

# Morfološka analiza mišjih mozgova nakon ishemijske ozljede i primjene natriuretskih peptida

---

Šimunić, Sven

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:383072>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-20**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

Sven Šimunić

**Morfološka analiza mišjih mozгова nakon ishemijske ozljede i primjene  
natriuretskih peptida**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, 2015.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurogenetiku i genetiku razvoja Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, te u laboratoriju Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: dr. sc. Marina Dobrivojević

*Zahvaljujem svojoj mentorici dr.sc. Marini Dobrivojević na njenoj strpljivosti i razumijevanju te podršci koju mi je pružila u izradi ovoga rada i bez čije potpore ovaj rad ne bi bio moguć.*

*Posebnu zahvalnost dugujem laborantici ing.med.lab.dg. Željki Punčec na stručnoj i tehničkoj pomoći u izradi ovog doktorata.*

*Zahvaljujem svojim roditeljima i bratu na neizmjerne podršci koju su mi pružili tijekom studija.*

# SADRŽAJ

Popis kratica

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Moždani udar</b> .....	1
<b>1.2. Definicija i patogeneza moždanog udara</b> .....	1
1.2.1. Definicija moždanog udara.....	1
1.2.2. Kategorije moždanog udara.....	2
1.2.3. Simptomi ishemijskog oštećenja mozga.....	3
1.2.4. Posljedice ishemijskog oštećenja mozga.....	3
<b>1.3. Bradikinin i kalikrein-kininski sustav</b> .....	5
1.3.1. Sinteza bradikinina.....	6
1.3.2. Metabolizam bradikinina.....	6
1.3.3. Bradikininski receptori.....	7
<b>1.4. Natriuretski peptidi</b> .....	7
1.4.1. Struktura natriuretskih peptida.....	8
1.4.2. Metabolizam natriuretskih peptida.....	8
1.4.3. Receptori natriuretskih peptida.....	9
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA</b> .....	10
<b>2.1.</b>	
<b>Hipoteza</b> .....	10
<b>2.2. Ciljevi rada</b> .....	10
2.2.1. Opći cilj.....	10
2.2.2. Specifični ciljevi.....	10
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	11
<b>3.1. Pokusne životinje</b> .....	11
<b>3.2. Izazivanje ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja mozga na mišjem modelu– metoda privremene okluzije srednje moždane arterije</b> .....	11
<b>3.3. Procjena neurološkog oštećenja</b> .....	14
<b>3.4. Priprema tkiva za histološku analizu</b> .....	15
3.4.1. Perfuzijska fiksacija tijela miša.....	15

3.4.2. Izolacija mozga, postfiksacija i krioprotekcija.....	15
3.4.3. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i pohrana uzoraka.....	16
<b>3.5. Histološko bojenje po Nisslu.....</b>	<b>16</b>
<b>3.6. Procjena volumena moždane ishemijske lezije i statistička analiza.....</b>	<b>17</b>
<b>3.7. Prikaz i analiza rezultata.....</b>	<b>17</b>
<b>4.REZULTATI.....</b>	<b>18</b>
<b>4.1. Procjena neurološkog oštećenja.....</b>	<b>18</b>
<b>4.2. Procjena veličine ishemijske lezije.....</b>	<b>20</b>
4.2.1. Procjena postotka moždanog edema.....	22
<b>4.3. Patohistološka analiza.....</b>	<b>24</b>
<b>4.4. Praćenje protoka krvi u mozgu prilikom izvođenja MCAO zahvata.....</b>	<b>30</b>
<b>5. RASPRAVA.....</b>	<b>31</b>
<b>6. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>34</b>
<b>7. SAŽETAK.....</b>	<b>35</b>
<b>8. UMMARY.....</b>	<b>36</b>
<b>9. LITERATURA.....</b>	<b>37</b>
<b>10. BIOGRAFIJA.....</b>	<b>44</b>

## POPIS OZNAKA I KRATICA

- ACE - *Angiotensin-converting enzyme*, hrv. enzim konverter angiotenzina
- ANP - *Atrial natriuretic peptide*, hrv. atrijski natriuretski peptid
- B<sub>1</sub>R - *Bradykinin receptor type 1*, hrv. bradikininski receptor tipa 1
- B<sub>2</sub>R - *Bradykinin receptor type 2*, hrv. bradikininski receptor tipa 2
- BK – *Bradykinin*, hrv. bradikinin
- BNP - *Brain natriuretic peptide*, hrv. moždani natriuretski peptid
- CNP - *C-type natriuretic peptide*, hrv. C-tip natriuretski peptid
- GC - *Membrane-associated guanylyl cyclase*, hrv. membranski vezane gvanilat ciklaze
- GC-A - *Guanylyl cyclase*, hrv. gvanilat ciklaza A
- GC-B - *Guanylyl cyclase*, hrv. gvanilat ciklaza B
- GPCR - *G protein-coupled receptors*, hrv. G protein-vezani receptori
- HK - *High molecular weight kininogen*, hrv. kininogen visoke molekulske mase
- MCAO - *Middle Cerebral Artery Occlusion*, hrv. okluzija srednje moždane arterije
- NC - *Non-selective cation channel*, hrv. neselektivni kationski kanal
- NEP - *Neutral endopeptidase*, hrv. neutralne endopeptidaze
- NPR - *Natriuretic peptide receptors*, hrv. receptori natriuretskih peptida
- NPR-A - *Natriuretic peptide receptor-A*, hrv. receptor natriuretskih peptida A
- NPR-B - *Natriuretic peptide receptor-B*, hrv. receptor natriuretskih peptida B
- NPR-Bi - *Natriuretic peptide receptor–Bi*, hrv. receptor NPR-Bi
- NPR-C - *Natriuretic peptide clearance receptor*, hrv. receptor natriuretskih peptida C ili klirens receptor
- PK – *Prekallikrein*, hrv. prekalikrein
- URO – *Urodilatin*, hrv. urodilatin

# **1. UVOD**

## **1.1. Moždani udar**

Moždani udar označava naglo nastali neurološki poremećaj uzrokovan poremećajem moždane cirkulacije. Drugi je vodeći uzrok smrti u osoba starijih od 60 godina, a peti uzrok kod osoba između 15 i 59 godina starosti. Prema statistikama Svjetske zdravstvene organizacije, 15 milijuna ljudi godišnje u svijetu doživi moždani udar, od čega 5 milijuna ima smrtni ishod, a u 5 milijuna uslijedi teška invalidnost (1). Jedna od šest osoba će tijekom svoga života oboljeti od moždanog udara. U Europi broj oboljelih iznosi oko 650.000 godišnje, dok u Sjedinjenim Američkim Državama broj zahvaćenih iznosi čak preko 790.000 svake godine, od čega je njih oko 610.000 novooboljelih. Vodeći je uzrok smrtnosti u Hrvatskoj, pri čemu 1/3 slučajeva završava smrtno, 1/3 oporavkom ili ima minimalnim deficitom, a 1/3 trajnom teškom onesposobljenošću (2). Moždani udar nosi teške posljedice po zdravlje čovjeka. Smanjujući funkcionalnu sposobnost dovodi do ovisnosti pacijenata o tuđoj skrbi te do potrebe za dugotrajnim bolničkim liječenjem, čime povećava financijski pritisak kako na obitelj pojedinca tako i na društvo (3, 4). Predviđa se udvostručenje troškova liječenja moždanog udara u sljedećih 15 godina (5, 6). Iako moždani udar predstavlja ozbiljan javnozdravstveni problem, u mnogim zemljama ima manji prioritet u odnosu na druge bolesti te stoga i slabije razvijenu i zastupljenu nacionalnu strategiju prevencije i liječenja.

Trenutno ne postoji učinkovit neuroprotektivni lijek, a mogućnosti liječenja nastalog moždanog udara su skromne te dostupne vrlo malom broju bolesnika. Važnu ulogu u smanjenju incidencije moždanog udara imaju preventivne mjere, edukacija stanovništva o ranom prepoznavanju znakova i simptoma moždanog udara te primjena antihipertenzivnih i antitrombocitnih lijekova, lijekova za diabetes mellitus i sniženje kolesterola (7). Unatoč tome, incidencija moždanog udara ostaje i dalje visoka zbog stalnog porasta udjela starije populacije.

## **1.2. Definicija i patogeneza moždanog udara**

### **1.2.1. Definicija moždanog udara**

Svjetska zdravstvena organizacija definirala je moždani udar kao "skup naglo nastalih kliničkih znakova fokalnog (ili globalnog) poremećaja moždane funkcije sa simptomima koji



traju 24 sata ili duže ili koji dovode do smrti, a njihov nastanak povezujemo s vaskularnim uzrokom".

### 1.2.2. Kategorije moždanog udara

Moždani udar na patofiziološkoj osnovi dijelimo u dvije kategorije; ishemijske i hemoragijske moždane udare, pri čemu ih je 87% ishemijske prirode (8).

Hemoragijski moždani udar uzrokovan je oslabljenjem krvne žile te njenim puknućem i krvarenjem u okolno moždano tkivo. Krv se posljedično nakuplja i pritišće okolno moždano tkivo. Razlikujemo dva tipa krvarenja u mozgu koja za posljedicu imaju nastanak hemoragijskog moždanog udara, a to su intracerebralno krvarenje (krvarenje u moždani parenhim) i subarahnoidalno krvarenje (ispod meke moždane ovojnice). Dva najčešća tipa oslabljenih krvnih žila koja dovode do puknuća jesu aneurizme i arteriovenske malformacije (9).

Ishemijski moždani udar karakteriziran je naglim gubitkom krvne opskrbe dijela mozga koji rezultira gubitkom njegove funkcije. Postoje četiri glavna razloga koja dovode do trajnog ili privremenog smanjenja krvne cirkulacije u mozgu, a u njih ubrajamo arterijsku trombozu, embolizam, sistemsku hipoperfuziju i vensku trombozu (10). Moždani udar bez poznatog uzroka, kriptogeni moždani udar, čini otprilike 30 - 40% svih moždanih udara. Takav tip moždanog udara najčešće nalazimo kod pacijenata mlađih od 55 godina starosti (11).

Aterotrombotsko začepljenje velikih arterija najčešći je uzrok ishemijskog moždanog udara (12). Aterosklerotske plakove nalazimo gotovo isključivo na stijenkama jedne ili obje krvnih žila koje proizlaze iz bifurkacije karotide (13). Ateroskleroza i razvoj arterijskih plakova posljedica su biokemijskih procesa koji uključuju oksidaciju lipoproteina niske gustoće (engl. *low-density lipoproteins* - LDL), formaciju masnih pruga te proliferaciju stanica glatkog mišićja. Formiranjem plakova stijenke krvne žile postaju zadebljane, fibrotično promijenjene i kalcificirane što dovodi do smanjenja lumena krve žile. Posljedica je smanjen protok krvi u tkiva koja opskrbljuje zahvaćena krvna žila (14).

Krvni ugrušak koji nastaje na udaljenom mjestu u tijelu te putuje krvlju do mjesta gdje začepljuje krvnu žilu uzrokujući moždani udar primjer je embolusom uzrokovanog moždanog udara. Emboli se mogu odvojiti od skleroziranog plaka u karotidnim arterijama ili mogu biti

kardiogenog porijekla kao što je to slučaj kod atrijske fibrilacije, otvorenog foramena ovale i hipokinetike lijevog ventrikula (15). Emboli sastavljeni od ugrušaka krvi, masti ili mjehurića plinova mogu ući u krvotok tijekom kirurških postupaka, najčešće zahvata na srcu, ali i tijekom operacija dugih kostiju (16). Rjeđi uzroci ishemijskog udara su disekcije karotide ili prisutnost koagulopatija (17, 18). Ostali uzroci koji mogu dovesti do nastanka ishemijskog moždanog udara uključuju fibromuskularne displazije, arteritis, infekcije te zlouporabu droga (19).

### **1.2.3. Simptomi ishemijskog oštećenja mozga**

Klinički simptomi ishemijskog moždanog udara nastaju naglo, tijekom nekoliko sekundi ili minuta i najčešće ne progrediraju. Simptomi koreliraju s područjem mozga koji je zahvaćen ishemijom. Što je veći dio mozga zahvaćen, možemo očekivati i veći funkcionalni deficit. Simptomi uključuju utrnulost, hemiparezu, monoparezu, hemisenzorne poremećaje, monookularno ili binokularno slabljenje ili gubitak vida, diplopiju, nistagmus, oduzetost lica i udova, ataksiju, disfagiju, poremećaje govora u obliku disfazije ili afazije, glavobolju, omaglice ili vrtoglavice te iznenadni gubitak svijesti.

### **1.2.4. Posljedice ishemijskog oštećenja mozga**

Edem mozga koji nastaje kao posljedica ishemijskog oštećenja mozga spoj je tri vrste edema: citotoksičnog, ionskog i vazogenog (20). Mozak održava homeostazu unutarstanične i međustanične tekućine regulacijom transporta vode i otopljenih tvari kroz endotel krvno-moždane barijere, epitel koroidnog plexusa te stanične membrane neurona i glije. U fiziološkim uvjetima koncentracija iona  $K^+$  veća je u stanici nego izvan nje, dok za koncentraciju  $Na^+$  vrijedi upravo obrnuto. Postojeću razliku u koncentracijama iona održavaju energetske ovisne ionske crpke kao što su  $Na^+/K^+$ -ATP-aza i  $Ca^{2+}$ -ATP-aza. One izbacuju  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  iz stanice i ubacuju  $K^+$  u stanicu protivno njihovim elektrokemijskim gradijentima. Nedostatak energije u obliku ATP-a uzrokuje prestanak rada  $Na^+/K^+$  crpke, priljev elektrolita i vode što za posljedicu ima bubrenje i nekrotičnu smrt stanica (21).

