

# Učinak natriuretskih peptida na signalni put bradikina nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga

---

Dobrivojević, Marina

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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:105:845063>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Dobrivojević**

**Učinak natriuretskih peptida na signalni put  
bradikinina nakon ishemijskog oštećenja  
mišjeg mozga**

**DISERTACIJA**



**Zagreb, 2013.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Marina Dobrivojević**

**Učinak natriuretskih peptida na signalni put  
bradikinina nakon ishemijskog oštećenja  
mišjeg mozga**

**DISERTACIJA**

**Zagreb, 2013.**

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neurogenetiku i genetiku razvoja Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te u Laboratoriju za staničnu signalizaciju Zavoda za fiziologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelji rada: prof. dr. sc. Srećko Gajović i doc. dr. sc. Aleksandra Sinđić

*Zahvaljujem svojim mentorima, učiteljima i prijateljima prof.dr.sc. Srećku Gajoviću i prof.dr.sc. Aleksandri Sinđić koji su nesebično, usrdno i strpljivo na mene prenosili svoje znanje i mudrost. Hvala vam na podršci, potpori i razumijevanju te brojnim korisnim i stručnim savjetima koji su mi pomogli u izradi ovoga rada te ponajprije na tome što su mi dali slobodu u istraživačkom radu što je od iznimne važnosti za razvoj mladog znanstvenika.*

*Srdačno zahvaljujem svojim kolegama i prijateljima Katarini Špiranec, dr.vet., dr.sc. Ivanu Bohačeku, Igoru Erjavcu, dipl.ing., Dunji Gorup, dr.med., dr.sc. Katarini Kapuralin, mr.sc. Mariji Čurlin, prof.dr.sc. Dinku Mitrečiću i Nikoli Habeku za nesebičnu pomoć u svim fazama izrade ovog doktorata bez čije pomoći ovaj rad ne bi bio ostvaren.*

*Posebnu zahvalnost dugujem laboranticama ing.med.lab.dg. Sandri Grgić i Iris Elezović čija je temeljitost, pouzdanost i posvećenost laboratorijskom radu značajno unaprijedila eksperimentalni dio ovog rada.*

*Također zahvaljujem prof.dr.sc. Jochenu Hirshu i dr.sc. Stephanie S. Kaweit na stručnoj i tehničkoj pomoći u izradi ovog doktorata.*

*Mojoj dragim roditeljima i bratu zahvaljujem na ljubavi, podršci te neizmjernej vjeri u moj uspjeh.*

*I na kraju najtoplije zahvaljujem Domagoju na nemjerljivoj ljubavi, potpori i iznimnom strpljenju*

## POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE - *angiotensin-converting enzyme*, hrv. enzim konverter angiotenzina  
ANP - *atrial natriuretic peptide*, hrv. atrijski natriuretski peptid  
B<sub>1</sub>R - bradikininski receptor tipa 1  
B<sub>2</sub>R - bradikininski receptor tipa 2  
BK - bradikinin  
BNP - *brain natriuretic peptide*, hrv. moždani natriuretski peptid  
BWC - *brain water content*, hrv. moždani sadržaj vode  
C1-INH - *C1-inhibitor*, hrv. inhibitor komplementa C1  
cGMP - PKG - *cGMP dependent protein kinases*, hrv. o cikličkom gvanozin monofosfatu ovisna protein kinaza G  
cGMP - PDEs - *cGMP binding phosphodiesterases*, hrv. ciklički gvanozin monofosfat vezujuće fosfodiesteraze  
CGN - *cyclic nucleotide-gated ion channels*, hrv. ionski kanali ovisni o cikličkim nukleotidima  
CK1 - citokeratin 1  
CNP - *C-type natriuretic peptide*, hrv. C-tip natriuretski peptid  
EGF - *epidermal growth factor*, hrv. epidermalni čimbenik rasta  
eNOS - *endothelial nitric oxide synthase*, hrv. endotelna sintaza dušikov(II)-oksida  
FXII - faktor XII  
FLS - *fibroblast-like satellite cells*, hrv. fibroblastima slične satelitne stanice  
G<sub>αq</sub>-PLC $\beta$  - G<sub>αq</sub>-sensitive phospholipase  $\beta$ , hrv. G<sub>αq</sub>-senzitivna fosfolipaza  $\beta$   
gC1qR - *receptor for the globular heads of C1q*, hrv. receptor za globularnu glavu C1q  
GC - *membrane-associated guanylyl cyclase*, hrv. membranski vezane gvanilat ciklaze  
GC-A - gvanilat ciklaza A  
GC-B - gvanilat ciklaza B  
GPCR - *G protein-coupled receptors*, hrv. G protein-vezani receptori  
HEK-293 - *Human embryonic kidney cells - 293*, hrv. humane embrionalne bubrežne stanice  
HK - *high molecular weight kininogen*, hrv. kininogen visoke molekulske mase  
HSP70 - *heat shock protein 70*, hrv. protein toplinskog šoka 70  
HSP90 - *heat shock protein 90*, hrv. protein toplinskog šoka 90  
K<sub>H</sub> - koeficijent hidrauličke vodljivosti  
K<sub>O</sub> - koeficijent osmotske vodljivosti  
MCAO - *Middle Cerebral Artery Occlusion*, hrv. okluzija srednje moždane arterije  
MDCK - *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells*, hrv. *Madin-Darby pseće bubrežne epitelne stanice*  
MMP - *matrix metalloproteinases*, hrv. metaloproteinaze matriksa  
NC - *non-selective cation channel*, hrv. neselektivni kationski kanal  
NEP - neutralne endopeptidaze  
NMDA - N-metil-D-aspartat  
NPR - *natriuretic peptide receptors*, hrv. receptori natriuretskih peptida  
NPR-A - *natriuretic peptide receptor-A*, hrv. receptor natriuretskih peptida A  
NPR-B - *natriuretic peptide receptor-B*, hrv. receptor natriuretskih peptida B

NPR-Bi - *natriuretic peptide receptor-Bi*, hrv. receptor NPR-Bi  
NPR-C - *natriuretic peptide clearance receptor*, hrv. receptor natriuretskih peptida C ili klirens receptor  
 $P_c$  - hidrostatski tlak  
 $P_i$  - hidrostatski tlak intersticija  
PAR 1 - *protease-activated receptor 1*, hrv. receptor aktiviran proteazom 1  
PK - prekalikrein  
PDE - *phosphodiesterase*, hrv. fosfodiesteraza  
PKC - *protein kinase C*, hrv. protein kinaza C  
PKG - *protein kinase G*, hrv. protein kinaza G  
PLC - *phospholipase C*, hrv. fosfolipaza C  
PT - *pertussis toxin*, hrv. pertusis toksin  
RGS-2 - *regulator of G-protein signaling 2*, hrv. regulator signalnog puta G-proteina 2  
ROI - *regions of interest*, hrv. regije od interesa  
rtPA - recombinant tissue plasminogen activator, hrv. rekombinirani tkivni aktivator plazminogena  
RT-PCR - *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*, hrv. reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom  
u-PAR - *urokinase plasminogen activator receptor*, hrv. receptor za aktiviranje urokinaze plazminogena  
URO - urodilatin  
VEGF - *vascular endothelial growth factor*, hrv. vaskularni endotelni čimbenik rasta  
 $\delta\pi$  - osmotski gradijent  
 $\pi_c$  - kapilarni osmotski tlak  
 $\pi_i$  - intersticijski osmotski tlak  
 $\pi_i$  - osmotska koncentracija unutarstanične tekućine  
 $\pi_o$  - osmotska koncentracija izvanstanične tekućine

# SADRŽAJ

Popis kratica

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Moždani udar</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Kategorije moždanog udara .....	1
1.1.2. Simptomi .....	2
1.1.3. Posljedice ishemijskog oštećenja .....	2
1.1.4. Održavanje staničnog volumena i nastanak moždanog edema .....	4
1.1.4.1. Citotoksični edem .....	5
1.1.4.2. Ionski edem .....	6
1.1.4.3. Vazogeni edem .....	8
<b>1.2. Bradikinin</b> .....	<b>11</b>
1.2.1. Sinteza bradikнина .....	11
1.2.2. Metabolizam bradikнина .....	13
1.2.3. Bradikininski receptori .....	14
1.2.3.1. Organizacija i struktura bradikininskih receptorskih gena .....	14
1.2.3.2. Signalni mehanizmi bradikinskih receptora .....	17
1.2.3.3. Bradikininski receptori u patofiziologiji .....	18
<b>1.3. Natriuretski peptidi</b> .....	<b>19</b>
1.3.1. Struktura natriuretskih peptida .....	20
1.3.2. Oslobađanje natriuretskih peptida .....	23
1.3.3. Metabolizam natriuretskih peptida .....	23
1.3.4. Receptori natriuretskih peptida .....	24
1.3.4.1. Gvanilat ciklaza A .....	26
1.3.4.2. Gvanilat ciklaza B .....	27
1.3.4.3. Signalni mehanizmi receptora natriuretskih peptida .....	28
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI RADA</b> .....	<b>31</b>
<b>2.1. Hipoteza</b> .....	<b>31</b>
<b>2.2. Ciljevi rada</b> .....	<b>31</b>
2.2.1. Opći cilj .....	31
2.2.2. Specifični ciljevi .....	31

<b>3. UZORCI I POSTUPCI</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1. Uzorci</b> .....	<b>32</b>
3.1.1. Stanični model - Divlji tip stanica HEK-293 .....	32
3.1.2. Animalni model - miševa soja C57Bl/6NCrl .....	33
3.1.2.1. Žrtvovanje životinja i izolacija mozga radi izolacije RNA .....	33
<b>3.2. Izolacija ukupne RNA iz HEK-293 stanične kulture i iz mišjeg mozga soja C57Bl/6NCrl</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3. Reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR) na RNA iz HEK-293 stanične kulture i iz mišjeg mozga soja C57Bl/6NCrl</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4. Metoda prikovanih potencijala</b> .....	<b>37</b>
<b>3.5. Mjerenje koncentracije unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup></b> .....	<b>40</b>
<b>3.6. Izazivanje ishemijskog oštećenja</b> .....	<b>41</b>
<b>3.7. Procjena neurološkog oštećenja</b> .....	<b>43</b>
<b>3.8. Procjena veličine ishemijske lezije <math>\mu</math>CT-om</b> .....	<b>43</b>
<b>3.9. Histološko bojenje po Nisslu</b> .....	<b>45</b>
<b>3.10. Evaluacija moždanog edema mokro – suhom metodom</b> .....	<b>46</b>
<b>3.11. Tvari korištene u pokusima</b> .....	<b>46</b>
<b>3.12. Prikaz i analiza rezultata</b> .....	<b>46</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>47</b>
<b>4.1. Pokusi na HEK-293 stanicama</b> .....	<b>47</b>
4.1.1. RT-PCR .....	47
4.1.2. Osnovne elektrofiziološke značajke HEK-293 stanica .....	47
4.1.3. Učinci natriuretskih peptida na membranski potencijal ( $V_m$ ) u HEK-293 stanicama .....	49
4.1.4. Učinci bradikinina na membranski potencijal i koncentraciju unutarstaničnog Ca <sup>2+</sup> u HEK-293 stanicama .....	51
4.1.5. Učinci natriuretskih peptida na depolarizacijski učinak bradikinina u HEK-293 stanicama .....	56
4.1.6. Međudjelovanje signalnih putova natriuretskih peptida i bradikinina .....	63



<b>4.2. Pokusi na C57Bl/6NCrl miševima</b> .....	<b>65</b>
4.2.1. RT-PCR .....	<b>65</b>
4.2.2. Odabir $\mu$ CT kontrastnog sredstva za <i>ex vivo</i> oslikavanje mišjeg mozga .....	<b>66</b>
4.2.3. MikroCT kao nova metoda za <i>ex vivo</i> oslikavanje ishemijskih lezija mišjeg mozga .....	<b>68</b>
4.2.4. Procjena neurološkog oštećenja .....	<b>72</b>
4.2.5. Procjena veličine ishemijske lezije mikroCT-om .....	<b>73</b>
4.2.6. Procjena postotka moždanog edema mikroCT-om .....	<b>74</b>
4.2.7. Evaluacija moždanog edema mokro – suhom metodom .....	<b>79</b>
4.2.8. Praćenje protoka krvi u mozgu prilikom izvođenja MCAO zahvata .....	<b>80</b>
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>81</b>
<b>5.1. Stanični model: HEK-293 stanice</b> .....	<b>82</b>
<b>5.2. Animalni model: miševi soja C57Bl/6NCrl</b> .....	<b>85</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>90</b>
<b>7. SAŽETAK</b> .....	<b>92</b>
<b>8. SUMMARY</b> .....	<b>93</b>
<b>9. LITERATURA</b> .....	<b>94</b>
<b>10. BIOGRAFIJA</b> .....	<b>115</b>

## **1. UVOD**

## 1.1. Moždani udar

Moždani udar je danas među tri vodeća uzroka smrtnosti u zapadnom svijetu te prvi uzrok smrtnosti u Republici Hrvatskoj, bivajući pritom veliki zdravstveni, društveni i ekonomski problem (1). Moždani udar čini prvi uzrok invalidnosti u svijetu, zahvaćajući pritom ne samo starije dobne skupine, već i osobe u reproduktivnim godinama života. Iako danas postoji mogućnost smanjenja rizika moždanog udara primjenom antihipertenzivnih i antitrombocitnih lijekova te lijekova za sniženje kolesterola, uz rast udjela starije populacije postoji hitna potreba za klinički efektivnom terapijom moždanog udara (2). Međutim, unatoč desetljeća intenzivnih istraživanja moždanog udara trenutno ne postoji efektivan neuroprotektivni lijek, već je jedino učinkovito liječenje otapanje ugruška, trombolizom rekombiniranim tkivnim aktivatorom plazminogena (rtPA). Primjena rtPA preporučuje se samo unutar prva tri sata od nastanka ishemijskog moždanog udara (1). Liječenje se provodi po točno određenom protokolu, zbog opasnosti od sekundarnih krvarenja, čime je primjena trombolize rtPA-om omogućena vrlo malom broju bolesnika.

### 1.1.1. Kategorije moždanog udara

Moždani udar se može podijeliti u dvije kategorije, hemoragijski i ishemijski, pri čemu je 87% ishemijske prirode (3).

**Hemoragijski moždani udar** nastaje uslijed degeneracije ili prsnuća moždanih krvnih žila, prilikom čega dolazi do izlivanja krvi u moždano tkivo. Hemoragijski moždani udar u 60% slučajeva povezan je s kroničnom hipertenzijom te u 10 % slučajeva cerebralnom amiloidnom angiopatijom (4).

**Ishemijski moždani udar** nastaje zbog privremene ili trajno smanjene opskrbe krvlju dijelova mozga, kao rezultat začepjenja moždanih arterija što uključuje embolizam, lokalnu trombozu ili relativnu sistemskom hipo-perfuziju (5), a neki od rijetkih uzroka mogu biti i vazospazam, vaskulitis ili trombocitemija (6). U 30% slučajeva točan uzrok nastanka ishemijskog oštećenja ne može se utvrditi i to najčešće kod mladih pacijenata ispod 50 godina starosti (7). Uzrok začepjenja površinskih grana cerebralnih arterija i arteriola je embolus, koji nastaje uslijed otkidanja dijelova fibrinskih plakova, oslobođanjem mjehurića zraka tijekom kirurške ili anesteziološke intervencije te prilikom različitih ozljeda, osobito ozljeda prsnog koša (8, 9, 10). Najčešće mjesto za nastanak začepjenja uslijed kojeg dolazi do

prestanaka protoka krvi je središnja moždana arterija, obzirom na to da 80 % krvi nošeno velikim vratnim arterijama prolazi kroz središnje moždane arterije (11).

Ateroskleroza je najčešći uzrok nastanka vaskularne opstrukcije, čija je posljedica trombozom uzrokovani ishemijski moždani udar (12). Aterosklerotski plakovi često prolaze kroz razne patogene promjene poput ulceracija, tromboze i kalcifikacije. Promjene aterosklerotskih plakova ovise o samoj strukturi, kompoziciji i konzistenciji plaka, zbog čega dolazi do fraktura i trganja pa se dijelovi plaka izlažu cirkulaciji uzrokujući trombozu (12, 13, 14, 15).

Niz drugih patoloških stanja mogu dovesti do tromboze moždanih krvnih žila poput fibromuskularne displazije, arteritisa te depozicije fibrina koje dovode do lipohijalinoze (16). Ishemijski moždani udar nastao uslijed hipotenzije, najčešće je uzrokovan promjenama u hemodinamici, posebno u regijama s graničnom krvnom opskrbom nastalim uslijed stenoze krvnih žila ili sniženja arterijskog tlaka (6).

### **1.1.2. Simptomi**

Klinički simptomi ishemijskog moždanog udara uključuju utrnulost, slabost ili oduzetost lica i udova, ataksiju, disfagiju, poremećaje govora (afazija ili disfazija), naglo zamagljenje ili gubitak vida, osobito na jednom oku ili u polovini vidnog polja, naglo nastalu jaku glavobolju praćenu povraćanjem bez jasnog uzroka, gubitak ravnoteže i/ili koordinacije, omaglice ili vrtoglavice, nesigurnost i zanošenje u hodu, iznenadne padove povezane s drugim simptomima.

### **1.1.3. Posljedice ishemijskog oštećenja**

Ishemijsko oštećenje karakterizira kompleks prostornih i vremenskih događaja koji se postepeno razvijaju. Razvoj patofizioloških procesa događa se u određenim vremenskim okvirima do kojih dolazi unutar minuta, sati ili dana pritom uzrokujući oštećenje neurona, glije i endotelnih stanica (17). Različiti dijelovi mozga različito su osjetljivi na ishemijsko oštećenje, pri čemu je siva tvar osjetljivija na nedostatak glukoze i novonastale uvjete

anaerobnog metabolizma od bijele tvari (18). Smanjenje protoka s normalnih 50 – 60 ml/ 100 g moždanog tkiva/min na 10 ml/ 100 g/min dovesti će do ireverzibilnih oštećenja (19, 20).

Unutar središnje zone oštećenja dolazi do nedostatne krvne opskrbe, smanjenja stanične koncentracije ATP-a, poremećaja u metabolizmu i ionskoj ravnoteži te odumiranja stanica. Periferna zona oštećenja, zona hipoperfuzije ili tzv. zona penumbre, čini dio ishemijskog područja čiji stupanj oštećenja ovisi o vremenu potrebnom za reperfuziju te o opskrbi krvlju kolateralnim krvnim žilama (21). Neuronu u području penumbre mogu preživjeti i tijekom nekoliko dana ishemijskog oštećenja (22). Nakon začepjenja krvne žile penumbra može obuhvaćati do polovine volumena oštećenja. U tom području aerobni metabolizam glukoze djelomično je očuvan, ali također dolazi do raznih dodatnih patoloških zbivanja poput periinfarktne depolarizacije, glutamatne citotoksičnosti, oksidativnog stresa, upale te programirane smrti stanica. Nedostatak glukoze i kisika dovodi do poremećaja u održavanju ionskih gradijenata, a nedostatak energije dovodi do depolarizacije neurona i glija stanica. Depolarizacija aktivira kalcijске kanale ovisne o naponu oslobađajući pritom ekscitacijske aminokiseline i istovremeno onemogućavajući presinaptički povrat (engl. *reuptake*) čime je omogućeno povećano nagomilavanje glutamata u izvanstaničnom prostoru pridonoseći time ekscitotoksičnosti (5). Aktivacija N-metil-D-aspartatnih (NMDA) receptora i metabotropnih glutamatnih receptora doprinosi kalcijskom preopterećenju neurona. Prezasićenje glutamatom dovodi do aktivacije niza drugih receptora, što uzrokuje ulazak monovalentnih iona natrija ( $\text{Na}^+$ ) i klora ( $\text{Cl}^-$ ) u neurone. Ulazak  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  je mnogo veći od izlaza iona kalija ( $\text{K}^+$ ), zbog čega pasivno za ionima  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  u neurone ulazi i voda uzrokujući stvaranje unutarstaničnog edema (23). Povećanjem koncentracije kalcija ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kao drugog glasnika započinje niz događaja unutar citoplazme i jezgre, poput aktivacije fosfolipaze A i ciklooksigenaze te oslobađanja slobodnih radikala što dovodi do lipidne peroksidacije i oštećenja membrana (24, 25, 26, 27, 28, 29).

Ishemijskom oštećenju doprinose endotel, leukociti, trombociti i neuroni oslobađanjem niza vazoaktivnih tvari (30). Stvaranje i otpuštanje posrednika upale poput reaktivnih oksidativnih vrsta, dušikov(II)-oksida, ekscitacijskih aminokiselinskih neurotransmitera, citokina i bradikinina (31), uzrokuje upalnu reakciju koja potiče moždano-arteriolarnu dilataciju, leziju endotelnih stanica te remeti krvno-moždanu barijeru, dovodeći do stvaranja edema, neuralnih oštećenja te posljedično odumiranja stanica (32). Moždani edem pogoršava već oslabljeni krvni optok zahvaćenog područja te pridonosi povećanju ishemijske ozljede zbog daljnjeg smanjenja perfuzije i oksigenacije (33).

#### 1.1.4. Održavanje staničnog volumena i nastanak moždanog edema

Mozak održava homeostazu unutarstanične i međustanične tekućine preciznom regulacijom transporta vode i otopljenih tvari kroz endotel krvno-moždane barijere, epitel koroidnog pleksusa te stanične membrane neurona i glije. U fiziološkim uvjetima koncentracija iona  $K^+$  veća je u stanici nego izvan nje, dok je suprotno u slučaju iona  $Na^+$ . Razlike u koncentracijama iona održavaju energetske ovisne ionske crpke,  $Na^+-K^+$ -ATPaza („ $Na^+-K^+$  crpka“) i  $Ca^{2+}$ -ATPaza, koje izbacuju  $Na^+$  i  $Ca^{2+}$  iz stanice i ubacuju  $K^+$  u stanicu protiv elektrokemijskog gradijenta.  $Na^+-K^+$  ATPaza izravno sudjeluje u regulaciji staničnog volumena održavajući koncentraciju elektrolita u citoplazmi, pritom utječući na osmotske sile. Nedostatak ATP-a dovodi do prestanka rada  $Na^+-K^+$  crpke te priljeva elektrolita i vode koji kao posljedicu ima bubrenje neurona te naposljetku nekrotičnu staničnu smrt. Koncentracija iona  $Ca^{2+}$  u citoplazmi neurona je niska ( $10^{-7}$  M), dok je u međustaničnoj tekućini visoka ( $10^{-3}$  M), stoga na kretanje  $Ca^{2+}$  kroz membranu djeluje snažni koncentracijski gradijent te već prodor i malih količina  $Ca^{2+}$  u neuron, bitno povećava koncentraciju slobodnih iona  $Ca^{2+}$  u citosolu neurona. Ulazak  $Ca^{2+}$  u neuron je važan način brzog prijenosa izvanstaničnog signala, zbog čega je održavanje niske unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  od ključnog značaja za signalne funkcije neurona.

Promjene u koncentracijama unutarstaničnih i međustaničnih elektrolita doprinose transmembranskom osmotskom gradijentu koji utječe na ulazak ili izlazak vode iz stanice te promjenu volumena stanica. Također, tijekom stvaranja i prenošenja akcijskih potencijala dolazi do kratkotrajnih promjena u transmembranskom protoku iona i pH-u međustanične tekućine mijenjajući ionski gradijent staničnih membrana pritom utječući na mehanizme održavanja volumena stanica u mozgu (34, 35).

Ishemijski moždani udar inducira nastanak edema mozga kad se protok krvi u mozgu smanji ispod kritične razine od 10 ml/ 100 g/min (36), pri čemu prvo dolazi do smanjenja ionskog transporta, a potom i do oštećenja krvno-moždane barijere što omogućuje ekstravazaciju serumskih proteina i nastanka vazogenog edema (37). Nastanak edema mozga nakon ishemijskog moždanog udara razvija se iz citotoksičnog edema neurona i glije, koji je posljedica prestanka protoka krvi te ionskog i vazogenog edema, koji nastaje nakon ponovne uspostave protoka u ozlijeđenom području.

#### 1.1.4.1. Citotoksični edem

Nakon prvih znakova ishemije dolazi do razvoja citotoksičnog edema mozga (37, 38). Citotoksični edem je proces koji uključuje bubrenje stanica onkotske prirode, nastao kao rezultat kretanja osmotski aktivnih molekula,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  i posljedično vode iz međustaničnih odjeljaka u unutarstanične odjeljke (39, 40, 41). Danas su u upotrebi razni sinonimi za citotoksični edem, poput stanični edem i nekrotično povećanje volumena, koji označavaju patofiziološki proces na staničnoj razini u kojem nema priljeva vode iz intravaskularnog odjeljka niti sveukupnog otoka tkiva. Međutim, citotoksični edem inducira nastanak ionskog i vazogenog edema, koji uzrokuju otok tkiva (42). Osnovne stanice koje bubre su neuroni i astrociti. S obzirom na to da su astrociti od prilike 20 puta brojniji od neurona te unos vode u astrocite može biti i do pet puta veći od njihove dimenzije, to čini bubrenje glije primarnim razlogom nastanka citotoksičnog edema (40). U fiziološkim uvjetima prijenos vode i elektrolita u neurone i gliju odvija se putem primarnog i sekundarnog aktivnog transporta, pri čemu primarni aktivni transport zahtjeva konstantan priljev energije u obliku ATP-a, koji nije dostupan tijekom ishemije (43, 44). Sekundarni aktivni transport pritom koristi postojeće ionske gradijente poprijeko staničnih membrana (transport ionskim kanalima i  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kotransporterima).

Jedna od karakteristika citotoksičnog edema je unutarstanično nakupljanje natrija, do kojeg dolazi zbog ishemijom inducirane promjene u permeabilnosti stanice za natrij, čime se inducira dodatni ulazak iona klora kroz  $\text{Cl}^-$ -kanale te vode kroz kanale za vodu (engl. *aquaporin*), čime se nastoji održati osmotska ravnoteža (45, 46). Za sekundarni aktivni transport koriste se različiti molekularni mehanizmi, primjerice unos  $\text{Na}^+$  uključuje tetradotoksin-senzitivne  $\text{Na}^+$ -kanale,  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  kontransportere, NDMA receptorske kanale koji propuštaju  $\text{Na}^+$  kako u fiziološkim, tako i u patofiziološkim stanjima, pri čemu tijekom ishemije novopridošli  $\text{Na}^+$  ne može biti izbačen iz stanice radi deplecije ATP-a onemogućivši rad ATPaze i ATP-ovisnih transportera (47).

Ishemija osim toga utječe na povećan izražaj neselektivnih kationskih kanala, koji pridonose dodatnim putovima unosu  $\text{Na}^+$  u stanice, poput neselektivnog kationskog kanala  $\text{NC}_{\text{Ca-ATP}}$  koji je izražen 2 do 3 sata od nastanka ishemije, za čije je otvaranje okidač deplecija ATP-a (48). Otvaranje neselektivnih kationskih kanala omogućava izlazak  $\text{K}^+$  iz stanice, međutim kretanja  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  ne neutraliziraju se međusobno, jer je stanica ispunjena negativno nabijenim makromolekulama i proteinima, koji na sebe vežu  $\text{K}^+$ , utječući tako na veći unos

$\text{Na}^+$  nego što je izlaz  $\text{K}^+$ , čime se proizvode osmotske sile koje pridonose unosu vode. Stoga, kako  $\text{Na}^+$  ulazi u stanicu niz koncentracijski gradijent, uzrokuje ulaz  $\text{Cl}^-$  i vode, stanica se depolarizira, dolazi do promjena na staničnoj membrani koja se naposljetku počinje kidati, dolazi do lize i nekrotične stanične smrti (49, 50).

Ekscitatorne aminokiseline poput glutamata također igraju značajnu ulogu u staničnom oštećenju ne samo poticanjem ekscitotoksičnosti neurona, već i potičući unutarstanični unos  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  i time citotoksično bubrenje stanica (51). Završne sinapse neurona u fiziološkim uvjetima oslobađaju glutamat u milimolarnim koncentracijama. Glutamat se veže za nekoliko vrsta receptora poput post- i presinaptičkih ionotropnih i metabotropnih glutamatnih receptora te također za glutamatne transportere glije i neurona, pri čemu je normalna stehiometrija 3  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{H}^+$ , 1  $\text{Cl}^-$  kotransport i antiport jednog iona  $\text{K}^+$  za molekulu glutamata, što se reflektira prijenosom vode iz međustaničnog u unutarstanični odjeljak (52). Unos glutamata u neuron prilikom neuronske aktivnosti indirektno utječe na smanjenje glutamata u sinapsi, međutim to je također većim dijelom zadaća astrocita. Astrociti čiste međustanični odjeljak kako bi spriječili nekontroliranu neuronsku aktivnost uzrokovanu preopterećenjem sinaptičke pukotine glutatom. Međutim, to nije slučaj kod ishemijske ozljede kod koje radi promjena u klirensu glutamata već 30 minuta nakon ishemijske dolazi do porasta koncentracija glutamata u sinapsi i do 150 puta (53).

#### **1.1.4.2. Ionski edem**

Citotoksični edem stanica mozga ne dovodi do povećanja volumena mozga osim u slučaju da dođe do ponovne uspostave krvnog protoka. Citotoksični edem stoga predstavlja redistribuciju tekućine iz međustaničnog u unutarstanični odjeljak. Međustanični prostor zauzima 12 - 19% volumena mozga, zauzimajući tako manji dio mozga u odnosu na unutarstanični prostor (41). Kako bi došlo do stvarnog povećanja moždanog volumena potreban je priljev dodatne tekućine u međustanični prostor. Kretanje iona i vode tijekom nastanka citotoksičnog edema dovodi do deplecije istih u međustaničnom prostoru stvarajući novi gradijent za  $\text{Na}^+$  preko krvno-moždane barijere, između intravaskularnog i međustaničnog odjeljka. Deplecija iona i vode u međustaničnom prostoru inducira transkapilarno kretanje tekućine i stvaranje izvanstaničnog ionskog edema (54, 55, 56). Odumiranjem neurona i glija stanica, njihov unutarstanični sadržaj priključuje se onome međustaničnog odjeljka, pri čemu koncentracijski gradijent  $\text{Na}^+$  uspostavljen poprijeko krvno-moždane barijere potiče dodatno kretanje tekućine u smjeru nastanka edema (57).



Kod ishemije prvu fazu disfunkcije endotela čini nastanak ionskog edema (58, 59, 60, 61, 62). Ionski edem uključuje prijenos  $\text{Na}^+$  kroz krvno-moždanu barijeru, što inducira nastanak gradijenta  $\text{Cl}^-$  i osmotskog gradijenta za vodu, koji dovode do dolijevanja vode u međustanični odjeljak koji je već imao manje  $\text{Na}^+$  zbog nastanka citotoksičnog edema. Kod ionskog edema poput citotoksičnog edema, koncentracija nakupljenog  $\text{Na}^+$  u staničnom odjeljku premašuje koncentraciju  $\text{K}^+$  pospješujući time akumulaciju i abnormalan transport  $\text{Na}^+$  iz vaskularnog odjeljka u međustanični odjeljak (61). Za vrijeme ionskog edema krvno-moždana barijera ostaje intaktna, a mehanizam selektivnog prolaza  $\text{Na}^+$  kroz krvno-moždanu barijeru ovisi o primarnom i sekundarnom aktivnom transportu i analogan je mehanizmu nastanka citotoksičnog edema. Osim promjena ionskih koncentracijskih gradijenata preko krvno-moždane barijere nastalih zbog citotoksičnog edema neurona i glija stanica, ishemija inducira i promjene ionskih kanala endotelne stanice pridonoseći time nastanku ionskog edema. Kanali na luminalnoj strani endotelne stanice doprinose citotoksičnom edemu endotelne stanice, pridonoseći ulijevanju  $\text{Na}^+$  u endotelne stanice, dok kanali na abluminalnoj strani djeluju na smanjenje citotoksičnog edema endotelne stanice, inducirajući izljev  $\text{Na}^+$  niz njegov koncentracijski gradijent iz stanice u međustanični odjeljak doprinoseći ionskom edemu. Integritet krvno-moždane barijere je održan te i kapilarni čvrsti spojevi, tako da na formaciju ionskog edema primarno utječu gradijenti koncentracija  $\text{Na}^+$ , odnosno osmotskog tlaka (63, 64). Kod ionskog edema ne dolazi do prolaza plazmatskih proteina poput albumina iz vaskularnog odjeljka u međustanični odjeljak, karakteristike vazogenog edema koji nastaje oko 6 sati nakon ionskog edema (65, 66, 67, 68).

Ionski i vazogeni edem nastaju zbog promjena u endotelnim stanicama. Prema Starlingovom zakonu nastanka edema  $J_v = K_O (\pi_c - \pi_i) + K_H (P_c - P_i)$  potrebno je identificirati dvije značajke: definirati silu koja „gura“ tvari u međustanični prostor mozga te stupanj propusnosti koji omogućuje prolaz tvari iz intravaskularnog odjeljka u međustanični odjeljak (69). Pomicanje tekućine iz plazme u međustanični odjeljak s pozitivnim izlazim tokom ( $J_v$ ) određen je kapilarnim hidrostatskim tlakom ( $P_c$ ), hidrostatskim tlakom intersticija ( $P_i$ ), kapilarnim osmotskim tlakom ( $\pi_c$ ), intersticijskim osmotskim tlakom ( $\pi_i$ ) te dvama koeficijentima hidrauličke vodljivosti ( $K_H$ ) i osmotske vodljivosti ( $K_O$ ). Sila je definirana zbrojem gradijenata hidrostatskog ( $P$ ) i osmotskog tlaka ( $\pi$ ). Prosječni hidrostatski tlak jednak je razlici tlaka prekapilarnih arteriola i tlaka postkapilarnih venula, koji je generiran pumpanjem srca, dok je osmotski tlak jednak koncentraciji osmotski aktivnih tvari u plazmi naspram koncentraciji u međustaničnom odjeljku (42, 53). U fiziološkim uvjetima osmotski

tlak igra veću ulogu od hidrostatskog tlaka, zbog postojanja čvrstih spojeva između endotelnih stanica onemogućavajući prijenos tekućine poprijeko kapilara. Međutim tijekom ishemijskog oštećenja osmotski i hidrostatski tlak podjednako uz permeabilne pore utječu na prolaz tekućine između endotelnih stanica kapilara koje formiraju krvno-moždanu barijeru (70). U skladu sa Starlingovim zakonom novonastala sila preko krvno-moždane barijere stvorena nastankom citotoksičnog edema predstavlja potencijalnu energiju koja će se osloboditi ako dođe do promjena endotelnih stanica i permeabilnosti krvno-moždane barijere.

#### **1.1.4.3. Vazogeni edem**

Kompleks moždanih kapilara čini bitan dio krvno-moždane barijere, selektivno propustne, metabolički aktivne dinamičke strukture sastavljene od endotelnih stanica čvrsto povezanih čvrstim spojevima. Oko endotelnih stanica nalazi se bazalna membrana, astrocitne nožice glije limitans i periciti. Čvrsti spojevi između endotelnih stanica onemogućavaju prolaz hidrofobih i nabijenih molekula te molekulama velike molekulske mase. Gubitkom integriteta krvno-moždane barijere, kapilare preuzimaju svojstva fenestriranih kapilara, pri čemu i hidrostatski i osmotski tlak podjednako sudjeluju u generiranju edema. Sastavnice hidrostatskog tlaka, krvni tlak i intrakranijalni tlak imaju važnu ulogu uz sastavnice osmotskog tlaka u održavanju volumena mozga. Mozak osim što treba određeni krvni tlak za perfuziju tkiva, istovremeno on ne smije biti prekomjerni jer se time stvara podloga za nastanak edema. Također i intrakranijalni tlak mora biti u određenim granica, jer i prekomjerno snižavanje intrakranijalnog utječe na stvaranje edema (71). Održavanje odgovarajućeg volumena mozga i ionskog sastava svih odjeljaka je vrlo značajno, zbog toga što se mozak nalazi unutar lubanje koja ne dopušta promjene u volumenu mozga te već i male promjene mogu dovesti do povećanja intrakranijalnog tlaka, hernijacije i oštećenja moždanih struktura te naposljetku smrti.

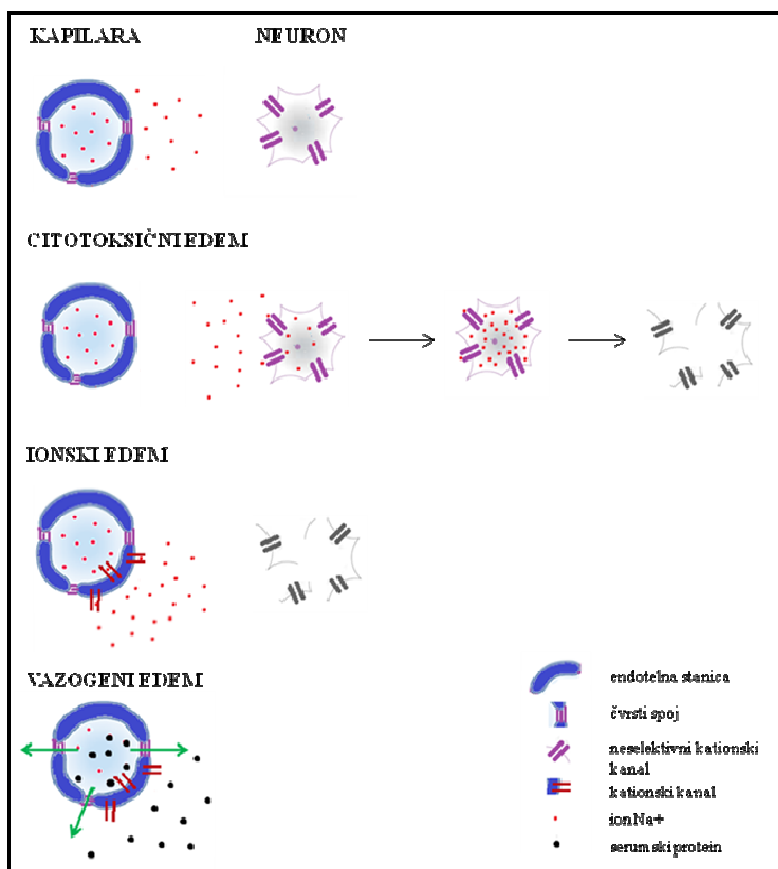
Drugu fazu disfunkcije endotela karakterizira prekid krvno-moždane barijere s izlaskom proteina plazme u međustanični odjeljak, pri čemu makromolekule poput albumina, IgG i dekstrana za koje je inače krvno-moždana barijera nepermeabilna, sada slobodno prolaze (58, 72, 73). Za nastanak vazogenog edema i stvaranje permeabilnih pora koje omogućavaju prolaz većih molekula poprijeko krvno-moždane barijere, poput proteinskog ultrafiltrata bez prolaza eritrocita predloženo je nekoliko mehanizama poput: transcitoze (74), prekida u staničnoj signalizaciji zbog promjena koncentracija kalcija (75), kidanja čvrstih

spojeva (76, 77), propadanje bazalne membrane (78, 79) te retrakcije i zaokruživanja endotelnih stanica ovisnih o aktinskoj polimerizaciji pri čemu dolazi do stvaranja interendotelnih pukotina (80). Posrednici upale poput trombina, histamina i bradikina uzrokuju povećanje endotelne propusnosti stvaranjem interendotelnih pukotina retrakcijom endotelnih stanica zbog aktinske polimerizacije, procesu ovisnom o povećanju unutarstaničnih koncentracija  $Ca^{2+}$  (80). Točan mehanizam nastanka vazogenog edema još nije u potpunosti razjašnjen, međutim posljedice oštećenja endotela moždanih kapilara i integriteta krvno-moždane barijere dovode do prodora proteina plazme u međustanični prostor. Proteini plazme poput albumina za sobom povlače vodu i elektrolite pridonoseći time povećanju volumena ne samo međustaničnog prostora, već i cjelokupne moždane hemisfere.

