Uloga urogvanilina u razvoju ishemijskog moždanog udara

Ratko, Martina

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:597290

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-19**



Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository





SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Martina Ratko

Uloga urogvanilina u razvoju ishemijskog moždanog udara

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Martina Ratko

Uloga urogvanilina u razvoju ishemijskog moždanog udara

DISERTACIJA

Zagreb, 2022.

Disertacija je izrađena na Hrvatskom Institutu za istraživanje mozga, Zavodu za fiziologiju i imunologiju i Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, uz podršku projekata Hrvatske zaklade za znanost „Plana razvoja karijere doktoranda“ (DOK-01-2018) financiranom od strane Operativnog programa „Učinkoviti ljudski potencijali“ 2014-2020 te projekta „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi“ (KK.01.1.1.01.0007).

Voditelj rada: prof. dr. sc. Aleksandra Dugandžić, dr. med.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Aleksandri Dugandžić, na neizmjernom strpljenju, pomoći i vodstvu u izradi ove doktorske disertacije. Iskustvo i znanje koje sam dobila u radu s njom biti će mi od neizmjerne koristi u nastavku moje karijere. Njen doprinos ovoj disertaciji i mojem razvoju kao mlade znanstvenice od neprocjenjive je važnosti. Sandra, hvala ti!

Srdačno se zahvaljujem svojim kolegama dr. sc. Nikoli Habeku, izv. prof. dr. sc. Marini Radmilović, Siniši Škokiću, Heleni Justić, Anji Barić te laborantici ing. med. lab. dg. Sandri Grgić na suradnji, savjetima i pomoći u eksperimentalnom dijelu ovog rada.

I na kraju najtoplije zahvaljujem svojim roditeljima, sestri i prijateljima na ljubavi, podršci i strpljenju koje su mi pokazivali svaki dan. Bez njihove vjere u mene i moj uspjeh izrada ove disertacije ne bi bila moguća.

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA 1

1.1. Moždani udar 1

1.1.1. Vrste moždanog udara 1

1.1.1.1. Ishemijski moždani udar 1

1.1.1.2. Hemoragijski moždani udar 2

1.1.2. Simptomi moždanog udara 2

1.1.3. Dijagnoza moždanog udara 2

1.1.4. Liječenje moždanog udara 3

1.1.5. Ishemijsko oštećenje i razvoj edema mozga 3

1.1.5.1. Citotoksični edem 4

1.1.5.2. Ionski edem 5

1.1.5.3. Vazogeni edem 7

1.2. Natriuretski peptidi 7

1.2.1. Atrijski natriuretski peptid (ANP) 8

1.2.2. Urodilatin (URO) 10

1.2.3. Moždani natriuretski peptid (BNP) 10

1.2.4. Natriuretski peptid tip C (CNP) 11

1.3. Gvanilinski peptidi 12

1.3.1. Gvanilin (GN) 12

1.3.2. Urogvanilin (UGN) 14

1.3.3. Limfogvanilin 15

1.3.4. Renogvanilin 16

1.4. Signalni putevi natriuretskih peptida 16

1.4.1. Gvanilat ciklaza A (GC-A) 17

1.4.2. Gvanilat ciklaza B (GC-B) 18

1.4.3. Gvanilat ciklaza C (GC-C) 18

1.4.4. Stanični signalni mehanizmi cGMP-a 19

1.4.4.1. Protein kinaze G (PKG) 19

1.4.4.2. Fosfodiesteraze (PDE) 20

1.4.4.3. Ionski kanali ovisni o cikličkim nukleotidima 21

1.4.5. Receptor natriuretskih peptida C (NPR-C) 21

1.4.6. Signalni put gvanilinskih peptida neovisan o gvanilat ciklazi C 22

1.5. Učinci natriuretskih peptida 24
1.5.1. Fiziološka uloga 24
1.5.1.1. Natriuretski peptidi 24
1.5.1.2. Gvanilinski peptidi 25
1.5.1.2.1. Probavni sustav 25
1.5.1.2.2. Mokraćni sustav 27
1.5.1.2.3. Hipotalamus 28
1.5.2. Uloga u patofiziologiji 30
1.5.2.1. Kardiovaskularni sustav 30
1.5.2.2. Urogenitalni sustav 31
1.5.2.3. Koštani sustav 32
1.5.2.4. Respiracijski sustav 32
1.5.2.5. Probavni sustav 33
1.5.2.6. Središnji živčani sustav 34
1.5.2.6.1. Poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću (ADHD) 34
1.5.2.6.2. Anksiozni poremećaji 35
1.5.2.6.3. Migrena 35
1.5.2.6.4. Ishemijski moždani udar 36

2. HIPOTEZA 38

3. CILJEVI RADA 39

4. MATERIJALI I METODE 40

4.1. Modeli korišteni u pokusima 40

4.1.1. Životinje 40
4.1.1.1. Izolacija DNA 41
4.1.1.2. Lančana reakcija polimerazom 42
4.1.1.3. Elektroforeza na agaroznom gelu 42
4.1.2. Primarna stanična kultura kortikalnih stanica mozga 44

4.2. Ishemijsko oštećenje mozga 46

4.3. Snimanje magnetnom rezonancom (MR) 49

4.4. Mjerenje krvnog tlaka 51

4.5. Procjena težine razvijenih simptoma nakon ishemijskog moždanog udara 52

4.6. Mjerenje unutarstanične koncentracije Ca^{2+} 53

4.7. Imunohistokemijska analiza i *in situ* hibridizacija 55

4.7.1. Izražaj GC-C-a na proteinskoj razini 56

4.7.2. Određivanje lokalizacije mRNA specifične za GC-C 57

4.7.3. Određivanje izražaja GC-C-a u staničnoj kulturi nakon hipoksije 60

4.8. Statistička obrada rezultata 61

5. REZULTATI 62

5.1. Učinci urogvanilina i njegovih signalnih puteva na veličinu moždane lezije 62

5.1.1. Urogvanilin ili GC-C ne utječu na veličinu moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara 62

5.1.2. Životinje kojima nedostaje GC-C imaju manju ishemijsku leziju u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla 65

5.1.3. Manji moždani udar u životinja kojima nedostaje GC-C nije rezultat ostatnog protoka tijekom začepljenja srednje moždane arterije 66

5.1.4. Manja lezija u životinja kojima nedostaje GC-C ne razvija i manje simptoma 67

5.2. Učinci urogvanilina i njegovih signalnih puteva na arterijski tlak 69

5.2.1. Arterijski tlak u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN - čiste linije 69

5.2.2. Vrijednosti arterijskog tlaka u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na vrijednosti izmjerene u životinja divljeg tipa iz istog legla 71

5.3. Učinci urogvanilina na unutarstaničnu koncentraciju kalcija u astrocitima peri-ishemijske kortikalne regije moždanog udara 71

5.3.1. Veći porast koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijske kortikalne regije moždanog udara 71

5.3.2. Životinje kojima nedostaje GC-C nemaju veći porast koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijskog kortikalnog područja moždanog udara 73

5.4. Izražaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijskog područja moždanog udara 75

5.4.1. Promjena izražaja GC-C-a u peri-ishemijskom području moždanog udara u korteksu velikog mozga 75

5.4.2. Izražaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijskog područja kore velikog mozga zahvaćenog moždanim udarom 79

5.5. Izražaj GC-C-a u primarnoj kulturi moždanih stanica u uvjetima primjerene oksigenacije i hipoksijskim uvjetima 79

6. RASPRAVA 82

6.1. Smanjena veličina moždane lezije ishemijskog moždanog udara kod životinja kojima nedostaje GC-C 84

6.2. Povišen arterijski tlak kod životinja kojima nedostaje GC-C 85

6.3. Smanjeni učinci urogvanilina na kalcijski odgovor astrocita u kortikalnoj peri-ishemijskoj regiji moždanog udara kod životinja kojima nedostaje GC-C 86

6.4. Izražaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijskog područja moždanog udara 88

6.5. Izražaj GC-C-a i u astrocitima i u neuronima primarne kulture moždanih stanica u uvjetima primjerene oksigenacije i hipoksijskim uvjetima 89

7. ZAKLJUČAK 90

8. SAŽETAK 92

9. SUMMARY 93

10. POPIS LITERATURE 94

11. ŽIVOTOPIS 122

POPIS OZNAKA I KRATICA:

ADH	Antidiuretski hormon
ADHD	Poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću (eng., Attention deficit hyperactivity disorder)
ANP	Atrijski natriuretski peptid
ATP	Adenozin trifosfat
BAT	Smeđe masno tkivo (eng., Brown adipose tissue)
BNP	Moždani natriuretski peptid (eng., Brain natriuretic peptide)
cAMP	Ciklički adenozin monofosfat
CFTR	Transmembranski regulator provodljivosti za cističnu fibrozu (eng., Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
cGMP	3',5'-ciklički gvanozin monofosfat
CNG	Ionski kanali ovisni o cikličkim nukleotidima (eng., Cyclic nucleotide-gated ion channels)
CNP	Natriuretski peptid tip C (eng., C-type natriuretic peptide)
CST	Cerebrospinalna tekućina
CT	Kompjuterizirana tomografija (eng., Computed tomography)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	Etilendiamintetraoctena kiselina
FBS	Serum goveđeg fetusa (eng., Fetal bovine serum)
GC-A	Gvanilat ciklaza A
GC-B	Gvanilat ciklaza B
GC-C	Gvanilat ciklaza C
GC-C KO	Životinje kojima nedostaje GC-C (eng., GC-C knock out animals)
GC-D	Gvanilat ciklaza D
GC-E	Gvanilat ciklaza E
GC-F	Gvanilat ciklaza F
GC-G	Gvanilat ciklaza G
gDNA	Genomska DNA
GFAP	Glijalni fibrilarni kiseli protein (eng., Glial fibrillary acidic protein), biljeg astrocita
GN	Gvanilin
GP	Gvanilinski peptidi
GTP	Gvanozin trifosfat
HBSS	Hankova otopina soli (eng., Hank's Balanced Salt Solution)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonska kiselina (eng., 4-(2-hydroxyethyl)-1--piperazineethanesulfonic acid)
HRP	Peroksidaza hrena (eng., Horseradish peroxidase)
LDFU	Jedinica fluksa laserskog dopplera (eng., Laser doppler flux units)
MCAO	Metoda začepljenja srednje moždane arterije (eng., Middle cerebral artery occlusion)
MR	Magnetna rezonanca
NEP	Neutralna endopeptidaza
NeuN	Antigen koji se nalazi u jezgri neurona, biljeg neurona
NHE	Natrij-proton izmjenjivač (eng., Sodium proton exchanger)

NMDG	N-metil-D-glukamin
NPR	Receptor natriuretskih peptida (eng., Natriuretic peptide receptor)
NPR-A	Receptor natriuretskih peptida A (eng., Natriuretic peptide receptor A)
NPR-B	Receptor natriuretskih peptida B (eng., Natriuretic peptide receptor B)
NPR-C	Receptor natriuretskih peptida C (Receptor čistač) (eng., Natriuretic peptide receptor C)
pb	Par baza
PBS	Fiziološka otopina puferirana fosfatima (eng., Phosphate-buffered saline)
PCR	Lančana reakcija polimerazom (eng., Polymerase chain reaction)
PDE	Fosfodiesteraza
PDL	poli-D-lizin
PKA	Protein kinaza A
PKC	Protein kinaza C
PKG	Protein kinaza G
PLC	Fosfolipaza C (eng., Phospholipase C)
POMC	Pro-opimelanokortin (eng., Pro-opiomelanocortin)
PS	Početno stanje
rtPA	Rekombinirani tkivni aktivator plazminogena (eng., Recombinant tissue plasminogen activator)
vsGC	Citoplazmatska gvanilat ciklaza (eng., Soluble guanylate cyclase)
SR101	Sulforodamin 101
STa	Termo-stabilni enterotoksin Escherischia coli (eng., Heat stable Escherichia coli enterotoxin)
SŽS	Središnji živčani sustav
TIA	Prolazni ishemijski napad (eng., Transient ischemic attack)
UGN	Urogvanilin
UGN KO	Životinje kojima nedostaje gen za UGN (eng., UGN knock out animals)
URO	Urodilatin

POPIS SLIKA I TABLICA

POPIS SLIKA:

Slika 1. Razvoj edema nakon ishemijske ozljede mozga..... 6

Slika 2. Atrijski natriuretski peptid (ANP)..... 9

Slika 3. Sinteza i razgradnja natriuretskih peptida..... 9

Slika 4. Urodilatin (URO)..... 10

Slika 5. Moždani natriuretski peptid (BNP)..... 11

Slika 6. Natriuretski peptid tip C (CNP)..... 11

Slika 7. Sinteza gvanilina i urogvanilina..... 12

Slika 8. Gvanilin i termo-stabilni enterotoksin *Escherischia coli*..... 13

Slika 9. Urogvanilin (UGN)..... 14

Slika 10. Tri najvažnije skupine bjelančevina koje aktivira cGMP..... 20

Slika 11. Djelovanje natriuretskog receptora C (NPR-C)..... 22

Slika 12. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja GC-C neovisnog signalnog puta u astrocitima..... 23

Slika 13: Gvanilinski peptidi u crijevima..... 26

Slika 14: Centralni učinci urogvanilina..... 29

Slika 15. Karakterizacija genotipova..... 43

Slika 16. Izolacija mozga novookoćenog miša..... 45

Slika 17. Primarna kultura stanica korteksa velikog mozga..... 46

Slika 18. Sustav za anesteziju i stol za izvođenje operacije začepljenja srednje moždane arterije..... 47

Slika 19. Začepljenje srednje moždane arterije..... 48

Slika 20. Uređaj za snimanje magnetnom rezonancom..... 49

Slika 21. Snimke magnetne rezonance (MR) mišjeg mozga snimljene prije i nakon izazivanja moždanog udara..... 50

Slika 22. Sustav za neinvazivno mjerenje krvnog tlaka..... 51

Slika 23. Analiza mjerenja unutarstaničnog Ca^{2+} na moždanim rezovima u MATLAB programu..... 54

Slika 24. Odabir astrocita među stanicama koje su ispunjene bojom osjetljivom na Ca^{2+}..... 55

Slika 25. Izrada moždanih rezova za određivanje smještaja mRNA specifične za GC-C..... 57

Slika 26. Hipoksijska komora..... 60

Slika 27. Nedostatak GC-C-a nije doveo do razlika u veličini moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara između GC-C WT i GC-C KO..... 63

Slika 28. Nedostatak UGN-a nije doveo do razlika u veličini moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara između UGN WT i UGN KO..... 64

Slika 29: Veličina moždanog udara u životinja kojima nedostaje GC-C je manja u odnosu na divlji tip životinja..... 65

Slika 30. Ne postoji korelacija između ostatnog protoka za vrijeme začepljenja srednje moždane arterije i veličine moždanog udara te razvoja moždanog edema..... 66

Slika 31. Ne postoji razlika u izraženim simptomima moždanog udara nakon 24 i 48 sati..... 67

Slika 32. Veličina lezije je u pozitivnoj korelaciji s razvijenim simptomima 24 i 48 sati nakon nastanka moždanog udara..... 68

Slika 33. Nema razlike u arterijskim tlakovima i frekvenciji srca između divljih tipova životinja te čistih linija miševa kojima nedostaje GC-C ili UGN..... 69

Slika 34. Životinje kojima nedostaje GC-C imaju viši arterijski tlak od divljeg tipa životinja iz istog legla..... 70

Slika 35. Urogvanilin dovodi do većeg Ca^{2+} odgovora u peri-ishemijskoj regiji moždanog udara u divljeg tipa životinja te životinja kojima nedostaje UGN, ali ne i u životinja kojima nedostaje GC-C..... 72

Slika 36. Smanjen Ca^{2+} odgovor astrocita peri-ishemijskog područja moždanog udara u korteksu velikog mozga na podražaj UGN-om u životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na divlje tipove životinja iz istog legla..... 74

Slika 37. GC-C je izražen u neuronima kore velikog mozga kontralateralne hemisfere (hemisfera bez moždanog udara)..... 76

Slika 38. GC-C nije izražen u neuronima peri-ishemijske regije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom..... 77

Slika 39. mRNA za GC-C ko-lokalizira s biljegom astrocita u peri-ishemijskoj regiji kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom, ali ne i u odgovarajućem kortikalnom području nezahvaćene kontralateralne moždane hemisfere divljeg tipa životinja 48 sati nakon izazivanja moždanog udara..... 78

Slika 40. U primarnoj kulturi moždanih stanica u uvjetima primjerene oksigenacije GC-C je izražen i u astrocitima i u morfološki dobro diferenciranim neuronima..... 80

Slika 41. U primarnoj kulturi moždanih stanica u hipoksijskim uvjetima u trajanju od 4 i 24 sata GC-C izražaj u astrocitima ne prati i izražaj GFAP-a..... 81

POPIS TABLICA:

Tablica 1. Razlika u građi urogvanilina kod pojedinih životinjskih vrsta..... 15
Tablica 2. Membranske gvanilat ciklaze i njihovi ligandi..... 16
Tablica 3. Sekvence početnica za genotipizaciju životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN..... 41
Tablica 4. Protokol lančane reakcije polimerazom..... 42
Tablica 5. Popis korištenih protutijela za imunohistokemijsku analizu..... 59
Tablica 6. Izražaj natriuretskih peptida i njihovih receptora u mozgu..... 82

1. UVOD I SVRHA RADA

1.1. MOŽDANI UDAR

Moždani udar je, nakon srčanog udara, drugi uzročnik smrtnosti u Republici Hrvatskoj, Europskoj uniji i u svijetu. Procjenjuje se kako će svaka šesta osoba doživjeti moždani udar, a 10% oboljelih će umrijeti od posljedica moždanog udara (1). Učestalost razvoja prvog moždanog udara povećala se od 1990. do 2010. za 68%, što bi moglo biti posljedica rasta svjetske populacije i produženog životnog vijeka (2). U istom vremenskom razdoblju, preživljavanje nakon moždanog udara povećalo se za 84% što je povezano s povećanjem radne nesposobnosti i invalidnosti osoba koje su pretrpjele moždani udar te ta bolest stoga predstavlja značajni socioekonomski i financijski teret državama i pojedincima zbog čega je od velike važnosti razjasniti patofiziološke mehanizme ove bolesti sa svrhom razvoja ne samo boljih metoda liječenja već i metoda sprečavanja nastanka moždanog udara (3).

1.1.1. Vrste moždanog udara

Moždani udar je definiran kao akutna pojava žarišne disfunkcije u mozgu koja traje dulje od 60 min, ili koja je potvrđena dijagnostičkim metodama ili tijekom obdukcije (4). Moždane udare dijelimo u dvije velike skupine, a to su ishemijski i hemoragijski moždani udar. Trajanje žarišne disfunkcije kraće od sat vremena bez dijagnostičke potvrde ishemijskog infarkta ili krvarenja smatra se prolaznim ishemijskim napadom (engl. *Transient ischemic attack*; TIA) (4).

1.1.1.1. Ishemijski moždani udar

Najčešći oblik moždanog udara je ishemijski moždani udar koji se javlja kod 87% pacijenata (5, 6). Nastaje prekidom protoka krvi u mozak što dovodi do smrti ili dugotrajnog invaliditeta kod oboljelih osoba i često zahtijeva trajnu medicinsku njegu (1).

Uzroci nastanka ishemijskog moždanog udara mogu biti: začepljenje moždanih arterija embolusom ili trombom, sistemna hipoperfuzija tkiva ili venska tromboza (7). U zahvaćenom dijelu mozga razlikujemo 2 regije – ishemijsku jezgru i peri-ishemijsko područje odnosno penumbru. U ishemijskoj jezgri dolazi do odumiranja moždanih stanica (neurona i glije) uslijed nedostatka kisika i glukoze zbog prekida cirkulacije. U

peri-ishemijskom području još uvijek postoji opskrba nutrijentima iako u nedovoljnim količinama potrebnim za preživljavanje stanica, stoga je ta regija u opasnosti od daljnjeg oštećenja i nekroze koji se mogu spriječiti pravovremenim liječenjem (8,9).

1.1.1.2. Hemoragijski moždani udar

Rjeđi oblik moždanog udara je hemoragijske prirode koji nastaje kao posljedica oštećenja arterije. Najčešće se razvija u supratentorijalnoj regiji i stopa smrtnosti iznosi 40% (10). Hemoragijski moždani udar može biti posljedica traume. Ovaj oblik moždanog udara se češće pojavljuje kod pacijenata koji pate od hipertenzije ili amiloidne angiopatije te pacijenata koji primaju terapiju protiv zgrušavanja. Incidencija hemoragijskog moždanog udara veća je kod osoba koje uzimaju kokain i amfetamine (11).

1.1.2. Simptomi moždanog udara

Tipični simptomi moždanog udara su nagla pojava jednostrane slabosti, obamrlosti ili gubitka vida, pojava dvoslika (diplopije), poremećaja u govoru, ataksije (gubitak koordinacije mišićnih pokreta) i nepoložajne vrtoglavice (12). Pacijenti također mogu imati i obostrani gubitak vida, gubitak pamćenja, anosognoziju (bolesnik nije u stanju shvatiti da je bolestan), dizartriju (motorički govorni poremećaj koji otežava izgovor), otežano gutanje, stridor (grub, visokotonski zvuk čujan pri disanju), glavobolju, hemibalizam (iznenadan, munjevit i snažan pokret cijeloga uda na strani suprotnoj od oštećenja mozga), zbunjenost ili poremećaj svijesti (12).

1.1.3. Dijagnoza moždanog udara

Rano prepoznavanje simptoma moždanog udara od neizmjerne je važnosti (uspješnost terapije unutar 3 sata od prve pojave simptoma) kako bi pacijent što prije mogao primiti potrebnu terapiju. Prvi korak u dijagnozi moždanog udara je primjena FAST smjernica (engl. *Face, Arm and Speech Test*), gdje se prati pojava nagle pareze lica, slabost u rukama i otežani govor pacijenta. Jednako učinkovite su i ROSIER smjernice (engl. *Recognition of Stroke in the Emergency Room*), koje dodatno prate poremećaje u vidnom polju, slabost u nogama i gubitak svijesti (12).

Dijagnoza moždanog udara se potvrđuje snimanjem mozga kompjuteriziranom tomografijom (engl. *Computed tomography*; CT) ili magnetnom rezonancom (MR). CT bez kontrasta pokazuje visoku točnost pri dijagnostici akutnog intrakranijalnog krvarenja, međutim nije pogodan za dijagnozu većine ishemijskih moždanih udara (2). MR-om se mogu dijagnosticirati ishemijski moždani udar u 90% slučajeva i TIA-e kod trećine pacijenata (13).

1.1.4. Liječenje moždanog udara

Jedini način liječenja ishemijskog moždanog udara je pravovremena ponovna uspostava protoka krvi u zahvaćenom tkivu. Ona se postiže trombolizom (otapanjem ugruška) rekombiniranim tkivnim aktivatorom plazminogena (engl. *Recombinant tissue plasminogen activator*; rtPA) ili uklanjanjem ugruška trombektomijom (14-16).

rtPA terapija primjenjuje se unutar 4 do 5 sati nakon pojave ishemijskog udara i pokazano je da smanjuje nastanak invaliditeta kod trećine pacijenata te smanjuje pojavu smrtnih ishoda (17). Jedna od nuspojava ove terapije je povećana sklonost krvarenju koja se može spriječiti primjenom niže doze rtPA-e kod visokorizičnih pacijenata (18).

Trombektomija može se primijeniti u kombinaciji s rtPA terapijom ili zasebno te dovodi do poboljšane revaskularizacije unutar prvih 24 sata, ne dovodi do nastanka krvarenja i rezultira povećanom pokretljivosti i neovisnosti pacijenata u prva 3 mjeseca nakon moždanog udara (19).

Glavni nedostatak navedenih terapija je što se moraju primijeniti u vrlo kratkom vremenskom razdoblju nakon nastupa udara. Kako bi to bilo moguće, pacijenti moraju biti u blizini medicinske ustanove koja posjeduje dijagnostičke alate za točnu procjenu vrste moždanog udara te prihvatljivosti primjena tih terapija u pojedinih pacijenata s obzirom na komorbiditete i kontraindikacije te medicinske djelatnike osposobljene za provedbu navedenih terapija (20).

1.1.5. Ishemijsko oštećenje i razvoj edema mozga

Kratko nakon prekida opskrbe mozga krvlju dolazi do nastanka ishemijskog oštećenja mozga zbog smanjene opskrbe tkiva kisikom i nutrijentima (poglavito

glukozom) što kao posljedicu ima djelomičan ili potpuni prestanak sinteze adenozin trifosfata (ATP). Neuroni su pogotovo osjetljivi na hipoksiju jer nedostatak ATP-a dovodi do smanjenja ionskih gradijenata na staničnoj membrani koji su neophodni za prijenos živčanih signala. Stoga je razumljivo da hipoksija u vrlo kratkom roku (5 – 10 minuta) može dovesti do nepovratnih oštećenja mozga (21). U ishemijskoj jezgri krvni protok se smanjuje na manje od 10–12 mL/100 g/min, dok u peri-ishemijskom području protok iznosi oko 60 mL/100 g/min te se u tom području stanice ipak mogu oporaviti (22). Ubrzo nakon prekida dotoka nutrijenata dolazi do nekroze stanica u području ishemijske jezgre (posebice neurona), dok smrt neurona (nekrozom ili apoptozom) u peri-ishemijskom području može nastati i do 10 dana nakon ishemije (23). Ishemijsku ozljedu mozga prati razvoj citotoksičnog edema u neuronima i gliji te razvoj ionskog i vazogenog edema do kojeg dolazi nakon ponovne uspostave protoka krvi (Slika 1.). Razvoj opsežnog moždanog edema nakon udara može povećati smrtnost kod pacijenata do 80% (24) te je u 8,5 – 30,0% slučajeva popraćen krvarenjem u mozgu (25).

1.1.5.1. Citotoksični edem

Nedostatak glukoze i kisika brzo dovodi do prestanka sinteze ATP-a oksidativnom fosforilacijom u mitohondrijima te opskrbe stanice energijom (23). Nedostatak staničnog ATP-a dovodi do inhibicije ionskih crpki ovisnih o ATP-u, poput Na^+/K^+-ATP-aze i Ca^{2+}-ATP-aze koje više nisu u mogućnosti obavljati svoju funkciju. Time se gubi elektrokemijski gradijent iona na staničnoj membrani zbog čega dolazi do manjka K^+ te viška Na^+ i Ca^{2+} unutar stanice.

Poremećaju u gradijentu iona doprinosi i nekontrolirano otpuštanje ekscitatornog neuroprijenosnika glutamata. U fiziološkim uvjetima koncentracija glutamata u sinaptičkoj pukotini je niska zahvaljujući djelovanju astrocita koji ga uklanjaju iz sinapse, dok u ishemijskim uvjetima koncentracija glutamata može porasti i do 150 puta (26). Glutamat aktivira N-metil-D-aspartatne (NMDA), α-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske (engl. *α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid;* AMPA) i kainatne receptore što uzrokuje ulazak Na^+ i Ca^{2+} u stanice (23). Normalno u fiziološkim uvjetima, stanična koncentracija Ca^{2+} u neuronima održava se niskom. Porast koncentracije Ca^{2+} nakon ishemijske ozljede ima za posljedicu dodatno trošenje ATP-a, aktivaciju hidrolitičkih enzima ovisnih o

Ca^{2+} koji dodatno oštećuju stanicu, izmijenjen izražaj staničnih bjelančevina te proizvodnju reaktivnih radikala kisika (23). Tijekom ishemije, osim gašenja ionskih crpki i glutamatne ekscitotoksičnosti, pojačava se i izražaj neselektivnih kationskih kanala poput $NC_{Ca\text{-}ATP}$ (engl. *Ca^{2+}-activated, ATP-sensitive nonselective cation channel*), na neuronima i astrocitima što dovodi do još većeg ulaska Na^+ u stanicu (Slika 1.) (27).

Povećana unutarstanična koncentracija Na^+ utječe na osmotsku ravnotežu i ima za posljedicu ulaženje Cl^- u stanicu kroz kloridne kanale te posljedično vode kroz akvaporine (28). Ovim ulaskom vode u stanicu zbog osmotskog gradijenta dolazi do bubrenja neurona i glije (poglavito astrocita, koji brojnošću i veličinom nadmašuju neurone) te pojave citotoksičnog edema, pucanja stanične membrane i smrti stanica (Slika 1.) (29-31).

Osim nekroze stanica, tijekom ishemije aktivira se i niz apoptotičnih čimbenika koji dovode do umiranja neurona i glije u peri-ishemijskom području. Iz mitohondrija se oslobađaju citokrom C i čimbenik indukcije apoptoze koji preko aktivacije kaspaza dovode do programirane smrti stanice (32).

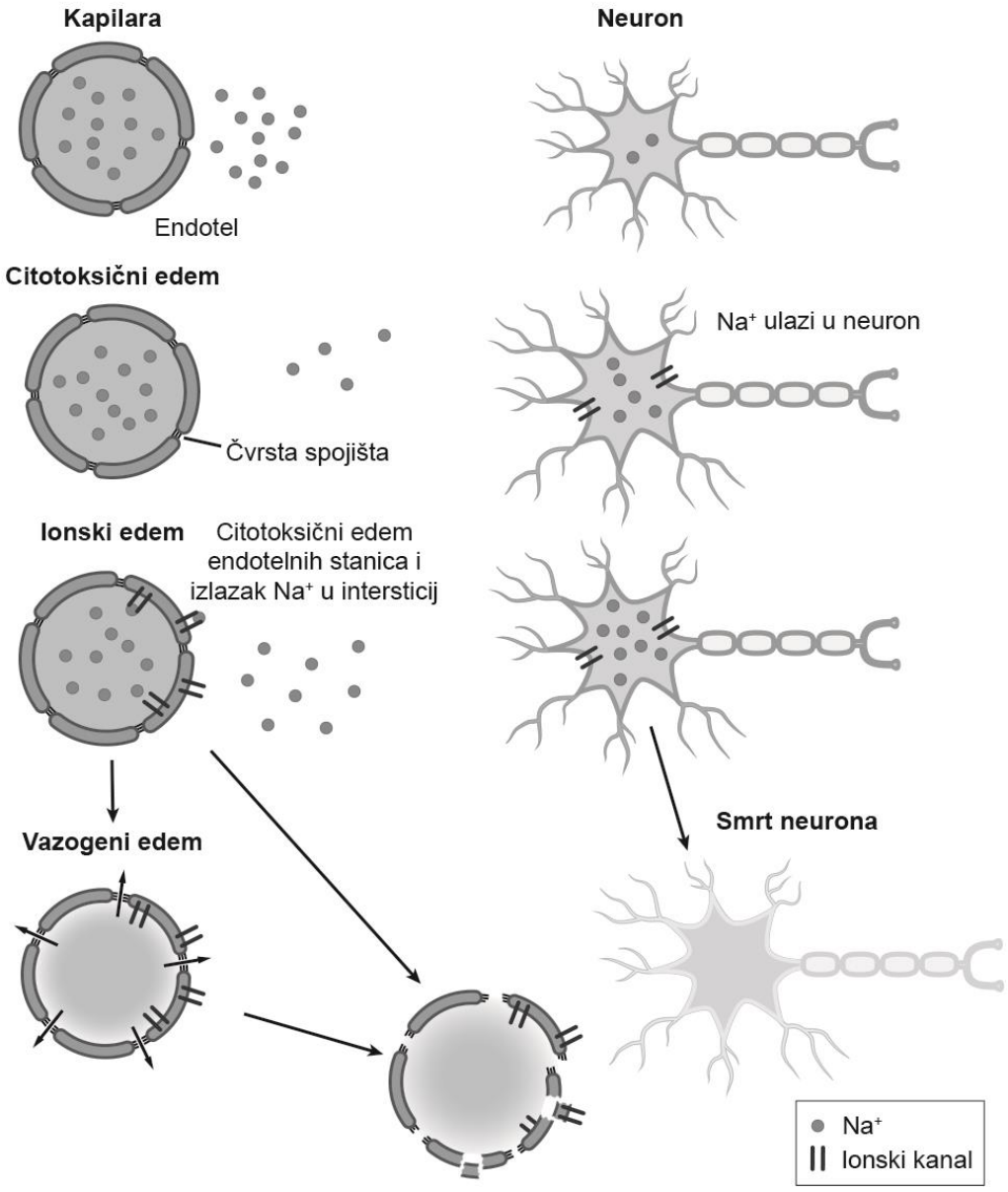
1.1.5.2. Ionski edem

Prijenos elektrolita i vode u stanice tijekom razvoja citotoksičnog edema drastično smanjuje njihovu koncentraciju u međustaničnoj tekućini. Time se stvara gradijent za Na^+ na krvno-moždanoj barijeri koji potiče izlazak Na^+, Cl^- i tekućine iz plazme u međustanični prostor te nastanak ionskog edema (33, 34). Integritet krvno-moždane barijere je održan u ovoj fazi razvoja ishemijskog moždanog udara, a na razvoj ionskog edema utječu isključivo ionski kanali i izmjenjivači na luminalnoj i bazolateralnoj membrani endotelnih stanica (Slika 1.).

$Na^+/K^+/2Cl^-$ kotransporter izražen je na luminalnoj membrani endotelnih stanica kapilara te mu se izražaj povećava u hipoksiji (36). Ovaj transporter prenosi Na^+ iz krvi u endotelnu stanicu te doprinosi nastanku osmotskog gradijenta koji potiče osmozu vode (37, 38).

Za prijenos Na^+ preko bazolateralne membrane u pravilu je odgovorna Na^+-K^+-ATPaza. Međutim, vjerojatnije je da se transport Na^+ odvija putem Na^+/Ca^{2+} izmjenjivača (39). Natrijsko-protonski izmjenjivači, (engl. *Na^+/H^+ exchanger*; NHE1 i 2)

izraženi na luminalnoj i bazolateralnoj membrani endotelnih stanica kapilara, povećavaju svoju aktivnost u hipoksijskim i hipoglikemičkim uvjetima (40, 41). U prijenosu Na^+ kroz kapilarnu membranu sudjeluje i Sur1-Trpm4 (engl. *Sulfonylurea receptor 1 – transient receptor potential melastatin 4*) kanal čiji izražaj je povećan i na luminalnoj i na bazolateralnoj membrani endotelnih stanica ishemijskog područja (42).



Slika 1. Razvoj edema nakon ishemijske ozljede mozga. Prikazani su stadiji razvoja edema koji uključuju citotoksični, ionski i vazogeni edem. Prilagođeno prema (35).

Osim Na^+, osmotski gradijent za difuziju vode može nastati i djelovanjem glukoze. Glukozni prijenosnici (engl. *Glucose transporter*; GLUT) 1 i 2, izraženi su na obje membrane endotelnih stanica, dok je kotransporter Na^+ i glukoze 1 (engl. *Sodium glucose transporter 1*; SGLT) izražen samo na luminalnoj membrani (43, 44).

Nastalim osmotskim gradijentom iona ili glukoze, voda ulazi u međustanični prostor putem akvaporina. Akvaporin 4, dvosmjerni kanal za vodu, pojačano je izražen na krvno-moždanoj barijeri 6 sati nakon moždanog udara (45) te uzrokuje značajan ulazak vode u međustanični prostor i nastanak izvanstaničnog edema (Slika 1.) (46).

1.1.5.3. Vazogeni edem

Za razliku od ionskog edema, nakupljanje vode u moždanom intersticiju tijekom vazogenog edema nastaje zbog osmotskog i hidrostatskog gradijenta kroz propusniju krvno-moždanu barijeru (47, 48). Ulaz velikih negativno nabijenih molekula, elektrolita i vode u moždani intersticij doprinosi povećanju nastalog ionskog edema te može dovesti do povećanja intrakranijalnog tlaka, oštećenja moždanog tkiva i smrti (Slika 1.). Povećana propusnost kapilara (gubitak krvno-moždane barijere) nastaje iz više razloga, a navedeni su samo oni najvažniji.

Gubitak čvrstih spojeva između endotelnih stanica moždanih kapilara (49) nastaje zbog skvrčavanja endotelnih stanica nastalog polimerizacijom aktina (50) koje je zamijećeno tijekom upalne reakcije i ishemije. Nadalje, do povećanja kapilarne propusnosti dolazi i zbog nastanka kanalića kroz same endotelne stanice čime kapilare poprimaju izgled i funkciju fenestriranih kapilara. Jedno od mogućih objašnjenja nastanka ovih transendotelnih kanalića je stapanje pinocitotičkih mjehurića (51).

1.2. NATRIURETSKI PEPTIDI

Iako je tema doktorske disertacije uloga gvanilinskih peptida (GP) u razvoju moždanog udara, prvo je važno pobliže prikazati cijelu porodicu natriuretskih peptida upravo zbog njihove raznolike fiziološke uloge te usporedbe djelovanja pojedinih članova ove skupine hormona na razvoj moždanog udara.

Glavna fiziološka uloga natriuretskih peptida je regulacija izlučivanja natrija i vode bubrezima (natriureza i diureza) te krvnog tlaka (52). Povijest otkrića natriuretskih peptida započela je prije 40 godina istraživanjem koje pokazuje da ekstrakti pretklijetke štakora dovode do natriureze i diureze (53). Čimbenik odgovoran za zamijećene učinke nazvan je atrijskim natriuretskim peptidom (ANP) zato što ga proizvode kardiomiociti obje pretklijetke. Njegovo otkriće potaknulo je daljnja

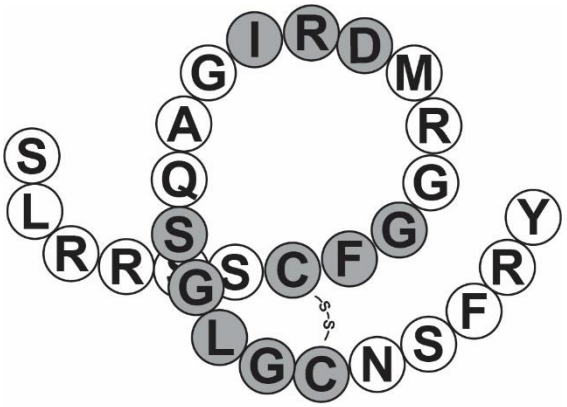
istraživanja peptida slične strukture te diuretskih i natriuretskih učinaka. Nedugo nakon, otkriven je i drugi pripadnik te porodice, moždani natriuretski peptid (engl. *Brain natriuretic peptide*; BNP) koji je izoliran iz mozga, prema čemu je dobio i ime. BNP je po svojoj strukturi i funkciji sličan ANP-u (54). Iste godine iz ljudske mokraće izoliran je urodilatin (URO), bubrežna izoforma ANP-a, s post-translacijskim promjenama na N-terminalnom kraju (55). Treći član ove porodice otkriven je 1990. godine i kao takav nazvan je natriuretski peptid tip C (engl. *C-type natriuretic peptide*; CNP) (56).

Istraživanje natriuretskih peptida nastavlja se otkrićem gvanilina (GN) koji je po prvi puta opisan 1992. godine nakon što je izoliran iz tankog crijeva štakora (57). Već sljedeće godine iz urina oposuma izoliran je urogvanilin (UGN) (58), po čemu je i dobio naziv. Dodavanjem novih članova nastala je porodica gvanilinskih peptida. Glavna fiziološka uloga članova ove porodice hormona jest poticanje natriureze, kaliureze i diureze nakon obroka bogatog solju. Osim GN i UGN u ovu porodicu ubrajaju se i renogvanilin i limfogvanilin te termo-stabilni toksin *Escherichia coli* (engl. *Heat stable Escherichia coli enterotoxin*; STa) zbog sličnog mehanizma djelovanja. Limfogvanilin je opisan 1999. godine nakon što je izoliran iz slezene oposuma (59) dok je renogvanilin potvrđen u crijevu i bubregu riba koštunjača (60). GN i UGN prisutni su kod čovjeka te je njihova uloga u održavanju homeostaze soli i vode do danas najviše istraživana. Izražaj limfogvanilina i renogvanilina do danas nije potvrđen kod sisavaca te je njihov fiziološki značaj slabije istražen.

1.2.1. Atrijski natriuretski peptid (ANP)

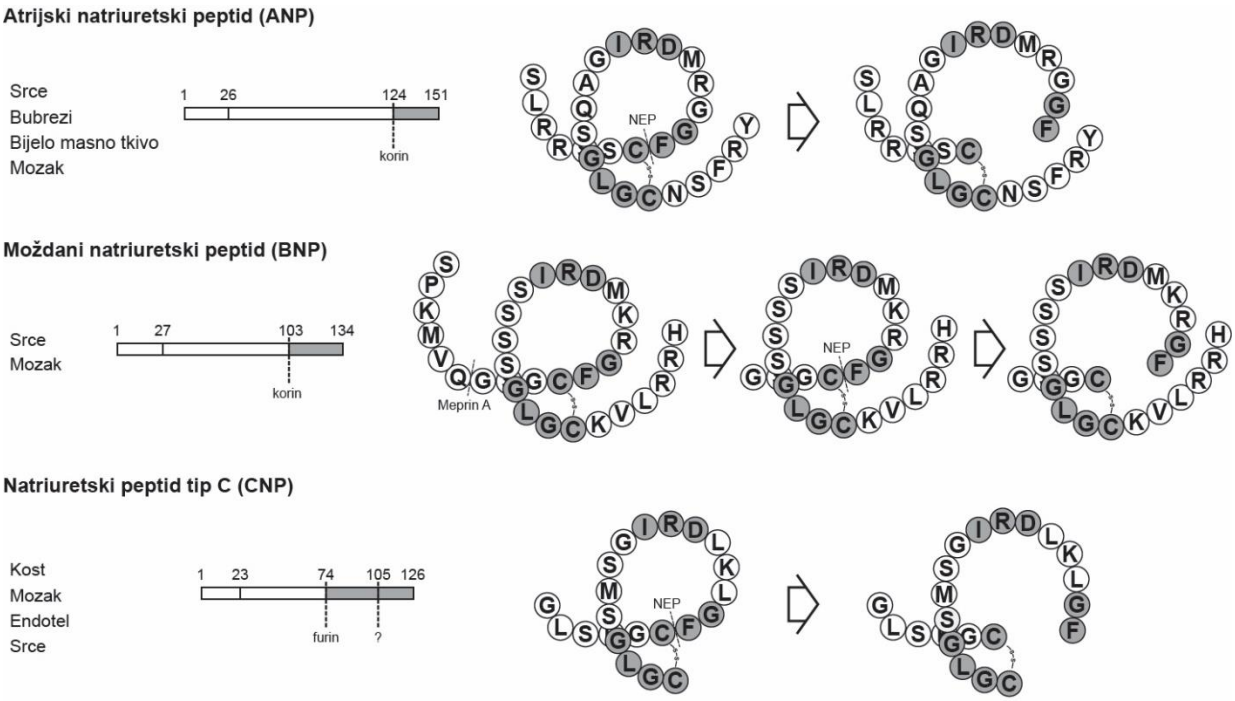
Svi natriuretski peptidi dijele sličnu strukturu prstena građenog od 17 aminokiselina povezanog disulfidnom vezom između 7. i 23. cisteina, što omogućuje njihovo vezanje za pripadajuće receptore (Slika 2.) (61). Struktura ANP-a prvi puta je opisana 1984. godine (82). ANP je kodiran genom na 1. kromosomu u ljudi čije prepisivanje dovodi do sinteze prepro-ANP-a građenog od 151 aminokiseline (63). Njegovim cijepanjem nastaje pro-ANP, polipeptid od 126 aminokiselina, koji se skladišti u granulama kardiomiocita pretklijetki (Slika 3.) (64). Do otpuštanja pro-ANP-a iz granula može doći zbog mehaničkog podražaja – rastezanje zida pretklijetki ili promjene u tlaku zida pretklijetke (65, 66) te nakon lučenja niza čimbenika poput endotelina 1 (67-69), angiotensina II (70, 71), anti-diuretskog hormona (ADH) (72, 73), glukokortikoida (74), acetilkolina (72), adrenalina (72) i opioida (75) dok dušikov

monoksid (NO) inhibira sintezu ANP-a (76). Lučenje ANP-a je također povećano pri hipoksijskim uvjetima (77). Nakon otpuštanja iz granula, pro-ANP se proteolitički cijepa korinom, transmebranskom serinskom proteazom, što dovodi do stvaranja biološki aktivnog ANP-a građenog od 28 aminokiselina (Slika 3.) (78). mRNA za ANP pronađena je, osim u srcu, i u mozgu, bijelom masnom tkivu i bubregu (79).



Slika 2. Atrijski natriuretski peptid (ANP). Ljudski atrijski natriuretski peptid je građen od 28 aminokiselina te posjeduje jednu disulfidnu vezu. Aminokiseline označene tamnijim krugovima su identične s aminokiselinama u urodilatinu, moždanom natriuretskom peptidu i natriuretskom peptidu tip C.

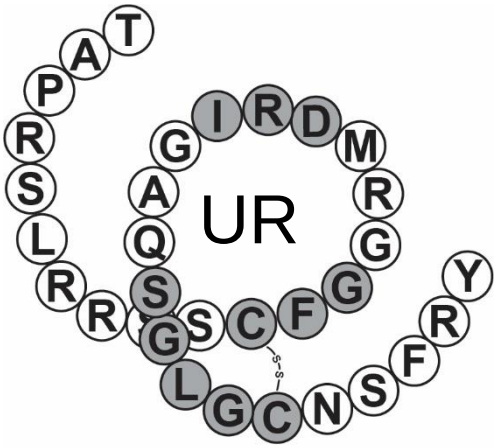
Poluživot ANP-a u plazmi iznosi oko 2 minute (80, 81) jer se razgrađuje enzimatski putem djelovanjem neutralnih endopeptidaza (NEP) (Slika 3.) (82, 83) ili vezanjem za receptor natriuretskih peptida C, tzv. receptor čistač (engl. Natriuretic peptide receptor C; NPR-C) (84, 85).



Slika 3. Sinteza i razgradnja natriuretskih peptida. Prikazan je tkivni izražaj, sinteza i razgradnja atrijskog natriuretskog peptida (A, ANP), moždanog natriuretskog peptida (B, BNP) te natriuretskog peptida tip C (C, CNP). NEP - neutralne endopeptidaze. Prilagođeno prema (63).

1.2.2. Urodilatin (URO)

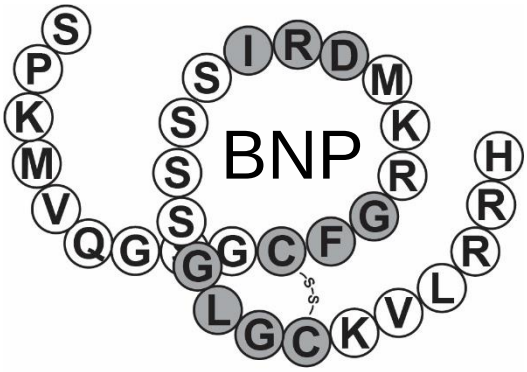
Urodilatin (URO) je izoforma ANP-a građena od 32 aminokiseline. Nastaje cijepanjem pro-ANP-a korinom između 94. i 95. aminokiseline – čime nastaje peptid identičan ANP-u uz dodatak 4 aminokiseline na N-terminalnom kraju (treonin-alanin-prolin-arginin, Slika 4.) (86, 87). Sinteza URO-a odvija se u bubregu, i to ponajviše u distalnim kanalićima gdje se secernira u lumen kanalića (88). Razgradnja URO-a odvija se vezanjem za NPR-C (89). Za razliku od ANP-a, URO pokazuje veću otpornost na enzimatsku razgradnju NEP-om zbog dodatnih aminokiselina na N-terminalnom kraju (90, 91).



Slika 4. Urodilatin (URO). Ljudski urodilatin građen je od 32 aminokiseline te posjeduje jednu disulfidnu vezu. Urodilatin je u stvari atrijski natriuretski peptid koji ima 4 aminokiseline više na svom N-terminalnom kraju. Aminokiseline označene tamnijim krugovima su identične s aminokiselinama u atrijskom i moždanom natriuretskom peptidu te natriuretskom peptidu tip C.

1.2.3. Moždani natriuretski peptid (BNP)

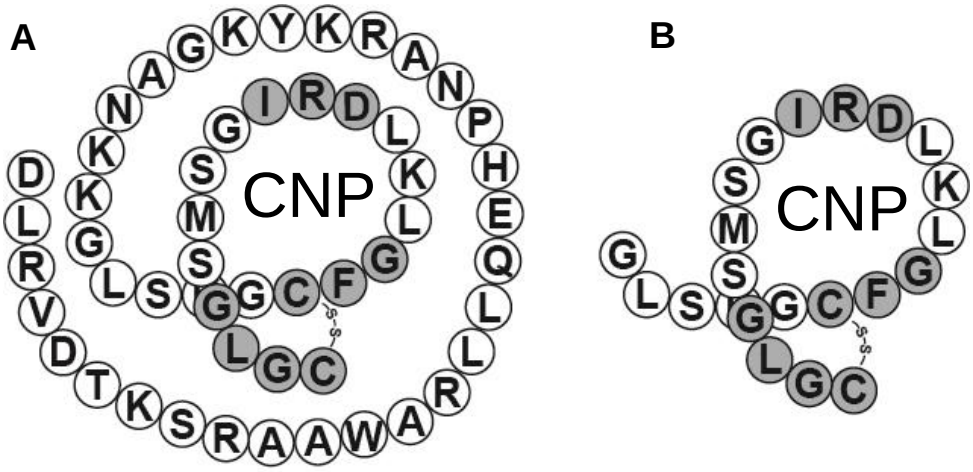
Moždani natriuretski peptid (engl. *Brain natriuretic peptide*; BNP) je natriuretski peptid prvotno izoliran iz mozga svinje (54) međutim daljnjim istraživanjima utvrđeno je da mu je veći izražaj u kardiomiocitima klijetki (92, 93). Gen za BNP je smješten na 1. kromosomu kod ljudi (94) odnosno 4. kromosomu u miševa (95). Prepro-BNP je peptid građen od 134 aminokiseline koji se cijepanjem pretvara u pro-BNP dužine 108 aminokiselina (Slika 3.) (63). Biološki aktivan hormon građen je od 32 aminokiseline kod čovjeka (Slika 5.), odnosno 45 kod miševa (96). Slično ANP-u, BNP nastaje cijepanjem pro-BNP-a korinom (Slika 3.) (96). Ne skladišti se u granulama kardiomiocita, poput ANP-a, već se sintetizira prema potrebi (63) te u patofiziološkim stanjima, poput zatajenja srca, dolazi do drastičnog povećanja plazmatske koncentracije BNP-a (92). Poluživot BNP-a znatno je duži od ANP-a i traje oko 20 minuta (92). Uklanjanje BNP-a odvija se putem vezanja za NPR-C te razgradnjom s metaloproteazom meprin A i NEP-om (Slika 3.) (97).



