

# Izražaj koneksina i dendrina u kralježničnoj moždini čovjeka tijekom razvoja i štakora nakon izlaganja kroničnom stresu i kastraciji

---

**Jurić, Marija**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2022**

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:599913>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-06**



*Repository / Repozitorij:*

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJA JURIĆ, dr. med.**

**IZRAŽAJ KONEKSINA I DENDRINA U KRALJEŽNIČNOJ MOŽDINI  
ČOVJEKA TIJEKOM RAZVOJA I ŠTAKORA NAKON IZLAGANJA  
KRONIČNOM STRESU I KASTRACIJI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2022.**

**SVEUČILIŠTE U SPLITU**  
**MEDICINSKI FAKULTET**

**MARIJA JURIĆ, dr. med.**

**IZRAŽAJ KONEKSINA I DENDRINA U KRALJEŽNIČNOJ MOŽDINI  
ČOVJEKA TIJEKOM RAZVOJA I ŠTAKORA NAKON IZLAGANJA  
KRONIČNOM STRESU I KASTRACIJI**

**DOKTORSKA DISERTACIJA**

**SPLIT, 2022.**

*Doktorska disertacija sadrži rezultate znanstvenih istraživanja provedenih u okviru znanstvene suradnje Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Osijeku i Farmaceutskog fakulteta, Sveučilišta u Szegedu (Mađarska). Animalni eksperimenti provedeni su u nastambi za pokusne životinje Farmaceutskog fakulteta Sveučilišta u Szegedu, dok je obrada prikupljenih tkiva obavljena u Laboratoriju za neurokardiologiju i Laboratoriju za istraživanje ranog razvoja čovjeka pri Zavodu za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu. Pristupnica je sudjelovala u izradi plana i organizaciji istraživanja. Sudjelovala je u prikupljanju, obradi i rezanju prikupljenih tkiva, kao i u postupcima imunohistokemijskog bojanja, mikroskopiranja i fotografiranja, analizi prikupljenih mikrofotografija, statističkoj obradi dobivenih podataka, tumačenju rezultata te pisanju iz rezultata proizašlih radova.*

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

## **Zahvala**

*Od srca zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na vodstvu, nesebičnoj pomoći, usmjeravanju i savjetima. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Katarini Vukojević na podršci i savjetima. Posebno hvala prof. dr. sc. Ivani Bočini, doc. dr. sc. Nives Kević i dr.sc. Benjaminu Benzoni na podršci, neizmjernoj pomoći i odvojenom vremenu pri izradi znanstvenih radova. Veliko hvala svim suradnicima znanstvenih radova.*

*Hvala svim kolegama sa Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju koji su sa mnom podijelili svoja profesionalna i životna iskustva. Zahvaljujući mojim dragim kolegicama sa Zavoda, Ivoni, Aniti, Danici i Ivani ovaj put je bio mnogo lakši.*

*Osobito hvala prof. dr. sc. Ivici Grkoviću, na profesionalnosti, neprekidnoj motivaciji i entuzijastičnom prenošenju znanja.*

*Najveća hvala mojim roditeljima i prijateljima za potporu, pomoć i strpljenje tijekom svih ovih godina.*

## SADRŽAJ

1. POPIS OZNAKA I KRATICA .....	1
2. UVOD .....	4
2.1 Kralježnična moždina .....	5
2.1.1 Embrionalni razvoj .....	5
2.1.2 Građa kralježnične moždine .....	8
2.2 Spinalni ganglij .....	9
2.3 Sinapsa .....	10
2.4 Sinaptička plastičnost .....	11
2.5 Bol .....	12
2.6 Kronični stres .....	14
2.7 Koneksini .....	15
2.8 Dendrin .....	19
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	21
4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA .....	23
5. METODE I MATERIJALI .....	25
5.1 Etička načela .....	26
5.2 Sakupljanje tkiva ljudskih zametaka .....	26
5.3 Pokusne životinje .....	26
5.4 Ovarijektomija i orhidektomija pokusnih životinja .....	27
5.5 Protokol kroničnog stresa .....	27
5.6 Imunohistokemijsko bojenje .....	30
5.6.1 Priprema tkiva .....	30
5.6.2 Prikupljanje podataka i kvantifikacija .....	33
5.7 Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i <i>Western blot</i> . .....	34

5.8 Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju .....	34
5.9 Statistički postupci.....	36
6. REZULTATI.....	37
6.1 Promjene izražaja koneksina 37, 43 i 45 u KM tijekom razvoja ljudskog zametka....	38
6.1.1 Ultrastrukturalna karakterizacija pukotinskih spojišta u spinalnom gangliju ljudskog zametka .....	48
6.2 Promjene izražaja dendrina u KM tijekom razvoja ljudskog zametka .....	49
6.3 Validacija modela kroničnog stresa u štakora .....	51
6.4 Promjene izražaja koneksina u KM nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu .	54
6.4.1 Izražaj koneksina 37 (Cx37) .....	55
6.4.2 Izražaj koneksina 40 (Cx40) .....	59
6.4.3 Izražaj koneksina 43 (Cx43) .....	63
6.5 Promjene izražaja dendrina u KM nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu ...	67
6.5.1 Analiza specifičnosti protutijela za dendrin koristeći <i>Western blot</i> .....	67
6.5.2 Specifični obrazac lokalizacije dendrina u KM.....	67
6.5.3 Preklapanje signala imunofluorescencije dendrina s biljezima primarnih aferentnih nociceptivnih vlakna u dorzalnom rogu i u neuronima spinalnih ganglija.....	69
6.5.4 Razlike izražaja dendrina između eksperimentalnih skupina .....	71
6.5.5 Ultrastrukturalna karakterizacija izražaja dendrina u dorzalnom rogu KM .....	75
7. RASPRAVA .....	76
7.1 Izražaj koneksina i dendrina u kralježničnoj moždini i ganglijima tijekom razvoja ljudskog zametka .....	77
7.2 Izražaj koneksina u kralježničnoj moždini nakon kastracije i izlaganja kroničnom stresu .....	84
7.3 Izražaj dendrina u kralježničnoj moždini ljudskog zametka i nakon kastracije štakora i izlaganja kroničnom stresu .....	89
8. ZAKLJUČCI.....	92

9. SAŽETAK.....	94
10. SUMMARY .....	97
11. LITERATURA.....	100
12. ŽIVOTOPIS .....	119



## 1. POPIS OZNAKA I KRATICA

AM	paučinasta opna (engl. <i>arachnoidea mater</i> )
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionska kiselina
AP	alarna ploča
ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
AUC	površina ispod krivulje (engl. <i>area under a curve</i> )
BMP	koštani morfogenetski protein (engl. <i>bone morphogenetic protein</i> )
BP	bazalna ploča
BrdU	bromodeoksiuridin
CAMKII $\alpha$	kalcij/kalmodulin-ovisna protein kinaza II alfa
CC	središnji kanal (engl. <i>central canal</i> )
CGRP	peptid povezan s genom za kalcitonin (engl. <i>calcitonin gene-related peptide</i> )
CMTX	X-povezana Charcot-Marie-Tooth bolest
CRL	duljina tjeme-zadak (engl. <i>crown rump length</i> )
Cx	koneksin (engl. <i>connexin</i> )
DAPI	4', 6-diamid-2-fenilindol (engl. <i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i> )
DIL	dorzalni dio sloja plašta (engl. <i>dorsal part of the intermediate layer</i> )
DM	tvrda opna (engl. <i>dura mater</i> )
DRG	spinalni ganglij (engl. <i>dorsal root ganglia</i> )
EMT	epitelno-mezenhimska transformacija
F-Gx-C	ovarijektomirane ženke izložene lažnim stresorima
F-Gx-S	ovarijektomirane ženke izložene stresu
FP	podna ploča (engl. <i>floor plate</i> )
F-SH-C	lažno operirane ženke izložene lažnim stresorima
F-SH-S	lažno operirane ženke izložene stresu

GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GTT	test opterećenja glukozom (engl. <i>glucose tolerance test</i> )
IB4	izolektin B4
INL	ventrikularni sloj (engl. <i>inner layer</i> )
IT	izvanstanična tekućina
KIBRA	engl. <i>kidney and brain protein</i>
KKMB	krvno- kralježnično moždinska-barijera
KM	kralježnična moždina
LTD	dugoročna depresije (engl. <i>long-term depression</i> )
LTP	dugoročno potenciranje (engl. <i>long-term potentiation</i> )
MAGI/S- SCAM	membranska gvanilat kinaza obrnute orijentacije (engl. <i>membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation</i> )
mGluR1	metabotropni glutamatni receptor 1
M-Gx-C	orhidektomirani mušjaci izloženi lažnim stresorima
M-Gx-S	orhidektomirani mušjaci izloženi stresu
mRNA	glasnička RNA (engl. <i>messenger RNA</i> )
M-SH-C	lažno operirani mušjaci izloženi lažnim stresorima
M-SH-S	lažno operirani mušjaci izloženi stresu
NF200	neurofilament 200
NMDA	N-metil D-aspartat
NO	dušikov oksid
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate-buffered saline</i> )
PGP 9.5	proteinski genski produkt 9.5 (engl. <i>protein gene product 9.5</i> )
PKMζ	protein kinaza C M zeta
PM	meka opna (engl. <i>pia mater</i> )
PMLD	bolest slična Pelizaeus–Merzbacher bolesti (engl. <i>Pelizaeus-Merzbacher-like</i> )

*disease)*

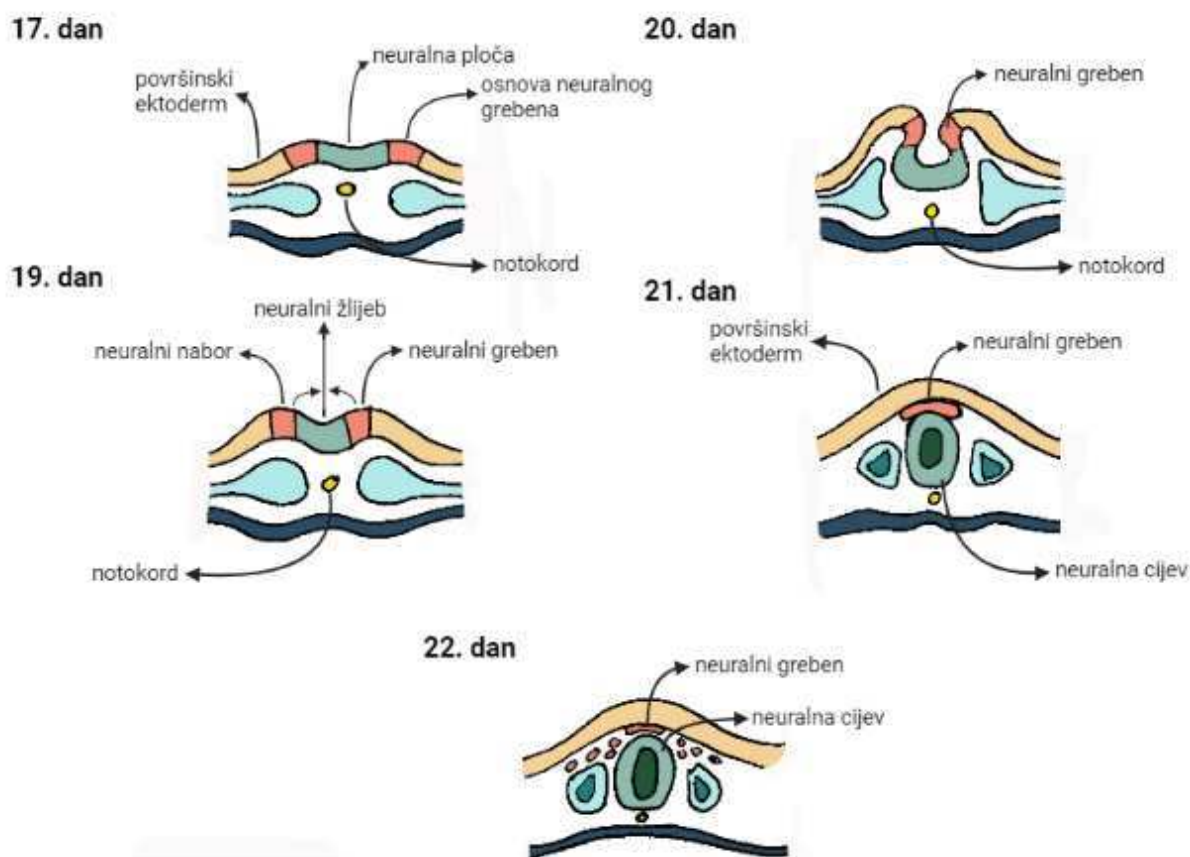
RP	krovna ploča (engl. <i>roof plate</i> )
Shh	sonic hedgehog protein (engl. <i>sonic hedgehog</i> )
shRNA	kratka RNA molekula sa strukturom ukosnice (engl. <i>short hairpin RNA</i> )
SŽS	središnji živčani sustav
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
UT	unutarstanična tekućina
VIL	ventralni dio sloja plašta (engl. <i>ventral part of the intermediate layer</i> )

## **2. UVOD**

## 2.1 Kralježnična moždina

### 2.1.1 Embrionalni razvoj

Složena struktura ljudskog perifernog i središnjeg živčanog sustava (SŽS) potječe od neuralne ploče, zadebljalog dijela ektoderma, koja se počinje razvijati krajem trećeg tjedna embriogeneze (1). Neuralna ploča koje se u to vrijeme sastoji od jednog sloja stanica nalazi se dorzalno ispred primitivnog čvora. Ektoderm neuralne ploče podliježe brzom proliferaciji, te stopa rasta na rubovima premašuje onu u središnjem dijelu neuralne ploče. Ta razlika u proliferaciji naposljetku, u procesu zvanom primarna neurulacija, uzrokuje stvaranje neuralnog žlijeba omeđenog sa svake strane povišenim neuralnim naborom (1). Daljnjom proliferacijom primitivnih ektodermalnih stanica, neuralni se žlijeb produbljuje, dok približavanje zadebljanih neuralnih nabora naposljetku uzrokuje stvaranje neuralne cijevi (Slika 1). Zatvaranje neuralne cijevi započinje na razini buduće cervikalne regije, te se odvija u kranijalnom i kaudalnom smjeru. Lumen neuralne cijevi tijekom formiranja komunicira s amnionskom šupljinom putem kranijalnog i kaudalnog neuroporusa u procesu zvanom sekundarna neurulacija (1). Kranijalni neuroporus zatvara se ranije od kaudalnog, te postaje *lamina terminalis*. Tijekom zatvaranja kranijalnog neuroporusa, kranijalni dijelovi neuralne cijevi brzo se povećavaju i proliferiraju što dovodi do stvaranja primarnih moždanih vezikula, kao osnove budućeg mozga. Kaudalni dijelovi neuralne cijevi koji ostaju relativno malog promjera čine kralježničnu moždinu (KM). Tijekom spajanja neuralnih nabora nastaje privremeni međusloj stanica između neuralne cijevi i površinskog ektoderma nazvan neuralni greben (Slika 1). Ovaj privremeni sloj stanica neuralnog grebena proteže se kontinuirano u središnjoj ravnini od razine mezencefalona do kaudalnog završetka KM.

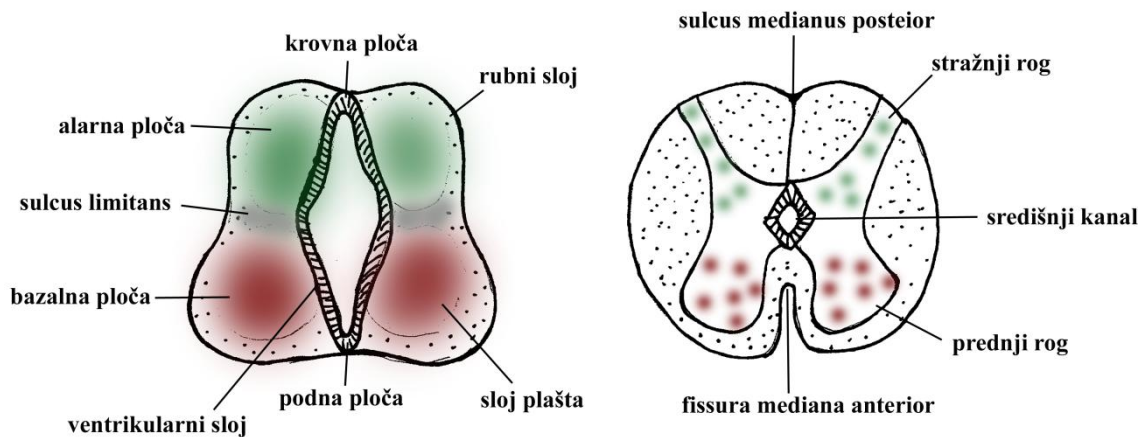


**Slika 1. Prikaz razvoja kralježnične moždine.**

Daljnijim razvojem, stanice neuralnog grebena dijele se u središnjoj liniji, migriraju bočno i stvaraju nakupine stanica između neuralne cijevi i okolnog mezoderma. Te nakupine stanica osim što su osnova primarnih osjetnih neurona spinalnih ganglija, također migracijom u različita tkiva tvore osjetne stanice i vlakna perifernog živčanog sustava, te većinu perifernih stanica autonomnog živčanog sustava; paravertebralne i prevertebralne ganglije (simpatički neuroni), te ganglije u efektorskim organima (parasimptički neuroni) (1, 2). Nakon zatvaranja, neuralna cijev formirana je od samo jednog sloja stanica koje proliferiraju i potom tvore pseudostratificirani neuroepitel koji se proteže kroz tri sloja (Slika 2). Unutarnji, ventrikularni sloj građen je od stanica postavljenih radialno oko središnjeg kanala (engl. *central canal*, CC) i od zametnih stanica koje prolaze kroz proces mitoze. Srednji sloj, sloj plašta sastoji se od gusto nabijenih primitivnih neuroblasta nastalih iz zametnih stanica ventrikularnog sloja. Vanjski sloj, nazvan rubni sloj sastavljen je od izdanaka stanica dvaju unutarnjih slojeva (1). Kontinuirana proliferacija stanica uzrokuje prednje i stražnje

zadebljanje u sloju plašta. Prednja veća zadebljanja su bazalne ploče koje će na kraju razvoja postati prednji i lateralni rogovi sive tvari, dok manja stražnja zadebljanja su alarne ploče, koje će naposljetku oblikovati stražnje rogove sive tvari KM. Uzdužni žlijeb, *sulcus limitans*, označava lateralni spoj bazalnih i alarnih ploča. Tijekom razvoja presjek lumena neuralne cijevi u tranzverzalnoj ravnini je romboidnog oblika s relativno tankim krovim i podnim pločama ispunjenim samo glioblastičnim tvorbama (2). Aksoni neuroblasta bazalnih ploča prodiru kroz rubni sloj i vanjsku graničnu membranu, te izlaze iz KM kao vlakna prednjeg korijena. Vlakna prednjih korjenova izravno inerviraju skeletne mišiće ili odlaze u autonomne ganglije za inervaciju visceralnih struktura. S druge strane, svi aksoni neuroblasta alarnih ploča ostaju unutar SŽS-a. Razvoj različitih podskupina stanica tijekom embriogeneze KM ovisi o prostorno-vremenskim promjenama izražaja različitih morfogenata (3-5). Na primjer, diferencijacija stanica duž rostralno-kaudalne osi određena je gradijentima koncentracije rostralizirajuće retinoične kiseline i kaudalizirajućeg faktora rasta fibroblasta (3, 6), dok je u dorzo-ventralnoj osi razmještanje podskupina stanica regulirano gradijentima koncentracije izlučenog Sonic hedgehog (engl. *sonic hedgehog*, Shh) proteina i koštanog morfogenetskog proteina (engl. *bone morphogenetic protein*, BMP) (4, 7). Ektoderm, tkivo koje prekriva neuralnu cijev vrši sekreciju BMP-a, te zatim potiče sekreciju BMP-a i u krovnoj ploči. BMP i Wnt su faktori koji određuju početnu dorzalizirajuću specijalizaciju stanica neuralne cijevi (4, 7). Ventralni signal, Shh, kojeg primarno luči notokord, a zatim i sama podna ploča, inducira diferencijaciju neuralnih stanica podnih ploča, motornih neurona i ventralnih interneurona (3, 7, 8). Gradijenti koncentracije različitih morfogenetskih signala imaju funkciju regulacije transkripcijskih faktora koji pokreću specijalizaciju neuroblasta različitih podskupina stanica ventralnog i dorzalnog dijela KM (7).

Daljnijim razvojem, stupanj proliferacije zametnih stanica postupno se smanjuje da bi na kraju potpuno prestao. Od ventrikularnog sloja ostaje samo jedan sloj endodimskih stanica oko CC. S druge strane, sloj plašta postupno se povećava te tvori sivu tvar KM okruženu rastućim rubnim slojem koji sadržava uzlazne i silazne aksone. S vremenom neki aksoni postaju mijelinizirani, a rubni sloj poprima obilježja bijele tvari KM (1).



**Slika 2. Prikaz građe kralježnične moždine.** Prikaz građe embrionalne (lijevo), te odrasle kralježnične moždine (desno).

### 2.1.2 Građa kralježnične moždine

Kralježnična moždina (KM) je duga cilindrična struktura ovijena moždanim ovojnica i smještena u kralježničnom kanalu (2). Prostire se od velikog lubanjskog otvora, odnosno *foramen magnum*, do razine donje granice prvog ili drugog lumbalnog kralješka. Ima dva zadebljanja, cervikalno i lumbalno, iz kojih izlaze spinalni živci koji inerviraju strukture gornjih i donjih ekstremiteta. U središtu KM možemo pronaći CC obložen ependimskim stanicama i ispunjen cerebrospinalnim likvorom. Segmentacija KM nije vidljiva morfološki već se očituje kroz 31 par spinalnih živaca, čiji korijenovi izlaze iz nje i inerviraju specifične regije tijela (2). KM sadrži sljedeće segmente: 8 cervikalnih, 12 torakalnih, 5 lumbalnih, 5 sakralnih i 1 kokcigealni. Iz svakog segmenta KM izlazi prednji korijen i u njega ulazi stražnji korijen, koji se spajaju u spinalni živac prilikom izlaska iz kralježničnog kanala preko intervertebralnih otvora. Do 3. mjeseca fetalnog života KM proteže se cijelom dužinom kralježničnog kanala, međutim tijekom daljnjeg razvoja brzina rasta kralježničnog kanala premašuje brzinu rasta KM (2).