Patofiziologija moždanog edema nastalog kao posljedice ishemije je složen proces. Kaskada započne promjenama u permeabilnosti stanica za natrij te prekomjernim oslobađanjem ekscitacijskog neurotransmitera glutamata u međustanični prostor potičući time unutarstanični prodor  $Na^{+}$  i  $Ca^{2+}$  te posljedično  $Cl^{-}$  i vode iz međustaničnih odjeljaka u unutarstanične odjeljke. Kretanje osmotski aktivnih tvari i vode unutar stanice dovodi do citotoksičnog bubrenja stanica i naposljetku stanične smrti. Citotoksični edem pritom označavaju patofiziološki proces na staničnoj razini u kojem nema sveukupnog otoka tkiva, međutim inducira nastanak ionskog i vazogenog edema, do kojih dolazi nakon reperfuzije. Kod ionskog edema pritom dolazi do promjene propusnosti endotelnih stanica za  $Na^{+}$ , inducirajući nastanak gradijenta  $Cl^{-}$  i vode iz intravaskularnog odjeljka u međustanični odjeljak koji je već bio prethodno osiromašen  $Na^{+}$  zbog citotoksičnog edema. Posljednju fazu moždanog edema čini vazogeni edem kod kojeg dolazi do gubitka integriteta krvno-moždane barijere. Promjenama u čvrstim spojevima među endotelnim stanicama kapilare preuzimaju svojstva fenestriranih kapilara pri čemu dolazi do prodora proteina plazme te posljedično vode i elektrolita u međustanični prostor pridonoseći povećanju volumena moždanog tkiva (Slika 1).

Trenutno ne postoji djelotvorna terapija specifično usmjerena smanjenju moždanog edema već se koristi niz lijekova i operativnih zahvata za smanjenje visokog intrakranijalnog tlaka koji prati edem mozga nakon velikih ishemijskih oštećenja, počevši od drenaže CNS-a, hiperventilacije, osmotskih diuretika poput manitola ili hipertonične fiziološke otopine, hipotermije, a u slučaju da tlak postane refraktilan dekompresivne hemikranijektomije te odstranjivanja dijelova lubanje, kako bi se edematoznom mozgu omogućio dodatni prostor (53, 81, 82). S obzirom na to da stupanj razvoja edema u različitim vremenskim periodima

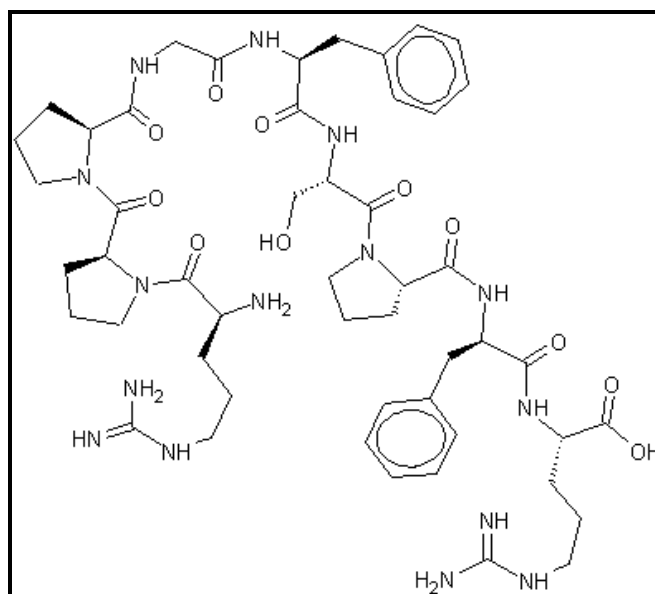
ima drugačiji ishod potrebni su različiti pristupi njegovog smanjenja. Kako je mehanizam nastanka edema predmet ovog istraživanja usmjerili smo se u istraživanje utjecaja bradikininina, s obzirom na to da se smatra važnim posrednikom u upalnom odgovoru živčanog sustava i oštećenju mozga nakon ishemijskog moždanog udara (83, 84).



**Slika 1.** Citotoksični, ionski i vazogeni edem pridonose moždanom edemu nakon ishemijske ozljede mozga. U fiziološkim uvjetima koncentracije iona natrija ( $\text{Na}^+$ ) u serumu i međustaničnom prostoru su podjednake te mnogo više nego unutar neurona. Patološke promjene u ionskoj homeostazi koje nastaju kao posljedica ishemijske ozljede utječu na razvoj različitih vrsta edema koji pridonose oticanju moždanog tkiva. Do citotoksičnog edema neurona dolazi zbog ulaska iona  $\text{Na}^+$  kroz neselektivne kationske kanale u unutarstanični odjeljak stvarajući time koncentracijski ionski i osmotski gradijent između intravaskularnog i međustaničnog odjeljka. Kretanje osmotski aktivnih tvari te posljedično i vode u unutarstanični odjeljak dovodi do citotoksičnog bubrenja neurona i naposljetku stanične smrti. Ionski edem nastaje kao posljedica citotoksičnog edema i promjena propusnosti kationskih kanala na luminalnoj i abluminalnoj membrani endotelnih stanica, pri čemu dolazi do izljevanja iona  $\text{Na}^+$  iz intravaskularnog odjeljka u natrijem osiromašeni međustanični prostor. Vazogeni edem nastaje kao posljedica propadanja čvrstih spojeva između endotelnih stanica pri čemu je omogućen izlaz serumskih proteina i posljedično vode u međustanični odjeljak.

## 1.2. Bradikinin

Kinini su porodica vazoaktivnih peptida koji uključuju bradikinin, kalidin i metionil-lizil-bradikinin, pri čemu se kalidin i metionil-lizil-bradikinin vrlo brzo pretvaraju uz pomoć aminopeptidaza u bradikinin (85). Bradikinin je nonapeptid ( $C_{50}H_{73}N_{15}O_{11}$ ) male molekulske mase (1060.21 Da) (Slika 2). Nastaje kaskadom, koja započinje vezanjem i autoaktivacijom faktora XII u faktor XIIa, aktivacijom prekalikreina (PK) u kalikrein pomoću faktora XIIa te povratnom aktivacijom nastalog kalikreina koji cijepajući kininogen visoke molekulske mase (engl. *high molecular weight kininogen* – HK) stvara bradikinin (86). Bradikinin ima vrijeme poluraspada manje od 30 s i pritom se pretežno veže za bradikininiski receptor  $B_2$ . Aktivacija receptora  $B_2$  dovodi do povećanja vaskularne propustnosti i vazodilatacije (87).



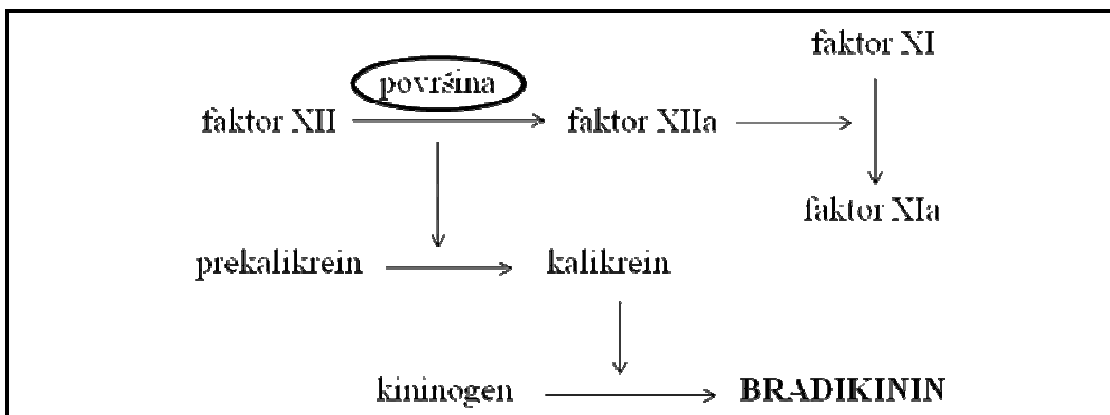
Slika 2. Shematski prikaz molekularne strukture bradikinina.

### 1.2.1. Sinteza bradikinina

Kalikrein-kininski sustav plazme sastoji se od dva proenzima: faktora XII (FXII) i PK te kofaktora HK. Prvotno se smatralo da je to površinski-aktiviran koagulacijski sustav koji se aktivira kad krv ili plazma napusti krvne žile i dođe u dodir s okolnim strukturama. Međutim, iako kontaktna površinska aktivacija djeluje u *in vivo* uvjetima prilikom propadanja tkiva ili nastanka tromba (88), fiziološki poticaji za ovu aktivaciju nisu u potpunosti razjašnjeni. Niz

tvori može djelovati na kontaktnu aktivaciju nastajućeg tromba poput RNA raspadnutih stanica, polisoma s trombocita ili fibrin (89, 90). Iako plazmin aktivira faktor XII, čini se da zasebno nije dovoljan za aktivaciju već samo u slučaju u nedostatka plazmatskog inhibitora komplementa C1 (C1-INH) (91). U *in vitro* uvjetima kaskada nastanka bradikinin je aktivirana vezanjem faktora XII i kompleksa koji se sastoji od HK i PK za negativno nabijenu površinu poput silikata i stakla, pri čemu se PK indirektno povezuje za površinu preko HK (92, 93). Faktor XII je zatim autoaktiviran u faktor XIIa koji konvertira proenzim PK u plazmatski kalikrein koji cijepa HK oslobađajući bradikinin (Slika 3), pri čemu i najmanja autoaktivacija faktora XII dovodi do eksponencijalnog nastanka kalikreina (90). Autoaktivacija pritom označava proces u kojem faktor XII u prisutnosti negativno nabijene površine postaje enzim, faktor XIIa (94). HK, faktor XII i PK vežu se također i za endotelne stanice, trombocite i granulocite (95, 96, 97) te HK služi kao glavno mjesto vezivanja PK i faktora XI, iako se oni mogu vezati za endotelne stanice i neovisno o HK (98, 99). Faktor XII primarno se veže za dupleks endotelnih membranskih proteina u-PAR (engl. *urokinase plasminogen activator receptor*) i citokeratin 1, dok se HK primarno veže na receptor za C1q gC1qR (engl. *receptor for the globular heads of C1q*) i citokeratin 1 (CK1) (100, 101, 102, 103).

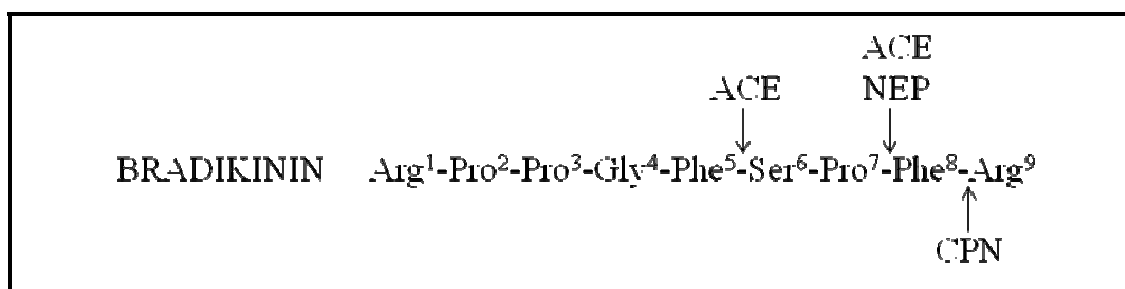
HK ima strukturu koja mu istovremeno omogućava vezanje za endotel i razgradnju u bradikinin. Domena 5 lakog lanca HK i domena 3 lakog lanca vežu se na endotelne membranske proteine gC1qR i citokeratin 1, dok se bradikinin nalazi na domeni 4 koja povezuje domene 1, 2 i 3 lakog lanca i domene 5 i 6 teškog lanca. Na domeni 6 dolazi do vezivanja PK na HK. Donedavno se smatralo da je PK inaktivan, međutim inkubacija PK s HK pokazuje stehiometrijski nastanak bradikinin te također da do aktivacije PK na endotelnim stanicama dolazi i u plazmi bez faktora XII (104). Prilikom dodavanja staničnoj kulturi HK i cinka dolazi do aktivacije PK i stvaranja bradikinin, također se faktor XII može zaobići i dodavanjem proteina HSP-90 (engl. *heat-shock protein*) koji vezanjem na PK-HK inducira nastajanje kalikreina (105, 106).



Slika 3. *In vitro* stvaranje bradikinina (modificirano prema 91).

### 1.2.2. Metabolizam bradikinina

U humanoj plazmi bradikinin se cijepa u inaktivan metabolit posredstvom dvije vrste kinaza: 90% bradikinina cijepa angiotenzin-konvertirajući enzim (engl. *angiotensin-converting enzyme* – ACE; EC 3.4.15.1, kininaza II) u inaktivni bradikinin-(1-5), a ostatak karboksipeptidaza N (CPN; EC 3.4.17.3, kinaza I) u aktivni metabolit bradikinin-(1-8). U tkivima najveću ulogu u metabolizmu bradikinina imaju neutralne endopeptidaze (NEP) te u manjem omjeru ACE. NEP cijepa bradikinin u inaktivni oblik bradikinin-(1-5) (107, Slika 4).



Slika 4. Shematski prikaz bradikinina te mjesta cijepanja bradikinina enzimom konverterom angiotenzina (ACE), neutralnom endopeptidazom (NEP) i karboksipeptidazom N (CPN) (modificirano prema 91).

### 1.2.3. Bradikininski receptori

BK djeluje na dva tipa receptora: bradikininski receptor tipa 1 (B<sub>1</sub>R) i bradikininski receptor tipa 2 (B<sub>2</sub>R) (108). Receptor B<sub>2</sub>R je ubikvitarno i konstitutivno izražen, dok je receptor B<sub>1</sub>R izražen u vrlo maloj količini u zdravom tkivu, što međutim nije slučaj prilikom ozljede kad dolazi do indukcije receptora B<sub>1</sub>R različitim proupalnim citokinima poput interleukina-1 $\beta$ . B<sub>2</sub>R veže bradikinin i kalidin (lilizil-bradikinin), dok je B<sub>1</sub>R aktiviran vezivanjem razgradnog produkta karboksipeptidaza M i N, [Des-Arg9]-bradikininom i [Des-Arg10]-kalidinom (109). Oba receptora su iz rodopsinske porodice G protein-vezanih receptora (engl. *G protein-coupled receptors* – GPCR) koji djeluju primarno preko G proteina G $\alpha_{q/11}$  stimulirajući fosfolipazu C $\beta$  te posljedično hidrolizu fosfoinozitola i mobilizaciju unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup> (110). Također djeluju preko G $\alpha_{i/o}$  radi inhibicije adenilat ciklaze i stimulacije mitogen-aktivirane protein kinaze (111) te neovisno o G proteinima pomoću unutarstaničnih efektora. Na primjer, vezanjem bradikinina na receptor B<sub>2</sub>R endotelnih stanica dolazi do stvaranja dušikov(II)-oksida (NO), prostaciklina i povećanja unutarstaničnih koncentracija Ca<sup>2+</sup> što posljedično dovodi do povećane vaskularne permeabilnosti endotelnih stanica te djelovanjem na glatke mišićne stanice krvnih žila do vazodilatacije (112).

Korištenje knockout miševa za dva gena bradikininskih receptora te različitih specifičnih antagonista pokazano je da su oba bradikininska receptora uključena u niz patoloških stanja poput boli, sepse, alergijske astme, hereditarnog angioedema, dijabetesa, migracije stanica raka te razvoja edema osobito nakon moždanog udara (2, 113, 114, 115).

#### 1.2.3.1. Organizacija i struktura bradikininskih receptorskih gena

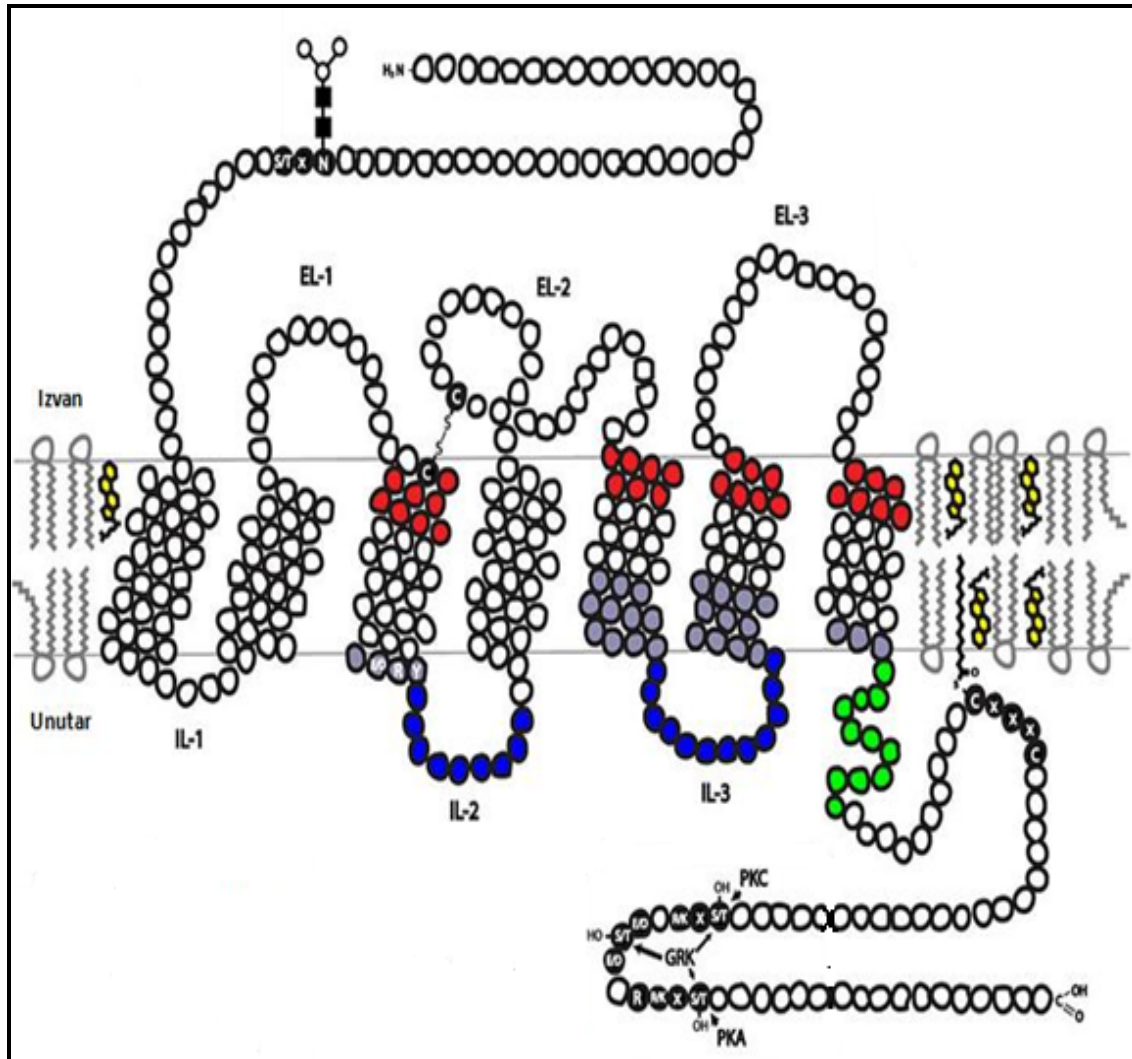
Struktura proteina receptora B<sub>2</sub>R tipična je za strukturu receptora GPCR, koja se sastoji od jednog integralnog membranskog polipeptidnog lanca, koji posjeduje sedam transmembranskih domena (7  $\alpha$ -heliksa, TM1 do TM7) s jednom izvanstaničnom amino N-terminalnom domenom, jednom unutarstaničnom karboksilnom C-terminalnom domenom te tri izvanstanične petlje (EL1 do EL3) i tri unutarstanične petlje (IL1 do IL3) koje povezuju transmembranske domene (Slika 5). Također sadrže i N-vezana glikozilacijska mjesta na izvanstaničnim domenama, zatim motive poput E/DRY i NPxxY koji su parcijalno uklopljeni u unutarstanične domene i uključeni u strukturalne modifikacije receptora prilikom vezivanja liganda (116). Specifično C-terminalna domena često sadrži serin (Ser) ili treonin (Thr) koji služe kao mjesta za fosforilaciju, povećavajući afinitet unutarstanične površine za vezivanje



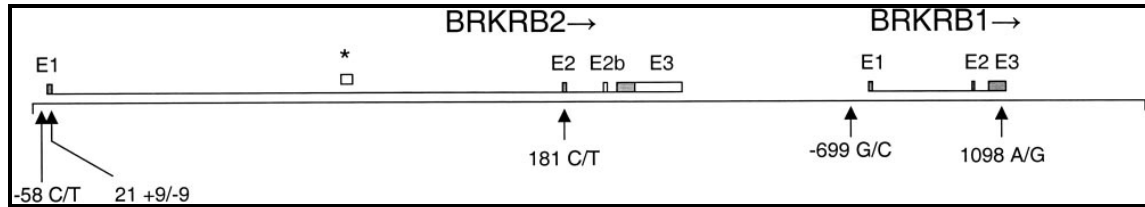
$\beta$ -arestina koji sudjeluju u razdvajanju i internalizaciji G proteina, kao važnog mehanizma desenzitizacije (117). Također na C-terminalnoj domeni se nalaze cisteini koji služe kao mjesta za acetilaciju. GPCR-i formiraju terciarnu strukturu oblika bureta u kojoj sedam transmembranskih heliksa tvore mjesto vezanja liganada. Međutim do vezanja liganada može doći i na izvanstaničnim petljama. Agonistom inducirana aktivacija dovodi do promjena u relativnoj orijentaciji transmembranskih heliksa dovodeći do povećanja unutarstanične površine, dok antagonisti sprječavaju stabilizaciju transmembranske heliksne orijentacije povoljne za prijenos signala. Gen BDKRB2 nalazi se na humanom kromosomu 14 i sadrži 3 egzona (118, Slika 6).

Receptor B<sub>1</sub> homologan je receptoru B<sub>2</sub>, dijele 36% aminokiselinske sekvence te poput B<sub>2</sub> receptora također sadrži N-vezana glikozilacijska mjesta na izvanstaničnim domenama, motive E/DRY i NPxxY te specifična mjesta za fosforilaciju i acetilaciju. Gen humanog B<sub>1</sub> receptora također ima tro-egzonska strukturu (119, Slika 6).

Dva gena kininskih receptora grupirana su u tandem u kompaktni lokus na kromosomu 14, međusobno odvojena za samo 12 kb (120). Danas postoje knockout miševi za gene oba bradikinin receptora, pri čemu B<sub>2</sub>R knockout miševi ne reagiraju na bradikinin, fertilni su te prividno zdravi (121), dok su B<sub>1</sub>R knockout miševi fertilni, razvijaju se normalno, ali ne reagiraju na [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradikinin (122).



**Slika 5.** Dvodimenzionalni shematski prikaz GPCR receptora u lipidnom dvosloju. Struktura GPCR receptora sadrži karakteristični izvanstanični N-terminalni kraj, kojega slijede sedam transmembranskih (7-TM)  $\alpha$ -heliksa (TM-1 do TM-7) povezanih s tri unutarstanične petlje (IL-1 do IL-3) i tri izvanstanične petlje (EL-1 do EL-3) te izvanstanični C-terminalni kraj. Sedam transmembranskih heliksa formira domenu za koju se vežu ligandi (modificirano prema 123).



**Slika 6.** Shematski prikaz lokusa BRKRB1 i BRKRB2 gena humanih kininskih receptora organiziranih u tandem. Prikazan je kromosom 14q32, pozicija 94.66 do 94.73 Mb, ukupno 70 kb te tri glavna egzona svakog gena. Pojedinačni nukleotidni polimorfizmi označeni su ispod strukture gena (modificirano prema 118).

### 1.2.3.2. Signalni mehanizmi bradikinskih receptora

Djelovanje receptora  $B_2$  odvija se preko G proteina  $G_{\alpha_{q/11}}$  (124, 125), ali i preko niza drugih G proteina uključujući  $G_{\alpha_i}$  (126),  $G_{\alpha_s}$  (127) i  $G_{\alpha_{12/13}}$  (128). Djelovanje bradikinina na različitim vrstama stanica stimulira  $G_{\alpha_q}$ -senzitivnu fosfolipazu  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) inducirajući hidrolizu fosfoinozitola te posljedično porast unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  (109, 129). Bradikinin potiče aktivnost fosfolipaze  $A_2$  (130) te fosfolipaze D preko protein kinaze C (PKC) i monomernu GTPazu RhoA (131). Također je pokazano da je bradikinin efikasni stimulator proizvodnje endotelne sintaze dušikov(II)-oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase* - eNOS-a) i NO (132) te aktivira signalni put Janus kinaze/STAT u endotelnim stanicama (133). Ovisno o stanicama na koje djeluje, bradikinin potiče ili smanjuje umnažanje stanica. Proliferativno djelovanje povezano je s faktorima rasta, u čije su signalne putove uključeni razni čimbenici poput MAP kinaze, epidermalnog čimbenika rasta (engl. *epidermal growth factor* - EGF), zajedničkog djelovanja tirozin kinaze Pyk2 i Src, paksilina, a koji reguliraju proliferaciju, migraciju te adheziju. Suprotno djelovanje posredovano je prostaglandinima (134, 135, 136).

Bradikinin za vrijeme ozljede ili upale aktivira transkripcijske čimbenike uključene u indukciju  $B_1$  receptora i citokina.  $B_1$  receptor djeluje slično  $B_2$  receptoru, međutim različitim signalnim obrascima, primjerice u glatkim mišićnim stanicama aktivacija  $B_2$  receptora vodi privremenoj hidrolizi fosfoinozitola koji pokazuje malu ovisnost o izvanstaničnom  $Ca^{2+}$ , dok je signal  $B_1$  receptora značajno ovisan o izvanstaničnom  $Ca^{2+}$  (137).

### 1.2.3.3. Bradikininški receptori u patofiziologiji

Ishemija je jedan od niza patoloških procesa u kojemu dolazi do aktivacije kalikrein-kininskog sustava, a do sad su istražene različite uloge kinina u ishemiji: protektivna uloga kinina u oštećenju tkiva koje slijedi nakon ishemije i reperfuzije (138), proangiogenetski utjecaj inhibicije enzima konvertera angiotenzina (engl. angiotensin-converting enzyme – ACE) (139) te posredovanje u oštećenju mozga nakon moždanog udara djelujući na niz mehanizama odgovornih za upalni odgovor organizma, arteriolarnu dilataciju, povećanu propusnost krvno-moždane barijere te nastanak edema (83, 84).

Nedavna istraživanja su pokazala da proteini Rho i Rac antagonistički reguliraju funkciju endotelne barijere. Nakon stimulacije bradikininom Rho omogućava kidanje međustaničnih čvrstih spojeva, dok Rac na njih djeluje stabilizacijski (140). Nakon injekcije sintetičkog bradikinina dolazi do razvoja tipičnih simptoma upale poput crvenila, žarenja, oticanja i boli, što podudara s regulatornim obrascima aktivacije B2 receptora. Pokazano je pritom da korištenjem različitih antagonista ili inhibitora B2 receptora te kod miševa knockouta B2 receptora dolazi do gubitka upalnog odgovora. Antagonizam B2 receptora se posebno istražuje kod razvoja vazogenog edema koji nastaje nakon ishemičnog moždanog udara, udarca u glavu ili hereditarnog angioedema. Prva klinička aplikacija antagonista B2 receptora s pozitivnim rezultatima pokazana je u mišjem modelu koristeći antagonist LF 16-0687 (84, 141). Danas se koristi i agonizam kinina kako bi se povećala permeabilnost krvno-moždane barijere i omogućila dostava raznih lijekova, ponajprije kemoterapeutika.

Sve komponente kalikrein/kininskog sustava identificirane su u ljudskom mozgu (142). Kalikrein/kininski sustav također pokazuje i značajnu uloga u nizu bolesti središnjeg živčanog sustava, primjerice pokazana je aktivacija kalikrein/kininskog sustava tijekom ishemije (143). Mehanizmi prema kojima bi bradikinin mogao posredovati u ishemijskom oštećenju mozga primarno uključuju aktivaciju B2 receptora, pri čemu dolazi do povećanja permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilatacije, inducira se proupalni učinak i nastanak edema (2, 144). Pokazano je da nakon moždanog udara primjenom antagonista B2 receptora, CP-0597, dolazi do smanjenja moždanog edema, volumena lezije i odumiranja neurona sa znatnim poboljšanjem neurološkog ishoda kod štakora (145). Jednako tako, primjenom novog B2 antagonista, LF 16-0687 Ms, prije i nakon ishemijskog oštećenja znatno se smanjuju poremećaji krvno-moždane barijere, smanjuje se infiltracija neutrofila, neurološko oštećenje i moždani edem (146). LF 16-0687 Ms je trenutno u fazi kliničkog

pokusa za liječenje traumatske ozljede glave, za što je korišten i drugi antagonist B<sub>2</sub> receptora CP-0127 koji je pokazao značajno smanjenje visokog intrakranijalnog tlaka nastalog kao posljedica kontuzije glave (147). Nadalje bradikinin djelujući preko B<sub>2</sub> receptora štiti endotel od induktora stanične smrti, posebice vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (148). Korištenjem bradikinina pokazana je inhibicija ekscitotoksičnosti, a inhibitorni učinak je poništen korištenjem inhibitora receptora B<sub>2</sub>, HOE 140 (149). S obzirom na dvojak učinak aktivacije kalikrein/kininskog sustava korištenje antagonista B<sub>2</sub> receptora onemogućava pozitivno djelovanje bradikinina, pri čemu bi bolja strategija liječenja bila korištenje agonista B<sub>2</sub> receptora za ranu indukciju signalnih putova za preživljavanje endotelnih stanica održavanjem integriteta vaskulature.

S obzirom da trenutno ne postoji djelotvorna terapija specifično usmjerena smanjenju moždanog edema nastalog djelovanjem bradikina na receptor B<sub>2</sub> izabrali smo za naše istraživanje i drugu skupinu vazoaktivnih peptida, natriuretske peptide. Kako su vrijednosti određenih natriuretskih peptida u plazmi i do 18 puta više u osoba s ishemijskim moždanim udarom te ostaju povišene i do 7 dana nakon oštećenja mozga (150) izabrali smo ih uz bradikinin za naše istraživanje s namjerom proučiti također i moguću ulogu njihovog međudjelovanja.

### 1.3. Natriuretski peptidi

Prvi povijesni zapis učinka natriuretskih peptida seže još iz doba rimljana kad je povjesničar Flavius nazvao ronioce koji su gradili luku Cesarea, *urinatores*. Promjene u tlaku prsnog koša prilikom zarona imale su za posljedicu diurezu koja ih je tjerala na češće mokrenje, što će tek mnogo stoljeća kasnije biti znano kao Henry-Gauer refleks (151). Objašnjenje Henry-Gauer refleksa, kao i postojanje endokrine funkcije srca otkriveno je tek polovinom prošlog stoljeća (151, 152), što je otvorilo čitavo novo polje istraživanja od velikog kliničkog značaja.

Tek je 1981. izoliran protein iz atrija štakora, koji povećava bubrežno izlučivanje Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> i urina (153). Peptid je nazvan atrijskim natriuretskim peptidom (engl. *atrial natriuretic peptide* - ANP) zbog toga što je raspoređen unutar desne i lijeve pretkljetke u granulama srčanih mišićnih stanica, a struktura mu je određena 1984. (154, 155). 1988. godine otkriven

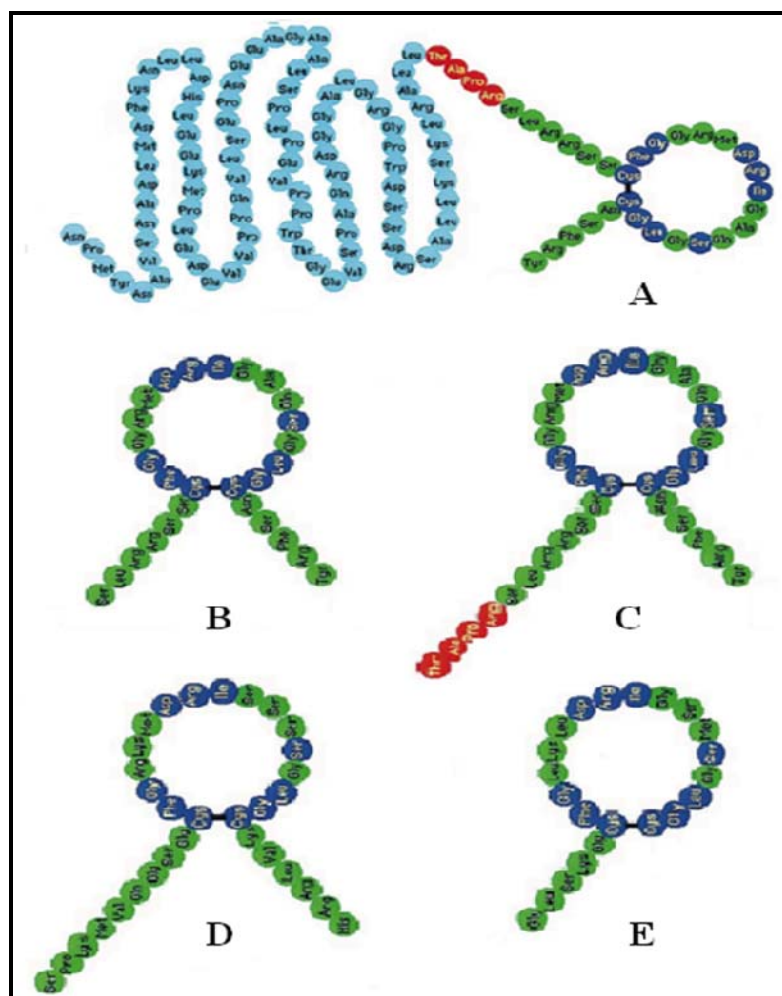
je homologni peptid sa sličnim biološkim učincima u mozgu svinje, zbog čega je nazvan moždanim natriuretskim peptidom (engl. *brain natriuretic peptide* – BNP) iako je kasnije pokazano da ga pretežno izlučuju srčane klijetke (156). Sinteza i sekrecija ANP-a i BNP-a se znatno razlikuje te i nivo BNP-a u plazmi korelira s jačinom srčanog zatajenja, za razliku od nivoa ANP-a (157, 158). 1988. godine otkriven je još jedan član porodice natriuretskih peptida, urodilatin (URO). Proces purifikacije 1000 litara urina rezultirao je otkrićem peptida homolognog C-terminalnim aminokiselinama nađenih u prohormonu atrijskog natriuretskog peptida koji sadrži dodatne četiri aminokiseline na N-terminalnom kraju (159, Slika 7). N-terminalni produžetak govori u prilog tome da je URO sintetiziran u bubregu i kasnije izlučen u urin (160). 1990. godine iz mozga svinje izoliran je još jedan pripadnik natriuretskih peptida nazvan C-tip natriuretski peptid (engl. *C-type natriuretic peptide* - CNP), za kojeg se tek mnogo kasnije otkrilo da se proizvodi u endotelu krvnih žila, glatkim mišićnim stanicama i makrofazima (161, 162, 163).

### **1.3.1. Struktura natriuretskih peptida**

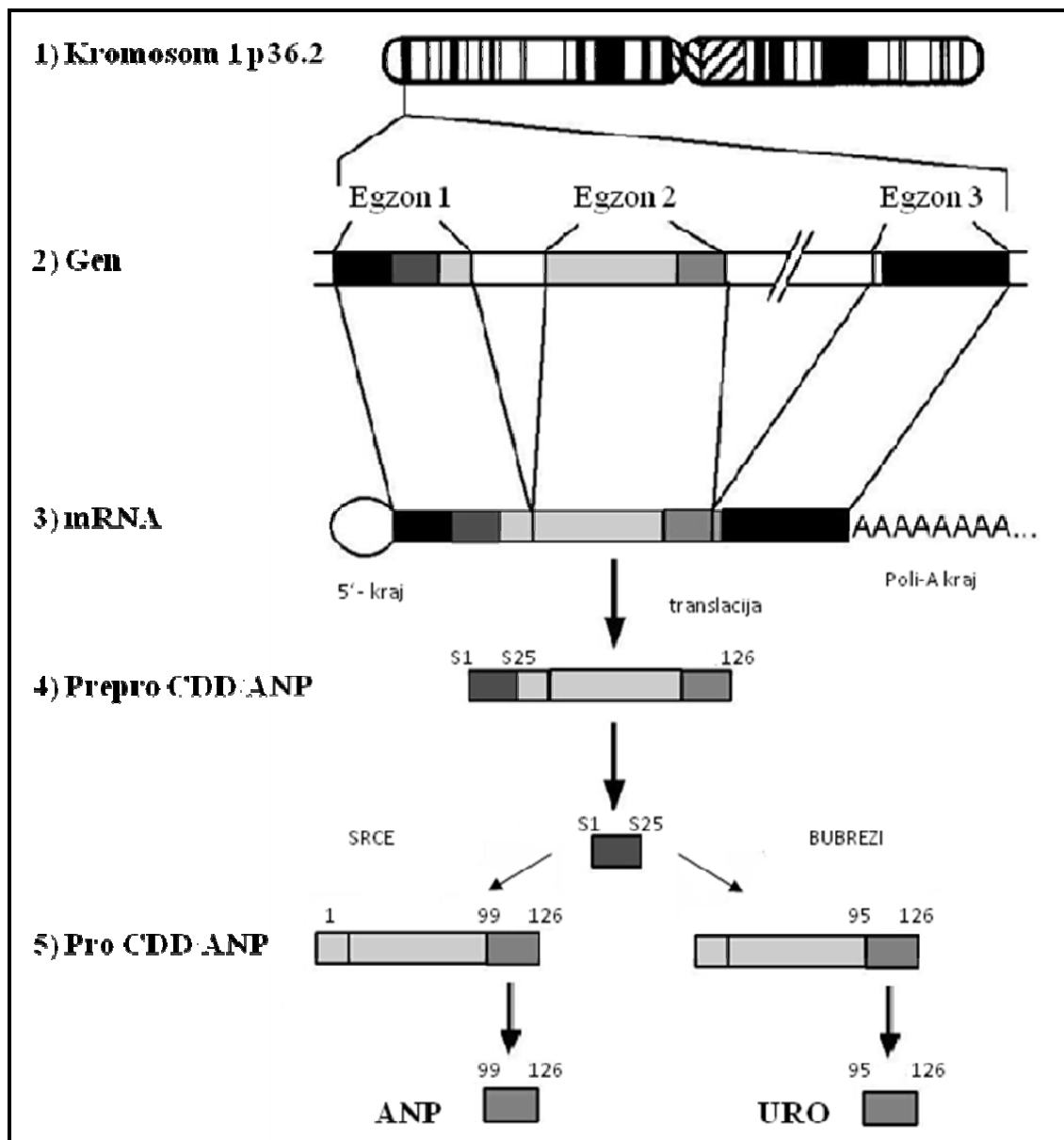
ANP, BNP, CNP i URO imaju sličnu strukturu prstena te dijele 17 zajedničkih aminokiselina (Slika 7). Aminokiselinski završetci ANP-a i BNP-a završavaju karboksi i amino krajem, dok CNP-u nedostaje karboksi kraj, a URO sadrži dodatne četiri aminokiseline na karboksi kraju.