Slika 5. Moždani natriuretski peptid (BNP). Ljudski moždani natriuretski peptid je građen od 32 aminokiseline te posjeduje jednu disulfidnu vezu. Aminokiseline označene tamnijim krugovima su identične s aminokiselinama u urodilatinu, atrijskom natriuretskom peptidu i natriuretskom peptidu tip C.

1.2.4. Natriuretski peptid tip C (CNP)

Natriuretski peptid tip C, (engl. *C-type natriuretic peptide*; CNP) je najizraženiji natriuretski peptid u mozgu, poglavito u hipotalamusu (vidi tablicu 6.), odakle je prvotno izoliran (56, 98), međutim snažno je izražen i u hondrocitima, endotelnim stanicama (56), makrofazima (99) te reproduktivnom sustavu (100). Gen za CNP nalazi se na 2. kromosomu kod ljudi i miševa (101). Prepro-CNP je građen od 126 aminokiselina, čijim cijepanjem nastaje pro-CNP sastavljen od 103 aminokiseline (Slika 3.) (102).



Slika 6. Natriuretski peptid tip C (CNP). Ljudski natriuretski peptid tip C ima dvije izoforme: jedna građena od 53 (A), a druga od 22 aminokiseline (B). Obje izoforme posjeduju jednu disulfidnu vezu. Aminokiseline označene tamnijim krugovima su identične s aminokiselinama u urodilatinu, atrijskom natriuretskom peptidu i moždanom natriuretskom peptidu.

Postoje dva oblika biološki aktivnog CNP-a: CNP-53 i CNP-22 građeni od 53 odnosno 22 aminokiseline (Slika 6.). Oba oblika posjeduju prsten i jednu disuflidnu vezu poput prethodno opisanih natriuretskih peptida (103). CNP-53 nastaje cijepanjem pro-CNP-a unutarstaničnom serinskom endoproteazom furin (Slika 3.) (104) i oblik je CNP-a najčešće izražen u raznim tkivima (105). Enzim uključen u sintezu CNP-22 nije

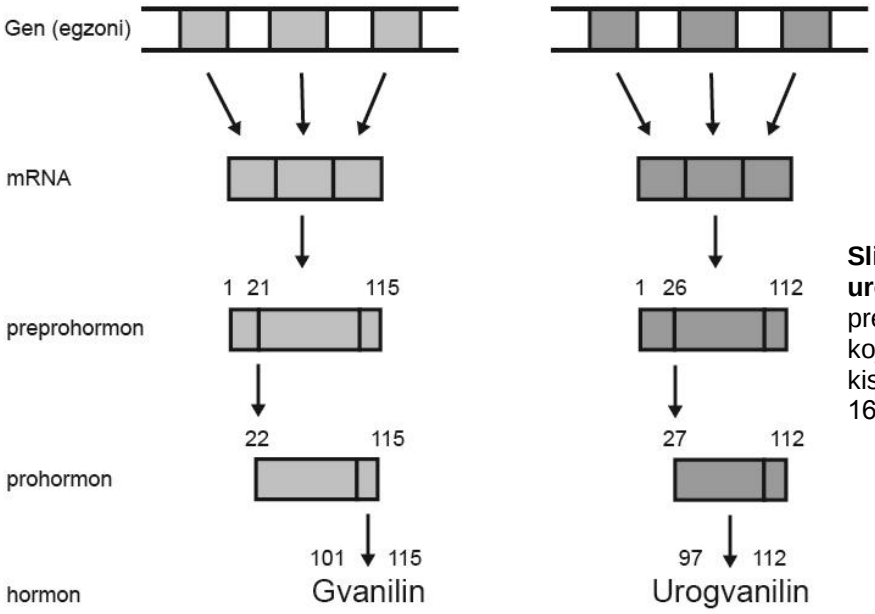
poznat, ali ta je izoforma hormona dominantna u krvnim žilama (105). Lučenje CNP-a potiču citokini (106), transformirajući čimbenik rasta β (engl. *Transforming growth factor β*; TGF-β) (107), posmično naprezanje (108) i ozljede endotela (105) te njegova koncentracija raste u patofiziološkim stanjima poput zatajenja srca (109, 110). Poluživot CNP-a iznosi 2 – 3 minute (103, 111) zbog uklanjanja vezanjem za NPR-C ili enzimatske razgradnje putem NEP-a (Slika 3.) (112).

1.3. GVANILINSKI PEPTIDI

Slično natriuretskim peptidima, GP se također prvotno sintetiziraju u obliku preprohormona, nakon čega cijepanjem nastaje prvo prohormon, a potom i biološki aktivan hormon (Slika 7.) (113). Za razliku od prije navedenih natriuretskih peptida, većina gvanilinskih peptida posjeduje dvije disulfidne veze između aminokiselina cisteina. Ove disulfidne veze su ključne za njihovu biološku funkciju (114, 115). STa iznimno posjeduje tri disulfidne veze, što je odgovorno za njegovo jače djelovanje te nastanak proljeva (Slika 8., za više detalja vidi kasnije).

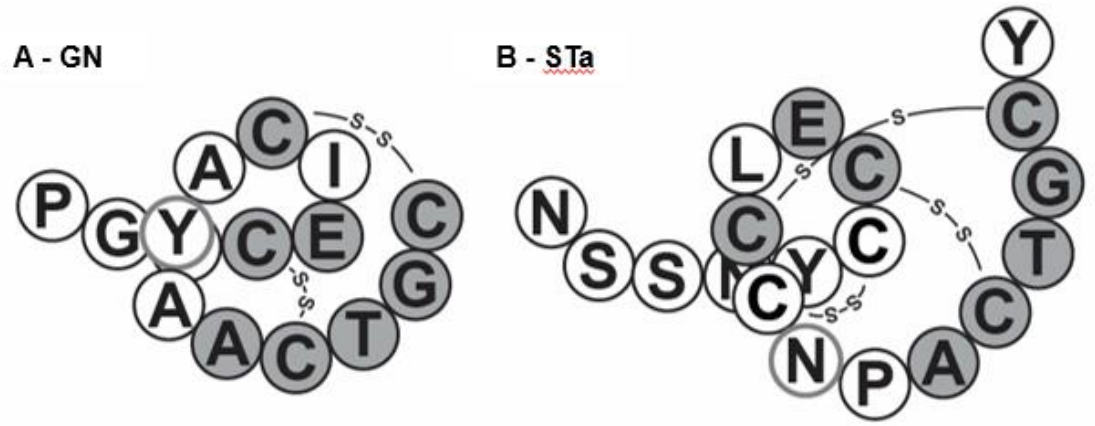
1.3.1. Gvanilin (GN)

Gen koji kodira gvanilin (engl. *Guanylate cyclase activator 2a*; GUCA2a) sastoji se od 3 egzona i 2 introna (Slika 7.) (116) te je smješten na 1. kromosomu kod ljudi i 4. kromosomu kod miševa (117).



Slika 7. Sinteza gvanilina i urogvanilina. Sintezom iz preprohormona nastaje gvanilin koji je građen od 15 amino-kiselina te urogvanilin koji ih ima 16. Prilagođeno prema (118).

Ljudski prepro-GN građen je od 115 aminokiselina, a cijepanjem nastaje pro-GN koji sadrži 94 aminokiseline (Slika 7.). Biološki aktivni GN je mali peptid od 15 aminokiselina s 2 disulfidne veze između 4. i 12. te 7. i 15. cisteina (Slika 8.) (114, 119, 120).



Slika 8. Gvanilin (A) i termo-stabilni enterotoksin *Escherischia coli* (B). Prikazan je slijed aminokiselina ljudskog gvanilina (GN) koji je građen od 15 aminokiselina i posjeduje dvije disulfidne veze te termo-stabilnog enterotoksina *Escherischia coli* (STa) koji se sastoji od 19 aminokiselina te posjeduje tri disulfidne veze. Tamnije označene aminokiseline su identične svim gvanilinskim peptidima pronađenim u ljudi. Posebno zaokružena aminokiselina asparagin (N) odgovorna je za otpornost enterotoksina na razgradnju kimotripsinom. Prilagođeno prema (121).

Glavni izvor GN-a su epitelne i vrčaste stanice crijevne sluznice, ali specifična mRNA pronađena je duž probavnog sustava, a najviše u debelom crijevu (122, 123). U crijevima prehrana s niskim udjelom soli dovodi do smanjenog izražaja GN-a i smanjene sinteze 3',5'-cikličkog gvanozin monofosfata (cGMP), pa je smanjena inhibicija NHE-a te povećana apsorpcija Na^+ iz crijeva (122). Upravo je probavni sustav mjesto sinteze plazmatskog GN-a (124) koji je u plazmi prisutan u obliku pro-GN-a u koncentracijama od 30 do 40 pM (125).

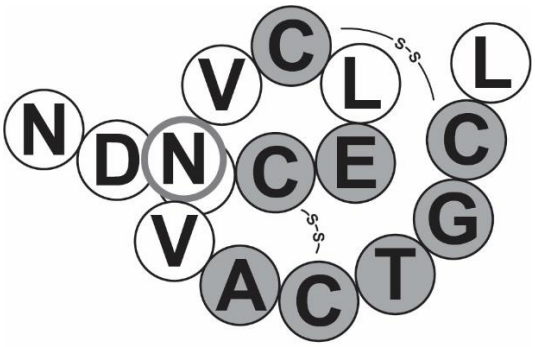
Specifična mRNA za GN također je prisutna u bubregu, posebno u distalnim dijelovima nefrona (sabirnim cijevima) dok je u proksimalnim kanalićima jedva zamjetna. Ovaj proksimalno/distalni odnos pojave GN-a se može primijetiti kako u bubrezima tako i u crijevima (126). GN je također izražen u gušterači, žučnom mjehuru, plućima, nadbubrežnoj žlijezdi, reproduktivnom sustavu i žlijezdama slinovnicama (127-131).

GN nije otporan na degradaciju kimotripsinom, kao UGN i STa, stoga što na poziciji 9. umjesto asparagina ima tirozin (Slika 8.). Kimotripsin može razgraditi GN u bubrežnim glomerulima te ga stoga ne nalazimo u urinu (132, 133).

1.3.2. Urogvanilin (UGN)

Gen koji kodira UGN (engl. *Guanylate cyclase activator 2b*; GUCA2b) sastoji se od 3 egzona i 2 introna (Slika 7.) i smješten je na 1. kromosomu kod ljudi odnosno 4. kromosomu kod miševa (117, 134).

Ljudski prepro-UGN građen je od 112 aminokiselina (Slika 7.). Njegovim cijepanjem nastaje pro-UGN od 86 aminokiselina. Biološki je aktivan UGN od 16 aminokiselina koji posjeduje 2 disulfidne veze između 4. i 12. te 7. i 15. aminokiseline cisteina (Slika 9.) (115, 135). Razlike u strukturi UGN-a koji se pojavljuje u različitih vrsta sisavaca, kornjača i jegulja prikazane su u tablici 1., a svima je zajednički položaj aminokiselina cisteina i disulfidnih veza koji omogućavaju biološku aktivnost UGN-a (136). Osim toga, UGN posjeduje i dvije kisele aminokiseline (koje izostaju kod GN-a) što mu omogućuje snažnije djelovanje u uvjetima niskog pH u duodenumu gdje se u probavnom sustavu UGN najviše i stvara (137-139).



Slika 9. Urogvanilin (UGN). Prikazan je slijed aminokiselina ljudskog urogvanilina koji je građen od 16 aminokiselina i posjeduje dvije disulfidne veze. Tamnije označene aminokiseline su identične svim gvanilinskim peptidima pronađenim u ljudi. Posebno zaokružena aminokiselina asparagin (N) odgovorna je za otpornost urogvanilina na razgradnju kimotripsinom. Prilagođeno prema (121).

UGN se primarno sintetizira u enterokromafinim stanicama tankog crijeva nakon čega se luči preko luminalne membrane u crijevni lumen a preko bazolateralne membrane u krv (140, 141). Jednako kao GN, i UGN pokazuje proksimalno/distalni odnos izražaja s time da je najveći izražaj UGN-a pokazan u dvanaesniku, ali i u proksimalnim kanalićima bubrega (126, 140, 142, 143).

Kako je već navedeno za GN, i UGN je izražen u brojnim tkivima, međutim smatra se da je porijeklo plazmatskog UGN-a probavni sustav (144, 145). UGN je u plazmi prisutan u obliku pro-UGN-a (99,95%), a prisutan je u koncentraciji od 10,3 ± 1,7 nmol/L (146, 147). Biološki aktivan UGN u plazmi prisutan je u izrazito niskim koncentracijama (144, 148).

Pro-UGN se u bubrezima enzimatski cijepa proteazama u UGN koji ima fiziološku ulogu i koji se izlučuje urinom (147, 149). Nadalje, UGN posjeduje asparagin na 9. mjestu od N-terminalnog kraja (Slika 9.) što onemogućuje njegovu razgradnju bubrežnim kimotripsinom što je vjerojatan razlog zašto ga nalazimo u urinu za razliku od GN-a koji se razgrađuje u bubregu (132).

Zbog izraženih natriuretskih učinaka, kako bi se i očekivalo, u staničnoj kulturi stanica porijeklom od ljudskog karcinoma kolona, nakon dodavanja hipertonične otopine NaCl, Steinbrecher i sur. (150) su pokazali pojavu mRNA specifične za UGN. Međutim, unos većih količina soli zapravo povećava izražaj UGN-a u bubrezima, a ne u crijevima, što ukazuje na važnost lokalno stvorenog UGN-a u nastanku natriureze nakon velikog unosa soli, a ne onog proizvedenog u crijevima te otpuštenog u krv (126, 151).

Osim u navedenim tkivima, UGN je do sada pronađen i u srcu, gušterači, plućima, reproduktivnom sustavu, limfnom sustavu, žlijezdama slinovnicama, i žučnom mjehuru (59, 127, 128, 130, 135, 140, 143, 146, 152-154).

Vrsta	Slijed aminokiselina
Čovjek	NDDCELCVNVACTGCL
Svinja	GDDCELCVNVACTGCS
Štakor/miš	TDECELC I NVACTGC
Oposum	QED CELC I NVACTGC
Kornjača	IDICE I CANAACAGCL
Jegulja	PDP CE I CANAACTGCL

Tablica 1. Razlika u građi urogvanilina kod pojedinih životinjskih vrsta. Crvenom bojom su označene aminokiseline cisteina povezane disulfidnim vezama. Prilagođeno prema (155).

1.3.3. Limfogvanilin

Limfogvanilin mali je peptid građen od 15 aminokiselina, te je jedini gvanilinski peptid s jednom disulfidnom vezom između 4. i 12. aminokiseline. Do danas nije potvrđen izražaj limfogvanilina kod čovjeka, međutim kod oposuma nalazi se u limfnom sustavu, leukocitima, koštanoj srži, bubregu, reproduktivnom sustavu, srcu i središnjem živčanom sustavu (SŽS) (59).

1.3.4. Renogvanilin

Renogvanilin je otkriven u jegulji (60). Ondje je izražen u probavnom sustavu i bubregu (prema čemu je dobio ime) te se smatra da sudjeluje u regulaciji osmolarnosti izvanstaničnih tekućina djelujući na apsorpciju vode u završnom dijelu probavnog sustava (60, 156). Građen je od 16 aminokiselina s dvije disulfidne veze između 4. i 12. te 7. i 15. aminokiseline (60).

1.4. SIGNALNI PUTEVI NATRIURETSKIH PEPTIDA

Receptori natriuretskih pa time i gvanilinskih peptida su transmembranske gvanilat ciklaze (Tablica 2.). Postoji i citoplazmatska gvanilat ciklaza (engl. *Soluble guanylate cyclase;* sGC) (157, 158), međutim njezini agonisti nisu natriuretski peptidi već dušikov (NO) i ugljični monoksid (CO) (157, 159).

Tablica 2. Membranske gvanilat ciklaze i njihovi ligandi. Navedeno je 7 do danas otkrivenih membranskih gvanilat ciklaza te njihovi poznati ligandi. Prilagođeno prema (160).

	GC-A	**GC-B**	**GC-C**	**GC-D**	**GC-E**	**GC-F**	**GC-G**
Ligandi	ANP	CNP	GN	CO_2	GCAP 1	GCAP 2	CO_2
	BNP		UGN	GN			
	URO		STa	UGN			

ANP - atrijski natriuretski peptid; BNP - moždani natriuretski peptid; CNP - natriuretski peptid tip C; GN – gvanilin, UGN – urogvanilin, STa – termo-stabilan toksin *Escherischia coli*, GCAP I i II - bjelančevine aktivatori gvanilat ciklaza I i II.

Transmembranske gvanilat ciklaze su povijesno nosile i naziv receptori natriuretskih peptida (engl. *Natriuretic peptide receptor;* NPR). Aktivacija tih receptora dovodi do stvaranja unutarstaničnog cGMP-a. Do danas je otkriveno 7 pripadnika porodice membranskih gvanilat ciklaza (Tablica 2.).

Gvanilat ciklaza A (GC-A), odnosno receptor natriuretskih peptida A (engl. *Natriuretic peptide receptor A;* NPR-A), na sebe veže ANP, BNP i URO (161-163). Agonist gvanilat ciklaze B (GC-B), drugog naziva receptor natriuretskih peptida B (engl. *Natriuretic peptide receptor B;* NPR-B), je CNP (164). Svi navedeni natriuretski peptidi vežu se i na receptor natriuretskih peptida C ili receptor čistač, (engl.

Natriuretic peptide receptor C; NPR-C), međutim on ne posjeduje unutarstaničnu gvanilat ciklaznu domenu poput GC-A i GC-B.

Do sada jedini otkriveni receptor GP-a je gvanilat ciklaza C (GC-C), a o njoj će biti više govora kasnije (165). Gvanilat ciklaze D (GC-D), E (GC-E) i F (GC-F) izražene su u osjetnim organima. Smatra se da je GC-D glavni receptor za GP-e u olfaktornom sustavu (166) gdje je izražen u neuroepitelnim stanicama i sudjeluje u osjetu njuha (167, 168). GC-E i GC-F izraženi su u fotoreceptorima mrežnice gdje se aktiviraju bjelančevinama aktivatorima gvanilat ciklaza (engl. *Guanylate cyclase activator protein*; GCAP) I i II (169-171). GCAP I je sinonim za GN. C-terminalnih 16 aminokiselina GCAP-a II je identično UGN-u pa se ponekad koristi i kao sinonim za UGN. Gvanilat ciklaza G (GC-G) je izražena u skeletnim mišićima, plućima, probavnom sustavu, testisima i bubregu, gdje se pretpostavlja da igra važniju ulogu u signalizaciji GP-a od GC-C-a (172-174). Ova gvanilat ciklaza je izražena i u olfaktornom sustavu gdje se aktivira hladnoćom (175, 176).

1.4.1. Gvanilat ciklaza A (GC-A)

Gvanilat ciklaza A (GC-A) prvi je put opisana 1989. godine (161). GC-A je izražena u masnom tkivu, bubregu, glatkim mišićima krvnih žila, malom i velikom mozgu, nadbubrežnoj žlijezdi, plućima, srcu i testisima (162, 177-179).

GC-A je homodimer građen od izvanstanične, transmembranske i unutarstanične domene (180). Gen za GC-A se nalazi na 1. kromosomu kod ljudi (181) odnosno 3. kod miševa (63). Izvanstanična domena, građena od 450 aminokiselina, sadrži 3 disulfidne veze i 5 glikozilacijskih mjesta na N-terminalnom kraju te je ova domena vezno mjesto za ANP, BNP i URO (Tablica 2.) (182, 183). Transmembranska hidrofobna domena je kratka, građena od 20 – 25 aminokiselina, a unutarstanična domena sastoji se od domene slične protein kinazi koja je smještena neposredno uz staničnu membranu te gvanilat ciklazne domene smještene na C-terminalnom kraju receptora (184-186). N-terminalni kraj domene slične protein kinazi fosforiliran je pri aktivaciji GC-A (187), dok je defosforilirana forma dio mehanizma desenzitizacije receptora na produženo vezanje ANP-a ili na aktivaciju protein kinazom C (PKC) (188, 189).

Vezanje liganda za izvanstaničnu domenu dovodi do aktivacije gvanilat ciklaze, koja je unutarstanična domena, te sinteze cGMP-a (161). Vezanje liganda dovodi i do internalizacije i razgradnje receptor/hormon kompleksa (190). Međutim, brojna druga istraživanja su opovrgnula tvrdnju da vezanje liganda za GC-A dovodi do internalizacije receptora (84, 191, 192).

1.4.2. Gvanilat ciklaza B (GC-B)

Postojanje GC-B-a potvrđeno je nedugo nakon otkrića GC-A (163). GC-B je kodiran genom koji se nalazi na 9. kromosomu kod ljudi (193) odnosno 4. kromosomu kod miševa (181). Izvanstanične i unutarstanične domene slične su građe kao kod GC-A. Domena slična protein kinazi također posjeduje fosforilacijska mjesta (194) čija defosforilacija potpomaže desenzitizaciji nakon produžene izloženosti CNP-u ili nakon aktivacije PKC-om (195-197). Izražaj GC-B-a ili njegove mRNA potvrđen je u bubrezima, fibroblastima, glatkim mišićima krvnih žila, jetri, kostima, maternici, mozgu, plućima i srcu (198-202).

1.4.3. Gvanilat ciklaza C (GC-C)

GC-C po prvi puta je opisana 1990. godine kao receptor za STa (203). Vezanje STa za GC-C dovodi do snažne sekrecije elektrolita i vode u lumen crijeva i posljedične pojave sekrecijskog proljeva. Mogući uzrok takve snažne aktivacije je činjenica da STa, za razliku od gvanilinskih peptida, posjeduje 3 disulfidne veze (204).

GC-C je građen poput GC-A i GC-B. GC-C se pojavljuje u obliku dimera i trimera (205, 206). Izvanstanična domena sadrži nekoliko N-glikozilacijskih mjesta za vezanje liganda te višestruke disulfidne veze (205). Uz hidrofobnu transmembransku domenu posjeduje i domenu sličnu protein kinazi te gvanilat ciklaznu domenu. Fosforilacija domene slične protein kinazi PKC-om dovodi do pojačanog djelovanja gvanilat ciklazne aktivnosti vidljivog u povećanju unutarstanične koncentracije cGMP-a (207, 208). Osim PKC-om, gvanilat ciklazna aktivnost regulirana je i ATP-om koji stabilizira aktivan oblik receptora (209). C-terminalni kraj receptora veže GC-C za stanični citoskelet i ključan je čimbenik u endocitozi hormon/receptor kompleksa (210).

U fiziološkim uvjetima GC-C je izražen u brojnim tkivima: nadbubrežnoj žlijezdi, žlijezdama znojnicama i slinovnicama, placenti, testisima, dišnim putevima, slezeni,

limfnim čvorovima, timusu, gušterači, žučnom mjehuru, reproduktivnom sustavu i bubrezima (127-130, 143, 152, 211). Izrazito visok izražaj pokazuje na luminalnoj membrani enterocita te je pokazano da smanjen unos soli dovodi do smanjenog izražaja GC-C-a u enterocitima debelog crijeva štakora (122). Zanimljivo je da zdrava jetra odraslih ne posjeduje GC-C već je on prisutan jedino tijekom razvoja i regeneracije jetre (212, 213).

GC-C je izražen i u malom i velikom mozgu, točnije u dopaminergičkim neuronima ventralnog tegmentalnog područja *substantia nigra* srednjeg mozga (214) te pro-opiomelanokortinskim (engl. *Pro-opiomelanocortin*; POMC) neuronima arkuatne jezgre hipotalamusa (215). GC-C je također izražen i u neuronima bazolateralne jezgre i kortikalnog područja amigdale (216), Purkinjeovim stanicama i neuronima dubokih jezgara malog mozga te u kortikalnim neuronima velikog mozga, međutim u fiziološkim uvjetima nije prisutan u astrocitima (217).

1.4.4. Stanični signalni mehanizmi cGMP-a

Aktivirana gvanilat ciklaza sintetizira cGMP što posljedično dovodi do porasta njegove unutarstanične koncentracije. cGMP je drugi glasnik natriuretskih peptida (218, 219) te je prvotno izoliran iz urina štakora (220). Kako je prikazano na slici 10. gvanilat ciklaze sintetiziraju cGMP iz prekursora gvanozin trifosfata (GTP) (57, 58). Porast koncentracije cGMP-a u stanici utječe na tri važne skupine bjelančevina ovisnih o cGMP-u: protein kinazu G (PKG), fosfodiesteraze (PDE) te ionske kanale (Slika 10.) (221-223). Aktivacija tih bjelančevina utječe na niz fizioloških procesa poput natriureze, diureze, vazodilatacije, te djeluje protuupalno, a u patofiziološkim uvjetima dovodi do smanjenja fibroze miokarda i hipertrofije klijetki (92).

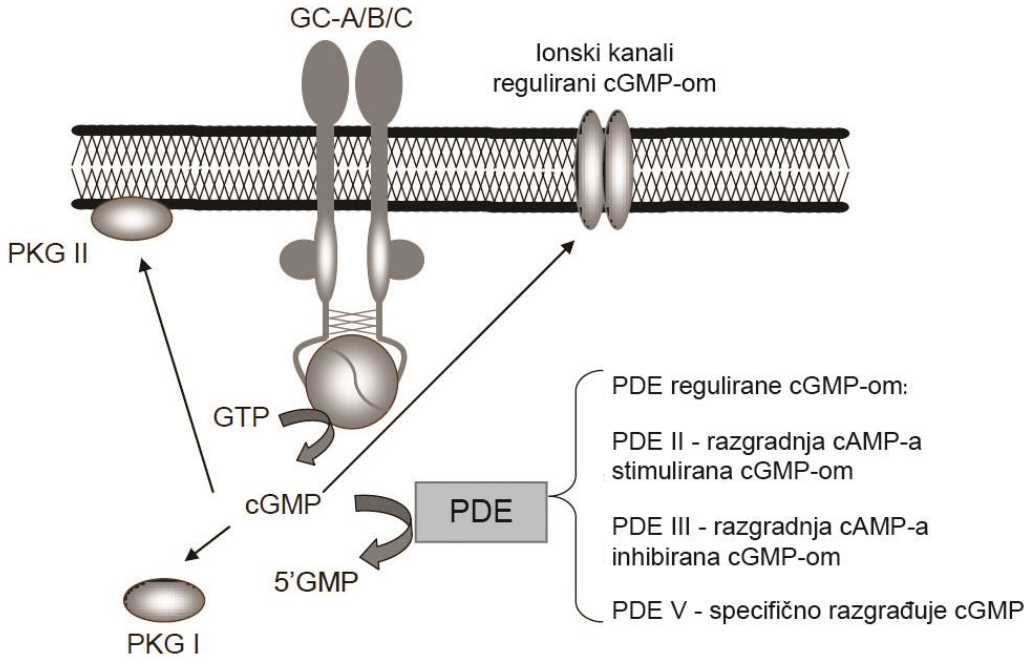
1.4.4.1. Protein kinaze G (PKG)

PKG su serinske i treoninske kinaze aktivirane cGMP-om (224). Vezanje cGMP-a uzrokuje konformacijsku promjenu kinaze koja dovodi do prestanka inhibicije kinazne domene na C-terminalnom kraju (225). Postoje dvije izoforme PKG-a i to: PKG I i PKG II.

Citoplazmatska izoforma enzima (PKG I) može biti podvrste α i β, a razlikuju se na N kraju bjelančevine. Izražaj PKG-a I potvrđen je u trombocitima, glatkom mišiću,

kardiomiocitima te u nekoliko moždanih regija (lateralna amigdala, hipokampus, Purkinjeove stanice). Gubitak funkcije PKG-a I dovodi do juvenilne hipertenzije te gubitka relaksacije glatkih mišića ovisne o cGMP-u (221).

PKG II je membranska izoforma enzima, a nalazi se u probavnom sustavu, bubrezima, kostima, plućima, prostati i mozgu (226-228). Životinje kojima nedostaje PKG II patuljastog su rasta te su otporne na proljeve izazvane STa (229).



Slika 10. Tri najvažnije skupine bjelančevina koje aktivira cGMP. Nakon sinteze cGMP-a iz GTP-a djelovanjem gvanilat ciklaze dolazi do aktivacije protein kinaze tipa I ili II (PKG I ili II), fosfodiesteraza (PDE) koje mogu mijenjati koncentraciju unutarstaničnog cAMP-a (PDE II i III), te direktno regulirati ionske kanale na staničnoj membrani. cGMP – 3',5'-ciklički gvanozin monofosfat; 5'GMP – 5'-gvanozin monofosfat; GTP - gvanozin trifosfat; GC – gvanilat ciklaza

1.4.4.2. Fosfodiesteraze (PDE)

Fosfodiesteraze (PDE) su ključni enzimi u kontroli koncentracije cikličkih nukleotida jer dovode do njihove razgradnje do 5'-cikličkih monofosfata (Slika 10.). Do danas je opisano 11 njihovih izoformi koje se razlikuju prema supstratu na koji djeluju te načinu njihove aktivacije odnosno inhibicije. Primjerice, PDE V, VI i IX hidroliziraju isključivo cGMP dok PDE I do III, X i XI hidroliziraju cGMP i ciklički adenozin monofosfat (cAMP) (222). Vezanje cGMP-a za PDE V dovodi istovremeno do pojačane aktivnosti enzima te degradacije cGMP-a. Djelovanjem na PDE III cGMP dovodi do povećanja unutarstanične koncentracije cAMP-a, a djelovanjem na PDE II do smanjenja koncentracije cAMP-a (230, 231).

1.4.4.3. Ionski kanali ovisni o cikličkim nukleotidima

cGMP i cAMP se vežu na ionske kanale ovisne o cikličkim nukleotidima (engl. *Cyclic nucleotide-gated ion channels*; CNG). Radi se o neselektivnim kationskim kanalima (Na^+, K^+, Ca^{2+}) s domenom za vezanje cikličkih nukleotida na svojem N-terminalnom kraju. Nakon vezanja nukleotida, dolazi do konformacijske promjene koja otvara kanal. Ovi ionski kanali izraženi su u fotoreceptorskim stanicama, epitelu dišnih puteva, bubregu, Müllerovim glija-stanicama mrežnice i hipokampalnim neuronima u mozgu (223, 232). Uz njihovu ulogu u vidnom i olfaktornom sustavu, sudjeluju i u signalizaciji putem Ca^{2+} u SŽS-u. Na primjer, otvaranje CNG kanala izraženih u senzornim i hipokampalnim neuronima dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+}. Smatra se da CNG kanali, također, imaju ulogu u ranom razvoju neurona (233). Osim ovih ionskih kanala koje ciklički nukleotidi aktiviraju, pokazano je da cGMP inhibira K^+ kanale u stanicama proksimalnih kanalića bubrega (234, 235).

CNG kanali su uključeni u modulaciju sinaptičke plastičnosti utjecajem na dugoročnu potencijaciju (engl. *Long-term potentiation*) i depresiju (engl. *Long-term depression*), vjerojatno zbog ulaska Ca^{2+} u presinaptičke završetke što dovodi do otpuštanja neurotransmitera. Pokazano je da povećana koncentracija cGMP-a, jednog od liganda CNG-a, u hipokampalnim neuronima dovodi do dugoročne potencijacije (236). U Purkinjeovim stanicama malog mozga cGMP je pak uključen u nastanak dugoročne depresije, međutim taj učinak se pripisuje učinku NO/sGC signalnog puta te učinak cGMP-a nastalog aktivacijom membranskih gvanilat ciklaza do danas nije istražen (237).

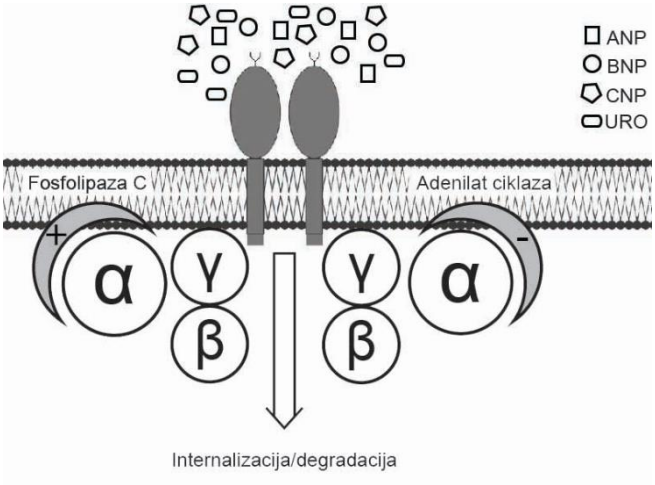
CNG kanali izraženi su i u astrocitima gdje su također važni u regulaciji Ca^{2+} odgovora na razne podražaje. Upravo promjene u koncentraciji Ca^{2+} utječu na otpuštanje niza neurotransmitera iz astrocita. Otpušteni neurotransmiteri mogu djelovati na same astrocite ili utjecati na komunikaciju između astrocita i neurona te posljedično na regulaciju sinaptičkog prijenosa i plasticiteta (238).

1.4.5. Receptor natriuretskih peptida C (NPR-C)

Receptor natriuretskih peptida C (receptor čistač; NPR-C) najčešće je izražen natriuretski receptor (239). Kodiran je genom na 5. kromosomu kod ljudi (181) odnosno 15. kromosomu kod miševa (63). Homodimerne je građe s disulfidnim

vezama. NPR-C građen je od 450 aminokiselina te sadrži veliku izvanstaničnu domenu s glikoziliranim mjestima za vezanje ANP-a, BNP-a i CNP-a (240), hidrofobni transmembranski dio te kratki unutarstanični lanac građen od svega 37 aminokiselina (Slika 11.) (163, 241). Za razliku od GC-A i GC-B, ne posjeduje gvanilat ciklaznu domenu već je vezan za G-bjelančevine. Aktivacijom NPR-C-a dolazi do inhibicije adenilat ciklaze te aktivacije fosfolipaze C (engl. *Phospholipase C*; PLC) (Slika 11.) (242, 243). Glavna uloga NPR-C-a je vezanje, uklanjanje i razgradnja natriuretskih peptida procesom endocitoze dok je fiziološka uloga potaknuta staničnim signalnim sustavom još uvijek nedovoljno istražena (84, 85, 244).

NPR-C je najizraženiji natriuretski receptor te je prisutan u bubregu, glatkim mišićima krvnih žila, mozgu, nadbubrežnoj žlijezdi i srcu (177, 178, 245, 246). Do danas nije pokazano vezanje i uklanjanje gvanilinskih peptida djelovanjem ovog receptora. Za ove peptide pretpostavlja se postojanje GC-C neovisnog signalnog puta koji ne uključuje i aktivaciju NPR-C-a, a bit će detaljnije opisan.



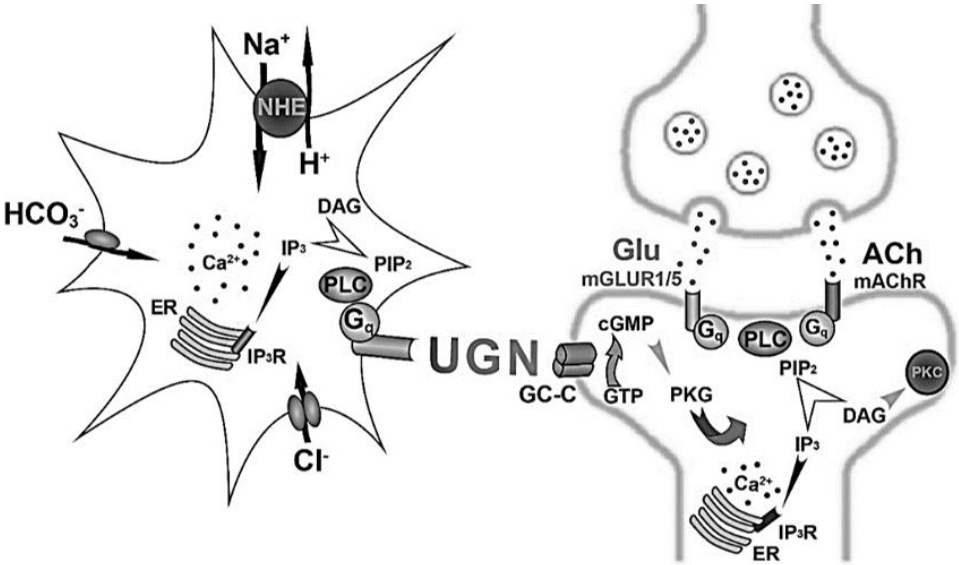
Slika 11. Djelovanje natriuretskog receptora C (NPR-C). Jedini receptor natriuretskih peptida koji ne posjeduje gvanilat ciklaznu domenu već je vezan za G-bjelančevine sastavljene od α, β i γ podjedinice. Vezanje liganda dovodi do inhibicije adenilat ciklaze i aktivacije fosfolipaze C (PLC). Prilagođeno prema: Hayek i Nemer, 2011. ANP - atrijski natriuretski peptid; BNP - moždani natriuretski peptid; CNP - natriuretski peptid tip C; URO - urodilatin, "+" - stimulacija, "-" - inhibicija

1.4.6. Signalni put gvanilinskih peptida neovisan o gvanilat ciklazi C

Hipoteza da postoji drugi signalni put GP-a koji je neovisan o GC-C-u postoji već tri desetljeća. Istraživanja ovog neovisnog puta započela su radom Crane i sur. iz 1992. godine koji su pokazali nepotpuno preklapanje mRNA specifične za GC-C i veznih mjesta za STa u crijevima. 5% svih veznih mjesta s visokim afinitetom za STa ne posjeduju gvanilat ciklaznu aktivnost (247). Kod životinja kojima nedostaje GC-C (engl. *GC-C knock out animals*; GC-C KO) izostaje djelovanje STa na enterocite iako u

tih životinja još uvijek postoji 10% veznih mjesta za STa u odnosu na divlji tip životinja. Ovaj GC-C neovisni signalni put u crijevima povezuje se s aktivacijom PKC (248, 249).

Djelovanje GP-a u bubrezima neovisno je o aktivaciji GC-C-a. Naime, kod mužjaka miševa kojima nedostaje GC-C dolazi do natriureze, kaliureze i diureze potaknute GP-ima (250) te do promjena u membranskom potencijalu glavnih stanica kortikalnih sabirnih cijevi iako tim životinjama nedostaje GC-C (235). U ženki miševa kojima nedostaje GC-C dolazi do stvaranja manjeg volumena urina u odnosu na divlji tip ženki iz istog legla što ukazuje na različitu ulogu i GC-C ovisnog i GC-C neovisnog signalnog puta GP-a u bubrezima koja ovisi o spolu životinja korištenih u istraživanju. Spolna razlika u funkciji GC-C-a pokazana je i na učinak GP-a na aktivaciju smeđeg masnog tkiva (engl. *Brown adipose tissue*; BAT) (251).



Slika 12. Pretpostavljeni mehanizam djelovanja GC-C neovisnog signalnog puta u astrocitima. U fiziološkim uvjetima GC-C je dominantno izražen u neuronima. U srednjem mozgu urogvanilin (UGN) putem GC-C-a pospješuje ekscitatorni učinak glutamata putem metabotropnih glutamatnih receptora (mGluR1/5) i acetilkolina (Ach) putem muskarinskih acetilkolinskih receptora (mAChR). UGN se veže za još nepoznat receptor na astrocitnoj membrani čija aktivacija dovodi do porasta unutarstaničnog Ca^{2+} što može imati za posljedicu aktivaciju fosfolipaze C (PLC) koja razgrađuje membranske fosfoinozitol-4,5-bisfosfate (PIP_2) na inozitol-1,4,5,-trifosfat (IP_3) i diacil-glicerol (DAG). IP_3 se veže za svoj receptor (IP_3R) na endoplazmatskoj mrežici što dovodi do otpuštanja Ca^{2+} u citoplazmu. Ovaj signalni put posljedično dovodi do aktivacije Na^+/H^+ izmjenjivača (NHE), transporta HCO_3^- i hiperpolarizacije stanične membrane zbog ulaska kloridnih iona. Prilagođeno prema (252). cGMP - ciklički gvanozin-monofosfat, ER – endoplazmatska mrežica, GC-C - gvanilat ciklaza C, GTP - gvanozin-trifosfat, PKC – protein-kinaza C, PKG – protein-kinaza G

Signalni put GP-a neovisan o GC-C-u do danas nije razjašnjen te su potrebna dodatna istraživanja kako bi se utvrdilo, ne samo koji receptor se aktivira vezanjem GP-a, već i koji su nizvodni signalni putovi uključeni u njegovo djelovanje. Iako NPR-C nije uključen u ovaj GC-C neovisan signalni put, vjerojatno se radi o sličnom tipu

receptora spregnutog s G-bjelančevinom (234, 235). Istraživanja koja se provode u posljednje vrijeme pokušavaju odgonetnuti važnosti GC-C neovisnog signalnog puta u mozgu (217). Ako sažmemo dosadašnja istraživanja uloge ovog puta u fiziološkim uvjetima u mozgu, možemo pretpostaviti, kako je prikazano na slici 12., da se UGN veže za još uvijek nepoznati receptor na membrani astrocita čija aktivacija dovodi do porasta unutarstaničnog Ca^{2+}. Ovaj signalni put dovodi do alkalinizacije citoplazme zbog povećanja aktivnosti NHE-a i transporta HCO_3^- u astrocite te hiperpolarizacije stanične membrane zbog ulaska klorida (217).

1.5. UČINCI NATRIURETSKIH PEPTIDA

1.5.1. Fiziološka uloga

1.5.1.1. Natriuretski peptidi

Natriuretski peptidi uključeni su u kontrolu krvnog tlaka i proces endohondralnog okoštavanja. U fiziološkim uvjetima, plazmatske koncentracije tih peptida su niske, međutim kod patofizioloških promjena se pojačava njihov izražaj. Ovdje ćemo prikazati samo njihove najvažnije funkcije.

Pro-ANP se otpušta iz granula kardiomiocita pri rastezanju zida pretklijetke koje nastaje zbog povećanog volumena krvi i/ili krvnog tlaka (253), nakon čega se cirkulacijom prenosi do ciljnih organa i tkiva (63). Pri fiziološkim uvjetima koncentracija ANP-a iznosi 10 fmol/mL (254). Većina BNP-a nalazi se u kardiomiocitima klijetki gdje se ne skladišti već sintetizira nakon podražaja, dok se manji dio nalazi u granulama pretklijetki zajedno s ANP-om. Plazmatske koncentracije BNP-a i CNP-a su također u fiziološkim uvjetima niske (1 fmol/mL) (92, 109).

ANP/GC-A signalni put ključan je u regulaciji krvnog tlaka te istraživanja pokazuju da veći izražaj GC-A dovodi do snižavanja krvnog tlaka kod laboratorijskih miševa (255). Regulacija krvnog tlaka putem GC-A postiže se natriurezom, diurezom i kočenjem renin-angiotenzin sustava u bubrezima te vazodilatacijom i povećanom propusnošću endotela krvnih žila (53, 256-258).

ANP pokazuje natriuretski i diuretski učinak inhibicijom niza ionskih kanala i kanala za vodu (akvaporina), izmjenjivača (NHE, $Na^+/K^+/2Cl^-$ izmjenjivač) i pumpi

(Na^+/K^+-ATPaza) (259-263). Diuretski učinak manifestira se i djelovanjem ANP-a na proizvodnju ADH (264). Sličan učinak posjeduje i CNP koji, nakon primjene u mozak, inhibira proizvodnju ADH inhibicijom L-tipa kalcijskih kanala (265). Smanjenje krvnog tlaka ANP postiže i centralnim djelovanjem dovodeći do smanjenja apetita za sol (266).

Osim navedenih učinaka, natriuretski peptidi također sudjeluju u održavanju energetske homeostaze organizma. ANP i BNP potiču lipolizu u adipocitima putem PKG signalnog puta (267). Povećana koncentracija natriuretskih peptida u krvi povezana je s postprandijalnom oksidacijom masti i gubitkom težine kod ljudi (268) te koncentracija tih peptida pokazuje negativnu korelaciju s indeksom tjelesne mase (engl. *Body mass index; BMI*) (269). Oni također sudjeluju u pretvorbi bijelog masnog tkiva u smeđe povećavanjem izražaja bjelančevine za rasprezanje 1 (engl. *Uncoupling protein 1*; UCP-1) i PPARγ koaktivatora-1α (PGC-1α) te aktivacijom mTOR kompleksa 1 (270, 271). Aktivacijom GC-A u skeletnim mišićima, natriuretski peptidi također dovode i do pojačanog oksidativnog metabolizma i oksidacije masti (272).

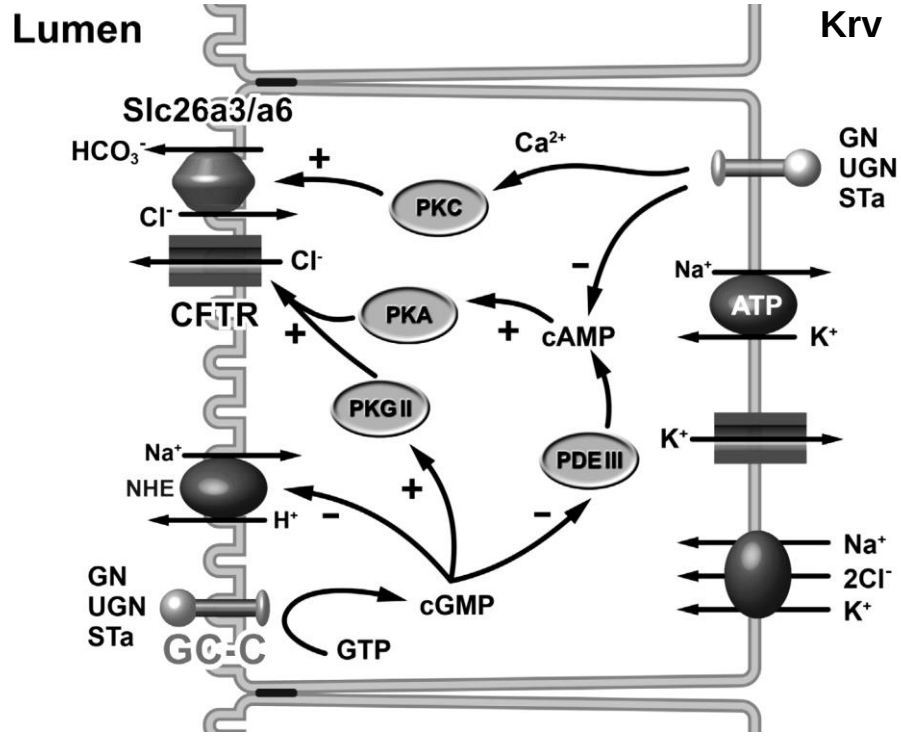
1.5.1.2. Gvanilinski peptidi

Kako je već ranije navedeno, nakon povećanog unosa soli dolazi do lučenja GP-a u lumen crijeva i krv, a to oslobađanje ovisi o leptinu (273, 274). GP, djelovanjem na GC-C smješten u luminalnoj membrani enterocita, inhibiraju NHE, stimuliraju sekreciju hidrogenkarbonata i Cl^-, inhibiraju apsorpciju vode te djelovanjem GP-a u krvi ili lokalno stvorenih GP-a u bubrezima, potiču izlučivanje Na^+ i K^+ kako bi spriječili postprandijalnu hipernatremiju (113, 122, 132, 273, 275, 276).

1.5.1.2.1. Probavni sustav

U crijevima, porast koncentracije cGMP-a djelovanjem GC-C-a smještenog na luminalnoj membrani enterocita dovodi do aktivacije PKG-a II, inhibicije NHE-a te porasta cAMP-a indirektno putem smanjenja razgradnje PDE-om III što posljedično aktivira protein kinazu A (PKA). PKG II i PKA aktiviraju transmembranski regulator vodljivosti odgovoran za nastanak cistične fibroze (engl. *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) i time uzrokuju sekreciju Cl^- u lumen crijeva (Slika 13.) (277-279). CFTR, u kompleksu sa Cl^-/HCO_3^- izmjenjivačima (SLC26a3 i Slc26a6), dovodi do sekrecije hidrogenkarbonata u lumen crijeva (280-

282). Djelovanjem na smanjeni transport vodika i povećan transport hidrogenkarbonata kroz luminalnu membranu enterocita dolazi do alkalinizacije crijevnog sadržaja što je posebno važno u duodenumu (vidi kasnije) (137). Osim na transport elektrolita, GP aktivacijom GC-C-a produžuju stanični ciklus i na taj način reguliraju staničnu proliferaciju (283).