U transverzalnom presjeku vidljivo je da se KM sastoji od središnje sive tvari koja ima oblik leptira i bijele tvari koja je okružuje. Siva tvar sastoji se od nakupine tijela neurona, njihovih dendrita i dijelova nemijeliniziranih i mijeliniziranih živčanih vlakana, dok se bijela tvar sastoji od snopova mijeliniziranih vlakana, s uzlaznom ili silaznom putanjom (2). Svaka polovica KM ima stražnji rog sive tvari koji se proteže posterolateralno gotovo do samog ruba, blizu zone ulaska stražnjeg korijena, i prednji rog sive tvari koji se proteže prema



naprijed, ali ne doseže rub KM. Torakalni segmenti KM osim prednjeg i stražnjeg roga sive tvari imaju i mali bočni (lateralni) rog u blizini baze prednjeg roga. *Commissura grisea* koja okružuje CC povezuje sivu tvar dviju polovica KM (2). Oko CC nalazi se područje ispunjeno uglavnom stanicama neuroglije, poznato još kao središnja želatinozna tvar (lat. *substantia gelatinosa centralis*). Uzlazna i silazna vlakna bijele tvari KM organizirana su u specifične snopove. Snop vlakana koji ima isto ili sličnog podrijetlo, smjer i završetak ima naziv *funiculus*, te se bijela tvar KM dijeli u 3 parna snopa: stražnji, bočni i prednji. Funkcije KM kao dijela SŽS izuzetno su važne jer neuronski krugovi KM služe za primanje aferentnih somatskih i visceralnih informacija preko stražnjih korjenova, komunikaciju s višim razinama SŽS silaznim i uzlaznim putovima, slanje eferentnih podražaja preko prednjih korjenova do somatskih i visceralnih efektora i održavanje somatskih i visceralnih refleksa (2).

Siva tvar KM sadrži veliku količinu neurona različitih veličina i oblika. Neuroni smješteni u prednjem ili lateralnom rogu daju aksone koji izlaze kroz prednji korijen KM za inervaciju somatskih ili visceralnih efektora, dok neuroni smješteni u stražnjem rogu imaju izdanke ograničene samo na područje unutar SŽS-a. Živčane stanice sive tvari organizirane u specifične skupine koje se protežu longitudinalno duž KM nazivaju se staničnim jezgrama. U neuroanatomskom smislu, stanična jezgra sastoji se od veće količine stanica koje dijele slične citološke karakteristike, razmještaj, konačna odredišta aksona i funkcije. Rexed je opisao arhitektonsku organizaciju neurona u KM mačke koja je dokazano usporediva s citoarhitekturnom raspodjelom lamina u segmentima KM u novorođenčeta i odraslog čovjeka (9). Stoga je laminacija, odnosno raspoređivanje staničnih populacija u lamine unutar sive tvari KM postala najpreciznija i najčešće korištena metoda za opis staničnih skupina kod KM sisavaca.

Citoarhitektonika sive tvari čini ukupni razmještaj neurona, jezgara i lamina. Postoji deset različitih staničnih lamina, područja s karakterističnim svojstvima, označenih rimskim brojevima od I-X. Kroz dorzalni rog protežu se lamine od I-VI, dok je lamina X područje sive tvari koja okružuje CC.

## **2.2 Spinalni ganglij**

Spinalni gangliji (engl. *dorsal root ganglia*, DRG), uklopljeni u dorzalne korjenove, dio su perifernog živčanog sustava i prenose periferne aferentne podražaje u SŽS preko aksona njihovih pseudounipolarnih neurona. Neuroni spinalnih ganglija su prvi neuroni aferentnih putova iz tijela. Aksoni koji ulaze u KM mogu izravno tvoriti sinapsu s neuronima

stražnjeg roga sive tvari ili proći i uspeti se u neke više dijelove SŽS-a (7, 10). Embrionalno podrijetlo spinalnog ganglija su stanice neuralnog grebena (11). Tijekom razvoja, stanice neuralnog grebena koje će formirati spinalne ganglije ne diferenciraju se sve u neuroblaste. Neke od njih se diferenciraju u satelitske stanice koje okružuju tijela neurona spinalnih ganglija, dok druge migriraju uz periferna živčana vlakana tijekom njihovog rasta, obavijaju ih, te postaju Schwannove stanice (12). Spinalni gangliji su smješteni izvan krvno-moždane barijere, te su stoga izloženi različitim tvarima koje cirkuliraju vaskularnim sustavom (13). Neuroni spinalnih ganglija ne komuniciraju međusobno putem sinapsi već imaju različite receptore na svojoj membrani za komunikaciju neuroaktivnim tvarima (14).

### 2.3 Sinapsa

Sinapsa je visokospecijalizirani morfološki i funkcionalni spoj između neurona ili neurona i efektornog organa. Razlikujemo dvije vrste sinapsi s obzirom na način sinaptičkog prijenosa – električne i kemijske sinapse.

Osnova električne sinapse je tijesni spoj, odnosno pukotinsko spojište, kanal koji povezuje membrane dvaju neurona (15). Električne sinapse omogućavaju pasivni, trenutni prijenos struje iona nastale razlikom potencijala između presinaptičkog i postsinaptičkog elementa, čak i ispod praga akcijskog potencijala (15). Osim struje iona, omogućena je i difuzija različitih tvari molekularne mase do nekoliko stotina daltona, kao što su adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) i drugi glasnici (16). Jedna od glavnih karakteristika električnih sinapsi je dvosmjernost kanala, kao i velika brzina prijenosa signala (15). Električnim sinapsama osigurava se povezivanje i usklađivanje velikih skupina neurona koji tada reagiraju na vanjske podražaje kao jedna stanica po načelu sve ili ništa (15).

Kemijske sinapse su složenije građe od električnih, te se sastoje od tri glavna dijela: presinaptičkog elementa, sinaptičke pukotine, te postsinaptičkog elementa (16). Za razliku od električnih, kod kemijskih sinapsi presinaptički i postsinaptički element odvojeni su sinaptičkom pukotinom, te je prijenos signala uvjetovan oslobađanjem kemijske tvari, neurotransmitera, kao i postizanjem praga akcijskog potencijala (15). Neurotransmiteri potječu iz sinaptičkih vezikula nakupljenih u presinaptičkom elementu, odnosno aksonskom završetku. Za pražnjenje sinaptičkih vezikula potrebna je promjena membranskog potencijala aksonskog završetka nastala dolaskom akcijskog potencijala. Na taj način se potiče otvaranje naponom reguliranih kalcijevih kanala i utok struje  $\text{Ca}^{2+}$  iona u presinaptički element što uzrokuje egzocitozu sinaptičkih vezikula, odnosno otpuštanje neurotransmitera u sinaptičku

pukotinu (16). U sinaptičkoj pukotini neurotransmiteri difundiraju do postsinaptičkog elementa gdje se vežu za membranske receptore. Vežanje neurotransmitera za receptore uzrokuje njihovu aktivaciju te dovodi do otvaranja ili zatvaranja ionskih kanala na posljeticu mijenjajući membranski potencijal postsinaptičke stanice. Djelovanje neurotransmitera prestaje njihovim uklanjanjem iz sinaptičke pukotine, odnosno razgradnjom enzimima ili djelovanjem glija stanica (16).

## 2.4 Sinaptička plastičnost

Sinaptička plastičnost je sposobnost promjene snage sinapse koja nastaje zbog promjena u dinamici neuronske aktivnosti i utječe na proces učenja i pamćenje (17). Promjena u neuronskoj aktivnosti je posljedica prilagodbe na različite vanjske ili unutrašnje čimbenike. Razlikujemo kratkoročnu i dugoročnu sinaptičku plastičnost. Kratkoročna sinaptička plastičnost traje od nekoliko milisekundi do nekoliko minuta (18). Ima važnu ulogu u odgovoru na različite senzorne podražaje, kratkotrajne promjene u ponašanju ili u formiranju kratkoročnog oblika pamćenja (19). Očituje se na naglom promjenom u sinaptičkoj aktivnosti zbog sinaptičke facilitacije, sinaptičke depresije, sinaptičke potencijacije, te umnažanja. Svi oblici kratkoročne sinaptičke plastičnosti oslanjaju se na promjenu broja otpuštenih neurotransmitera iz sinaptičkih vezikula presinaptičkog elementa sinapse (19).

S druge strane, dugoročna sinaptička plastičnost uzrokuje promjene u neuronskim krugovima kroz puno duži vremenski period koji se mjeri u danima, tjednima ili godinama, a nastaje zbog promjena u genskom izražaju i sintezi pojedinih proteina. Dugotrajna promjena sinaptičke snage se postiže pomoću dugoročne potencijacije (engl. *long-term potentiation*, LTP) i dugoročne depresije (engl. *long-term depression*, LTD). N-metil D-aspartat (NMDA) je glutamatni receptor odgovoran za nastanak LTP-a (20). LTP nastaje samo u trenutku kada su i presinaptički i postsinaptički element depolarizirani pri čemu dolazi do aktivacije NMDA receptora izbijanjem  $Mg^{+}$  iona iz pore kanala, te vezanja glutamata otpuštenog iz sinaptičkih vezikula (21). Aktivacijom NMDA receptora postiže se povećanje količine  $Ca^{2+}$  u postsinaptičkom neuronu i kaskadna signalizacija koja uzrokuje povećani izražaj  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolepropionska kiselina (AMPA) receptora na postsinaptičkoj membrani i samim time veću osjetljivost na glutamat (22). Neke od proteinskih kinaza aktiviranih kaskadnom signalizacijom za koje se smatra da su zadužene za održavanje LTP-a su izoforma protein kinaze C – M zeta (PKM $\zeta$ ) i alfa izoforma kalcij/kalmodulin-ovisne protein kinaze II (CAMKII $\alpha$ ) (21, 23-25).

S druge strane, LTD se očituje dugotrajnim smanjenjem snage sinapse osiguravajući povoljnije djelovanje LTP-a. Postiže se dugotrajnijim kontinuiranim podražajem niske frekvencije (26). Djelovanje LTD se očituje suprotnim učincima od LTP. Sporo i umjereno povećanje broja  $\text{Ca}^{2+}$  aktivira fosfataze ovisne o  $\text{Ca}^{2+}$  u postsinaptičkom elementu što dovodi do smanjenja broja AMPA receptora na postsinaptičkoj membrani i smanjenja osjetljivosti na glutamat (19, 27). Osim u hipokampusu, učinci LTD su istraživani u malom mozgu, gdje ima ulogu u motornom učenju aktivacijom metabotropnog glutamatnog receptora 1 (mGluR1) koji aktivira fosfolipazu C/inozitol-trifosfat/diacilglicerol signalni put u Prukinjeovim stanicama (28). Ravnoteža između aktiviranja kinaza i fosfataza ovisi o količini i vremenskom periodu porasta postsinaptičkog  $\text{Ca}^{2+}$  pri tome uključujući i  $\text{Ca}^{2+}$  oslobođene iz unutarstaničnih zaliha, čime se određuje smjer sinaptičke plastičnosti, odnosno aktivacija LTD ili LTP (29).

Presinaptička plastičnost očituje se promjenom količine otpuštenih neurotransmitera iz sinaptičkih vezikula, koji ovise o količini  $\text{Ca}^{2+}$  u presinaptičkom elementu. Smatra se da se presinaptička plastičnost oslanja na autokrinu signalizaciju glutamatom, te na parakirnu signalizaciju retrogradnim glasnicima kao što su dušikov oksid (NO) i endokanabinoidi (30).

Astrociti i glija stanice imaju ulogu u modulaciji sinaptičke plastičnosti otpuštajući različite neuroaktivne tvari u blizini sinapsi, koje utječu na komunikaciju između neurona (31). Otpuštanje aminokiseline D-serin, agonista NMDA receptora iz astrocita potiče se LTP (32). Osim toga, smatra se da signalizacija između neuralnog efrinskog A4 receptora (engl. *ephrin type-A receptor 4*, EPHA4 receptor) na dentritičkim bodljama i glijalnog liganda efrina A3, te razmjena laktata između neurona i glije u hipokampusu također utječe na sinaptičku plastičnost (33-35).

## **2.5 Bol**

Osjet boli ima zaštitnu funkciju, upozorava na oštećenje ili ozljedu tkiva. Liječenje i procjena jakosti boli je otežana zbog subjektivne, odnosno individualne prirode boli. S obzirom na trajanje, razlikujemo akutnu i kroničnu bol. Osjet boli nastaje stimulacijom nociceptora, odnosno slobodnih perifernih živčanih završetaka primarnih osjetnih neurona, koji se aktiviraju izlaganjem tkiva štetnim podražajima. Tijela primarnih osjetih neurona smještena su u spinalnom gangliju.

Bolni podražaji perifernih tkiva, kože, potkožja, mišića ili zglobova aktiviraju različite tipove nociceptora. Tri glavna tipa nociceptora, termički, mehanički i polimodalni, rasprostranjeni su svugdje po tkivima, te se često njihova aktivnost isprepleće. Možemo

razlikovati dvije vrste boli s obzirom na percepciju: prvu, oštru i brzu bol i drugu, tupu i sporu bol. Prvu bol prenose termički i mehanički nociceptori A $\delta$  mijeliziranim vlaknima, dok drugu bol prenose polimodalni nociceptori C nemijeliziranim vlaknima (16).

Nociceptivna vlakna ulaze kroz stražnje korijenove i završavaju na neuronima različitih lamina dorzalnog roga KM. Glavni neurotransmiteri kojima se postiže sinaptički prijenos su glutamat i tvar P. Sekundarne neurone koji stvaraju izravne sinapse s nociceptivnim vlaknima primarnih neurona možemo pronaći u lamini I, II (lat. *substantia gelatinosa*) i V (16). Sekundarni neuroni I i V lamine svoje projekcije pružaju u više centre SŽS, moždano deblo i talamus, dok II lamina sadrži interneurone koji moduliraju pristigle informacije. Projekcijska vlakna neurona I i V lamine križaju središnju ravninu KM u prednjoj bijeloj komisuri, te se penju preko lateralne kolumne, tvoreći *tractus spinothalamicus lateralis*, do viših centara. U produženoj moždini spajajući se s prednjim spinotalamičkim traktom tvori *lemniscus spinalis*. Preko njega vlakna na kraju dolaze do ventroposteriorne talamičke jezgre u kojoj se nalaze tercijarni neuroni koji šalju svoje aksone do postcentralne vijuge velikog mozga, odnosno do primarnog osjetnog područja (36).

U području glave primarni osjetni neuroni se nalaze u ganglijima trigeminalnog (V.), facijalnog (VII.), glosofaringealnog (IX.) i vagalnog živca (X.). Vlakna primarnih neurona prekapčaju se sa sekundarnim neuronima u nucleus tractus spinalis nervi trigemini u moždanom deblu. Sekundarni neuroni šalju svoja vlakna preko *lemniscus trigeminalis* do tercijarnih neurona u ventroposteriomedijalnoj jezgri talamusa, te na kraju do primarnog osjetnog područja velikog mozga (36).

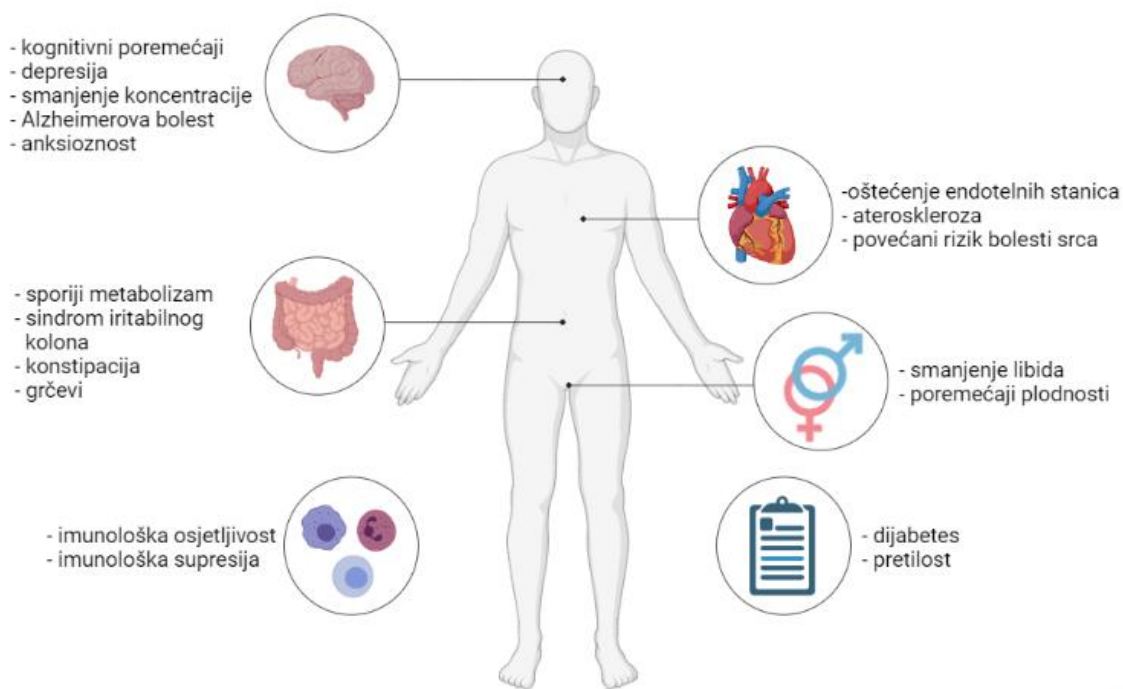
Visceralna bol je bol difuznog karaktera, te se ne može se s preciznošću utvrditi izvor boli. Uzrok tome je mala gustoća visceralne osjetne inervacije, te široka raspodjela signala, odnosno aktivacija velikog broja neurona unutar KM, što smanjuje preciznost lokalizacije. Prenesena bol nastaje zbog ispreplitanja somatskih i visceralnih podražaja na razini KM (37). Visceralni nociceptori imaju viši prag aktivacije na štetne podražaje od somatskih nociceptora, aktiviraju se pri izlaganju kemijskim podražajima, upali ili drugo. Osjetna visceralna vlakna koja mogu biti A $\delta$  i C vlakna ulaze u SŽS preko simpatičkih i parasimpatičkih živaca (38). Tijela primarnih neurona nalaze se u nodoznom gangliju (vagalni živac), te u DRG. U KM ulaze preko stražnjeg korijena tvoreći sinapse ili odmah u površinskim laminama dorzalnog roga sa sekundarnim neuronima čiji se aksoni udružuju u kontralateralni prednji spinotalamički trakt ili u području intermedijarne sive tvari lamine X čiji neuroni šalju vlakna ipsilateralnom dorzalnom kolumnom do moždanog debla (39). U

moždanom deblu prekapčaju se s tercijarnim neuronima u jezgrama *nucleus gracilis* i *nucleus cuneatus*, čiji aksoni se prekapčaju na neuronima ventroposteriornog talamusa koji daju talamokortikalne projekcijama (16).

Poremećaj prijenosa boli može dovesti do stanja hiperalgezije i alodinije. Hiperalgezija je stanje u kojem nociceptori imaju jako smanjen prag podražaja što dovodi do prekomjerne aktivacije i pojačanog osjećaja boli, dok se stanje alodinije razvija pri ozljedama KM pri čemu inače neštetni podražaji izazivaju bol.

## **2.6 Kronični stres**

Kronični stres se javlja kao odgovor tijela na situaciju u kojoj se organizam dugotrajno, povremeno ili kontinuirano, izlaže značajnim emocionalnim ili psihološkim događajima (40). Reakcija tijela na stres i bol ima zaštitnu ulogu s ciljem održavanja normalnog unutrašnjeg miljea (41). Središnju ulogu djelovanja kroničnog stresa na organizam ima aktivacija osi hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (40). Međutim, kada se organizam izlaže tim procesima kroz duži vremenski period počinju se razvijati abnormalni/neprikladni odgovori (Slika 3) (42, 43). To se može objasniti kroz to što se dugotrajnom aktivacijom aferentnih putova različitim stresorima može utjecati na neuroplastičnost u područjima SŽS-a odgovornim za obradu nociceptivnih signala, uzrokujući naposljetku povećanu ekscitabilnost neurona i značajne promjene u propusnosti krvno-moždane barijere (41, 44, 45). Sve se više povezuje uloga kroničnog stresa u podlozi razvoja određenih stanja kronične boli kao što su sindrom iritabilnog crijeva, fibromialgija, migrena i druge (43, 46, 47). Tijekom posljednjeg desetljeća epidemiološke studije i sustavni pregledi ukazuju na veću učestalost stanja kronične boli kod žena, te se pažnja sve više usmjerava na prisutnost i fluktuaciju gonadalnih hormona kao glavnog objašnjenja tih spolnih razlika (43, 47-49). Danas se smatra da se mehanizmi nastanka kronične boli i kronični stres u mnogočemu preklapaju (42). Kronična bol je jedna od raširenijih patoloških stanja koje zahvaća četvrtinu odrasle populacije (42, 49). Ima velikog utjecaja na kvalitetu života pacijenta jer kod više od polovice nije uspostavljena prikladna terapija (42).



