemijske podloge bihevioralnih razlika i specifičnosti unutar i između promatranih vrsta roda *Podarcis*.

5.1.3 Optimizacija kromatografskih uvjeta i masene detekcije

Uspostava precizne kvantifikacije monoamina omogućena je primjenom odgovarajućeg unutarnjeg standarda (IS), koji kompenzira gubitke tijekom ekstrakcije i varijacije u ionizaciji. Iako se u LC-MS/MS analizama preferiraju izotopno označeni standardi, najčešće odabrani interni standard za analize monoamina jest DHBA (Bicker i sur. 2013), budući da zadovoljava ključne kriterije (strukturna sličnost, ne pojavljuje se prirodno u biološkom uzorku, stabilnost), a pritom je i ekonomski pristupačniji. DHBA je korišten kao IS za sve analizirane spojeve, što je omogućilo

pouzdanu korekciju mogućih gubitaka tijekom ekstrakcije i fluktuacije u ionizaciji te osiguralo visoku preciznost i ponovljivost analitičkog praćenja ciljnih spojeva.

Odabir kromatografske kolone i mobilne faze bio je ključan za omogućavanje optimalne separacije analiziranih monoamina i njihovih metabolita. Kako su monoamini izrazito polarne molekule niske molekulske mase, njihova je kromatografska separacija izazovna. U kiselim uvjetima pozitivno su nabijeni, a zbog svoje hidrofилности slabo se zadržavaju na standardnim hidrofobnim stacionarnim fazama, što često dovodi do vrlo brze elucije analita, ponekad već u tzv. mrtvom volumenu, odnosno u onom volumenu mobilne faze koji prolazi kroz kolonu bez ikakve interakcije sa stacionarnom fazom. Iako su dostupne različite analitičke kolone punjene stacionarnim fazama na bazi silika-gela kemijski modificiranog alkilnim lancima (npr. C8, C18, C30), kao i monolitne kolone, C18 kolone obrnute faze i dalje su najčešći izbor zbog relativno brze analize, stabilne retencije te zadovoljavajuće separacije polarnih spojeva (Bicker i sur., 2013). U našoj metodi korištena je upravo Kromasil 100-5-C18 kolona s pripadajućom pretkolonom. Pretkolonu smo koristili radi zaštite same analitičke kolone, a posljedično i cijelog kromatografskog sustava, od čestica matriksa i potencijalnih onečišćivača prisutnih u kompleksnom biološkom uzorku homogenata polutke mozga. Time smo produžili vijek trajanja kolone te osigurali stabilnost i reproducibilnost analize.

Kako bismo prevladali rizik prebrzog prolaska polarnih analita kroz hidrofobnu C18 stacionarnu fazu, optimizirali smo ključne parametre mobilne faze: udio organskog modifikatora, sastav pufera i pH. Učinak pH mobilne faze izravno je povezan sa stupnjem ionizacije analita, ovisno o njihovim pKa vrijednostima. Budući da već izuzetno male promjene pH mogu uzrokovati velike pomake u retencijskim vremenima i obliku vrhova, pravilna optimizacija ovog parametra od presudne je važnosti. U literaturi se, za razdvajanje monoamina, najčešće koriste pH vrijednosti mobilne faze niže od 4,5, ne samo zbog stabilnosti stacionarne faze, odnosno silika-gela, već i radi smanjenja oksidacije samih monoamina. Usprkos tome što je izokratna elucija jednostavnija za primjenu, u slučaju analize većeg broja spojeva različite polarности često ne omogućava zadovoljavajuće razdvajanje. Upravo zbog velikog broja spojeva različite polarности u jednom

uzorku, kao i svih navedenih ograničenja, u našem slučaju bila je nužna gradijentna elucija. Gradijentna metoda započinje s 0 % organske faze to jest sa 100 % vodene faze (0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu), čime je omogućeno bolje zadržavanje polarnih analita na C18 koloni na početku analize. Postupno povećanjem udjela organske faze (0,1 % mravlja kiselina u 5 mM amonijevom formijatu u smjesi acetonitrila i vode u omjeru 95:5) omogućilo je ispiranje manje polarnih analita koji se snažnije vežu i posljedično duže zadržavaju na stacionarnoj fazi. Zbog izražene supresije signala (eng. *ion suppression*) koju TFA uzrokuje pri ESI ionizaciji, u razvoju MS metode ona je zamijenjena mravljom kiselinom i amonijevim formijatom. Iako TFA osigurava bolju kromatografsku rezoluciju, njezin učinak ionskog uparivanja u plinskoj fazi drastično narušava osjetljivost masene detekcije. Ovakav sustav omogućio je učinkovito razdvajanje i ravnomjernu eluciju bez potrebe za upotrebom agresivnih ionskih parova, koji prema Bicker i sur. (2013) mogu produljiti vrijeme ekvibracije kolone, narušiti oblik vrhova i zahtijevati češće čišćenje sustava zbog visokog sadržaja soli u mobilnoj fazi.

5.1.4 Analitičke prednosti i ograničenja metode

Naš metodološki pristup nadovezuje se na ranija istraživanja kojima je cilj bio HPLC metodama detektirati monoamine u moždanom tkivu. Metodu koju su Thomas i sur. (2015) razvili za detekciju 5HT i NA u mozgu miševa, Nikolic i sur. (2019) su prilagodili za analizu monoamina u mozgu guštera. U potonjem istraživanju autori su pomoću UV-Vis detektora kvantificirali razine 5HT, DA i NA u uzrocima mozga vrsta *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*. Taj smo pristup značajno unaprijedili razvojem i primjenom LC-MS/MS metode koja, za razliku od prethodne detekcije 3 analita, u standardnim otopinama pouzdano i simultano detektira i kvantificira njih čak 11 u jednom analitičkom ciklusu (A, DA, 5-HIAA, 5HT, 5HTP, L-DOPA, NA, TRP, TYR, VMA). Pri primjeni na realne uzorke mozga guštera roda *Podarcis*, metoda je omogućila pouzdanu kvantifikaciju 7 analita, uključujući monoamine (5-HT, DA, NA, A), njihove aminokiselinske prekursore (TRP, TYR) te glavni metabolit serotonina (5-HIAA). Razlika između 11 analita validiranih u standardnim otopinama i 7 kvantificiranih u biološkom matriksu odraz je specifičnih

ograničenja samog uzorka, prvenstveno izrazito male mase dostupnog tkiva (jedne polutke mozga), vrlo niskih endogenih fizioloških koncentracija pojedinih spojeva te njihove kemijske labilnosti i podložnosti brzom metaboličkom obrtaju, a ne ograničenja selektivnosti same LC-MS/MS metode.

Unatoč uspješnoj optimizaciji i validaciji novorazvijene metode, u uzorcima polutke mozga guštera nije bilo moguće kvantificirati L-DOPA, 5HTP, HVA i VMA. Iako su mjerenja ovih spojeva u standardnim otopinama pokazala zadovoljavajući odziv, njihova odsutnost u biološkim uzorcima najvjerojatnije je odraz njihove brze metaboličke konverzije i niskih fizioloških koncentracija (Baluchová i sur., 2018; Höglund i sur., 2019). Tako se 5HTP ubrzano dekarboksilira u 5HT, a L-DOPA u DA, zbog čega se ovi prekursori u tkivu zadržavaju samo kratko vrijeme u izvornom obliku. Posljedično su prisutni u vrlo niskim koncentracijama u biološkim uzorcima, što dodatno otežava njihovu detekciju. U našem slučaju, treba uzeti u obzir i izuzetno malu količinu tkiva mozga guštera gdje su spojevi koji se i inače nalaze u tragovima još slabije zastupljeni, što uz neizbježne gubitke tijekom ekstrakcije rezultira razinama analita koje ne prelaze prag kvantifikacije. Dok su monoamini protonirani i stabilniji u kiselom mediju, njihovi kiselinski metaboliti HVA i VMA imaju drugačiju kemijsku strukturu (O-metilirani derivati bez cis-diolne skupine), koja otežava stvaranje stabilnih kompleksa tijekom ekstrakcije, čime je njihova izolacija iz kompleksnog biološkog matriksa još složenija. Detekciju HVA i VMA dodatno otežava činjenica da se u MS sustavu tipično analiziraju u negativnom načinu ionizacije (ESI-), dok su svi ostali analiti bazični i analiziraju se u pozitivnom načinu ionizacije (ESI+) (Bicker i sur., 2013; Shen i sur. 2019). Iako je metoda omogućila rad u oba ionizacijska načina (brzo prebacivanje polariteta), vrlo niske koncentracije ovih metabolita u moždanom tkivu, u kombinaciji s njihovom visokom hidrofiličnošću, rezultirale su razinama ovih analita ispod granice kvantifikacije.

Unatoč ograničenjima u detekciji pojedinih analita, razvijena LC-MS/MS metoda omogućila je pouzdanu i osjetljivu kvantifikaciju 7 monoamina i njihovih metabolita u ograničenoj količini moždanog tkiva guštera. Time je postavljen robustan metodološki temelj za daljnju interpretaciju neurokemijskih razlika između promatranih vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*. Buduća istraživanja

mogla bi dodatno ispitati mogućnost kvantifikacije preostalih analita u većoj količini tkiva, primjerice u homogenatu cijelog mozga ili u združenim uzorcima (eng. *pool*), no takav pristup nije bio moguć u ovom istraživanju, budući da je cilj rada bio analizirati individualne jedinice i omogućiti uvid u varijabilnost među njima.

5.2 Razine monoamina u simpatrijskih populacija *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*

U ovom istraživanju analizirane su razine monoamina (DA, NA, A i 5HT), njihovih prekursora (TYR i TRP) i metabolita (5-HIAA) u mozgu vrsta *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*. Iako su neurokemijska istraživanja na vrstama roda *Podarcis* rijetka, mozak guštera bio je predmet istraživačkog interesa još 1960-ih i 1970-ih godina, kada su pionirski radovi opisali raspodjelu i osnovne karakteristike monoaminskih sustava u središnjem živčanom sustavu gmazova (Baumgarten, 1968; Wartenberg i Baumgarten, 1969; Doshi i sur., 1975). Među ranim istraživanjima može se izdvojiti terenska studija na vrsti *Sceloporus occidentalis*, koja je pokazala da razine 5HT i aktivnost MAO u mozgu istraživanih guštera mogu varirati ovisno o dobu dana i temperaturi, upućujući na dinamičnu regulaciju serotoniniskog sustava u prirodnim uvjetima (Quay i sur., 1970). Iako metodološki udaljena od suvremenih pristupa, ova studija upućuje na dinamičnu prirodu serotoniniske regulacije u mozgu gmazova i podupire pretpostavku da su razine 5HT u mozgu guštera podložne fiziološkim i okolišnim modulacijama, što daje širi kontekst za interpretaciju naših rezultata. Interes za ovo područje nastavio se u narednim desetljećima kroz istraživanja raspodjele serotoninina (Marschall, 1980; Smeets i Steinbusch, 1988; Pierre i sur., 1990) i razvoja katekolaminskih sustava u mozgu guštera (Medina i sur., 1994). Međutim, navedena istraživanja bila su primarno usmjerena na neuroanatomsku lokalizaciju, dok je precizna kvantifikacija bila ograničena tadašnjim analitičkim metodama. Također, izostala je integracija s molekularnim analizama, što ograničava izravnu usporedbu s modernim pristupima. Iako su ove rane studije pružile uvid u osnovnu organizaciju monoaminskih sustava, suvremena istraživanja koja povezuju te sustave s ekološkim interakcijama, razlikama u ponašanju među vrstama te invazivnim potencijalom u divljim populacijama i dalje su vrlo rijetka.

Stoga, ovi rezultati popunjavaju prazninu u razumijevanju neuromodulacijske osnove invazivnosti i socijalne dominacije između istraživanih vrsta. Dobiveni rezultati uspoređivani su i s dostupnim literaturnim podacima za druge vrste guštera ili gmazova, ili je konzultirana literatura na filogenetski bliskim skupinama ptica. Treba uzeti u obzir da koncentracije monoamina u mozgu izravno ovise o analiziranoj moždanoj regiji, veličini uzorka te korištenoj analitičkoj metodi, zbog čega izravna usporedba apsolutnih vrijednosti između različitih studija često nije moguća. Kako bi se dobio pregledan i cjelovit uvid u neurokemijske razlike između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*, dobiveni rezultati u nastavku raspravljani su u kontekstu dvaju glavnih monoaminskih sustava uključenih u regulaciju ponašanja i fizioloških odgovora - katekolaminskog i serotoniniskog.

5.2.1 Katekolaminski sustav

Tirozin (TYR) je početni prekursor u biosintezi katekolamina, ali i široko rasprostranjena aminokiselina uključena u brojne metaboličke procese. U našem istraživanju nisu utvrđene statistički značajne razlike u razinama TYR između mozgova jedinki vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*. Iako su podaci o razinama TYR u mozgu gmazova ograničeni, istraživanja na drugim kralježnjacima pokazuju da koncentracije ove aminokiseline mogu varirati ovisno o fiziološkom stanju organizma i metaboličkoj aktivnosti katekolaminskog sustava (Fernstorm i Fernstorm, 2007; Lieberman i sur. 2015; Tran i sur., 2015). Primjerice, istraživanje provedeno na mozgovima pilića, pokazalo je da su razine TYR i katekolamina, poput noradrenalina, povezane s regulacijom unosa hrane (Tran i sur., 2015).

Dopamin (DA), noradrenalin (NA) i adrenalin (A) predstavljaju glavne neurotransmitere katekolaminskog sustava. U našem istraživanju A nije pokazao statistički značajne razlike s obzirom na vrstu ili spol, za DA i NA također nije utvrđen statistički značajan glavni učinak vrste, što je u kontekstu ovog rada bila ključna razina usporedbe između *P. siculus* i *P. melisellensis*. Ipak, kod oba analita zabilježena je značajna interakcija vrste i spola, a kod NA i značajan učinak spola. Statistički značajna interakcija spola i vrste kod razina DA posljedica je viših razina DA u

mozgovima mužjaka *P. siculus* u odnosu na ženke iste vrste, dok je kod razina NA to posljedica značajno viših razina u mozgovima mužjaka *P. siculus* u odnosu na sve ostale skupine. Jedna od rijetkih studija koja je analizirala razinu monoamina u mozgu ove dvije vrste proveli su Nikolic i sur. (2019), koji su zabilježili značajne razlike u koncentracijama DA između *P. siculus* i *P. melisellensis*, dok razlike u NA nisu bile statistički značajne. Naši rezultati u velikoj su mjeri u skladu s navedenim nalazima, budući da ni u ovom istraživanju nije utvrđen statistički značajan opći učinak vrste na razine NA. Također, za DA je uočen sličan obrazac raspodjele vrijednosti, pri čemu su najviše razine zabilježene u mužjaka *P. siculus*, dok su ostale skupine imale niže i međusobno usporedive vrijednosti. Međutim, za razliku od istraživanja Nikolic i sur. (2019), u kojem je značajnost utvrđena između mužjaka dviju vrsta, u ovom radu statistički značajne razlike proizlaze iz interakcije vrste i spola, odnosno razlika između mužjaka i ženki unutar vrste *P. siculus*. Ova razlika vjerojatno odražava veću analitičku osjetljivost i robusniji eksperimentalni dizajn u ovom istraživanju, uključujući veći broj uzoraka i detaljniju *post-hoc* analizu interakcijskih učinaka. Neurokemijski profil vrste *Podarcis siculus* opisali su u svom istraživanju Blazevic i sur. (2020), u kojem su pokazali da razine DA nisu značajno varirale između populacija različitih staništa, dok su koncentracije NA i A bile više u jedinki iz kopnene populacije, u usporedbi s otočnom. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost da razine katekolamina u mozgu mogu varirati ovisno o ekološkim uvjetima i specifičnim prilagodbama pojedinih populacija unutar iste vrste. U spomenutim studijama analizirale su se isključivo razine monoamina, međutim, u ovom istraživanju mjerenje i analiza prekursora dodatno razjašnjavaju njihov metabolički put. Slične razine TYR u obje vrste sugeriraju da dostupnost prekursora, odnosno kapacitet za sintezu katekolamina, nije ograničavajući faktor u bazalnim uvjetima te upućuje na to da su uočene razlike u razinama DA i NA rezultat specifične enzimske regulacije ili različitih potreba za ovim neurotransmiterima.

Nedavna istraživanja na vrsti *P. siculus* dodatno naglašavaju funkcionalnu važnost ovih neurotransmitera. Sciarrillo i sur. (2025) pokazali su da tretmani katekolaminima potiču specifične neuroendokrine odgovore, pri čemu svaki od njih na jedinstven način modulira aktivnost tireoidne žlijezde. Njihovo istraživanje upućuje na to da održavanje stabilnih razina katekolamina može imati važnu ulogu u očuvanju fiziološke ravnoteže i prilagodbi organizma na vanjske podražaje.

Nedostatak razlika među vrstama u bazalnim razinama DA, NA i A u našem istraživanju ukazuje na važnost ravnoteže ovog sustava. Promjene katekolaminskog odgovora zabilježene su i u drugim vrstama guštera. Primjerice, Campos i sur. (2022) pokazali su da se koncentracije DA, ali ne i NA i A, u prednjem mozgu zelene anole (*Anolis carolinensis*) mogu mijenjati ovisno o društvenim interakcijama. Ovakvi rezultati dodatno potvrđuju da su razine katekolamina u mozgu osjetljive na različite fiziološke i okolišne čimbenike.

5.2.2 Serotoninski sustav

Analiti uključeni u serotoninski put (TRP, 5HT i 5-HIAA) u ovom su istraživanju jedini omogućili uvid u povezane razine prekursora, neurotransmitera i metabolita unutar istog metaboličkog puta. Iako su analizirani i katekolamini, cjeloviti katekolaminski metabolički put nije bilo moguće interpretirati na isti način, budući da L-DOPA, HVA i VMA nisu mogli biti pouzdano kvantificirani u uzorcima polutke mozga guštera. Naime, razine intermedijera L-DOPA te metabolita HVA i VMA u uzorcima polutke mozga guštera bile su ispod granice kvantifikacije, što je onemogućilo njihovu pouzdanu numeričku integraciju i statističku obradu. Slijedom toga, daljnja je interpretacija rezultata u ovome radu primarno usmjerena na metabolički put serotonina, za koji je osiguran najpotpuniji i analitički najvjerodostojniji skup podataka.