Slika 13. Gvanilinski peptidi u crijevima. Gvanilin (GN), urogvanilin (UGN), i termo-stabilini enterotoksin *Escherichia coli* (STa) vežu se i aktiviraju luminalno smještenu gvanilat ciklazu C (GC-C). Posljedični porast unutarstanične koncentracije cikličkog gvanozin monofostafa (cGMP) dovodi do: inhibicije Na^+/H^+ izmjenjivača (NHE), aktivacije protein kinaze G II (PKG II) direktno te protein kinaze A (PKA) indirektno putem porasta cikličkog adenozin monofosfata (cAMP) koji nastaje kao posljedica inhibicije fosfodiesteraze tipa 3 (PDE III). PKG II i PKA aktiviraju transmembranski regulator vodljivosti odgovoran za nastanak cistične fibroze (CFTR) uz posljedičnu aktivaciju Cl^-/HCO_3^- izmjenjivača (Slc26a3 i Slc26a6) što dovodi do sekrecije klorida i hidrogenkarbonata u crijevni lumen. Vezna mjesta za gvanilinske peptide postoje na bazolateralnoj membrani enterocita. Taj signalni put dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} te smanjenja unutarstanične koncentracije cAMP-a, a to povećava sekreciju hidrogenkarbonata. Prilagođeno prema (252). ATP - adenozin trifosfat, PKC - protein kinaza C

Danas se pretpostavlja i djelovanje GC-C neovisnog puta GP-a na crijeva gdje je njegovo postojanje prvi put i naslućeno (Slika 13, a za više detalja pogledati ranija poglavlja) (247, 248). Vezna mjesta za GP-e postoje na bazolateralnoj membrani enterocita (284), aktivacija ovog signalnog puta dovodi do porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} te smanjenja unutarstanične koncentracije cAMP-a što podsjeća na već ranije opisano djelovanje NPR-C receptora (249). Očigledno je da smanjenje koncentracije cAMP-a uz bazolateralnu membranu neće utjecati na aktivnost PKA-e i

CFTR-a na luminalnoj membrani. Porastom unutarstanične koncentracije Ca^{2+} koji dovodi do porasta Ca^{2+} u cijeloj citoplazmi (poznat i kao Ca^{2+} val) dolazi do aktivacije PKC koja zatim aktivira Cl^-/HCO_3^- izmjenjivače na luminalnoj membrani. Upravo je to jedan od razloga zašto u nedostatku CFTR-a ili GC-C-a GP još uvijek dovode do transporta hidrogenkarbonata u crijevni lumen (285).

U dvanaesniku, UGN pomaže u regulaciji pH s ciljem neutralizacije kiselog sadržaja koji dolazi iz želuca i zaštitom epitela tankog crijeva. Upravo pri tom sniženom pH UGN do 10 puta snažnije aktivira GC-C od GN-a (59, 282). Nastali cGMP dovodi do inhibicije NHE i potiče sekreciju hidrogenkarbonata što alkalinizira crijevni sadržaj (137).

GN i UGN prisutni su i u želudcu u parijetalnim odnosno enterokromafin-sličnim stanicama. Pokazano je da i.v. primjena GN-a dovodi do pojačane sekrecije sluzi i time štiti želučani epitel od štetnog učinka HCl-a. UGN vjerojatno doprinosi toj zaštiti i sekrecijom alkalične sluzi bogate hidrogenkarbonatima, međutim to do danas nije potvrđeno (286-288).

Kao što je prethodno spomenuto, UGN ne pokazuje izražaj u zdravoj jetri odraslih ljudi. Međutim, nakon djelomične hepatektomije kod štakora pojavljuje se izražaj GC-C proteina već 4 sata nakon operacije te nestaje nakon 96 sati. Izražen je u većoj mjeri u neparenhimalnim stanicama te u manjoj mjeri u hepatocitima i smatra se da ima važnu ulogu u regeneraciji jetre nakon ozljede (289). To je potvrđeno na GC-C KO miševima, kod kojih je došlo do gotovo 100%-tne smrtnosti nakon indukcije ozljede jetre injekcijom ugljikovog tetraklorida (213).

1.5.1.2.2. Mokraćni sustav

Istraživanja pokazuju da GP uzrokuju natriurezu, diurezu i kaliurezu u bubregu bez promjena u veličini glomerularne filtracije ili bubrežnog protoka (275, 290, 291). Kako je isti učinak GP-a zamijećen i kod životinja kojima nedostaje GC-C, smatra se da je u djelovanje GP-a na bubrege u mužjaka osim GC-C-a uključen i dodatni signalni put neovisan o tom receptoru (217, 250).

S obzirom na njihovu ulogu u održavanju homeostaze elektrolita i vode, ne iznenađuje činjenica da GP imaju utjecaj na krvni tlak. Lorenz i sur. (292) pokazali su da životinje kojima nedostaje UGN (engl. *UGN knock out animals*; UGN KO) imaju

povišen krvni tlak u usporedbi s divljim tipom miševa iz istog legla. Međutim, GC-C KO miševi su normotenzivni, što navodi na zaključak da se regulacija krvnog tlaka UGN-om ne vrši preko GC-C receptora već da je uključen neovisan signalni put GP-a u bubrezima. Više o djelovanju GP-a na pojedine dijelove nefrona opisano je u nizu preglednih članaka (118, 121, 293).

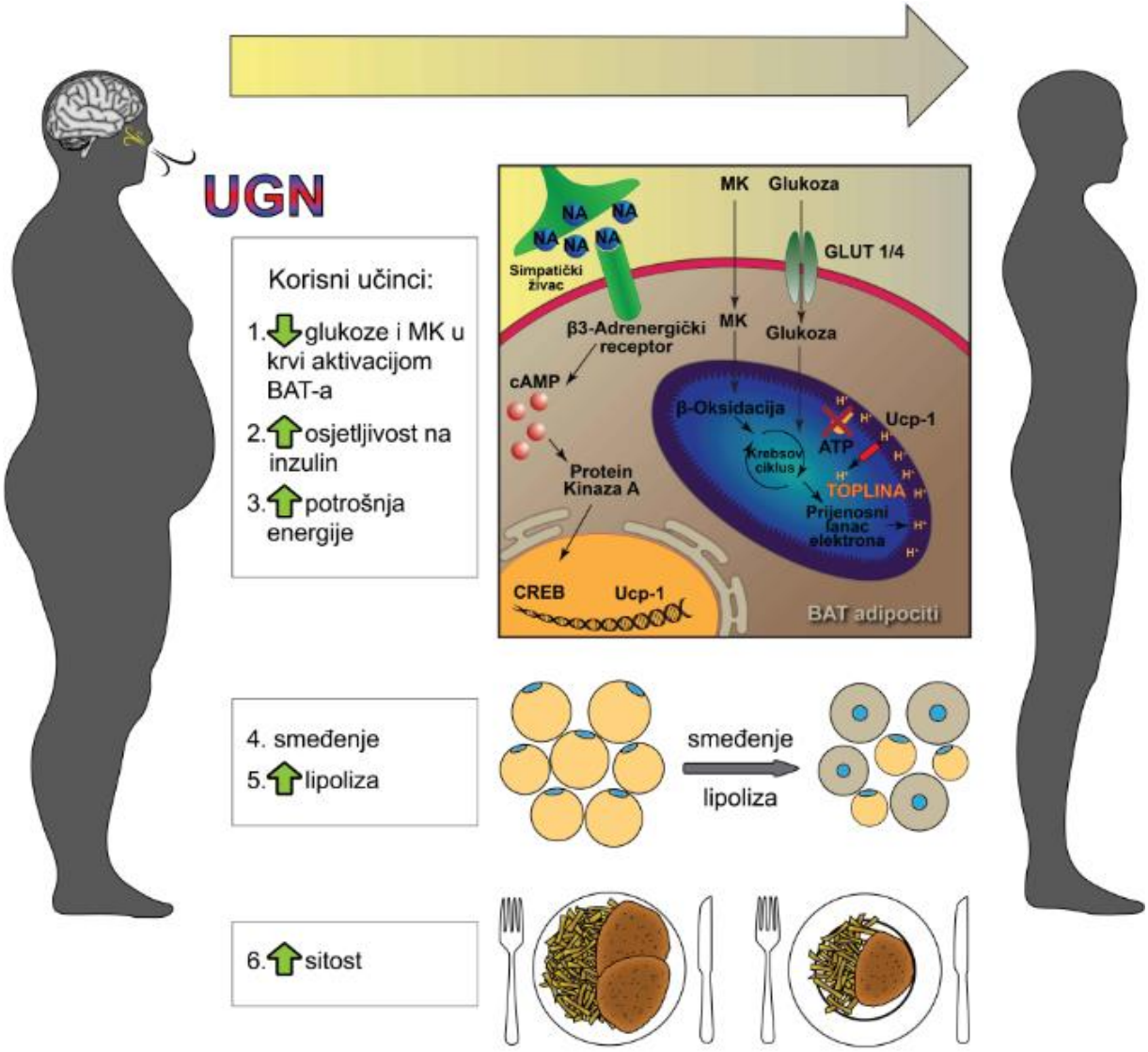
1.5.1.2.3. Hipotalamus

Učinci gvanilinskih peptida očituju se i u njihovoj regulaciji metabolizma. Danas pretpostavljamo centralne učinke GP-a koji reguliraju homeostazu glukoze u organizmu. U znanstvenim krugovima još uvijek je tema rasprave da li na mozak mogu utjecati GP iz krvi prolaskom kroz krvno moždanu barijeru ili oni nastaju i u samom mozgu. Učinci UGN-a na mozak te mogući korisni učinci u terapiji pretilosti sažeto su prikazani na slici 14.

Valentino i sur. (215) pokazali su da je UGN ključni čimbenik u izazivanju osjećaja sitosti što posljedično dovodi do smanjenog unosa hrane u organizam te su stoga UGN prozvali hormonom sitosti. Naime, ubrzo nakon hranjenja dolazi do lučenja pro-UGN-a u probavnom sustavu ljudi i miševa kako u crijevni lumen tako i u krv. Primjena STa i.v. ili direktno u moždane komore (intracerebroventrikularno, i.c.v.), smanjuje količinu unesene hrane dok i.v. primjena protutijela na pro-UGN povećava unos hrane. Uzimajući u obzir činjenicu da je GC-C izražen u POMC neuronima arkuatne jezgre hipotalamusa, Valentino i sur., zaključili su da je UGN endokrini regulator osjećaja sitosti i da se pro-UGN iz plazme cijepa u hipotalamusu u svoj biološki aktivan oblik.

Kod GC-C KO životinja izostaje osjećaj sitosti te su one podložne razvoju pretilosti (povećanjem naslaga bijelog masnog tkiva) i metaboličkog sindroma (pojava hiperinzulinemije, hiperleptinemije, hipertrofije srca i poremećene tolerancije na glukozu), što upućuje na činjenicu da UGN djeluje preko GC-C receptora (215, 294). Međutim, kasnija istraživanja opovrgnula su taj zaključak jer su pokazala da životinje kojima nedostaje UGN, ali ne i GC-C KO, imaju povećanu tjelesnu masu zbog nakupljanja bijelog masnog tkiva, povećanog unosa hrane i poremećaja u kontroli glikemije nakon obroka (295). Upravo rezultate na GC-C KO životinjama smo potvrdili u našem nedavnom istraživanju gdje smo pokazali da unos hrane ne ovisi o GC-C-u te se ne mijenja ovisno o dobi i spolu životinja (251). Iz navedenih rezultata, može se

pretpostaviti postojanje GC-C neovisnog signalnog puta za UGN u mozgu. Nedugo nakon ovih istraživanja Habek i sur. (217) pokazali su postojanje Ca^{2+}-ovisnog, ali GC-C neovisnog signalnog puta u astrocitima SŽS-a.



Slika 14. Centralni učinci urogvanilina. Učinci urogvanilina (UGN) su aktivacija smeđeg masnog tkiva (engl. *brown adipose tissue*, BAT) putem aktivacije simpatikusa nakon čega slijedi smanjenje koncentracije glukoze i masnih kiselina u plazmi (1.) što rezultira povećanjem osjetljivosti na inzulin (2.) te porastom potrošnje energije (3.). Centralni učinak UGN-a je i izazivanje sitosti (6.). Uz učinak na BAT, UGN svojim direktnim učinkom na bijelo masno tkivo dovodi do pretvaranja bijelog u smeđe masno tkivo (4., smeđenje, engl. *browning*) te poticanje lipolize (5.). Ukupan učinak primjene UGN-a bio bi gubitak tjelesne mase zbog povećanja potrošnje energije i smanjenog unosa hrane te regulacija metabolizma glukoze, povećanje osjetljivosti na inzulin i povećanje volumena BAT-a. Prilagođeno prema (252). CREB - bjelančevina koja veže cAMP te je odgovorna za njegovo djelovanje u jezgri (engl. *cAMP Response Element-Binding protein*); GC-C: gvanilat ciklaza C; GLUT1/4 - nosač za glukozu izoforme od 1 do 4 (engl. *Glucose Transporters 1-4*); MK - masne kiseline; NA - noradrenalin; Ucp-1 - bjelančevina za rasprezanje 1 (engl. *Uncoupling protein 1*)

Još jedan centralni učinak UGN-a je i aktivacija BAT-a. Ovo masno tkivo se aktivira nakon izlaganja hladnoći ili nakon unosa hrane što pridonosi povećanoj potrošnji energije koja nastaje za vrijeme termogeneze uzrokovane hranom. Aktivacijom BAT-a dolazi do povećanog ulaska glukoze i masnih kiselina u adipocite te stvaranja topline (Slika 14.) (296). Aktivnost BAT-a je regulirana simpatičkim živčanim sustavom, a što dovodi do njegove aktivacije još je tema znanstvene rasprave. Smatra se da je jedan od aktivatora BAT-a leptin, koji dovodi do pretvorbe bijelog masnog tkiva u BAT putem hipotalamičkih POMC neurona (297) te aktivira BAT inhibicijom hipotalamičke paraventrikularne jezgre (298). Međutim, s obzirom da lučenje leptina dosiže maksimalne vrijednosti tek 6 sati nakon najsnažnije termogeneze uzrokovane hranom te činjenice da miševi kojima nedostaje leptin nakon presađivanja BAT-a pokazuju smanjenje tjelesne mase i povećanu toleranciju na glukozu, očito je da on nije jedini čimbenik koji utječe na aktivnost BAT-a (299-302). Folgueira i sur. (303) pokazali su da dugotrajna i.c.v. primjena UGN-a uzrokuje smanjenje tjelesne mase, pretvorbu bijelog masnog tkiva u BAT i porast termogeneze. Pošto GC-C ne pokazuje izražaj u BAT-u, ali ga nalazimo u arkuatnoj jezgri hipotalamusa, učinak UGN-a na akutnu postprandijalnu aktivaciju BAT-a vjerojatno proizlazi iz aktivacije tih receptora, što je pokazano i.n. primjenom UGN-a kod miševa (251). Ova akutna regulacija aktivnosti BAT-a UGN-om je ovisna i o dobi i o spolu, kao što je pokazano i za aktivaciju BAT-a nakon obroka i kod ljudi (304).

1.5.2. Uloga u patofiziologiji

1.5.2.1. Kardiovaskularni sustav

Natriuretski peptidi su uključeni u patofiziološka zbivanja u kardiovaskularnom sustavu. Kod osoba sa zatajenjem srca povećavaju se plazmatske koncentracije svih opisanih natriuretskih peptida (ANP-a, BNP-a i CNP-a, pro-GN-a i pro-UGN-a) te je povećano izlučivanje UGN-a urinom (92,109,110, 305-307).

Iz dosadašnjeg izlaganja upoznali smo se s fiziološkim ulogama ANP-a u regulaciji krvnog tlaka pa je razumno pretpostaviti da će kod poremećaja u sintezi ANP-a ili funkciji GC-A doći do razvoja hipertenzije. Uistinu, miševi kojima nedostaje ANP imaju hipertenziju neovisnu o količini soli unesenoj prehranom (308). Do hipertenzije dolazi i kod miševa s nedostatkom enzima korin (Slika 3.) jer kao

posljedicu imaju sniženu koncentraciju ANP-a (309) dok je kod miševa kojima nedostaje GC-A hipertenzija popraćena srčanom hipertrofijom i fibrozom (310, 311). Mutacija u genu za korin dovodi do pojave hipertenzije, hipertrofije srca i smanjene količine natriuretskih peptida u ljudi i laboratorijskih životinja (312). Transgenični miševi s mutacijom u genu za korin imaju povišenu koncentraciju pro-ANP-a u srcu i razvijaju hipertenziju i srčanu hipertrofiju (313). Hipertenzija neovisna o količini unesene soli pokazana je i kod UGN KO miševa, koji imaju viši srednji arterijski krvni tlak u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (292).

Sukladno tome miševi kojima je pretjerano izražen BNP su hipotenzivni te pokazuju smanjenje krvnog tlaka od 20 mmHg zbog povećanja plazmatske koncentracije BNP-a 10 do 100 puta (95). Iako kod miševa kojima nedostaje BNP ne dolazi do hipertenzije, oni razvijaju fibrozne lezije na klijetkama (314). Uloga BNP-a u fiziologiji srca nije još u potpunosti razjašnjena, ali se sugerira da bi BNP mogao biti biljeg oštećenja srca nakon radioterapije kod pacijenata oboljelih od raka dojke (315). Naposljetku, miševi kojima nedostaje NPR-C su hipotenzivni jer je smanjena razgradnja ANP-a, BNP-a i CNP-a (316) te imaju blagu diurezu, izlučuju razrijeđenu mokraću što posljedično smanjuje volumen krvi što pridonosi razvoju hipotenzije (316).

U srcu, ANP/GC-A put inhibira nastanak srčane hipertrofije što je pokazano kod miševa kojima nedostaje GC-A. Ti miševi razvili su hipertrofiju srca čak i nakon cjeloživotnog liječenja antihipertenzivnim lijekovima (317). To upućuje na zaključak da GC-A inhibira razvoj hipertrofije srca neovisno o postojanju hipertenzije.

1.5.2.2. Urogenitalni sustav

Promjene u funkciji natriuretskih peptida zamijećene su u bubrežnim bolestima. Povećana koncentracija ANP-a i UGN-a u cirkulaciji vidljiva je kod nefrotskog sindroma (318, 319), ali koncentracija UGN-a u urinu je smanjena. Dugotrajni učinci ANP-a mogu dovesti do desenzitizacije GC-A i povećane reapsorpcije vode i natrija u bubrezima karakteristične za nefrotski sindrom (320). Mehanizam smanjene natriureze i diureze vjerojatno uključuje PDE V, čija povišena koncentracija je također zabilježena u nefrotskom sindromu (320). Plazmatske koncentracije GP-a također su povišene i kod osoba oboljelih od kroničnog zatajenja bubrega i glomerulonefritisa (144, 145) kod kojih su zamijećene i snižene razine korina u bubregu i urinu (321).

U reproduktivnom sustavu, UGN je izražen u korpus kavernozusu kod ljudi, te kao i ANP, aktivacijom GC-C-a dovodi do relaksacije, čime se ukazuje moguća primjena ovih peptida u liječenju erektilne disfunkcije (322). GP/GC-C signalni put nalazi se i u epididimisu u štakora te prostati u ljudi (130, 153). Aktivacija ANP-a korinom u reproduktivnom sustavu ženki pokazala se važnom za remodeliranje spiralnih arterija u maternici, te miševi kojima nedostaje korin tijekom trudnoće razvijaju simptome slične pre-eklampsiji (odgođena invazija trofoblasta, poremećaji u remodeliranju spiralnih arterija, trudnička hipertenzija i proteinurija) (323, 324). Nekoliko mutacija gena za korin potvrđeno je i kod ljudi, koje utječu na izražaj gena, post-translacijske preinake i proteinsku strukturu, i time dovode do pojave pre-eklampsije (325).

1.5.2.3. Koštani sustav

CNP/GC-B signalni put bitan je za stimulaciju rasta dugih kostiju. Zamijećeno je da tijekom intenzivnog razdoblja razvoja kosti, endogeni osteokrin se natječe za vezno mjesto s CNP-om i time dovodi do povećane koncentracije CNP-a u kostima (326). Prevelike koncentracije CNP-a koje dovode do pretjeranog rasta kostiju nalaze se i kod miševa kojima nedostaje NPR-C (316, 327).

Miševi kojima nedostaje CNP su patuljastog rasta jer ne dolazi do endohondralnog okoštavanja (328). Patuljasti rast uočen je i kod miševa kojima nedostaje GC-B zajedno s pojavom sterilnosti kod ženki (329). Endotelni CNP regulira krvni protok kroz distalne arteriole i kapilare i inhibira proliferaciju glatkih mišića žila (330).

1.5.2.4. Respiracijski sustav

GN izražen u plućima preko aktivacije GC-C receptora aktivira CFTR, što utječe na regulaciju prometa iona i vode u respiratornom epitelu. Nedostatna funkcija CFTR-a dovodi do proizvodnje guste sluzi koja blokira dišne puteve i uzrokuje pojavu najčešćih simptoma cistične fibroze te podrobnija istraživanja uloge GP-a na CFTR mogla bi dovesti do novih terapija za tu bolest (211, 331, 332). UGN dodatno relaksira trahealne mišiće i dovodi do smanjene proizvodnje sluzi u dišnim putevima te bi mogao imati primjenu u liječenju astme (333, 334).

1.5.2.5. Probavni sustav

Kao što je prethodno spomenuto, smatra se da je probavni sustav glavni izvor plazmatskog UGN-a. Kod pretilih adolescenata smanjen je izražaj UGN-a u probavnom sustavu, što bi moglo dovesti do smanjenja koncentracije plazmatskog UGN-a zamijećene kod pretilih ljudi i ljudi s dijabetesom tipa 2 (355, 356). Miševi kojima nedostaje leptin imaju smanjenu koncentraciju UGN-a koja se može vratiti na normalne vrijednosti primjenom leptina, što navodi na zaključak da bi leptin mogao utjecati na promjene u lučenju UGN-a u navedenim metaboličkim bolestima (274).

U gušterači štakora, ANP povećava otpuštanje inzulina te dovodi do inhibicije lučenja glukagona, vjerojatno preko cGMP signalne kaskade, inhibicije Ca^{2+} odgovora te G bjelančevina osjetljivih na pertusis toksin (337, 338). Stoga ne iznenađuje da su u šećernoj bolesti dokazane niske plazmatske koncentracije ANP-a te ljudi koji posjeduju mutaciju rs5068 na genu koji kodira ANP imaju manju vjerojatnost razvoja šećerne bolesti (339). Suprotno tome, više koncentracije ANP-a i slobodnih masnih kiselina povezane su s netolerancijom na glukozu i otpornosti na inzulin kod pacijenata s poremećenom funkcijom mitralnog zaliska te su potrebna daljnja istraživanja ovog fenomena (340).

Slično UGN-u, niske koncentracije ANP-a i BNP-a su također zabilježene u pretilosti, glavnog rizičnog čimbenika za nastanak šećerne bolesti (341). CNP, kao i ANP, pokazuje snižen izražaj kod pretilih adolescenata (342). Uzrok je vjerojatno pojačan izražaj NPR-C-a u adipocitima pretilih osoba, koji posljedično smanjuje koncentraciju natriuretskih peptida te osim pretilosti uzrokuje pojavu dijabetesa, hipertenzije i bolest nealkoholne masne jetre (343).

Uznapredovala ciroza jetre, popraćena nakupljanjem tekućine u peritonealnoj šupljini (ascites), još je jedan patofiziološki proces koji uključuje aktivnost natriuretskih peptida. Istraživanje na štakorima pokazalo je da nakon indukcije ciroze ugljikovim tetrakloridom dolazi do gotovo četverostrukog povećanja izražaja ANP-a u klijetkama, popraćenog povećanom koncentracijom ANP-a u krvi. Za razliku od fizioloških procesa, ovdje se ANP ne otpušta zbog rastezanja srčane stijenke već uključuje neki drugi, za sada nepoznat poticaj (344). Plazmatske koncentracije BNP-a su također povišene kod ciroze jetre, te se smatra da bi BNP mogao služiti kao biljeg mogućeg nadolazećeg smrtnog ishoda pacijenata koji boluju od te bolesti (345). S druge strane,

BNP pokazuje niži izražaj kod bolesti masne jetre, što je vjerojatno povezano s višim izražajem NPR-C-a u adipocitima (346).

Nedavna istraživanja ukazuju na moguću upotrebu natriuretskih peptida u liječenju karcinoma, posebice tumora probavnog sustava. Plazmatske koncentracije BNP-a povišene su kod osoba oboljelih od nekih oblika karcinoma, vjerojatno kao posljedica upalnog odgovora (347). Nadalje, UGN/GC-C signalni put povezan je s razvojem crijevnih tumora. Istraživanja pokazuju da UGN sprečava proliferaciju tumora debelog crijeva i dovodi do apoptoze tumorskih stanica (348). UGN djeluje aktivacijom GC-C-a, jer je pokazano da kod životinja kojima GC-C nedostaje dolazi do tumorogeneze (349), što je vjerojatno posljedica smanjene koncentracije cGMP-a i izostanka GC-C/cGMP kontrole nad staničnim ciklusom (350). UGN također inhibira rast stanica raka gušterače aktivacijom GC-C receptora. S obzirom da je GC-C pretjerano izražen u stanicama raka gušterače, a ne i kod kroničnog pankreatitisa, GC-C predstavlja potencijalni biljeg za razlikovanje ovih patoloških stanja nakon uzimanja bioptičkog materijala (351).

Do danas registrirani lijekovi su agonisti GC-C-a linaklotid i plekanitid. Linaklotid, sintetski analog GN-a i UGN-a, aktivira GC-C u crijevima djelujući lokalno te se ne resorbira u krv (352). Ovaj lijek se uspješno koristi u liječenju kronične konstipacije i sindroma iritabilnog crijeva (353). Plekanitid, sintetski analog UGN-a, također se koristi u liječenju tih poremećaja, međutim istraživanja na mišjem modelu tumora crijeva upućuju na njegovu moguću ulogu u liječenju raka debelog crijeva zbog njegovog učinka na ublažavanje kolitisa i usporavanja razvoja polipa crijeva u životinjskom modelu ove bolesti (354).

1.5.2.6. Središnji živčani sustav

1.5.2.6.1. Poremećaj pozornosti s hiperaktivnošću (ADHD)

Poznato je da je dopaminergički sustav srednjeg mozga uključen u razvoj poremećaja pozornosti s hiperaktivnošću (engl. *Attention deficit hyperactivity disorder*; ADHD) (355). Aktivacija GC-C-a UGN-om u dopaminergičkim neuronima srednjeg mozga pojačava učinke metabotropnih glutamatnih receptora 1 (mGlur1) i muskarinskih acetilkolinskih receptora (engl. *Muscarinic acetylcholine receptor;* mAchR) aktivacijom cGMP/PKG signalnog puta. Blokiranje nizvodnog signalnog puta

PKG-a poništava taj učinak dok kod životinja kojima nedostaje GC-C taj učinak u potpunosti izostaje (214). GC-C KO miševi pokazuju pojačanu količinu lokomotorne aktivnosti te visok stupanj impulzivnosti i ponašanja potrage za novitetima (engl. *Novelty-seeking behavior*). Navedeni oblici ponašanja su znatno umanjeni nakon primjene niskih doza (1 mg/kg) amfetamina, lijeka za ADHD kod ljudi, te su GC-C KO miševi predloženi kao životinjski model ADHD-a (214, 356).

1.5.2.6.2. Anksiozni poremećaji

Istraživanje na mužjacima štakora pokazalo je da centralna (primjena u centralnu amigdaloidnu jezgru) i periferna primjena ANP-a imaju anksiolitički učinak (357), vjerojatno inhibicijom otpuštanja kortikotropin-oslobađajućeg hormona u limbičkom sustavu (358). Stoga ne iznenađuje da je u osoba koje pate od učestalih napada panike razina ANP-a u plazmi snižena, a primjena ANP-a povoljno djeluje kod tog poremećaja (359, 360).

Anksiolitički učinak BNP-a i CNP-a pri različitim koncentracijama također je potvrđen kod životinja; takav učinak BNP-a moguće je poništiti primjenom antagonista β-adrenoreceptora ili muskarinskim kolinergičnim blokatorima dok se anksiolitički učinak CNP-a može spriječiti davanjem antagonista dopaminergičnog receptora te blokatora α- ili β-adrenoreceptora (361, 362).

Moguć je i utjecaj GC-C-a u anksioznim poremećajima. Anksioznost je češće prisutna kod žena nego muškaraca u ljudskoj populaciji te se njen intenzitet i pojavnost mijenjaju ovisno o fazi menstrualnog ciklusa. Istraživanje na miševima pokazalo je da kod porasta razine anksioznosti ženki divljeg tipa u diestrusu istodobno dolazi do pada izražaja GC-C-a u amigdali. GC-C KO ženke pokazuju povišen stupanj anksioznosti tijekom cijelog ciklusa, što navodi na zaključak da aktivacija GC-C-a ima anksiolitički učinak (216).

1.5.2.6.3. Migrena

Natriuretski peptidi i njihovi receptori izraženi su u kralježničnoj trigeminalnoj jezgri, periakveduktalnoj sivoj tvari, velikoj jezgri rafe te *locus coeruleus*-u (363-366), strukturama povezanima s osjetom boli tijekom napada migrene. Izražaj peptida povezanog s kalcitoninom, čija primjena može pokrenuti napad migrene, kolokalizira s izražajem BNP-a, GC-A i GC-B (367). Zanimljiva je činjenica da je glavobolja jedna od

nuspojava nesiritida, rekombinantnog oblika humanog BNP-a (368). Ljudi koji pate od migrene također imaju više koncentracije pro-BNP-a od zdravih ispitanika (369). Daljnja istraživanja su potrebna da bi pobliže rasvijetlila ulogu natriuretskih peptida u patologiji migrenskih napada.

1.5.2.6.4. Ishemijski moždani udar

Djelovanje natriuretskih peptida tijekom nastanka moždanog udara je kompleksno. Mutacije u genu koji kodira ANP u kombinaciji s određenim izoformama GC-A doprinose riziku nastajanja ishemijskog moždanog udara, te je postojanje točkaste mutacije T2238C povezana s četverostruko većom vjerojatnosti pojave ishemijskog moždanog udara (370). Postojanjem te mutacije dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih radikala, oštećenja endotela, kontrakcije glatkih mišića žila i povećanog nakupljanja trombocita. Mehanizam uključuje veći afinitet mutiranog ANP-a za vezanje za NPR-C od GC-A, što dovodi do smanjene koncentracije cAMP-a te snižene aktivnosti PKA (371). Osim navedene, mutacija u egzonu 1 gena koji kodira ANP povezana je s dvostruko većom vjerojatnosti nastanka ishemijskog moždanog udara, dok takva mutacija u genu za BNP nije nađena kod ljudi (372).

ANP sudjeluje u patofiziološkim promjenama tijekom ishemijskog moždanog udara na način da povećava permeabilnost moždanih kapilara i njegov izražaj je pojačan u astrocitima peri-ishemijskog područja (373-375). Suprotno tomu, istraživanja pokazuju da ANP dovodi do smanjenja područja zahvaćenih edemom (376, 377) najvjerojatnije inhibicijom bradikinina što dovodi do razvoja manje ishemijske lezije kod miševa (378).

Zaštitna uloga ANP-a u moždanom udaru primijećena je i kod spontano hipertenzivnih štakora, gdje inhibicija neprilisina (neutralna endopeptidaza; NEP) dovodi do povećane koncentracije ANP-a i sprečavanja nastanka moždanog udara (379). Šireća kortikalna depresija (engl. *Cortical spreading depression*) je neuroprotektivni proces koji štiti od razvoja ishemijskog udara, te ANP mRNA pokazuje dugotrajno viši izražaj u korteksu štakora nakon indukcije kortikalne depresije (380).

Plazmatske koncentracije ANP-a i BNP-a kod ljudi su povišene nakon ishemijskog moždanog udara te su mogući pokazatelj vjerojatnosti smrtnog ishoda

(381, 382). Pokazano je da odgođena primjena ANP-a nakon hemoragijskog moždanog udara dovodi do smanjenja intersticijskog edema kod štakora (377) vjerojatno posredovano inhibicijom bradikinina. Nadalje, primjena BNP-a u životinjskom modelu ishemijskog moždanog udara dovela je do smanjenog razvoja lezije i boljeg funkcionalnog oporavka u usporedbi s kontrolnim životinjama (383).

Snižene serumske koncentracije korina pronađene su nakon ishemijskog i hemoragijskog moždanog udara kod muškaraca i žena (384) i povezane su s većim rizikom razvoja težih oblika invaliditeta (372). Kako bi smanjena funkcija korina dovela do smanjene koncentracije ANP-a i BNP-a, uloga ovog enzima u nastanku moždanog udara tek treba biti objašnjena.

Dosadašnja istraživanja GC-A i GC-B receptora i njihovih agonista ukazuju na njihov utjecaj na rizik nastanka te razvoj i posljedice ishemijskog moždanog udara. Djelomično su razjašnjeni i mehanizmi njihovog djelovanja te signalni putevi i enzimi za razgradnju putem kojih djeluju. Međutim, do danas nije istraženo ima li urogvanilin ikakav učinak na razvoj ishemijske ozljede te, ukoliko je odgovor potvrdan, da li je taj utjecaj posljedica aktivacije GC-C ovisnog ili neovisnog signalnog puta. Stoga je svrha ove doktorske disertacije utvrditi moguću ulogu UGN-a kao agonista GC-C-a na razvoj i veličinu moždanog udara, odrediti moguće stanične mehanizme te ulogu GC-C neovisnog signalnog puta.

2. HIPOTEZA

Urogvanilin štetnim djelovanjem putem GC-C-ovisnog i/ili GC-C-neovisnog signalnog puta sudjeluje u razvoju ishemijskog moždanog udara.

3. CILJEVI RADA

OPĆI CILJ:

Cilj ovog istraživanja je istražiti ulogu urogvanilina i njegovih signalnih puteva u razvoju ishemijskog moždanog udara.

Specifični ciljevi ove doktorske disertacije su:

1. Odrediti veličinu lezije i edema i procijeniti neurološko oštećenje u životinja s moždanim udarom kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na divlji tip životinja,

2. Odrediti postoji li razlika u arterijskom tlaku (sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak) u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na divlji tip životinja,

3. Odrediti izražaj GC-C receptora na histološkim rezovima hemisfera s moždanim udarom u odnosu na neoštećenu hemisferu mozga divljeg tipa životinja,

4. Odrediti razliku u aktivaciji GC-C-neovisnog, Ca^{2+}-ovisnog, signalnog puta u oštećenoj i neoštećenoj hemisferi životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN s moždanim udarom u odnosu na divlji tip životinja,

5. Na primarnoj kulturi stanica korteksa velikog mozga u hipoksijskim uvjetima različite dužine trajanja odrediti izražaj GC-C-a u astrocitima i neuronima.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. MODELI KORIŠTENI U POKUSIMA

Ovo istraživanje bilo je provedeno na životinjama i na staničnoj kulturi. Životinje koje su bile korištene u ovom istraživanju su mužjaci miševa starosti između 6 i 9 mjeseci sojeva C57Bl/6NCrl te miševi iz istog legla (engl. *Littermates*) kojima nedostaju GC-C ili UGN. Oni imaju istu genetsku podlogu kao korišteni divlji tip životinja osim što im nedostaje bjelančevina od interesa. Primarna stanična kultura moždanih stanica kore velikog mozga bila je izolirana iz korteksa mozgova novookoćenih mladunaca soja C57Bl/6NCrl.

4.1.1. Životinje

Za potrebe ovog istraživanja bili su korišteni muški miševi triju mišjih linija: divlji tip soja C57Bl/6NCrl te miševi kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) ili UGN (UGN KO) izrađeni na genetskoj podlozi korištenog divljeg tipa životinja. Svi miševi bili su stari između 6 i 9 mjeseci (29,7 ± 0,7 tjedana) u trenutku izvođenja pokusa. Miševi kojima nedostaje GC-C donacija su dr. Kris Steinbrecthera (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, OH, SAD) (248), dok su miševi kojima nedostaje UGN donacija prof. dr. Anjaparavande P. Narena (Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, SAD) (292).

Životinje su bile uzgojene u Nastambi za pokusne životinje (HRPOK-006) Instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te su bile smještene u uvjetima 12/12 satnog režima (dan/noć) uz *ad libitum* pristup vodi i standardnoj hrani za glodavce, osim ako nije drugačije naznačeno u opisu izvedene metode. Životinje su do korištenja u pokusu bile grupno smještene u kavezima unutar pravilno ventilirane prostorije uz održavanje stalnih okolišnih uvjeta (temperatura: 24 ± 1°C; vlaga 53 ± 1%).

Za potrebe izvođenja ovog istraživanja, donirani homozigoti kojima nedostaje GC-C ili UGN bili su spareni s divljim sojem miševa (C57Bl/6NCrl soj). Dobivene jedinke su bile heterozigoti za GC-C odnosno UGN (F1 generacija). Heterozigotne životinje su bile križane međusobno, te su njihovi potomci (F2 generacija) odgovarajućeg genotipa nakon provedene genotipizacije bili korišteni u daljnjim

pokusima. Ovim postupkom bio je osiguran visoki stupanj genetičke sličnosti između životinja iz istog legla i posljedično dobivanje pouzdanih rezultata istraživanja (385).

4.1.1.1. Izolacija DNA

Na početku procesa genotipizacije tj. određivanja genotipa životinja koje smo koristili u ovom istraživanju, bio je uzet vršak repa svake životinje. Dobiveno tkivo repa svake životinje bilo je inkubirano preko noći na 56°C u otopini: 50 mM tris(hidroksimetil)aminometan (pH = 8,0) (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD), 100 mM etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA; Sigma-Aldrich Corporation), 100 mM NaCl (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Njemačka), 1% natrijev dodecil sulfat (Carl Roth GmbH), 1% (10 mg/mL) proteinaza K (Promega, Madison, WI, SAD). Uzorci su potom bili centrifugirani (20 minuta, 12 000 g), a nadtalog odvojen. Uzorku je bilo dodano 500 µL izopropanola (Carl Roth GmbH) nakon čega je uzorak ponovno bio centrifugiran (5 minuta, 12 000 g) kako bi se istaložila DNA. Istaložena genomska DNA (gDNA) bila je isprana 70%-tnim etanolom i kratko centrifugirana, nakon čega je višak etanola bio odliven te je uzorak bio stavljen na sušenje (37°C). Nakon što je sav etanol ispario iz uzorka, gDNA je otopljena u sterilnoj vodi (postupak otapanja potpomognut je dodatnom inkubacijom uzorka 30 minuta na 70°C). Uzorci su držani na +4°C do korištenja.

Tablica 3. Sekvence početnica za genotipizaciju životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN.

	Početnice	Sekvenca	Veličina produkta
GC-C	WT-S	5' CTT TCG CAC TAT GTC CAG 3'	500 pb
	WT-AS	5' GTG ATG TGT CAC AAA CGG 3'	
	KO-S	5' TGG ATG TGG AAT GTG TGC 3'	285 pb
	KO-AS	5' TCA ACC AAG CTG TAT CCC 3'	
UGN	WT-S	5' CCT CCA GTG AGC ACA AAG GT 3'	397 pb
	WT-AS	5' AAC CCA GAG GTG TGA GCT TG 3'	
	KO-S	5' GCT ATC AGG ACA TAG CGT TGG 3'	450 pb
	KO-AS	5' CAA GGC TGG TCT TTC CGC 3'	

S - nizvodno (lanac koji se koristi kao kalup za sintezu bjelančevina, engl. *Sense*); AS - uzvodno (kompatibilini lanac DNA, engl. A*ntisense*), WT - divlji tip (engl. *Wild type*); GC-C - gvanilat ciklaza C; UGN - urogvanilin

4.1.1.2. Lančana reakcija polimerazom

Nakon izolacije DNA bila je provedena lančana reakcija polimerazom (eng., *Polymerase chain reaction*, PCR). Cilj ovog postupka je bio odrediti genotip životinja F2 generacije i odabrati homozigotne životinje koje će se koristiti dalje u pokusima, bilo one divlji tip ili životinje kojima nedostaje GC-C ili UGN. Početnice koje su bile korištene za umnažanje regije od interesa nalaze se u tablici 3. Početnice koje su se koristile za genotipizaciju životinja kojima nedostaje GC-C kupljene su od tvrtke Microsynth (Microsynth AG, Balgach, Švicarska), a za genotipizaciju životinja kojima nedostaje UGN od Metabion International (Metabion International AG, Planegg, Njemačka). Reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 µL sastojala se od: 1 µL uzorka gDNA, 1 µL (10 pM) svake od početnica (dva para, ukupno 4 µL), 0,5 µL (10 mM) smjese nukleotida (Qiagen, Hilden, Njemačka), 5 µL reakcijskog pufera (Promega), 1 µL (25 mM) $MgCl_2$ (Promega), 0,125 µL (5U/µL) DNA polimeraze (Promega) i 13,375 µL sterilne vode. Broj ciklusa koji su bili korišteni nalaze se u tablici 4.

Tablica 4. Protokol lančane reakcije polimerazom.

	GC-C			UGN		
Korak	**Temp.**	**Trajanje**	**Broj**	**Temp.**	**Trajanje**	**Broj**
1.	95°C	2 min	1x	95°C	2 min	1x
2.	95°C	30 s		95°C	30 s	
3.	61°C	30 s	35x	63°C	30 s	30x
4.	72°C	45 s		72°C	45 s	
5.	72°C	7 min	1x	72°C	7 min	1x
6.	4°C	∞	1x	4°C	∞	1x

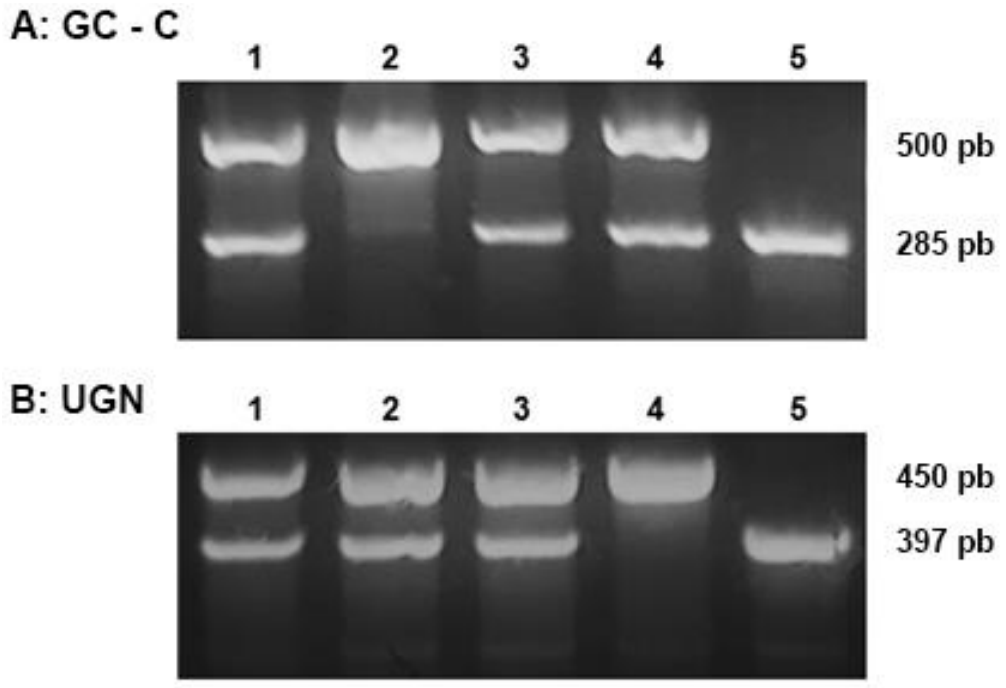
GC-C - gvanilat ciklaza C; UGN - urogvanilin

4.1.1.3. Elektroforeza na agaroznom gelu

Umnoženi ulomci gDNA elektroforetski su razdvojeni na agaroznom gelu nakon čega je analiziran položaj dobivenih produkata u odnosu na kontrolu. Kao kontrola korištena je smjesa DNA ulomaka poznatih veličina (DirectLoad™; Sigma-Aldrich Corporation). Ukratko, agaroza (1,8%; Carl Roth GmbH) otopljena je kuhanjem u tris-borat-EDTA puferu (ROTIPHORESE®, Carl Roth GmbH). Otopini je dodano 2,5 µL boje za vizualizaciju nukleinskih kiselina (ROTI®GelStain Red, Carl Roth GmbH) nakon čega je izlivena u kalup za izradu gela (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, SAD). U tekući gel umetnuti su češljići i pušten je da se ohladi do

sobne temperature. Gel je potom postavljen u uređaj za elektroforezu (Bio-Rad Laboratories, Inc.) u koji je dodan tris-borat-EDTA pufer do oznake na uređaju. 10 µL umnoženih DNA ulomaka svakog uzorka dodano je u jažice gela. Naposljetku je dodan biljeg veličine DNA (5 µL; Sigma-Aldrich Corporation). Sustav je spojen na izvor napajanja (PowerPac™, Bio-Rad Laboratories, Inc.) koji je potom namješten na 100 V. Nakon 40 – 50 minuta gel je postavljen u transiluminator (Elchrom Scientific AG, Cham, Švicarska) i očitani su rezultati elektroforetskog razdvajanja DNA ulomaka.

Ulomci dobiveni umnažanjem gDNA s GC-C setom početnica bili su dugi 285 parova baza (pb) ukoliko se radilo o životinji kojoj nedostaje GC-C, odnosno 500 pb ako se radilo o divljem tipu miša. Kod heterozigotnih životinja, primijećena su dva produkta PCR reakcije i takve su životinje isključene iz daljnjih pokusa (Slika 15.). Korištenjem UGN seta početnica dobiveni su ulomci od 450 pb kod životinja kojima nedostaje UGN dok je kod divljeg tipa životinja iz istog legla dobiveni produkt PCR reakcije bio veličine 397 pb.



Slika 15. Karakterizacija genotipova. A – određivanje homozigotnih životinja za izvođenje istraživanja bilo da su to životinje kojima nedostaje GC-C ili divlji tip životinja iz istog legla. Uzorci označeni 1, 3 i 4 su dobiveni od heterozigotnih životinja, uzorak označen s 2 je dobiven od divljeg tipa životinje, a uzorak označen s 5 je dobiven od životinje kojoj je nedostajao GC-C. B - određivanje homozigotnih životinja bilo da su to životinje kojima nedostaje UGN ili divlji tip životinja iz istog legla. Uzorci označeni od 1 do 3 su dobiveni od heterozigotnih životinja, uzorak 4 od životinje kojoj nedostaje UGN te uzorak 5 od životinje divljeg tipa. pb - parovi baza; GC-C - gvanilat ciklaza C; UGN - urogvanilin

4.1.2. Primarna stanična kultura kortikalnih stanica mozga

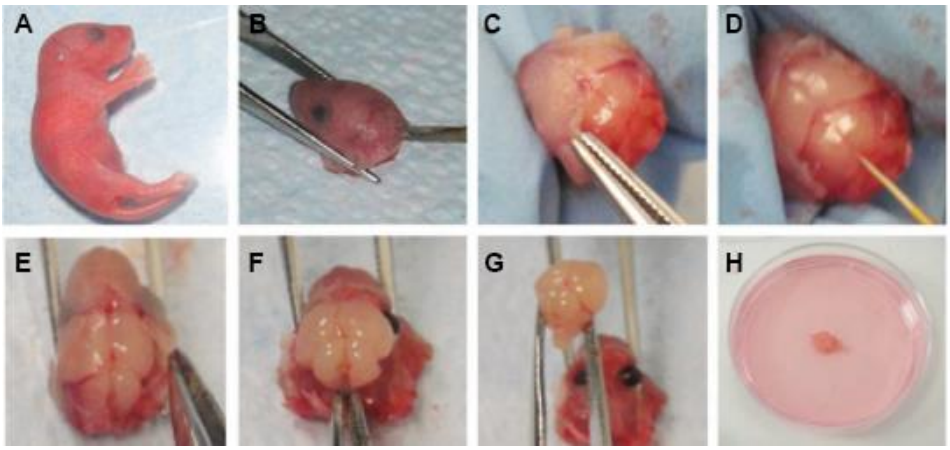
Stanična kultura korištena u ovom istraživanju je bila miješana primarna kultura stanica korteksa velikog mozga izolirana iz mozgova novookoćenih mladunaca C57Bl/6NCrl soja miševa. Sve kemikalije koje su bile korištene prilikom izolacije i održavanja stanične kulture su nabavljene od Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Corporation), osim ako nije drugačije navedeno.

Puferska i enzimska otopina su pripremljene prije početka izolacije mozga. Puferska otopina na bazi Hankove otopine soli (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*; HBSS) napravljena je otapanjem 1M 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetansulfonske kiseline (engl. *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*; HEPES; Carl Roth GmbH), 5 mL/L Penicilin/Streptomicina (10 000 U/mL Penicilin, 10 000 µg/mL Streptomicin), 100 mM natrijevog piruvata i 15% destilirane vode u HBSS otopini. Enzimatska otopina za razgradnju tkiva bila je napravljena otapanjem 1,65 µM L-cisteina, 50 mM EDTA (pH=7,4) i 1M $CaCl_2$ (Kemika d.d., Zagreb, Hrvatska) u HBSS otopini uz dodatak 2% enzima papain izoliranog iz biljke *Carica papaya* i 10% enzima deoksiribonukleaza I (DNaza I). Pripremljena je otopina bila filtirana kroz filter s porama 5 µm (Sterifix® Pury; B. Braun Adria d.o.o., Zagreb, Hrvatska) radi uklanjanja mogućih zagađenja (bakterije, gljivice i sl.) te držana na ledu do korištenja.