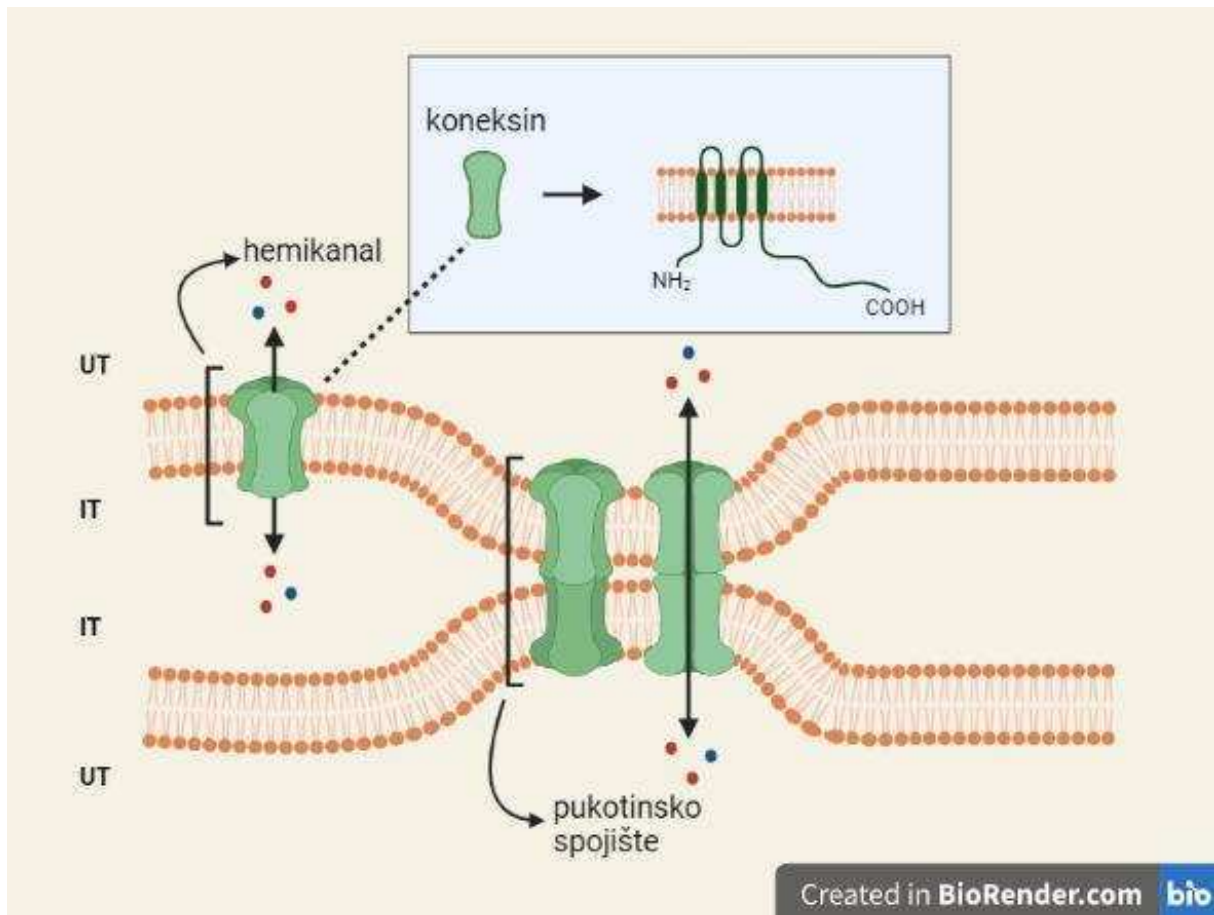
Created in BioRender.com 

**Slika 3. Djelovanje kroničnog stresa na organizam.**

## 2.7 Koneksini

Koneksini (engl. *connexin*, Cx) su proteini koji sudjeluju u stvaranju dvosmjernih kanala, pukotinskih spojišta ili hemikanala (Slika 4) (50). Pukotinska spojišta (engl. *gap junctions*) sastoje se od dvije heksamerne formacije koneksina – koneksiona, koji se nalaze na svakoj pojedinoj susjednoj stanici koja sudjeluje u komunikaciji (51). U SŽS pukotinska spojišta imaju ulogu u stvaranju električnih sinapsi, koje služe za sinkronizaciju električne aktivnosti među neuronima, glijom ili međusobno, pružajući tako potpurnu okosnicu neuronske aktivnosti prije uspostave kemijskih sinapsi u razvijajućem i odraslom SŽS-u (52-54). Hemikanali su nesporeni koneksioni koji posreduju u razmjeni malih molekula između citosola i izvanstaničnog prostora (55). Hemikanali u fiziološkim uvjetima su većinski u zatvorenoj konformaciji jer tijekom poremećaja otvaranja, gubitkom metabolita i ionskog gradijenta, mogu dovesti do stanične smrti (56). Uz spomenuto, koneksinski kanali mogu sudjelovati u kaskadnoj reakciji unutarstanične signalizacije, te imati utjecaja na modulaciju stanične adhezije (57). Sve navedeno ima važnu ulogu u embriogenezi, od koordinacije migracije staničnih masa, diferencijacije neurona do oblikovanja obrazaca neuronske aktivnosti (58). Tvari koje se mogu razmijeniti putem koneksinskih kanala imaju velik utjecaj na različite signalne putove. Stoga su koneksinski kanali presudni za održavanje i

koordinaciju aktivnosti u SŽS (50). Gradivni elementi ovih kanala, koneksini, pod utjecajem su čitavog spektra različitih mehanizama (51, 59). Na primjer, mogu se modulirati različitim o aktivnosti-ovisnim mehanizmima, poput glutamatnih ionotropnih ili metabotropnih receptora, drugih signalnih sustava te unutarstaničnih promjena pH i  $\text{Ca}^{2+}$  (51, 59, 60). Koneksini imaju kratak poluživot kako bi pravovaljano odgovorili na različite fiziološke potrebe organizma kroz povećavanje ili smanjivanje količine nastalih hemikanala ili pukotinskih spojišta (61).



**Slika 4. Molekularna i strukturna građa pukotinskih spojišta i hemikanala.** Prikaz pukotinskog spojišta na dvije susjedne stanice građenog od dva heksamerna kanala koneksina – koneksona. Koneksin je građen od četiri domene koje premošćuju membranu, dvije izvanstanične petlje, jedne unutarstanične petlje, jednog unutarstaničnog N-terminalnog kraja i jednog unutarstaničnog C-terminalnog kraja.

**Kratice:** IT – izvanstanična tekućina; UT – unutarstanična tekućina.

Smatra se da promjena izražaja koneksina, a time i njihove funkcije ima veliku važnost u genezi različitih patoloških stanja u SŽS-u (50). Koneksini su rasprostranjeni u svim tkivima gdje su svojom specifičnom funkcijom važni u održavanju homeostaze, te su



njihove genetske mutacije povezane s različitim bolestima srca, živčanog sustava, sluha, kože i drugo. Prva opisana mutacija je mutacija gena GJB1 za Cx32 koji utječe na mijelinizaciju kod pacijenata sa X-povezanim bolesti Charcot-Marie-Tooth (CMTX) (62). Danas su otkrivene mutacije gena za mnoge izomere koneksina koje uzrokuju različite kožne bolesti poput Vohwinkelovog sindroma (Cx26), Cloustonovog sindroma (Cx30), bolesti povezane s poremećajem mijelinizacije poput bolesti slične Pelizaeus–Merzbacher bolesti (engl. *Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease*, PMLD; Cx46/Cx47), zatim gubitak sluha (Cx26), okulodontodigitalnu displaziju (Cx43), idiopatsku atrijsku fibrilaciju (Cx40) i ostale (56).

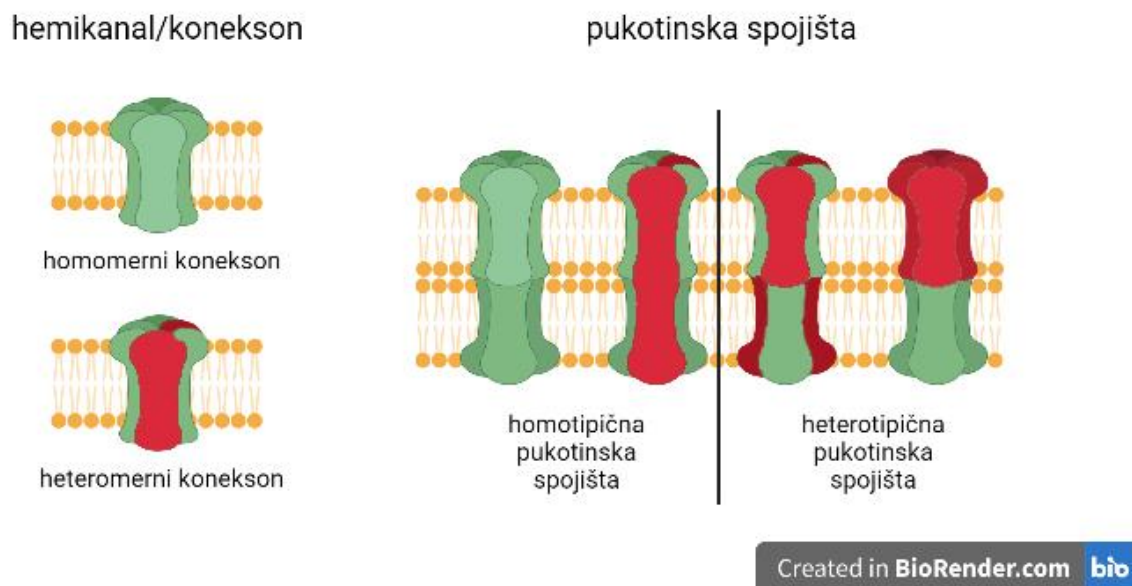
U SŽS stanice imaju izražaj više izomera koneksina na svojoj membrani. Mutacije gena za Cx32, Cx47 i Cx43 dovode do težih neuroloških poremećaja (63). Mutacije gena za Cx32 dovodi do gore navedene CMTX bolesti koji uzrokuje perifernu demijelinizirajuću neuropatiju. Mutacija gena za Cx47 dovodi do PLMD koja se očituje nistagmusom, cerebelarnom ataksijom, spastičnošću, te poremećajem mijelinizacije (64). Mutacija gena za Cx43 uzrokuje okulodontodigitalnu displaziju koja se očituje mikrokornijom, mikroftalmijom, sindaktilijom, abnormalnostima zuba, te gluhoćom, smanjenim kognitivnim funkcijama i epileptičkim napadajima (65).

Osim toga, koneksini imaju utjecaja u tumorogenezi (66). S jedne strane, smatra se da imaju tumor-supresorski učinak, što je opisano kod genetski modificiranih miševa bez gena za Cx32, koji su bili podložniji razvoju tumora jetre i pluća, dok su oni bez gena za Cx43 imali učestalije metastaze raka dojke u pluća (67, 68). S druge strane, opisan je tumor prostate s bogatim izražajem Cx43, što je u tom slučaju predstavljalo negativan prognostički znak (69).

Identifikacija distribucije koneksina bitna je za razumijevanje njihove uloge u regulaciji staničnog odgovora na događaje u okolišu pomoću fine koordinacije susjednih stanica. S druge strane, uzimajući u obzir središnju ulogu KM u percepciji i obradi boli, sve je više dokaza koji opisuju važnost izražaja i funkcije spinalnih koneksina u patogenezi stanja neuropatske boli induciranih ozljedom perifernog živca ili same KM, kao i kod upalnih stanja, te onih povezanih sa zloćudnim bolestima (70-74). Korištenjem modela stresa izbjegavanja vode kod štakora, Golovatscka i sur. pronašli su porast proupalnih medijatora u KM i povećanu propusnosti krvno-KM-barijere (KKMB) u životinja izloženih stresu, paralelno s poremećajem izražaja kralježničnog Cx43 (45). Uz to, i spolni hormoni imaju utjecaja na izražaj i funkciju koneksina u SŽS (75, 76), te se pretpostavlja da bi promjena njihove

količine mogla biti povezana s većom učestalošću kronične boli povezane s kroničnim stresom u žena.

Obitelj proteina koneksina kodira 20 gena kod glodavaca, odnosno 21 gen kod ljudi, a svaki protein dobio je ime ovisno o svojoj molekularnoj masi (77). Većina koneksina ima selektivan izražaj ovisan o određenim staničnim skupinama s najvećom raznolikošću u SŽS-u (78). Iako svaki specifični koneksin može stvoriti svoje vlastito pukotinsko spojište, u mnogim slučajevima ona se sastoje od više izoformi koneksina, stvarajući heteromerne koneksone s više od dva različita koneksina ili heterotipska pukotinska spojišta s različitim koneksonima što je prikazano na slici 5 (79, 80).



**Slika 5. Prikaz koneksona i pukotinskih spojišta.** a) Koneksini prilikom formiranja heksamerne strukture – koneksone mogu se povezivati s istim ili različitim izoformama koneksina, tvoreći homomerne i heteromerne koneksone. b) Pukotinska spojišta nastaju spajanjem homomernih i/ili heteromernih koneksone na susjednim stanicama pri čemu formiraju homotipična ili heterotipična pukotinska spojišta.

Cx37 i Cx40 do sada su najviše opisivani u kardiovaskularnom sustavu. Cx40 je opisan atrijskim miocitima srca, gdje je važan za provodljivost, dok je Cx37 opisan u endotelnim stanicama te se povezuje procesom ateroskleroze (81-83). Osim toga, opisana je važna uloga Cx37 i Cx40 u održavanju endotelne komunikacije tijekom vaskulogeneze (84). U SŽS pronađeni su u endotelnim stanicama, gdje imaju ulogu endotelnoj komunikaciji, kao i

u komunikaciji endotelnih stanica s astrocitima (85). Navedeno ima važnu ulogu u permeabilnosti krvno-moždane barijere (86, 87). Uz to, do sada su opisani u području motoričkih regija KM u razvoju te u razvijenim motornim neuronima (78, 88).

Cx43 je jedan od najraširenijih koneksina, prisutan u svim stanicama KM s najvećom imunoreaktivnošću u astrocitima (89). Omogućava stvaranje funkcionalnog sincicija međusobnim povezivanjem astrocita, osiguravajući na taj način homeostazu živčanog tkiva (90). Uz to, smatra se da Cx43 djeluje neuroprotektivno u ishemijskim ili neurodegenerativnim stanjima (91).

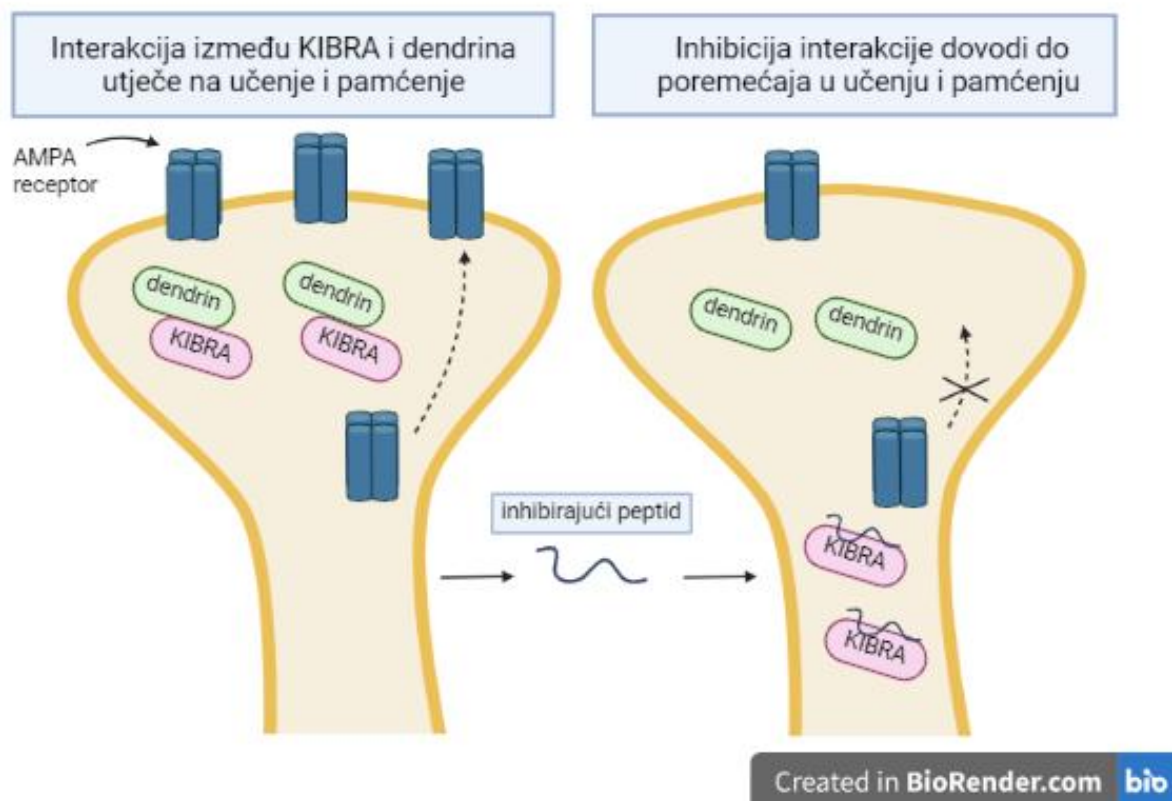
Cx45 je opisan u gotovo svim regijama mozga tijekom razvoja, te u neuronima korteksa, hipokamusa, talamusa i malog mozga u odraslom SŽS (92). Nadalje, opisan je i u olfaktornom epitelu i bulbusu odraslih miševa (93). U KM opisan je u neuronima dorzalnog roga, laminama I-III, koje su povezane s obradom boli (94). Uz to, Cx45 sudjeluje u gradnji heterotipičnih pukotinskih kanala skupa s Cx43 u provodnom sustavu srca (95).

## **2.8 Dendrin**

Dendrin je do sada opisan u dendritima neurona velikog mozga gdje, kao supstrat brojnih proteinskih kinaza ima važnu ulogu u modulaciji sinaptičke plastičnosti (96, 97). Dendrin-kodirajuća glasnička RNA (engl. *messenger RNA*, mRNA) transportira se u dendrite s ciljem sinteze proteina na dendritičkim ribosomima (98). Pretpostavka je da se na taj način brzom i ekonomičnom isporukom proteina omogućavaju precizne i odgovarajuće promjene u sinaptičkim svojstvima kada je to potrebno (99). Dendrin-kodirajuća mRNA do sada je opisana u somi i dendritima struktura prednjeg mozga, posebno u neuronima neokorteksa, hipokampusa, putamena i limbičkog sustava (97). Postsinaptički smještaj dendrina usko je povezan sa sinaptičkim citoskeletnim proteinima CIN85 i MAGI/S-SCAM (98, 100). Ti proteini imaju velik utjecaj na promjenu morfologije i strukture postsinaptičkog citoskeleta, kao i na premještanje AMPA i drugih receptora, pri čemu imaju utjecaja na sinaptičku plastičnost (99, 101, 102).

Kroz istraživanja opisana je ovisnost izražaja dendrina o različitim čimbenicima. Dulje razdoblje budnosti uskraćivanjem sna dovodi do smanjenja izražaja i koncentracije mRNA i proteina dendrina u subkortikalnim i kortikalnim područjima velikog mozga i mezencefalona (96). S druge strane, promjena izražaja dendrina nakon izlaganja nikotinu specifična je za dob, te je izraženija u adolescentskom mozgu zbog aktivnijeg sinaptičkog preuređivanja i sazrijevanja mozga za vrijeme adolescentskog razdoblja (101).

Osim toga, u najnovijim istraživanjima aktivnost dendrina sve se više povezuje s proteinom KIBRA (engl. *Kidney and brain protein*) (103). KIBRA je sinaptički protein koji ima ulogu u regulaciji načina učenja i pamćenja preko interakcije sa PKM $\zeta$  s dominantnim izražajem u neuronima hipokampusa, korteksa, malog mozga i hipotalamusa (104, 105). Inhibicija interakcije između Kibre i dendrina dovodi do atenuacije LTP-a, sinaptičke jakosti i plastičnosti (Slika 6) (103). Promjena prirode interakcije između Kibre i dendrina uzrokovana mutacijom gena Kibre mogla bi biti odgovorna za poremećaje u procesima učenja i pamćenja u neurološkim stanjima poput Touretteovog sindroma i Alzheimerove bolesti (106, 107).



**Slika 6. Pojednostavljeni prikaz poremećaja učenja i formiranja memorije nakon primjene peptida koji inhibira interakciju između KIBRA i dendrina.**

**Kratica:** AMPA receptor - receptor  $\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline.

### **3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA**

1. Odrediti prostorno-vremensku distribuciju koneksina i dendrina u različitim područjima KM i spinalnih ganglija u razvoju
2. Prikazati preklapanje izražaja koneksina i dendrina s proteinskim genskim produkt 9.5 (engl. *protein gene product 9.5*, PGP), biljegom za neurone, u različitim područjima KM i spinalnim ganglijima tijekom razvoja
3. Prikazati ultrastrukturalnu distribuciju koneksina u području spinalnog ganglija u razvoju
4. Prikazati izražaj i distribuciju koneksina i dendrina u KM štakora
5. Ispitati ovisnosti izražaja koneksina i dendrina u KM štakora o kroničnom stresu i kastraciji
6. Prikazati ultrastrukturalnu distribuciju koneksina i dendrina u dorzalnog rogu KM štakora
7. Prikazati preklapanje izražaja dendrina s biljezima primarnih aferentnih nociceptivnih vlakana u dorzalnog rogu i biljezima za neurone u spinalnim ganglijima štakora
8. Prikazati preklapanje izražaja dendrina s biljegom perifernih neuralnih projekcija u srcu i koži

#### **4. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA**

1. Izražaj koneksina i dendrina u različitim područjima KM i ganglijima tijekom razvoja čovjeka upućuje na njihovu važnu ulogu u koordinaciji migracije staničnih masa, diferencijaciji neurona i oblikovanju obrazaca neuronske aktivnosti.
2. Izlaganje kroničnom stresu i kastraciji dovodi do promjene izražaja i distribucije koneksina i dendrina u dorzalnom rogu KM, što ukazuje na njihovu moguću ulogu u modulaciji percepcije boli povezane sa stresom, te bi moglo biti povezano sa spolnim razlikama u pojavnosti neprilagođenih odgovora na bol.



## **5. METODE I MATERIЈALI**

## 5.1 Etička načela

Ovo znanstveno istraživanje sukladno je sa svim primjenjivim svjetskim smjernicama i preporukama, čiji je cilj osigurati pravilno ophođenje i rukovanje s biološkim materijalima (tkivo KM štakora, te ljudskih zametaka). Pokusi sa životinjama provedeni u nastambi za životinje Farmaceutskog fakulteta, Sveučilišta u Sezgedu, s odobrenjem znanstvenog etičkog povjerenstva za pokuse na životinjama u Mađarskoj (broj odobrenja: IV./3796/2015). Istraživanje na ljudskim zametcima odobreno je od strane Etičkog povjerenstva Sveučilišne bolnice Split (klasa: 003-08/16-03/0001, broj odobrenja: 2181-198-03-04-16-0024) i Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u skladu s Helsinškom deklaracijom (108).

## 5.2 Sakupljanje tkiva ljudskih zametaka

Tkivo iz arhive Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju korišteno u istraživanju prikupljeno je s Klinike za ginekologiju i porodništvo, te s Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju Kliničkog Bolničkog Centra Split. Loše očuvan materijal je odbačen. Starost zametaka određena je na temelju vanjskih mjerenja (duljina tjeme-zadak, engl. *crown rump length* - CRL), podataka o datumu posljednje menstruacije, te usporedbom sa stadijima Carnegie instituta (109). Ukupno je prikupljeno 10 normalnih ljudskih zametaka nakon spontanih pobačaja ili ektopičnih tubarih trudnoća od 5. do 10. tjedna starosti (Tablica 1). Uzorci su podijeljeni u 3 grupe ovisno o visini reza (kranijalni dio, trup, kaudalni dio).

**Tablica 1. Ljudski zametci analizirani u ovom radu.**

Starost (tjedni)	CRL (mm)	Carnegie stadij	Broj
5	8	14	1
6	14	16	2
7	21	20	2
8	27	22	1
9	32	-	2
10	36	-	2

## 5.3 Pokusne životinje

U istraživanju je korišten dvadeset jedan Sprague Dawley štakor (Charles River, Wilmington, MA, SAD) ženskog spola i dvadeset jedan štakor muškog spola (slika 7).

Životinje su bile smještene u standardne kaveze, dvije životinje u kavezu. Kroz cijelo vrijeme pokusa, osim tijekom primjene nekih stresora protokola kroničnog stresa, životinje su držane u standardnim laboratorijskim uvjetima, koji su uključivali temperaturu  $21 \pm 2$  ° C, relativnu vlažnost 40-60% te 12/12h ciklus svjetlo/tama, dok su hranu i vodu dobivali *ad libitum*.