Triptofan (TRP) predstavlja esencijalnu aminokiselinu i primarni prekursor u biosintezi 5HT, ali služi kao prekursor i u drugim metaboličkim putevima, poput kinureninskog (Huang i sur., 2023). Stoga je očekivano da je, u našim analizama, upravo TRP zabilježen u znatno višim razinama u odnosu na sve ostale analizirane spojeve. Budući da se TRP u mozgu ne može sintetizirati *de novo*, njegova dostupnost kao ključnog supstrata izravno utječe na biosintezu serotonina, a posljedično i na neurokemijsku ravnotežu (Huang i sur., 2023). U našem istraživanju mužjaci vrste *P. siculus* pokazali su značajno više razine TRP-a u usporedbi s mužjacima *P. melisellensis*. Iako su podaci o razinama slobodnog TRP u mozgu gmazova nedovoljno zastupljeni u literaturi, njegova prisutnost u moždanom tkivu mjerena je u istraživanjima na drugim, filogenetski srodnim skupinama kralježnjaka, poput ptica. Primjerice, Aleksandrova (2019) je analizirala monoamine i njihove prekursore u mozgu kokoši (*Gallus domesticus*) te nije zabilježila značajne razlike u

koncentracijama TRP između skupina u različitim fazama reproduktivnog ciklusa. Slično tome, analize aminokiselinskog sastava mozga ptica prepelica (*Coturnix coturnix*) (Abed i sur., 2018) i grlica (*Spilopelia senegalensis*) (Shefa Khldon i Asmaa Basheer, 2024) također su potvrdile prisutnost TRP u različitim regijama mozga, bez izraženih promjena između promatranih stanja ili razvojnih faza. Činjenica da smo u našem istraživanju upravo u razini ovog prekursora zabilježili statistički vrlo značajnu razliku među vrstama, uz značajnu interakciju spola i vrste, upućuje na potencijalne razlike u regulaciji serotoninskog metaboličkog puta između promatranih vrsta. Budući da dostupnost TRP u mozgu predstavlja jedan od ključnih čimbenika koji mogu utjecati na brzinu sinteze serotonina, njegove povišene razine u mužjaka vrste *P. siculus* mogle bi ukazivati na potencijalno povećanu aktivnost serotoninskog metaboličkog puta u ovoj skupini.

Nakon utvrđenih razlika u razini prekursora, naši rezultati dosljedno bilježe značajne razlike i u nastavku metaboličkog puta. Za razinu serotonina (5HT) utvrđena je značajna interakcija vrste i spola, pri čemu mužjaci vrste *P. siculus* imaju značajno više razine u odnosu na ženke iste vrste. Zanimljivo je da u prethodnom istraživanju na ovim vrstama (Nikolic i sur., 2019) nisu zabilježene statistički značajne razlike u razinama 5HT u mozgu. U odnosu na prethodno istraživanje, naši rezultati upućuju na spolno specifične razlike u razinama 5HT, pri čemu mužjaci vrste *P. siculus* pokazuju više vrijednosti u odnosu na ženke iste vrste. Nedavna istraživanja na drugim vrstama gmazova, poput onog Wu i sur. (2024) na kineskim kornjačama (*Mauremys sinensis*) potvrđuju da su varijacije u razinama 5HT u mozgu usko povezane s fiziološkim statusom jedinki i njihovim odgovorom na vanjske podražaje. Za 5-hidroksiindoleoctenu kiselinu (5-HIAA), glavni metabolit serotonina, u našem je istraživanju utvrđen jasan učinak vrste, pri čemu je *P. siculus* pokazala više razine 5-HIAA u odnosu na *P. melisellensis*, dok učinak spola i interakcija vrste i spola nisu bili značajni. Usporedba s dostupnom literaturom za rod *Podarcis* ovdje je ograničena jer, primjerice, Nikolic i sur. (2019) nisu u svojim analizama obuhvaćali mjerenja razine 5-HIAA, no njegova prisutnost potvrđena je u ranijim istraživanjima na drugim vrstama gmazova, poput zvjezdaste agame (*Agama stellio stellio*) (Michaelidis i sur., 2002). Dodatno, istraživanja na zelenoj anoli (*Anolis carolinensis*) pokazala su da se, u neurokemijskim istraživanjima mozga guštera, 5HT i 5-HIAA rutinski analiziraju zajedno (Emerson i sur., 2000; Summers i sur., 2005; Korzan i sur., 2021),

iako su se ta istraživanja ponajprije usmjerila na procjenu serotoninske aktivnosti prateći omjer 5-HIAA i 5HT, a ne na izravnu usporedbu razina pojedinih spojeva. Ipak, istraživanja na vrsti *Anolis carolinensis* ukazuju na to da bazalne razine 5HT mogu varirati ovisno o bihevioralnom fenotipu. Tako su Summers i sur. (2005) pokazali da agresivniji mužjaci vrste *Anolis carolinensis* prije interakcije imaju nižu bazalnu serotonergičku aktivnost u pojedinim moždanim regijama, što upućuje na to da su niže bazalne razine 5HT povezane s agresivnijim fenotipom. Michaelidis i sur. (2002) mjerili su razine 5HT i 5-HIAA u mozgu vrste *Agama stellio stellio*, pri čemu su njihove razine varirale ovisno o fiziološkom stanju, poput hibernacije, što dodatno potvrđuje osjetljivost ovih analita na promjene u aktivnosti organizma te upućuje na njihovu ulogu u regulaciji funkcionalnih stanja. Dok kratkotrajni stresni podražaji ili agresivne interakcije mogu izazvati brze promjene u razinama 5-HIAA (Emerson i sur., 2000), naši rezultati sugeriraju da su kod mužjaka vrste *P. siculus* povišene razine prisutne i u bazalnim uvjetima.

Ukupno gledajući, naši rezultati omogućuju najcjelovitiju interpretaciju upravo serotoninskog metaboličkog puta pošto su za njega kvantificirani prekursor (TRP), neurotransmiter (5HT) i metabolit (5-HIAA). Uočene razlike ne mogu svesti isključivo na razinu 5HT, već su jasno izražene u razinama TRP i 5-HIAA, posebice kod mužjaka vrste *P. siculus*.

Kako bi se dodatno procijenila dinamika serotoninskog sustava između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*, uz razine pojedinačnih metabolički povezanih spojeva, analizirani su i njihovi omjeri. Omjer 5HT/TRP odražava relativnu učinkovitost pretvorbe prekursora u neurotransmiter unutar serotoninskog puta te služi kao pokazatelj učinkovitosti sinteze. U našem istraživanju, ovaj omjer nije pokazao statistički značajne razlike između vrsta, spolova ni njihove interakcije, što upućuje na to da je učinkovitost sinteze 5HT iz TRP podjednaka između *P. siculus* i *P. melisellensis*. Navedeno upućuje na to da uočene razlike u serotoninskom profilu vjerojatno nisu primarno određene promjenama u sintezi 5HT. Omjer 5-HIAA/5HT široko se primjenjuje kao mjera serotoninske aktivnosti i razgradnje (eng. *turnover*) u istraživanjima ponašanja i stresa kod guštera i drugih kralježnjaka, pri čemu povišen omjer upućuje na pojačanu razgradnju 5HT u odnosu na njegovu dostupnu razinu (Emerson i sur., 2000; Summers i sur., 2005; Korzan i sur., 2021). Za

razliku od 5HT/TRP, omjer 5-HIAA/5HT pokazao je da ženke vrste *P. siculus* imaju statistički značajno više vrijednosti u odnosu na mužjake iste vrste, kao i u odnosu na ženke i mužjake vrste *P. melisellensis*. Ovakav obrazac upućuje na to da je razgradnja serotonina značajno povišena u ženki vrste *P. siculus*. S druge strane, niže vrijednosti ovog omjera, kod mužjaka iste vrste, uz trend viših razina 5HT i podjednake razine 5-HIAA, mogu upućivati na razlike u aktivnosti enzima uključenih u razgradnju serotonina. Korzan i sur. (2021) dodatno naglašavaju metodološku vrijednost ovog omjera kao robusnog indeksa serotoninske aktivnosti jer smanjuje varijabilnost vezanu uz ukupne razine pojedinih spojeva.

5.2.3 Metodološki pristupi i razlike u eksperimentalnom dizajnu

Razlike između rezultata naših analiza i onih predstavljenih u drugim studijama mogu biti povezane s različitim metodološkim pristupom te eksperimentalnim dizajnom. Dok su prethodna istraživanja koristila različite analitičke pristupe, uključujući HPLC s UV-Vis detekcijom (Nikolic i sur., 2019), HPLC-ECD (Emerson i sur., 2000; Korzan i sur., 2000; 2006; 2021; Summers i sur., 2005), ELISA-u (Blazevic i sur., 2020; Wu i sur., 2024) te HPLC-MS (Aleksandrova, 2019; Campos i sur., 2022), u našem je istraživanju primijenjena HPLC-MS/MS metoda, koja omogućuje znatno veću selektivnost i osjetljivost detekcije u odnosu na navedene pristupe. Nadalje, analiza cjelokupnog metaboličkog puta, koja uključuje prekursore, neurotransmitere i metabolite, omogućila je detaljniji uvid u funkcionalne odnose unutar serotoninskog metaboličkog puta, koji je u ovom istraživanju bio najpotpunije obuhvaćen. Za razliku od metaboličkog puta katekolamina, u kojem pojedini ključni intermedijeri i metaboliti nisu mogli biti kvantificirani u biološkim uzorcima, uspješna kvantifikacija omogućila je interpretaciju odnosa TRP–5HT–5-HIAA. Razlike unutar serotoninskog metaboličkog puta osobito su bile izražene kod mužjaka vrste *P. siculus*.

Značajna razlika leži i u prostornoj rezoluciji uzoraka. Važno je napomenuti da je u ovom istraživanju analizirana jedna polutka mozga, dok su u ranijim istraživanjima koncentracije monoamina najčešće određivane u homogenatu cijelog mozga (Nikolic i sur., 2019; Blazevic i sur.,

2020) ili u specifičnim moždanim regijama poput prednjeg mozga ili pojedinih limbičkih struktura (Emerson i sur., 2000; Korzan i sur., 2000; 2006; 2020; Summers i sur., 2005). Regionalna mikrodisekcija mozga u potonjim istraživanjima (Emerson i sur., 2000; Korzan i sur., 2000; 2006; 2021; Summers i sur., 2005) olakšana je činjenicom da su modeli poput zelene anole (*Anolis carolinensis*) detaljno neuroanatomski opisani te da za njih postoje objavljeni stereotaksijski atlas (Greenberg, 1982). Osim toga, njihov mozak relativno veće mase omogućuje preciznije izdvajanje pojedinih moždanih regija. Nasuprot tome, kod vrsta roda *Podarcis*, čiji su mozgovi znatno manji, takav je pristup metodološki zahtjevniji, a dodatno ga otežava nedostatak specifičnog stereotaksijskog atlasa mozga.

Naš eksperimentalni dizajn primarno je bio usmjeren na postizanje maksimalne pouzdanosti rezultata mjerenjem razine monoamina i genske ekspresije iz uzorka mozga iste jedinke, zbog čega korištenje homogenata cijelog mozga za samo jednu vrstu analize nije bilo moguće. Razlike u uočenim neurokemijskim profilima između našeg istraživanja i prethodnih studija na rodu *Podarcis* (Nikolic i sur., 2019; Blazevic i sur., 2020) vjerojatno su uvjetovane značajnim daljnjim odstupanjima u eksperimentalnom dizajnu. Prvenstveno, naše istraživanje obuhvatilo je znatno veći i reprezentativniji broj uzoraka (N=132) prikupljan tijekom dvije godine na tri geografski različite lokacije, dok su prethodne studije bile prostorno i brojčano ograničene. Primjerice, Nikolic i sur. (2019) proveli su uzorkovanje jedinki oba spola na jednoj lokaciji (Sinjsko polje) i analizirali ukupno 32 jedinke, dok su Blazevic i sur. (2020) uspoređivali kopnenu populaciju (Kaštela) s otočnom (otočić Pijavica) na uzorku od 80 jedinki, isključivo mužjaka. Poznato je da varijacije u razinama spolnih hormona tijekom reproduktivnog ciklusa mogu značajno modulirati aktivnost monoaminskih sustava u mozgu gmazova (Crews i sur., 2009). Shodno tome, spomenuti autori uzorkovali su životinje isključivo u lipnju i srpnju, tijekom vrhunca reproduktivnog razdoblja, dok je naše istraživanje provedeno u post-reproduktivnom razdoblju (kasni kolovoz - početak listopada) s ciljem analiziranja bazalnih razina monoamina. Posebno kritičan čimbenik je i postupak eutanazije. Za razliku od prethodnih studija u kojima je korištena anestezija izofluranom (Nikolic i sur., 2019; Blazevic i sur., 2020), u našem radu anestetici nisu primjenjivani, kako bi se izbjegao njihov dokumentirani utjecaj na biokemiju mozga (Wang i sur., 2019).

5.2.4 Ekspresija gena uključenih u regulaciju serotonergičkog sustava

Uvid u molekularne mehanizme sinteze, metabolizma i signalizacije neurotransmitera ključan je za razumijevanje uzročno-posljedične veze između genotipa, neurokemijskog fenotipa i ponašanja. Poznato je da genetski čimbenici mogu utjecati na funkciju živčanog sustava putem modulacije neurotransmiterskih sustava i neuralnih mreža, posredno oblikujući ponašanje (Dang i sur., 2012). Dok mjerenje koncentracije neurotransmitera pruža informaciju o trenutačnom neurokemijskom statusu organizma, analiza ekspresije gena omogućuje uvid u regulatorne mehanizme koji određuju sintezu, razgradnju i prijenos signalnih molekula u živčanom sustavu. Takav pristup posebno je važan u istraživanjima evolucijskih i ekoloških razlika među srodnim vrstama, gdje varijacije u ekspresiji regulatornih gena mogu dovesti do značajnih razlika u fiziologiji i ponašanju (Bassitta i sur., 2021). Razvoj naprednih tehnologija sekvenciranja značajno je unaprijedio mogućnosti istraživanja genetske osnove fenotipske plastičnosti i adaptacije, omogućujući analizu cjelokupnih genoma i transkriptoma različitih organizama, uključujući guštare roda *Podarcis* (Stratakis i sur., 2025). Tako su relativno novija istraživanja objavila referente genoma *P. muralis* (Andrade i sur., 2019), *P. raffonei* (Gabrielli i sur., 2023) i *P. lilfordi* (Gomez-Garrido i sur., 2023), a objavljeni su i transkriptomi temeljeni na RNA-seq analizama za vrste *P. siculus* (Trapanese i sur., 2017) te *P. cretensis* (Stratakis i sur., 2025).

Iako je broj studija temeljenih na analizi genoma i transkriptoma unutar roda *Podarcis* u porastu, funkcionalna interpretacija ekspresije specifičnih gena uključenih u regulaciju monoaminskih sustava još je uvijek slabo istražena. Budući da ovi sustavi imaju ključnu ulogu u regulaciji ponašanja, fizioloških odgovora na stres i neuroendokrinih procesa, analiza ekspresije gena uključenih u serotoninski metabolizam predstavlja važan korak za razumijevanje molekularne podloge neurokemijskih razlika među srodnim vrstama. Stoga je u ovom radu analizirana ekspresija gena uključenih u procese sinteze (*Tph2*) i metabolizma (*MaoA*, *MaoB*) serotonina te gena koji kodiraju specifične serotoninske receptore (*5Htr1a*, *5Htr2b*), a koji bi potencijalno mogli

biti povezani s prethodno uočenim razlikama u serotoninskom profilu između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*.

5.2.4.1 Sinteza serotonina: ekspresija gena *Tph2*

U našem istraživanju, razina ekspresije gena *Tph2*, ključne izoforme enzima odgovorne za sintezu serotonina u mozgu kralježnjaka (Matthes i sur., 2019; Xu i sur., 2019; Lv i sur., 2020; Chivite i sur., 2021; Sviridova i sur. 2026), nije pokazala statistički značajne razlike s obzirom na vrstu ili spol, iako je zabilježen trend interakcije vrste i spola. Ovi podaci upućuju na to da uočene promjene unutar serotoninskog sustava vjerojatno nisu izravno povezane s povećanom transkripcijom ovog gena. Istraživanja na različitim modelnim organizmima pokazuju da ekspresija *Tph2* može biti osjetljiva na fiziološke promjene, uključujući stres i nutritivni status (Shimomura i sur., 2019; Mandic i Volkoff, 2018). Primjerice, Shimomura i sur. (2019) pokazali su da kronični toplinski stres dovodi do istodobnog smanjenja ekspresije *Tph* i razina 5HT u mozgu, dok akutni stres nije imao učinak ni na ekspresiju ni na razine 5HT. S druge strane, nutritivni status i hormoni koji reguliraju apetit značajno moduliraju ekspresiju gena uključenih u sintezu monoamina, uključujući i *Tph* (Mandic i Volkoff, 2018), što dodatno potvrđuje osjetljivost ovog sustava na fiziološke uvjete. Eksperimentalno smanjenje ekspresije *Tph2* u mozgu štakora dovodi do smanjenja razina 5HT i 5-HIAA, potvrđujući funkcionalnu povezanost između ekspresije ovog gena i serotoninske neurotransmisije (Matthes i sur., 2019).

U kontekstu naših rezultata, moguće je da su uočene razlike unutar serotoninskog sustava barem djelomično povezane s većom dostupnošću prekursora TRP, a ne s promjenama u ekspresiji *Tph2*. Time se dodatno potvrđuje da se razlike u serotoninskom sustavu između promatranih skupina ne moraju nužno odvijati na razini transkripcije gena odgovornih za sintezu, nego mogu uključivati i druge regulatorne mehanizme unutar istog metaboličkog puta ili biti pod utjecajem razlike u prehrani i drugih čimbenika koje utječu na unos triptofana.