Prije početka izolacije mozga bile su pripremljene i petrijeve zdjelice (Falcon™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) za nasađivanje stanica. Okrugle staklene pokrovnice prebrisane su 70%-tnim etanolom te izložene otvorenom plamenu kako bi se osigurala njihova sterilnost. Tako pripremljene staklene pokrovnice (Φ 15 mm; Ru-Ve d.o.o., Sveta Nedjelja, Hrvatska) položene su na dno petrijevih zdjelica i puštene da se ohlade, nakon čega su prelivene otopinom poli-D-lizina (0,1 mg/mL; PDL). Dva sata nakon, PDL je temeljito ispran sterilnom vodom.

Na dan okota, mladunci su odvojeni od majke u zaseban kavez i držani na zagrijanoj podlozi (37°C) do trenutka izolacije. Prije upotrebe, pribor za disekciju i operacijski stol dezinficirani su 70%-tnim etanolom. Životinja je dekapitirana prema smjernicama Institucionalnog odbora za njegu i uporabu životinja (engl. *Institutional Animal Care and Use Committee*; IACUC) (386). Lubanja je otvorena škaricama, a mozak je brzo izvađen i prebačen u petrijevu zdjelicu s ledeno hladnom HBSS

otopinom (Slika 16. prikazuje slike iz rada Beaudoin i sur., 2012, čija metoda je korištena u ovom istraživanju). Prvo su odstranjeni mali i srednji mozak, nakon čega su pincetom pažljivo uklonjene moždane ovojnice. Potom su moždane hemisfere razdvojene i uklonjen je hipokampus, ostavljajući samo tkivo korteksa. Izolirani korteksi premješteni su u petrijevu zdjelicu sa svježom HBSS otopinom i držani na ledu do sljedećeg koraka.



Slika 16. Izolacija mozga novookoćenog miša. Mladunac je položen na podlogu (A) i dekapitiran u kratkom roku (B). Nakon uklanjanja kože (C), napravljen je longitudinalni rez na lubanji s dorzalne strane (D). Nakon otvaranja lubanje (E), mozak je izvađen (F) te premješten u petrijevu zdjelicu s ledeno hladnom HBSS otopinom (G i H). Prilagođeno prema (387).

Izrada primarne miješane kulture stanica korteksa velikog mozga prilagođena je prema već opisanoj metodi (388, 389). Ukratko, hemisfere su nakon vađenja mozga prebačene u enzimsku otopinu za razgradnju tkiva i inkubirane 30 minuta na 37°C u termo-treskalici (VWR International, LLC., Radnor, PA, SAD). Po završetku enzimske razgradnje, otopina je uklonjena te je tkivu dodan medij za nasađivanje u kojem je tkivo inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi. Medij za nasađivanje dobiven je otapanjem 5% seruma goveđeg fetusa (engl. *Fetal bovine serum*; FBS), 1% L-alanil-L-glutamina (GlutaMax™; Thermo Fisher Scientific), 2% dodatka B-27 (Thermo Fisher Scientific) i 5 mL/L Penicilin/Streptomicina u neurobazalnom mediju (Thermo Fisher Scientific). Po završetku inkubacije, tkivo je isprano dva puta s 10 mL HBSS otopine. Nakon ispiranja, višak otopine je uklonjen, a tkivo je ostavljeno u 2 mL otopine, koja je nježno triturirana do dobivanja homogene suspenzije stanica. Suspenzija stanica nanesena je na pokrovnice smještene u petrijeve zdjelice u kojima se nalazio ugrijani medij za nasađivanje stanica. Posude su potom premještene u inkubator Binder CB150 (37°C, 5% CO_2/95% zrak) (Binder GmbH, Tuttlingen, Njemačka) te su ostavljene preko noći kako bi se omogućilo stanicama da

se prime za podlogu. Svi koraci nakon enzimske razgradnje tkiva, kao i priprema svih korištenih otopina, obavljeni su u laminarnom zaštitnom uređaju (MSC-Advantage™, Thermo Fisher Scientific).



Slika 17. Primarna kultura stanica korteksa velikog mozga. Na slici crne strelice pokazuju diferencirane neurone, dok bijele strelice astrocite.

Sljedeći dan pripremljen je medij za uzgoj stanica istog sastava kao medij za nasađivanje osim što ne sadrži FBS. Nakon što je medij izmijenjen, stanice su ponovno vraćene u inkubator. Istraživanje smo proveli na stanicama nakon što je postignut željeni stupanj staničnog razvoja, 6,4 ± 0,51 dana nakon izolacije (Slika 17.).

4.2. ISHEMIJSKO OŠTEĆENJE MOZGA

Za izazivanje ishemijskog moždanog udara koristili smo metodu začepljenja srednje moždane arterije (engl. *Middle cerebral artery occlusion*; MCAO). Ova metoda je detaljno opisana u radu Dobrivojević i sur., 2016., a ovdje će biti ukratko opisana (378). U ovom dijelu istraživanja korišteni su mužjaci miševa i to životinje kojima nedostaje GC-C i divlji tipovi miševa iz istog legla (engl. *Littermates*) te životinje kojima nedostaje UGN i njihovi divlji tipovi.

Prije početka operacije, mišu je injicirano i.p. 0,2 mL fiziološke otopine (0,9% sterilna fiziološka otopina, Pliva d.o.o., Zagreb, Hrvatska) i analgetik buprenorfin (0,05 mg/kg; Buprenovet, Bayer AG, Leverkusen, Njemačka). Miš je postavljen u komoru za indukciju anestezije s 4%-tnim protokom izoflurana (Isofluran, Abbott Laboratories Ltd., Maidenhead, UK) u smjesi 30% kisika/70% zraka (Slika 18.). Anesteziranа životinja položena je bočno na grijaču podlogu (37°C) i na njušku joj je namještena maska za anesteziju sa smanjenim dotokom izoflurana na 1,5%. Na oči

je zatim nanesen lubrikant (Recugel, Bausch + Lomb, Laval, Kanada) kako bi se spriječilo isušivanje rožnice tijekom operacije. Operacija je izvedena pod biomikroskopom ZEISS Stemi DV4 SPOT (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Njemačka) uz korištenje hladnog izvora svjetla (KL 1500 LCD Light Source, Schott AG, Mainz, Njemačka).

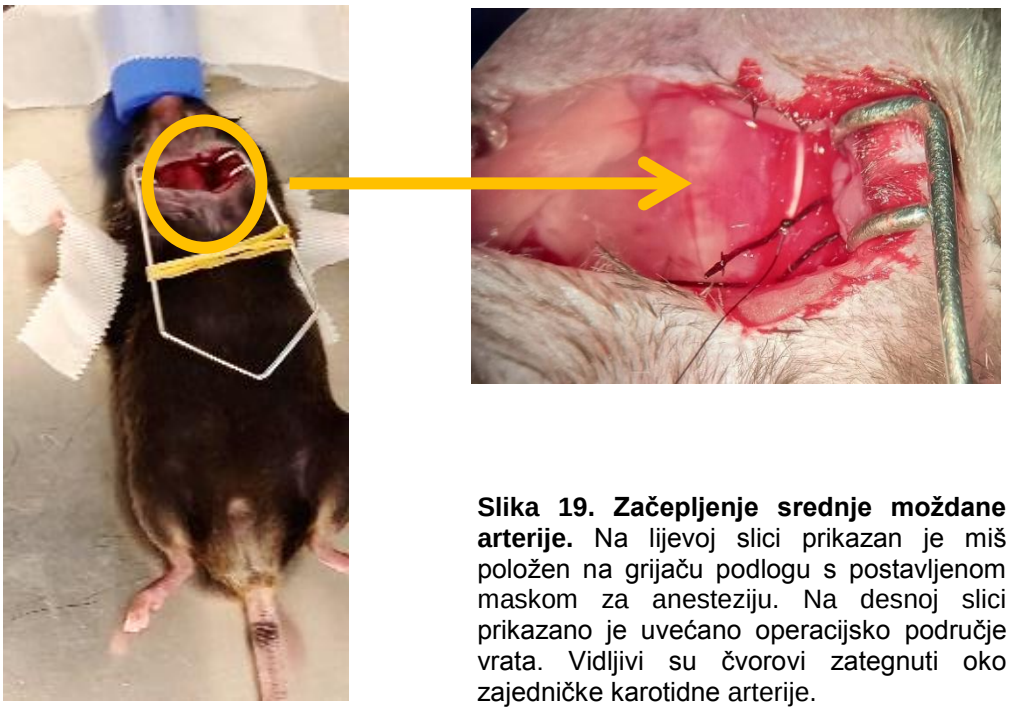


Slika 18. Sustav za anesteziju i stol za izvođenje operacije začepljenja srednje moždane arterije.

Nakon šišanja dlake i dezinfekcije kože 70%-tnim etanolom, napravljen je rez u desnom sljepoočnom mišiću između oka i uha životinje (rostralni dio sljepoočne regije, dorzalno od retroorbitalnog sinusa). Miš je potom položen na leđa i na mjestu reza namještena je i učvršćena laserska sonda (Φ 1 mm). Pomoću sonde mjerene su promjene krvnog protoka u srednjoj moždanoj arteriji uređajem za praćenje perfuzije laserskom doppler metodom (Moor Instruments, Axminster, UK). Rezultati su prikazani kao jedinica fluksa laserskog dopplera (engl. *Laser doppler flux units*; LDFU).

Nakon ponovnog šišanja dlake i dezinfekcije kirurškog polja 70%-tnim etanolom, napravljen je rez u središnjoj liniji vratnog područja (Slika 19.). Žlijezde slinovnice i sternokleidomastoidni mišići odmaknuti su u stranu kako bi zajednička, unutarnja i vanjska karotidna arterija bile vidljive. Zajednička karotidna arterija bila je izdvojena od okolnog tkiva te su korištenjem monofilamentnog konca debljine 6-0 (Dafilon, B. Braun Surgical SA, Barcelona, Španjolska) bila postavljena dva čvora neposredno uz račvište zajedničke karotidne arterije. Unutarnja karotidna arterija privremeno je bila zatvorena pomoću samozatvarajuće Dumont pincete br. 7 (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Njemačka). Nakon toga, na zajedničkoj karotidnoj arteriji, između postavljenih čvorova napravljen je mali rez kroz koji je u žilu uvedena

monofilamentna nit obložena silikonom debljine 6-0 (Doccol Corporation, Sharon, MA, SAD). Monofilamentna nit gurnuta je do račvišta u početnom dijelu unutarnje karotidne arterije te, nakon uklanjanja pincete, progurana do početnog dijela srednje moždane arterije. Nit je potom čvorom učvršćena na mjestu, a rana je privremeno zatvorena pričvrsnim spajalicama.



Slika 19. Začepljenje srednje moždane arterije. Na lijevoj slici prikazan je miš položen na grijaču podlogu s postavljenom maskom za anesteziju. Na desnoj slici prikazano je uvećano operacijsko područje vrata. Vidljivi su čvorovi zategnuti oko zajedničke karotidne arterije.

Nakon uvođenja monofilamentne niti, životinja je premještena u grijani kavez gdje se probudila iz anestezije. Sat vremena nakon, miš je ponovno anesteziran kao što je prethodno opisano i postavljen na operacijsku podlogu. Pričvrsne spajalice su potom uklonjene i monofilamentna nit je pažljivo izvučena kako bi se omogućila reperfuzija tkiva. Rana je zatim zatvorena koncem debljine 4-0 i premazana otopinom joda (Betadine 10%, Alkaloid d.o.o., Zagreb, Hrvatska) radi dezinfekcije i pospješivanja zarastanja. Postoperativno je mišu aplicirana i.p. injekcija 0,2 mL fiziološke otopine za sprečavanje dehidracije i 0,1 mL buprenorfina za analgeziju. Nakon operacije, životinja je stavljena u kavez u kojem su na dno kaveza postavljeni voda i omekšana hrana kako bi se životinji olakšalo hranjenje tijekom oporavka od operacije.

Operaciju izazivanja ishemijskog moždanog udara izveli smo na 40 miševa. Od toga 15 životinja isključeno je iz daljnjih faza istraživanja jer: a) nisu razvile moždani udar zbog neuspjele operacije (n = 3), b) razvile su hemoragijski oblik

moždanog udara, vjerojatno zbog greške kirurga (n = 2) ili c) došlo je do smrtnog ishoda unutar 24 sata od izvođenja operativnog zahvata (n = 10). Kod preostalih životinja (n = 25) uspješnost operacije potvrđena je snimanjem magnetnom rezonancom (MR) kojom se vidjela ishemijska lezija u području kore, strijatalnog područja i hipokampusa.

4.3. SNIMANJE MAGNETNOM REZONANCOM (MR)

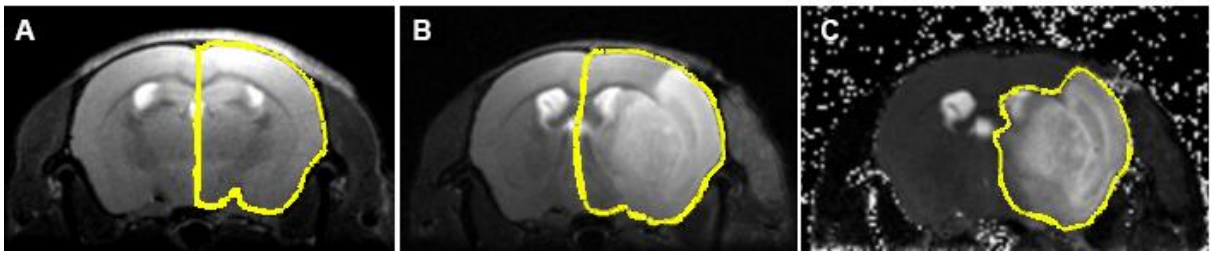
U ovom istraživanju svaka životinja je snimana dvaput. Prvo snimanje je provedeno prije MCAO operacije (PS - početno stanje) kako bi se odredio volumen ipsilateralne (hemisfera zahvaćena ishemijskim moždanim udarom) i kontralateralne (nezahvaćene) hemisfere. Drugo snimanje bilo je provedeno 24 sata nakon MCAO-a kako bi se ponovno izmjerili volumeni hemisfera te omogućilo određivanje veličine nastalog ishemijskog oštećenja i veličine edema.



Slika 20. Uređaj za snimanje magnetnom rezonancom. Pretklinički Bruker Biospec 70/20 USR uređaj s magnetskim poljem snage 7 T za snimanje magnetnom rezonancom, smješten u Laboratoriju za regenerativnu neuroznanost Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Snimanje je provedeno pretkliničkim Bruker Biospec 70/20 USR uređajem magnetskim poljem snage 7 tesla (Slika 20.) uz korištenje programa Paravision 6.0.1 (Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Njemačka). Životinje su anestezirane izofluranom (Abbott Laboratories Ltd.) u smjesi 30% kisika/70% zraka kao što je prethodno opisano. Nakon uvođenja u anesteziju, životinja je postavljena na grijani držač s njuškom unutar inhalacijske maske. Prije početka snimanja životinji je nanesen lubrikant (Recugel, Bausch + Lomb) kako bi se spriječilo isušivanje rožnica. Tjelesna temperatura održavana je u uskom rasponu (36,5 - 37,5°C) pomoću rektalne temperaturne probe (Medres Medical Research, GmbH, Koln, Njemačka)

spojene na ugrađeni sustav za cirkulaciju tople vode kroz grijanu podlogu na kojoj se nalazila životinja. Sustavom za nadzor vitalnih funkcija nadziran je respiratorni ciklus putem optičke probe (Medres Medical Research GmbH).



Slika 21. Snimke magnetne rezonance (MR) mišjeg mozga snimljene prije i nakon izazivanja moždanog udara. A) MR snimka vezana na T2 parametre snimljena prije izazivanja ishemijskog moždanog udara. Ipsilateralna hemisfera obrubljena je žutom linijom. B) MR snimka vezana na T2 parametre snimljena 24 sata nakon izazivanja moždanog udara. Ipsilateralna hemisfera obrubljena je žutom linijom. Ishemijska ozljeda vidljiva je kao svjetlije područje unutar hemisfere. C) T2 mapa mišjeg mozga sa žutom linijom označenim područjem zahvaćenim ishemijskom ozljedom.

Nakon što je miš postavljen u predviđeno postolje, ono je postavljeno u središte radiofrekventne zavojnice i umetnuto u otvor uređaja. Tijekom MR snimanja korištene su dvije frekvence. Snimke vezane na T2 parametre (engl. *T2-weighted images*) izrađene su u frontalnoj ravnini pomoću RARE sekvence (engl. *Rapid acquisition with Relaxation Enhancement*) s vremenom 33 ms odjeka/3000ms vremenom ponavljanja, veličinom matrice 166x100, vidnim poljem 16x10 mm^2, debljinom snimke 0,4 mm, udaljenosti između snimki 0,1 mm i ukupnim brojem snimki od 25. T2 mape izrađene su putem sekvence s višestrukim odjekom i spinom, vremenom 8 ms odjeka/3500 ms vremenom ponavljanja, veličinom matrice 128x80, vidnim poljem 16x10 mm^2, debljinom snimke 0,4 mm, udaljenosti između snimki 0,1 mm i ukupnim brojem snimki od 25. Početnu obradu podataka proveli smo programom Paravision 6.0.1 (Bruker BioSpin GmbH), nakon čega smo proveli volumetrijsku analizu hemisfera, ishemijske lezije i edema pomoću programa ImageJ 1.53i (Slika 21.) (Wayne Rasband National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Volumetrijsku analizu hemisfera prije i 24 sata nakon ishemijskog moždanog udara proveli smo iz podataka dobivenih iz MR snimki vezane na T2 parametre. Veličinu ishemijske lezije izračunali smo iz T2 mapi. Po završetku snimanja svake životinje, snimke su bile kodirane te je njihova analiza provedena bez spoznaje o genotipu životinje. Veličinu edema izračunali smo i prikazali kao postotak povećanja volumena ipsilateralne hemisfere 24 sata nakon MCAO-a s obzirom na početni volumen iste hemisfere prije izazivanja moždanog udara.

4.4. MJERENJE KRVNOG TLAKA

Krvni tlak smo izmjerili 40 životinja i to:

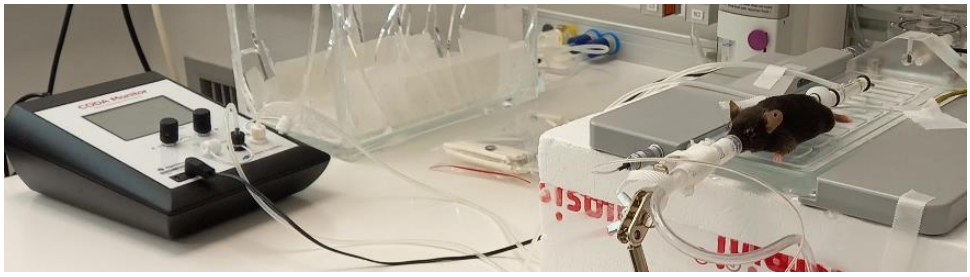
a) životinjama čiste linije miševa:

1. C57Bl/6NCrl soj (divlji tip, WT, eng., *Wild type*; n = 6),
2. miševi kojima nedostaje GC-C (GC-C KO; n = 5),
3. miševi kojima nedostaje UGN (UGN KO; n = 6),

b) životinjama iz istog legla:

1. koje posjeduju GC-C (GC-C WT; n = 6),
2. kojima nedostaje GC-C (GC-C KO; n = 6),
3. koje posjeduju UGN (UGN WT; n = 5),
4. kojima nedostaje UGN (UGN KO; n = 6).

Životinje smo prenijeli u laboratorij dan prije izvođenja pokusa kako bi se prilagodile novom okolišu. Prije početka mjerenja, životinje su anestezirane 4%-tnim izofluranom (Abbott Laboratories Ltd.) u smjesi 30% kisika/70% zraka kako je prethodno opisano. Anestezirane životinje su potom premještene na grijaču podlogu gdje im je postavljena inhalacijska maska za anesteziju. Anestezija je održavana s 1,4 - 1,8%-tnim izofluranom (Abbott Laboratories Ltd.). Stopa disanja praćena je tijekom cijelog postupka i tjelesna temperatura održavana je u uskom rasponu (36,5 - 37,5°C). Životinjama je na oči nanesen lubrikant (Recugel, Bausch + Lomb) kako bi se spriječilo isušivanje oka tijekom anestezije.



Slika 22. Sustav za neinvazivno mjerenje krvnog tlaka. Anestezirani miš položen je na grijaču podlogu i na njušku mu je namještena inhalacijska maska. Manžetu za snimanje postavili smo na rep i spojili s mjernim uređajem za neinvazivno mjerenje krvnog tlaka.

Krvni tlak smo mjerili neinvazivnom metodom pomoću repne manžete spojene na Coda Monitor Noninvasive Blood Pressure System (Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, SAD) (Slika 22.). Postupak je bio izveden prema preporuci proizvođača, opisanog u radu Zhao i sur. iz 2011 (390). Ukratko, prije početka snimanja, u programu smo odredili sljedeće početne parametre: 5 ciklusa prilagodbe

i 15 ciklusa mjerenja s pauzom od 5 s između ciklusa. Vrijeme ispuhivanja manžete tijekom mjerenja bilo je namješteno na 20 s uz minimalan volumen repne krvi od 15 µL. Nakon uvođenja životinje u anesteziju, bila joj je postavljena okluzijska manžeta pri bazi repa. Manžeta za snimanje bila je postavljena 2 - 3 mm niže od nje. Ovom metodom izmjerili smo sljedeće parametre: sistolički, dijastolički i srednji arterijski krvni tlak (mmHg), frekvenciju srca (otkucaja/min), volumen krvi u repu (µL) i protok krvi kroz rep (µL/min).

4.5. PROCJENA TEŽINE RAZVIJENIH SIMPTOMA NAKON ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA

Nakon izazivanja ishemijske ozljede mozga, provedena je procjena razvijenih simptoma 24 i 48 sati nakon MCAO-a (391, 392). Niži zbroj bodova dobile su životinje s blagim simptomima dok su najveći zbroj imale životinje s najtežim simptomima moždanog udara. Bodovanje je izvršeno na sljedeći način:

1. praćenje gubitaka na težini (0 bodova = nema gubitka težine, 1 bod = gubitak težine < 5%, 2 boda = gubitak težine između 5% i 15%, 3 boda = gubitak težine između 15% i 20%, 4 boda = gubitak težine iznad 20%),
2. promjene u izgledu životinje (neuredna dlaka = 0-2 boda, položaj uški = 0-2 boda, izgled očiju = 0-4 boda, položaj tijela = 0-4 boda),
3. stupanj slobodne lokomotorne aktivnosti i poremećaji u kretanju (1-10 bodova),
4. pravilnost fleksije prednjih udova (0-2 boda),
5. zakretanje prsnog koša prilikom držanja za rep (0-2 boda),
6. položaj prednjih i stražnjih udova prilikom stajanja (0-4 boda),
7. reakcije na podražaje boka, uški, brkova i udova (0-8 bodova).

Zamijećeni simptomi su bili bodovani i najveći broj bodova koji je životinja mogla dobiti tijekom jedne procjene je 42. Bodovi su potom razdijeljeni u 5 kategorija po jačini izražaja simptoma:

Grupa 0: 0–10 bodova,
Grupa 1: 11–18 bodova,
Grupa 2: 19–26 bodova,
Grupa 3: 27–34 boda,
Grupa 4: 35–42 boda.

4.6. MJERENJE UNUTARSTANIČNE KONCENTRACIJE Ca^{2+}

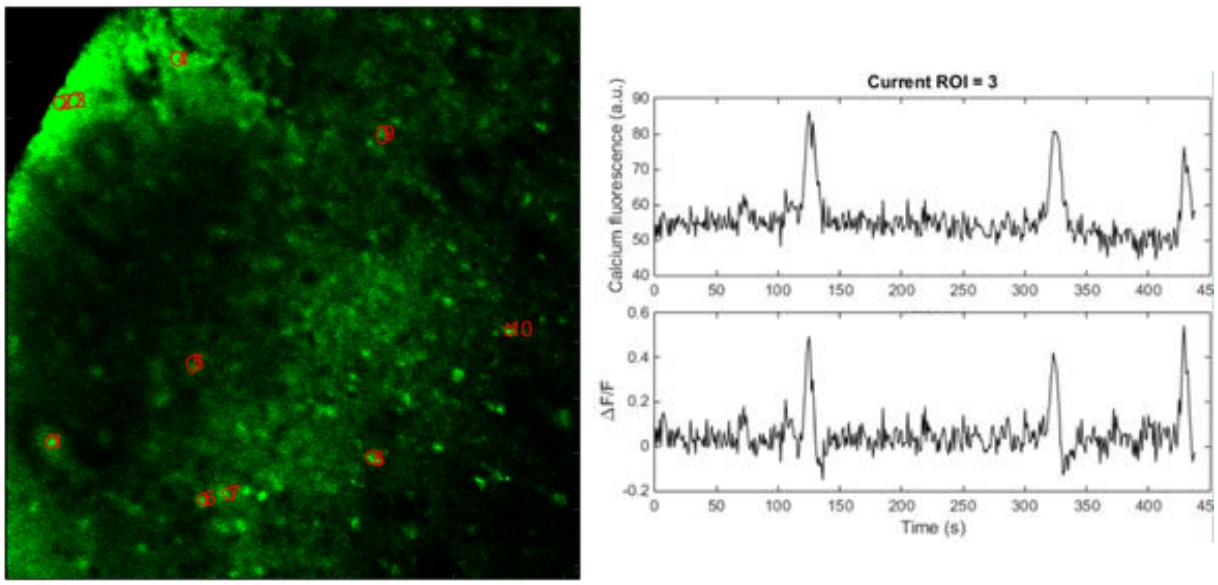
Ova metoda je ranije opisana u radu Habek i sur., iz 2021. godine te će ovdje biti ukratko opisana (217). 48 sati nakon izazivanja ishemijskog moždanog udara životinje smo anestezirali i.p. aplikacijom ketamina (80-100 mg/kg) i ksilazina (12,5 mg/kg). Nakon potvrde neosjetljivosti životinje na podražaj, životinja je položena na leđa na operacijski stol koji je prethodno dezinficiran 70%-tnim etanolom. Kirurškim škaricama otvorili smo trbušnu šupljinu od prepona do vrha prsnog koša. Prsni koš je otvoren i u lijevu klijetku uvedena je igla za perfuziju. Napravljen je rez u desnoj pretklijetci da bi se omogućilo izlaženje krvi i perfuzijske otopine iz sistemne cirkulacije. Životinja je perfundirana ledeno hladnom otopinom umjetne cerebrospinalne tekućine (CST). Kemikalije korištene u metodi mjerenja unutarstanične koncentracije Ca^{2+} kupljene su od tvrtke Kemika (Kemika d.d.) osim ako nije drugačije navedeno. Umjetna CST s N-metil-D-glukaminom (NMDG) imala je sljedeći sastav: 93 mM NMDG (Sigma-Aldrich Corporation), 93 mM HCl (Carl Roth GmbH), 2,5 mM KCl, 1,2 mM NaH_2PO_4, 30 mM $NaHCO_3$, 20 mM HEPES (Carl Roth GmbH), 25 mM D-glukoza, 10 mM $MgSO_4$ (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švicarska) i 0,5 mM $CaCl_2$. Otopina je pripremljena unaprijed i nakon ozračivanja plinskom mješavinom 5% CO_2/ 95% O_2 pH je podešen na vrijednost 7,3-7,4.

Nakon perfuzije, životinju smo dekapitirali. Lubanja je otvorena rezom po medijalnoj liniji od kaudalne prema rostralnoj strani te je mozak pažljivo izvađen i odložen u petrijevu zdjelicu sa svježim ledeno hladnim CST s NMDG-om.

Da bismo mozak izrezali na moždane rezove, izolirani mozak smo učvrstili na držač i postavili na vibrirajući mikrotom Leica VT1200S (Leica Biosystems Nußloch GmbH, Nußloch, Njemačka). Tkivo je rezano u svježem ledeno hladnom CST-u s NMDG-om uz ozračivanje plinskom mješavinom 5% CO_2/ 95% O_2. Za potrebe mjerenja unutarstanične koncentracije Ca^{2+} izrezivali smo koronarne rezove debljine 250 µm koji su potom inkubirani u otopini CST-a s NMDG-om ozračenoj 5% CO_2/ 95% O_2 i zagrijanoj na 33°C. Nakon kratkog oporavka (20-30 minuta), rezovi su potom inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u otopini sastava: 127 mM NaCl (Carl Roth GmbH), 10 mM D-glukoza, 1,25 mM NaH_2PO_4, 26 mM $NaHCO_3$, 2 mM $MgSO_4$ (Fluka Chemie GmbH), 3 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$.

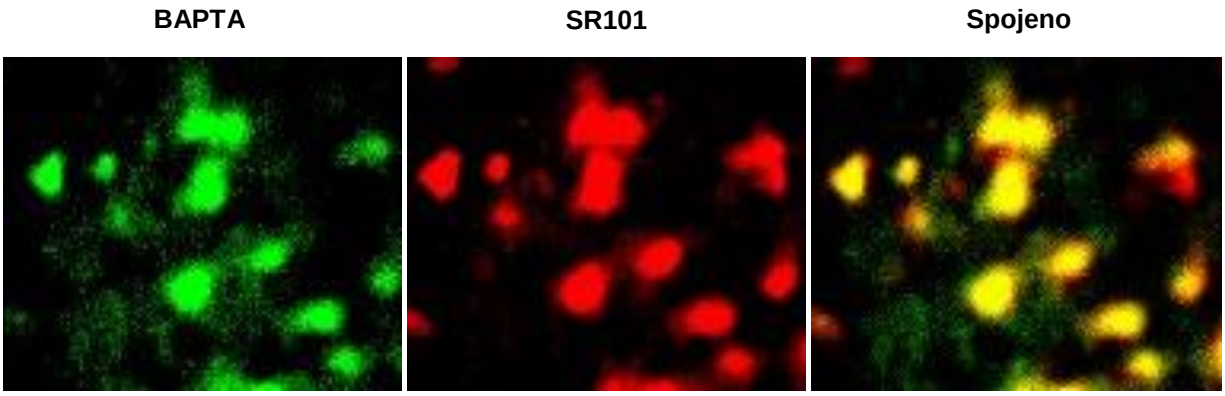
Moždane rezove smo zatim inkubirali u dvije fluorescentne boje: boji osjetljivoj na Ca^{2+} (10 μM; Oregon-Green 488 BAPTA-1, AM; Life Technologies, Carlsbad, CA, SAD) i boji koja specifično boji astrocite (0,8 μM; sulforodamin 101, SR101; Sigma Aldrich Corporation) otopljenima u prethodno opisanoj otopini za oporavak rezova. Rezovi su inkubirani uz ozračivanje s 5% CO_2/ 95% O_2.na sobnoj temperaturi u trajanju od 20 minuta. Moždane rezove smo zatim isprali dva puta po 10 minuta istom otopinom, samo bez prisutnosti boje te postavili na komoru za vizualizaciju (u 1 mL iste otopine) te učvrstili harpicom (Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Njemačka).

Komoru za vizualizaciju smo postavili na konfokalni mikroskop Zeiss LSM 510-META (Carl Zeiss AG). Kalcijski odgovor na podražaj UGN-om (100 nM; PeptaNova GmbH, Sandhausen, Njemačka) snimali smo u peri-ishemijskom području korteksa velikog mozga ipsilateralne hemisfere te odgovarajuće kortikalne regije kontralateralne hemisfere. Boju osjetljivu na Ca^{2+} pobudili smo argonskim laserom valne duljine 488 nm i emitirani signal fluorescentne boje prikupljali na valnim duljinama između 505 i 530 nm. Snimke su prikupljene frekvencijom od 1 Hz. Nakon snimljenog staničnog odgovora na podražaj hormonom, boja SR101 je pobuđena helij-neonskim laserom valne duljine 543 nm, a fluorescentni signal smo prikupili na valnoj duljini od 605 nm.



Slika 23. Analiza mjerenja unutarstaničnog Ca^{2+} na moždanim rezovima u MATLAB programu. Prikaz dijela programa gdje se prikazuje rez korteksa velikog mozga inkubiran u boji specifičnoj za Ca^{2+} na kojemu su zaokružene stanice kao regije od interesa. Program automatski prolazi kroz sve slike i izračunava promjene intenziteta signala u vremenu za svaku odabranu regiju.

Kod analize snimki odabrali smo regije od interesa i analizirali promjene u intenzitetu fluorescentnog signala pomoću programa MATLAB (MathWorks, Natick, MA, SAD) (Slika 23.). Rezultati analize prikazani su kao omjer razlike u intenzitetu između dvije uzastopne slike i pozadinskog signala ($\Delta F/F_0$).



Slika 24. Odabir astrocita među stanicama koje su ispunjene bojom osjetljivom na Ca^{2+}. U ovom istraživanju korištene su samo stanice koje su obojene SR101, biljegom astrocita (BAPTA: fluorescentna boja osjetljiva na Ca^{2+} - zeleno; SR101: boja specifična za astrocite - crveno; Spojeno: stanice koje su ispunjene s obje boje kada se preklope daju žutu boju).

Snimke obje fluorescentne boje su potom bile preklopljene kako bi se potvrdila obojenost promatrane stanice SR101 bojom (Slika 24.). Od 260 stanica koje su odgovorile na podražaj UGN-om, 12 je bilo isključeno iz daljnje analize jer nisu bile obojene i SR101 bojom zbog čega nije bilo moguće utvrditi radi li se zaista o astrocitima.

4.7. IMUNOHISTOKEMIJSKA ANALIZA I *IN SITU* HIBRIDIZACIJA

Za određivanje mjesta izražaja GC-C receptora u peri-ishemijskom području korteksa ipsilateralne hemisfere i pripadajućem kortikalnom području kontralateralne hemisfere na razini bjelančevina i mRNA koristili smo moždane rezove životinja nakon MCAO-a. Imunohistokemijskim bojanjem moždanih rezova protutijelima na antigene smještene u jezgri neurona (engl. *Neuronal Nuclei*; NeuN) i GC-C receptor utvrdili smo izražaj GC-C-a na proteinskoj razini u odnosu na smještaj neurona, dok je na razini mRNA, smještaj GC-C-a bio istražen *in situ* hibridizacijom metodom RNAscope™ i naknadnim imunohistokemijskim bojanjem protutijelom specifičnim za glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. *Glial fibrillary acidic protein*; GFAP), biljeg astrocita (393).

Miješanu staničnu kulturu kortikalnih stanica velikog mozga, izoliranih iz mozga novookoćenih miševa, podvrgnuli smo hipoksijskim uvjetima različite duljine trajanja. Stanice su potom imunohistokemijski bojane protutijelom na GC-C te protutijelima specifičnim za NeuN ili GFAP. Sva protutijela koja smo koristili navedena su u tablici 5 (str. 63).

4.7.1. Izražaj GC-C-a na proteinskoj razini

Moždani rezovi životinja kojima je bio izazvan moždani udar i koji nisu korišteni za snimanje kalcijskog odgovora na podražaj UGN-om, fiksirani su u 4% paraformaldehidu (PFA; Biognost Ltd., Zagreb, Hrvatska) preko noći na +4°C. Nakon fiksacije tkiva bio je proveden postupak krioprotekcije tijekom kojeg su mozgovi susljedno inkubirani u fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatima (engl. *Phosphate-buffered saline*; PBS) sastava: 137 mM NaCl (Carl Roth GmbH), 2,7 mM KCl (Kemika d.d.), 10 mM Na_2HPO_4 (Kemika d.d.), 1,8 mM KH_2PO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka), s rastućim udjelima otopljene saharoze (10%, 20% i 30%). Rezovi su inkubirani u svakoj od otopina 24 sata na +4°C, nakon čega su premješteni u krioprotektivnu otopinu (PBS, 30% saharoza [Carl Roth GmbH], 1% polivinilpirolidon [Sigma-Aldrich Corporation], 30% etilen-glikol [Sigma-Aldrich Corporation]) i čuvani na -20°C do korištenja.

Na dan pokusa, rezove smo položili na predmetna stakla (Thermo Fisher Scientific) te isprali PBS otopinom u trajanju od 90 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se u potpunosti uklonila krioprotektivna otopina i kako bi se rezovi rehidrirali. Postupak otkrivanja antigena bio je proveden kuhanjem rezova 20 minuta u citratnom puferu (pH 6,0) sastava: 8,2 mM natrij citrat, (Merck KGaA), 1,8 mM limunske kiseline (Merck KGaA). Nakon hlađenja, rezove smo isprali (PBS, 3 puta po 10 minuta na sobnoj temperaturi). Permeabilizacija je postignuta inkubacijom rezova 15 minuta u 0,4%-tnoj otopini Tween deterdženta (TWEEN® 20, Sigma-Aldrich Corporation) u PBS-u također na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja, rezovi su inkubirani 1 sat na sobnoj temperaturi u blokirajućem puferu (1% albumin goveđeg seruma (Sigma-Aldrich Corporation) u PBS-u).

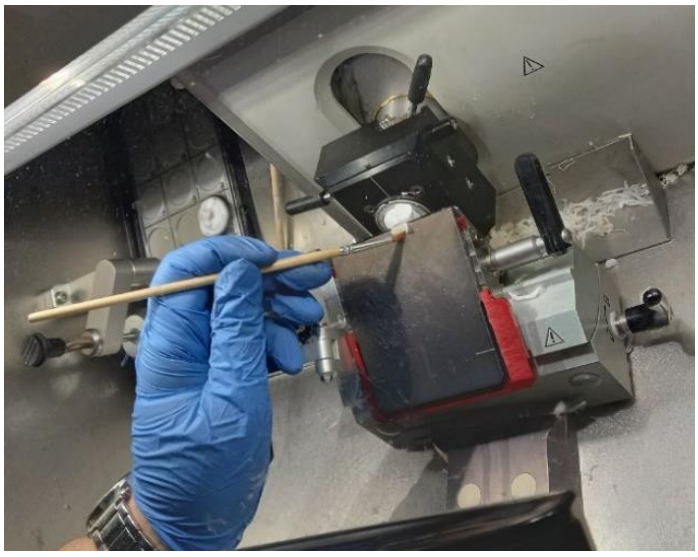
Nakon blokiranja mogućnosti nespecifičnog vezanja, rezovi su inkubirani sa zečjim poliklonalnim protutijelom specifičnim za GC-C (1:50) preko noći na +4°C. Ponovili smo korak ispiranja prije inkubacije rezova u sekundarnom poliklonalnom

anti-zečjem protutijelu (1:500) u trajanju od 1 sata na sobnoj temperaturi. Kako bismo utvrdili koje stanice izražavaju GC-C, isti rezovi su nakon ispiranja sekundarnog protutijela inkubirani u mišjem monoklonalnom protutijelu specifičnom za NeuN (1:500) preko noći na +4°C. Nakon ispiranja i inkubacije u magarećem poliklonalnom anti-mišjem protutijelu 1 sat na sobnoj temperaturi, rezovi su isprani posljednji put te su stanične jezgre obojane DAPI-jem (4',6-diamidino-2-fenilindol; Thermo Fisher Scientific). Rezovi su potom bili prekriveni Mowiol pokrivalom (Merck KGaA) i poklopljeni pokrovnim stakalcima.

Nakon sušenja, predmetna stakla s tkivom su postavljena na konfokalni laserski mikroskop FV3000 (Olympus Corp., Shinjuku, Tokyo, Japan). Vizualizirali smo peri-ishemijsko područje kore velikog mozga u ipsilateralnoj hemisferi i pripadajuće kortikalno područje kontralateralne hemisfere. Fluorescentni signali pobuđeni su laserima valnih duljina 488 i 640 nm za određivanje smještaja NeuN-a odnosno GC-C-a. Signal je prikupljen u područjima valnih duljina 500 – 540 za NeuN te 650 – 750 nm za GC-C.

4.7.2. Određivanje lokalizacije mRNA specifične za GC-C

Nazočnost i smještaj mRNA za GC-C u peri-ishemijskoj i zdravoj regiji kore velikog mozga bila je proučena kod divljeg tipa životinja *in situ* hibridizacijom RNAscope™ metodom (Mm-Gucy2C, 436591, Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, SAD) i naknadnim imunohistokemijskim bojanjem čime smo utvrdili smještaj GFAP-a, biljega astrocita.



Slika 25. Izrada moždanih rezova za određivanje smještaja mRNA specifične za GC-C. Dva dana nakon izazivanja moždanog udara, mozak je izoliran, fiksiran te krioprotektiran. Mozak je zatim učvršćen za držač te smo odrezali moždane rezove debljine 60 µm na kriostatu Leica CM1950. GC-C - gvanilat ciklaza C

48 sati nakon MCAO-a, životinja je bila anestezirana i.p. primjenom ketamina (80-100 mg/kg) i ksilazina (10-12,5 mg/kg) te perfundirana PBS otopinom, na način kako je opisano ranije. Nakon perfuzije PBS otopinom, životinja je perfundirana 4%-tnim paraformaldehidom (Biognost Ltd.). Mozak je izoliran i dodatno fiksiran u paraformaldehidu preko noći na +4°C nakon čega je prošao postupak krioprotekcije kao što je prethodno opisano.

Da bismo dobili rezove debljine 60 µm pogodne za provođenje ove metode, mozak je učvršćen na držač pomoću otopine Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, Nizozemska) i postavljen u kriostat uređaj za rezanje Leica CM1950 (Leica Biosystems Nußloch GmbH). Mišji mozak rezan je na temperaturi manjoj od -20 °C (Slika 25.) i rezovi su navučeni na pozitivno nabijene predmetnice Superfrost Plus (Thermo Fisher Scientific).

Postupak *in situ* hibridizacije proveden je prema preporuci proizvođača (Advanced Cell Diagnostics, Bio-Techne, Minneapolis, MN, SAD) i prethodno objavljenim radovima (394, 395). Ukratko, moždani rezovi isprani su PBS otopinom s dodatkom dietil pirokarbonata (DEPC; Sigma Aldrich) tri puta po 10 minuta. Zatim smo moždane rezove inkubirali u 3%-tnoj otopini vodikovog peroksida 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega je ponovljen korak ispiranja kao što je prethodno opisano. Otkrivanje antigena smo postigli kuhanjem rezova 15 minuta na 95°C u otopini za otkrivanje antigena (Bio-Techne). Nakon ispiranja, moždane rezove smo inkubirali u otopini proteaze IV (Bio-Techne) 30 minuta na 40°C. Enzim je ispran s rezova nakon čega su rezovi inkubirani 2 sata s GC-C probom na 40°C u pećnici s komorom za kontrolu vlage (HybEZ™ II, Bio-Techne). Pojačavanje signala postignuto je uzastopnom inkubacijom rezova na 40°C u otopinama pojačala 1, 2 i 3 (Advanced Cell Diagnostics) u trajanju od 30, 30 i 15 minuta redoslijedom kako su navedeni. Između inkubacija, rezovi su isprani otopinom za ispiranje (Bio-Techne). Za detekciju signala, inkubirali smo rezove u C1 probi obilježenoj peroksidazom hrena (engl. *Horseradish peroxidase*; HRP; Bio-Techne) u trajanju od 15 minuta na 40°C. Nakon ispiranja otopinom za ispiranje (Bio-Techne), rezovima je dodana fluorescentna boja za pojačavanje signala (1:100; Akoya Biosciences, Marlborough, MA, SAD) u kojoj su inkubirani 30 minuta na 40°C. Zatim smo ponovili ispiranje rezova otopinom za ispiranje (Bio-Techne) te je rezovima dodan HRP blokator (15 minuta, 40°C).

Nakon *in situ* hibridizacije GC-C probom, rezovi su isprani pri sobnoj temperaturi 3 puta u trajanju od 10 minuta PBS otopinom s dodatkom deterdženta Triton X-100 (0,1%; Sigma Aldrich). Moždani rezovi su nakon toga inkubirani u blokirajućoj otopini (PBS, 0,1% Triton X-100, 1% albumin goveđeg seruma) 2 sata na sobnoj temperaturi. Astrociti su određeni inkubacijom rezova u kokošjem poliklonalnom protutijelu specifičnom za GFAP (1:100) preko noći na +4°C. Rezovi su potom isprani PBS otopinom tri puta po 10 minuta te inkubirani u kozjem poliklonalnom anti-kokošjem protutijelu (1:500) u trajanju od 1 sata pri sobnoj temperaturi. Rezovi su naposljetku obojani bojom DAPI (1:4000, Thermo Fisher Scientific), isprani otopinom i pokriveni korištenjem pokrivala ProLong™ Diamond Antifade (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific).

Tablica 5. Popis korištenih protutijela za imunohistokemijsku analizu

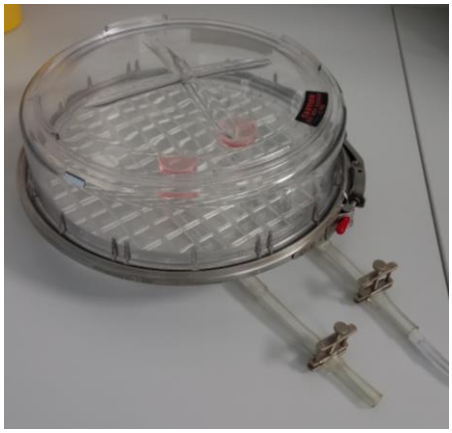
	Protutijelo	**Razrjeđenje**	**Proizvođač**
Primarno	Zečje poliklonalno anti GC-C	1:50	Aviva Systems Biology, San Diego, CA, SAD
	Mišje monoklonalno anti NeuN	1:500	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, SAD
	Kokošje poliklonalno anti GFAP	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Sekundarno	Magareće poliklonalno anti-zečje protutijelo (Alexa Fluor Plus 647)	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
	Magareće poliklonalno anti-mišje protutijelo (Alexa Fluor Plus 488)	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
	Kozje poliklonalno anti-kokošje protutijelo (Alexa Fluor® 555)	1:500	Abcam, Cambridge, UK

Rezovi su snimljeni na isti način kako je prethodno opisano za imunohistokemijsku analizu. Fluorescentni signal GC-C probe pobuđen je laserom valne duljine 488 nm, a za pobuđivanje signala DAPI-a i GFAP-a koristili smo valne duljine 405 nm odnosno 561 nm. Emitirani fluorescentni signal skupljen je na valnim duljinama 430-470 nm za DAPI, 500-540 nm za GC-C te 570-670 nm za GFAP.

4.7.3. Određivanje izražaja GC-C-a u staničnoj kulturi nakon hipoksije

Postupak izolacije primarne kulture stanica korteksa velikog mozga opisan je prethodno. 6,4 ± 0,51 dana nakon nasađivanja na pokrovna stakalca, stanice su podvrgnute hipoksijskim uvjetima (<1% O_2) na sljedeći način. Polovica petrijevih zdjelica sa stanicama stavljena je u hipoksijsku komoru (Slika 26.) (Billups-Rothenberg Inc., San Diego, CA, SAD). U komoru je, nakon hermetičkog zatvaranja, puštena plinska mješavina 5% CO_2/95% N_2. Komoru smo zatim smjestili u inkubator Binder CB150 (Binder GmbH). Postupak je ponovljen sat vremena kasnije kako bi se uklonio kisik koji je u međuvremenu difundirao iz staničnog medija. Druga polovica petrijevih zdjelica s nasađenim stanicama korištena je kao kontrola i stoga je ostala u uvjetima primjerene oksigenacije u inkubatoru. Duljina trajanja hipoksije iznosila je 4 i 24 sata.

Po završetku izlaganja stanica hipoksijskim uvjetima, stanice su bile isprane tri puta po 10 minuta PBS otopinom i fiksirane 4%-tnim paraformaldehidom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon ponovnog ispiranja, uslijedio je postupak otkrivanja antigena kuhanjem u citratnom puferu (pH 6,0) u trajanju od 10 minuta. Stanice su puštene da se ohlade, ponovno isprane kako je prethodno opisano, i inkubirane u otopini za permeabilizaciju (0,4% TWEEN® 20 u PBS-u) 10 minuta na sobnoj temperaturi. Ispiranje je ponovljeno nakon čega smo proveli inkubaciju u blokirajućoj otopini (1% albumin goveđeg seruma u PBS-u) tijekom 30 minuta na sobnoj temperaturi. Stanice su potom inkubirane u kokošjem poliklonalnom protutijelu za GFAP (1:100) u trajanju od 1 sata na sobnoj temperaturi, nakon čega je protutijelo isprano na prethodno opisani način. Nadalje, stanice su inkubirane u kozjem poliklonalnom anti-kokošjem protutijelu (1:500) u istim uvjetima nakon čega su ponovno isprane.



Slika 26. Hipoksijska komora. Nasađene stanice u petrijevim zdjelicama stavljene su u hipoksijsku komoru (Billups-Rothenberg Inc., San Diego, CA, SAD). U komoru je uvedena hipoksijska plinska mješavina 5% CO_2/95% N_2 nakon čega je komora stavljena u inkubator Binder CB150. Stanice su bile u hipoksiji 4 i 24 sata.

Ponovljen je korak inkubacije blokirajućom otopinom, nakon čega su stanice inkubirane prvo u zečjem poliklonalnom protutijelu specifičnom za GC-C i potom u magarećem poliklonalnom anti-zečjem protutijelu. Uvjeti inkubacije za oba protutijela, te postupak ispiranja, bili su isti kao u prethodnom koraku. Nakon ispiranja protutijela, stanice smo obojili DAPI-jem (1:4000, Thermo Fisher Scientific) i poklopili ProLong™ Diamond Antifade pokrivalom (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific).