#### **5.4 Ovarijektomija i orhidektomija pokusnih životinja**

U dobi od 13 mjeseci štakori su anestezirani 5%-tnim izofluranom (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Queenborough, Velika Britanija). Jedna skupina štakora ženskog spola bila je ovarijektomirana (F-Gx), dok je jedna skupina štakora muškog spola bila orhidektomirana (M-Gx). Preostale životinje bile su lažno operirane, bez odstranjenja spolnih žlijezda (sham-operacija; F-SH i M-SH). Ovarijektomija je izvedena kroz ventralni abdominalni rez za vrijeme opće anestezije izofluranom (110, 111). Postupak orhidektomije izveden je prema protokolu Idrisa (112). Nakon operacije, dostupnost hrane i vode bila je *ad libitum*, te su životinje bile pažljivo praćene kroz iduća 72 sata. Do početka primjene protokola kroničnog stresa trebalo je proći najmanje 4 tjedna jer se tada stres koji su životinje doživjele za vrijeme operacije smatra beznačajnim, kao što je to prethodno opisano u istraživanju Balog i sur. (113).

#### **5.5 Protokol kroničnog stresa**

Dva mjeseca nakon operacije (u dobi od 15 mjeseci), ovarijektomirane, orhidektomirane i lažno operirane životinje podijeljene su u po dvije skupine (slika 7): skupina izložena kroničnom stresu (S) (lažno operirane ženke [F-SH-S] i ovarijektomirane ženke [F-Gx-S] i lažno operirani mužjaci [M-SH-S] i orhidektomirani mužjaci [M-Gx-S]) i skupina izložena lažnim stresorima (kontrolna skupina [C]) (lažno operirane ženke [F-SH-C] i ovarijektomirane ženke [F-Gx-C], te lažno operirani mužjaci [M-SH-C] i orhidektomirani mužjaci [M-Gx-C]).

Protokol kroničnog stresa sastojao se od tri odvojena razdoblja primjene, svako u trajanju od 10 dana (113-115). Tijekom razdoblja primjene protokola kroničnog stresa štakori su svaki dan bili izloženi drugom stresoru kao što je prikazano u Tablici 2. Štakori iz grupa izloženih lažnim stresorima tijekom protokola kroničnog stresa bili su istoj okolini kao i skupine izložene kroničnom stresu, ali bez primjene stresora. Razmak između razdoblja primjene stresora trajao je tri tjedna.

Protokol kroničnog stresa sastojao se od slijedećih stresora (Tablica 2): (i) uskraćivanje hrane tijekom 12 sati u skupinama s kroničnim stresom, bez stresora u lažno-stresiranim skupinama; (ii) test opterećenja glukozom (engl. *glucose tolerance test*, GTT) skupinama izloženim kroničnom stresu, bez stresora u lažno-stresiranim skupinama; (iii) nemogućnost kretanja u uvjetima pothlađivanja, u kojem su skupine izložene kroničnom stresu bile zadržane u metalnim cijevima, u hladnoj sobi na + 4 ° C tijekom razdoblja od 60 minuta, dok su lažno-stresirane skupine bile smještene u cijevi na sobnoj temperaturi tijekom istog razdoblja; (iv) svjetlo tijekom noći, u kojem su svjetla kod skupina izloženih kroničnom stresu bila upaljena od 21:00 do 9:00 sati, kao i kod lažno-stresiranih skupina koje su imale polovicu kaveza natkriveno; (v) buka tijekom noći, pri kojem su se alarmi oglašavali u nepravilnim intervalima od 21:00 do 9:00 sati kod skupina izloženih kroničnom stresu, dok je kod lažno-stresiranih skupina kroz isto vrijeme u pozadini svirala radio glazba; (vi) test plivanja, u kojem je svaki štakor iz skupine izložene kroničnom stresu plivao 3 minute u posudi napunjenoj hladnom vodom, dok je svaki štakor u lažno-stresiranim skupinama smještene u praznu posudu na 3 minute; i (vii) rotacija kaveza, tijekom kojeg se kroz 40 minuta kavez sa štakorima iz skupina izloženih kroničnom stresu okretao na laboratorijskoj tresilici, dok su kavezi lažno-stresiranih skupina za to vrijeme bili na isključenoj laboratorijskoj tresilici.

Nakon završetka protokola kroničnog stresa, štakori su bili eutanazirani izofluranom u dobi od 17 i pol mjeseci. Tkiva kranijalnih prsnih segmenata KM (razina Th1 – Th3) prikupljena su za analizu.

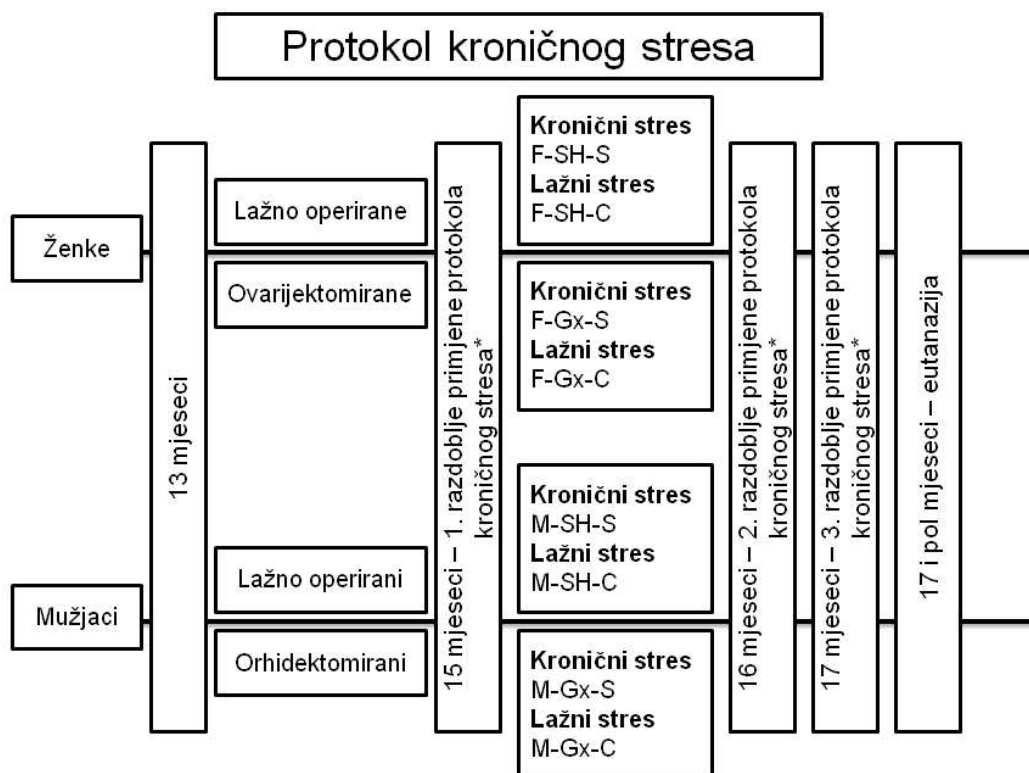
Kako bi se potvrdio učinak izlaganja kroničnom stresu, uz GTT (samo kod skupina štakora izloženih stresu) praćene su i promjene tjelesne težine. Bihevioralno ispitivanje provedeno je samo kod skupina izloženih kroničnom stresu uz pomoć kaveza za testiranje aktivnosti (Ugo Basile, Varese, Italija; broj 47420) kako bi se potvrdio razvoj anksioznog/depresivnog fenotipa. Ispitivanje bihevioralne aktivnosti provedeno je jedan dan prije primjene prvog GTT-a u prvom razdoblju protokola kroničnog stresa (kontrola, mjerenje početne vrijednosti), te jedan dan nakon primjene posljednjeg stresora u 1., 2. i 3. razdoblju protokola kroničnog stresa (kronični stres i produženi kronični stres). Štakori su bili pojedinačno smješteni u kavez za testiranje aktivnosti, gdje im je bilo dopušteno slobodno kretanje. Broj kretnji u okomitom i vodoravnom smjeru je zabilježen nakon 1 i 4 minute. Kako bi se smanjila smetnja mirisom, uređaj je između testiranja životinja bio očišćen 70% etanolom.

**Tablica 2. Detaljni protokol kroničnog stresa kroz tri razdoblja.**

<b>1. RAZDOBLJE PROTOKOLA KRONIČNOG STRESA</b>	
<b>Dan</b>	<b>Stresori</b>
1	Uskraćivanje hrane (tijekom 12 sati)
2	Test opterećenja glukozom (GTT)
3	Nemogućnost kretanja u uvjetima pothlađivanja (+4°C, 60 min) + uskraćivanje hrane
4	GTT
5	Svjetlo tijekom noći (21:00 - 09:00)
6	Rotacija kaveza (40 min)
7	Test plivanja
8	Buka tijekom noći (21:00 - 09:00)
9	Nemogućnost kretanja u uvjetima pothlađivanja (+4°C, 60 min) + uskraćivanje hrane
10	GTT

<b>2. I 3. RAZDOBLJE PROTOKOLA KRONIČNOG STRESA</b>	
<b>Dan</b>	<b>Stresori</b>
1	Rotacija kaveza (40 min)
2	Test plivanja
3	Nemogućnost kretanja u uvjetima pothlađivanja (+4°C, 60 min) + uskraćivanje hrane
4	Buka tijekom noći (21:00 - 09:00)
5	Svjetlo tijekom noći (21:00 - 09:00)
6	Rotacija kaveza (40 min)
7	Test plivanja
8	Buka tijekom noći (21:00 - 09:00)
9	Nemogućnost kretanja u uvjetima pothlađivanja (+4°C, 60 min) + uskraćivanje hrane
10	GTT



**Slika 7. Prikaz protokola kroničnog stresa.**

\*Razdoblja tijekom kojih su životinje bile izložene različitim stresorima (ili lažnim stresorima) ovisno o danu primjene (Tablica 2) kroz 10 uzastopnih dana nakon kojih je slijedilo razdoblje od 3 tjedna bez stresora.

**Kratice:** **F-SH-C** – lažno operirane ženke izložene lažnim stresorima; **F-SH-S** – lažno operirane ženke izložene stresu; **F-Gx-C** – ovarijsktomirane ženke izložene lažnim stresorima; **F-Gx-S** – ovarijsktomirane ženke izložene stresu; **M-SH-C** – lažno operirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-SH-S** – lažno operirani mužjaci izloženi stresu; **M-Gx-C** – orhidektomirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-Gx-S** – orhidektomirani mužjaci izloženi stresu.

## 5.6 Imunohistokemijsko bojenje

### 5.6.1 Priprema tkiva

Uzorci tkiva su fiksirani u 4% paraformaldehidu u fosfatnom puferu (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) i dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola. Nakon što su dehidrirani uzorci uklopljeni u parafin, izrezani su na debljinu od 5 $\mu$ m i postavljeni na predmetna stakalca. Za imunohistokemijsko bojenje uzeta su po dva uzorka iste životinje

međusobno udaljena minimalno 10 rezova, odnosno 50  $\mu\text{m}$ . Postupak imunohistokemijskog bojenja započet je deparafinizacijom u ksilolu i rehidracijom u vodi (116-118). Potom je uslijedilo kuhanje u puferu natrijevog citrata (pH 6,0) tijekom 30 minuta u kuhalu na paru, te hlađenje na sobnu temperaturu.

Nakon ispiranja u PBS-u, stakalca su i inkubirana u blokirajućem puferu (ab64226, Abcam, Cambridge, UK) kroz period od 30 minuta. Stakalca su zatim prekrivena primarnim protutijelom, te su preko noći inkubirana u vlažnoj komori (Tablica 3). Idući dan, stakalca su isprana u PBS-u i prekrivena sekundarnim protutijelom kroz 1 sat. Nakon ispiranja, jezgre su obojene otopinom 4',6-diamidino-2-fenilindola (engl. 4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) koja se veže za DNK, stakalca su isprana destiliranom vodom, uklopljena u nosivi medij (Immu-Mount, Shandon, Pittsburgh, PA, SAD) i prekrivena pokrovnim stakalcima. Negativnu kontrolu dobili smo izuzimanjem primarnog protutijela tijekom imunohistokemijskog bojenja.

**Tablica 3. Popis korištenih konjugata te primarnih i sekundarnih protutijela za imunohistokemijsko bojenje.**

	Protutijelo	Tvornički naziv	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Kuniće protutijelo za dendrin	Anti-dendrin	AB15299-I	kunić	1:100	EMD Millipore, Temecula, SAD
	Mišje protutijelo za neurofilament 200	Anti-neurofilament 200kD (NF200)	MAB5266	miš	1:100	
	Kuniće protutijelo za koneksin 37/GJA4	Anti-Connexin 37/GJA4/Cx37	ab181701	kunić	1:100	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Kuniće protutijelo za koneksin 45/GJA7	Anti-Connexin 45/GJA7/Cx45	ab135474		1:100	
	Kuniće protutijelo za koneksin 40/GJA5	Anti-Connexin 40/GJA5/Cx40	ab213688		1:100	

	Kozje protutijelo za peptid povezan s genom za kalcitonin	Anti-calcitonin gene-related peptide (CGRP)	ab36001		1:1000	
	Kozje protutijelo za koneksin 43/GJA1	Anti-Connexin 43/GJA1/Cx43	ab87645	koza	1:300	
	Kozje protutijelo za Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)	Anti-GFAP	ab53554		1:100	
	Mišje protutijelo za Glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP)	Anti-GFAP (2E1)	sc-33673	miš	1:50	Santa Cruz, CA, SAD
	Mišje protutijelo za proteinski genski produkt 9.5	Anti-PGP9.5 Monoclonal Antibody (BH7)	480012	miš	1:500	Invitrogen, Camarillo CA, SAD
	$\alpha$ -d-galaktozil-specifični izolektin B4 (IB4) konjugiran s FITC	FITC-conjugated $\alpha$ -d-galactosyl-specific isolectin B4 (IB4)	ALX-650-001F		1:200	Enzo, Farmingdale, NY, SAD
	Magareće protutijelo za kuniće IgG konjugirano s AlexaFluor®488	AlexaFluor®488 Donkey Anti-Rabbit IgG (H&L)	711-545-152	magarac	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West



Sekundarna protutijela	Magareće protutijelo za kozje IgG konjugirano s AlexaFluor®488	AlexaFluor®488 Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	705-545-003			Grove, PA, SAD
	Magareće protutijelo za kozje IgG konjugirano s rodaminom	Rhodamine Red™-X (RRX) AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	705-295-003			
	Magareće protutijelo za mišje IgG konjugirano s rodaminom	Rhodamine Red™-X (RRX) Donkey Anti-Mouse IgG	715-295-151			
	Magareće protutijelo za kuniće IgG konjugirano s rodaminom	Rhodamine (TRITC) AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L)	711-025-152			

### 5.6.2 Prikupljanje podataka i kvantifikacija

Preparati su promatrani fluorescencijskim mikroskopom (Olympus BX61, Tokio, Japan), te su fotografirani korištenjem digitalne kamere DP71 (Olympus, Tokyo, Japan) uz pomoć Olympus Cella Software (Olympus Life Sciences Microscopy).

Mikrofotografije su slikane s povećanjem objektiva  $\times 4$  (kako bi se zabilježio cijeli segment KM);  $\times 20$  (samo dorzalni rog KM);  $\times 40$  (za mikrofotografije korištene u analizi) i  $\times 100$  (za detalje). Mikrofotografije su obrađene i analizirane u programu ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, SAD). Prvo je uklonjeno propuštanje fluorescencijskog signala oduzimanjem crvenog signala od mikrofotografije uslikane zelenim filterom, nakon čega je mikrofotografija provučena kroz filter medijana radijusa 5,0 piksela. Svaka mikrofotografija na kraju je prilagođena metodi praga segmentacije slike (metoda algoritma triangle), te analizirana mjerenjem postotka površine pod fluorescencijom.

Nakon gore navedene obrade slike provedena je analiza kolokalizacije proteina na preparatima u programu Adobe Photoshop (Adobe Inc., San Jose, California, SAD). Preklapanjem obrađenih mikrofotografija različitih fluorescencijskih signala izračunat je postotak površine pod fluorescencijom za svaki protein pojedinačno i za mjesta gdje se oni preklapaju.

### **5.7 Denaturirajuća elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE) i Western blot**

Homogenizacija smrznutog tkiva KM i mozga dva mjeseca starih Sprague Dawley štakora, izvedena je s Miniliys (Bertin Technologies SAS, France) u ledeno hladnom RIPA puferu (50 mM Tris, 1 mM EDTA, 150 mM NaOH, 1% Triton, 0.5% DOC, 0.1% SDS pH 7,4) uz inhibitore proteaza i fosfataza (1:1000 Aprotinin, 1:1000 Na-Vanadate, 1:200 PMSF, 1:1000 Leupeptin). Homogenizirana tkiva bila su inkubirana 2 sata na +4°C uz stalno miješanje, nakon čega je slijedilo centrifugiranje 20 minuta na 12000 o/min, +4°C. Nakon toga, supernatanti s proteinskim lizatom sakupljeni su u nove epruvete, te su podvrgnuti standardnim protokolima za elektroforezu na natrij dodecil-sulfat-poliakrilamidnom gelu i imunobloting (119). Proteini su potom preneseni na nitroceluloznu membranu (GE Healthcare, Chicago, Illinois, SAD) koja je inkubirana protutijelom za dendrin (1: 500, AB15299-I, EMD Millipore, Temecula, SAD) i  $\beta$ -aktin (1: 5000, A5316, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Detekcija vezanih protutijela od interesa izvodila se upotrebom HRP-konjugiranih sekundarnih protutijela (1: 6000, P0448, DakoCytomation, Carpinteria, CA, SAD) i ECL Plusom (Termo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, SAD).

### **5.8 Priprema tkiva za elektronsku mikroskopiju**

Tkiva za elektronsku mikroskopiju pripremljena su korištenjem imunogold imunohistokemijskog protokola (120-122). Uzorci su fiksirani u 4%-tnom paraformaldehidu u PBS-u, potom isprani uz pomoć PBS-a, te izrezani na vibratomu (Vibratome Series 1000, Pelco 101, Ted Pella, Inc., Redding, CA, SAD) na debljinu od 20  $\mu$ m. Nakon ispiranja u PBS-u, rezovi su prvo permeabilizirani u 50%-tnom etanolu, a zatim inkubirani s primarnom protutijelom na +4° C kroz 48 sati (Tablica 4). Nakon inkubacije uzorci su isprani u PBS-u, te su stavljani na inkubaciju preko noći sa sekundarnim protutijelom konjugiranim sa zlatom. Nakon ispiranja u PBS-u, uzorci su fiksirani u 1%-tnom osmij tetroksidu kroz 1 sat, dehidrirani u etanolu i uklopljeni u DURCUPAN smolu (Sigma-Aldrich Inc. St. Louis, Missouri, USA). Uzorci su promatrani transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM; JEM JEOL 1400, Japan).

**Tablica 4. Popis korištenih primarnih i sekundarnih protutijela za elektronsku mikroskopiju.**

	Protutijelo	Tvornički naziv	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna protutijela	Kunićje protutijelo za dendrin	Anti-Dendrin	AB15299-I	kunić	1:100	EMD Millipore, Temecula, SAD
	Kunićje protutijelo za koneksin 37/GJA4	Anti-Connexin 37/GJA4/Cx37	ab181701	kunić	1:100	Abcam, Cambridge, Velika Britanija
	Kunićje protutijelo za koneksin 40/GJA5	Anti-Connexin 40/GJA5/Cx40	ab213688		1:100	
	Kozje protutijelo za koneksin 43/GJA1	Anti-Connexin 43/GJA1/Cx43	ab87645	koza	1:300	
Sekundarna protutijela	Magareće protutijelo za kunićje IgG konjugirano sa zlatom	Gold-Conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG	711-205-152	magarac	1:1000	
	Magareće protutijelo za kozje IgG konjuigirano sa zlatom	Gold-Conjugated Donkey Anti-Goat IgG	705-185-147			

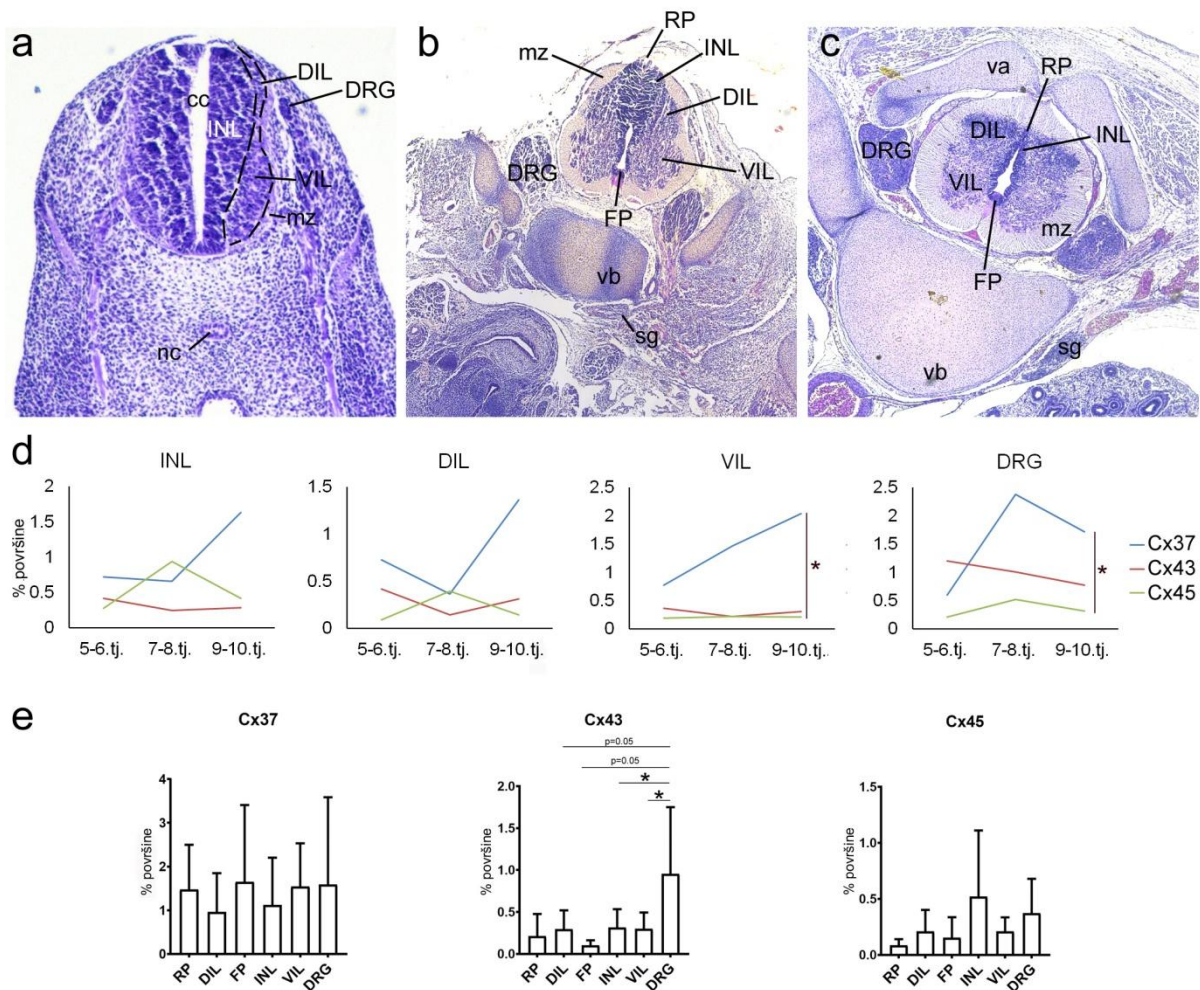
## 5.9 Statistički postupci

Meadova jednadžba resursa korištena je za izračun veličine uzorka kojem je dobiveno da minimalna veličina pokusnih skupina iznosi  $n=3$ . PAST 3.22 (Øyvind Hammer, Prirodoslovni muzej, Sveučilište u Oslu, Norveška) i GraphPad Prism 8 program (8.0.1, GraphPad Software, San Diego, California SAD) korišteni su za statističku analizu. Upotrebom Anderson-Darling i Leveneovih testova ispitana je normalnost i homogenost podataka. Da bi se utvrdile razlike među skupinama, korištena je ANOVA s Welch-ovom korekcijom za nejednake varijance, gdje je razlika između pojedinih skupina ispitana je T-testom s Welch-ovom korekcijom za nejednake varijance, te trosmjerna ANOVA s Welch-ovom korekcijom za nejednake varijance. Za usporedbu promjene izražaja pojedinog koneksina tijekom razvojnih stadija KM koristili smo Kruskal-Wallis test, dok za utvrđivanje promjena izražaja između različitih koneksina korišten je Freidmanov test. Statistički značajnom smatrana je razlika pri  $P<0,05$ . Nismo koristili korekciju višestrukih usporedbi jer su sve usporedbe unaprijed planirane.

