

# Djelovanje dušik (II) oksida na propusnost krvno-moždane barijere u šarana (Cyprinus carpio L.)

---

**Kovačić, Sanja**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2011**

*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:105:888241>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-24**



*Repository / Repozitorij:*

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





## Središnja medicinska knjižnica

**Kovačić, Sanja (2011) *Djelovanje dušik (II) oksida na propusnost krvno-moždane barijere u šarana (Cyprinus carpio L.) [Role of nitric oxide on blood-brain permeability in common carp (Cyprinus carpio L.)]*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.**

<http://medlib.mef.hr/977>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET

**Sanja Kovačić**

**Djelovanje dušik (II) oksida  
na propusnost krvno-moždane barijere  
u šarana (*Cyprinus carpio* L.)**

**DISERTACIJA**

Zagreb, 2011.

Doktorska disertacija izrađena je u Zavodu za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Dio istraživanja učinjen je u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Zavodu za patologiju Opće bolnice Zabok.

**Voditelji rada:** prof. dr. sc. Zdravko Petrinec, prof. dr. sc. Lada Rumora

## ZAHVALA

Zasigurno se ne bih mogla nositi sa svim teškoćama povezanim s ovim istraživanjem da nije bilo profesionalne, ali i ljudske podrške mnogobrojnih kolega, prijatelja i suradnika. Njihovi su intelektualni poticaji u svim fazama rada bili doista nemjerljivi te im stoga u ovoj prigodi želim iskazati najdublju zahvalnost.

To se ponajprije odnosi na mojeg mentora prof. dr. sc. Zdravka Petrinca sa Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje je i nastao temeljni dio istraživanja ovog rada. Osim intelektualno poticajnoga radnog okruženja Zavoda, stručni savjeti, komentari, sugestije i kritike profesora Petrinca bili su mi više nego dragocjeni. Posebnu zahvalnost dugujem svojoj sumentorici, prof. dr. sc. Ladi Rumora iz Zavoda za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, koja mi je, iznimnim smislom za interdisciplinarni dijalog, dala dragocjene savjete u svezi s postavom istraživanja, izradom rada i doradom rukopisa disertacije.

Od neprocjenjive mi je pomoći bila mudrost i velikodušna pomoć pedijatrice i kliničke genetičare prof. dr. sc. Nine Canki-Klain s Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, koja je svesrdno pomagala u rješavanju mojih znanstvenih, stručnih i praktičnih nedoumica i zapreka koje su mi se u pojedinim trenucima činile nepremostivima. Velika hvala i prof. dr. sc. Milošu Judašu, koji mi je pružio veliku pomoć sugestijama na području neuroanatomije i komparativne anatomije.

Veliki doprinos u nastanku ove disertacije imala su i stručna znanja i kompetencije brojnih kolegica i kolega te prijateljica i prijatelja koji nisu štedjeli ni truda ni vremena da mi pomognu. Među njima ponajprije valja spomenuti dragu prijateljicu Gordanu Husinec, vet. tehničara, i dr. vet. med. Emila Gjurčevića sa Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kojima dugujem veliku zahvalnost što su sa

mnom nesebično podijelili svoje teorijsko poznavanje anatomije i fiziologije šarana kao i praktične vještine izvođenja pokusa na tom životinjskom modelu.

Srdačno zahvaljujem i sljedećim kolegama i prijateljima koji su također dali važan obol u nastanku ove disertacije: svojoj nezaobilaznoj znanstvenoj suradnici doc. dr. sc. Maji Šegvić Klarić sa Zavoda za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, med. lab. ing. Aniti Siketić i Valentini Vrlec, dr. med. Cvjetku Ležu sa Zavoda za Patologiju u OB Zabok, dr. med. Goranu Ivkiću iz Hrvatskog Instituta za istraživanje mozga, prim. dr. med. Višeslavu Čuku sa Zavoda za otorinolaringologiju OB Zabok te prof. dr. sc. Arijani Lovrenčić-Huzjan s Klinike za neurologiju KB Sestre Milosrdnice.

Veliku zahvalnost dugujem knjižničarkama Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb, posebno gospođi Sofiji Herceg, koja je uvijek spremno i uslužno pronalazila sve tražene članke.

Posebnu zahvalnost dugujem prof. dr. sc. Stjepanu Pepeljnjaku, koji je bio mentor mojeg magistarskog rada i koji me usmjerio i potaknuo na znanstveni rad te na taj način umnogome utjecao na moje buduće profesionalno opredjeljenje.

Najveću potporu u radu uvijek su mi pružali moji najbliži. Njihovu strpljenju, ljubavi i razumijevanju dugujem svoja postignuća. To se ponajprije odnosi na mojeg supruga Brunu, mojeg najboljeg kritičara. Najvažniji poticaj i trajno nadahnuće moja je kći Nika. Njezina životna radost, radoznalost i dječja mudrost neprestano me potiču na stjecanje novih znanja.

## POPIS KRATICA I SIMBOLA

KBC	klinički bolnički centar
OB	opća bolnica
NO	dušik (II) oksid
EDRF	relaksirajući čimbenik iz endotela (engl. <i>endothelium-derived relaxing factor</i> )
GTN	gliceriltrinitrat
n.	živac (lat. <i>nervus</i> )
JAM	vezna adhezijska molekula (engl. <i>junctional adhesion molecule</i> )
ZO-1	čvrsti spoj 1 (lat. <i>zonula occludens 1</i> )
ZO-2	čvrsti spoj 2 (lat. <i>zonula occludens 2</i> )
ZO-3	čvrsti spoj 3 (lat. <i>zonula occludens 3</i> )
ASIP	protein koji stupa u interakciju s atipičnom proteinskom kinazom C (engl. <i>atypical protein kinase C isotype-specific interacting protein</i> )
AF6	afadin 6
VAP-33	protein 33 usmjeren ka vezikulama (engl. <i>vesicle targeting protein 33</i> )
ZAK	kinaza povezana s čvrstim spojem (engl. <i>sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase</i> )
ZONAB	transkripcijski čimbenik koji se veže na nukleinske kiseline, a povezan je s čvrstim spojem 1 (engl. <i>ZO-1-associated nucleic acid binding protein</i> )
PKC	proteinska kinaza C
SŽS	središnji živčani sustav
ATP	adenozin trifosfat
MIP-2	makrofagni upalni protein 2 (engl. <i>macrophage inflammatory protein 2</i> )
TNF- $\alpha$	čimbenik tumorske nekroze $\alpha$ (engl. <i>tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
IL- $\beta$	interleukin $\beta$
AQ-4	akvaporin 4 (engl. <i>aquaporin 4</i> )

BBB	krvno-moždana barijera (engl. <i>blood-brain barrier</i> )
cGMP	ciklički gvanozin monofosfat
MMP	metaloproteinaza matriksa (engl. <i>matrix metalloproteinase</i> )
NOS	sintaza dušikova oksida (engl. <i>nitric oxide synthase</i> )
cNOS	konstitutivna NOS
iNOS	inducibilna NOS
eNOS	endotelna NOS
nNOS	neuronska NOS
NF-κB	nuklearni čimbenik κB (engl. <i>nuclear factor κB</i> )
AP-1	aktivirani protein 1
X	aritmetička sredina
SEM	standardna pogreška aritmetičke sredine (engl. <i>standard error of the mean</i> )
n	broj uzoraka
IQR	interkvartilni raspon (engl. <i>interquartile range</i> )
Q	kvartile (engl. <i>quartiles</i> )
<i>C. carpio</i>	šaran (lat. <i>Cyprinus carpio</i> )
<i>C. auratus</i>	zlatni karas (lat. <i>Carassius auratus</i> )



# SADRŽAJ

<b>ZAHVALA</b>	3
<b>POPIS KRATICA I SIMBOLA</b>	5
<b>1. UVOD</b>	9
1.1. Živčani sustav koštunjača	10
1.1.1. Komparativna neurobiologija i evolucija mozga riba	13
1.2. Krvno-moždana barijera	15
1.2.1. Komparativna neurobiologija i evolucija krvno-moždane barijere u riba	16
1.2.2. Funkcija i važnost krvno-moždane barijere	18
1.3. Biološka uloga i važnost dušik (II) oksida	19
1.3.1. Uloga dušik (II) oksida u mijenjanju propusnosti krvno-moždane barijere	20
1.3.2. Gliceriltrinitrat kao donor dušik (II) oksida	22
1.3.3. Uloga i važnost NO u teleosta	22
<b>2. CILJEVI I SVRHA RADA</b>	24
2.1. Očekivana korist od rezultata istraživanja	26
<b>3. MATERIJALI I METODE</b>	27
3.1. Pokusne životinje	27
3.2. Određivanje koncentracije serumskih nitrita, nitrata i ukupnih nitrita i nitrata	27
3.3. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evan plavila	28
3.3.1. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na makroskopskom preparatu mozga šarana	28
3.3.2. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na mikroskopskom preparatu mozga šarana	29

3.4. Utvrđivanje moždanog edema gravimetrijskom metodom	29
3.5. Utvrđivanje moždanog edema i vazodilatacije na hemalaun-eozin obojenim preparatima mozga pod svjetlosnim mikroskopom	30
3.6. Obrada podataka	30
<b>4. REZULTATI</b>	<b>32</b>
4.1. Rezultati određivanja koncentracije serumskih nitrita, nitrata i ukupnih nitrita i nitrata	32
4.1.1. Ukupna koncentracija serumskih nitrita i nitrata	32
4.1.2. Koncentracija serumskih nitrata	34
4.1.3. Koncentracija serumskih nitrita	36
4.1.4. Udjel nitrata i nitrita u ukupnim nitratima i nitritima	38
4.2. Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evans plavila	40
4.2.1. Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na makroskopskom preparatu mozga šarana	40
4.2.2. Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na mikroskopskom preparatu mozga šarana	43
4.3. Rezultati utvrđivanja moždanog edema gravimetrijskom metodom	44
4.4. Rezultati utvrđivanja moždanog edema i vazodilatacije na hemalaun-eozin obojenim preparatima mozga pod svjetlosnim mikroskopom	45
4.5. Utvrđivanje povezanosti ispitivanih varijabli	47
4.5.1. Povezanost koncentracije nitrata i nitrita sa stupnjem obojenosti Evansovim plavilom	47
4.5.2. Povezanost koncentracije nitrata i nitrita s udjelom mokre tvari u mozgu	48
4.5.3. Povezanost stupnja obojenosti Evansovim plavilom s udjelom mokre tvari	48
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>50</b>
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	<b>55</b>
<b>7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU</b>	<b>56</b>
<b>8. SAŽETAK I NASLOV NA ENGLESKOM JEZIKU</b>	<b>58</b>
ROLE OF NITRIC OXIDE ON BLOOD-BRAIN PERMEABILITY IN COMMON CARP ( <i>Cyprinus carpio L.</i> )	58
<b>9. POPIS LITERATURE</b>	<b>60</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS AUTORICE</b>	<b>75</b>

## 1. UVOD

Engleski prirodoslovac, istraživač i putopisac Charles Darwin početkom 19. st. utemeljio je suvremeno shvaćanje evolucije tezom o biološkoj determiniranosti, prema kojoj je evolucija vrste trajan, progresivan i ireverzibilan proces koji gotovo uvijek vodi k sve većoj složenosti, odnosno usavršenosti organizma. Darwinova je teorija omogućila da se i čovjek smjesti u veliko drvo života, pokazujući njegovo mjesto u prirodi i povezanost sa svim drugim vrstama.

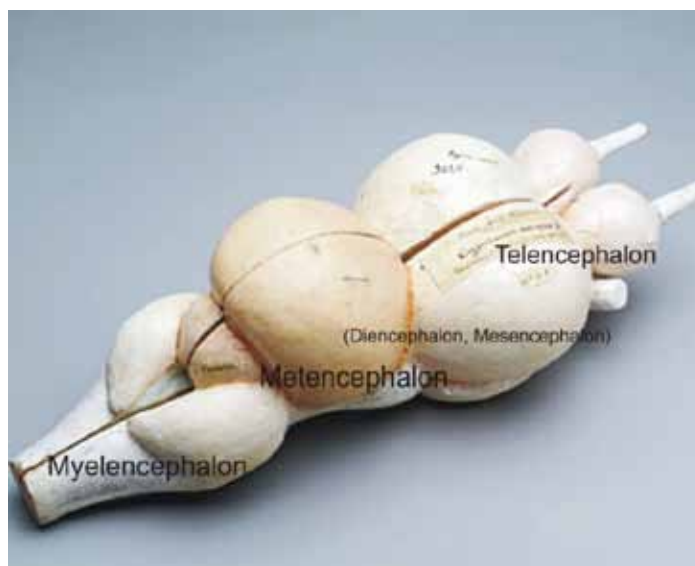
Kralježnjacima pripadaju životinje koje su svojom građom dosegle najviši stupanj u životinjskom svijetu. Sa stajališta evolucije životinjskog carstva to su najviše organizirane životinje, čiji se postupni razvoj može pratiti po pojedinim razredima tog potkoljena (plaštenjaci, bezlubanjci, kralježnjaci). Evolucija u toj skupini dovela je do snažnog razvoja živčanog sustava.

Voda je bila kolijevka života tijekom najvećeg dijela njezine 4,6 milijardi godina stare povijesti. Najraniji oblici života, jednostavna zbirka organskih spojeva, razvili su se i zadržali u vodi. Koštunjače (*Teleostei*) najbrojnija su skupina koštanih riba (*Osteichthy*) koja ima oko 25000 vrsta (1). To ih čini najbrojnijom skupinom kralježnjaka. Budući da su najranije koštunjače živjele davno prije najranijih kopnenih kralježnjaka, a također i zbog toga što se jedna skupina koštanih riba (*Sarcopterygii*) drži pretkom kopnenih kralježnjaka, koštane ribe, uključujući koštunjače, često se označavaju kao »primitivne«. S gledišta filogenetskog razvoja to nije sasvim točno jer su sve sada živuće vrste koštunjača imale mnogo više vremena za diferencijaciju i adaptaciju nego svi kopneni kralježnjaci.

Zbog svega navedenog, istraživanje središnjega živčanog sustava koštunjača potiče komparativni pristup u istraživanju, odnosno komparativnu, diferencijalnu neuroanatomiju i zoološku psihologiju, čime se ističe pristup filogenetske ekvivalencije.

## 1.1. Živčani sustav koštunjača

Mozak koštunjača anatomski se sastoji od 1) **velikog** ili **prednjeg mozga** (*telencephalon*), 2) **međumozga** (*diencephalon*), 3) **srednjeg mozga** (*mesencephalon*) i 4) **zadnjeg** ili **malog mozga** (*metencephalon, cerebellum*) te 5) **produžene moždine** (*myelencephalon, medulla oblongata*) (slika 1) (2, 3, 4).



**Slika 1. Model šaranskog mozga.**

Dijelovi mozga označeni u zagradi nisu vidljivi na modelu.

**Veliki** ili **prednji mozak** (*telencephalon*) riba razvijen je slabije od ostalih dijelova mozga (5). Na njemu razlikujemo dorzalno *pallium*, tanku epitelnu membranu koja odvaja prostor zajedničke moždane komore (*ventriculus communis*) od lubanjske šupljine te ventralni dio, *corpora striata* (6). *Corpora striata* sastoji se od dva dijela, dorzalnog i bazalnog dijela, koji čini kaudalni produžetak njušnog živca (*bulbus olfactorius*) (7). Prednji mozak je centar za njih.

**Međumozak** (*diencephalon*) je u većine riba malen i pokriven srednjim mozgom. Njegova je struktura prilično složena. Sastoji se od *epitalamusa*, *talamusa* i *hipotalamusa* (8, 9). Na epitalamusu se nalazi parni *ganglion habenulare* iznad ležeće epifize (*glandula pinealis*) (10). Pokraj epifize nalazi se žljezdasta paraepifiza (*glandula parapinealis*) (11, 12). U znatnog broja vrstâ ribâ epifiza ima utjecaj na pigmentne stanice i reakcije ribe na svjetlo i tamu (13). Ona je rudiment optičkog organa. Ispred talamusa nalazi se mjesto križanja

vidnog živca (*chiasma opticum*). Osobito je dobro razvijen hipotalamus, koji se sastoji od membrane (*infundibulum*) na koju se nastavlja hipofiza. Lateralno se nalaze donji režnjevi (*lobi inferiores*). Međumozak je tijesno povezan s hipofizom, i u njemu postoje mjesta kroz koje se obavlja sekrecija (14). Smatra se da međumozak vrši korelaciju dolazećih i odlazećih impulsa, posebice onih koji se odnose na endokrini sustav i autonomni živčani sustav (12).

**Srednji mozak** (*mesencephalon*) sastoji se od ventralnog dijela koji čini nastavak talamusa, a nastavlja se kaudalno u produženu moždinu (*basis* ili *tegmentum*) (15). Dorzalni dio (*tectum opticum*) podužom je brazdom podijeljen na dva režnja koji se nazivaju *lobi optici* ili *corpora bigemina* (8, 15). Ispod njih nalazi se *torus longitudinalis*, koji se kod nekih vrsta, primjerice šarana, može vidjeti kaudalno (16). Nakon križanja u optičkoj hijazmi većina vlakana vidnog živca završava u tektumu, centru za vid (4). Ovdje se stvara slika nakon prenošenja podražaja primljenih u oku. Iz baze izlaze dva moždana živca koji inerviraju oko i očne mišiće (*n. oculomotorius* i *n. trochlearis*). Srednje mozak je povezan sa svim okolnim dijelovima mozga.

Tektum riba nije povezan samo s funkcijama vida. Osim funkcije vida on provodi i koordinaciju informacija dobivenih ostalim osjetilima te na taj način utječe na kretanje i položaj (17).

**Zadnji** ili **mali mozak** (*metencephalon, cerebellum*) tvori kaudodorzalni dio mozga (4). Smješten je iznad produžene moždine. Sastoji se od tijela (*corpus cerebelli*) i postraničnih izbočina (*auriculae cerebelli*) koje su u sredini odvojene jednom dubokom brazdom. Mali mozak kranijalno ulazi ispod optičkog tektuma u treću moždanu komoru kao *valvula cerebelli*. Mali mozak ima istu građu kao kod sisavaca (18). Vanjski sloj tvore živčane stanice, a unutrašnji sloj živčana vlakna. Između ta dva sloja nalaze se Purkynčove stanice. Brojna aferentna i eferentna vlakna povezuju mali mozak s receptorima i efektorima. Mali mozak ima funkciju održavanja ravnoteže, odnosno usklađivanja pokreta, održava tonus mišića, regulira funkcionalnu sposobnost organa vida, sluha i dr. (19). Tijelo malog mozga povezano je s leđnom moždinom, a time i s osjetima i miškulaturom tijela. Postranične izbočine povezane su s vestibularnim aparatom i s organom bočne linije. Nedavna istraživanja pokazala su da je mali mozak teleosta prijeko potreban u klasičnom kondicioniranju motornih odgovora (20).

**Produžena moždina** (*myelencephalon, medulla oblongata*) povezuje mozak s leđnom moždinom, u koju prelazi bez jasne granice (21). Produžena moždina je kontinuirani nastavak bazalnog dijela srednjeg mozga u kaudalnom smjeru. Na dorzalnoj i ventralnoj strani na njoj

se nalaze mediane brazde. Dorzalna brazda kranijalno ograničuje četvrtu moždanu komoru (*fossa rhombidae*). Stranice ove komore su zadebljale, i u njima se nalaze jezgre X moždanog živca (*n. vagus*). Kranijalno od *lobi vagales* nalazi se parno zadebljanje u kojem je smješten centar za slušne živce (*lobi acustici*). Kod ciprinida i silurida *lobi vagales* posebno su razvijeni (22).

Kao i leđna moždina, produžena moždina ima dorzalne i ventralne korijene iz kojih izlazi 6 pari moždanih živaca. Preko njih produžena je moždina povezana s cijelim nizom osjetnih i ostalih organa tijela. Osim toga, kroz nju prolaze motorički i senzorni putovi između ostalih dijelova mozga i leđne moždine.

**Leđna moždina** (*columna vertebralis*) znatno je jače razvijena od mozga (23). Ona se nastavlja na produženu moždinu i seže do zadnjeg kralješka. Dorzalno i ventralno nalaze se udubljenja, *sulcus medianus dorsalis* i *fissura mediana ventralis*. U centru moždine u sivoj tvari smješten je centralni kanal obložen ependimskim stanicama. U centralnom kanalu nalazi se likvor. Leđna moždina sastoji se od sive i bijele tvari. Siva tvar nalazi se u unutrašnjosti moždine i tvori četiri roga, dva dorzalna (*columna dorsalis*) i dva ventralna (*columna ventralis*) iz kojih izlaze korijeni živaca (24). Živci imaju segmentalni raspored: iz svakog segmenta izlazi po jedan živac (25). Segmentalno raspoređeni dorzalni i ventralni živčani korijeni u riba spajaju se u jedan živac koji se dijeli na tri grane: *ramus dorsalis*, *ramus ventralis* i *ramus visceralis*. Dorzalna i ventralna grana segmentalno inerviraju kožu, mišiće i pigmentne stanice. Visceralna grana inervira unutrašnje organe i krvne žile te sudjeluje u stvaranju simpatičkoga živčanog sustava.

**Moždane komore** (*ventriculi*) su prostori ili šupljine u mozgu ispunjeni moždanom tekućinom (*liquor cerebralis*) (4). Zajednička komora (*ventriculus communis*) nalazi se u prednjem mozgu i sastoji se od dva dijela: prve i druge komore. Treća komora je razmjerno velika. Ona ulazi u sve izdanke međumozga, u *infundibulum*, *ascus vasculosum* i šupljine, *lobi inferiores*. Kaudalno se preko moždanog vodovoda povezuje s četvrtom komorom.

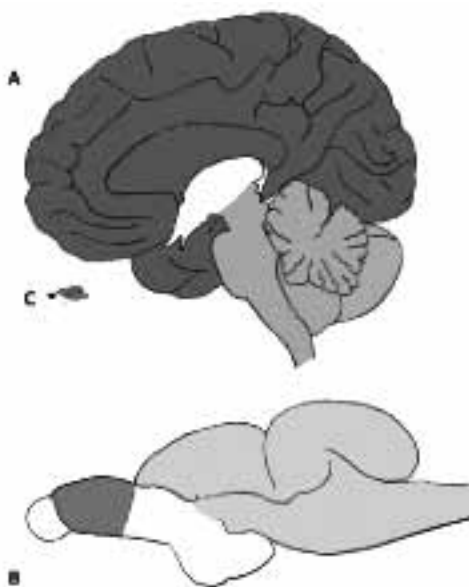
**Moždane ovojnice** (*meninges*) obavijaju cijeli mozak. Moždana ovojnica riba jednostavne je građe. Između ovojnice i periosta, odnosno perihondrija, nalazi se rastresito vezivno tkivo bogato masnim stanicama, perimeningealno tkivo (26).

Ribe imaju deset pari **moždanih živaca** (*n. olfactorius*, *n. opticus*, *n. oculomotorius*, *n. trochlearis*, *n. trigeminus*, *n. abducens*, *n. facialis*, *n. acusticus*, *n. glossopharyngeus*, *n. vagus*) (27, 28).