Nakon sušenja, stanice su bile snimljene pomoću invertnog fluorescentnog mikroskopa Olympus IX83 (Olympus Corp.) i programa za vizualizaciju Olympus cellSens (Olympus Corp.). Fluorescentni signal DAPI-ja pobudili smo valnom duljinom od 360 nm te smo specifičan signal prikupili na valnim duljinama između 430-470 nm. Fluorescentni signali GC-C i GFAP protutijela pobuđeni su valnim duljinama 633 nm (Cy5 filter) odnosno 550 nm (TRITC filter) i skupljeni na valnim duljinama 660-670 nm odnosno 560-570 nm.

4.8. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA

Podaci su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, osim ako nije drugačije naznačeno u tekstu. U pokusima mjerenja promjene unutarstanične koncentracije Ca^{2+}, svaka pokusna skupina sastojala se od najmanje tri jedinke.

Normalna raspodjela podataka testirana je putem Kolmogorov-Smirnov testa. Usporedba dvije varijable napravljena je pomoću Studentovog t-testa. Analiza više varijabli napravljena je metodom analize varijance (engl. *Analysis of variance*; ANOVA) s *post hoc* Tukey testom. Rezultati oba testa su bili priznati kao statistički značajni kod $p < 0,05$. Pearsonov test korelacije korišten je pri analizama korelacija između varijabli.

Podaci dobiveni promatranjem razvoja simptoma nakon ishemijskog moždanog udara analizirani su neparametrijskim testovima: Kruskal-Wallis test koristili smo za analizu razlika između pokusnih skupina, a parni Wilcoxon test za testiranje razlika u razvijenim simptomima 24 i 48 sati nakon moždanog udara. Statističke analize napravljene su u programu GraphPad InStat (GraphPad Software, verzija 3.06, San Diego, CA, SAD).

5. REZULTATI

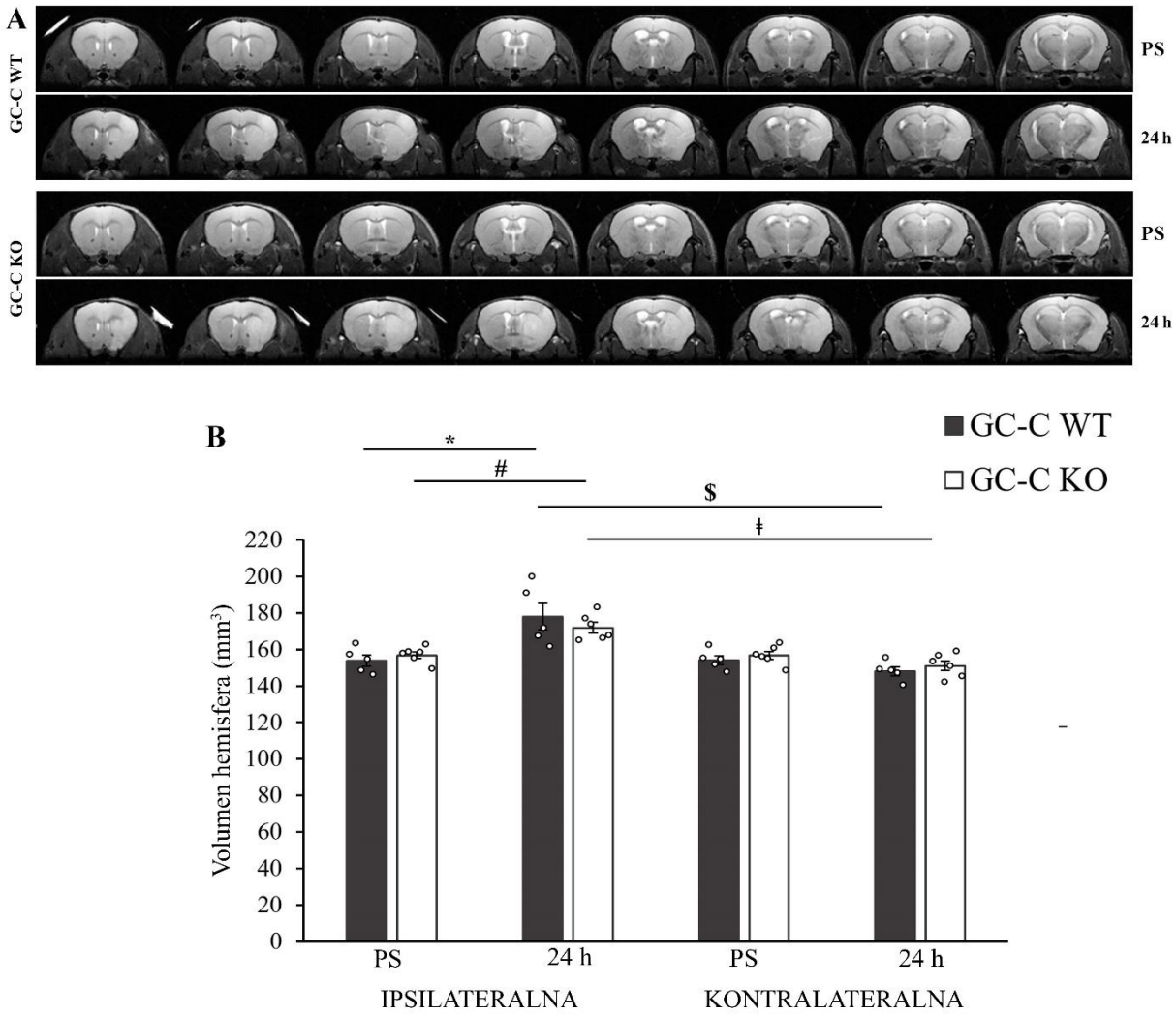
5.1. UČINCI UROGVANILINA I NJEGOVIH SIGNALNIH PUTEVA NA VELIČINU MOŽDANE LEZIJE

5.1.1. Urogvanilin ili GC-C ne utječu na veličinu moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara

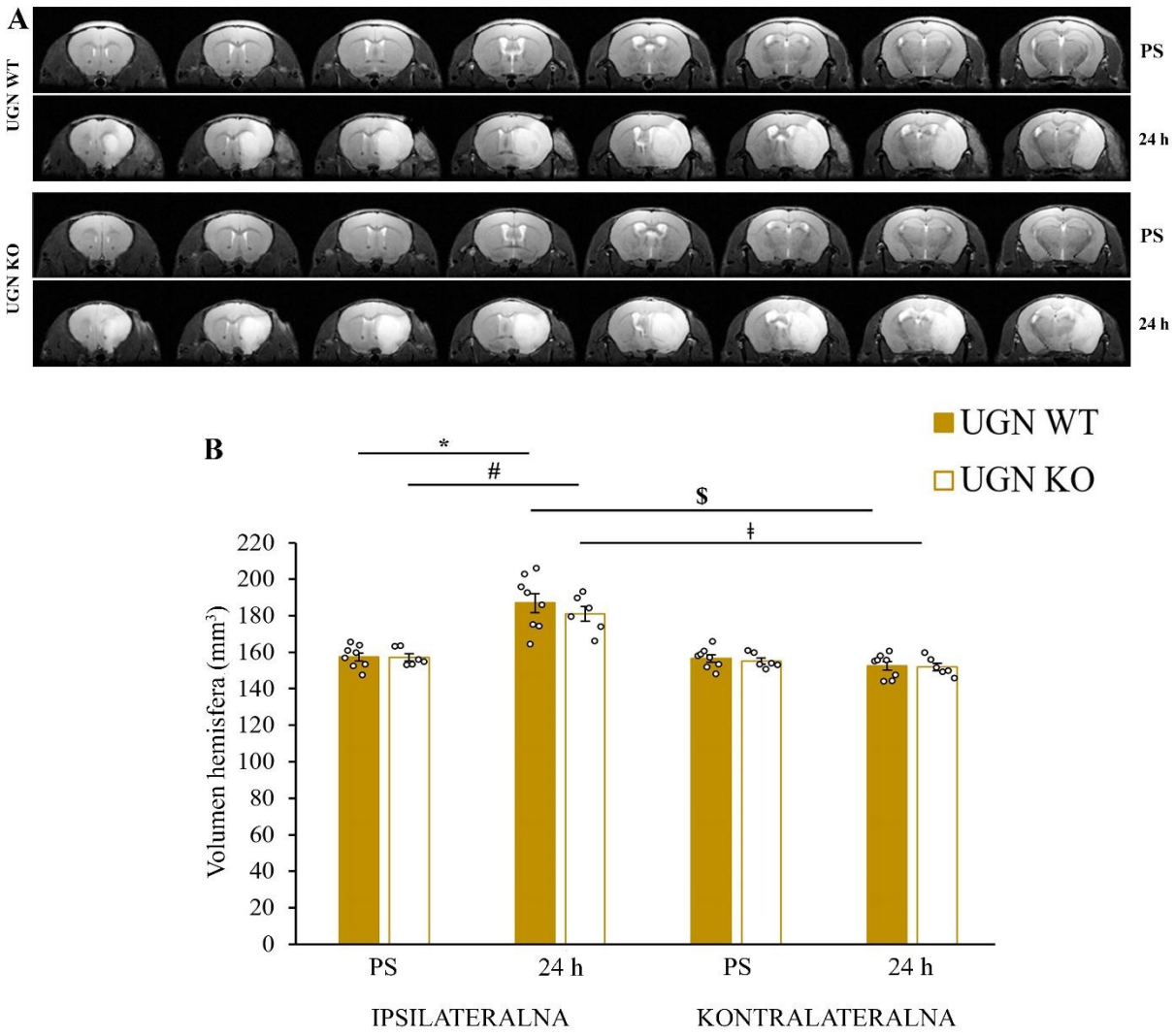
Da bismo istražili da li UGN ili njegov signalni put koji uključuje aktivaciju GC-C dovodi do promjena veličine moždanog udara koristili smo mišji model ishemijskog moždanog udara (začepljenje srednje moždane arterije u trajanju od 60 min - MCAO). MR snimke mozga miševa učinjene su prije izazivanja moždanog udara (početno stanje - PS) te 24 sata nakon (24 h). Originalne snimke su prikazane na slici 27A (GC-C) i slici 28A (UGN).

Nedostatak GC-C-a u GC-C KO životinja nije doveo do razlika u veličini moždanih hemisfera prije izazivanja moždanog udara. Dan nakon izazivanja moždanog udara (24 h), u obje skupine životinja došlo je do povećanja volumena ipsilateralne hemisfere (hemisfera na strani začepljene srednje moždane arterije - hemisfera s moždanim udarom: GC-C WT: PS: 153,8 ± 3,0 mm^3, 24h: 178,0 ± 7,3 mm^3, n = 5; GC-C KO: PS: 156,8 ± 1,8 mm^3, 24h: 171,9 ± 2,9 mm^3, n = 6; $F(3,18) = 8,134$, $p = 0,001$), dok se volumen kontralateralne hemisfere nije mijenjao. Nakon moždanog udara oštećena hemisfera je u obje skupine životinja bila veća u odnosu na kontralateralnu moždanu hemisferu (Slika 27B).

Nedostatak UGN-a u UGN KO životinja nije utjecao na veličinu moždanih hemisfera prije i nakon izazivanja moždanog udara. Nakon nastanka moždanog udara, volumen ipsilateralne hemisfere se povećao u odnosu na volumen prije (PS) i u životinjama kojima nedostaje UGN (UGN KO) i u životinjama divljeg tipa iz istog legla (UGN WT) (UGN WT: PS: 157,4 ± 2,2 mm^3, 24h: 187,0 ± 5,2 mm^3, n = 8; UGN KO: PS: 157,3 ± 2,0 mm^3, 24h: 181,0 ± 4,1 mm^3, n = 6; $F(3,24) = 17,473$, $p = 0,000003$). Također se volumen kontralateralne hemisfere nije promijenio, a ipsilateralna hemisfera je u obje skupine životinja 24 sata nakon izazivanja moždanog udara bila veća u odnosu na kontralateralnu hemisferu (Slika 28B).



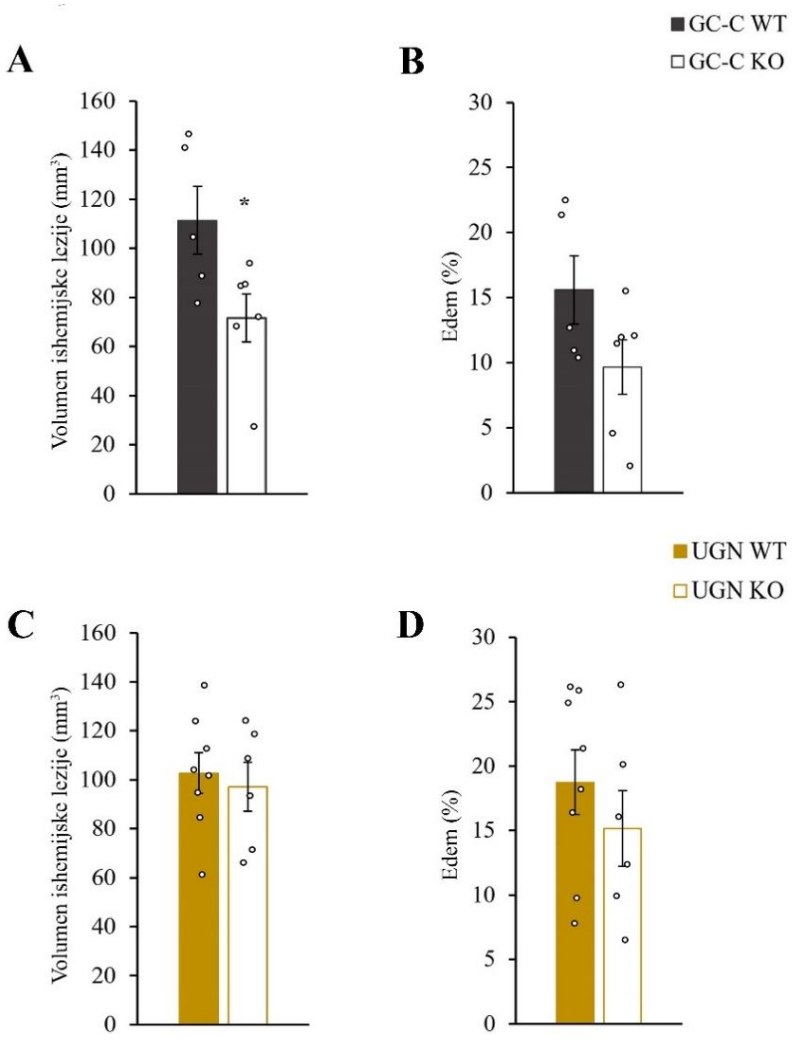
Slika 27. Nedostatak GC-C-a nije doveo do razlika u veličini moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara između GC-C WT i GC-C KO. Veličine hemisfera određene su oslikavanjem magnetnom rezonancom (MR) (GC-C WT: n = 5; GC-C KO: n = 6). A) Originalne MR snimke neoštećene hemisfere (suprotna strana u odnosu na arterijsko začepljenje - kontralateralna) te hemisfere zahvaćene moždanim udarom (hemisfera na strani arterijskog začepljenja - ipsilateralna) prije (PS - početno stanje) te 24 sata nakon izazivanja moždanog udara (24 h); rezovi su snimljeni s odmakom od 0.5 mm. B) U obje skupine životinja došlo je do povećanja volumena ipsilateralne hemisfere 24 h nakon moždanog udara u usporedbi s PS, dok se volumen kontralateralne hemisfere nije mijenjao. Nakon moždanog udara, oštećena hemisfera je u obje skupine životinja bila veća u odnosu na kontralateralnu moždanu hemisferu. Rezultati su analizirani ANOVA-om s Tukey post-hoc testom. * p = 0,0004 statistički značajan porast volumena hemisfere zahvaćene moždanim udarom (ipsilateralna) u odnosu na njezin volumen prije nastanka moždanog udara kod divljeg tipa životinja iz istog legla (GC-C WT); # p = 0,0355 statistički značajan porast volumena ipsilateralne hemisfere zahvaćene moždanim udarom u odnosu na njezin volumen prije nastanka moždanog udara kod životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO); $ p = 0,00001 statistički značajno povećan volumen ipsilateralne u odnosu na kontralateralnu hemisferu 24 sata nakon izazivanja moždanog udara kod GC-C WT životinja; ‡ p =0,001 statistički značajno povećan volumen ipsilateralne u odnosu na kontralateralnu hemisferu 24 sata nakon izazivanja moždanog udara kod GC-C KO životinja iz istog legla ($F(7,36) = 9,727$, $p = 1 \times 10^{-8}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla, GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C, PS - početno stanje.



Slika 28. Nedostatak UGN-a nije doveo do razlika u veličini moždanih hemisfera prije i nakon moždanog udara između UGN WT i UGN KO. Veličine hemisfera određene su oslikavanjem magnetnom rezonancom (MR) (UGN WT: n = 8; UGN KO: n = 6). A) Originalne MR snimke neoštećene hemisfere (kontralateralna) te hemisfere zahvaćene moždanim udarom (ipsilateralna) prije (PS - početno stanje) te 24 sata nakon izazivanja moždanog udara (24 h); rezovi su snimljeni s odmakom od 0.5 mm. B) U obje skupine životinja došlo je do povećanja volumena ipsilateralne hemisfere 24 h nakon moždanog udara u usporedbi s PS, dok se volumen kontralateralne hemisfere nije mijenjao. Nakon moždanog udara, oštećena hemisfera je u obje skupine životinja bila veća u odnosu na kontralateralnu moždanu hemisferu. Rezultati su analizirani ANOVA-om s Tukey post-hoc testom. * $p = 6 \times 10^{-8}$ statistički značajan porast volumena hemisfere zahvaćene moždanim udarom (ipsilateralna) u odnosu na njezin volumen prije nastanka moždanog udara kod divljeg tipa životinja iz istog legla (UGN WT); # p = 0,0001 statistički značajan porast volumena ipsilateralne hemisfere zahvaćene moždanim udarom u odnosu na njezin volumen prije nastanka moždanog udara kod životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO); $ $p = 9 \times 10^{-10}$ statistički značajno povećan volumen ipsilateralne u odnosu na kontralateralnu hemisferu 24 sata nakon izazivanja moždanog udara kod UGN WT životinja; ‡ p =0,000003 statistički značajno povećan volumen ipsilateralne u odnosu na kontralateralnu hemisferu 24 sata nakon izazivanja moždanog udara kod UGN KO životinja iz istog legla ($F(7,48) = 20,490$, $p = 2 \times 10^{-12}$). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla, UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN, PS - početno stanje.

5.1.2. Životinje kojima nedostaje GC-C imaju manju ishemijsku leziju u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla

Veličine hemisfera prije i nakon moždanog udara se nisu razlikovale u GC-C KO i UGN KO životinja u odnosu na njihove divlje tipove iz istog legla. Ipak, GC-C KO životinje imale su 35% manju moždanu leziju (Slika 29A; GC-C WT: 111,3 ± 13,8 mm^3, n = 5; GC-C KO: 71,6 ± 9,7 mm^3, n = 6; p =0,0386) dok se veličina lezije nije razlikovala u UGN KO životinja u odnosu na njihove divlje tipove (Slika 29C; UGN WT: 102,7 ± 8,4 mm^3, n = 8; UGN KO: 97,1 ± 10,0 mm^3, n = 6; p = 0,6716). Ovi rezultati ukazuju na moguću štetnu ulogu aktivacije GC-C-a u razvoju moždanog udara što je oprečno rezultatima dobivenim aktivacijom GC-A (378).

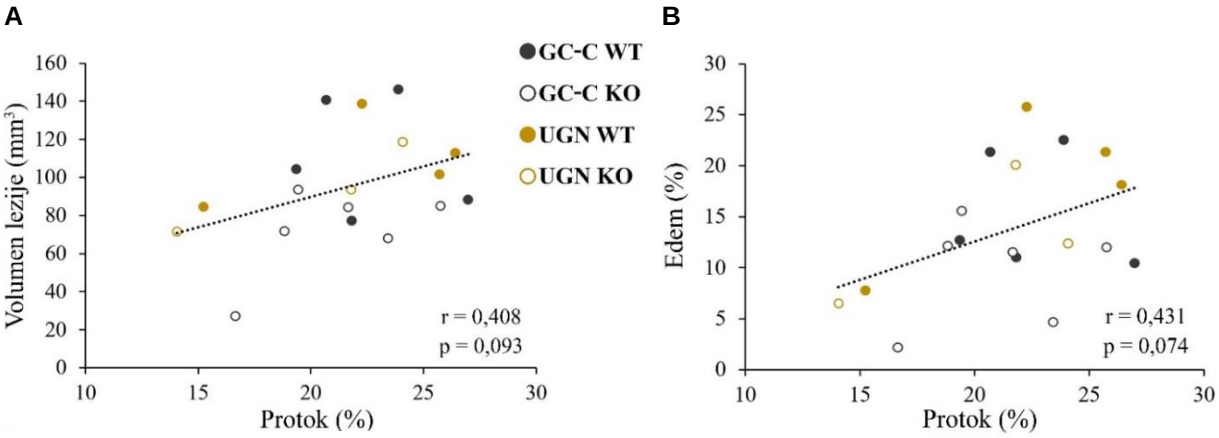


Slika 29. Veličina moždanog udara u životinja kojima nedostaje GC-C je manja u odnosu na divlji tip životinja. Smanjena moždana lezija u GC-C KO životinja (A) nije praćena i sa statistički značajno manjim edemom (B). Kod životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO) ne razlikuje se niti veličina lezije (C) niti razvoj moždanog edema (D). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. Rezultati su analizirani Studentovim t-testom te * p = 0,0386. GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla, n = 5, GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C, n = 6, UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla, n = 8, UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN, n = 6.

Iako manja lezija u GC-C KO životinja dovodi i do smanjenog porasta volumena ipsilateralne hemisfere prikazane kao veličina edema (%) na slici 29B taj smanjeni porast volumena nije statistički značajno manji u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (GC-C WT: 15,6 ± 2,6%, n = 5; GC-C KO: 9,7 ± 0,1%, n = 6; p = 0,106). Veličina edema u životinja kojima nedostaje UGN se nije razlikovala u odnosu na njihov divlji tip životinja (Slika 29D: UGN WT: 18,7 ± 2,5%, n = 8; UGN KO: 15,2 ± 2,9%, n = 6; p = 0,372).

5.1.3. Manji moždani udar u životinja kojima nedostaje GC-C nije rezultat ostatnog protoka tijekom začepljenja srednje moždane arterije

Jedan od mogućih razloga nastanka manjeg moždanog udara kod životinja kojima nedostaje GC-C je i moguća razlika u postotku smanjenja krvnog protoka tijekom začepljenja srednje moždane arterije (378) koja bi se mogla očekivati zbog razlika u arterijskom tlaku (vidi kasnije). U ovom istraživanju, moždani protok tijekom 60-minutnog začepljenja moždane arterije se u životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO) te divljih tipova životinja iz istog legla (GC-C WT) nije statistički značajno razlikovao (protok: GC-C WT: 70,0 ± 5,2 LDFU, n = 5; GC-C KO: 70,0 ± 3,7 LDFU, n = 6, p = 0,999; ostatni protok u odnosu na početni: GC-C WT: 22,5 ± 1,3 %, n = 5; GC-C KO: 21,0 ± 1,4 %, n = 6; p = 0,433).

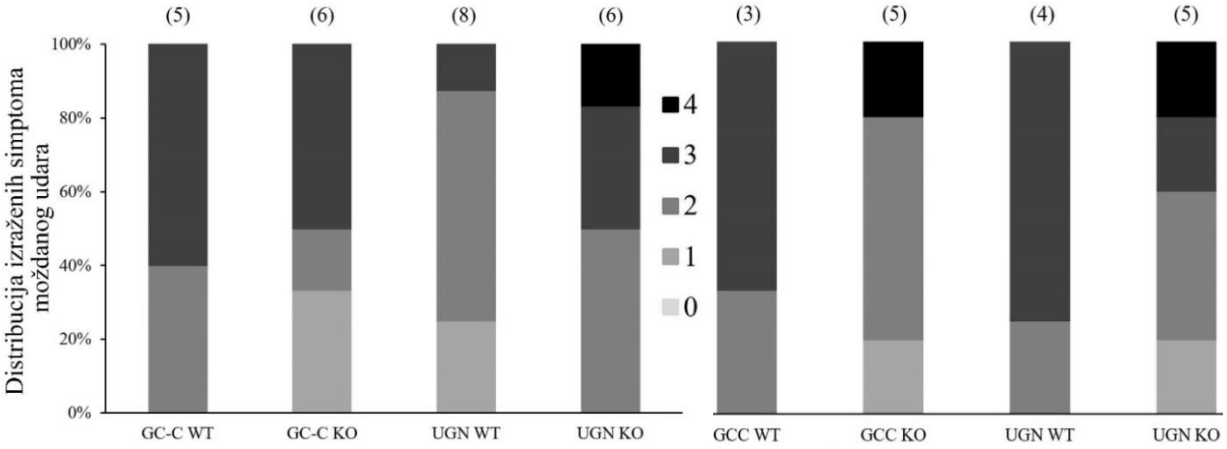


Slika 30. Ne postoji korelacija između ostatnog protoka za vrijeme začepljenja srednje moždane arterije i veličine moždanog udara (A) te razvoja moždanog edema (B). Rezultati su analizirani Pearsonovim testom korelacije. GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla, GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C, UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla, UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.

Veličina lezije te porast volumena ipsilateralne hemisfere u odnosu na početni volumen prije nastanka moždanog udara (edem) nisu u korelaciji s ostatnim protokom tijekom začepljenja srednje moždane arterije (Slika 30: veličina moždanog

udara: r = 0,408, p = 0,093; moždani edem: r = 0,431, p = 0,074). Ovi rezultati ukazuju da manja lezija u GC-C KO životinja nije nastala zbog različitog protoka krvi tijekom začepljenja moždane arterije već zbog nedostatka GC-C u GC-C KO životinja.

A – 24 sata nakon moždanog udara **B** – 48 sati nakon moždanog udara



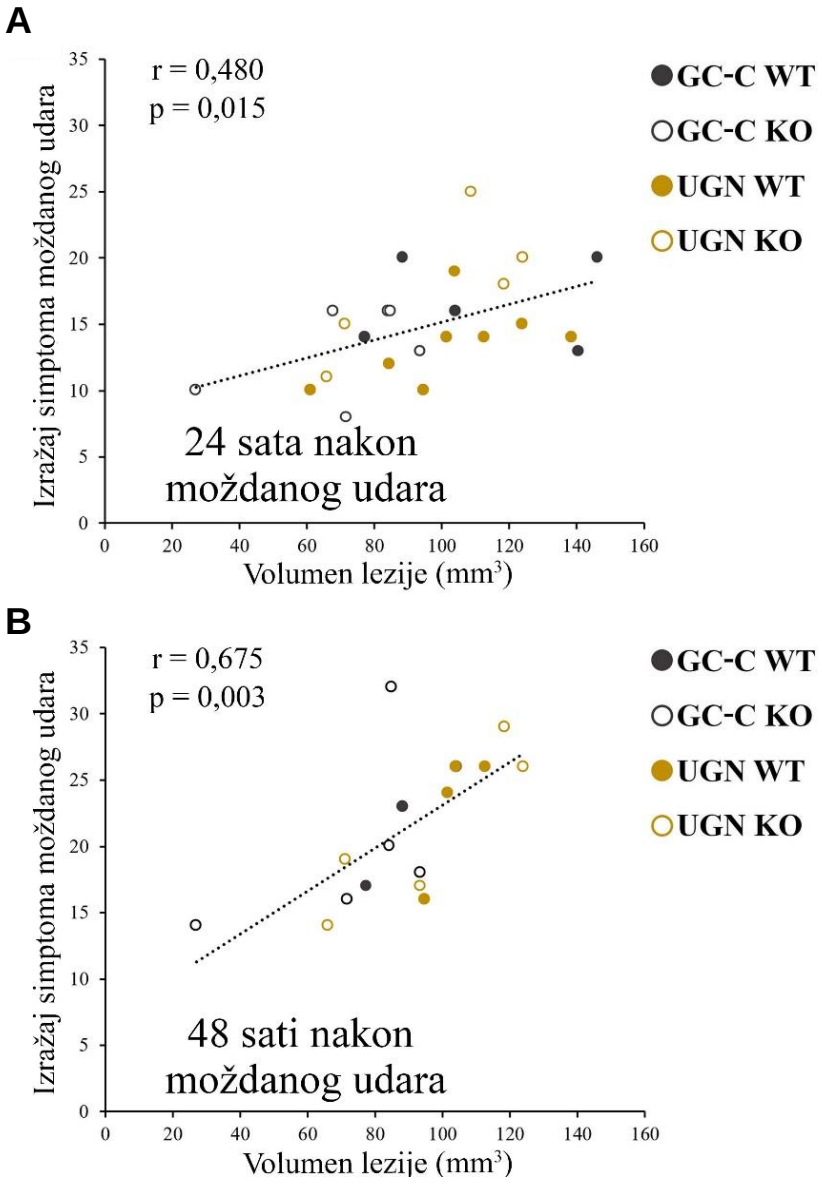
Slika 31. Ne postoji razlika u izraženim simptomima moždanog udara nakon 24 (A) i 48 sati (B). Dodijeljeni bodovi za pojedine simptome su podijeljeni u 5 grupa po njihovoj jačini. Prikazan je postotak životinja koje su imale pojedine težine simptoma. Rezultati su analizirani ne-parametrijskim Kruskal-Wallis testom, a broj životinja je prikazan u zagradama. GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla, GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C, UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla, UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.

5.1.4. Manja lezija u životinja kojima nedostaje GC-C ne razvija i manje simptoma

Razvoj simptoma moždanog udara određivan je 24 i 48 sati nakon izazivanja moždanog udara začepljenjem srednje moždane arterije. Kao što je opisano ranije, simptomi moždanog udara su bodovani. Težina moždanog udara podijeljena je u pet kategorija s obzirom na razvoj simptoma (grupa 0: 0-10 bodova, grupa 1: 11-18 bodova, grupa 2: 19-26 bodova, grupa 3: 27-34 boda te grupa 4: 35-42 boda). Postotak životinja u svakoj kategoriji je prikazan na slici 31. Analiza rezultata ne-parametrijskim Kruskal-Walls testom nije pokazala statistički značajnu razliku između pojedinih grupa.

Iako nije pronađena razlika u težini simptoma moždanog udara između pojedinih skupina životinja (Slika 31.), dan nakon nastanka moždanog udara, kako se i očekuje, izražaj simptoma bolesti bio je u pozitivnoj korelaciji s veličinom moždane lezije (Slika 32A: r = 0,480, p = 0,015, n = 25) dok veličina moždanog edema nije bila u korelaciji sa razvojem simptoma (rezultati nisu prikazani, r = 0,382, p = 0,060, n =

25). Dva dana nakon razvoja moždanog udara, nije došlo do promjena u težini simptoma bolesti (GC-C WT: p = 0,250; GC-C KO: p = 0,063; UGN WT: p = 0,125; UGN KO: p = 0,063).



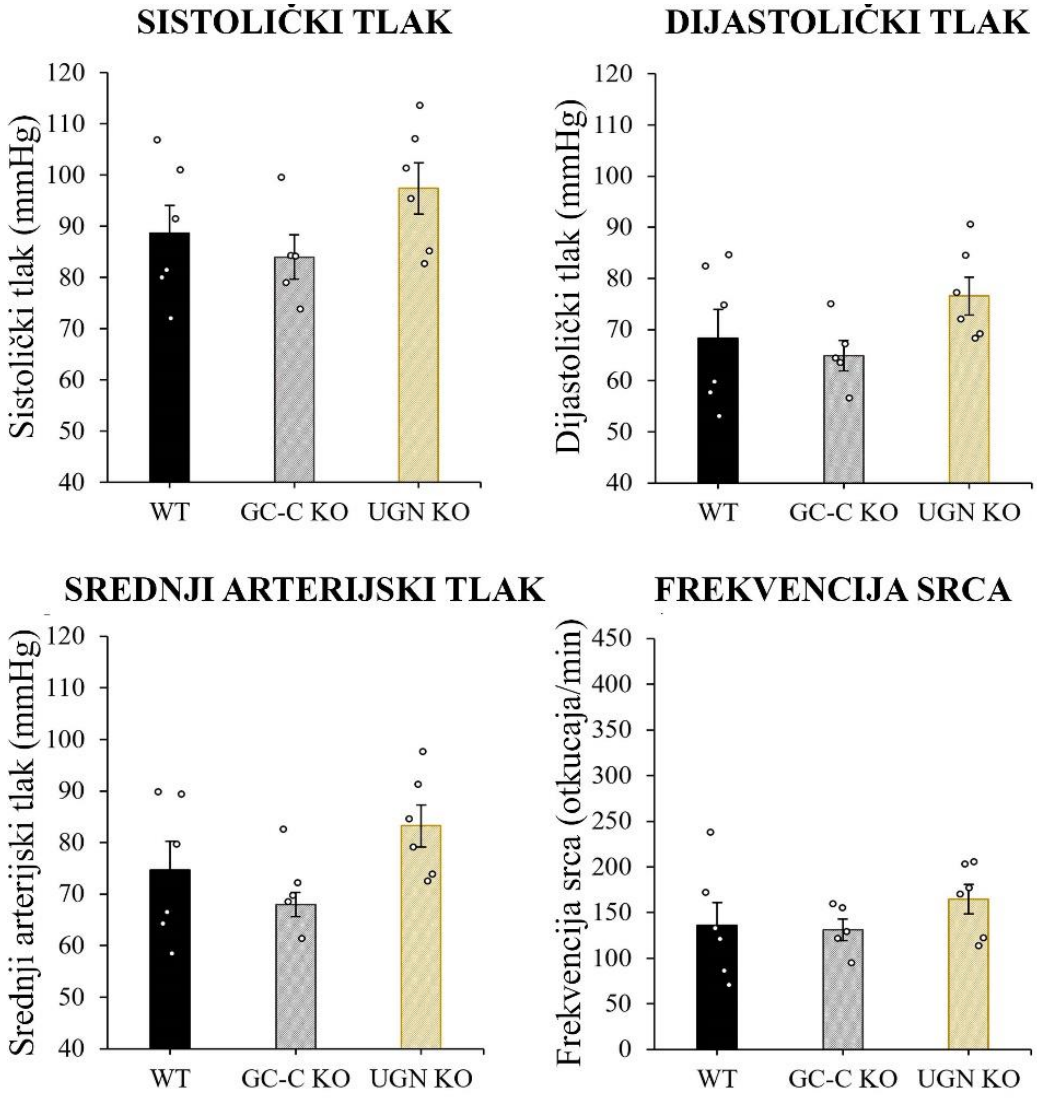
Slika 32. Veličina lezije je u pozitivnoj korelaciji s razvijenim simptomima 24 (A) i 48 sati (B) nakon nastanka moždanog udara. Rezultati su analizirani Pearsonovim testom korelacije. GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla, GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C, UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla, UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.

Drugi dan nakon izazivanja moždanog udara, težina simptoma bolesti te veličina moždanog udara su ponovno bili u pozitivnoj korelaciji (Slika 32B: r = 0,675, p = 0,003, n = 17) dok veličina moždanog edema (povećanje volumena ipsilateralne hemisfere) nije bila u korelaciji s izraženim simptomima bolesti (r = 0,347, p = 0,172, n = 17).

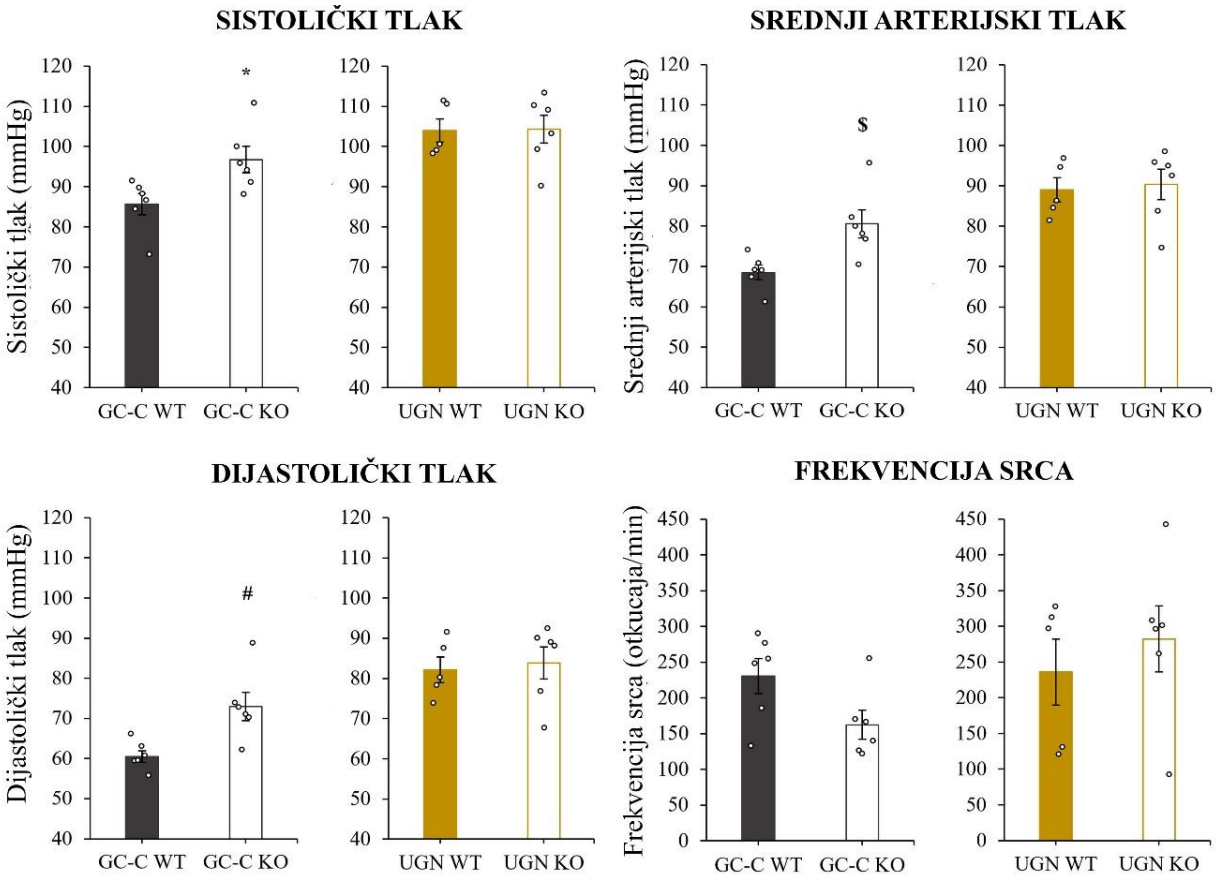
5.2. UČINCI UROGVANILINA I NJEGOVIH SIGNALNIH PUTEVA NA ARTERIJSKI TLAK

5.2.1. Arterijski tlak u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN - čiste linije

Iako nije postojala razlika u protoku tijekom začepljenja srednje moždane arterije, razlika u arterijskom tlaku bi, pogotovo nakon re-perfuzije, mogla imati utjecaj na razvoj moždanog udara. Do sada je pokazano da životinje kojima nedostaje UGN imaju viši arterijski tlak u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (292).



Slika 33. Nema razlike u arterijskim tlakovima i frekvenciji srca između divljih tipova životinja te čistih linija miševa kojima nedostaje GC-C ili UGN. Rezultati su analizirani ANOVA-om te post-hoc Tukey testom (WT: n = 6; GC-C KO: n = 5; UGN KO: n = 6) i prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. WT - divlji tip životinja iz istog legla, GC-C KO - životinje kojima nedostaje gvanilat ciklaza C (GC-C), UGN KO - životinje kojima nedostaje urogvanilin (UGN).



Slika 34. Životinje kojima nedostaje GC-C imaju viši arterijski tlak od divljeg tipa životinja iz istog legla. Sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak bili su viši u životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO, n = 6) u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (GC-C WT, n = 6) dok promjene u arterijskom tlaku nisu zamijećene kod životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO, n = 6) u donosu nad divlji tip iz istog legla (UGN WT, n = 5). Rezultati su analizirani Studentovim *t*-testom i prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška. * p = 0,026 statistički značajna razlika vrijednosti sistoličkog tlaka između životinja kojima nedostaje GC-C te divljih tipova iz istog legla, # p = 0,009 statistički značajna razlika vrijednosti dijastoličkog tlaka između životinja kojima nedostaje GC-C te divljih tipova iz istog legla. $ p = 0,011 statistički značajna razlika vrijednosti srednjeg arterijskog tlaka između životinja kojima nedostaje GC-C te divljih tipova iz istog legla. GC-C - gvanilat-ciklaza C; GC-C WT - divlji tip životinja iz istog legla; GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C; UGN WT - divlji tip životinja iz istog legla; UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.

Zbog čestog ignoriranja mogućih razlika u arterijskom tlaku tijekom istraživanja moždanog udara kod životinja kojima nedostaje izražaj nekog gena, prvo smo odredili da li postoji razlika kod čistih linija divljeg tipa životinja te životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN (Slika 33.). Iako su se sistolički i srednji arterijski tlak činili viši u životinja kojima nedostaje UGN u odnosu na divlji tip životinja, nije postojala statistički značajna razlika u sve tri skupine životinja u izmjerenom sistoličkom ($F(2,14) = 1,802$, $p = 0,201$), dijastoličkom tlaku ($F(2,14) = 1,863$, $p = 0,192$) te srednjem arterijskom tlaku ($F(2,14) = 1,900$, $p = 0,186$). Jednako tako nije postojala niti razlika u srčanoj frekvenciji ($F(2,14) = 0,887$, $p = 0,434$) niti izmjerenim volumenima krvi u repu ili protoku krvi kroz rep koji bi mogli utjecati na samo mjerenje

(rezultati nisu prikazani na slici - volumen krvi u repu: WT: 8,2 ± 2,4 µL, n = 6; GC-C KO: 10,0 ± 2,1 µL, n = 5; UGN KO: 15,5 ± 2,6 µL, n = 6; F(2,14) = 2,574, p = 0,112; protok krvi kroz rep: WT: 2,8 ± 0,8 µL/min, n = 6; GC-C KO: 3,8 ± 0,7 µL/min, n = 5; UGN KO: 5,4 ± 0,7 µL/min, n = 6; F(2,14) = 3,498, p = 0,059).

5.2.2. Vrijednosti arterijskog tlaka u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na vrijednosti izmjerene u životinja divljeg tipa iz istog legla

Kada se mjerenje arterijskog tlaka provelo na životinjama kojima nedostaje GC-C ili UGN te divljim tipovima životinja iz njihovih legala, dobiveni su drugačiji rezultati. Statistički značajno viši arterijski tlak je izmjeren u životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na divlje tipove iz istog legla (Slika 34.: sistolički tlak: p = 0,026; dijastolički tlak: p = 0,009 i srednji arterijski tlak: p = 0,011). Iako je frekvencija srca niža u GC-C KO životinja, ona nije statistički značajna (GC-C WT: 230 ± 25 otkucaja/min, n = 6; GC-C KO: 162 ± 20 otkucaja/min, n = 6, p = 0,058). Statistički nije značajna ni razlika u volumenu krvi u repu (GC-C WT: 9,6 ± 2,6 µL, n = 6; GC-C KO: 12,7 ± 0,9 µL, n = 6, p = 0,296) niti u protoku krvi kroz rep (GC-C WT: 3,4 ± 0,8 µL/min, n = 6; GC-C KO: 4,8 ± 0,3 µL/min, n = 6, p = 0,142) što bi moglo utjecati na mjerenje.

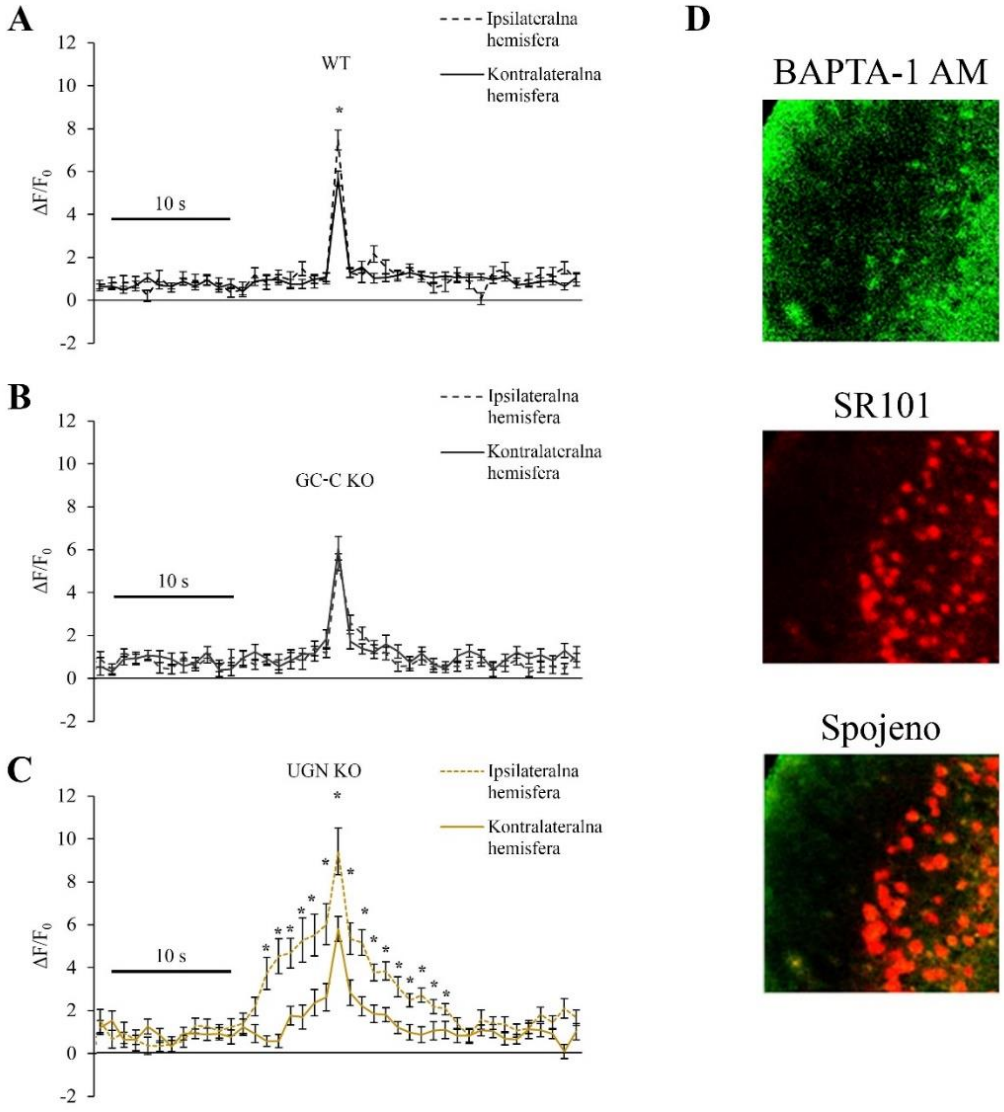
U životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO, n = 6) kao i divljim tipovima iz istog legla (UGN WT, n = 5) nije zamijećena razlika u sistoličkom (p = 0,947), dijastoličkom (p = 0,745), srednjem arterijskom tlaku (p = 0,795), frekvenciji srca (p = 0,500), te volumenu krvi (p = 0,918) i protoku krvi u repu (p = 0,899) kao što je vidljivo na slici 34.

5.3. UČINCI UROGVANILINA NA UNUTARSTANIČNU KONCENTRACIJU KALCIJA U ASTROCITIMA PERI-ISHEMIJSKE KORTIKALNE REGIJE MOŽDANOG UDARA

5.3.1. Veći porast koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijske kortikalne regije moždanog udara

Da bismo odredili učinak UGN-a na Ca^{2+} signalni sustav astrocita u peri-ishemijskom području moždanog udara 48 sati nakon izazivanja istog, moždani rezovi od barem tri životinje su inkubirani u Oregon-Green 488 BAPTA-1, AM (10

μM) boji osjetljivoj na Ca^{2+} te SR101 (0.8 μM) boji koja je astrocitni biljeg (Slika 35.). Rezultati su prikazani kao $\Delta F/F_0$ što je omjer razlike intenziteta boje u dvaju mjerenja u nizu i pozadinskog signala.



Slika 35. Urogvanilin dovodi do većeg Ca^{2+} odgovora u peri-ishemijskoj regiji moždanog udara u divljeg tipa životinja te životinja kojima nedostaje UGN, ali ne i u životinja kojima nedostaje GC-C. Promjene koncentracije Ca^{2+} nakon stimulacije urogvanilinom (UGN, 100 nM) prikazane su kao promjena $\Delta F/F_0$. (A) prikazani su zbirni rezultati za oba divlja tipa životinja (WT) koji pripadaju istom leglu sa životinjama kojima nedostaje gvanilat ciklaza C (GC-C) i UGN (GC-C WT i UGN WT). U astrocitima peri-ishemijskog područja moždanog udara u kori velikog mozga došlo je do statistički značajno većeg porasta unutarstanične koncentracije Ca^{2+} u odnosu na astrocite odgovarajuće kortikalne regije kontralateralne hemisfere (hemisfera bez moždanog udara) (* p = 0,002). (B) prikazani porast kod WT životinja nije pokazan i u životinja kojima nedostaje GC-C (GC-C KO, nema razlike u Ca^{2+} odgovoru između astrocita odgovarajućih kortikalnih područja obje hemisfere nakon stimulacije UGN-om). (C) u životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO) zamijećen je veći porast koncentracije Ca^{2+} u astrocitima peri-ishemijskog kortikalnog područja moždanog udara u odnosu na astrocite u odgovarajućem kortikalnom području kontralateralne hemisfere (*p = 0,0005–0,0387). Taj odgovor na poticaj UGN-om je trajao 17 s. Duže trajanje Ca^{2+} odgovora primijećeno je i kod divljeg tipa životinja iz istog legla. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a analizirani Studentovim *t*-testom. Crta označava vremensko trajanje od 10 s. Broj korištenih životinja, moždanih rezova te stanica vidi se u opisu slike 36. (D) prikazane su kortikalne stanice peri-ishemijskog područja moždanog udara s bojom osjetljivom na Ca^{2+} (BAPTA-1 AM (10 μM), gore), bojom specifičnom za astrocite (SR101 (0,8 μM), sredina) te njihovo preklapanje (dolje).