## **6. REZULTATI**

## 6.1 Promjene izražaja koneksina 37, 43 i 45 u KM tijekom razvoja ljudskog zametka

Izražaj Cx37, Cx43 i Cx45 istražili smo u različitim dijelovima KM tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja ljudskog zametka. Područja od interesa su: ventrikularni sloj (engl. *inner layer*, INL); dorzalni dio sloja plašta (engl. *dorsal part of the intermediate layer*, DIL), odnosno alarne ploče (AP); ventralni dio sloja plašta (engl. *ventral part of the intermediate layer*, VIL), odnosno bazalne ploče (BP); krovne (engl. *roof plate*, RP) i podne (engl. *floor plate*, FP) ploče i DRG (Slika 8).



**Slika 8.** Prikaz tkiva kraljeznične moždine i spinalnih ganglija tijekom razvoja ljudskog zametka obojenih hemalaun-eozinom, te prikaz statističke analize izražaja koneksina u područjima od interesa. Torakalni rezovi kraljeznične moždine ljudskog zametka (a) 5 tjedana starosti, (b) 6.5 tjedana starosti i (c) 10 tjedana starosti. (d) Prikaz statističke analize izražaja koneksina u različitim područjima kraljeznične moždine i u spinalnom gangliju tijekom razvoja. (e) Prikaz statističke analize izražaja Cx37, Cx43 i Cx45 u različitim područjima.

područjima kralježnične moždine. \*  $P < 0,05$  značajne razlike između naznačenih koneksina/područja (povećanje objektiva – 10x; mjerna ljestvica: 80  $\mu\text{m}$ ).

**Kratice:** **DRG** – spinalni ganglij; **INL** – ventrikularni sloj; **DIL** – dorzalni dio sloja plašta; **VIL** – ventralni dio sloja plašta; **mz** – rubni sloj (engl. *marginal zone*); **cc** - središnji kanal (engl. *central canal*); **RP** – krovna ploča; **FP** – podna ploča; **nc** – notokord (engl. *notochord*); **sg** – simpatički ganglij; **vb** – trup kralješka (engl. *vertebral body*); **va** – luk kralješka (engl. *vertebral arch*).

Tijekom ranog ljudskog razvoja u svim područjima KM bio je vidljiv izražaj istraživanih koneksina – Cx37, Cx43 i Cx45 (Slika 9). Uz to, pronađen je i specifičan obrazac izražaja koneksina u moždanim ovojnica (Slika 9). Imunoreaktivnost Cx37 bila je prisutna u sva tri meningealna sloja, mekoj opni (engl. *pia mater*, PM), paučinastoj opni (engl. *arahnoida*, AM) i tvrdoj opni (engl. *dura mater*, DM). Međutim, najjači signal imunofluorescencije Cx37 bio je vidljiv u AM, a najslabiji u PM. Za razliku od Cx37, imunofluorescencijski signal Cx43 nije bio prisutan u PM, dok je u AM i DM bio vidljiv, s najjačom imunoreaktivnošću u AM. S druge strane, imunoreaktivnost Cx45 u AM i PM bila je slabo prisutna, te odsutna u DM.

Izražaj Cx37 u većini analiziranih struktura bio je jači od drugih istraživanih koneksina. U VIL imunoreaktivnost Cx37 bila je značajno viša od izražaja Cx43 ( $P=0,0087$ ) i Cx45 ( $P=0,032$ ) (Slika 8). Iako je naizgled bilo više imunofluorescencijskog signala Cx45, nije pronađena statistički značajna razlika između izražaja Cx45 i Cx43.

Upoređujući istraživana područja KM nije bilo značajne razlike u izražaju Cx37, kao ni u usporedbi tih područja s njegovim izražajem u DRG. Međutim, izražaj Cx43 bio je značajno veći u DRG u usporedbi s INL ( $P=0,0212$ ) i VIL ( $P=0,0237$ ), dok je razlika između izražaja u DRG u odnosu na DIL (kada je bio prisutan) bila  $P=0,0521$ , te DRG u odnosu na FP  $P=0,0505$ . Izražaj Cx45 nije se značajno razlikovao između istraživanih područja KM, kao ni u odnosu na DRG.

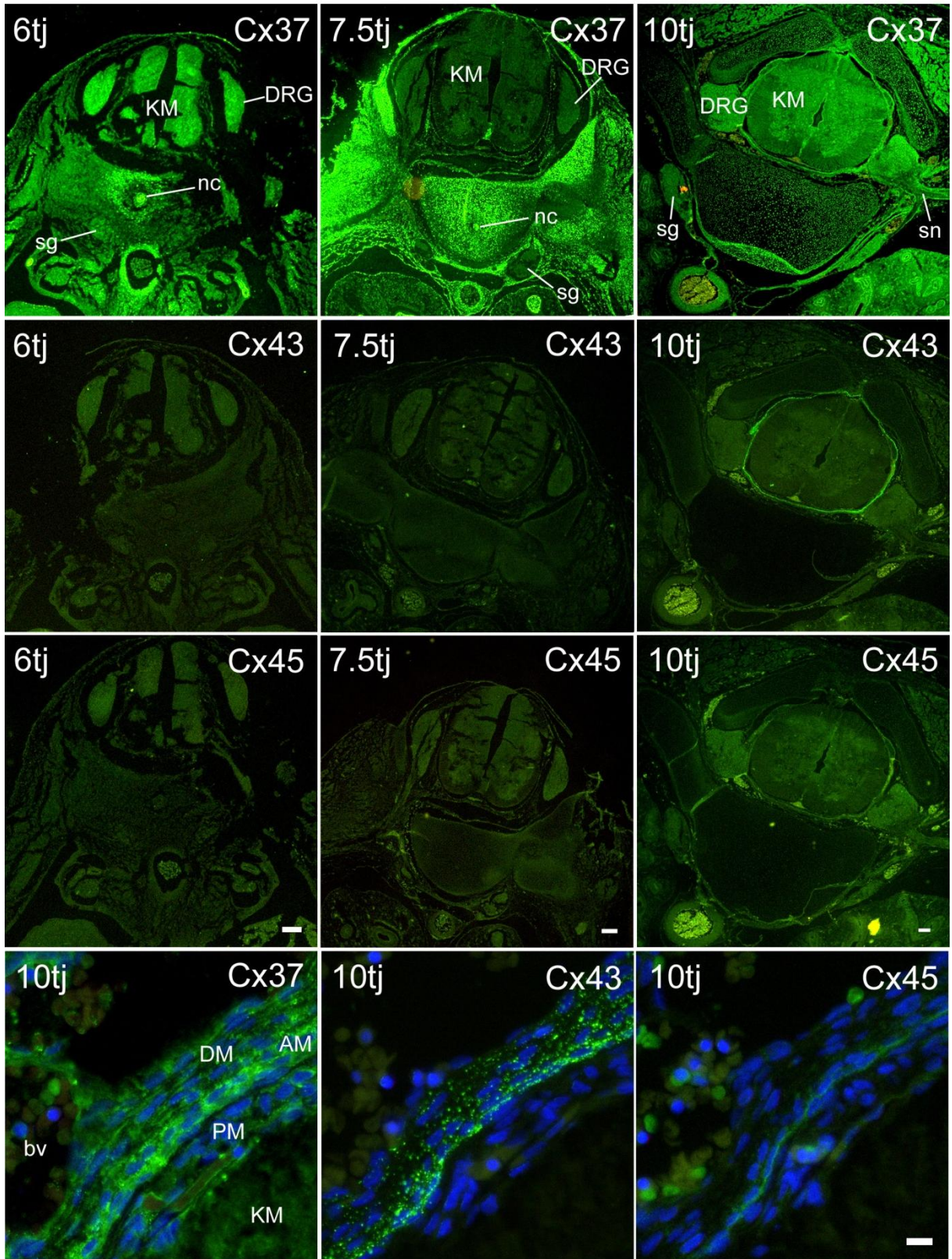
Također, istražili smo kako se izražaj koneksina mijenjao u odnosu na embrionalna/rana fetalna razdoblja, odnosno između 5 – 6., 7 – 8. i 9 – 10. razvojnog tjedna. Značajne razlike u izražaju Cx37, Cx43 ili Cx45 između ispitivanih razdoblja nisu pronađene ni u jednom od područja od interesa. Međutim, primijećena je tendencija porasta izražaja Cx37, što je rezultiralo značajno većim izražajem Cx37 tijekom 9 – 10. razvojnog tjedna u usporedbi s Cx45 u VIL ( $P=0,0417$ ) i DRG ( $P=0,0133$ ) (Slika 8).

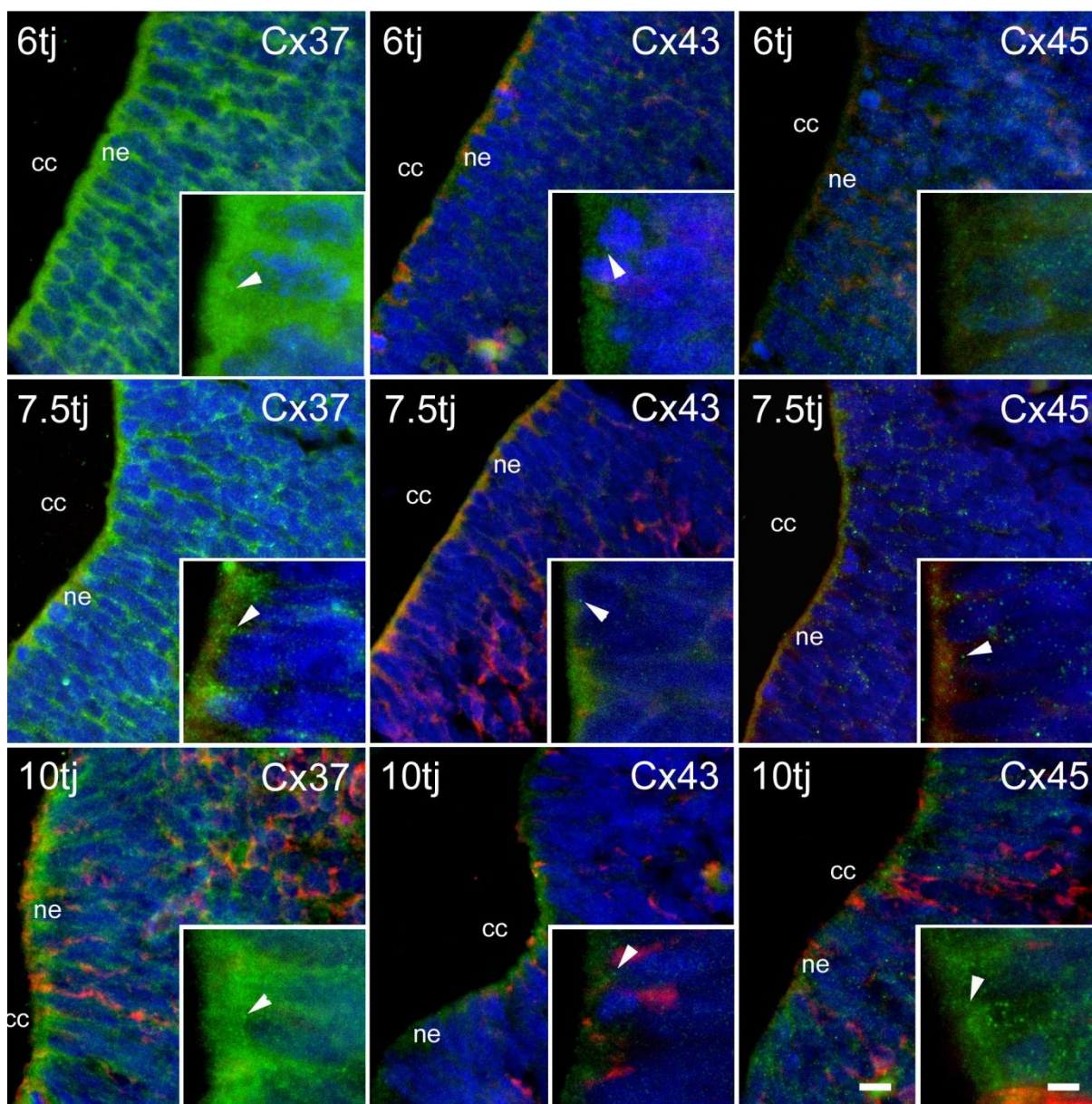
Jaka imunoreaktivnost koneksina od interesa zapažena je u INL području što je vidljivo na slici 10. Također, pronađena je kolokalizacija svih koneksina s PGP 9.5, biljekom za neurone, u sloju plašta (Slika 11), kao i u DRG (Slika 12). Međutim, izražaj koneksina nije bio ograničen samo na PGP 9.5 imunoreaktivne neurone, već je bio prisutan i u PGP 9.5 negativnim stanicama, uključujući neuroepitel INL područja (Slika 10), te stanice koje okružuju neurone u DRG – buduće satelitske stanice (Slika 12). Uz to, sva tri koneksina pronađena su i u ganglijima simpatičkog stabla (lat. *truncus sympathicus*) u razvoju (Slika 13) sa sličnim izražajem i kolokalizacijom s PGP 9.5, kao što je opisano i u području DRG.



**Slika 9. Izražaj koneksina 37, 43 i 45 u kralježničnoj moždini, ganglijima i moždanim ovojnicama ljudskih zametaka.** Torakalni segmenti kralježnične moždine ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Najjači imunofluorescencijski signal vidljiv je bojenjem sa Cx37 (povećanje objektiva – 4x; mjerna ljestvica: 200 µm). Uz neuronska tkiva, značajna imunoreaktivnost koneksina primijećena je i u moždanim ovojnicama (najniži red slika) (povećanje objektiva – 40x; mjerna ljestvica: 20 µm).

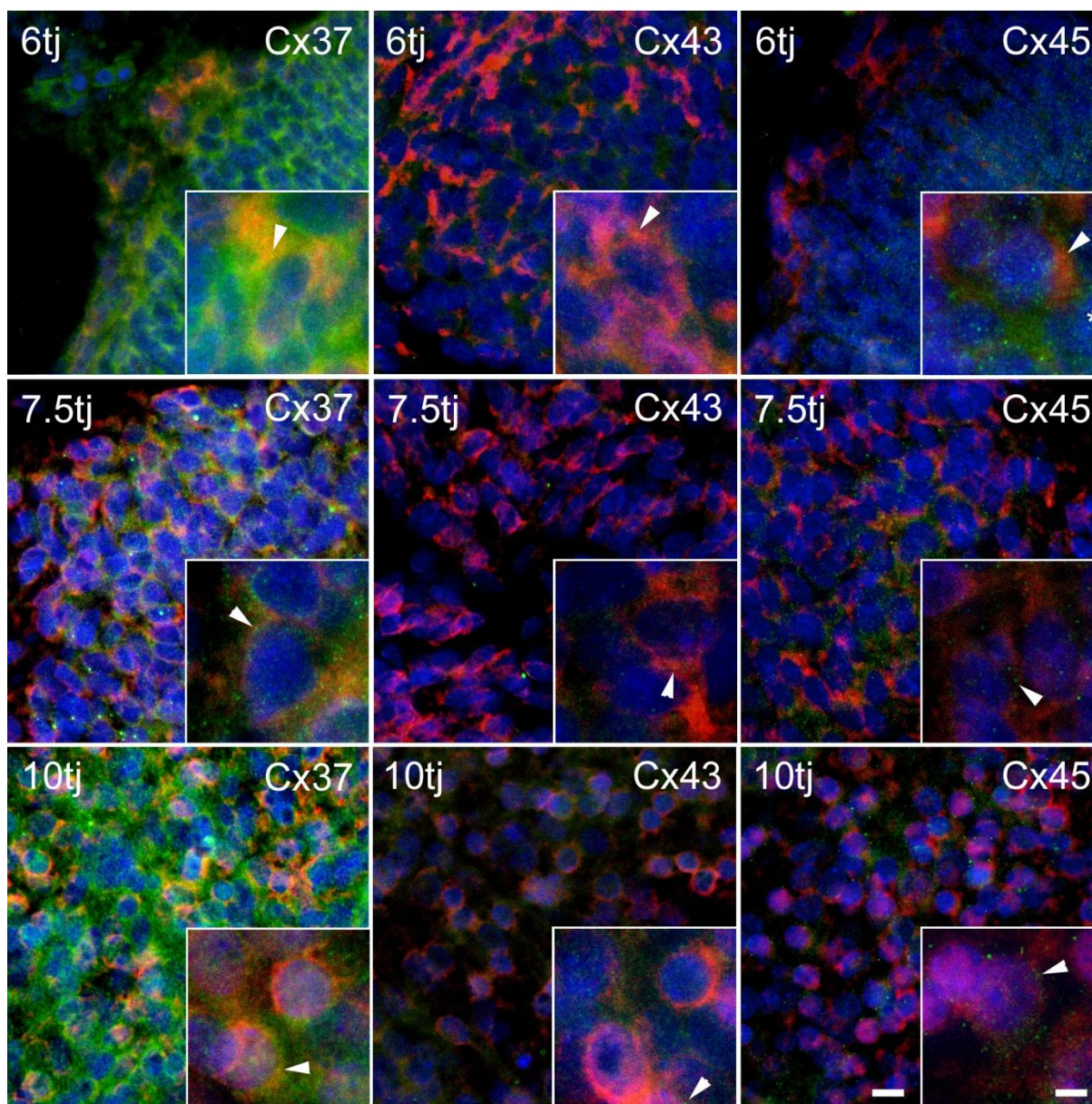
**Kratice:** **KM** – kralježnična moždina; **DRG** – spinalni ganglij (engl. *dorsal root ganglia*); **sg** - simpatički ganglij; **sn** – spinalni živac (engl. *spinal nerve*); **nc** – notokord (engl. *notochord*), **DM** – tvrda opna (engl. *dura mater*); **AM** – paučinasta opna (engl. *arachnoidea mater*); **PM** – meka opna (engl. *pia mater*); **bv** - krvna žila (engl. *blood vessel*)



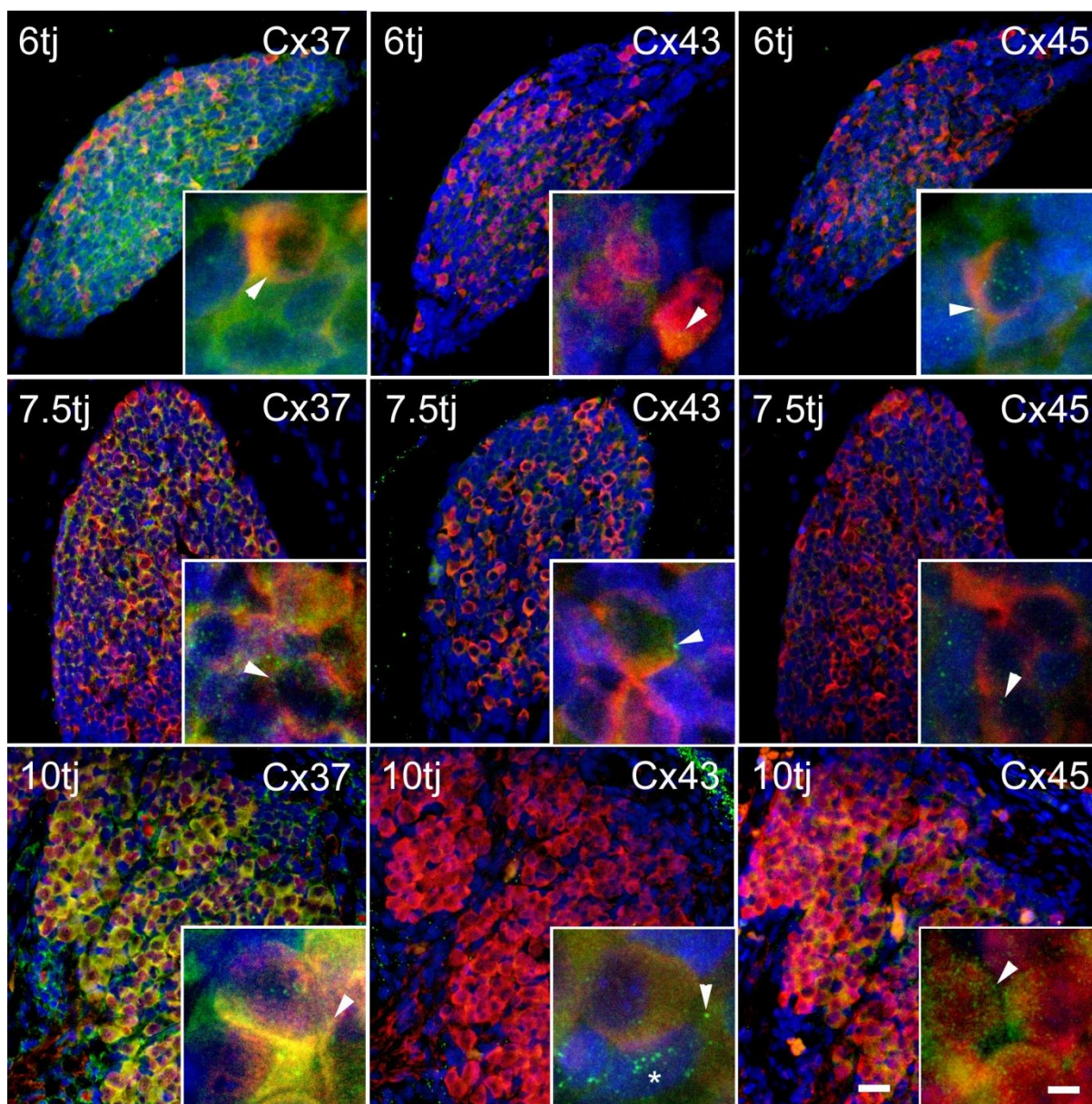


**Slika 10. Izražaj koneksina 37, 43 i 45 u ventrikularnom sloju (INL) kralježnične moždine ljudskih zametaka.** Torakalni segmenti kralježnične moždine ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno), PGP 9.5 (crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Umetcima su prikazani detalji sloja neuroepitela u dodiru sa središnjim kanalom. Vrhovi strelica upućuju na zrnati uzorak imunoreaktivnosti koneksina priustan u citoplazmi neuroepitelnih stanica (povećanje objektiva - 40x, mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m; umetci - 100x, mjerna ljestvica = 8  $\mu$ m).