Gen polipeptida humanog ANP prekursora kodira 151 aminokiselinski preprohormon koji se cijepa u 126 aminokiselinski prohormon (proANP<sub>1-126</sub>) u granulama srčanih mišićnih stanica pretklijetki (164). Nakon adekvatnog podražaja za oslobađanje istežanjem srčanih mišićnih stanica dolazi do djelovanja transmembranske serinske proteaze *corin* koja cijepa proANP<sub>1-126</sub> u proANP<sub>1-98</sub> te biološki aktivni ANP<sub>99-126</sub> (154, 165; Slika 8). Humani BNP nastaje cijepanjem 132 aminokiselinskog propeptida u neaktivni N-terminalni fragment od 108 aminokiselina (proBNP<sub>1-108</sub>) koji je dalje cijepan u aktivni hormon od 32 aminokiseline i N-terminalni proBNP (NT proBNP) (166). Humani peptidni prekursori ANP-a, BNP-a i CNP-a kodirani su na kromosomu 1p36.2 i sastoje se od tri egzona odvojena s dva introna. Od 126 aminokiselinskog preprohormona nastaju dvije zrele forme CNP-a, CNP<sub>53</sub> je rasprostranjen u tkivima dok se CNP<sub>22</sub> nalazi u plazmi i cerebrospinalnoj tekućini. URO nastaje alternativnim cijepanjem proANP-a (ANP<sub>95-126</sub>) u tubulima bubrega.

Prvi blok kodirajuće sekvence gena kodira prvih 40 do 41 aminokiseline, 2 egzon kodira aminokiseline 40 (41) do 125, a treći egzon kodira COOH terminalne aminokiseline. Struktura gena ANP-a, BNP-a i CNP-a veoma je slična i lokalizirani su u klaster gena na istom kromosomu.



**Slika 7.** Shematski prikaz natriuretskih peptida. 126 aminokiselinski prohormon proANP<sub>1-126</sub> (A) se cijepa u biološki aktivni atrijski natriuretski peptid - ANP<sub>99-126</sub> (B) te u bubrežnu izoformu urodilatin (C). Moždani natriuretski peptid - BNP (D) i C-tip natriuretski peptid CNP (E) dijele s ANP-om i urodilatinom prstenastu strukturu, 17 zajedničkih aminokiselina te disulfidnu vezu dvije molekule cisteina (modificirano prema 161).



**Slika 8.** Prerada produkta gena lociranom na kromosomu 1p36.2. Egzoni su prepisani u mRNA atrijskog natriuretskog peptida – ANP. Translacijom mRNA nastaje prepro CDD/ANP čijim cijepanjem nastaju propetidi koji u srcu daju kao produkt ANP, a u bubrezima urodilatin (modificirano prema 161).

### 1.3.2. Oslobođanje natriuretskih peptida

Glavni faktor za oslobođanje ANP-a iz sekretornih zrnaca srčanih mišićnih stanica pretklijetke je rastezanje mioendotelnih stanica ili promjena u tlaku zida pretklijetke, međutim osim toga do oslobođanja ANP-a može doći i uslijed djelovanja niza faktora poput



glukokortikosteroida, katekolamina, arginin vazopresina, angiotenzina II i endotelina 1 (153, 167). Sintetizirani ANP u fiziološkim uvjetima utječe na regulaciju homeostaze elektrolita i vode te regulaciju krvnog tlaka. Izvan srca različitim imunohistokemijskim metodama pokazano je prisustvo ANP-specifične mRNA u nizu drugih organa poput mozga, bubrega, probavnom traktu, nadbubrežnim žlijezdama, plućima, timusu, za koje se smatra da nemaju veliki utjecaj na sekreciju ANP-a koji se nalazi u plazmi, već da imaju lokalno autokrino/parakrino djelovanje (167).

Osim ANP-a, sinteza BNP u manjim količinama se također odvija u granulama srčanih mišićnih stanica pretkljetki, a oba peptida se u manjim količinama sintetiziraju i u miokardu kljetke. Smatra se da je regulacija sinteze različita u fiziološkim uvjetima, gdje igra glavnu ulogu u regulaciji povećanog istezanja zida kljetke te u patološkim uvjetima poput ventrikularne hipertrofije ili fibroze miokarda koje uvjetuju pojačanu sintezu (158).

Posttranslacijske modifikacije prohormona ANP-a u bubrezima su različite od onih u srcu, rezultirajući stvaranjem URO-a umjesto ANP-a (168). URO se sintetizira u distalnim tubulima bubrega s funkcijom regulacije natrija i izlučivanja vode. Osim toga URO zajedno s ANP-om smanjuje sekreciju renina te onemogućava oslobađanje aldosterona i angiotenzin II induciranu reapsorpciju natrija i vode u proksimalnim tubulima bubrega.

CNP regulira opuštanje glatkih mišićnih stanica te inhibira aktivaciju i proliferaciju fibroblasta onemogućavajući razvoj fibroze (169). Također, igra važnu ulogu u enhondralnoj osifikaciji, spermatogenezi i posteljici (170, 171).

### **1.3.3. Metabolizam natriuretskih peptida**

Natriuretski peptidi mogu biti inaktivirani različitim putovima: enzimatskom razgradnjom NEP-ama ili lizosomalnom razgradnjom nakon vezanja na receptor čistač (engl. *clearance receptor*). NEP je membranski vezana metalopeptidaza koja sadrži cink, a rasprostranjena je u endotelnim stanicama, vaskularnim glatkim mišićnim stanicama, srčanim miocitima, bubrežnim epitelnim stanicama i fibroblastima (172). NEP uspješno razgrađuje natriuretske peptide te ostale vazoaktivne peptide poput supstance P, bradikinina, angiotenzina II, endotelina 1, adrenmedulina, enkefalina i amiloidnog  $\beta$  peptida. Lokaliziran je primarno u bubrezima, međutim također je nađen u plućima, nadbubrežnoj žlijezdi, mozgu,

srcu i perifernoj vaskulaturi (173). Dugotrajnom inhibicijom NEP inducira se pojačano izlučivanje natrija i potiče prekomjerno stvaranje cGMP-a i ANP-a neovisno o promjenama u sistemskoj hemodinamici utječući pritom na glomerálnu i tubularnu funkciju bubrega (174, 175). URO je za razliku od ostalih natriuretskih peptida sintetiziran u distalnim bubrežnim tubulima i izlučen u lumen te se skoro čitav izlučuje iz bubrežnog tubularnog sistema. Također je pokazano da je URO puno otporniji na NEP od ostalih natriuretskih peptida, zbog dodatne četiri aminokiseline na N-terminalnom kraju (159, 160).

#### **1.3.4. Receptori natriuretskih peptida**

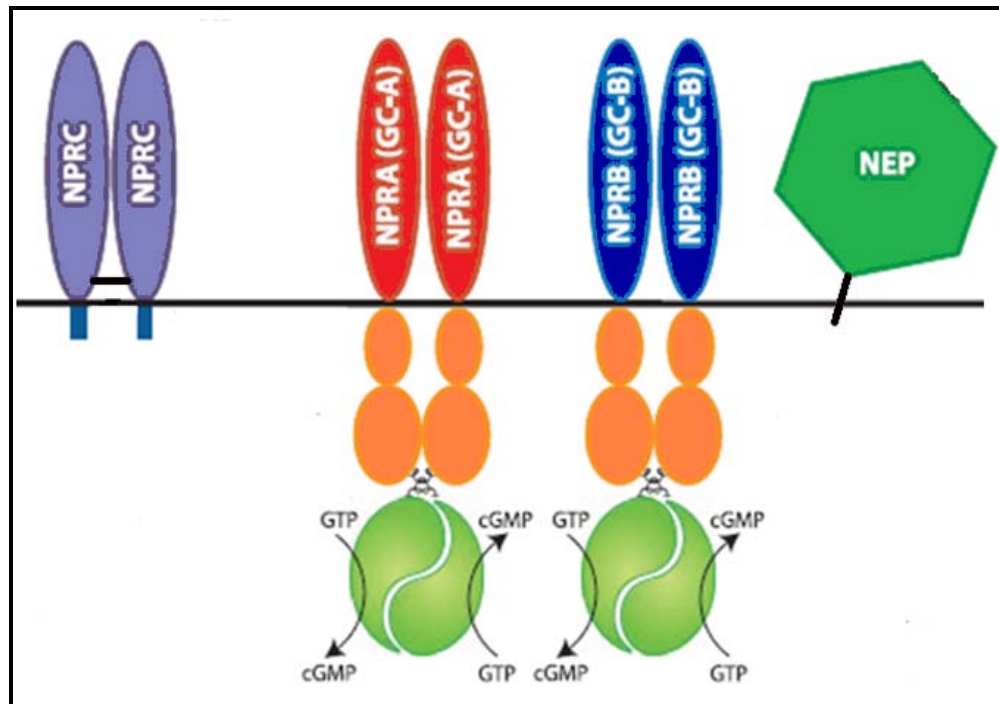
Različiti biološki učinci natriuretskih peptida posredovani su vezanjem za membranski-vezane gvanilat ciklaze (membrane-associated guanylyl cyclase - GC), nazvane još i receptori natriuretskih peptida (engl. *natriuretic peptide receptors* - NPR). Receptori za natriuretske peptide koji sudjeluju u regulaciji elektrolita i vode te krvnog tlaka su gvanilat ciklaza A (GC-A), nazivana još i receptor natriuretskih peptida A (engl. *natriuretic peptide receptor-A* - NPR-A), zatim gvanilat ciklaza B (GC-B) ili receptor natriuretskih peptida B receptor za CNP, a naziva se i (engl. *natriuretic peptide receptor-B* - NPR-B), inačica prekrajanja NPR-B, receptor NPR- Bi (engl. *natriuretic peptide receptor-Bi*) te receptor natriuretskih peptida C (engl. *natriuretic peptide clearance receptor* - NPR-C) ili receptor čistač, receptor koji nema gvanilat ciklaznu funkciju.

1988. godine izoliran je prvi receptor natriuretskih peptida, NPR-C, iz glatkih mišićnih stanica u stijenci krvnih žila. Koristeći parcijalnu sekvencu aminokiselina, uspješno je klonirana čitava cDNA, što je omogućilo utvrđivanje čitave aminokiselinske sekvence. Molekula receptora sadržavala je 496 aminokiselina koje čine veliku izvanstaničnu domenu, transmembranski heliks i 37 aminokiselinski ostatak koji čini citoplazmatsku domenu. Općenito je prihvaćeno je da je uloga ovog receptora vezanje, uklanjanje i razgradnja natriuretskih peptida i njihovih fragmenata iz krvne plazme, zbog čega je i nazvan receptor čistač natriuretskih peptida. Osim toga pokazana je i njegova uloga u aktivaciji G-proteina osjetljivog na pertusis toksin (PT) i inhibiciji adenilat ciklaze (176).

Slijedeće godine klonirana je prva humana gvanilat ciklaza nazvana GC-A, čijom je ekspresijom pokazano da se radi o receptoru za ANP (177). Ubrzo nakon kloniranja GC-A, potvrđeno je i postojanje GC-B receptora koji također na sebe veže natriuretske peptide (178).

Nakon vezanja natriuretskih peptida na izvanstanične domene membranskih proteina, biološka aktivnost natriuretskih peptida posredovana je aktivacijom gvanilat ciklazne domene koja se nalazi na C-terminalnom kraju na unutarstaničnom kraju receptora (Slika 9). GC-A specifično veže na sebe ANP, BNP i URO, GC-B veže na sebe CNP, a NPR-C veže ANP, BNP i CNP. Vezanje natriuretskih peptida na receptore aktivira gvanilat ciklaznu funkciju povećavajući unutarstaničnu koncentraciju 3',5'-cikličkog gvanozin monofosfata ciljne stanice (177). NPR-Bi je skraćeni receptor, rasprostranjeno izražen u tkivima te poput NPR-B veže CNP, međutim nema gvanilat ciklaznu funkciju, već tirozin kinazno djelovanje (179).

Velika porodica gvanilat ciklaza sastoji se još i od niza drugih gvanilat ciklaza poznatih i nepoznatih funkcija i liganada. Primjerice, GC-C je glavni receptor gvanilinskih peptida gvanilina i urogvanilina u crijevu, zatim GC-D, GC-E, GC-F smještene su u osjetilnim organima, a njihovi ligandi nisu poznati, dok je GC-G receptor čiji ligand nije poznat, a smješten je u poprečno-prugastim mišićima, plućima, probavnom sustavu i glavnim stanicama kortikalnih sabirnih kanalića (180 - 186).



**Slika 9.** Shematski prikaz tri receptora natriuretskih peptida: receptor natriuretskih peptida C (engl. *natriuretic peptide clearance receptor* - NPR-C) ili klirens receptor, receptor bez gvanilat ciklazne funkcije na koji se vežu svi natriuretski peptidi, zatim gvanilat ciklaza A (GC-A; receptor natriuretskih peptida A engl. *natriuretic peptide receptor-A* - NPR-A) na koji se vežu ANP i BNP i gvanilat ciklaza B (GC-B; receptor natriuretskih peptida B engl. *natriuretic peptide receptor-B* - NPR-B) na koji se veže CNP te neutralna endopeptidaza (NEP) enzimatski razgrađuje sve natriuretske peptide (modificirano prema 222).

#### 1.3.4.1. Gvanilat ciklaza A

Izražaj mRNA humanog receptora GC-A pokazao je rasprostranjenost receptora u bubrezima, nadbubrežnim žlijezdama, aorti, plućima, ileumu, masnom tkivu te malom i velikom mozgu (187, 188, 189). Od staničnih linija, GC-a je izražen u primarnim glatkim mišićnim stanicama, bubrežnim mezangijskim stanicama, humanim embrionalnim bubrežnim stanicama (engl. *Human embryonic kidney cells 293* - HEK-293) (190).

GC-A receptor sastoji se od izvanstanične 450 aminokiselinske domene na koju se vežu ligandi, 20 do 25 ostataka jednostruke hidrofobne membranske regije i unutarstanične 570 aminokiselinske domene koja tvori uz pomoć 250 aminokiselina domenu homolognu

kinazi, 40 ostataka dimerizirajuće domene i oko 250 aminokiselina tvori karboksi terminalnu katalitičku domenu gvanil ciklaze (191).

Za GC-A je pokazano da se povezuje s nekoliko proteina, u HEK-293 stanicama pokazana je interakcija GC-A s proteinima *heat shock* 70 i 90 (HSP70 i HSP90), koji služe kao molekularni šaperoni zaslužni za pravilno savijanje proteina. Pretpostavka je da se HSP90 veže za homolognu domenu GC-A povećavajući produkciju cGMP-a induciranu vezanjem ANP-a (192). Također je pokazan mehanizam fosforilacije i aktivacije GC-A cGMP-ovisnom protein kinazom I (193).

Humani gen za GC-A dugačak je oko 16 kb, sadrži 22 egzona i nalazi se na kromosomu 1q21-22 (194). Knockouti GC-A gena imaju visok krvni tlak, srčanu hipertofiju i ventrikularnu fibrozu (195). Kod ljudi je pokazano da mutacija jednog alela u promotoru gena GC-A, smanjuje izražaj receptora za više od 70% (196). Također, nedavno je pokazano da neadekvatna funkcija atrijskog natriuretskog peptida dovodi do povećanog rizika od moždanog udara u ljudi i pokusnih životinja. Točkasta mutacija na egzonu 1 povećava dva puta rizik za nastanak hipertenzije, dijabetesa i debljine te nasljeđivanje T2238C mutacije povećava do četiri puta vjerojatnost dobivanja ishemijskog moždanog udara. Osim toga pokazano je i da sinergističkim djelovanjem mutiranog ANP peptida te različitih molekularnih varijanti njegovog receptora GC-A patološki efekti se amplificiraju, povećavajući, tako i rizik nastanka ishemijskog moždanog udara (197, 198).

Aktivacija GC-A receptora nije u potpunosti razjašnjena, ali hipoteza je da postoje tri stanja u kome se nalazi: bazalno, aktivno i stanje desenzitizacije. U bazalnom stanju GC-A receptor je u stanju visoko organiziranog oligomera i fosforiliran je na 6 mjesta unutar homologne domene kinaze. Smatra se da se fosforilacijom omogućava hormonalna aktivacija. Vežanjem natriuretskih peptida na fosforilirani inaktivni receptor dolazi do konformacijske promjene kod koje dolazi do primicanja jukstamembranskih h domena što aktivira prijenos signala preko membrane te dovodi do dimerizacije ciklazne domene (Slika 9; 190, 191).

#### **1.3.4.2. Gvanilat ciklaza B**

Izražaj mRNA humanog receptora GC-B pokazao je rasprostranjenost receptora u plućima, mozgu, nadbubrežnim žlijezdama, jajnicima, koži, malom mozgu te u velikom mozgu ponajprije limbičkom korteksu, neokorteksu, hipokampusu i amigdali (199, 200, 201).

GC-B receptor ima jednaku topologiju GC-A receptora. Mutirani NRP2 smanjuju hormon-ovisnu aktivnost gvanilat ciklaze. Danas postoje dva mišja modela s nefunkcionalnim GC-B receptorima, kod kojih je uočen patuljasti rast te sterilnost ženki (202). Humani gen za GC-B je dugačak oko 16,5 kb, sadrži 22 egzona i lociran je na kromosomu 9q21-22 (203). Homozigotni gubitak funkcije zbog mutacije GC-B gena identificiran je kod ljudi patuljastog rasta s kratkim udovima, tj. kod koštane displazije tipa Maroteaux, kod koje međutim za razliku od mišjeg modela nije uočena sterilnost. Također je primijećeno da su pacijenti sa samo jednom mutacijom GC-B alela niže visine (204).

### 1.3.4.3. Signalni mehanizmi receptora natriuretskih peptida

Glavna fiziološka uloga natriuretskih peptida je regulacija volumena krvi i krvnog tlaka te djelovanje na različite organske sustave posebno bubrege, srce i krvne žile (205). Međutim, efekti natriuretskih peptida mijenjaju se ovisno o patofiziološkom stanju, primjerice o intravaskularnom volumenu, srčanom tonu te receptorskoj aktivnosti. Natriuretski peptidi djeluju posredstvom sinteze unutarstaničnog drugog glasnika cGMP-a. cGMP se veže na 3 cGMP-vežuća proteina: cGMP-ovisnu protein kinazu (engl. *cGMP dependent protein kinases* - PKG), cGMP-vežuću fosfodiesterazu (engl. *cGMP binding phosphodiesterases* - PDEs) i ionske kanale ovisne o cGMP-u (engl. *cyclic nucleotide-gated ion channels* - CGN).

Uloga natriuretskih peptida u regulaciji volumena krvi i krvnog tlaka pokazana je kod miševa kojima potpuno nedostaje ANP ili GC-A receptor i koji imaju 20 do 40 mmHg viši tlak od normalnog, dok miševi bez BNP imaju 20 do 30 mmHg niži od normalnog krvnog tlaka (195, 206). ANP regulira ravnotežu transvaskularne tekućine povećavajući mikrovaskularnu permeabilnost, mehanizmom koji je još uvijek nepoznat (207, 208, 209). Mehanizam ANP-ovisne vazorelaksacije je poprilično dobro istražen i dokazana je njegova ovisnost o PKGI signalnom putu. Kod knockout PKGI miševa ne dolazi do vazodilatacije kao odgovora na povišenje koncentracije cGMP zbog djelovanja agenasa poput ANP-a ili NO (205). PKGI inducira relaksaciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica smanjujući unutarstaničnu koncentraciju  $Ca^{2+}$  aktivirajući i fosforilirajući nekoliko kalcijevih kanala (210). Postoje dvije izoforme PKG-a, PKGI koja je citoplazmatska te PKGII koja je vezana na membrane. Delecija gena PKGI homolognom rekombinacijom kod miševa dovodi do gubitka cGMP-ovisnog opuštanja vaskularnih glatkih mišića te juvenilne hipertenzije, dok kod delecije PKGII gena miševi su normotenzivni, patuljastog rasta (205, 211). PDE su važni

regulatori signalnog sustava cikličkih nukleotida i njihovih koncentracija, jer razgrađuju cikličke nukleotide u inaktivne monofosfate.

ANP i BNP imaju direktne učinke na srce, primjerice miševi koji nemaju ANP ili GC-A imaju povećano srce kao rezultat dugotrajne sistemske hipertenzije te zbog gubitka lokalnih inhibitornih efekata na rast srca (212, 213). BNP utječe na inhibiciju proliferacije fibroblasta, što je pokazano kod miševa kojima nedostaje BNP i u kojih se razvija fibroza klijetki (214). Nedavna istraživanja pokazuju da srčana fibroza uključuje signalni put endopeptidaza MMP (engl. *matrix metalloproteinases*), jer i ANP i BNP reguliraju razinu MMP-a, koja je značajno povišena u nedostatku GC-A receptora (215, 216). Također je pokazano i da se cGMP-ovisna PKGI $\alpha$  veže direktno na regulatore signalnog puta G-proteina 2 (engl. *regulator of G-protein signaling* – RGS-2) kojeg fosforilira, čime se inhibira signalni put receptora *thrombin receptor protease-activated receptor* (PAR) 1, upućujući na kardioprotektivni učinak RGS2 preko PKG kod patoloških stanja poput hipertrofije kod kojih dolazi do pretjerane aktivacije G $\alpha_q$  (217). Osim toga pokazana je značajna uloga RGS-4 u srčanim mišićnim stanicama, kod kojih se u fiziološkim uvjetima kod stimulacije ANP–om PKG veže i fosforilira RGS-4, potom se on veže na G $\alpha_q$  inhibirajući njegove hipertrofičke faktore (218). Razina BNP-a se koristi u dijagnozi srčanog udara te kao prediktor mortaliteta nakon srčanog i moždanog udara (219). U bubrežima ANP povećava glomerularnu filtraciju, smanjuje reapsorpciju natrija i vode te sekreciju renina. Funkcija ANP-a u bubrežima je cGMP-ovisna i posredovana je isključivo GC-A receptorima, što je pokazano u knockout miševima koji potpuno gube ovu funkciju (220). Natriuretski peptidi također sudjeluju u imunološkom odgovoru organizma. ANP djeluje protuupalno smanjujući proizvodnju proupalnih citokina poput TNF- $\alpha$  i IL-12 (221). URO inducira snažniju diurezu i natriurezu od ANP-a, regulira homeostazu vode, soli i krvni tlak te je zbog svojih karakteristika korišten kod dekompenziranog zastoja srca gdje je pokazao blagotvoran hemodinamički učinak (222).

Svi natriuretski peptidi i njihovi receptori pronađeni su u mozgu (223). Djelovanje natriuretskih peptida u mozgu proučavano je ponajprije preko želje za solju te ANP-ovisnoj supresiji simpatičke aktivnosti (224, 225). Neodgovrajuće djelovanje ANP-a ili GC-A receptora zbog genskog polimorfizma dovodi do povećanog rizika od moždanog udara u ljudi (197, 198) te je pokazano povišenje vrijednosti ANP-a u plazmi u osoba s moždanim udarom, koje ostaju više od normalnih i do 7 dana nakon oštećenja mozga (150).

U ovom radu opisan je učinak natriuretskih peptida na signalni put bradikinina u staničnom modelu. Kako je pokazano da su natriuretski peptidi prirodni antagonisti signalnog puta bradikininskog receptora tipa 2 istražen je njihov učinak u mišjem modelu ishemijskog moždanog udara u kojemu dolazi do aktivacije bradikininskog receptora tipa 2. Također je za ovo istraživanje osmišljena nova metoda oslikavanja mišjih mozgova mikro-kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT), koja je omogućila brzu vizualizaciju i kvantifikaciju ishemijskih lezija i moždanog edema u mišjem mozgu.



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

## **2.1. Hipoteza**

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

## **2.2. Ciljevi rada**

### **2.2.1. Opći cilj**

Opći cilj istraživanja je razjasniti mogući mehanizam djelovanja natriuretskih peptida na signalni sustav bradikinina te učinak njihovog međudjelovanja na događaje koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga.

### **2.2.2. Specifični ciljevi**

U svrhu potvrđivanja hipoteze, određen je niz specifičnih ciljeva:

1. istražiti učinke bradikinina, ANP-a, BNP-a, CNP-a i urodilatina na HEK-293 stanicama
2. odrediti učinke i mehanizam djelovanja natriuretskih peptida na učinak bradikinina na HEK-293 stanicama
3. odrediti prisutnost receptora za bradikinin i natriuretske peptide u HEK-293 stanicama i mozgu divljeg tipa miševa
4. odrediti učinak natriuretskih peptida, bradikinina te njihovog međudjelovanja na veličinu ishemijske lezije, sadržaj vode te stupanj neurološkog oštećenja u miševa divljeg tipa te na taj način donijeti zaključak utječu li pojedine komponente ili njihovo međudjelovanje na ishemijsku ozljedu mišjeg mozga.

### **3. UZORCI I POSTUPCI**

### 3.1. Uzorci

U ovom radu korišteni su divlji tip HEK-293 (engl. *human embryonic kidney*) stanica i mužjaci miševa soja C57Bl/6NCrI, starosti od 2 do 4 mjeseca (težine  $22 \pm 3$  g). Svi miševi korišteni u pokusima imali su slobodan pristup hrani i vodi prije i nakon pokusa.

#### 3.1.1. Stanični model - Divlji tip stanica HEK-293

Stanice HEK-293 divljeg tipa (WT HEK-293) nasadene su na stakalca metodom tripsinizacije. Kad su stanice dosegle konfluenciju od oko 80% isprane su s 5 ml otopine Hank's Balanced Salt Solution (HBSS; Sigma Aldrich Chemie GmbH) te nakon toga s 10 ml otopine HBSS bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$ . Nakon odstranjenja medija, tijekom 1 minute primijenjen je 1 ml otopine 0,25% tripsina (Sigma Aldrich Chemie GmbH) i 0,02% EDTA (Sigma Aldrich Chemie GmbH) kako bi se stanice odvojile od podloge posude za staničnu kulturu, nakon čega su centrifugirane 4 minute na 1000 okretaja/min u mediju za prekid tripsinizacije (5 ml HBSS bez  $Mg^{2+}$  i  $Ca^{2+}$  kojem je dodano 1 ml 10%-tnog seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal Bovine Serum* - FBS; Sigma Aldrich Chemie GmbH). Supernatant je bačen, a stanice su resuspendirane u 10 ml medija za održavanje medija Eagle prilagođenog po Dulbeccou (Dulbecco's Modified Eagle Medium - DMEM; Sigma Aldrich Chemie GmbH) te presađene u nove posude za staničnu kulturu s prethodno steriliziranim stakalcima. Inicijalna kultura stanica obilježena je kao P0, a svaka slijedeća subkultura (pasaža) obilježena je brojem koji označava broj izloženosti tripsinu (P1, P2, P3, itd.). HEK-293 stanice korištene su od 2 do 197 pasaže, a upotrebljavane u pokusima 2 - 10 (prosječno 6) dana nakon nasađivanja. Stanice su održavane u DMEM mediju koji sadrži 3,7 g/l  $NaHCO_3$ , uz dodanih 2 mM L-glutamina (Sigma Aldrich Chemie GmbH), 10 ml/l Penicilin/Streptomicina (10000 E/10000 mg/ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH) i 10% FBS-a. Stanice su održavane u atmosferi s 5%  $CO_2$ /95% zraka na 37°C.

### **3.1.2. Animalni model - miševa soja C57Bl/6NCrl**

#### **3.1.2.1. Žrtvovanje životinja i izolacija mozga radi izolacije RNA**

Mušjaci miševa predviđeni za izolaciju mozga ( $n = 2$ ), radi izolacije RNA žrtvovani su postupkom cervikalne dislokacije. Cervikalna dislokacija izvedena je naglim povlačenjem repa miša, uz istovremeno držanje glave u nepomičnom položaju, pri čemu dolazi do trenutnog prekida kralježničke moždine te istovremenu smrt uz minimalan osjet boli. Nakon brze izolacije mozak je zamrznut u tekućem dušiku te po smrzavanju tretiran 1 ml otopine za izolaciju RNA, TRI-Reagensom (TRI-Reagent; Molecular Research Center, Cincinnati (OH), SAD) i homogeniziran korištenjem za to predviđene staklene tučke (engl. *glass tissue grinders*). Tijelo miša koje nije bilo potrebno za daljnje pokuse odloženo je u za to predviđenom hladnjaku ( $\square 20^{\circ}\text{C}$ ) te potom spaljeno. Uzorci za izolaciju ukupne RNA iz mišjeg mozga nakon izolacije mozga i dodavanja otopine za izolaciju RNA odloženi su na led 5 - 15 minuta.

### **3.2. Izolacija ukupne RNA iz HEK-293 stanične kulture i iz mišjeg mozga soja C57Bl/6NCrl**

Za izolaciju ukupne RNA iz HEK-293 stanične kulture korišten je kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Prema uputama proizvođača  $1 \times 10^7$  stanica lizirano je uz 1 minutno miješanje na vortexu u 600  $\mu\text{l}$  pufera Buffer RLT za lizu stanica s dodanim gvanidin isotiocijanatom (GITC), pri čemu je dobiveni stanični homogenat. Staničnom homogenatu dodano je 600  $\mu\text{l}$  70% etanola te promiješano pipetiranjem. 700  $\mu\text{l}$  uzorka naneseo je na RNeasy mini spin kolonu (koja je postavljena na novu epruvetu od 2 ml) te centrifugirano 15 sekundi na 8000 g. Nakon centrifugiranja u RNeasy mini spin kolonu dodano je 700  $\mu\text{l}$  pufera za ispiranje Buffer RW1 i centrifugirano još 15 sekundi na 8000 g. RNeasy mini spin kolona je zatim prebačena na novu epruvetu od 2 ml te je u kolonu pipetirano 500  $\mu\text{l}$  pufera Buffer RPE i centrifugirano 15 sekundi na 8000 g, nakon čega je taj postupak ponovljen pri čemu je centrifugiranje trajalo 2 minute kako bi se omogućilo sušenje RNeasy membrane. RNeasy mini spin kolona je zatim prebačena na novu epruvetu od 1,5 ml te je u kolonu pipetirano 30 - 50  $\mu\text{l}$  vode bez RNaza (engl. *RNase-free water*) i centrifugirano minutu na 8000 g.

Za izolaciju ukupne RNA iz mišjeg mozga nakon izolacije mozga i dodavanja otopine za izolaciju RNA, uzorci su inkubirani na sobnoj temperaturi 5 minuta, a potom centrifugirani brzinom od 12000 g 10 minuta na 4°C. Uzorcima je dodano 0,2 mL kloroforma, inkubirano 5 do 15 minuta na sobnoj temperaturi i centrifugirano pri 12000 g do 15 minuta na 4°C. Gornja, vodena faza prenesena je u novu epruvetu te na nju dodano 0,5 mL izopropanola i inkubirano 5 do 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ponovnim centrifugiranjem pri 12000 g tijekom 8 minuta na 4°C dobiveni se precipitat spustio na dno epruvete. Supernatant je bačen, a precipitat ispran 1 mL 75% etanola i centrifugiran brzinom od 7500 g 5 minuta na 4°C. Zatim je talog otopljen u destiliranoj vodi te koncentracija i čistoća izolirane RNK provjerena pomoću UV-VIS spektrofotometra za mjerenje malih uzoraka (*NanoDrop* ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., Wilmington (DE), SAD) mjerenjem apsorbancija pri 260 nm i 280 nm. Iz izmjerene apsorbancije pri 260 nm dobivena je koncentracija DNK, dok je čistoća DNK uzorka određena iz omjera  $A_{260}/A_{280}$ , pri čemu je za DNK zadovoljavajuće čistoće taj omjer iznosio između 1,6 i 1,8.

### **3.3. Reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR) na RNA iz HEK-293 stanične kulture i iz mišjeg mozga**

Reverznu transkripciju čini sinteza jednolančane komplementarne DNA (cDNA) na temelju kalupa mRNA uz pomoć enzima reverzne transkriptaze. Nakon reverzne transkripcije slijedi umnažanje odsječaka cDNA postupkom lančane reakcije polimerazom (umnožavanja DNA *in vitro* uz pomoć termostabilne DNA polimeraze), zbog čega se cijeli postupak naziva reverzna transkripcija s lančanom reakcijom polimerazom (engl. *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*, RT-PCR).

Sinteza cDNA iz RNA HEK-293 stanične kulture provedena je koristeći kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Njemačka) u reakcijskom volumenu od 20 µl i sadržavala je slijedeće:

- 3 µl mRNA
- 1 µl početnica Oligo (dT)<sub>18</sub>-Primer (0.5 µg/µl)
- 8,5 µl vode bez nukleaza (engl. *nuclease-free water*)

- 4 µl pufera 5X Reaction buffer
- 0,5 µl inhibitora RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (20 U/µl)
- 2 µl 10 mM smjese nukleotida dNTP Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- 1 µl reverzne transkriptaze RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/µl)

Sadržaj reakcijske smjese je inkubiran 5 min na 25°C, nakon čega je slijedila sinteza 60 minuta na 42°C i prekid reakcije zagrijavanjem 5 minuta na 70°C.

Po 1 µl cDNA korišten je za 50-µl PCR reakcijsku smjesu koja je sadržavala:

- 20 pmol od svake početnice (2 x 1,5 µl) (Tablica 1)
- 0,5 µl (5 U/µl) polimeraze DreamTaq<sup>TM</sup>-DNA Polymerase (Fermentas)
- 5 µl 10X PCR buffer
- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- 3 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 35, 5 µl vode bez nukleaza (engl. *nuclease-free water*)

Lančana reakcija polimerazom (PCR) za uzorke iz HEK-293 stanične kulture izvedena je u Biometra TGradient 96 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Njemačka) koristeći slijedeće uvijete: denaturacija uzoraka 2 minute na 95°C, lijepljenje početnica 30 sekundi na 57 - 62°C i produljivanje lanaca 30 sekundi na 72°C, 1 ciklus; 30 sekundi na 57 - 62°C i 30 sekundi na 72°C, 34 ciklusa za PCR reakcije ili 25 ciklusa za reamplifikacijske reakcije: 30 sekundi na – specifičnoj temperaturi (Tablica 1) te 10 minuta na 72°C, 1 ciklus.

1 µg izolirane stanične RNA iz homogenata mišjeg mozga prepisano je u cDNA postupkom reverzne transkripcije. Sinteza cDNA provedena je u reakcijskom volumenu od 25 µl i sadržavala je slijedeće:

- 1 µg mRNA
- 1 µl početnica Oligo (dT)<sub>18</sub>-Primer (1 µg/µl; Promega GmbH, Mannheim, Njemačka)
- 14 µl H<sub>2</sub>O (sterilizirana, deionizirana; inkubirano 5 minuta na 70°C i 5 minuta na 4°C)
- 5 µl pufera M-MLV RT 5X Reaction buffer (Promega)
- 0,5 µl 10 mM smjese nukleotida dNTP Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; Promega)

- 1  $\mu\text{l}$  reverzne transkriptaze RevertAid<sup>TM</sup> H Minus M-MuIV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu\text{l}$ ; Promega)
- 4,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (sterilizirana, deionizirana; inkubirano 10 minuta na 40°C, 50 minuta na 47°C i 15 minuta na 70°C)

Dobivena cDNA kvantitativno je umnožena postupkom PCR. Mješavina za PCR ukupnog volumena 50  $\mu\text{l}$  sadržavala je:

- 2  $\mu\text{l}$  cDNA
- 2  $\mu\text{l}$  od svake početnice
- 0,4  $\mu\text{l}$  10 mM smjese nukleotida dNTP Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP; Promega)
- 10  $\mu\text{l}$  pufera 5X Green GoTaq Reaction Buffer (Promega)
- 10  $\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub>
- 0,25  $\mu\text{l}$  GoTaq DNA polimeraze (Promega)
- 31,35  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O (sterilizirana, deionizirana)

PCR je izveden u stroju 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem, SAD). Uvjeti reakcije bili su slijedeći: početna denaturacija uzoraka 2 minute na 94°C, nakon toga 30 ciklusa koji sadrže denaturaciju (30 sekundi na 94°C), lijepljenje početnica (30 sekundi na specifičnoj temperaturi (Tablica 1)) i produljivanje lanaca (60 sekundi na 72°C) te završno produljenje lanaca 7 minuta na 72°C. Za reamplifikacijske reakcije korišteno je 35 ciklusa po jednakim uvjetima.

Postupak elektroforeze DNA na horizontalnom agaroznom gelu korišten je za analizu proizvoda lančane reakcije polimerazom. Postotak agaroze u gelu ovisio je o duljini odsječaka DNA koji su trebali biti analizirani, gušći (2% ili 1,5%) za kraće odsječke i rjeđi (0,8%) za dulje odsječke. Agarozni gel je pripremljen stavljanjem agaroze i 40 ml 0,5 x Tris boratnog pufera (89 mM Tris baza, 89 mM borna kiselina i 2mM EDTA, pH 8) u Erlenmeyerovu tikvicu te zagrijavanjem minutu u mikrovalnoj pećnici. Za vrijeme hlađenja na otprilike 50°C u agarozni gel dodana je otopina etidij bromida (10 mg/ml) na 100 ml gela. Tekući agarozni gel prebačen je u horizontalnu kadnicu za elektroforezu u koju je postavljen češalj za oblikovanje jažica, gdje je ostavljen oko 15 minuta kako bi se polimerizirao. Na agarozni gel stavljen je Tris boratni puffer. Po 10  $\mu\text{l}$  uzorka DNA (PCR produkta) i veličinskih DNA standarda Bench Top 100 bp DNA ladder (Promega) nanošeni su u jažice gela. Elektroforeza



je trajala oko sat vremena pri naponu od 100 mV (10 mV/cm gela). Gel je fotografiran digitalnom kamerom Electrophoresis Documentation and Analysis System EDAS 290 (Eastman Kodak Company, SAD) pod UV svjetlošću transiluminatora (Vilber Lourmat GmbH, Njemačka). Slike su analizirane i obrađene softverom KODAK 1D LE 3,6.

**Tablica 1.** Početnice korištene za identifikaciju mRNA za B<sub>1</sub>R, B<sub>2</sub>R, NPR-A, NPR-B, NPR-Bi, NPR-C receptore i pozitivnu kontrolu GAPDH HEK-293 stanične kulture i za B<sub>1</sub>R, B<sub>2</sub>R, GC-A receptora u mozgu miševa soja C57Bl/6NCrl.

mRNK	Početnice	Veličina	T
B <sub>1</sub> R	S: 5'- AAC TCC TCC AAA AGC AGC TCT CAC -3' AS: 5'- CTG CCA CGT TCA GTT GCC GC -3'	418 pb	64,0°C
B <sub>2</sub> R	S: 5'- ACC ACG GCC TCT TTC AGC GC -3' AS: 5'- ATG GCA TTC ACC ACG CGG CA -3'	350 pb	62,0°C
NPR-A	S: 5'- CAA GCG CTC ATG CTC TAC GCC TAC -3' AS: 5'- GAT GTT CTC CCC ATC AGT AAC AGT TC -3'	600 pb	61,0°C
NPR-B	S: 5'- GAC AAT ACA GGA AGG AGG CA -3' AS: CAG GGT TGA AAG TGG AGT TT -3'	319 pb	61,6°C
NPR-Bi	S: 5'- GAC TCT CAC TCC AGC CCT AGT CTC -3' AS: 5'- TTC AGC GCT TGA CCA TTA GAC TCC -3'	169 pb	52,1°C
NPR-C	S: 5'- AAT TGT CGT GGG GGC TTT AC -3' AS: 5'- TGG AGG CAG ATG GTG ATT AAT -3'	349 pb	59,8°C
GAPDH	S: 5'- CAA GGT CAT CCA TGA CAA CTT TG -3' AS: 5'- GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G -3'	496 pb	58,0°C
B <sub>1</sub> R	S: 5'- GAC GGC AAG CCC AAG TGA CCT G -3' AS: 5'- AGA GCC GGC CTG CAA AGA CAT AAA -3'	504 pb	60°C
B <sub>2</sub> R	S: 5'- ACA CAA GTC CTC GGG TCT GCT CT -3' AS: 5'- TTG TGG CCC TCT TCG CTG TAT TCC -3'	530 pb	60°C
GC-A	S: 5'- CCT GAA GCA GCT AAA ACT CTT -3' AS: 5'- CAT TAA AGT TCA GGA CAA CCC -3'	308 pb	54°C

### 3.4. Metoda prikovanih potencijala

Metoda prikovanih potencijala (engl. Patch-clamp) korištena je za određivanje učinaka natriuretskih peptida, određivanje učinaka bradikininu te određivanje učinaka njihovog međudjelovanje na HEK-293 stanicama.