Astrociti peri-ishemijskog područja korteksa velikog mozga oštećene moždane hemisfere (ipsilateralna hemisfera) divljeg tipa životinja (WT - prikazani rezultati zajedno i za UGN WT i za GC-C WT) imaju statistički značajno veći porast koncentracije Ca^{2+} na podražaj UGN-om (100 nM) u odnosu na odgovarajuće kortikalno područje neoštećene, kontralateralne hemisfere (ipsilateralna hemisphera: 7,47 ± 0,46, n = 53; kontralateralna hemisphera: 5,68 ± 0,34, n= 68; p = 0,002, Slika 35.). Slični rezultati dobiveni su i kod životinja kojima nedostaje UGN (ipsilateralna hemisphera: 9,41 ± 1,1, n = 37; kontralateralna hemisphera: 5,78 ± 0,59, n = 22; p = 0,018). Ova razlika u Ca^{2+} odgovoru oštećene i neoštećene moždane hemisfere nije primijećena kod životinja kojima nedostaje GC-C (ipsilateralna hemisphera: 5,42 ± 0,39, n = 30; kontralateralna hemisphera: 5,93 ± 0,52, n = 38; p = 0,459).

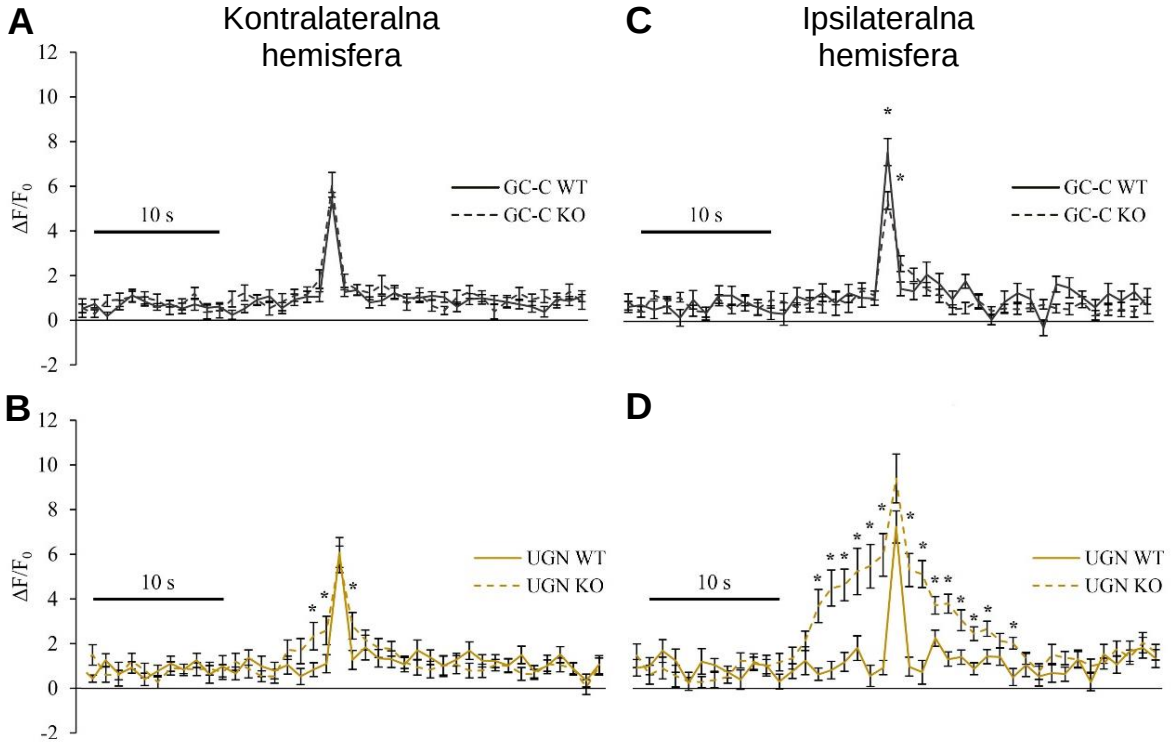
Trajanje odgovora je utvrđeno kada je došlo do statistički značajnog porasta koncentracije Ca^{2+} u odnosu na vrijednost 1. Kalcijski odgovor astrocita u obje hemisfere divljeg tipa životinja je trajao oko jedne sekunde (Slika 35). U kontralateralnim hemisferama životinja kojima nedostaje GC-C, kalcijski odgovor je bio samo malo produžen (2 s), dok je u životinja kojima nedostaje UGN taj odgovor bio značajno produžen (7 s). U ipsilateralnoj hemisferi ponovno je u životinja kojima nedostaje GC-C odgovor bio neznatno produžen (3 s), dok je u životinja kojima nedostaje UGN ovaj odgovor bio znatno produžen i trajao je čak 17 s.

5.3.2. Životinje kojima nedostaje GC-C nemaju veći porast koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijskog kortikalnog područja moždanog udara

Sada ćemo usporediti Ca^{2+} odgovor na podražaj UGN-om u astrocitima peri-ishemijskog područja korteksa velikog mozga zahvaćenog moždanim udarom (ipsilateralne) te nezahvaćene (kontralateralne) hemisfere u pojedinim skupinama životinja. Kalcijski odgovor se nije razlikovao u kontralateralnim hemisferama bilo životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na divlje tipove životinja iz istog legla (Slika 36A i B). Kako smo i očekivali, Ca^{2+} odgovor u astrocitima peri-ishemijskog područja moždanog udara u ipsilateralnim hemisferama se razlikovao u životinja kojima nedostaje UGN, kako je pokazano i za divlji tip životinja, ali ne i u životinja kojima nedostaje GC-C.

U peri-ishemijskom području moždanog udara smještenog u korteksu velikog mozga ipsilateralne hemisfere kalcijski odgovor astrocita na podražaj UGN-om je bio

statistički značajno smanjen u životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (Slika 36C: GC-C WT: 7,59 ± 0,6, n = 34; GC-C KO: 5,42 ± 0,39, n = 30; p = 0,005) te se kalcijski odgovor u astrocitima obje moždane hemisfere u ovih životinja nije razlikovao (Slika 35B). Kako smo i očekivali, u astrocitima kortikalnog peri-ishemijskog područja ipsilateralne hemisfere životinja kojima nedostaje UGN, veličina kalcijskog odgovora je bila slična kad se usporedila s divljim tipom životinja iz istog legla (Slika 36D: UGN WT: 7,25 ± 0,73, n = 19; UGN KO: 9,41 ± 1,1, n = 37; p = 0,188).



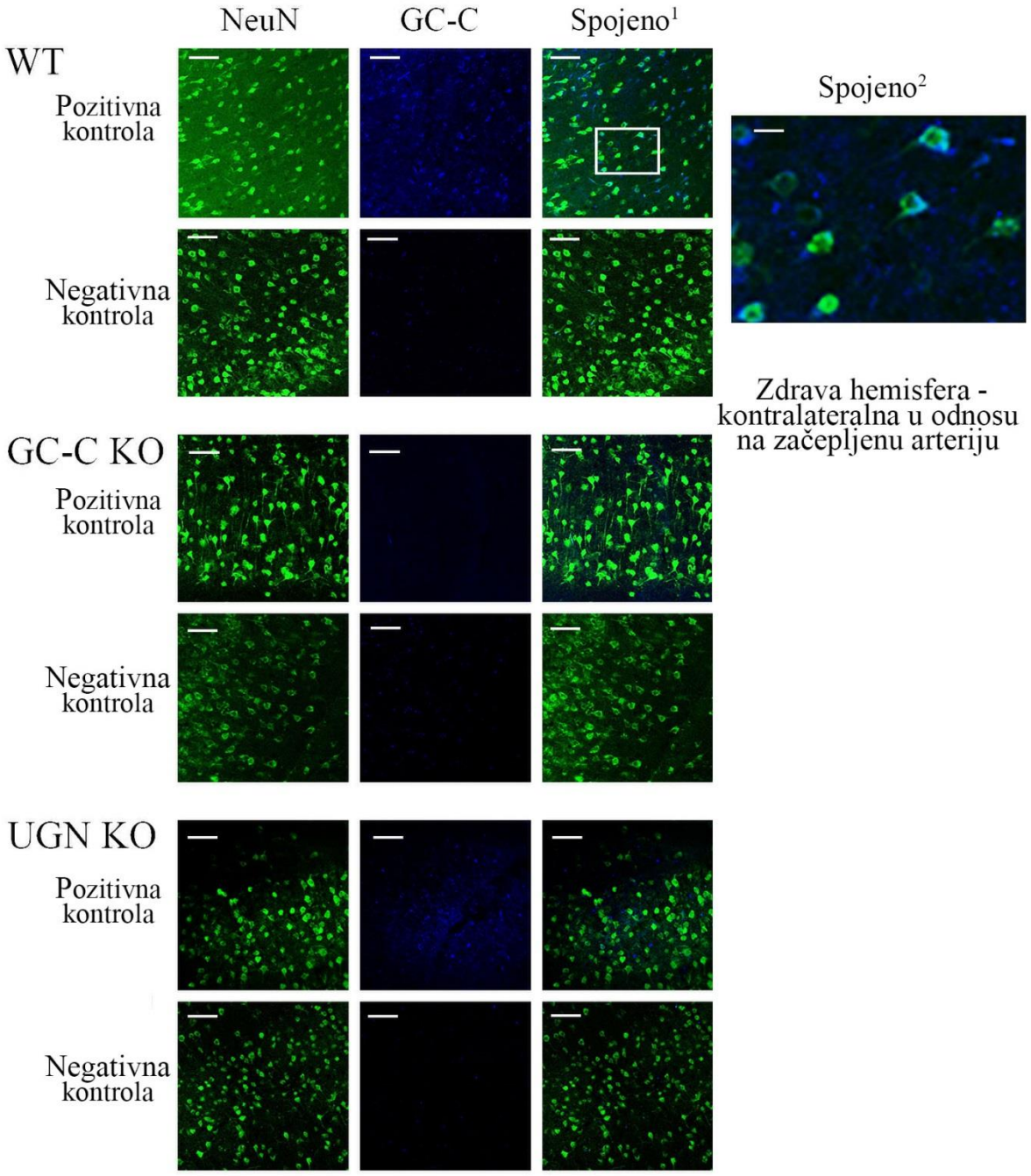
Slika 36. Smanjen Ca^{2+} odgovor astrocita peri-ishemijskog područja moždanog udara u korteksu velikog mozga na podražaj UGN-om u životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na divlje tipove životinja iz istog legla. (A) nije nađena razlika u kalcijskom odgovoru u odgovarajućim kortikalnim područjima kontralateralne hemisfere u životinja kojima nedostaje gvanilat ciklaza C (GC-C KO: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 6, $n_{stanice}$ = 38) u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (GC-C WT: $n_{životinje}$ = 4, $n_{moždani\ rezovi}$ = 8, $n_{stanice}$ = 40). (B) nije nađena razlika u veličini kalcijskog odgovora ni u astrocitima odgovarajućeg kortikalnog područja kontralateralne hemisfere u životinja kojima nedostaje urogvanilin (UGN KO: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 6, $n_{stanice}$ = 22) u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla (UGN WT: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 5, $n_{stanice}$ = 28). Kalcijski odgovor je u UGN KO životinja bio produžen te je trajao 3 s (*p =0,025–0,047, statistički značajna razlika u kalcijskom odgovoru astrocita kortikalnog područja kontralateralne hemisfere životinja kojima nedostaje UGN u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla). (C) životinje kojima nedostaje GC-C (GC-C KO: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 6, $n_{stanice}$ = 30) imale su statistički značajno manji kalcijski odgovor na podražaj UGN-om u astrocitima peri-ishemijskog kortikalnog područja moždanog udara ipsilateralne hemisfere u odnosu na divlji tip iz istog legla (GC-C WT: $n_{životinje}$ = 4, $n_{moždani\ rezovi}$ = 7, $n_{stanice}$ = 34; * p = 0,005–0,018). (D) jačina kalcijskog odgovora astrocita u kortikalnom peri-ishemijskom području moždanog udara na podražaj UGN-om u životinja kojima nedostaje UGN (UGN KO: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 6, $n_{stanice}$ = 37) nije se razlikovala od jačine kalcijskog odgovora u divljem tipu životinja iz istog legla (UGN WT: $n_{životinje}$ = 3, $n_{moždani\ rezovi}$ = 5, $n_{stanice}$ = 19), ali je trajao statistički značajno duže (* p = 0,00002–0,02789, statistički značajna razlika u kalcijskom odgovoru između UGN WT i UGN KO životinja). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška, a analizirani Studentovim *t* testom. Crta označava vremensko trajanje od 10 s. UGN – urogvanilin.

5.4. IZRAŽAJ GC-C-a U ASTROCITIMA PERI-ISHEMIJSKOG PODRUČJA MOŽDANOG UDARA

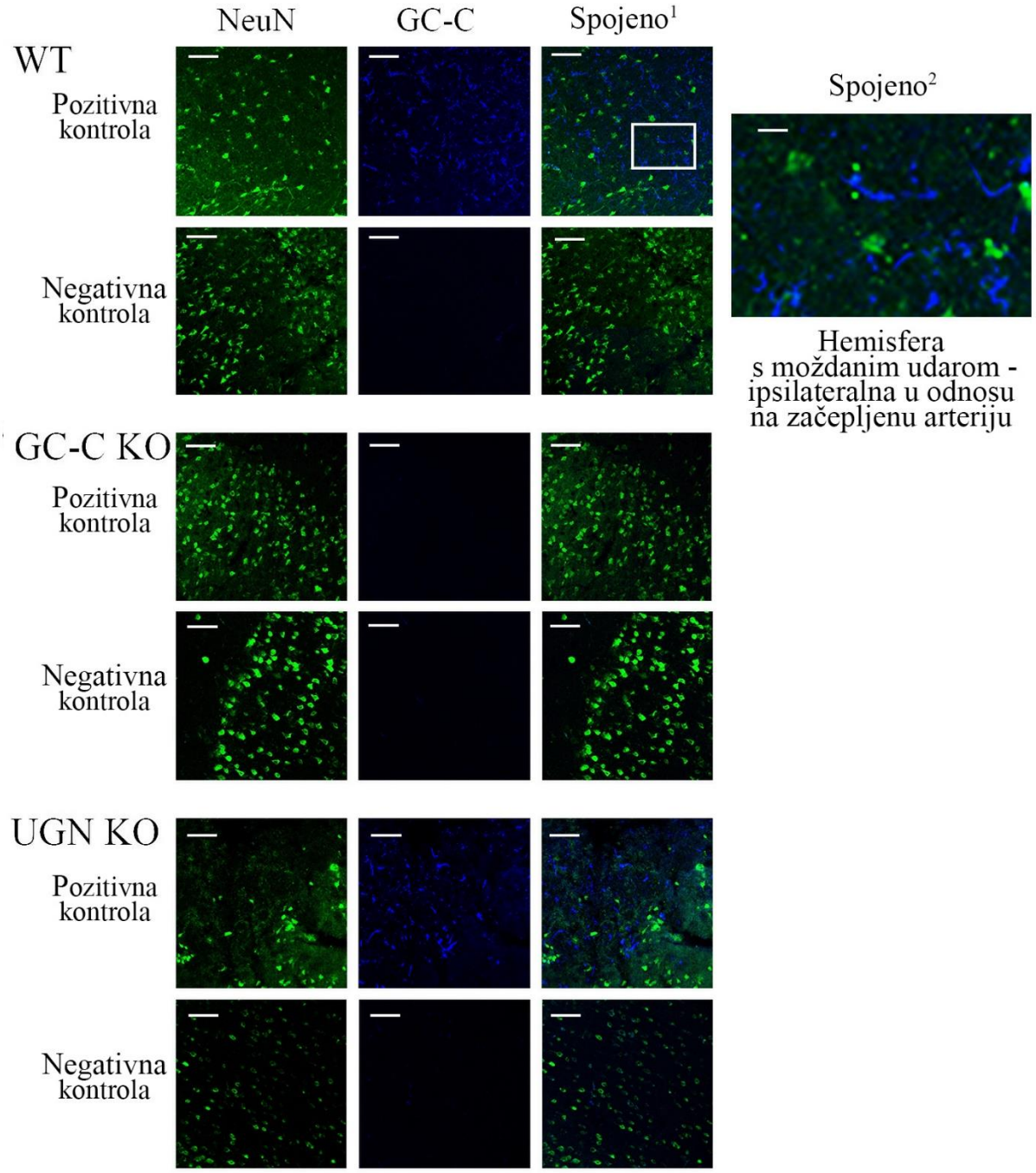
5.4.1. Promjena izražaja GC-C-a u peri-ishemijskom području moždanog udara u korteksu velikog mozga

Četrdeset i osam sati nakon izazivanja moždanog udara, na moždanim rezovima životinja kojima nedostaje GC-C i UGN te divljim tipovima iz istog legla određen je smještaj GC-C-a koristeći anti-GC-C protutijelo te smještaj neurona koristeći njihov specifični biljeg NeuN (Slike 37. i 38.). GC-C je bio izražen u kortikalnim neuronima velikog mozga kontralateralnih hemisfera kod životinja divljeg tipa (bile one iz istog lega kao i životinje kojima nedostaje GC-C ili UGN) te u životinja kojima nedostaje UGN, što je pokazano ko-lokalizacijom NeuN-a i GC-C-a (Slika 37.). Neuralan izražaj GC-C-a u nezahvaćenoj hemisferi odgovara nedavno objavljenim rezultatima (217). Životinje kojima nedostaje GC-C korištene su kao negativna kontrola te ne pokazuju izražaj GC-C-a.

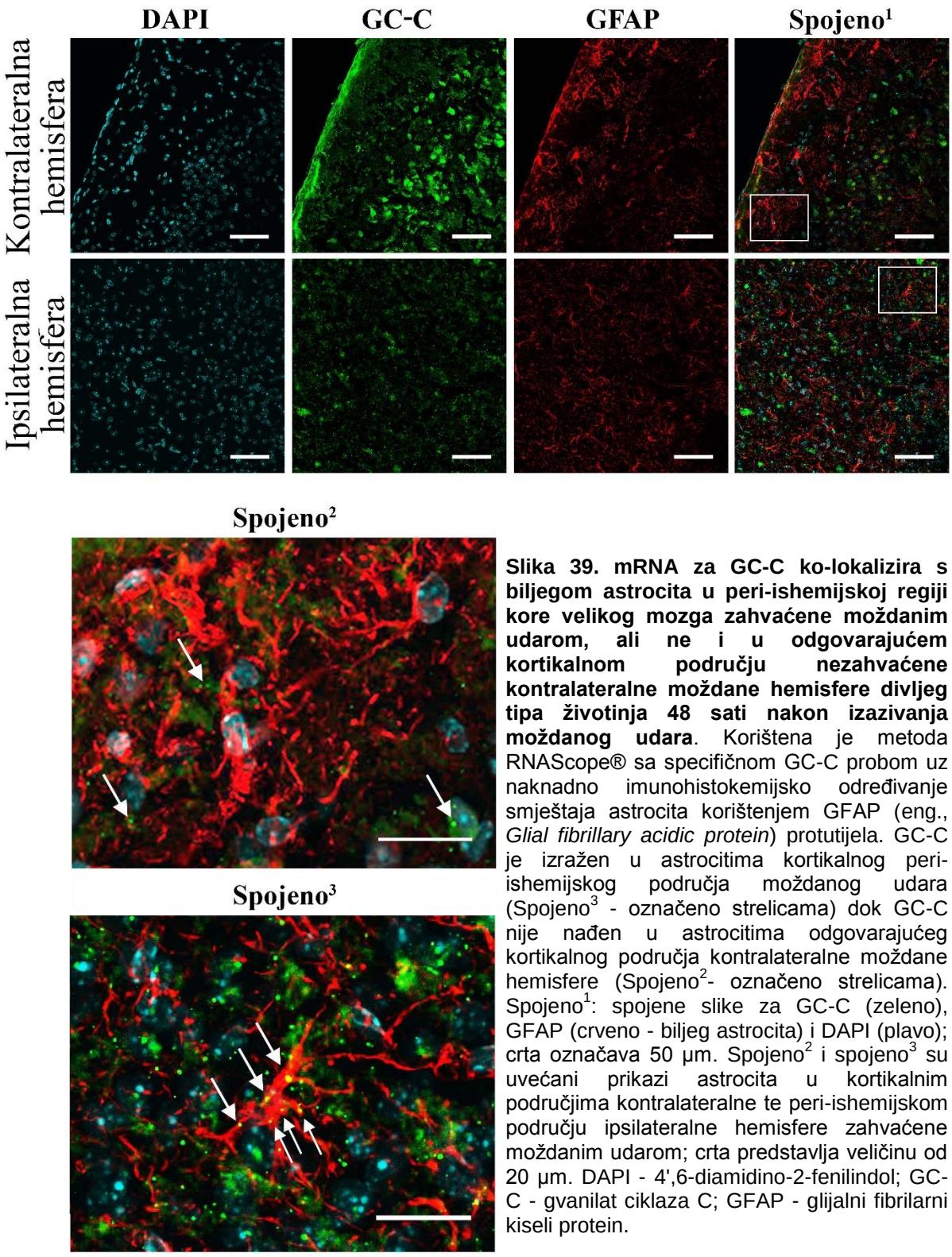
Za razliku od kontralateralne hemisfere, u peri-ishemijskom području korteksa velikog mozga ipsilateralne hemisfere divljeg tipa životinja te životinja kojima nedostaje UGN izražaj GC-C-a je bio promijenjen. U ovom području, GC-C nije ko-lokalizirao s NeuN-om, što upućuje na pretpostavku da nakon moždanog udara izražaj GC-C-a više nije u neuronima već u drugom tipu moždanih stanica.



Slika 37. GC-C je izražen u neuronima kore velikog mozga kontralateralne hemisfere (hemisfera bez moždanog udara). Izražaj GC-C-a u neuronima pokazan je imunohistokemijskom metodom kod životinja kojima nedostaje urogvanilin (UGN) te divljem tipu životinja upotrebom protutijela specifičnih za NeuN i GC-C. Moždani rezovi životinja kojima nedostaje GC-C korišteni su kao negativna kontrola. Pozitivna kontrola: korišteno specifično GC-C protutijelo. Negativna kontrola: bez korištenja protutijela specifičnog za GC-C. Spojeno[1]: spojene slike na kojima su prikazani smještaji GC-C-a i NeuN-a. Crta označava veličinu od 50 µm. Spojeno[2]: uvećan dio spojene slike 1. Crta predstavlja veličinu od 10 µm. NeuN – biljeg jezgri neurona; GC-C – gvanilat ciklaza C; WT - divlji tip životinja; GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C; UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.



Slika 38. GC-C nije izražen u neuronima peri-ishemijske regije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom. Izražaj GC-C-a i NeuN-a pokazan je imunohistokemijskom metodom kod životinja kojima nedostaje urogvanilin (UGN) te divljem tipu životinja upotrebom protutijela specifičnih za NeuN i GC-C. Moždani rezovi životinja kojima nedostaje GC-C korišteni su kao negativna kontrola. Pozitivna kontrola: korišteno specifično GC-C protutijelo. Negativna kontrola: bez korištenja protutijela specifičnog za GC-C. Spojeno[1]: spojene slike na kojima su prikazani smještaji GC-C-a i NeuN-a. Crta označava veličinu od 50 μm. Spojeno[2]: uvećan dio spojene slike 1. Crta predstavlja veličinu od 10 μm. NeuN – biljeg jezgri neurona; GC-C – gvanilat ciklaza C; WT - divlji tip životinja; GC-C KO - životinje kojima nedostaje GC-C; UGN KO - životinje kojima nedostaje UGN.



Slika 39. mRNA za GC-C ko-lokalizira s biljegom astrocita u peri-ishemijskoj regiji kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom, ali ne i u odgovarajućem kortikalnom području nezahvaćene kontralateralne moždane hemisfere divljeg tipa životinja 48 sati nakon izazivanja moždanog udara. Korištena je metoda RNAScope® sa specifičnom GC-C probom uz naknadno imunohistokemijsko određivanje smještaja astrocita korištenjem GFAP (eng., *Glial fibrillary acidic protein*) protutijela. GC-C je izražen u astrocitima kortikalnog peri-ishemijskog područja moždanog udara (Spojeno^3 - označeno strelicama) dok GC-C nije nađen u astrocitima odgovarajućeg kortikalnog područja kontralateralne moždane hemisfere (Spojeno^2- označeno strelicama). Spojeno^1: spojene slike za GC-C (zeleno), GFAP (crveno - biljeg astrocita) i DAPI (plavo); crta označava 50 μm. Spojeno^2 i spojeno^3 su uvećani prikazi astrocita u kortikalnim područjima kontralateralne te peri-ishemijskom području ipsilateralne hemisfere zahvaćene moždanim udarom; crta predstavlja veličinu od 20 μm. DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol; GC-C - gvanilat ciklaza C; GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein.

5.4.2. Izražaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijskog područja kore velikog mozga zahvaćenog moždanim udarom

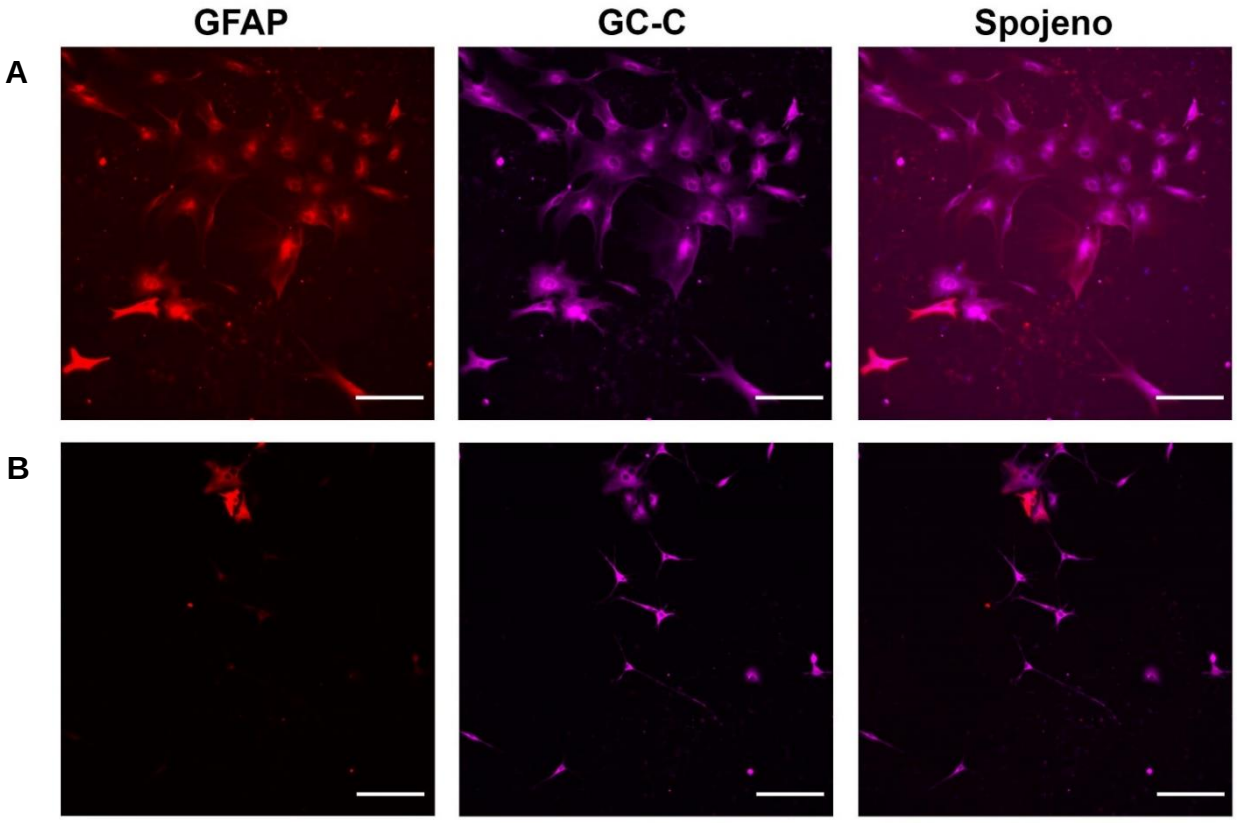
Snižen kalcijski odgovor smo pokazali u astrocitima peri-ishemijskog područja kore velikog mozga zahvaćenog moždanim udarom nakon stimulacije UGN-om kod životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na ostale grupe životinja korištene u ovom istraživanju. Poznato je da je u fiziološkim uvjetima GC-C izražen u neuronima, a ne u astrocitima (217) pa se postavlja pitanje kako uopće GC-C može utjecati na Ca^{2+} odgovor.

Po svim dosadašnjim rezultatima izražaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijske regije moždanog udara je vjerojatan. Da bismo to i dokazali odredili smo nazočnost GC-C-a na mRNA razini koristeći *in* situ hibridizaciju (RNAScope®) sa specifičnim GC-C probama te naknadnom imunohistokemijskom metodom pokazali ko-lokalizaciju sa specifičnim protutijelom za GFAP. Ova metoda je korištena na moždanim rezovima divljih tipova životinja 48 sati nakon izazivanja moždanog udara (Slika 39.). mRNA specifična za GC-C je pronađena na astrocitima (GFAP-pozitivne stanice) peri-ishemijske regije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom, dok se ko-lokalizacija nije mogla naći na stanicama odgovarajuće regije korteksa kontralateralne hemisfere (hemisfera bez moždanog udara).

5.5. IZRAŽAJ GC-C-a U PRIMARNOJ KULTURI MOŽDANIH STANICA U UVJETIMA PRIMJERENE OKSIGENACIJE I HIPOKSIJSKIM UVJETIMA

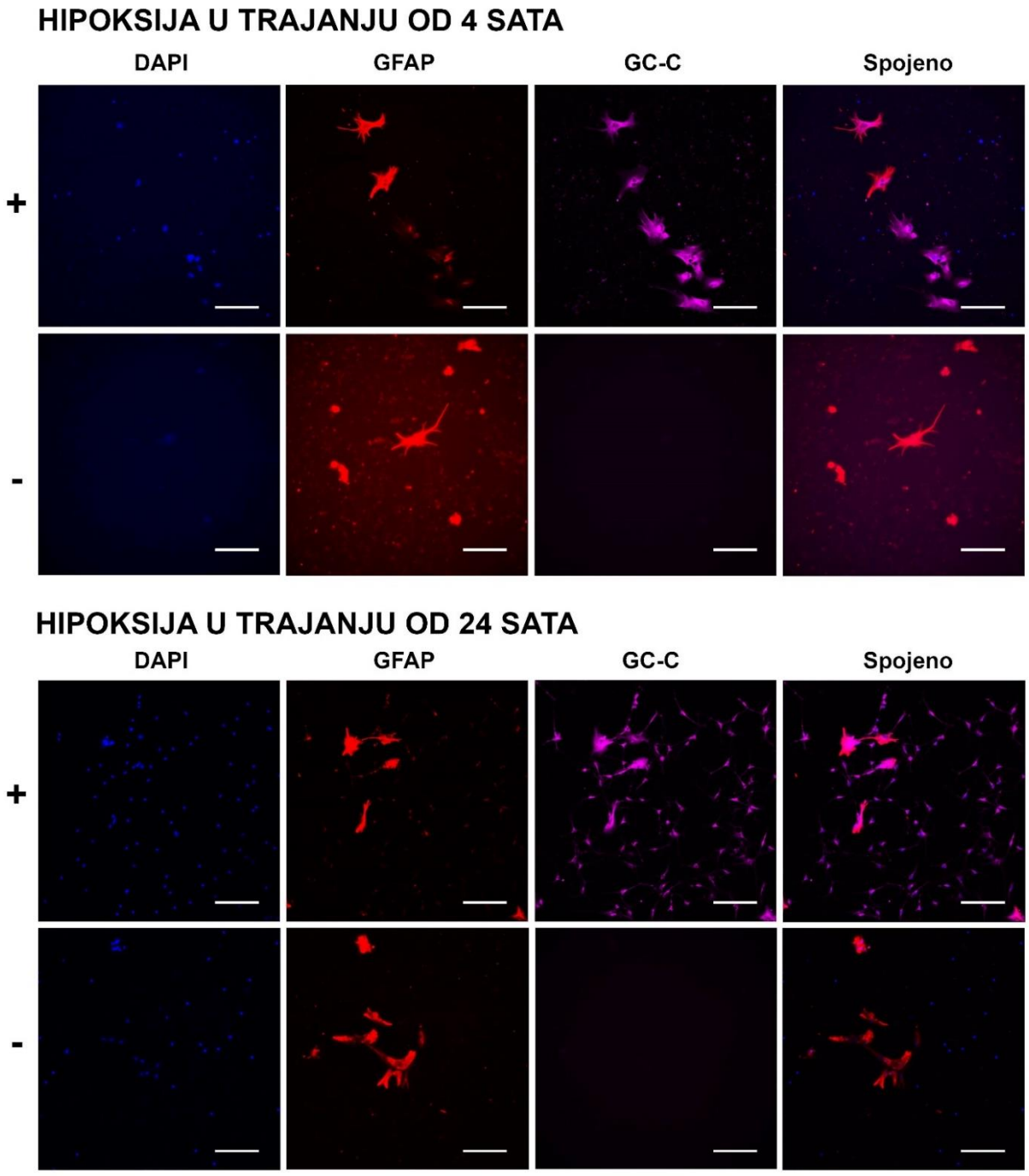
U nastavku ovog istraživanja željeli smo detaljno istražiti promjene izražaja GC-C-a u astrocitima u peri-ishemijskoj regiji moždanog udara na primarnoj kulturi moždanih stanica podvrgnutih hipoksijskim uvjetima. Kako astrociti izolirani magnetski aktiviranim odjeljivanjem stanica putem protutijela specifičnog za ACSA-2 (površinski specifični antigen astrocita, eng., *Astrocyte cell surface antigen-2*) ne izražavaju GC-C (217), prvi korak u ovom dijelu istraživanja je bio provjeriti izražaj GC-C-a u astrocitima miješane kulture moždanih stanica 6-7 dana nakon izolacije.

U uvjetima primjerene oksigenacije, izražaj GC-C-a i GFAP-a u astrocitima je identičan. Osim u astrocitima, GC-C izražaj je primijećen i u morfološki dobro diferenciranim neuronima (Slika 40.).



Slika 40. U primarnoj kulturi moždanih stanica u uvjetima primjerene oksigenacije GC-C je izražen i u astrocitima (A) i u morfološki dobro diferenciranim neuronima (B). Primarna kultura moždanih stanica izolirana je iz novookoćenih divljih tipova životinja (P0) te održavana u kulturi 6-7 dana. Crta označava veličinu od 100 μm. GC-C - gvanilat ciklaza C; GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein.

Iz dosadašnjih rezultata je očigledno da se izražaj GC-C-a u astrocitima pojavljuje i na druge podražaje, a ne samo pod djelovanjem hipoksije, vjerojatno na podražaj koji dovodi do diobe astrocita. Iako bi se poticaji za izražaj GFAP-a i GC-C-a mogli djelomično preklapati, u hipoksijskim uvjetima (pogotovo 4 sata nakon početka hipoksije) izražaj GC-C-a ne slijedi u potpunosti izražaj GFAP-a (Slika 41.). Otkrivanje detaljnog mehanizma i poticaja na izražaj GC-C-a u astrocitima je izvan okvira ovog istraživanja.



Slika 41. U primarnoj kulturi moždanih stanica u hipoksijskim uvjetima u trajanju od 4 i 24 sata GC-C izražaj u astrocitima ne prati i izražaj GFAP-a. Primarna kultura moždanih stanica izolirana je iz novookoćenih divljih tipova životinja (P0) te održavana u kulturi 6-7 dana. Crta označava veličinu od 100 μm. DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol; GC-C - gvanilat ciklaza C; GFAP - glijalni fibrilarni kiseli protein; „+“ – stanice bojane primarnim GC-C protutijelom; „-“ – stanice bez dodatka primarnog GC-C protutijela (negativna kontrola).

6. RASPRAVA

Gvanilinski peptidi pripadaju obitelji natriuretskih peptida te aktiviraju GC-C što dovodi do porasta unutarstanične koncentracije cGMP-a, koji aktivira protein kinazu G ovisnu o cGMP-u. Postojanje receptora za gvanilinske peptide te dijelova signalnog sustava u mozgu je poznato gotovo tri desetljeća te je, što je važno za ovo istraživanje, izražaj GC-C-a pronađen i u korteksu velikog mozga laboratorijskih životinja i ljudi (217, 396).

Kako u velikom broju moždanih regija GP-i ne mogu dospjeti iz krvi zbog krvno-moždane barijere upitano je postojanje agonista GC-C receptora u mozgu. Izražaj ostalih natriuretskih peptida i njihovih receptora u mozgu (Tablica 6.) je poznat već neko vrijeme (397) dok izražaj GN-a nije pronađen u mozgu miša i štakora (129). Iako izražaj UGN-a u mozgu, osim u oposumu (143), nije potvrđen u istraživanjima na drugim životinjskim vrstama (294, 295), mi smo potvrdili izražaj UGN-a u miševa u korteksu velikog mozga (slojevi 2/3), malom mozgu (Purkinjeove stanice), hipotalamusu, srednjem mozgu, amigdali, entorinalnom korteksu te laterodorzalnoj tegmentalnoj jezgri (rad u izradi).

Tablica 6. Izražaj natriuretskih peptida i njihovih receptora u mozgu

Regija:	ANP	BNP	CNP	UGN	GC-A	GC-B	GC-C	NPR-C
Korteks	slab	jak	jak	jak	srednji	srednji	jak	jak
Amigdala	srednji	slab	jak	srednji	slab	srednji	srednji	jak
HTH	jak	jak	jak	slab	jak	jak	srednji	jak
MM	slab	slab	jak	slab	slab	srednji	slab	srednji
HC	slab	slab	slab	neg.	slab	slab	-	srednji

Prilagođeno prema (397). GC - gvanilat ciklaza; NPR-C - receptor natriuretskih peptida C; GN - gvanilin; HC - hipokampus; HTH - hipotalamus; MM - mali mozak; UGN – urogvanilin

Uloga agonista gvanilat ciklaza u razvoju moždanog udara pokazana je u nekoliko provedenih istraživanja. Još 1991. godine Naruse i sur., pokazali su da aktivacija GC-A dovodi do neuroprotektivnog učinka u odraslih štakora dok agonisti GC-B imaju neuroprotektivnni učinak tijekom nastanka neonatalnih hipoksijsko-ishemijskih ozljeda mozga (398). U pokusima provedenim u našem laboratoriju,

urodilatin, kao bubrežna izoforma ANP-a koji posjeduje dulje djelovanje (otporniji na razgradnju endopeptidazama), smanjuje volumen ishemijske lezije djelujući inhibicijski na nepoželjan učinak bradikinina. CNP, agonist GC-B, nije imao isti takav učinak (378, 399). Ova istraživanja upućuju na moguću važnost natriuretskih peptida u razvoju moždanog udara te su potrebna daljnja istraživanja kao što je istraživanje prikazano u ovoj doktorskoj disertaciji.

U skupinu natriuretskih peptida pripadaju i gvanilinski peptidi sa svojim glavnim predstavnicima, gvanilinom i urogvanilinom. Ovi hormoni se vežu za GC-C, koji je za sada jedini poznati receptor za gvanilinske peptide. Kao što je i vidljivo u tablici 6., GC-C je pronađen u nekoliko moždanih regija u laboratorijskih životinja i ljudi kao što su: hipotalamus (251,294, 400), srednji mozak (214), amigdala (216) i korteks velikog mozga (217, 396). Upravo ovako širok smještaj GC-C-a, receptora za UGN, daje nam mogućnost istraživanja učinaka ovog hormona na razvoj moždanog udara te utvrđivanje da li će aktivacija ovog receptora dovoditi do preaktivnih ili štetnih učinaka tijekom razvoja moždanog udara.

Učinak UGN-a na razvoj moždanog udara utvrdili smo određivanjem promjena veličine moždanog udara na mišjem modelu (začepljenje srednje moždane arterije u trajanju od 60 min - MCAO) na životinjama kojima nedostaje UGN ili GC-C te divljim tipovima životinja iz istog legla. MR snimke mozga miševa te procjena veličine moždanih hemisfera učinjene su prije te 24 sata nakon izazivanja moždanog udara. Da bismo procijenili mogući učinak razlike u arterijskom tlaku u pojedinih skupina životinja na veličinu moždane lezije, u ispitivanih životinja je mjeren tlak, a da bi se odredio stanični učinak UGN-a na moždanim rezovima hemisfera sa i bez moždanog udara, određivala se promjena unutarstanične koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijske regije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom 48 sati nakon izazivanja istog. Na kraju je i određen smještaj GC-C-a u astrocitima peri-ishemijskog područja kore velikog mozga zahvaćenog moždanim udarom u odnosu na predominantan neuralni smještaj GC-C-a u sličnom kortikalnom području neoštećene moždane hemisfere. Da bismo detaljnije razjasnili mehanizam nastanka ove pojave, istraživanje smo proveli i na miješanoj primarnoj kulturi moždanih stanica.

6.1. SMANJENA VELIČINA MOŽDANE LEZIJE ISHEMIJSKOG MOŽDANOG UDARA KOD ŽIVOTINJA KOJIMA NEDOSTAJE GC-C

Kako su provedena snimanja životinja prije izazivanja moždanog udara (378, 401), mogli smo usporediti veličine ne samo hemisfere zahvaćene moždanim udarom te kontralateralne hemisfere koja nije bila zahvaćena udarom već i usporediti njihove veličine u odnosu na stanje prije izazivanja moždanog udara. Dan nakon izazivanja moždanog udara, zbog razvoja edema i same ishemijske lezije, došlo je do porasta volumena oštećene hemisfere, dok se volumen ne zahvaćene hemisfere neznatno smanjio na račun povećanja suprotne hemisfere, ali ta promjena nije bila statistički značajna. Kako je bilo i za očekivati, i u životinja kojima nedostaje GC-C i u životinja kojima nedostaje UGN te divljih tipova životinja iz istog legla, dan nakon izazivanja moždanog udara zahvaćena ipsilateralna hemisfera je bila veća u odnosu na nezahvaćenu hemisferu iste životinje.

Unatoč sličnim promjenama u veličini moždanih hemisfera, životinje kojima nedostaje GC-C imaju manju moždanu leziju u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla. Veličina moždanog edema je također bila manja u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla, ali ona nije bila statistički značajna. Veličina edema je prikazana kao postotak porasta volumena hemisfere zahvaćene moždanim udarom u odnosu na veličinu te iste hemisfere prije izazivanja moždanog udara. Ovi rezultati upućuju na to da aktivacija GC-C-a dovodi do povećanja ishemijske lezije, a ne do smanjenja kako je to pokazano za aktivaciju GC-A (378). Suprotan učinak gvanilinskih u odnosu na druge natriuretske peptide na veličinu moždanog udara ukazuje i na njihovu različitu fiziološku ulogu, ali i različit mehanizam djelovanja u patofiziološkim stanjima te je cilj ove doktorske disertacije bio detaljnije proučiti upravo učinak gvanilinskih peptida na nastanak moždanog udara. Nedostatak UGN-a nije doveo do jednakih rezultata kao i nedostatak GC-C-a te možemo pretpostaviti moguću ulogu još uvijek neotkrivenih agonista signalnog sustava GP-a u mozgu (moguća uloga sustavnih promjena u Ca^{2+} odgovoru, vidi kasnije).

Ako promotrimo sve skupine životinja te stavimo u odnos razvoj simptoma moždanog udara 24 te 48 sati nakon izazivanja istog, vidljivo je da su dobiveni očekivani rezultati, a to je da što je lezija veća to su i simptomi izraženiji (391, 392). No, ako zasebno pogledamo težinu simptoma moždanog udara ovisno o skupinama

životinja, tada nismo dobili statistički značajno slabije izražene simptome kod miševa kojima nedostaje GC-C, a koji imaju manju moždanu leziju, u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla.

6.2. POVIŠEN ARTERIJSKI TLAK KOD ŽIVOTINJA KOJIMA NEDOSTAJE GC-C

Prije nego što smo pokušali odrediti učinak UGN-a na staničnoj razini trebalo je procijeniti da li bi razlike u arterijskom tlaku u ispitivanih životinja mogle biti razlogom nastanka i različitih veličina same lezije nakon moždanog udara, bilo zbog promjena u perfuziji tijekom začepljenja srednje moždane arterije ili nakon reperfuzije. Naime, poznato je da životinje kojima nedostaje UGN imaju povišen arterijski tlak u odnosu na divlje tipove životinja iz istog legla (292).

U ovom istraživanju, viši sistolički, dijastolički i srednji arterijski tlak izmjereni su kod životinja kojima nedostaje GC-C, a ne UGN, u odnosu na divlji tip životinja iz istog legla. Nije postojala statistički značajna razlika u ovih životinja u srčanoj frekvenciji, volumenu krvi u repu (mjesto mjerenja tlaka manžetom) ili krvnog protoka u repu, što su parametri koji bi mogli utjecati na izmjerene vrijednosti tlakova. Mogući razlog neusklađenosti dobivenih rezultata s rezultatima koje su objavili Lorenz i suradnici mogla bi biti razlika u starosti životinja. U ovom istraživanju mjerenja smo provodili na životinjama starosti od 30 tjedana (7,5 mjeseci) upravo zbog kasnije dobi u kojoj se pojavljuje ishemijski moždani udar u ljudi (402), dok su Lorenz i suradnici provodili istraživanje na gotovo upola mlađim životinjama (15-25 tjedana starosti).

Važno je naglasiti da iste promijene u arterijskom tlaku nisu primijećene u životinja koje su uzgajane kao samostalne, čiste linije, iako su životinje kojima nedostaje GC-C ili UGN nastale na bazi divljeg tipa životinja s kojima su se uspoređivale (C57Bl/6). Ovaj rezultat samo ukazuje na potrebu korištenja životinja iz istog legla kadgod se koriste životinje kojima nedostaje izražaj gena od interesa. Neizmjerno je važno da se životinje razlikuju upravo samo po izražaju te jedne bjelančevine od interesa, a ne i u više njih, što je slučaj kada se rade istraživanja na čistim linijama miševa.

Posebnu pažnju treba posvetiti radu koji su objavili Thakkar i suradnici 2020. godine (403). U ovom radu autori prikazuju da bi porast srednjeg arterijskog tlaka mogao dovesti do smanjenja veličine moždane lezije kod ishemijskog moždanog udara. Upravo je to i slučaj kod naših životinja kojima nedostaje GC-C, naime imaju manju leziju, a viši i sistolički i dijastolički, ali i srednji arterijski tlak. U objavljenom radu za porast tlaka od 10 mmHg, veličina lezije u štakora je bila za 10 % manja. U našem istraživanju, za isti porast srednjeg arterijskog tlaka u životinja kojima nedostaje GC-C u odnosu na divlji tip iz istog legla, veličina lezije je bila 35 % manja. Uz navedeno, nije pronađena korelacija između izmjerenih tlakova i veličine moždane lezije ili edema jer je srednji arterijski tlak viši u životinja kojima nedostaje UGN, ali kod tih životinja se ne razvija manja moždana lezija. Ovi rezultati ukazuju na postojanje i drugih čimbenika koji dovode do razvoja manje moždane lezije u životinja kojima nedostaje GC-C.

Iako smo pokazali razliku u arterijskom tlaku u ispitanih grupa životinja, ta razlika nije utjecala na protok tijekom djelomičnog začepljenja srednje moždane arterije. Upravo promjene u protoku bi mogle značajno utjecati na veličinu same lezije. Ako pogledamo korelacije ostatnog protoka tijekom začepljenja srednje moždane arterije i veličine moždane lezije u svih testiranih životinja, ne postoji pozitivna korelacija kako bi se očekivalo. Razlog tome je upravo utjecaj samog životinjskog soja na razvoj većeg ili manjeg moždanog udara, a ne razlike u tlaku koje između životinja postoje.

6.3. SMANJENI UČINCI UROGVANILINA NA KALCIJSKI ODGOVOR ASTROCITA U KORTIKALNOJ PERI-ISHEMIJSKOJ REGIJI MOŽDANOG UDARA KOD ŽIVOTINJA KOJIMA NEDOSTAJE GC-C

Da bismo utvrdili mogući mehanizam smanjenja moždane lezije kod životinja kojima nedostaje GC-C proveli smo mjerenja unutarstanične koncentracije kalcija u astrocitima peri-ishemijske lezije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom te odgovarajuće regije korteksa nezahvaćene (kontralateralne) hemisfere u svih skupina životinja 48 sati nakon izazivanja moždanog udara. Razlog upravo ovog pristupa je da UGN promjenom koncentracije Ca^{2+} u astrocitima tijekom fizioloških uvjeta povećava aktivnost NHE izmjenjivača te povećava ulazak hidrogenkarbonata

u astrocite (217). Upravo ovo djelovanje UGN-a dovodi do još jačeg zakiseljavanja međustanične tekućine što pogoršava već postojeću acidozu koja nastaje tijekom moždanog udara (404).