5.2.4.2 Metabolizam serotonina: ekspresija gena *MaoA* i *MaoB*

Gen *MaoA* kodira enzim monoamin-oksidazu A, ključan za razgradnju monoamina, uključujući serotonin i katekolamine (Kolla i Bortolato, 2020). U našem istraživanju, zabilježena je značajno viša ekspresija *MaoA* u vrste *P. melisellensis* u odnosu na *P. siculus*, dok učinak spola i interakcija spola i vrste nisu bili značajni, što upućuje na jasnu razliku u transkripciji ovog enzima između dvije promatrane vrste. Budući da MAOA katalizira oksidativnu deaminaciju serotonina i drugih monoamina, promjene u ekspresiji ovog gena mogu imati važnu ulogu u regulaciji dostupnosti neurotransmitera u mozgu. Niska razina aktivnosti ovoga gena sustavno je povezana s povećanom agresivnošću, impulzivnošću i kompetitivnim ponašanjem kod širokog raspona kralježnjaka, uključujući ljude (McDermott i sur., 2009), pse (Eo i sur., 2016), miševe (Kolla i Bortolato, 2020) i svinje (Chen i sur., 2019). Istraživanja ponašanja provedena na miševima s isključenim genom (eng. *knock-out*, KO) za MAOA pokazala su da je agresivni fenotip praćen smanjenom socijabilnošću i slabije izraženim istraživačkim ponašanjem (Bortolato i sur., 2011; Godar i sur., 2011; Bortolato i sur., 2013). Djelomično preklapanje funkcija MAOA i MAOB upućuje na to da učinak promjena u aktivnosti MAOA može biti moduliran prisutnošću druge izoforme, pri čemu istodobna inaktivacija oba enzima dovodi do veće akumulacije 5HT (Chen i sur., 2004). Osim toga, istraživanja na *MaoA* KO miševima pokazala su da nedostatak ovog enzima može dovesti do promjena i u drugim monoaminskim sustavima, primjerice kolinskom, što dodatno upućuje na šire neurobiološke posljedice poremećene razgradnje monoamina (Grailhe i sur., 2009). Usprkos tome što su razine DA u središnjem živčanom sustavu *MaoA* KO miševa tek blago povišene, novija istraživanja sugeriraju da agresivni fenotip ne ovisi isključivo o ukupnoj koncentraciji, već o specifičnoj aktivnosti dopaminskih krugova. U prilog tome govore rezultati Yu i sur. (2014), koji su pokazali da izravna optogenetička stimulacija dopaminergičnih neurona u mezokortikolimbickom sustavu dovodi do izraženog pojačanja agresivnog ponašanja. Iako su istraživanja ekspresije *MaoA* u mozgu gmazova rijetka, studija na gušterima roda *Sceloporus* pokazala je da geni povezani s metabolizmom serotonina i regulacijom MAOA mogu sudjelovati u neurobiološkom odgovoru na socijalne podražaje i agresivne teritorijalne interakcije (Romero-Diaz i sur., 2021).

Naši rezultati upućju na to da bi niža ekspresija *MaoA* kod *P. siculus* mogla predstavljati molekularni mehanizam koji omogućuje održavanje viših bazalnih razina serotonina, potencijalno pridonoseći njihovoj bihevioralnoj kompetitivnosti. Ovakav transkripcijski profil sugerira da se razlike u serotoninskom sustavu ovih dviju vrsta potencijalno temelje na varijacijama u kapacitetu za razgradnju monoamina.

Gen *MaoB* kodira izoenzim monoamin-oksidadu B, čija je funkcionalna diferencijacija u odnosu na izoformu MAOA nastala rano u evoluciji tetrapoda (Merello Oyarzún i sur., 2025). Dok MAOA preferencijalno metabolizira 5HT, smatra se da MAOB ima važnu ulogu u održavanju monoaminske homeostaze u serotonergičnim neuronima sprječavanjem akumulacije drugih monoamina (Goldstein, 2021), a primarno se povezuje s metabolizmom β -feniletilamina (PEA) (Bortolato i sur., 2009). Za razliku od *MaoA*, stabilna ekspresija *MaoB* upućuje na to da je ova izoforma evolucijski konzerviranija te manje uključena u specifičnu regulaciju serotoninskog odgovora na socijalne podražaje. U eksperimentalnim modelima na miševima pokazano je da manjak MAOB dovodi do promjena u ponašanju, uključujući smanjenu anksioznost, brže stupanje u potencijalno rizične situacije i intenzivnije istraživanje novih objekata, pri čemu su ti učinci barem djelomično povezani s porastom razina PEA, ali ne i monoamina, u mozgu (Bortolato i sur., 2009). Farmakološka istraživanja na zebrecama (*Danio rerio*) također pokazuju da inhibicija MAOA ima izraženiji učinak na anksiozno ponašanje od inhibicije MAOB, što dodatno upućuje na veću funkcionalnu važnost MAOA u regulaciji serotoninskih i emocionalnih procesa (Jaka i sur., 2021). Inhibicija oba izoenzima, koja je uzrokovala povišene razine svih monoamina i PEA, popraćena je povećanom anksioznošću (Chen i sur. 2004). Činjenica da statistička analiza nije pokazala razlike u ekspresiji *MaoB* između promatranih vrsta u našem istraživanju, upućuje na to da ovaj gen vjerojatno ne predstavlja ključni čimbenik u objašnjenju razlika u serotoninskom sustavu između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*. Dok kombinirani manjak oba izoenzima može snažno narušiti monoaminsku homeostazu (Singh i sur., 2013), naši rezultati upućuju na to da je uočenoj razlici među vrstama vjerojatno više pridonijela regulacija gena *MaoA* nego *MaoB*.

5.2.4.3 Receptorska signalizacija serotonina: ekspresija gena *5htr1a* i *5Htr2b*

Gen *5Htr1a* kodira serotoninski receptor 5Htr1a, koji djeluje kao inhibitorni regulator serotoninske neurotransmisije. Sudjeluje u negativnoj povratnoj sprezi oslobađanja serotonina, a prisutan je i postsinaptički, u regijama mozga uključenima u regulaciju aktivnosti i ponašanja (Albert i Vahid-Ansari, 2019). Razna istraživanja, uključujući i bihevioralna, svrstavaju upravo ovaj receptor među ključne regulatore serotoninske neurotransmisije, pošto s visokim afinitetom veže 5HT i sudjeluje u finoj modulaciji emocija i ponašanja (Banerjee i sur., 2007). U našem istraživanju, razina ekspresije gena *5Htr1a* pokazala je statistički značajne razlike s obzirom na vrstu, pri čemu je vrsta *P. siculus* pokazala višu razinu ekspresije od *P. melisellensis*. Zabilježena je i značajna razlika na razini spola, pri čemu su mužjaci obje vrste pokazali višu ekspresiju *5Htr1a* gena u odnosu na ženke. Budući da receptori 5Htr1a kontroliraju dinamiku oslobađanja 5HT i osjetljivost neuronskih mreža na 5HT, promjene u njihovoj ekspresiji mogu imati izravan utjecaj na bihevioralne i fiziološke odgovore organizma povezane s funkcijom serotoninskog sustava. U kontekstu socijalnog ponašanja, povišena ekspresija *5Htr1a* često se povezuje s nižim razinama agresije i povećanom prosocijalnošću. Primjerice, kod štakora primjena agonista ovog receptora povećava sklonost životinja prema uzajamnom nagrađivanju u socijalnim interakcijama bez promjena u bihevioralnoj fleksibilnosti, lokomociji ili anksioznosti (Schönfeld i sur., 2020). Kod ciklidnih riba (*Astatotilapia burtoni*) viša ekspresija ovog receptora bilježi se kod subdominantnih jedinki u usporedbi s dominantnima, što korelira s promjenama u metabolizmu serotonina i smanjenom agresivnošću (Loveland i sur., 2014). Ovi rezultati upućuju na to da ekspresija serotoninskih receptora može biti usko povezana s društvenom hijerarhijom i strategijama ponašanja. Istraživanja na gušterima vrste *Anolis carolinensis* pokazala su da su obrasci vezanja i raspodjele 5Htr1a receptora u mozgu gmazova uvelike usporedivi s onima kod sisavaca (Clark i Baxter, 2000). Zanimljivo istraživanje na modelu partenogenetskog guštera *Cnemidophorus uniparens* pokazalo je da aktivacija 5Htr1a receptora inhibira zaskakivanje, ponašanje specifično za mužjake, dok aktivacija drugog podtipa serotoninskog receptora, 5Htr2a, potiče receptivno ponašanje tipično za ženke. Ovi rezultati ukazuju na to da serotonin, djelujući putem receptora,

služi kao ključan neuroendokrini mehanizam koji omogućuje prebacivanje između različitih bihevioralnih stanja (Dias i Crews, 2008).

Važno je naglasiti da promjene u ekspresiji serotoninskih receptora ne moraju nužno izravno odražavati promjene u koncentraciji samog neurotransmitera, već mogu predstavljati kompenzacijske ili regulatorne mehanizme unutar serotoninskog sustava. Povišena ekspresija *5Htr1a* kod mužjaka *P. siculus* mogla bi predstavljati regulatorni odgovor na specifičan serotoninski profil ove skupine. U sustavu u kojem je serotoninska signalizacija pojačano modulirana, povećana gustoća receptora 5Htr1a može pridonijeti istančanijoj regulaciji osjetljivosti neuronskih mreža te modulaciji impulzivnosti i bihevioralne fleksibilnosti (Oliver i sur., 2022).

Gen *5Htr2b* kodira serotoninski receptor 5Htr2b koji sudjeluje u modulaciji serotoninske signalizacije i regulaciji različitih bihevioralnih i fizioloških procesa. Iako je funkcija ovog receptora u središnjem živčanom sustavu slabije istražena u odnosu na 5Htr1a, literaturni podaci upućuju na njegovu važnu ulogu u regulaciji ponašanja, osjetljivosti na promjene u serotoninskom sustavu te u interakciji serotoninskog sustava s neuroplastičnim i upalnim mehanizmima (D'Andrea i sur., 2020; Turkin i sur., 2025). U našem istraživanju ekspresija gena *5Htr2b* pokazala je statistički značajan učinak vrste, pri čemu je vrsta *P. melisellensis* pokazala višu razinu ekspresije u odnosu na *P. siculus*. Utvrđen je i značajan učinak spola, pri čemu su mužjaci pokazali višu ekspresiju ovog gena u odnosu na ženke, dok interakcija vrste i spola nije bila statistički značajna. Istraživanja na različitim modelnim organizmima pokazuju da promjene u funkciji 5Htr2b receptora mogu utjecati na socijalno ponašanje te regulaciju emocionalnih i fizioloških odgovora. Istraživanja na glodavcima upućuju na to da se ekspresija ovog receptora u hipokampusu prilagođava razini dostupnog 5HT. Primjerice, kod štakora s manjkom 5HT u mozgu zabilježen je značajan porast ekspresije gena *5Htr2b*, što sugerira da stanice povećavaju broj receptora kako bi kompenzirale nedostatak neurotransmitera (Turkin i sur., 2025). Studije na miševima pokazuju da nedostatak ili blokada receptora 5Htr2b povećava osjetljivost na serotoninski sindrom (prekomjernu

akumulaciju 5HT u organizmu), što upućuje na to da ovaj receptor ima zaštitnu ulogu u ublažavanju akutne serotoninske toksičnosti, odnosno sprječavanju pretjerane aktivacije sustava pri vrlo visokim razinama 5HT (Diaz i Maroteaux, 2011). Niska razina aktivnosti ili genetički polimorfizmi koji smanjuju funkciju 5Htr2b u miševa, ali i ljudi, sustavno se povezuju s naglašenom impulzivnošću (Bevilacqua i sur., 2010; Delprato i sur., 2018), suicidalnim ponašanjem i poteškoćama u socijalnoj interakciji (Pitychoutis i sur., 2015). Dodatno, istraživanja na drugim modelnim organizmima ukazuju na povezanost 5Htr2b sa socijalnim i emocionalnim ponašanjem. Kod vinskih mušica (*Drosophila melanogaster*) pokazano je da smanjena funkcija 5Htr2b dovodi do poremećaja socijalne interakcije i pojačanih repetitivnih obrazaca ponašanja, što upućuje na to da je ovaj receptor važan za normalnu regulaciju socijalnog odgovora (Cao i sur., 2022).

U kontekstu naših rezultata, viša ekspresija *5Htr2b* kod vrste *P. melisellensis* mogla bi upućivati na drugačiji obrazac osjetljivosti ili kompenzacijske regulacije serotoninskog sustava u odnosu na *P. siculus*. Budući da je u ovom istraživanju *P. melisellensis* pokazala višu ekspresiju *5htr2b*, dok su razlike u razinama serotoninskih analita bile izraženije u okviru serotoninskog profila vrste *P. siculus*, moguće je da varijacije u ekspresiji ovog receptora odražavaju različite regulatorne strategije odgovora na serotoninsku signalizaciju. Ovakav obrazac upućuje na to da se razlike u serotoninskom sustavu između ovih dviju vrsta ne odvijaju samo na razini sinteze i razgradnje 5HT, već i na razini osjetljivosti receptora i regulacije signalnog odgovora.

5.2.5 Integrativna analiza serotoninskog sustava

5.2.5.1 Korelacije između neurokemijskih i molekularnih pokazatelja

Dodatni uvid u međusobne odnose neurokemijskih i molekularnih pokazatelja pruža analiza korelacija između izmjerenih varijabli. Unutar skupine neurokemijskih analita zabilježena je snažna međusobna povezanost, pri čemu su posebno izražene korelacije između DA i 5HT te između TYR i TRP. Vrlo jaka korelacija između DA i 5HT upućuje na blisku metaboličku i funkcionalnu povezanost dopaminskog i serotoninskog sustava u mozgu guštera, što je potvrđeno

i recentnim eksperimentalnim istraživanjima koja pokazuju njihovu koordiniranu ulogu u regulaciji ponašanja i učenja (Cardozo Pinto i sur., 2024). Slično tome, visoka korelacija njihovih prekursora TYR i TRP ukazuje na ujednačen transport i dostupnost aromatskih aminokiselina potrebnih za sintezu neurotransmitera. Ovakvi rezultati u skladu su s ustaljenom tezom prema kojoj stopa sinteze neurotransmitera u mozgu izravno ovisi o dostupnosti odgovarajućih prekursora u samim neuronima (Fernstrom, 1981). Umjerene korelacije između DA i NA, DA i 5-HIAA te između 5HT i 5-HIAA dodatno potvrđuju funkcionalnu povezanost monoaminskih sustava. DA je prekursor NA, dok 5-HIAA, kao glavni metabolit 5HT, nastaje njegovom razgradnjom, što upućuje na to da su više razine neurotransmitera praćene višim razinama prekursora i metabolita unutar istih metaboličkih puteva. Korelacija između DA i 5-HIAA može odražavati širu metaboličku koordinaciju između dopaminskog i serotoninskog sustava.

Unutar skupine gena zabilježene su umjerene do slabe korelacije. Umjerena pozitivna korelacija između ekspresije *5Htr2b* i *MaoA*, može odražavati zajednički regulatorni odgovor na promjene u serotoninskom sustavu, upućujući na koordiniranu regulaciju receptora i enzima uključenih u razgradnju 5HT. Također, slabe pozitivne korelacije između *MaoA* i *MaoB* mogu biti posljedica njihove funkcionalne srodnosti i djelomično preklapajućih regulatornih mehanizama u održavanju homeostaze monoamina. Slabe pozitivne korelacije između *5Htr1a* i *MaoB* sugeriraju koordiniranu regulaciju ekspresije ovih gena unutar monoaminskog sustava, vjerojatno u svrhu homeostatske kontrole. Nasuprot tome, korelacije između ekspresije gena i razina analita nisu dosegle prag statističke značajnosti, što upućuje na to da transkripcijska regulacija nije primarni čimbenik koji određuje uočene razlike u serotoninskom sustavu između *P. siculus* i *P. melisellensis*, već da one vjerojatno proizlaze iz posttranskripcijskih, translacijskih i degradacijskih mehanizama regulacije proteinske aktivnosti (Vogel i Marcotte, 2012) ili razlika u brzini oslobađanja i ponovnog unosa (eng. *reuptake*) neurotransmitera. Stoga, dobiveni rezultati upućuju na složenu i dinamičnu regulaciju monoaminskih sustava, u kojoj su transkripcijski i biokemijski mehanizmi međusobno povezani, ali ne nužno izravno ovisni.

5.2.5.2 Neurobiološka podloga bihevioralnih razlika: Integracija neurokemijskih, molekularnih i bihevioralnih pokazatelja

Integracija rezultata neurokemijskih analiza, omjera metabolički povezanih spojeva i ekspresije gena pruža cjelovit uvid u funkcionalnu organizaciju serotoninskog sustava u mozgu dviju promatranih vrsta te čini molekularno-biokemijsku podlogu koja bi mogla pojasniti prethodno opisane razlike u ponašanju. Rezultati dobiveni u sklopu ovog istraživanja dosljedno upućuju na razlike između *P. siculus* i *P. melisellensis* koje se odvijaju unutar serotoninskog sustava: na razini dostupnosti serotonina, njegove razgradnje i receptorske regulacije.