Stakalca s jednim slojem WT HEK-293 stanica fiksirana su na dno komorice za perfuziju smještenoj na invertnom mikroskopu (Axiovert 10, Zeiss, Göttingen, Njemačka). Kao otopina za perfuziju korištena je standardna Ringerova otopina koja je sadržavala: 145 mmol/l NaCl, 1,6 mmol/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 mmol/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol/l D-glukoze, 1 mmol/l MgCl<sub>2</sub> i 1,3 mmol/l kalcij-glukonata (pH 7.4). Svi pokusi izvedeni su na 37°C uz brzinu perfuzije od 10 ml/min. Membranski potencijali mjereni su pomoću staklene „Patch-clamp“ pipete izgrađene izvlačenjem zagrijanih staklenih cijevčica promjera 1,4 mm (Science products GmbH, Hofheim, Njemačka) uz pomoć Single Stage Glass Microelectrode Puller-a (PP 830, Narishige, Japan). Pipete korištene za pokuse ispunjene su otopinom koja je sadržavala: 95 mmol/l kalij- glukonata, 30 mmol/l KCl, 4,8 mmol/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,2 mmol/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mmol/l D-glukoze, 0,73 mmol/l kalcij-glukonata, 1 mmol/l EGTA, 1,03 mmol/l MgCl<sub>2</sub> i 1 mmol/l ATP (pH 7,2). Da bi se omogućila permeabilizacija membrane pod otvorom pipete otopini je dodano 160 μM nistatina (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Njemačka). Otopina za pipete je filtrirana prije upotrebe. Početni otpor pipeta iznosio je između 5 i 15 MΩ. U patch clamp pipetu uložena je mjerna elektroda, dok je referentna elektroda uložena u otopinu za perfuziju koja je oplakivala stanice. Obje elektrode sačinjene su od AgCl<sub>2</sub>.

Nakon dodirivanja stanice vrhom patch clamp pipete, primijenjen je vakuum nastao uz pomoć povlačenja šprice povezane cjevčicom s patch clamp pipetom, da bi se dio membrane uvukao u otvor pipete i pritom postiglo priljublivanje membrane uz pipetu s posljedičnim stvaranjem megaomskog otpora. Nistatin u pipeti je nakon par minuta doveo do otvaranja nespecifičnih ionskih kanala, čime se električki povezala unutrašnjost stanice s mjernom elektrodom smještenoj u patch clamp pipeti. Zbog polaganog porasta mjenog potencijala, ova metoda se naziva “slow-whole-cell patch clamp technique”. Membranski potencijal mjereno je pomoću pojačala (U. Fröbe, Physiologisches Institut, Universität Freiburg, Germany) i bilježen pisačem (WeKa graph WK-250R, WKK, Kaltbrunn, Switzerland).

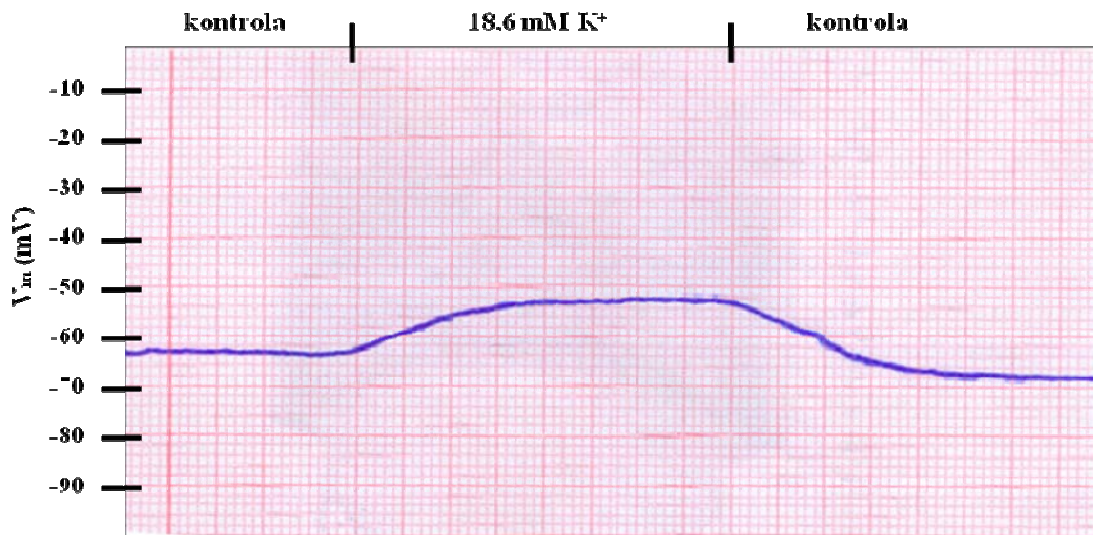
Učinak svih korištenih tvari na membranski potencijal (V<sub>m</sub>) je odredivan parnim pokusima te izračunavan je prema formuli (Slika 10):

$$\Delta V_m \text{ (mV)} = V_2 - \frac{V_1 + V_3}{2}$$

V<sub>1</sub> = membranski potencijal stanice prije učinka ispitivane tvari

V<sub>2</sub> = membranski potencijal stanice za vrijeme učinka

V<sub>3</sub> = membranski potencijal stanice nakon učinka



**Slika 10.** Izračunavanje promjene membranskog potencijala  $\Delta V_m$  (mV) na primjeru depolarizacije u iznosu od 14 mV na HEK-293 stanicama izazvane porastom koncentracije  $K^+$  u kupelji s 3,6 mM na 18,6 mM.

Sve tvari korištene u pokusima otopljene su u Ringerovoj otopini neposredno prije pokusa (Tablica 2). Nakon uspostavljanja stabilnog membranskog potencijala, vijabilnost stanice određivana je promjenom koncentracije kalija u otopini s 3,6 na 18,6 mM.

**Tablica 2.** Tvari korištene u pokusima mjerenja membranskog potencijala.

Tvar	Koncentracija
ANP	$10^{-10}$ do $10^{-6}$ M (10 nM)
BNC	$10^{-10}$ do $10^{-6}$ M (10 nM)
CNP	$10^{-10}$ do $10^{-6}$ M (10 nM)
URO	$10^{-10}$ do $10^{-6}$ M (10 nM)
BK	100 nM
BaCl <sub>2</sub>	1m M
NPPB	10 $\mu$ M
8Br-cGMP	100 $\mu$ M
EHNA	1 $\mu$ M
CCG-63802	5 $\mu$ M
HOE 140	100 nM
KT 5823	1 $\mu$ M
U 73122	10 $\mu$ M

### 3.5. Mjerenje koncentracije unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup>

Stanice WT HEK-293 održavane su u DMEM mediju 2 dana. Dva dana prije početka pokusa pripremljen je Fluo 4-AM-loading medij miješanjem 1 mM Fluo 4-AM (Invitrogen, Karlsruhe, Njemačka) u dimetil-sulfoksidu (DMSO) s jednakim volumenom 20% Pluronic F-127, nakon čega je Fluo 4-AM razrijeđen HHB medijem (otopina HBSS s dodanih 20 mM 2-(4-(2-hidroksietil)-1-piperazinil)-etansulfonske kiseline (HEPES; Sigma Aldrich Chemie GmbH) i 0,1% albumina govedeg seruma (engl. *bovine serum albumin* - BSA; Sigma Aldrich Chemie GmbH) do krajnje koncentracije od 1 μM. Za svaki pokus 1,5x10<sup>6</sup> stanica inkubirano je u Fluo 4-AM-loading mediju 30 minuta na sobnoj temperaturi, pri čemu su stanice u mediju zaštićene od svijetla. Stanice su zatim isprane HHB medijem dva puta, inkubirane u HHB mediju 15 minuta na sobnoj temperaturi te 15 minuta na 37°C radi deesterifikacije. Protok Ca<sup>2+</sup> mjereno je 204 sekunde koristeći protočni citometar FACSCalibur (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Njemačka). Jednaki volumeni aktivatora i inhibitora otopljenih u HHB mediju dodani su 30 sekundi nakon početka svakog mjerenja (Tablica 3). Pozadinski šum definiran je koristeći jednake volumene HHB medija bez korištenja aktivatora i inhibitora. Za analizu podataka korišten je program za analizu protočne citometrije FlowJo 7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, SAD).

**Tablica 3.** Tvari korištene u pokusima mjerenja koncentracije unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup>.

Tvar	Koncentracija
URO	10 nM
CNP	10 nM
8Br-cGMP	500 μM
BK	100 nM
2-APB	50 μM
UTP	10 μM
U-73122	10 μM

### 3.6. Izazivanje ishemijskog oštećenja

Za izazivanje ishemijskog oštećenja mozga miša u istraživanju korištena je unilateralna intraluminalna okluzija (začepljenje) srednje moždane arterije, tj. MCAO metoda (*engl. Middle Cerebral Artery Occlusion method*).

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

Relativni protok krvi u mogu miševa za vrijeme MCAO zahvata praćen je pomoću laser dopplera moorVMS-LDF (Moore Instruments Inc., Wilmington (DE), SAD). Postavljanje probe izvedeno je pod operacijskim mikroskopom, radi pravilnog postavljanja probe dopplera te izbjegavanja mogućih dodatnih oštećenja okolnih struktura. Miš je anesteziran i održavan pod anestezijom 2 % mješavinom izoflurana i kisika korištenjem vaporizatora. Izveden je zasjek uzduž glave miša kako bi se odstranila koža i opne te izložio skalp. Štapićima obloženim vatom se pažljivo osušio skalp na koji je uz pomoć ljepljive pričvršćena plastična cjevčica koja je služila kao držač probe dopplera. Cjevčica je dodatno učvršćena korištenjem akrilata za izradu reparatura hladnom polimerizacijom Poli repair S (Ivoclar Vivadent GmbH, Austrija) pomiješanim s Pro base cold polimerom (Ivoclar Vivadent GmbH, Austrija), kako bi se onemogućilo pokretanje probe i osigurala stabilnost tijekom snimanja. Otvor cjevčice postavljen je 1 mm posteriorno od bregme, lateralno od sljepoočne linije. Cjevčica je ispunjena parafinskim uljem (Sigma Aldrich Chemie GmbH) i u nju postavljena proba dopplera. Mjerenja su izvedena pri frekvenciji od 2 Hz prilikom čitavog MCAO zahvata te tijekom vađenja filameta kako bi se pratio protok krvi prilikom reperfuzije, praćena su pomoću softvera moorVMS-PC V1.0 (Moore Instruments Inc., Wilmington (DE), SAD). Pravilan položaj laser dopplera iznad središnje moždane arterije određen je tako da se privremeno stisnula zajednička karotidna arterija i pratio pad protoka krvi.

Zahvat je u potpunosti izveden pod operacijskim mikroskopom, radi izbjegavanja mogućih dodatnih oštećenja okolnih struktura te skraćivanja trajanja kirurškog zahvata. Nakon

postavljanja miša na grijanu podlogu operacijskog stola izveden je zasjek u području vrata, odmaknuto meko tkivo i žlijezde slinovnice pomoću štapića omotanih vatom te su izložene lijeva zajednička karotidna arterija te vanjska i unutrašnja karotidna arterija rasijecanjem od okolnog tkiva i živaca. Zatim je 6-0 kirurškim koncem napravljeno 3 čvora, prvi na zajedničkoj karotidnoj arteriji, zatim drugi što distalnije na vanjskoj karotidnoj arteriji te treći proksimalno od račvišta. Unutrašnja karotidna arterija je zatim izolirana te su na nju postavljene samozatvarajuće pincete. Između 2 i trećeg čvora je zatim napravljen mali zasjek te je okluzija srednje moždane arterije provedena uvođenjem kirurškog konca obloženog silikonom, debljine 6-0 (Docol Corporation, Redlands, CA 92374-4707, USA) prvo u lijevu unutrašnju karotidnu arteriju te nakon njenog grananja, u srednju moždanu arteriju. Duljina uvođenja od otprilike 14 mm mjerena je od račvišta zajedničke karotidne arterije, odnosno do pružanja otpora konca koji je dobar pokazatelj da se konac nalazi na račvištu srednje moždane arterije. Nakon sat vremena silikonizirani konac uveden u srednju moždanu arteriju je izvađen omogućivši tako reperfuziju. Rana je zašivena 4-0 silikoniziranim koncem te premazana otopinom joda. Moguća dehidracija spriječena je primjenom 1 ml fiziološke otopine. Miš je potom premješten na 24 sata u kavez, na grijanu podlogu (37 °C). Hrana i voda pružena je *ad libitum*. U prethodno navedenim postupcima radi postizanja maksimalno aseptičnih uvjeta korišten je zasebni set instrumenata koji je prije svake operacije dezinficiran i steriliziran u suhom sterilizatoru.

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

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

(1,14mg/kg po primjeni) otopljen u fiziološkoj otopini (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl) te četvrtoj skupini mješavina BK-a (1,14mg/kg po primjeni) i URO-a (0,68 mg/kg po primjeni) otopljenih u fiziološkoj otopini (50 µl po primjeni, ukupno 150 µl).

### **3.7. Procjena neurološkog oštećenja**

24 sata nakon izazivanja ishemijske ozljede, miševi su podvrgnuti procjeni neurološkog oštećenja, modificiranom metodom koja je opisana u literaturi (226), a korištena studijama iz laboratorija (227, 228). 24 sata nakon MCAO zahvata neurološki status miševa procjenjivan je tako da je promatrana spontana aktivnost miša unutar kaveza te zatim pri pridržavanju miša za rep.

Procjenjivani parametri bodovani su slijedećim vrijednostima:

- 0 bodova - miševi bez deficita, koji nisu pokazivali nikakva odstupanja od uobičajene spontane aktivnosti
- 1 bod - miševi koji su pokazivali slabost (nemogućnost ispružanja) prednjih udova te okretanje torza prema ipsilateralnoj strani pri pridržavanju miša za rep
- 2 bodova - kruženje miševa tijelom prema oštećenoj strani pri kretanju unutar kaveza
- 3 boda - nemogućnost podnošenja težine na oštećenoj strani prilikom kretanja unutar kaveza
- 4 boda- nedostatak spontane lokomotorne aktivnosti

### **3.8. Procjena veličine ishemijske lezije mikroCT-om**

24 sata nakon MCAO zahvata miševi su anestetizirani intraperitonealnom (i. p.) injekcijom 2,5% avertina (oko 0,7 ml; Sigma Aldrich Chemie GmbH). Nakon što je miš uspavan škaricama je napravljen zasjek u području abdomena, tako da su prerezani koža i mišići. Pincetom se zatim pridrži sternum te škaricama prerežu dijafragma te rebra kako bi se

otvorio prilaz srcu. U lijevu klijetku se uvede igla 27 G te pažljivo prereže desna predklijetka. Perfuzija (oko 10 ml/min) započinje uštrcavanjem 50 ml otopine fosfatnog pufera (engl. *phosphate buffered saline* - PBS; sastava: 13,7 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,65 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) kako bi se isprala sva krv iz krvotoka. Blijeda jetra su znak uspješne perfuzije, nakon čega je otopina PBS-a zamijenjena s 30 ml 4%-tne otopine paraformaldehida (engl. *Paraformaldehyde* - PFA; Sigma Aldrich Chemie GmbH) u PBS-u. Miševima je nakon dekapitacije pažljivo pincetama odstranjena lubanja te izolirani mozak postavljen u 4%-tnu otopinu PFA u PBS-u na 4°C na 24 sata radi postfiksacije. Nakon postfiksacije, mozgovi su isprani dva puta u PBS-u te premješteni na 5 dana na sobnoj temperaturi u kontrastno sredstvo Omnipaque razrijeđeno PBS-om 1:2. Kontrastno sredstvo i njegova koncentracija odabrani su na isti način probirom između neionskog kontrastnog sredstva niske osmolarnosti monomera ioheksola Omnipaque (GE-HealthCare, Oslo, Norveška) te ionskog kontrastnog sredstva visoke osmolarnosti, meglumin ioksitalamat Telebrix (Guerbert, Charles de Gaulle, Cedex, Francuska) razrijeđena PBS-om u omjerima 1:2, 1:5, 1:10 i 1:20, do krajnje koncentracije joda od 0,14 mol/dm<sup>3</sup>, 0,28 mol/dm<sup>3</sup>, 0,55 mol/dm<sup>3</sup> i 1,38 mol/dm<sup>3</sup>.

Nakon kontrastiranja mozgovi su pripremljeni za skeniranje 1076 mikroCT-om (SkyScan, Belgija) na način da je odstranjen višak kontrastnog sredstva te su mozgovi omotani plastičnom folijom, čime je onemogućena dehidracija prilikom skeniranja. Slike su dobivene korištenjem 48 kV i 90 μA što odgovara prostornoj rezoluciji od 9 μm, uz rotacijski pomak od 0,6° kroz 198° dajući 331 projekcijsku sliku. Upotrebom 0,5 mm aluminijskog filtera promijenjena je kvaliteta energije snopa x-zraka u mikroCT uređaju. Smanjenje šuma na dobivenim slikama dobiveno je uprosječanjem 5 slika u konačnu sliku.

Koncentracija kontrastnog sredstva određena je mjerenjem unutar regija od interesa (engl. *regions of interest*, ROI) 10 optičkih rezova bijele tvari (corpus callosum) i sive tvari (kore mozga) kako bi se dobio što bolji signal i time omogućila veća morfološka razlučivost. Izmjerene vrijednosti signala pretvorene su u standardne atenuacijske jedinice (Hounsfield Units, HU). Tako dobivene vrijednosti ucrtane su u odnosu na izračunate koncentracije joda u odgovarajućem razrjeđenju kontrastnog sredstva.

Za rekonstrukciju dobivenih rezultata korišten je softver mikroCT NRecon (SkyScan, Belgium). Rekonstruirane slike obrađene su softverom DataViewer (SkyScan, Belgium) kako bi se ujednačio položaj svakog mozga, koji je pohranjen kao transaksijalni set podataka. Granice lijeve hemisfere, desne hemisfere i lezije određene su i pohranjene kao zasebne regije



od interesa. Zatim je softverom CTAn (SkyScan, Belgium) izvedena volumetrijska analiza hemisfera i same lezije na način da je ručno određen volumen, koji je generiran i izračunat interpolacijom kroz rezove od značaja unutar referentnih granica.

### **3.9. Histološko bojenje po Nisslu**

Nakon skeniranja mikroCT-om mišji mozgovi su isprani otopinom PBS-a te prebačeni u 30%-tnu otopinu saharoze u PBS-u na 4°C radi dehidracije i krioprotekcije. Nakon 3 dana mozgovi su izvađeni iz saharoze, pažljivo je odstranjen višak saharoze te neposredno prije rezanja uklopljeni u ljepilo za tkivo Tissue-Tek (O.C.T. compound, Sakura, SAD). Mозgovi su smrznuti na -20°C te koristeći kriostat (Leica CM1850, Leica Microsystems, Njemačka) prethodno ohlađen na -20°C izrezani na frontalne rezove debljine 35µm koji su postavljeni na pozitivno nabijena predmetna stakla (Superfrost Plus, Menzel-Glaser, Gerhard Menzel GmbH, Njemačka) i pohranjeni na -20°C do uporabe. Svaki šesti rez korišten je za bojenje po Nisslu.

Rezovi mozga na stakalcima fiksirani su u 100% metanolu na 10 minuta, zatim rehidrirani u silazećem alkoholnom nizu (96% etilni alkohol (EtOH) 5 minuta, 70% EtOH 2 minute i 50% EtOH 2 minute), isprani 2 puta u destiliranoj vodi (2 minute), obojani bojom Cresyl Violet (Sigma Aldrich Chemie GmbH) 6 minuta te 2 puta isprani vodom po 2 minute. Nakon bojanja, rezovi su dehidrirani u uzlaznoj seriji alkohola (50% EtOH 2 minute, 70% EtOH s nekoliko kapi 10% glacijalne octene kiseline) 2 minute, 70% EtOH 2 minute, 96% EtOH 2 minute i 100% EtOH 10 min. Zatim je korišteno sredstvo za bistrenje Histoclear (Invitrogen) na 5 minuta te dodana kapljica otopine Histomount mounting media (Invitrogen) netom prije pokrivanja pokrovnicom. Stakalca s obojenim rezovima skenirana su koristeći skener Flatbed Epson perfection 4870 scanner (Epson America, Inc.) s rezolucijom od 4800 dpi.

Skenirane slike analizirane su koristeći softver ImageJ 1,45 (NIH, Bethesda, Maryland, SAD). Volumeni hemisfera i lezija su ručno određeni na pojedinačnim rezovima kroz čitav mozak. Volumeni su izračunati množenjem površina svih ocrtanih područja s zbrojem debljine rezova plus udaljenost među rezovima.

### 3.10. Evaluacija moždanog edema mokro – suhom metodom

Evaluacija moždanog edema mjerenjem sadržaja vode (BWC, *engl. brain water content*), određivana je prema mokro-suhom metodi. Lažno operirani miševi te miševi kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje mozga žrtvovani su postupkom cervikalne dislokacije 24 sata nakon MCAO zahvata, u trenutku maksimalnog edema mozga. Miševi su dekapitirani te su im izolirani mozgovi kojima su odstranjeni bulbusi i moždano deblo. Hemisfere su odvojene te zasebno izvagane prije i nakon sušenja 24 sata na 110°C. Iz dobivenih rezultata izračunat je sadržaj vode nastao uslijed formiranja edema, prema formuli:

$ww$  = težina prije sušenja, *engl. wet weight*

$dw$  = težina nakon sušenja na 110°C, *engl. dry weight*

### 3.11. Tvari korištene u pokusima

Zahvaljujemo PHARIS Biotec GmbH (Hannover, Njemačka) na donaciji svih natriuretskih peptida (ANP, BNP, CNP I URO). 8-Br-cGMP, HOE 140, NPPB, KT 5823, UTP i U-73122 nabavljeni su od Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Njemačka), dok su 2-APB, i CCG-63802 nabavljeni od R&D Systems GmbH (Wiesbaden-Nordenstadt, Njemačka). Sve ostale kemikalije nabavljene su od tvrtke Merck (Darmstadt, Njemačka) ili Sigma Aldrich Chemie GmbH.

### 3.12. Prikaz i analiza rezultata

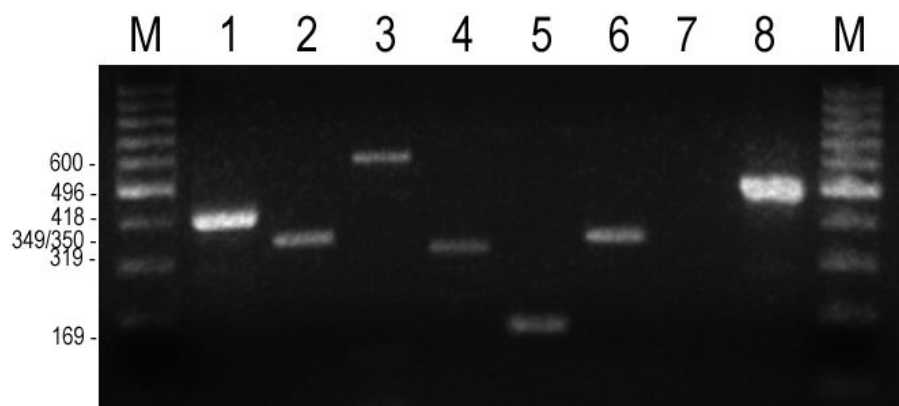
Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. Za statističku obradu podataka korišten je studentov t test (zavisni i nezavisni ovisno o potrebi, pri čemu je svaki učinak uspoređivan sa svojom kontrolom) te linearna regresijska analiza. Kod uspoređivanja više od dva parametra korišten je ANOVA statistički test s posthoc Tukey testom. Statistička značajnost definirana je na razini p vrijednosti manjoj od 0,05. Analiza je provedena koristeći računalni program GrafPad Software.

#### **4.REZULTATI**

## 4.1. Pokusi na HEK-293 stanicama

### 4.1.1. RT-PCR

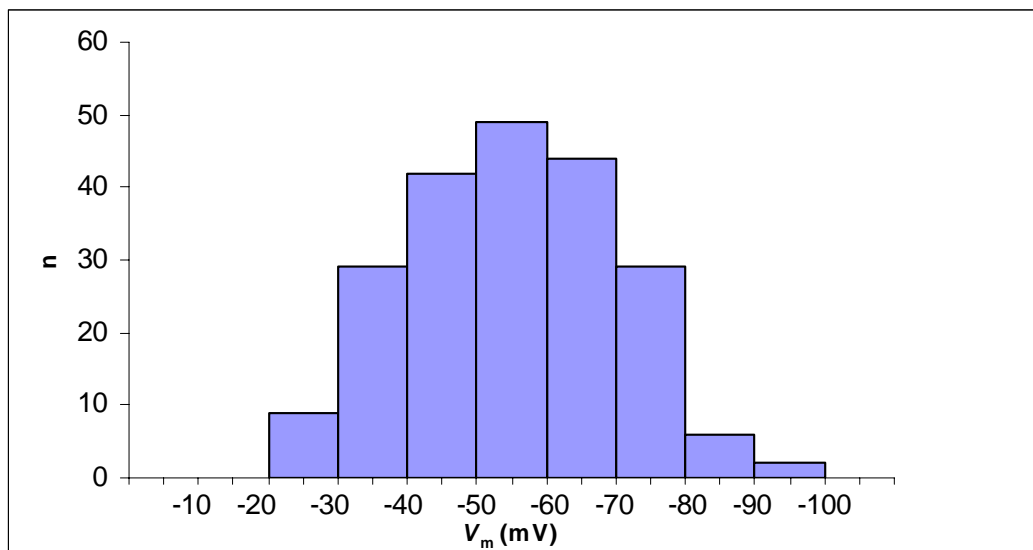
U svrhu ispitivanja učinka natriuretskih peptida, bradikininina te njihovog međudjelovanja korišten je divlji tip HEK-293 stanica koje izražavaju 4 različita receptora za natriuretske peptide: GC-A (NPR-A), GC-B (NPR-B), NPR-Bi i NPR-C, također i oba bradikininiska receptora tipa B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R kao što je prikazano RT-PCR-om na slici 11.



**Slika 11.** Određivanje receptora u HEK-293 stanicama koristeći reverznu transkripciju s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR). M - 100 bp veličinski DNA standard, 1: bradikininiski receptor tipa 1 (B<sub>1</sub>R) (418 pb), 2: bradikininiski receptor tipa 2 (B<sub>2</sub>R) (350 pb), 3: receptor za gvanilat ciklazu tipa A (GC-A, NPR-A) (600 pb), 4: receptor za gvanilat ciklazu tipa B (GC-B, NPR-B) (319 pb), 5: inačica prekrajanja receptora za gvanilat ciklazu tipa B (NPR-Bi) (169 pb), 6: klirens receptor (NPR-C) (349 pb), 7: negativna kontrola RT-PCR reakcije (cDNA nedostaje u reakcijskoj smjesi PCR-a), 8: pozitivna kontrola koja sadrži GAPDH početnice (496 pb).

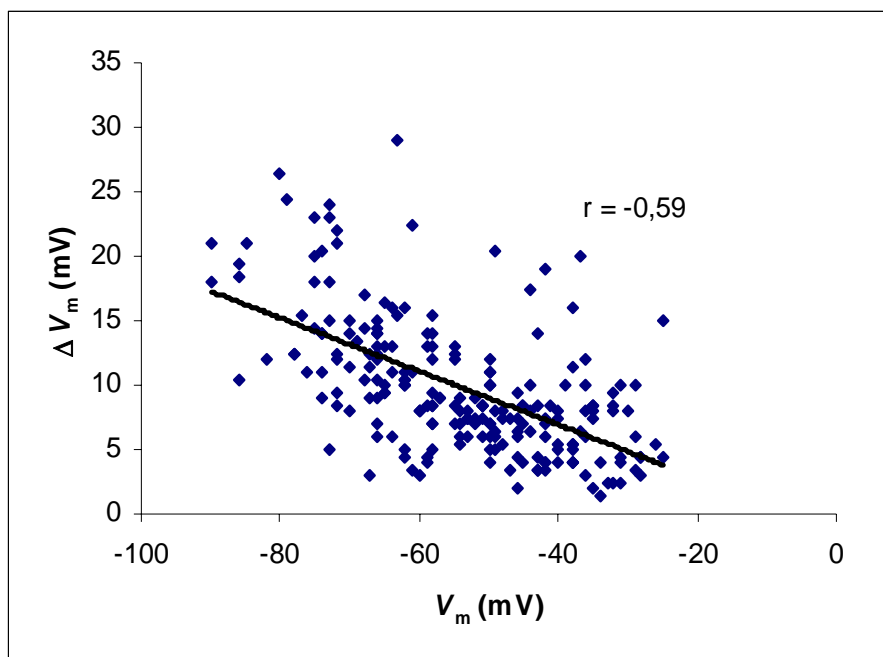
### 4.1.2. Osnovne elektrofiziološke značajke HEK-293 stanica

S obzirom da je RT-PCR-om dokazano prisustvo receptora za natriuretske peptide i bradikinin, HEK-293 stanice korištene su za mjerenje učinaka natriuretskih peptida i bradikininina metodom prikovanih potencijala. Početni membranski potencijal ( $V_m$ ) u HEK-293 stanicama iznosio je  $-54.0 \pm 1.0$  mV ( $n = 207$ ). Stanice s početnim  $V_m$  nižim od  $-25$  mV nisu bile pogodne za istraživanje učinka natriuretskih peptida i bradikininina te stoga nisu korištene u pokusima. Raspodjela frekvencija početnog  $V_m$  u HEK-293 stanicama prikazana je na slici 12.



**Slika 12.** Raspodjela frekvencija početnog  $V_m$  u HEK-293 stanicama.

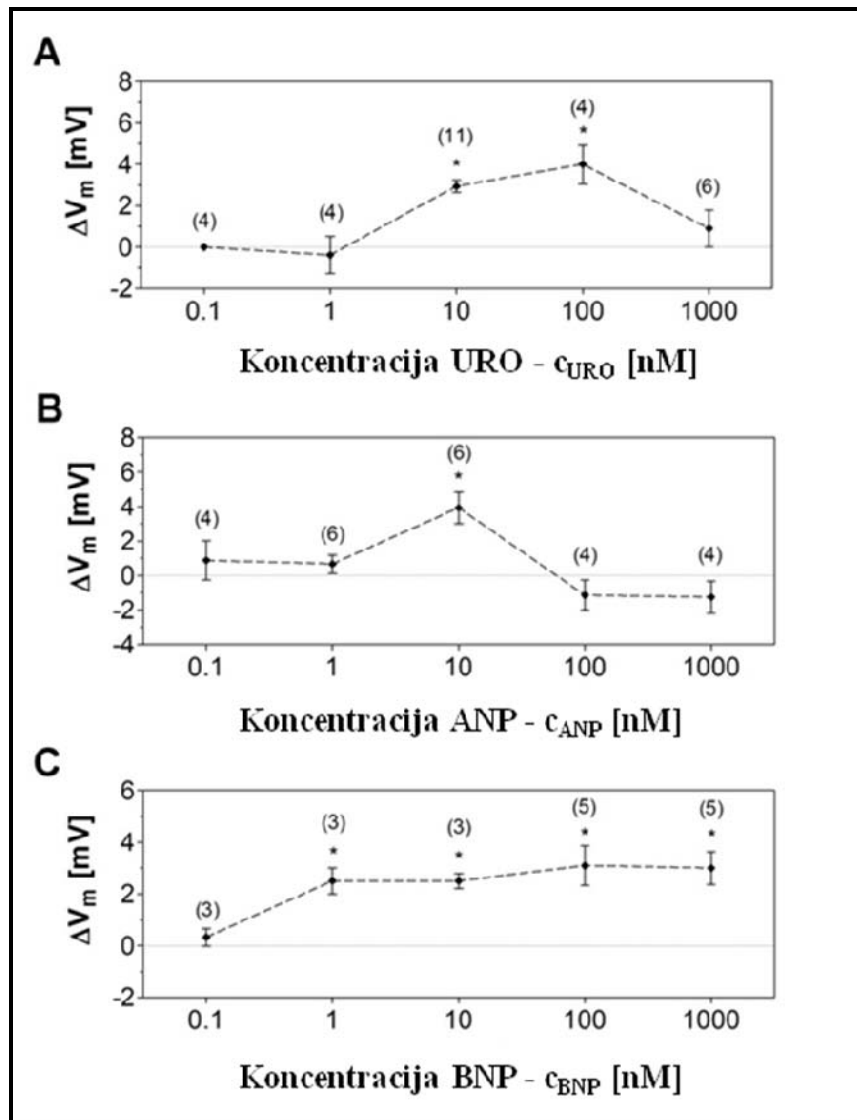
Nakon uspostavljanja stabilnog membranskog potencijala, vijabilnost stanica određivana je promjenom koncentracije kalija u otopini s 3,6 na 18,6 mM, pri čemu je prosječna depolarizacija ( $\Delta V_m$ ) iznosila  $9,8 \pm 0,4$  mV ( $n = 207$ ). Mjereni membranski potencijal funkcija je odnosa vodljivosti stanične membrane za kalijeve, natrijeve i kloridne ione. Depolarizacijski učinak uzrokovan porastom izvanstanične koncentracije  $K^+$  bio je niži kod nižih  $V_m$ , zbog manjeg udjela membranske vodljivosti na  $K^+$ , dok je bio viši kod većih vrijednosti  $V_m$ . Odnos vrijednosti početnog membranskog potencijala i depolarizacijskog učinka uzrokovanog porastom izvanstanične koncentracije  $K^+$  prikazan je na slici 13.



**Slika 13.** Odnos  $V_m$  i  $\Delta V_m$  uzrokovanog porastom izvanstanične koncentracije kalija u otopini s 3,6 na 18,6 mM u HEK-293 stanicama.

#### 4.1.3. Učinci natriuretskih peptida na membranski potencijal ( $V_m$ ) u HEK-293 stanicama

Kako bi odredili koncentracije natriuretskih peptida pogodnih za korištenje u pokusima određene su krivulje učinaka ovisnih o koncentraciji za ANP, BNP i URO. Korištene su koncentracije od  $10^{-10}$  do  $10^{-6}$  M, prikazano na slici 14. ANP i URO pokazali su dvojak učinak na membranski potencijal. Pokazan je depolarizacijski učinak ANP-a i URO-a pri niskim koncentracijama, dok su pri višim koncentracijama hiperpolarizirali HEK-293 stanice, prikazano na slici 14. BNP je za razliku od ANP-a i URO-a pokazao samo depolarizacijski učinak na HEK-293 stanice pri svim korištenim koncentracijama (Slika 14). S obzirom da su svi korišteni natriuretski peptidi pokazivali najjači depolarizacijski učinak pri koncentraciji od 10 nM, ta koncentracija je korištena u svim daljnjim pokusima.



**Slika 14.** Krivulje učinaka ovisnih o koncentraciji za atrijski natriuretski peptid (ANP), moždani natriuretski peptid (BNP) i urodilatin (URO). URO pokazuje najjači depolarizacijski učinak pri koncentracijama od 10 - 100 nM. ANP pokazuje najjači depolarizacijski učinak pri koncentraciji od 10 nM, dok BNP pri svim koncentracijama od 1 do 1000 nM pokazuje podjednak depolarizacijski učinak. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. n označava broj pokusa. \* označava statistički značajan učinak ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4. Učinci bradikininina na membranski potencijal i koncentraciju unutarstaničnog $\text{Ca}^{2+}$ u HEK-293 stanicama

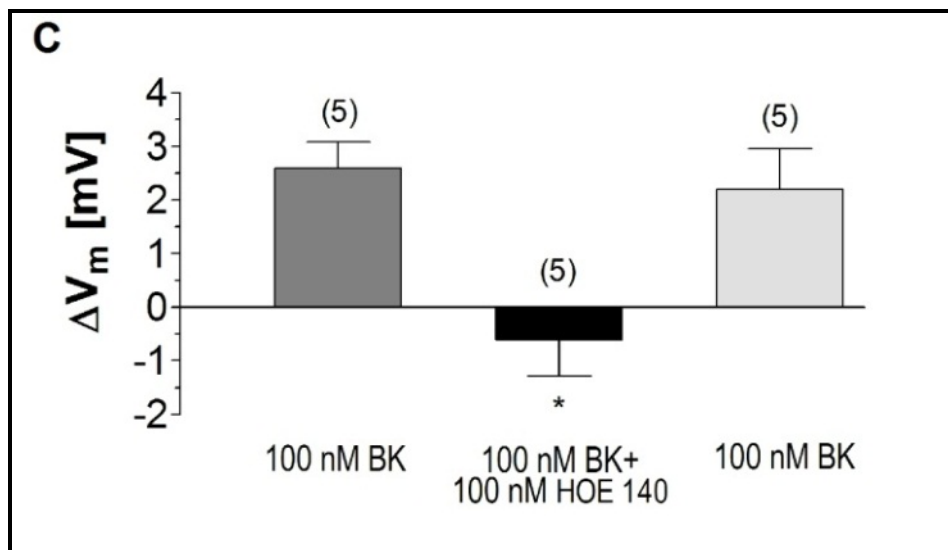
Bradikinin (BK) je depolarizirao HEK-293 stanice pri koncentraciji od 100 nM,  $\Delta V_m = 2,8 \pm 0,2$  mV ( $n = 73$ ) (Tablica 4). U HEK-293 stanicama su izražena dva bradikinininska receptora,  $B_1R$  i  $B_2R$  (Slika 11). Kako bi odredili koji je bradikinininski receptor uključen u depolarizacijski učinak bradikininina na HEK-293 stanicama, korišten je HOE 140, selektivni antagonist  $B_2R$  receptora. HOE 140 je blokirao depolarizacijski učinak bradikininina pri koncentraciji od 100 nM, pri čemu je predkontrola za HOE 140 (BK 100 nM) iznosila:  $2,6 \pm 0,5$  mV, učinak (BK 100 nM + HOE 140 100 nM):  $-0,6 \pm 0,7$  mV te postkontrola (BK 100 nM):  $2,2 \pm 0,8$  mV,  $n = 5$  (Slika 15). Kako bi potvrdili uključenosti  $B_2R$  receptora u depolarizacijski učinak bradikininina na HEK-293 stanicama korišteni su za mjerenje koncentracije unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  bradikinin kao selektivni agonist  $B_2R$  receptora i [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradikinin kao selektivni agonist  $B_1R$  receptora. Mjerenje promjena  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama pokazalo je da je bradikinin utjecao na povećanje unutarstanične količine  $\text{Ca}^{2+}$  (Slika 16A), što međutim nije bio slučaj za [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradikinin koji nije pokazao utjecaj na količinu unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  (Slika 16B).

