

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Vida Čadež

Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim
škrigama i srednjem crijevu bočatog raka
Carcinus aestuarii (Nordo, 1847)

DIPLOMSKI RAD

prof. dr.sc. Čedomil Lucu

Dubrovnik, 2009.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU
ODJEL ZA AKVAKULTURU
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Vida Čadež

Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim
škrigama i srednjem crijevu bočatog raka
Carcinus aestuarii (Nordo, 1847)

DIPLOMSKI RAD

Mentor:
prof. dr.sc. Čedomil Lucu

Dubrovnik, 2009.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Čedomila Lucua, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za akvakulturu Sveučilišta u Dubrovniku.

Rad posvećujem mome djedu Rudolfu Rösleru.

Prvenstveno želim izraziti zahvalnost mome mentoru, dr.sc. Čedomilu Lucuu na nesebičnom pomaganju tijekom svih faza izrade ovoga rada. Njegovi savjeti su bili od izrazite važnosti, kao i njegov optimizam te ohrabrivanje prilikom praktičnog rada.

Posebno se zahvaljujem dr.sc. Zvonimiru Kozariću koji je ustupio svoje stručno znanje i laboratorijsku opremu, bez čije pomoći ne bi bila moguća histkemijska obrada uzoraka.

Također velika hvala kolegici Suzani Stanković na pomoći pri mjerenjima te brizi oko rakova, kao i za milijun drugih stvari.

Svim profesorima Sveučilišta u Dubrovniku kao i zaposlenicima Instituta Ruđer Bošković se zahvaljujem na znanju koje ste mi prenijeli, pomoći i instrukcijama.

Na kraju moram spomenuti moju obitelj i prijatelje koji su mi pružali potporu tijekom svih godina studiranja. Posebno hvala mojoj majci na svakome danu koji je uz mene, a istovremeno i na slobodi koju mi pruža kako bi mogla spoznati sebe i svoje mogućnosti.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1. Biologija i komercijalna upotreba bočatog raka <i>Carcinus aestuarii</i>	1
1.2. Građa škrge bočatog raka <i>Carcinus aestuarii</i>	4
1.2.1. Anatomija.....	5
1.2.2. Histologija.....	6
1.3. Građa crijeva bočatog raka <i>Carcinus aestuarii</i>	7
1.3.1. Anatomija.....	7
1.3.2. Histologija.....	8
1.4. Osmoregulacija vodenih beskralješnjaka.....	9
1.4.1. Funkcija i građa enzima Na ⁺ , K ⁺ ATP-aze	9
1.4.2. Utjecaj enzima Na ⁺ , K ⁺ ATP-aze na osmoregulaciju rakova	12
2. Materijal i metode	18
2.1. Postupak mjerenja aktivnosti enzima.....	18
2.2. Postupak mjerenja koncentracije proteina	21
2.3. Histokemijske metode - Wachstein Meisel metoda (1957).....	21
2.4. Statistička obrada podataka.....	22
3. Rezultati	23
3.1. Aktivnost Na ⁺ , K ⁺ ATP-aze u anteriornim škragama.....	24
3.2. Aktivnost Na ⁺ , K ⁺ ATP-aze u srednjem crijevu	29
4. Rasprava.....	31
5. Zaključak.....	36
6. Literatura.....	37

Sažetak

Aktivnost Na⁺, K⁺ ATP-aze u anteriornim škragama i srednjem crijevu bočatog raka *Carcinus aestuarii* (Nordo, 1847)

Rad prikazuje utjecaj promijene slanosti okolnog medija na specifičnu aktivnost enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze u anteriornim škragama i srednjem crijevu, koji predstavljaju sekundarna osmoregulacijska tkiva bočatog raka *Carcinus aestuarii*. Ona su slabije istraživana jer pokazuju manju aktivnost enzima od glavnih osmoregulacijskih tkiva, prvenstveno posteriornih škrge.

Specifična aktivnost enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze u anteriornim škragama bočatih rakova prilagođenih na morsku vodu (38psu) je iznosila $1,61 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, a kod rakova prilagođenih na razrijeđenu morsku vodu (12 psu) $2,52 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$. Zaključeno je da anteriorne škrge imaju uz respiratornu i osmoregulacijsku ulogu ($P < 0,05$), nevezano za stadij presvlačenja rakova. U srednjem crijevu nije zabilježena statistički značajna razlika ($P > 0,05$) između aktivnosti enzima u morskoj ($2,749 \pm 0,949 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) i razrijeđenoj morskoj vodi ($3,23 \pm 1,46 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) rakova prilagođenih na navedene uvijete.

Ključne riječi: Na⁺, K⁺ ATP-aza / anteriorne škrge / srednje crijevo / *Carcinus aestuarii*

Activity of Na⁺, K⁺ ATP-ase in anterior gills and midgut of green crab *Carcinus aestuarii* (Nordo, 1847)

This thesis shows the impact of salinity changes on specific enzyme activity Na⁺, K⁺ ATP-ase in anterior gills and midgut, which are secondary osmoregulatory tissues of the green crab *Carcinus aestuarii*. Both tissues are less studied in the past because they show smaller enzyme activity than in main osmoregulatory tissues, like posterior gills.

Specific enzyme activity of Na⁺, K⁺ ATP-ase in anterior gills of the crabs acclimated in sea water (38 psu) was $1,61 \pm 1,02 \mu\text{mol/h}^{-1} \text{ mg proteins}^{-1}$ and in diluted sea water (12

psu) was $2,52 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteins}^{-1}$. This shows that anterior gills have role in respiration and osmoregulation ($P < 0,05$), no matter are they in moult or not. There was no statistical difference ($P > 0,05$) in the midgut of crabs acclimated on sea water ($2,749 \pm 0,949 \mu\text{mol/h}^{-1} \text{ mg proteins}^{-1}$) and diluted sea water ($3,23 \pm 1,46 \mu\text{mol/h}^{-1} \text{ mg proteins}^{-1}$).

Key words: Na^+ , K^+ ATP-ase / anterior gills / midgut / *Carcinus aestuarii*

1. Uvod

Način na koji morski organizmi podešavaju svoje osmoregulacijske mehanizme često je ispitivan, bilo u normalnim ili u stresnim uvjetima. Rakovi roda *Carcinus* dugo se vremena upotrebljavaju za ova ispitivanja. Danski znanstvenik Jens C. Skou je upravo na vrsti *Carcinus maenas* otkrio postojanje enzima Na^+ , K^+ ATP-aze. Za taj je enzim uspostavljeno da obavlja glavnu ulogu u ionskoj regulaciji svih metazoa, a od ukupnog ATP-a kojeg troši organizam u mirovanju, više od trećine otpada na stanični prijenos iona Na^+ i K^+ (Stryer, 1991). Zbog toga je enzim Na^+ , K^+ ATP-aza intenzivno istraživana kod mnogih vrsta, pa tako i kod brahiurnih rakova.

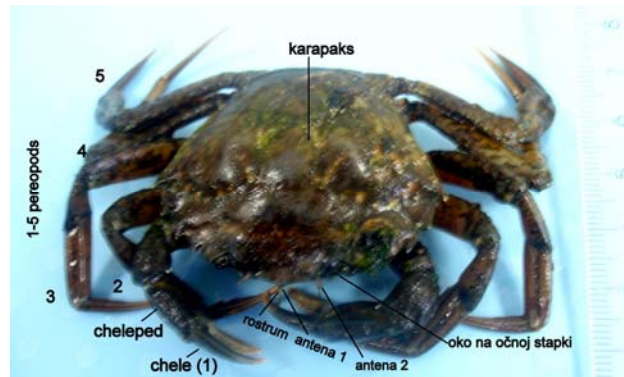
Aktivnost enzima Na^+ , K^+ ATP-aze je ispitivana pretežno u posteriornim škragama rakova roda *Carcinus* (Bianchini i Gilles, 1990; Burnett i Towle, 1990; Bertorello i Katz, 1993; Beguin i sur., 1994; Lucu i Flik 1999), koje su glavni osmoregulatorni organ, dok je u drugim, manje izraženim osmoregulatornim organima, njezina uloga slabije ispitana.

U ovom radu je proučavan utjecaj slanosti na specifičnu aktivnost enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u manje istraženim tkivima koja sudjeluju u osmoregulaciji, odnosno u anteriornim škragama i srednjem crijevu bočatog raka *Carcinus aestuarii*, prilagođenog na morsku (38 psu) i razrijeđenu morsku vodu (12 psu).

1.1. Biologija i komercijalna upotreba bočatog raka *Carcinus aestuarii*

Sinonim i stariji naziv za bočatog raka *Carcinus aestuarii* (Nordo, 1847) je *Carcinus mediterraneus* (Czerniavsky, 1884). Česti nazivi su: Eng.: Green crab; Bul.: Kriv rak; Rom.: Crabul de iarba; Rus.: Travyanoy krab; Tur.: Çalpara, Cingene pavuryasi; Ukr.: Trav'yany krab; Hrv.: Rak vodar, vodnjar, boćati rak. Spada u koljeno Crustacea, razred Eumalacostraca, podrazred Eucarida, red Decapoda, podred Brachyura, nadporodica Portunoidea, porodica Portunidae, rod *Carcinus* (NIMPIS, 2002).

Carcinus aestuarii spada u velike rakove, ima gladak, manje ili više šesterokutan oklop s relativno ravnim posterolateralnim rubom, dužim od anterolateralnog koji ima pet istaknutih, oštrih bridova. Anteriorna strana se sastoji od tri niska brida (slika 1).



Slika 1. Bočati rak, *Carcinus aestuarii*, vanjska anatomija - dorzalna strana.

Antenule su kratke, a antene imaju vrlo tanak bič. Najveće dimenzije oklopa su 80 mm u duljinu i 63 mm u širinu (Dumitrache, URL). Različitih su boja, ali uglavnom tamno zeleni s žutim ili crvenkastim abdomenom (slika 2).



Slika 2. Bočati rak, *Carcinus aestuarii*, vanjska anatomija - ventralna strana.

Litoralna je vrsta, česta u stjenovitim područjima, uz livade cvjetnica (*Zoostera* sp., *Cymodocea* sp.), kao i u bočatim lagunama te staništima s periodičkim podzemnim slatkovodnim izvorima (Lucu i sur., 2008). Prisutan je u Europi, najviše u Sredozemnom moru, oko Kanarskih otoka i sjeverne Afrike, a uveden je i u Japan, južnu Afriku, Australiju, Tasmaniju i Zapadnu Ameriku. Eurihalina i euritemna vrsta, omnivor i strvinar (NIMPIS, 2002).



Slika 3. Spolni dimorfizam raka *Carcinus aestuarii*. Lijevo mužjak, desno ženka, s ventralnom stranom okrenutom prema gore.

Iteroparni su, diecični, sa spolnim dimorfizmom (slika 3). Period razmnožavanja je od svibnja do prosinca, pri temperaturama od 3-26°C i slanosti od 13-54 psu, a za to vrijeme migrira na obalu. Mužjak odabire ženku neposredno prije njenog presvlačenja, prihvati je i nosi s ventralnom stranom prema dole. Parenje počinje nakon presvlačenja ženke, mužjak je tada okrene tako da je dorzalna strana prema gore, oplodi i nosi dok joj oklop ne otvrdne. Nakon toga se odvajaju, a ženka se zakapa u pijesak i stvara zatvorenu šupljinu u kojoj čuva jajašca. Njih nosi nekoliko mjeseci, periodički čisti i ventilira. Fekunditet ženki je oko 200.000 jaja. Postoji 6 ličinačkih faza u 3 stadija; protozoa, zoea i megalopa. Mogu doseći spolnu zrelost u prvoj godini. Planktonske ličinke su vrlo rezistentne pa mogu preživjeti u balastnim vodama. Gustoća populacije je procijenjena na 0,1-20 odraslih rakova/m² i do 2000 rakova/m² u pogodnim staništima tijekom ljeta u Europi. Maksimalno doživi 4-6 godina. Treba oko 10 presvlačenja da naraste 20 mm, 5-6 dodatnih do 60 mm, a za maksimalnu veličinu od oko 86 mm treba još 7-8 presvlačenja. Prosječna širina oklopa raka starog godinu dana je oko 36 mm (NIMPIS, 2002).

Komercijalna upotreba rakova roda *Carcinus*

Dugo vremena su komercijalno izlovljavani u različitim dijelovima Europe. Smatraju se delikatesom u Italiji, Španjolskoj i Portugalu, gdje je čak zabilježen i prijelov (Gomes, 1991; Klassen i Locke, 2007). Komercijalni ribolov u Francuskoj, Portugalu i Španjolskoj je bio oko 900 tona/god (Svane 1997). Problemi veće komercijalizacije ulova su u tome što vjerojatno ne postoje dovoljno velike populacije za održiv izlov (Klassen i Locke, 2007), upitan je utjecaj na populacije zbog predatorstva i (stalnog) tržišta za ovu

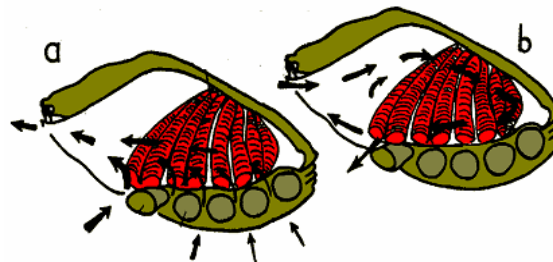
vrstu (Welch 1968; Moore i Howarth 1996; Gilles i sur., 2000; Catchpole i sur., 2006). *Carcinus* sp. se može upotrebljavati za uklanjanje nepojedene hrane, deritusa i obraštaja na uzgajalištu pod uvjetom da im se neutraliziraju kliješta (chelae) kako ne bi jeli uzgajane organizme, npr. školjkaše (Smith i Benos, 1991; Enright i sur., 1993).