Citotoksični edem razvija se kroz nekoliko minuta do sati od oštećenja i reverzibilnog je karaktera (22). Proces nastanka citotoksičnog edema je onkotsko bubrenje stanica, koje nastaje kao rezultat kretanja osmotski aktivnih molekula  $Na^+$ ,  $Cl^-$  te posljedično i vode iz međustaničnih odjeljaka u unutarstanične odjeljke (23). Ishemijsko oštećenje uzrokuje

promjene u propusnosti stanice za ione  $\text{Na}^+$  što dovodi do njegovog unutarstaničnog nakupljanja. Posljedično tome inducira se dodatni ulazak iona  $\text{Cl}^-$  kroz kloridne kanale te vode kroz kanale za vodu, akvaporine, kako bi se održala osmotska ravnoteža (24). Na nastanak citotoksičnog edema utječe i aktivnost neselektivnih kationskih kanala, čiji povećan izražaj nalazimo u ishemiji. Oni pridonose dodatnim putovima unosa iona  $\text{Na}^+$  u stanice, poput neselektivnog kationskog kanala  $\text{NCCa-ATP}$ , koji je pojačanog izražaja 2 do 3 sata od nastanka ishemijskog oštećenja, a za čije je otvaranje okidač deplecija ATP-a (25).

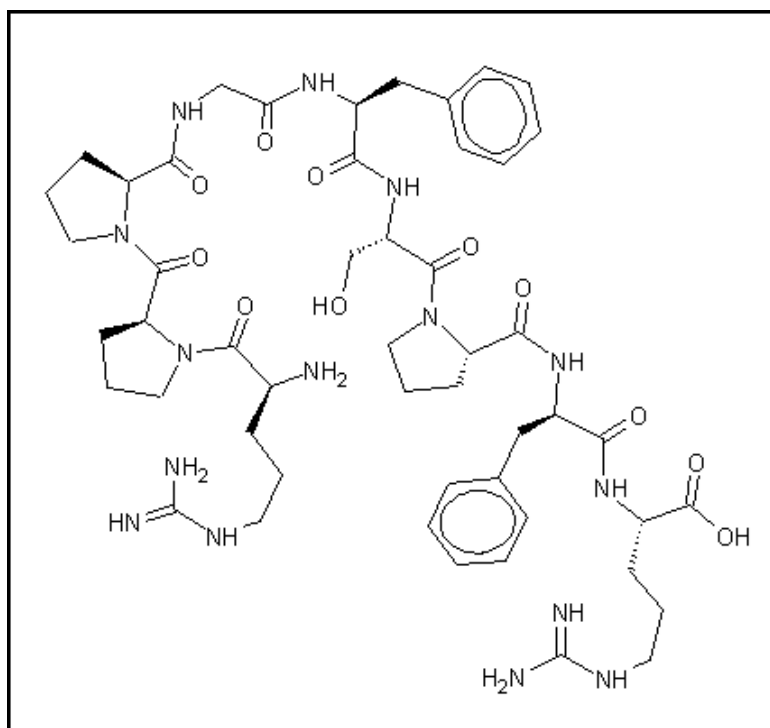
Nastanak citotoksičnog edema dovodi do deplecije iona i vode u međustaničnom prostoru, a posljedica toga je stvaranje novog gradijenta za ione  $\text{Na}^+$  preko krvno-moždane barijere. Deplecija iona i vode u međustaničnom prostoru potiče kretanje tekućine kroz kapilare i stvaranje ionskog edema u izvanstaničnom prostoru (26). Otpuštanje unutarstaničnog sadržaja neurona i glija stanica, uzrokovano njihovim odumiranjem, pridonosi porastu koncentracijskog gradijenta iona  $\text{Na}^+$  na krvno-moždanoj barijeri te potiče dodatno kretanje tekućine u smjeru nastanka edema (27). Ionski edem uključuje prijenos  $\text{Na}^+$  kroz krvno-moždanu barijeru, što inducira nastanak gradijenta iona  $\text{Cl}^-$  i osmotskog gradijenta za vodu, koji dovode do dolijevanja vode u međustanični odjeljak. Kod ionskog edema poput citotoksičnog edema, koncentracija nakupljenog  $\text{Na}^+$  u staničnom odjeljku premašuje koncentraciju  $\text{K}^+$  pospješujući time akumulaciju i abnormalan transport  $\text{Na}^+$  iz vaskularnog odjeljka u međustanični odjeljak (28).

Posljednju fazu moždanog edema čini vazogeni edem kod kojeg dolazi do gubitka integriteta krvno-moždane barijere. Dok citotoksični edem označava patofiziološki proces na staničnoj razini u kojem nema sveukupnog otoka tkiva, on potiče nastanak ionskog i vazogenog edema, pokretača nastanka otoka tkiva (29). Vazogeni edem karakterizira disfunkcija endotela i posljedični prekid krvno-moždane barijere s izlaskom proteina plazme iz vaskularnog odjeljka u međustanični, pri čemu makromolekule poput albumina, IgG i dekstrana, za koje je krvno-moždana barijera u fiziološkim uvjetima nepermeabilna, sada slobodno prolaze (30). Mehanizam nastanka vazogenog edema još nije u potpunosti razjašnjen, međutim poznato je da posrednici upale poput bradikinina i histamina uzrokuju povećanje propusnosti endotelnih stanica smanjujući integritet krvno-moždane barijere (31, 32). Kako je bradikinin kao posrednik u upalnom odgovoru živčanog sustava uključen u mehanizam nastanka moždanog edema, predmet ovog istraživanja usmjerili smo u istraživanje utjecaja bradikinina na oštećenje mozga nakon ishemijskog moždanog udara.

### 1.3. Kalikrein-kininski sustav i bradikinin

Kalikrein-kininski sustav uključen je u mnogim klinički važnim stanjima poput respiratornih alergijskih reakcija, septičkog šoka, srčanih bolesti, nasljednog i stečenog angioedema, Alzheimerove bolesti, ciroze jetre te pankreatitisa. Aktivacija kalikrein-kininskog sustava važna je u regulaciji krvnoga tlaka i u upalnim reakcijama posredstvom bradikinina koji povećava vaskularnu propusnost te uzrokuje vazodilataciju arterija i vena gastrointestinalnog sustava, aorte, uterusa i uretre (33).

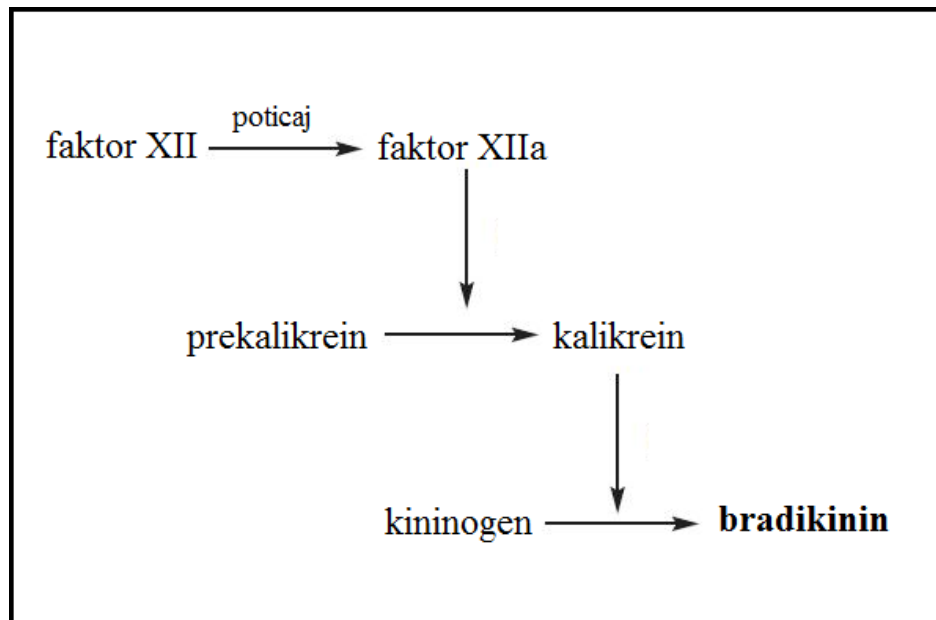
Kinini čine porodicu vazoaktivnih peptida koja uključuje bradikinin, kalidin i metionil-lizil-bradikinin, pri čemu se kalidin i metionil-lizil-bradikinin brzo pretvaraju u bradikinin djelovanjem enzima aminopeptidaza (34). Bradikinin je nonapeptid male molekulske mase (1060,21 Da), čija je kemijska formula  $C_{50}H_{73}N_{73}O_{11}$  (Slika 1). Vrijeme poluraspada bradikinina je manje od 30 sekundi i pritom se pretežno veže za bradikininiski receptor  $B_2$ , čija aktivacija dovodi do povećanja vaskularne propusnosti i vazodilatacije (35).



**Slika 1.** Shematski prikaz molekularne strukture bradikinina.

### 1.3.1. Sinteza bradikinina

Kalikrein-kininski sustav sastoji se od kofaktora kininogena visoke molekulske mase (engl. *High molecular weight kininogen* - HMWK) te dva proenzima, faktora XII i prekalikreina. Kaskada nastanka bradikinina započinje vezanjem i autoaktivacijom faktora XII u faktor XIIa, koji potom pretvara proenzim prekalikrein u plazmatski kalikrein. Sljedeći korak u kaskadi čini cijepanje HMWK djelovanjem kalikreina te oslobađanje bradikinina (Slika 2; 36). Važno je napomenuti da i najmanja autoaktivacija faktora XII dovodi do eksponencijalnog nastanka kalikreina (37). Poticaji za aktivaciju kaskade u *in vivo* uvjetima nisu do kraja razjašnjeni, dok je u *in vitro* uvjetima poticaj za aktivaciju kaskade vezanje faktora XII i kompleksa koji se sastoji od HMWK i prekalikreina na negativno nabijenu površinu (38).



Slika 2. In vitro stvaranje bradikinina

### 1.3.2. Metabolizam bradikinina

U ljudskoj plazmi bradikinin se cijepa u inaktivan metabolit djelovanjem dvije vrste kinaza: 90% bradikina cijepa angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *Angiotensin-converting enzyme* - ACE) u inaktivni bradikinin-(1-5), a ostatak karboksi peptidaza N u aktivni metabolit bradikinin-(1-8). U tkivima glavnu ulogu u metabolizmu bradikinina imaju

neutralne endopeptidaze te u manjem omjeru ACE. Neutralne endopeptidaze cijepaju bradikinin u inaktivni oblik bradikinin-(1-5) (39, 40).

### 1.3.3. Bradikininski receptori

Biološki učinci kinina posredovani su dvama specifičnim receptorima, bradikininskim receptorom tipa 1 (B<sub>1</sub>R) i bradikininskim receptorom tipa 2 (B<sub>2</sub>R) (41). B<sub>2</sub>R tip receptora je konstitutivno prisutan u neuronima moždanog debla, bazalnih jezgara, kore mozga, talamusa i hipotalamusa, dok se B<sub>1</sub>R tip receptora nalazi na neuronima talamusa, leđne moždine i hipotalamusa te je inducibilnog karaktera i reguliran prisustvom citokina, endotoksina ili ozljedom tkiva (42, 43). Oba receptora su iz rodopsinske porodice G protein-vezanih receptora (engl. *G protein-coupled receptors* - GPCR) koji djeluju primarno preko G proteina Gα<sub>q/11</sub> stimulirajući fosfolipazu Cβ te posljedično hidrolizu fosfoinozitola i mobilizaciju unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup> (44). Također djeluju preko proteina Gα<sub>i/o</sub> radi inhibicije adenilat ciklaze i stimulacije mitogen-aktivirane protein kinaze te neovisno o G proteinima pomoću unutarstaničnih efekatora (45).

Širenjem znanja o svojstvima bradikininskih receptora te razvojem selektivnih antagonista bradikininskih receptora omogućuje se racionalni dizajn lijekova koji su učinkoviti u kontroli upalnih procesa te terapiji upalnih bolesti. Dokazano je da antagonisti receptora igraju važnu ulogu kao potencijalni endogeni kardioprotektivni lijekovi zajedno s ACE-inhibitorima (46, 47). Također, nedavna istraživanja pokazuju postojanje inhibitornog učinka natriuretskih peptida agonista gvanilat ciklaze A na signalni put bradikininskog receptora tipa 2 u *in vitro* uvjetima (48). Natriuretski peptidi kao prirodni antagonisti signalnog puta bradikininskog receptora tipa 2 uključeni su u ovo istraživanje kako bi se istražila njihova moguća uloga u patološkim zbivanjima koja slijede nakon ishemijske ozljede mozga, a u kojima bradikinin posreduje.

### 1.4. Natriuretski peptidi

Porodica natriuretskih peptida sastoji se od četiri vrste peptida: atrijskog natriuretskog peptida (engl. *Atrial natriuretic peptide* - ANP), moždanog natriuretskog peptida (engl. *Brain natriuretic peptide* - BNP), urodilatina (URO) i C-tip natriuretskog peptida (CNP). Tkivno-specifična distribucija i regulacija svake vrste peptida je jedinstvena. Atrijski natriuretski peptid dobio je naziv zbog svoje lokacije unutar pretklijetki srca, gdje se nalazi u granulama

stanica srčanog mišićja (49). Peptid sličnog biološkog učinka, moždani natriuretski peptid, dobio je naziv prema mjestu gdje je prvotno lokaliziran, u mozgu svinje, međutim kasnije je pokazano da ga pretežno izlučuju srčane klijetke (50). Urodilatin je natriuretski peptid koji se sintetizira u bubregu, a otkriven je purifikacijom urina (51). C-tip natriuretski peptid se sintetizira u endotelu krvnih žila, glatkim mišićnim stanicama i makrofazima (52).