Zatim smo istražili da li signalni put bradikininina aktivacijom  $B_2R$  receptora uključuje aktivaciju fofolipaze C (PLC). Za određivanje učinka PLC-a u bradikinininskom signalnom putu korišten je inhibitor PLC-a U-73122, u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$ . 10  $\mu\text{M}$  U-73122 u potpunosti inhibira depolarizaciju potaknutu bradikininom (100 nM), pri čemu je predkontrola za U-73122 (BK 100 nM) iznosila:  $2,2 \pm 0,3$  mV, učinak (BK 100 nM + U-73122 10  $\mu\text{M}$ ):  $-1,8 \pm 0,4$  mV te postkontrola (BK 100 nM):  $0,8 \pm 0,8$ ,  $n = 6$ , postkontrola  $n = 3$  (Slika 17).

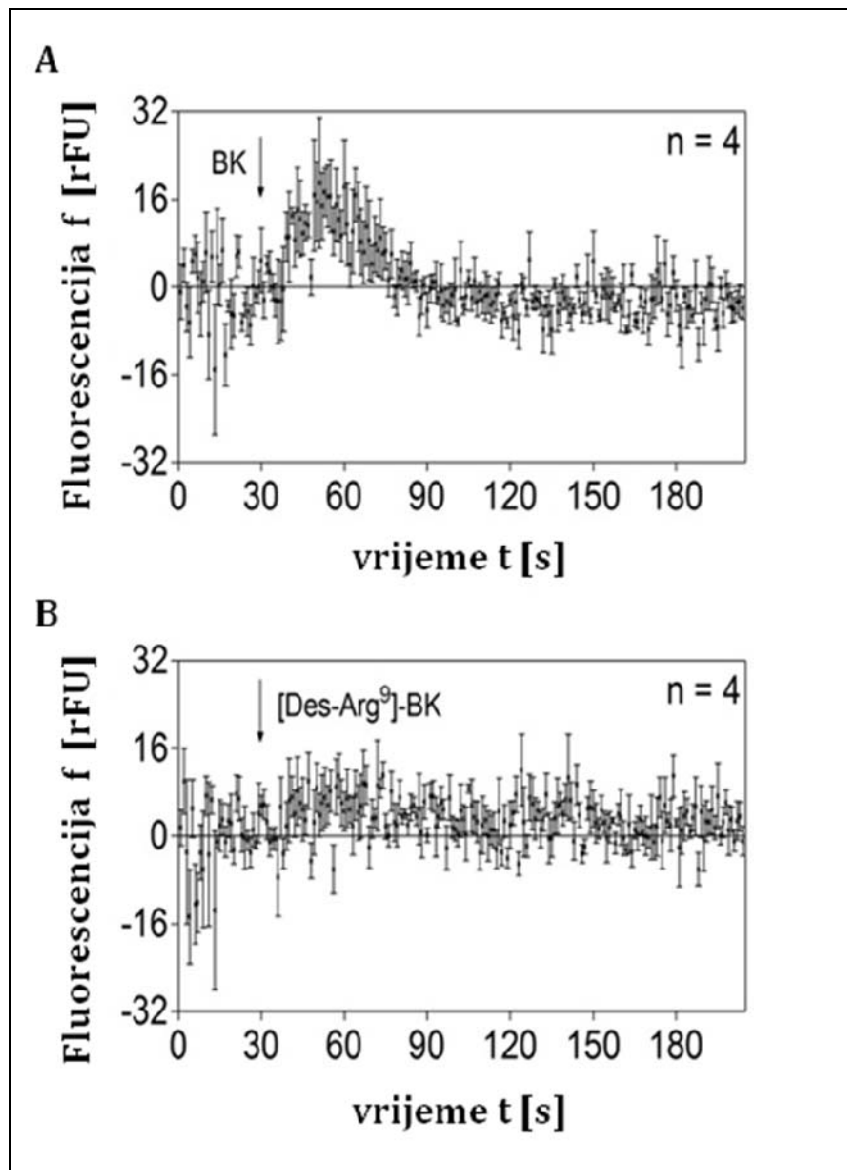
Kako bi se utvrdilo koji su kanali uključeni u promjenu vodljivosti uzrokovanom bradikininom, ispitani su učinci inhibitora ionskih kanala. Prvo je korišten  $\text{Ba}^{2+}$  kao inhibitor  $\text{K}^+$ -kanala, u obliku 1 mM  $\text{BaCl}_2$ , kako bi se utvrdila uključenost  $\text{K}^+$ -kanala u promjeni vodljivosti uzrokovanom bradikininom. Međutim,  $\text{Ba}^{2+}$  nije utjecao na depolarizacijski učinak bradikininina, isključujući djelovanje  $\text{K}^+$ -kanala, kao što je prikazano na slici 18A. Zatim je korišten inhibitor kloridnih kanala NPPB u koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$  kako bi se utvrdila uključenost  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnih kloridnih kanala u depolarizacijski učinak bradikininina. Slika 18B prikazuje inhibiciju depolarizacijskog učinka bradikininina u nazočnosti inhibitora kloridnih kanala NPPB-a, ukazujući da je aktivacija  $\text{Ca}^{2+}$ -ovisnih  $\text{Cl}^-$  kanala odgovorna za učinak bradikininina. Depolarizacijski učinak bradikininina je u potpunosti inhibiran, pri čemu su



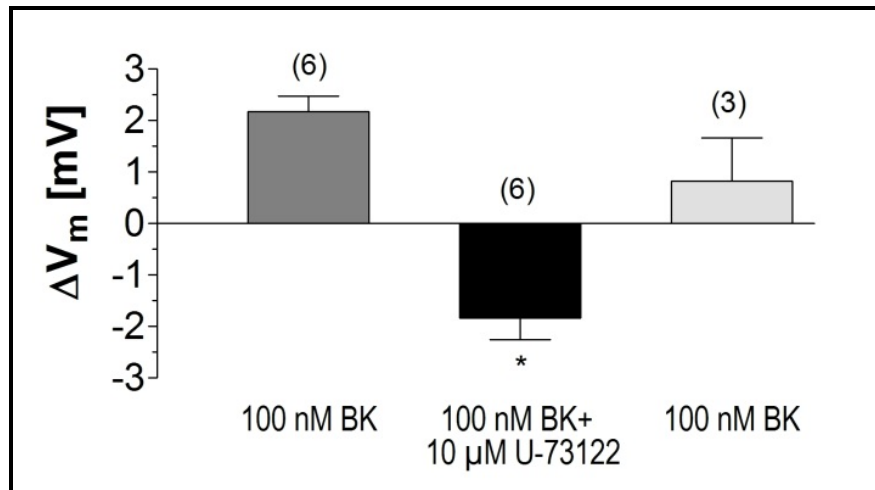
početne vrijednosti  $\Delta V_m$  (predkontrola BK 100 nM) od  $3,3 \pm 0,6$  mV dodatkom  $10 \mu\text{M}$  NPPB u perfuzijsku otopinu uz bradikinin ( $100 \text{ nM}$ ) iznosile  $-0,4 \pm 0,6$  mV te se vratile na približno početnu vrijednost nakon ispiranja inhibitora (postkontrola BK  $100 \text{ nM}$ )  $2,2 \pm 0,3$  mV ( $n = 6$ ; postkontrola  $n = 5$ ).



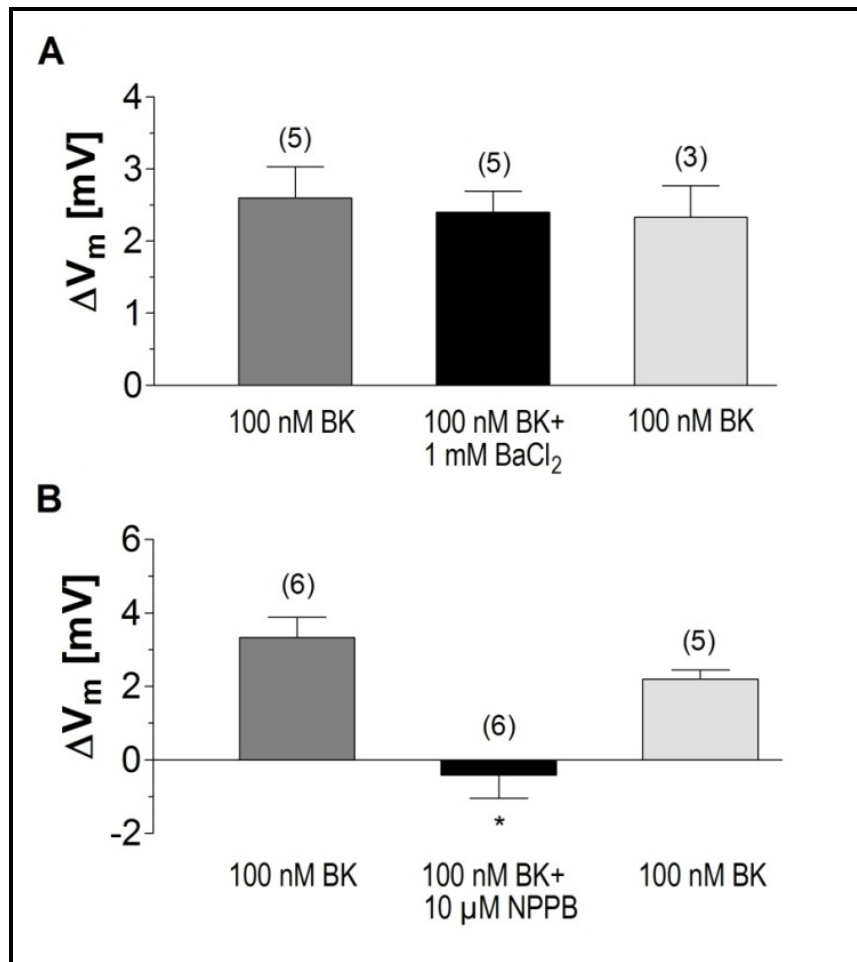
**Slika 15.** Učinak HOE 140, selektivnog antagonista  $B_2R$  receptora na depolarizacijski učinak bradikinina (BK) u HEK-293 stanicama.  $100 \text{ nM}$  HOE-140 potpuno inhibira depolarizaciju uzrokovanu bradikininom ( $100 \text{ nM}$ ; srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu  $100 \text{ nM}$  bradikinina prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s depolarizacijskim učinkom bradikinina ( $p < 0,05$ ).



**Slika 16.** Učinak bradikinina (BK) i [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradikinina na koncentraciju unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup> u HEK-293 stanicama. Povećanje unutarstanične koncentracije Ca<sup>2+</sup> pod utjecajem 100 nM bradikinina (A). 100nM [Des-Arg<sup>9</sup>]-bradikinina nije utjecalo na koncentraciju unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup> (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije uključujući korekciju pozadinskog šuma ± standardna pogreška. n označava broj pokusa. ↓ označava vremensku točku primjene ispitivane tvari (t = 30 s).



**Slika 17.** Učinak U-73122 inhibitora fosfolipaze C (PLC) na bradikininom (BK) potaknutu depolarizaciju u HEK-293 stanicama. 10  $\mu$ M U-73122 inhibira depolarizaciju uzrokovanu 100 nM BK-om (srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikininina prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s depolarizacijskim učinkom bradikininina ( $p < 0,05$ ).



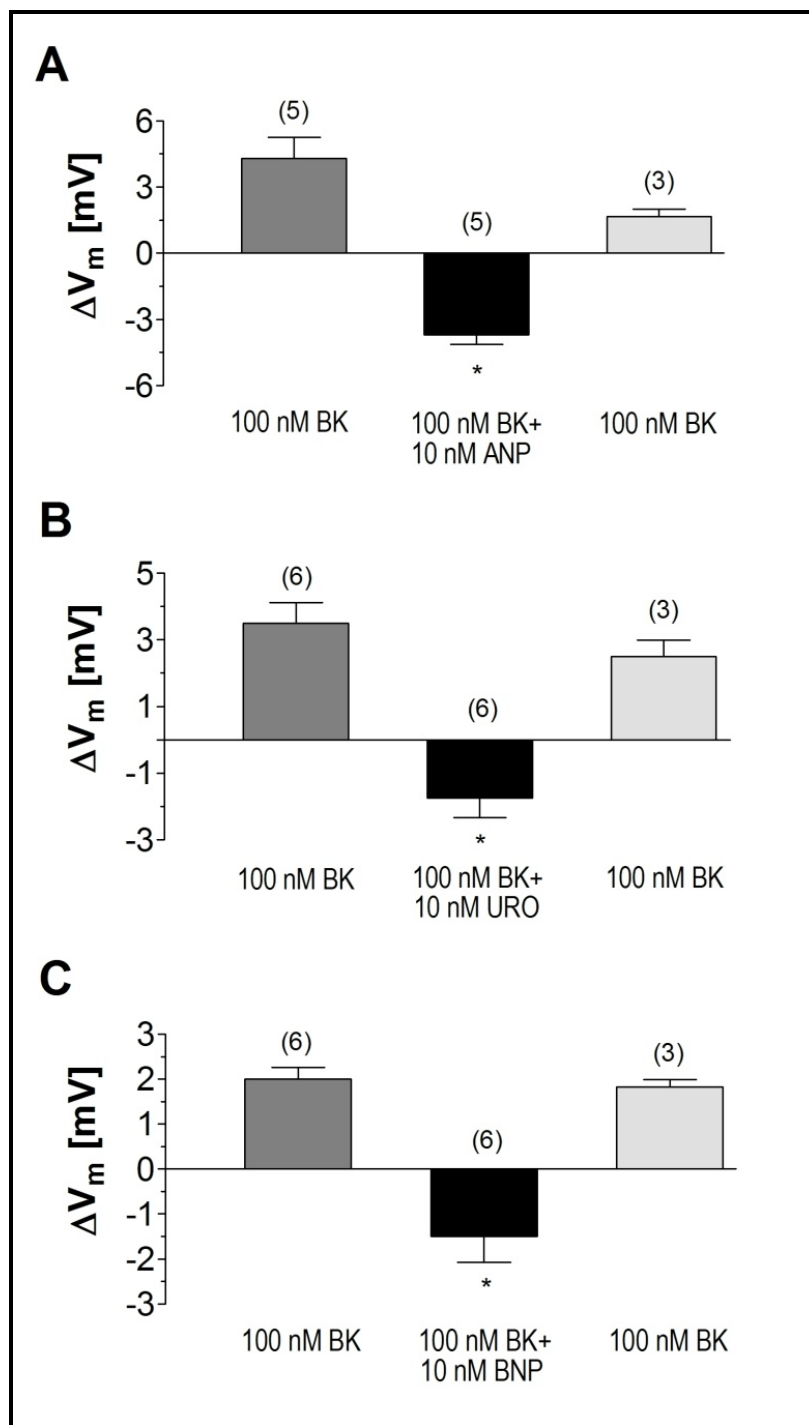
**Slika 18.** Učinak inhibitora K<sup>+</sup>-kanala, 1 mM BaCl<sub>2</sub> na depolarizacijski učinak bradikinina u HEK-293 stanicama (A). Ba<sup>2+</sup> nije utjecao na depolarizacijski učinak bradikinina (A, srednji stupac). Učinak inhibitora Cl<sup>-</sup>-kanala, 10 μM NPPB-a na depolarizacijski učinak bradikinina u HEK-293 stanicama (B). 10 μM NPPB je inhibirao depolarizacijski učinak bradikinina (B, srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikinina prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s depolarizacijskim učinkom bradikinina (p < 0,05).

#### 4.1.5. Učinci natriuretskih peptida na depolarizacijski učinak bradikininu u HEK-293 stanicama

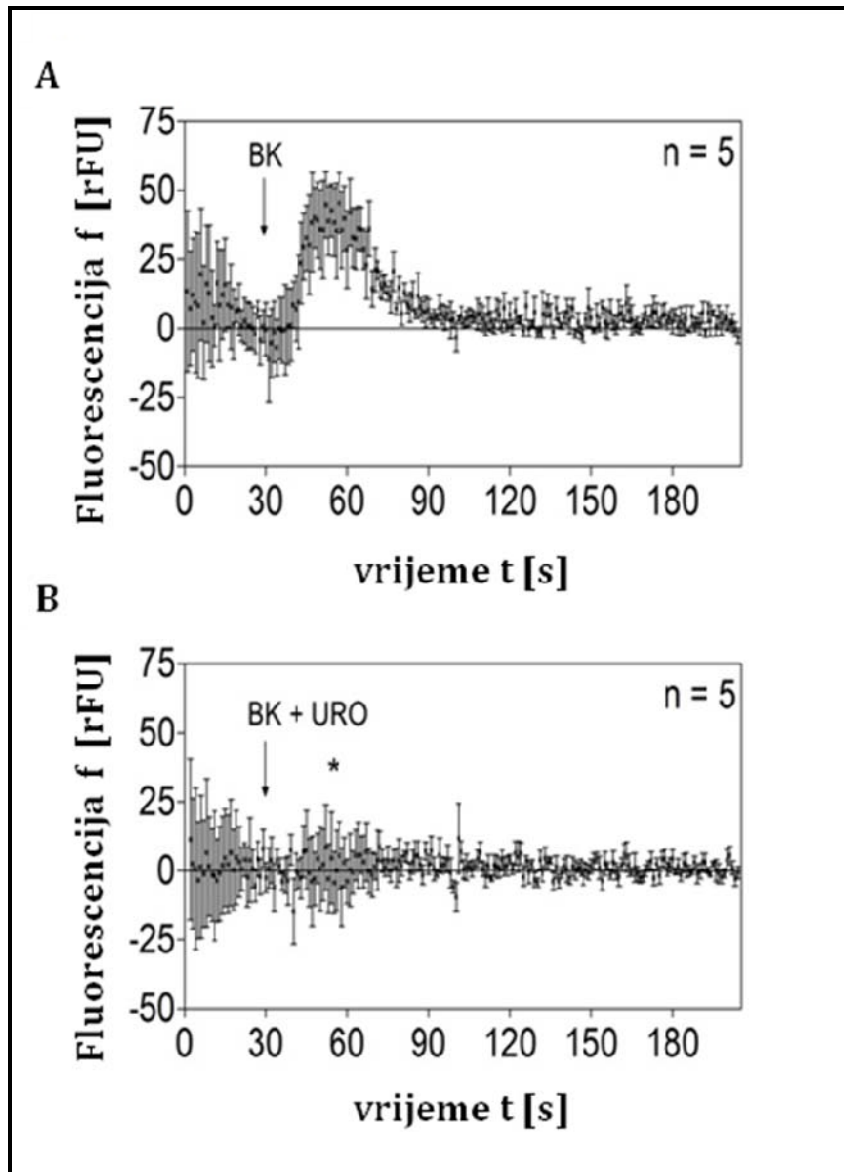
Kako bi odredili učinke natriuretskih peptida na signalni put bradikininu koristili smo ANP, njegovu bubrežnu izoformu URO, BNP i CNP. Kao što je prikazano na slici 19A 10 nM ANP inhibiralo je depolarizaciju potaknutu bradikininom, pri čemu je  $\Delta V_m$  za ANP iznosio u predkontroli (BK 100 nM):  $4,3 \pm 0,9$  mV, za vrijeme inhibicije učinka (BK 100 nM + ANP 10nM):  $-3,7 \pm 0,4$  mV te u postkontroli (BK 100 nM):  $1,7 \pm 0,3$  mV ( $n = 5$ , postkontrola  $n = 3$ ). 10 nM URO imalo je podjednak učinak na depolarizaciju potaknutu bradikininom, pri čemu je za URO predkontrola (BK 100 nM) iznosila:  $3,5 \pm 0,6$  mV, učinak (BK 100 nM + URO 10nM):  $-1,8 \pm 0,6$  mV i postkontrola (BK 100 nM):  $2,5 \pm 0,5$  mV,  $n = 6$ , postkontrola  $n = 3$  (Slika 19B). 10 nM BNP je također poput ANP-a i URO-a inhibiralo depolarizaciju potaknutu bradikininom, pri čemu je za BNP predkontrola (BK 100 nM) iznosila:  $2,0 \pm 0,3$  mV, učinak (BK 100 nM + BNP 10nM):  $-1,5 \pm 0,6$  mV i postkontrola (BK 100 nM):  $1,8 \pm 0,2$  mV,  $n = 6$ , postkontrola  $n = 3$  (Slika 19C).

Kako bi potvrdili učinak inhibicije bradikininom potaknute depolarizacije natriuretskim peptidima korišten je URO, koji je potpuno blokirao bradikininom potaknuti učinak porasta unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  u HEK-293 stanicama. Pod utjecajem 10 nM URO-a signal induciran bradikininom se značajno snizio s  $45,4 \pm 11,0$  na  $5,4 \pm 12,2$  relativnih fluorescencijskih jedinica (engl. *Relative fluorescence units*, rFU), prikazano na slici 20.

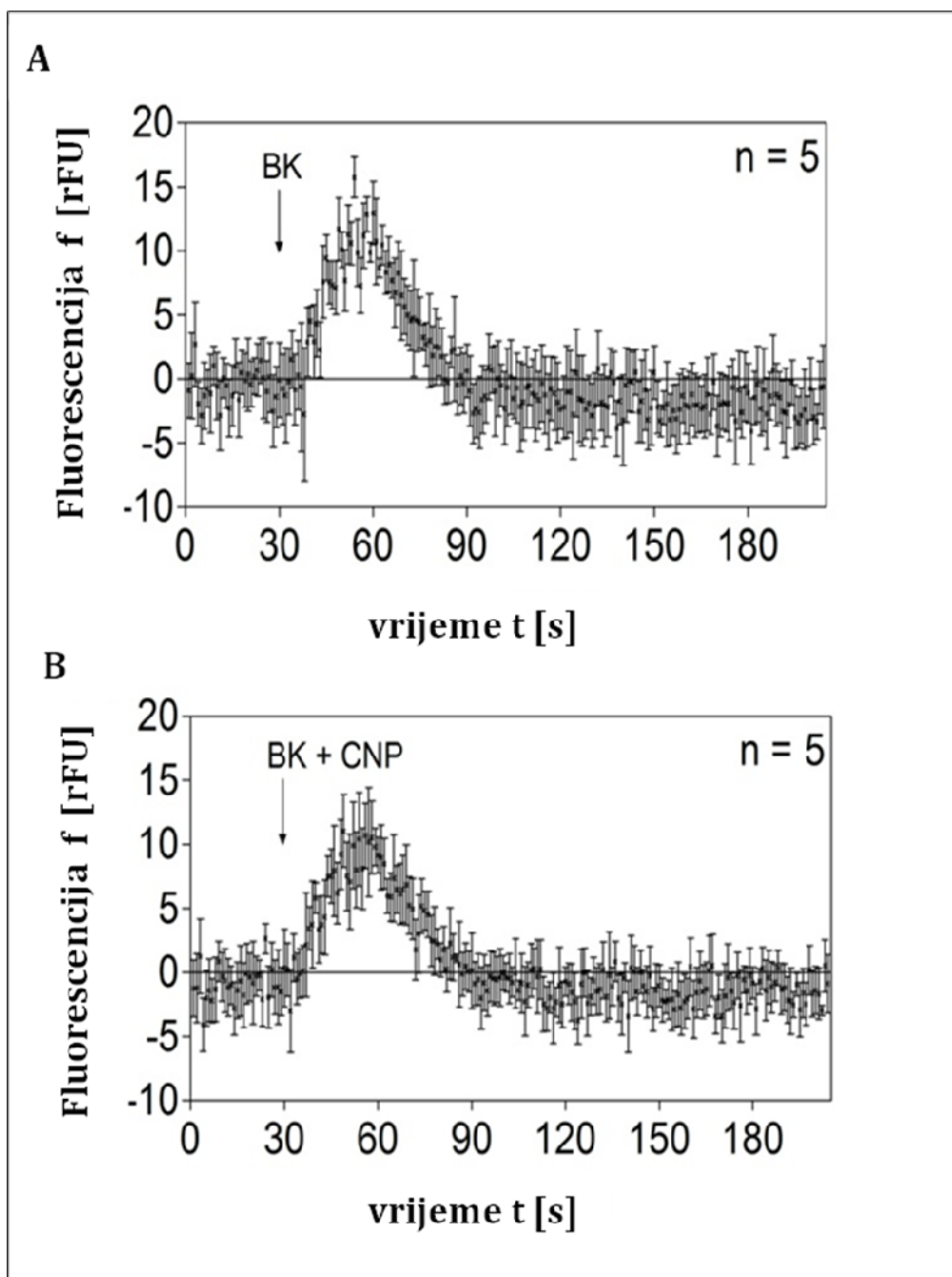
Nadalje, CNP-a kao specifični aktivator NPR-B (GC-B) receptora, također depolarizira staničnu membranu HEK-293 stanicama pri koncentraciji od 10 nM (Tablica 4) te je ta koncentracija korištena u daljnjim pokusima. Pod utjecajem CNP-a, depolarizacija inducirana bradikininom nije inhibirana, pri čemu je za CNP predkontrola (BK 100 nM) iznosila:  $3,9 \pm 0,8$  mV, a učinak (BK 100 nM + CNP 10nM):  $3,1 \pm 0,8$  mV,  $n = 6$ . 10 nM CNP također nije blokirao bradikininom potaknuti učinak porasta unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  u HEK-293 stanicama. Signal induciran bradikininom je pokazao neznatan pad od  $15,7 \pm 16$  na  $10,4 \pm 3,6$  rFU kad je korišten CNP (Slika 21).



**Slika 19.** Inhibicija bradikininom (BK) potaknute depolarizacije u HEK-293 stanicama atrijskim natriuretskim peptidom (ANP; A), urodilatinom (URO; B) i moždanim natriuretskim peptidom (BNP; C). Sva tri natriuretska peptida korištena su u koncentraciji od 10 nM. Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikininu prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s depolarizacijskim učinkom bradikininu ( $p < 0,05$ ).



**Slika 20.** Inhibicija bradikininom (BK) potaknutog porasta unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama 10 nM urodilatinom (URO). 100 nM bradikininina uzrokuje porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama (A), dok 10 nM URO-a signifikantno inhibira porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  potaknut bradikininom (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije uključujući korekciju pozadinskog šuma  $\pm$  standardna pogreška. n označava broj pokusa.  $\downarrow$  označava vremensku točku primjene ispitivane tvari (t = 30 s). \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s učinkom bradikininina na unutarstaničnu koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ).



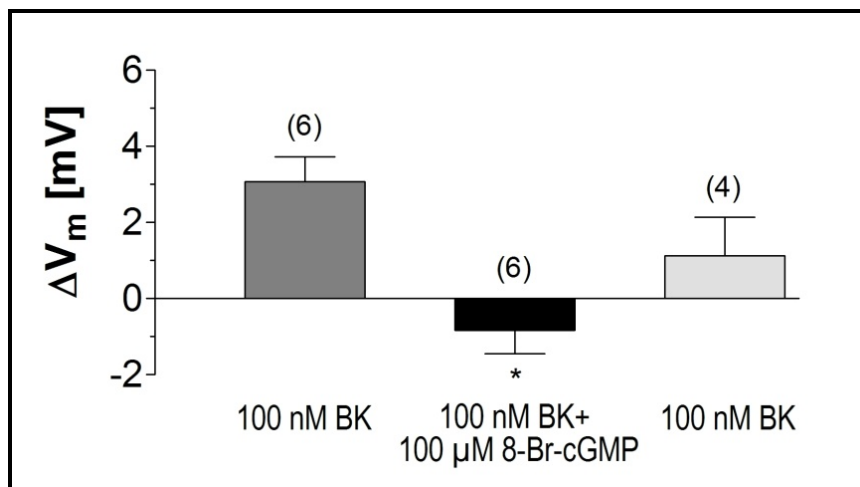
**Slika 21.** Učinak C-tipa natriuretskog peptida (CNP) na bradikininom potaknuti porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama. 100nM bradikinin uzrokuje porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama (A). 10 nM CNP-a ne inhibira porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  potaknut bradikininom (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta fluorescencije uključujući korekciju pozadinskog šuma  $\pm$  standardna pogreška. n označava broj pokusa.  $\downarrow$  označava vremensku točku primjene ispitivane tvari ( $t = 30$  s).



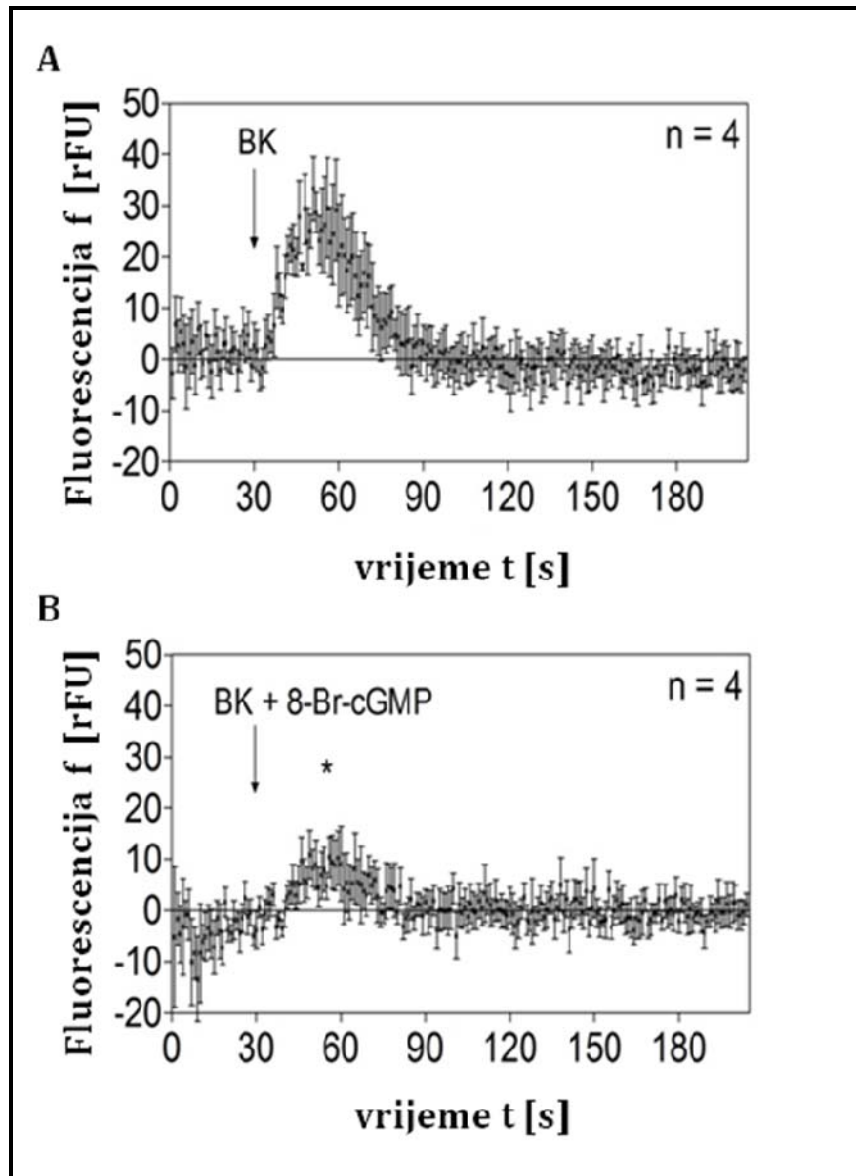
**Tablica 4.** Učinak barija ( $\text{Ba}^{2+}$ ) (1 mM), 8-Br-cGMP (100  $\mu\text{M}$ ), atrijskog natriuretskog peptida (ANP) (10 nM), urodilatina (URO) (10 nM), moždanog natriuretskog peptida (BNP) (10 nM), C-tipa natriuretskog peptida (CNP) (10 nM) i bradikininina (BK) (100 nM) na HEK-293 stanice.  $\Delta$  označava razliku membranskog potencijala između učinka određene tvari i učinka njegovih pred i post kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. (n) označava broj pokusa.

	mV	n
$\Delta \text{Ba}^{2+}$ (1 mM)	$15,0 \pm 3,4$	8
$\Delta$ 8-Br-cGMP (100 $\mu\text{M}$ )	$3,3 \pm 0,6$	4
$\Delta$ ANP (10 nM)	$3,9 \pm 1,0$	6
$\Delta$ URO (10 nM)	$3,0 \pm 0,3$	11
$\Delta$ BNP (10 nM)	$2,5 \pm 0,3$	3
$\Delta$ CNP (10 nM)	$2,5 \pm 0,6$	6
$\Delta$ BK (100 nM)	$2,8 \pm 0,2$	73

S obzirom da natriuretski peptidi ANP, URO i BNP djelujući na receptor NPR-A (GC-A) povisuju unutarstaničnu koncentraciju cGMP-a, istražen je i učinak analoga cGMP-a, 8-Br-cGMP-a na HEK-293 stanice. 8-Br-cGMP pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  je depolarizirao HEK-293 stanice (Tablica 4). Pri koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP je poput natriuretskih peptida ANP-a, URO-a i BNP-a inhibirao bradikininom potaknutu depolarizaciju, pri čemu je predkontrola za 8-Br-cGMP (BK 100 nM) iznosila:  $3,1 \pm 0,7$  mV, učinak (BK 100 nM + 8-Br-cGMP 100  $\mu\text{M}$ ):  $-0,8 \pm 0,6$  mV te postkontrola (BK 100 nM):  $1,1 \pm 1,0$  mV, n = 6; postkontrola n = 4) (Slika 22). 500  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP-a je također blokiralo porast unutarstaničnog  $\text{Ca}^{2+}$  potaknut bradikininom (od  $33,3 \pm 6,2$  do  $8,9 \pm 4,8$  rFU, n = 4) (Slika 23).



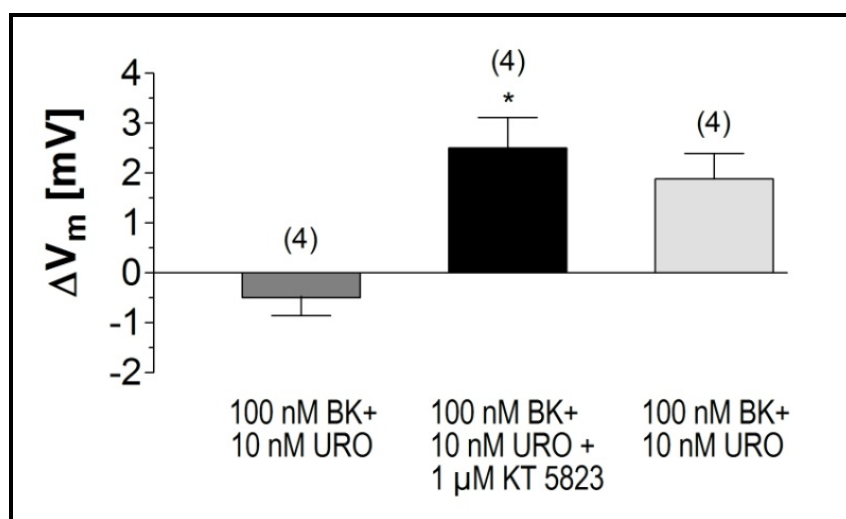
**Slika 22.** Učinak 8-Br-cGMP-a, analoga cGMP-a na bradikininom (BK) potaknutu depolarizaciju u HEK-293 stanicama. 100 μM 8-Br-cGMP inhibira depolarizaciju uzrokovanu 100 nM bradikininom (srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikininu prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s depolarizacijskim učinkom bradikininu ( $p < 0,05$ ).



**Slika 23.** Učinak 8-Br-cGMP-a na bradikininom (BK) potaknuti porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama. 100nM bradikinin uzrokuje porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  u HEK-293 stanicama (A). 100  $\mu\text{M}$  8-Br-cGMP-a inhibira porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  potaknut bradikininom (B). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost intenziteta uključujući korekciju pozadinskog šuma  $\pm$  standardna pogreška. n označava broj pokusa.  $\downarrow$  označava vremensku točku primjene ispitivane tvari ( $t = 30$  s). \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s učinkom bradikinin na unutarstaničnu koncentraciju  $\text{Ca}^{2+}$  ( $p < 0,05$ ).

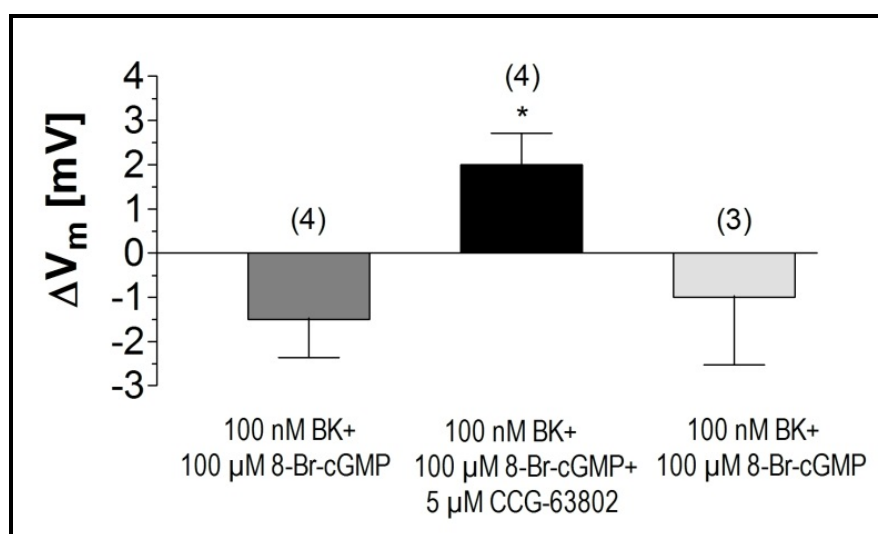
#### 4.1.6. Međudjelovanje signalnih putova natriuretskih peptida i bradikininina

Kako bi odredili mehanizam djelovanja natriuretskih peptida na depolarizacijski učinak bradikininina u HEK-293 stanicama, pokušali smo odrediti mjesto interakcije signalnih putova natriuretskih peptida i bradikininina. Kako je poznato da natriuretski peptidi aktivirajući membranske gvanilat ciklaze podižu razinu unutarstaničnog cGMP-a aktivacijom cGMP-ovisne protein kinaze G (PKG), istražili smo učinak KT 5823 inhibitora PKG-a na inhibicijski učinak URO-a na depolarizaciju potaknutu bradikininom u HEK-293 stanicama. Inhibicijski učinak URO-a na depolarizaciju potaknutu bradikininom kompletno je inhibiran 1  $\mu$ M KT 5823, pri čemu je predkontrola (100 nM BK + 10 nM URO) iznosila:  $-0,5 \pm 0,4$  mV, učinak (100 nM BK + 10 nM URO + 1  $\mu$ M KT 5823):  $2,5 \pm 0,6$  mV te postkontrola (100 nM BK + 10 nM URO):  $1,9 \pm 0,5$  mV, n = 4 (Slika 24).



**Slika 24.** Učinak KT 5823 inhibitora cGMP-ovisne protein kinaze G (PKG) na bradikininom (BK) potaknutu depolarizaciju inhibiranu urodilatinom (URO) u HEK-293 stanicama. 1  $\mu$ M KT 5823 u potpunosti inhibira inhibicijski učinak 10 nM URO na depolarizaciju potaknutu 100 nM bradikininom (srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikinin plus 10 nM URO prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava značajnu razliku učinaka u usporedbi s inhibicijskim učinkom URO-a na depolarizacijski učinak bradikininina ( $p < 0,05$ ).

S obzirom da je poznato da je receptor B<sub>2</sub>R G-protein vezani receptor reguliran proteinima RGS, istražen je učinak CCG-63802 inhibitora RGS proteina na međudjelovanje signalnog puta natriuretskih peptida na bradikininški signalni put. 100 μM 8-Br-cGMP inhibiralo je bradikininom (100 nM) potaknutu depolarizaciju u HEK-293 stanicama. Učinak 8-Br-cGMP na bradikinin inhibiran je u prisutnosti 5 μM inhibitora CCG-63802, koji je inhibirajući RGS proteine, depolarizirao je HEK-293 stanice, pri čemu je ΔV<sub>m</sub> iznosio za predkontrolu (BK 100 nM + 8-Br-cGMP 100 μM): -1,5 ± 0,9 mV (n=4), učinak (BK 100 nM + 8-Br-cGMP 100 μM + CCG-63802 5 μM): 2,0 ± 0,7 mV (n=4) te postkontrola (BK 100 nM + 8-Br-cGMP 100 μM): -1,0 ± 1,5 mV, n=3 (Slika 25). Sam CCG-63802 nije imao nikakav učinak na membranski potencijal HEK-293 stanica (ΔV<sub>m</sub> = -1,5 ± 0,5 mV, n=4).