Rakovi roda *Carcinus*, pa i *Carcinus aestuarii* služe kao obećavajući modelni organizmi za razna biomedicinska istraživanja, jednako zbog velike sličnosti transportnih mehanizama epitelnih struktura škrga rakova *Carcinus* s proksimalnim bubrežnim kanalima kralješnjaka, kao i jednostavnog sustava živčanih stanica, uz relativno lak pristup neuroprijenosnicima.

1.2. Građa škrga bočatog raka *Carcinus aestuarii*

Škrge rakova omogućuju selektivnu barijeru između vanjskog i unutarnjeg okoliša, predstavljajući organ s nekoliko uloga; izmjena plinova, prijenos osmolita, izlučivanje nitrita, regulacija volumena i održavanje kiselobazne ravnoteže (Gilles i Péqueux, 1985; Péqueux, 1995; Lucu i Towle, 2003).

Na prednjoj strani škržne šupljine nalazi se veliki anteriorni otvor kroz koji u normalnim uvjetima skafognatit izvlači vodu, a zauzvrat dolazi do ulaska vode kroz druge otvore, prvenstveno na osnovi kliješta (slika 4 a). Tok vode je tako usmjeren prema naprijed (Crothers, 1967). Voda se može usmjeravati i unazad (obruti tok, slika 4 b) pomoću periodičkih promjena toka vode u škržnoj šupljini. Ove promjene se događaju jednom u minuti, a pomažu čišćenju škrga od detritusa i pijeska (Crothers, 1967).



Slika 4. Škržna ventilacija raka *Carcinus maenas* (dijagram). Strelice pokazuju smjer toka vode: a) normalan tok, b) obrnuti tok (Crothers, 1967).

1.2.1. Anatomija

Jedna od značajki rakova koja ih razlikuje od kralješnjaka je površinski sloj epitelnih stanica škrge pokriven kutikulom. Kutikula slatkovodnih i morskih rakova je selektivno propusna za ione i male organske molekule.



Slika 5. Odignut oklop s dorzalne strane, prikaz škrge *in situ*; prva četiri para su anteriorne, ostatak su posteriorne škrge

Carcinus aestuarii ima devet parova filibranhijalnih škrge (slika 5) pokrivenih višeslojnom hitinskom kutikulom (Goodman i Cavey, 1990). Škrge prvog para su najkraće (oko 4 mm duljine), šestog su najduže (oko 20 mm duljine), a sastoje se od parnih, serijski poredanih ploča ili lamela uzduž središnje osi (Goodman i Cavey, 1990) koje se distalno smanjuju (slika 5).

Kod brahiurnih rakova postoje razlike između škrge:

1. Anteriorne škrge imaju tanak, slabo diferenciran epitel (2-4 μm) i uloga im je pretežno povezana s disanjem (Compère i sur., 1989; Lucu i Flik, 1999).
2. Posteriorne škrge sadrže brojne ionocite, deblje su (10-20 μm) i uglavnom odgovorne za osmoregulaciju (Siebers i sur., 1982; Barra i sur., 1983; Holliday, 1985; Welcomme i Devos, 1988; Péqueux, 1995; Luquet i sur., 2002; Lucu i Towle, 2003.).

Te razlike škrge su karakteristika brahiurnih rakova jer kod drugih vrsta rakova (npr. *Pacifastacus leniusculus*, *Astacus leptodactylus*, *Homarus gammarus*, *Macrobranchium*

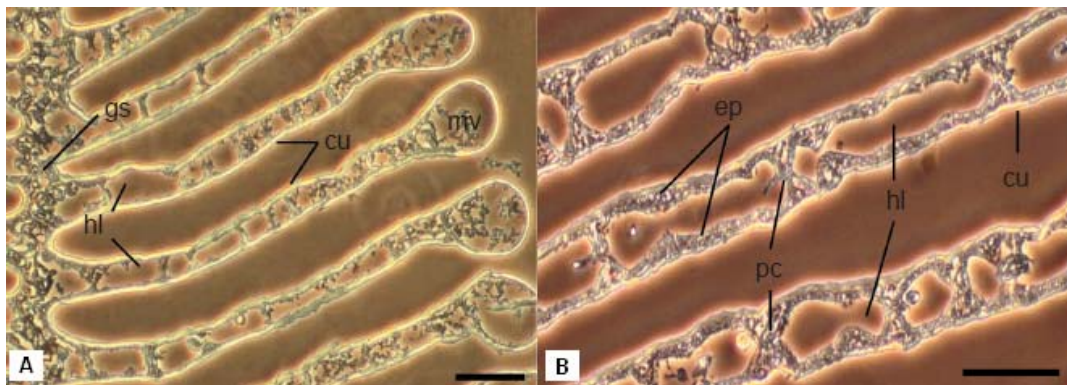
rosenbergii) nije zabilježena razlika u aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze anteriornih i posteriornih škruga (Wheatly i Henry, 1987; Flik i Haond, 2000; Wilder i sur., 2000; Lucu i Towle, 2003).

1.2.2. Histologija

Škrge se sastoje od škržnih lamela s hitinskom kutikulom. Apikalna površina škržnog epitela dotiče kutikulu, a bazalna membrana odvaja epitel i intralamelarni hemocel (McNamara i sur., 2005).

Kod životinja koje su prilagođene na morsku vodu može se razlikovati pet tipova epitelnih stanica škruga (Goodman i Cavey, 1990; Cieluch i sur., 2003) (slika 6):

- glavne stanice - dominiraju škržnim epitelom, skvamozne su ili lagano kuboidne i vjerojatno imaju ulogu u disanju,
- prugaste stanice (ionociti, kloridne stanice) - također su skvamozne ili lagano kuboidne s vjerojatnom ulogom u ionskoj regulaciji, bazalni nabori ovih stanica sadrže brojne mitohondrije,
- potporne stanice - vežu proksimalne i distalne strane lamela,
- nefrociti - velike, sferične stanice s voluminoznim vakuolama, često u kontaktu s potpornim stanicama.
- glikociti su pleomorfne stanice sastavljene od zrnaca glikogena i multigranularnih rozeta.



Slika 6. Imunolokalizacija Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim (A) i posteriornim (B) škragama odraslog raka *Carcinus maenas*. Fluorescentni mikrograf, fazni kontrast. Cu – kutikula, ep – epitel, gs – otvor škruga, hl – hemolimfa, mv – marginalna hemolimfna žila pc – potporne stanice (Cieluch i sur., 2003)

1.3. Građa crijeva bočatog raka *Carcinus aestuarii*

1.3.1. Anatomija

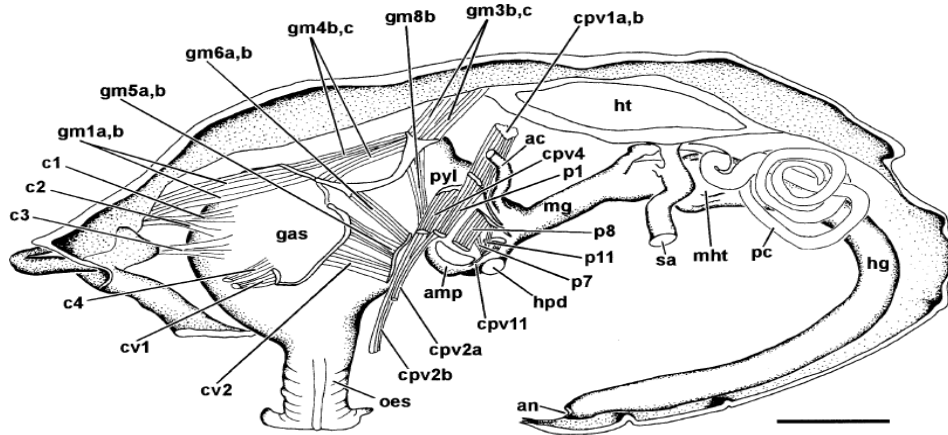
Crijevo raka se sastoji od prednjeg, srednjeg i stražnjeg crijeva (slika 7). Prednje i stražnje su ektodermalnog porijekla, a srednje je endodermalnog. Prednje crijevo se sastoji od usta, jednjaka i želuca (slika 7).

Srednje crijevo ima osnovni tubularni dio i nekoliko divertikula koje uključuju probavnu žlijezdu (veliki žučkasti dio odnosno hepatopankreas) i tri srednja cekuma. Ti organi obavljaju cjelokupnu probavu hrane. Srednje crijevo ima jednostavni žljezdani epitel bez kutikule (Icely i Nott, 1992), počinje na spoju s piloričkim područjem regije želuca (slika 7) i završava s jednom savinutom cijevi, posteriornim cekumom srednjega crijeva (Smith, 1978) neposredno ispred spoja telzona i abdomena (Johnson, 1980).

Probavna žlijezda (hepatopankreas, slika 7) potječe odmah iza početka srednjeg crijeva i zauzima većinu dorzalne anteriorne polovice glavopršnjaka (cefalotoraksa) (Pearson, 1908; Barker i Gibson, 1978; Johnson, 1980).

Cekum srednjeg crijeva ima opsežno grananje unutar probavne žlijezde, tvoreći slijepo završavajuće tubule (slika 7). Ovdje započinje enzimatska probava i apsorpcija hrane (Johnson, 1980).

Stražnje crijevo se sastoji od tubularnog crijeva, rektuma i anusa, ima kutikulu i počinje iza posteriornog srednjeg cekuma (Smith, 1978). Proteže se od abdomena do anusa, koji se otvara ventralno na telzonu (Pearson, 1908; Johnson, 1980).



Slika 7. Poprečni presjek probavnog sustava raka *Carcinus maenas*, uključujući asociirane mišiće i organe, (mužjak 6 cm duljina oklopa); [*ac* anteriorni cekum, *amp* pilorička ampula, *an* anus, *c1*, *c3* kardijačni mišići želuca 1 i 3, *c2* anteriorni superiorni dilatator ventrikule, *c4* dilatator lateralne anteriorne ventrikule, *cv1* lateralno posteriorni dilatator ventrikule, *cv2* lateralni interiori dilatator ventrikule, *cpv1a,b* anteriorni dorzalni pilorički dilator, *cpv2a* vanjski inferiorni dilatator pilorusa, *cpv2b* unutarnji inferiorni dilatator pilorusa, *cpv4* pilorički mišić 216a, *cpv11* pilorički mišić 216 m, *gas* gastički dio želuca, *gm1a,b* anteriorni gastički mišići, *gm3b,c* lateralni posteriorni želučani mišići 4b,c kardio-pilorični mišići, *gm5a,b*, *gm6a,b* i *gm8b* lateralni kardijačni mišići, *hg* stražnje crijevo, *hpd* otvor cijevi probavne žlijezde, *ht* srce, *mg* srednje crijevo, *mht* prijelaz srednjeg u stražnje crijevo, *oes* jednjak, *p1* pilorički mišić 216c, *p7* pilorički mišić 216f, *p8* pilorički mišić 216e, *p11* pilorički mišić 11, *pc* posteriorni cekum srednjeg crijeva, *pyl* pilorički dio želuca, *sa* sternalnim arterijskim panjem (hemolimfna opskrba srednjeg crijeva)]. Skala 5 mm (Webster i sur., 2000).

1.3.2. Histologija

Srednje crijevo morskih rakova se sastoji od jednoslojnog epitela s brojnim naborima i vrlo visokim, uskim potpornim stanicama koje sadrže brojne mikrovile iznad tanke, guste apikalne citoplazme. Bazalna membrana je dobro razvijena i višestruko presavijena te prilježe uz gustu bazalnu laminu. Jezgre su velike, lagano obojene, eliptične i središnje smještene (McNamara i sur., 2005).

U stražnjem crijevu nalazi se jedan sloj globularnih epitelnih stanica s uglavnom bazalnim jezgrama, preko kojih je tanka kutikula (McNamara i sur., 2005).

1.4. Osmoregulacija vodenih beskralješnjaka

Homeostaza koncentracije soli u tjelesnim tekućinama je važna za održavanje normalnih funkcija svih organizama. Ovo je posebno značajno kod vodenih organizama u plitkom litoralnom području gdje često dolazi do promjena slanosti okolne vode. Takvi organizmi moraju razviti strategije prilagođavanja različitim osmotskim koncentracijama, a prema tome ih možemo podijeliti na osmoregulatore (mogu održavati osmolarnost tjelesnih tekućina neovisno o okolišnim fluktuacijama) i osmokonformere (prilagođavaju se osmolarnosti okoline).

Glavni doprinos osmolarnosti hemolimfe u eurihalinih rakova imaju ioni natrija i klorida; zato je mogućnost njihove regulacije jedna od glavnih sposobnosti životinja za toleriranje promijena slanosti okolnog medija.

1.4.1. Funkcija i građa enzima Na^+ , K^+ ATP-aze

Na^+ , K^+ ATP-aza je transportni enzim koji se nalazi u plazmatskim membranama životinjskih stanica (Lucu i Towle, 2003). Ona ima važnu ulogu u procesima koji zahtijevaju energiju u okolini jer kontrolira stanični volumen održavanjem gradijenata Na^+ i K^+ preko stanične membrane i stvara membranske potencijale u stanici (Lucu i Towle, 2003).