#### **1.4.1. Struktura natriuretskih peptida**

Gen humanog ANP prekursora kodira 151-aminokiselinski preprohormon. Preprohormon se cijepa u 126-aminokiselinski prohormon u granulama srčanih mišićnih stanica pretklijetki (53). Atrijski natriuretski peptid nastaje cijepanjem prekursora atrijskog natriuretskog peptida, čime se otpuštaju dva fragmenta od kojih jedan čini zreli i biološki aktivni atrijski natriuretski peptid, koji sadrži 28 aminokiselina s karboksi krajem (54). Humani BNP nastaje cijepanjem 132-aminokiselinskog propeptida u neaktivni N-terminalni fragment od 108 aminokiselina koji je dalje cijepan u aktivni hormon od 32 aminokiseline i N-terminalni proBNP (55). Gen za atrijski natriuretski peptid je također izražen u bubrezima, gdje alternativnim cijepanjem prekursora nastaje peptid urodilatin koji se sastoji od 32 aminokiseline (51). C-tip natriuretskog peptida u *in vivo* uvjetima razlikujemo u dva oblika, ovisno o dužini, tj. broju prisutnih aminokiselina. Svaki od njih nastaje drukčijim procesima obrade iz prekursora C-tip natriuretskog peptida. Oblik koji sadrži 22 aminokiseline nalazimo dominantno u središnjem živčanom sustavu, hipofizi, bubregu, vaskularnim endotelnim stanicama i plazmi te je potentnijeg djelovanja od oblika koji sadrži 53 aminokiseline. Plazmatske koncentracije C-tipa natriuretskog peptida vrlo su niske (56).

#### **1.4.2. Metabolizam natriuretskih peptida**

Natriuretski peptidi mogu biti inaktivirani enzimatskom razgradnjom neutralnim endopeptidazama ili lizosomalnom razgradnjom nakon vezanja na receptor čistač (engl. *Clearance receptor*) (57). Neutralne endopeptidaze su metalopeptidaze vezane za membranu koje sadrže cink, a nalaze se u endotelnim stanicama, vaskularnim glatkim mišićnim stanicama, srčanim miocitima, bubrežnim epitelnim stanicama i fibroblastima (58). Osim što razgrađuju natriuretske peptide, neutralne endopeptidaze uspješno razgrađuju i vazoaktivne peptide poput bradikinina, angiotenzina II, endotelina I, enkefalina, amiloidnog  $\beta$  peptida te supstance P (59). Urodilatin se za razliku od ostalih natriuretskih peptida sintetizira u

distalnim bubrežnim tubulima te se izlučen u njihov lumen odstranjuje iz bubrežnog sustava. Pokazano je da neutralne endopeptidaze slabije razgrađuju urodilatin od ostalih natriuretskih peptida zbog četiri dodatne aminokiseline na N-terminalnom kraju (51).

### 1.4.3. Receptori natriuretskih peptida

Biološki učinci natriuretskih peptida ostvaruju se vezanjem na membranske receptore natriuretskih peptida, gvanilat ciklaze. Receptori natriuretskih peptida koji sudjeluju u regulaciji elektrolita i vode te posljedično i krvnog tlaka su gvanilat ciklaza A ili receptor natriuretskih peptida A (engl. *Natriuretic peptide receptor A*), gvanilat ciklaza B ili receptor natriuretskih peptida B (engl. *Natriuretic peptide receptor B*), njegova inačica receptor natriuretskih peptida Bi (engl. *Natriuretic peptide receptor Bi*) te receptor natriuretskih peptida C (engl. *Natriuretic peptide clearance receptor C*) ili receptor čistač, koji nema gvanilat ciklaznu funkciju (60).

Gvanilat ciklaza A receptor sastoji se od izvanstanične 450-aminokiselinske domene na koju se vežu ligandi, zatim 20 do 25 ostataka jednostruke hidrofobne membranske regije i unutarstanične 570-aminokiselinske domene koja tvori uz pomoć 250 aminokiselina domenu homolognu kinazi, 40 ostataka dimerizirajuće domene i oko 250 aminokiselina tvori karboksi terminalnu katalitičku domenu gvanilat ciklaze (61). GC-B receptor ima jednaku topologiju GC-A receptora. GC-A specifično veže ANP, BNP i URO, GC-B veže CNP, a NPR-C veže ANP, BNP i CNP. Vezanje natriuretskih peptida na receptore aktivira gvanilat ciklaznu funkciju povećavajući pritom unutarstaničnu koncentraciju 3',5'-cikličkog gvanozin monofosfata ciljne stanice (62). Svi natriuretski peptidi i njihovi receptori pronađeni su u mozgu (63, 64). Nedavna istraživanja pokazuju da neadekvatna funkcija ANP-a i točkasta mutacija alela u promotoru gena GC-A dovode do povećanog rizika nastanka ishemijskog moždanog udara (64, 65).



## **2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA**

### **2.1. Hipoteza**

Natriuretski peptidi djelovanjem na signalni sustav bradikinina mogu utjecati na ishod ishemijskog oštećenja mišjeg mozga.

### **2.2. Ciljevi rada**

#### **2.2.1. Opći cilj**

Opći cilj istraživanja je razjasniti učinak djelovanja natriuretskih peptida, bradikinina te učinak njihovog međudjelovanja u događajima koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga.

#### **2.2.2. Specifični ciljevi**

U svrhu potvrđivanja hipoteze određen je niz specifičnih ciljeva:

- 1.** Odrediti učinak natriuretskih peptida i bradikinina na stupanj neurološkog oštećenja, veličinu ishemijske lezije te moždani edem u miševa divljeg tipa te time donijeti zaključak utječu li pojedine komponente ili njihovo međudjelovanje na ishemijsku ozljedu mišjeg mozga.
- 2.** Opisati morfologiju stanica područja mozga zahvaćenih ishemijskim oštećenjem nakon primjene natriuretskih peptida.
- 3.** Opisati morfologiju stanica područja mozga zahvaćenih ishemijskim oštećenjem nakon primjene bradikinina.
- 4.** Opisati morfologiju stanica područja mozga zahvaćenih ishemijskim oštećenjem nakon primjene natriuretskih peptida i bradikinina.

### **3. MATERIJALI I METODE**

#### **3.1. Pokusne životinje**

Eksperimentalni postupci provedeni su na mužjacima miševa soja C57Bl/6NCrl, starosti od 2 do 4 mjeseca (težine  $22 \pm 3$  g). Svi miševi korišteni u pokusima imali su slobodan pristup hrani i vodi prije i nakon pokusa. Svi postupci izvedeni za izradu ovog diplomskog rada odobreni su od Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i u skladu su s naputcima Etičkog kodeksa Hrvatskog društva za znanost o laboratorijskim životinjama, koji je usklađen sa naputcima Međunarodnog vijeća za znanost o pokusnim životinjama (*International Council for Laboratory Animal Science*). Također, istraživanje je izvedeno u skladu s odredbama Zakona o zaštiti životinja (NN 135/06) i čl. 9 Pravilnika o uvjetima držanja pokusnih životinja, posebnim uvjetima za nastambe i vrstama pokusa (NN 176/04).

#### **3.2. Izazivanje ishemijsko-reperfuzijskog oštećenja mozga na mišjem modelu – metoda privremene okluzije srednje moždane arterije**

U istraživanju je za izazivanje ishemijskog oštećenja mozga miša korištena metoda unilateralne privremene intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (engl. *MCAO – Middle Cerebral Artery Occlusion*) u trajanju od 60 minuta. Operativne zahvate na svim životinjama izvela je jedna osoba kako bi se smanjila varijabilnost veličine lezije.

Sat vremena prije zahvata mišu je intraperitonealno (i. p.) primijenjena fiziološka otopina u volumenu od 1,0 ml, nakon čega je miš anesteziran postavljanjem u indukcijsku komoru te održavan pod anestezijom 2% mješavinom izoflurana (Isoflurane Baxter U.S., SAD) i kisika korištenjem vaporizatora. Miš je tijekom cijelog zahvata položen na grijanu podlogu koja održava tjelesnu temperaturu na  $37,0 - 37,5$  °C, pri čemu se izbjegava moguća hipotermija miša.

Relativni protok krvi u mogu miševa za vrijeme MCAO zahvata praćen je pomoću laser dopplera moorVMS-LDF (Moore Instruments Inc., Wilmington (DE), SAD). Postavljanje probe izvedeno je pod operacijskim mikroskopom, radi pravilnog postavljanja probe dopplera te izbjegavanja mogućih dodatnih oštećenja okolnih struktura. Miš je anesteziran i održavan pod anestezijom 2 % mješavinom izoflurana i kisika korištenjem vaporizatora. Izveden je zasjek uzduž glave miša kako bi se odstranila koža i opne te izložio

skalp. Štapićima obloženim vatom se pažljivo osušio skalp na koji je uz pomoć ljepila pričvršćena plastična cjevčica koja je služila kao držač probe dopplera. Cjevčica je dodatno učvršćena korištenjem akrilata za izradu reparatura hladnom polimerizacijom Poli repair S (Ivoclar Vivadent GmbH, Austrija) pomiješanim s Pro base cold polimerom (Ivoclar Vivadent GmbH, Austrija), kako bi se onemogućilo pokretanje probe i osigurala stabilnost tijekom snimanja. Otvor cjevčice postavljen je 1 mm posteriorno od bregme, lateralno od sljepoočne linije. Cjevčica je ispunjena parafinskim uljem (Sigma Aldrich Chemie GmbH) i u nju postavljena proba dopplera. Mjerenja su izvedena pri frekvenciji od 2 Hz prilikom čitavog MCAO zahvata te tijekom vađenja silikoniziranog konca kako bi se pratio protok krvi prilikom reperfuzije, praćena su pomoću softvera moorVMS-PC V1.0 (Moore Instruments Inc., Wilmington (DE), SAD). Pravilan položaj laser dopplera iznad središnje moždane arterije određen je tako da se privremeno stisnula zajednička karotidna arterija i pratio pad protoka krvi.

MCAO zahvat je u potpunosti izveden pod operacijskim mikroskopom, radi izbjegavanja mogućih dodatnih oštećenja okolnih struktura te skraćenja trajanja kirurškog zahvata. Nakon postavljanja miša na grijanu podlogu operacijskog stola izveden je zasjek u području vrata, odmaknuto meko tkivo i žlijezde slinovnice pomoću štapića omotanih vatom te su izložene lijeva zajednička karotidna arterija te vanjska i unutrašnja karotidna arterija rasijecanjem od okolnog tkiva i živaca. Zatim je 6-0 kirurškim koncem napravljeno 3 čvora, prvi na zajedničkoj karotidnoj arteriji, zatim drugi što distalnije na vanjskoj karotidnoj arteriji te treći proksimalno od račvišta. Unutrašnja karotidna arterija je zatim izolirana te su na nju postavljene samozatvarajuće pincete. Između 2 i trećeg čvora je zatim napravljen mali zasjek te je okluzija srednje moždane arterije provedena uvođenjem kirurškog konca obloženog silikonom (monofilament), debljine 6-0 (Doccol Corporation, Redlands, CA 92374-4707, USA) prvo u lijevu unutrašnju karotidnu arteriju te nakon njenog grananja, u srednju moždanu arteriju. Duljina uvođenja od otprilike 14 mm mjerena je od račvišta zajedničke karotidne arterije, odnosno do pružanja otpora konca koji je dobar pokazatelj da se konac nalazi na račvištu srednje moždane arterije. Naknadno je pritegnut treći čvor oko monofilamenta kako se ne bi pomaknuo van uslijed pokreta miša u budnom stanju. Rana je zatvorena posebnim privremenim pričvrstnim spajalicama ili šavovima. Miš je potom probuđen iz anestezije i stavljen u grijani kavez na period od 60 minuta. Nakon 60 minuta okluzije srednje moždane arterije miš je ponovno uspavan u indukcijskoj komori sa plinskim anestetikom 2% izofluranom. Uklonjene su privremene pričvrstne spajalice, a monofilamentni

konac je izvučen do trenutka kada se vrh približio na udaljenost od oko 2 mm do otvora na vanjskoj karotidnoj arteriji kroz koji je monofilament uveden. Privremeno je začepljena unutarnja karotidna arterija Dumont pincetom br. 7 te je monofilament u potpunosti izvađen iz krvne žile. Treći čvor je potom čvrsto pritegnut kako bi se spriječilo krvarenje. Samozatvarajuća pinceta je potom uklonjena, kao i prvi čvor koji je postavljen na zajedničkoj karotidnoj arteriji na samom početku zahvata. Rana je zatvorena uz pomoć spajalica. Na kraju zahvata rana je premazana otopinom joda, a naposljetku je miš premješten u kavez, na grijanu podlogu na 37°C na kojoj je ostao slijedeća 24 sata.

Kod lažno operiranih miševa korišten je jednak postupak osim što je monofilament nakon uvođenja u lijevu unutrašnju karotidnu arteriju odmah izvučen, omogućavajući tako neposrednu reperfuziju.

Hrana i voda pružena je *ad libitum*. U prethodno navedenim postupcima radi postizanja maksimalno aseptičnih uvjeta korišten je zasebni set instrumenata koji je prije svake operacije dezinficiran i steriliziranu u suhom sterilizatoru.

Kako bismo istražili učinak natriuretskih peptida, bradikinina te učinak njihovog međudjelovanja u mozgu miševa nakon izazivanja ishemijske lezije, miševima je u tri vremenske točke (1) 10-15 minuta prije MCAO zahvata, (2) za vrijeme reperfuzije (60 minuta od početka zahvata) te (3) 6 sati od početka reperfuzije ubrizgan intravenski (i. v.) bolus s ispitivanom tvari u jugularnu venu. Od natriuretskih peptida za pokuse s miševima odabran je URO zbog njegove specifične strukture koja mu pruža veću otpornost na neutralne endopeptidaze. Prvoj skupini miševa je u tri vremenske točke ubrizgana fiziološka otopina (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl). Drugoj skupini je u istim vremenskim točkama ubrizgan natriuretski peptid URO (0,68 mg/kg po primjeni) otopljen u fiziološkoj otopini (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl). Trećoj skupini ubrizgan je BK (Sigma Aldrich Chemie GmbH) (1,14mg/kg po primjeni) otopljen u fiziološkoj otopini (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl) te četvrtoj skupini mješavina BK-a (1,14mg/kg po primjeni) i URO-a (0,68 mg/kg po primjeni) otopljenih u fiziološkoj otopini (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl).