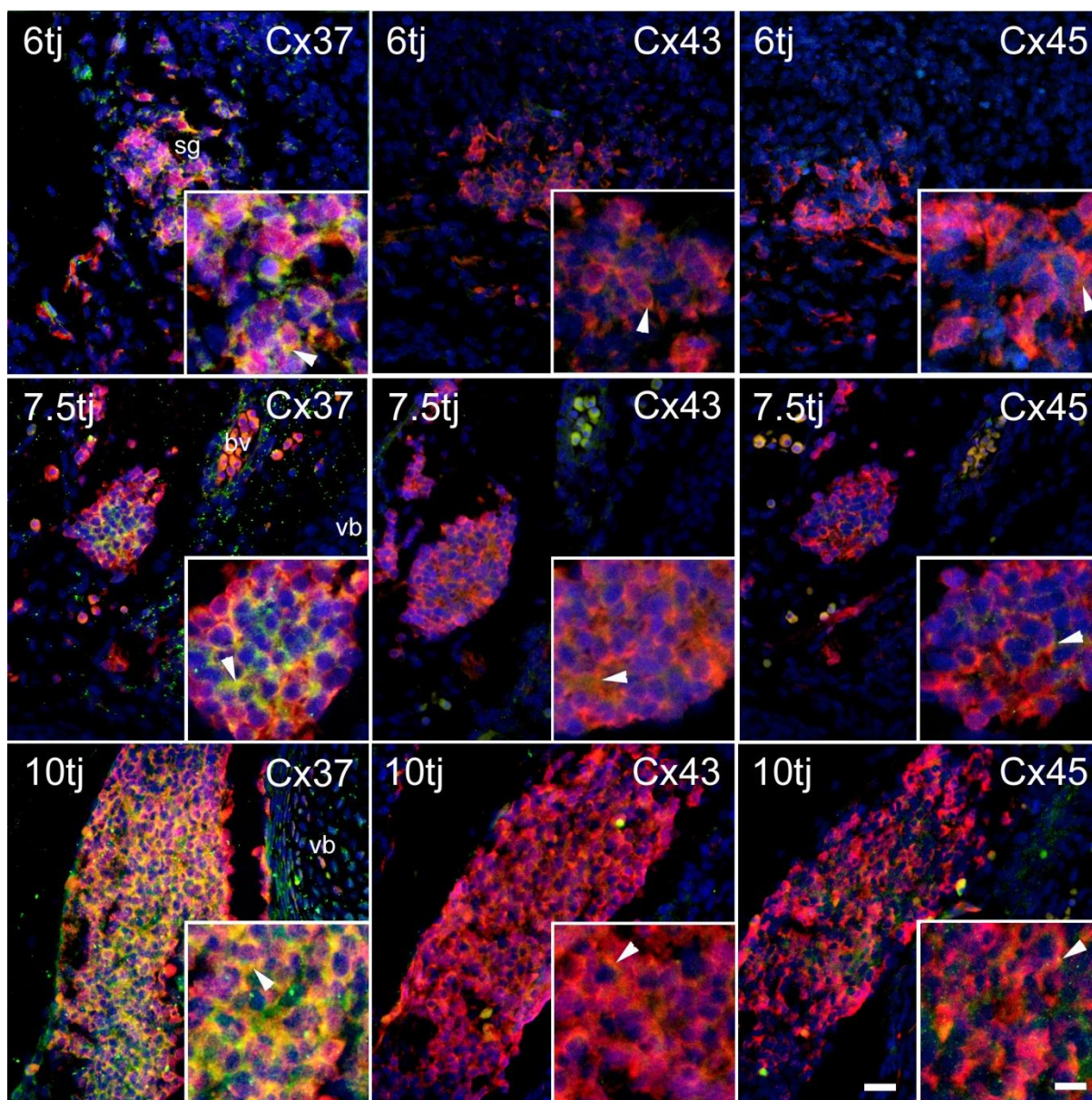
**Kratice:** ne – neuroepitel, cc – središnji kanal (engl. *central canal*)



**Slika 11. Izražaj koneksina 37, 43 i 45 u ventralnom dijelu sloja plašta (VIL) kralježnične moždine ljudskih zametaka.** Torakalni segmenti kralježnične moždine ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno), PGP 9.5 (crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Na mikrofotografijama predstavljen je VIL, koji odgovara bazalnim pločama. Umetcima su prikazani detalji. Vrhovi strelica upućuju na žuti zrnati uzorak kolokalizacije koneksina s PGP 9.5 u citoplazmi motornih neurona u razvoju. Zvezdica - ne-neuronska stanica, vjerojatno glija, sa Cx45 imunoreaktivnošću (povećanje objektiva - 40x, mjerna ljestvica = 20  $\mu\text{m}$ ; umetci - 100x, mjerna ljestvica = 8  $\mu\text{m}$ ).



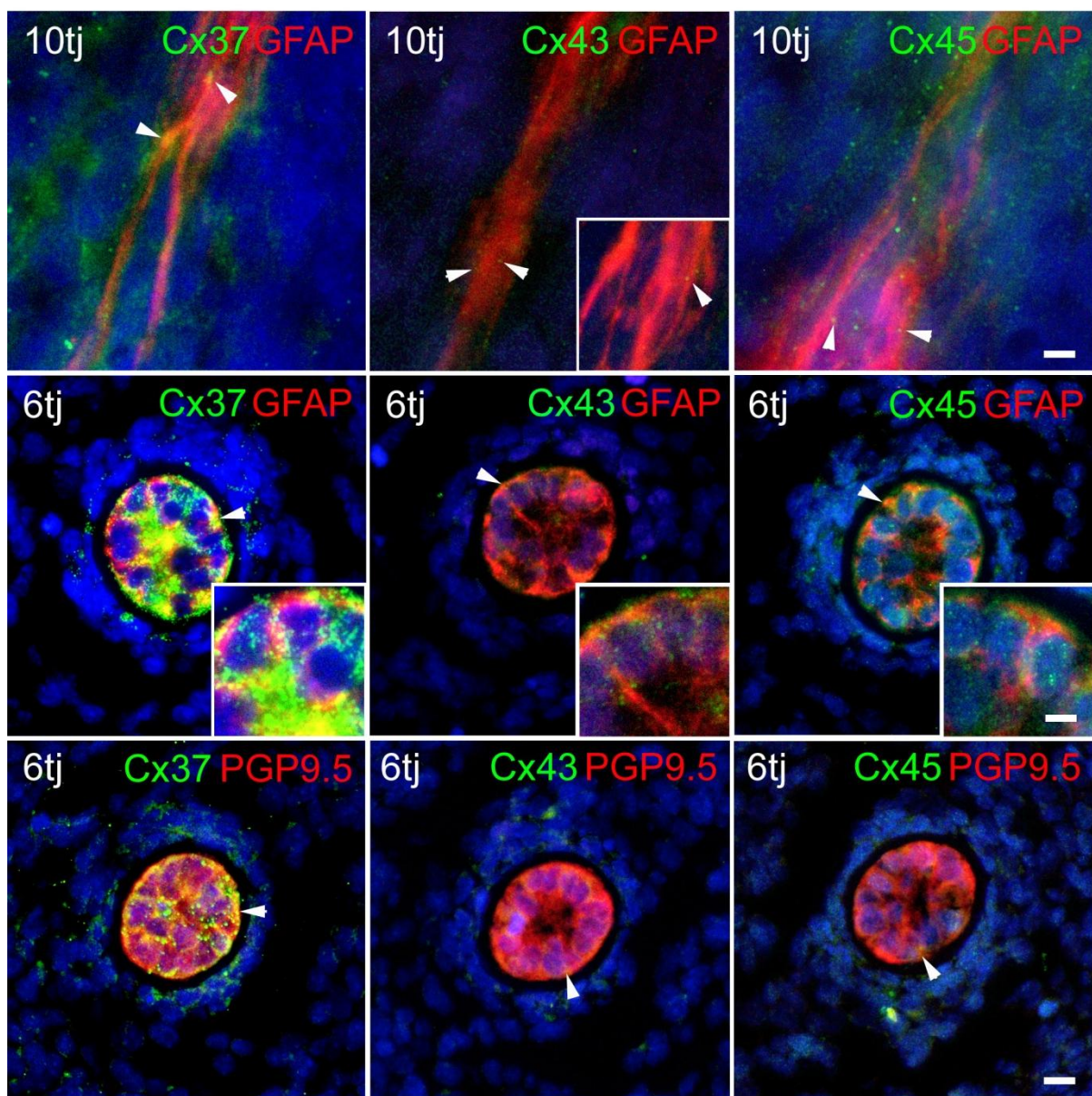
**Slika 12. Izražaj koneksina 37, 43 i 45 u spinalnim ganglijima ljudskih zametaka.** Spinalni ganglij ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno), PGP 9.5 (crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Umetcima su prikazani detalji. Vrhovi strelica upućuju na žuti zrnati uzorak kolokalizacije koneksina s PGP 9.5 u citoplazmi primarnih osjetnih neurona u razvoju. Zvezdica - ne-neuronska stanica, vjerojatno glija, s Cx43 imunoreaktivnošću (povećanje objektiva - 10x, mjerna ljestvica = 80  $\mu\text{m}$ ; umetci - 100x, mjerna ljestvica = 8  $\mu\text{m}$ ).



**Slika 13. Izražaj koneksina 37, 43 i 45 u simpatičkim ganglijima ljudskih zametaka.** Simpatički ganglij (paravertebralni) ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno), PGP 9.5 (crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Umetcima su prikazani detalji. Vrhovi strelica upućuju na žuti zrnati uzorak kolokalizacije koneksina s PGP 9.5 u citoplazmi simpatičkih neurona u razvoju (povećanje objektiva - 10x, mjerna ljestvica = 80  $\mu$ m; umetci - 40x, mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m).

**Kratica:** vb – trup kralješka (engl. *vertebral body*)

Pored kolokalizacije s PGP 9.5, pronašli smo i kolokalizaciju Cx37, Cx43 i Cx45 s glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) u području RP ljudskog fetusa starosti 10 tjedana (Slika 14). Na kraju, snažan izražaj Cx37, Cx43 i Cx45 bio je prisutan i u stanicama notokorda, gdje je imunoreaktivnost Cx37 bila najjača, a Cx43 najslabija (Slika 14). Također, važno je spomenuti da je imunoreaktivnost istraženih koneksina u notokordu bila znatno snažnija u usporedbi s njihovom imunoreaktivnošću u istraženim neuralnim tkivima. Izražaj koneksina u notokordu značajno je kolokalizirao s jakim izražajem GFAP-a, kao i s još jačom imunoreaktivnošću PGP 9.5.

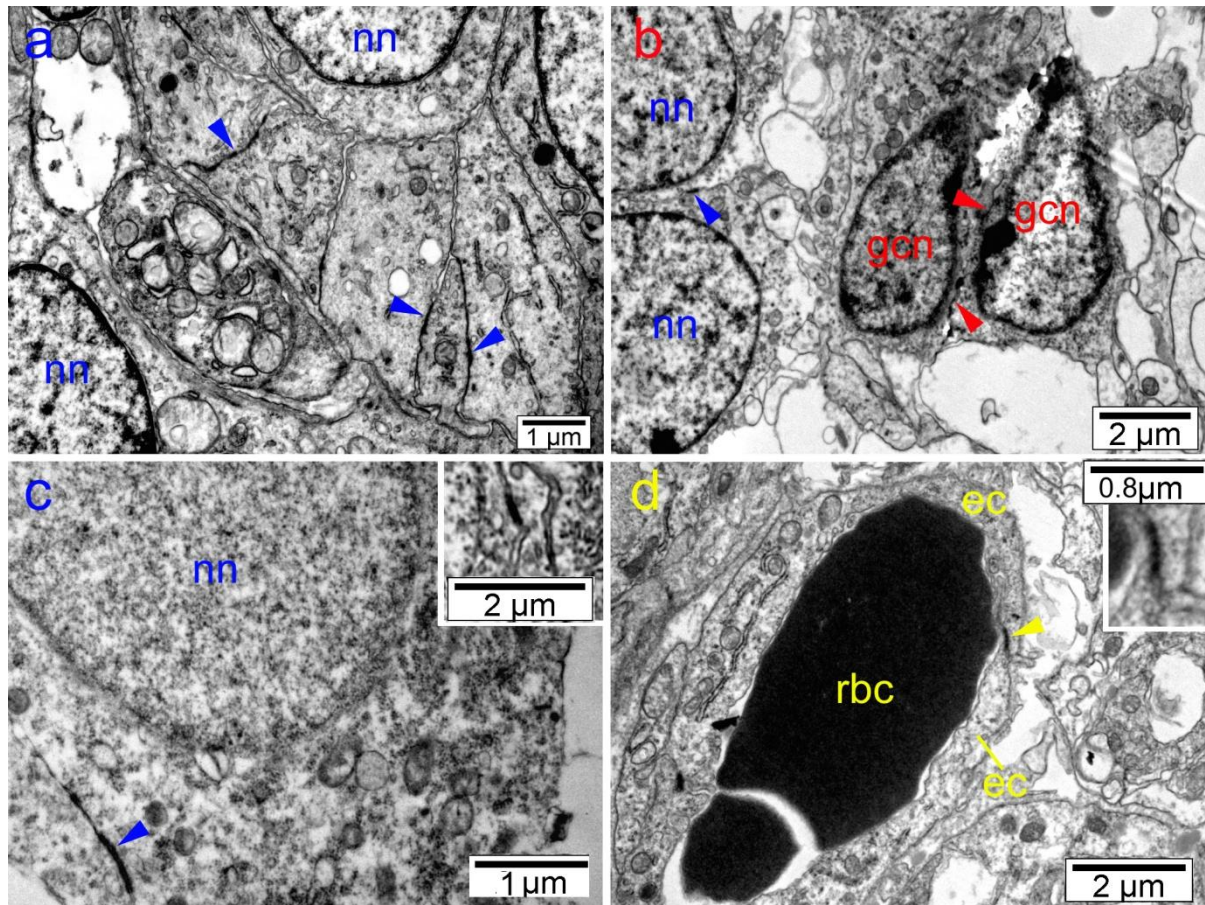


**Slika 14. Izražaj i kolokalizacija koneksina 37, 43 i 45 u RP i notokordu ljudskih zametaka.** Kolokalizacija Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno) s GFAP (crveno) pronađena je u RP ljudskog zametka starog 10 tjedana (prvi red). Notokord ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojen sa Cx37, Cx43 i Cx45 (zeleno), GFAP (drugi red, crveno) i PGP 9.5 (treći red, crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Umetcima su prikazani detalji. Vrhovi strelica upućuju na žuti zrnati uzorak kolokalizacije koneksina s GFAP ili PGP 9.5 u citoplazmi stanica notokorda u razvoju (povećanje objektiva - 100x - prvi red, mjerna ljestvica = 8  $\mu$ m; 40x - slike u drugom i trećem redu, mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m; umetci - 100x, mjerna ljestvica = 8  $\mu$ m).



### 6.1.1 Ultrastrukturna karakterizacija pukotinskih spojišta u spinalnom gangliju ljudskog zametka

TEM je otkrila prisutnost brojnih pukotinskih spojišta na membranama neuralnih stanica, te između njihovih izdanaka. Također, pukotinska spojišta pronađena su na membranama glija stanica (Slika 15).

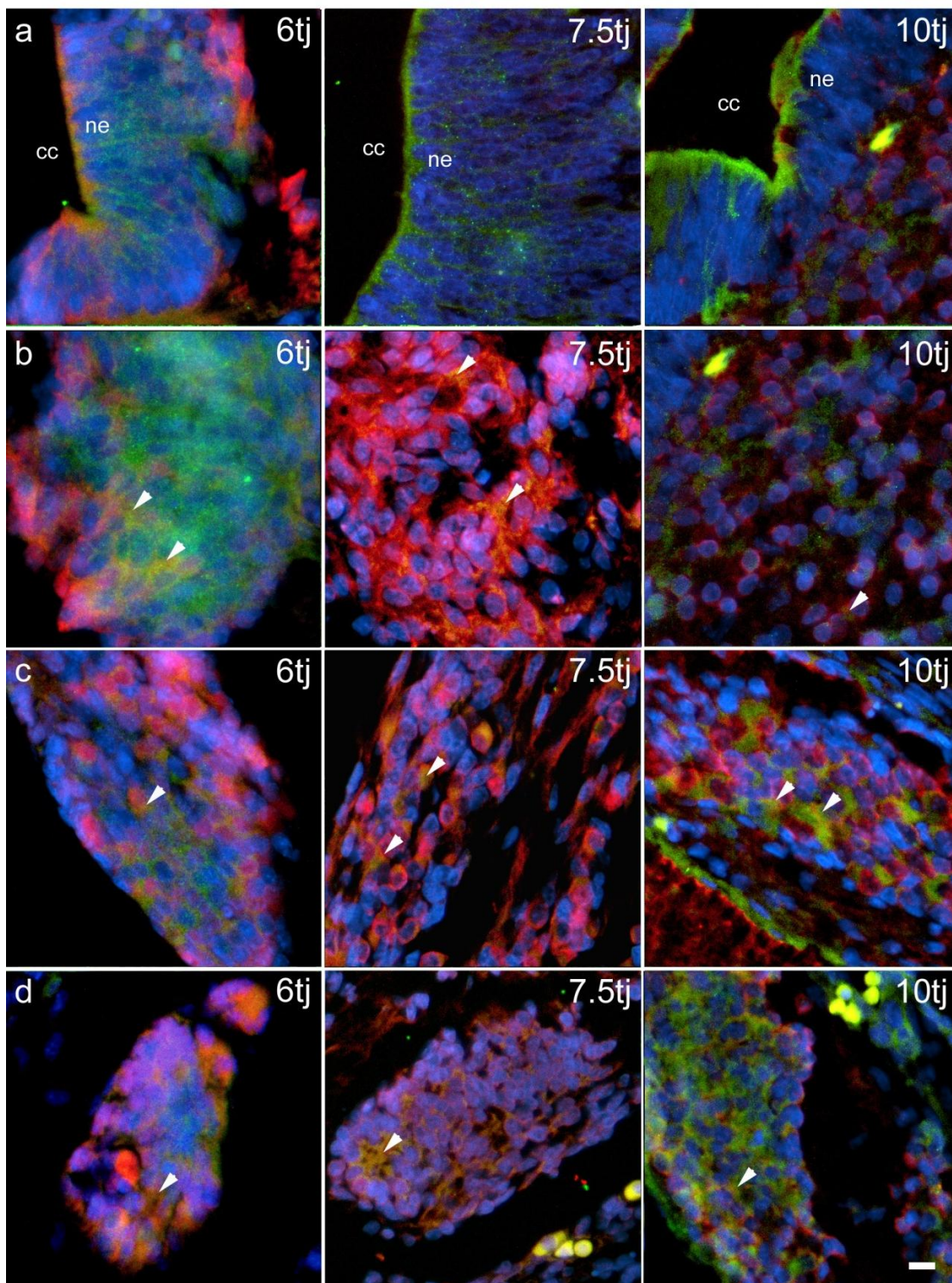


**Slika 15. TEM mikrofotografije spinalnog ganglija ljudskog zametka.** a) jezgra neurona; pukotinsko spojište između membrana neurona (plavi vrhovi strelica). b) Pukotinsko spojište između dva neurona (plavi vrhovi strelica) i dvije glija stanice (crveni vrhovi strelica). c) Detalji pukotinskog spojišta između dva neurona (plavi vrhovi strelica) Umetak prikazuje pukotinsko spojište između neurona na velikom povećanju. d) Pukotinsko spojište između dvije endotelne stanice kapilare (žuta strelica). Umetak pokazuje detalj označen žutom strelicom.

**Kratice:** **nn** – jezgra neurona (engl. *neuronal nucleus*); **gcn** - jezgra glija stanica (engl. *glial-cell nucleus*); **ec** – endotelna stanica (engl. *endothelial cell*); **rbc** – crvena krvna zrnca u kapilari (engl. *red blood cell*)

## **6.2 Promjene izražaja dendrina u KM tijekom razvoja ljudskog zametka**

Izražaj dendrina istražili smo u različitim područjima od interesa u KM tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja. U neuroepitelu INL područja uočili smo imunoreaktivnost dendrina koja je bila srednjeg intenziteta, ali se nije mijenjala tijekom sva tri istraživana razdoblja (Slika 16a). Jaka imunoreaktivnost dendrina zapažena je u VII, odnosno području BP – budućim motornim regijama KM u najranijem istraživanom razdoblju (6 tjedana), dok je intenzitet imunoreaktivnosti dendrina u istome području bio slabiji u kasnijim istraživanim razdobljima (Slika 16b). Također smo pronašli imunoreaktivnost dendrina u stanicama DRG i simpatičkih ganglija u razvoju, ali je ona bila slabijeg intenziteta (Slika 16c,d). Uočena je kolokalizacija dendrina s biljegom za neurone, PGP 9.5, u sloju plašta, kao i u DRG i simpatičkim ganglijima (Slika 16).