Vrsta *P. siculus* pokazala je više razine 5-HIAA na razini učinka vrste, dok su za TRP i 5HT uočeni obrasci koji ovise o spolu, pri čemu se posebno izdvajaju mužjaci *P. siculus*. Pritom je za TRP utvrđen i značajan učinak vrste, uz više vrijednosti kod mužjaka *P. siculus* u odnosu na sve ostale skupine. Takav obrazac ne upućuje na jednostavno povećanje 5HT kod jedne od promatranih vrsta, nego na kompleksniju i spolno specifičnu modulaciju serotoninskog metaboličkog puta. Stabilan omjer 5HT/TRP, koji upućuje na stabilnu učinkovitost sinteze 5HT, i nepromijenjena ekspresija gena *Tph2* među vrstama isključuje sintezu kao primarni izvor uočenih razlika. Unatoč povišenim razinama 5HT i 5-HIAA kod mužjaka vrste *P. siculus*, niži omjer 5-HIAA/5HT ukazuje na smanjenu serotoninsku razgradnju, što je u skladu s nižom ekspresijom gena *MaoA* te upućuje na to da razlike između vrsta proizlaze iz promjena u razgradnji, a ne sintezi serotonina. Sličan obrazac opisali su Summers i sur. (2005) kod guštera *Anolis carolinensis*, gdje su dominantni i agresivniji mužjaci pokazivali niži bazalni omjer 5-HIAA/5HT u specifičnim moždanim regijama prije agresivne interakcije. U tom kontekstu, niže vrijednosti ovog omjera kod mužjaka vrste *P. siculus* mogu odražavati smanjenu razgradnju 5HT i njegovu veću dostupnost, potencijalno povezanu s izraženijim istraživačkim i kompetitivnim ponašanjem. Suprotno tome, povišeni omjer 5-HIAA/5HT u ženki vrste *P. siculus* upućuje na spolno specifičnu modulaciju serotoninske razgradnje unutar iste vrste. Nadalje, u našem istraživanju vrsta *P. siculus* pokazala je višu ekspresiju gena *5Htr1a*, dok je kod *P. melisellensis* zabilježena viša ekspresija *5Htr2b*. Budući da receptor 5Htr1a djeluje kao inhibitorni regulator serotoninske neurotransmisije i sudjeluje u

negativnoj povratnoj sprezi oslobađanja 5HT, njegova povišena ekspresija kod vrste *P. siculus* može predstavljati kompenzacijski mehanizam u uvjetima povišene dostupnosti 5HT. S druge strane, receptor 5Htr2b povezuje se s postsinaptičkom signalizacijom, što može upućivati na razlike u načinu odgovora neuronskih mreža između promatranih vrsta. Ovakav komplementaran obrazac ekspresije receptora dodatno potvrđuje da se razlike između vrsti *P. siculus* i *P. melisellensis* ne odvijaju samo na razini 5HT, već i na razini njegove signalizacije. Dublje razumijevanje ovih odnosa pruža analiza korelacija, koja je pokazala snažnu međusobnu povezanost monoaminskih sustava, umjerene korelacije gena uključenih u razgradnju i signalizaciju, dok su se korelacije između genske ekspresije i razina monoaminskih analita pokazale slabima, što dodatno upućuje na kompleksnu regulaciju različitih komponentni serotoninskog sustava, koja se odvija na više razina.

Prethodno dokumentirana dominantnost *P. siculus* nad *P. melisellensis* u interspecijskim susretima (Downes i Bauwens, 2002), kao i njezin invazivni potencijal i kompetitivna isključivost (Herrel i sur., 2008), u ovom istraživanju dobivaju neurobiološku interpretaciju. Rezultati upućuju na to da se razlike ne temelje na izoliranim promjenama, već na koordiniranim pomacima unutar serotoninskog sustava. Posebnu vrijednost ovim rezultatima daje činjenica da su neurokemijske i molekularne analize u ovom radu provedene na jedinkama za koje su prethodno bili prikupljeni podaci bihevioralnih istraživanja (Gojak i sur., 2026) u okviru istog projekta. Takav pristup omogućio je izravno povezivanje serotoninskog profila s ponašanjem istih jedinki, što predstavlja rijedak i metodološki vrijedan pristup u neuroetološkim istraživanjima. Tako su Gojak i sur. (2026), opisali da je *P. siculus* bila aktivnija i pokazivala izraženiju sklonost prema novim objektima (neofilija) i istraživačkom ponašanju u odnosu na *P. melisellensis*, dok su mužjaci obiju vrsta pokazivali izraženiju neofiliju u odnosu na ženke. Mužjaci vrste *P. siculus* isticali su se češćim promjenama smjera kretanja, prelaženjem većih udaljenosti te bržim i učestalijim stupanjem u kontakt s novim objektom u usporedbi s ostalim skupinama. Objedinjeni neurokemijski i molekularni profil mužjaka *P. siculus* uključuje povišene razine TRP i 5-HIAA, trend viših razina 5HT, niži omjer 5-HIAA/5HT, nižu ekspresiju *MaoA* te višu ekspresiju *5Htr1a*, što upućuje na razlike u regulaciji serotoninskog sustava, prvenstveno na razini razgradnje i signalizacije 5HT, koje

bi mogle biti povezane s uočenim razlikama u ponašanju ove skupine. Dobiveni serotoninski profil stoga može pružiti neurobiološku podlogu za prethodno opisane razlike između vrsta, gdje *P. siculus* redovito pokazuje veću neofiliju i aktivnost, izraženije istraživačko ponašanje i učinkovitije iskorištavanje resursa u odnosu na *P. melisellensis*, što se nalaže kao ključ njene kompetitivne superiornosti u uvjetima simpatrije (Downes i Bauwens, 2002; Limnios i sur., 2022; Damas-Moreira i sur., 2024; Gojak i sur., 2026). U skladu s time, Glogoški i sur., (2024) navode da *P. siculus* pokazuje izraženije istraživačko ponašanje, veći unos hrane, ali i manju sklonost rizičnom ponašanju na nepoznatom teritoriju u odnosu na *P. melisellensis*. Takva kombinacija visoke eksploratornosti i manje sklonosti riziku može predstavljati adaptivnu strategiju u uvjetima interspecijske kompeticije. Veza između serotoninskog sustava i ovakvih bihevioralnih obrazaca ima čvrstu neurobiološku osnovu. Istraživanja na štakorima s eksperimentalno smanjenom razinom 5HT pokazala su smanjenu sklonost istraživačkom ponašanju, dok su modeli s povišenom razinom 5HT pokazali povećanu eksplorativnost i smanjeno anksiozno ponašanje (Hranilovic i sur., 2011; Blazevic i sur., 2012).

Uzevši sve u obzir, može se pretpostaviti da specifičan serotoninski profil mužjaka vrste *P. siculus*, obilježen trendom viših razina 5HT, smanjenom razgradnjom i specifičnom receptorskom regulacijom, omogućuje finiju modulaciju ponašanja i fleksibilniji odgovor na okolišne podražaje. Zaključno, rezultati ovog istraživanja upućuju na to da se razlike između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis* ne temelje na pojedinačnim promjenama unutar serotoninskog puta, već na koordiniranim promjenama u sintezi, razgradnji i signalizaciji, koje zajedno oblikuju funkcionalni serotoninski profil. Upravo takav kompleksni obrazac potencijalno predstavlja jedan od neurobioloških mehanizama povezanih s njihovim različitim bihevioralnim strategijama i kompetitivnom uspješnosti u prirodnim uvjetima.

5.2.6 Analiza ciljeva istraživanja u kontekstu dobivenih rezultata

U skladu s prvim specifičnim ciljem, u okviru istraživanja uspješno je razvijena i optimizirana analitička metoda temeljena na spregnutom sustavu tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti i spektrometrije masa (HPLC-MS/MS), namijenjena istodobnom praćenju 11 ciljanih analita: monoamina (DA, NA, A, 5HT), njihovih prekursora (TYR, TRP, 5-HTP, L-DOPA) i metabolita (HVA, VMA, 5-HIAA), uz dodatak unutarnjeg standarda (DHBA). Iako je metoda uspješno razvijena i validirana, potencijalno zbog specifične kemijske prirode i općenito nižih razina u biološkom matriksu u odnosu na druge analite, HVA, VMA, 5-HTP i L-DOPA nisu mogli biti pouzdano kvantificirani u uzorcima male mase polutki mozga guštera. Usprkos tom ograničenju, metoda se može koristiti na širokom spektru bioloških uzoraka, potencijalno i uspješnije na uzorcima veće mase i/ili, za organizme za koje postoje stereotaksijski atlas, u specifično ciljanim moždanim regijama. U našem istraživanju, usprkos ograničenjima, primjenom ove metode uspješno smo izmjerili 7 analita DA, NA, A, 5HT, TYR, TRP i 5-HIAA te detaljnije okarakterizirali monoaminske profile mozga dviju promatranih vrsta.

Rezultati dobiveni u okviru drugog cilja ovog istraživanja upućuju na postojanje razlika u serotoninskom sustavu mozga između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*. Pritom su najjasnije razlike utvrđene za prekursor TRP i glavni metabolit serotonina 5-HIAA, dok je za sam 5HT uočen obrazac koji ovisi o interakciji vrste i spola. Osobito su se izdvajali mužjaci vrste *P. siculus*, kod kojih su zabilježene povišene razine TRP u odnosu na sve ostale skupine te više razine 5HT u odnosu na ženke iste vrste, dok je za 5-HIAA potvrđen jasan učinak vrste, pri čemu je *P. siculus* pokazala više vrijednosti u odnosu na *P. melisellensis*. Ovi rezultati upućuju na mogućnost različite regulacije serotoninske signalizacije između promatranih vrsta, ali i na spolno specifičnu modulaciju razina TRP i 5HT unutar vrste *P. siculus*. Dodatno, omjer 5-HIAA/5HT pokazao je spolno specifičan obrazac unutar vrste *P. siculus*, pri čemu su ženke imale više vrijednosti u odnosu na mužjake iste vrste, što upućuje na razlike u regulaciji razgradnje serotonina. Uočeni obrasci potencijalno mogu biti povezani s prethodno opisanim bihevioralnim razlikama između populacija vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis*.

Stoga je u okviru trećeg cilja analizirana ekspresija odabranih gena uključenih u metabolički put serotonina. Dobiveni rezultati pokazali su da razlike među vrstama u serotoninskom sustavu vjerojatno nisu primarno povezane s promjenama u sintezi serotonina, budući da ekspresija gena *Tph2* nije pokazala značajne razlike. S druge strane, uočene su razlike u ekspresiji gena uključenih u razgradnju i signalizaciju serotonina. Niža ekspresija gena *MaoA* (smanjena razgradnja 5HT) kod vrste *P. siculus* potencijalno može pridonositi specifičnom serotoninskom profilu zabilježenom u toj vrsti. Razlike u ekspresiji gena za serotoninske receptore također upućuju na mogućnost različite osjetljivosti neuronskih mreža na serotoninsku signalizaciju između promatranih vrsta. Pritom je *P. siculus* pokazala višu ekspresiju *5Htr1a* (inhibitorni autoreceptor uključen u regulaciju oslobađanja 5HT), dok je kod vrste *P. melisellensis* zabilježena viša ekspresija *5Htr2b* (uključen u modulaciju serotoninske signalizacije i osjetljivosti neurona na 5HT). Dodatno, za oba receptora utvrđen je statistički značajan glavni učinak spola, pri čemu su mušjaci obje vrste pokazali višu razinu ekspresije u odnosu na ženke. Ovakav obrazac upućuje na to da spol može imati važnu ulogu u modulaciji osjetljivosti neuronskih mreža na serotoninsku signalizaciju unutar promatranih vrsta. Međutim, razumijevanje biološkog značaja ovih spolnih razlika zahtijeva dodatne analize i usporedbu s bihevioralnim profilima, koji nadilaze okvire ovog istraživanja.

Objedinjeno promatranje rezultata neurokemijskih i molekularnih analiza sugerira da se razlike u serotoninskom sustavu između vrsta *P. siculus* i *P. melisellensis* ne odvijaju samo na razini sinteze i razgradnje serotonina, već i na razini receptorske osjetljivosti i regulacije signalnog odgovora (Tablica 21.). Iako se svi neurokemijski pokazatelji nisu mijenjali na isti način, ukupni rezultati upućuju na neurokemijsku diferencijaciju između promatranih skupina unutar serotoninskog sustava. Ovakav integrirani pristup, koji sjedinjuje neurokemijsku analizu i analizu genske ekspresije, pruža čvrstu i vrijednu osnovu za daljnja istraživanja neurobioloških mehanizama koji oblikuju ponašanje i adaptaciju kod guštera roda *Podarcis* te ujedno pridonosi proširenju izbora modelnih organizama u neurobiološkim istraživanjima.

Tablica 21. Sažeti prikaz glavnih statističkih učinaka i razlika unuta serotoninskog sustava između vrsta *Podarcis siculus* (PS) i *Podarcis melisellensis* (PM) te između spolova.

Parametar	Učinak vrste	Učinak spola	Interakcija vrsta × spol	Glavni obrazac
TRP	✓ PS > PM	✓	✓	PS♂ > PS♀, PM♀, PM♂
5HT	–	✓	✓	PS♂ > PS♀
5-HIAA	✓ PS > PM	–	–	PS > PM
5-HIAA/5HT	trend PS > PM	✓	✓	PS♀ > PS♂, PM♀, PM♂
<i>MaoA</i>	✓ PM > PS	–	–	PM > PS
<i>5Htr1a</i>	✓ PS > PM	✓	trend	PS > PM; ♂ > ♀
<i>5Htr2b</i>	✓ PM > PS	✓	–	PM > PS; ♂ > ♀

6 ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja omogućuju integrirani uvid u neurokemijsku i molekularnu regulaciju monoaminskih sustava u mozgu dviju simpatrijskih vrsta guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis*. Analizom razina monoamina, njihovih prekursora i metabolita te ekspresije odabranih gena uključenih u metabolički put serotonina dobiveni su podaci koji pridonose razumijevanju neurobiološke podloge prethodno opisanih razlika u ponašanju između ove dvije vrste.

Metodološki doprinos:

- Uspješno je razvijena, optimizirana i validirana osjetljiva HPLC-MS/MS metoda koja omogućuje simultanu kvantifikaciju 11 analita (monoamina, prekursora i metabolita).
- Primjenom tandemske spektrometrije masa (MS/MS) uz minimiziranu predanalitičku pripremu (modificirana LLE ekstrakcija bez derivatizacije) postiglo se očuvanje integriteta kemijski labilnih analita i visoka selektivnost analize.
- Primjenom kombinirane korekcije unutarnjim i vanjskim standardom uspješno je kompenzirana varijabilnost matriksa i instrumentalna nestabilnost između analitičkih ciklusa.
- HVA, VMA, L-DOPA i 5HTP nisu mogli biti kvantificirani u biološkim uzorcima zbog izuzetno niskih fizioloških koncentracija i brze metaboličke konverzije u moždanom tkivu guštera male mase; svi ostali analiti (DA, NA, A, 5HT, TYR, TRP, 5-HIAA) uspješno su kvantificirani.

Razlike u razinama monoamina između vrsta

- Monoaminski neurotransmiteri nisu pokazali konzistentne razlike između *P. siculus* i *P. melisellensis* na razini glavnog učinka vrste; za DA, NA i 5HT zabilježena je statistički značajna interakcija vrste i spola, pri čemu su mužjaci *P. siculus* pokazali više razine u odnosu na sve ostale skupine.
- Razine A i TYR nisu pokazale značajne razlike između vrsta, spolova te u interakciji vrste i spola.
- Analiti uključeni u serotoninski metabolički put predstavljaju najpotpunije karakterizirano područje neurokemijske divergencije između proučavanih vrsta: *P. siculus* pokazuje više razine prekursora TRP i glavnog metabolita 5-HIAA u usporedbi s *P. melisellensis*.
- Za TRP zabilježena je statistički značajna interakcija vrste i spola, s posebno izraženim razlikama kod mužjaka *P. siculus*.
- Za 5-HIAA utvrđen je jasan učinak vrste bez interakcije sa spolom, što ga čini najkonzistentnijim pokazateljem razlika među promatranim vrstama.
- Analiza metaboličkih omjera pokazala je da je učinkovitost sinteze 5HT iz TRP (omjer 5HT/TRP) podjednaka između vrsta, dok je omjer 5-HIAA/5HT, koji odražava relativnu razinu razgradnje 5HT, pokazao spolno specifičan obrazac unutar *P. siculus*: ženke imaju značajno više vrijednosti od mužjaka iste vrste i od oba spola *P. melisellensis*, upućujući na spolno specifičnu modulaciju serotoninske razgradnje.

Razlike u ekspresiji gena serotoninskog puta

- Ekspresija gena *Tph2* nije pokazala statistički značajne razlike između vrsta ni spolova, što zajedno sa stabilnim omjerom 5HT/TRP isključuje sintezu kao primarni izvor uočenih neurokemijskih razlika
- Vrsta *P. siculus* pokazuje značajno nižu ekspresiju gena *MaoA*, što objašnjava smanjenu razgradnju i posljedično višu dostupnost serotonina u mozgu ove kompetitivno superiorne vrste.
- Ekspresija *MaoB* nije pokazala značajne razlike između vrsta.
- *P. siculus* pokazuje višu ekspresiju inhibitornog autoreceptora *5Htr1a*, dok *P. melisellensis* pokazuje višu ekspresiju *5Htr2b*, što upućuje na razlike u receptorskoj osjetljivosti i regulaciji signalnog odgovora između ove dvije vrste.
- Za oba ispitivana receptora (*5Htr1a* i *5Htr2b*) utvrđen je statistički značajan glavni učinak spola, pri čemu su mužjaci obiju vrsta pokazuju višu razinu ekspresije u odnosu na ženke, što upućuje na spolno specifičnu modulaciju serotoninske signalizacije unutar promatranih vrsta.

Integrativni zaključak

- Korelacijska analiza pokazala je snažnu međusobnu povezanost neurokemijskih analita i umjerene korelacije između gena, dok su korelacije između ekspresije gena i razina analita bile slabe i statistički neznačajne, što upućuje na posttranskripcijsku regulaciju kao važnu razinu kontrole serotoninskog metabolizma.

- Razlike između *P. siculus* i *P. melisellensis* ne temelje se na izoliranim promjenama već na koordiniranim pomacima unutar serotoninskog sustava - na razini dostupnosti neurotransmitera, kapaciteta razgradnje i receptorske signalizacije
- Objedinjeni neurokemijski i molekularni profil konzistentan je s dokumentiranim bihevioralnim razlikama između vrsta, pri čemu je viša dostupnost 5HT, niska ekspresija *MaoA* i specifična receptorska regulacija mužjaka *P. siculus* usklađen s većom aktivnošću, neofilijom i kompetitivnom superiornosti u odnosu na *P. melisellensis*.
- Integracijom neurokemijskih, molekularnih i bihevioralnih podataka dobivenih na istim jedinkama, ovo istraživanje pruža jedan od prvih izravnih uvida u neurobiološku osnovu kompetitivne asimetrije između ovih dviju vrsta guštera, upućujući na to da su njihove različite bihevioralne strategije u simpatriji rezultat koordiniranih promjena unutar serotoninskog sustava.