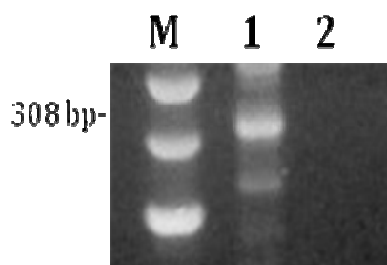


**Slika 25.** Učinak CCG-63802 inhibitora RGS proteina na bradikininom (BK) potaknutu depolarizaciju inhibiranu 8-Br-cGMP-om u HEK-293 stanicama. 5 μM CCG-63802 u potpunosti inhibira inhibicijski učinak 100 μM 8-Br-cGMP-a na depolarizaciju potaknutu 100 nM bradikininom (srednji stupac). Pokusi su izvedeni kao parni, koristeći kao kontrolu 100 nM bradikinin plus 100 μM 8-Br-cGMP prije i poslje istraživanog učinka. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. (n) označava broj pokusa. \* označava statistički značajnu razliku učinaka u usporedbi s inhibicijskim učinkom 8-Br-cGMP-a na depolarizacijski učinak bradikininina (p < 0,05).

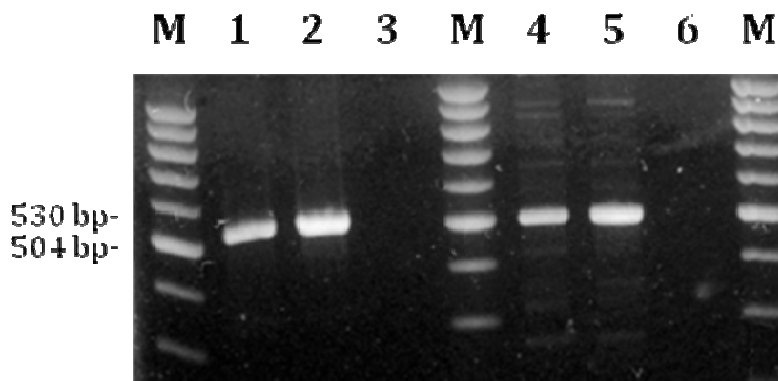
## 4.2. Pokusi na C57Bl/6NCr1 miševima

### 4.2.1. RT-PCR

U svrhu ispitivanja učinka natriuretskih peptida, bradikinina te njihovog međudjelovanja na mozak mužjaka miševa soja C57Bl/6NCr1 provjeren je izražaj receptora GC-A (NPR-A) za natriuretske peptide (Slika 26), i B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R za bradikinin te su prikazani RT-PCR-om (Slika 27).



**Slika 26.** Određivanje receptora u mozgu mužjaka miševa soja C57Bl/6NCr1 koristeći reverznu transkripciju s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR). M - 100 bp veličinski DNA standard, 1: receptor za gvanilat ciklazu tipa A (GC-A, NPR-A) (308pb), 2: negativna kontrola RT-PCR reakcije (cDNA nedostaje u reakcijskoj smjesi PCR-a).

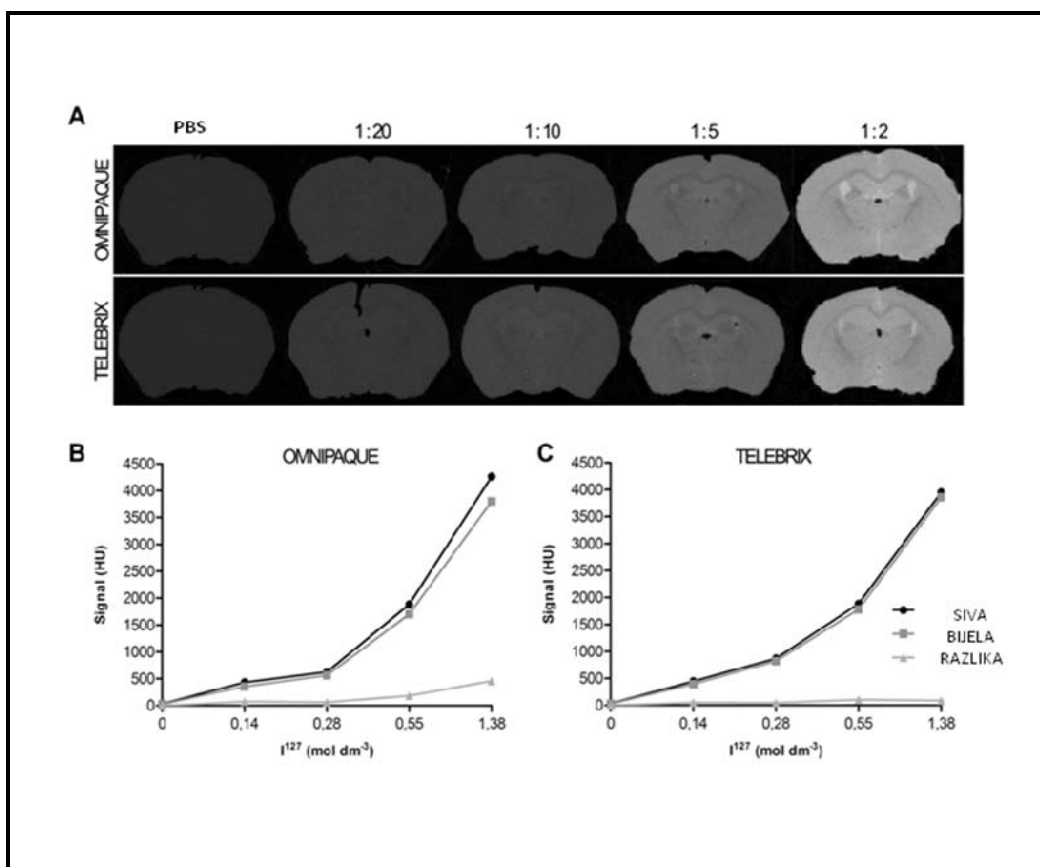


**Slika 27.** Određivanje receptora u mozgovima mužjaka miševa soja C57Bl/6NCr1 koristeći reverznu transkripciju s lančanom reakcijom polimerazom (RT-PCR). M - 100 bp veličinski DNA standard, 1: bradikininski receptor tipa 1 (B<sub>1</sub>R) (504 pb), 2: pozitivna kontrola, 3: negativna kontrola RT-PCR reakcije (cDNA nedostaje u reakcijskoj smjesi PCR-a), 4: bradikininski receptor tipa 2 (B<sub>2</sub>R) (530 pb), 5: pozitivna kontrola, 6: negativna kontrola RT-PCR reakcije (cDNA nedostaje u reakcijskoj smjesi PCR-a).

#### 4.2.2. Odabir kontrastnog sredstva za *ex vivo* oslikavanje mišjeg mozga mikroCT-om

Kako bi odabrali najbolje kontrastno sredstvo za *ex-vivo* oslikavanje mišjeg mozga usporedili smo izmjerene vrijednosti signala dobivenih mikroCT-om mišjih mozgova uronjenih u dvije vrste kontrastnih sredstva različitih koncentracija joda. Mišji mozgovi su uronjeni u Omnipaque i Telebrix kontrastna sredstva te u PBS koji je služio kao negativna kontrola. Mozgovi uronjeni u PBS pokazali su slabi signal, jer bez kontrasta mikroCT-om nije moguće razlučiti morfologiju tkiva bez prethodnog dodatnog zasjenjenja samog tkiva (Slika 28A). Mišji mozgovi uronjeni u kontrastna sredstva pokazali su različiti intenzitet signala interesnih regija bijele i sive tvari koji je bio u ovisnosti s koncentracijom jodidnih iona u pojedinom kontrastnom sredstvu (Slika 28A).

Kako bi odredili najoptimalnije kontrastno sredstvo i koncentraciju istog, njihova učinkovitost je određena mjerenjem unutar regija od interesa bijele i sive tvari. Izmerene vrijednosti signala kontrasta pretvorene su u standardne atenuacijske jedinice koje su ucrtane u graf u odnosu na izračunate koncentracije joda u odgovarajućem razrjeđenju kontrastnog sredstva. Razrjeđenje kontrastnog sredstva Omnipaque u omjeru od 1:2 s PBS-om pokazalo je razliku u vrijednosti signala sive i bijele tvari od 460 HU, dok je za Telebrix kontrastno sredstvo istog razrjeđenja ta razlika iznosila samo 89 HU (Slika 28B, 28C). S obzirom da je kontrastno sredstvo Omnipaque razrijeđeno u omjeru od 1:2 s PBS-om pokazalo najveći kontrast između sive i bijele tvari, omogućivši najveću morfološku razlučivost izabrali smo ga za sva daljnja istraživanja.



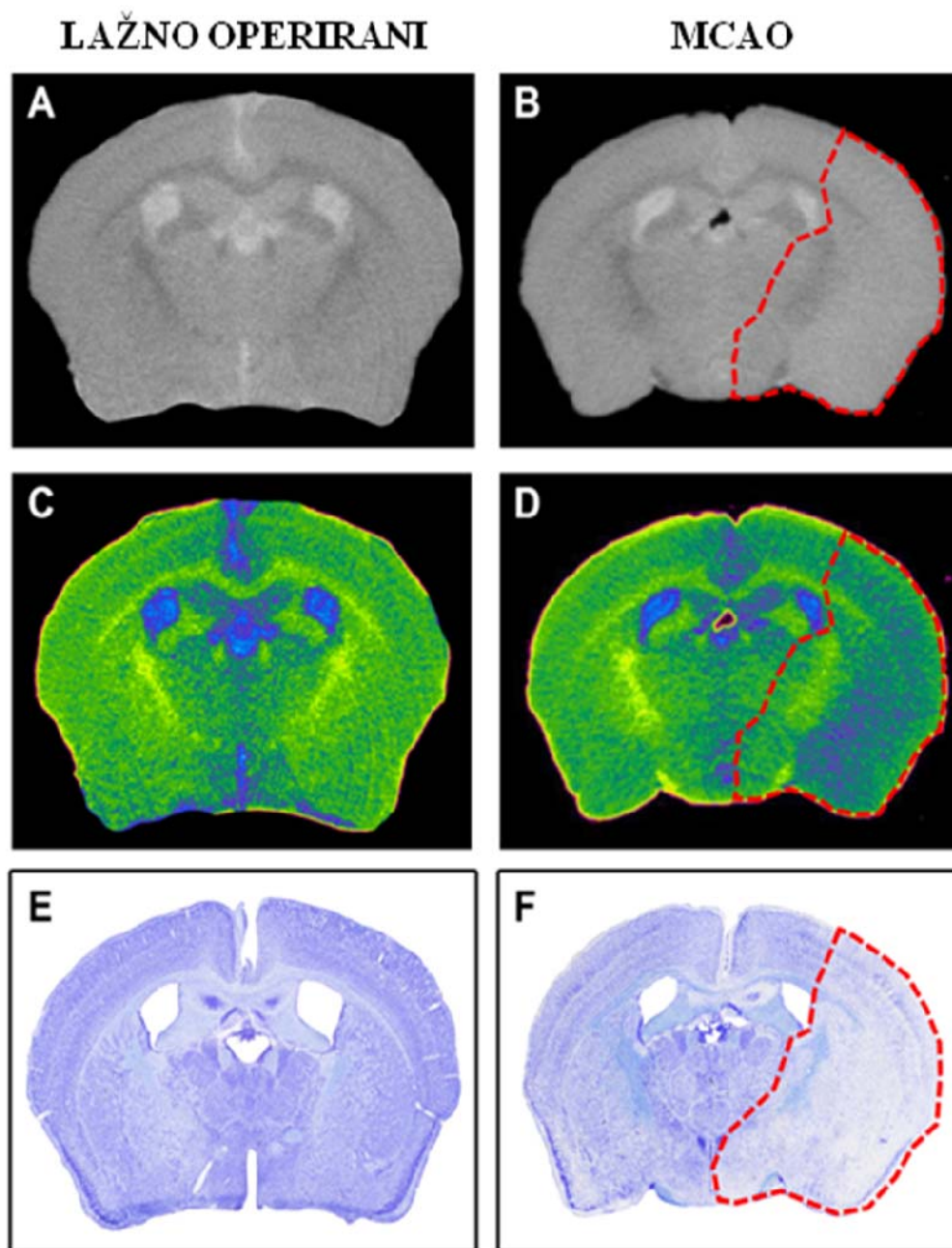
**Slika 28.** (A) Usporedba frontalnih rezova mišjih mozgova snimljenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT). Mišji mozgovi uronjeni su u PBS i različita razrijeđena (od 1:2 do 1:20) dva kontrastna sredstva Omnipaque (prvi stupac) i Telebrix (drugi stupac) u fosfatnom puferu (PBS). Dijagram intenziteta signala izražen u Hounsfieldovim jedinicama (HU) pokazuje različite vrijednosti signala za regije od interesa sive i bijele tvari u ovisnosti o koncentraciji iona joda ( $I^{127}$ ) u Omnipaque kontrastnom sredstvu (B) i Telebrix kontrastnom sredstvu (C). Razlika u intenzitetu signala između sive i bijele tvari označena je na dijagramu kao "razlika". Mišji mozgovi uronjeni u PBS ne pokazuju nativni tkivni kontrast. Mозgovi uronjeni u razrijeđenoj koncentraciji kontrastnog sredstva Omnipaque u omjeru od 1:2 s PBS-om pokazuju razliku u vrijednosti signala sive i bijele tvari od 460 HU (B), dok je Telebrix kontrastno sredstvo istog razrijeđenja pokazalo je razliku signala od 89 HU (C).



#### 4.2.3. MikroCT kao nova metoda za *ex vivo* oslikavanje ishemijskih lezija mišjeg mozga

Kako bi potvrdili da je metoda *ex-vivo* oslikavanja mišjeg mozga mikroCT optimalna za vizualizaciju ishemijskih lezija, usporedili smo slike dobivene mikroCT-om s odgovarajućim rezovima istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu. Slike frontalnih rezova mišjih mozgova lažno operiranih miševa histološki obojanih po Nisslu (Slike 2A) uspoređene su s odgovarajućim slikama dobivenih mikroCT-om (Slike 29C i 29E). Također, slike rezova mišjih mozgova miševa kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije histološki obojanih po Nisslu (Slike 29B) uspoređene su s odgovarajućim slikama dobivenih mikroCT-om (Slike 29D i 29F).

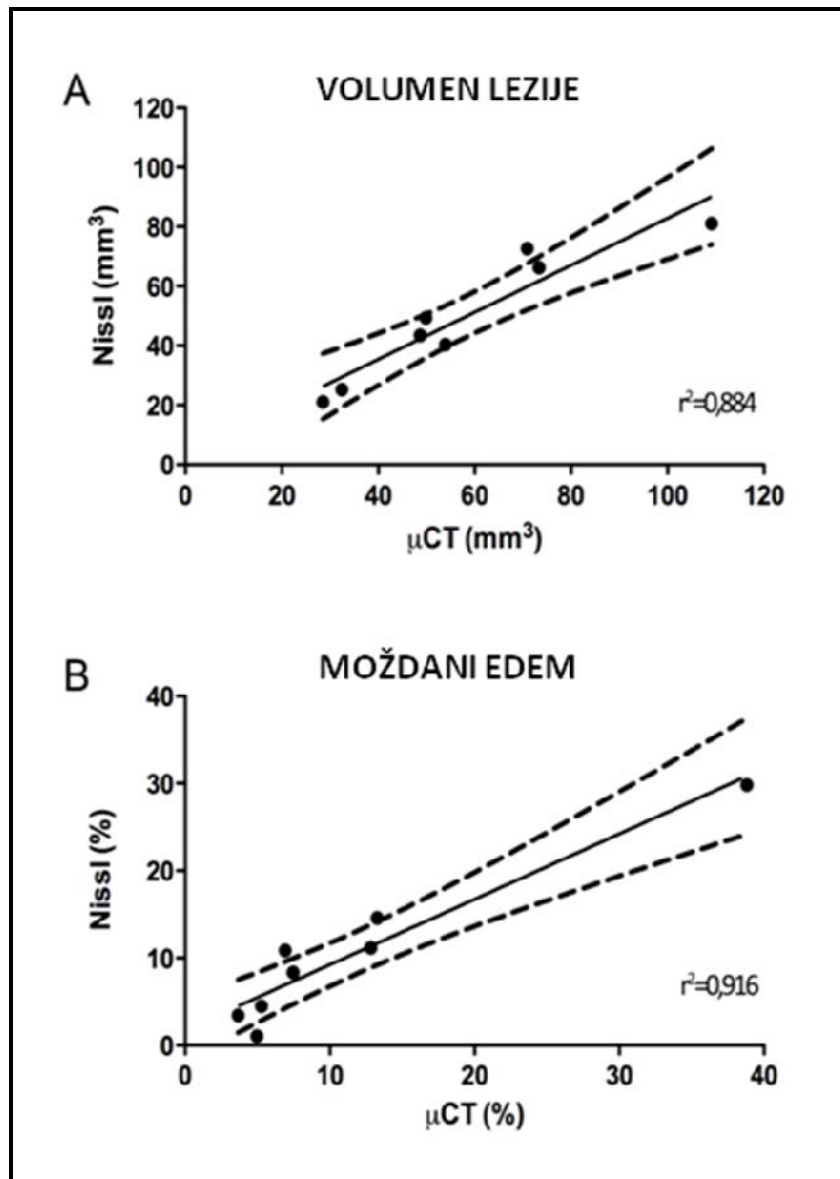
Kako bi poboljšali vizualizaciju i najmanjih morfoloških detalja na slikama dobivenim mikroCT-om korištene su različite skale boja koje omogućuje kompjuterski program CTAn i time poboljšali vizualizaciju područja u mozgu zahvaćenog lezijom (Slike 29C i 29D). Slike dobivene mikroCT-om i slike rezova obojenih po Nisslu mozgova miševa koji su lažno operirani nisu pokazale razlike u morfologiji moždanih hemisfera (Slike 29A, 29C i 29E), za razliku od slika mozgova miševa kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje koje pokazuju razliku u morfologiji moždanih hemisfera u kojima se jasno razlikuje područje zdravog tkiva od područja zahvaćenih lezijom (Slike 29B, 29D i 29F). Područje zahvaćeno lezijom u slikama dobivenih mikroCT-om je prikazano je kao područje signala visokog intenziteta, što je omogućilo lako ocrtavanje samog područja zahvaćenog lezijom (crvena crta, Slike 29B i 29D). Ocrtana područja na slikama dobivenima mikroCT-om odgovaraju područjima na slikama rezova mozgova histološki obojanih po Nisslu (Slike 29B, 29D i 29F). Ovim rezultatima pokazana je nova mogućnost korištenja mikroCT-a za oslikavanje mozgova koristeći neionsko kontrastno sredstvo Omnipaque. Oslikavanje mikroCT-om omogućilo je detekciju i vizualizaciju ishemijskih lezija sa sličnom preciznošću kao i histološkom metodom bojanja rezova po Nisslu (Slike 29D i 29F).



**Slika 29.** Usporedba frontalnih rezova istog mišjeg mozga dobivenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) u neobrađenom formatu (A, B), softverski obrađenom formatu (C, D) i histološki obojanih po Nisslu (E, F). U lijevom stupcu slike prikazuju lažno operiranog miša, kod kojeg nema vidljivih morfoloških razlika moždanih hemisfera (A, C, E). U desnom stupcu slike prikazuju frontalne rezove mozgovog miša kod kojeg je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije - MCAO (B, D, F). Crvena linija ocrta područje lezije koje se razlikuje od okolnog zdravog tkiva.

Kako bi odredili da li je kvantifikacijska analiza mjerenja mikroCT-om usporediva analizi mjerenoj standardnom histološkom metodom na serijskim histološkim rezovima bojenih Nisslom, obje metode smo izvodili na istom mozgu. Mjerenje ishemijskih lezija izmjereno je indirektnom metodom oduzimanjem ne-ishemijskog područja tkiva ipsilateralne hemisfere od neozlijeđene kontralateralne hemisfere. Linearna regresijska analiza izvedena za izmjerene volumene ishemijskih lezija kvantificirane mikroCT-om i na odgovarajućim rezovima istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu pokazala je značajnu korelaciju ( $r^2=0,884$ ,  $p=0,0005$ ; Slika 30A).

Postotak moždanog edema određen je kao postotak povećanja obima ipsilateralne (ishemijske) hemisfere u usporedbi s neozlijeđenom kontralateralnom hemisferom. Linearna regresijska analiza izvedena za izmjerene postotke moždanih edema kvantificirane mikroCT-om i na odgovarajućim rezovima istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu također je poput volumena lezija pokazala značajnu korelaciju ( $r^2=0,916$ ,  $p=0,0002$ ; Slika 30B).



**Slika 30.** Linearna regresijska analiza volumena ishemijskih lezija (A) i moždanog edema (B) mjerenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) i mjerenih iz serijskih histoloških rezova bojenih Nisslom. x-os predstavlja volumetrijsku analizu dobivenu mikroCT-om, a y-os predstavlja volumetrijsku analizu dobivenu izračunavanjem iz serijskih histoloških rezova. Moždani edem je mjereno kao postotak povećanja obima ozlijeđene hemisfere u usporedbi s neozlijeđenom hemisferom. Mjerenje volumena ishemijske lezije i moždanog edema mikroCT-om i histološkom metodom mjerenja pokazalo je postojanje signifikantne korelacije među samim metodama, za volumen ishemijske lezije  $r^2=0,884$ ,  $p=0,0005$  te za moždani edem  $r^2=0,916$ ,  $p=0,0002$ .

#### 4.2.4. Procjena neurološkog oštećenja

Kako bi procijenili neurološko oštećenje miševa nakon izazivanja ishemijskog oštećenja, 24 sata nakon MCAO zahvata miševi su podvrgnuti procjeni različitih parametara senzomotornih funkcija neurološkim bodovanjem. Kod prve (kontrolne) skupine miševa kojima je primijenjena fiziološka otopina od ukupno 19 miševa, 10 (52 %) imalo je slabi motorni deficit, dok je 9 (47 %) imalo umjereni motorni deficit. Kod druge skupine miševa kojima je primijenjen bradikinin od ukupno 17 miševa 3 (18 %) nije pokazalo motorni deficit, 8 (47 %) je pokazalo slabi, 5 (29 %) umjereni i 1 miš (6 %) jaki motorni deficit. U trećoj skupini životinja kojima je primijenjena mješavina BK i URO od ukupno 19 miševa 3 (16 %) životinja nije pokazalo motorni deficit, 7 (37%) životinja je pokazalo slabi deficit, 8 (42 %) životinja umjereni deficit te 1 (6 %) životinja jaki motorni deficit. Kod niti jedne životinje od ukupno 14 iz četvrte skupine životinja kojima je primijenjen URO nije pokazan motorni deficit. U skupini lažno operiranih životinja niti jedna životinja u skupini od ukupno tri nije pokazivala znakove motornog deficita (Tablica 5).

**Tablica 5.** Prikaz neurološkog bodovanja koji odražava motorni deficit u 4 skupina životinja 24 sata nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO) te u jednoj lažno operiranoj skupini. Četiri skupine životinja koje su podvrgnute MCAO zahvatu primijenjena je redom: fiziološka otopina, bradikinin (BK), mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK) te urodilatin (URO). Podaci pokazuju broj životinja te u zagradi postotak od ukupnog broja životinja koje su pokazale motorni deficit. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na urodilatin ( $p < 0,05$ ).

	<b>BEZ DEFICITA (0)</b>	<b>SLABI (1)</b>	<b>UMJERENI (3 i 6)</b>	<b>JAKI (10)</b>	<b>UKUPNO</b>
<b>FIZIOLOŠKA</b>	0 (0,00 %)	10 (52,63 %)	9 (47,37 %)	0 (0,00 %)	19 *
<b>BK</b>	3 (17,65 %)	8 (47,06 %)	5 (29,41 %)	1 (5,88 %)	17 *
<b>URO/BK</b>	3 (15,79 %)	7 (36,84%)	8 (42,11 %)	1 (5,26 %)	19 *
<b>URO</b>	14 (100,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	14
<b>LAŽNO OPERIRANI</b>	3 (100,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	0 (0,00 %)	3
<b>UKUPNO</b>	20	25	22	2	69

#### 4.2.5. Procjena veličine ishemijske lezije mikroCT-om

Kako bi odredili veličinu volumena ishemijske lezije kod 5 istraživanih skupina miševa korišten je mikroCT kao optimalna metoda *ex vivo* oslikavanja mišjeg mozga. U prvoj skupini životinja kojoj je primijenjena fiziološka otopina od ukupno 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu njih 6 imalo je ishemijsku leziju čiji je volumen iznosio  $33,90 \pm 25,76 \text{ mm}^3$ . U drugoj skupini životinja kojima je primijenjen bradikinin svih 8 od ukupno 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu imalo je ishemijsku leziju, a volumen ishemijske lezije iznosio je  $58,09 \pm 21,93 \text{ mm}^3$ . Treća skupina životinja kojima je primijenjena mješavina URO-a i bradikinina od ukupno 9 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu 3 je imalo ishemijsku leziju, volumena  $41 \pm 14 \text{ mm}^3$ . U četvrtoj skupini životinja kojima je primijenjen URO svih 7 od ukupno 7 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu nije imalo vidljivu ishemijsku leziju. U petoj skupini životinja koja je lažno operirana nije bilo vidljivih ishemijskih lezija kod nijednog miša od njih ukupno 4 (Tablica 6).

**Tablica 6.** Prikaz veličina volumena ishemijskih lezija mjerenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) kod 5 istraživanih skupina miševa nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO) te u jednoj lažno operiranoj skupini. Četiri skupine životinja koje su podvrgnute MCAO zahvatu primijenjena je redom: fiziološka otopina, bradikinin (BK), mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK) i urodilatin (URO). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. (n) označava broj miševa. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na urodilatin ( $p < 0,05$ ). # označava statističku značajnost učinka u odnosu na bradikinin ( $p < 0,05$ ).

	UKUPNO (n)	OZLIJEĐENI (n)	ISHEMIJSKA LEZIJA ( $\text{mm}^3$ )
<b>FIZIOLOŠKA</b>	8	6	$33,90 \pm 25,76^*$
<b>BK</b>	8	8	$58,09 \pm 21,93^*$
<b>URO/BK</b>	9	3	$13,56 \pm 23,81^* \#$
<b>URO</b>	7	0	0,00
<b>LAŽNO OPERIRANI</b>	4	0	0,00
<b>UKUPNO</b>	23,84	36	$29,25 \pm 29,25$

#### 4.2.6. Procjena postotka moždanog edema mikroCT-om

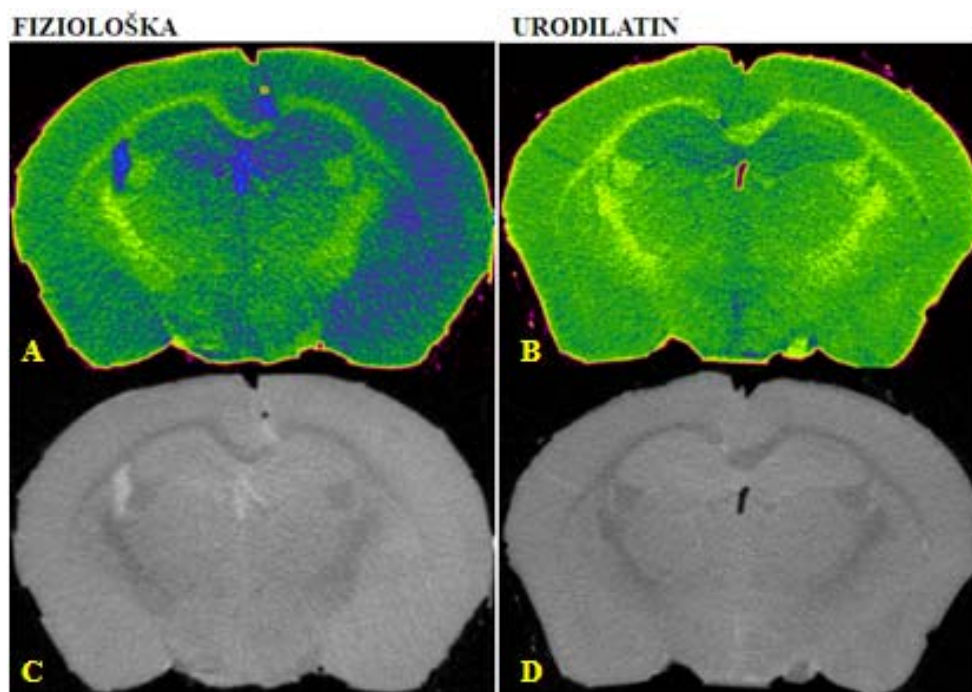
Kako bi odredili postotak moždanog edema kod 5 istraživanih skupina miševa korišten je mikroCT. Rekonstrukcija dobivenih rezultata omogućila je volumetrijsku analizu lijeve i desne hemisfere i određivanje ukupnog volumena mišjeg mozga. Postotak moždanog edema određen je kao postotak povećanja obima ipsilateralne (ishemijske) hemisfere u usporedbi s neozlijeđenom kontralateralnom hemisferom. U prvoj skupini životinja kojoj je primijenjena fiziološka otopina od ukupno 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu 6 s ishemijskom ozljedom imalo je povećanje ipsilateralne hemisfere za  $2,879 \pm 1,899\%$ . U skupini životinja kojima je primijenjen bradikinin kod svih 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu došlo je do znatnog povećanja ipsilateralne hemisfere za  $7,611 \pm 7,231\%$ . U skupini životinja kojima je primijenjena mješavina URO-a i bradikinina od ukupno 9 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu 3 je imalo ishemijsku leziju s povećanjem volumena ipsilateralne hemisfere za  $1,144 \pm 1,161\%$ . U skupini životinja kojima je primijenjen samo URO došlo do značajno manjeg povećanja ipsilateralne hemisfere za  $0,985 \pm 0,689\%$  u odnosu na skupine kojima je primijenjena fiziološka otopina, bradikinin te mješavina URO i bradikinina. Kod peta skupine životinja koja je lažno operirana povećanje ipsilateralne hemisfere mišjih mozgova iznosilo je  $-0,353 \pm 0,639\%$  (Tablica 7).

Povećanje ipsilateralne hemisfere kao mjere moždanog edema koji nastaje kao posljedica ishemijske lezije u skupini miševa kojima je primijenjen URO neznatno je u odnosu na lažno operirane miševe ( $n = 0,984$ ) te nešto niže od kontrolne skupine životinja kojima je primijenjena fiziološka otopina koje pokazuju područje signala visokog intenziteta odražavajući područje lezije (Slika 31). Povećanje ipsilateralne hemisfere kao mjere moždanog edema značajno snižen ( $p < 0,05$ ) u skupini miševa kojima je primijenjena mješavina URO-a i bradikinina, naspram skupine životinja kojima je primijenjen samo bradikinin koji pokazuju i značajno veći volumen lezije ( $p < 0,05$ ) i postotak moždanog edema ( $p < 0,05$ ) (Slika 32). Također, povećanje ipsilateralne hemisfere kao mjere moždanog edema u skupini miševa kojima je primijenjen samo URO značajno je snižen ( $p < 0,05$ ) u odnosu na skupinu životinja kojima je primijenjen samo bradikinin.

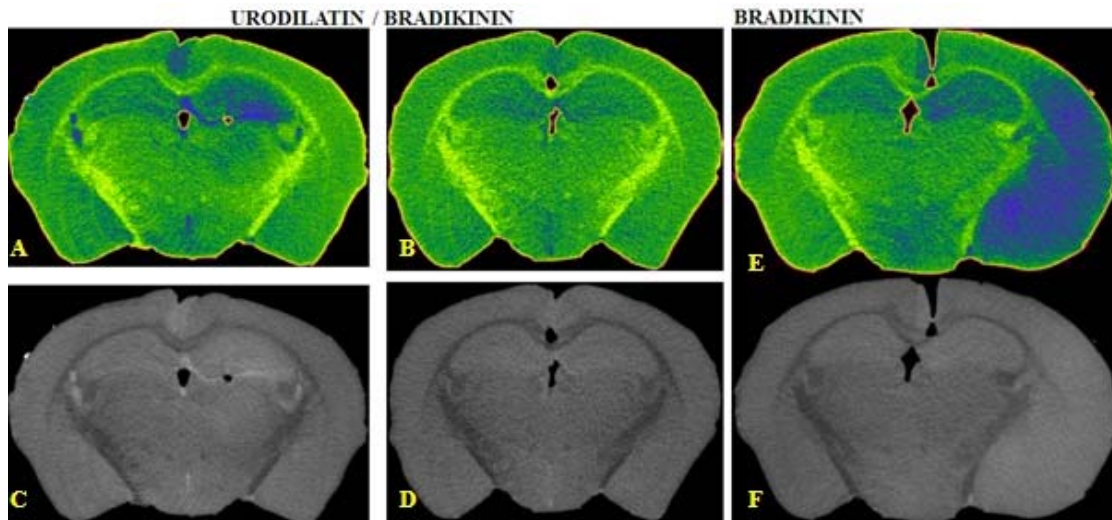
**Tablica 7.** Prikaz postotka moždanih edema mjerenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) u mozgu miševa kod 4 istraživanih skupina miševa nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO) te u jednoj skupini lažno operiranih miševa. Četiri skupine životinja koje su podvrgnute MCAO zahvatu primijenjena je redom: fiziološka otopina, bradikinin (BK), mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK) i urodilatin (URO). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. (n) označava broj miševa. \* označava statističku značajnost učinka u odnosu na bradikinin ( $p < 0,05$ ).

	<b>UKUPNO (n)</b>	<b>EDEM (%)</b>
<b>FIZIOLOŠKA</b>	8	2,879 $\pm$ 1,899
<b>BK</b>	8	7,611 $\pm$ 7,231
<b>URO/BK</b>	9	1,144 $\pm$ 1,161*
<b>URO</b>	7	0,985 $\pm$ 0,689*
<b>LAŽNO OPERIRANI</b>	4	-0,353 $\pm$ 0,639
<b>UKUPNO</b>	36	2,770 $\pm$ 4,404





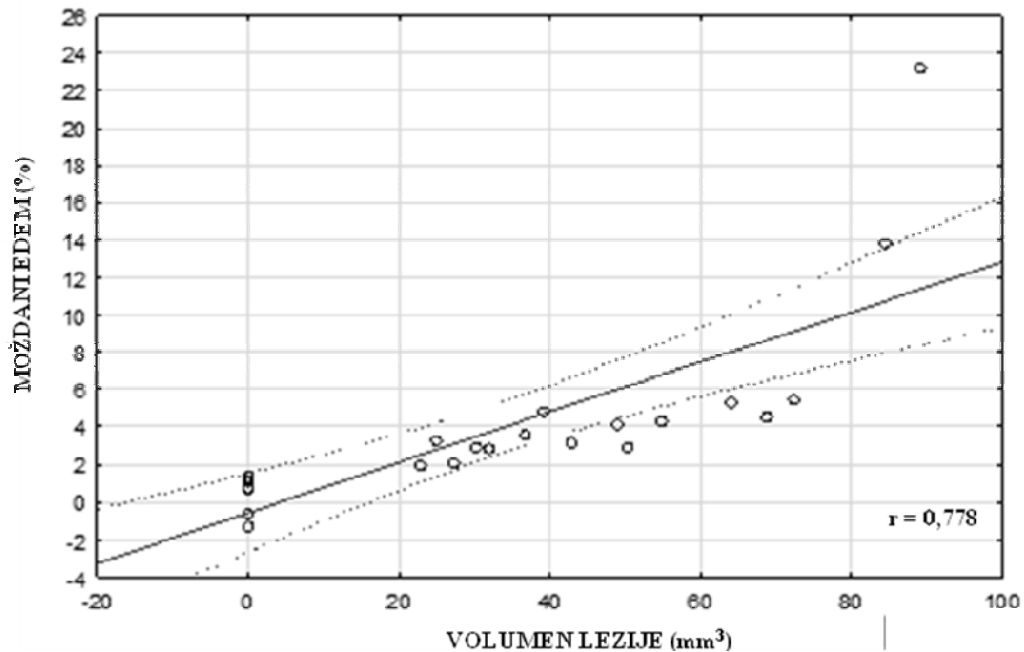
**Slika 31.** Usporedba frontalnih rezova mozgova miševa kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO), dobivenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) u softverski obrađenom formatu (A, B) i neobrađenom formatu (C, D). U lijevom stupcu slike prikazuju miša kojemu je primijenjena fiziološka otopina, kod kojeg se jasno vide promjene u morfologiji ipsilateralne hemisfere nastale uslijed ishemijske ozljede mozga (A, C). U desnom stupcu slike prikazuju frontalne rezove mozgova miša kojemu je primijenjen urodilatin, kod kojeg nema vidljivih morfoloških razlika moždanih hemisfera (B, D).



**Slika 32.** Usporedba frontalnih rezova mozgov miševa kod kojih je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije (MCAO) dobivenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT) u softverski obrađenom formatu (A, B) i neobrađenom formatu (C, D). U lijevom stupcu slike prikazuju miša kojemu je primijenjena mješavina urodilatina i bradikinina, kod kojeg se jasno vide promjene u morfologiji ipsilateralne hemisfere nastale uslijed ishemijske ozljede mozga u samo 33 % primijenjenih miševa (A, C), dok 67 % ne pokazuje vidljive morfoloških razlike moždanih hemisfera (srednji stupac B, D). U desnom stupcu slike prikazuju frontalne rezove mozgov miša kojemu je primijenjen bradikinin, kod kojeg se jasno vide promjene u morfologiji ipsilateralne hemisfere nastale uslijed ishemijske ozljede mozga (E, F).

Kako bi odredili da li je kvantifikacijska analiza mjerenja ishemijskih lezija kvantificirana mikroCT-om usporediva analizi postotka moždanih edema također kvantificirana mikroCT-om obje su metode izvedene na istom mozgu. Analiza je izvedena među parametrima mjerenima na 4 istražive skupina miševa na kojima je izveden 60 minutni MCAO zahvat kojima je redom primijenjena fiziološka otopina, bradikinin, mješavina bradikinina i urodilatina te urodilatin. Mjerenje ishemijskih lezija izmjereno je indirektnom metodom oduzimanjem ne-ishemijskog područja tkiva ipsilateralne hemisfere od neozlijeđene kontralateralne hemisfere, dok je postotak moždanog edema određen je kao postotak povećanja obima ipsilateralne (ishemijske) hemisfere u usporedbi s neozlijeđenom kontralateralnom hemisferom. Linerana regresijska analiza izvedena za izmjerene volumene ishemijskih lezija i postotak moždanog edema kvantificirane mikroCT-om pokazala je značajnu korelaciju ( $r=0,777$ ,  $p<0,001$ ) (Slika 33).