**Autonomni žičani sustav** dio je perifernog živčanog sustava i kod viših se kralježnjaka sastoji od simpatičkog i parasimpatičkog sustava. U koštunjača je parasimpatički sustav slabo razvijen i malo poznat.

### 1.1.1. **Komparativna neurobiologija i evolucija mozga riba**

Evoluciju kralježnjaka obilježava postupni razvoj živčanog sustava koji ide usporedno sa sve jače izraženim razvojem glavene regije. S osvajanjem kopnene sredine razvoj mozga je ubrzan, škržne pukotine postoje samo u zametku, repni predio postupno gubi svoje značenje, a parne peraje nadomještavaju udovi (autopodi), čiji se opći plan građe ne mijenja od vodozemaca pa sve do čovjeka (29) (slika 2). Svi kralježnjaci od vodozemaca nadalje su četveronošci.



**Slika 2. Usporedba ljudskog mozga i mozga pastrve (*Salmo trutta*).**

A. Ljudski mozak. Hemisfera velikog mozga označena je tamno sivo, a moždano deblo svijetlo sivo. B. Mozak pastrve. Hemisfera velikog mozga (tamno sivo) vrlo je mala u usporedbi s moždanim deblom (svijetlo sivo).

Regija označena bijelim je olfaktorni bulbus koji procesuirala informacije njuha. Olfaktorni bulbus u čovjeka relativno je malen. C. Usporedba veličine ljudskog mozga i mozga pastrve (31).

Evolucijski put riba razreda zrakoperki (*Actinopterygii*), među njima i koštunjača (*Teleostei*), tekao je odvojeno od evolucijskog puta kopnenih životinja (*Tetrapoda*) (30). Tijekom zasebne evolucije mozak koštunjača stekao je vrlo kompleksnu makroskopsku strukturu; neki dijelovi mozga nemaju ekvivalente u tetrapodnih kralježnjaka (primjerice *valvula cerebelli* i *torus longitudinalis*) ili imaju različit oblik, primjerice *telencephalon*, koji je podlegao tzv. »everzivnom« razvoju, za razliku od »inverzivnog« razvoja koji se uobičajeno nalazi u tetrapoda.

U viših kralježnjaka i čovjeka prednji mozak znatno je razvijeniji; u kori se nalaze živčane stanice, za razliku od koštunjača u kojih ne postoji siva tvar u homolognom dijelu (*pallium*) (32). Za ribe, koje se drže najprimitivnijim kralježnjacima i imaju slabo razvijen telecefalon, smatra se da imaju ograničene kapacitete učenja, međutim, novija razvojna, neuroanatomska i funkcionalna istraživanja ukazuju na to da je evolucija mozga i ponašanja mnogo više konzervirana nego što se to ranije mislilo. Eksperimentalni podatci upućuju na to da osobine i neuralna osnova učenja i pamćenja među teleostima i višim kralježnjacima pokazuju znatne sličnosti. Primjerice, lateralni telencefalički palij u teleosta, koji je homologan hipokampusu, selektivno je uključen u prostorno učenje i pamćenje, kao i u klasično kondicioniranje (6). Za razliku od njega, medijalni palij, koji se drži homolognim amigdalima, odgovoran je za emocionalno kondicioniranje teleostnih riba (33). *Neopallium* se prvi put pojavio u mozgu naprednih reptila kao što su krokodili (34). U mozgu sisavaca neopalij je znatno povećan i naziva se *neocortex*.

Tektum, multisenzorna i topološki mapirana struktura u kranijalnom dijelu srednjeg mozga primjer je važnog stupnja konzerviranosti u svih kralježnjaka (30). Svojstvo učenja, tj. stvaranje refleksa, u riba je povezano s tektumom srednjeg mozga koji obavlja jedan dio funkcija što ih u viših kralježnjaka obavlja kora velikog mozga.

Komparativna neurobiologija upućuje na to da se mali mozak najprije pojavio u riba kao specijalizirana struktura sustava lateralne linije, koja služi za orijentaciju organizma. Primitivne ribe, kao sljepulja i paklara, nemaju strukturu malog mozga. Za razliku od njih, koštunjače imaju dobro definiran mali mozak. U hrskavičnih riba prva se javlja struktura anatomske i funkcionalno slična malom mozgu sisavaca (35). Mali mozak ima istu građu kao kod sisavaca (36).

Struktura i funkcija leđne moždine u riba vrlo je slična onima u viših kralježnjaka (37).

Ribe imaju deset pari moždanih živaca, za razliku od sisavaca koji ih imaju dvanaest (27).

Moždana ovojnica riba jednostavne je građe, za razliku od viših kralježnjaka u kojih se ona diferencira u dvije do tri ovojnice (38).



## 1.2. Krvno-moždana barijera

Već prije više od 100 godina Paul Ehrlich (1885) zamijetio je da određene farmakološki aktivne molekule i boje injicirane u krvotok brzo difundiraju u većinu organa, s iznimkom središnjega živčanog sustava (SŽS) (39). Ehrlich je na temelju tih zapažanja ustvrdio da okolina središnjega živčanog sustava ima specijalizirana svojstva koja omogućuju selektivni ulazak samo određene frakcije cirkulirajućih čimbenika. Od toga se vremena pa do danas temeljni koncept funkcioniranja i uloge krvno-moždane barijere nije bitno promijenio. Krvno-moždana barijera membranska je struktura s primarnom ulogom zaštite središnjega živčanog sustava od potencijalno štetnih tvari koje se nalaze u krvi, uz istodobno propuštanje tvari koje su potrebne za fiziološke metaboličke funkcije. Prema suvremenim shvaćanjima, krvno-moždana barijera kontrolira tijek molekula između krvi i mozga (mozga, leđne moždine i retine), ali i pridonosi regulaciji (homeostazi) mikrokoliša mozga.

Krvno-moždana barijera najviše je istraživana u sisavaca. Svojstvo propusnosti te specifične stanične barijere u ljudskom mozgu u osnovi je regulirano kapilarnim endotelnim stanicama (40, 41). Te cerebralne kapilare inervirane su živčanim završetcima intracerebralnog ili ekstracerebralnog podrijetla (42). Različite komponente paracelularnih i transcelularnih putova zajedno upravljaju obiljem fizioloških osobina transportnog epitela kralježnjaka. Transcelularni putovi koriste se apikalnim i bazolateralnim transporterima/kanalima, vezanima za membranu, koji provode tvari kroz samu epitelnu stanicu, dok je paracelularna propusnost regulirana međustaničnom »gustoćom«, odnosno selekcijom molekula na temelju njihova naboja i veličine. Osobinama paracelularnog prolaza tvari ponajviše upravlja kompleks tijesnih veza (engl. *tight junctions*) koji je smješten između epitelnih stanica na najapikalnijoj regiji lateralne stanične membrane (43). Nagy i autori zaključili su da endotelne stanice moždanih kapilara imaju najkompleksnije čvrste spojeve od svih endotelnih kapilara u tijelu (44). Susjedne epitelne stanice oblikuju proteinske niti tijesnih veza koje prijanjaju jedna na drugu tvoreći polupropusnu barijeru. Osim toga, tijesne veze polariziraju epitelne stanice tako da okružuju apikalno-lateralnu regiju stanice i oblikuju »obrambeni zid« koji razdvaja apikalne i bazolateralne proteine vezane uz membranu. Kompleks tijesnih veza sastavljen je od integralnih transmembranskih proteina tijesnih veza, kao i perifernih proteina-podupirača tijesnih veza (43). Do danas je opisano više od 40 proteina tijesnih veza sisavaca. Dije se na integralne proteine (kludine, okludine i JAM) i periferne proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulin, simplekin, 7H6 antigen, AF6, ASIP, Sec6/8 kompleks, VAP-33, ZAK, ZONAB, Rab 3B, Rab 13,  $G\alpha_{12}$ , PKC i dr.) (45, 46). Drži se da postoji logaritamski odnos između

broja čvrstih spojeva i transcelularnoga električnog otpora (47). Također se drži da se kompleksnost čvrstih spojeva može koristiti kao parametar propusnosti (48).

Danas se zna da osim endotelnih stanica postoje još najmanje četiri druge stanične vrste koje također pridonose regulaciji propusnosti krvno-moždane barijere (41). Dokazano je da astrociti, neuroni i periciti, uz izvanstanični matriks, na određen način pridonose jedinstvenom fenotipu krvno-moždane barijere (49, 50, 51, 52). Ustroj endotelnih stanica, pericita, astrocita, neurona i izvanstaničnog matriksa u novije se vrijeme definira kao neurovaskularna jedinica (53). Endotelne stanice i periciti dijele zajedničku kapilarnu bazalnu membranu, dok je više od 99% moždane kapilarne površine opkoljeno završnim nožicama astrocita (54). Prostor ispunjen bazalnom membranom i smještaj između endotela/pericita i završnih nožica astrocita zapravo oblikuje međuodnos krvi i mozga. Udaljenost između završnih nožica astrocita, kapilarnih endotelnih stanica i pericita samo je 20 nm, što čini odnos između endotela, pericita i završnih nožica astrocita jednim od najintimnijih staničnih interakcija u biologiji uopće (55). Periciti pridonose stabilnosti malih krvnih žila: općenito, interakcija pericita s endotelom potrebna je za tvorbu, sazrijevanje i održavanje krvno-moždane barijere (56). Astrociti su lokalizirani između neurona, pericita i endotelnih stanica sa svojim nastavcima i potrebni su za održavanje i sazrijevanje krvno-moždane barijere (57). Dokazano je da posreduju u regionalnom moždanom protoku (58) te da imaju visoku gustoću akvaporin-4 (AQ-4) vodenih kanala, povezanih s ubrzanim unosom vode za vrijeme nastajanja moždanog edema (59). Malo je dokaza o tome na koji način neuroni pridonose ustrojstvu krvno-moždane barijere. Funkcije izvanstaničnog matriksa jesu podržavanje i usidravanje stanica kroz adhezijske receptore, odvajanje stanica jedne od druge te reguliranje međustanične komunikacije. Izvanstanični matriks sastavljen je od strukturnih proteina kolagena, laminina, fibronektina, elastina, trombospondina i proteoglikana (60). Ti su proteini osjetljivi na enzimsku razgradnju. Razgradnja strukturnih proteina izvanstaničnog matriksa i adhezijskih receptora povezuje se s povećanom propusnošću krvno-moždane barijere pri moždanom udaru (61, 62).

### **1.2.1. *Komparativna neurobiologija i evolucija krvno-moždane barijere u riba***

Iako je krvno-moždana barijera opisana u svih kralježnjaka, najbolje je istražena u sisavaca, a slabo karakterizirana u nižih kralježnjaka. Komparativno-anatomske studije pokazale su da postoje određene razlike među pojedinim vrstama kralježnjaka, kao i razlike u pojedinim vrsta tijekom razvoja. Krvno-moždanu barijeru u nekralježnjaka i u nekih nižih kralježnjaka,

poput prečnoustih riba, čini interakcija neurona i glijalnih stanica (63, 64, 65). Prečnouste ribe od ostalih kralježnjaka su se odijelile prije 400 milijuna godina (66, 67). No, u većine kralježnjaka, pa tako i u riba nadreda teleosta, ustrojstvo i funkcija krvno-moždane barijere koordinirani su interakcijama između neurona, astrocita i endotelnih stanica. Prema novijim radovima Bundgaard i Abbotta (2008.), »glijalna« krvno-moždana barijera predstavlja pleziomorfno obilježje, dok je »endotelna« krvno-moždana barijera apomorfno obilježje (66). Poznato je da se endotelijalna barijera pojavljivala nezavisno nekoliko puta tijekom evolucije te se drži sekundarnom evolucijskom razvojnom karakteristikom. Selektivna prednost može djelomično potjecati iz većeg razdvajanja funkcije između endotela i astrocitne glije (67).

Mehanizmi ionskog transporta preko transcelularnih putova u riba relativno su dobro karakterizirani (68, 69). Endotelna barijera ribljeg mozga istraživana je na ultrastrukturnoj razini u mnogih teleostnih vrsta (70). Na ultratankim rezovima pod elektronskim mikroskopom i na smrznutim rezovima prikazani su čvrsti spojevi smješteni na mjestu kontakta između staničnih membrana susjednih stanica (71, 72, 73). Ultrastrukturna istraživanja kompleksa tijesnih veza (74), kao i elektrofiziološka istraživanja koja su koristila ionoregulacijski epitel (69, 75, 76), snažno podržavaju heterogenost tijesnih veza kao kritičnu komponentu sveukupne fiziološke strategije koja omogućuje ribama da dominiraju u vodenim uvjetima. Na temelju istraživanja na živim embrijima transgeničnih japanskih riba riže (*Oryzias latipes*) saznajemo da su klaudini ključne molekule koje diktiraju funkciju čvrstih spojeva (77). Duplikacije genoma u riba kao i tandemske duplikacije gena, posebice u odgovoru na posebne fiziološke izazove povezane s raznolikošću u vodenim uvjetima, dovele su do osobite ekspanzije obitelji kladina u ovoj skupini životinja (78, 79, 80). Primjerice, čak 35 gena koji kodiraju kladine teleostnih riba vrste *Fugu rubripes* odgovara broju od 17 gena koje nalazimo u sisavaca, što preostali 21 gen čini specifičnim za riblje vrste (81).

Još uvijek se, međutim, nedovoljno zna o paracelularnim putovima i njihovim sastavnicama u ovoj skupini kralježnjaka, a, osim kladina, vrlo malo se zna i o proteinima tijesnih veza u riba te kako ti proteini odgovaraju na fiziološke izazove povezane sa životom u vodenim uvjetima (82, 83, 84).

Još jedna osobitost koja se vezuje uz funkciju krvno-moždane barijere u teleosta jesu proteini izvanstaničnog matriksa ependimini. Do sada nisu u potpunosti karakterizirani homologni slijedovi ependimina u sisavaca. Nakon sinteze u unutrašnjem endomeningealnom sloju, topivi ependimini distribuiraju se putem sustava cerebrospinalnog likvora. Dio ependimina povezan je s kolagenim vlaknima izvanstaničnog matriksa krvno-moždane barijere i drže se modulatorom njezine funkcije (85).

Mozak riba, kao i u drugih naprednijih vrsta kralježnjaka, izdvojen je iz sistemske cirkulacije krvno-moždanom barijerom koja omogućuje transport glukoze, monokarboksilata i aminokiselina. Postoje izvješća o nekim jasnim razlikama u propusnosti krvno-moždane barijere zamijećenima u teleosta i sisavaca, primjerice da monoamini mogu prolaziti krvno-moždanu barijeru u teleosta, ali ne i u sisavaca (86). Jedno od istraživanja propusnosti krvno-moždane barijere s pomoću određenih standardnih tvari pokazalo je da tvari tzv. 1. klase, koju čine tripansko plavilo, bromfenolno plavilo, natrijfenolsulfonftalein i natrijfluorescein, ne prolaze krvno-moždanu barijeru zlatnog karasa, no natrijtiocijanat, koji ubrajamo u 2. klasu tvari, nakon intraperitonealne injekcije zauzima veći moždani prostor od klorida, kojega držimo 3. klasom tvari (87). Rezultati tog istraživanja upućuju na to da postoji bitna razlika u mehanizmu krvno-moždane barijere teleostnih riba i sisavaca (87). Ipak, još uvijek se ne zna dovoljno o strukturnim i funkcionalnim razlikama u barijeri između pojedinih vrsta kralježnjaka; velika varijabilnost anatomije krvno-moždane barijere u kralježnjaka u određenom smislu otežava izučavanje njezine funkcije, kao i interpolaciju rezultata tih istraživanja s jedne vrste na drugu.

### **1.2.2. *Funkcija i važnost krvno-moždane barijere***

Pojednostavnjeno možemo reći da je jedan od najvažnijih razloga postojanja barijere između krvi i mozga njegova zaštita. Neki bakterijski toksini, primjerice toksin bacila difterije, tetanusa i dr., osobito su neurotoksični. Potpuna ili barem djelomična zaštita središnjega živčanog sustava stoga je nedvojbeno iznimno važna tijekom infekcije takvim bakterijama. U istom kontekstu čini se nevjerovatnim da krvno-moždana barijera, prisutna u svih životinjskih vrsta, i nekralježnjaka i kralježnjaka koji imaju znatno razvijen i kompleksan živčani sustav, može imati samo ulogu zaštite protiv infektivnih agensa i drugih štetnih okolišnih utjecaja. Naime, jedna od temeljnih funkcija krvno-moždane barijere, u kralježnjaka kao i u nekralježnjaka, jest uspostavljanje stabilne ionske mikrookoline koja osigurava odgovarajuće aktiviranje neurona i širenje akcijskog potencijala (88). U tom je smislu barijera učinkovita, ili možda čak učinkovitija, u blokiranju izravne izmjene tvari koje iz intersticijskog prostora dolaze u krvotok nego u obrnutom smjeru. Svi su neurotransmiteri polarne prirode te stoga imaju vrlo ograničenu propusnost kroz krvno-moždanu barijeru (89). Regije mozga koje su bogate sinapsama imaju visoku metaboličku razinu i zbog toga pojačan protok krvi za vrijeme aktivnosti. Bilo bi neekonomično odmah nakon sekrecije neurotransmiter »ispratiti« u kapilarnu moždanu cirkulaciju. Takvo zatvaranje unutrašnjeg okoliša podupire kon-

cept aktivne regulacije homeostaze cerebralnoga intersticijskog prostora (90, 91). Općenito, prisutnost te barijere između krvi i intersticijskog prostora potrebna je za omogućavanje mehanizama ulaska tvari koje su potrebne, odnosno izlaska tvari koje se trebaju ukloniti. Individualne komponentne neurovaskularne jedinice funkcioniraju tako da reguliraju mikrovaskularnu permeabilnost, ionski gradijent, unos nutrijenata, uklanjanje toksina i cerebralnu hemodinamiku (88, 92). Bilo koja od individualnih komponenata može pridonijeti promjeni propusnosti krvno-moždane barijere (92).

Propusnost krvno-moždane barijere može se mijenjati na tri razine. U prvom redu, učinkovitost transporta ovisi o količini i odistribuciji protoka krvi u mozgu. Potom su tu tijesne veze koje mogu biti djelomično ili potpuno otvorene, čime omogućuju ili povećavaju »vodeni put« za prolaz otopina u moždani intersticijski prostor. Na posljeticu, postoje specifični transportni mehanizmi, čija se propusnost može regulirati (88).

Danas se intenzivno ispituju metode za sigurno i reverzibilno otvaranje krvno-moždane barijere u svrhu primjene dijagnostičkih i terapijskih tvari (93, 94). Također, izniman znanstveni interes usmjeren je k istraživanju krvno-moždane barijere u patološkim uvjetima, posebice njezine uloge u vazogenom moždanom edemu, odnosno povećanoj propusnosti (95, 96, 97).

Usprkos brojnim istraživanjima, neka temeljna pitanja vezana uz stanične i molekularne mehanizme, koji kontroliraju ustrojstvo, integritet i funkcioniranje krvno-moždane barijere, još uvijek ostaju otvorena.

### **1.3. Biološka uloga i važnost dušik (II) oksida**

Dušik (II) oksid (NO), u početku poznat kao relaksirajući čimbenik iz endotela (engl. *endothelium-derived relaxing factor*, EDRF), plinovita je signalna molekula koja ima važnu ulogu u različitim biološkim procesima u kralježnjaka, slobodno difundira kroz membrane i ne veže se za specifične receptore (98). Jedna je od najmanjih i najjednostavnijih biološki aktivnih molekula u prirodi. U različitim fiziološkim i patološkim uvjetima endogeni NO otpuštaju različite vrste stanica, poput endotelnih stanica, neurona, astrocita, fagocita (monociti, makrofagi i neutrofilni) i trombocita (99, 100, 101, 102). NO se biosintetizira iz L-arginina s pomoću enzima sintaze dušikova oksida (NOS). NOS postoji u tri izoforme, od kojih su dvije konstitutivne (cNOS) i ovisne o kalciju, a jedna je inducibilna (iNOS) i nije ovisna o kalciju (103). Endotelna NOS (eNOS) i neuronska NOS (nNOS) dvije su konstitutivne

izoforme. Kao jedna od najraširenijih signalnih molekula u sisavaca, NO je glavni čimbenik u kontroliranju gotovo svake stanične i organske funkcije u tijelu. NO je jedina endogena molekula koja ima funkciju neurotransmitera, autakoida, konstitutivnog medijatora, inducibilnog medijatora, citoprotekcijske molekule i citotoksične molekule. Endotelni NO odgovoran je za tonus krvnih žila, dok neuronalni NO vjerojatno ima ulogu neurotransmitera, odnosno dio je sustava drugog glasnika (104). NO može poticati biološko djelovanje putem molekularnih mehanizama ovisnih i neovisnih o cikličkom gvanozin monofosfatu (cGMP). NO uzrokuje vazodilataciju time da aktivira drugi glasnik, cGMP. Budući da NO ima mnogo fizioloških uloga u reguliranju brojnih i različitih organskih funkcija, poremećaji u NO putu dovode do razvoja mnogih različitih patofizioloških stanja. Treća izoforma NOS je inducibilna, a može se stimulirati u uvjetima stresa, upale i infekcije (103). Pod tim uvjetima NO se može stvarati u velikim količinama te imati štetan učinak na SŽS. Takva oštećenja uključuju arterijsku hipertenziju, aterosklerozu, koronarnu arterijsku bolest, srčano zatajenje, plućnu hipertenziju, moždani udar, impotenciju, vaskularne komplikacije u šećernoj bolesti, ulkuse gastrointestinalnog trakta, astmu i druga sistemska oboljenja i oboljenja središnjega živčanog sustava (99).

Usprkos tome što je riječ o jednostavnoj tvari, NO je važna molekula na području neuroznosti, u fiziologiji i imunologiji, te je stoga 1992. godine proglašena »molekulom godine«, a trojica istraživača Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro i Ferid Murad, zbog otkrića ovoga novog načela signalnog mehanizma u biološkim sustavima dobila su Nobelovu nagradu iz područja medicine za 1998. godinu (105).

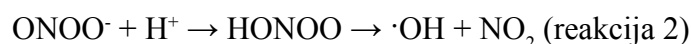
### **1.3.1. Uloga dušik (II) oksida u mijenjanju propusnosti krvno-moždane barijere**

Pokusima na sisavcima dokazano je da NO povećava propusnost krvno-moždane barijere omogućavajući tvarima da ulaze u mozak na pasivan način. *In situ* perfuzijske studije na modelu štakora pokazale su da NO posreduje otvaranje krvno-moždane barijere do određene mjere, ovisno o donoru NO koji se koristio (106, 107). Precizni molekularni mehanizam povećane propusnosti krvno-moždane barijere kompleksan je i nije u potpunosti razjašnjen, no može se zaključiti da je ovisan o koncentraciji (108). NO sam po sebi uzrokuje umjereno oštećenje propusnosti krvno-moždane barijere. Rezultati istraživanja na sisavcima upućuju na to da donori NO uzrokuju povećanje propusnosti krvno-moždane barijere, koje se može povezati s nastajanjem peroksinitrita (108, 109, 110).