7 LITERATURA

- Abed, A. B., Al-Bakri, N. A., & Selman, M. O. (2018). Analysis of amino acids of the brain in embryo and adult of quail. *Iraqi Journal of Embryos and Infertility Researches*, 8(1), 1. <https://www.researchgate.net/publication/335395913>
- Ajtic, R., Böhme, W., Lymberakis, P., Crnobrnja Isailovic, J., & Sindaco, R. (2009). *Podarcis melisellensis*, Dalmatian wall lizard. The IUCN Red List of Threatened Species 2008. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2009.RLTS.T61549A12513547.en>
- Albert, P. R., & Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT_{1A} receptor: Signaling to behavior. *Biochimie*, 161, 34–45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2018.10.015>
- Aleksandrova, Y. (2019). Neuroendocrine control of maternal behaviour in birds [Doctoral dissertation]. <https://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/PQDT:68456884>
- Alwindi, M., & Bizanti, A. (2023). Vesicular monoamine transporter (VMAT) regional expression and roles in pathological conditions. *Heliyon*, 9(11), e22413. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e22413>
- Andrade, P., Pinho, C., de Lanuza, G. P., Afonso, S., Brejcha, J., Rubin, C. J., Wallerman, O., Pereira, P., Sabatino, S. J., Bellati, A., Pellitteri-Rosa, D., Bosakova, Z., Bunikis, I., Carretero, M. A., Feiner, N., Marsik, P., Paupério, F., Salvi, D., Soler, L., & Carneiro, M. (2019). Regulatory changes in pterin and carotenoid genes underlie balanced color polymorphisms in the wall lizard. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(12), 5633–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820320116>
- Arnold, E. N. (1987). Resource partition among lacertid lizards in southern Europe. *Journal of Zoology*, 1(4), 739–782. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1987.tb00753.x>
- Arnold, E. N., Arribas, O., & Carranza, S. (2007). Systematics of the Palearctic and Oriental lizard tribe Lacertini (Squamata: Lacertidae: Lacertinae), with descriptions of eight new genera. Magnolia Press.

- Aston-Jones, G., & Cohen, J. D. (2005). An integrative theory of locus coeruleus-norepinephrine function: Adaptive gain and optimal performance. *Annual Review of Neuroscience*, 28, 403–450. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.28.061604.135709>
- Azizi, S. A. (2022). Monoamines: Dopamine, norepinephrine, and serotonin, beyond modulation, “switches” that alter the state of target networks. *The Neuroscientist*, 28(2), 121–143. <https://doi.org/10.1177/1073858420974336>
- Bacqué-Cazenave, J., Bharatiya, R., Barrière, G., Delbecque, J. P., Bouguiyou, N., Di Giovanni, G., Cattaert, D., & De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonin in animal cognition and behavior. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1649. <https://doi.org/10.3390/ijms21051649>
- Baluchová, S., Barek, J., Tomé, L. I. N., Brett, C. M. A., & Schwarzová-Pecková, K. (2018). Vanillylmandelic and homovanillic acid: Electroanalysis at non-modified and polymer-modified carbon-based electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 821, 22–32. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.03.011>
- Banerjee, P., Mehta, M., & Kanjilal, B. (2007). The 5-HT_{1A} receptor: A signaling hub linked to emotional balance. In A. Chattopadhyay (Ed.), *Serotonin receptors in neurobiology* (pp. 151–174). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420005752-12>
- Bargmann, C. I. (2012). Beyond the connectome: How neuromodulators shape neural circuits. *BioEssays*, 34(6), 458–465. <https://doi.org/10.1002/bies.201100185>
- Bassitta, M., Brown, R. P., Pérez-Cembranos, A., Pérez-Mellado, V., Castro, J. A., Picornell, A., & Ramon, C. (2021). Genomic signatures of drift and selection driven by predation and human pressure in an insular lizard. *Scientific Reports*, 11(1), 6136. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85591-x>
- Baumgarten, H. G. (1968). Catecholamines in the brain of lizard (*Lacerta viridis* and *Lacerta muralis*). *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 86(4), 574–602.

- Becker, S., Schulz, A., Kreyer, S., Dreßler, J., Richter, A., & Helmschrodt, C. (2023). Sensitive and simultaneous quantification of 16 neurotransmitters and metabolites in murine microdialysate by fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 253, 123965. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123965>
- Bejaković, D., Aleksić, I., Kalezić, M. L., Džukić, G., & Crnobrnja-Isailović, J. (1995). Reproductive cycle and clutch traits in the Dalmatian wall lizard (*Podarcis melisellensis*). *Folia Zoologica*, 44(4), 371–380.
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bergmann, M. L., & Schmedes, A. (2020). Highly sensitive LC-MS/MS analysis of catecholamines in plasma. *Clinical Biochemistry*, 82, 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2020.03.006>
- Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., Belmer, A., Colin, A. H., Dell'Osso, L., Suvisaari, J., Coccaro, E., Rose, R. J., Peltonen, L., Virkkunen, M., & Goldman, D. (2010). A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature*, 468(7327), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/nature09629>
- Bicker, J., Fortuna, A., Alves, G., & Falcão, A. (2013). Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples: A review. *Analytica Chimica Acta*, 768(1), 12–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.12.030>
- Blazevic, S. A., Colic, L., Culig, L., & Hranilovic, D. (2012). Anxiety-like behavior and cognitive flexibility in adult rats perinatally exposed to increased serotonin concentrations. *Behavioural Brain Research*, 230(1), 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2012.02.001>
- Blazevic, S. A., Glogoski, M., Nikolic, B., Hews, D. K., Lisicic, D., & Hranilovic, D. (2020). Differences in cautiousness between mainland and island *Podarcis siculus* populations are paralleled by differences in brain noradrenaline/adrenaline concentrations. *Physiology & Behavior*, 224, 113072. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2020.113072>

- Bortolato, M., Chen, K., Godar, S. C., Chen, G., Wu, W., Rebrin, I., Farrell, M. R., Scott, A. L., Wellman, C. L., & Shih, J. C. (2011). Social deficits and perseverative behaviors, but not overt aggression, in MAO-A hypomorphic mice. *Neuropsychopharmacology*, 36(13), 2674–2688. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.157>
- Bortolato, M., Godar, S. C., Alzghoul, L., Zhang, J., Darling, R. D., Simpson, K. L., Bini, V., Chen, K., Wellman, C. L., Lin, R. C. S., & Shih, J. C. (2013). Monoamine oxidase A and A/B knockout mice display autistic-like features. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16(4), 869–888. <https://doi.org/10.1017/S1461145712000715>
- Bortolato, M., Godar, S. C., Davarian, S., Chen, K., & Shih, J. C. (2009). Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice. *Neuropsychopharmacology*, 34(13), 2746–2757. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.118>
- Bosse, K. E., Birbeck, J. A., Newman, B. D., & Mathews, T. A. (2017). Analysis of neurotransmitters and their metabolites by liquid chromatography. *Liquid Chromatography: Applications*, 2, 665–725. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805392-8.00021-9>
- Bourcier, S., Benoist, J. F., Clerc, F., Rigal, O., Taghi, M., & Hoppilliard, Y. (2006). Detection of 28 neurotransmitters and related compounds in biological fluids by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(9), 1405–1421. <https://doi.org/10.1002/rcm.2459>
- Bowles, P. (2024). *Podarcis melisellensis*; IUCN Red List of Threatened Species. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2024-1.RLTS.T61549A137855479.en>
- Bustin, S. A., Beaulieu, J. F., Huggett, J., Jaggi, R., Kibenge, F. S. B., Olsvik, P. A., Penning, L. C., & Toegel, S. (2010). MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. *BMC Molecular Biology*, 11(1), 74. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-74>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines:

Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/CLINCHEM.2008.112797>

Campos, S. M., Erley, A., Ashraf, Z., & Wilczynski, W. (2022). Signaler's vasotocin alters the relationship between the responder's forebrain catecholamines and communication behavior in lizards (*Anolis carolinensis*). *Brain, Behavior and Evolution*, 97(3–4), 184–196. <https://doi.org/10.1159/000524217>

Cao, H., Tang, J., Liu, Q., Huang, J., & Xu, R. (2022). Autism-like behaviors regulated by the serotonin receptor 5-HT2B in the dorsal fan-shaped body neurons of *Drosophila melanogaster*. *European Journal of Medical Research*, 27(1), 203. <https://doi.org/10.1186/s40001-022-00838-1>

Capula, M. (1992) Competitive exclusion between *Podarcis* lizards from Thyrrenian islands: inference from comparative species distributions. In: Korsos Z, Kiss I. (Ed.) Proceedings of the 6th Ordinary General Meeting Societas Europaea Herpetologica. Budapest, Hungary: Hungarian Natural History Museum, 89–93

Capula, M., & Aloise, G. (2011). Extreme feeding behaviours in the Italian wall lizard, *Podarcis siculus*. *Acta Herpetologica*, 6(1), 11–14.

Cardozo Pinto, D. F., Pomrenze, M. B., Guo, M. Y., Touponse, G. C., Chen, A. P. F., Bentzley, B. S., Eshel, N., & Malenka, R. C. (2024). Opponent control of reinforcement by striatal dopamine and serotonin. *Nature*, 639(8053), 143. <https://doi.org/10.1038/S41586-024-08412-X>

Carlson, B. A. (2012). Diversity matters: The importance of comparative studies and the potential for synergy between neuroscience and evolutionary biology. *Archives of Neurology*, 69(8), 987–993. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2012.77>

Chan, E. T., Quon, G. T., Chua, G., Babak, T., Trochesset, M., Zirngibl, R. A., Aubin, J., Ratcliffe, M. J. H., Wilde, A., Brudno, M., Morris, Q. D., & Hughes, T. R. (2009). Conservation of core gene expression in vertebrate tissues. *Journal of Biology*, 8(3), 33. <https://doi.org/10.1186/jbiol130>

- Chen, K., Holschneider, D. P., Wu, W., Rebrini, I., & Shih, J. C. (2004). A spontaneous point mutation produces monoamine oxidase A/B knock-out mice with greatly elevated monoamines and anxiety-like behavior. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39645–39652. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405550200>
- Chen, R., Chu, Q., Shen, C., Tong, X., Gao, S., Liu, X., Zhou, B., & Schinckel, A. P. (2019). Identification of single nucleotide polymorphisms in porcine MAOA gene associated with aggressive behavior of weaned pigs after group mixing. *Animals*, 9(11), 952. <https://doi.org/10.3390/ani9110952>
- Chivite, M., Leal, E., Míguez, J. M., & Cerdá-Reverter, J. M. (2021). Distribution of two isoforms of tryptophan hydroxylase in the brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): An in situ hybridization study. *Brain Structure and Function*, 226(7), 2265–2278. <https://doi.org/10.1007/s00429-021-02322-8>
- Choleris, E., Galea, L. A. M., Sohrabji, F., & Frick, K. M. (2018). Sex differences in the brain: Implications for behavioral and biomedical research. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 85, 126–145. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.07.005>
- Clark, E. C., & Baxter, L. R. (2000). Mammal-like striatal functions in *Anolis*. I. Distribution of serotonin receptor subtypes, and absence of striosome and matrix organization. *Brain, Behavior and Evolution*, 56(5), 235–248. <https://doi.org/10.1159/000047207>
- Crews, D., Sanderson, N., & Dias, B. G. (2009). Hormones, brain, and behavior in reptiles. *Hormones, Brain and Behavior*, 771–818. <https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00023-1>
- D’Andrea, I., Béchade, C., & Maroteaux, L. (2020). Serotonin and 5-HT2B receptors in microglia control of behavior. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 31, 589–599. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64125-0.00034-7>
- Damas-Moreira, I., Szabo, B., Drosopoulos, G., Stober, C., Lisičić, D., & Caspers, B. A. (2024). Smarter in the city? Lizards from urban and semi-natural habitats do not differ in a cognitive task in two syntopic species. *Current Zoology*, 70(3), 361. <https://doi.org/10.1093/cz/zoae010>

- Dang, L. C., O'Neil, J. P., & Jagust, W. J. (2012). Genetic effects on behavior are mediated by neurotransmitters and large-scale neural networks. *NeuroImage*, 63(1), 203. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.10.090>
- Davla, S., Daly, E., Nedow, J., Gritsas, A., Curran, L., Taylor, L., & van Meyel, D. J. (2023). An LC-MS/MS method for simultaneous analysis of up to six monoamines from brain tissues. *Journal of Chromatography B*, 1216, 123604. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2023.123604>
- Delprato, A., Bonheur, B., Algéio, M. P., Murillo, A., Dhawan, E., Lu, L., Williams, R. W., & Crusio, W. E. (2018). A quantitative trait locus on chromosome 1 modulates intermale aggression in mice. *Genes, Brain and Behavior*, 17(7), e12469. <https://doi.org/10.1111/GBB.12469>
- Dias, B. G., & Crews, D. (2008). Regulation of pseudosexual behavior in the parthenogenetic whiptail lizard, *Cnemidophorus uniparens*. *Endocrinology*, 149(9), 4622–4631. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0349>
- Diaz, S. L., & Maroteaux, L. (2011). Implication of 5-HT_{2B} receptors in the serotonin syndrome. *Neuropharmacology*, 61(3), 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2011.01.025>
- Doshi, E. C., Huggins, S. E., & Fitzgerald, J. M. (1975). Circadian rhythm in brain serotonin concentrations of lizard, *Anolis carolinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 51(2), 227–229.
- Downes, S. J., & Bauwens, D. (2002). Does reproductive state affect a lizard's behavior toward predator chemical cues? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 52(6), 444–450. <https://doi.org/10.1007/s00265-002-0538-3>
- Downes, S. J., & Bauwens, D. (2002). An experimental demonstration of direct behavioural interference in two Mediterranean lacertid lizard species. *Animal Behaviour*, 63(6), 1037–1046. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.3022>
- Downes, S. J., & Bauwens, D. (2004). Associations between first encounters and ensuing social relations within dyads of two species of lacertid lizards. *Behavioral Ecology*, 15(6), 938–945. <https://doi.org/10.1093/beheco/arh090>

- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., & Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 331–349. <https://doi.org/10.1124/pr.56.3.1>
- El-Beqqali, A., Kussak, A., & Abdel-Rehim, M. (2007). Determination of dopamine and serotonin in human urine samples utilizing microextraction online with liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 30(3), 421–424. <https://doi.org/10.1002/jssc.200600369>
- Emerson, A. J., Kappenman, D. P., Ronan, P. J., Renner, K. J., & Summers, C. H. (2000). Stress induces rapid changes in serotonergic activity: Restraint and exertion. *Behavioural Brain Research*, 111(1–2), 83–92. [https://doi.org/10.1016/S0166-4328\(00\)00143-1](https://doi.org/10.1016/S0166-4328(00)00143-1)
- Eo, J. W., Lee, H. E., Nam, G. H., Kwon, Y. J., Choi, Y., Choi, B. H., Huh, J. W., Kim, M., Lee, S. E., Seo, B., & Kim, H. S. (2016). Association of DNA methylation and monoamine oxidase A gene expression in the brains of different dog breeds. *Gene*, 580(2), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.022>
- European Medicines Agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf. (n.d.). Zadnje pristupljeno: 21. ožujka 2026.
- Fernandez, C. J., Hanna, F. W. F., Pacak, K., & Nazari, M. A. (2023). Catecholamines and blood pressure regulation. *Endocrine Hypertension*, 19–34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-96120-2.00010-8>
- Fernstrom, J. D. (1981). Effects of precursors on brain neurotransmitter synthesis and brain functions. *Diabetologia*, 20(1), 281–289. <https://doi.org/10.1007/BF00254494>
- Fernstrom, J. D., & Fernstrom, M. H. (2007). Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *The Journal of Nutrition*, 137(6), 1539S–1547S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1539s>

- Frazer, A., & Hensler, J. G. (1999). Serotonin. In G. J. Siegel (Ed.), *Basic neurochemistry: Molecular, cellular and medical aspects* (6th ed.). Lippincott-Raven.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK28150/>
- Gabrielli, M., Benazzo, A., Biello, R., Ancona, L., Fuselli, S., Iannucci, A., Balacco, J., Mountcastle, J., Tracey, A., Ficetola, G. F., Salvi, D., Sollitto, M., Fedrigo, O., Formenti, G., Jarvis, E. D., Gerdol, M., Ciofi, C., Trucchi, E., & Bertorelle, G. (2023). A high-quality reference genome for the critically endangered Aeolian wall lizard, *Podarcis raffonei*. *Journal of Heredity*, *114*(3), 279–285. <https://doi.org/10.1093/jhered/esad014>
- Gargaglioni, L. H., Bicego, K. C., & Branco, L. G. S. (2008). Brain monoaminergic neurons and ventilatory control in vertebrates. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, *164*(1–2), 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2008.04.017>
- Gasc, J. P., Cabela, A., Crnobrnja-Isailović, J., Dolmen, D., Grossenbacher, K., Haffner, P., Lescure, J., Martens, H., Martínez Rica, J. P., Maurin, H., Oliveira, M. E., Sofianidou, T. S., Veith, M., & Zuiderwijk, A. (Eds.). (1997). *Atlas of amphibians and reptiles in Europe*. Societas Europaea Herpetologica.
- Glogoški, M., Hocenski, K., Gojak, T., Blažević, S. A., Hranilović, D., & Lisičić, D. (2024). Behavioural traits for success: Comparison between two sympatric lacertid lizard species. *Animal Behaviour*, *218*, 263–273.
- Godar, S. C., Bortolato, M., Frau, R., Dousti, M., Chen, K., & Shih, J. C. (2011). Maladaptive defensive behaviours in monoamine oxidase A-deficient mice. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, *14*(9), 1195–1207.
<https://doi.org/10.1017/S1461145710001483>
- Gojak, T., Glogoški, M., Lisičić, D., & Blažević, S. A. (2026). Exploratory and neophilic behavior explain coexistence of two closely related lizard species. *Herpetologica*. (In press).
- Goldstein, D. S. (2012). Noradrenergic neurotransmission. *Primer on the Autonomic Nervous System*, 37–43. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386525-0.00006-8>

- Goldstein, D. S. (2021). The catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of catecholaminergic neurodegeneration: What we know and what we do not know. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5999. <https://doi.org/10.3390/ijms22115999>
- Gomez-Garrido, J., Cruz, F., Alioto, T. S., Feiner, N., Uller, T., Gut, M., Sanchez Escudero, I., Tavecchia, G., Rotger, A., Otalora Acevedo, K. E., & Baldo, L. (2023). Chromosome-level genome assembly of Lilford's wall lizard, *Podarcis lilfordi* (Günther, 1874) from the Balearic Islands (Spain). *DNA Research*, 30(3), dsad008. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsad008>
- Goridis, C., & Rohrer, H. (2002). Specification of catecholaminergic and serotonergic neurons. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(7), 531–541. <https://doi.org/10.1038/nrn871>
- Gorman, G. C., Soulé, M., Yang, S. Y., & Nevo, E. (1975). Evolutionary genetics of insular Adriatic lizards. *Evolution*, 29(1), 52–71. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1975.tb00813.x>
- Goult, M., Botton-Amiot, G., Rosato, E., Sprecher, S. G., & Feuda, R. (2023). The monoaminergic system is a bilaterian innovation. *Nature Communications*, 14(1), 3192. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39030-2>
- Grailhe, R., Cardona, A., Even, N., Seif, I., Changeux, J. P., & Cloëz-Tayarani, I. (2009). Regional changes in the cholinergic system in mice lacking monoamine oxidase A. *Brain Research Bulletin*, 78(6), 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.12.004>
- Grbac, I., & Bauwens, D. (2001). Constraints on temperature regulation in two sympatric *Podarcis* lizards during autumn. *Copeia*, 2001(1), 178–186. [https://doi.org/10.1643/0045-8511\(2001\)001\[0178:COTRIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1643/0045-8511(2001)001[0178:COTRIT]2.0.CO;2)
- Greco, S., Danysz, W., Zivkovic, A., Gross, R., & Stark, H. (2013). Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters: A versatile and sensitive LC-MS/MS method. *Analytica Chimica Acta*, 771, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.004>
- Greenberg, N. (1982). A forebrain atlas and stereotaxic technique for the lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of Morphology*, 174(2), 203–236.