**Slika 16. Izražaj dendrina u kralježničnoj moždini ljudskih zametaka.** a – ventrikularni sloj; b – sloj plašta; c – spinalni ganglij; d – simpatički ganglij ljudskih zametaka starosti 6, 7.5 i 10 tjedana imunohistokemijski obojeni s dendrinom (zeleno), PGP 9.5 (crveno) i DAPI (plavo obojenje jezgara). Vrhovi strelice predstavljaju kolokalizaciju dendrina i PGP 9.5 (žuto). (povećanje objektiva - 40x, mjerna ljestvica = 20  $\mu$ m)

**Kratice:** ne – neuroepitel, cc – središnji kanal (engl. *central canal*)

### 6.3 Validacija modela kroničnog stresa u štakora

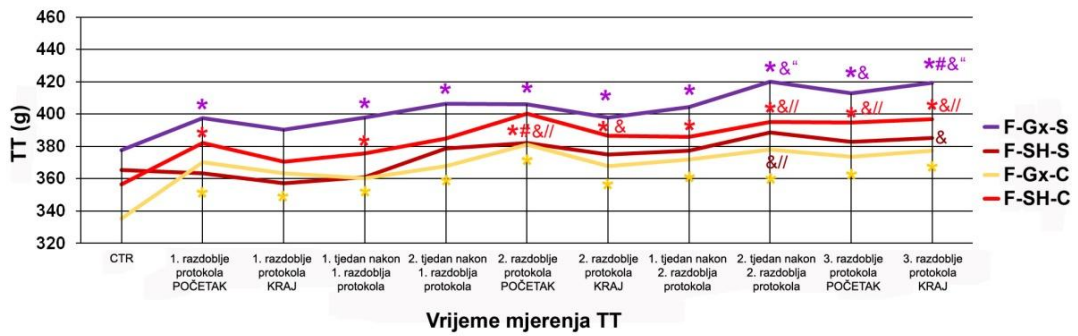
Promjene tjelesne težine za sve skupine životinja u svim fazama pokusa prikazane su na slici 17. Kao posljedica izloženosti stresu i/ili kastracije, utvrđene su razlike u tjelesnoj težini, odnosno njezino povećanje. U ženki štakora, nakon kastracije ili izloženosti stresu, tjelesna težina nije se dodatno povećavala nakon 15. mjeseca starosti. U kontrolnoj skupini životinja (F-SH-C) tjelesna težina nastavila se polako povećavati do kraja pokusa. Nadalje, stres kod kastriranih životinja rezultirao je još većim povećanjem tjelesne težine (slika 17a). S druge strane, mužjaci su na početku na stres reagirali izostankom normalnog povećanja tjelesne težine i zadržali su nižu tjelesnu težinu do kraja pokusa (slika 17b). Rezultati GTT-a kod lažno-operiranih ženki izloženih stresu pokazali su, odmah nakon prvog razdoblja primjene protokola kroničnog stresa, povećanje razine glukoze u krvi mjereno povećanjem površine ispod krivulje (engl. *area under a curve*, AUC; slika 17c). To je također bilo vidljivo i nakon drugog i trećeg razdoblja primjene protokola kroničnog stresa, što ukazuje na poremećaj metabolizma glukoze. S druge strane, ovarijektomija je spriječila porast razine glukoze, što je vidljivo kod skupine F-Gx-S. Životinje u skupini M-SH-S imale su najveće vrijednosti bazalnog mjerenja AUC, koje su se postupno smanjivale nakon prvog i drugog razdoblja primjene protokola kroničnog stresa, uz istodobno smanjenje tjelesne težine. Međutim, nakon trećeg razdoblja primjene protokola kroničnog stresa, AUC se povećala na visoku osnovnu razinu. U muških orhidektomiranih štakora povećanje AUC-a bilo je očito tek nakon drugog i trećeg razdoblja primjene protokola kroničnog stresa (slika 17c).

Rezultati bihevioralnog ispitivanja prikazani su na Slici 18. Statistički značajan pad ukupnih horizontalnih i vertikalnih kretnji utvrđen je pred kraj pokusa kod svih skupina izloženih stresu (mužjaci i ženke).

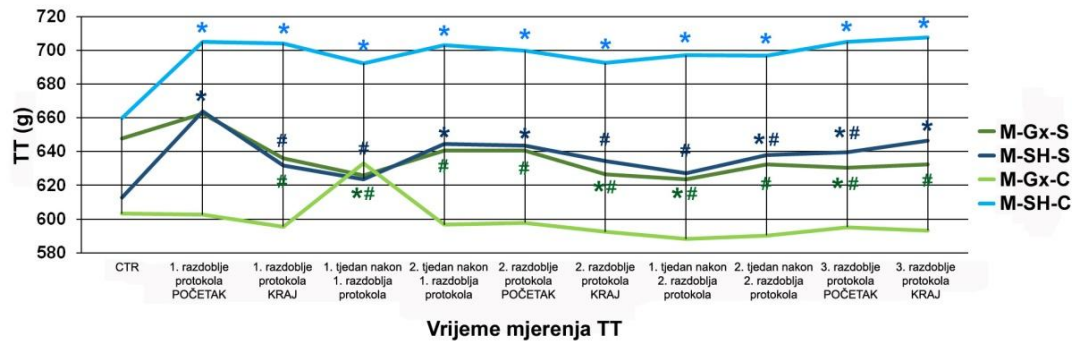
**Slika 17. Promjene tjelesne težine i rezultati testa tolerancije na glukozu kod štakora izloženih kroničnom stresu i/ili kastraciji.** a – tjelesne težine štakora ženskog spola, b – tjelesne težine štakora muškog spola. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolno mjerenje (CTR) \* –  $P < 0,05$ ; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na prvo razdoblje primjene protokola kroničnog stresa POČETAK # –  $P < 0,05$ ; & – označava statistički značajnu razliku u odnosu na prvo razdoblje primjene protokola kroničnog stresa KRAJ & –  $P < 0,05$ ; // – označava statistički značajnu razliku u usporedbi s 2. tjednom nakon 1. razdoblja primjene protokola kroničnog stresa // –  $P < 0,05$ ; “ – označava statistički značajnu razliku u usporedbi s 2. razdobljem primjene protokola kroničnog stresa POČETAK ” –  $P < 0,05$ . c – označava rezultate testa tolerancije na glukozu štakora nakon izlaganja kroničnom stresu i kastraciji – područje ispod krivulje (AUC) za glukozu u krvi. Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na osnovno mjerenje \* –  $P < 0,05$ ; 1 – označava statistički značajnu razliku u usporedbi s mjerenjem tijekom 1. razdoblja primjene protokola kroničnog stresa –  $P < 0,05$ ; 2 – označava statistički značajnu razliku u odnosu na mjerenje tijekom 2. razdoblja primjene protokola kroničnog stresa –  $P < 0,05$ .

**Kratice:** **F-SH-C** – lažno operirane ženke izložene lažnim stresorima; **F-Gx-C** – ovarijsktomirane ženke izložene lažnim stresorima; **F-SH-S** – lažno operirane ženke izložene stresu; **F-Gx-S** – ovarijsktomirane ženke izložene stresu; **M-SH-C** – lažno operirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-Gx-C** – orhidektomirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-SH-S** – lažno operirani mužjaci izloženi stresu; **M-Gx-S** – orhidektomirani mužjaci izloženi stresu; **GTT** – test opterećenja glukozom (engl. *glucose tolerance test*); **AUC** – površine ispod krivulje (engl. *area under a curve*)

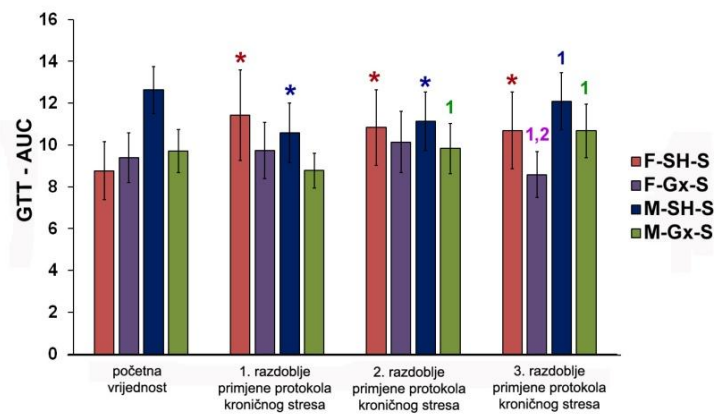
a

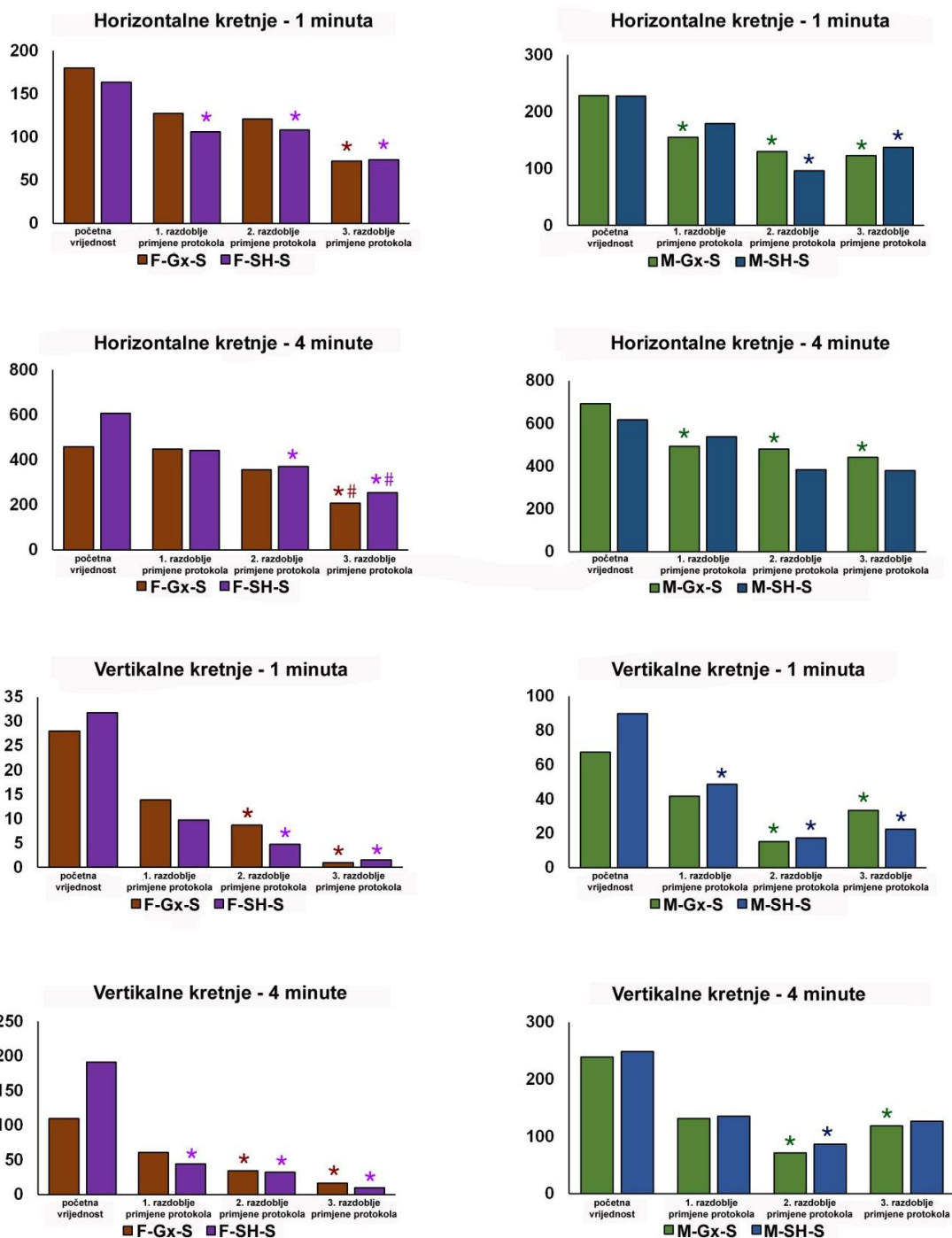


b



c





**Slika 18. Rezultati bihevioralnog ispitivanja u skupinama štakora izloženih stresu.** Zvezdica označava statistički značajnu razliku u odnosu na osnovno mjerenje \*-  $P < 0,05$ ; # označava statistički značajnu razliku u odnosu na mjerenje nakon 1. razdoblja primjene protokola kroničnog stresa.

**Kratice:** **F-SH-S** – lažno operirane ženke izložene stresu; **F-Gx-S** – ovarijektomirane ženke izložene stresu; **M-SH-S** – lažno operirani mužjaci izloženi stresu; **M-Gx-S** – orhidektomirani mužjaci izloženi stresu.

#### 6.4 Promjene izražaja koneksina u KM nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu

Istražili smo učinak razlike među spolovima, kastracije i kroničnog stresa na izražaj Cx37, Cx40 i Cx43 u području dorzalnog roga i oko CC (lamina X). Rezultati analize učinka spola, kastracije i kroničnog stresa na izražaj koneksina trosmjernom ANOVA-om prikazani su u Tablici 5.

**Tablica 5. Usporedba izražaja koneksina u kralježničnoj moždini štakora korištenjem trosmjerne ANOVA-e.**

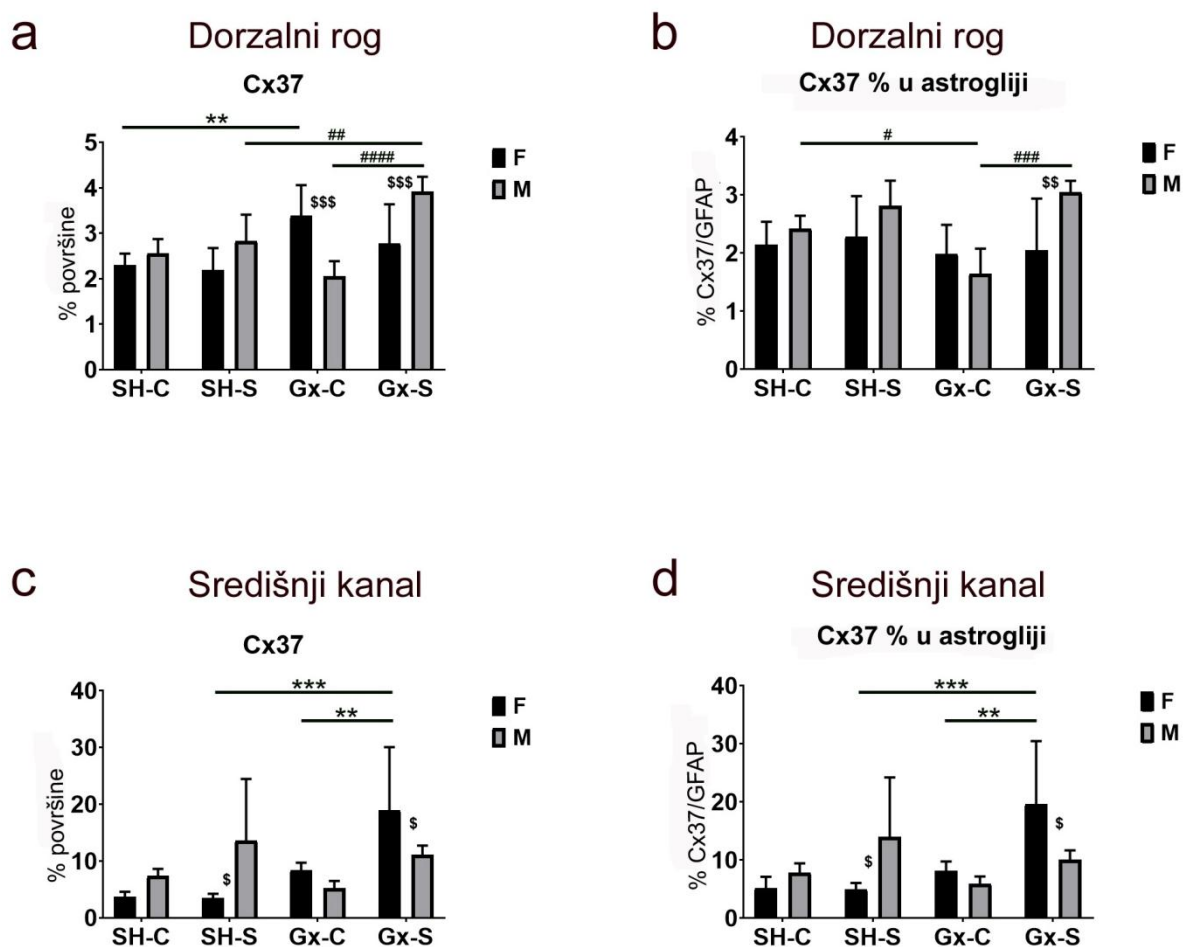
		Cx37	Cx37/ GFAP	Cx40	Cx40/ GFAP	Cx43	Cx43/ GFAP
Varijable		P vrijednost					
<b>Dorzalni rog</b>	<b>Stres</b>	<b>0,0496</b>	<b>0,0054</b>	0,9189	0,2921	0,6081	0,6437
	<b>Kastracija</b>	<b>0,0028</b>	0,1785	0,1829	0,3833	0,0901	0,1481
	<b>Spol</b>	0,3053	<b>0,0352</b>	0,9571	0,6437	0,3419	0,8565
	<b>Stres*kastracija</b>	0,1258	0,1726	0,4519	0,191	0,7184	0,1896
	<b>Stres*spol</b>	<b>0,0002</b>	<b>0,0238</b>	0,2346	0,1029	0,3124	0,9293
	<b>Kastracija*spol</b>	0,1208	0,8167	<b>0,0016</b>	<b>0,036</b>	0,4869	<b>0,0065</b>
	<b>Stres*kastracija *spol</b>	<b>0,0048</b>	0,1147	<b>0,0382</b>	<b>0,0082</b>	0,1019	0,6697
<b>Središnji kanal</b>	<b>Stres</b>	<b>0,0102</b>	<b>0,0103</b>	<b>0,0066</b>	<b>0,0424</b>	0,1149	0,179
	<b>Kastracija</b>	0,0647	0,1486	0,3542	0,1584	0,6144	0,6022
	<b>Spol</b>	0,7309	0,9857	<b>0,0087</b>	0,0809	0,7923	0,6254
	<b>Stres*kastracija</b>	0,2145	0,2293	0,1796	0,087	0,2723	0,7958
	<b>Stres*spol</b>	0,8294	0,8997	0,4357	0,9413	<b>0,049</b>	0,1564
	<b>Kastracija*spol</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,006</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0454</b>	0,4974	0,6823
	<b>Stres*kastracija *spol</b>	0,1827	0,0958	<b>0,0117</b>	0,3553	<b>0,034</b>	0,439



#### 6.4.1 Izražaj koneksina 37 (Cx37)

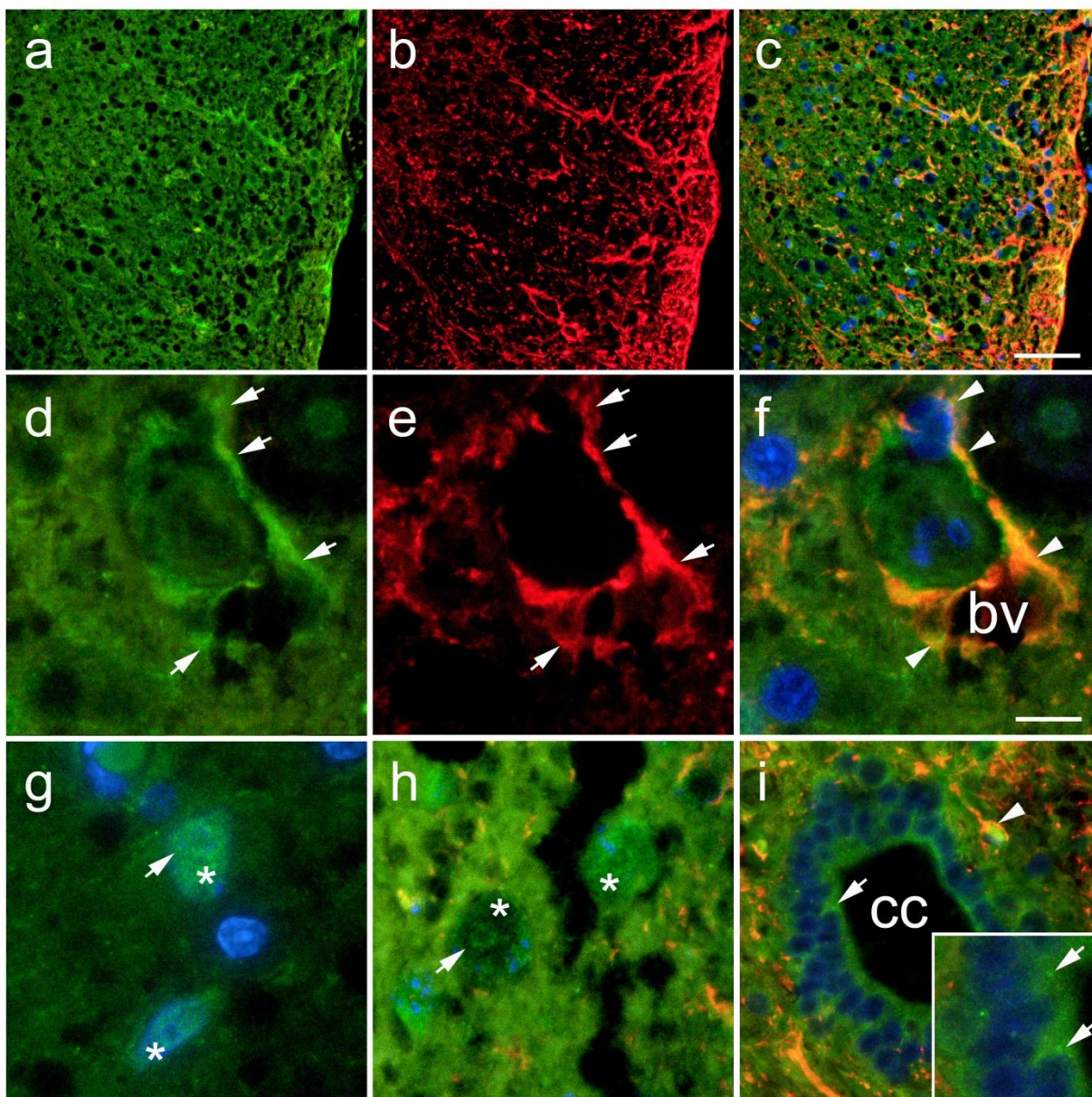
Na histološkim presjecima, usporedbom istraživanih koneksina, najmanju količinu izražaja imao je Cx37. Jaka imunoreaktivnost Cx37 bila je posebno vidljiva u jezgri, odnosno u ovojnici jezgrice, te nešto manja u citoplazmi neurona (Slika 20g-h). Također, imunoreaktivnost Cx37 bila je prisutna u endimskim stanicama CC, kao i u području oko CC (lamina X; Slika 20i). Posebno jaka imunoreaktivnost vidljiva je u GFAP-imunoreaktivnoj astrogliji koja okružuje krvne žile (Slika 20d-f). TEM-om je potvrđen izražaj Cx37 u jezgri i jezgrici neurona i njihovim ovojnicama (Slika 21). Uz to, primijećen je izražaj Cx37 u citoplazmi neurona u području neurofilamenata.