*Reakcija nastajanja hidroksilnih radikala iz superoksida i NO: (111, 112)*

U ovoj reakciji superoksid ( $O_2^-$ ) reagira s dušikoksidnim radikalom ( $NO\cdot$ )

( $k = 3,7 \times 10^7 \text{ m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  (113)) te nastaje potencijalno toksični peroksinitritni anion ( $ONOO^-$ ; reakcija 1) (114). Peroksinitrit ima  $pK_a$  6,5 (115, 116) i, kada je protoniran, pretvara se u peroksiduškastu kiselinu ( $HONOO$ ), koja se vrlo brzo homolitički razgrađuje te nastaje hidroksilni radikal ( $\cdot OH$ ) i dušikov dioksid ( $NO_2$ ; reakcija 2).



No, precizna biokemija NO još uvijek nije jasno definirana. U širem kemijskom smislu NO može osim dušikoksidnog radikala ( $NO\cdot$ ) proizvesti i druge redoks vrste s različitim osobinama reaktivnosti:  $NO^+$  (nitrozilni kation) i  $NO^-$  (nitroksilni anion) (117). Prema istraživanju *Boje* i *Lakhmana*, najteže oštećenje krvno-moždane barijere u štakora bilo je uzrokovano donorima NO koji su proizveli više različitih redoks vrsta ( $NO\cdot$ ,  $NO^+$ ,  $NO^-$ ) (106).

Mehanizam štetnog učinka na krvno-moždanu barijeru najvjerodostojnije je povezan sa stvaranjem peroksinitrita (118, 119). Posljedično dolazi do moždanog edema, pa i do razvoja upalne reakcije, odnosno otpuštanja citokina, kao što su čimbenik nekroze tumora ili interleukin  $1\beta$ , te do sekundarnog oštećenja mozga. Također je zamijećeno da otpuštanje tih medijatora upale može imati i određeni neuroproteksijski učinak (120). NO također nastaje i kao posljedica upalnog procesa te poput modulatora upale sudjeluje u moždanom oštećenju (121, 122). Stvaranje peroksinitrita može dovesti i do nitrotirozinacije proteina, što pak može utjecati na stanične funkcije i na vijabilnost stanica (123).

Također je opaženo da inhibicija aktivnosti gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze s pomoću NO uzrokuje smanjenje koncentracije adenzin trifosfata (ATP) u endotelnim stanicama, što može potaknuti pojačanu propusnost tijesnih veza (124).

Neka su istraživanja razmatrala povezanost NO i metaloproteinaza matriksa (MMP) u otvaranju krvno-moždane barijere. NO može aktivirati neke MMP, a dokazano je da MMP razgrađuju brojne supstrate, među ostalim i komponente bazalne lamine poput laminina, tipa IV kolagena i dr. (125). Zamijećeno je da je nakon ishemije ili traume smanjena koncentracija laminina, tipa IV kolagena i proteina ZO-1 tijesnih veza (126). Dokazano je da NO aktivira MMP-9 s pomoću transkripcijskih čimbenika osjetljivih na NO (nuklearni čimbenik  $\kappa B$ , NF- $\kappa B$ , aktivirani protein 1, AP-1), koji su također transkripcijski čimbenici za sintezu MMP-9

(127, 128). Povećana aktivnost MMP-2 opažena je tijekom inicijacije ishemijskog procesa i dokazano je da je povezana s prvim razdobljem bifazičnog otvaranja krvno-moždane barijere (129, 130, 131). Drugo razdoblje bifazičnog otvaranja korelira s povećanom aktivnošću MMP-9, povezanom s povećanim vazogenim edemom i hemoragijskom transformacijom u ljudskom kao i u životinjskom modelu (132, 133, 134).

Također postoje i studije koje pokazuju da NO modulira ionske kanale u ekscitacijskim stanicama i tako utječe na povećanje propusnosti krvno-moždane barijere (135).

Utjecaj NO na propusnost krvno-moždane barijere za sada nije istraživani u nižih kralježnjaka.

### **1.3.2. Gliceriltrinitrat kao donor dušik (II) oksida**

Tvari koje daju NO (bilo spontano ili interakcijom s komponentama tkiva) često se koriste u istraživanju jer oponašaju endogeno otpuštanje NO. Primjeri takvih donora NO su natrijev nitroprusid, S-nitrozo-N-acetil-penicilamin, 3-morfolinosidnonimin, NO aspirini i gliceriltrinitrat (GTN) (136). GTN je organski nitrat koji otpušta NO biotransformacijom u ciljnom tkivu u metaboličkoj pretvorbi organskog nitrata u NO s pomoću enzima glutathion S-tranferaze, citokroma P450 i tiolnih reakcija (137). GTN je visoko lipofilna molekula koja lako prolazi krvno-moždanu barijeru (138, 139). Reuter i suradnici dokazali su povećanje ekspresije iNOS mRNA u moždanim strukturama 2 sata nakon primjene GTN, kao i povećanje ekspresije iNOS proteina 4, 6 i 10 sati nakon infuzije (140). Istjecanje proteina plazme iz arteriola i kapilara uočeno je 4 sata nakon infuzije GTN, što se može potisnuti primjenom specifičnog inhibitora iNOS. Isti autori pokazali su i da primjena GTN potiče ekspresiju proupalnih gena kao što su geni za interleukin-6 i interleukin-1, odnosno da aktivira mastocyte i makrofage, što dovodi do odgođene upalne reakcije nakon 4 do 6 sati (140).

### **1.3.3. Uloga i važnost NO u teleosta**

Za sada se vrlo malo zna o regulaciji cerebralne cirkulacije povezane s NO u nižih kralježnjaka, posebice u riba. NOS je eksprimirana u središnjem živčanom sustavu svih istraživanih teleostnih riba. Otkriven je donekle jednoznačan obrazac distribucije aktivnosti NOS u istraživanim dijelovima mozga različitih vrsta riba: u šarana (*Cyprinus carpio* L.), zlatnog karasa (*Carassius auratus*) i kalifornijske pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) su *telencephalon*, *hipotalamus* i *mesencephalon* pokazali najviše NOS aktivnosti; u antarktičkih teleosta NOS



se može dokazati u Purkyněovim stanicama malog mozga, dok se u malom mozgu zlatnog karasa NOS nije mogao uočiti (141, 142, 143, 144, 145, 146). Ekspresija nNOS i iNOS opažena je u nekih ribljih vrsta, dok su za eNOS dobiveni nepodudarni podatci (147).

U svjetlu povezanosti NO i središnjega živčanog sustava ribe najviše je pozornosti posvećeno istraživanju utjecaja hiperkapnije/anoksije na moždanu cirkulaciju. U sisavaca hiperkapnija uzrokuje cerebralnu vazodilataciju i povećanje protoka krvi kroz mehanizme koji uključuju povećanje stvaranja NO (148). Poznato je da mozak većine kralježnjaka, s obzirom na visoke metaboličke potrebe i određene biokemijske specifičnosti, slabo podnosi produljeno stanje anoksije. Iznimka od toga pravila su sve ektotermne vrste (149). Regulacija cerebralne cirkulacije povezana s NO donekle se razlikuje u pojedinim vrsta riba. U riba koje dobro podnose hiperkapniju/anoksiju, kao što su zlatni karas i šaran, smatra se da je regulacija cerebralne cirkulacije ograničeno povezana s NO (150). Aktivnost NO sintaze povezana je s pH te u uvjetima produljenog stanja anoksije prestaje biti aktivna (151). Kalifornijska pastrva izložena pCO<sub>2</sub> od 22,5 mmHg pokazuje 80% povećanje brzine cerebralnog protoka, dok karas ne pokazuje promjene cerebralnog protoka koje bi bile vezane uz NO (152). Istraživanja cerebralne cirkulacije provedena na zlatnom karasu pokazala su sličan obrazac kao u karasa, bez odgovora na hiperkapniju (153). Ista istraživanja nisu potpuno isključila NO u regulaciji cerebralne cirkulacije te upućuju na to da NO regulira cerebralni protok krvi u zlatnog karasa u normoksičnim uvjetima, dok je adenzin glavna vazoregulacijska molekula koja povećava cerebralni protok potreban za anaerobnu glikolizu za vrijeme anoksije (151). Također je dokazano da NO sintaza u sisavaca nije ovisna o temperaturi, za razliku od nekih istraženih ribljih vrsta u kojih je aktivnost NOS ovisna o temperaturi kao u šarana i zlatnog karasa (142, 154).

U posljednje vrijeme istraživanja na području neuroendokrinologije i imunologije ističu važnost NO u teleosta. Pokazalo se da u teleosta NO sudjeluje u modulaciji sekrecije hormona na sličan način kao u sisavaca (155), dok imunološke studije upućuju na važnu ulogu NO u imunosnom odgovoru organizma riba razreda teleosta (156).

## 2. CILJEVI I SVRHA RADA

Koncept važnosti krvno-moždane barijere u regulaciji unutrašnjeg okoliša mozga već je odavno široko prihvaćen. Svi kralježnjaci imaju krvno-moždanu barijeru, specijalizirani sloj stanica koji kontrolira transport/prolaz molekula između krvi i mozga (mozga, leđne moždine i retine) i pridonosi regulaciji (homeostazi) mikrookoliša mozga. Krvno-moždana barijera, ranije shvaćena kao statički, rigidni zid između SŽS i periferije, zapravo je dinamična, kompleksna struktura sposobna za brzu modulaciju pod određenim uvjetima (92, 157).

Mehanizmi signalnih putova krvno-moždane barijere još nisu dovoljno jasni i istraženi. Signalni putovi i procesi povezani s čvrstim spojevima podrazumijevaju signale koji polaze iz unutrašnjosti stanice, a usmjereni su na čvrste spojeve u smislu da mijenjaju njihovo ustrojstvo i reguliraju međustaničnu propusnost, kao i signale usmjerene od čvrstih spojeva do stanične unutrašnjosti koji moduliraju gensku ekspresiju, staničnu proliferaciju i diferencijaciju (158). Istraživanja na sisavcima nedvojbeno su potvrdila da postoje mnogi kaskadni putovi, među ostalima i oni posredovani s pomoću NO, koji mogu dovesti do otvaranja krvno-moždane barijere, a eventualno posljedično i do razvoja vazogenog edema i sekundarnog oštećenja mozga (109). Krvno-moždana barijera danas je u žarištu znanstvene pozornosti s krajnjim ciljem iznalaženja načina mijenjanja propusnosti ove na prvi pogled nepremostive zapreke za prolaz lijekova, ili obratno, zaštite integriteta barijere u svrhu sprječavanja nekih neuroloških bolesti kao što su multipla skleroza, AIDS, Alzheimerova bolest i Parkinsonova bolest, za koje se danas zna da su povezane s povećanom propusnošću krvno-moždane barijere (109, 159). Osim NO, i za mnoge druge kemijske medijatore, npr. glutamat, aspartat, taurin, ATP, endotelin-1, makrofagni upalni protein-2 (MIP-2), čimbenik nekroze tumora- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin- $\beta$  (IL- $\beta$ ) i dr., do sada je u *in vitro* i *in vivo* pokusima utvrđeno da sudjeluju u otvaranju krvno-moždane barijere (160, 161, 162, 163, 164). NO u sisavaca sudjeluje u mnogim fiziološkim i patološkim procesima u velikom broju ciljnih tkiva, a poglavito

u živčanom tkivu. Čini se da bazalno stvaranje NO ima važnu biološku ulogu u organizmu, dok povećano stvaranje NO može, uz neke druge medijatore, pridonositi ekscitotoksičnosti. U posljednjih je 20-ak godina znatno porastao interes za istraživanja uloge i djelovanja NO u različitim životinjskih vrsta. Histološka ispitivanja potvrdila su prisutnost NOS u središnjem živčanom sustavu svih istraživanih kralježnjaka, od paklare do sisavaca, no uloga i funkcija NO pokazala se različitom u različitim životinjskih vrsta (165). U sisavaca hiperkapnija uzrokuje cerebralnu vazodilataciju i povećanje protoka krvi putem mehanizama koji uključuju porast stvaranja NO (148). Iznimka od toga pravila pojedine su ektotermne vrste kralježnjaka (149, 166, 167). Na temelju danas dostupnih istraživanja može se reći da se uloga i funkcija NO u cerebralnoj cirkulaciji razlikuju u pojedinim vrsta riba (165). U riba koje dobro podnose hiperkapniju/anoksiju kao što su zlatni karas (*C. auratus*) i šaran (*C. carpio* L.), drži se da je regulacija cerebralne cirkulacije ograničeno povezana s NO (150). Aktivnost NO sintaze povezana je s pH te u uvjetima produljenog stanja anoksije prestaje biti aktivna (151).

Na temelju navedenoga može se zaključiti da je još uvijek nedovoljno komparativno-fizioloških istraživanja funkcije NO u mozgu nižih kralježnjaka. Stoga je potrebno provoditi istraživanja na nižim kralježnjacima sve dok se precizno ne utvrde uloga NO u moždanoj cirkulaciji kao i njegova evolucijska uloga i važnost.

#### *Primarni cilj istraživanja:*

1. utvrditi djelovanje NO na propusnost krvno-moždane barijere *in vivo* u šarana (*C. carpio* L.) uporabom gliceriltrinitrata kao donora NO.

#### *Sekundarni ciljevi istraživanja:*

1. utvrditi dolazi li u šarana do razvoja moždanog edema nakon primjene gliceriltrinitrata;
2. prikazati patohistološke promjene karakteristične za moždani edem i vazodilataciju nakon primjene gliceriltrinitrata;
3. ustanoviti i vremenski odrediti reverzibilnost procesa povećane propusnosti krvno-moždane barijere;
4. utvrditi sličnosti mehanizma povećanja propusnosti krvno-moždane barijere, u kojem sudjeluje NO na nižim kralježnjacima u odnosu na dosad istraživane vrste;
5. utvrditi mogućnost uporabe šarana kao modela za istraživanje krvno-moždane barijere u riba.

## 2.1. Očekivana korist od rezultata istraživanja

Istraživanja kojima je cilj pridonijeti utvrđivanju promjene propusnosti krvno-moždane barijere zbog prekomjerne koncentracije NO imaju mnoge praktične i potencijalno važne implikacije. Povećana propusnost krvno-moždane barijere, povezana s NO, dokazana je u mnogim patološkim stanjima koja zahvaćaju središnji živčani sustav, dok se regulacija propusnosti krvno-moždane barijere danas intenzivno istražuje također i zbog mogućnosti primjene dijagnostičkih i terapijskih tvari u središnji živčani sustav.

Molekularni mehanizam kojim NO posreduje u oštećenju tkiva i u povećanju propusnosti krvno-moždane barijere kompleksan je i dosad nije u potpunosti razjašnjen.

Istraživanja ove vrste pridonose preciznom utvrđivanju uloge NO u regulaciji propusnosti krvno-moždane barijere.

U svih je kralježnjaka opisana krvno-moždana barijera koja je najbolje istražena u sisavaca, a slabo je karakterizirana u nižih kralježnjaka. Ovim bismo istraživanjem mogli procijeniti mogućnost uporabe modela šarana za istraživanje krvno-moždane barijere te pridonijeti sadašnjim spoznajama o ulozi NO u cerebralnoj cirkulaciji ribljih vrsta koje su otporne na oksidacijski stres. Nadalje, poznato je da u sisavaca krvno-moždana barijera postaje relativno nepropusna tijekom razvoja, u postnatalnom razdoblju. Jedna od najvažnijih prednosti uporabe šarana kao modela jest mogućnost pružanja modela istraživanja prolaza tvari na relativno propusnoj krvno-moždanoj barijeri u usporedbi sa sisavcima. U svjetlu aktualnih spoznaja o određenim razlikama anatomskog ustroja krvno-moždane barijere u pojedinim vrsta kralježnjaka, čini se važnim utvrđivanje filogenetske konzerviranosti sudjelovanja NO u regulaciji njezine propusnosti.

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

#### **3.1. Pokusne životinje**

U pokusu se koristila dvogodišnja šaranska mlađ (*C. carpio* L.) podrijetlom s ribničarstva Topličica. Neposredno po izlovu iz ribnjaka obavljen je zdravstveni pregled mlađa, a potom je prenešen do laboratorija u plastičnim vrećama. U plastičnu vreću volumena 50 l stavljeno je 15 l vode s ribom. Prostor iznad vode do 50 l ispunjen je s čistim kisikom pomoću posebnog uređaja, tako da je pritisak u vreći bio 1 bar. Pokus na šaranskom mlađu proveden je u mokrom laboratoriju Zavoda za biologiju i patologiju riba i pčela Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a mikroskopske pretrage i određivanje koncentracije nitrita i nitrata u drugim laboratorijima, navedenima u odgovarajućim poglavljima. Po dopremi u laboratorij ribe su prije izvođenja pokusa bile podvrgnute 4-tjednom privikavanju u bazenima s protočnom dekloriranim vodom. Za to vrijeme hranile su se uravnoteženom krmnom smjesom za riblju mlađ. Pokusi su provedeni na 148 komada šaranske mlađi, tjelesne mase od 500 do 1000 g.

#### **3.2. Određivanje koncentracije serumskih nitrita, nitrata i ukupnih nitrita i nitrata**

Šaranima (ukupno 120 komada) intraperitonealno je apliciran gliceriltrinitrat u dozi od 1 mg/kg tjelesne mase (Trinitrosan amp., Merck Pharma, Njemačka). Po primjeni preparata tretiranoj skupini šarana je po primjeni preparata u određenim vremenskim razmacima (15

minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata) vađena krv iz kaudalne vene. Paralelno je vađena krv i kontrolnoj skupini šarana. Uzorci krvi centrifugirani su 15 minuta na 2500 okretaja u minuti na temperaturi od 4 °C, serum profiltriran kroz 10 kDa filter (Millipore Company, SAD). Uzorci su do izvođenja analize bili pohranjeni u zamrzivaču na -20 °C.

Za određivanje koncentracija nitrita, nitrata te ukupnih nitrita i nitrata korišten je komercijalni test paket (Cayman Chemical Company, SAD). Svako je mjerenje bilo izvedeno u triplikatu.

Navedeno istraživanje provedeno je u Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **3.3. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evans plavila**

Ovaj pokus provodio se na 32 komada šaranskog mlada. Šarani su biti podijeljeni na četiri skupine po 8 komada. U tri skupine šaranima je intraperitonealno apliciran 1 mg gliceriltrinitrata/kg tjelesne mase. Šaranima kontrolne skupine intraperitonealno je primijenjena fiziološka otopina za ribe (0,63% otopina NaCl). Šest, dvanaest i dvadeset četiri sata nakon tretiranja šarani su anestetizirani. Anestezija šarana obavljena je preparatom MS-222 (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka). Šaranima je po anestetiziranju intrakardijalno aplicirana 2% otopina Evans plavila (Sigma Aldrich Chemie, Njemačka) u dozi od 2 mg/kg tjelesne mase. Nakon nekoliko minuta cirkuliranja otopine, kirurški je otvorena perikardijalna šupljina i preko arterijske lukovice u krvotok aplicirana fiziološka otopina. Poslije primjene fiziološke otopine u krvotok je apliciran 4% formaldehid. Potom su šarani anestetizirani, žrtvovani, a mozak im je izvađen i fiksiran u 4% formaldehidu.

#### **3.3.1. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na makroskopskom preparatu mozga šarana**

Fiksirani uzorci mozga šarana fotografirani su, a obojenje Evans plavilom pojedinih dijelova središnjega živčanog sustava šarana [prednji mozak (*telencephalon*), međumozak (*diencephalon*), srednji mozak (*mesencephalon*), mali mozak (*metencephalon*), leđna moždina

(*medulla spinalis*)] stupnjevano je ljestvicom od 0 do 3. Stupanj »0« označava neobojenje, »1« lagano obojenje, »2« jače obojenje, a »3« označava jako obojenje.

### **3.3.2. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na mikroskopskom preparatu mozga šarana**

Fiksirani uzorci mozga šarana uklopljeni su u parafin te rezani mikrotomom na 5 µm debele rezove. Od svakog uzorka mozga nasumce je odabrano 8 rezova koji su stavljeni na predmetno stakalce i analizirani pod fluorescentnim mikroskopom. Istjecanje Evans plavila kao pokazatelja povećanja propusnosti krvno-moždane barijere vidljivo je kao svijetleći prsten u neposrednoj okolini kapilare, odnosno intenzivno crveno obojenje perikapilarnog prostora.

Ekscitacijsko područje fluorescencije Evans plavila je od 470 do 540 nm, a emisija na 680 nm (168).

Ovo istraživanje izvedeno je u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

### **3.4. Utvrđivanje moždanog edema gravimetrijskom metodom**

U pokusu smo analizirali 3 skupine riba. Svaka skupina sastojala se od 15 šarana. Šest i dvadeset četiri sata po primjeni gliceriltrinitrata šarani iz tretiranih skupina te iz kontrolne skupine kojoj je intraperitonealno aplicirana fiziološka otopina za ribe (0,63% otopina NaCl) uspavani su povećanom dozom anestetika. Potom je iz šarana izdvojen mozak, odložen odvojeno na prethodno izvagane Petrijeve zdjelice i zajedno sa zdjelicom izvagan da se utvrdi težina mokre tvari. Potom su uzorci isušeni u suhom sterilizatoru 24 sata na 105 °C te izvagani na Petrijevoj zdjelici da se utvrdi težina suhe tvari. Udjel vode u mozgu izrazili smo na sljedeći način:

$$\text{udjel vode u mozgu (\%)} = [\text{mokra tvar} - \text{suha tvar} / \text{mokra tvar}] \times 100 \text{ (169).}$$

### **3.5. Utvrđivanje moždanog edema i vazodilatacije na hemalaun-eozin obojenim preparatima mozga pod svjetlosnim mikroskopom**

U ovom su pokusu korištena 23 komada šarana podijeljena na 3 skupine. Kontrolna skupina sadržavala je 13 komada. Svaka skupina (2 ukupno) tretirana s 1 mg GTN/kg tjelesne mase sadržavala je po 10 komada. Ribe su žrtvovane 6 sati i 24 sata nakon primjene donora NO. Mozgovi šarana tretiranih gliceriltrinitratom i mozgovi kontrolne skupine fiksirani su nakon žrtvovanja u 4% puferiranom formalinu. Fiksirani materijal je uklopljen u parafin, izrezan mikrotomom na 5 µm debele rezove i obojen standardnim hemalaun-eozin bojenjem (HE). Pod svjetlosnim mikroskopom analizirane su promjene karakteristične za vazodilataciju i edem.

Ovo je istraživanje provedeno u Zavodu za patologiju Opće bolnice Zabok.

### **3.6. Obrada podataka**

Dobiveni podatci statistički su obrađeni s pomoću standardnoga statističkog računalnog programa (SPSS for MS Windows, ver. 11.5) (170).

Rezultati podataka koji su slijedili normalnu distribuciju prikazani su u obliku srednje vrijednosti ( $\bar{x}$ ) i standardne pogreške aritmetičke sredine (engl. *standard error of the mean*, SEM), a rezultati podataka koji nisu slijedili normalnu razdiobu prikazani su u obliku medijana (M) i interkvartilnog raspona (engl. *interquartile range*, IQR).

Koncentracija nitrita, nitrata i ukupnih nitrita i nitrata statistički je obrađena s pomoću parametrijskih testova. Podatci su prezentirani kao  $\bar{x} \pm \text{SEM}$ . Za ispitivanje normalnosti distribucije podataka primijenjen je Kolmogorov Smirnovljevi »Goodness of fit« test. Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između promatranih skupina primijenjeni su ANOVA i »Tukey post« test multiple komparacije na razini značajnosti  $p < 0,05$ .