- Güntürkün, O., Stacho, M., & Ströckens, F. (2016). The brains of reptiles and birds. *Evolution of Nervous Systems*, 171–221. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804042-3.00007-5>
- Hale, M. W., & Lowry, C. A. (2011). Functional topography of midbrain and pontine serotonergic systems: Implications for synaptic regulation of serotonergic circuits. *Psychopharmacology*, 213(2–3), 243–264. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2089-z>
- Harris-Warrick, R. M. (2011). Neuromodulation and flexibility in central pattern generator networks. *Current Opinion in Neurobiology*, 21(5), 685–692. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.05.011>
- Helmschrodt, C., Becker, S., Perl, S., Schulz, A., & Richter, A. (2020). Development of a fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous quantification of neurotransmitters in murine microdialysate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 7777–7787. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02906-z>
- Herrel, A., Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Backeljau, T., Breugelmans, K., Grbac, I., Van Damme, R., & Irschick, D. J. (2008). Rapid large-scale evolutionary divergence in morphology and performance associated with exploitation of a different dietary resource. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(12), 4792–4795. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711998105>
- Höglund, E., Øverli, Ø., & Winberg, S. (2019). Tryptophan metabolic pathways and brain serotonergic activity: A comparative review. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 158. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00158>
- Holeček, M. (2026). Serotonin, kynurenine, and indole pathways of tryptophan metabolism in humans in health and disease. *Nutrients*, 18(3), 507. <https://doi.org/10.3390/nu18030507>
- Hori, A., Nitta, T., Inamori, K. I., Kanoh, H., & Kuraishi, T. (2026). High-throughput single-fly LC–MS/MS for quantitative profiling of biogenic amines in *Drosophila*. *PLOS ONE*, 21(1), e0341188. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0341188>

- Hoyer, D., Hannon, J. P., & Martin, G. R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 71(4), 533–554. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(01\)00746-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(01)00746-8)
- Hranilovic, D., Blazevic, S., Ivica, N., Cicin-Sain, L., & Oresković, D. (2011). The effects of the perinatal treatment with 5-hydroxytryptophan or tranylcypromine on the peripheral and central serotonin homeostasis in adult rats. *Neurochemistry International*, 59(2), 202–207. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2011.05.003>
- Huang, Y., Zhao, M., Chen, X., Zhang, R., Le, A., Hong, M., Zhang, Y., Jia, L., Zang, W., Jiang, C., Wang, J., Fan, X., & Wang, J. (2023). Tryptophan metabolism in central nervous system diseases: Pathophysiology and potential therapeutic strategies. *Aging and Disease*, 14(3), 858–878. <https://doi.org/10.14336/AD.2022.0916>
- Huyghe, K., Husak, J. F., Herrel, A., Tadić, Z., Moore, I. T., Van Damme, R., & Vanhooydonck, B. (2009). Relationships between hormones, physiological performance and immunocompetence in a color-polymorphic lizard species, *Podarcis melisellensis*. *Hormones and Behavior*, 55(4), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.005>
- Huyghe, K., Vanhooydonck, B., Herrel, A., Tadić, Z., & Van Damme, R. (2007). Morphology, performance, behavior and ecology of three color morphs in males of the lizard *Podarcis melisellensis*. *Integrative and Comparative Biology*, 47(2), 211–220. <https://doi.org/10.1093/icb/icm043>
- ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. [Internet]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m10-bioanalytical-method-validation-step-5_en.pdf. (n.d.). Zadnje pristupljeno: 21. ožujka 2026.
- Jacob, S. N., & Nienborg, H. (2018). Monoaminergic neuromodulation of sensory processing. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, 51. <https://doi.org/10.3389/FNCIR.2018.00051>
- Jacobs, B. L., & Azmitia, E. C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiological Reviews*, 72(1), 165–229. <https://doi.org/10.1152/physrev.1992.72.1.165>

- Jaka, O., Iturria, I., van der Toorn, M., Hurtado de Mendoza, J., Latino, D. A. R. S., Alzualde, A., Peitsch, M. C., Hoeng, J., & Koshibu, K. (2021). Effects of natural monoamine oxidase inhibitors on anxiety-like behavior in zebrafish. *Frontiers in Pharmacology*, 12, 669370. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.669370>
- James, M., Flower, R. J., Henderson, G., Loke, Y. K., MacEwan, D., & Rang, H. P. (2023). *Rang & Dale's pharmacology* (10th ed.). Elsevier.
- Jelić, D., Kuljerić, M., Koren, T., Treer, D., Šalamon, D., Lončar, M., Podnar Lešić, M., Janev Hutinec, B., Bogdanović, T., Mekinić, S., Jelić, K. (2015). *Red book of Amphibians and Reptiles of Croatia* (Dušan Jelić & Patricija Gambiroža, Ur.). Ministry of Environmental and Nature Protection; State Institute for Nature Protection; Croatian Herpetological Society HYLA.
- Judaš, M., & Kostović, I. (2013). *Temelji neuroznanosti*. Hrvatski institut za istraživanje mozga i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. <http://braindamagerepair.hiim.hr/index.php/udzbenik-temelji-neuroznanosti>
- Kabelik, D., & Hofmann, H. A. (2018). Comparative neuroendocrinology: A call for more study of reptiles! *Hormones and Behavior*, 106, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.10.005>
- Kaliontzopoulou, A., Carretero, M. A., & Llorente, G. A. (2007). Multivariate and geometric morphometrics in the analysis of sexual dimorphism variation in *Podarcis* lizards. *Journal of Morphology*, 268(2), 152–165. <https://doi.org/10.1002/jmor.10494>
- Kandel, E. R., Koester, J. D., Mack, S. H., & Siegelbaum, S. A. (2021). *Principles of neural science* (6th ed.). McGraw Hill.
- Klawitter, S. J., & Hübschmann, O. K. (2019). Analysis of catecholamines and pterins in inborn errors of monoamine neurotransmitter metabolism: From past to future. *Cells*, 8(8), 867. <https://doi.org/10.3390/cells8080867>

- Kolla, N. J., & Bortolato, M. (2020). The role of monoamine oxidase A in the neurobiology of aggressive, antisocial, and violent behavior: A tale of mice and men. *Progress in Neurobiology*, 194, 101875. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101875>
- Korzan, W. J., Forster, G. L., Watt, M. J., & Summers, C. H. (2006). Dopaminergic activity modulation via aggression, status, and a visual social signal. *Behavioral Neuroscience*, 120(1), 93–102. <https://doi.org/10.1037/0735-7044.120.1.93>
- Korzan, W. J., Summers, T. R., & Summers, C. H. (2000). Monoaminergic activities of limbic regions are elevated during aggression: Influence of sympathetic social signaling. *Brain Research*, 870(1–2), 170–178.
- Korzan, W. J., Summers, T. R., & Summers, C. H. (2021). Neural and endocrine responses to social stress differ during actual and virtual aggressive interactions or physiological sign stimuli. *Behavioural Processes*, 182, 104294. <https://doi.org/10.1016/J.BEPROC.2020.104294>
- Krakowski, M. (2003). Violence and serotonin: Influence of impulse control, affect regulation, and social functioning. *Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*, 15(3), 294–305. <https://doi.org/10.1176/jnp.15.3.294>
- Kumar, D., Sinha, S. N., & Gouda, B. (2024). Novel LC-MS/MS method for simultaneous determination of monoamine neurotransmitters and metabolites in human samples. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 35(4), 663–673. <https://doi.org/10.1021/jasms.3c00326>
- Lee, W., Park, N. H., Lee, Y. C., Kim, K. H., & Hong, J. (2018). Advances and challenges in neurochemical profiling of biological samples using mass spectrometry coupled with separation methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 106, 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.07.006>
- Lewis, C., Goult, M., Wroblewska, A., Croxall, N., Onion, D., Robinson, S., Zinzen, R. P., Solana, J., Kyriacou, C. P., Rosato, E., & Feuda, R. (2025). Evolutionarily conserved transcriptional regulators control monoaminergic neuron development. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.10.29.685200>

- Li, Z. S., Pham, T. D., Tamir, H., Chen, J. J., & Gershon, M. D. (2004). Enteric dopaminergic neurons: Definition, developmental lineage, and effects of extrinsic denervation. *The Journal of Neuroscience*, 24(6), 1330–1339. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3982-03.2004>
- Libersat, F., & Pflueger, H. (2004). Monoamines and the orchestration of behavior. *BioScience*, 54(1), 17–25.
- Lieberman, H. R., Thompson, L. A., Caruso, C. M., Niro, P. J., Mahoney, C. R., McClung, J. P., & Caron, G. R. (2015). The catecholamine neurotransmitter precursor tyrosine increases anger during exposure to severe psychological stress. *Psychopharmacology*, 232(5), 943–951. <https://doi.org/10.1007/s00213-014-3727-7>
- Limnios, A., Adamopoulou, C., Carretero, M. A., & Pafilis, P. (2022). Invasive Italian wall lizards outcompete native congeneric species in finding food in a Y-maze. *Acta Ethologica*, 25(1), 43–55. <https://doi.org/10.1007/s10211-021-00385-8>
- Loer, C. M., Yim, H., Geiger, L. T., Ramadan, Y. H., Hampton, M. F., Bernal, D. V., Carstensen, H. R., Morgan, J., Rivard, L., Medina, T., Cook, S. J., Okumura, M., Lightfoot, J. W., Hobert, O., & Hong, R. L. (2025). Identity and functions of monoaminergic neurons in the predatory nematode *Pristionchus pacificus* reveal nervous system conservation and divergence. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2025.10.16.682888>
- Loveland, J. L., Uy, N., Maruska, K. P., Carpenter, R. E., & Fernald, R. D. (2014). Social status differences regulate the serotonergic system of a cichlid fish, *Astatotilapia burtoni*. *Journal of Experimental Biology*, 217(15), 2680–2690. <https://doi.org/10.1242/jeb.100685>
- Lv, Y., Li, Y., Li, J., Bian, C., Qin, C., & Shi, Q. (2020). A comparative genomics study on the molecular evolution of serotonin/melatonin biosynthesizing enzymes in vertebrates. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7(11), 505626. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00011>
- Ma, S. R., Yu, J. B., Fu, J., Pan, L. Bin, Yu, H., Han, P., Zhang, Z. W., Peng, R., Xu, H., & Wang, Y. (2021). Determination and application of nineteen monoamines in the gut microbiota targeting

phenylalanine, tryptophan, and glutamic acid metabolic pathways. *Molecules*, 26(5), 1377.
<https://doi.org/10.3390/molecules26051377>

Mandic, S., & Volkoff, H. (2018). The effects of fasting and appetite regulators on catecholamine and serotonin synthesis pathways in goldfish (*Carassius auratus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 223, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.04.017>

Manger, P. R., Cort, J., Ebrahim, N., Goodman, A., Henning, J., Karolia, M., Rodrigues, S. L., & Štrkalj, G. (2008). Is 21st century neuroscience too focussed on the rat/mouse model of brain function and dysfunction? *Frontiers in Neuroanatomy*, 2, 5.
<https://doi.org/10.3389/neuro.05.005.2008>

Marder, E. (2012). Neuromodulation of neuronal circuits: Back to the future. *Neuron*, 76(1), 1–11.
<https://doi.org/10.1016/J.NEURON.2012.09.010>

Marschall, C. (1980). Hypothalamic monoamines in lizards (*Lacerta*): A histofluorescence study. *Cell and Tissue Research*, 205(1), 95–105.

Mathuru, A. S., Libersat, F., Vyas, A., & Teseo, S. (2020). Why behavioral neuroscience still needs diversity? A curious case of a persistent need. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 116, 130–141. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.06.021>

Matthes, S., Mosienko, V., Popova, E., Rivalan, M., Bader, M., & Alenina, N. (2019). Targeted manipulation of brain serotonin: RNAi-mediated knockdown of tryptophan hydroxylase 2 in rats. *ACS Chemical Neuroscience*, 10(7), 3207–3217.
<https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.8b00635>

McCorry, L. K. (2007). Physiology of the autonomic nervous system. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 71(4), 78. <https://doi.org/10.5688/aj710478>

McDermott, R., Tingley, D., Cowden, J., Frazzetto, G., & Johnson, D. D. P. (2009). Monoamine oxidase A gene (MAOA) predicts behavioral aggression following provocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(7), 2118–2123.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0808376106>

- Medina, L., Puellas, L., & Smeets, W. J. A. J. (1994). Development of catecholamine systems in the brain of the lizard *Gallotia galloti*. *Journal of Comparative Neurology*, 350(1), 41–62.
- Merello Oyarzún, G., Olivares-Costa, M., Basile, L., Pástor, T. P., Mendoza-Soto, P., Padilla-Santiago, L., Mardones, G. A., Binda, C., & Opazo, J. C. (2025). Evolutionary and functional analysis of monoamine oxidase F: A novel member of the monoamine oxidase gene family. *Genome Biology and Evolution*, 17(2), evae280. <https://doi.org/10.1093/gbe/evae280>
- Michaelidis, B., Loumbourdis, N. S., & Kapaki, E. (2002). Analysis of monoamines, adenosine and GABA in tissues of the land snail *Helix lucorum* and lizard *Agama stellio stellio* during hibernation. *The Journal of Experimental Biology*, 205(8), 1135–1144. <https://doi.org/10.1242/jeb.205.8.1135>
- Miczek, K. A., Fish, E. W., De Bold, J. F., & De Almeida, R. M. (2002). Social and neural determinants of aggressive behavior: Pharmacotherapeutic targets at serotonin, dopamine and γ -aminobutyric acid systems. *Psychopharmacology*, 163(3–4), 434–458. <https://doi.org/10.1007/s00213-002-1139-6>
- Młynarczyk, M., Belka, M., & Hewelt-Belka, W. (2024). Novel materials and approaches for solid-phase (micro) extraction in LC-MS-based metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 180, 117941. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117941>
- Mo, M., & Mo, E. (2021). Observations of southern Italian wall lizards (*Podarcis siculus siculus*) scavenging artificial foods in the province of Messina, Sicily, Italy. *Reptiles & Amphibians*, 28(2), 292–294. <https://doi.org/10.17161/randa.v28i2.15547>
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: A review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x>
- Moriarty, M., Lee, A., O'Connell, B., Kelleher, A., Keeley, H., & Furey, A. (2011). Development of an LC-MS/MS method for the analysis of serotonin and related compounds in urine and the identification of a potential biomarker for attention deficit hyperactivity/hyperkinetic

disorder. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(8), 2481–2493.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5322-7>

Moroz, L. L., Romanova, D. Y., & Kohn, A. B. (2021). Neural versus alternative integrative systems: Molecular insights into origins of neurotransmitters. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 376(1821), 20190762. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0762>

Nalewajko, E., Wiszowata, A., & Kojło, A. (2007). Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43(5), 1673–1681.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.12.021>

Naumann, R. K., Ondracek, J. M., Reiter, S., Shein-Idelson, M., Tosches, M. A., Yamawaki, T. M., & Laurent, G. (2015). The reptilian brain. *Current Biology*, 25(8), R317–R321.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.049>

Negoiță, A. I., Amuzescu, B., Mihăilescu, D. F., & Bordea, C. (2025). The serotonergic system and its role in thermoregulation. *Physiologia*, 5(4), 37. <https://doi.org/10.3390/physiologia5040037>

Nevo, E., Gorman, G., Soulé, M., Yang, S. Y., Clover, R., & Jovanović, V. (1972). Competitive exclusion between insular *Lacerta* species (Sauria, Lacertidae): Notes on experimental introductions. *Oecologia*, 10(2), 183–190. <https://doi.org/10.1007/BF00347990>

Nicastro, T. M., & Greenwood, B. N. (2016). Central monoaminergic systems are a site of convergence of signals conveying the experience of exercise to brain circuits involved in cognition and emotional behavior. *Current Zoology*, 62(3), 293–305. <https://doi.org/10.1093/cz/zow027>