U fiziološkim uvjetima, GC-C je većinom izražen u neuronima, a ne i u astrocitima (217). Upravo zbog toga je i Ca^{2+} odgovor astrocita u korteksu velikog mozga na podražaj UGN-om jednak u nezahvaćenim (kontralateralnim) hemisferama životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN u odnosu na divlje tipove životinja iz istog legla. Kako je pokazano i ranije, nije zamijećen Ca^{2+} odgovor kortikalnih neurona u nezahvaćenoj hemisferi (217). Ovaj Ca^{2+} odgovor u astrocitima je neovisan o GC-C-u.

Jači Ca^{2+} odgovor na stimulaciju UGN-om zabilježen je u astrocitima peri-ishemijske regije kore velikog mozga zahvaćene moždanim udarom, i to u divljeg tipa životinja te životinja kojima nedostaje UGN, kada se odgovori usporede s odgovarajućom kortikalnom regijom nezahvaćene hemisfere. Promijena u Ca^{2+} odgovoru astrocita tijekom razvoja moždanog udara poznata je već neko vrijeme. Ovaj odgovor uključuje o Ca^{2+}-ovisno otpuštanje neurotransmitera nakon čega slijede promjene u ekscitabilnosti neurona te neurotoksičnost koja se javlja u moždanom udaru (405). Nadalje, kako je već ranije navedeno, aktivacija Ca^{2+}-ovisnog signalnog puta za UGN dovodi do zakiseljavanja izvanstanične tekućine povećanjem aktivnosti NHE i ulaska hidrogenkarbonata u astrocite (217). Sudjelovanje NHE i transporta hidrogenkarbonata u razvoju moždanog udara nije novitet (406, 407). Primijećene promjene u Ca^{2+} odgovoru astrocita peri-ishemijskog područja na podražaj UGN-om 48 sati nakon izazivanja moždanog udara mogle bi biti i dio mehanizma nazvanog astroglioza te stvaranja glijalnog ožiljka (408). Stoga, povećanje Ca^{2+} odgovora astrocita u peri-ishemijskom području moždanog udara može biti štetno djelujući putem nekoliko različitih mehanizama.

Razlika u Ca^{2+} odgovoru astrocita peri-ishemijskog područja korteksa velikog mozga i astrocita u odgovarajućoj kortikalnoj regiji kontralateralne hemisfere nije primijećen u životinja kojima nedostaje GC-C što ukazuje na mogućnost da upravo smanjeni Ca^{2+} odgovor astrocita na podražaj UGN-om je i odgovoran za nastanak manje lezije moždanog udara u tih životinja.

Kako može GC-C djelovati na stanični Ca^{2+} odgovor? Kako je i ranije navede-

no, aktivacija GC-C dovodi do stvaranja cGMP-a koji može aktivirati ionske kanale ovisne o cikličkim nukleotidima (CGN kanali, engl. *cyclic nucleotide–gated ion channel*) što pak može regulirati ulazak Ca^{2+} iz izvanstanične tekućine u astrocite. Izražaj CGN kanala je pokazan u astrocitima štakora (238) te je, sukladno našim rezultatima, njihov izražaj povećan u astrocitima nakon nastanka ishemijskog moždanog oštećenja (409).

Iz naših rezultata proizlazi da GC-C-neovisan Ca^{2+} signalni put gvanilinskih peptida u astrocitima ne igra važnu ulogu u nastanku moždanog udara. Sam Ca^{2+} odgovor na podražaj UGN-om je u potpunosti različit u životinja kojima nedostaje UGN u odnosu na životinje kojima nedostaje GC-C ili divlji tip životinja. Te promjene ne dovode do promjena i u veličini moždanog udara. Iako je u životinja kojima nedostaje UGN jačina Ca^{2+} odgovora slična u odnosu na divlje tipove, porast koncentracije Ca^{2+} u astrocitima obje hemisfere je sporiji te je ova pojava izraženija u hemisferi zahvaćenoj moždanim udarom u odnosu na nezahvaćenu hemisferu. Kako se usporavanje porasta koncentracije Ca^{2+} može naći u obje hemisfere, čini se da je to generalizirani fenomen. Upravo promijene u Ca^{2+} odgovoru astrocita u obje hemisfere su primijećene, ali se one pojavljuju tek 7 dana nakon izazivanja moždanog udara somato-senzoričkog korteksa (410). Mehanizam i značenje produljenja Ca^{2+} odgovora u astrocitima obje hemisfere na podražaj UGN-om nisu tema ove doktorske disertacije.

6.4. IZRAŽAJ GC-C-a U ASTROCITIMA PERI-ISHEMIJSKOG PODRUČJA MOŽDANOG UDARA

I na kraju ostaje nam riješiti jedno od najvažnijih pitanja, a to je kako GC-C može utjecati na Ca^{2+} odgovor u astrocitima peri-ishemijskog područja izazvan UGN-om, ako se taj receptor u astrocitima u fiziološkim uvjetima uopće ne nalazi (217). Jedini mogući odgovor je da se u peri-ishemijskoj zoni izražaj GC-C-a mijenja i upravo smo to pokazali na proteinskoj razini korištenjem imunohistokemijskih metoda gdje u nezahvaćenoj hemisferi GC-C ko-lokalizira gotovo u potpunosti s biljegom neurona NeuN, dok to nije slučaj u peri-ishemijskom području moždanog udara. Da bismo potvrdili da se GC-C počinje izražavati u astrocitima na rubnim područjima moždanog udara, koristili smo *in situ* hibridizaciju te tako dokazali

smještaj GC-C-a na mRNA razini upravo u tim astrocitima. Sad kada znamo da se u astrocitima tijekom moždanog udara pojavljuje GC-C, lako je objasniti dobivene rezultate.

Dobiveni rezultati nisu neuobičajeni. Poznato je da postoji regulacija izražaja GC-C-a u jetri, ali samo nakon oštećenja jetre ili tijekom perinatalnog brzog rasta jetre (213, 289). Nakon djelomične hepatektomije, GC-C se počinje pojavljivati u jetri već nakon 4 sata, maksimalan porast doseže između 24 do 48 sati te se izražaj gubi nakon 96 sati što je i u skladu s našim rezultatima (289).

6.5. IZRAŽAJ GC-C-a I U ASTROCITIMA I U NEURONIMA PRIMARNE KULTURE MOŽDANIH STANICA U UVJETIMA PRIMJERENE OKSIGENACIJE I HIPOKSIJSKIM UVJETIMA

Do sada je poznato da astrociti izolirani magnetski aktiviranim odjeljivanjem stanica putem protutijela specifičnog za ACSA-2 ne izražavaju GC-C (217). Prvi korak u ovom dijelu istraživanja je bio provjeriti izražaj GC-C-a u astrocitima miješane kulture moždanih stanica 6-7 dana nakon izolacije. U ovom dijelu istraživanja stanična kultura je održavana u uvjetima primjerene oksigenacije (5% CO_2/95% zrak).

Izražaj GC-C-a u uvjetima primjerene oksigenacije nas je iznenadio. Naime, u ovim uvjetima GC-C je bio izražen i u astrocitima i u neuronima. GC-C u astrocitima vjerojatno je izražen kod onih astrocita koji se u kulturi stanica dijele, kreću ili mijenjaju oblik jer se taj izražaj preklapao sa izražajem GFAP biljega aktiviranih astrocita. GFAP je intermedijarni stanični filament. Njegova glavna uloga je održavanje stanične strukture te pomoć pri staničnom kretanju i promjeni staničnog oblika (393). Iz ovih rezultata možemo zaključiti da se GC-C pojavljuje u astrocitima i na neke druge podražaje osim hipoksije.

Ako se primarna kultura moždanih stanica stavi u hipoksijske uvjete (5% CO_2/ 95% N_2) i dalje se primjećuje izražaj GC-C-a i u astrocitima i u neuronima, ali sada, pogotovo nakon 4 sata hipoksijskih uvjeta, izražaj GC-C-a nije identičan izražaju GFAP-a. Da bi smo razaznali razliku u mehanizmima regulacije izražaja GC-C-a u odnosu na GFAP, potrebna su daljnja istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

Istraživanjem potencijalnog štetnog djelovanja urogvanilina (UGN) na razvoj ishemijskog moždanog udara putem GC-C-ovisnog i/ili GC-C-neovisnog signalnog puta zaključeno je sljedeće:

1. Nedostatak GC-C-a dovodi do razvoja manje moždane lezije.

2. Nedostatak UGN-a nije doveo do jednakih rezultata kao i nedostatak GC-C-a te možemo pretpostaviti moguću ulogu još uvijek neotkrivenih agonista signalnog sustava gvanilinskih peptida u mozgu ili ulogu drugih, do sada nepoznatih čimbenika regulacije kalcijskog signalnog sustava astrocita.

3. Nije pronađena poveznica između izmjerenih vrijednosti arterijskih tlakova i veličine moždane lezije.

4. Nedostatak GC-C-a ili UGN-a ne mijenja Ca^{2+} odgovor kortikalnih astrocita na podražaj UGN-om u nezahvaćenim hemisferama životinja.

5. Nedostatak GC-C-a dovodi do jednakog, a ne snažnijeg, Ca^{2+} odgovora kortikalnih astrocita peri-ishemijskog područja u odnosu na astrocite odgovarajućeg kortikalnog područja nezahvaćene hemisfere nakon podražaja UGN-om, kako je primijećeno kod životinja kojima nedostaje UGN te životinja divljeg tipa. Izostanak snažnijeg Ca^{2+} odgovora mogao bi biti razlog razvoja manje ishemijske lezije pri nedostatku GC-C-a.

6. Promjene u dužini trajanja Ca^{2+} odgovora na podražaj UGN-om u kortikalnim astrocitima peri-ishemijskog područja te u astrocitima odgovarajućeg kortikalnog područja nezahvaćene hemisfere kod životinja kojima nedostaje UGN ukazuju na generalizirane promjene signalnog sustava gvanilinskih peptida.

7. Ulogu GC-C-a u astrocitima u razvoju moždanog udara potvrđuje pojava izražaja ovog receptora u astrocitima kortikalnog peri-ishemijskog područja moždanog udara, dok to nije slučaj u astrocitima odgovarajućeg kortikalnog područja nezahvaćene hemisfere.

8. Promjena izražaja GC-C-a ovisno o prisutnosti ishemije koja je prikazana na moždanim rezovima nije primijećena u primarnoj kulturi kortikalnih stanica. Iako je GC-C izražen i u astrocitima u uvjetima primjerene oksigenacije, u hipoksijskim uvjetima izražaj GC-C-a nije identičan izražaju GFAP-a, što ukazuje na različite mehanizme regulacije tih aktivacijskih biljega astrocita.

8. SAŽETAK

Tijekom nastanka moždanog udara agonisti gvanilat ciklaze (GC)-A djeluju neuroprotektivno. Ovaj učinak nije dokazan za agoniste GC-B. S obzirom da do danas ne postoji istraživanje koje proučava ulogu GC-C receptora i njegovih agonista u razvoju ishemične ozljede mozga, cilj je ove doktorske disertacije utvrditi ulogu urogvanilina (UGN) te aktivacije GC-C ovisnog i GC-C neovisnog signalnog puta u razvoju moždanog udara. Istraživanje je provedeno na mišjem modelu moždanog udara (začepljenje srednje moždane arterije u trajanju od 60 min, MCAO) i to u životinja kojima nedostaje GC-C ili UGN te divljim tipovima (WT) životinja iz istog legla. Mozak miševa sniman je magnetnom rezonancom prije te 24 sata nakon MCAO-a. 48 sati nakon MCAO-a, sniman je Ca^{2+} odgovor na podražaj UGN-om te je tkivo podvrgnuto imunohistokemijskom bojanju. Nedostatak GC-C-a dovodi do razvoja manje ishemijske lezije. Nedostatak UGN-a nije doveo do jednakih rezultata. U WT i životinja kojima nedostaje UGN, Ca^{2+} odgovor nakon davanja UGN-a je veći u astrocitima peri-ishemijskog korikalnog područja velikog mozga kada se usporedi s odgovarajućim područjem korteksa neoštećene hemisfere. To nije zabilježeno i kod životinja kojima nedostaje GC-C. Jedini način kako bi GC-C mogao utjecati na Ca^{2+} stanični signalni sustav astrocita peri-ishemijskog područja je da ove stanice izražavaju GC-C nakon MCAO-a, što nije slučaj u fiziološkim uvjetima. Mogući razlog nastanka manje ishemijske lezije je smanjen Ca^{2+} odgovor astrocita u peri-ishemijskom području. Kako u životinja kojima nedostaje UGN nije primijećena promjena u veličini lezije u odnosu na divlji tip životinja, možemo pretpostaviti moguću ulogu još uvijek neotkrivenih agonista signalnog sustava gvanilinskih peptida u mozgu ili ulogu drugih, do sada nepoznatih čimbenika regulacije kalcijskog signalnog sustava astrocita. Ovi rezultati ukazuju na mogućnost primjene GC-C inhibitora u smanjenju moždanog oštećenja nakon pojave ishemičnog moždanog udara.

9. SUMMARY

"The role of uroguanylin in ischemic stroke development"

Martina Ratko, M.Sc. (mag. oecol. et prot. nat.)

Zagreb, 2022.

After ischaemic stroke, agonists of guanylate cyclase (GC)-A have a neuroprotective effect, whereas the same has not been confirmed for agonists of GC-B. Considering that there has been a lack of research into the effect of GC-C and its agonist uroguanylin (UGN) on ischemic stroke development, the aim of this doctoral thesis is to determine the role of UGN and activation of GC-C dependent and GC-C independent signaling pathway on the development of stroke. In this study a mouse model of ischemic stroke (middle cerebral artery occlusion for 60 min, MCAO) was used in GC-C KO and UGN KO mice and their wild type (WT) littermates. MR images of mouse brains were acquired before and 24 h after MCAO. 48 h after MCAO, the Ca^{2+} response to UGN stimulation was recorded and immunohistochemical staining was performed. Absence of GC-C resulted in the development of smaller ischaemic lesions while the same effect was not present in the absence of UGN. Upon UGN stimulation, WT and UGN KO animals showed a stronger Ca^{2+} response in astrocytes of the peri-ischaemic cerebral cortex compared with the same cortical region of the unaffected hemisphere. This was not observed in GC-C KO animals. The only reason why GC-C might affect Ca^{2+} signalling in peri-ischaemic astrocytes is that GC-C is expressed in these cells after MCAO, which is not the case in physiological conditions. Possible reason for the development of smaller ischaemic lesions is the reduced astrocyte's Ca^{2+} response in the peri-ischaemic area. Considering that lesion size did not differ between animals lacking UGN and WT, we can assume either the involvement of still unknown agonists of the guanylin peptide signaling system in the brain or the effect exerted by yet undiscovered regulatory factors of the astrocytic Ca^{2+} signaling system. These results suggest a possible application of GC-C inhibitors in decreasing brain damage after ischaemic stroke.

10. POPIS LITERATURE

1. Pekny M, Wilhelmsson U, Tatlisumak T, Pekna M. Astrocyte activation and reactive gliosis-A new target in stroke?. Neurosci Lett. 2019;689:45-55.

2. Hankey GJ. Stroke. Lancet. 2017;389(10069):641-54.

3. Heuschmann PU, Berger K, Misselwitz B, Hermanek P, Leffmann C, Adelmann M, i sur. Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality: the German Stroke Registers Study Group. Stroke. 2003;34(5):1106-13.

4. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Buddy Connors JJ, Culebras A, i sur. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 2013;44(7):2064-89.

5. Pei X, Li Y, Zhu L, Zhou Z. Astrocyte-derived exosomes suppress autophagy and ameliorate neuronal damage in experimental ischemic stroke. Exp Cell Res. 2019;382(2):111474.

6. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. Lancet Neurol. 2019;18(5):439-58.

7. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. Pathophysiology. 2010;17(3):197-218.

8. Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, i sur. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. Nat Med. 2001;7(4):471-7.

9. Ramos-Cabrer P, Campos F, Sobrino T, Castillo J. Targeting the ischemic penumbra. Stroke. 2011;42(1 Suppl 1):S7-11.

10. van Asch CJ, Luitse MJ, Rinkel GJ, van der Tweel I, Algra A, Klijn CJ. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. Lancet Neurol. 2010;9(2):167-76.

11. Rannikmäe K, Woodfield R, Anderson CS, Charidimou A, Chiewvit P, Greenberg SM, i sur. Reliability of intracerebral hemorrhage classification systems: A systematic review. Int J Stroke. 2016;11(6):626-36.

12. Hankey GJ, Blacker DJ. Is it a stroke?. BMJ. 2015;350:h56.

13. Brunser AM, Hoppe A, Illanes S, Díaz V, Muñoz P, Cárcamo D, i sur. Accuracy of diffusion-weighted imaging in the diagnosis of stroke in patients with suspected cerebral infarct. Stroke. 2013;44(4):1169-71.

14. Campbell BCV, Ma H, Ringleb PA, Parsons MW, Churilov L, Bendszus M, i sur. Extending thrombolysis to 4·5-9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. Lancet. 2019;394(10193):139-47.

15. Campbell BCV, Donnan GA, Lees KR, Hacke W, Khatri P, Hill MD, i sur.

Endovascular stent thrombectomy: the new standard of care for large vessel ischaemic stroke. Lancet Neurol. 2015;14(8):846-54.

16. Zerna C, Thomalla G, Campbell BCV, Rha JH, Hill MD. Current practice and future directions in the diagnosis and acute treatment of ischaemic stroke. Lancet. 2018;392(10154):1247-56.

17. Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, i sur. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. Lancet. 2014;384(9958):1929-35.

18. Strbian D, Michel P, Seiffge DJ, Saver JL, Numminen H, Meretoja A, i sur. Symptomatic intracranial hemorrhage after stroke thrombolysis: comparison of prediction scores. Stroke. 2014;45(3):752-8.

19. Badhiwala JH, Nassiri F, Alhazzani W, Selim MH, Farrokhyar F, Spears J, i sur. Endovascular Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke: A Meta-analysis. JAMA. 2015;314(17):1832-43.

20. Goyal M, Yu AY, Menon BK, Dippel DWJ, Hacke W, Davis SM, i sur. Endovascular Therapy in Acute Ischemic Stroke: Challenges and Transition From Trials to Bedside. Stroke. 2016;47(2):548-53.

21. Karaszewski B, Wardlaw JM, Marshall I, Cvoro V, Wartolowska K, Haga K, i sur. Early brain temperature elevation and anaerobic metabolism in human acute ischaemic stroke. Brain. 2009;132(Pt 4):955-64.

22. Krause GS, Kumar K, White BC, Aust SD, Wiegenstein JG. Ischemia, resuscitation, and reperfusion: mechanisms of tissue injury and prospects for protection. Am Heart J. 1986;111(4):768-80.

23. Sweeney MI, Yager JY, Walz W, Juurlink BH. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. Can J Physiol Pharmacol. 1995;73(11):1525-35.

24. Kochanek KD, Xu J, Murphy SL, Miniño AM, Kung HC. Deaths: final data for 2009. Natl Vital Stat Rep. 2011;60(3):1-116.

25. Liebeskind DS, Jüttler E, Shapovalov Y, Yegin A, Landen J, Jauch EC. Cerebral Edema Associated With Large Hemispheric Infarction. Stroke. 2019;50(9):2619-25.

26. 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.

27. Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, i sur. Newly expressed SUR1-regulated $NC_{Ca\text{-}ATP}$ channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. Nat Med. 2006;12(4):433-40.

28. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. J Cereb Blood Flow Metab. 2002;22(4):367-78.

29. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. Neuroscience. 2004;129(4):1021-9.

30. Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. J Neurosurg. 1995;83(6):1051-9.

31. Barros LF, Castro J, Bittner CX. Ion movements in cell death: from protection to

execution. Biol Res. 2002;35(2):209-14.

32. Erecińska M, Silver IA. Relationship between ions and energy metabolism: cerebral calcium movements during ischaemia and subsequent recovery. Can J Physiol Pharmacol. 1992;70(Suppl 1):S190-3.

33. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. Lancet Neurol. 2007;6(3):258-68.

34. Ito U, Ohno K, Nakamura R, Suganuma F, Inaba Y. Brain edema during ischemia and after restoration of blood flow. Measurement of water, sodium, potassium content and plasma protein permeability. Stroke. 1979;10(5):542-7.

35. Leinonen V, Vanninen R, Rauramaa T. Raised intracranial pressure and brain edema. Handb Clin Neurol. 2017;145:25-37.

36. Foroutan S, Brillault J, Forbush B, O'Donnell ME. Moderate-to-severe ischemic conditions increase activity and phosphorylation of the cerebral microvascular endothelial cell Na^+-K^+-Cl^- cotransporter. Am J Physiol Cell Physiol. 2005;289(6):C1492-501.

37. Blaesse P, Airaksinen MS, Rivera C, Kaila K. Cation-chloride cotransporters and neuronal function. Neuron. 2009;61(6):820-38.

38. MacAulay N, Zeuthen T. Water transport between CNS compartments: contributions of aquaporins and cotransporters. Neuroscience. 2010;168(4):941-56.

39. Dömötör E, Abbott NJ, Adam-Vizi V. Na+-Ca2+ exchange and its implications for calcium homeostasis in primary cultured rat brain microvascular endothelial cells. J Physiol. 1999;515(1):147-55.

40. O'Donnell ME, Chen YJ, Lam TI, Taylor KC, Walton JH, Anderson SE. Intravenous HOE-642 reduces brain edema and Na uptake in the rat permanent middle cerebral artery occlusion model of stroke: evidence for participation of the blood-brain barrier Na/H exchanger. J Cereb Blood Flow Metab. 2013;33(2):225-34.

41. Lam TI, Wise PM, O'Donnell ME. Cerebral microvascular endothelial cell Na/H exchange: evidence for the presence of NHE1 and NHE2 isoforms and regulation by arginine vasopressin. Am J Physiol Cell Physiol. 2009;297(2):C278-89.

42. Mehta RI, Ivanova S, Tosun C, Castellani RJ, Gerzanich V, Simard JM. Sulfonylurea receptor 1 expression in human cerebral infarcts. J Neuropathol Exp Neurol. 2013;72(9):871-83.

43. Elfeber K, Köhler A, Lutzenburg M, Osswald C, Galla HJ, Witte OW, i sur. Localization of the Na^+-D-glucose cotransporter SGLT1 in the blood-brain barrier. Histochem Cell Biol. 2004;121(3):201-7.

44. Farrell CL, Pardridge WM. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial lumenal and ablumenal membranes: an electron microscopic immunogold study. Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88(13):5779-83.

45. Wei X, Zhang B, Cheng L, Chi M, Deng L, Pan H, i sur. Hydrogen sulfide induces neuroprotection against experimental stroke in rats by down-regulation of AQP4 via activating PKC. Brain Res. 2015;1622:292-9.

46. Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, i sur. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. Nat Med. 2000;6(2):159-63.

47. 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(4):296-300.

48. Hofmeijer J, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Kappelle LJ, Bär PR, i sur. Delayed decompressive surgery increases apparent diffusion coefficient and improves peri-infarct perfusion in rats with space-occupying cerebral infarction. Stroke. 2004;35(6):1476-81.

49. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. Nature. 2005;437(7058):497-504.

50. Garcia JG, Siflinger-Birnboim A, Bizios R, Del Vecchio PJ, Fenton JW 2nd, Malik AB. Thrombin-induced increase in albumin permeability across the endothelium. J Cell Physiol. 1986;128(1):96-104.

51. Castejón OJ. Formation of transendothelial channels in traumatic human brain edema. Pathol Res Pract. 1984;179(1):7-12.

52. Maack T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2006;50(2):198-207.

53. 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(1):89-94.

54. Sudoh T, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H. A new natriuretic peptide in porcine brain. Nature. 1988;332(6159):78-81.

55. 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(17):752-9.

56. 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(2):863-70.

57. Currie MG, Fok KF, Kato J, Moore RJ, Hamra FK, Duffin KL, i sur. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(3):947-51.

58. Hamra FK, Forte LR, Eber SL, Pidhorodeckyj NV, Krause WJ, Freeman RH, i sur. Uroguanylin: structure and activity of a second endogenous peptide that stimulates intestinal guanylate cyclase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993;90(22):10464-8.

59. Forte LR, Eber SL, Fan X, London RM, Wang Y, Rowland LM, i sur. Lymphoguanylin: cloning and characterization of a unique member of the guanylin peptide family. Endocrinology. 1999;140(4):1800-6.

60. Yuge S, Inoue K, Hyodo S, Takei Y. A novel guanylin family (guanylin, uroguanylin, and renoguanylin) in eels: possible osmoregulatory hormones in intestine and kidney. J Biol Chem. 2003;278(25):22726-33.

61. Suga S, Nakao K, Hosoda K, Mukoyama M, Ogawa Y, Shirakami G, i sur. Receptor

selectivity of natriuretic peptide family, atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and C-type natriuretic peptide. Endocrinology. 1992;130(1):229-39.

62. Kangawa K, Matsuo H. Purification and complete amino acid sequence of α-human atrial natriuretic polypeptide (α-hANP). Biochem Biophys Res Commun. 1984;118(1):131-9.

63. Potter LR, Yoder AR, Flora DR, Antos LK, Dickey DM. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. Handb Exp Pharmacol. 2009;(191):341-66.

64. Oikawa S, Imai M, Ueno A, Tanaka S, Noguchi T, Nakazato H, i sur. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding a precursor for human atrial natriuretic polypeptide. Nature. 1984;309(5970):724-6.

65. Bilder GE, Schofield TL, Blaine EH. Release of atrial natriuretic factor. Effects of repetitive stretch and temperature. Am J Physiol. 1986;251(5 Pt 2):F817-21.

66. Edwards BS, Zimmerman RS, Schwab TR, Heublein DM, Burnett JC Jr. Atrial stretch, not pressure, is the principal determinant controlling the acute release of atrial natriuretic factor. Circ Res. 1988;62(2):191-5.

67. Lew RA, Baertschi AJ. Endothelial cells stimulate ANF secretion from atrial myocytes in co-culture. Biochem Biophys Res Commun. 1989;163(2):701-9.

68. Lew RA, Baertschi AJ. Endothelium-dependent ANF secretion in vitro. Am J Physiol. 1992;263(4 Pt 2):H1071-7.

69. Fukuda Y, Hirata Y, Taketani S, Kojima T, Oikawa S, Nakazato H, i sur. Endothelin stimulates accumulations of cellular atrial natriuretic peptide and its messenger RNA in rat cardiocytes. Biochem Biophys Res Commun. 1989;164(3):1431-6.

70. Focaccio A, Volpe M, Ambrosio G, Lembo G, Pannain S, Rubattu S, i sur. Angiotensin II directly stimulates release of atrial natriuretic factor in isolated rabbit hearts. Circulation. 1993;87(1):192-8.

71. Church DJ, Braconi S, van der Bent V, Vallotton MB, Lang U. Protein kinase C-dependent prostaglandin production mediates angiotensin II-induced atrial-natriuretic peptide release. Biochem J. 1994;298(2):451-6.

72. Sonnenberg H, Veress AT. Cellular mechanism of release of atrial natriuretic factor. Biochem Biophys Res Commun. 1984;124(2):443-9.

73. Veress AT, Milojevic S, Yip C, Flynn TG, Sonnenberg H. In vitro secretion of atrial natriuretic factor: receptor-mediated release of prohormone. Am J Physiol. 1988;254(5 Pt 2):R809-14.

74. Garcia R, Debinski W, Gutkowska J, Kuchel O, Thibault G, Genest J, i sur. Gluco- and mineralocorticoids may regulate the natriuretic effect and the synthesis and release of atrial natriuretic factor by the rat atria in vivo. Biochem Biophys Res Commun. 1985;131(2):806-14.

75. Crum RL, Brown MR. Effects of morphine and opioid peptides on plasma levels of atrial natriuretic peptide. Life Sci. 1988;43(10):851-8.

76. Skvorak JP, Dietz JR. Endothelin and nitric oxide interact to regulate stretch-induced ANP secretion. Am J Physiol. 1997;273(1 Pt 2):R301-6.

77. Lew RA, Baertschi AJ. Mechanisms of hypoxia-induced atrial natriuretic factor release

from rat hearts. Am J Physiol. 1989;257(1 Pt 2):H147-56.

78. Yan W, Wu F, Morser J, Wu Q. Corin, a transmembrane cardiac serine protease, acts as a pro-atrial natriuretic peptide-converting enzyme. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(15):8525-9.

79. Mathisen P, Hall C, Simonsen S. Comparative study of atrial peptides ANF (1-98) and ANF (99-126) as diagnostic markers of atrial distension in patients with cardiac disease. Scand J Clin Lab Invest. 1993;53(1):41-9.

80. Nakao K, Sugawara A, Morii N, Sakamoto M, Yamada T, Itoh H, i sur. The pharmacokinetics of α-human atrial natriuretic polypeptide in healthy subjects. Eur J Clin Pharmacol. 1986;31(1):101-3.

81. Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG, Cuneo R, Espiner EA, Livesey JH. Metabolic clearance rate and plasma half life of alpha-human atrial natriuretic peptide in man. Life Sci. 1986;38(20):1827-33.

82. Stephenson SL, Kenny AJ. The hydrolysis of α-human atrial natriuretic peptide by pig kidney microvillar membranes is initiated by endopeptidase-24.11. Biochem J. 1987;243(1):183-7.

83. Vanneste Y, Michel A, Dimaline R, Najdovski T, Deschodt-Lanckman M. Hydrolysis of α-human atrial natriuretic peptide in vitro by human kidney membranes and purified endopeptidase-24.11. Evidence for a novel cleavage site. Biochem J. 1988;254(2):531-7.

84. Koh GY, Nussenzveig DR, Okolicany J, Price DA, Maack T. Dynamics of atrial natriuretic factor-guanylate cyclase receptors and receptor-ligand complexes in cultured glomerular mesangial and renomedullary interstitial cells. J Biol Chem. 1992;267(17):11987-94.

85. Nussenzveig DR, Lewicki JA, Maack T. Cellular mechanisms of the clearance function of type C receptors of atrial natriuretic factor. J Biol Chem. 1990;265(34):20952-8.

86. Vesely DL, Douglass MA, Dietz JR, Giordano AT, McCormick MT, Rodriguez-Paz G, i sur. Negative feedback of atrial natriuretic peptides. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(5):1128-34.

87. Vesely DL, Overton RM, Blankenship M, McCormick MT, Schocken DD. Atrial natriuretic peptide increases urodilatin in the circulation. Am J Nephrol. 1998;18(3):204-13.

88. Saba SR, Ramirez G, Vesely DL. Immunocytochemical localization of ProANF 1-30, ProANF 31-67, atrial natriuretic factor and urodilatin in the human kidney. Am J Nephrol. 1993;13(2):85-93.

89. Herten M, Lenz W, Gerzer R, Drummer C. The renal natriuretic peptide urodilatin is present in human kidney. Nephrol Dial Transplant. 1998;13(10):2529-35.

90. Gagelmann M, Hock D, Forssmann WG. Urodilatin (CDD/ANP-95-126) is not biologically inactivated by a peptidase from dog kidney cortex membranes in contrast to atrial natriuretic peptide/cardiodilatin (α-hANP/CDD-99-126). FEBS Lett. 1988;233(2):249-54.

91. 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(4):335-57.

92. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, Suga S, Saito Y, Ogawa Y, 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(4):1402-12.

93. Mayo DD, Colletti JE, Kuo DC. Brain natriuretic peptide (BNP) testing in the emergency department. J Emerg Med. 2006;31(2):201-10.

94. Lajer M, Tarnow L, Jorsal A, Parving HH. Polymorphisms in the B-type natriuretic peptide (BNP) gene are associated with NT-proBNP levels but not with diabetic nephropathy or mortality in type 1 diabetic patients. Nephrol Dial Transplant. 2007;22(11):3235-9.

95. Ogawa Y, Itoh H, Tamura N, Suga S, Yoshimasa T, Uehira M, 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(5):1911-21.

96. Zhao H, Li T, Liu G, Zhang L, Li G, Yu J, i sur. Chronic B-Type Natriuretic Peptide Therapy Prevents Atrial Electrical Remodeling in a Rabbit Model of Atrial Fibrillation. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2019;24(6):575-85.

97. Pankow K, Wang Y, Gembardt F, Krause E, Sun X, Krause G, i sur. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide. Circ Res. 2007;101(9):875-82.

98. Herman JP, Langub MC Jr, Watson RE Jr. Localization of C-type natriuretic peptide mRNA in rat hypothalamus. Endocrinology. 1993;133(4):1903-6.

99. Naruko T, Ueda M, van der Wal AC, van der Loos CM, Itoh H, Nakao K, i sur. C-type natriuretic peptide in human coronary atherosclerotic lesions. Circulation. 1996;94(12):3103-8.

100. Waschek JA. Developmental actions of natriuretic peptides in the brain and skeleton. Cell Mol Life Sci. 2004;61(18):2332-42.

101. Ogawa Y, Itoh H, Yoshitake Y, Inoue M, Yoshimasa T, Serikawa T, i sur. Molecular cloning and chromosomal assignment of the mouse C-type natriuretic peptide (CNP) gene (Nppc): comparison with the human CNP gene (NPPC). Genomics. 1994;24(2):383-7.

102. Tawaragi Y, Fuchimura K, Tanaka S, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H. Gene and precursor structures of human C-type natriuretic peptide. Biochem Biophys Res Commun. 1991;175(2):645-51.

103. Hunt PJ, Richards AM, Espiner EA, Nicholls MG, Yandle TG. Bioactivity and metabolism of C-type natriuretic peptide in normal man. J Clin Endocrinol Metab. 1994;78(6):1428-35.

104. Wu C, Wu F, Pan J, Morser J, Wu Q. Furin-mediated processing of Pro-C-type natriuretic peptide. J Biol Chem. 2003;278(28):25847-52.

105. Brown J, Chen Q, Hong G. An autocrine system for C-type natriuretic peptide within rat carotid neointima during arterial repair. Am J Physiol. 1997;272(6 Pt 2):H2919-31.

106. Suga S, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, Yoshimasa T, i sur. Cytokine-induced

C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. Endocrinology. 1993;133(6):3038-41.

107. Suga S, Nakao K, Itoh H, Komatsu Y, Ogawa Y, Hama N, i sur. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". J Clin Invest. 1992;90(3):1145-9.

108. Chun TH, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, i sur. Shear stress augments expression of C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. Hypertension. 1997;29(6):1296-302.

109. Charles CJ, Prickett TC, Espiner EA, Rademaker MT, Richards AM, Yandle TG. Regional sampling and the effects of experimental heart failure in sheep: differential responses in A, B and C-type natriuretic peptides. Peptides. 2006;27(1):62-8.

110. Del Ry S, Passino C, Maltinti M, Emdin M, Giannessi D. C-type natriuretic peptide plasma levels increase in patients with chronic heart failure as a function of clinical severity. Eur J Heart Fail. 2005;7(7):1145-8.

111. Potter LR. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. Cell Signal. 2011;23(12):1921-6.

112. Kenny AJ, Bourne A, Ingram J. Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligands by endopeptidase-24.11. Biochem J. 1993;291(1):83-8.

113. Hamra FK, Fan X, Krause WJ, Chin DT, Smith CE, Currie MG, i sur. Prouroguanylin and proguanylin: purification from colon, structure, and modulation of bioactivity by proteases. Endocrinology. 1996;137(1):257-65.

114. de Sauvage FJ, Keshav S, Kuang WJ, Gillett N, Henzel W, Goeddel DV. Precursor structure, expression, and tissue distribution of human guanylin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(19):9089-93.

115. Kita T, Smith CE, Fok KF, Duffin KL, Moore WM, Karabatsos PJ, i sur. Characterization of human uroguanylin: a member of the guanylin peptide family. Am J Physiol. 1994;266(2 Pt 2):F342-8.

116. Hill O, Kuhn M, Zucht HD, Cetin Y, Kulaksiz H, Adermann K, i sur. Analysis of the human guanylin gene and the processing and cellular localization of the peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(6):2046-50.

117. Schulz S. Targeted gene disruption in the development of mouse models to elucidate the role of receptor guanylyl cyclase signaling pathways in physiological function. Methods. 1999;19(4):551-8.

118. Sindic A. Current understanding of guanylin peptides actions. ISRN Nephrol. 2013;2013:813648.

119. Nokihara K, Wray V, Ando E, Naruse S, Hayakawa T. Synthesis, solution structure, binding activity, and cGMP activation of human guanylin and its disulfide isomer. Regul Pept. 1997;70(2-3):111-20.

120. Wiegand RC, Kato J, Huang MD, Fok KF, Kachur JF, Currie MG. Human guanylin: cDNA isolation, structure, and activity. FEBS Lett. 1992;311(2):150-4.

121. Sindić A, Schlatter E. Mechanisms of actions of guanylin peptides in the kidney. Pflugers Arch. 2005;450(5):283-91.

122. Li Z, Knowles JW, Goyeau D, Prabhakar S, Short DB, Perkins AG, i sur. Low salt intake down-regulates the guanylin signaling pathway in rat distal colon. Gastroenterology. 1996;111(6):1714-21.

123. London RM, Krause WJ, Fan X, Eber SL, Forte LR. Signal transduction pathways via guanylin and uroguanylin in stomach and intestine. Am J Physiol. 1997;273(1 Pt 1):G93-105.

124. Kinoshita H, Nakazato M, Yamaguchi H, Matsukura S, Fujimoto S, Eto T. Increased plasma guanylin levels in patients with impaired renal function. Clin Nephrol. 1997;47(1):28-32.

125. Nakazato M, Yamaguchi H, Shiomi K, Date Y, Fujimoto S, Kangawa K, i sur. Identification of 10-kDa proguanylin as a major guanylin molecule in human intestine and plasma and its increase in renal insufficiency. Biochem Biophys Res Commun. 1994;205(3):1966-75.

126. Potthast R, Ehler E, Scheving LA, Sindic A, Schlatter E, Kuhn M. High salt intake increases uroguanylin expression in mouse kidney. Endocrinology. 2001;142(7):3087-97.

127. Kulaksiz H, Rausch U, Vaccaro R, Renda TG, Cetin Y. Guanylin and uroguanylin in the parotid and submandibular glands: potential intrinsic regulators of electrolyte secretion in salivary glands. Histochem Cell Biol. 2001;115(6):527-33.

128. Schwabe K, Cetin Y. Guanylin and functional coupling proteins in the hepatobiliary system of rat and guinea pig. Histochem Cell Biol. 2012;137(5):589-97.

129. Schulz S, Chrisman TD, Garbers DL. Cloning and expression of guanylin. Its existence in various mammalian tissues. J Biol Chem. 1992;267(23):16019-21.

130. Jaleel M, London RM, Eber SL, Forte LR, Visweswariah SS. Expression of the receptor guanylyl cyclase C and its ligands in reproductive tissues of the rat: a potential role for a novel signaling pathway in the epididymis. Biol Reprod. 2002;67(6):1975-80.

131. Reinecke M, David I, Loffing-Cueni D, Ablinger P, Cetin Y, Kuhn M, i sur. Localization, expression, and characterization of guanylin in the rat adrenal medulla. Histochem Cell Biol. 1996;106(4):367-74.

132. Greenberg RN, Hill M, Crytzer J, Krause WJ, Eber SL, Hamra FK, i sur. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and Escherichia coli heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. J Investig Med. 1997;45(5):276-82.

133. Forte LR, London RM, Freeman RH, Krause WJ. Guanylin peptides: renal actions mediated by cyclic GMP. Am J Physiol Renal Physiol. 2000;278(2):F180-91.

134. Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Genomic structure and chromosomal localization of human uroguanylin. Genomics. 1997;43(3):359-65.

135. Miyazato M, Nakazato M, Matsukura S, Kangawa K, Matsuo H. Uroguanylin gene expression in the alimentary tract and extra-gastrointestinal tissues. FEBS Lett. 1996;398(2-3):170-4.

136. Mägert HJ, Hill O, Zucht HD, Martin S, Meyer M, Forssmann WG, i sur. Porcine guanylin and uroguanylin: cDNA sequences, deduced amino acid sequences, and biological activity of the chemically synthesized peptides. Biochem Biophys Res Commun. 1999;259(1):141-8.

137. Hamra FK, Eber SL, Chin DT, Currie MG, Forte LR. Regulation of intestinal uroguanylin/guanylin receptor-mediated responses by mucosal acidity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(6):2705-10.

138. Hamra FK, Krause WJ, Eber SL, Freeman RH, Smith CE, Currie MG, i sur. Opossum colonic mucosa contains uroguanylin and guanylin peptides. Am J Physiol. 1996;270(4 Pt 1):G708-16.

139. Sindić A, Başoglu C, Cerçi A, Hirsch JR, Potthast R, Kuhn M, i sur. Guanylin, uroguanylin, and heat-stable euterotoxin activate guanylate cyclase C and/or a pertussis toxin-sensitive G protein in human proximal tubule cells. J Biol Chem. 2002;277(20):17758-64.

140. Perkins A, Goy MF, Li Z. Uroguanylin is expressed by enterochromaffin cells in the rat gastrointestinal tract. Gastroenterology. 1997;113(3):1007-14.

141. Li Z, Perkins AG, Peters MF, Campa MJ, Goy MF. Purification, cDNA sequence, and tissue distribution of rat uroguanylin. Regul Pept. 1997;68(1):45-56.

142. Whitaker TL, Witte DP, Scott MC, Cohen MB. Uroguanylin and guanylin: distinct but overlapping patterns of messenger RNA expression in mouse intestine. Gastroenterology. 1997;113(3):1000-6.

143. Fan X, Wang Y, London RM, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, i sur. Signaling pathways for guanylin and uroguanylin in the digestive, renal, central nervous, reproductive, and lymphoid systems. Endocrinology. 1997;138(11):4636-48.

144. Kinoshita H, Fujimoto S, Nakazato M, Yokota N, Date Y, Yamaguchi H, i sur. Urine and plasma levels of uroguanylin and its molecular forms in renal diseases. Kidney Int. 1997;52(4):1028-34.

145. Hess R, Kuhn M, Schulz-Knappe P, Raida M, Fuchs M, Klodt J, i sur. GCAP-II: isolation and characterization of the circulating form of human uroguanylin. FEBS Lett. 1995;374(1):34-8.

146. Fan X, Hamra FK, Freeman RH, Eber SL, Krause WJ, Lim RW, i sur. Uroguanylin: cloning of preprouroguanylin cDNA, mRNA expression in the intestine and heart and isolation of uroguanylin and prouroguanylin from plasma. Biochem Biophys Res Commun. 1996;219(2):457-62.

147. Moss NG, Fellner RC, Qian X, Yu SJ, Li Z, Nakazato M, i sur. Uroguanylin, an intestinal natriuretic peptide, is delivered to the kidney as an unprocessed propeptide. Endocrinology. 2008;149(9):4486-98.

148. Nakazato M, Yamaguchi H, Kinoshita H, Kangawa K, Matsuo H, Chino N, i sur. Identification of biologically active and inactive human uroguanylins in plasma and urine and their increases in renal insufficiency. Biochem Biophys Res Commun. 1996;220(3):586-93.

149. Qian X, Moss NG, Fellner RC, Goy MF. Circulating prouroguanylin is processed to its active natriuretic form exclusively within the renal tubules. Endocrinology. 2008;149(9):4499-509.

150. Steinbrecher KA, Rudolph JA, Luo G, Cohen MB. Coordinate upregulation of guanylin and uroguanylin expression by hypertonicity in HT29-18-N2 cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2002;283(6):C1729-37.

151. Fellner RC, Moss NG, Goy MF. Dietary salt regulates uroguanylin expression and signaling activity in the kidney, but not in the intestine. Physiol Rep. 2016;4(9):e12782.

152. Kulaksiz H, Cetin Y. Uroguanylin and guanylate cyclase C in the human pancreas: expression and mutuality of ligand/receptor localization as indicators of intercellular paracrine signaling pathways. J Endocrinol. 2001;170(1):267-75.

153. Maake C, Auf der Maur F, Jovanovic K, Reinecke M, Hauri D, John H. Occurrence and localization of uroguanylin in the aging human prostate. Histochem Cell Biol. 2003;119(1):69-76.

154. Miyazato M, Nakazato M, Yamaguchi H, Date Y, Kojima M, Kangawa K, i sur. Cloning and characterization of a cDNA encoding a precursor for human uroguanylin. Biochem Biophys Res Commun. 1996;219(2):644-8.

155. Ruhr IM, Bodinier C, Mager EM, Esbaugh AJ, Williams C, Takei Y, i sur. Guanylin peptides regulate electrolyte and fluid transport in the Gulf toadfish (Opsanus beta) posterior intestine. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2014;307(9):R1167-79.

156. Cramb G, Martinez AS, McWilliam IS, Wilson GD. Cloning and expression of guanylin-like peptides in teleost fish. Ann N Y Acad Sci. 2005;1040:277-80.

157. Kimura H, Murad F. Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart. J Biol Chem. 1974;249(21):6910-6.

158. Chrisman TD, Garbers DL, Parks MA, Hardman JG. Characterization of particulate and soluble guanylate cyclases from rat lung. J Biol Chem. 1975;250(2):374-81.

159. Koesling D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. Methods. 1999;19(4):485-93.

160. Kuhn M. Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. Physiol Rev. 2016;96(2):751-804.

161. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS, Lowe DG, Chin HM, Goeddel DV, i sur. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. Nature. 1989;338(6210):78-83.

162. Lowe DG, Chang MS, Hellmiss R, Chen E, Singh S, Garbers DL, i sur. Human atrial natriuretic peptide receptor defines a new paradigm for second messenger signal transduction. EMBO J. 1989;8(5):1377-84.

163. 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(6237):68-72.

164. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL, Minamino N, Kangawa K, Matsuo H, i sur. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). Science. 1991;252(5002):120-3.

165. Forte LR, Eber SL, Turner JT, Freeman RH, Fok KF, Currie MG. Guanylin stimulation of Cl- secretion in human intestinal T84 cells via cyclic guanosine monophosphate. J Clin Invest. 1993;91(6):2423-8.

166. Basu N, Visweswariah SS. Defying the stereotype: non-canonical roles of the Peptide hormones guanylin and uroguanylin. Front Endocrinol (Lausanne). 2011;2:14.

167. 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 U S A. 1995;92(8):3571-5.

168. Leinders-Zufall T, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, i sur. Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(36):14507-12.

169. Yang RB, Foster DC, Garbers DL, Fülle HJ. Two membrane forms of guanylyl cyclase found in the eye. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(2):602-6.

170. Yang RB, Garbers DL. Two eye guanylyl cyclases are expressed in the same photoreceptor cells and form homomers in preference to heteromers. J Biol Chem. 1997;272(21):13738-42.

171. Dizhoor AM, Olshevskaya EV, Peshenko IV. Mg^{2+}/Ca^{2+} cation binding cycle of guanylyl cyclase activating proteins (GCAPs): role in regulation of photoreceptor guanylyl cyclase. Mol Cell Biochem. 2010;334(1-2):117-24.

172. Hirsch JR, Kruhøffer M, Adermann K, Heitland A, Maronde E, Meyer M, i sur. Cellular localization, membrane distribution, and possible function of guanylyl cyclases A and 1 in collecting ducts of rat. Cardiovasc Res. 2001;51(3):553-61.

173. Schulz S, Wedel BJ, Matthews A, Garbers DL. The cloning and expression of a new guanylyl cyclase orphan receptor. J Biol Chem. 1998;273(2):1032-7.

174. Kuhn M, Ng CK, Su YH, Kilić A, Mitko D, Bien-Ly N, i sur. Identification of an orphan guanylate cyclase receptor selectively expressed in mouse testis. Biochem J. 2004;379(Pt 2):385-93.

175. Liu CY, Fraser SE, Koos DS. Grueneberg ganglion olfactory subsystem employs a cGMP signaling pathway. J Comp Neurol. 2009;516(1):36-48.

176. Chao YC, Chen CC, Lin YC, Breer H, Fleischer J, Yang RB. Receptor guanylyl cyclase-G is a novel thermosensory protein activated by cool temperatures. EMBO J. 2015;34(3):294-306.

177. 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(7):3454-62.

178. Nagase M, Katafuchi T, Hirose S, Fujita T. Tissue distribution and localization of natriuretic peptide receptor subtypes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. J Hypertens. 1997;15(11):1235-43.

179. Goy MF, Oliver PM, Purdy KE, Knowles JW, Fox JE, Mohler PJ, i sur. Evidence for a novel natriuretic peptide receptor that prefers brain natriuretic peptide over atrial natriuretic peptide. Biochem J. 2001;358(Pt 2):379-87.

180. Zhang J, Li M, Yang Y, Yan Y, Li J, Qu J, i sur. NPR-A: A Therapeutic Target in Inflammation and Cancer. Crit Rev Eukaryot Gene Expr. 2015;25(1):41-6.

181. Lowe DG, Klisak I, Sparkes RS, Mohandas T, Goeddel DV. Chromosomal distribution of three members of the human natriuretic peptide receptor/guanylyl cyclase gene family. Genomics. 1990;8(2):304-12.

182. Miyagi M, Misono KS. Disulfide bond structure of the atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain: conserved disulfide bonds among guanylate cyclase-coupled receptors. Biochim Biophys Acta. 2000;1478(1):30-8.

183. Miyagi M, Zhang X, Misono KS. Glycosylation sites in the atrial natriuretic peptide receptor: oligosaccharide structures are not required for hormone binding. Eur J Biochem. 2000;267(18):5758-68.

184. Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. Science. 1989;245(4924):1392-4.