Stupanj obojenja mozga Evans plavilom na pojedinim dijelovima makroskopskog uzorka mozga statistički je evaluirano pomoću Mann-Whitneyevog testa. Razina  $p < 0,05$  drži se statistički značajnom.

Podatci o udjelu vode u mozgu šarana u kontrolnoj i tretiranoj skupini prikazani su kao M sa zadanim kvartilama (engl. *quartiles*, Q) od 25% do 75%. Za ispitivanje normalnosti dis-



tribucije podataka primijenjeni su Kolmogorov Smirnovljev »Goodness of fit« test i Shapiro Wilks test. Za ispitivanje statističke značajnosti razlika između promatranih skupina primijenjen je neparametrijski test, Kruskal Wallis neparametrijska ANOVA. Za ispitivanje razlika između parova primijenjen je Mann Whitney U neparametrijski test za nezavisne uzorke. Razina  $p < 0,05$  drži se statistički značajnom.

Rezultati mikroskopske analize istjecanja Evans plavila (analiza pod fluorescentnim mikroskopom) i utvrđivanja moždanog edema i vazodilatacije na HE preparatima (analiza pod svjetlosnim mikroskopom) prikazani su opisno.

Za utvrđivanje značajnosti međusobne povezanosti ispitivanih varijabli (ukupnih nitrata i nitrita, nitrata i nitrita, stupnja obojenosti Evans plavilom, udjela mokre tvari u mozgu) korištena je Spearmanova korelacijska analiza za neparametrijske uzorke. Razine  $p < 0,01$  i  $p < 0,05$  drže se statistički značajnima. Spearmanov koeficijent korelacije ( $r$ ):  $r = 0$  do  $\pm 0,25$ : nema povezanosti,  $r = \pm 0,26$  do  $\pm 0,50$ : slaba povezanost,  $r = \pm 0,51$  do  $\pm 0,75$ : umjerena do dobra povezanost,  $r = \pm 0,76$  do  $\pm 1$ : vrlo dobra do izvrsna povezanost.

## 4. REZULTATI

Mortalitet šarana nije zabilježen ni u jednoj eksperimentalnoj skupini. Četiri šarana (dva iz kontrolne skupine, jedan iz skupine koja je analizirana 6 sati nakon primjene GTN, jedan iz skupine koja je analizirana 12 sati nakon primjene GTN) iz pokusa utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evans plavila isključena su iz istraživanja. Kod tih životinja nije bila vidljiva plava obojenost u škrgama neposredno nakon injiciranja boje punkcijom srca, te je stoga postupak provedbe tog pokusa smatran neuspješnim.

### 4.1. Rezultati određivanja koncentracije serumskih nitrita, nitrata i ukupnih nitrita i nitrata

#### 4.1.1. Ukupna koncentracija serumskih nitrita i nitrata

Ukupna koncentracija nitrita i nitrata u *kontrolnoj skupini* je  $109,0 \pm 2,67$   $\mu\text{mol/l}$  (srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška aritmetičke sredine, *standard error of the mean*;  $x \pm \text{SEM}$ ) ( $n = 13$ ). Skupine analizirane 15 minuta ( $188,1 \pm 10,65$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 15$ ), 1 sat ( $173,7 \pm 7,27$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 16$ ), 6 sati ( $236,4 \pm 28,92$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 18$ ), 8 sati ( $255,2 \pm 11,54$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 15$ ), 12 sati ( $178,2 \pm 7,45$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 12$ ) i 24 sata ( $148,6 \pm 3,41$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 17$ ) nakon primjene GTN statistički su značajno većih koncentracija nitrita i nitrata u odnosu na kontrolnu skupinu. Skupina kojoj je koncentracija određena 3 sata ( $127,5 \pm 8,43$   $\mu\text{mol/l}$ ,  $n = 15$ ) nakon primjene aktivne tvari nije statistički značajno različita u odnosu na kontrolnu skupinu.

Ubrzo nakon primjene GTN (*15 minuta*) koncentracija nitrita i nitrata statistički je značajno viša nego u skupini analiziranoj nakon 3 sata te značajno niža nego u skupini analiziranoj

nakon 8 sati. Nema statistički značajne razlike između skupine analizirane nakon 15 minuta i skupine analizirane 1 sat, 6 sati, 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN. Odnos prema kontrolnoj skupini analiziran je ranije.

U skupini koja je analizirana **1 sat** nakon primjene aktivne tvari koncentracija nitrita i nitrata značajno je viša nego u skupini analiziranoj nakon 3 sata, a značajno je niža nego u skupinama analiziranim nakon 6 i 8 sati. Nema statistički značajne razlike između skupine analizirane nakon 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta analiziran je ranije.

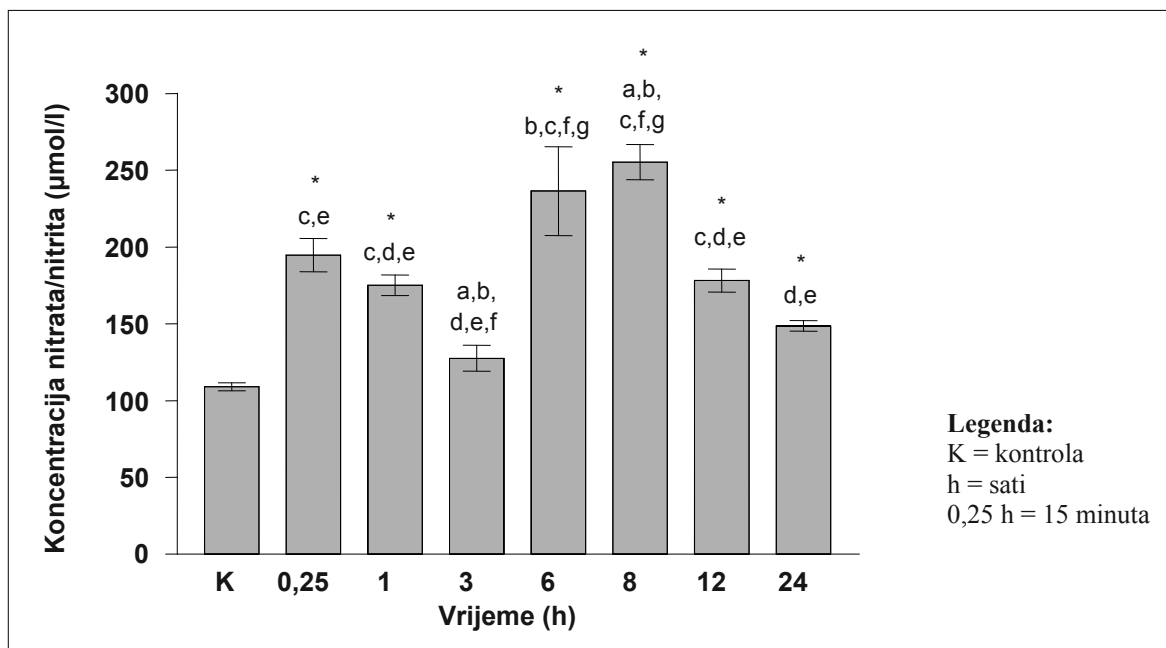
Skupina koja je analizirana **3 sata** nakon primjene GTN pokazala je najnižu koncentraciju nitrita i nitrata, statistički neznačajnu u odnosu na skupinu analiziranu nakon 24 sata te značajno nižu u odnosu na skupine analizirane nakon 6 sati, 8 sati i 12 sati. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta i 1 sat analiziran je ranije.

U skupini analiziranoj **6 sati** nakon primjene GTN nalazimo statistički značajno višu koncentraciju nitrita i nitrata u odnosu na 12 sati i 24 sata. Nema statistički značajne razlike između te skupine i skupine koja je analizirana 8 sati nakon primjene aktivne tvari. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat i 3 sata analiziran je ranije.

Skupina analizirana **8 sati** nakon primjene GTN pokazuje statistički značajno više koncentracije nitrita i nitrata u odnosu na skupine analizirane nakon 12 sati i 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata i 6 sati analiziran je ranije.

Skupina koja je analizirana **12 sati** nakon primjene GTN ne pokazuje statistički značajnu razliku koncentracija u odnosu na skupinu analiziranu nakon 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati i 8 sati analiziran je ranije.

Odnos skupine koja je analizirana **24 sata** nakon primjene aktivne tvari prema ostalim skupinama analiziran je ranije (slika 3).



**Slika 3.** Koncentracija ( $\mu\text{mol/l}$ ) ukupnih nitrata i nitrita u serumu šarana u kontrolnoj skupini i nakon intraperitonealne primjene 1 mg/kg glicerilnitrata (15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata).

Okomite linije predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine.

(\*) u odnosu na kontrolu (K) ( $p < 0,05$ ); (a) u odnosu na 0,25 h ( $p < 0,05$ ); (b) u odnosu na 1 h ( $p < 0,05$ ); (c) u odnosu na 3 h ( $p < 0,05$ ); (d) u odnosu na 6 h ( $p < 0,05$ ); (e) u odnosu na 8 h ( $p < 0,05$ ); (f) u odnosu na 12 h ( $p < 0,05$ ); (g) u odnosu na 24 h ( $p < 0,05$ ).

Petnaest minuta nakon primjene GTN dolazi do blagog povišenja koncentracije nitrita i nitrata koje nastaje zbog metaboličke razgradnje donora NO. Skupine analizirane nakon 1 sat, 3 sata, 12 sati i 24 sata pokazuju tendenciju povratka na bazalne vrijednosti. Povišenje koncentracije nitrita i nitrata zamijećeno u skupinama analiziranima nakon 6 i 8 sati upućuje na mogućnost endogene sinteze NO, inducirane primjenom donora NO.

#### 4.1.2. Koncentracija serumskih nitrata

Dinamika koncentracije serumskih nitrata odgovara onoj ukupnih nitrita i nitrata.

Koncentracija nitrata u *kontrolnoj skupini* iznosi  $99,2 \pm 3,02 \mu\text{mol/l}$ . Skupine analizirane 15 minuta ( $180,2 \pm 11,52 \mu\text{mol/l}$ ), 1 sat ( $168,2 \pm 7,34 \mu\text{mol/l}$ ), 6 sati ( $232,4 \pm 28,55 \mu\text{mol/l}$ ), 8 sati ( $236,9 \pm 39,86 \mu\text{mol/l}$ ), 12 sati ( $166,8 \pm 6,71 \mu\text{mol/l}$ ) i 24 sata ( $139,7 \pm 4,87 \mu\text{mol/l}$ ) nakon primjene GTN statistički su značajno većih koncentracija nitrata u odnosu na kon-

trolnu skupinu. Skupina kojoj je koncentracija određena 3 sata ( $113,2 \pm 7,41$ ,  $n = 15$ ) nakon primjene aktivne tvari nije statistički značajno različita u odnosu na kontrolnu skupinu.

**Petnaest minuta** nakon primjene GTN koncentracija nitrata statistički je značajno viša nego u skupini koja je analizirana 3 sata nakon primjene aktivne tvari, a niža od skupine analizirane nakon 8 sati. Ne postoji statistički značajna razlika između ove skupine i skupine analizirane 1 sat, 6 sati, 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN. Odnos prema kontrolnoj skupini analiziran je ranije.

Koncentracija nitrata u skupini **1 sat** nakon primjene GTN je značajno viša nego u skupini analiziranoj 3 sata nakon primjene aktivne tvari, a značajno je niža nego u skupinama analiziranim nakon 6 i 8 sati. Ne postoji statistički značajna razlika između te skupine i skupine analizirane nakon 12 sati i 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta analiziran je ranije.

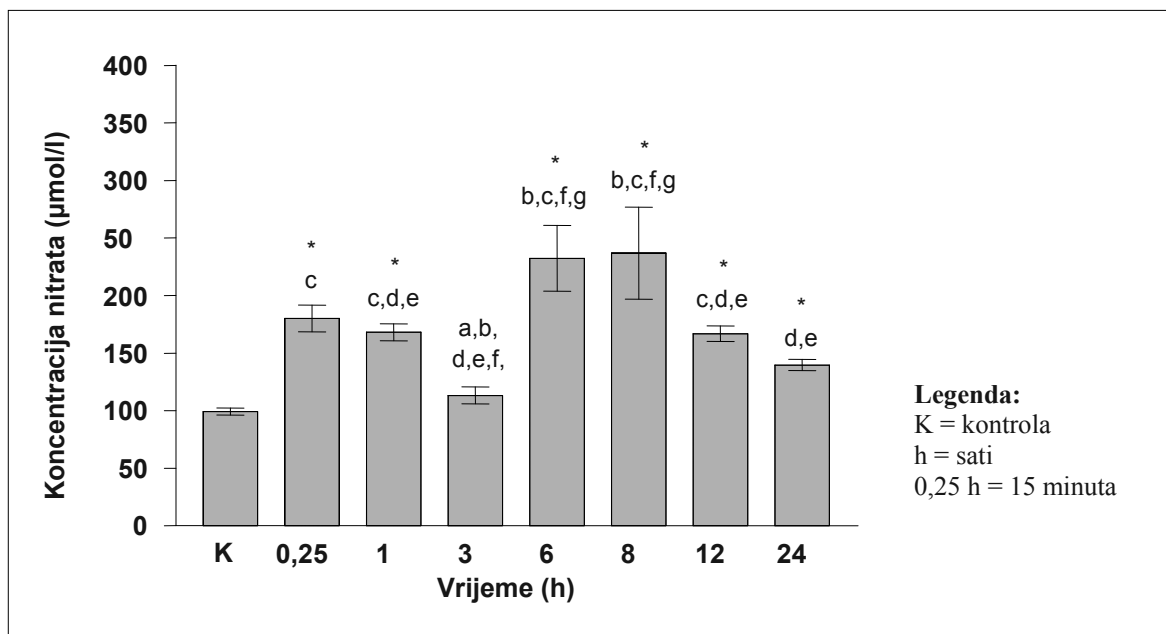
Skupina kojoj je serum analiziran **3 sata** nakon primjene GTN pokazala je koncentraciju nitrata koja je statistički značajno niža od skupine analizirane nakon 6 sati, 8 sati i 12 sati. Nije statistički značajno različita od skupine analizirane nakon 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta i 1 sat analiziran je ranije.

U skupini analiziranoj **6 sati** nakon primjene GTN nalazimo statistički značajno višu koncentraciju nitrita i nitrata u odnosu na skupine koje su analizirane 12 sati i 24 sata dok je statistički neznačajna u odnosu na skupinu analiziranu nakon 8 sati. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat i 3 sata analiziran je ranije.

Skupina analizirana **8 sati** nakon primjene GTN pokazuje statistički značajno više koncentracije nitrita i nitrata u odnosu na skupine analizirane nakon 12 sati i 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata i 6 sati analiziran je ranije.

Skupina koja je analizirana **12 sati** nakon primjene GTN statistički nije značajno različita od skupine analizirane nakon 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati i 8 sati analiziran je ranije.

Odnos skupine koja je analizirana **24 sata** nakon primjene aktivne tvari prema ostalim skupinama analiziran je ranije (slika 4).



**Slika 4. Koncentracija ( $\mu\text{mol/l}$ ) nitrata u serumu šarana u kontrolnoj skupini i nakon intraperitonealne primjene 1 mg/kg gliceriltrinitrata (15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata).**

Okomite linije predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine.

(\*) u odnosu na kontrolu (K) ( $p < 0,05$ ); (a) u odnosu na 0,25 h ( $p < 0,05$ ); (b) u odnosu na 1 h ( $p < 0,05$ ); (c) u odnosu na 3 h ( $p < 0,05$ ); (d) u odnosu na 6 h ( $p < 0,05$ ); (e) u odnosu na 8 h ( $p < 0,05$ ); (f) u odnosu na 12 h ( $p < 0,05$ ); (g) u odnosu na 24 h ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3. Koncentracija serumskih nitrita

Koncentracija nitrita značajno je niža u odnosu na koncentraciju nitrata, a dinamika promjene koncentracije tijekom vremena donekle je različita od one za ukupne nitrite i nitrate te same nitrate.

**Kontrolna skupina** ( $9,82 \pm 3,02 \mu\text{mol/l}$ ) nije statistički značajno različita u odnosu na ispitivane skupine: skupinu analiziranu 15 minuta ( $7,95 \pm 2,92 \mu\text{mol/l}$ ), 1 sat ( $5,52 \pm 0,78 \mu\text{mol/l}$ ), 3 sata ( $14,28 \pm 2,49 \mu\text{mol/l}$ ), 6 sati ( $4,01 \pm 1,01 \mu\text{mol/l}$ ), 8 sati ( $16,17 \pm 2,97 \mu\text{mol/l}$ ), 12 sati ( $3,61 \pm 0,77 \mu\text{mol/l}$ ) i 24 sata ( $5,55 \pm 0,85 \mu\text{mol/l}$ ) nakon primjene GTN.

Ubrzo nakon primjene GTN (**15 minuta**) koncentracija nitrita također nije značajno različita od skupina analiziranih 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata nakon primjene te tvari. Odnos prema kontrolnoj skupini analiziran je ranije.

Skupina kojoj je koncentracija nitrita određena **1 sat** nakon primjene GTN statistički je značajno niža od skupina koje su analizirane nakon 3 sata i 8 sati. Prema skupinama analiziranim nakon 6 sati, 8 sati 12 sati i 24 sata ova skupina ne pokazuje statističku značajnost. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta analiziran je ranije.

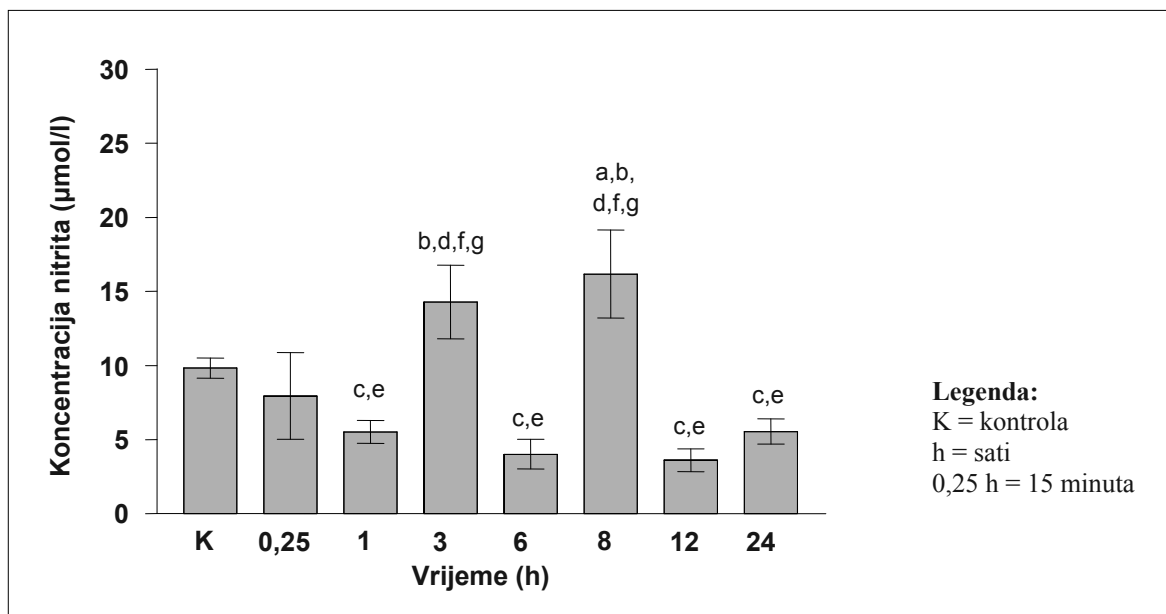
Skupina koja je analizirana **3 sata** nakon primjene GTN pokazala je statistički značajno veću koncentraciju nitrita u odnosu na skupine koje su analizirane nakon 6 sati, 12 sati i 24 sata. Ista skupina nije pokazala značajno različite koncentracije nitrita od tretirane skupine koja je analizirana nakon 8 sati. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta i 1 sat analiziran je ranije.

Skupina koja je određena **6 sati** nakon primjene GTN statistički je značajno niže koncentracije nitrita u odnosu na skupinu koja je analizirana nakon 8 sati. Prema tretiranim skupinama koje su analizirane nakon 12 sati i 24 sata, ova skupina nije pokazala statistički značajnu razliku. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat i 3 sata analiziran je ranije.

Maksimalne vrijednosti koncentracije nitrita zamijetili smo u skupini koja je analizirana **8 sati** nakon tretiranja, a vrijednosti su statistički značajno veće u odnosu na skupine koje su analizirane 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata i 6 sati analiziran je ranije.

Skupina analizirana **12 sati** nakon primjene GTN statistički je neznčajna u odnosu na tretiranu skupinu koja je analizirana nakon 24 sata. Odnos prema kontrolnoj skupini i skupini koja je analizirana nakon 15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati i 8 sati analiziran je ranije.

Odnos skupine koja je analizirana **24 sata** nakon primjene aktivne tvari prema ostalim skupinama analiziran je ranije (slika 5).



**Slika 5. Koncentracija (µmol/l) nitrita u serumu šarana u kontrolnoj skupini i nakon intraperitonealne primjene 1 mg/kg gliceriltrinitrata (15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata).**

Okomite linije predstavljaju standardnu pogrešku aritmetičke sredine.

(a) u odnosu na 0,25 h ( $p < 0,05$ ); (b) u odnosu na 1 h ( $p < 0,05$ ); (c) u odnosu na 3 h ( $p < 0,05$ ); (d) u odnosu na 6 h ( $p < 0,05$ ); (e) u odnosu na 8 h ( $p < 0,05$ ); (f) u odnosu na 12 h ( $p < 0,05$ ); (g) u odnosu na 24 h ( $p < 0,05$ ).