Mnoge estuarijske vrste rakova su pokazale povećane razine aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u homogenatima životinja prilagođenih na niže slanosti u usporedbi s životinjama prilagođenim na visoke slanosti (Siebers i sur., 1982; Holliday, 1985; Harris i Santos, 1993).

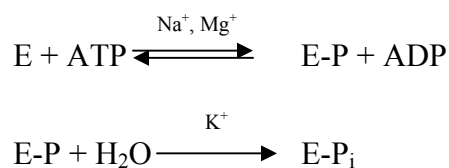
Prilagodбом pri prelasku iz morske u razrijeđenu morsku vodu, u škragama velikog broja rakova (npr. *Carcinus maenas*, *C. aestuarii*, *Callinectes sapidus*, *C. similis*, *Homarus gammarus*, *Uca pugnax* i *Chasmagnathus granulatus*) se aktivira transportni enzim Na^+ , K^+ ATP-aza, za koji se smatra da uzrokuje povećan unos Na^+ i Cl^- kroz škrge (Towle i sur., 1976; Neufeld i sur., 1980; Siebers i sur., 1982; Holliday, 1985; Siebers i sur., 1985; Welcomme i Devos, 1988; Piller i sur., 1995; Castilho i sur., 2001; Lucu i Towle, 2003).

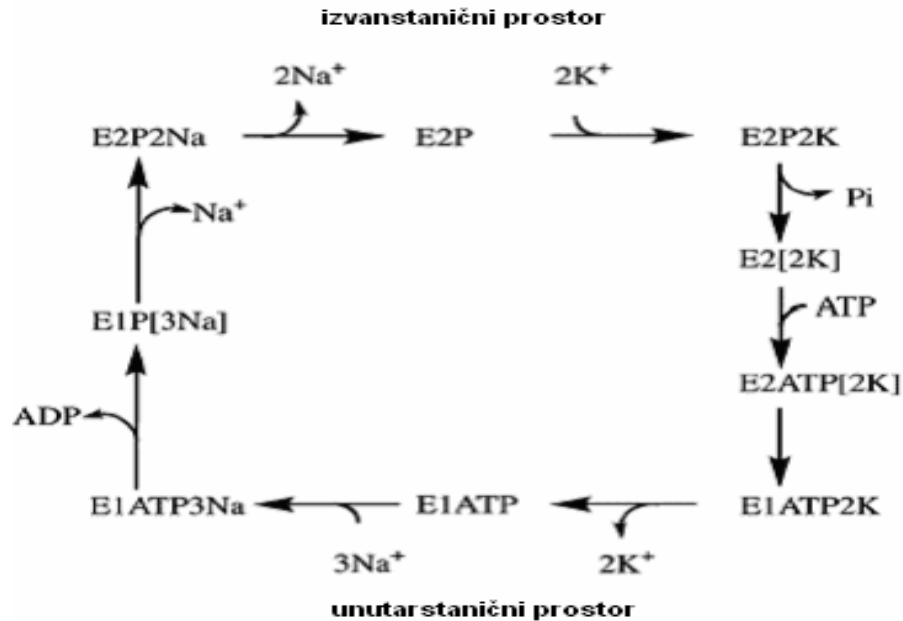
Enzim Na^+ , K^+ ATP-aza je tetramer čiju primarnu strukturu čine dvije α i dvije β podjedinice (Peterson i Hokin, 1981):

1. Glavna, α proteinska podjedinica molekularne mase oko 95000 (112 kDA) prolazi kroz membranu na više mjesta. Odgovorna je za katalitička i transportna svojstva enzima. Na njoj su vezna mjesta za katione, ATP i specifični inhibitor enzima ouabain (Lucu i Towle, 2003).
2. β podjedinica je polipeptid molekularne mase oko 40000 (40 do 60 kDA) koji prolazi kroz membranu ovisno o stupnju glikosilacije i pretpostavlja se da ima ulogu u savijanju proteina, važna je za normalnu aktivnost enzima i obavlja modulaciju α podjedinice za afinitet Na^+ i K^+ (Lucu i Towle, 2003).

Ovaj enzim spada u P-tip ATP-aza jer tijekom njegovog rada dolazi do fosforilacije; fosforiliran je u stanju E1 (slika 8; E1 ATP) i defosforiliran u stanju E2 (slika 8; E2P) (Stryer, 1991).

Uz nazočnost intracelularnog Na^+ i Mg^+ , hidrolizom molekule ATP-a oslobađa se ADP i anorganski fosfat (Pi). To daje energiju za fosforilaciju Na^+ , K^+ ATP-aze (slika 8; E1ATP3Na) i tri iona natrija se vežu na protein (γ -fosforilacijska grupa iz ATP-a je prebačena na aspartilni nastavak u enzimu koji formira kovalentni fosforilacijski intermedijer - EP kompleks) (Stryer, 1991; Lee, 1996).

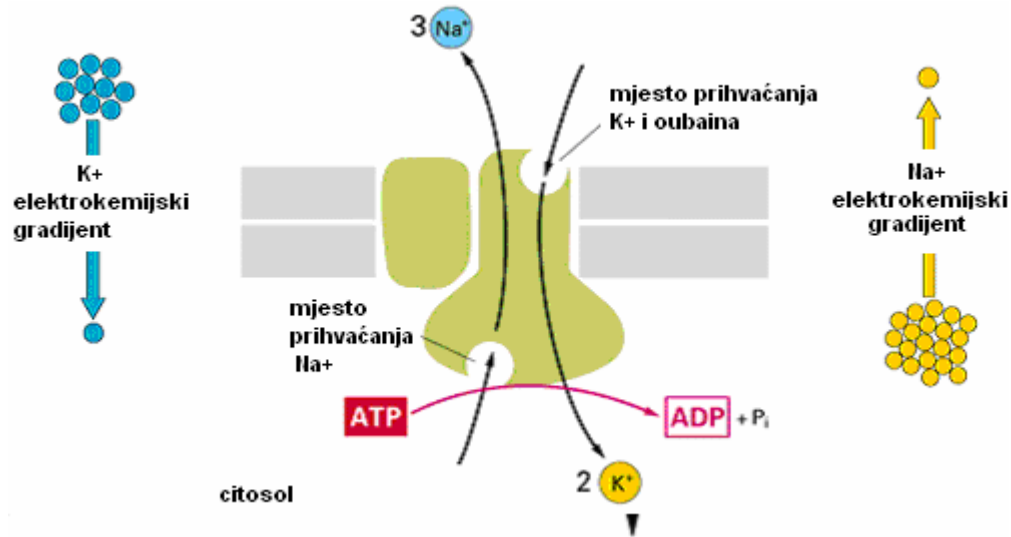




Slika 8. Funkcioniranje enzima Na^+ , K^+ ATP-aze. (Hilge i sur., 2003)

Nakon promjene konformacije enzimske molekule, Na^+ je okružen proteinom i 3 iona natrija su izbačena iz stanice u vanstanični prostor (slika 8; E2P2Na). U prisutnosti K^+ , taj se fosforilirani intermedijer (slika 8; E2P) hidrolizira – to je defosforilacijski korak, dva iona kalija iona iz vanstaničnog prostora su vezana na mjesto izbačenog Na^+ (slika 8; E2PK). Nakon konformacijske promjene, dva iona kalija su unesena u stanicu, a Na^+ , K^+ ATP-aza se ponovno formira (Stryer, 1991; Hilge i sur., 2003). To je elektrogeni proces, za koji je potrebna energija (ATP).

Za fosforilacijsku reakciju nije potreban K^+ , a za defosforilaciju nisu potrebni Na^+ i Mg^{2+} . Nadalje, ATP je djelatan supstrat za ATP-azu samo kada je unutar stanice. Kardiotonički steroidi (ouabain, digitalis) koče crpku samo kada su izvan stanice, a vanadat samo kada je unutar stanice (Stryer, 1991). Specifični inhibitor ouabain se čvrsto veže na E~P na α podjedinicu, blizu položaja gdje je K^+ vezan za enzim čime se prekida ciklus i mogućnost pretvorbe E~P u E (slika 9).



Slika 9. Građa i funkcija enzima Na^+ , K^+ ATP-aze i njegova inhibicija oubainom. (URL: [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm))

Uloga K^+ kao protuiona za Na^+ može biti zamijenjena i amonij ionom, doduše s manjim afinitetom (Skou, 1960; Towle i sur., 1976; Towle, 1981; Masui i sur., 2002). Istovremeno dodavanje K^+ i NH_4^+ je dovelo do zaključka da se ovi ioni pričvršćuju na protein na dva različita mjesta (Masui i sur., 2002).

Na^+ , K^+ ATP-aza stvara koncentracijski gradijent kojim je omogućen sekundarni prijenos drugih iona i malih organskih molekula (aminokiseline, šećeri). Primjerice, tri molekule glukoze mogu biti prenesene u stanicu uz rad Na^+ , K^+ ATP-aze (tri natrija izbačena iz stanice) o istome trošku. Prema tome, obnavljanje Na^+ , K^+ ATP-aze zahtijeva uvjete u kojima je Na^+ u unutarstaničnom i K^+ u vanstaničnom prostoru. Maksimalna aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze je pri temperaturi od 37 do 40°C.

1.4.2. Utjecaj enzima Na^+ , K^+ ATP-aze na osmoregulaciju rakova

Modelni primjeri vrsta koji mogu regulati hemolimfu i stanični volumen pri različitim slanostima su zeleni rak, *Carcinus maenas*, bočati rak *C. aestuarii* i plavi rak *Callinectes sapidus*. Za razliku od slatkovodnih rakova i kralješnjaka, navedeni rakovi ne mogu reapsorbirati sol iz urina pa ne mogu ni ispuštati urin različite koncentracije od hemolimfe (Li, 2003). To znači da rakovi gube puno soli preko urina kada su u razrijeđenoj morskoj vodi. Oni mogu nadoknaditi taj gubitak aktivnim unosom soli,

uglavnom preko posteriornih škruga (Lucu i Flik, 1999; Li, 2003; Lucu i Towle, 2003) čime održavaju ionsku koncentraciju i osmotski tlak hemolimfe viši od onoga u razrijeđenom okolišu (umjereni hiperosmoregulatori).

Enzim Na^+ , K^+ ATP-aza je smješten u bazolateralnoj membrani stanica škruga rakova, a s apikalne membrane je odsutan (Towle i Kays, 1986; Towle, 1997; Ziegler, 1997; Lucu i Towle, 2003). Kod rakova je amino sekvenca α podjedinice ovog enzima 71-74% identična onoj kralješnjaka (Lucu i Towle, 2003).

Katalitički aktivna α podjedinica Na^+ , K^+ ATP-aze je odgovorna za pobudu aktivnog izbacivanja natrija iz energetski bogatih kloridnih stanica u hemolimfu, koja postaje hiperosmotska u odnosu prema vanjskom mediju (razrijeđena morska voda); potiče volumnu regulaciju stanica i preživljavanje u novim uvjetima (Lucu i Towle, 2003). Takva regulacija kod rakova roda *Carcinus* je učinkovita do donje granice slanosti od 8 psu (Siebers i sur., 1982), a kod roda *Callinectes* su poznate određene populacije koje učinkovito reguliraju osmolarnost hemolimfe i u slatkovodnim uvjetima (Cameron, 1978; Mantel i Farmer, 1983).

Kada su rakovi roda *Carcinus* u morskoj vodi osmolarnosti oko 1000mOsmol/l, osmolarnost hemolimfe im je oko 1070mOsmol/l (malo povišena u odnosu na okoliš - blago hipersomotska) odnosno gotovo izoosmotska s medijem (Lucu i Flik, 1999; Lucu i Towle, 2003). Ako se nalaze u 10 psu slanosti (razrijeđena morska voda osmolarnosti 313 mOsmol/l), osmolarnost hemolimfe je 615 mOsmol/l (hiperosmotska hemolimfa); njihovi ionski regulatorni mehanizmi brzo reagiraju na promjenu slanosti, gdje razina Na^+ u hemolimfi doseže stabilno stanje u roku od 6 sati iza smanjenja slanosti (Cieluch i sur., 2005).

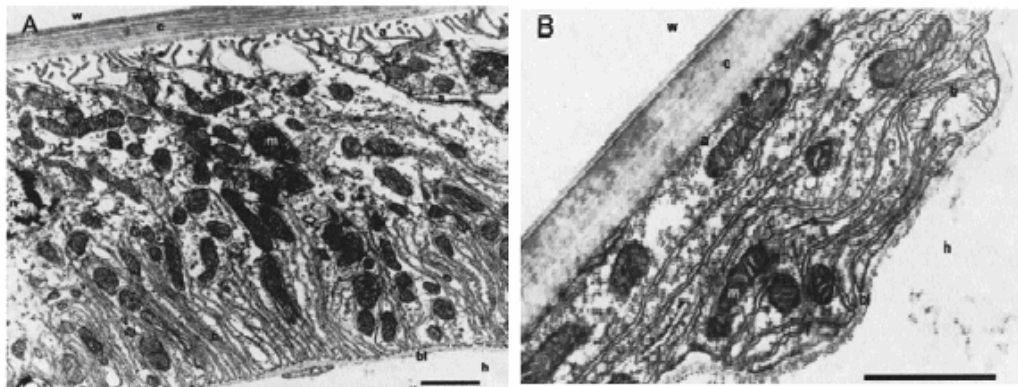
Osim Na^+ , K^+ ATP-aze, koja ima najveću ulogu u transportu preko škržnog epitela (Lucu i Towle, 2003), i nekoliko drugih enzima je uključeno u osmoregulacijski proces, uključujući V-tip H^+ ATP-aze, ugljikovu anhidrazu, protuizmjene $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ i Na^+/H^+ (Lin i Tsail, 2007).