### 3.3. Procjena neurološkog oštećenja

Dvadeset i četiri sata nakon izazivanja ishemijske ozljede, miševi su podvrgnuti procjeni neurološkog oštećenja, modificiranom metodom koja je opisana u literaturi (67), a korištena studijama iz laboratorija (68, 69). Dvadeset i četiri sata nakon MCAO zahvata neurološki status miševa procjenjivan je tako da je promatrana spontana aktivnost miša unutar kaveza te zatim pri pridržavanju miša za rep.

Procjenjivani parametri bodovani su slijedećim vrijednostima:

0 bodova - miševi bez deficita, koji nisu pokazivali nikakva odstupanja od uobičajene spontane aktivnosti

1 bod - miševi koji su pokazivali slabost (nemogućnost ispružanja) prednjih udova te okretanje torza prema ipsilateralnoj strani pri pridržavanju miša za rep

2 bodova - kruženje miševa tijelom prema oštećenoj strani pri kretanju unutar kaveza

3 boda - nemogućnost podnošenja težine na oštećenoj strani prilikom pridržavanju miša za rep

4 boda - nedostatak spontane lokomotorne aktivnosti

Spontana aktivnost ocijenjena je u trajanju od 5 minuta u, za miša, normalnom okruženju (kavezu). Proučavana je spontana aktivnost prilikom istraživanja prostora. Tom prilikom ispitivač se nije pokretao, niti proizvodio buku kako ne bi ometao miša i uzrokovaokarakteristično ponašanje miša u kojemu se on zaustavi i ukoči, a javlja se u situacijama kada se životinja osjeća ugroženom. Simetrija pokretanja svih udova izvedena je na način da se miša drži u zraku, pridržavajući ga samo za rep. Svi udovi u zdrave životinje su ispruženi, a posebna pozornost posvećena je pokretanju udova desne strane. Simetrija ispruženosti prednjih udova izvedena je na način da miša držimo u zraku, pridržavajući ga za rep, polagano spuštajući do podloge omogućivši hod na prednjim udovima. Zdrava životinja u potpunosti simetrično ispruži prednje udove. Pridržavanje miša za rep promatrano je i okretanje torza prema ipsilateralnoj strani pri pridržavanju miša za rep pri čemu životinja sa neurološkim ispadom u potpunosti zanemaruje jednu stranu tijela. Penjanje po zidu žičanog kaveza provedeno je na način da je poklopac kaveza postavljen pod kutem od gotovo 90 stupnjeva, a miš je postavljen na donju 1/3 poklopca pri čemu se miš nastoji popeti do vrha. Tipičan odgovor zdrave životinje uključivao je okretanje glave i pokret cijelog tijela kako prema ispisilateralnoj tako i kontraleteralnoj strani u jednakoj mjeri, pri čemu pri životinja sa

neurološkim ispadom u potpunosti zanemaruje jednu stranu tijela te kod jakog neurološkog oštećenja u potpunosti dolazi do spontane lokomotorne aktivnosti.

### **3.4. Priprema tkiva za histološku analizu**

Prilikom pripreme tkiva za izvođenje histološke metode bojenja prema Nisslu korištena je metoda perfuzijske fiksacije 4% paraformaldehidom (4% PFA) u fosfatnom puferu - PBS (engl. *phosphate buffer saline*) kao fiksativom. Perfuzijska fiksacija korištena je kako bi se uporabom krvožilnog sustava doboko anestetizirane životinje fiksativ raspodjelio kroz čitavo tijelo prije nastupanja autolitičkih procesa koji se događaju uslijed umiranja životinje. Postupak perfuzijske fiksacije obuhvaća uspavljivanje životinje, perfuziju fosfatnim puferom, perfuziju fiksativom te izolaciju tkiva za daljnje pokuse uz naknadnu postfiksaciju tkiva.

#### **3.4.1. Perfuzijska fiksacija tijela miša**

Postupak perfuzijske fiksacije miša započet je uspavljivanjem miša dozom anestetika 2,5% Avertina (tribrometanol, 500 µl, 250 mg/kg) primjenjenog intraperitonealno. Nakon što je miš duboko zaspao, škaricama su otvorene abdominalna i torakalna šupljina te prikazani jetra i srce. U lijevu klijetku umetnuta je igla debljine 23G, a desna pretklijetka bila je presječena škaricama kako bi se omogućilo otjecanje krvi iz krvožilnog sustava. Prvotno je provedena fiksacija sa 50 ml fosfatnog pufera (engl. *Phosphate buffered saline – PBS*), sastava 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH=7,4) te nakon adekvatnog ispiranja krvožilnog sustava puferom uslijedila je perfuzija sa 30 ml 4% paraformaldehida (PFA).

#### **3.4.2. Izolacija mozga, postfiksacija i krioprotekcija**

Nakon provedene fiksacije perfuzijom miš je dekapitiran, sa glave je uklonjena koža te uzdužnim rezom od *foramen magnuma* prema rostralno duž *suture sagitalis* prerezana lubanja. Najprije je uklonjena okcipitalna kost te zatim koštano tkivo iznad nosnih bulbusa i obje ljuske parijetalne kosti. Uz pomoć škarica i fine metalne špatule mozak je odvojen od baze lubanje te uronjen na 24 sata u otopinu 4% PFA u svrhu postfiksacije imerzijom. Nakon postfiksacije mozak je prebačen u otopinu za krioprotekciju, 30% saharozu otoplenu u

fosfatnom puferu na 4°C radi dehidracije i krioprotekcije. Neposredno prije rezanja mozgovi su uklopljeni u ljepilo za tkivo Tissue-Tek (O.C.T. compound, Sakura, SAD).

### **3.4.3. Rezanje mišjeg mozga na kriostatu i pohrana uzoraka**

Nakon postupka uklanjanja u otopinu za rezanje mozgovi su smrznuti na -80°C kako bi se formirao tvrdi blok, koji je potom montiran na držač kriostata (Leica CM3050 S). Na kriostatu su rezani frontalni rezovi debljine 35 µm, koji su odmah postavljeni na pozitivno nabijena stakla (Menzel SuperFrost Plus).

### **3.5. Histološko bojenje po Nisslu**

U svrhu procjene veličine moždane lezije 24 sata nakon postupka privremene okluzije srednje moždane arterije poprečni presjeci mozga miša bojeni su prema Nisslu, prema standardiziranom protokolu. Rezovi mozga na stakalcima fiksirani su u 100% metanolu na 10 minuta, zatim rehidrirani u silazećem alkoholnom nizu (96% etilni alkohol 5 minuta, 70% etilni alkohol 2 minute i 50% etilni alkohol 2 minute), isprani 2 puta u destiliranoj vodi (2 minute), obojani bojom Cresyl Violet (Sigma Aldrich Chemie GmbH) 6 minuta te 2 puta isprani vodom po 2 minute. Nakon bojanja, rezovi su dehidrirani u uzlaznoj seriji alkohola (50% EtOH 2 minute, 70% EtOH s nekoliko kapi 10% glacijalne octene kiseline) 2 minute, 70% etilni alkohol 2 minute, 96% etilni alkohol 2 minute i 100% etilni alkohol 10 min. Zatim je korišteno sredstvo za bistrenje Histoclear (Invitrogen) na 5 minuta te dodana kapljica otopine Histomount mounting media (Invitrogen) netom prije pokrivanja pokrovnicom. Staklaca sa rezovima su ostavljena preko noći u ventilirnoj laboratorijskoj komori, digestoru, kako bi medij za pokrivanje polimerizirao i očvrsnuo. Slijedeći dan, višak očvrsnutog medija za pokrivanje odstranjen, a stakalca sa rezovima odložena su u obilježene kutije čuvane na sobnoj temperaturi. Stakalca s obojenim rezovima skenirana su koristeći skener Flatbed Epson perfection 4870 scanner (Epson America, Inc.) s rezolucijom od 4800 dpi. Skenirane slike analizirane su koristeći softver ImageJ 1,45 (NIH, Bethesda, Maryland, SAD). Stakalca s obojenim rezovima su također analizirana na način da su fotografirana po 3 prethodno određena područja (korteks, stiatum i hipokampus) u području ishemijske lezije na ipsilateralnoj strani i 3 odgovarajuća polja na kontralateralnoj strani. Prilikom fotografiranja korišten je svjetlosni mikroskop ECLIPSE E200 sa objektivima 40x i 100x, te digitalnom kamerom.

### **3.6. Procjena volumena moždane ishemijske lezije i statistička analiza**

Volumen ishemijske lezije nastale nakon MCAO procijenjen je u svim skupinama miševa u vremenskoj točki od 24 sata nakon operativnog zahvata. U analizu je bio uključen svaki šesti frontalni presjek kroz mozak dobiven rezanjem na kriostatu te obojen prema Nisslu. Nakon bojenja, poklapanja i sušenja, stakalca sa uzorcima su digitalizirana te analizirana. Kvantifikacija volumena ishemijske lezije provedena je mjerenjem "izravnog" volumena ishemijske lezije (58). "Izravni volumen ishemijske lezije" je volumen lezije vidljiv na histološkim preparatima kao tkivo ipsilateralne hemisfere koje nije uredne histološke građe (svjetlije edematozno tkivo). "Izravni" volumen ishemijske lezije izračunat je na način da je površina lezije (u  $\text{mm}^2$ ) izračunata na svakom šestom presjeku kroz mozak umnožena sa 6 i s debljinom presjeka ( $35\mu\text{m}$ ). Krajnja vrijednost bila je izražena u  $\text{mm}^3$ . Razlika između ipsilateralne i kontralateralne hemisfere označavala je moždani edem. Postotak moždanog edema izražen je kao postotak povećanja volumena ishemijske ipsilateralne hemisfere u odnosu na kontralateralnu hemisferu (70).

### **3.7. Prikaz i analiza rezultata**

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Za statističku obradu podataka korišten je studentov t test te Kruskal-Wallis statistički test s Dunn post testom. Statistička značajnost definirana je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05. Analiza je provedena koristeći računalni program GrafPad Software.



## **4. REZULTATI**

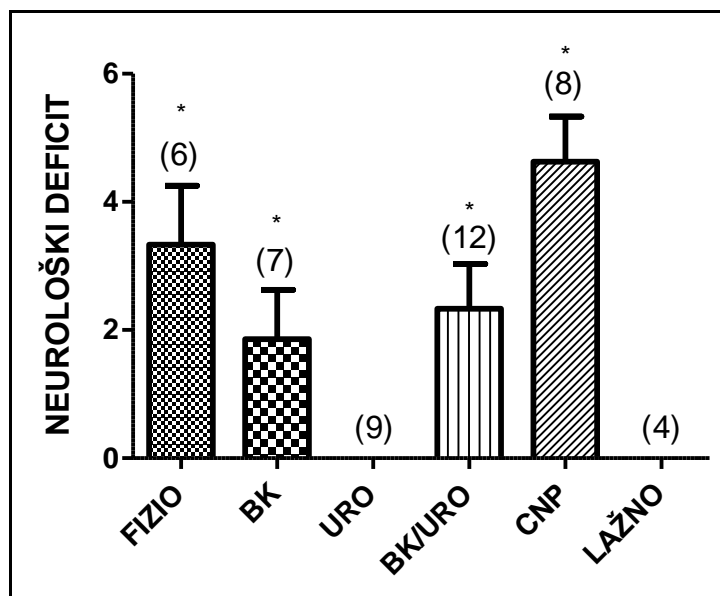
### **4.1. Procjena neurološkog oštećenja**

Kako bi se procijenio opseg neurološkog deficita nastalog kao posljedica ishemijskog oštećenja mozga, korištena je modifikacija standardiziranog testa za procjenu neurološkog oštećenja. Ljestvica vrijednosti parametara sensorimotornih funkcija dobivenih navedenim testom kreće se od 0 do 10, gdje ocjena 0 označava zdravu životinju urednog neurološkog statusa. Neurološka procjena vršena je jedan dan prije operacije te 24 sata nakon MCAO na svim skupinama miševa. Neurološka procjena motornog deficita u kontrolnoj skupini miševa kojima je administrirana fiziološka otopina pokazala je neurološki ispad u obliku slabog motornog deficita kod 2 miša (33,3 %) te u obliku umjerenog motornog deficita kod 4 miša (66,6%) od ukupno 6 miševa. U skupini miševa kojima je administriran bradikinin, od ukupno 7 miševa 5 (71,4 %) je pokazalo slabi motorni deficit, a 2 (28,6 %) umjereni motorni deficit. U skupini životinja kojima je administrirana mješavina BK i URO, od ukupno 12 administriranih miševa 7 (58,3 %) životinja nije pokazalo motorni deficit, dok je 5 (41,6%) životinja pokazalo umjereni motorni deficit. U skupini miševa kojima je administriran URO nijedna administrirana životinja (100 %) od ukupno 9 nije pokazivala znakove motornog deficita. U skupini životinja kod kojih je administriran CNP, od ukupno 8 životinja 1 (12,5 %) je pokazivala slabi motorni deficit te 7 (87,5 %) umjereni motorni deficit. Lažno operirana skupina životinja (ukupno 4, 100%) nije pokazivala znakove motornog deficita (Tablica 1).

**Tablica 5.** Prikaz neurološkog bodovanja koji odražava motorni deficit u 6 skupina životinja 24 sata nakon podvrgavanja 60 minutnog začepljenja središnje moždane arterije. Životinjama koje su podvrgnute MCAO zahvatu administrirana je redom: fiziološka otopina (FIZIO), bradikinin (BK), mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK), urodilatin (URO), C-tip natriuretskog peptida (CNP). Jedna skupina životinja bila je lažno operirana. Podaci pokazuju broj životinja, te u zagradi postotak od ukupnog broja životinja koje su pokazale motorni deficit. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na urodilatin ( $p < 0,05$ ).