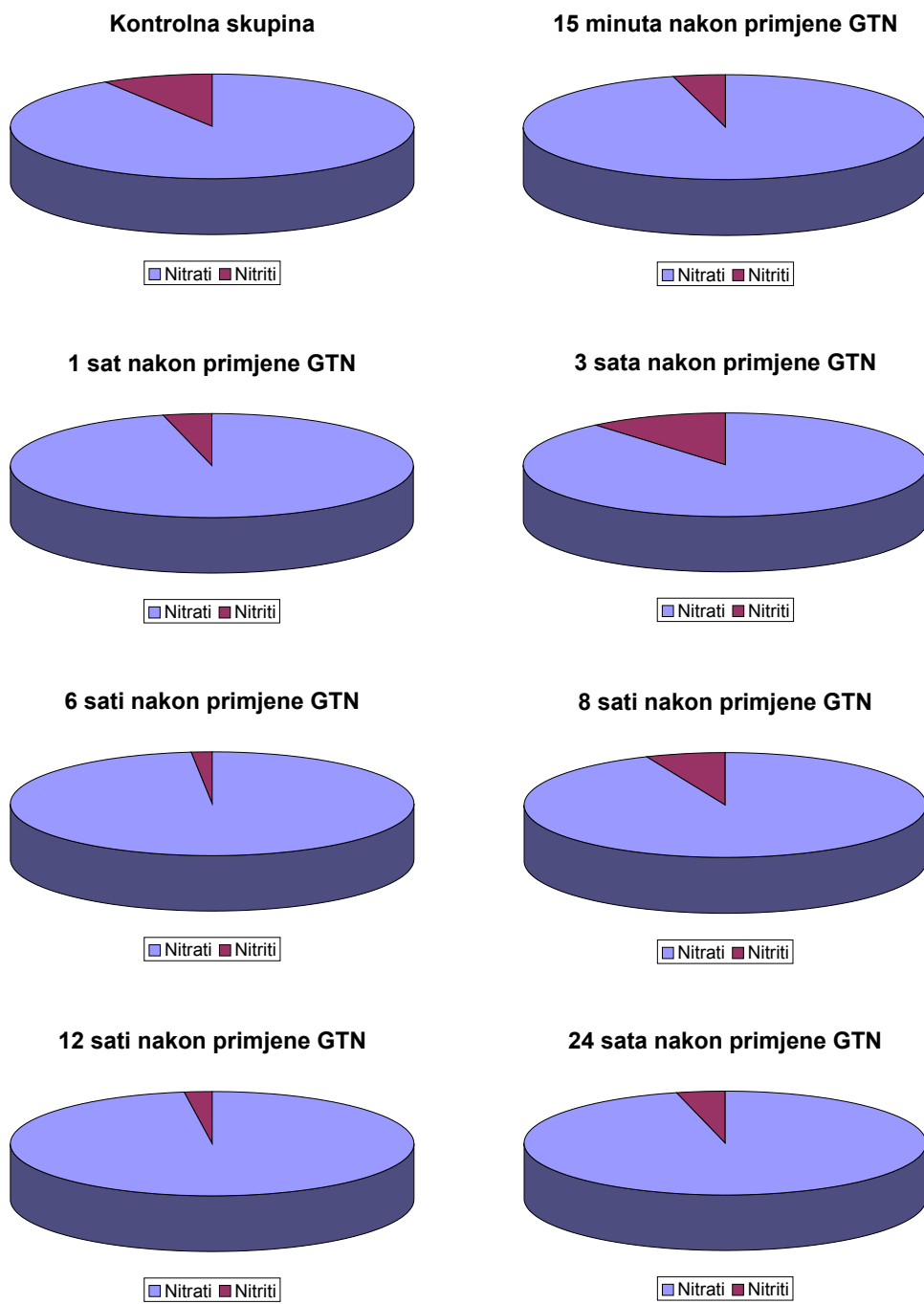
#### 4.1.4. Udjel nitrata i nitrita u ukupnim nitratima i nitritima

Udjel nitrata u ukupnoj koncentraciji nitrita i nitrata u kontroli i svim ispitivanim vremenima nakon primjene GTN mnogo je veći od udjela nitrita i iznosi od 89,1% 3 sata nakon primjene GTN do 96,8% u skupini koja je analizirana 1 sat nakon primjene aktivne tvari. Udjel nitrita iznosi 6,0% u skupini koja je analizirana 24 sata nakon primjene GTN do najviše 10,9% u skupini analiziranoj 3 sata nakon primjene GTN (tablica 1, slika 6).

**Tablica 1. Udjel nitrata i nitrita u ukupnoj koncentraciji nitrata i nitrita u kontrolnoj skupini i u skupinama tretiranima s 1 mg/kg GTN.** Navedena vremena u minutama i satima označavaju vrijeme uzimanja uzorka seruma šarana nakon primjene aktivne tvari.

Skupine	% nitrati	% nitriti
Kontrola	91,0	9,0
15 minuta	95,8	4,2
1 sat	96,8	3,2
3 sata	89,1	10,9
6 sati	91,0	9,0
8 sati	92,8	7,2
12 sati	93,6	6,4
24 sata	94,0	6,0



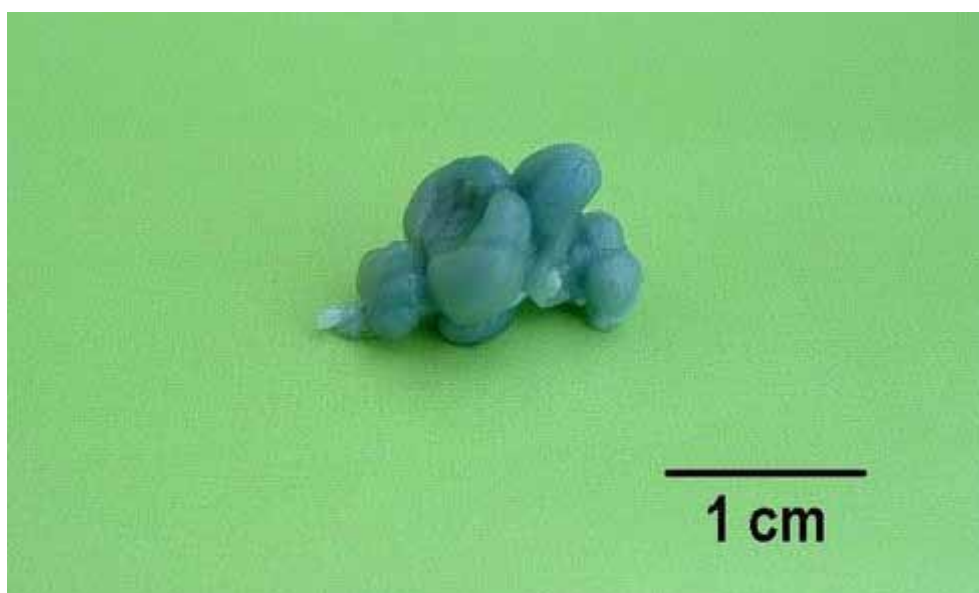


**Slika 6.** Udjel nitrata (plavo) i nitrita (ljubičasto) u ukupnim nitratima i nitritima u kontrolnoj skupini i u skupinama tretiranima nakon 15 min, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata.

## 4.2. Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evans plavila

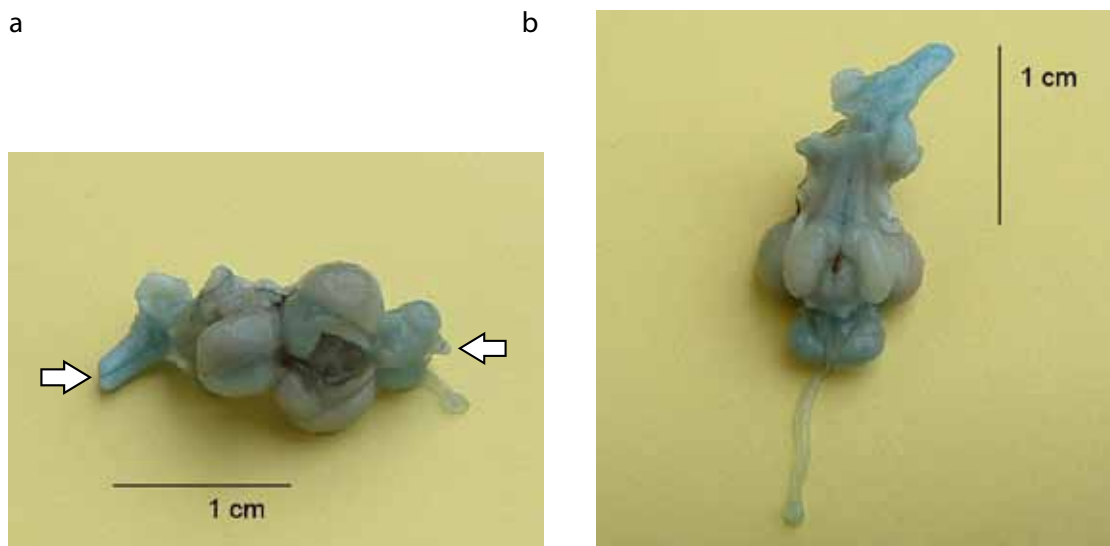
### 4.2.1. Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na makroskopskom preparatu mozga šarana

U tablicama (2a-d) prikazan je stupanj intenziteta obojenja Evans plavilom po pojedinim skupinama (kontrolna skupina i skupine 6 sati, 12 sati i 24 sata nakon djelovanja 1 mg/kg GTN) i po pojedinim dijelovima mozga. Svi dijelovi mozga šarana (*telencephalon*, *diencephalon*, *mesencephalon*, *metencephalon* i *columna vertebralis*) pokazali su statistički značajan stupanj intenziteta obojenja ( $p < 0,05$ ) skupine koja je analizirana 6 sati nakon primjene aktivne tvari (slika 7) u odnosu na kontrolnu skupinu te u odnosu na skupine koje su analizirane 12 sati (slika 8a i b) i 24 sata nakon primjene GTN. Navedeni rezultati upućuju na to da je 6 sati nakon primjene GTN krvno-moždana barijera propusna za Evans plavilo, odnosno albumin, dok je 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN krvno-moždana barijera ponovno nepropusna. Blago statistički neznačajno obojenje pojedinih dijelova mozga (*telencephalon*, *diencephalon*, *columna vertebralis*) u skupinama životinja koje su pokazale nepropusnu krvno-moždanu barijeru (kontrolna skupina, tretirane skupine analizirane nakon 12 sati i 24 sata) upućuje na istjecanje boje kroz područje cirkumventrikularnih organa, a to su područja mozga kojima nedostaje krvno-moždana barijera.



**Slika 7. Mozak šarana obojen in vivo Evansovim plavilom 6 sati nakon tretmana 1 mg gliceriltrinitrata/kg tjelesne mase.**

Svi dijelovi mozga šarana pokazuju stupanj obojenja »3«.



**Slika 8. a.** Mozak šarana obojen in vivo Evansovim plavilom 12 sati nakon tretmana 1 mg gliceriltrinitrata/kg tjelesne mase (dorzalno). Strelica lijevo označava leđnu moždinu koja je pokazala stupanj obojenja »2«, strelica desno označava prednji mozak koji je pokazao stupanj obojenja »1«. Ostali dijelovi mozga vidljivi na ovoj slici pokazali su stupanj obojenja »0«. **b.** Isti uzorak mozga postavljen ventralno.

**Tablice 2a, b, c, d.** Stupanj intenziteta obojenja od »0« (neobojenje) do »3« (maksimalno obojenje) pojedinih dijelova mozga šarana (*telencephalon*, *diencephalon*, *mesencephalon*, *metencephalon* i *columna vertebralis*) u kontrolnoj skupini i u skupinama koje su primile GTN.

n = broj ispitanih životinja u skupini.

Područje mozga n = 6	Stupanj obojenja			
	0	1	2	3
<i>Telencephalon</i>	5	1	0	0
<i>Diencephalon</i>	3	3	0	0
<i>Mesencephalon</i>	6	0	0	0
<i>Metencephalon</i>	6	0	0	0
<i>Columna vertebralis</i>	4	2	0	0

**Tablica 2a.** Intenzitet obojenja Evansovim plavilom pojedinih dijelova mozga u kontrolnoj skupini životinja.

Područje mozga n = 7	Stupanj obojenja			
	0	1	2	3
<i>Telencephalon</i>	0	2	1	4
<i>Diencephalon</i>	0	0	0	7
<i>Mesencephalon</i>	0	3	4	0
<i>Metencephalon</i>	0	1	4	2
<i>Columna vertebralis</i>	0	0	0	7

**Tablica 2b.** Intenzitet obojenja Evansovim pravilom pojedinih dijelova mozga u skupini životinja žrtvovanoj 6 sati nakon tretmana s 1 mg GTN/kg tjelesne mase.

Područje mozga n = 7	Stupanj obojenja			
	0	1	2	3
<i>Telencephalon</i>	5	2	0	0
<i>Diencephalon</i>	2	4	1	0
<i>Mesencephalon</i>	7	0	0	0
<i>Metencephalon</i>	6	1	0	0
<i>Columna vertebralis</i>	2	5	0	0

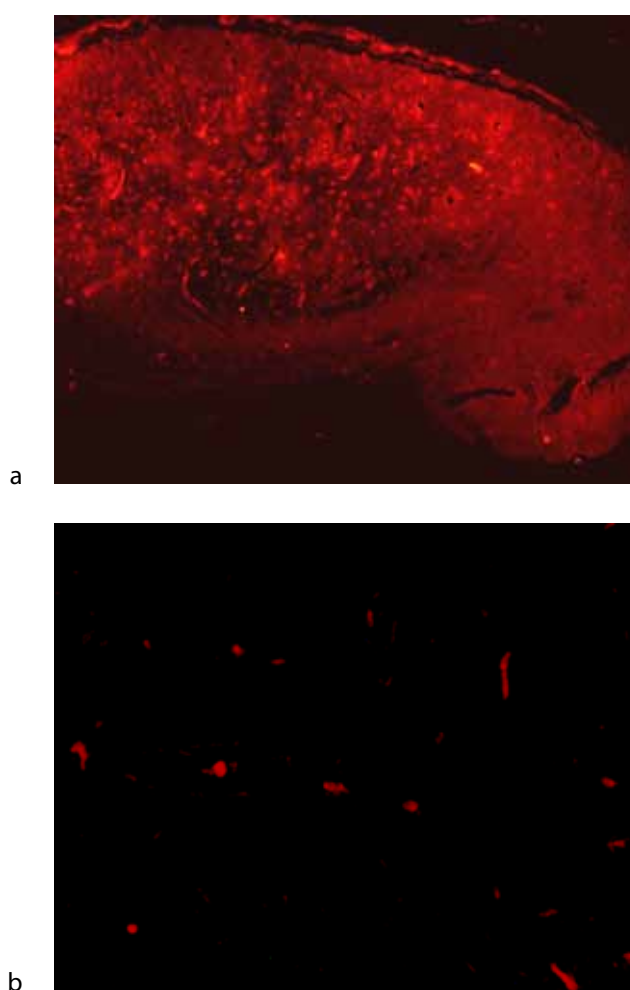
**Tablica 2c.** Intenzitet obojenja Evansovim pravilom pojedinih dijelova mozga u skupini životinja žrtvovanoj 12 sati nakon tretmana s 1 mg GTN/kg tjelesne mase.

Područje mozga n = 8	Stupanj obojenja			
	0	1	2	3
<i>Telencephalon</i>	7	1	0	0
<i>Diencephalon</i>	1	7	0	0
<i>Mesencephalon</i>	7	1	0	0
<i>Metencephalon</i>	8	0	0	0
<i>Columna vertebralis</i>	5	3	0	0

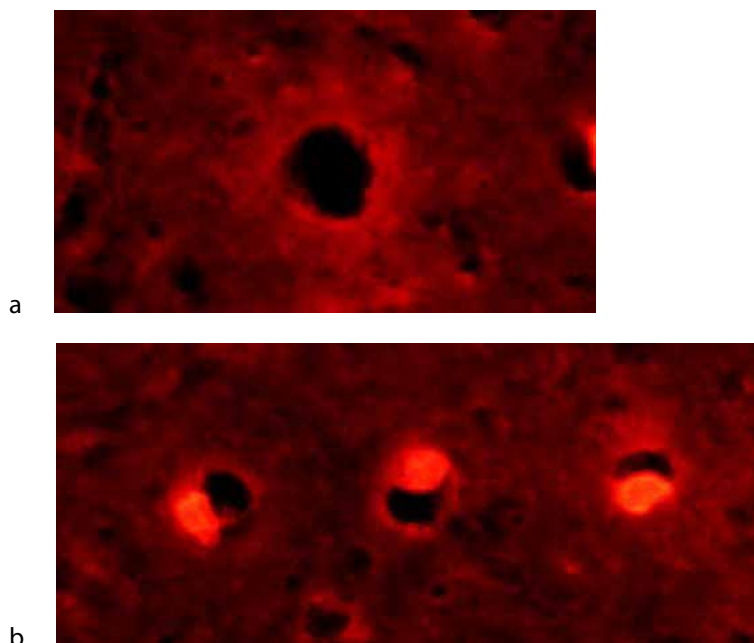
**Tablica 2d.** Intenzitet obojenja Evansovim pravilom pojedinih dijelova mozga u skupini životinja žrtvovanoj 24 sata nakon tretmana s 1 mg GTN/kg tjelesne mase.

#### 4.2.2. *Rezultati utvrđivanja propusnosti krvno-moždane barijere na mikroskopskom preparatu mozga šarana*

U svim preparatima mozga šarana (7 životinja, po 3 preparata od svakog uzorka mozga) koji su obojeni Evans plavilom *in vivo* 6 sati nakon primjene GTN u dozi od 1 mg/kg tjelesne težine došlo je do znakova istjecanja boje u perikapilarni prostor, što upućuje na povećano propusnu krvno-moždanu barijeru (slika 9a, 10a i 10b). U preparatima ostale 3 skupine životinja (životinje kojima je *in vivo* aplicirano Evans plavilo 12 i 24 sata nakon primjene GTN – po 8 životinja i kontrolna skupina – 6 životinja) nije došlo do značajnog istjecanja boje vidljive pod fluorescentnim mikroskopom kao crveno obojenje (slika 9b).



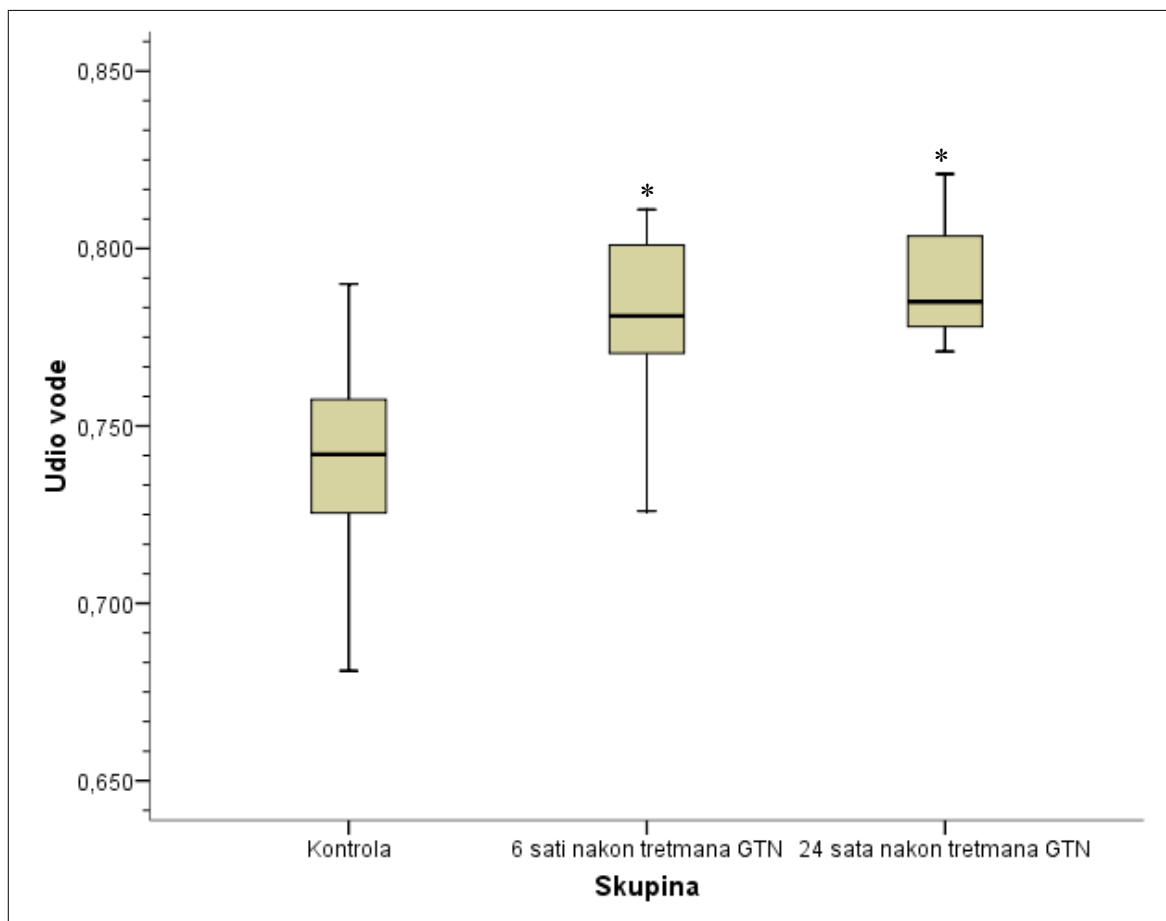
**Slika 9. Utvrđivanje propusnosti krvno-moždane barijere na temelju istjecanja Evans plavila na mikroskopskom preparatu mozga gledanom pod fluorescentnim mikroskopom. a. Preparat malog mozga obojen Evansovim plavilom 6 sati nakon primjene 1 mg/kg tjelesne težine GTN. Crveno obojenje upućuje na istjecanje albumina/Evansovog plavila iz kapilara, odnosno povećanje propusnosti krvno-moždane barijere. Povećanje 100 x. b. Preparat olfaktornog bulbusa obojen Evansovim plavilom 12 sati nakon primjene 1 mg/kg tjelesne težine GTN. Vidi se obojenje kapilara bez značajnog istjecanja boje u perikapilarni prostor. Povećanje 400 x.**



**Slika 10. a. Kapilara propusna za Evans plavilo.** Oko kapilare vidljivo je svijetlo crveno obojenje koje upućuje na to da je došlo do istjecanja boje u perikapilarni prostor. Povećanje 800 x. **b. Eritrociti u kapilarama.** U kapilarama se vide eritrociti jarko crvenog obojenja. Povećanje 800 x.

### 4.3. Rezultati utvrđivanja moždanog edema gravimetrijskom metodom

U kontrolnoj skupini šarana udjel mokre tvari mozga iznosi  $M = 74.2\%$  ( $IQR = 72.2\% - 76.1\%$ ). U skupini tretiranoj s 1 mg GTN/kg tjelesne mase šarana koja je žrtvovana nakon 6 sati, udjel mokre tvari mozga iznosi  $78.1\%$  ( $77.0\% - 80.2\%$ ). U skupini tretiranoj s 1 mg GTN/kg tjelesne mase šarana, koja je žrtvovana nakon 24 sata, udjel mokre tvari mozga iznosi  $78.5\%$  ( $77.5\% - 80.4\%$ ) (slika 11). Između kontrolne skupine i skupine analizirane 6 sati nakon primjene GTN postoji statistički značajna razlika, kao i između kontrolne skupine i skupine analizirane 24 sata nakon primjene GTN ( $p < 0,05$ ), dok nema značajne razlike između dvije skupine tretirane s GTN. Rezultati potvrđuju postojanje moždanog edema nakon 6 sati i nakon 24 sata od primjene GTN.