Mehanizmi kojima se natrijevi ioni ekstrahiraju iz okoliša kroz apikalnu membranu epitelnih stanica škrga su slabije proučeni, ali postoje tri kandidata za transport:

1. Na^+/H^+ protuizmjena (NHE)
2. Tip epitelskog natrijskog kanala (ENaC) i
3. Istosmjerni kotransport natrij-kalij-2 klorid ($\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$)

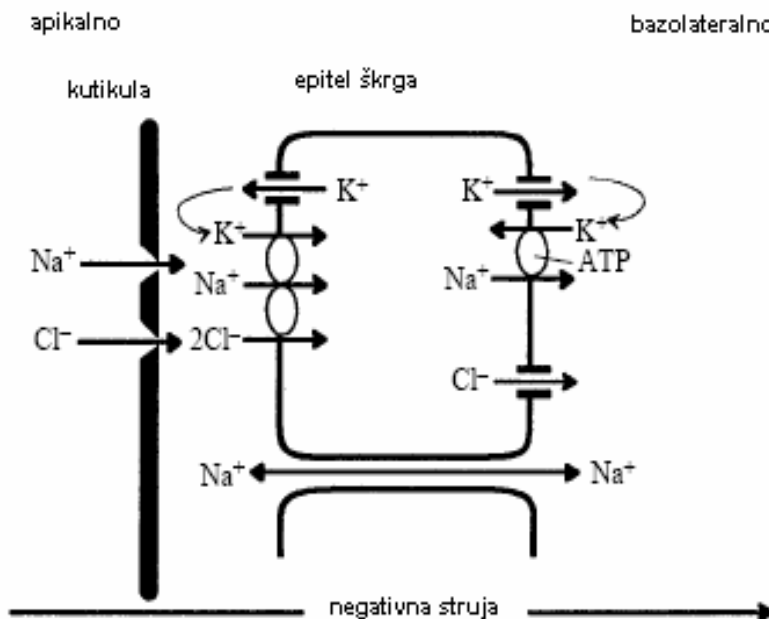
1.4.3. Osmoregulacija u kloridnim stanicama

MRC, ionociti ili kloridne stanice (slika 10) su raspoređene kroz epitelne stanice tkiva kao što su antenalne žlijezde, crijevo, kutikula i integument, a najviše ih je zabilježeno u škragama (Evans, 2008). Specijalizirane su za ionski transport i na njima se temelji osmoregulacijska uloga; pri niskim slanostima kloridne stanice kompenziraju gubitak iona preko površine tijela i urina, aktivno crpeći ione, uglavnom Na^+ i Cl^- (Cieluch i sur., 2005). Sastoje se od velikog broja uvrnuća bazolateralne i apikalne membrane (s mikrovilima) za aktivnu ionsku regulaciju, uz brojne mitohondrije (Mantel i Farmer 1983; Compère i sur., 1989; Péqueux 1995).



Slika 10. Ultrastruktura 2 glavna stanična tipa u škržnom epitelu plavog raka *Callinectes sapidus* (Towle i Kays, 1986). (A) Tip ionskih transportnih stanica koji pokazuju opsežnu proliferaciju membrane i brojne mitohondrije i (B) tip respiracijskih stanica koje su puno tanje, s manje razvijenom površinskom membranom u usporedbi s A. a: apikalna membrana; b: bazolateralna membrana; bl: bazalna lamina; c: kutikula; h: hemolimfni prostor; m: mitohondriji; n: jezgra; w: vodeni prostor. Skala $1\mu\text{m}$. (Towle i Weihrauch, 2001).

Dva generalna modela su predstavljena na slikama 11 i 12; osmoregulacija morskih i slatkovodnih rakova (Onken i sur., 1995; Riestenpatt i sur., 1996; Saez i sur., 2009). Oba scenarija stavljaju Na^+ , K^+ ATP-azu na bazolateralnu membranu kloridnih stanica.



Slika 11. Model aktivnog prenosa NaCl -a kroz posterirone škrge raka *Carcinus maenas* (Riestenpatt i sur., 1996).

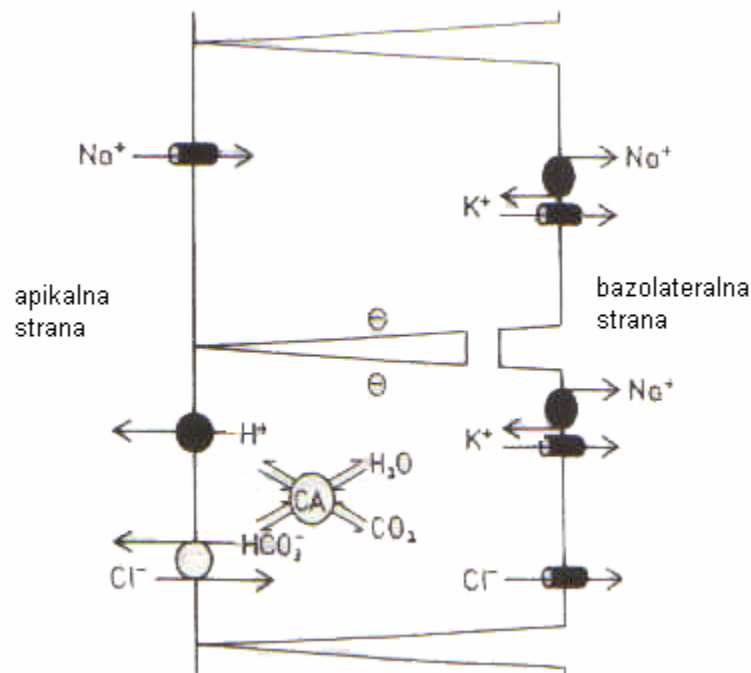
Model osmoregulacije morskih rakova (slika 11); afinitet škržne Na^+ , K^+ ATP-aze raka *Carcinus maenas* za Na^+ se povećava sa smanjenjem slanosti, ali afinitet za K^+ se ne mijenja (Siebers i sur., 1983; Winkler, 1986). Aktivni prijenos Na^+ i Cl^- preko škrge raka *Carcinus maenas* je elektrogen. S bazolateralne strane Na^+ , K^+ ATP-aza daje energiju za unos Na^+ i Cl^- u hemolimfu, održavajući membranski gradijent Na^+ i K^+ . Na^+ gradijent (usmjeren u stanicu) dovodi do transapikalnog ulaza Na^+ , K^+ i Cl^- preko istosmjernog kotransporta $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ (Riestenpatt. i sur., 1996).

Rakovima *Carcinus maenas*, prilagođenim razrijeđenoj morskoj vodi, kalijski je kanal na obje strane škržnog preparata (obnavljaju tok iona kalija). Gradijent K^+ (usmjeren van stanice) stvara negativan potencijal koji dovodi do bazolateralnog izlaza Cl^- preko kloridnih kanala u smjeru suprotnom od gradijenta. Tako negativna struja ide kroz apikalnu membranu preko K^+ kanala (blokira ih CsCl , u suprotnom se recikliraju

apikalnim istosmjernim kotransportom) i kroz bazolateralnu membranu preko Cl^- kanala (Riestenpatt i sur., 1996).

S obzirom da preko $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ kotransporta uđe dvostruko više iona klorida, dio iona natrija i kalija prolazi paracelularno u stanicu (provodljivost od 45 do 50 mS cm^{-2}), a i napušta organizam kroz propusne stanične spojeve, bez obzira na njihov nepovoljan kemijski gradijent.

Unos Na^+ i Cl^- u škrigama raka *Carcinus maenas* (slika 11) je najvjerojatnije neovisan o ugljikovoj anhidrazi i ne prenosi se putem elektroneutralnih protuizmjena Na^+/H^+ i $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ na apikalnoj membrani (Onken i sur., 1995).



Slika 12. Model aktivnog prenosa NaCl -a kroz posterirone škrge raka *Eriocheir sinensis* prilagođenog na slatku vodu (Onken i sur., 1995).

Kod rakova koji dio života žive u slatkoj vodi (npr. *Eriocheir sinensis*, *Dilocarcinus pagei*) osmoregulacijski mehanizmi se ponešto razlikuju (slika 12). Natrij ulazi u stanicu putem protuizmjene Na^+/H^+ (Saez i sur., 2009). Natrij ovdje ne može proći paracelularno kao kod morskih rakova jer su međustanični spojevi tijesni (Onken i sur., 1995). Na^+ , K^+

ATP-aza slatkovodnih rakova pokazuje veći afinitet za natrij nego kod boćatih rakova, dok je kod morskih osmokonformera očit niži afinitet (Lucu i Towle, 2003).

Za razliku od morskih rakova, Cl^- se s apikalne strane prenosi pomoću ugljikove anhidraze i H^+ ATP-aze (Onken i sur., 1991; Onken i sur., 1995), dok s bazolateralne strane izlazi generiran potencijalom kroz Cl^- kanale (slika 12).

2. Materijal i metode

Bočati rakovi *Carcinus maenas* su prikupljeni u području solane Ston, Pelješac. To je područje karakterizirano po plitkim bazenima, izoliranim od morskih gibanja koji služe za kristalizaciju morske soli. Tijekom godine slanost u takvim bazenima varira, pogotovo u rano proljeće kada dolazi do nakupljanja oborinskih voda koje smanjuju inače relativno visoku slanost. Ovo su idealni uvjeti za bočate rakove, koji zbog već spomenute visoke plastičnosti, mogu tolerirati velike promijene u okolišu.

Na dan prikupljanja rakova slanost je iznosila 24 psu. Prikupljene su jedinke veličina od 35 do 55 mm, dakle odrasle, spolno zrele jedinke. U istraživanju su se koristili samo mužjaci, a istraživalo se izvan sezone mriješćenja i u fazi između dva presvlačenja rakova.

28 mužjaka je držano u četiri plastična bazena volumena 50 l (u svakom po 7 rakova). U dva bazena slanost je iznosila 12 psu (razrijeđena morska voda), a u ostala dva 38 psu (morska voda). Svi su bazeni imali šljunčanu podlogu koja je služila kao supstrat i biofiltrar, uz konstantno prozračivanje. Temperatura vode u bazenima je iznosila $17\pm 2^{\circ}\text{C}$. Rakovi su hranjeni dva puta tjedno goveđim srcem ili mesom lubina, s izmjenom vode nakon svaka četiri hranjenja. Ispitivane jedinke su prilagođavane minimalno 14 dana na laboratorijske uvjete slanosti morske vode od 12 i 38 psu, a prije krioanestezije nisu hranjene barem 24 sata.

2.1. Postupak mjerenja aktivnosti enzima

Podaci za biometrijsku analizu (širina toraksa i masa) uzimani su nakon krioanestezije u trajanju od 10 minuta. Rakovima je skinut oklop zbog prikupljanja četiri anteriorne škrge, a četiri posteriorne su prethodno uklonjene da ne onečiste uzorak.

Škragama je izmjerena masa prema kojoj je određena količina homogenizacijske otopine (omjer 1:10=w/v). 0.5 l otopine za homogenizaciju tkiva (hypo) se sastoji od: 12,5 mM NaCl 0,35g; 1mM HEPES 0,119 g; 1mM DTT 0,075 g; 0,5 mM EDTA 0,093 g; pH 8-

8.5; aprotinin 0,1ml/100ml (stavlja se neposredno prije mjerenja). Aprotinin je inhibitor proteaza iz goveđih pluća (aseptička otopina u 0,9% NaCl i 0,9% benzilnom alkoholu; 1,7 mg proteina/ml (Biuret), 4,4 TIU/mg proteina, 1 jedinica inhibitora tripsina. Sigma – Aldrich, A-6279, EC No 232-994, Lot 063K7016).

Škrge su stavljene u Dounce-ov homogenizator zajedno sa 10 puta većom količinom ledene homogenizacijske otopine hipotoničnog pufera i homogenizirane s 50 udaraca. Nakon homogenizacije, uzorak je profiltriran kroz mrežicu od najlona pora 0,1 mm i stavljen na led.

Za disekciju srednjega crijeva, rak je uzdužno presječen škarama, te je nježnim povlačenjem telzona izolirano srednje crijevo (ne smije biti onečišćeno divertikulima ili probavnom žlijezdom, mora biti ispražnjeno i odrezano u području prelaska abdomena u telzon). Nakon mjerenja mase srednjeg crijeva, uzorci su obrađeni na isti način kao i škrge te pohranjeni na led do centrifugiranja na 500 x g u trajanju od 15 min pri 4°C.

S obzirom da su metoda ispitivanja i izračunavanje podataka isti za oba ispitivana tkiva, u ovom radu je cjelokupni postupak prikazan samo na anteriornim škragama.

Određivanje aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze je obavljeno prema Lucu i Flik, 1999, u supernatantu. Aktivnost je procijenjena u triplikatima inkubirajući 30 μl homogenata s 250 μl otopine za inkubaciju A. Istovremeno su drugi triplikati homogenata tretirani s otopinom za inkubaciju E.

Obje otopine za inkubaciju u sebi sadrže osnovnu otopinu - Assay solution (AS) koja se sastoji od 40 ml otopine za inkubaciju uzorka (0,5l otopine = 200 mM NaCl 5,844g; 10 mM MgCl_2 1,0165 g; 0,2 mM EDTA 0,02922 g; 60mM imidazol 2,0424 g; pH 7,5 određen pomoću HEPES) i 8 ml Na_2ATP (AS; 50ml otopine = 30mM Na_2ATP 0,8267g; Boeringer Lot 137 68431-04 (Adenozin – 5 – trifosfat); pH do 7,5 TRIS, pohraniti na -20°C u zamrzivaču). Razlika između otopina je u tome što otopina A sadrži 24 ml AS, 8

ml KCl (100ml; 125mM KCl; 0,932g) i 8 ml destilirane vode, dok otopina E sadrži 24 ml AS, 16ml destilirane vode i 40 mg oubaina (inhibitor enzima Na^+ , K^+ ATP-aze).