Nikolic, B., Josic, P., Buric, D., Tkalec, M., Lisicic, D., Blazevic, S. A., & Hranilovic, D. (2019). Coexisting lacertid lizard species *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis* differ in dopamine brain concentrations. *Journal of Comparative Physiology A*, 205(4), 451–456.
<https://doi.org/10.1007/s00359-019-01335-3>

- O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behavioural Brain Research*, 277, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027>
- Oliver, B. L., Burdette, M. H., Pahua, A. E., Cavazos, C., Morales, C. A., Alvarez, B. D., & Amodeo, D. A. (2022). Acute serotonin 1B/1A receptor activation impairs behavioral flexibility in C57BL/6J mice. *Behavioural Brain Research*, 427, 113865. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.113865>
- Olivier, B. (2015). Serotonin: A never-ending story. *European Journal of Pharmacology*, 753, 2–18. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.10.031>
- Ortega, Z., Mencía, A., & Pérez-Mellado, V. (2016). Thermal ecology of *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmalz, 1810) in Menorca (Balearic Islands, Spain). *Acta Herpetologica*, 11(2), 127–133.
- Petrović, A. M. (2023). Odabir i evaluacija kandidatnih referentnih gena za analizu genske ekspresije u mozgu gušterica roda *Podarcis* [Master's thesis, University of Zagreb]. Repozitorij PMF-a.
- Pierre, J., Repérant, J., Belleli, A., & Miceli, D. (1990). Distribution of serotonin immunoreactivity in the brain of the lizard *Ophisaurus apodus*. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 311(1), 43–49.
- Pitt, J. J. (2009). Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews*, 30(1), 19–22.
- Pitychoutis, P. M., Belmer, A., Moutkine, I., Adrien, J., & Maroteaux, L. (2015). Mice lacking the serotonin Htr2B receptor gene present an antipsychotic-sensitive schizophrenic-like phenotype. *Neuropsychopharmacology*, 40(12), 2764–2773. <https://doi.org/10.1038/NPP.2015.126>
- Podnar, M., Mayer, W., & Tvrtković, N. (2004). Mitochondrial phylogeography of the Dalmatian wall lizard, *Podarcis melisellensis* (Lacertidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 4(4), 307–317. <https://doi.org/10.1016/j.ode.2004.04.004>

- Poletta, G. L., Siroski, P. A., Amavet, P. S., Ortega, H. H., & Mudry, M. D. (2013). Reptiles as animal models: Examples of their utility in genetics, immunology and toxicology. In W. I. Lutterschmidt (Ed.), *Reptiles in Research: Ecology, Physiology and Behavior from Desert to Sea* (pp. 437–464). Nova Science Publishers.
- Quay, W. B., Kelley, T. D., Stebbins, R. C., & Cohen, N. W. (1970). Experimental studies on brain 5-hydroxytryptamine and monoamine oxidase in a field population of the lizard *Sceloporus occidentalis*. *Physiological Zoology*, 43(2), 90–97.
- Radovanović, M. (1956). Rassenbildung bei den Eidechsen auf adriatischen Inseln. *Denkschriften der Österreichischen Akademie der Wissenschaften*, 110, 1–82.
- Richard, D. M., Dawes, M. A., Mathias, C. W., Acheson, A., Hill-Kapturczak, N., & Dougherty, D. M. (2009). L-Tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *International Journal of Tryptophan Research*, 2, 45–60. <https://doi.org/10.4137/ijtr.s2129>
- Romero-Diaz, C., Xu, C., Campos, S. M., Herrmann, M. A., Kusumi, K., Hews, D. K., & Martins, E. P. (2021). Brain transcriptomic responses of Yarrow's spiny lizard, *Sceloporus jarrovii*, to conspecific visual or chemical signals. *Genes, Brain and Behavior*, 20(7), e12753. <https://doi.org/10.1111/gbb.12753>
- Saggu, S., Pless, A., Dew, E., Ware, D., Jiao, K., & Wang, Q. (2025). Monoamine signaling and neuroinflammation: Mechanistic connections and implications for neuropsychiatric disorders. *Frontiers in Immunology*, 16, 1543730. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2025.1543730>
- Schönfeld, L. M., Schäble, S., Zech, M. P., & Kalenscher, T. (2020). 5-HT1A receptor agonism in the basolateral amygdala increases mutual-reward choices in rats. *Scientific Reports*, 10(1), 16622. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73829-z>
- Schultz, W. (2015). Neuronal reward and decision signals: From theories to data. *Physiological Reviews*, 95(3), 853–951. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2014>

- Sciarrillo, R., Falzarano, A., Gallicchio, V., Lallo, A., Carrella, F., Mileo, A., Capaldo, A., & de Falco, M. (2025). Catecholaminergic systems and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis: Adrenaline, noradrenaline and dopamine treatments in vivo in lizard *Podarcis siculus*. *General and Comparative Endocrinology*, 373, 114801. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2025.114801>
- Scudiero, R., Chianese, T., Creti, P., & Rosati, L. (2025). Risk assessment arising from the exposure of terrestrial vertebrates to soil contamination: Learning from field lizards of the *Podarcis* genus. *Journal of Xenobiotics*, 15(1), 22–38. <https://doi.org/10.3390/jox15010021>
- Senczuk, G., Castiglia, R., Böhme, W., & Corti, C. (2019). *Podarcis siculus latastei* (Bedriaga, 1879) of the western pontine islands (Italy) raised to the species rank, and a brief taxonomic overview of *Podarcis* lizards. *Acta Herpetologica*, 14(2), 71–80.
- Shefa Khldon, M., & Asmaa Basheer, A. (2024). Analysis of amino acids of the brain in *Spilopelia senegalensis*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 43(S1), 254–258.
- Shen, Y., Li, H., Lu, J., Luo, X., Guan, Q., & Cheng, L. (2019). Analytical validation and clinical application of urinary vanillylmandelic acid and homovanillic acid by LC–MS/MS for diagnosis of neuroblastoma. *Biomedical Chromatography*, 33(6), e4484. <https://doi.org/10.1002/bmc.4484>
- Sherpa, S., Paris, J. R., Silva-Rocha, I., Di Canio, V., Carretero, M. A., Ficetola, G. F., & Salvi, D. (2023). Genetic depletion does not prevent rapid evolution in island-introduced lizards. *Ecology and Evolution*, 13(11), e10721. <https://doi.org/10.1002/ece3.10721>
- Shi, N., Bu, X., Zhang, M., Wang, B., Xu, X., Shi, X., Hussain, D., Xu, X., & Chen, D. (2022). Current sample preparation methodologies for determination of catecholamines and their metabolites. *Molecules*, 27(9), 2702. <https://doi.org/10.3390/molecules27092702>
- Shimomura, Y., Inahata, M., Komori, M., & Kagawa, N. (2019). Reduction of tryptophan hydroxylase expression in the brain of medaka fish after repeated heat stress. *Zoological Science*, 36(3), 223–230. <https://doi.org/10.2108/zs180135>

- Shine, R. (2013). Reptiles. *Current Biology*, 23(6), R227–R231. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.02.024>
- Silva, L. C., Denis, E. V. C., Silva, J. S. H. G., Pereira, L. M. M., Morais, E. S. G., & Soares, A. F. (2024). Reptiles as experimental models: Uncovering their role in drug development and health research. *Advances in Research*, 25(6), 92–97. <https://doi.org/10.9734/air/2024/v25i61182>
- Silva-Rocha, I., Salvi, D., & Carretero, M. A. (2012). Genetic data reveal a multiple origin for the populations of the Italian wall lizard *Podarcis sicula* (Squamata: Lacertidae) introduced in the Iberian Peninsula and Balearic islands. *Italian Journal of Zoology*, 79(4), 502–510. <https://doi.org/10.1080/11250003.2012.680983>
- Singh, C., Bortolato, M., Bali, N., Godar, S. C., Scott, A. L., Chen, K., Thompson, R. F., & Shih, J. C. (2013). Cognitive abnormalities and hippocampal alterations in monoamine oxidase A and B knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31), 12816–12821. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308037110>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2014). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Cengage Learning.
- Smeets, W. J. A. J., & González, A. (2000). Catecholamine systems in the brain of vertebrates: New perspectives through a comparative approach. *Brain Research Reviews*, 33(2–3), 308–379. [https://doi.org/10.1016/S0165-0173\(00\)00034-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0173(00)00034-5)
- Smeets, W. J. A. J., & Steinbusch, H. W. M. (1988). Distribution of serotonin immunoreactivity in the forebrain and midbrain of the lizard *Gekko gekko*. *Journal of Comparative Neurology*, 271(3), 419–434.
- Speybroeck, J., Beukema, W., Bok, B., & Van Der Voort, J. (2016). *Field guide to the amphibians and reptiles of Britain and Europe*. Bloomsbury Natural History.
- Stanford, S. (2020). Norepinephrine and epinephrine: Introduction. In John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). *eLS*, 1(2), 1–7. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000271.pub4>

- Stratakis, M., Ioannidis, P., Bista, I., Absolon, D., Eagles, W., McCarthy, S., Denton, A., Lymberakis, P., & Poulakakis, N. (2025). Unravelling the thread of *Podarcis* omics: Insights into the genome and transcriptome of the Cretan wall lizard. *Genes & Genomics*, 48(1), 27–42. <https://doi.org/10.1007/s13258-025-01676-1>
- Strausfeld, N. J., & Hirth, F. (2013). Deep homology of arthropod central complex and vertebrate basal ganglia. *Science*, 340(6129), 157–161. <https://doi.org/10.1126/science.1231828>
- Summers, C. H., Korzan, W. J., Lukkes, J. L., Watt, M. J., Forster, G. L., Øverli, Ø., Höglund, E., Larson, E. T., Ronan, P. J., Matter, J. M., Summers, T. R., Renner, K. J., & Greenberg, N. (2005). Does serotonin influence aggression? Comparing regional activity before and during social interaction. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(5), 679–694. <https://doi.org/10.1086/432139>
- Summers, T. R., Hunter, A. L., & Summers, C. H. (1997). Female social reproductive roles affect central monoamines. *Brain Research*, 767(2), 272–278.
- Sviridova, V. M., Absalyamova, M. T., Karpenko, M. N., & Ivleva, I. S. (2026). Tryptophan hydroxylase: A target for the correction of affective and neurodegenerative disorders. *Journal of Neuroscience Research*, 104(1), e70106. <https://doi.org/10.1002/jnr.70106>
- Šikić, D., Matković, M., Gojak, T., Malev, O., & Blažević, S. A. (2022). Development of a HPLC-UV-FLD method for monoamine determination in lizard brain tissue samples. In *FENS Forum 2022: E-Book of Abstracts* (p. 6249). FENS.
- Takahashi, A., Quadros, I. M., De Almeida, R. M. M., & Miczek, K. A. (2010). Brain serotonin receptors and transporters: Initiation vs. termination of escalated aggression. *Psychopharmacology*, 213(2–3), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00213-010-2000-y>
- Tank, A. W., & Wong, D. L. (2015). Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Comprehensive Physiology*, 5(1), 1–15. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140007>
- Taverne, M., Fabre, A. C., King-Gillies, N., Krajnović, M., Lisičić, D., Martin, L., Michal, L., Petricioli, D., Štambuk, A., Tadić, Z., Vigliotti, C., Wehrle, B. A., & Herrel, A. (2019). Diet variability among

insular populations of *Podarcis* lizards reveals diverse strategies to face resource-limited environments. *Ecology and Evolution*, 9(22), 12408–12420. <https://doi.org/10.1002/ece3.5626>

Thomas, J., Khanam, R., & Vohora, D. (2015). A validated HPLC-UV method and optimization of sample preparation technique for norepinephrine and serotonin in mouse brain. *Pharmaceutical Biology*, 53(10), 1539–1544. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.991837>

Tiedemann, F., & Henle, K. (1986). *Podarcis melisellensis* (Braun, 1877) – Adriatische Mauereidechse, Karstläufer. In W. Böhme (Ed.), *Handbuch der Reptilien und Amphibien Europas*, Band 2/II: Echsen III (Lacertidae III: Podarcis) (pp. 111–141). Aula-Verlag.

Tran, P. V., Chowdhury, V. S., Nagasawa, M., & Furuse, M. (2015). Changes in free amino acid and monoamine concentrations in the chick brain associated with feeding behavior. *SpringerPlus*, 4(1), 252. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-1058-8>

Trapanese, M., Buglione, M., Maselli, V., Petrelli, S., Aceto, S., & Fulgione, D. (2017). The first transcriptome of Italian wall lizard, a new tool to infer about the Island Syndrome. *PLOS ONE*, 12(9), e0185227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185227>

Tuomainen, U., & Candolin, U. (2011). Behavioural responses to human-induced environmental change. *Biological Reviews*, 86(3), 640–657. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00164.x>

Turkin, A., Sidorova, M., Kurilova, E., Alenina, N., Tuchina, O., & Klempin, F. (2025). Microglial expression of serotonin receptors reveals parallel regulation of 5-HT_{2b} and BDNF in the rat hippocampus. *Cells*, 15(1), 66. <https://doi.org/10.3390/cells15010066>

Valerioti, C., & Sperone, E. (2024). Even lizards have brioche for breakfast: Observations of the Italian wall lizard, *Podarcis siculus* (Rafinesque-Schmaltz, 1810), feeding on unusual food in Calabria, Italy. *Herpetology Notes*, 17, 597–598.

- Vervust, B., Grbac, I., Brecko, J., Tvrtković, N., & Van Damme, R. (2009). Rasprostranjenost vodozemaca i gmazova u Parku prirode »Lastovsko otočje«: Mogući biotički i abiotički uzroci. *Natura Croatica*, 18(1), 113–127.
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 13(4), 227–232. <https://doi.org/10.1038/NRG3185>
- Wang, A. Z., Husak, J. F., & Lovern, M. (2019). Leptin ameliorates the immunity, but not reproduction, trade-off with endurance in lizards. *Journal of Comparative Physiology B*, 189(2), 261–269. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01202-2>
- Wartenberg, H., & Baumgarten, H. G. (1969). On electron microscopic identification of noradrenergic nerves in pineal organ of lizard *Lacerta muralis* by 5-hydroxydopamine and 5-hydroxydopa. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 94(2), 252–260.
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2008). *Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications, and strategies for data interpretation* (4th ed.). Wiley. <https://doi.org/10.1002/9780470516898>
- Whitaker-Azmitia, P. M. (1999). The discovery of serotonin and its role in neuroscience. *Neuropsychopharmacology*, 21(1), 2–8. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00031-7](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00031-7)
- Wimalasena, K. (2010). Vesicular monoamine transporters: Structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Medicinal Research Reviews*, 31(4), 483–519. <https://doi.org/10.1002/med.20187>
- Wooding, K. M., & Auchus, R. J. (2013). Mass spectrometry theory and application to adrenal diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371(1–2), 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.12.026>
- Woodley, S. K., Matt, K. S., & Moore, M. C. (2000). Neuroendocrine responses in free-living female and male lizards after aggressive interactions. *Physiology & Behavior*, 71(3–4), 373–381. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(00\)00345-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(00)00345-0)

- Wu, X., Khan, I., Ai, X., Zhang, J., Shi, H., Li, D., & Hong, M. (2024). Effects of butyl paraben on behavior and molecular mechanism of Chinese striped-necked turtle (*Mauremys sinensis*). *Aquatic Toxicology*, 268, 106841. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2024.106841>
- Xie, L., Chen, L., Gu, P., Wei, L., & Kang, X. (2018). A convenient method for extraction and analysis with high-pressure liquid chromatography of catecholamine neurotransmitters and their metabolites. *Journal of Visualized Experiments*, 133, e56445. <https://doi.org/10.3791/56445>
- Xu, J., Li, Y., Lv, Y., Bian, C., You, X., Endoh, D., Teraoka, H., & Shi, Q. (2019). Molecular evolution of tryptophan hydroxylases in vertebrates: A comparative genomic survey. *Genes*, 10(3), 203. <https://doi.org/10.3390/GENES10030203>
- Yamamoto, K., & Vernier, P. (2011). The evolution of dopamine systems in chordates. *Frontiers in Neuroanatomy*, 5, 21. <https://doi.org/10.3389/fnana.2011.00021>
- Yu, Q., Teixeira, C. M., Mahadevia, D., Huang, Y., Balsam, D., Mann, J. J., Gingrich, J. A., & Ansorge, M. S. (2014). Dopamine and serotonin signaling during two sensitive developmental periods differentially impact adult aggressive and affective behaviors in mice. *Molecular Psychiatry*, 19(6), 688–698. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.10>
- Zuffi, M. A. L., & Giannelli, C. (2013). Trophic niche and feeding biology of the Italian wall lizard, *Podarcis siculus campestris* (De Betta, 1857) along western Mediterranean coast. *Acta Herpetologica*, 8(1), 35–39.

8 PRILOZI

8.1 Protokol za žrtvovanje

Materijali

	Aluminijska folija
Postolje za žrtvovanje	Markeri
Filter papir	Predmetna stakalca
Laboratorijske škare	Kapaljka
Mikropipeta (20 – 200 μ L)	Papirnati ubrusi
Obični tipsevi	Vatice
Pinceta	Plamenik
Iglice	Analitička vaga
Laboratorijska špatula	Rukavice
Skalpel	Parafilm
Eppendorf epruvete (1 i 2 mL)	Otopine
Falcon epruvete	70 i 96 %-tni etanol (C ₂ H ₅ OH)
Stalak za falcon epruvete	Natrijev citrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)
Led	Paraformaldehid (OH(CH ₂ O) nH (n=8-1000))
Suhi led	
Kutije od stiropora	
Postolje za vađenje mozga (Petrijeva zdjelica bez poklopca i spužvica smrznuto)	
Lampa	

Postupak

1. Izvaditi guštericu iz kutije.
2. Glavu gušterice odrezati laboratorijskim škarama. Krv iz glave ispustiti na predmetno stakalce za krvni razmaz, a ispuštenu krv iz tijela ispustiti na parafilm i sakupiti pipetom namještenom na 200 μ L te prebaciti u eppendorf epruvetu od 1 mL. Tips pipete prethodno isprati natrijevim citratom. Tubicu pohraniti na ledu.
3. Glavu staviti na postolje za vađenje mozga pokriveno aluminijskom folijom. Laboratorijskim škarama napraviti dva bočna reza lubanje, podignuti svod lubanje i laboratorijskom špatulom izvaditi mozak. Staviti ga na aluminijsku foliju i pohraniti u kutiji od stiropora ispunjenoj suhim ledom (-80°C). Nakon nekoliko minuta izvaditi mozak iz suhog leda i skalpelom odvojiti polutke. Desnu hemisferu laboratorijskom špatulom prebaciti u prethodno izvaganu tubicu od 2 mL za RNA analizu, a lijevu hemisferu u prethodno izvaganu tubicu od 2 mL za HPLC. Tubice pohraniti na -80°C do ponovnog vaganja.
4. Prerezati rep na tri dijela. Vrh repa baciti, a ostala dva dijela prebaciti u posebne tubice i napuniti ih 96 %-tnim etanolom tako da je cijeli dio repa uronjen u njega.
5. Laboratorijskim škarama napraviti ventralni medijalni rez od kaudalnog dijela trupa do vrata. Tijelo i glavu guštera prebaciti u falcon epruvetu i napuniti ju paraformaldehidom tako da su cijelo tijelo i glava uronjeni u njega.
6. Korišteni pribor prebrisati papirnatim ubrusom/vaticom natopljenim/om vodom, a potom flambirati uranjanjem u 70 %-tni etanol i paljenjem.