	<b>BEZ DEFICITA (0)</b>	<b>SLABI (1)</b>	<b>UMJERENI (3 i 6)</b>	<b>JAKI (10)</b>	<b>UKUPNO</b>
<b>FIZIO</b>	0 (0,0 %)	2 (33,3 %)	4 (66,6 %)	0 (0,0 %)	6 *
<b>BK</b>	0 (0,0 %)	5 (47,06 %)	2 (28,6 %)	0 (0,0 %)	7 *
<b>URO/BK</b>	7(58,3 %)	0 (0,0 %)	5 (41,6 %)	0 (0,0 %)	12 *
<b>URO</b>	9 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	9
<b>CNP</b>	0 (0,0 %)	1 (12,5 %)	7 (87,5 %)	0 (0,0 %)	8*
<b>LAŽNO</b>	4 (100,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	4
<b>UKUPNO</b>	20	8	18	0	46

Ukupan neurološki deficit koji nastaje kao posljedica ishemijske lezije u skupini miševa kojima je administriran URO nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na lažno operirane miševe ( $p < 0,05$ ). Kontrolna skupine životinja kojima je administrirana fiziološka otopina, skupine životinja kojima je administriran BK, CNP i mješavina BK i URO pokazali su neurološki ispad visokog intenziteta odražavajući učinak ishemijske lezije na funkciju ipsilateralne moždane polutke (Slika 3).

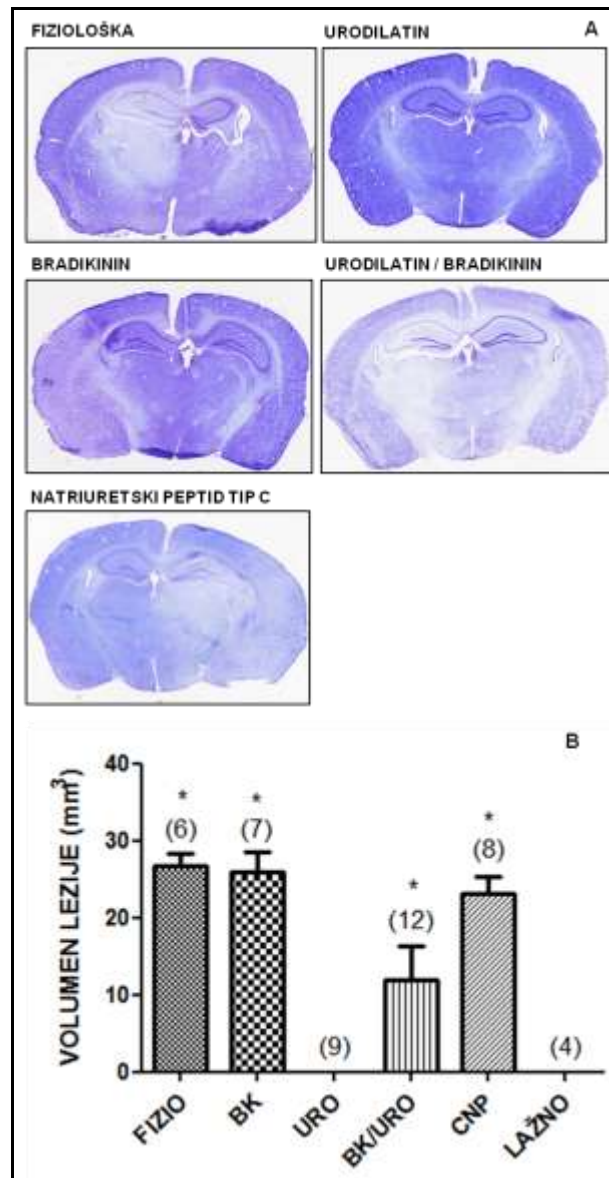


**Slika 3.** Neurološka procjena miševa nakon tretmana fiziološkom otopinom (FIZIO), bradikininom (BK), urodilatinom (URO), mješavinom urodilatina i bradikininom (URO/BK) i C-tipom natriuretskog peptida (CNP) kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Jedna skupina životinja bila je lažno operirana. (n) označava broj miševa. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na urodilatin ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2. Procjena veličine ishemijske lezije

S ciljem određivanja utjecaja natriuretskih peptida, bradikininom i njihovog međudjelovanja na ishemijsku ozljedu mozga provedena je kvantifikacija volumena ishemijske lezije mjerenjem "izravnog" volumena ishemijske lezije na rezovima mozga obojenim prema Nisslu (Slika 4A). Svih 6 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu kojima je administrirana fiziološka otopina imalo je vidljivu ishemijsku leziju u vremenskoj točki od 24 sata nakon izvođenja MCAO zahvata. Volumen ishemijske lezije u kontrolnoj skupini životinja kojima je administrirana fiziološka otopina iznosio je  $26,90 \pm 4,20 \text{ mm}^3$ . Skupini životinja kojima je administriran bradikinin svih 7 od ukupno 7 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu imalo je ishemijsku leziju, a volumen ishemijske lezije iznosio je  $25,89 \pm 7,13 \text{ mm}^3$ . Skupina životinja kojima je administrirana mješavina URO i BK od ukupno 12 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu 5 je imalo ishemijsku leziju, volumena  $11,91 \pm 15,87 \text{ mm}^3$ . U skupini životinja kojima je administriran URO svih 9 od ukupno 9 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu nije imalo vidljivu ishemijsku leziju. Svih 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu kojima je administriran CNP imalo je vidljivu ishemijsku leziju nakon izvođenja

MCAO zahvata. Volumen ishemijske lezije u CNP skupini životinja iznosio je  $23,20 \pm 6,27$  mm<sup>3</sup>. U skupini lažno operiranih životinja nije bilo vidljivih ishemijskih lezija kod nijednog miša od njih ukupno 4 (Slika 4B).

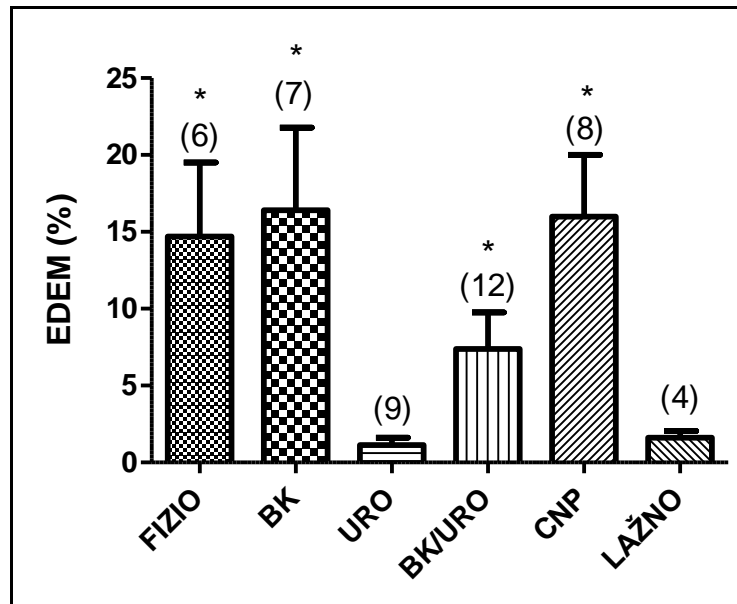


**Slika 4.** Procjena veličina volumena ishemijske lezija 24 sata nakon podvrgavanja 60 minutnom začepljenju središnje moždane arterije (MCAO). Skupine životinja koje su podvrgnute MCAO zahvatu administrirana je redom: fiziološka otopina (FIZIO), bradikinin (BK), mješavina bradikinina i urodilatina (BK/URO), urodilatin (URO) i C-tip natriuretskog peptida (CNP). Jedna skupina životinja bila je lažno operirana. A: Reprezentativne fotografije rezova mozga bojenih prema Nisslu sa označenom ishemijskom lezijom (crna linija). B: Izračun "izravnog volumena ishemijske lezije". Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. (n) označava broj miševa. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na urodilatin ( $p < 0,05$ ).

#### 4.2.1. Procjena postotka moždanog edema

Kako bi odredili učinak natriuretskih peptida, bradikinina i njihovog međudjelovanja na moždani edem koji nastaje kao posljedica ishemijske ozljede mozga provedena je volumetrijsku analizu lijeve i desne moždane hemisfere. Postotak moždanog edema određen je kao postotak povećanja obujma ipsilateralne ishemijske hemisfere u usporedbi s zdravom kontralateralnom hemisferom. U kontrolnoj skupini životinja kojoj je administrirana fiziološka otopina svih 6 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu imalo je ishemijsku ozljedu uz postotak moždanog edema od  $14,70 \pm 11,77\%$ . Kod skupine od 7 životinja kojima je administriran bradikinin nakon podvrgavanja MCAO zahvatu došlo je do povećanja ipsilateralne hemisfere za  $16,40 \pm 14,23\%$ . U skupini životinja kojima je administrirana mješavina BK i URO od ukupno 12 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu njih 5 je imalo ishemijsku leziju te postotak povećanja ipsilateralne moždane hemisfere od  $7,37 \pm 8,26\%$ . U skupini životinja kojima je administriran URO nakon MCAO zahvata postotak edema iznosio je  $1,13 \pm 1,45\%$ . Životinjama kojima je administriran CNP, svih 8 životinja podvrgnutih MCAO s ishemijskom ozljedom imalo je postotak moždanog edema od  $15,98 \pm 11,38\%$ . Kod lažno operirane skupine životinja povećanje ipsilateralne hemisfere mišjih mozgova iznosilo je  $1,60 \pm 0,88\%$ .

Povećanje ipsilateralne hemisfere kao mjere moždanog edema koji nastaje kao posljedica ishemijske lezije u skupini miševa kojima je administriran URO neznatan je u odnosu na lažno operirane miševe, te značajno ( $p < 0,05$ ) niži od kontrolne skupine životinja kojima je administrirana fiziološka otopina, od skupine životinja kojima je administriran BK te skupine životinja kojima je administriran CNP (Slika 5) kod kojih je vidljivo područje neuredne histološke građe koje odražava područje ishemijske lezije (Slika 4A). Povećanje ipsilateralne hemisfere kao mjere moždanog edema koji nastaje kao posljedica ishemijske lezije značajno snižen ( $p < 0,05$ ) u skupini miševa kojima je administrirana mješavina BK i URO, naspram skupine životinja kojima je administriran samo bradikinin (Slika 5), koji također imaju i značajno veći volumen ishemijske lezije ( $p < 0,05$ ; Slika 4B).



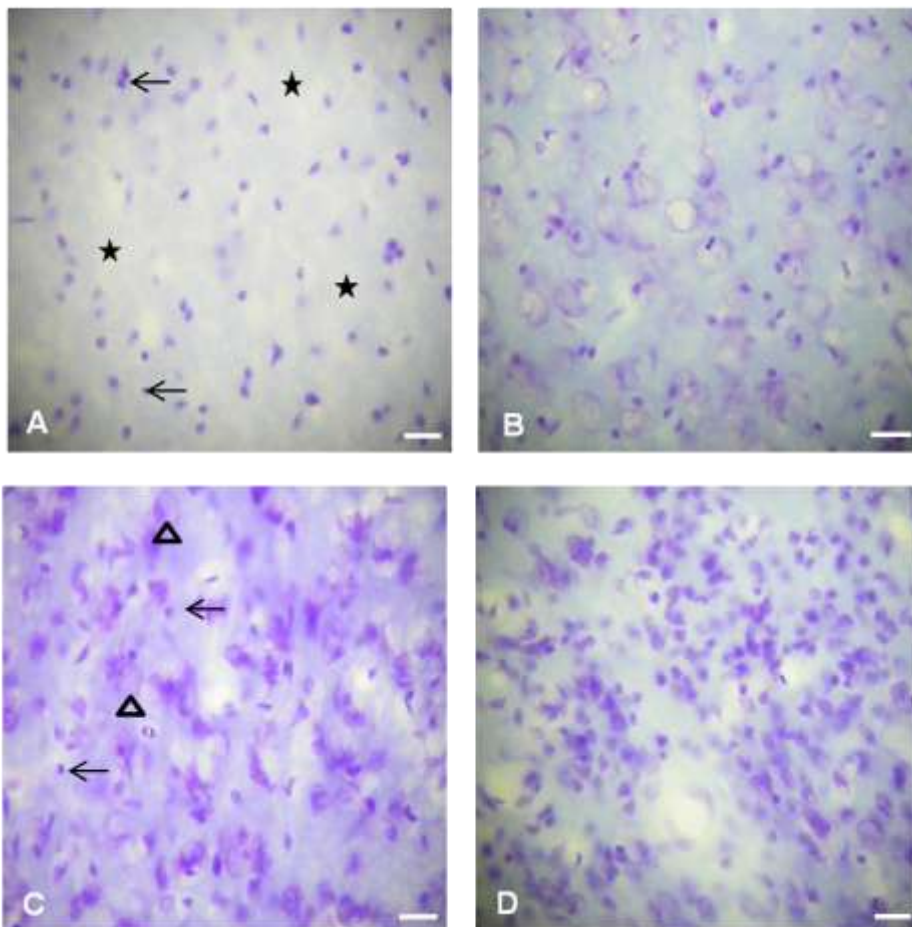
**Slika 5.** Prikaz postotka moždanih edema mjenjenih u mozgu miševa kod 6 istraživanih skupina miševa nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO), te u jednoj skupini lažno operiranih miševa. Četiri skupine životinja koje su podvrgnute MCAO zahvatu administrirana je redom: fiziološka otopina, bradikinin (BK), mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK) i urodilatin (URO). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. (n) označava broj miševa. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na bradikinin ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Patohistološka analiza

Kako bi odredili učinak djelovanja peptida na ishemijsku ozljedu mozga povedena je patohistološka analiza na frontalnim rezovima mozgovu obojenim prema Nisslu. Nisslovom metodom prikazujemo citoarhitektoniku ustrojstva sive tvari središnjeg živčanog sustava. Korištenjem Nisslove metode oboji se Nisslova tvar, tj. nukleinske kiseline jezgre i ribosoma, čime se prikažu tijela neurona. Prilikom razvoja ishemijske lezije dolazi do patoloških promjena u staničnoj morfologiji koje se mogu uočiti u obliku povećanog gubitka neurona, promjena Nisslove tvari u obliku raspršenja zbog bubrenja stanica (kromatoliza) te nekrotične promjene stanične morfologije neurona u male tamnije stanice trokutastog oblika kao posljedica kondenzacije citoplazme i karioplazme (piknoza).