Nakon dodavanja otopina A i E, uzorci se stavljaju na inkubaciju u vodenom termostatu pri 37°C na 15 minuta. Reakcija se stopira dodavanjem 1 ml stop otopine.

Stop otopina se sastoji od otopine amonij heptamolibdata (11,14g) i koncentrirane H_2SO_4 (36,6 ml); nakon otapanja dodati do 1l destilirane vode, iz hladnjaka; u otopinu dodati 2,3g FeSO_4 i nakon njegovog otapanja nadoliti 25 ml TCA (8,6%w/w trikloroctene kiseline; 86g TCA/1l destilirane vode iz hladnjaka); držati na ledu za mjerenje aktivnosti enzima, pripremiti na dan mjerenja.

Uzorci se ostave 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi reakcija bila sigurno prekinuta, iza čega se mjeri apsorbanacija na valnoj dužini od 700 nm (Perkin–Elmer UV/VIS spectrometer lambda EZ201). Kao standard se koristio kalcij/fosfat, kombiniran standard (100 ml = kalcij 100 mg/l (2,5 mmol/l), fosfat 50 mg/dl (1,62 mmol/l) i hidroklorna kiselina 0,02 N, magnezij, približno 20 mg/l. Sigma Diagnostics).

Spektrofotometrija je metoda koja se zasniva na kvantitativnim reakcijama između tvari koju ispituje i pogodnih reagensa uz stvaranje obojenog proizvoda. Intenzitet nastale boje mjeri se spektrofotometrijski. Fizička veličina koja se na instrumentu najčešće određuje je apsorbanacija – Abs. Ona je jednaka produktu molarnog koeficijenta apsorpcije, koncentracije i debljine sloja otopine.

Apsorbancija uz konstantnu debljinu sloja je linearno proporcionalna koncentraciji tvari. Absorbancija je bezdimenzijska veličina, debljinu sloja obično izražavamo u cm, a koncentraciju u mol/dm^3 . Koncentracija svakog uzorka se može odrediti uspoređivanjem s mjerenom apsorbanacijom standardne otopine poznate koncentracije (Burns i MacDonald, 1975).

2.2. Postupak mjerenja koncentracije proteina

Koncentracija proteina u homogenatima je procijenjena Bradfordovom metodom (1976). Na homogeniziran i centrifugiran uzorak je apliciran 1 ml razrijeđene otopine Bio-Rad (Commassie Brilliant Blue reagent; 10 ml Bio-Rad koncentrata (bojilo, koncentrat, 450 ml, Bio-Rad Laboratories GmbH. Sastav: fosfatna kiselina i metanol. (Toxic.Lot.No:1087449) i 40 ml destilirane vode (otopinu pripremiti na dan mjerenja.).

Mješavina je promiješana na Vorteks mješaču 1-2 sekunde i ostavljena 15 minuta da miruje na sobnoj temperaturi. Nakon toga je spektrofotometrijski mjerena apsorbancija proteina na valnoj dužini od 595 nm. Kao standard je korišten BSA serum (Sigma-Aldrich Protein standard, 2 mg. 055K8805. BSA/ml (bovine serum albumine) u 0,9% NaCl, sadrži 0,05%NaN₃. SL05204).

2.3. Histokemijske metode - Wachstein Meisel metoda (1957)

Uzorci se nakon disekcije stave na prethodno smrznut Killik medij za kriostaciju (Bio Optica, LOT 0550840) i režu na kriostatu u debljini od 15 µm. Kriostat je dobro izolirana komora u kojoj se nalazi mikrotom temperature od -10 do -30°C, a po potrebi i niža (Svob, 1974).

Svježe smrznuti uzorci se fiksiraju u tri različita medija; osnovni - medij 1 (0,2 M TRIS-maleat pufer, pH 7,2; 20 ml, ATP; 9,15 mg, MgSO₄; 49,3 mg, Pb(NO₃)₂; 15,9 mg – stavlja se zadnji), medij 2 (0,2 M TRIS-maleat pufer, pH 7,2, 19,8 ml, ATP, 9,15 mg, MgSO₄; 49,3 mg, Pb(NO₃)₂; 15,9 mg – stavlja se zadnje, NaCl (1mg/ml); 0,1 ml, KCl (1 mg/3,3 ml; 0,1 ml) i medij 3 (0,2 M TRIS-maleat pufer pH 7,2; 19,8 ml, ATP; 9,15 mg, MgSO₄; 49,3 mg, NaCl (1 mg/ml); 0,1 ml, KCl (1 mg/3,3 ml); 0,1 ml, strofantin; 1,45 mg, Pb(NO₃)₂; 15,9 mg – stavlja se zadnje).

Uzorci se inkubiraju 20 min na sobnoj temperaturi, nakon čega se dobro ispiru u destiliranoj vodi. Rezovi se potom stavljaju u 1% amonij sulfit na 60 sekundi iza čega se ponovno detaljno ispiru destiliranom vodom i uklapaju u glicerol želatinu (Glychrogel; destilirana voda 80 ml, glicerol 20 ml, želatina u prahu 3 g, kromni alaun 0,2 g; kromni alaun (krom aluminij sulfat) se rastopi u 30 ml vode, a želatina u 50 ml vode; pomiješa se

i doda glicerin; pH otopine treba biti 7,4 što se korigira pomoću NaHCO_3). Ovaj medij se dosta stvrdne i retrahira pa nije moguće odstraniti pokrovno stakalce.

2.4. Statistička obrada podataka

Izračunate vrijednosti su izražene kao srednjak \pm S.D; dvije male grupe uzoraka da se utvrdi ima li značajne razlike između njih. Razlike između grupa su bile procijenjene kao jednosmjerna ANOVA statistička analiza koju je slijedio Studentov t-test. Razlike su procijenjene za $P < 0,05$.

3. Rezultati

Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze je mjerena u homogenatima anteriornih škrga bočatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanost od 38 i 12 psu minimalno 2 tjedna prije početka pokusa. Rakovima su prikupljeni biometrijski podaci; širina oklopa, ukupna masa tijela i masa pojedinih organa (tablice 1 i 2). Biometrijski podaci su potrebni kako bi se osigurala uniformnost rezultata.

Tablica 1. Biometrija rakova (S – morska voda slanosti 38 psu, D- razrijeđena voda slanosti 12 psu)

Morska voda, 38 psu			Razrijeđena morska voda, 12 psu		
Oznaka	Širina oklopa (mm)	Masa tijela (g)	Oznaka	Širina oklopa (mm)	Masa tijela (g)
1. rak = (1S)	50	34	1. rak = (1D)	44	19
2. rak = (2S)	48	24	2. rak = (2D)	48	23
3. rak = (3S)	51	35	3. rak = (3D)	44	22

Prema masi organa je određena količina homogenizacijske otopine koja se dodaje u omjeru 1:10 (masa : volumen, w/v) (tablica 2).

Tablica 2. Masa anteriornih škrga i količine dodane otopine za homogenizaciju (1:10 razrijeđenje); S – morska voda slanosti 38 psu, D- razrijeđena voda slanosti 12 psu

Uzorci:	Oznaka uzorka	Slanost	Masa škrga (g)	Homogenizacijska otopina, dodano:
1. škrge	1GS	38	0,22	2,2 ml
2. škrge	2GS	38	0,29	2,9 ml
3. škrge	3GS	38	0,34	3,4 ml
1. škrge	1GD	12	0,24	2,4 ml
2. škrge	2GD	12	0,29	2,9 ml
3. škrge	3GD	12	0,23	2,3 ml

3.1. Aktivnost Na⁺, K⁺ ATP-aze u anteriornim škrigama

U tablici 3 su prikazani rezultati spektrofotometrijske analize homogenata anteriornih škriga izmjerenih pri valnoj duljini od 700 nm. Dobivena je apsorbancija enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze pomoću koje je izračunata specifična aktivnost toga enzima.

Tablica 3. Izmjerena apsorbancija enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze pri 700 nm. A (otopina KCl-a) te E (otopina s oubainom za inhibiciju enzima); S – morska voda slanosti 38 psu, D- razijeđena voda slanosti 12 psu; G – anteriorne škrge

Oznaka uzorka	A	E	Oznaka uzorka	A	E
1GS	0,368	0,326	1GD	0,549	0,444
	0,383	0,32		0,591	0,455
	0,362	0,327		0,577	0,448
Srednjak (1GS)	0,371	0,324	Srednjak (1GD)	0,572	0,449
2GS	0,22	0,228	2GD	0,316	0,267
	0,235	0,225		0,311	0,25
	0,213	0,201		0,354	0,268
Srednjak (2GS)	0,222	0,218	Srednjak(2GD)	0,327	0,2617
3GS	0,294	0,266	3GD	0,461	0,321
	0,312	0,266		0,464	0,354
0,388	0,328	0,255		0,445	0,338
Srednjak (3GS)	0,311	0,262	Srednjak (3GD)	0,456	0,337
Standardi	0,567		BLANK	0,100	
	0,55				
	0,571				
Srednjak (standarda)	0,562				

Tablica 4. Spektrofotometrijski izmjerena koncentracija proteina na 595 nm; abs – absorbancija, S – morska voda slanosti 38 psu, D- razijeđena voda slanosti 12 psu; G – anteriorne škrge

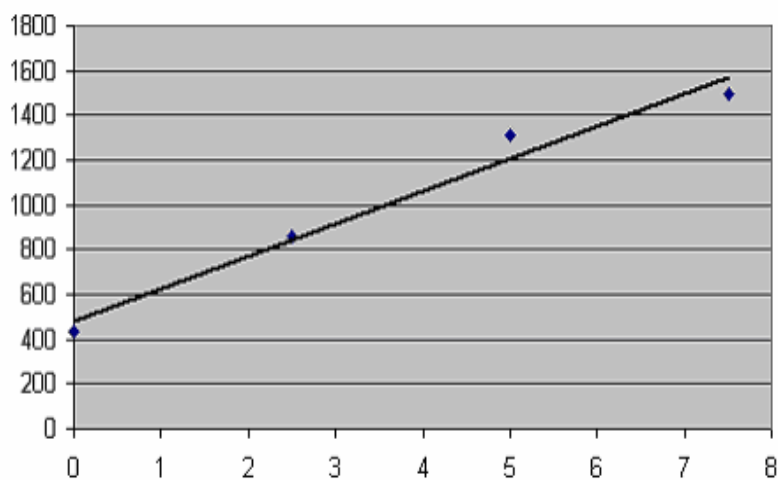
Apsorbancija BSA standarda, koncentracije 0, 2.5, 5 i 7.5 µl			
Oznaka uzorka	Abs	Oznaka uzorka	Abs
0µl	0,428	2,5µl	0,939
	0,44		0,8
	0,433		
Srednjak (0µl)	0,433666667	Srednjak (2,5µl)	0,854667
5µl	1,153	7,5µl	1,598
	1,455		1,472
	1,322		1,424
Srednjak (5µl)	1,31	Srednjak (7,5µl)	1,498

Tablica 4, nastavak			
Absorbancija uzoraka, koncentracija 2,5 µl			
Slanost 38 psu		Slanost 12 psu	
Oznaka uzorka	Abs	Oznaka uzorka	Abs
1GS	0,964 1,07	1GD	1,243 1,211
Srednjak (1GS)	1,017	Srednjak (1GD)	1,227
2GS	0,817 0,803	2GD	0,777 0,8
Srednjak (2GS)	0,81	Srednjak (2GD)	0,7885
3GS	1,055 1,039	3GD	0,785 0,893
Srednjak (3GS)	1,047	Srednjak (3GD)	0,839

Iz podataka dobivenih spektrofotometrijskom analizom proteinskih BSA standarda pri 595 nm, prikazanih u tablici 4, procijenjeni su srednjaci i obrađeni regresijskom analizom (tablica 5, slika 13).

Tablica 5. Srednjaci BSA standarda proteina dobivenih spektrofotometrijskom analizom pri 595 nm.

Koncentracije standarda proteina	Apsorbancija standarda proteina
x os	y os
0	434
2,5	855
5	1310
7,5	1498



Slika 13. Regresijski pravac, $R^2=0,9735$; $y = 145,88x + 477,2$.

Dobiven je regresijski pravac (slika 13) i formula prema kojoj je izračunata koncentracija proteina u pojedinom uzorku (tablica 6). Izmjerene absorbancije se uvrste u formulu (u primjeru $f(x) = (y-477,2)/145,88$), a rezultat se množi s faktorom 0,8 (2 μ g proteina x faktor 0,4 zbog kasnijeg izjednačavanja mjernih jedinica). Kao konačni rezultat se dobije koncentracija proteina u uzorku izražena u mg/ml (tablica 6).