8.2 Protokol pripreme kalibracijskih otopina analita i unutarnjeg standarda

Priprema kalibracijskih otopina provedena je serijskim razrjeđivanjem početnih standardnih otopina (*stock*) u ultračistoj vodi. Kao unutarnji standard (IS) korišten je DHBA u finalnoj koncentraciji od 0,125 mg/L (ppm).

1. Priprema početnih i radnih otopina

- **Početna otopina analita (stock K):** Smjesa svih analita pripravljena je otapanjem 2 mg svakog standarda u 50 mL ultračiste vode uz dodatak 100 µL 0,01 M HCl (konačna koncentracija 40 mg/L).
- **Radna otopina 1 (WS1):** Pripremljena razrjeđenjem 2,5 mL otopine Stock K do 100 mL (konačna koncentracija 1 mg/L).
- **Radna otopina 2 (WS2):** Pripremljena razrjeđenjem 2,5 mL otopine WS1 do 20 mL (konačna koncentracija 0,125 mg/L).
- **Početna otopina IS-a (stock DHBA):** Otapanjem 2,5 mg DHBA u 50 mL ultračiste vode uz dodatak 100 µL 0,01 M HCl (konačna koncentracija 50 mg/L).
- **Radna otopina IS-a (WS DHBA):** Pripremljena razrjeđenjem 2,5 mL otopine Stock DHBA do 100 mL (konačna koncentracija 1,25 mg/L).

2. Priprema serije kalibratora (K1–K11)

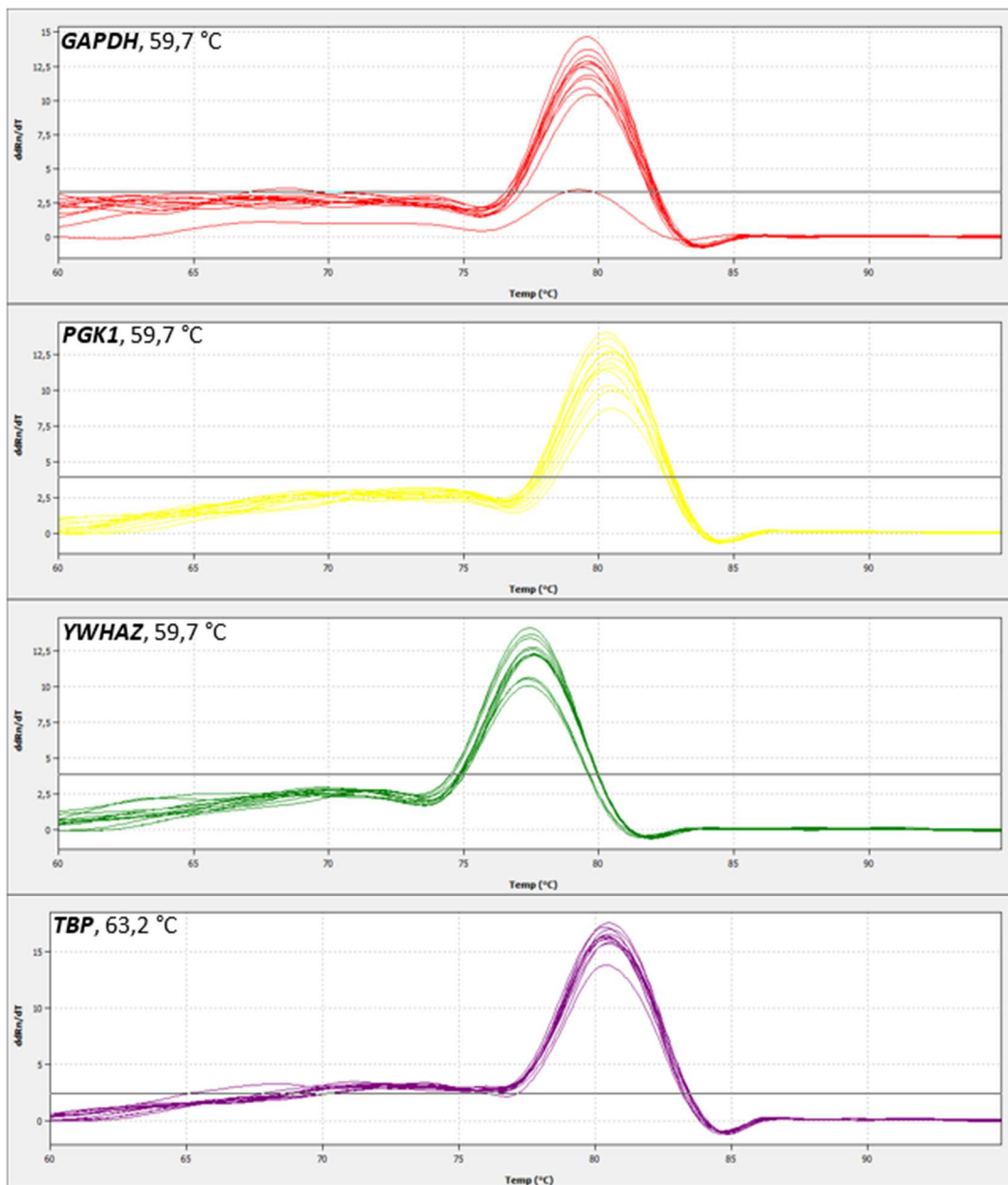
Sve kalibracijske otopine pripravljene su u mjernim tikvicama uz dodatak radne otopine unutarnjeg standarda (WS DHBA) tako da njegova finalna koncentracija iznosi 0,125 mg/L.

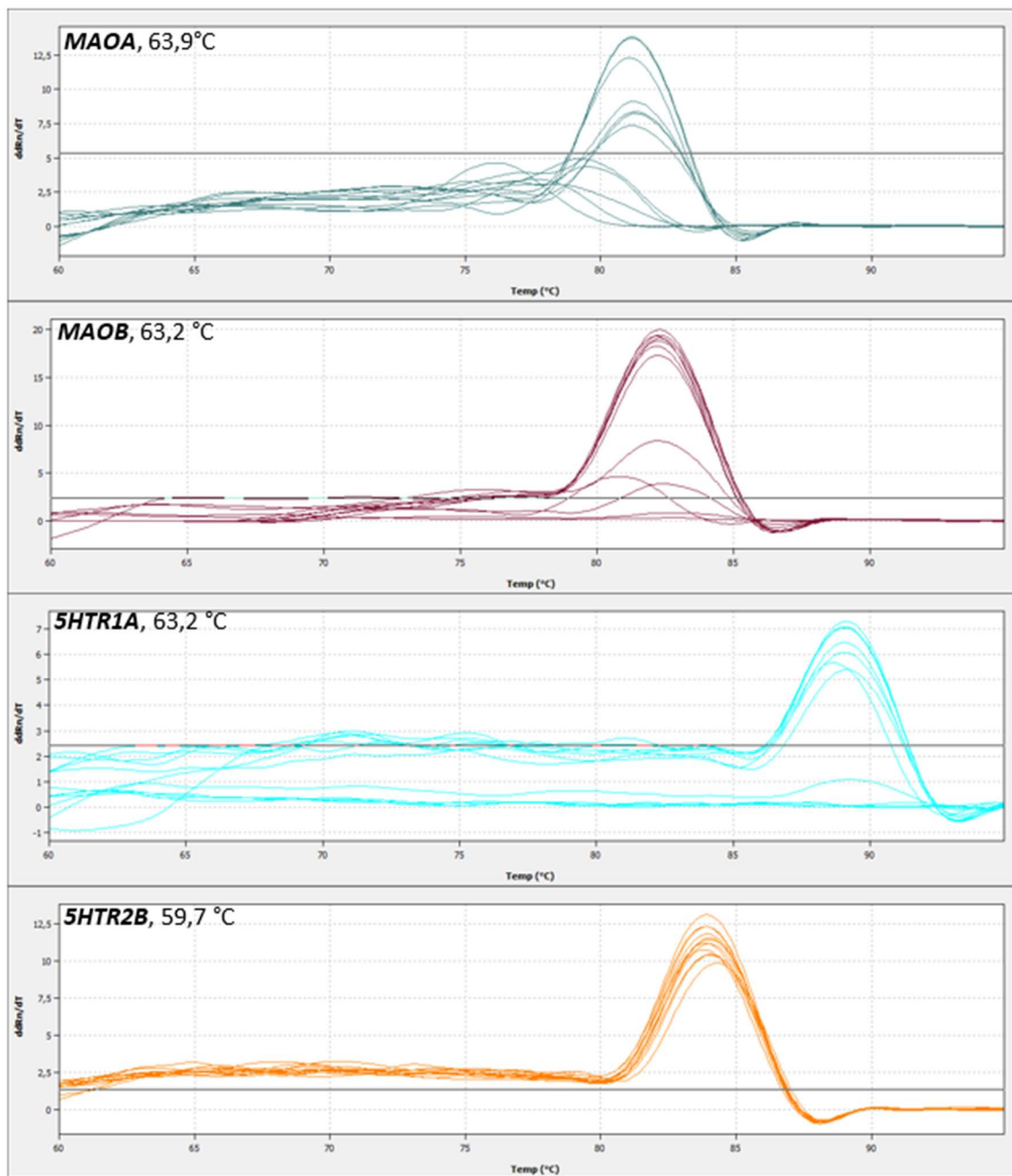
Tablica P1. Shema razrjeđenja za pripremu kalibracijskih otopina.

Kalibrator	Finalna koncentracija (mg/L)	Izvorna otopina	V, izvorna otopina (mL)	V, radna otopina DHBA (mL)	Ukupni V (mL)
K11	1,0	Stock K	0,25	1,0	10
K10	0,75	WS1	7,5	1,0	10
K9	0,5	WS1	5,0	1,0	10
K8	0,35	WS1	3,5	1,0	10
K7	0,25	WS1	2,5	1,0	10
K6	0,125	WS1	2,5	2,0	20
K5	0,0625	WS2	5,0	1,0	10
K4	0,04	WS2	3,2	1,0	10
K3	0,03	WS2	2,4	1,0	10
K2	0,01	WS2	1,6	1,0	10
K1	0,005	WS2	0,8	2,0	20

8.3 Krivulje taljenja korištenih referentnih gena i gena od interesa

Slika P1. Krivulje taljenja pri 12 različitim temperatura umnažanja cDNA setom početnica za gene *GAPDH*, *PGK1*, *YWHAZ*, *Tbp2*, *MaoA*, *MaoB*, *5Htr1a* i *5Htr2b*. Temperatura najviše krivulje taljenja uzeta je kao optimalna temperatura umnažanja. Na apscisi su prikazane vrijednosti temperature, a na ordinati prva derivacija normaliziranog intenziteta fluorescencije u odnosu na temperaturu ($ddRN/dT$).





9 ŽIVOTOPIS

Dunja Vlašić (rođ. Šikić) rođena je 3. ožujka 1995.god. u Zagrebu. Po završetku zagrebačke V. gimnazije, upisuje Prirodoslovno-matematički fakultet u Zagrebu. Završila je prijediplomski smjer Znanosti o okolišu, nakon kojeg upisuje diplomski studij Eksperimentalne biologije, modul Fiziologija i imunobiologija. Dobitnica je Rektorove nagrade ak. god. 2019./2020. za projekt "Organizacija i online provedba Susreta s biolozima - HRZZ izdanje". Diplomirala je 2020. godine na temu "Učinak anestetika izoflurana i ionizirajućeg zračenja na primarna oštećenja DNA u miša". Na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu zaposlena je od 2020. godine, gdje radi kao asistent. Tijekom rada u ustanovi sudjeluje u projektu Hrvatske zaklade za znanost - Dopaminska regulacija kompetitivnog ponašanja u kohabitirajućim populacijama guštera *Podarcis siculus* i *Podarcis melisellensis* (BOLDeR), na kojem je zaposlena kao doktorandica. Bavi se područjem neurofiziologije i u svom znanstvenom djelovanju radi s pokusnim životinjama, provodi molekularna istraživanja i analize te razvija i primjenjuje analitičke metode na HPLC-UV-FLD i HPLC-MS/MS uređajima. Bila je uključena je u izvođenje praktične nastave iz kolegija: Animalna fiziologija, Bioetika, Kronike znanstvenih istraživanja u fiziologiji, Laboratorijska stručna praksa i Laboratorijske životinje u znanosti. Aktivno je sudjelovala na 5 kongresa s posterskim ili usmenim priopćenjima, završila 2 tečaja-MedILS Bioinformatics School in Transcriptomics i Laboratory Animal Science Course (FELASA), sudjelovala je u organizaciji Dana i noći na PMF-u te LabAnim tečaja za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama i životinjama za proizvodnju bioloških pripravaka. Koautorica je četiri znanstvena rada i deset kongresnih priopćenja. Inače nije ovako dosadna kako zvuči na papiru.

Radovi u časopisima

Šikić D, Turković L, Malev O, Gojak T, Lisičić D, Sertić M, Blažević SA (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* 211: 527–540. doi: 10.1007/s00359-025-01753-6

Shek Vugrovečki A, Miljković J, Žura Žaja I, Pađen L, **Šikić D**, Gojak T, Glogoški M, Lisičić D, Blažević SA, Aladrović J (2024) Antioxidant capacity and reactive oxygen metabolites in lizard (*Podarcis siculus*) skeletal muscle tissues – preliminary results. *Veterinarska stanica* 56: 57–69. doi: 10.46419/vs.56.1.2

Benković V, Marčina N, Horvat Knežević A, **Šikić D**, Rajevac V, Milić M, Kopjar N (2021) Potential radioprotective properties of arbutin against ionising radiation on human leukocytes in vitro. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 872: 503413. doi: 10.1016/j.mrgentox.2021.503413

Benković V, Borojević N, **Šikić D**, Horvat Knežević A, Milić M (2021) DNA damage assessment in peripheral blood of Swiss albino mice after combined exposure to volatile anesthetics and 1 or 2 Gy radiotherapy in vivo. *International Journal of Radiation Biology* 97: 1962565. doi: 10.1080/09553002.2021.1962565

Sažeci sa skupova

Šikić D, Turković L, Malev O, Gojak T, Lisičić D, Sertić M, Blažević SA (2025) An LC-MS/MS-based approach for monitoring monoaminergic status in lizard brains. *Book of Abstracts of 9th Faculty of Science PhD Student Symposium, Zagreb, Hrvatska, str. 94.*

Miljković J, Aladrović J, Pađen L, **Šikić D**, Glogoški M, Gojak T, Lisičić D, Blažević SA, Shek Vugrovečki A (2024) Comparison of the antioxidative and oxidative status in muscle tissue of Dalmatian wall lizard (*Podarcis melisellensis*) and Italian wall lizard (*Podarcis siculus*). ICARE2024 International Conference on Avian, Herpetological, Exotic Mammal, Zoo and Wildlife Medicine, Gent, Belgija, str. 454.

Shek Vugrovečki A, Miljković J, Aladrović J, Pađen L, **Šikić D**, Gojak T, Lisičić D, Blažević SA (2023) Oxidative stability of muscle tissue in a free-living lizard *Podarcis siculus* from two different locations – a pilot study. 16th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Osijek, Hrvatska, str. 55.

Aladrović J, Miljković J, Shek Vugrovečki A, Blažević SA, Lisičić D, Gojak T, **Šikić D**, Beer Ljubić B, Pađen L (2023) Lipid indices in abdominal fat and ovaries in *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis*. 16th Annual Meeting of Croatian Physiological Society with International Participation, Osijek, Hrvatska, str. 33.

Šikić D, Turković L, Malev O, Sertić M, Blažević SA (2023) Targeted monoamine profiling in lizard brain tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. FENS Regional Meeting 2023, Portugal.

Šikić D, Gojak T, Glogoški M, Blažević SA, Lisičić D (2022) Into the wild: znanstvena pozadina laboratorijskog istraživanja na životinjama iz divljine. 14. Hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem, str. 105.

Gojak T, Karan D, Glogoški M, **Šikić D**, Lisičić D, Marčić Z, Blažević SA (2022) Behaviour of coexisting lizard species, *Podarcis siculus* and *Podarcis melisellensis*, in a novel environment.

Šikić D, Matković M, Gojak T, Malev O, Blažević SA (2022) Development of a HPLC-UV-FLD method for monoamine determination in lizard brain tissue samples. FENS Forum 2022: E-Book of Abstracts, Paris, Francuska, str. 6249.

Marčina N, Milić M, Horvat Knežević A, Rajevac V, **Šikić D**, Kopjar N, Benković V (2021) Radioprotective effect assessment of arbutin in human leukocytes. 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation CROTOX 2021, Zagreb, Hrvatska, str. 62.

Gojak T, Glogoški M, **Šikić D**, Lisičić D, Blažević SA (2021) Comparison of new digital morphometric method with traditional method in lizards. 2nd International Scientific and Professional Meeting on Reptiles and Exotic Animals "Reptilia", str. 41–45.