Kod prve skupine životinja kojoj je administrirana fiziološka otopina mogle su se uočiti stanice normalne morfologije u području kore mozga i prugastog tijela kontralateralne moždane polutke te u područjima ipsilateralne moždane polutke koja nisu bila zahvaćena ishemijskom lezijom (Slika 6B, D). Dvadeset četiri sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u području ipsilateralne moždane kore bile su vidljive tipične patološke promjene u obliku svjetlijeg edematoznog tkiva koje nije uredne histološke građe te promijenjene morfologije neurona u obliku smanjenja veličine stanice neurona koji poprima trokutasti oblik zbog kondenzacije citoplazme i karioplazme (Slika 6A). U području ipsilateralnog prugastog tijela zahvaćenog ishemijskom lezijom uz "crvene" zgusnute piknotične neurone mogli su se uočiti neuroni sa znakovima kromatolize, smanjenog broja Nisslovih tijela koje nastaje kao posljedica bubrenja stanica te razlaganja Nisslove tvari (Slika 6C).

## FIZIOLOŠKA

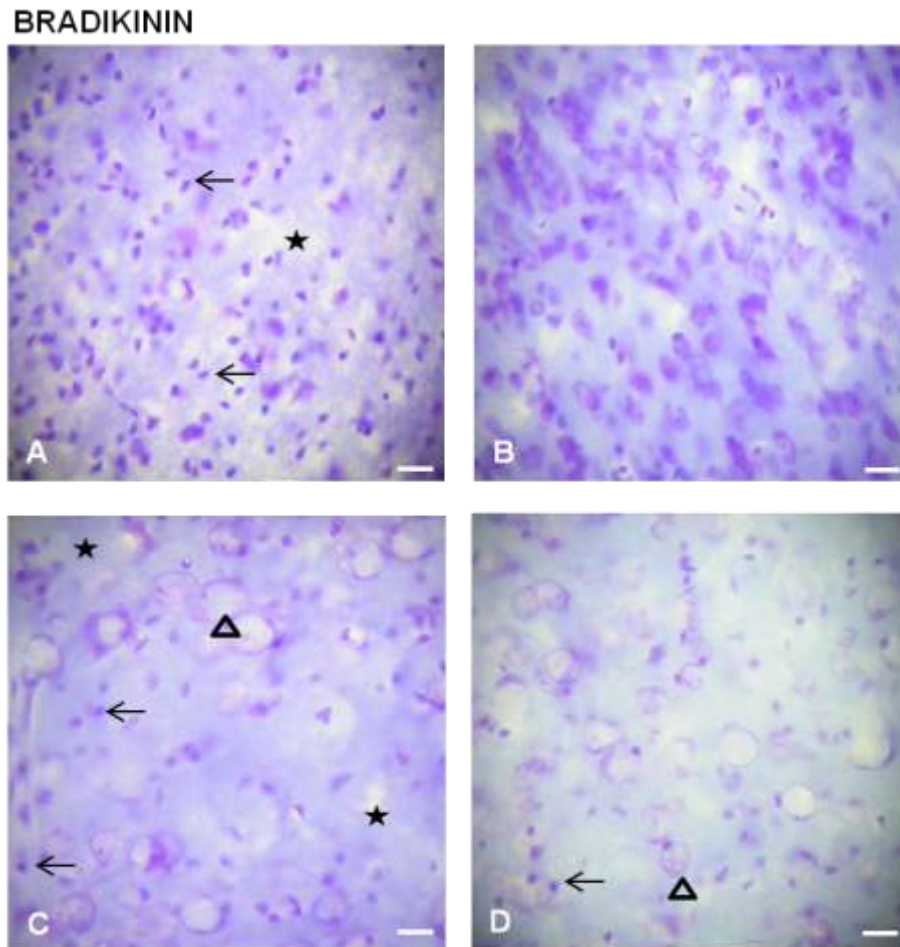


**Slika 6.** Učinak tretmana fiziološkom otopinom na morfologiju stanica mozga miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Usporedba frontalnih rezova ipsilateralne (A) i kontralateralne kore velikog mozga (B) te ipsilateralnog (C) i kontralateralnog prugastog tijela (D) istog mišjeg mozga histološki obojanih po Nisslu. U područjima zahvaćenima ishemijskom lezijom (A, C) vidljive su patološke promjene kromatolize (razlaganja Nisslove tvari zbog bubrenja stanica; trokut), povećanog gubitka neurona (zvijezda) te piknoze (promijenjene morfologije neurona u smanjene stanice trokutastog oblika zbog kondenzacije citoplazme i karioplazme; strelica) u usporedbi sa područjima kore (B) i prugastog tijela (D) kontralateralne (zdrave) moždane polutke. Mjerna oznaka: 10  $\mu$ m.

U drugoj skupini životinja kojoj je administriran bradikinin 24 sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja stanice normalne morfologije mogle su se uočiti samo u području kore mozga kontralateralne moždane polutke (Slika 7B). Za razliku od kontrolne skupine miševa kojima je administrirana fiziološka otopina u području ipsilateralnog prugastog tijela također su uočene promjene kromatolize neurona te promjene morfologije neurona u obliku smanjenih



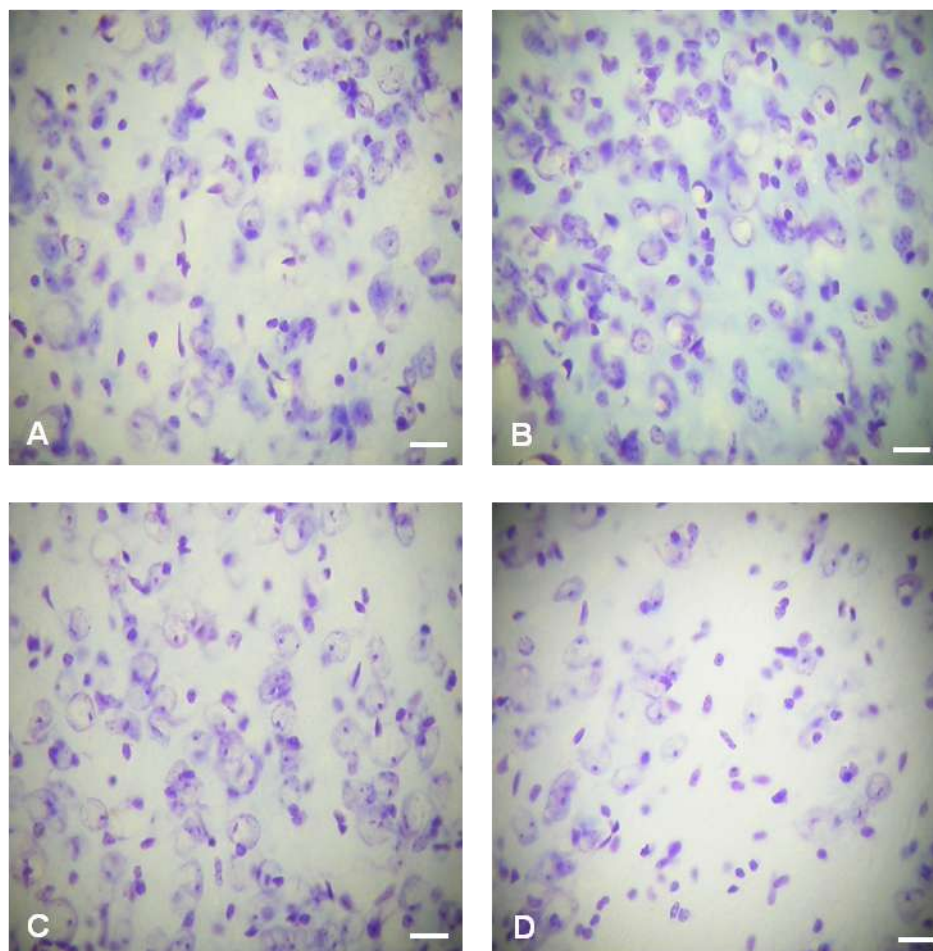
tamnijih stanica (Slika 7D). Područje ipsilateralne moždane kore bilo je izrazito neuredne histološke građe. Uz svijetlo edematozno tkivo uočene su patološke promjene morfologije neurona u obliku smanjenja veličine stanice neurona u mali trokutasti oblik s piknotičnim jezgrama (Slika 7A). U području ipsilateralnog prugastog tijela bili su vidljivi kako nekrozom zahvaćeni mali piknotični neuroni tako i izrazito nabubreni neuroni sa znakovima kromatolize (Slika 7C).



**Slika 7.** Učinak tretmana bradikininom na morfologiju stanica mozga miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Usporedba frontalnih rezova ipsilateralne (A) i kontralateralne kore velikog mozga (B) te ipsilateralnog (C) i kontralateralnog prugastog tijela (D) istog mišjeg mozga histološki obojanih po Nisslu. U područjima zahvaćenima ishemijskom lezijom (A, C) vidljive su patološke promjene kromatolize (razlaganja Nisslove tvari zbog bubrenja stanica; trokut), povećanog gubitka neurona (zvijezda) te piknoze (promijenjene morfologije neurona u smanjene stanice trokutastog oblika zbog kondenzacije citoplazme i karioplazme; strelica) u usporedbi sa područjem kore kontralateralne (zdrave) moždane polutke (B) u kojem nema vidljivih patoloških promjena te prugastog tijela kontralateralne polutke (D) u kojem ste nalazi patoloških promjena kromatolize i piknoze. Mjerna oznaka: 10  $\mu$ m.

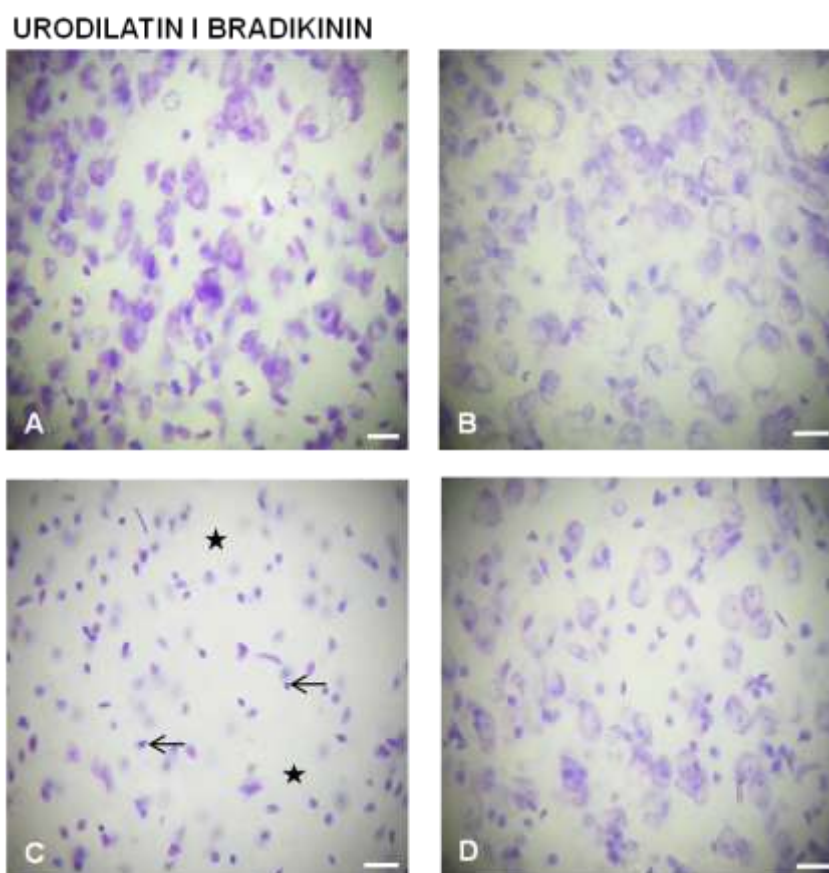
U trećoj skupini životinja kojoj je administriran urodilatin 24 sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja mogle su se uočiti stanice normalne morfologije u području kore mozga i prugastog tijela kontralateralne moždane polutke te također u područjima moždane kore i prugastog tijela ipsilateralne moždane polutke čija je krvna opskrba zahvaćena začepljenom središnjom moždanom arterijom prilikom 60 minutne okluzije (Slika 8A, B, C i D).