Tablica 6. Izračun proteina pojedinih uzoraka: srednjaci apsorbancija uzoraka proteina izmjerenih pri 595 nm; abs – absorbancija, S – morska voda slanosti 38 psu, D- razrijeđena voda slanosti 12 psu; G – anteriorne škrge

Uzorak	Apsorbancija proteina Abs (y)	Regresijska formula $f(x)=$ $(y-477,2)/145,88$	Množenje s faktorom 0,8 *2μg prot.x 0,4	= koncentracija proteina mg/ml
1GS	1017	3,70	0,8	2,96
2GS	810	2,28	0,8	1,83
3GS	1047	3,91	0,8	3,12
1GD	1227	5,14	0,8	4,11
2GD	789	2,14	0,8	1,71
3GD	839	2,48	0,8	1,98

Za izračun specifične aktivnosti enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze potrebno je ispraviti vrijednost absorbancija standarda kalcij/fosfat oduzimajući srednjak absorbancije standarda od srednjaka absorbancije destilirane vode (blank, tablica 7). Nakon uvrštavanja u formulu 1, dobije se faktor F. S obzirom da su se uzorci inkubirali 15 minuta, potrebno je pomnožiti recipročnu vrijednost ispravljenog standarda s faktorom za sat 4 (da se dobije aktivnost enzima u 1 satu). Također je potrebno u formulu uvrstiti i broj 0,162 koji predstavlja koncentraciju standarda (0,162 μ l standard =Sigma kalcijev fosfat 1,62 mmol/l = 0,00162 μ mol/ml x 100 = 0,162 μ l). S obzirom da je u inkubacijske otopine A i E dodano po 30 μ l homogenata uzorka, cijela formula 1 se množi s 33,33 (formula 2).

$$\text{Formula 1. } F = \frac{1}{(\Delta_{\text{standard}} - \text{blank})} * 4 * 0,162 * 33,33 = \mu\text{mol}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{h}^{-1}$$

$$\text{Formula 2. } 33,33 = \frac{1}{1/1000} * \text{dodano uzorka (30}\mu\text{l)}$$

Tablica 7. srednjaci (ΔA i ΔE) apsorbancije inkubacijskih otopina A i E uzoraka za izračunavanje enzima Na⁺, K⁺ ATP-aze; S – morska voda slanosti 38 psu, D-

razrijeđena voda slanosti 12 psu; G – anteriorne škrge; blank – destilirana voda umjesto uzorka

Uzorak	ΔA	ΔE	$\Delta A - \Delta E$	Uzorak	ΔA	ΔE	$\Delta A - \Delta E$
1GS	371	324	47	1GD	572	449	123
2GS	223	218	5	2GD	327	262	65
3GS	312	262	50	3GD	457	338	119
Standardi-blank	562- 100 = 462						

Dobivenu vrijednost F (u ovom slučaju 0,04645) množimo s razlikom oduzetih srednjaka uzoraka inkubacijske otopine A od srednjaka inkubacijske otopine E ($\Delta A - \Delta E$, tablica 7) i djelimo s izmjerenom koncentracijom proteina uzorka u pitanju (tablica 6); formula 3.

Formula 3.
$$V = \frac{(\Delta A - \Delta E) \times F}{c \text{ (proteina; mg/l)}} \quad (\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1})$$

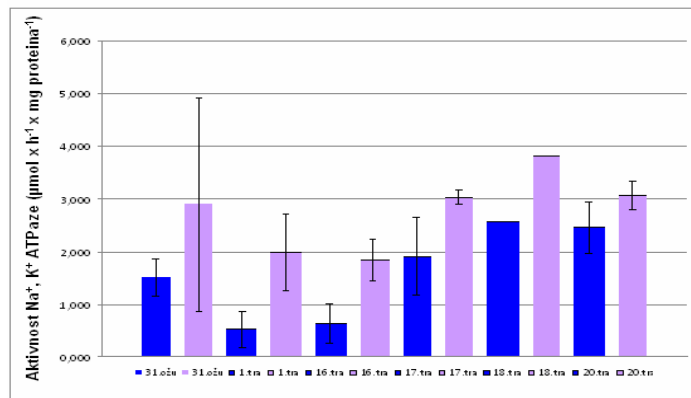
Konačne vrijednosti specifične aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim škragama su izražene kao $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$ i predstavljene u tablici 8, odnosno na slikama 14 i 15.

Tablica 8. Specifična aktivnost enzima Na^+ , K^+ ATP-aze (V ; $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) u anteriornim škragama rakova prilagođenih na morsku (12 psu) i razrijeđenu morsku vodu (38 psu).

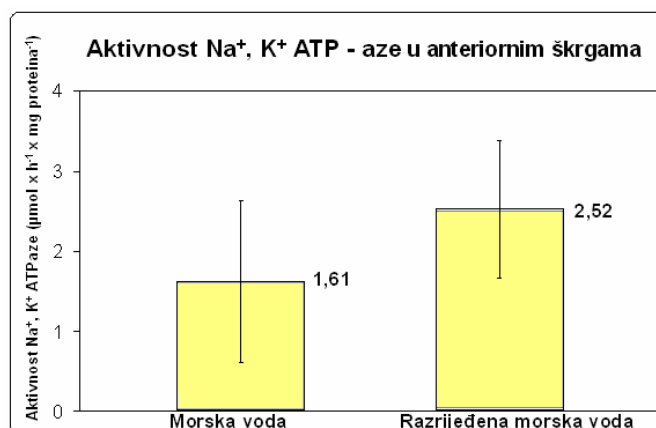
Datum	morska	razrijeđena voda
31.3.2009.	1,517	2,896
1.4.2009.	0,526	1,989
16. 4.2009.	0,367	1,567
17. 4.2009.	1,9105	1,831
18. 4.2009.	2,561	3,799
20. 4.2009.	2,8035	3,0575
Srednjak (V; $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$)	1,614166667	2,52325
Standardna devijacija	1,014671704	0,863823

Specifična aktivnost homogenata škrge u morskoj vodi (38 psu) je iznosila $1,61 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$, a u razrijeđenoj morskoj vodi (12 psu) $2,52 \pm 0,86 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$ (tablica 8, slike 14 i 15.).

Razlike između morske i razrijeđene morske vode su izračunate koristeći Studentov t-test. Zabilježena je statistička razlika ($P < 0,05$) između specifične aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze (V ; $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg prot}^{-1}$) rakova prilagođenih na 12 i na 38 psu.



Slika 14. Aktivnost Na^+ , K^+ ATPaze ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) u anteriornim škrgama izoliranim iz bočatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanost od 38 (plavi stupci) i 12 psu (ljubičasti stupci). Okomita linija predstavlja standardnu devijaciju srednjaka uzorka mjerenih taj dan.



Slika 15. Aktivnost Na^+ , K^+ ATPaze ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) u anteriornim škrgama izoliranim iz bočatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanosti od 38 (lijevi stupac) i 12 psu (desni stupac). Okomita linija predstavlja standardnu devijaciju ukupnog srednjaka.



Slika 16. Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim škragama bočatog raka *Carcinus aestuarii*.

Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim škragama bočatog raka *Carcinus aestuarii* je prikazana i histokemijskom metodom Wachstain Meisel, a vidljiva je kao tamnosmede-crni zrnati precipitat (slike 16 i 17). Nalazi se uglavnom u epitelnim pločastim stanicama škržnih listića, a naročito u bazalnom dijelu stanične membrane.



Slika 17. Histokemijska analiza specifične aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze u posteriornim škragama bočatog raka *Carcinus aestuarii*, vidljiva kao tamnosmede-crni precipitat; (C) kutikula, (H) hemolimfni prostor, (Mc) marginalni kanal, (P) potporne stanice, (R) respiratorni epitel, (S) konektivni septum. Skala 200 μm .

3.2. Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu

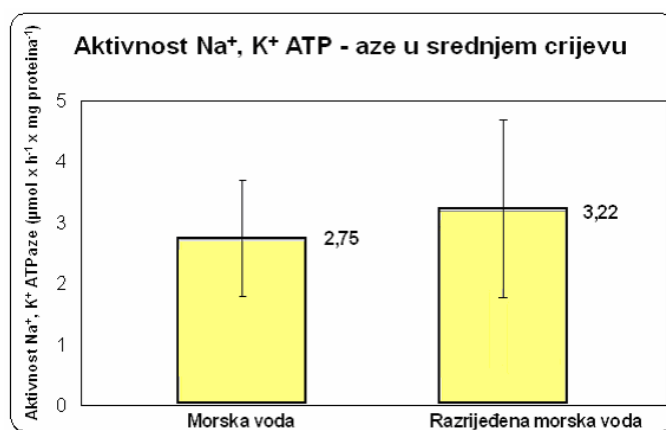
Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze je mjerena u homogenatima srednjeg crijeva bočatog raka prilagođenog na slanost od 38 (1280 mOsmol/l) i 12 psu (360 mOsmol/l) minimalno 2

tjedna prije početka pokusa, na isti način kao i kod anteriornih škrga. Kod ovih uzoraka postoji naznaka povećanja specifične aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze (V ; $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) rakova prilagođenih na 12 psu u odnosu na rakove prilagođene na 38 psu, ali ona nije statistički značajna ($P > 0,05$).

Specifična aktivnost u morskoj vodi je iznosila $2,75 \pm 0,95$, a u razrijeđenoj morskoj vodi $3,23 \pm 1,46$ (tablica 9, slika 18). Razlike između morske i razrijeđene morske vode su izračunate koristeći Studentov t-test.

Tablica 9. Aktivnost enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu rakova prilagođenih morskoj (38 psu) i razrijeđenoj morskoj vodi.

Datum	morska	razrijeđena voda
31.3.2009.	3,34	5,47
1.4.2009.	2,87	3,53
16.4.2009.	1,78	3,40
17. 4.2009.	4,26	3,03
18. 4.2009.	2,39	3,03
20. 4.2009.	1,86	0,90
Srednjak (V; $\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$)	2,748583	3,22475
Standardna devijacija	0,949342	1,458861



Slika 18. Aktivnost Na^+ , K^+ ATPaze ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) u srednjem crijevu izoliranom iz bočatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanost od 38 (lijevi stupac) i 12 psu (desni stupac). Okomita linija predstavlja standardnu devijaciju ukupnog srednjaka.

4. Rasprava

Cilj ovog istraživanja je bio dokazati da kod bočatog raka *Carcinus aestuarii* pri aklimaciji na razrijeđenu morsku vodu, osim posteriornih škrga, sudjeluju i anteriorne škrge te srednje crijevo. Jaka hiperregulacija osmolarnosti hemolimfe u razrijeđenoj morskoj vodi slanosti 12 psu zahtjeva da bočati rakovi povećaju unos natrija, kalija i kalcija. Kako se povećavaju ionski gradijenti između hemolimfe i okolnog medija sa smanjenjem slanosti, predviđa se povećana aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u osmoregulacijskim tkivima.

Glavni osmoregulacijski organ brahiurnih rakova su škrge, koje su neposredno izložene vanjskom mediju, a time i osmotskom stresu. Kako bi pri promjenama u okolišu rakovi održali stanje homeostaze, dolazi do promjena u građi i funkciji pojedinih dijelova škrge. Povećava se debljina kloridnih stanica (hiperplazija), visina apikalnih mikrovila, broj mitohondrija i bazolateralnih uvrnuća (Barra i sur., 1983; Compère i sur., 1989; Charmantier, 1998; Goodman i Cavey, 1990; Haond i sur., 1998; Luguet i sur., 2002).

Hiperplazija kloridnih stanica označava povećanje enzimatske aktivnosti i membranskog transporta (Lucu i Filk, 1999). Ovo je najizraženije pri dugotrajnom utjecaju smanjene slanosti u trajanju od nekoliko dana; dugotrajna aklimacija na slanost od 10 psu u trajanju od 3 do 12 dana će i više nego udvostručiti aktivnost enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u posteriornim škrgama (Lucu i Flik, 1999; Lucu i sur., 2008). To sugerira da dugotrajna aklimacija na hipoosmotske uvjete povećava sintezu enzima i/ili reducira njegovu brzinu razgradnje.

Određivanje aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze je obavljeno prema Lucu i Flik, 1999; specifična aktivnost homogenata škrge u morskoj vodi (38 psu) je iznosila $1,61 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, a u razrijeđenoj morskoj vodi (12 psu) $2,52 \pm 0,86 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$ (slika 19).

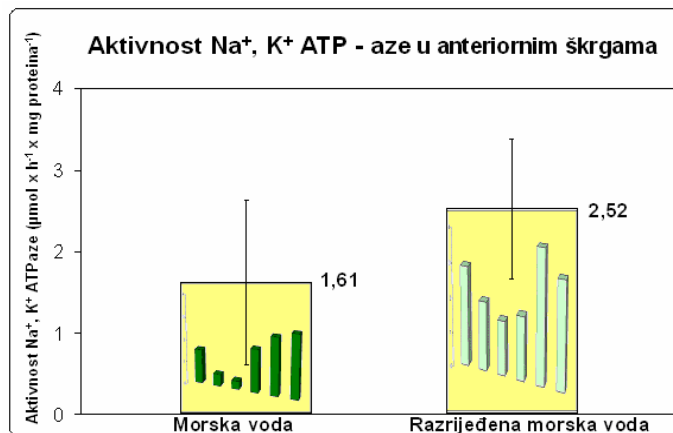
Prema ovdje iznesenim (slika 19), ali i istraživanjima drugih autora (Neufeld i sur., 1980; Lucu i Flik, 1999), zabilježena je razlika u aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim

škrigama. Ova aktivnost je niža od vrijednosti dobivenih od strane Lucu i sur. (2008). Oni su ispitivali aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze na posteriornim škrigama, koja je u morskoj vodi (38 psu) iznosila $3,89 \pm 0,64 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, odnosno $10,08 \pm 1,90 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$ u razrijeđenoj morskoj vodi (10 psu). S obzirom da se u posteriornim škrigama bočatog raka odvija većina osmoregulacijskih procesa, ovakva razlika je očekivana kod ove vrste rakova.