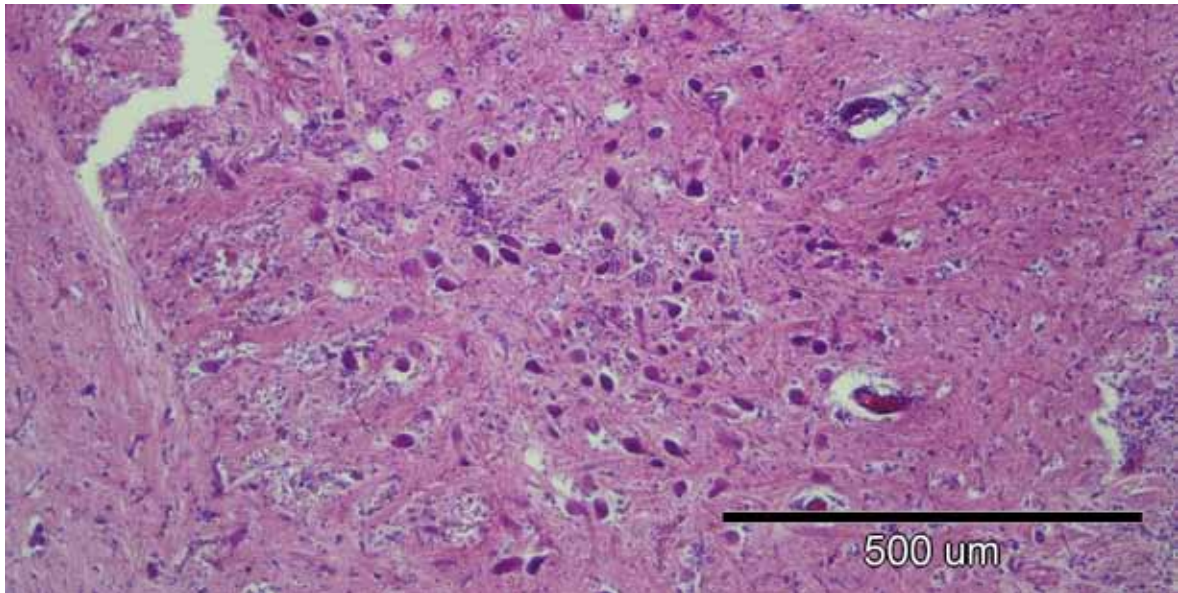
**Slika 11. Utvrđivanje moždanog edema gravimetrijskom metodom.**

Slika pokazuje statistički značajno povećanje udjela vode u mozgovima šarana 6 sati i 24 sata nakon primjene 1 mg GTN/kg tjelesne mase ( $n = 15$  u svim skupinama). Vrijednosti su izražene kao median i interkvartilni raspo.  $p < 0,05$  u odnosu na kontrolnu skupinu.

#### **4.4. Rezultati utvrđivanja moždanog edema i vazodilatacije na hemalaun-eozin obojenim preparatima mozga pod svjetlosnim mikroskopom**

Nalazi histološkog pregleda preparata mozga šarana 6 sati i 24 sata poslije tretmana s 1 mg/kg GTN, nakon bojenja prema standardnom HE protokolu, u svih životinja pokazuju znakove vazodilatacije i edema. U svih tretiranih životinja u oba vremena nakon tretmana ovom tvari vidi se vakuolizacija ili »promjene poput spužve«, perivaskularna i pericelularna vakuolizacija kao i svijetli izgled tkiva (slika 12). Također su difuzno vidljivi znaci kongestije i dilatacije krvnih žila (slika 13), kao i razasuti diskretni areali perivaskularne mononuklearne infiltracije (slika 14). Patohistološki nalaz kontrolne skupine životinja je uredan.





**Slika 12. Vazogeni moždani edem u mozgu šarana 6 sati nakon primjene GTN.**

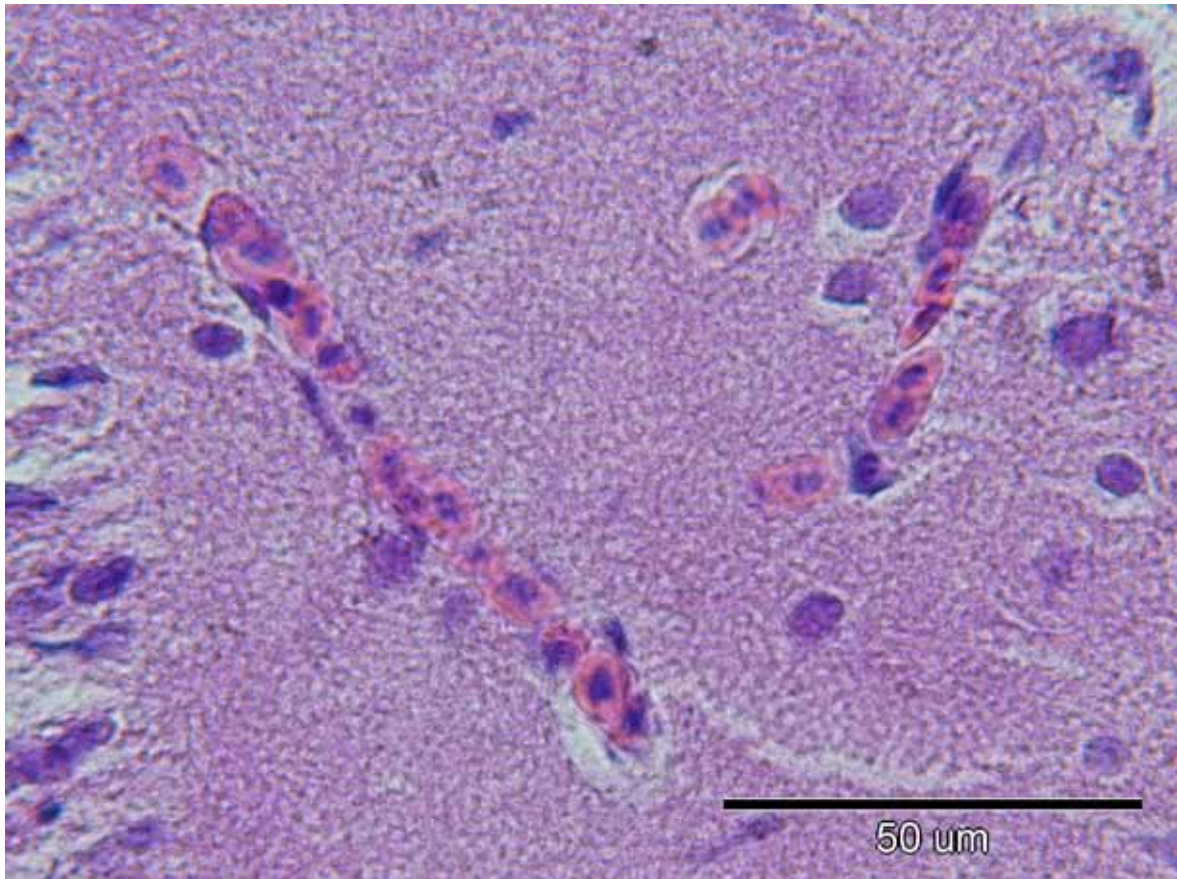
U pericelularnom i perivaskularnom tkivu vide se prazni prostori, »izgled poput spužve«. Povećanje 400 x.



**Slika 13. Vazodilatacija i edem u mozgu životinja 6 sati nakon primjene GTN.**

Detalj krvnih žila mozga na većem povećanju. Vide se dilatirane krvne žile koje su pune krvi sa stanjenim, elongiranim, ali regularnim endotelnim stanicama. U perivaskularnom tkivu vide se znaci edema, pericelularni i perivaskularni prazni prostori. Povećanje 800 x.





**Slika 14. Infiltracija mononuklearnim stanicama u mozgu šarana 24 sata nakon primjene GTN.**  
Neposredno uz moždane kapilare vidljiva je infiltracija mononuklearnim stanicama. Povećanje 1000 x.

## 4.5. Utvrđivanje povezanosti ispitivanih varijabli

### 4.5.1. *Povezanost koncentracije nitrata i nitrita sa stupnjem obojenosti Evansovim plavilom*

Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita u pozitivnoj je statističkoj korelaciji s najintenzivnijim stupnjem obojenja Evansovim plavilom,  $r = 0,629$  (dobra povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita u negativnoj je statističkoj korelaciji s najmanjim stupnjem obojenja Evansovim plavilom,  $r = -0,540$  (dobra povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija nitrata u pozitivnoj je statističkoj korelaciji s najintenzivnijim stupnjem obojenja Evansovim plavilom,  $r = 0,629$  (dobra povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija nitrata u negativnoj je statističkoj korelaciji s najmanjim stupnjem obojenja Evansovim plavilom,  $r = -0,501$  (dobra povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija nitrita nije u statistički značajnoj korelaciji sa stupnjem obojenja Evansovim plavilom (tablica 3).

Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita i samih nitrata pokazuje dobru korelaciju s najvećim (pozitivnu) i najmanjim (negativnu) stupnjem obojenja Evansovim plavilom, što znači da je koncentracija metabolita NO značajno povezana s propusnošću krvno-moždane barijere. Povećanjem koncentracije nitrita i nitrata povećava se otvorenost krvno-moždane barijere.

#### ***4.5.2. Povezanost koncentracije nitrata i nitrita s udjelom mokre tvari u mozgu***

Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita u pozitivnoj je statističkoj korelaciji s udjelom mokre tvari u mozgu,  $r = 0,497$  (slaba povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija nitrata u pozitivnoj je statističkoj korelaciji s udjelom mokre tvari u mozgu,  $r = 0,493$  (slaba povezanost),  $p < 0,01$ .

Koncentracija nitrita u statističkoj je negativnoj korelaciji s udjelom mokre tvari u mozgu,  $r = - 0,392$  (slaba povezanost),  $p < 0,05$  (tablica 3).

Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita i koncentracija nitrata pokazuje statistički značajnu, ali slabu korelaciju s udjelom mokre tvari, tj. s postojanjem moždanog edema. Statistički značajna, no slaba povezanost tih varijabli u usporedbi s također statistički značajnom, no dobrom povezanosti koncentracije nitrita i nitrata i stupnjem obojenja Evansovim plavilom može se objasniti razlikama u obrascu ponašanja ispitivanih varijabli 24 sata nakon primjene GTN. Naime, u kontrolnoj skupini najmanja je koncentracija nitrita i nitrata i najmanji je udjel mokre tvari, u 6. satu nakon tretmana GTN povećava se koncentracija nitrita i nitrata i udjel mokre tvari, u 24. satu smanjuje se koncentracija nitrita i nitrata, a udjel mokre tvari ostaje povećan.

Koncentracija nitrita značajno je niža od koncentracije ukupnih nitrata i nitrita te koncentracije nitrata, i ne slijedi iste pravilnosti.

#### ***4.5.3. Povezanost stupnja obojenosti Evansovim plavilom s udjelom mokre tvari***

Stupanj obojenja Evansovim plavilom nije u statistički značajnoj korelaciji s udjelom mokre tvari (tablica 3).

Statistički neznačajna povezanost ovih varijabli u usporedbi sa statistički značajnom povezanosti koncentracije nitrita i nitrata i stupnja obojenja Evansovim plavilom se može objasniti slabijom povezanošću stupnja obojenosti Evans plavilom s udjelom mokre tvari u 24. satu nakon tretmana GTN. Naime, u kontrolnoj skupini najmanji je intenzitet obojenosti Evans plavilom i najmanji udio mokre tvari, u 6. satu nakon tretmana GTN povećava se intenzitet obojenosti Evansovim plavilom i udio mokre tvari, u 24. Satu smanjuje se intenzitet obojenja Evansovim plavilom, dok udio mokre tvari ostaje povećan.

**Tablica 3. Povezanost koncentracije ukupnih nitrata i nitrita, nitrata i nitrita, stupnja obojenosti Evansovim plavilom i udjela mokre tvari u mozgu.** U tablici je naveden Spearmanov koeficijent korelacije r.

	Stupanj obojenosti				Udio mokre tvari
	»0«	»1«	»2«	»3«	
<b>Koncentracija ukupnih nitrata i nitrita</b>	-0,540**	-0,032	0,248	0,629**	0,497**
<b>Koncentracija nitrata</b>	-0,501**	-0,073	0,241	0,629**	0,493**
<b>Koncentracija nitrita</b>	-0,066	0,000	0,038	0,069	-0,392*
<b>Stupanj obojenosti</b>	»0«				-0,262
	»1«				0,072
	»2«				0,205
	»3«				0,156

\*\* razina značajnosti  $p < 0,01$

\* razina značajnosti  $p < 0,05$

## 5. RASPRAVA

U ovom smo istraživanju ispitivali utjecaj gliceriltrinitrata na promjenu propusnosti krvno-moždane barijere u šarana. U svih ispitivanih vrsta sisavaca donori dušikovog (II) oksida izazvali su povećanje propusnosti krvno-moždane barijere (107, 171, 172). Histološka ispitivanja uputila su na prisutnost NOS u središnjem živčanom sustavu svih kralježnjaka, no uloga i funkcija NO nije precizno utvrđena, poglavito u ektodermnih vrsta (164). Ne zna se kako NO djeluje na propusnost krvno-moždane barijere u nižih kralježnjaka. Budući da je zbog njegova vrlo kratkog poluživota teško izravno odrediti koncentraciju NO, uobičajeno se mjere koncentracije njegovih stabilnih metabolita, nitrita i nitrata. Naše istraživanje, u kojem smo određivali koncentraciju ukupnih nitrata i nitrita te samih nitrata u serumu šarana, pokazalo je bifazični obrazac promjene sa statistički značajnim povećanjem koncentracija 15 minuta i 1 sat nakon primjene GTN, a zatim su se koncentracije snizile na razine kao u kontrolnih životinja (slika 3 i 4). Najviše koncentracije izmjerene su 6 i 8 sati nakon primjene GTN, dok se nakon 12 sati i 24 sata koncentracije vraćaju na bazalne vrijednosti. Koncentracija nitrita u serumu šarana značajno je niža od koncentracije nitrata, a tretirane skupine (1 mg GTN/kg tijekom 15 minuta, 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata) ne pokazuju statistički značajno različite koncentracije u odnosu na kontrolnu skupinu (slika 5). Iako bi koncentracije nitrita i nitrata trebale biti identične, s obzirom na to da se nitrati pretvaraju u nitrite, dokazano je da je *in vivo* gotovo uvijek prisutna manja ili veća razlika u koncentracijama zbog nepotpune redukcije u nitrite (173). Budući da je, prema našim rezultatima kao i prema do sada objavljenim drugim istraživanjima, omjer nitrita naspram nitrata varijabilan i nepredvidljiv u biološkim tekućinama, kao najbolji pokazatelj nastajanja NO pokazala se ukupna koncentracija nitrata i nitrita (tablica 1, slika 6) (174). GTN je organski nitrat s kratkim poluživotom u plazmi (1 - 4 min), no prema nalazima analiziranih uzoraka mozga štakora u usporedbi s plazmom dokazano je da mu poluživot može doseći i do 2 sata

(175, 176). Metabolizira se u NO unutar stanice pomoću glutathion S-transferaze, citokroma P-450 i tiolne reakcije (137). Na temelju nalaza povećanja koncentracije ukupnih nitrata i nitrita nakon 6 sati i 8 sati od primjene donora NO, mislimo da je došlo do endogene sinteze NO koju potiče GTN, a ona je potisnuta 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN. Rezultati naših istraživanja i istraživanja provedenih do sada upućuju na to da primjena donora NO može dovesti do indukcije sinteze endogenog NO (177, 178). NO se endogeno sintetizira s pomoću NO sintaze koristeći L-arginin kao supstrat (179). Opaženi bifazični obrazac promjene izmjerene koncentracije NO nakon primjene GTN u skladu je s ranije objavljenim istraživanjima (180, 181). Istraživanje slično našem u kronološkom smislu, no izvedeno na višim kralježnjacima, pokazalo je povećanu ekspresiju iNOS mRNA 2 sata nakon infuzije GTN, a koja je još snažnija 4 sata, 6 sati i 10 sati nakon primjene GTN (140).

Rezultati našeg pokusa u skupini životinja koje su žrtvovane 6 sati nakon primjene GTN pokazali su istjecanje Evansovog plavila, što upućuje na povećanu propusnost krvno-moždane barijere. S pomoću Evans plavila, azo boje koja ima veliki afinitet za serumski albumin i uobičajeno se koristi za intravitalnu procjenu propusnosti krvno-moždane barijere na makromolekule, pokazali smo na makroskopskim preparatima mozga intenzivnu plavu obojenost (slika 7, 8a i b), odnosno crveno obojenje vidljivo fluorescentnim mikroskopom na mikroskopskim preparatima (9a i b, 10a i b), što je statistički značajno različito u odnosu na kontrolnu skupinu (tablica 2a, b, c i d). S druge strane, statistički nije bilo značajne razlike između intenziteta obojenosti pojedinih dijelova mozga u ovoj skupini životinja (tablica 2a, b, c i d). U skupini životinja koje su analizirane 12 sati i 24 sata nakon primjene Evansovog plavila nije došlo do statistički značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu životinja, što upućuje na ponovno nepropusnu krvno-moždanu barijeru, odnosno uspostavu njezine normalne funkcije (8a i b). U nekih tretiranih životinja, kao i u kontrolnoj netretiranoj skupini, primijećeno je blago obojenje pojedinih dijelova središnjeg živčanog sustava, što upućuje na to da je došlo do istjecanja albumina na području cirkumventrikularnih organa u kojima nedostaje krvno-moždana barijera (8a i b). U teleosta su poznati cirkumventrikularni organi hipotalamsko-hipofizni sustav, paraventricularni organ, posteriorni recesusni organ, posteriorna recesusna jezgra i *succus vasculosus*, a u nekih teleosta, primjerice šarana, urofiza (182, 183, 184).

Rezultati istraživanja koji se odnose na moždani edem pokazuju znakove edema u obje tretirane skupine, tj. 6 sati i 24 sata nakon primjene GTN (slika 11, 12, 13 i 14). Usprokos zatvaranju krvno-moždane barijere, što je dokazano nepropusnošću za molekule albumina koje su vezane na Evansovo plavilo, suvišni dio tekućine ostaje zarobljen u intersticijskom prostoru mozga i nakon 24 sata. Na sisavcima su provedena brojna istraživanja koja svje-

doče o povezanosti povećane propusnosti krvno-moždane barijere i nastanka cerebralnog edema s povećanom sintezom NO (185, 186, 187). U ovom smo radu pokazali da postoji statistički značajna pozitivna povezanost između koncentracije ukupnih nitrata i nitrita u serumu šarana i propusnosti krvno-moždane barijere (stupanj obojenja Evansovim plavilom) te između koncentracije ukupnih nitrata i nitrita i postojanja moždanog edema (udjel mokre tvari u mozgu) (tablica 3). Ipak, postavke našeg istraživanja ne daju preciznu informaciju o tome je li uloga NO u nastanku moždanog edema neizravna, u smislu da edem nastaje kao posljedica otvaranja krvno-moždane barijere pod utjecajem NO ili NO izravno sudjeluje u nastanku moždanog edema. Istraživanja Louina i suradnika pokazuju da primjena iNOS inhibitora smanjuje neurološki deficit, ali ne i cerebralni edem koji je nastao kao posljedica traumatskog oštećenja mozga (188, 189). Rezultati takvih istraživanja ne podupiru izravnu ulogu NO u nastanku moždanog edema koja bi bila neovisna o njegovom utjecaju na otvaranje krvno-moždane barijere.

Molekula NO, koju sintetizira endotelna NOS, korisna je u modelu traumatskog oštećenja mozga i žarišne moždane ishemije povećavajući protok krvi u penumbri (190, 191). Na prvi pogled kontradiktorna uloga NO u fiziologiji i patofiziologiji kralježnjaka samo povrđuje da je NO posvuda prisutna molekula s brojim funkcijama u organizmu. Rezultati našeg istraživanja koje se odnosi na cerebralnu vazodilataciju nakon primjene donora NO, kao i mnogih drugih istraživanja, potvrđuju poznatu ulogu NO u povećanju cerebralnog protoka u viših i nižih kralježnjaka.

Evolucijski dokazi upućuju na to da je potreba suptilne ionske homeostaze koja okružuje centralne sinapse glavni selektivni pritisak koji je doveo do usavršavanja sustava barijere središnjega živčanog sustava (192). Propusnost krvno-moždane barijere može se modulirati brojnim signalnim procesima. Modulirajući agensi mogu potjecati iz krvi ili iz stanica koje su povezane s krvnim žilama. NO je prisutan kao važna molekula u fiziologiji moždane cirkulacije, ali mu funkcija varira u ovisnosti o evolucijskom stupnju vrste. Rezultati ovog istraživanja upućuju na to da donor NO inducira povećanje propusnosti krvno-moždane barijere u šarana, vjerojatno tako da potiče sintezu peroksinitrita. Histološkim ispitivanjima utvrđena je prisutnost NO sintaze u središnjem živčanom sustavu svih istraživanih vrsta kralježnjaka, pa tako i šarana (150). Još nema dovoljno komparativnih fizioloških istraživanja koja se odnose na preciznu ulogu i funkciju NO u pojedinim nižim vrsta kralježnjaka. U svjetlu povezanosti NO i središnjega živčanog sustava ribe najviše je pozornosti posvećeno istraživanjima regulacije cerebralnog protoka (148). U ovom je radu ispitan utjecaj NO na propusnost krvno-moždane barijere u šarana, što pridonosi novim spoznajama u istraživanjima na nižim kralježnjacima.

Naše istraživanje također pokazuje da je povećana propusnost krvno-moždane barijere izazvana primjenom donora NO reverzibilna te je kao takva potencijalno primjenjiva u stanjima kada je potrebna povremena primjena određene terapijske tvari u središnji živčani sustav. U pokusnih životinja dokazana je veća kemoterapijska učinkovitost citostatika na tumore koji zahvaćaju SŽS dodavanjem donora NO. U istraživanju Konovalove i suradnika primjena ove kombinirane terapije rezultirala je značajnim povećanjem životnog vijeka miševa koji su imali leukemiju. U tom je istraživanju životni vijek miša tretiranog ciklofosfamidom i donorom NO trostruko povećan u usporedbi s miševima koji su primali sam ciklofosfamid (193). Nedavno su u preliminarnim kliničkim pokusima predložene neke terapijske strategije moždanog glioma kojima se modificiraju onkogeni u tumorskim stanicama i protok krvi u tumoru kao i bioraspoloživost antitumorskih lijekova u tumorsko tkivo, u čemu bi važnu ulogu imao NO (194). Kao važna karakteristika u istraživanjima takve vrste ističe se svojstvo NO da povećava propusnost krvno-moždane barijere. Tvari i postupci koji su se do sada istraživali u svrhu poticanja povećanja propusnosti krvno-moždane barijere jesu dimetil sulfoksid, bradikinin ili njegov stabilni snažni analog RMP-7, antitumorski agens etoposid te mehanički stresori kao što su hipertenzija i hiperkapnija, ali nijedan se nije pokazao trajno neškodljivim (195). Na temelju rezultata našeg pokusa povećanje propusnosti krvno-moždane barijere pod utjecajem NO pokazalo se reverzibilnim i vremenski predvidljivim, međutim, poznato je da u tim okolnostima neminovno dolazi do ekstravaskularnog istjecanja proteina seruma, odnosno vazogenoga moždanog edema (196, 197). Duljina vremenskog intervala u kojem je otvorena krvno-moždana barijera važan je čimbenik koji utječe na opsežnost moždanog edema (198). U uvjetima otvorenosti krvno-moždane barijere te izlaska proteina plazme u intersticijski prostor dolazi do migracije leukocita u središnji živčani sustav i razvoja upalne reakcije (199). Nastajanje moždanog edema prati povišenje tkivnog tlaka, što dovodi do smanjenja cerebralnog protoka krvi i smanjenja energetske opskrbe te do daljnjeg oštećenja tkiva.