#### URODILATIN



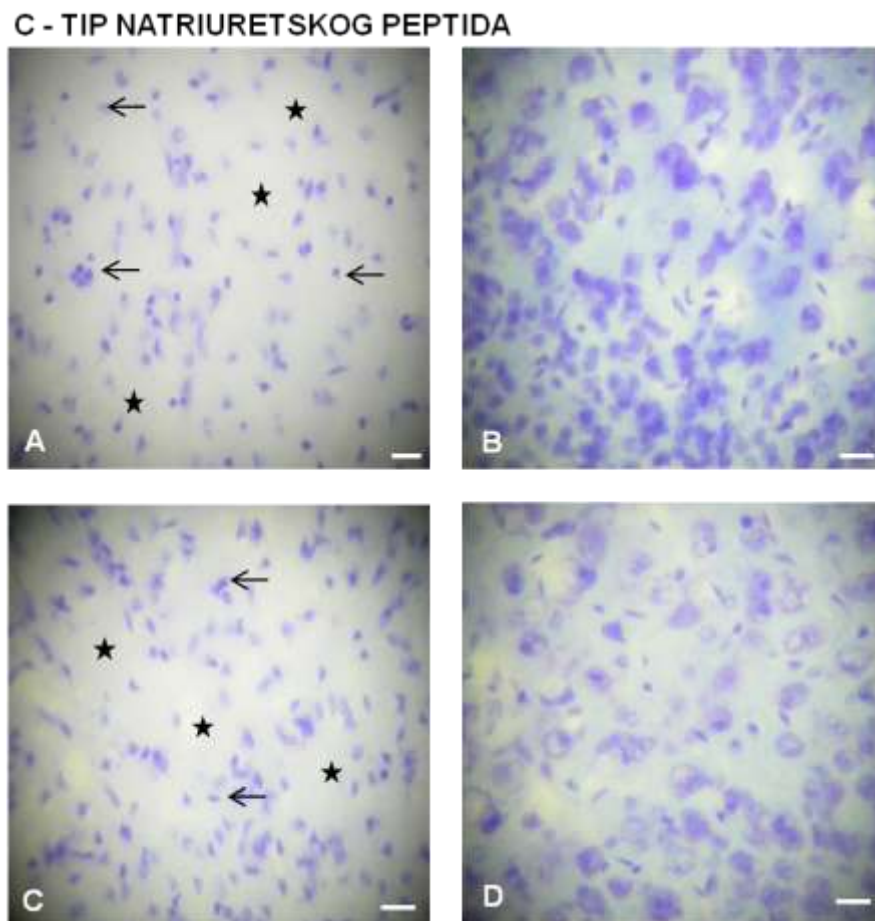
**Slika 8.** Učinak tretmana urodilationom na morfologiju stanica mozga miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Usporedba frontalnih rezova ipsilateralne (A) i kontralateralne kore velikog mozga (B) te ipsilateralnog (C) i kontralateralnog prugastog tijela (D) istog mišjeg mozga histološki obojanih po Nisslu. U područjima opskrbe začepljene središnje moždane arterije, ipsilateralnoj moždanoj kori (A) i ipsilateralnom prugastom tijelu ne zamjećuju se patološke promjene stanica. Mjerna oznaka: 10  $\mu$ m.

Kod četvrte skupine životinja kojoj je administrirana mješavina urodilatina i bradikinina mogle su se uočiti stanice normalne morfologije u području kore mozga i prugastog tijela kontralateralne moždane polutke te u područjima ipsilateralne moždane polutke koja nisu bila zahvaćena ishemijskom lezijom 24 sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja (Slika 9B, D). Nakon izazivanja ishemijskog oštećenja u području ipsilateralne moždane kore nije bilo su vidljivih patoloških promjena te je tkivo pokazivalo znakove uredne histološke građe (Slika 9A). Međutim, u području ipsilateralnog prugastog tijela zahvaćenog ishemijskom lezijom uočeno je edematozno tkivo s piknotičnim neuronima sitne tamnije trokutaste građe (Slika 9C).



**Slika 9.** Učinak tretmana mješavine urodilatina i bradikinina na morfologiju stanica mozga miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Usporedba frontalnih rezova ipsilateralne (A) i kontralateralne kore velikog mozga (B) te ipsilateralnog (C) i kontralateralnog prugastog tijela (D) istog mišjeg mozga histološki obojanih po Nisslu. U području prugastog tijela ipsilateralne moždane polutke (C) vidljive su patološke povećanog gubitka neurona (zvijezda) te piknoze (promijenjene morfologije neurona u smanjene stanice trokutastog oblika zbog kondenzacije citoplazme i karioplazme; strelica) u usporedbi sa područjem prugastog tijela kontralateralne (zdrave) moždane polutke (D). Mjerna oznaka: 10 µm.

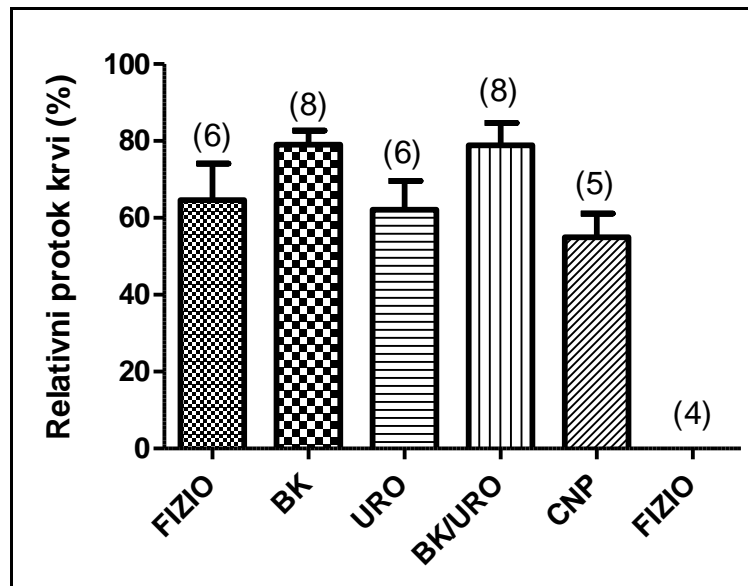
Skupini životinja kojoj je administriran natriuretski peptid C-tip 24 sata nakon izazivanja ishemijskog oštećenja stanice normalne morfologije mogle su se uočiti u području kore mozga te prugastog tijela kontralateralne moždane polutke (Slika 10B, D). Područje ipsilateralne moždane kore te ipsilateralnog prugastog tijela bilo je neuredne histološke građe. Uz edematozno tkivo svjetlije boje uočene su patološke promjene morfologije neurona u obliku malih nekrotičnih trokutastih stanica s piknotičnim jezgrama (Slika 10A, C).



**Slika 10.** Učinak tretmana natriuretskim peptidom tipa C na morfologiju stanica mozga miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO). Usporedba frontalnih rezova ipsilateralne (A) i kontralateralne kore velikog mozga (B) te ipsilateralnog (C) i kontralateralnog prugastog tijela (D) istog mišjeg mozga histološki obojanih po Nisslu. U područjima zahvaćenima ishemijskom lezijom (A, C) vidljive su patološke promjene povećanog gubitka neurona (zvijezda) i piknoze (promijenjene morfologije neurona u smanjene stanice trokutastog oblika zbog kondenzacije citoplazme i karioplazme; strelica) u usporedbi sa područjima kore (B) i prugastog tijela (D) kontralateralne (zdrave) moždane polutke. Mjerna oznaka: 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4. Praćenje protoka krvi u mozgu prilikom izvođenja MCAO zahvata

Kako bi se utvrdio pravilan položaj monofilamenta u središnjoj moždanoj arteriji te pratile promjene u lokalnom relativnom protoku krvi u mozgu miševa za vrijeme 60 minutnog začepljenja središnje moždane arterije korišten je laserski doppler. Začepljenje središnje moždane arterije za posljedicu je imalo pad ipsilateralnog relativnog protoka krvi u području središnje moždane arterije za 60 do 80% (Slika 11). Nakon 60 minutnog začepljenja središnje moždane arterije vađenjem monofilamenta omogućena je reperfuzija kako bi se ponovo uspostavio normalan protok krvi područja opskrbe ipsilateralne središnje moždane arterije.



**Slika 11.** Postotak lokalnog relativnog protoka krvi u mozgu miševa za vrijeme 60 minutnog začepljenja središnje moždane arterije mjereno laserskim dopplerom. Životinje kod kojih je izveden MCAO zahvat i pritom mjereno relativni protok krvi tretirane su fiziološkom otopinom (FIZIO), bradikininom (BK), urodilatinom (URO), mješavinom urodilatina i bradikinina (BK/URO) i natriuretskim peptidom tipa C (CNP). Jedna skupina životinja bila je lažno operirana. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. (n) označava broj miševa.

## 5. RASPRAVA

Jedan od osnovnih ciljeva ovog istraživanja bio je razjasniti učinak bradikinina, natriuretskih peptida i njihovog međudjelovanja na stupanj neurološkog oštećenja, veličinu ishemijske lezije te moždani edem u miševa divljeg tipa. Kako bi se ostvario ovaj cilj korišten je mišji model ishemijske ozljede mozga koji je višestruko korišten u pretkliničkim studijama za istraživanja mehanizama nastanka moždanog udara i mogućih terapija. Za izazivanje ishemijske ozljede mozga korištena je unilateralna intraluminalna okluzija srednje moždane arterije, zbog toga što taj životinjski model vjerno odražava oštećenje mozga koje nastaje nakon moždanog udara kod ljudi (71, 72).

Rezultati ovog istraživanja pokazuju da bolusna aplikacija bradikinina dovodi do nakupljanja vode u ozlijeđenoj moždanoj hemisferi uz neznatno povećanje moždanog edema i volumena ishemijske lezije u odnosu na kontrolne miševe koji su tretirani fiziološkom otopinom, što potvrđuju i dosadašnja istraživanja na životinjskim modelima moždanog udara. Postojanje svih komponenti kalikrein-kininskog sustava kako u zdravom ljudskom mozgu tako i u moždanom tkivu nakon ishemijske ozljede mozga upućuje na njihovu ključnu ulogu kako u fiziološkim tako i u patološkim uvjetima (73, 74, 75). Prema posljednjim istraživanjima mehanizam prema kojem bi bradikinin mogao posredovati u ishemijskom oštećenju mozga uključuje aktivaciju B<sub>2</sub> receptora, utječući na povećanje permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilataciju te nastanak edema (76, 77). Uloga bradikininskih receptora B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R u fiziološkim uvjetima nije poznata, međutim pokazana je njihova višestruka uloga u patologiji ishemijske ozljede mozga (75). Kod knockout miševa receptora B<sub>2</sub>R nakon ishemijske ozljede mozga dolazi do smanjenog razvitka moždanog edema i značajnije bržeg oporavka nastalog neurološkog deficita (75). Korištenje različitih inhibitora bradikininskog receptora B<sub>2</sub> u postishemijskoj ozljedi mozga dokazano dovodi do smanjenja moždanog edema, volumena lezije te značajnog poboljšanja neurološkog ishoda u životinjskim modelima (70, 78). Jednako tako, uključujući i ovo istraživanje, koristeći natriuretske peptide kao antagoniste bradikininskog receptora B<sub>2</sub> potvrđen je učinak B<sub>2</sub>R u razvoju moždanog edema koji nastaje nakon reperfuzije začepljene središnje moždane arterije.

Kako je za natriuretske peptide agoniste gvanilat ciklaze A pokazano da u *in vitro* uvjetima inhibiraju bradikininski receptor tipa 2, u ovom istraživanju istražen je učinak urodilatina na razvoj moždanog edema nakon ishemijske ozljede mozga miša (48). Učinak

natriuretskih peptida u mozgu u fiziološkim i patološkim uvjetima je slabo istraživano. Moguća uloga natriuretskih peptida u ishemijskoj ozljedi mozga poduprijet je s dvije nedavne studije koje su ukazale na utjecaj poremećene funkcije ANP-a koji uz neadekvatnu funkciju GC-A receptora dovodi do povećanog rizika od moždanog udara u ljudi (65, 66). Također je poznato da kod osoba s moždanim udarom dolazi do povećanja koncentracije ANP-a u plazmi koje ostaju povišenih vrijednosti i do tjedan dana nakon inzulta (79).

Bubrežna izoforma atrijskog natriuretskog peptida, urodilatin, izabran je za ovo istraživanje zbog specifične strukture sa izduženim N-terminalnim krajem koja ga čini otpornijim na enzimatsku aktivnost neutralnih endopeptidaza. Za urodilatin je pokazano da pri dugotrajnim intravenoznim infuzijama u dozama manjim od 15 ng/kg/min ne uzrokuje nuspojave, čime se opravdalo korištenje opetovanih aplikacija urodilatina u malim bolusnim dozama (80). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da primjena urodilatina u tri bolusne doze u mišjem MCAO modelu moždanog udara ima protektivan učinak. Primjena urodilatina utjecala je na promjene u neurološkoj funkciji koje bi upućivale na simptome oštećenja koji nastaju kao posljedica moždanog udara. Nijedna od životinja kod kojih je začepljena središnja moždana arterija, a primijenjen urodilatin, nije imala vidljivih znakova patoloških promjena morfologije tkiva. Postotak moždanog edema kod životinja tretiranih ovim natriuretskim peptidom bio je neznatno veći od onog izmjerenog u skupini lažno operiranih miševa. Mehanizam kojim bi urodilatin mogao posredovati u pokazanom neuroprotektivnom učinku na razvoj moždanog edema nije u potpunosti razjašnjen, međutim hipoteza koja je postavljena ovim istraživanjem je da posreduje inhibicijskim djelovanjem na bradikininski B<sub>2</sub>R signalni sustav.

Kako bismo istražili je li neuroprotektivan učinak urodilatina posredovan inhibicijom bradikininskog signalnog sustava, primijenjen je bolus mješavine urodilatina i bradikinina, čime je pokazano da se neurološko oštećenje pojavljuje u značajno manjem broju životinja u odnosu na životinje kojima je apliciran samo bradikinin ili fiziološka otopina. Također, kod životinja kojima su aplicirana oba peptida volumen lezije bio je značajno smanjen uz značajno smanjen postotak moždanog edema. Rezultati korištenja oba peptida ukazala su na to da urodilatin djeluje ne samo na endogeni postreceptorski signalni sustav bradikinina, već i na egzogeno dodani bradikinin.

Nadalje kao potvrdu neuroprotektivnog djelovanja urodilatina posredstvom međudjelovanja postreptorskog signalnog sustava GC-A i postreptorskog signalnog sustava bradikininskog B<sub>2</sub> receptora korišten je natriuretski peptid tip-C agonist GC-B receptora u malim bolusnim dozama. Primjenom CNP-a pokazano je da su sve tretirane životinje imale značajno neurološko oštećenje u odnosu na životinje kod kojih je primijenjen urodilatin. Također je kod svih tretiranih životinja uočena promjena u morfologiji tkiva ipsilateralne hemisfere kao odraz edematoznog ishemijskog zahvaćenog tkiva, sa značajnim povećanjem ipsilateralne ishemijske polutke mozga u odnosu na urodilatinom tretiranu skupinu životinja.