Prilikom ispitivanja aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze u škrigama hiperregulirajućeg raka *Carcinus maenas* Lucu i Filk (1999) su primijetili povećanje aktivnosti Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim škrigama za koje su zaključili da može biti dio prilagodbenog odgovora na hipoosmotske promijene.

Aktivnost Na^+ , K^+ ATP-aze u anteriornim škrigama je primijećena i tijekom istraživanja aktivnosti mRNA u transportnom proteinu Na^+ , K^+ ATP-aze raka *Chasmagnathus granulatus* nakon prijenosa u razrijeđenu morsku vodu (2 psu). U tom istraživanju Luquet i sur. (2005) su zabilježili povećanje Na^+ , K^+ ATP-aze za 33 do 35 puta. Ovo povećanje je zabilježeno i u anteriornim i u posteriornim škrigama između 6 do 24 sata nakon prijenosa s 30 na 2 psu slanost; u posteriornim škrigama gustoća mRNA je dosegla maksimalni nivo povećanja od oko 50 puta i takva je ostala barem 4 dana. Anteriorne škrge su također pokazale znatan porast, 20 puta veći nego kontrolne grupe, što potvrđuje pretpostavku da one imaju ulogu u osmoregulaciji.

Nadalje, ako se usporede rezultati dobiveni u ovome radu s pokusima Neufeld i sur. (1980), na anteriornim škrigama raka *Callinectes sapidus*, može se primijetiti sličnost između dobivenih vrijednosti. S obzirom da postoji statistički značajna razlika između aktivnosti enzima u anteriornim škrigama rakova prilagođenih na 38 psu i onih prilagođenih na 12 psu, može se zaključiti da osim funkcije u disanju, anteriorne škrge imaju aktivnu ulogu i u osmoregulaciji.



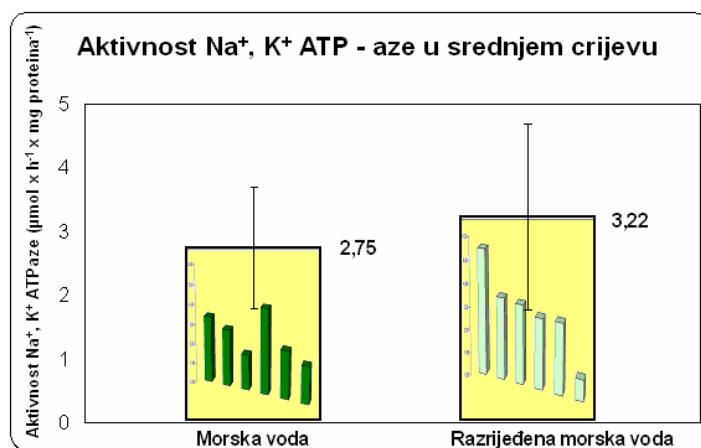
Slika 19. Aktivnost Na⁺, K⁺ ATPaze (µmol Pi x h⁻¹ x mg proteina⁻¹) u anteriornim škrgama izoliranim iz bočatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanosti od 38 (lijevi stupac) i 12 psu (desni stupac). Srednje vrijednosti su dobivene iz 6 mjerenja (pojedinačne vrijednosti označene unutar svakog stupca, a ukupni srednjak s njegove desne strane). Okomita linija predstavlja standardnu devijaciju ukupnog srednjaka. Razlike između morske i razrijeđene morske vode su izračunate koristeći Studentov t-test.

Uloga srednjeg crijeva u apsorpciji nutrijanata i osmoregulaciji kod rakova je još uvijek proturiječna. Iako se smatra da je apsorpcija nutrijanata glavna uloga srednjeg crijeva, prema novijim studijama se ta apsorpcija obavlja u probavnoj žlijezdi (Ahearn, 1999; Evans, 2008). U srednjem crijevu rakova koji žive u slanoj vodi (kao što su *Chasmagnathus granulata* i *Sesarma rectum*) pronađene su visoke epitelne stanice sastavljene od jednog sloja sa apikalnim mikrovilima, gustom citoplazmom i središnje postavljenom jezgom, što su karakteristike tipičnih epitelnih transportnih stanica (Mykles, 1979, McNamara i sur., 2005). Kod raka *Sesarma rectum* prilagođenog na slanost morske vode od 15 psu je zabilježena ionska permeabilnost srednjeg crijeva za ione kalija, klorida, natrija, nitrata, acetata, sulfata, glutarata, a slaba permeabilnost je zabilježena za ione kalcija i magnezija (McNamara i sur., 2005). Slični rezultati su zabilježeni i u srednjem crijevu raka *Chasmagnathus granulata* prilagođenog na slanost od 2 psu: najveća permeabilnost je bila za ione kalija, klorida, natrija i nitrata, a također je slaba permeabilnost zabilježena za ione kalcija i magnezija (McNamara, 2005).

Osim ovih rakova i drugi člankonošci (npr. insekti) imaju vrlo razvijen ionski transport u srednjem crijevu, kritičan za održavanje homeostaze ionske koncentracije i alkalnog pH

tipičnog za probavu u ovoj grupi (Dow 1981). Također Mykles (1979) sugerira da ultrastruktura srednjeg i stražnjeg crijeva kod mnogih rakova ima indikativnu transportnu funkciju, pogotovo u vrijeme presvlačenja (McNamara i sur., 2005). Neposredno pred presvlačenje rakovi apsorbiraju tekućinu preko srednjeg crijeva, vjerojatno kao rezultat promjena njegove propusnosti (Mykles i Ahearn, 1978) što dovodi do hidratacije i oticanja, kulminirajući hormonalno reguliranim presvlačenjem. Međutim, u razdoblju između presvlačenja upitna je količina unosa tekućine kroz srednje crijevo, i smatra se da je mala ili neznačajna (McNamara i sur., 2005).

S obzirom da tijekom ispitivanja nije primijećeno očekivano presvlačenje rakova, u ovome radu je ispitano postoji li ionska aktivnost u srednjem crijevu raka *Carcinus aestuarii* u doba između dva presvlačenja. Kako bi se utvrdilo postoji li statistički značajna razlika u aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu, istraživana je razlika aktivnosti kod jedinki prilagođenih na slanosti od 12 i 38 psu. Specifična aktivnost u morskoj vodi je iznosila $2,75 \pm 0,95 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, a u razrijeđenoj morskoj vodi $3,23 \pm 1,46 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$.



Slika 20. Aktivnost Na^+ , K^+ ATPaze ($\mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$) u anteriornim škragama izoliranim iz boćatog raka *Carcinus aestuarii* prilagođenog na slanosti od 38 (lijevi stupac) i 12 psu (desni stupac). Srednje vrijednosti su dobivene iz 6 mjerenja (pojedinačne vrijednosti označene unutar svakog stupca, a ukupni srednjak s njegove desne strane). Okomita linija predstavlja standardnu devijaciju ukupnog srednjaka. Razlike između morske i razrijeđene morske vode su izračunate koristeći Studentov t-test.

Prema navedenim rezultatima (slika 20), primijećena je naznaka povećanja u aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u razrijeđenoj morskoj vodi, ali ona nije statistički značajna ($P > 0,05$). Ovo se poklapa s istraživanjima Chu (1987) koji je ispitivao prijenos iona natrija kroz crijevo plavog raka *Callinectes sapidus*. On je ustvrdio da kod rakova *Callinectes sapidus* prilagođenih na 7% i 34% morsku vodu postoji transport iona natrija usporediv sa tkivima crijeva drugih vrsta, ali nije značajno različit, što pokazuje da ne postoji veća uloga srednjeg crijeva u regulaciji natrijevih iona.

U daljnjem istraživanju specifične aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu bočatog raka *Carcinus aestuarii* bi bilo uputno provesti slično ispitivanje na jedinkama koje su u stadiju presvlačenja kada je, zbog rasta, znatno veći unos tekućine kroz srednje crijevo.

5. Zaključak

Bez obzira što se dugi niz godina istražuje enzim Na^+ , K^+ ATP-aza kod bočatog raka *C. aestuarii*, malo je pažnje posvećeno sekundarnim osmoregulatornim tkivima, a većina istraživanja se bazirala na posteriornim škragama (koje su primarni osmoregulatorni organ brahiurnih rakova). U ovome radu je prikazan utjecaj promijene slanosti na anteriorne škrge te na srednje crijevo, a to su dva tkiva koja se najčešće spominju kao sekundarna osmoregulatorna tkiva rakova.

Prema provedenim istraživanjima izračunata je specifična aktivnost homogenata škrge u morskoj vodi (38 psu) iznosila $1,61 \pm 1,02 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, a u razrijeđenoj morskoj vodi (12 psu) $2,52 \pm 0,86 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$. Zaključeno je da i u anteriornim škragama postoji statistički značajna razlika ($P < 0.05$) u specifičnoj aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aza rakova prilagođenih na 12 psu i na 38 psu. Veća aktivnost je zabilježena u razrijeđenoj morskoj vodi slanosti 12 psu što se podudara s istraživanjima drugih autora (Lucu i sur., 2008, Neufeld i sur., 1980).

Prilikom prilagodbe rakova *C. aestuarii* razrijeđenoj morskoj vodi (12 psu) u trajanju od 14 do 37 dana nije zabilježena statistički značajna razlika ($P > 0.05$) u specifičnoj aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu rakova u usporedbi s rakovima u morskoj vodi slanosti od 38 psu. Specifična aktivnost u morskoj vodi je iznosila $2,75 \pm 0,95 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$, a u razrijeđenoj morskoj vodi $3,23 \pm 1,46 \mu\text{mol Pi} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg proteina}^{-1}$.

Sugerira se da se u daljnjem istraživanju specifične aktivnosti enzima Na^+ , K^+ ATP-aze u srednjem crijevu bočatog raka *Carcinus aestuarii* ispitivanje provede tijekom njihova presvlačenja, kada je zabilježen veći unos tekućine kroz srednje crijevo.

6. Literatura

1. Ahearn G. A., Duerr J. M., Zhuang Z., Brown R. J., Aslamkhan A., Killebrew D. A. 1999. Ion transport processes of crustacean epithelial cells. *Phys Biochem Zool* 72: 1–18.
2. Barker, P. L., Gibson, R. 1978. Observations on the structure of the mouthparts, histology of the alimentary tract and digestive physiology of the mud crab *Scylla serrata* (Forskål) (Decapoda: Portunidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* (32): 177–196.
3. Barra, J. A., Péqueux, A., Humbert, W. 1983. A morphological study on gills of a crab acclimated to fresh water. *Tissue cell* 15: 583-596.
4. Beguin, P., Beggah, A. T., Chibalin, A. V. , Brugener-Kairuz, P., Jaisser, F., Mathews, P. M., Rossier, B. C., Cotecchia, S., Geering, K. 1994. Phosphorylation of the Na,K-ATPase alpha-subunit by protein kinase A and C in vitro and in intact cells. Identification of a novel motif for PKC-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 269: 24437–24445.
5. Bertorello, A. M., Katz, A. I. 1993. Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *Am. J. Physiol.* 265 (*Renal Fluid Electrolyte Physiol.*34): F743–F755.
6. Bianchini, A., Gilles, R. 1990. Cyclic AMP as a modulator of NaCl transport in gills of the euryhaline Chinese crab *Eriocheir sinensis*. *Mar. Biol. (Berl.)* 104: 191–195.
7. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-253.
8. Burnett, L. E., Towle, D. W. 1990. Sodium ion uptake by perfused gills of the blue crab *Callinectes sapidus*: Effects of ouabain and amiloride. *J. Exp. Biol.* 149: 293-305.
9. Burns M. D., MacDonald S. G. G. 1975. Fizika za biologe i medicinare, Školska knjiga, Zagreb, str 264.
10. Cameron, J. N. 1978. NaCl balance in blue crabs, *Callinectes sapidus*, in fresh water. *J. Comp. Physiol.* 123: 127-135.

11. Castilho P. C., Martins, I. A., Bianchini, A. G. 2001. Gill Na⁺,K⁺-ATPase and osmoregulation in the estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* Dana, 1851 (Decapoda, Grapsidae). *J. Exp Mar Biol Ecol* 256: 215–227.
12. Catchpole, T. L., Frid, C. L. J., Gray, T. S. 2006. Importance of discards from the English *Nephrops norvegicus* fishery in the North Sea to marine scavengers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 313: 215-226.
13. Charmantier, G. 1998. Ontogeny of osmoregulation in crustaceans: a review. *Inv. Reprod. Develop.* 33: 177-190.
14. Chu, K. H. 1987. Sodium transport across the perfused midgut and hindgut of the blue crab *Callinectes sapidus*: The possible role of the gut in crustacean osmoregulation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 87: 21–25.
15. Cieluch, U., Anger, K., Aujoulat, F., Buchholz, F., Charmantier-Dautres, M., Charmantier, G. 2003. Ontogeny of osmoregulatory structures and functions in the green crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda) *J.Exp. Biol.* 207: 325-336.
16. Cieluch, U., Charmantier, G., Grousset, E., Charmantier-Daures, M., Anger, K. 2005. Osmoregulation, Immunolocalization of Na⁺/K⁺-ATPase, and Ultrastructure of Branchial Epithelia in the Developing Brown Shrimp, *Crangon crangon* (Decapoda, Caridea). *Physiological i Biochemical Zoology* 78 (6): 1017–1025.
17. Compère, D., Wanson, S., Péqueux, A., Gilles, R., Goffinet, G. 1989. Ultrastructural changes in the gill epithelium of the green crab *Carcinus meanas* in relation to the internal salinity. *Tissue Cell* 21: 299-318.
18. Crothers, J. H. 1967. *The Biology of the Shore Crab*. Dale Fort Field Centre. 407-434.
19. Dow J. A. T. 1981. Countercurrent flows, water movements and nutrient absorption in the locust midgut. *J Insect Physiol* 27: 579–585.
20. Dumitrache, C. URL:
<http://www.grid.unep.ch/bsein/redbook/txt/carcinus.htm?%20CRUSTACEA>
21. Enright, C. T., Elner, R.W., Griswold, A., Borgese, E.M. 1993. Evaluation of crabs as control agents for biofouling in suspended culture of European oysters. *World Aquacult.* 24 (4): 49-51.
22. Evans, E. 2008. *Osmotic and Ionic Regulation, Cells and Animals*. CRC Press, Taylor and Francis Group. Boca Raton. Str. 590.