MOŽDANIEDEM - VOLUMEN LEZIJE



**Slika 33.** Linearna regresijska analiza volumena ishemijskih lezija i moždanog edema mjerenih mikro kompjuteriziranom tomografijom (mikroCT). Mjerenje volumena ishemijske lezije i moždanog edema mikroCT-om izvedeno je na 4 skupina miševa nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO), kojima je primijenjena je redom: fiziološka otopina, bradikinin, mješavina urotilatina i bradikinina i urotilatin. x-os predstavlja volumetrijsku analizu moždanog edema, a y-os predstavlja volumetrijsku analizu ishemijske lezije. Mjerenje ishemijskih lezija izmjereno je indirektnom metodom oduzimanjem ne-ishemijskog područja tkiva ipsilateralne hemisfere od neozlijeđene kontralateralne hemisfere. Moždani edem je mjeren kao postotak povećanja obima ozlijeđene hemisfere u usporedbi s neozlijeđenom hemisferom. Linerana regresijska analiza izvedena za izmjerene volumene ishemijskih lezija i postotak moždanog edema kvantificirane mikroCT-om pokazalo je postojanje signifikantne korelacije među mjerenim parametrima ( $r=0,777$ ,  $p<0,001$ ).

#### 4.2.7. Evaluacija moždanog edema mokro – suhom metodom

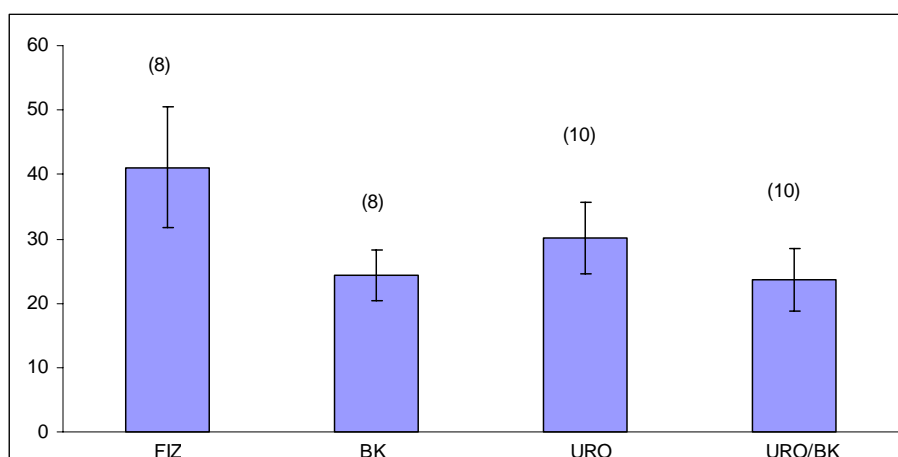
Kako bi potvrdili da je povećanje ipsilateralne ozlijeđene hemisfere nastalo uslijed okluzije središnje moždane arterije, mjereno je sadržaj vode u moždanim hemisferama mišjeg mozga 24 sata nakon MCAO zahvata uslijed maksimalnog moždanog edema. Sadržaj vode je mjereno u 4 skupina životinja kojima su primijenjeni redom fiziološka otopina, bradikinin, mješavina URO-a i bradikinina i URO. U prvoj skupini životinja kojoj je primijenjena fiziološka otopina u 3 životinje podvrgnutih MCAO zahvatu izmjerena je razlika sadržaja vode od  $1,830 \pm 0,384\%$ . U drugoj skupini životinja kojima je primijenjen bradikinin u 8 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu izmjerena je razlika sadržaja vode od  $4,139 \pm 7,180\%$ . Treća skupina životinja kojima je primijenjena mješavina URO-a i bradikinina u 9 životinja podvrgnutih MCAO zahvatu izmjerena je razlika sadržaja vode od  $2,074 \pm 3,584\%$ . U četvrtoj skupini 5 životinja kojima je primijenjen URO i koje su podvrgnute MCAO zahvatu izmjerena je razlika sadržaja vode od  $1,674 \pm 2,418\%$ . Razlika postotka sadržaja vode kao mjere moždanog edema pokazuje jednaku tendenciju kao i postotak moždanog edema mjereno mikroCT-om, pri čemu je vidljivo snižen u skupini miševa kojima je primijenjen URO i mješavina URO-a i bradikinina, naspram skupine životinja kojima je primijenjen samo bradikinin (Tablica 8).

**Tablica 8.** Prikaz razlike mjerenja postotka sadržaja vode ( $\Delta$  % BWC) kao mjere moždanog edema mozga miševa 24 sata nakon podvrgavanja 60 minutnoj okluziji središnje moždane arterije (MCAO) kod istraživanih skupina miševa kojima su primijenjeni urodilatin (URO), fiziološka otopina, mješavina urodilatina i bradikinina (URO/BK) i bradikinin (BK). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. (n) označava broj miševa.

	$\Delta$ % BWC	n
URO	$1,674 \pm 2,418$	5
FIZIOLOŠKA	$1,830 \pm 0,384$	3
URO/BK	$2,074 \pm 3,584$	9
BK	$4,139 \pm 7,180$	8

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

Kako bi se utvrdio pravilan položaj silikoniziranog konca u središnjoj moždanoj arteriji te pratio lokalni relativni protok krvi u mozgu miševa za vrijeme MCAO zahvata korišten je laserski doppler. Okluzija središnje moždane arterije imala je za posljedicu smanjenje ipsilateralnog relativnog protoka krvi u području središnje moždane arterije za 60 do 80%. Sat vremena nakon početka zahvata vađenjem silikoniziranog konca je omogućena reperfuzija prilikom koje je došlo do ponovnog uspostavljanja normalnog relativnog protoka krvi u mozgu u području ipsilateralne središnje moždane arterije. Nije pokazana značajna razlika u smanjenju relativnog protoka krvi uslijed MCAO zahvata kako za kontrolnu skupinu kojoj je primijenjena fiziološka otopina, tako ni za sve ostale tri skupine životinja kojima su primijenjeni URO, bradikinin i mješavina URO-a i bradikinina (Slika 34).



**Slika 34.** Postotak lokalnog relativnog protoka krvi u mozgu miševa za vrijeme 60 minutne okluzije središnje moždane arterije mjereno laserskim dopplerom za četiri skupine miševa kojima je primijenjena fiziološka otopina (FIZ), bradikinin (BK), urodilatin (URO) i mješavina urodilatina i bradikinina (BK/URO). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna pogreška. (n) označava broj miševa.

## **5. RASPRAVA**

Moždani udar je danas među tri vodeća uzroka smrtnosti u zapadnom svijetu. Međutim, unatoč desetljeća intenzivnih istraživanja moždanog udara trenutno ne postoji efektivan neuroprotektivni lijek te jedino učinkovito liječenje koje nam stoji na raspolaganju je tromboliza uz primjenu tkivnog aktivatora plazminogena. Liječenje je omogućeno vrlo malom broju bolesnika zbog uskog vremenskog razdoblja u kojem je primjenjivo (1). Ishemijski moždani udar inducira nastanak edema mozga, koji se razvija iz citotoksičnog edema neurona i glije, pa sve do ionskog i vazogenog, koji nastaje nakon reperfuzije ozlijeđenog područja (36, 37). Bradikinin se smatra važnim posrednikom u upalnom odgovoru živčanog sustava i oštećenju mozga nakon ishemijskog moždanog udara (83, 84). Mehanizmi prema kojima bi bradikinin mogao posredovati u ishemijskom oštećenju mozga primarno uključuju aktivaciju B<sub>2</sub> receptora, pri čemu dolazi do povećanja permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilatacije, inducira se proupalni učinak i nastanak edema (2, 144). S obzirom na dokazani pozitivan učinak antagonista B<sub>2</sub> receptora, CP-0597 i LF 16-0687 Ms, pri čemu dolazi do smanjenja moždanog edema, volumena lezije i odumiranja neurona s znatnim poboljšanjem neurološkog ishoda (145, 146) postoji hitna potreba za istraživanjem terapijskih svojstava inhibitora B<sub>2</sub> receptora. Međutim, bradikinin također djelujući preko B<sub>2</sub> receptora štiti vijabilnost mikrovaskularnog endotela od induktora stanične smrti te pokazuje značajnu inhibitornu ulogu u kontroli signalnih putova mikrovaskularne stanične smrti (148). S obzirom na dvojak učinak aktivacije kalikrein/kininskog sustava korištenje antagonista B<sub>2</sub> receptora onemogućava pozitivno djelovanje bradikininina, potrebne su nove strategije istraživanja terapijskih djelovanja agonista B<sub>2</sub> receptora uz ranu indukciju signalnih putova koje bi omogućile preživljavanje endotelnih stanica i održavanje integriteta vaskulature. Također je poznato da su vrijednosti natriuretskih peptida u plazmi povišene u osoba s ishemijskim moždanim udarom te ostaju više od normalnih i do 7 dana nakon oštećenja mozga (150) te da natriuretski peptidi imaju pozitivan učinak na smanjenje intersticijskog edema još nepoznatim mehanizmom (229). Kako bi odredili moguću interakciju i međudjelovanje signalnih putova natriuretskih peptida i bradikininina u ovom istraživanju izabrana su dva modela, stanični model: HEK-293 divlji tip stanica i animalni model: mužjaci miševa soja C57Bl/6NCrl kojima je izazvano ishemijsko oštećenje mozga metodom unilateralne intraluminalne okluzije srednje moždane arterije.

## 5.1. Stanični model: HEK-293 stanice

U svrhu ispitivanja učinka natriuretskih peptida, bradikinina te njihovog međudjelovanja korišten je divlji tip HEK-293 stanica u kojima su izražene mRNA nekoliko različitih receptora natriuretskih peptida (230). Postojanje 4 različita receptora za natriuretske peptide u HEK-293 stanicama: GC-A (NPR-A), GC-B (NPR-B), NPR-Bi i klirens receptor (NPR-C), potvrđeno je i ovim istraživanjem. Za razliku od prethodno opisanih istraživanja u ovom istraživanju izražaj mRNA receptora natriuretskog peptida tipa B u HEK-293 stanicama pokazan je RT-PCR-om, ali tek nakon reamplifikacije.

Krivulje učinaka ovisnih o koncentraciji za ANP, BNP i URO pokazale su učinak natriuretskih peptida na HEK-293 stanice u rasponu koncentracija od  $10^{-10}$  do  $10^{-6}$  M, pri čemu su ANP i URO pokazali dvojak učinak na membranski potencijal HEK-293 stanica ukazujući na regulaciju dvije populacije  $K^+$ -kanala (230). BNP je za razliku od ANP i URO pokazao samo depolarizacijski učinak. Svi navedeni natriuretski peptidi dovode do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a. Depolarizacijski učinak pokazan korištenjem natriuretskih peptida na HEK-293 stanice pokazan je i korištenjem permeabilnog membranskog analoga cGMP-a, 8-Br-cGMP, podupirući prethodna istraživanja inhibicije  $K^+$ -kanala atrijskim natriuretskim peptidom djelujući preko cGMP-a i PKG (224). Za CNP je u prethodnim istraživanjima pokazan učinak preko inačice prekrajanja receptora natriuretskih peptida tipa B, receptora natriuretskih peptida tipa Bi (179).

U HEK-293 stanicama izražena su oba bradikininska receptora  $B_1R$  i  $B_2R$  (231). Receptor  $B_1$  je inducibilan, što ukazuje na to da mora doći do indukcije receptora kako bi se prenio na staničnu membranu (85). U ovom istraživanju receptor  $B_1$  nije uspješno aktiviran pod utjecajem njegovog specifičnog agonista [Des-Arg9]-bradikinina, dok je receptor  $B_2$  koji je konstitutivno izražen (85) aktiviran pod utjecajem njegovog specifičnog agonista bradikinina. Vežući se za receptor  $B_2$  u HEK-293 stanicama bradikinin dovodi do depolarizacije stanica što inducira porast unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$ . Signal porasta unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  u potpunosti je blokiran korištenjem HOE 140, selektivnog inhibitora receptora  $B_2$ , za koji se smatra da ima potencijalni terapijski učinak. Porast unutarstanične koncentracije  $Ca^{2+}$  aktivira specifično  $Ca^{2+}$ -ovisne  $Cl^-$ -kanale, što je pokazano korištenjem specifičnog inhibitora  $Ca^{2+}$ -ovisnih  $Cl^-$ -kanala NPPB-a koji je u potpunosti blokirao depolarizacijski učinak bradikinina. Aktivacija bradikininom  $Ca^{2+}$ -ovisnih  $Cl^-$ -kanala



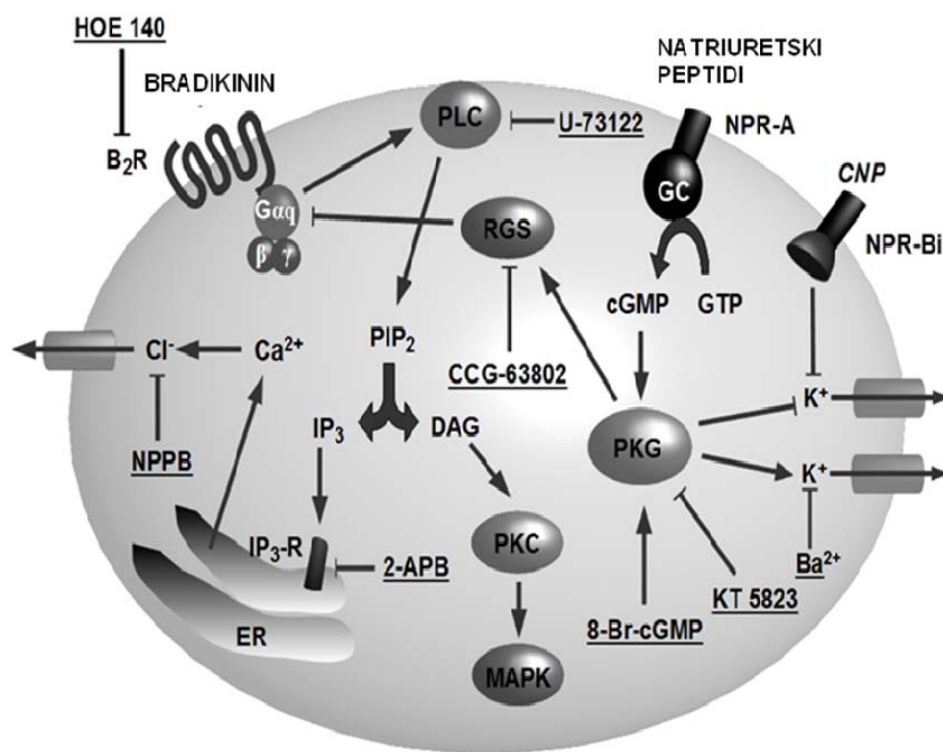
je već ranije pokazana na epitelnim stanicama bubrega (engl. *Madin-Darby Canine Kidney Epithelial Cells - MDCK Line*) i stanicama *fibroblast-like satellite cells* (FLS) (232, 233).

U ovom istraživanju pokazan je učinak inhibicije depolarizacijskog učinka bradikinina na HEK-293 stanicama te njegovog učinka na porast unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  ANP-om, BNP-om i URO-om. Također je pokazan izostanak inhibicije učinka porasta unutarstanične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$  kad je korišten CNP, iako je CNP depolarizirao HEK-293 stanice vjerojatno inhibicijom  $\text{K}^+$ -kanala. Depolarizacijski učinak CNP-a je moguć s obzirom da je inhibicija  $\text{K}^+$ -kanala osim fosforilacijom PKG preko aktivacije GC-A i cGMP-a, također moguća i fosforilacijom tirozinom kao što je i opisano za inačicu prekranja NPR-B, NPR-Bi (179, 230). S obzirom da natriuretski peptidi i bradikinin aktiviraju ili inhibiraju različite vrste ionskih kanala pritom dovodeći do depolarizacije HEK-293 stanica, međudjelovanje njihovih signalnih putova nije locirano na mjestu ionskog kanala već negdje drugdje duž signalne kaskade.

Inhibicijski učinak natriuretskih peptida na depolarizacijski učinak bradikinina izostao je prilikom korištenja KT 5823 specifičnog inhibitora protein kinaze G, ukazujući na sudjelovanje ove protein kinaze u međudjelovanju signalnih putova natriuretskih peptida i bradikinina. PKG može na nekoliko mogućih načina djelovati na signalnu kaskadu bradikinina, putem inhibicije PLC direktnom fosforilacijom (234) te u interakciji s receptorom inozitol-3 fosfata, inhibirajući oslobađanje  $\text{Ca}^{2+}$  iz endoplazmatskog retikuluma (235).

Bradikininski receptor  $\text{B}_2$  je iz rodopsinske obitelji receptora GPCR i reguliran je proteinima RGS (236). Pokazano je da PKG može aktivirati RGS proteine i tako inhibirati receptore GPCR, primjerice aktivirajući RGS-4 u glatkim mišićnim stanicama aorte (237). Također je pokazano i da se cGMP-ovisna PKGI $\alpha$  veže direktno na regulatore signalnog puta G-proteina 2 (RGS-2), prilikom čega dolazi do fosforilacije te do signifikantnog povećanja razine GTP-aze  $\text{G}\alpha_q$  čime se inhibira signalni put receptora PAR-1. Aktivacija RGS2 preko PKG-a ukazuje na moguću kardioprotektivni učinak kod patoloških stanja poput hipertrofije kod kojih dolazi do pretjerane aktivacije  $\text{G}\alpha_q$  (217). Osim toga pokazana je značajna uloga RGS-4 u srčanim miocitima, kod kojih se u fiziološkim uvjetima kod stimulacije ANP-om PKG veže i fosforilira RGS-4 na što se on veže na  $\text{G}\alpha_q$  inhibirajući njegove hipertrofičke učinke (218). CCG-63802 je specifični inhibitor RGS proteina, s najvećom specifičnošću za RGS-4 proteine (238). U ovom radu smo pokazali da je inhibicija depolarizacijskog učinka

bradikinina 8-Br-cGMP-om, analogom cGMP-a uspješno poništena korištenjem inhibitora CCG-63802. Učinak inhibitora RGS proteina ukazuje na direktno međudjelovanje signalnog puta cGMP-a i signalnog puta bradikinina kroz regulaciju RGS proteina (Slika 35), što se podudara s prethodno objavljenim mehanizmom djelovanja u srčanim miocitima (218). S obzirom da je u radu određeno mjesto međudjelovanja natriuretskih peptida i bradikinina na razini regulacije receptora B<sub>2</sub>R distalni dijelovi signalnog sustava bradikinina nisu istraživani.



**Slika 35.** Signalni put bradikinina i natriuretskih peptida u HEK-293 stanicama. Vežanje bradikinina na bradikininski receptor tipa 2 (B<sub>2</sub>R) dovodi do aktivacije fosfolipaze C (PLC) i posljedično do porasta koncentracije unutarstaničnog kalcija (Ca<sup>2+</sup>) oslobađanjem Ca<sup>2+</sup> iz endoplazmatskog retikuluma (ER). Uslijed povećanja razine unutarstaničnog Ca<sup>2+</sup>, aktiviraju se Ca<sup>2+</sup>-ovisni kloridni (Cl<sup>-</sup>) kanali koji uzrokuju depolarizaciju membranskog potencijala HEK-293 stanica. Vežanjem natriuretskih peptida na receptor gvanilat ciklazu tipa A (GC-A, NPR-A) dolazi do povišenja unutarstanične koncentracije cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP) uslijed aktivacije cGMP-ovisne protein kinaze G (PKG) i istovremene inhibicije različitih vrsta kalijevih (K<sup>+</sup>) kanala. Učinak natriuretskih peptida nadalje omogućava

regulatore signalnog puta G-proteina (RGS) da inhibiraju G protein u kaskadi receptora B<sub>2</sub>. C-tip natriuretskog peptida (CNP) inhibira K<sup>+</sup>-kanale aktivacijom inačice prekranja receptora gvanilat ciklazu tipa B (GC-B, NPR-B), NPR-Bi, pri čemu ne dolazi do stvaranja cGMP-a te nije uključen u inhibiciju signalnog puta bradikinina. Korišteni inhibitori: HOE 140 (inhibitor receptora B<sub>2</sub>), Ba<sup>2+</sup> (blokator K<sup>+</sup>-kanala), NPPB (blokator Ca<sup>2+</sup>-ovisnih Cl<sup>-</sup>-kanala), U-73122 (inhibitor PLC-a), CCG-63802 (inhibitor RGS proteina), 2-APB (blokator receptor inozitol-3-fosfata), KT 5823 (inhibitor PKG); korišteni aktivator: 8-Br-cGMP (membranski permeabilni analog cGMP-a).

Ovo je prvi rad koji opisuje učinak signalnih mehanizama natriuretskih peptida na signalni put bradikinina u HEK-293 stanicama. Kao prirodni antagonisti signalnog puta bradikininskog receptora tipa 2, mogli bi imati pozitivne učinke u patološkim stanjima u kojima je bradikinin posreduje, poput ishemijskog moždanog udara gdje aktivacijom B<sub>2</sub> receptora inducira povećanje permeabilnosti krvno-moždane barijere, vazodilataciju i nastanak moždanog edema. Kako natriuretski peptidi imaju pozitivan učinak na smanjenje intersticijskog edema, njihovo djelovanje na signalni put bradikinina moguć je mehanizam ovog protektivnog djelovanja koji do sad nije bio razjašnjen. Nadalje, istraživanje je usmjereno na utjecaj međudjelovanja signalnih putova natriuretskih peptida i bradikinina nakon ishemijskog oštećenja mišjeg mozga.

## **5.2. Animalni model: miševi soja C57Bl/6NCrl**

U ovom istraživanju korišten je animalni model ishemijske ozljede mozga koji je tijekom desetljeća često korišten u predkliničkim istraživanjima za istraživanja mehanizama nastanka moždanog udara i mogućih načina liječenja istog. Za izazivanje ishemijske ozljede mozga kod glodavaca koristi se unilateralna intraluminalna okluzija srednje moždane arterije, zbog toga što odgovara oštećenju mozga u ljudi nakon moždanog udara (239, 240). MCAO metoda izaziva obustavu dostave glukoze i kisika u mozak što dovodi do apoptotičke i nekrotičke smrti stanica, poremećaja u krvno-moždanoj barijeri i posljedično nastanka moždanog edema (241). Predklinička istraživanja animalnih modela moždanog udara pokazuju da postoji konstantna potreba za novim metodama oslikavanja mozga koja pritom

omogućavaju kvantifikaciju volumena lezije, kako bi se omogućilo praćenje i najmanjih terapijskih učinaka potencijalnih neuroprotektivnih lijekova. Idealan alat za određivanje i kvantifikaciju ishemijske lezije trebao bi biti brz, neinvazivan i jeftin omogućavajući pritom izravno mjerenje volumena lezija. U ovom istraživanju istražili smo mogućnost oslikavanja mišjih mozгова mikro-kompjuteriziranom tomografijom, omogućivši pritom vizualizaciju i kvantifikaciju ishemijskih lezija u mišjem mozgu.

Mikro-kompjuterizirana tomografija omogućava neinvazivno oslikavanje visoke rezolucije, kako za *in vivo* tako i za *ex vivo* oslikavanje, pritom se koristi ponajprije za oslikavanje kosti (242), dok meko tkivo zahtjeva korištenje kontrastnih sredstava, zbog minimalnih razlika mekog tkiva u apsorpciji x-zraka (243). Prijašnja istraživanja pokazala su da korištenje metode kontrastiranja tkiva za oslikavanje mikroCT-om omogućava na jednostavan način vizualizaciju morfologije mekog tkiva, poput mišjih i zečjih mozgov (243, 244). Za razliku od prethodnih istraživanja u ovom istraživanju korišteno je neionsko kontrastno sredstvo široke primjene u klinici. Omnipaque kontrastno sredstvo pokazalo je najbolji intenzitet signala pružajući pritom dobru vizualizaciju morfologije mozga. Korištenje kontrastnog sredstva omogućilo je vizualizaciju ishemijskih lezija, jer se zbog gubitka granice između bijele i sive tvari mozga i povećanja cjelokupne tkivne količine vode nastankom moždanog edema smanjila atenuacija x-zraka (245). Promjene u gustoći slika dobivenih mikroCT-om ovise o lokalnim gustoćama elektrona te o povećanju koncentracija jodidnih iona u području ishemijske lezije zbog nastalog moždanog edema. Predloženi mehanizam omogućava razlikovanje ishemijske lezije od okolnog zdravog moždanog tkiva.

Vizualizacija ishemijskih lezija mišjih mozgov mikroCT-om potvrđena je usporedbom s odgovarajućim rezovima istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu. Bojanje histoloških rezova po Nisslu omogućava potrebnu preciznost za analizu ishemijskih lezija prikazujući stanične elemente koji su metabolički narušeni kao slabije obojane (246, 247). Međutim, iako se danas tradicionalne histološke metode koriste kao metoda izbora pri određivanju ishemijskih lezija, histološke metode su po prirodi dvodimenzionalne, zahtijevaju dugotrajnu pripremu tkiva, dugotrajan rad pri rezanju tkiva pri čemu često dolazi do sažimanja tkiva i geometrijske distorzije (242). U ovom istraživanju rezultati dobiveni mikroCT-om signifikantno su korelirali onima dobivenima kvantifikacijom odgovarajućih rezova istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu. Korištenjem mikroCT-a omogućena je rekonstrukcija visoke rezolucije čitavog mišjeg mozga te i volumetrijska analiza obje moždane hemisfere, a pritom je izbjegnuta mogućnost sažimanja tkiva prilikom

tkivne pripreme i komplicirana trodimenzionalna rekonstrukcija iz pojedinih histoloških rezova.

Kvantifikacija moždanog edema se smatra važnim alatom u određivanju posljedica moždanog udara (248). Različite vazoaktivne tvari mogu utjecati na opseg moždanog edema i time utjecati na patofiziološke događaje koje nastaju nakon ishemijskog moždanog udara, pri čemu mogu imati povoljne ili negativne posljedice na oporavak nakon moždanog udara (249). U ovom istraživanju pokazali smo kako se mikroCT može koristiti i za procjenu moždanog edema, koji je također potvrđen usporedbom s odgovarajućim rezovima istog mišjeg mozga histološki obojanog po Nisslu, pri čemu je prednost mikroCT-a u tome što ne prolazi kroz postupak dehidracije tkiva prije samog snimanja.

Iako se isti zaključci mogu dobiti *ex vivo* mikroCT oslikavanjem mišjeg mozga i tradicionalnom metodom poput trodimenzionalne rekonstrukcije histološki bojanih serijskih rezova mišjeg mozga Nisslom, važno je naglasiti da mikroCT omogućava kvantitativna mjerenja bez oštećivanja tkiva, brzu identifikaciju i kvantifikaciju ishemijske lezije smanjujući vrijeme koje je inače potrebno za histološku pripremu tkiva. Osim toga nakon oslikavanja mozga mikroCT-om moguće je korištenje istog mozga za daljnja histološka istraživanja smanjujući tako broj životinja koje se koriste u samom istraživanju.

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je odrediti učinak natriuretskih peptida, bradikinina te njihovog međudjelovanja na veličinu ishemijske lezije, sadržaj vode te stupanj neurološkog oštećenja u miševa divljeg tipa.

Sve komponente kalikrein/kininskog sustava identificirane su u ljudskom mozgu (142). Bradikinin je detektiran kako u zdravom mozgu (250), tako i u moždanom tkivu nakon ishemijske ozljede mozga (143, 251). Također izražaj oba bradikininska receptora B<sub>1</sub>R i B<sub>2</sub>R u mišjem mozgu potvrđena su i ovim istraživanjem. Njegova uloga u patologiji ishemijske ozljede višestruka je, od stvaranja upalnih čimbenika u astrocitima, aktivacije mikroglije te povećanje permeabilnosti otvarajući krvno-moždanu barijeru (252, 253, 83). Funkcija bradikininskih receptora u zdravom mozgu nije poznata, međutim poznato je da knockout miševi receptora B<sub>2</sub> pokazuju smanjeno stvaranje moždanog edema i brži oporavak nakon ishemijske ozljede mozga (251). Važna uloga bradikininskog receptora B<sub>2</sub> u postishemijskoj ozljedi mozga poduprijeta je s nekoliko različitih istraživanja, uključujući i ovo istraživanje, koristeći natriuretske peptide kao antagoniste bradikininskog receptora B<sub>2</sub> (145, 84, 254). Kao

što je i prikazano u ovom radu, u MCAO modelu moždanog udara, bolusna aplikacija bradikininu dovodi do nakupljanja vode u ozlijeđenoj moždanoj hemisferi uz povećanje moždanog edema i veličine lezije, što potvrđuju dosadašnja istraživanja.

Za razliku od ostalih studija u ovom istraživanju je korišten natriuretski peptid, URO, u malim bolusnim dozama, koji kod ljudi i pri dugotrajnim intravenoznim infuzijama u dozama manjim od 15 ng/kg/min ne pokazuje značajne nuspojave (255). Svi natriuretski peptidi i njihovi receptori su pronađeni u mozgu (224), što je potvrđeno ovim istraživanjem i za izražaj mRNA GC-A receptora u mišjem mozgu. Utjecaj natriuretskih peptida u mozgu je proučavan ponajprije na utjecaju intercerebroventrikularne infuzije ANP-a te ANP-ovisnoj supresiji simpatičke aktivnosti (218, 225). Nedavno je pokazano i da se cGMP-ovisna PKG veže direktno na RGS-4 u fiziološkim uvjetima kod stimulacije ANP-om, pri čemu se RGS-4 fosforilira. Fosforilirani RGS-4 se zatim veže na  $G\alpha_q$  inhibirajući njegov hipertrofički učinak u srčanim miocitima (218). Također je pokazan utjecaj neadekvatne funkcije ANP-a koji uz neadekvatnu funkciju GC-A receptora zbog genskog polimorfizma dovodi do povećanog rizika od moždanog udara u ljudi (197, 198). Pokazano je i povišenje vrijednosti ANP-a u plazmi u osoba s moždanim udarom, koje ostaju više od normalnih i do 7 dana nakon oštećenja mozga (150). Ova istraživanja ukazuju na moguću ulogu natriuretskih peptida u ishemijskoj ozljedi mozga.

Urodilatin bubrežna izoforma atrijskog natriuretskog peptida, izabran je kao predstavnik natriuretskih peptida u ovom dijelu rada zbog specifične strukture koja mu daje veću otpornost na neutralne endopeptidaze. URO je u primijenjenim dozama u MCAO modelu moždanog udara pokazao protektivni učinak. U skupini životinja kojoj je primijenjen ovaj natriuretski peptid niti jedna nije pokazivala promjene u neurološkoj funkciji koje bi upućivale na simptome oštećenja koji nastaju kao posljedica moždanog udara. Također kod ove skupine životinja nije bilo vidljivih ishemijskih lezija u mozgovima oslikanim mikroCT-om, također niti na serijskim rezovima histološki bojenim po Nisslu. U odnosu na životinje kojima je primijenjen bradikinin, životinje tretirane ovim natriuretskim peptidom pokazale su signifikantno smanjenje moždanog edema u ozlijeđenoj moždanoj hemisferi, koje je neznatno veće od onog izmjenjenog u skupini lažno operiranih miševa. Protektivni učinak djelovanja natriuretskih peptida na nastanak moždanog edema još nije razjašnjen te je naša hipoteza da on nastaje inhibicijskim djelovanjem na  $B_2R$  signalni sustav bradikininu kao što smo prikazali na kulturi HEK-293 stanica.

Nadalje, u skupini životinja podvrgnutih MCAO zahvatu u kojima je primijenjen bolus mješavine URO-a i bradikinina pokazana je pojava neurološkog oštećenja u manjem broju nego u odnosu na životinje kojima je apliciran samo bradikinin. Životinje kojima su aplicirana oba hormona imale su znatno manje volumene lezija i znatno smanjeni moždani edem u odnosu na životinje kojima je primijenjen samo bradikinin, pri čemu rezultati ne proizlaze iz razlika u jačini okluzije u pojedinim ispitivanim skupinama. Na ovaj način pokazano je da URO kao predstavnik natriuretskih peptida, djeluje ne samo na endogeni već i na egzogeni bradikinin, kao posljedica djelovanja na postreceptorski signalni sustav bradikinina.

Iako dosadašnje spoznaje, uključujući i ovaj rad govore u prilog ulozi bradikininskog receptora B<sub>2</sub> u razvoju postishemijskog oštećenja mozga (145, 146, 251, 254) mehanizam koji bi podupirao tu činjenicu još je uvijek nepoznat. Do danas je mehanizam neuroprotekcije inhibicijom bradikininskog B<sub>2</sub> receptora objašnjavan redukcijom vaskularne permeabilnosti, što posljedično ima utjecaja u smanjenju nastanka moždanog edema nakon ishemijskog moždanog udara (37, 83, 256, 151, 141). Iako je predloženo još nekoliko modela od stvaranja upalnih čimbenika, neutrofilne adhezije, stvaranja slobodnih radikala, svi ti mehanizmi su većinom posljedica poremećaja krvno-moždane barijere i stvaranja moždanog edema te se neuroprotektivan učinak inhibicije bradikininskog receptora B<sub>2</sub> opet očituje u smanjenju edema. Uzevši u obzir sve rezultate dosadašnja istraživanja nepobitno govore o utjecaju bradikinina u stvaranju moždanog edema nakon ishemijske ozljede te o ulozi bradikininskog B<sub>2</sub> receptora kao glavnog medijatora oštećenja. Jednako tako pokazano je po prvi puta međudjelovanje i mehanizam međudjelovanja natriuretskih peptida i bradikinina na staničnom modelu. Osim toga prikazan je i utjecaj međudjelovanja natriuretskih peptida i bradikina u ishemijskoj ozljedi mišjeg mozga. Dosadašnja istraživanja govore u prilog protektivnoj ulozi natriuretskih peptida u mozgu idući u prilog pokazanom djelovanju urodilatina na bradikininski signalni put nakon ishemijske ozljede mišjeg mozga. Urodilatin kao prirodni antagonist bradikininskog signalnog sustava, pritom je nedvojbeno utjecao na kako endogeni tako i na egzogeno apliciran bradikinin, utječući na smanjenje moždanog edema, volumen lezije i poboljšanje ishoda neurološkog oštećenja nakon privremene okluzije srednje moždane arterije. Boljim razumijevanjem normalnih fizioloških uloga natriuretskih peptida i bradikinina u mozgu, mehanizama koji upravljaju transportom vode i iona u mozgu, zajedno s detaljnijim znanjem o staničnim te molekularnim procesima koji se događaju prilikom nastajanja edema kod ishemijskog oštećenja mozga, pridonijeti će pronalasku novih lijekova i strategija liječenja moždanog udara.

## **6. ZAKLJUČAK**



Istraživanjem mogućih mehanizama djelovanja natriuretskih peptida na signalni sustav bradikinina te učinka njihovog međudjelovanja na događaje koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga zaključeno je slijedeće:

1. Natriuretski peptidi ANP, BNP i URO imaju depolarizacijski učinak na HEK-293 stanice djelujući preko receptora GC-A. Svi navedeni peptidi dovode do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a. Korištenjem 8-Br-cGMP-a pokazan je depolarizacijski učinak podjednak učinku natriuretskih peptida na HEK-293 stanice, podupirući prethodna istraživanja djelovanja preko cGMP-a i PKG. Podjednaki depolarizacijski učinak na HEK-293 stanice pokazan je i za CNP, vjerojatno djelujući preko receptora natriuretskih peptida tipa Bi.

2. Vežući se za bradikininski receptor  $B_2$  u HEK-293 stanicama bradikinin dovodi do depolarizacije stanica što inducira aktivaciju fosfolipaze C i posljedično do porasta koncentracije unutarstaničnog  $Ca^{2+}$  te aktivacije  $Ca^{2+}$ -ovisnih  $Cl^-$ -kanala i posljedično depolarizacije HEK-293 stanica.

3. Učinak ANP, BNP i URO inhibira djelovanje regulatora signalnog puta G-proteina na G protein u kaskadi bradikininskog receptora  $B_2$ . CNP nije uključen u inhibiciju signalnog puta bradikinina, vjerojatno zbog njegovog djelovanja preko receptora NPR-Bi, pri čemu ne dolazi do stvaranja cGMP-a.

4. Prirodni antagonizam natriuretskih peptida na signalni put bradikininskog receptora  $B_2$  pokazan na staničnom modelu HEK-293 stanica primijenjen je na mišjem modelu ishemijske ozljede mozga. Uloga natriuretskih peptida u ishemijskoj ozljedi mozga, prikazana je primjenom urodilatina koji je u primijenjenim dozama u MCAO modelu moždanog udara pokazao protektivni učinak.

5. Važna uloga bradikininskog receptora  $B_2$  u ishemijskoj ozljedi mozga, poduprijeta je s nekoliko različitih istraživanja, uključujući i ovo istraživanje pokazanim povećanjem nakupljanja vode u ozlijeđenoj moždanoj hemisferi uz povećanje moždanog edema i volumena lezije kod aplikacije bradikinina u MCAO modelu moždanog udara.

6. Protektivni učinak djelovanja natriuretskih peptida pokazan je u skupini životinja kojoj je primijenjen urodilatin jer niti jedna nije pokazivala promjene u neurološkoj funkciji te također nije bilo vidljivih ishemijskih lezija kako u mozgovima oslikanim mikroCT-om, također niti na serijskim rezovima histološki bojenim po Nisslu.

7. Primjena urodilatina u mješavini s bradikininom utječe na ishod neurološkog oštećenja te na smanjenje moždanog edema i volumena lezije, upućujući na djelovanje urodilatina ne samo na endogeni već i na egzogeni bradikinin, kao posljedica djelovanja na postreceptorski signalni sustav bradikinina.

8. Korištenje nove metode oslikavanja *ex vivo* mišjih mozgova mikroCT-om omogućava kvantitativna mjerenja bez oštećivanja tkiva, brzu identifikaciju i kvantifikaciju ishemijske lezije i moždanog edema smanjujući vrijeme koje je inače potrebno za histološku pripremu tkiva.

## **7. SAŽETAK**

Začepljenje moždanih arterija dovodi do moždanog udara te posljedično do moždanog edema koji pridonosi povećanju ishemijske ozljede. Kako je bradikinin izravni uzročnik moždanog edema te natriuretski peptidi smanjuju moždani edem nakon moždanog udara još uvijek nepoznatim mehanizmom, cilj ovog istraživanja bio je razjasniti mogući mehanizam djelovanja natriuretskih peptida na signalni sustav bradikinina te učinak njihovog međudjelovanja na događaje koji slijede nakon ishemijske ozljede mozga. HEK-293 stanice su korištene kao stanični model jer smo pokazali, koristeći RT-PCR, postojanje bradikininskih receptora tipa 1 i 2, gvanilat ciklaze A i B te natriuretskog receptora tipa C. Mjerenjem membranskih potencijala i unutarstanične koncentracije kalcija HEK-293 stanica pokazali smo da natriuretski peptidi, agonisti gvanilat ciklaze-A (atrijski natriuretski peptid, moždani natriuretski peptid, urodilatin), ali ne i gvanilat ciklaze-B (C-tip natriuretski peptid) inhibiraju bradikininski signalni put nakon aktivacije njegovog receptora tipa 2. U *in vivo* pokusima na mišjem modelu moždanog udara pokazali smo da i.v. primjena urodilatina sprječava nastanak ishemijske lezije mozga te posljedičnog moždanog edema koje smo određivali mjerenjem stupnja neurološkog oštećenja, oslikavanjem mozgova mikrokompjuteriziranom tomografijom, serijskim rezovima mozgova histološki bojenim po Nisslu te određivanjem sadržaja vode u mozgu. Rezultati ovog istraživanja po prvi puta pokazuju postojanje prirodnog antagonista bradikininskog receptora tipa 2 te moguću primjenu natriuretskih peptida u liječenju moždanog udara.