185. Qiu Y, Ogawa H, Miyagi M, Misono KS. Constitutive activation and uncoupling of the atrial natriuretic peptide receptor by mutations at the dimer interface. Role of the dimer structure in signalling. J Biol Chem. 2004;279(7):6115-23.

186. Potter LR. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. Front Biosci. 2005;10:1205-20.

187. 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(4):2164-72.

188. Potter LR, Garbers DL. Dephosphorylation of the guanylyl cyclase-A receptor causes desensitization. J Biol Chem. 1992;267(21):14531-4.

189. Potter LR, Garbers DL. Protein kinase C-dependent desensitization of the atrial natriuretic peptide receptor is mediated by dephosphorylation. J Biol Chem. 1994;269(20):14636-42.

190. Pandey KN. Intracellular trafficking and metabolic turnover of ligand-bound guanylyl cyclase/atrial natriuretic peptide receptor-A into subcellular compartments. Mol Cell Biochem. 2002;230(1-2):61-72.

191. Fan D, Bryan PM, Antos LK, Potthast RJ, Potter LR. Down-regulation does not mediate natriuretic peptide-dependent desensitization of natriuretic peptide receptor (NPR)-A or NPR-B: guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors do not internalize. Mol Pharmacol. 2005;67(1):174-83.

192. Vieira MA, Gao M, Nikonova LN, Maack T. Molecular and cellular physiology of the dissociation of atrial natriuretic peptide from guanylyl cyclase a receptors. J Biol Chem. 2001;276(39):36438-45.

193. Rehemudula D, Nakayama T, Soma M, Takahashi Y, Uwabo J, Sato 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(5):605-10.

194. Potter LR, Hunter T. Identification and characterization of the major phosphorylation sites of the B-type natriuretic peptide receptor. J Biol Chem. 1998a;273(25):15533-9.

195. Potter LR. Phosphorylation-dependent regulation of the guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptor B: dephosphorylation is a mechanism of desensitization. Biochemistry. 1998;37(8):2422-9.

196. Potter LR, Hunter T. Activation of protein kinase C stimulates the dephosphorylation of natriuretic peptide receptor-B at a single serine residue: a possible mechanism of heterologous desensitization. J Biol Chem. 2000;275(40):31099-106.

197. Potthast R, Abbey-Hosch SE, Antos LK, Marchant JS, Kuhn M, Potter LR. Calcium-dependent dephosphorylation mediates the hyperosmotic and lysophosphatidic acid-dependent inhibition of natriuretic peptide receptor-B/guanylyl cyclase-B. J Biol Chem. 2004;279(47):48513-9.

198. Chrisman TD, Schulz S, Potter LR, Garbers DL. Seminal plasma factors that cause large elevations in cellular cyclic GMP are C-type natriuretic peptides. J Biol Chem. 1993;268(5):3698-703.

199. Langub MC Jr, Dolgas CM, Watson RE Jr, Herman JP. The C-type natriuretic peptide receptor is the predominant natriuretic peptide receptor mRNA expressed in rat hypothalamus. J Neuroendocrinol. 1995;7(4):305-9.

200. Herman JP, Dolgas CM, Rucker D, Langub MC Jr. Localization of natriuretic peptide-activated guanylate cyclase mRNAs in the rat brain. J Comp Neurol. 1996;369(2):165-87.

201. Bryan PM, Smirnov D, Smolenski A, Feil S, Feil R, Hofmann F, i sur. A sensitive method for determining the phosphorylation status of natriuretic peptide receptors: cGK-Iα does not regulate NPR-A. Biochemistry. 2006;45(4):1295-303.

202. Dickey DM, Flora DR, Bryan PM, Xu X, Chen Y, Potter LR. Differential regulation of membrane guanylyl cyclases in congestive heart failure: natriuretic peptide receptor (NPR)-B, Not NPR-A, is the predominant natriuretic peptide receptor in the failing heart. Endocrinology. 2007;148(7):3518-22.

203. Schulz S, Green CK, Yuen PS, Garbers DL. Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. Cell. 1990;63(5):941-8.

204. Field M, Graf LH Jr, Laird WJ, Smith PL. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: in vitro effects on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration, and ion transport in small intestine. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(6):2800-4.

205. Vaandrager AB, van der Wiel E, de Jonge HR. Heat-stable enterotoxin activation of immunopurified guanylyl cyclase C. Modulation by adenine nucleotides. J Biol Chem. 1993;268(26):19598-603.

206. Vaandrager AB, van der Wiel E, Hom ML, Luthjens LH, de Jonge HR. Heat-stable enterotoxin receptor/guanylyl cyclase C is an oligomer consisting of functionally distinct subunits, which are non-covalently linked in the intestine. J Biol Chem. 1994;269(23):16409-15.

207. Crane JK, Wehner MS, Bolen EJ, Sando JJ, Linden J, Guerrant RL, i sur. Regulation of intestinal guanylate cyclase by the heat-stable enterotoxin of Escherichia coli (STa) and protein kinase C. Infect Immun. 1992;60(12):5004-12.

208. Crane JK, Shanks KL. Phosphorylation and activation of the intestinal guanylyl cyclase receptor for Escherichia coli heat-stable toxin by protein kinase C. Mol Cell Biochem. 1996;165(2):111-20.

209. Bhandari R, Suguna K, Visweswariah SS. Guanylyl cyclase C receptor: regulation of catalytic activity by ATP. Biosci Rep. 1999;19(3):179-88.

210. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz Stewart I, Park J, Schulz S, i sur. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. Pharmacol Rev. 2000;52(3):375-414.

211. Range SP, Holland ED, Basten GP, Knox AJ. Regulation of guanosine 3':5'-cyclic monophosphate in ovine tracheal epithelial cells. Br J Pharmacol. 1997;120(7):1249-

54.

212. Laney DW Jr, Bezerra JA, Kosiba JL, Degen SJ, Cohen MB. Upregulation of Escherichia coli heat-stable enterotoxin receptor in regenerating rat liver. Am J Physiol. 1994;266(5 Pt 1):G899-906.

213. Mann EA, Shanmukhappa K, Cohen MB. Lack of guanylate cyclase C results in increased mortality in mice following liver injury. BMC Gastroenterol. 2010;10:86.

214. Gong R, Ding C, Hu J, Lu Y, Liu F, Mann E, i sur. Role for the membrane receptor guanylyl cyclase-C in attention deficiency and hyperactive behavior. Science. 2011;333(6049):1642-6.

215. Valentino MA, Lin JE, Snook AE, Li P, Kim GW, Marszalowicz G, i sur. A uroguanylin-GUCY2C endocrine axis regulates feeding in mice. J Clin Invest. 2011;121(9):3578-88.

216. Dugandžić A, Ratko M, Habek N. Anxiety-like behavior in female mice changes by feeding, possible effect of guanylate cyclase C. Eur J Neurosci. 2020;52(1):2781-90.

217. Habek N, Ratko M, Dugandžić A. Uroguanylin increases Ca2+ concentration in astrocytes via guanylate cyclase C-independent signaling pathway. Croat Med J. 2021;62(3):250-63.

218. Drewett JG, Garbers DL. The family of guanylyl cyclase receptors and their ligands. Endocr Rev. 1994;15(2):135-62.

219. Pandey KN. Biology of natriuretic peptides and their receptors. Peptides. 2005;26(6):901-32.

220. Ashman DF, Lipton R, Melicow MM, Price TD. Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. Biochem Biophys Res Commun. 1963;11:330-4.

221. Pfeifer A, Klatt P, Massberg S, Ny L, Sausbier M, Hirneiss C, i sur. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. EMBO J. 1998;17(11):3045-51.

222. Maurice DH, Palmer D, Tilley DG, Dunkerley HA, Netherton SJ, Raymond DR, i sur. Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, expression, and targeting in cells of the cardiovascular system. Mol Pharmacol. 2003;64(3):533-46.

223. Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. Physiol Rev. 2002;82(3):769-824.

224. Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, De Jonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. Trends Biochem Sci. 1997;22(8):307-12.

225. Wall ME, Francis SH, Corbin JD, Grimes K, Richie-Jannetta R, Kotera J, i sur. Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(5):2380-5.

226. Smolenski A, Burkhardt AM, Eigenthaler M, Butt E, Gambaryan S, Lohmann SM, i sur. Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1998;358(1):134-9.

227. Jarchau T, Häusler C, Markert T, Pöhler D, Vanderkerckhove J, De Jonge HR, i sur. Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(20):9426-30.

228. Orstavik S, Solberg R, Taskén K, Nordahl M, Altherr MR, Hansson V, i sur. Molecular cloning, cDNA structure, and chromosomal localization of the human type II cGMP-dependent protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 1996;220(3):759-65.

229. Pfeifer A, Aszódi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fässler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP-dependent protein kinase II. Science. 1996;274(5295):2082-6.

230. Maurice DH, Ke H, Ahmad F, Wang Y, Chung J, Manganiello VC. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. Nat Rev Drug Discov. 2014;13(4):290-314.

231. Potter LR, Abbey-Hosch S, Dickey DM. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. Endocr Rev. 2006;27(1):47-72.

232. Biel M, Michalakis S. Cyclic nucleotide-gated channels. Handb Exp Pharmacol. 2009;(191):111-36.

233. Zufall F, Shepherd GM, Barnstable CJ. Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. Curr Opin Neurobiol. 1997;7(3):404-12.

234. Sindić A, Hirsch JR, Velic A, Piechota H, Schlatter E. Guanylin and uroguanylin regulate electrolyte transport in isolated human cortical collecting ducts. Kidney Int. 2005;67(4):1420-7.

235. Sindić A, Velic A, Başoglu C, Hirsch JR, Edemir B, Kuhn M, i sur. Uroguanylin and guanylin regulate transport of mouse cortical collecting duct independent of guanylate cyclase C. Kidney Int. 2005;68(3):1008-17.

236. Arancio O, Kandel ER, Hawkins RD. Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3',5'-cyclic GMP in cultured hippocampal neurons. Nature. 1995;376(6535):74-80.

237. Hartell NA. Inhibition of cGMP breakdown promotes the induction of cerebellar long-term depression. J Neurosci. 1996;16(9):2881-90.

238. Podda MV, Leone L, Piacentini R, Cocco S, Mezzogori D, D'Ascenzo M, i sur. Expression of olfactory-type cyclic nucleotide-gated channels in rat cortical astrocytes. Glia. 2012;60(9):1391-405.

239. Leitman DC, Andresen JW, Kuno T, Kamisaki Y, Chang JK, Murad F. Identification of multiple binding sites for atrial natriuretic factor by affinity cross-linking in cultured endothelial cells. J Biol Chem. 1986;261(25):11650-5.

240. Stults JT, O'Connell KL, Garcia C, Wong S, Engel AM, Garbers DL, i sur. The disulfide linkages and glycosylation sites of the human natriuretic peptide receptor-C homodimer. Biochemistry. 1994;33(37):11372-81.

241. Fuller F, Porter JG, Arfsten AE, Miller J, Schilling JW, Scarbourough RM, i sur. Atrial natriuretic peptide clearance receptor. Complete sequence and functional expression of cDNA clones. J Biol Chem. 1988;263(19):9395-401.

242. Rose RA, Giles WR. Natriuretic peptide C receptor signalling in the heart and vasculature. J Physiol. 2008;586(2):353-66.

243. 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(32):19324-9.

244. Cohen D, Koh GY, Nikonova LN, Porter JG, Maack T. Molecular determinants of the clearance function of type C receptors of natriuretic peptides. J Biol Chem. 1996;271(16):9863-9.

245. Porter JG, Arfsten A, Fuller F, Miller JA, Gregory LC, Lewicki JA. Isolation and functional expression of the human atrial natriuretic peptide clearance receptor cDNA. Biochem Biophys Res Commun. 1990;171(2):796-803.

246. Suga S, Nakao K, Kishimoto I, Hosoda K, Mukoyama M, Arai H, i sur. Phenotype-related alteration in expression of natriuretic peptide receptors in aortic smooth muscle cells. Circ Res. 1992;71(1):34-9.

247. Crane MR, Hugues M, O'Hanley PD, Waldman SA. Identification of two affinity states of low affinity receptors for Escherichia coli heat-stable enterotoxin: correlation of occupation of lower affinity state with guanylate cyclase activation. Mol Pharmacol. 1992;41(6):1073-80.

248. Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E, Giannella RA. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. Biochem Biophys Res Commun. 1997;239(2):463-6.

249. Ganguly U, Chaudhury AG, Basu A, Sen PC. STa-induced translocation of protein kinase C from cytosol to membrane in rat enterocytes. FEMS Microbiol Lett. 2001;204(1):65-9.

250. Carrithers SL, Ott CE, Hill MJ, Johnson BR, Cai W, Chang JJ, i sur. Guanylin and uroguanylin induce natriuresis in mice lacking guanylyl cyclase-C receptor. Kidney Int. 2004;65(1):40-53.

251. Habek N, Dobrivojević Radmilović M, Kordić M, Ilić K, Grgić S, Farkaš V, i sur. Activation of brown adipose tissue in diet-induced thermogenesis is GC-C dependent. Pflugers Arch. 2020;472(3):405-17.

252. Strinić I, Habek N, Dugandžić A. Guanylin Peptides Signaling: Insights into guanylate cyclase C dependent and Independent signaling pathways. J Cell Signal. 2021;2(4):261-8.

253. Ruskoaho H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. Endocr Rev. 2003;24(3):341-56.

254. Burnett JC Jr, Kao PC, Hu DC, Heser DW, Heublein D, Granger JP, i sur. Atrial natriuretic peptide elevation in congestive heart failure in the human. Science. 1986;231(4742):1145-7.

255. Oliver PM, John SW, Purdy KE, Kim R, Maeda N, Goy MF, i sur. Natriuretic peptide receptor 1 expression influences blood pressures of mice in a dose-dependent manner. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(5):2547-51.

256. Lopez MJ, Garbers DL, Kuhn M. The guanylyl cyclase-deficient mouse defines differential pathways of natriuretic peptide signaling. J Biol Chem. 1997;272(37):23064-8.

257. Almeida FA, Suzuki M, Maack T. Atrial natriuretic factor increases hematocrit and decreases plasma volume in nephrectomized rats. Life Sci. 1986;39(13):1193-9.

258. Song W, Wang H, Wu Q. Atrial natriuretic peptide in cardiovascular biology and disease (NPPA). Gene. 2015;569(1):1-6.

259. Inoue T, Nonoguchi H, Tomita K. Physiological effects of vasopressin and atrial natriuretic peptide in the collecting duct. Cardiovasc Res. 2001;51(3):470-80.

260. Light DB, Schwiebert EM, Karlson KH, Stanton BA. Atrial natriuretic peptide inhibits a cation channel in renal inner medullary collecting duct cells. Science. 1989;243(4889):383-5.

261. Winaver J, Burnett JC, Tyce GM, Dousa TP. ANP inhibits Na+-H+ antiport in proximal tubular brush border membrane: role of dopamine. Kidney Int. 1990;38(6):1133-40.

262. Rocha AS, Kudo LH. Atrial peptide and cGMP effects on NaCl transport in inner medullary collecting duct. Am J Physiol. 1990;259(2 Pt 2):F258-68.

263. Brismar H, Holtbäck U, Aperia A. Mechanisms by which intrarenal dopamine and ANP interact to regulate sodium metabolism. Clin Exp Hypertens. 2000;22(3):303-7.

264. Samson WK, Aguila MC, Martinovic J, Antunes-Rodrigues J, Norris M. Hypothalamic action of atrial natriuretic factor to inhibit vasopressin secretion. Peptides. 1987;8(3):449-54.

265. Rose RA, Anand-Srivastava MB, Giles WR, Bains JS. C-type natriuretic peptide inhibits L-type Ca2+ current in rat magnocellular neurosecretory cells by activating the NPR-C receptor. J Neurophysiol. 2005;94(1):612-21.

266. Itoh H, Nakao K, Katsuura G, Morii N, Shiono S, Sakamoto M, i sur. Centrally infused atrial natriuretic polypeptide attenuates exaggerated salt appetite in spontaneously hypertensive rats. Circ Res. 1986;59(3):342-7.

267. Lafontan M, Moro C, Berlan M, Crampes F, Sengenes C, Galitzky J. Control of lipolysis by natriuretic peptides and cyclic GMP. Trends Endocrinol Metab. 2008;19(4):130-7.

268. Birkenfeld AL, Boschmann M, Moro C, Adams F, Heusser K, Franke G, i sur. Lipid mobilization with physiological atrial natriuretic peptide concentrations in humans. J Clin Endocrinol Metab. 2005;90(6):3622-8.

269. Chainani-Wu N, Weidner G, Purnell DM, Frenda S, Meritt-Worden T, Kemp C, i sur. Relation of B-type natriuretic peptide levels to body mass index after comprehensive lifestyle changes. Am J Cardiol. 2010;105(11):1570-6.

270. Bordicchia M, Liu D, Amri EZ, Ailhaud G, Dessì-Fulgheri P, Zhang C, i sur. Cardiac natriuretic peptides act via p38 MAPK to induce the brown fat thermogenic program in mouse and human adipocytes. J Clin Invest. 2012;122(3):1022-36.

271. Liu D, Ceddia RP, Collins S. Cardiac natriuretic peptides promote adipose 'browning' through mTOR complex-1. Mol Metab. 2018;9:192-8.

272. Engeli S, Birkenfeld AL, Badin PM, Bourlier V, Louche K, Viguerie N, i sur. Natriuretic peptides enhance the oxidative capacity of human skeletal muscle. J Clin Invest. 2012;122(12):4675-9.

273. Kita T, Kitamura K, Sakata J, Eto T. Marked increase of guanylin secretion in response to salt loading in the rat small intestine. Am J Physiol. 1999;277(5):G960-6.

274. Folgueira C, Sanchez-Rebordelo E, Barja-Fernandez S, Leis R, Tovar S, Casanueva FF, i sur. Uroguanylin levels in intestine and plasma are regulated by nutritional

status in a leptin-dependent manner. Eur J Nutr. 2016;55(2):529-36.

275. Fonteles MC, Greenberg RN, Monteiro HS, Currie MG, Forte LR. Natriuretic and kaliuretic activities of guanylin and uroguanylin in the isolated perfused rat kidney. Am J Physiol. 1998;275(2):F191-7.

276. Forte LR, Fan X, Hamra FK. Salt and water homeostasis: uroguanylin is a circulating peptide hormone with natriuretic activity. Am J Kidney Dis. 1996;28(2):296-304.

277. Toriano R, Ozu M, Politi MT, Dorr RA, Curto MA, Capurro C. Uroguanylin regulates net fluid secretion via the NHE2 isoform of the Na+/H+ exchanger in an intestinal cellular model. Cell Physiol Biochem. 2011;28(4):733-42.

278. Chao AC, de Sauvage FJ, Dong YJ, Wagner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl- channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. EMBO J. 1994;13(5):1065-72.

279. Cuthbert AW, Hickman ME, MacVinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, i sur. Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelial from normal and transgenic cystic fibrosis mice. Br J Pharmacol. 1994;112(1):31-6.

280. Vaandrager AB, Bot AG, De Jonge HR. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. Gastroenterology. 1997;112(2):437-43.

281. Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F, De Jonge HR. Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. Gastroenterology. 2000;118(1):108-14.

282. Joo NS, London RM, Kim HD, Forte LR, Clarke LL. Regulation of intestinal Cl- and HCO3-secretion by uroguanylin. Am J Physiol. 1998;274(4):G633-44.

283. Pitari GM, Di Guglielmo MD, Park J, Schulz S, Waldman SA. Guanylyl cyclase C agonists regulate progression through the cell cycle of human colon carcinoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(14):7846-51.

284. Albano F, Brasitus T, Mann EA, Guarino A, Giannella RA. Colonocyte basolateral membranes contain Escherichia coli heatstable enterotoxin receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2001;284(2):331-4.

285. Sellers ZM, Mann E, Smith A, Ko KH, Giannella R, Cohen MB, i sur. Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli (STa) can stimulate duodenal HCO3- secretion via a novel GC-C- and CFTR-independent pathway. FASEB J. 2008;22(5):1306-16.

286. Li Z, Taylor-Blake B, Light AR, Goy MF. Guanylin, an endogenous ligand for C-type guanylate cyclase, is produced by goblet cells in the rat intestine. Gastroenterology. 1995;109(6):1863-75.

287. Furuya S, Naruse S, Hayakawa T. Intravenous injection of guanylin induces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts. Anat Embryol (Berl). 1998;197(5):359-67.

288. Date Y, Nakazato M, Yamaguchi H, Kangawa K, Kinoshita Y, Chiba T, i sur. Enterochromaffin-like cells, a cellular source of uroguanylin in rat stomach. Endocrinology. 1999;140(5):2398-404.

289. Scheving LA, Russell WE. Guanylyl cyclase C is up-regulated by nonparenchymal cells and hepatocytes in regenerating rat liver. Cancer Res. 1996;56(22):5186-91.

290. Moss NG, Riguera DA, Fellner RC, Cazzolla C, Goy MF. Natriuretic and antikaliuretic effects of uroguanylin and prouroguanylin in the rat. Am J Physiol Renal Physiol. 2010;299(6):F1433-42.

291. Qian X, Moss NG, Fellner RC, Taylor-Blake B, Goy MF. The rat kidney contains high levels of prouroguanylin (the uroguanylin precursor) but does not express GC-C (the enteric uroguanylin receptor). Am J Physiol Renal Physiol. 2011;300(2):F561-73.

292. Lorenz JN, Nieman M, Sabo J, Sanford LP, Hawkins JA, Elitsur N, i sur. Uroguanylin knockout mice have increased blood pressure and impaired natriuretic response to enteral NaCl load. J Clin Invest. 2003;112(8):1244-54.

293. Sinđić A, Schlatter E. Cellular effects of guanylin and uroguanylin. J Am Soc Nephrol. 2006;7(3): 607-16.

294. Kim GW, Lin JE, Snook AE, Aing AS, Merlino DJ, Li P, i sur. Calorie-induced ER stress suppresses uroguanylin satiety signaling in diet-induced obesity. Nutr Diabetes. 2016;6(5):e211.

295. Begg DP, Steinbrecher KA, Mul JD, Chambers AP, Kohli R, Haller A, i sur. Effect of guanylate cyclase-C activity on energy and glucose homeostasis. Diabetes. 2014;63(11):3798-804.

296. Hibi M, Oishi S, Matsushita M, Yoneshiro T, Yamaguchi T, Usui C, i sur. Brown adipose tissue is involved in diet-induced thermogenesis and whole-body fat utilization in healthy humans. Int J Obes (Lond). 2016;40(11):1655-61.

297. Dodd GT, Decherf S, Loh K, Simonds SE, Wiede F, Balland E, i sur. Leptin and insulin act on POMC neurons to promote the browning of white fat. Cell. 2015;160(1-2):88-104.

298. Kong D, Tong Q, Ye C, Koda S, Fuller PM, Krashes MJ, i sur. GABAergic RIP-Cre neurons in the arcuate nucleus selectively regulate energy expenditure. Cell. 2012;151(3):645-57.

299. Verboeket-van de Venne WP, Westerterp KR, Hermans-Limpens TJ, de Graaf C, van het Hof KH, Weststrate JA. Long-term effects of consumption of full-fat or reduced-fat products in healthy non-obese volunteers: assessment of energy expenditure and substrate oxidation. Metabolism. 1996;45(8):1004-10.

300. Dallongeville J, Hecquet B, Lebel P, Edmé JL, Le Fur C, Fruchart JC, i sur. Short term response of circulating leptin to feeding and fasting in man: influence of circadian cycle. Int J Obes Relat Metab Disord. 1998;22(8):728-33.

301. Liu X, Wang S, You Y, Meng M, Zheng Z, Dong M, i sur. Brown Adipose Tissue Transplantation Reverses Obesity in Ob/Ob Mice. Endocrinology. 2015;156(7):2461-9.

302. Fischer AW, Hoefig CS, Abreu-Vieira G, de Jong JMA, Petrovic N, Mittag J, i sur. Leptin Raises Defended Body Temperature without Activating Thermogenesis. Cell Rep. 2016;14(7):1621-31.

303. Folgueira C, Beiroa D, Callon A, Al-Massadi O, Barja-Fernandez S, Senra A, i sur. Uroguanylin Action in the Brain Reduces Weight Gain in Obese Mice via Different Efferent Autonomic Pathways. Diabetes. 2016;65(2):421-32.

304. Habek N, Kordić M, Jurenec F, Dugandžić A. Infrared thermography, a new method for detection brown adipose tissue activity after a meal in humans. Infrared Phys

Technol. 2018;89:271-6.

305. Cody RJ, Atlas SA, Laragh JH, Kubo SH, Covit AB, Ryman KS, i sur. Atrial natriuretic factor in normal subjects and heart failure patients. Plasma levels and renal, hormonal, and hemodynamic responses to peptide infusion. J Clin Invest. 1986;78(5):1362-74.

306. Narayan H, Mohammed N, Quinn PA, Squire IB, Davies JE, Ng LL. Activation of a novel natriuretic endocrine system in humans with heart failure. Clin Sci (Lond). 2010;118(5):367-74.

307. Carrithers SL, Eber SL, Forte LR, Greenberg RN. Increased urinary excretion of uroguanylin in patients with congestive heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000;278(2):H538-47.

308. John SW, Veress AT, Honrath U, Chong CK, Peng L, Smithies O, i sur. Blood pressure and fluid-electrolyte balance in mice with reduced or absent ANP. Am J Physiol. 1996;271(1 Pt 2):R109-14.

309. Chan JC, Knudson O, Wu F, Morser J, Dole WP, Wu Q. Hypertension in mice lacking the proatrial natriuretic peptide convertase corin. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(3):785-90.

310. Lopez MJ, Wong SK, Kishimoto I, Dubois S, Mach V, Friesen J, i sur. Salt-resistant hypertension in mice lacking the guanylyl cyclase-A receptor for atrial natriuretic peptide. Nature. 1995;378(6552):65-8.

311. Oliver PM, Fox JE, Kim R, Rockman HA, Kim HS, Reddick RL, i sur. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(26):14730-5.

312. Rame JE, Tam SW, McNamara D, Worcel M, Sabolinski ML, Wu AH, i sur. Dysfunctional corin i555(p568) allele is associated with impaired brain natriuretic peptide processing and adverse outcomes in blacks with systolic heart failure: results from the Genetic Risk Assessment in Heart Failure substudy. Circ Heart Fail. 2009;2(6):541-8.

313. Wang W, Cui Y, Shen J, Jiang J, Chen S, Peng J, i sur. Salt-sensitive hypertension and cardiac hypertrophy in transgenic mice expressing a corin variant identified in blacks. Hypertension. 2012;60(5):1352-8.

314. Tamura N, Ogawa Y, Chusho H, Nakamura K, Nakao K, Suda M, i sur. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(8):4239-44.

315. Zhang C, Shi D, Yang P. BNP as a potential biomarker for cardiac damage of breast cancer after radiotherapy: a meta-analysis. Medicine (Baltimore). 2019;98(29):e16507.

316. Matsukawa N, Grzesik WJ, Takahashi N, Pandey KN, Pang S, Yamauchi M, i sur. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(13):7403-8.

317. Knowles JW, Esposito G, Mao L, Hagaman JR, Fox JE, Smithies O, i sur. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. J Clin Invest. 2001;107(8):975-84.

318. Perico N, Delaini F, Lupini C, Benigni A, Galbusera M, Boccardo P, i sur. Blunted

excretory response to atrial natriuretic peptide in experimental nephrosis. Kidney Int. 1989;36(1):57-64.

319. Kinoshita H, Fujimoto S, Fukae H, Yokota N, Hisanaga S, Nakazato M, i sur. Plasma and urine levels of uroguanylin, a new natriuretic peptide, in nephrotic syndrome. Nephron. 1999;81(2):160-4.

320. Valentin JP, Qiu C, Muldowney WP, Ying WZ, Gardner DG, Humphreys MH. Cellular basis for blunted volume expansion natriuresis in experimental nephrotic syndrome. J Clin Invest. 1992;90(4):1302-12.

321. Fang C, Shen L, Dong L, Liu M, Shi S, Dong N, i sur. Reduced urinary corin levels in patients with chronic kidney disease. Clin Sci (Lond). 2013;124(12):709-17.

322. Sousa CM, Havt A, Santos CF, Arnaud-Batista FJ, Cunha KMA, Cerqueira JBG, i sur. The relaxation induced by uroguanylin and the expression of natriuretic peptide receptors in human corpora cavernosa. J Sex Med. 2010;7(11):3610-9.

323. Cui Y, Wang W, Dong N, Lou J, Srinivasan DK, Chang W, i sur. Role of corin in trophoblast invasion and uterine spiral artery remodelling in pregnancy. Nature. 2012;484(7393):246-50.

324. Armstrong DW, Tse MY, O'Tierney-Ginn PF, Wong PG, Ventura NM, Janzen-Pang JJ, i sur. Gestational hypertension in atrial natriuretic peptide knockout mice and the developmental origins of salt-sensitivity and cardiac hypertrophy. Regul Pept. 2013;186:108-15.

325. Dong N, Zhou T, Zhang Y, Liu M, Li H, Huang X, i sur. Corin mutations K317E and S472G from preeclamptic patients alter zymogen activation and cell surface targeting. J Biol Chem. 2014;289(25):17909-16.

326. Moffatt P, Thomas G, Sellin K, Bessette MC, Lafrenière F, Akhouayri O, i sur. Osteocrin is a specific ligand of the natriuretic Peptide clearance receptor that modulates bone growth. J Biol Chem. 2007;282(50):36454-62.

327. Jaubert J, Jaubert F, Martin N, Washburn LL, Lee BK, Eicher EM, i sur. Three new allelic mouse mutations that cause skeletal overgrowth involve the natriuretic peptide receptor C gene (Npr3). Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(18):10278-83.

328. Chusho H, Tamura N, Ogawa Y, Yasoda A, Suda M, Miyazawa T, i sur. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(7):4016-21.

329. Tamura N, Doolittle LK, Hammer RE, Shelton JM, Richardson JA, Garbers DL. Critical roles of the guanylyl cyclase B receptor in endochondral ossification and development of female reproductive organs. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(49):17300-5.

330. Woodard GE, Rosado JA, Brown J. Expression and control of C-type natriuretic peptide in rat vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002;282(1):R156-65.

331. Cetin Y, Kulaksiz H, Redecker P, Bargsten G, Adermann K, Grube D, i sur. Bronchiolar nonciliated secretory (Clara) cells: source of guanylin in the mammalian lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(13):5925-9.

332. Zhang ZH, Jow F, Numann R, Hinson J. The airway-epithelium: a novel site of action by guanylin. Biochem Biophys Res Commun. 1998;244(1):50-6.

333. Ohbayashi H, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K. Effects of uroguanylin and guanylin against antigen-induced bronchoconstriction and airway microvascular leakage in sensitized guinea-pigs. Life Sci. 1998;62(20):1833-44.

334. Ohbayashi H, Yamaki KI. Both inhalant and intravenous uroguanylin inhibit leukotriene C4-induced airway changes. Peptides. 2000;21(10):1467-72.

335. Di Guglielmo MD, Perdue L, Adeyemi A, van Golen KL, Corao DU. Immunohistochemical Staining for Uroguanylin, a Satiety Hormone, is Decreased in Intestinal Tissue Specimens From Female Adolescents With Obesity. Pediatr Dev Pathol. 2018;21(3):285-95.

336. Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, Catalán V, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, i sur. Guanylin and uroguanylin stimulate lipolysis in human visceral adipocytes. Int J Obes (Lond). 2016;40(9):1405-15.

337. Cannon MV, Silljé HH, Sijbesma JW, Khan MAF, Steffensen KR, van Gilst WH, i sur. LXRα improves myocardial glucose tolerance and reduces cardiac hypertrophy in a mouse model of obesity-induced type 2 diabetes. Diabetologia. 2016;59(3):634-43.

338. Verspohl EJ, Bernemann IK. Atrial natriuretic peptide (ANP)-induced inhibition of glucagon secretion: mechanism of action in isolated rat pancreatic islets. Peptides. 1996;17(6):1023-9.

339. Jujić A, Nilsson PM, Engström G, Hedblad B, Melander O, Magnusson M. Atrial natriuretic peptide and type 2 diabetes development--biomarker and genotype association study. PLoS One. 2014;9(2):e89201.

340. Monti LD, Lucotti PC, Setola E, Rossodivita A, Pala MG, Galluccio E, i sur. Effects of chronic elevation of atrial natriuretic peptide and free fatty acid levels in the induction of type 2 diabetes mellitus and insulin resistance in patients with mitral valve disease. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2012;22(1):58-65.

341. Wang TJ, Larson MG, Levy D, Benjamin EJ, Leip EP, Wilson PWF, i sur. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. Circulation. 2004;109(5):594-600.

342. Del Ry S, Cabiati M, Bianchi V, Caponi L, Maltinti M, Caselli C, i sur. C-type natriuretic peptide is closely associated to obesity in Caucasian adolescents. Clin Chim Acta. 2016;460:172-7.

343. Pivovarova O, Gögebakan Ö, Klöting N, Sparwasser A, Weickert MO, Haddad I, i sur. Insulin up-regulates natriuretic peptide clearance receptor expression in the subcutaneous fat depot in obese subjects: a missing link between CVD risk and obesity?. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(5):E731-9.

344. Poulos JE, Gower WR, Fontanet HL, Kalmus GW, Vesely DL. Cirrhosis with ascites: increased atrial natriuretic peptide messenger RNA expression in rat ventricle. Gastroenterology. 1995;108(5):1496-503.

345. Woo JJ, Koh YY, Kim HJ, Chung JW, Chang KS, Hong SP. N-terminal pro B-type natriuretic peptide and the evaluation of cardiac dysfunction and severity of disease in cirrhotic patients. Yonsei Med J. 2008;49(4):625-31.

346. Metwaly A, Khalik AA, Nasr FM, Sabry AI, Gouda MF, Hassan M. Brain Natriuretic Peptide in Liver Cirrhosis and Fatty Liver: Correlation with Cardiac Performance. Electron Physician. 2016;8(2):1984-93.

347. Popat J, Rivero A, Pratap P, Guglin M. What is causing extremely elevated amino

terminal brain natriuretic peptide in cancer patients?. Congest Heart Fail. 2013;19(3):143-8.

348. Shailubhai K, Yu HH, Karunanandaa K, Eber SL, Wang Y, Joo NS, i sur. Uroguanylin treatment suppresses polyp formation in the ApcMin/+ mouse and induces apoptosis in human colon adenocarcinoma cells via cyclic GMP. Cancer Res. 2000;60(18):5151-7.

349. Li P, Schulz S, Bombonati A, Palazzo JP, Hyslop TM, Xu Y, i sur. Guanylyl cyclase C suppresses intestinal tumorigenesis by restricting proliferation and maintaining genomic integrity. Gastroenterology. 2007;133(2):599-607.

350. Basu N, Bhandari R, Natarajan VT, Visweswariah SS. Cross talk between receptor guanylyl cyclase C and c-src tyrosine kinase regulates colon cancer cell cytostasis. Mol Cell Biol. 2009;29(19):5277-89.

351. Kloeters O, Friess H, Giese N, Buechler MW, Cetin Y, Kulaksiz H. Uroguanylin inhibits proliferation of pancreatic cancer cells. Scand J Gastroenterol. 2008;43(4):447-55.

352. Bryant AP, Busby RW, Bartolini WP, Cordero EA, Hannig G, Kessler MM, i sur. Linaclotide is a potent and selective guanylate cyclase C agonist that elicits pharmacological effects locally in the gastrointestinal tract. Life Sci. 2010;86(19-20):760-5.

353. Vazquez-Roque MI, Bouras EP. Linaclotide, novel therapy for the treatment of chronic idiopathic constipation and constipation-predominant irritable bowel syndrome. Adv Ther. 2013;30(3):203-11.

354. Chang WL, Masih S, Thadi A, Patwa V, Joshi A, Cooper HS, i sur. Plecanatide-mediated activation of guanylate cyclase-C suppresses inflammation-induced colorectal carcinogenesis in Apc+/Min-FCCC mice. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2017;8(1):47-59.

355. Volkow ND, Wang GJ, Kollins SH, Wigal TL, Newcorn JH, Telang, F, i sur. Evaluating dopamine reward pathway in ADHD: clinical implications. JAMA. 2009;302(10):1084-91.

356. Sagvolden T, Russell VA, Aase H, Johansen EB, Farshbaf M. Rodent models of attention-deficit/hyperactivity disorder. Biol Psychiatry. 2005;57(11):1239-47.

357. Ströhle A, Jahn H, Montkowski A, Liebsch G, Boll E, Landgraf R, i sur. Central and peripheral administration of atriopeptin is anxiolytic in rats. Neuroendocrinology. 1997;65(3):210-5.

358. Wiedemann K, Jahn H, Kellner M. Effects of natriuretic peptides upon hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity and anxiety behaviour. Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2000;108(1):5-13.

359. Ströhle A, Kellner M, Holsboer F, Wiedemann K. Anxiolytic activity of atrial natriuretic peptide in patients with panic disorder. Am J Psychiatry. 2001;158(9):1514-6.

360. Kellner M, Knaudt K, Jahn H, Holsboer F, Wiedemann K. Atrial natriuretic hormone in lactate-induced panic attacks: mode of release and endocrine and pathophysiological consequences. J Psychiatr Res. 1998;32(1):37-48.

361. Bíró E, Tóth G, Telegdy G. Effect of receptor blockers on brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide caused anxiolytic state in rats. Neuropeptides.

1996;30(1):59-65.

362. Montkowski A, Jahn H, Ströhle A, Poettig M, Holsboer F, Wiedemann K. C-type natriuretic peptide exerts effects opposing those of atrial natriuretic peptide on anxiety-related behaviour in rats. Brain Res. 1998;792(2):358-60.

363. Vilotti S, Marchenkova A, Ntamati N, Nistri A. B-type natriuretic peptide-induced delayed modulation of TRPV1 and P2X3 receptors of mouse trigeminal sensory neurons. PLoS One. 2013;8(11):e81138.

364. Abdelalim EM, Osman AH, Takada T, Torii R, Tooyama I. Immunohistochemical mapping of natriuretic peptide receptor-A in the brainstem of Macaca fascicularis. Neuroscience. 2007;145(3):1087-96.

365. Abdelalim EM, Tooyama I. Mapping of NPR-B immunoreactivity in the brainstem of Macaca fascicularis. Brain Struct Funct. 2011;216(4):387-402.

366. Saper CB, Hurley KM, Moga MM, Holmes HR, Adams SA, Leahy KM, i sur. Brain natriuretic peptides: differential localization of a new family of neuropeptides. Neurosci Lett. 1989;96(1):29-34.

367. Zhang FX, Liu XJ, Gong LQ, Yao JR, Li KC, Li ZY, i sur. Inhibition of inflammatory pain by activating B-type natriuretic peptide signal pathway in nociceptive sensory neurons. J Neurosci. 2010;30(32):10927-38.

368. Colucci WS, Elkayam U, Horton DP, Abraham WT, Bourge RC, Johnson AD, i sur. Intravenous nesiritide, a natriuretic peptide, in the treatment of decompensated congestive heart failure. Nesiritide Study Group. N Engl J Med. 2000;343(4):246-53.

369. Uzar E, Evliyaoglu O, Yucel Y, Cevik MU, Acar A, Guzel I, i sur. Serum cytokine and pro-brain natriuretic peptide (BNP) levels in patients with migraine. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2011;15(10):1111-6.

370. Rubattu S, Stanzione R, Di Angelantonio E, Zanda B, Evangelista A, Tarasi D, i sur. Atrial natriuretic peptide gene polymorphisms and risk of ischemic stroke in humans. Stroke. 2004;35(4):814-8.

371. Rubattu S, Sciarretta S, Marchitti S, Bianchi F, Forte M, Volpe M. The T2238C Human Atrial Natriuretic Peptide Molecular Variant and the Risk of Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(2):540.

372. Rubattu S, Ridker P, Stampfer MJ, Volpe M, Hennekens CH, Lindpaintner K. The gene encoding atrial natriuretic peptide and the risk of human stroke. Circulation. 1999;100(16):1722-6.

373. Grammas P, Giacomelli F, Bessert D, Wiener J. Angiotensin II and atrial natriuretic factor receptor interactions at the blood-brain barrier. Brain Res. 1991;562(1):93-7.

374. Sarker MH, Fraser PA. The role of guanylyl cyclases in the permeability response to inflammatory mediators in pial venular capillaries in the rat. J Physiol. 2002;540(Pt 1):209-18.

375. Nogami M, Shiga J, Takatsu A, Endo N, Ishiyama I. Immunohistochemistry of atrial natriuretic peptide in brain infarction. Histochem J. 2001;33(2):87-90.

376. Naruse S, Aoki Y, Takei R, Horikawa Y, Ueda S. Effects of atrial natriuretic peptide on ischemic brain edema in rats evaluated by proton magnetic resonance method. Stroke. 1991;22(1):61-5.

377. Rosenberg GA, Estrada EY. Atrial natriuretic peptide blocks hemorrhagic brain edema after 4-hour delay in rats. Stroke. 1995;26(5):874-7.

378. Dobrivojević M, Špiranec K, Gorup D, Erjavec I, Habek N, Radmilović M. Urodilatin reverses the detrimental influence of bradykinin in acute ischemic stroke. Exp Neurol. 2016;284(Pt A):1-10.

379. Rubattu S, Cotugno M, Forte M, Stanzione R, Bianchi F, Madonna M, i sur. Effects of dual angiotensin type 1 receptor/neprilysin inhibition vs. angiotensin type 1 receptor inhibition on target organ injury in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. J Hypertens. 2018;36(9):1902-14.

380. Wiggins AK, Shen PJ, Gundlach AL. Atrial natriuretic peptide expression is increased in rat cerebral cortex following spreading depression: possible contribution to sd-induced neuroprotection. Neuroscience. 2003;118(3):715-26.

381. Estrada V, Téllez MJ, Moya J, Fernández-Durango R, Egido J, Fernández Cruz AF. High plasma levels of endothelin-1 and atrial natriuretic peptide in patients with acute ischemic stroke. Am J Hypertens. 1994;7(12):1085-9.

382. Mäkikallio AM, Mäkikallio TH, Korpelainen JT, Vuolteenaho O, Tapanainen JM, Ylitalo K, i sur. Natriuretic peptides and mortality after stroke. Stroke. 2005;36(5):1016-20.

383. Fernández-Susavila H, Rodríguez-Yáñez M, Dopico-López A, Arias S, Santamaría M, Ávila-Gómez P, i sur. Heads and Tails of Natriuretic Peptides: Neuroprotective Role of Brain Natriuretic Peptide. J Am Heart Assoc. 2017;6(12):e007329.

384. Peng H, Zhu F, Shi J, Han X, Zhou D, Liu Y, i sur. Serum Soluble Corin is Decreased in Stroke. Stroke. 2015;46(7):1758-63.

385. Holmdahl R, Malissen B. The need for littermate controls. Eur J Immunol. 2012;42(1):45-7.

386. Brooks T, Stonum P. IACUC Policy 19: Euthanasia of Teaching and Research Animals [Internet]. Institutional Animal Care and Use Committee [pristupljeno 18.05.2022.]. Dostupno na: https://www.depts.ttu.edu/iacuc/acrc/docs/Policy_19_Euthanasia_Policy.pdf

387. Beaudoin GM 3rd, Lee SH, Singh D, Yuan Y, Ng YG, Reichardt LF, i sur. Culturing pyramidal neurons from the early postnatal mouse hippocampus and cortex. Nat Protoc. 2012;7(9):1741-54.

388. Fiuza M, Rostosky CM, Parkinson GT, Bygrave AM, Halemani N, Baptista M, i sur. $PICK_1$ regulates AMPA receptor endocytosis via direct interactions with AP2 α-appendage and dynamin. J Cell Biol. 2017;216(10):3323-38.

389. Moutin E, Hemonnot AL, Seube V, Linck N, Rassendren F, Perroy J, i sur. Procedures for Culturing and Genetically Manipulating Murine Hippocampal Postnatal Neurons. Front Synaptic Neurosci. 2020;12:19.

390. Zhao X, Ho D, Gao S, Hong C, Vatner DE, Vatner SF. Arterial Pressure Monitoring in Mice. Curr Protoc Mouse Biol. 2011;1:105-22.

391. 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(4):627-35.

392. Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, i sur. Intrastriatal

transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2000;20(9):1311-9.

393. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). Neurochem Res. 2000;25(9-10):1439-51.

394. Ikpa PT, Sleddens HF, Steinbrecher KA, Peppelenbosch MP, de Jonge HR, Smits R, i sur. Guanylin and uroguanylin are produced by mouse intestinal epithelial cells of columnar and secretory lineage. Histochem Cell Biol. 2016;146(4):445-55.

395. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, i sur. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn. 2012;14(1):22-9.

396. Colantuoni C, Lipska BK, Ye T, Hyde TM, Tao R, Leek JT, i sur. Temporal dynamics and genetic control of transcription in the human prefrontal cortex. Nature. 2011;478(7370):519-23.

397. Sinđić A, Dobrivojević M, Hirsch J. Natriuretic peptides in brain physiology. Transl Neurosci. 2011;2(3):246-51.

398. Ma Q, Zhang L. C-type natriuretic peptide functions as an innate neuroprotectant in neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mouse via natriuretic peptide receptor 2. Exp Neurol. 2018;304:58-66.

399. Dobrivojević M, Sinđić A, Edemir B, Kalweit S, Forssmann WG, Hirsch JR. Interaction between bradykinin and natriuretic peptides via RGS protein activation in HEK-293 cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2012;303(12):C1260-8.

400. Merlino DJ, Barton JR, Charsar BA, Byrne MD, Rappaport JA, Smeyne RJ, i sur. Two distinct GUCY2C circuits with PMV (hypothalamic) and SN/VTA (midbrain) origin. Brain Struct Funct. 2019;224(8):2983-99.

401. Okar SV, Topcuoglu MA, Yemisci M, Cakir Aktas C, Oguz KK, Arsava EM. Post-stroke inflammatory response is linked to volume loss in the contralateral hemisphere. J Neuroimmunol. 2020;344:577247.

402. Paul S, Candelario-Jalil E. Emerging neuroprotective strategies for the treatment of ischemic stroke: An overview of clinical and preclinical studies. Exp Neurol. 2021;335:113518.

403. Thakkar PC, McGregor AL, Barber PA, Paton JFR, Barrett CJ, McBryde FD. Therapeutic Relevance of Elevated Blood Pressure After Ischemic Stroke in the Hypertensive Rats. Hypertension. 2020;75(3):740-7.

404. Endres M, Dirnagl U. Ischemia and stroke. Adv Exp Med Biol. 2002;513:455-73.

405. Ding S. Ca^{2+} signaling in astrocytes and its role in ischemic stroke. Adv Neurobiol. 2014;11:189-211.

406. Kintner DB, Su G, Lenart B, Ballard AJ, Meyer JW, Ng LL, i sur. Increased tolerance to oxygen and glucose deprivation in astrocytes from Na^+/H^+ exchanger isoform 1 null mice. Am J Physiol Cell Physiol. 2004;287(1):C12-21.

407. Yao H, Azad P, Zhao HW, Wang J, Poulsen O, Freitas BC, i sur. The Na^+/HCO_3^- co-transporter is protective during ischemia in astrocytes. Neuroscience. 2016;339:329-37.

408. Barreto GE, Sun X, Xu L, Giffard RG. Astrocyte proliferation following stroke in the

mouse depends on distance from the infarct. PLoS One. 2011;6(11):e27881.

409. Honsa P, Pivonkova H, Harantova L, Butenko O, Kriska J, Dzamba D, i sur. Increased expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in reactive astrocytes following ischemia. Glia. 2014;62(12):2004-21.

410. Takatsuru Y, Eto K, Kaneko R, Masuda H, Shimokawa N, Koibuchi N, i sur. Critical role of the astrocyte for functional remodeling in contralateral hemisphere of somatosensory cortex after stroke. J Neurosci. 2013;33(11):4683-92.

11. ŽIVOTOPIS

Martina Ratko, mag. oecol. et prot. nat., rođena je 10. veljače 1988. godine u Zagrebu. Završila je Međunarodni program International Baccalaureate u 15. gimnaziji u Zagrebu. 2007. godine upisuje preddiplomski studij Biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, a potom i diplomski studij Ekologije i zaštite prirode na istom fakultetu. Tijekom studija uključila se u rad Sekcije za šišmiše Udruge studenata biologije „BIUS“ u sklopu koje je sudjelovala u izvedbi 10 istraživačkih projekata vezanih uz inventarizaciju populacije šišmiša na području Republike Hrvatske. Osim istraživačkih projekata, aktivna je bila i na području popularizacije znanosti sudjelovanjem u aktivnostima poput Dana bioraznolikosti, Europske noći šišmiša te Noći biologije. Nakon studija, stručnu praksu odradila je u Centru za forenzična ispitivanja, istraživanja i vještačenja „Ivan Vučetić“ gdje je ko-autor na 2 znanstvena članka i jednom poglavlju u knjizi iz područja vještačenja bioloških tragova. Doktorski studij Neuroznanosti upisuje 2018. godine te pod mentorstvom prof. dr. sc. Aleksandre Dugandžić, dr med. izrađuje ovu doktorsku disertaciju. Tijekom poslijediplomskog studija ko-autor je na tri znanstvena članka te prvi autor na članku objavljenom iz područja ove doktorske disertacije. Svoje rezultate istraživanja prezentirala je na 11 simpozija u Hrvatskoj i inozemstvu, te je dobitnik nagrade za najbolji poster. Područje interesa joj je neuroznanost, prvenstveno mehanizam nastanka i patofiziološka zbivanja na staničnoj razini tijekom razvoja moždanog udara.