23. Flik, G., Haond, C. 2000. Na⁺ and Ca²⁺ pumps in the gills, epipodites and branchiostegites of the European lobster *Homarus gammarus*: Effects of dilute sea water. *J.Exp. Biol.* 203: 213-220.
24. Gilles, R., Péqueux, A. 1985. Ion transport in crustacean gills: Physiological and ultrastructural approaches. In: Gilles, R., Gilles-Baillien, M. (eds.), *Transport Processes: Iono – and osmoregulation*. Springer Verlag, Berlin. 136-158.
25. Gillis, D. J., MacPherson, J. N., Rattray, T. T. 2000. The status of green crab (*Carcinus maenas*) in Prince Edward Island in 1999. PEI Department of Fisheries and Tourism, Fisheries and Aquaculture Division, Charlottetown, PEI.
26. Goodman, S. H., Cavey, M. J. 1990. Organization of a phyllobranchiate gill from the green shore crab *Carcinus maenas* (Crustacea, Decapoda). *Cell Tissue Res.* 260: 495-505.
27. Gomes, V. 1991. First results of tagging experiments on crab *Carcinus maenas* (L.) in the Ria de Aveiro Lagoon, Portugal. *Ciênc.Biol.Ecol.Syst.Portugal.* 11: 21-29.
28. Haond, C., Flik, G., Charmantier, G. 1998. Confocal laser scanning and electron microscopical studies in osmoregulatory epithelia in the branchial cavity of the lobster *Hiarus gammarus*. *J. Exp. Biol.* 201: 1817-1833.
29. Harris, R. R., Santos, M. C. F. 1993. Sodium uptake and transport (Na⁺+K⁺) ATPase changes following Na⁺ depletion and low salinity acclimation in the mangrove crab *Ucides cordatus* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 105A: 35-42.
30. Hilge, M. Siega, G., Vuister, G.W., Günter, P., Gloor, S.M., Abrahams, J.P. 2003. ATP induced conformational changes of the nucleotide binding domain of Na, K-ATPase. *Nature Structural Biology.* vol. 10 (6): 468-474.
31. Holliday, C. W. 1985. Salinity-induced changes in gill Na, K-ATPase activity in the mud fiddler crab, *Uca pugnax*. *J. Exp. Zool.* 233:199-208.
32. Icely, J. D., Nott, J. A. 1992. Digestion and absorption: Digestive system and associated organs. *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, vol. 10, Decapod Crustacea. New York. 147–201.
33. Johnson, P. T. 1980. The gut. *Histology of the Blue Crab Callinectes sapidus: A Model for the Decapoda*. New York, NY: Praeger Scientific. 149–224.
34. Klassen, G., Locke, A. 2007. A Biological Synopsis of the European Green Crab, *Carcinus maenas*. Fisheries and Oceans Canada, Gulf Fisheries Centre, Canada, str 75.

35. Lee, A. G. 1996. Biomembranes. ATPases. Volume 5. University of Southampton. 133-185.
36. Li, T. 2003. Gill Na⁺, K⁺ ATPase as a function of size and salinity in the blue crab, *Callinectes sapidus* rathbun. Master Thesis, University of North Carolina at Wilmington, str 37.
37. Lin, H. C., Tsail, J. R. 2007. Type H⁺-ATPase i Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of 13 euryhaline crabs during salinity acclimation. J. Exp. Biol. 210: 620-627.
38. Lucu Č., Flik, G. 1999. Na⁺-K⁺-ATPase and Na⁺/Ca²⁺ exchange activities in gills of hyperregulating *Carcinus maenas*. Am J Physiol 276: R490–R499.
39. Lucu, Č., Towle, D. 2003. Na⁺, K⁺ ATPase in gills of aquatic crustacea. Comp. Biochem. Physiol. Part A.135: 195-214.
40. Lucu, Č., Pavičić, J., Ivanković, D., Pavičić-Hamer, D., Najdek, M. 2008. Changes in Na⁺/K⁺-ATPase activity, unsaturated fatty acids and metallothioneins in gills of the shore crab *Carcinus aestuarii* after dilute seawater acclimation. Comp. Biochem. Physiol. Part A. 149: 362-372.
41. Luquet, C. M., Genovese, G., Rosa, G. A., Pellerano, G. N. 2002. Ultrastructural changes in the gil epithelium of the crab *Chasmagnathus granulatus* (Decapoda:Grapsidae) in diluted and concentrated seawater. Mar.Biol. 141: 753-760.
42. Luquet, C. M., Weihrauch, D., Senek, M. Towle, D. W. 2005. Induction of branchial ion transporter mRNA expression during acclimation to salinity change in the euryhaline crab *Chasmagnathus granulatus* J. Exp. Biol. 208: 3627-3636.
43. Mantel, L. H., Farmer, L. L. 1983. Osmotic and ionic regulation. In L. H. Mantel, (ed.), The Biology of Crustacea, Vol. 5, Internal anatomy and physiological regulation, Academic Press, New York. 53-161.
44. Masui, D., Furriel, R., McNamara, J., Mantelatto, E., Leone, F. 2002. Modualtion by ammonium ions of gill epithelium of te freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae): Evidence from ultrastructural changes induced by acclimation to saline media. Biol. Bull. 192: 321-331.
45. McNamara, J. C., Zanotto, F. P., Oken, H. 2005. Adaptation to Hypoosmotic Challenge in Brachyuran Crabs: A Microanatomical and Electrophysiological Characterization of the Intestinal Epithelia J.Exp. Zoology 303a: 880–893.
46. Moore, P. G., Howarth, J. 1996. Foraging by marine scavengers: Effects of relatedness, bait damage and hunger. J. Sea Res. 36: 267-273.

47. Mykles D. L., Ahearn G.A. 1978. Changes in fluid transport across the perfused midgut of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, during the molting cycle. *Comp. Biochem Physiol* 61A: 643–645.
48. Mykles D. L. 1979. Ultrastructure of alimentary epithelia of lobsters, *Homarus americanus* and *H. gammarus*, and crab *Cancer magister*. *Zoomorphologie* 92: 201–215.
49. Neufeld, G. J., Holliday, C. W., Pritchard, J.B. 1980. Salinity adaptation of gill Na, K-ATPase in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *J.Exp.Zool.* 211: 215-224.
50. NIMPIS National Introduced Marine Pest Information System (Eds: Hewitt C.L., Martin R.B., Sliwa C., McEnnulty, F.R., Murphy, N.E., Jones T. & Cooper, S.). 2002. *Carcinus maenas* general notes. Web publication <http://crimp.marine.csiro.au/nimpis>.
51. Onken, H., Graszynski, K., Zeiske, W. 1991. Na⁺ - independent, electrogenic Cl⁻ uptake across the posterior gills of the Chinese crab (*Eriocheir sinensis*): voltage – clamp and microelectrode studies. *J.comp.Physiol.* 161: 293-301.
52. Onken, H., Graszynski, K., Johannsen, A., Putzenlechner, M, Riestenpatt, S., Schrimmer, C., Siebers, D., Zeiske, W. 1995. How to overcome osmotic stress? Marine crabs conquer freshwater. New insights from modern electrophysiology. *Helgolander meeresuntersuchungen. Helgolander Meeresunters.* 49: 715-725.
53. Pearson, J. 1908. *Cancer. Liverpool Mar. Biol Comm. Mem.* XVI: 1–209.
54. Péqueux, A. 1995. Osmotic regulation in crustaceans. *J Crustac Biol* 15: 1–60.
55. Peterson, G. L., Hokin, L. E. 1981. Molecular weight and stoichiometry of the sodium and potassium-activated adenosine triphosphatase subunits. *J. Biol.Chem.* 256: 3751-3761.
56. Piller, S. C., Heny, R. P., Doeller, J. E., Kraus, D. W. 1995. A comparison of the gill physiology of two eurihaline crab species, *Callinectes sapidus* and *Callinectes similis*: Energy production, transport-related enzymes and osmoregulation as a function of acclimation salinity. *J. Exp Biol.* 198, 349-358.
57. Riestenpatt, S., Onken, H., Siebers, D. 1996. Active absorption of Na⁺ and Cl⁻ across the gill epithelium of the shore crab *Carcinus maenas*: voltage – clamp and ion-influx studies. *J.Exp.Biology*, 199: 1545-1554.
58. Saez, A. G, Lozano, E., Zaldivar-Riveron, A. 2009. Evolutionary history of Na, K ATPases and their role in osmoregulation. *Genetica*, in press.

59. Siebers, D., Leweck, K., Markus, H., Winkler, A. 1982. Sodium regulation in the shore crab *Carcinus maenas* as related to ambient salinity. *Mar.Biol.* 69: 37-43.
60. Siebers, D., Winkler, A., Leweck, K., Madian, A. 1983. Regulation of sodium in the shore crab *Carcinus maenas*, adapted to environments of constant and changing salinities. *Helgoländer Meeresunters* 36: 303-312.
61. Skou, J. C. 1960. Further investigations on a $Mg^{2+} + Na^{+}$ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the nerve membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 42: 6-23.
62. Smith, R. I. 1978. The midgut caeca and the limits of the hindgut of brachyura: A clarification. *Crustaceana* 35: 195–205.
63. Smith, P. R., Benos, D.J. 1991. Epithelial Na^{+} channels. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 509-530.
64. Svane, I. 1997. On the ecology of *Carcinus maenas* in European waters. In: Thresher, R.E. (ed.) Proceedings the first international workshop on the demography, impacts and management of introduced populations of the European crab, *Carcinus maenas*. CRIMP Tech. Rep. 11. Centre for Research on Introduced Marine Pests, CSIRO Marine Laboratories, Hobart, Australia. 4-18.
65. Svob, M. 1974. Histološke i histokemijske metode. Svjetlost, Sarajevo, str 362.
66. Stryer, L. 1991. *Biokemija* (prijevod), Školska knjiga, Zagreb, str 876.
67. Towle, D. W., Palmer, G. E., Harris III, J. L. 1976. Role of gill $Na^{+} + K^{+}$ -dependent APTase in acclimation of blue crabs (*Callinectes sapidus*) to low salinity. *J. Exp. Zool.* 196: 315-322.
68. Towle, D. W., 1981. Transport-related ATPases as probes of tissue function in three terrestrial crabs of Palau. *J. Exp. Zool.* 218: 89-95.
69. Towle, D. W., Kays, W.T. 1986. Basolateral localization of Na^{+},K^{+} ATPase in gill epithelium of two osmoregulating crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*. *J. Exp. Zool.* 239: 311-318.
70. Towle, D. 1997. Molecular Approaches to Understanding Salinity Adaptation of Estuarine Animals *Amer. Zool.*, 37: 575-584.
71. Towle, D., Weihrauch, D. 2001. Osmoregulation by Gills of Euryhaline Crabs: Molecular Analysis of Transporters. *Amer. Zool*, 41: 770-780.

72. Wachstein, M., Meisel, E. 1957. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi. *Am. J. Clin Pathol.* 27: 13-23.
73. Webster, S. G., Dirksen, Chung, J. S. 2000. Endocrine cells in the gut of the shore crab *Carcinus maenas* immunoreactive to crustacean hyperglycaemic hormone and its precursor – related peptide. *Cell Tissue Res.* 300: 193-205.
74. Welch, W. R. 1968. Changes in abundance of the green crab, *Carcinus maenas* (L.) in relation to the recent temperature changes. *Fish. Bull* 67: 337-345.
75. Welcomme, L., Devos, P. 1988. Cytochrome c oxidase and Na,K ATPase activities in the anterior and posterior gills of the shore crab *Carcinus maenas* L. After adaptation to various salinities. *Comp. Biochem. Physiol. B* 89: 339-341.
76. Wheatly, M. G., Henry, R. P. 1987. Branchial and antennal gland Na⁺/K⁺-dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J.Exp.Biol.*133: 73-86.
77. Wilder, M. N. Do, T. T. Atmomarsono, M., Tran, T. T., Truong, Q. P. Yang., W. J. 2000. Characterization of Na/K ATPase in *Macrobranchium rosenbergii* and the effects of changing salinity on enzymatic activity. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* 125: 377-388.
78. Winkler, A. 1986. Effects of inorganic seawater constituents on branchial Na-K ATPase activity in the shore crab *Carcinus maenas*. *Mar.Biol.*92: 537-544.
79. Ziegler, A. 1997. Immunocytochemical localization of Na⁺,K⁺-ATPase in the calcium – transporting sternal epithelium of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* L. (Crustacea). *J.Histochem, Cytochem.* 45: 437-446.
80. URL: [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm)
81. URL: [http://219.221.200.61/ywwy/zbsw\(E\)/edetail5.htm](http://219.221.200.61/ywwy/zbsw(E)/edetail5.htm)