Zbog potrebe komparativno-anatomske istraživanja i određenih prednosti u manipulaciji pojedinih životinjskih vrsta, u biomedicinskim znanstvenim istraživanjima sve se više koriste tzv. alternativni modeli. Od tih životinjskih modela u evolucijskom smislu posebna se pozornost posvećuje nižim kralježnjacima. Ribe su najraznolikija, najbrojnija i geografski najraširenija skupina kralježnjaka na Zemlji. Od 1990. godine ribe se sve više koriste u biomedicinskim istraživanjima kao model za proučavanje evolucijskog razvoja, ali i oboljenja ljudi, posebice u toksikološkim testiranjima te u akvakulturnim istraživanjima u svrhu unapređenja uzgoja ribe kao ljudskog hranjiva (200). Većina riba koja se koristi u toksikološkim istraživanjima pripada superrazredu *Gnathostoma*, razredu *Osteichthyes*, podrazredu

*Actinopterygii*, infrarazredu *Teleostei*, vrsti *Eutelaosti* (kalifornijska pastrva, zebrasta riba, japanska riba riže) (201). Zebrasta riba (*Danio rerio*) postala je često korištena riblja vrsta u brojnim istraživanjima. Budući da su njezini embriji prozirni, razvijaju se izvan majke i brzo rastu, često se koriste u istraživanjima evolucije i fiziologije kralježnjaka (202). Kalifornijska pastrva nerijetko se koristi u istraživanju kancerogenosti (201). Šaran, kao predstavnik vrste koja je izrazito otporna na anoksiju, dosta se koristio u istraživanjima mehanizama koji su odgovorni za tu osobitost i selektivnu prednost (150, 151, 203). Od teleosta se u istraživanju krvno-moždane barijere koristila zebrasta riba (204), dok se šaran nije često koristio kao model za takva istraživanja te stoga rezultati ovog rada daju novi i originalni doprinos proučavanjima ponašanja i regulacije krvno-moždane barijere u nižih kralježnjaka.



## 6. ZAKLJUČCI

Ispitano je djelovanje gliceriltrinitrata (GTN), kao donora NO, na propusnost krvno-moždane barijere *in vivo* u šarana (*C. carpio* L.). Određivanje koncentracije ukupnih nitrata i nitrita u serumu pokazalo je bifazični obrazac ponašanja sa statistički značajnim povećanjem koncentracije u odnosu na kontrolne životinje 15 minuta i 1 sat nakon primjene GTN te najvećim povećanjem koncentracije nakon 6 do 8 sati, što upućuje na endogenu sintezu NO potaknutu primjenom GTN.

Šest sati nakon primjene GTN došlo je do otvaranja krvno-moždane barijere što se vremenski podudara sa značajnim povećanjem koncentracije serumskih nitrita i nitrata te drži da su te dvije pojavnosti uzročno povezane. Krvno-moždana barijera zatvara se nakon 12 sati od primjene GTN, što upućuje na reverzibilnost promjene. Propusnost krvno-moždane barijere dokazali smo na temelju istjecanja Evansovog plavila koje veže albumin, a za koji je krvno-moždana barijera u normalnim uvjetima nepropusna. Otvaranje krvno-moždane barijere vremenski prati nastanak moždanog edema koji smo dokazali metodom mjerenja omjera suhe i mokre tvari te histološki. Osim histoloških znakova moždanog edema, dokazali smo promjene karakteristične za vazodilataciju, tipično uzrokovanu djelovanjem NO.

Naše je istraživanje pokazalo da postoji statistički značajna pozitivna povezanost između koncentracije ukupnih nitrata i nitrita u serumu šarana i propusnosti krvno-moždane barijere te između koncentracije ukupnih nitrata i nitrita i postojanja moždanog edema.

Promatrani u cjelini, naši rezultati podupiru nekoliko pretpostavki. Donor NO može uzrokovati reverzibilno i vremenski predvidljivo povećanje propusnosti krvno-moždane barijere u šarana, vjerojatno tako da potiče sintezu peroksinitrita. Posljedično dolazi do razvoja moždanog edema i vazodilatacije. Slijed navedenih promjena u ovoj nižoj kralježnjačkoj vrsti odgovara sličnim do sada istraženim promjenama koje su utvrđene u sisavaca.

## 7. SAŽETAK NA HRVATSKOM JEZIKU

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi djelovanje dušik (II) oksida (NO) na propusnost krvno-moždane barijere *in vivo* u šarana korištenjem gliceriltrinitrata (GTN) kao donora NO. Ustanovili smo i vremenski odredili reverzibilnost procesa povećane propusnosti krvno-moždane barijere, pratili, opisali i vremenski odredili razvoj moždanog edema te utvrdili sličnost mehanizma povećanja propusnosti krvno-moždane barijere u kojem sudjeluje NO na nižim kralježnjacima u odnosu na do sada istraživane vrste.

Pokus je izveden na dvogodišnjoj šaranskoj mlađi (*Cyprinus carpio* L.) tretiranoj gliceriltrinitratom u dozi od 1 mg/kg tjelesne mase. U serumu životinja u vremenskim je razmacima od 15 minuta te 1 sat, 3 sata, 6 sati, 8 sati, 12 sati i 24 sata nakon tretmana određena koncentracija ukupnih nitrita i nitrata komercijalnim test-paketom. U kontrolnoj skupini i u tretiranim skupinama analizirana je propusnost krvno-moždane barijere 6 sati, 12 sati i 24 sata nakon primjene GTN na temelju istjecanja Evans plavila na makroskopskom uzorku mozga i mikroskopskim preparatima s pomoću fluorescentnog mikroskopa. U vremenskim razmacima od 6 sati i 24 sata nakon tretmana gravimetrijskom metodom odredili smo pojavu moždanog edema, koji smo opisali na hemalaun-eozin obojenim preparatima mozga pod svjetlosnim mikroskopom.

Ukupna koncentracija nitrata i nitrita pokazala je bifazičan obrazac promjene s najvišim koncentracijama 15 minuta nakon primjene GTN, srednja vrijednost  $\pm$  SEM:  $188,1 \pm 23,82$   $\mu\text{mol/l}$  te nakon 6 sati ( $236,4 \pm 64,67$   $\mu\text{mol/l}$ ) i 8 sati ( $255,2 \pm 25,81$   $\mu\text{mol/l}$ ). Dinamika promjene koncentracije nitrata odgovara ukupnoj koncentraciji nitrata i nitrita. Najviše su vrijednosti 15 minuta nakon primjene GTN ( $180,2 \pm 25,76$   $\mu\text{mol/l}$ ) te 6 sati ( $232,4 \pm 63,84$   $\mu\text{mol/l}$ ) i 8 sati nakon primjene ( $236,9 \pm 89,12$   $\mu\text{mol/l}$ ). Koncentracije nitrita su značajno niže od koncentracije nitrata, a maksimalne vrijednosti pokazuju nakon 3 sata ( $14,28 \pm 9,63$   $\mu\text{mol/l}$ ) i 8 sati ( $16,17 \pm 5,94$   $\mu\text{mol/l}$ ) od primjene donora NO, iako se te vrijednosti statistički značajno ne razlikuju u odnosu na kontrolnu skupinu.

Svi dijelovi mozga životinja (prednji mozak, međumozak, srednji mozak, mali mozak i leđna moždina) u skupini koja je analizirana 6 sati nakon primjene GTN pokazale su stupanj obojenja »3«. Odgovarajući dijelovi mozga u kontrolnoj skupini i u skupinama koje su analizirane 12 sati i 24 sata nakon primjene donora NO pokazali su neobojenje, odnosno blago obojenje u područjima cirkumventrikularnih organa. Nalaz upućuje na povećano propusnu krvno-moždanu barijeru 6 sati nakon primjene donorskog sredstva NO, dok u kontrolnoj skupini nije došlo do otvaranja krvno-moždane barijere, a u skupinama koje su analizirane 12 sati i 24 sata nakon primjene ponovno je došlo do njezinog zatvaranja. Navedeni rezultati potvrđeni su metodom istjecanja Evans plavila koja se izvodi analiziranjem pod fluorescenčnim mikroskopom.

Ispitivanje moždanog edema gravimetrijskom metodom pokazalo je da mozak kontrolne skupine životinja ima  $M = 74,2\%$  (IQR 25-75% = 72,2% – 76,1%), dok mozak skupina tretiranih gliceriltrinitratom pokazuje znakove edema te nakon 6 sati ima 78,1% (77,0% – 80,2%) vode, a nakon 24 sata 78,5% (77,5% – 80,4%) vode, što je u obje tretirane skupine statistički značajno više u odnosu na kontrolnu skupinu. Ovi nalazi potvrđeni su i histološki opisani na preparatima obojenima hemalaun-eozinom te analizirani pod svjetlosnim mikroskopom.

Istraživanje je pokazalo da je primjena gliceriltrinitrata kao donora dušik (II) oksida inducirala endogenu sintezu NO, koja je vidljiva nakon 6 sati i 8 sati od primjene. Povećana sinteza NO povezana je s povećanom propusnošću krvno-moždane barijere u šarana u istom vremenskom intervalu od 6 sati nakon primjene donorskog sredstva. Nakon 12 sati, a poglavito nakon 24 sata, krvno-moždana barijera vraća se u prvotno stanje, no i dalje ostaje moždani edem koji je jasno vidljiv i 24 sata nakon primjene gliceriltrinitrata.

Pokazali smo da postoji statistički značajna pozitivna povezanost između koncentracije ukupnih serumskih nitrata i nitrita i propusnosti krvno-moždane barijere te između koncentracije ukupnih nitrata i nitrita i postojanja moždanog edema.

Iz rezultata navedenih istraživanja možemo zaključiti da primjena donora NO dovodi do reverzibilnog otvaranja krvno-moždane barijere i pojave moždanog edema u šarana, što je do sada dokazano i na nekim vrstama sisavaca.

**Ključne riječi:** krvno-moždana barijera, šaran, gliceriltrinitrat, dušik (II) oksid, moždani edem

## 8. SAŽETAK I NASLOV NA ENGLESKOM JEZIKU

### ROLE OF NITRIC OXIDE ON BLOOD-BRAIN PERMEABILITY IN COMMON CARP (*Cyprinus carpio L.*)

The aim of this study was to determine the effect of nitric oxide (NO) on blood-brain barrier permeability *in vivo* in common carp by using glyceryltrinitrate (GTN) as an NO donor. We have established the reversibility and duration of increased permeability of the blood-brain barrier; we have observed, described and determined the duration of brain edema formation, and defined the similarities of the mechanism of NO regulated increase of the blood-brain barrier permeability in lower vertebrates and the species investigated so far.

We experimentally treated two-year-old carp (*Cyprinus carpio L.*) with 1 mg glyceryltrinitrate/kg body weight. Total nitrate and nitrite concentrations in the carp sera were determined 15 minutes, 1 hour, 3 hours, 6 hours, 8 hours, 12 hours, and 24 hours after treatment by using the commercial kit. In both control and treated groups blood-brain barrier permeability was analyzed at 6, 12, and 24 hours after GTN application based on Evans blue leakage in the brain specimens; the specimens were also observed under a fluorescent microscope. Brain edema was determined by using the wet/dry method and described on hemalaun-eosin stained preparations under a light microscope 6 and 24 hours after GTN treatment.

The total concentration of nitrite/nitrate showed a biphasic pattern with maximum concentrations 15 minutes after GTN application, mean values  $\pm$  SEM:  $188.1 \pm 23.82 \mu\text{mol/l}$ , and after 6 hours ( $236.4 \pm 64.67 \mu\text{mol/l}$ ) and 8 hours ( $255.2 \pm 25.81 \mu\text{mol/l}$ ). The dynamic changes of nitrate concentrations followed that of total nitrite/nitrate concentrations. Maximum values were observed 15 minutes after GTN application ( $180.2 \pm 25.76 \mu\text{mol/l}$ ), and after 6 ( $232.4 \pm$

63.84  $\mu\text{mol/l}$ ) and 8 hours ( $236.9 \pm 89.12 \mu\text{mol/l}$ ). Nitrite concentrations were considerably lower than nitrate concentrations, and maximum values were achieved 3 hours ( $14.28 \pm 9.63 \mu\text{mol/l}$ ) and 8 hours ( $16.17 \pm 5.94 \mu\text{mol/l}$ ) following NO donor application, although those values were not statistically different as compared to control group.

All parts of the carp brain (forebrain, midbrain, hindbrain, little brain, spinal cord) showed coloration score »3« in the group analyzed 6 hours after GTN application. Corresponding parts of the brains in the control group and in the groups analyzed 12 and 24 hours following GTN application showed no coloration and/or mild coloration in the areas of circumventricular organs. These findings indicate increased blood-brain barrier permeability 6 hours after NO donor application, while no increased permeability was observed in the control group. The blood-brain barrier in the groups analyzed 12 and 24 hours after GTN application was again impermeable. The results were confirmed by the method of Evans blue leakage analyzed under a fluorescent microscope.

The degree of brain edema was evaluated using the wet-dry weight method. The control group brains contained  $M = 74.2\%$  (IQR 25 - 75% = 72.2% - 76.1%) water, while the brains of both groups of the animals treated with GTN showed signs of edema with 78.1% (77.0% – 80.2%) water observed 6 hours after treatment, and 78.5% (77.5% – 80.4%) water observed 24 hours after treatment. These findings were histologically confirmed with hemalaun-eosin staining of the preparations and analyzed under a light microscope.

This investigation has shown that application of NO donor glyceryltrinitrate induced endogenous synthesis of nitric oxide which is up-regulated 6 and 8 hours after application. Increased NO synthesis is associated with increased permeability of the blood-brain barrier and develops at the same time interval of 6 hours following NO donor application. Although 12 and especially 24 hours after treatment the blood-brain barrier had completely restituted, brain edema still persisted 24 hours following GTN treatment.

Our research demonstrated a statistically significant positive correlations between total nitrate and nitrite concentrations in sera and blood-brain barrier permeability, and between total nitrate and nitrite concentrations and brain edema presence.

From these results we can conclude that NO donor application causes reversible blood-brain barrier opening and brain edema formation in common carp, a phenomenon which has so far been proven on some mammal species.

**Key words:** blood-brain barrier, carp, glyceryltrinitrate, nitric oxide, brain edema

## 9. POPIS LITERATURE

1. Nelson GJ. Origin and diversification of teleostean fishes. *Ann N Y Acad Sci.* 1969; 167:18-30.
2. Kunz YW. Ectodermal derivatives. U: Noakes DLG, urednik. *Developmental biology of teleost fishes.* Dordrecht: Springer; 2004. str. 268-270.
3. Kapoor BG, Evans HE, Pevzner RA. Brain morphology. U: Russell FS, Yonge M, urednici. *Advances in marine biology.* London: Academic Press; 1975. str. 85-93.
4. Meek J, Nieuwenhuys RD. Holosteans and teleost. U: Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, urednici. *The Central Nervous System of Vertebrates.* Heidelberg: Springer-Verlag; 1998. str. 759–937.
5. Cerda'-Reverter JM, Zanuy S, Munoz-Cueto JA. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). I. The telencephalon. *J Morphol.* 2001; 247:217–228.
6. Vargas JP, Lopez JC, Portavella M. What are the functions of fish brain pallium? *Brain Res Bull.* 2009; 79:436-440.
7. Northcutt RG, Davis RE. Telencephalic organization in ray-finned fishes. U: Northcutt RG, Davis RE, urednici. *Fish Neurobiology.* Ann Arbor: University of Michigan Press; 1983. str. 203–236.
8. Maler L, Sas E, Johnston S, Ellis W. An atlas of the brain of the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *J Chem Neuroanat.* 1991;4:1–38.
9. Gomez-Segade P, Anadon R. Specialization in the diencephalon of advanced teleost. *J Morphol.* 1988; 197:71–103.
10. Billard R, Peter RE. A stereotaxic atlas and technique for the nuclei of the diencephalon of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Reprod Nutr Develop.* 1982; 22:1–25.

11. Cerda'-Reverter JM, Zanuy S, Munoz-Cueto JA. Cytoarchitectonic study of the brain of a perciform species, the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). II. The diencephalon. *J Morphol.* 2001; 247:229–251.
12. Fernald RD, Shelton LC. The organization of the diencephalon and pretectum in the cichlid fish, *Haplochromis burtoni*. *J Comp Neurol.* 1985; 238:202–217.
13. Hoffman RA. The Epiphyseal complex in fish and reptiles. *Am Zoologist.* 1970; 10(2):191-199.
14. Green JD. The comparative anatomy of the hypophysis with special reference to its blood supply and innervation. *Am J Anat.* 1951; 88:225–311.
15. Wullimann MF, Rupp B, Reichert H. Mesencephalon. U: Wullimann MF, urednik. Neuroanatomy of the zebrafish brain: a topological atlas. Basel: Birkhäuser Verlag; 1996. str. 12.
16. Ito H. Fine structure of the carp torus longitudinalis. *J Morphol.* 1971; 135:153-164.
17. Maximino C. Evolutionary changes in the complexity of the tectum of nontetrapods: A cladistic approach. *PLoS ONE* 2008; 3(10):e3582.
18. Meek J. Comparative aspects of cerebellar organization. From mormyrids to mammals. *Eur J Morphol.* 1992; 30(1):37-51.
19. Bernstein JJ. Anatomy and physiology of the central nervous system. U: Hoar WS, Randall DJ, urednici. Fish physiology. San Diego: Academic Press Inc; 1970. str. 50-54.
20. Rodríguez F, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Álvarez E, Jiménez-Moya F, Broglio C, Salas C. Cognitive and emotional functions of the teleost fish cerebellum. *Brain Res Bull.* 2005; 66(4-6):365-370.
21. Sanders A. Contributions to the Anatomy of the Central Nervous System in Vertebrated Animals. Part I. Ichthyopsida. Section I. Pisces. Subsection III. Dipnoi. On the Brain of the *Ceratodus Forsteri*. *Proc R Soc Lond.* 1887-1888; 43:420-423.
22. Ito H, Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N. Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain Behav Evol.* 2007; 69:76-86.
23. Houghton W, Lydon AF. British fresh water fishes. 1. Izd. London: W. Mackenzie; 1879.
24. Kuypers HGJM, Martin GF. Anatomy of descending pathways to the spinal cord. 1. izd. Amsterdam: Elsevier; 1982.
25. Onuki A, Somiya H. Innervation of Sonic Muscles in Teleosts: Occipital vs. Spinal Nerves. *Brain Behav Evol.* 2007; 69:132-141.

26. Rascher G, Wolburg H. The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development. *J Hirnforsch.* 1997; 38:525-540.
27. Paxton JR, Eschmeyer WN, Kirshner D, urednici. *Encyclopedia of fishes.* 1. izd. San Diego: Academic Press; 1998.
28. Herrick CJ. The cranial nerves and cutaneous sense organs of the North American siluroid fishes. *J Comp Neurol.* 1901; 11:177–247.
29. Striedter GF. *Principles of brain evolution.* 2. Izd. Sunderland: Sinauer Associates; 2005.
30. Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy.* 2. Izd. New Jersey: Wiley Interscience; 2005.
31. [http://www.link.vet.ed.ac.uk/animalwelfare/Fish%20pain/Pain\\_files/image002.jpg](http://www.link.vet.ed.ac.uk/animalwelfare/Fish%20pain/Pain_files/image002.jpg)
32. Northcutt RG. Connections of the lateral and medial divisions of the goldfish telencephalic pallium. *J Comp Neurol.* 2006; 494:903–943.
33. Salas C, Broglio C, Durán E, Gómez A, Ocaña FM, Jiménez-Moya F i dr.. Neuropsychology of learning and memory in teleost fish. *Zebrafish.* 2006; 3(2):157-171.
34. Northcutt RG. Evolution of the telecephalon in nonmammals. *Ann Rev Neurosci.* 1981; 4:301-350.
35. Colin F, Ris L, Godaux E. *Neuroanatomy of the cerebellum.* U: Manto MU, Pandolfo M, urednici. *The cerebellum and its disorders.* Cambridge: Cambridge University Press; 2002. str. 6-30.
36. Goodman DC. The evolution of cerebellar structure and function. *Am Zoologist.* 1964; 4:33-36.
37. Wake DB. *The endoskeleton: The comparative anatomy of the vertebral column and ribs.* U: Wake MH, urednik. *Hyman's comparative vertebrate anatomy.* Chicago: The University of Chicago Press; 1979. str. 192-236.
38. Butler AB. *Nervous system.* U: Ostrander GK, urednik. *The laboratory fish.* London: Academic Press; 2000. str. 129-145.
39. Ehrlich P. *Eine Farbenanalytische Studie.* U: Erlich P, urednik. *Das sauerstoffbedürfnis des organismus.* Berlin: Hirschwald; 1885. str. 167.
40. Oldendorf WH. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol.* 1971; 221:1629–1639.
41. Pardridge WM. *A morphological approach to the analysis of blood-brain barrier transport function.* U: Paulson O, Knudsen GM, Moos T, urednici. *Brain Barrier Systems.* Copenhagen: Munksgaard; 1999. str. 7-29.



42. Stewart PA, Wiley MJ. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev Biol.* 1981; 84:183-192.
43. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 2003; 81:1–44
44. Nagy Z, Peters H, Hüttner I. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest.* 1984; 50:313-322.
45. Schneeberger EE, Lynch RD. Ultrastructure and immunolabeling of the tight junction. U: Cereijido M, Anderson JM, urednici. Tight junctions. González-Mariscal L, Betanzos A, Nava P, Jaramillo BE. Tight junction proteins. Boca Raton: CRC Press; 2001. str. 19-38.
46. Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 2006; 68:403–429.
47. Claude P. Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol.* 1978; 39(2-3):219–232.
48. Marcial MA, Carlson SL, Madara JL. Partitioning of paracellular conductance along the ileal crypt-villus axis: a hypothesis based on structural analysis with detailed consideration of tight junction structure-function relationship. *J Membrane Biol.* 1984; 80:59–70.
49. Janzer RC, Raff MC. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature.* 1987; 325:253–257.
50. Tontsch U, Bauer HC. Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 1991; 539(2):247–253.
51. Balabanov R, Dore-Duffy P. Role of the CNS microvascular pericyte in the blood-brain barrier. *J Neurosci Res.* 1998; 53:637-644.
52. Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.* 2002; 16:1274-1276.
53. Lok J, Gupta P, Guo S, Kim WJ, Whalen MJ, van Leyen K, Lo EH. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res.* 2007; 32(12):2032-2045.
54. Johanson CE. Permeability and vascularity of the developing brain: Cerebellum vs. cerebral cortex. *Brain Research.* 1980; 190:3–16.
55. Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science* 1987; 237:896–898.