Razna istraživanja uključujući i ovo ukazuju na ulogu bradikininskog receptora B<sub>2</sub> u razvoju oštećenja mozga nakon ishemijske (70, 75, 78, 81), međutim točan mehanizam posredovanja B<sub>2</sub>R je još uvijek nepoznat. Dosadašnje spoznaje objašnjavaju mehanizam neuroprotekcije inhibicijom bradikininskog B<sub>2</sub> receptora redukcijom vaskularne permeabilnosti čime se posljedično smanjuje moždani edem i volumen tkiva koji bi bio zahvaćen ishemijskom lezijom (22, 32, 82, 83, 84). Također, dosadašnja istraživanja govore u prilog protektivnoj ulozi natriuretskih peptida i gvanilat ciklaze A u mozgu, idući u prilog ovom radu u kojem je pokazano djelovanje urodilatina na bradikininski signalni put nakon ishemijske ozljede mišjeg mozga. Natriuretski peptid urodilatin korišten kao antagonist bradikininskog signalnog sustava utjecao je kako na endogeni tako i na egzogeno apliciran bradikinin, utječući pritom na ishod neurološkog oštećenja očekivanog nakon privremene okluzije srednje moždane arterije, na razvoj ishemijske lezije te posljedično i na moždani edem. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje prirodnog antagonizma bradikininskog signalnog sustava. Daljnje istraživanje uloge ovog međudjelovanja u patološkim zbivanjima koja slijede nakon ishemijskog oštećenja mozga pridonijet će pronalasku novih terapijskih strategija liječenja moždanog udara.



## 6. ZAKLJUČCI

Istraživanjem djelovanja natriuretskih peptida na signalni sustav bradikinina te učinka njihovog međudjelovanja na ishemijsku ozljedu mišjeg mozga zaključeno je sljedeće:

1. Važna uloga bradikininskog signalnog sustava, posebice bradikininskog receptora B<sub>2</sub>, u ishemijskoj ozljedi mozga, poduprijeta je s nekoliko različitih istraživanja, uključujući i u ovom istraživanju pokazanim povećanjem moždanog edema i volumena lezije kod aplikacije bradikinina u MCAO modelu moždanog udara.

2. Protektivna uloga natriuretskih peptida u ishemijskoj ozljedi mozga prikazana je primjenom urodilatina koji je u primijenjenim dozama u MCAO modelu moždanog udara utjecao na nastanak kako ishemijske lezije i moždanog edema tako i na promjene u neurološkom statusu.

3. Primjenom urodilatina u mješavini s bradikininom promijenjen je ishod neurološkog oštećenja te značajno smanjen moždani edem i volumen lezije, upućujući na djelovanje urodilatina ne samo na endogeni već i na egzogeno apliciran bradikinin, putem djelovanja na postreptorski signalni sustav bradikinina.

## 7. SAŽETAK

Prekid opskrbe mozga krvlju zbog začepjenja moždanih arterija dovodi do moždanog udara te posljedično do moždanog edema koji pridonosi povećanju ishemijske ozljede. Vazogeni peptidi bradikinin i natriuretski peptidi imaju važnu ulogu u razvoju moždanog edema nakon ishemijskog moždanog udara. Cilj ovog istraživanja bio je razjasniti učinak natriuretskih peptida, bradikinina te njihovog međudjelovanja u događajima koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga. U *in vivo* pokusima na mišjem modelu moždanog udara pokazali smo da intravenska primjena urodilatina sprječava nastanak ishemijske lezije mozga s posljedičnim moždanim edemom, a koje smo određivali mjerenjem stupnja neurološkog oštećenja te mjerenjem volumena ishemijske lezije i postotka moždanog edema, kao i patohistološkom analizom na serijskim rezovima mozгова histološki bojenima po Nisslu. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na postojanje prirodnog antagonizma bradikininskog receptora tipa 2 te moguću primjenu natriuretskih peptida u liječenju moždanog udara.

## 8. SUMMARY

Reduction in blood flow to the brain caused by the occlusion of cerebral arteries leads to stroke and consequential brain edema formation, which further increases the size of ischemic lesion. Vasogenic peptides bradykinin and natriuretic peptides play an important role in the formation of cerebral edema after ischemic stroke. The aim of this research was to clarify the possible effects of natriuretic peptides, bradykinin and their interactive effects on edema formation after ischemic brain injury. The *in vivo* experiments on a mouse model of stroke showed that urodilatin inhibited the formation of the ischemic lesion and brain edema, which was measured by neurological scoring, volumetric analysis of the ischemic lesion and brain edema along with patohistological analysis of serial Nissl stained sections. The results of this research show the existence of a natural antagonism of the bradykinin receptor type 2, and imply the possible use of natriuretic peptides in treatment of stroke.

## 9. LITERATURA

1. Thrift AG, Cadilhac DA, Thayabaranathan T i sur. Global stroke statistics. *Int J Stroke* 2014;9:6-18.
2. Demarin V, Lovrenčić-Huzjan A, Šerić V, Vargek-Solter V, Trkanjec Z, Vuković V, Lupret V, Kalousek M, Desyo D, Kadojić D, LUŠIĆ I, DIKANOVIĆ M, Vitas. Recommendations for Stroke Management. *Acta Clin Croat*. 2001; 40:127-54.
3. Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, SANDERCOCK P, Stroke. *Lancet* 2003;362: 1211-24.
4. Tomek-roksandić S. Stroke in older age groups. *Acta Clin Croat* 1999; 38:26-27.
5. Wang G, Zhang Z, Ayala C, Dunet DO, Fang J, George MG. Costs of hospitalization for stroke patients aged 18-64 years in the United States. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2014;23:861-8.
6. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F i sur. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011;21:718-779.
7. Fang J, Keenan NL, Ayala C, Dai S, Merritt R, Denny CH. Awareness of stroke warning symptoms—13 states and the District of Columbia, 2005. *MMWR* 2008;57:481–5.
8. Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS i sur. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015;131:29-322.
9. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*. 1999;22:391-7.
10. Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008;371:1612–23.
11. Guercini F, Acciarresi M, Agnelli G, Paciaroni M. Cryptogenic stroke: time to determine aetiology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2008;6: 549–54.
12. Elkind MS. Inflammatory mechanisms of stroke. *Stroke* 2010;41:3-8.
13. Hademenos GJ. The biophysics of stroke. *Am Scientist*. 1997;85:226-235.
14. Woolf N, Davies MJ. *Arterial plaque and thrombus formation*. *Sci Am Science & Medicine*. 1994;1:38-47.
15. Hickey, JV. *The clinical practice of neurological and neurosurgical nursing*. 5. izd. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2003.

16. Warlow C, Dennis M, van Gijn i sur. Stroke: A practical guide to management. 2. izd. London: Blackwell Science; 2001.
17. Bader MK. AANN core curriculum for neuroscience nursing. 4. izd. St. Louis: Elsevier; 2004.
18. APASS Investigators. Antiphospholipid Antibodies and Subsequent Thrombo-occlusive Events in Patients With Ischemic Stroke. *JAMA* 2004;291:576–584.
19. Blank-Reid C. How to have a stroke at an early age: The effects of crack, cocaine and other illicit drugs. *J Neurosci Nurs*. 1996;28:19–27.
20. Fishman RA. Cerebrospinal Fluid in Diseases in the Nervous System. 2. izd. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Co; 1992, str. 103-155.
21. Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 12. izd. London: Elsevier; 2010.
22. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129:1021-1029.
23. Klatzo I. Blood–brain barrier and ischaemic brain oedema. *Z Kardiol* 1987;76:67-69.
24. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:367-378.
25. Chen M, Simard JM. Cell swelling and a nonselective cation channel regulated by internal Ca<sup>2+</sup> and ATP in native reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci* 2001;21:6512-21.
26. Stiefel MF, Marmarou A. Cation dysfunction associated with cerebral ischemia followed by reperfusion: a comparison of microdialysis and ion-selective electrode methods. *J Neurosurg* 2002;97:97-103.
27. Young W, Constantini S. Ionic and water shifts in injured central nervous tissues. In: Salzman SK, Faden AI, editors. *The Neurobiology of Central Nervous System Trauma*. Oxford University Press, New York; 1994, str. 123–130.
28. Young W, Rappaport ZH, Chalif DJ, Flamm ES. Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke* 1987;18:751-759.

29. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 2007;6:258-268.
30. Betz AL, Iannotti F, Hoff JT. Brain edema: a classification based on blood–brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1989;1:133-154.
31. Ahmmed GU, Malik AB. Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflugers Arch* 2005;451:131-42
32. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young, AR. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 1996;33:257-263.
33. Agostoni A, Cugno M. The kinin system: biological mechanisms and clinical implications. *Recenti Prog Med.* 2001;92:764–773.
34. Bhoola KD, Figuerola CD, Wothy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80
35. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2001;429:161-76.
36. Sainz IM, Pixley RA, Colman RW. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost* 2007;98:77-83.
37. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006;103:903-8.
38. Brash JL, Scott CF, ten Hove P, Wojciechowski P, Colman RW. Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: role of the contact and fibrinolytic systems. *Blood* 1988;71:932-939.
39. Dendorfer A, Wolfrum S, Wagemann M, Qadri F, Dominiak P. Pathways of bradykinin degradation in blood and plasma of normotensive and hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;280:2182–2188.
40. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;278:1069–1074.

41. Hall JM. Bradykinin receptors. *Gen Pharmacol*. 1997;28:1–6.
42. Shughrue PJ, Ky B, Austin CP. Localization of B1 bradykinin receptor mRNA in the primate brain and spinal cord: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol*. 2003;465:372–384.
43. Raidoo DM, Bhoola KD. Kinin receptors on human neurones. *J Neuroimmunol*. 1997;77:39–44.
44. Zubakova R, Gille A, Faussner A, Hilgenfeldt U. Ca<sup>2+</sup> signalling of kinins in cells expressing rat, mouse and human B1/B2-receptor. *Int Immunopharmacol* 2008;8:276-281.
45. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
46. Wirth KJ, Heitsch H, Scholkens BA. Kinin receptor antagonists: unique probes in basic and clinical research. *Can J PhysiolPharmacol*. 1995;73:797–804.
47. Heitsch H. The therapeutic potential of bradykinin B2 receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12:759–770.
48. Dobrivojević M, Sindić A, Edemir B, Kalweit S, Forssmann WG, Hirsch JR. *Am J Physiol Cell Physiol*. Interaction between bradykinin and natriuretic peptides via RGS protein activation in HEK-293 cells. 2012;303:1260-1268.
49. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide ( $\alpha$ -hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:131-139.
50. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K i sur. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest*. 1991; 87:1402–1412.
51. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr*. 1988;66:752-9.
52. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990;168:863-70.

53. Oikawa S, Imai M, Ueno A i sur. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature*. 1984;309:724-6.
54. Forssmann W.G. Cardiac hormones. I. Review on the morphology, biochemistry, and molecular biology of the endocrine heart. *Eur J Clin Invest* 1986;16:439-451.
55. Seilhamer JJ1, Arfsten A, Miller JA i sur. Human and canine gene homologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165:650-8.
56. Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S et al. (1991). "Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide". *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 175 (2): 645-51.
57. Charles CJ, Espiner EA, Nicholls MG i sur. Clearance receptors and endopeptidase 24.11: equal role in natriuretic peptide metabolism in conscious sheep. *Am J Physiol* 1996;271:373-380.
58. Schirger JA, Grantham JA, Kullo IJ i sur. Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by atherosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35:796-801.
59. Gee NS, Bowes MA, Buck P, Kenny AJ. An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. *Biochem J*. 1985;228:119-126.
60. Hirose S, Hagiwara H, Takei Y. Comparative molecular biology of natriuretic peptide receptors. *Can. J. Physiol. Pharmacol*. 2001;79: 665-72.
61. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci*. 2005;10:1205-20.
62. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989;338:78-83.
63. Koller KJ, Goeddel DV. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. *Circulation* 1992;86:1081-1088.
64. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews* 2006;27:47-72.
65. Rubattu S, Ridker PM, Stampfer M, Hennekens CH, Volpe M, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation* 1999;100:1722-6.



66. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E i sur. Atrial Natriuretic Peptide Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Humans. *Stroke* 2004;35:814-8.
67. Longa, EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91.
68. Shah ZA, Namiranian K, Klaus J, Kibler K, Doré S. Use of an optimized transient occlusion of the middle cerebral artery protocol for the mouse stroke model. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15:133-8.
69. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995;26:627-34.
70. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1997;28:1430-6.
71. Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces highreproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 2009;58:19-29.
72. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computedtomography. *BMC Neurol* 2010;28:10-36.
73. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD. Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 1996;32:39-47.
74. Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* 1985;44:1892-7.
75. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, Plesnila N. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:978-89.
76. Sobey C-G. Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *Br J Pharmacol* 2003;139:1369-71.
77. Zausinger S. Bradykinin receptor antagonists in cerebral ischemia and trauma. *IDrugs* 2003;6:970-5.

78. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Therapeutical efficacy of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir* 2003;86:205-7.
79. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Fernández Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens* 1994;7:1085-9.
80. Dorner GT, Selenko N, Kral T, Schmetterer L, Eichler HG, Wolzt M. Hemodynamic effects of continuous urodilatin infusion: a dose-finding study. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:322-30.
81. Ding-Zhou L, Margail I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C: LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 2003;139:1539-47.
82. Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, Eriskat J, Pruneau D, Baethmann A. Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 2001;18:1049-58.
83. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 1956;4:85-90.
84. Go KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg* 1997;23:47-142.

## **10. BIOGRAFIJA**

Sven Šimunić rođen je 10. kolovoza 1990. godine u Zagrebu. Osnovnu školu, kao i prirodoslovno matematičku gimnaziju u Klaićevoj, završio je u Zagrebu. 2009. godine upisao je studij medicine, smjer doktor medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Aktivan je član kardiološke sekcije pri Medicinskom fakultetu u Zagrebu od njenog osnutka 2012. godine, gdje kao jedan od voditelja i članova organizacijskog odbora sekcije sudjeluje u radu i aktivnostima sekcije. Sudjelovao je u nastavi iz predmeta „Pedijatrija“ na diplomskom studiju medicine Medicinskog fakulteta u Zagrebu kao demonstrator.