## **8. SUMMARY**

Occlusion of the cerebral arteries leads to stroke and its consequence brain edema which further increases the brain damage. The aim of this research was clarifying the possible mechanisms of action of natriuretic peptides on bradykinin signaling, and their interactive effects after ischemic brain injury, since bradykinin is involved in the formation of cerebral edema and natriuretic peptides decrease brain edema via still unknown manner. HEK-293 cells were used as a model since using RT-PCR we proved the existence of bradykinin receptors type 1 and 2, guanylyl cyclase A and B, and natriuretic receptor type C. Measuring membrane potentials and intercellular calcium concentrations in HEK-293 cells we showed that natriuretic peptides, guanylyl cyclase A agonists (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, urodilatin), excluding the guanylyl cyclase B (C-type natriuretic peptide) inhibited the bradykinin signaling pathway after activation of bradykinin receptor type 2. The *in vivo* experiments on the animal model showed that urodilatin inhibited the formation of the ischemic lesion and brain edema which was measured by neurological scoring, visualization with microcomputerized tomography, serial Nissl stained sections and brain water content. The results of this research show for the first time the existence of a natural antagonist of the bradykinin type 2 receptor, and the possible use of natriuretic peptides in treatment of stroke.

**The effect of natriuretic peptides on the bradykinin signaling pathway after ischemic injury in the mouse brain**

Marina Dobrivojević, 2013.

## **9. LITERATURA**

1. Demarin V, Lovrenčić-Huzjan A, Šerić V i sur. Preporuke za zbrinjavanje bolesnika s moždanim udarom. Prvi dio: Organizacija skrbi za bolesnike s moždanim udarom, liječenje moždanog udara i neurorehabilitacija. *Liječ Vjesn* 2003;125:200-12.
2. Sobey C-G. Bradykinin B2 receptor antagonism: a new direction for acute stroke therapy? *Br J Pharmacol* 2003;139:1369-71.
3. Rosamond W, Flegal K, Friday G i sur. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics-2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007;115:69-171.
4. Bonita R. Epidemiology of stroke. *Lancet* 1992;339:342-4.
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.
6. Jovičević M, Divjak I, Slankamenac P, Jovanović A, Ruzicka S, Dickov A. Non-atherosclerotic arteriopathy as the cause of ischemic stroke among young adults. *Med Pregl* 2010;63:324-32.
7. Dabus G, Linfante I. The Natural History of Acute Ischemic Stroke Due to Intracranial Large-Vessel Occlusion: What Do We Know? *Tech Vasc Interv Radiol* 2012; 15:2-4.
8. Dudley TM, Elliott CG. Pulmonary embolism from amniotic fluid, fat and air. *Prog Cardiovasc Dis* 1994;36:447-74.
9. Estrera AS, Pass LJ, Platt MR. Systemic arterial air embolism in penetrating lung injury. *Ann Thorac Surg* 1990;50:257-61.
10. James PM, Myers RT. Central venous pressure monitoring: misinterpretation, abuses, indications and a new technic. *Ann Surg* 1972;175:693-701.
11. Demaerschalk BM, Hwang HM, Leung G. US cost burden of ischemic stroke: a systematic literature review. *Am J Manage Care* 2010;16:525-33.
12. Elkind MS. Inflammatory mechanisms of stroke. *Stroke* 2010;41:3-8.
13. Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation* 1990;82:47-59.
14. Glaglov S, Zarins CB. What are the determinants of plaque instability and its consequences? *J Vasc Surg* 1989;9:389-90.
15. Pullicino PM. Pathogenesis of lacunar infarcts and small deep infarcts. *Adv Neurol* 1993;62:125-40.



16. You R, McNeil JJ, O'Malley HM, Davis SM, Donnan GA. Risk factors for lacunar infarction syndromes. *Neurology* 1995;45:1483-7.
17. Doyle 2008 Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008;55:310-8.
18. Mattson MP, Duan W, Pedersen WA, Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases. *Apoptosis* 2001;6:69-81.
19. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 1994;36:553-4.
20. Hakim AM. Ischemic penumbra, the therapeutic window. *Neurology* 1998;51:44-6.
21. González RG. Imaging-guided acute ischemic stroke therapy: From "time is brain" to "physiology is brain". *Am J Neuroradiol* 2006;27:728-35.
22. Dereski MO, Chopp M, Knight RA, Rodolosi LC, Garcia JH. The heterogeneous temporal evolution of focal ischemic neuronal damage in the rat. *Acta Neuropathol* 1993;85:327-33.
23. Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J. Effect of the NMDA antagonist MK-801 on local cerebral blood flow in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:617-22.
24. Zhao Q, Pahlmark K, Smith ML, Siesjö BK. Delayed treatment with the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron (PBN) reduces infarct size following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Acta Physiol Scand* 1994;152:349-50.
25. Weisbrot-Lefkowitz M, Reuhl K, Perry B, Chan PH, Inouye M, Mirochnitchenko O. Overexpression of human glutathione peroxidase protects transgenic mice against focal cerebral ischemia/reperfusion damage. *Brain Res Mol Brain Res* 1998;53:333-8.
26. Yang G, Chan PH, Chen J i sur. Human copper-zinc superoxide dismutase transgenic mice are highly resistant to reperfusion injury after focal cerebral ischemia. *Stroke* 1994;25:165-70.
27. Kondo T, Reaume AG, Huang TT i sur.. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 1997;17:4180-9.
28. Murakami K, Kondo T, Kawase M, Li Y, Sato S, Chen SF, Chan PH. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci* 1998;18:205-13.

29. Iadecola, C. Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 1997;20:132-9.
30. Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Chen S, Lian J. Brain microvessels: factors altering their patency after the occlusion of a middle cerebral artery (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994;145:728-40.
31. Rosenblum WI. Hydroxyl radical mediates the endothelium-dependent relaxation produced by bradykinin in mouse cerebral arterioles. *Circ Res* 1987;61:601-3.
32. Su J, Cui M, Tang Y, Zhou H, Liu L, Dong Q. Blockade of bradykinin B2 receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B1 receptor inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;388:205-11.
33. Tang C, Hongli X, Changlin B, Rong F, Anhua W. The effects of Tanshinone IIA on blood-brain barrier and brain edema after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Phytomedicine* 2010;17:1145-9.
34. Iwasa K, Tasaki I, Gibbons RC. Swelling of nerve fibers associated with action potentials. *Science* 1980;210:338-9.
35. Dietzel I, Heinemann U, Lux HD. Relations between slow extracellular potential changes, glial potassium buffering, and electrolyte and cellular volume changes during neuronal hyperactivity in cat brain. *Glia* 1989;2:25-44.
36. Hossmann KA, Schuier FJ. Experimental brain infarcts in cats. I. Pathophysiological observations. *Stroke* 1980;11:583-92.
37. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 2004;129:1021-9.
38. Ito J, Marmarou A, Barzó P, Fatouros P, Corwin F. Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* 1996;84:97-103.
39. Klatzo I. Blood-brain barrier and ischaemic brain oedema. *Z Kardiol* 1987;76:67-69.
40. Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 1995;83:1051-9.
41. Go KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg* 1997;23:47-142
42. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 2007;6:258-68.

43. Sweeney MI, Yager JY, Walz W, Juurlink BH. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Can J Physiol Pharmacol* 1995;73:1525-35.
44. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 2000;179:1-33.
45. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:367-78.
46. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. The molecular basis of water transport in the brain. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:991-1001.
47. Beck J, Lenart B, Kintner DB, Sun D. Na-K-Cl cotransporter contributes to glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neurosci* 2003;23:5061-8.
48. Chen M, Simard JM. Cell swelling and a nonselective cation channel regulated by internal  $Ca^{2+}$  and ATP in native reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci* 2001;21:6512-21.
49. Barros LF, Hermosilla T, Castro J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2001;130:401-09.
50. Barros LF, Castro J, Bittner CX. Ion movements in cell death: from protection to execution. *Biol Res* 2002;35:209-14.
51. Strange K. Regulation of solute and water balance and cell volume in the central nervous system. *J Am Soc Nephrol* 1992;3:12-27.
52. Amara SG, Fontana AC. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 2002;41:313-8.
53. Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS, Sun D: Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 2009;24:257-65.
54. Katzman R, Pappius HM: *Brain Electrolytes and Fluid Metabolism*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1973;114.
55. Stiefel MF, Marmarou A. Cation dysfunction associated with cerebral ischemia followed by reperfusion: a comparison of microdialysis and ion-selective electrode methods. *J Neurosurg* 2002;97:97-103.
56. Mori K, Miyazaki M, Iwase H, Maeda M. Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion ( $Na^{+}$ ,  $K^{+}$ ) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J Neurotrauma* 2002;19:1261-70.

57. Young W, Constantini S. Ionic and water shifts in injured central nervous tissues. In: Salzman SK, Faden AI, editors. *The Neurobiology of Central Nervous System Trauma*. Oxford University Press, New York 1994;123-30.
58. Betz AL, Iannotti F, Hoff JT. Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1989;1:133-54.
59. Betz AL. Alterations in cerebral endothelial cell function in ischemia. *Adv Neurol* 1996;71:301-11.
60. Gotoh O, Asano T, Koide T, Takakura K. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat. I: The time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. *Stroke* 1985;16:101-9.
61. Young W, Rappaport ZH, Chalif DJ, Flamm ES. Regional brain sodium, potassium, and water changes in the rat middle cerebral artery occlusion model of ischemia. *Stroke* 1987;18:751-59.
62. Betz AL, Ennis SR, Schielke GP, Hoff JT. Blood-to-brain sodium transport in ischemic brain edema. *Adv Neurol* 1990;52:73-80.
63. Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 2000;80:211-76.
64. O'Donnell ME, Tran L, Lam TI, Liu XB, Anderson SE. Bumetanide inhibition of the blood-brain barrier Na-K-Cl cotransporter reduces edema formation in the rat middle cerebral artery occlusion model of stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:1046-56.
65. Schuier FJ, Hossmann KA. Experimental brain infarcts in cats II: ischemic brain edema. *Stroke* 1980;11:593-601.
66. Todd NV, Picozzi P, Crockard A, Russell RW. Duration of ischemia influences the development and resolution of ischemic brain edema. *Stroke* 1986;17:466-71.
67. Gotoh O, Asano T, Koide T, Takakura K. Ischemic brain edema following occlusion of the middle cerebral artery in the rat I: the time courses of the brain water, sodium and potassium contents and blood-brain barrier permeability to 125I-albumin. *Stroke* 1985;16:101-9.
68. Todd NV, Picozzi P, Crockard HA, Russell RR. Reperfusion after cerebral ischemia: influence of duration of ischemia. *Stroke* 1986;17:460-6.
69. Starling EH. On the absorption of fluids from connective tissue spaces. *J Physiol* 1896;19:312-26.

70. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005;57:173-85.
71. Kogure K, Busto R, Scheinberg P. The role of hydrostatic pressure in ischemic brain edema. *Ann Neurol* 1981;9:273-82.
72. Vorbrodt AW, Lossinsky AS, Wisniewski HM, Suzuki R, Yamaguchi T, Masaoka H, Klatzo I. Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol* 1985;66:265-73.
73. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987;72:236-39.
74. Castejon OJ. Formation of transendothelial channels in traumatic human brain edema. *Pathol Res Pract* 1984;179:7-12.
75. Brown RC, Davis TP. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke* 2002;33:1706-11.
76. Weis SM, Cheresch DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature* 2005;437:497-504.
77. van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *J Clin Invest* 1999;104:1613-20.
78. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1163-72.
79. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004;35:998-1004.
80. Ahmmed GU, Malik AB. Functional role of TRPC channels in the regulation of endothelial permeability. *Pflugers Arch* 2005;451:131-42.
81. Kilincer C, Asil T, Utku U, et al. Factors affecting the outcome of decompressive craniectomy for large hemispheric infarctions: a prospective cohort study. *Acta Neurochir (Wien)* 2005;147:587-94.
82. Cooper PR, Hagler H, Clark WK, Barnett P. Enhancement of experimental cerebral edema after decompressive craniectomy: implications for the management of severe head injuries. *Neurosurgery* 1979;4:296-300.

83. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, Schilling L, Parsons AA, Baethmann A, Young, AR. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology* 1996;33:257-263.
84. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Effects of LF 16-0687 MS, a bradykinin B2 receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain res* 2002;950:268-278.
85. Bhoola KD, Figuerola CD, Wothy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 1992;44:1-80.
86. Sainz IM, Pixley RA, Colman RW. Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost* 2007;98:77-83.
87. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 2001;429:161-76.
88. Renne T, Pozgajova M, Gruner S i sur. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005;280:28572-80.
89. Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F i sur. Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6388-93.
90. Smith SA, Mutch NJ, Baskar D, Rohloff P, Docampo R, Morrissey JH. Polyphosphate modulates blood coagulation and fibrinolysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:903-8.
91. Kaplan AP, Ghebrehiwet B. The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement. *Mol Immunol* 2010;47:2161-9.
92. Brash JL, Scott CF ten Hove P i sur. Mechanism of transient adsorption of fibrinogen from plasma to solid surfaces: role of the contact and fibrinolytic systems. *Blood* 1988;71:932-9.
93. Lindon JN, McManama G, Kushner L, Merrill EW, Salzman EW. Does the conformation of adsorbed fibrinogen dictate platelet interactions with artificial surfaces? *Blood* 198;68:355-62.
94. Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE III. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest* 2002;109:1057-63.

95. Gustafson EG, Schutsky D, Knight L, Schmaier AH. High molecular weight kininogen binds to unstimulated platelets. *J Clin Invest* 1986;78:310-8.
96. Gustafson EJ, Schmaier AH, Wachtfogel YT, Kaufman N, Kucich U, Colman RW. Human neutrophils contain and bind high molecular weight kininogen. *J Clin Invest* 1989;84:28-35.
97. Schmaier AH, Kuo A, Lundberg D, Murray SC, Cines DB. Expression of high molecular weight kininogen on human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* 1988;263:16327-33.
98. Motta G, Rojkaer R, Hasan AAK, Cines DB, Schmaier AH. High molecular weight kininogen regulates prekallikrein assembly and activation on endothelial cells: a novel mechanism for contact activation. *Blood* 1998;91:516-28.
99. Mahdi F, Shariat-Madar Z, Schmaier AH. The relative priority of prekallikrein and factors XI/XIa assembly on cultured endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:43983-90.
100. Herwald H, Dedio J, Kellner R, Loos M, Muller-Esterl W. Isolation and characterization of the kininogen binding protein p33 from endothelial cells. *J Biol Chem* 1996;271:13040-7.
101. Joseph K, Ghebrehiwet B, Peerschke EIB, Reid KBM, Kaplan AP. Identification of the zinc-dependent endothelial cell binding protein for high molecular weight kininogen and factor XII: identity with the receptor that binds to the globular heads of C1q (qC1qR). *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:8552-7.
102. Colman RW, Pixley RA, Najamunnisa S, Yan W, Wang J, Mazar A, McCrae KR. Binding of high molecular weight kininogen to human endothelial cells is mediated via a site within domains 2 and 3 of the urokinase receptor. *J Clin Invest* 1997;100:1481-7.
103. Hasan AAK, Zisman T, Schmaier AH. Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3615-20.
104. Motta G, Shariat-Madar Z, Mahdi F, Sampaio CAM, Schmaier AH. Assembly and activation of high molecular weight kininogen and prekallikrein on cell matrix. *Thromb Haemost* 2001;86:840-7.
105. Joseph K, Tholanikunnel BG, Kaplan AP. Heat shock protein 90 catalyzes activation of the Prekallikrein–Kininogen Complex in the absence of factor XII. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:896-900.

106. Silverberg M, Dunn JT, Garen L, Kaplan AP. Autoactivation of human Hageman factor: demonstration utilising a synthetic substrate. *J Biol Chem* 1980;255:7281-6.
107. Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, Kokkonen JO. Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;278:1069-74.
108. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 2010;44:145-54.
109. Leeb-Lundberg LM. Bradykinin specificity and signaling at GPR100 and B2 kinin receptors. *Br J Pharmacol* 2004;143:931-2.
110. Zubakova R, Gille A, Faussner A, Hilgenfeldt U. Ca<sup>2+</sup> signalling of kinins in cells expressing rat, mouse and human B1/B2-receptor. *Int Immunopharmacol* 2008;8:276-81.
111. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International Union of Pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005;57:27-77.
112. Hecker M, Dambacher T, Busse R. Role of endothelium-derived bradykinin in the control of vascular tone. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992;20:55-61.
113. Barki-Harrington L, Daaka Y. Bradykinin induced mitogenesis of androgen independent prostate cancer cells. *J Urology* 2001;165:2121-5.
114. Bas M, Adams V, Suvorava T, Niehues T, Hoffmann TK, Kojda G. Nonallergic angioedema: role of bradykinin. *Allergy* 2007;62:842-56.
115. Kaplan AP, Greaves MW. Angioedema. *J Am Acad Dermatol* 2005;53: 373-88.
116. Fredriksson C, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups and fingerprints. *Mol Pharmacol* 2003;63:1256-72.
117. Luttrell LM, Lefkowitz RJ. The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J. Cell Sci* 2002;115:455-65.
118. Powell SJ, Slynn G, Thomas C, Hopkins B, Briggs I, Graham A. Human bradykinin B2 receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomic* 1993;15:435-8.



119. Bachvarov D, Hess JF, Menke JG, Larriveé J-F, Marceau F. Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics* 1996;33:374-81.
120. Cayla C, Merino VF, Cabrini DA, Silva JA Jr, Pesquero JB, Bader M. Structure of the mammalian kinin receptor gene locus. *Int Immunopharmacol* 2002;2:1721-7.
121. Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, Trumbauer M, Chen H, Hill RG, Strader CD, Hess JF. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J Biol Chem* 1995;270:13706-10.
122. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:8140-5.
123. [http://en.wikipedia.org/wiki/G\\_protein-coupled\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/G_protein-coupled_receptor)
124. Wilk-Blaszczak MA, Gutowski S, Sternweis PC, Belardetti F. Bradykinin modulates potassium and calcium currents in neuroblastoma hybrid cells via different pertussis toxin-insensitive pathways. *Neuron* 1994;12:109-16.
125. Jones S, Brown DA, Milligan G, Willer E, Buckley NJ, Caulfield MP. Bradykinin excites rat sympathetic neurons by inhibition of M current through a mechanism involving B2 receptors and G alpha q/11. *Neuron* 1995;14:399-405.
126. Linder ME, Ewald DA, Miller RJ, Gilman AG. Purification and characterization of Go alpha and three types of Gi alpha after expression in Escherichia coli. *J Biol Chem* 1990;265:8243-51.
127. Liebmann C, Graness A, Ludwig B i sur. Dual bradykinin B2 receptor signalling in A431 human epidermoid carcinoma cells: activation of protein kinase C is counteracted by a GS-mediated stimulation of the cyclic AMP pathway. *Biochem J* 1996;313:109-118.
128. Gohla AS, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G. Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 1999;274:17901-7.
129. Derian CK, Moskowitz MA. Polyphosphoinositide hydrolysis in endothelial cells and carotid artery segments. Bradykinin-2 receptor stimulation is calciumindependent. *J Biol Chem* 1986;261:3831-7.

130. Lal MA, Proulx PR, Hebert RL. A role for PKC epsilon and MAP kinase in bradykinin-induced arachidonic acid release in rabbit CCD cells. *Am J Physiol* 1998;274:728-35.
131. Han JM, Kim JH, Lee BD i sur. Phosphorylation-dependent regulation of phospholipase D2 by protein kinase C delta in rat Pheochromocytoma PC12 cells. *J Biol Chem* 2002;277:8290-7.
132. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 1995;27:331-40.
133. Ju H, Venema VJ, Liang H, Harris MB, Zou R, Venema RC. Bradykinin activates the Janus-activated kinase/signal transducers and activators of transcription (JAK/STAT) pathway in vascular endothelial cells: localization of JAK/ STAT signalling proteins in plasmalemmal caveolae. *Biochem J* 2000;351:257-64.
134. Blaukat A, Barac A, Cross MJ, Offermanns S, Dikic I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of G<sub>q</sub> and G<sub>i</sub> signals. *Mol Cell Biol* 2000;20:6837-48.
135. Velarde V, Ullian ME, Morinelli TA, Mayfield RK, Jaffa AA. Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999;277:253-61.
136. Leeb-Lundberg LM, Song XH, Mathis SA. Focal adhesion-associated proteins p125FAK and paxillin are substrates for bradykinin-stimulated tyrosine phosphorylation in Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem* 1994;269:24328-34.
137. Bascands JL, Pecher C, Rouaud S i sur. Evidence for existence of two distinct bradykinin receptors on rat mesangial cells. *Am J Physiol* 1993;264:548-56.
138. Yang XP, Liu YH, Scicli GM, Webb CR, Carretero OA. Role of kinins in the cardioprotective effect of preconditioning: study of myocardial ischemia/ reperfusion injury in B2 kinin receptor knockout mice and kininogen-deficient rats. *Hypertension* 1997;30:735-40.
139. Silvestre JS, Bergaya S, Tamarat R, Duriez M, Boulanger C, Levy BI. Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B2 receptor pathway. *Circ Res* 2001;89:678-83.
140. Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol* 2002;39:187-99.

141. Kaplanski J, Pruneau D, Asa I i sur. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J Neurotrauma* 2002;19:953-64.
142. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD. Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology* 1996;32:39-47.
143. Wagner S, Kalb P, Lukosava M, Hilgenfeldt U, Schwaninger M. Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke. *Neurol Sci* 2002;202:75-6.
144. Zausinger S. Bradykinin receptor antagonists in cerebral ischemia and trauma. *IDrugs* 2003;6:970-5.
145. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1997;28:1430-6.
146. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, Schmid-Elsaesser R, Plesnila N, Baethmann A. Therapeutic efficacy of a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist on brain edema formation and ischemic tissue damage in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir* 2003;86:205-7.
147. Marmarou A, Nichols J, Burgess J, Newell D, Troha J, Burnham D, Pitts L. Effects of the bradykinin antagonist Bradycor (deltibant, CP-1027) in severe traumatic brain injury: results of a multi-center, randomized, placebocontrolled trial. American Brain Injury Consortium Study Group. *J Neurotrauma* 1999;16:431-44.
148. Kobayashi N, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW. Oxidative stress promotes endothelial cell apoptosis and loss of microvessels in the spontaneously hypertensive rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2114-21.
149. Bovenzi V, Savard M, Morin J, Cuerrier CM, Grandbois M, Gobeil F Jr. Bradykinin protects against brain microvascular endothelial cell death induced by pathophysiological stimuli. *J Cell Physiol* 2010;222:168-76.
150. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egidio J, Fernández Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. *Am J Hypertens* 1994;7:1085-9.
151. Henry JP, Gauer OH, Reeves JL. Evidence of the atrial location of receptors influencing urine flow. *Circ Res* 1956;4:85-90.
152. Kisch B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. Guinea pig. *Exp Med Surg* 1956;14:99-112.

153. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 1981;28:89-94.
154. Thibault G, Garcia R, Seidah NG, Lazure C, Cantin M, Chrétien M, Genest J. Purification of three atrial natriuretic factors and their amino acid composition. *FEBS Lett* 1983;164:286-90.
155. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of alpha-human atrial natriuretic polypeptide (alpha-hANP). *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:131-9.
156. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K i sur. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest* 1991;87:1402-12.
157. Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H i sur. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an 'emergency' cardiac hormone against ventricular overload. *J Clin Invest* 1995;96:1280-7.
158. Mukoyama M, Nakao K, Saito Y i sur. Increased human brain natriuretic peptide in congestive heart failure. *N Engl J Med* 1990;323:757-8.
159. Schulz-Knappe P, Forssmann K, Herbst F, Hock D, Pipkorn R, Forssmann WG. Isolation and structural analysis of "urodilatin", a new peptide of the cardiodilatin-(ANP)-family, extracted from human urine. *Klin Wochenschr* 1988;66:752-9.
160. Forssmann WG, Richter R, Meyer M. The endocrine heart and natriuretic peptides: histochemistry, cell biology, and functional aspects of the renal urodilatin system. *Histochem Cell Biol* 1998;110:335-57.
161. Sudoh T, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:863-87.
162. Suga S, Itoh H, Komatsu Y i sur. Regulation of endothelial production of C-type natriuretic peptide by interaction between endothelial cells and macrophages. *Endocrinology* 1998;139:1920-6.
163. Naruko T, Ueda M, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh H, Nakao K, Becker AE. C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions. *Circulation* 1996;94:3103-8.

164. Oikawa S, Imai M, Ueno A i sur. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. *Nature* 1984;309:724-6.
165. Forssmann WG. Cardiac hormones. I. Review on the morphology, biochemistry and molecular biology of the endocrine heart. *Eur J Clin Invest* 1986;16:439-51.
166. Seilhamer JJ, Arfsten A, Miller JA, Lundquist P, Scarborough RM, Lewicki JA, Poter JG. Human and canine gene hologs of porcine brain natriuretic peptide. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:650-8.
167. Ruskoaho H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol Rev* 1992;44:481-602.
168. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, Giordano AT, McCormick MT, Rodriguez-Paz G, Schocken DD. Negative feedback of atrial natriuretic peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:1128-34.
169. Chen HH, Burnett Jr JC. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:22-8.
170. Furuya M, Yoshida M, Hayashi Y, Ohnuma N, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. C-type natriuretic peptide is a growth inhibitor of rat vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;177:927-31.
171. Walther T, Stepan H. C-type natriuretic peptide in reproduction, pregnancy and fetal development. *J Endocrinol* 2004;180:17-22.
172. Schirger JA, Grantham JA, Kullo IJ i sur. Vascular actions of brain natriuretic peptide: modulation by arteriosclerosis and neutral endopeptidase inhibition. *J Am Coll Cardiol* 2000;35:796-801.
173. Gee N, Bowes M, Buck P, Kenny AJ. An immunoradiometric assay for endopeptidase-24.11 shows it to be a widely distributed enzyme in pig tissues. *Biochem J* 1985;228:119-26.
174. Cavero P, Margulies KB, Winaver J, Seymour AA, Delaney NG, Burnett JC Jr. Cardiorenal actions of neutral endopeptidase inhibition in experimental congestive heart failure. *Circulation* 1990;82:196-201
175. Achilihu G, Frishman WH, Landau A. Neutral endopeptidase inhibitors and atrial natriuretic peptide. *J Clin Pharmacol* 1991;31:758-62.
176. Anand-Srivastava MB, Sehl PD, Lowe DG. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. Involvement of a pertussis toxin-sensitive G protein. *J Biol Chem* 1996;271:19324-9.

177. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, Schulz S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989;338:78-83.
178. Chang MS, Lowe DG, Lewis M, Hellmiss R, Chen E, Goeddel DV. Differential activation by atrial and brain natriuretic peptides of two different receptor guanylate cyclases. *Nature* 1989;341:68-72.
179. Hirsch JR, Skutta N, Schlatter E. Signaling and distribution of NPR-Bi, the human splice form of the natriuretic peptide receptor type B. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285:370-4.
180. Seebacher T, Beitz E, Kumagami H, Wild K, Ruppertsberg JP, Schultz JE. Expression of membrane-bound and cytosolic guanylyl cyclase in the rat inner ear. *Hearing Res* 1999;127:95-102.
181. Lowe DG, Dizhoor AM, Liu K i sur. Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), Ret-GC-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:5535-39.
182. Juilfs DM, Fülle HJ, Zhao AZ, Houslay MD, Garbers DL, Beavo JA. The subset of olfactory neurons that selectively express cGMP-stimulated phosphodiesterase (PDE2) and guanylyl cyclase D define a unique olfactory signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3388-95.
183. Fülle HJ, Vassar R, Foster DC, Yang RB, Axel R, Garbers DL. A receptor guanylyl cyclase expressed specifically in olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3571-5.
184. Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle H-J. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:602-6.
185. Hirsch JR, Kruhøffer M, Herter P i sur. Cellular localization, membrane distribution and possible function of guanylyl cyclase A and 1 in collecting duct of rat. *Cardiovasc Res* 2001;51:553-61.
186. Hirsch JR, Meyer M, Mägert H-J i sur. cGMP-dependent and independent inhibition of a  $K^+$  conductance by natriuretic peptides. Molecular and functional studies in human proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:472-80.
187. Suga S, Nakao K, Hosoda K i sur. Receptor selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. *Endocrinology* 1992;130:229-39.

188. Wilcox JN, Augustine A, Goeddel DV, Lowe DG. Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. *Mol Cell Biol* 1991;11:3454-62.
189. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub Jr MC. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996;369:165-87.
190. Potter LR, Hunter T. Phosphorylation of the kinase homology domain is essential for activation of the A-type natriuretic peptide receptor. *Mol Cell Biol* 1998;18:2164-72.
191. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. *Front Biosci* 2005;10:1205-20.
192. Kumar R, Grammatikakis N, Chinkers M. Regulation of the atrial natriuretic peptide receptor by heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 2001;276:11371-5.
193. Airhart N, Yang YF, Roberts Jr CT, Silberbach M. ANP induces natriuretic peptide receptor-PKG interaction. *J Biol Chem* 2003;278:38693-8.
194. Takahashi Y, Nakayama T, Soma M, Izumi Y, Kanmatsuse K. Organization of the human natriuretic peptide receptor A gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:736-9.
195. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, Pandey KN, Milgram SL, Smithies O, Maeda N. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14730-5.
196. Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Rehemudula D, Kanmatsuse K, Furuya K. Functional deletion mutation of the 5'-flanking region of type A human natriuretic peptide receptor gene and its association with essential hypertension and left ventricular hypertrophy in the Japanese. *Circ Res* 2000;86:841-5.
197. Rubattu S, Ridker PM, Stampfer M, Hennekens CH, Volpe M, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. *Circulation* 1999;100:1722-6.
198. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E *et al*. Atrial Natriuretic Peptide Gene Polymorphisms and Risk of Ischemic Stroke in Humans. *Stroke* 2004;35:814-8.
199. Schulz S, Singh S, Bellet RA, Singh G, Tubb DJ, Chin H, Garbers DL. The primary structure of a plasma membrane guanylate cyclase demonstrates diversity within this new receptor family. *Cell* 1989;58:1155-62.

200. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in strokeprone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1997;15:1235-43.
201. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub Jr MC. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996;369:165-87.
202. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub Jr MC. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. *J Comp Neurol* 1996;369:165-87.
203. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M i sur. Structure of the type B human natriuretic peptide receptor gene and association of a novel microsatellite polymorphism with essential hypertension. *Circ Res* 1999;84:605-10.
204. Bartels CF, Bukulmez H, Padayatti P i sur. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet* 2004;75:27-34.
205. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S i sur. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J* 1998;17:3045-51.
206. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N i sur. Molecular cloning of the complementary DNA and gene that encode mouse brain natriuretic peptide and generation of transgenic mice that overexpress the brain natriuretic peptide gene. *J Clin Invest* 1994;93:1911-21.
207. Huxley VH, Tucker VL, Verburg KM, FreemanRH. Increased capillary hydraulic conductivity induced by atrial natriuretic peptide. *Circ Res* 1987;60:304-7.
208. McKay MK, Huxley VH. ANP increases capillary permeability to protein independent of perfusate protein composition. *Am J Physiol* 1995;268:1139-48.
209. He P, Zeng M, Curry FE. cGMP modulates basal and activated microvessel permeability independently of  $[Ca^{2+}]_i$ . *Am J Physiol* 1998;274:1865-74.
210. Swayze RD, Braun AP. A catalytically inactive mutant of type I cGMP-dependent protein kinase prevents enhancement of large conductance, calcium-sensitive  $K^+$  channels by sodium nitroprusside and cGMP. *J Biol Chem* 2001;276:19729-37.
211. Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMPdependent protein kinase II. *Science* 1996;274:2082-6.
212. Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, Rockman HA, Maeda N. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J Clin Invest* 2001;107:975-84.



213. Kishimoto I, Rossi K, Garbers DL. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:2703-6.
214. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H i sur. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:4239-44.
215. Wang D, Oparil S, Feng JA i sur. Effects of pressure overload on extracellular matrix expression in the heart of the atrial natriuretic peptide-null mouse. *Hypertension* 2003;42:88-95.
216. Tsuruda T, Boerrigter G, Huntley BK i sur. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ Res* 2002;91:1127-34.
217. Klaiber M, Kruse M, Völker K i sur. Novel insights into the mechanisms mediating the local antihypertrophic effects of cardiac atrial natriuretic peptide: role of cGMP-dependent protein kinase and RGS2. *Basic Res Cardiol* 2010;105:583-95.
218. Tokudome T, Kishimoto I, Horio T i sur. Regulator of G-protein signaling subtype mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation* 2008;117:2329-39.
219. Makikallio AM, Makikallio TH, Korpelainen JT i sur. Natriuretic peptides and mortality after stroke. *Stroke* 2005;6:1016-20.
220. Kishimoto I, Dubois SK, Garbers DL. The heart communicates with the kidney exclusively through the guanylyl cyclase-A receptor: acute handling of sodium and water in response to volume expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6215-9.
221. Kierner AK, Hartung T, Vollmar AM. cGMP-mediated inhibition of TNF- $\alpha$  production by the atrial natriuretic peptide in murine macrophages. *J Immunol* 2000;165:175-81.
222. Lüss H, Mitrovic V, Seferovic PM i sur. Renal effects of ularitide in patients with decompensated heart failure. *Am Heart J* 2008;155:1012-8.
223. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate-Dependent Signaling Functions. *Endocrine Reviews* 2006;27:47-72.
224. Itoh H, Nakao K, Katsuura G i sur. Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res* 1986;59:342-7.

225. Steele MK, Gardner DG, Xie PL, Schultz HD. Interactions between ANP and ANG II in regulating blood pressure and sympathetic outflow. *Am J Physiol* 1991;260:1145-51.
226. Longa, EZ, Weinstein PR, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 1989;20:84-91.
227. Shah ZA, Namiranian K, Klaus J, Kibler K, Doré S. Use of an optimized transient occlusion of the middle cerebral artery protocol for the mouse stroke model. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2006;15:133-8.
228. Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995;26:627-34.
229. Rosenberg GA, Estrada EY. Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats. *Stroke* 1995;26:874-7.
230. Hirsch JR, Schlatter E. Genistein potentiates the ANP effect on a K<sup>+</sup>-conductance in HEK-293 cells. *Cell Physiol Biochem* 2003;13:223-8.
231. Kramarenko II, Bunni MA, Morinelli TA, Raymond JR, Garnovskaya MN. Identification of functional bradykinin B2 receptors endogenously expressed in HEK293 cells. *Biochem Pharmacol* 2009;77:269-76.
232. England S, Hebllich F, James IF, Robbins J, Docherty RJ. Bradykinin evokes a Ca<sup>2+</sup>-activated chloride current in non-neuronal cells isolated from neonatal rat dorsal root ganglia. *J Physiol* 2001;530:395-403.
233. Simmons NL. Acetylcholine and kinin augmentation of Cl<sup>-</sup> secretion stimulated by prostaglandin in a canine renal epithelial cell line. *J Physiol* 1992;447:1-15.
234. Xia C, Bao Z, Yue C, Sanborn BM, Liu M. Phosphorylation and regulation of G-protein-activated phospholipase C-β3 by cGMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2001;276:19770-7.
235. Soulsby MD, Alzayady K, Xu Q, Wojcikiewicz RJH. The contribution of serine residues 1588 and 1755 to phosphorylation of the type I inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by PKA and PKG. *FEBS Lett* 2004;557:181-4.
236. Huang C, Hepler JR, Gilamn AG, Mumby SM. Attenuation of Gi- and Gq mediated signaling by expression of RGS4 and GAIP in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:6159-63.

237. Huang J, Zhou H, Mahavadi S, Sriwai W, Murthy KS. Inhibition of Gαq-dependent PLC-β1 activity by PKG and PKA is mediated by phosphorylation of RGS4 and GRK2. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;292:200-8.
238. Blazer LL, Roman DL, Chung A, Larsen MJ, Greedy BM, Husbands SM, Neubig RR. Reversible, allosteric small-molecule inhibitors of regulator of G protein signaling proteins. *Mol Pharmacol* 2010;78:524-33.
239. Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 2009;58:19-29.
240. Langheinrich AC, Yeniguen M, Ostendorf A, Marhoffer S, Kampschulte M, Bachmann G, Stolz E, Gerriets T. Evaluation of the middle cerebral artery occlusion techniques in the rat by in-vitro 3-dimensional micro- and nano computed tomography. *BMC Neurol* 2010;28:10-36.
241. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E i sur. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;78:131-7.
242. Metscher BD. MicroCT for comparative morphology: simple staining methods allow high-contrast 3D imaging of diverse non-mineralized animal tissues. *BMC Physiol* 2009;22:9-11.
243. de Crespigny A, Bou-Reslan H, Nishimura MC, Phillips H, Carano RA, D'Arceuil HE. 3D micro-CT imaging of the postmortem brain. *J Neurosci Methods* 2008;171:207-13.
244. Prajapati SI, Kilcoyne A, Samano AK i sur. MicroCT-based virtual histology evaluation of preclinical medulloblastoma. *Mol Imaging Biol* 2011;13:493-9.
245. Heo JH, Han SW, Lee SK. Free radicals as triggers of brain edema formation after stroke. *Free Radic Biol Med* 2005;39:51-70.
246. Osborne KA, Shigeno T, Balarsky AM. Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal ischemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1987;50:402-10.
247. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007;87:179-97.
248. Firlik AD, Yonas H, Kaufmann AM, Wechsler LR, Jungreis CA, Fukui MB, Williams RL. Relationship between cerebral blood flow and the development of swelling and life-threatening herniation in acute ischemic stroke. *J Neurosurg* 1998;89:243-9.
249. Barone FC and Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:819-34.

250. Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J Neurochem* 1985;44:1892-7.
251. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, Relton J, Kim SW, Nussberger J, Plesnila N. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005;25:978-89.
252. Schwaninger M, Sallmann S, Petersen N, Schneider A, Prinz S, Libermann TA, Spranger M. Bradykinin induces interleukin-6 expression in astrocytes through activation of nuclear factor-kappaB. *J Neurochem* 1999;73:1461-6.
253. Noda M, Kariura Y, Amano T, Manago Y, Nishikawa K, Aoki S, Wada K. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci* 2003;72:1573-81.
254. Ding-Zhou L, Margaille I, Palmier B, Pruneau D, Plotkine M, Marchand-Verrecchia C: LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 2003;139:1539-47.
255. Dorner GT, Selenko N, Kral T, Schmetterer L, Eichler HG, Wolzt M. Hemodynamic effects of continuous urodilatin infusion: a dose-finding study. *Clin Pharmacol Ther* 1998;64:322-30.
256. Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, Eriskat J, Pruneau D, Baethmann A. Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J Neurotrauma* 2001;18:1049-58.



Marina Dobrivojević rođena je 06. lipnja 1983. godine u Kopru. Osnovnu školu završila je u Novigradu, a opću gimnaziju u Puli. 2001. godine upisala je studij biologije, smjer biologija i kemija na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Diplomirala je 2008. godine diplomskim radom pod naslovom: "Molekularna sistematika dinaridskih zvončica (*Campanula L.*)". 2009. godine zaposlena je kao stručni suradnik na projektu pod nazivom: "Regeneracija i plastičnost nakon ishemijskog oštećenja mozga proučavane na inovativnim transgeničnim mišjim modelima", financiranog iz fonda Jedinstvo uz pomoć znanja (engl. *Unity Through Knowledge Fund* - UKF) pod vodstvom Prof. dr. sc. Srećka Gajovića. Iste godine u studenome upisala je poslijediplomski studij Neuroznanost na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Od 2010. godine zaposlena je kao asistent na Zavodu za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Autorica je 2 znanstvena rada indeksirana u CC bazi, koautorica u radu indeksiranome u SCI bazi te 10 sažetaka na međunarodnim kongresima. Marina Dobrivojević sudjelovala je u nastavi iz predmeta „Biologija stanice“ i „Histologija i embriologija“ na dodiplomskom studiju medicine Medicinskog fakulteta u Zagrebu te u nastavi istog predmeta na engleskome jeziku. Članica je Hrvatskog fiziološkog društva, Hrvatskog društva za neuroznanost, Hrvatskog mikroskopijskog društva mikroskopiju i IBRO Alumni.