56. Von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability *Exp Cell Res.* 2006; 312:623-629.
57. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7:41–53.
58. Koehler RC, Gebremedhin D, Harder DR. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol.* 2006; 100(1):307-317.
59. Kleffner I, Bungeroth M, Schiffbauer H, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kuhlenbäumer G. The role of aquaporin-4 polymorphisms in the development of brain edema after middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2008; 39(4):1333-1335.
60. Nag S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in cerebral vessels in chronic hypertension. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; 55:381–388.
61. Del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Koziol JA. Vascular matrix adhesion and the blood–brain barrier. *Biochem Soc Trans.* 2006; 34:1261–1266.
62. Wang CX, Shuaib A. Critical role of microvasculature basal lamina in ischemic brain injury. *Prog Neurobiol.* 2007; 83(3):140-148.
63. Abbott NJ, Bundgaard M, Hughes CCW. Morphology of brain microvessels: a comparative approach. U: F. Hammersen and K. Messmer, urednici. *Cerebral microcirculation.* Basel: Karger; 1989. str. 1-19.
64. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 1969; 40:648–677.
65. Bundgaard M, Cserr HF. A glial blood-brain barrier in elasmobranchs. *Brain Res.* 1981; 226:61–73.
66. Bundgaard M, Abbott NJ. All vertebrates started out with a glial blood-brain barrier 4-500 million years ago. *Glia.* 2008; 56(7):699-708.
67. Compagno LJV. Phyletic Relationships of Living Sharks and Rays. *Amer Zool.* 1977; 17:303-322.
68. Evans DH, Piermarini PM, Choe KP. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol Rev.* 2005; 85:97–177.
69. Marshall WS. Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *J Exp Zool.* 2002; 293:264–283.
70. Nakao T. Electron microscopic studies on the lamprey meninges. *J Comp Neurol.* 1979; 183(2):429-453.

71. Farquhar MG, Palade GE. Cell junctions in amphibian skin. *J. Cell Biol.* 1965; 26:263–291.
72. Staehelin LA. Structure and function of intercellular junctions. *Int Rev Cytol.* 1974; 39:191-283.
73. Rascher G, Wolburg H. The tight junctions of the leptomeningeal blood-cerebrospinal fluid barrier during development. *J Brain Res.* 1997; 38:525-540.
74. Sardet C, Pisam M, Maetz J. The surface epithelium of teleostean fish gills. Cellular and junctional adaptations of the chloride cell in relation to salt adaptation. *J Cell Biol.* 1979; 80:96–117.
75. Kelly SP, Wood CM. Effect of cortisol on the physiology of cultured pavement cell epithelia from freshwater trout gills. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281:811–820.
76. Loretz CA. Electrophysiology of ion transport in teleost intestinal cells. U: Wood CM, Shuttleworth TJ, urednici. *Fish Physiology, Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation.* San Diego: Academic Press; 1995. str. 285-315.
77. Miyamoto T, Momoi A, Kato K, Kondoh H, Tsukita S, Furuse M, Furutani-Seiki M. Generation of transgenic medaka expressing claudin7-EGFP for imaging of tight junctions in living medaka embryos. *Cell Tissue Res.* 2009; 335:465–471.
78. Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. Zebrafish *hox* clusters and vertebrate genome revolution. *Science.* 1998; 282:1711–1714.
79. Christoffels A, Koh EGL, Chia J, Brenner S, Aparicio S, Venkatesh B. Fugu genome analysis provides evidence for a whole-genome duplication early during the evolution of ray-finned fishes. *Mol Biol Evol.* 2004; 21:1146–1151.
80. Taylor JS, Braasch I, Frickey T, Meyer A, Van de Peer Y. Genome duplication, a trait shared by 22,000 species of ray-finned fish. *Genome Res.* 2003; 13:382–390.
81. Loh YH, Christoffels A, Brenner S, Hunziker W, Venkatesh B. Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res.* 2004; 14:1248–1257.
82. Boutet I, Long Ky CL, Bonhomme F. A transcriptomic approach of salinity response in the euryhaline teleost, *Dicentrarchus labrax*. *Gene.* 2006; 379:40–50.
83. Kollmar R, Nakamura SK, Kappler JA, Hudspeth AJ. Expression and phylogeny of claudins in vertebrate primordia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98:10196–10201.

84. Loh YH, Christoffels A, Brenner S, Hunziker W, Venkatesh B. Extensive expansion of the claudin gene family in the teleost fish, *Fugu rubripes*. *Genome Res.* 2004; 14:1248–1257.
85. Hoffmann W, Schwarz H. Ependymins: meningeal-derived extracellular matrix proteins at the blood-brain barrier. *Int Rev Cytol.* 1996; 165:121-158.
86. Khan N, Deschaux P. Role of serotonin in fish immunomodulation. *J Exp Biol.* 1997; 200:1833-1838.
87. Bernstein JJ, Streicher E. The blood-brain barrier of fish. *Exp Neurol.* 1965; 11:464-473.
88. Bradbury MWB. The blood-brain barrier. *Exp Phys.* 1993; 78:453-472.
89. Maher TJ. Amino acid neurotransmitters in the central nervous system. U: Lemke TL, Williams TA, Roche VF, Zito SW, urednici. *Medicinal chemistry.* Baltimore MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. str. 444-460.
90. Risau W, Wolburg H. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 1990; 13:174-178.
91. Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2006; 1(3):223-236.
92. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:173-185.
93. Kroll RA, Neuwelt EA. Outwitting the blood-brain barrier for therapeutic purposes: osmotic opening and other means. *Neurosurgery.* 1998; 42:1083-1100.
94. Rapoport SI. Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications. *Cell Moll Neurobiol.* 2000; 20:217-230.
95. Betz AL, Iannotti F, Hoff JT. Brain edema: classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1989; 1:133-154.
96. Klatzo I. Evaluation of brain edema concepts. *Acta Neurochir.* 1994; 60(Suppl):3-6.
97. Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. *J Neurosurg.* 1995; 83:1051-1095.
98. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, patophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991; 43:109-141.
99. Ignarro LJ. Nitric oxide: biology and pathobiology. 2. izd. San Diego: Academic Press; 2000.
100. Endoh M, Mainese K, Wagner J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res.* 1994; 651:92-100.

101. Murphy S. Production of nitric oxide by glial cells. *Glia*. 2000; 29:1-14.
102. Zhang Z, Chopp M, Bailey F, Malinski T. Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Sci*. 1995; 128:22-27.
103. Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev*. 1998; 17:7-23.
104. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric-oxide pathway. *N Engl J Med*. 1993; 329:2002-2012.
105. Culotta E, Koshland DE Jr. »NO news is good news. (nitric oxide; includes information about other significant advances & discoveries of 1992) (Molecule of the Year)«. *Science*. 1992; 258:5090:1862–1864.
106. Boje KMK, Lakhman SS. Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood–brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000; 293:545-550.
107. Mayhan WG. Nitric oxide donor-induced increase in permeability of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 2000; 866(1-2):101-8.
108. Iadecola C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci*. 1997; 20:132–139.
109. Thiel VE, Audus KL. Nitric oxide and blood–brain barrier integrity. *Antiox Redox Sign*. 2001; 3(2):273-278.
110. Phares TW, Fabis MJ, Brimer CM, Kean RB, Hooper C. A peroxynitrite-dependent pathway is responsible for blood-brain barrier permeability changes during a central nervous system inflammatory response: TNF- $\alpha$  is neither necessary nor sufficient. *J Immunol*. 2007; 178:7334 -7343.
111. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990; 87(4):1620–1624.
112. Hogg N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. *Biochem J*. 1992; 281:419–424.
113. Saran M, Michel C, Bors W. Reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup> implications for the action of endothelium-derived relaxing factor (EDRF). *Free Radic Res Commun*. 1990; 10(4-5):221-226.
114. Blough NV, Zafiriou OC. Reaction of superoxide with nitric oxide to form peroxynitrite in alkaline aqueous solution. *Inorg Chem*. 1985; 24:3502-3504.

115. Keith WG, Powell RE. Kinetics of decomposition of peroxyntrous acid. *J Chem Soc.* 1969;A90.
116. Barat F, Gilles B, Hickel B, Sutton J. Flash photolysis of the nitrate ion in aqueous solution: excitation at 200 nm. *J Chem Soc. A* 1970: 1982-1986.
117. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science.* 1992; 258:1898-1902.
118. Forman LJ, Liu P, Nagele RG, Yin K & Wong PY. Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxyntrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem Res.* 1998; 23:141-148.
119. Kumura E, Yoshimine T, Kubo S, Tanaka S, Hayakawa T, Shiga T & Kosaka H. Effects of superoxide dismutase on nitric oxide production during reperfusion after focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett.* 1995; 200:137-140.
120. Sinz EH, Kochanek PM, Dixon C, Clark RSB, Carchillo JA, Schiding JK, Chen M, Wisniewski SR, Carlos TM, Williams D, DeKosky ST, Watkins SC, Marion DW, Billiar TR. Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J Clin Invest.* 1999; 104:647-656.
121. Brown GC. Nitric oxide inhibition of cytochrome oxidase and mitochondrial respiration: implications for inflammatory, neurodegenerative and ischaemic pathologies. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174:189-192.
122. Holscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci.* 1997; 20:298-303.
123. Radi R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(12):4003-4008.
124. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med.* 2005; 39:51-70.
125. Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *Journal of Cell Science.* 2006; 119:339-349.
126. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1995; 26:2120-2126.
127. Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002; 297:1186-1190.

128. Gum R, Wang H, Lengyel E, Juarez J, Boyd D. Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *Oncogene*. 1997; 14:1481-1493.
129. Chang DI, Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Abumiya T, Mazar AP, del Zoppo GJ. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003; 23:1408–1419.
130. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002; 39:279–291.
131. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27:697–709.
132. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio MAGJ. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001; 32:1759–1766.
133. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio MAGJ. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001; 32:2762–2767.
134. Rosenberg GA, Yang Y. 2007. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus* .2007; 22:E4.
135. Janigro D, West GA, Nguyen TS, Winn HR. Regulation of blood-brain barrier endothelial cells by nitric oxide. *Circ Res*. 1994; 75:528–538.
136. Yamamoto T, Bing RJ. Nitric oxide donors. *PSEBM*. 2000; 225:200-206.
137. Murad F. Drugs used for the treatment of angina: organic nitrates, calcium channel blockers, and beta-adrenergic antagonist. U: Goodman Gilman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P, urednici. *Goodman and Gilman’s the pharmacologicals basis of therapeutics*. New York: Pergamon Press; 1990. str. 764-783.
138. Tassorelli C, Joseph SA, Buzzi MG, Nappi G. The effect of the central nervous system of nitroglycerin – putative mechanisms and mediators. *Progr Neurobiol*. 1999; 57:607-624.
139. Tassorelli C, Joseph CA. Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity i brain stem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* .1995; 682:167-178.
140. Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I, Chiarugi A, Sanchez del Rio M, Letourneau R et al. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain*. 2001; 124:2490-2502.

141. Holmquist B, Ekstrom P. Subcellular localization of neuronal nitric oxide synthase in the brain of a teleost: an immunoelectron and confocal microscopical study. *Brain Res.* 1997; 745:67-82.
142. Conte A, Ottaviani E. Characterization of *Cyprinus carpio* brain nitric oxide synthase. *Neurosci Lett.* 1998; 242(3):155-158.
143. Schober A, Malz CR, Meyer DL. Enzyme histochemical demonstration of nitric oxide synthase in the diencephalon of the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). *Neurosci Lett.* 1993; 151:67-70.
144. Bruning G, Katzbach R, Mayer B. Histochemical and immunocytochemical localization of nitric oxide synthase in the central nervous system of the goldfish, *Carassius auratus*, *J Comp Neurol.* 1995; 358:353-382.
145. Virgili M, Poli A, Beraudi A, Giuliani A, Villani L. Regional distribution of nitric oxide synthase and NADPH-diaphorase activities in the central nervous system of teleosts. *Brain Res.* 2001; 901:202-207.
146. Masini MA, Sturla M, Ricci F, Uva BM. Identification and distribution of nitric oxide synthase in the brain of adult Antarctic teleosts. *Polar Biol.* 2005; 29(1):23-26.
147. Cox RL, Mariano T, Heck DE, Laskin JD, Stegeman JJ. Nitric oxide synthase sequences in the marine fish *Stenotomus chrysops* and the sea urchin *Arbacia punctulata*, and phylogenetic analysis of nitric oxide synthase calmodulin-binding domains. *Comp Biochem Physiol.* 2001; 130:479-491.
148. Nilsson GE, Söderström V. Comparative aspects on nitric oxide in brain and its role as a cerebral vasodilator. *Comp Biochem Physiol.* 1997; 118:949-958.
149. Biggar KK, Storey KB. Perspectives in cell cycle regulation: Lessons from an anoxic vertebrate. *Curr Genom.* 2009; 10:573-584.
150. Nilsson GE, Renshaw GMC. Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark. *J Exp Biol.* 2004; 207:3131-3139.
151. Conte A. Physiologic pH changes modulate calcium ion dependence of brain nitric oxide synthase in *Carassius auratus*. *Biochem Biophys Acta.* 2003; 1619:29-38.
152. Söderström V, Nilsson GE. Brain blood flow during hypercapnia in fish: no role of nitric oxide. *Brain Res.* 2000; 857:207-211.
153. Shelton G, Jones DR, Milsom WK. Control of breathing in ectothermic vertebrates. U: Geiger SR, Fishman AP, Cherniac JG, Widdicome, urednici. *Handbook of Physiology.* Bethesda: Am Physiol Soc.; 1986, str. 857-917.



154. Venturini G, Colasanti M, Fioravanti E, Bianchini A, Ascenz P. Direct effect on the catalytic activity of the nitric oxide synthase types I, II i III. *Nitric oxide*. 1999; 3(5):375-382.
155. Bordieri L, Persichini T, Venturini G, Cioni C. Expression of Nitric Oxide Synthase in the Preoptic-Hypothalamo-Hypophyseal System of the Teleost *Oreochromis niloticus*. *Brain Behav Evol*. 2003; 62:43-55.
156. Pimpão CT, Zampronio AR, Silva de Assis HC. Exposure of *Ancistrus multispinis* (Regan, 1912, Pisces, Teleostei) to deltamethrin: Effects on cellular immunity. *Fish Shellfish Immun*. 2008; 25(5):528-532.
157. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. 2001; 24:719–725.
158. Matter K, Balda MS. Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(3):225-236.
159. Lutton JD, Winston R, Rodman TC. Multiple Sclerosis: Etiological Mechanisms and Future Directions. *Exp Biol Med*. 2004; 229:12-20.
160. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood–brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000; 20:131–147.
161. Abbott NJ. Astrocyte–endothelial interactions and blood–brain barrier permeability. *J Anat*. 2002; 200:629– 638.
162. Chen Y, McCarron RM, Azzam N, Bembry J, Reutzler C, Lenz FA, Spatz M. Endothelin-1 and nitric oxide affect human cerebrovascular endothelial responses and signal transduction. *Acta Neurochir*. 2000; 76:131–135.
163. Kustova Y, Grinberg A, Basile AS. Increased blood–brain barrier permeability in LP-BM5 infected mice is mediated by neuroexcitatory mechanisms. *Brain Res*. 1999; 839:153–163.
164. Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG. 1999. Energy on demand. *Science*. 1999; 283:496–497.
165. Nilsson GE, Soderstrom V. Comparative aspects on nitric oxide in brain and its role as a cerebral vasodilator. *Comp Biochem Physiol*. 1997; 118:949-958.
166. Hylland I, Nilsson GE, Lutz PL. Time course of anoxia-induced increase in cerebral blood flow rate in turtles: Evidence for a role of adenosine. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994; 14:877-881.
167. Soderstrom V, Hylland P, Nilsson GE. Nitric oxide synthase inhibitor blocks acetylcholine induced increase in brain blood flow in rainbow trout. *Neurosci Lett*. 1995; 197:191-194.

168. Hed J, Dahlgren C, and Rundquist, I. A simple fluorescence technique to stain the plasma membrane of human neutrophils. *Histochemistry*. 1983; 79(1):105–110.
169. Xi G, Keep RF & Hoff JT. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg*. 1998; 89:991–996.
170. <http://spss-for-windows.software.informer.com/11.5/>
171. Yamauchi A, Dohgu S, Nishioku T, Shuto H, Naito M, Tsuruo T, Sawada Y, Kataoka Y. An inhibitory role of nitric oxide in the dynamic regulation of the blood-brain barrier function. *Cell Mol Neurobiol*. 2007; 27(3):263-265.
172. Nag S. Blood-brain barrier permeability measured with histochemistry. U: Introduction to the blood-brain barrier. methodology, biology and pathology. Pardridge WM, Urednik. Cambridge: Cambridge University Press; 1998. str. 113–121.
173. Misko TP, Schilling RJ, Salvemini D, Moore WM, Currie MG. A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples. *Annal Biochem*. 1993; 214:11-16.
174. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982; 126(1):131–138.
175. Torfgard K, Ahlner J, Axelsson KL, Norlander B, Bertler A, Tissue levels of glyceryl trinitrate and cGMP after in vivo administration in rat, and the effect of tolerance development. *Can J Physiol Pharmacol*. 1991; 69:1257-1261.
176. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327:524-526.
177. Martinez-Murillo R, Fernandez AP, Serrano J, Rodrigo J, Salas E, Mourelle M, Martinez A. The nitric oxide donor LA 419 decreases brain damage in a focal ischemia model. *Neurosci Lett*. 2007; 415(2):149-153.
178. Read SJ, Smith MI, Hunter AJ, Parsons AA. Enhanced nitric oxide release during cortical spreading depression following infusion of glyceryl trinitrate in the anesthetized cat. *Cephalalgia*. 1997; 17:159-165.
179. Feelisch M, Brands F, Kelm M. Human endothelial cells bioactivate organic nitrates to nitric oxide: Implications for the reinforcement of endothelial defence mechanisms. *Eur J Clin Invest*. 1995; 25:737–745.
180. Yun HY, Dawson VL, Dawson TM. Neurobiology of nitric oxide. *Crit Rev Neurobiol*. 1996; 10:291-316.
181. Persson MG, Agvald P, Gustafsson LE. Detection of nitric oxide in exhaled air during administration of nitroglycerin in vivo. *Br J Pharmacol*. 1994; 111(3):825–828.

182. Peter RE, Fryer JN 1983 Endocrine function of the hypothalamus of actinopterygians. U: Davis RE, Northcutt RG, urednici. Fish Neurobiology. Ann Arbor: University of Michigan Press; 1983. str. 165–201.
183. Ichikawa T, McMaster D, Lederis K, Kobayashi H. Isolation and amino acid sequence of urotensin I, a vasoactive and ACTH-releasing neuropeptide from carp (*Cyprinus carpio*) urophysis. Peptides. 1982; 3:859–867.
184. Arai M, Assil IQ, Abou-Samra AB. Characterization of three corticotropin-releasing factor receptors in catfish: a novel third receptor is predominantly expressed in pituitary and urophysis. 2001; 142(1):446-454.
185. Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. J Cereb Blood Flow Metab. 1996; 16(4):605-611.
186. Dong Wook K, So-Hyang I, Jeong-Yeon K, Dong-Eog K, Goo-Taeg o, Sang-Wuk J. Decreased brain edema after collagenase-induced intracerebral hemorrhage in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. J Neurosurg. 2009; 111:(5):995-1000.
187. Oury TD, Piantadosi CA, Crapo JD. Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. J Biol Chem. 1993; 268(21):15394-15398.
188. Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. Neuropharmacology. 2006; 50(2):182-190.
189. Louin G, Marchand-Verrecchia C, Palmier B, Plotkine M, Jafarian-Tehrani M. Effect of three inducible NOS inhibitors on cerebral edema formation and neurological deficit in a rat model of traumatic brain injury. J Cereb Blood Flow Metab. 2005; 25:S49.
190. DeWitt DS, Smith TG, Deyo DJ, Miller KR, Uchida T, Prough DS. L-arginine and superoxide dismutase prevent or reverse cerebral hypoperfusion after fluid-percussion traumatic brain injury. J Neurotrauma. 1997; 14(4):223-233.
191. Huang Z, Huang PL, Ma J, Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. J Cereb Blood Flow Metab. 1996; 16(5):981-987.
192. Abbott NJ. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. Cell Mol Neurobiol. 2005; 25(1):5-23.

193. Konovalova NP, Goncharova SA, Volkova LM, Rajewskaya TA, Eremenko LT, Korolev AM. Nitric oxide donor increases the efficiency of cytostatic therapy and retards the development of drug resistance. *Nitric Oxide*. 2003; 8(1):59-64.
194. Shinoda J, Whittle IR. Nitric oxide and glioma: a target for novel therapy? *Br J Neurosurg*. 2001; 15(3):213-220.
195. Neuwelt EA. Mechanisms of Disease: The Blood-Brain Barrier. *Neurosurgery online*. 2004; 54(1):131-142.
196. Blakemore WF. The fate of escaped plasma protein after thermal necrosis of the rat brain: an electron microscope study. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1969; 28:139–152.
197. Brightman MW, Klatzo I, Olsson Y, Reese TS. The blood-brain barrier to proteins under normal and pathological conditions. *J Neurol Sci*. 1970; 10(3):215–239.
198. Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1967; 26(1):1–14.
199. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*. 1987; 72:236–239.
200. Cuoghi B, Mola L. Fish take their revenge: alternative models for modern neurobiology. *Ital J Zool*. 2007; 74(3):309-311.
201. Gad SC. Alternative species. U: Gad SC, urednik. *Animal models in toxicology*. Boca Raton: Taylor & Francis Group; 2007. str. 773-786.
202. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Rev Genet*. 2007; 8:353-367.
203. Poon WL, Hung CY, Nakano K, Randall. An *in vivo* study of common carp (*Cyprinus carpio* L.) liver during prolonged hypoxia. *Comp Biochem Physiol D Genomics Proteomics*. 2007; 2(4):295-302.
204. Jeong JY, Kwon HB, Ahn JC, Kang D, Kwon SH, Park JA, Kim KW. Functional and developmental analysis of the blood-brain barrier in zebrafish. *Brain Res Bull*. 2008; 28;75(5):619-628.

## 10. ŽIVOTOPIS AUTORICE

Mr. sc. Sanja Kovačić, dr. med., rođena je 3. ožujka 1970. Osnovnu školu završila je u Mariji Bistrici, srednju školu završila je u Zagrebu, a Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu 1995. godine. Poslijediplomski studij na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, polje Biologija, smjer Molekularna i stanična biologija upisala je 1996., a magistarski rad pod naslovom »Ispitivanje toksičnosti fumonizina B1 *in vitro* i *in vivo*« pod vodstvom prof. dr. sc. Stjepana Pepeljnaka obranila je u lipnju 2000. godine. Specijalistički ispit iz neurologije položila je 2003. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Od 1995. do 1996. radila je kao liječnica pripravnica u Domu zdravlja Donja Stubica. Nakon položenog državnog ispita od 1997. do 1998. radila je u ambulanti opće prakse u Domu zdravlja Zlatar. Od 1998. do 1999. radila je kao znanstvena asistentica na Zavodu za mikrobiologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

Od 1999. do danas zaposlenica je Opće bolnice Zabok u Zaboku na odjelu neurologije. Od 2009. voditeljica je Odjela neurologije Opće bolnice Zabok.

Od 1996. do 1997. bila je znanstvena suradnica na području molekularna biologija Instituta Ruđera Boškovića u Zagrebu. U dva navrata boravila je kao gostujuća liječnica u inozemstvu: 2001. u Kopfklinikum u Heidelbergu, u Njemačkoj i 2009. u Charite Klinikum u Berlinu, u Njemačkoj. Završila je više tečajeva stručnog usavršavanja na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu te u Charite Klinikum u Berlinu.

Mr. sc. Sanja Kovačić, dr. med., autorica je i/ili suautorica 7 znanstvenih radova, čije je izvorište u bazi podataka Current Contents, više radova u drugim znanstvenim bazama, a sudjelovala je na većem broju znanstvenih i stručnih skupova, u više navrata kao pozvani predavač.