Izolirani učinak izloženosti kroničnom stresu nije pokazao značajniji utjecaj na izražaj Cx37 u dorzalnog rogu (Slika 19a). Nije primijećen ni učinak spolne razlike u izražaju između lažno operiranih kontrolnih skupina mužjaka i ženki (F-SH-C i M-SH-C). S druge strane, kastracija je rezultirala značajnim povećanjem izražaja Cx37 kod štakora ženskog spola, dok je izloženost kroničnom stresu suprimirao taj učinak kastracije. U štakora muškog spola sinergistički učinak kastracije i kroničnog stresa rezultirao je povećanjem izražaja Cx37 u dorzalnog rogu. Postotak imunoreaktivnosti Cx37 u GFAP-imunoreaktivnoj astrogliji u dorzalnog rogu KM štakora ženskog spola nije se značajno promijenio nakon kastracije ili/i izloženosti kroničnom stresu, te nije slijedio promjene u ukupnoj količini Cx37 (koji se povećao nakon kastracije, kao što je gore navedeno). S druge strane, tijekom promjene izražaja Cx37 u GFAP-imunoreaktivnoj astrogliji u štakora muškog spola bio je paralelan s promjenom ukupne količine Cx37 (Slika 19b). Uočene promjene u izražaju Cx37 u kastriranih štakora izloženih kroničnom stresu rezultirale su nesrazmjerom ukupnog izražaja Cx37 među spolovima, kao i na područjima kolokalizacije Cx37 s GFAP. U području CC samo kod štakora ženskog spola pronašli smo značajnu promjenu u ukupnom izražaju Cx37, kao i u njegovoj kolokalizaciji s GFAP (Slika 19c, d). U području CC izražaj Cx37 značajno je porastao u štakora ženskog spola podvrgnutih i kastraciji i protokolu kroničnog stresa.



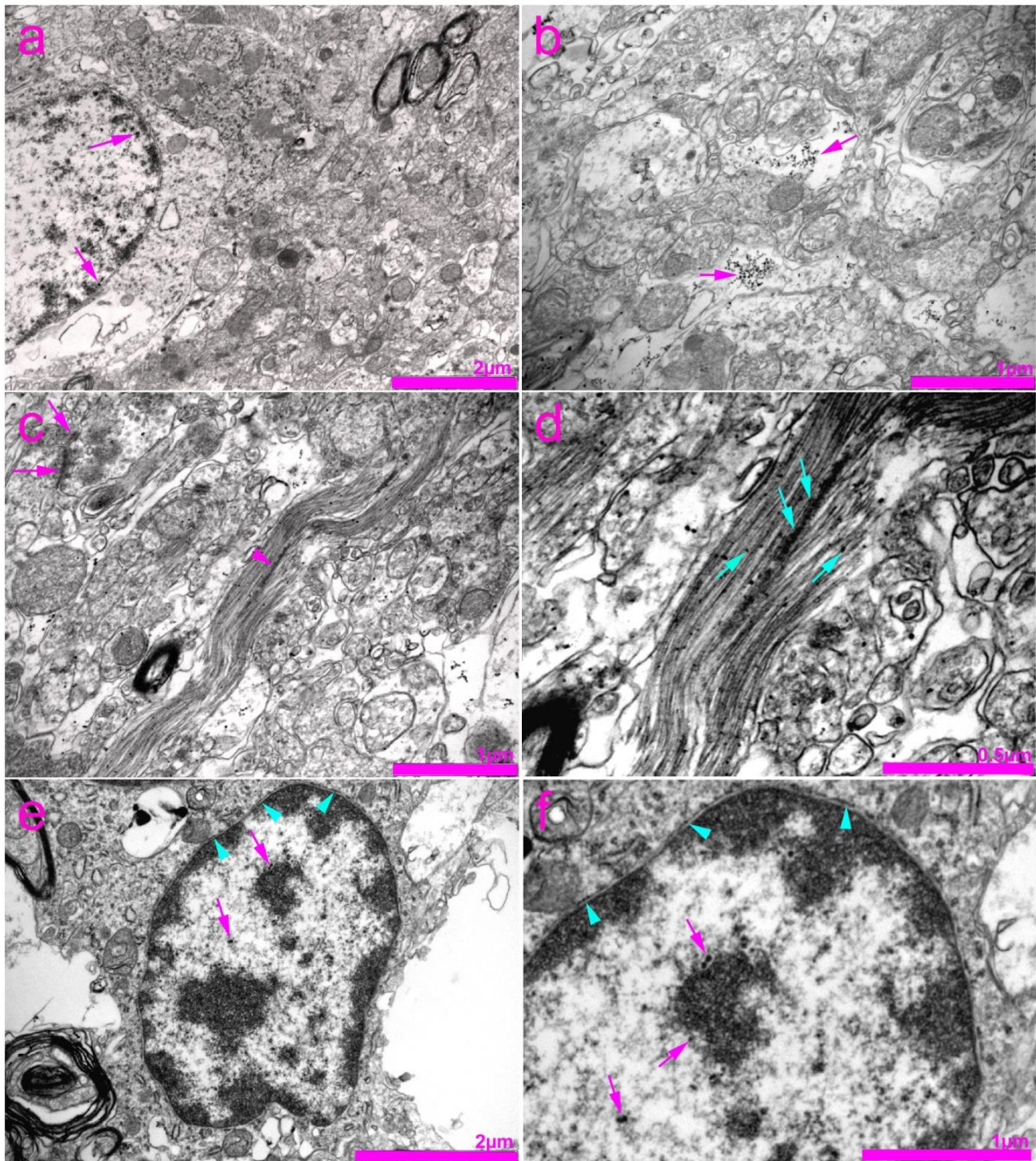
**Slika 19. Promjene u izražaju Cx37 u kralježničnoj moždini štakora nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu.** Postotak površine pod imunofluorescijom Cx37 i kolokalizacijom Cx37/GFAP u dorzalnom rogu (a i b) i u lamini X, uključujući središnji kanal (c i d). \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  između naznačenih skupina ženskog spola; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , #####  $P < 0,0001$  između naznačenih skupina muškog spola; \$  $P < 0,05$ , \$\$  $P < 0,01$ , \$\$\$  $P < 0,001$  između muških i ženskih skupina.

**Kratice:** F – ženke (engl. *female*); M – mušjaci (engl. *male*); SH-C – lažno operirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); SH-S – lažno operirana skupina izložena stresu; Gx-C – orhidektomirana/ovarijektomirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); Gx-S – orhidektomirana/ovarijektomirana skupina izložena stresu



**Slika 20. Izražaj Cx37 u kralježničnoj moždini štakora.** a-h – dorzalni rog; i – središnji kanal. Torakalni segmenti kralježnične moždine imunohistokemijski obojeni na Cx37 (zeleno; strelice) i GFAP (crveno; strelice). a-c,i – manje povećanje (mjerna ljestvica = 50  $\mu$ m); d-g, detalj na i – veće povećanje (mjerna ljestvica na f slici = 10  $\mu$ m). Vrhovi strelice predstavljaju kolokalizaciju Cx37 i GFAP (žuto); zvjezdica – jezgra neurona.

**Kratice:** CC – središnji kanal (engl. *central canal*); bv – krvna žila (engl. *blood vessel*)

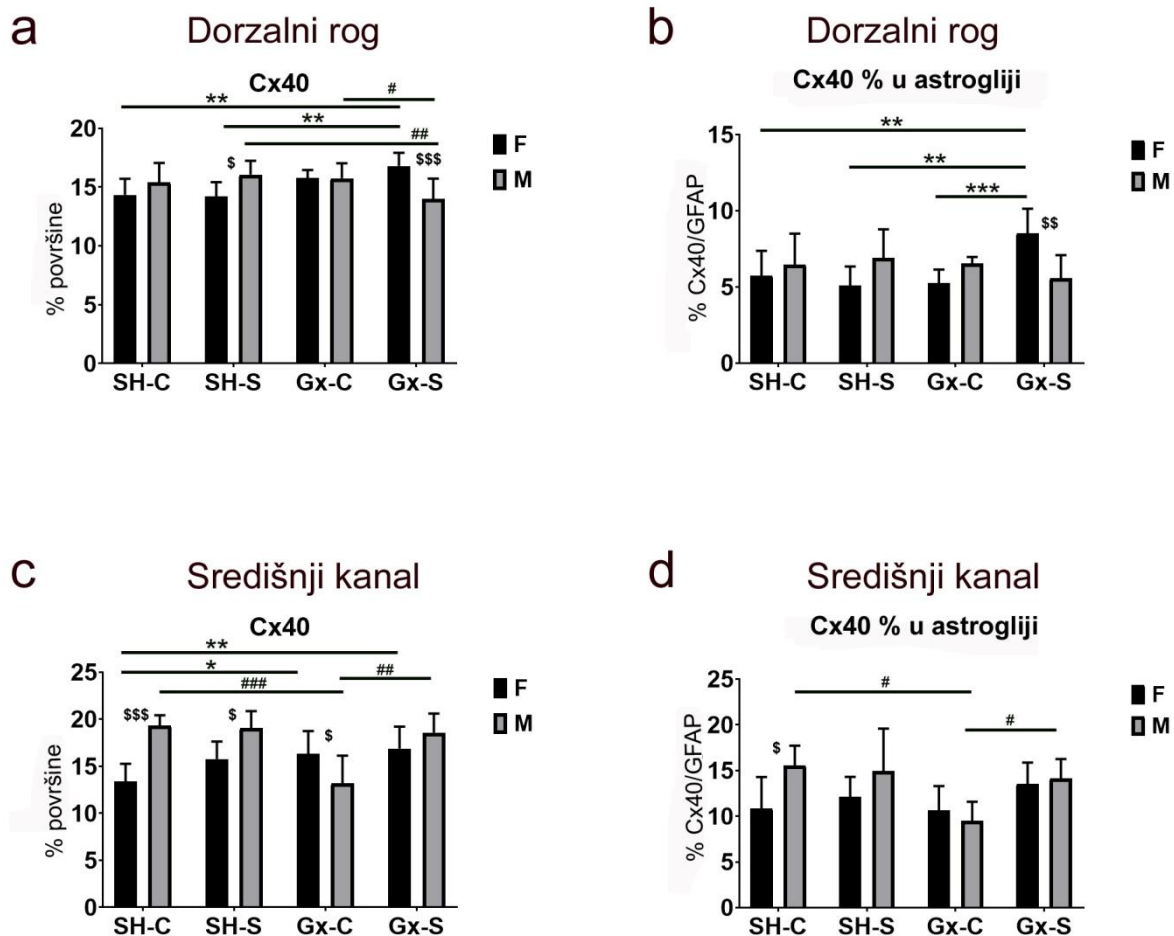


**Slika 21. TEM mikrofotografije kralježnične moždine štakora – imunogold bojenje na Cx37.** a) Izražaj Cx37 u jezgri neurona (strelice). b) Izražaj Cx37 u citoplazmi neurona (strelice). c) Pukotinska spojišta (električne sinapse) između dva susjedna aksonalna završetka (strelice). Izražaj koneksina u području neurofilamenata (vrh strelice). d) Uvećana mikrofotografija „c“: izražaj Cx37 u području neurofilamenata (strelice). e) Izražaj Cx37 u jezgri neurona (strelice) i jezgrinoj ovojnici (vrhovi strelica). f) Uvećana mikrofotografija „e“: izražaj Cx37 u jezgrinoj ovojnici (vrhovi strelica) i jezgri (strelice).

## 6.4.2 Izražaj koneksina 40 (Cx40)

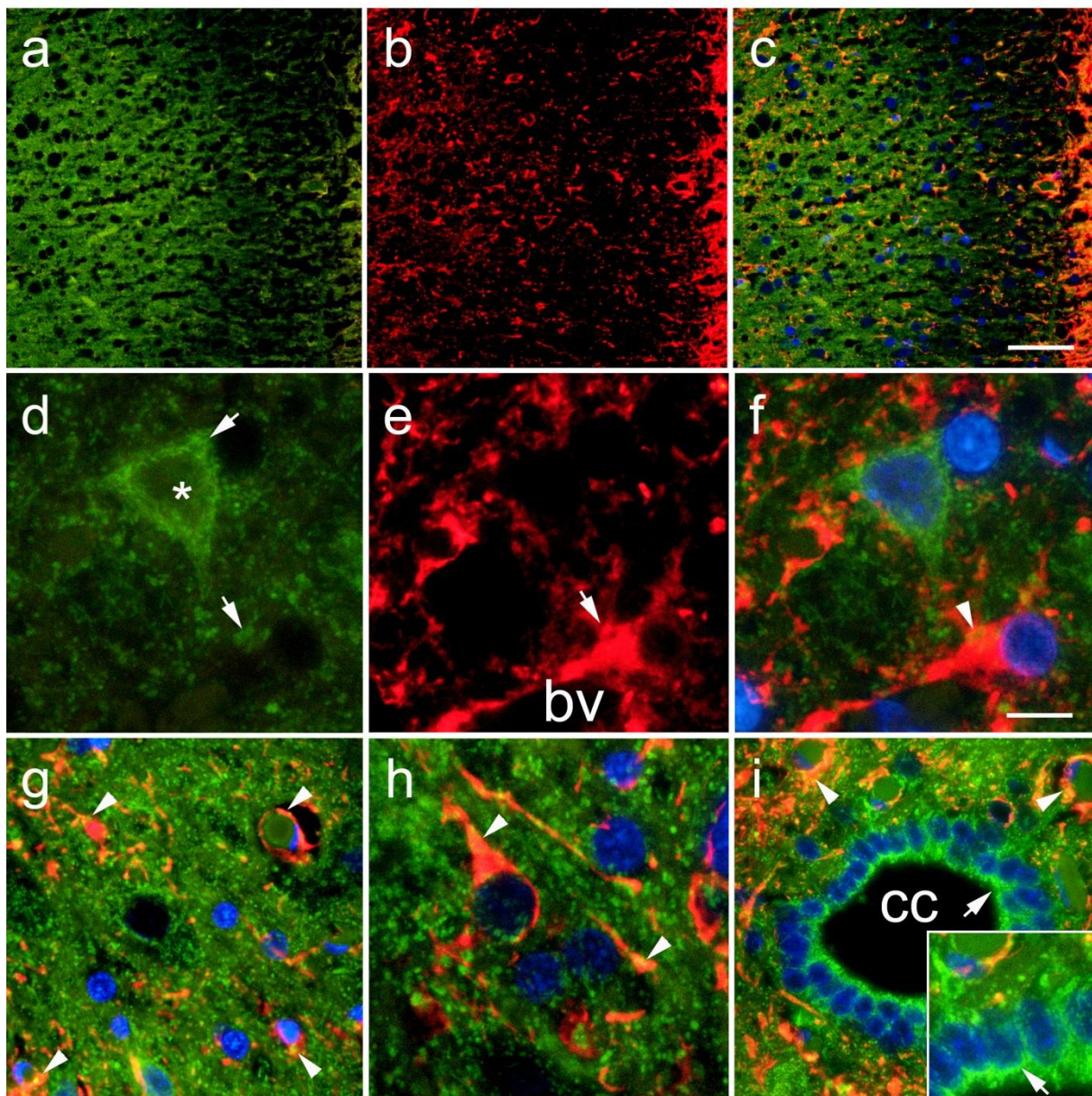
Na histološkim presjecima vidljiva je jaka imunoreaktivnost Cx40 u citoplazmi neurona (Slike 23d-g). Područje preklapanja Cx40 s GFAP pronađeno je u astrocitima oko krvnih žila (Slike 23g, i), te u onima nevezanim uz krvne žile (Slike 23f, h). U ependimskim stanicama CC očita je vrlo jaka imunoreaktivnost Cx40. Za razliku od izražaja Cx37, imunoreaktivnost Cx40 u jezgrama neurona je rijetka (Slike 23g, i; 24). TEM-om je potvrđena prisutnost Cx40 u citoplazmi neurona (Slika 24). Uz to, prikazana je prisutnost Cx40 u aksoaksonskim i aksodendritičkim sinapsama.

Statističkom analizom izražaja Cx40 nije otkriven izolirani učinak kastracije ili kroničnog stresa na ukupni izražaj Cx40 u dorzalnom rogu i CC, kao ni u područjima preklapanja Cx40 s GFAP, biljegom za astrogliju (Slike 22a, b). Međutim, utjecaj kroničnog stresa na ukupni izražaj Cx40 u dorzalnom rogu bio je vidljiv nakon kastracije kod oba spola, sa suprotnim smjerom promjene: značajno se povećao kod kastriranih štakora ženskog spola, dok se kod muškog spola smanjio. Izražaj Cx40 u GFAP-imunoreaktivnim područjima značajno se povećao samo kod kastriranih štakora ženskog spola, bez značajne promjene kod štakora muškog spola (Slika 22b). Uz to, izražaj ukupnog Cx40 u području oko CC značajno se povećao kod kastriranih skupina ženskog spola (F-Gx-C i F-Gx-S) u usporedbi s kontrolnom skupinom (F-SH-C). Izražaj ukupnog Cx40 u području CC značajno se smanjio nakon kastracije štakora muškog spola, dok je nakon izloženosti kroničnom stresu taj učinak kastracije suzbijen (Slika 22c). Nadalje, postotak imunoreaktivnosti Cx40 koji se preklapa s GFAP slijedio je sličan trend kao i ukupni izražaj Cx40: značajno se povećao u štakora ženskog spola nakon istovremenog djelovanja kastracije i kroničnog stresa, dok je kod muškog spola učinak kastracije, bez utjecaja kroničnog stresa, značajno smanjio izražaj (Slika 22d).



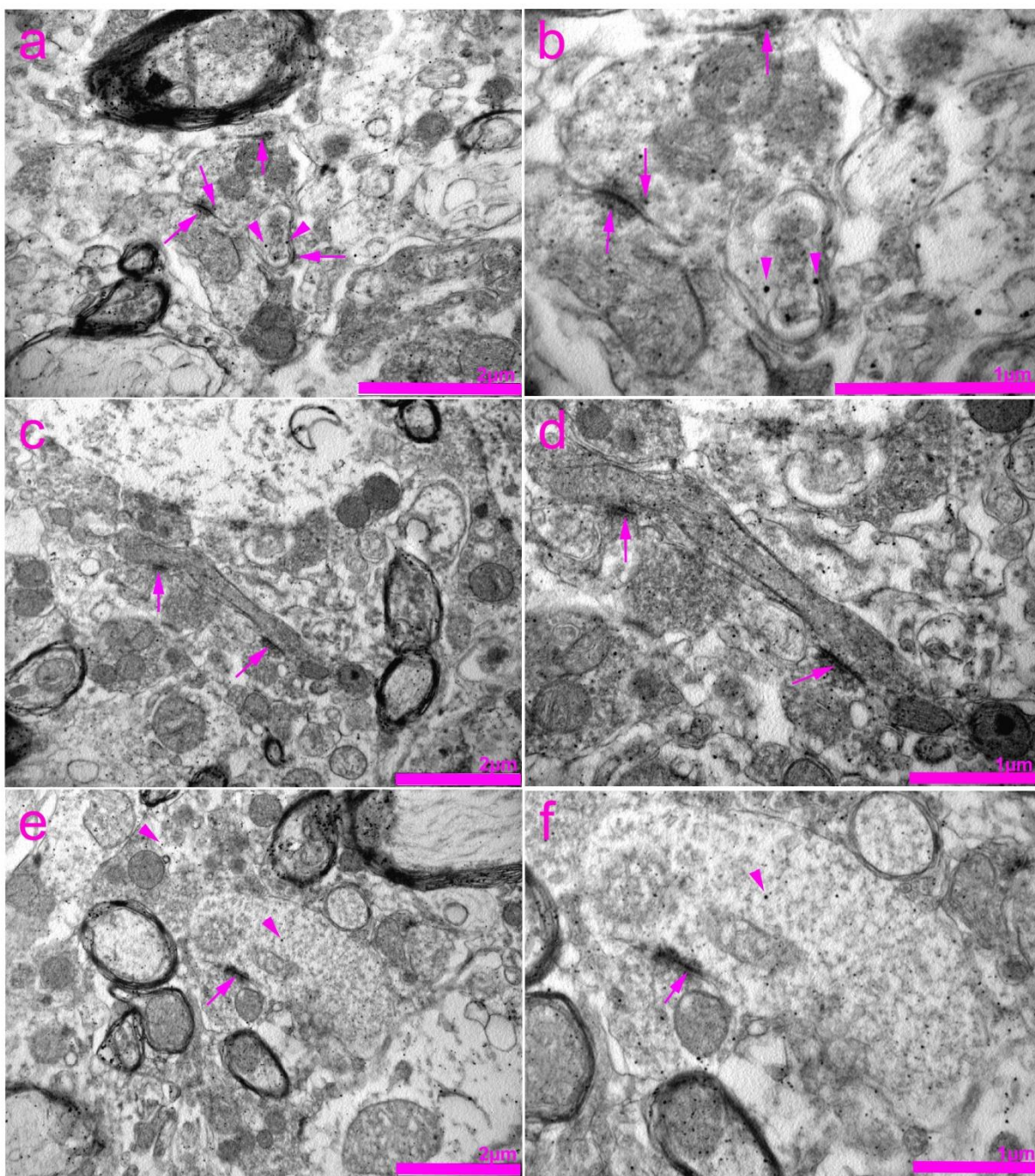
**Slika 22. Promjene izražaja Cx40 u kralježničnoj moždini štakora nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu.** Postotak površine pod imunofluorescijom Cx40 i kolokalizacijom Cx40/GFAP u dorzalnom rogu (a i b) i lamini X, uključujući središnji kanal (c i d). \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  između naznačenih skupina ženskog spola; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , ####  $P < 0,0001$  između naznačenih skupina muškog spola; \$  $P < 0,05$ , \$\$  $P < 0,01$ , \$\$\$  $P < 0,001$  između muških i ženskih skupina.

**Kratice:** **F** – ženke (engl. *female*); **M** – mušjaci (engl. *male*); **SH-C** – lažno operirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); **SH-S** – lažno operirana skupina izložena stresu; **Gx-C** – orhidektomirana/ovarijektomirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); **Gx-S** – orhidektomirana/ovarijektomirana skupina izložena stresu



**Slika 23. Izražaj Cx40 u kralježničnoj moždini štakora.** a-h – dorzalni rog; i – središnji kanal. Torakalni segmenti kralježnične moždine imunohistokemijski obojeni na Cx40 (zeleno; strelice) i GFAP (crveno; strelice). a-c, g, i – manje povećanje (mjerna ljestvica = 50  $\mu$ m); d-f, h, detalj na i – veće povećanje (mjerna ljestvica na f slici = 10  $\mu$ m). Vrhovi strelice predstavljaju kolokalizaciju Cx40 i GFAP (žuto); zvjezdica – jezgra neurona.

**Kratice:** CC – središnji kanal (engl. *central canal*); bv – krvna žila (engl. *blood vessel*)



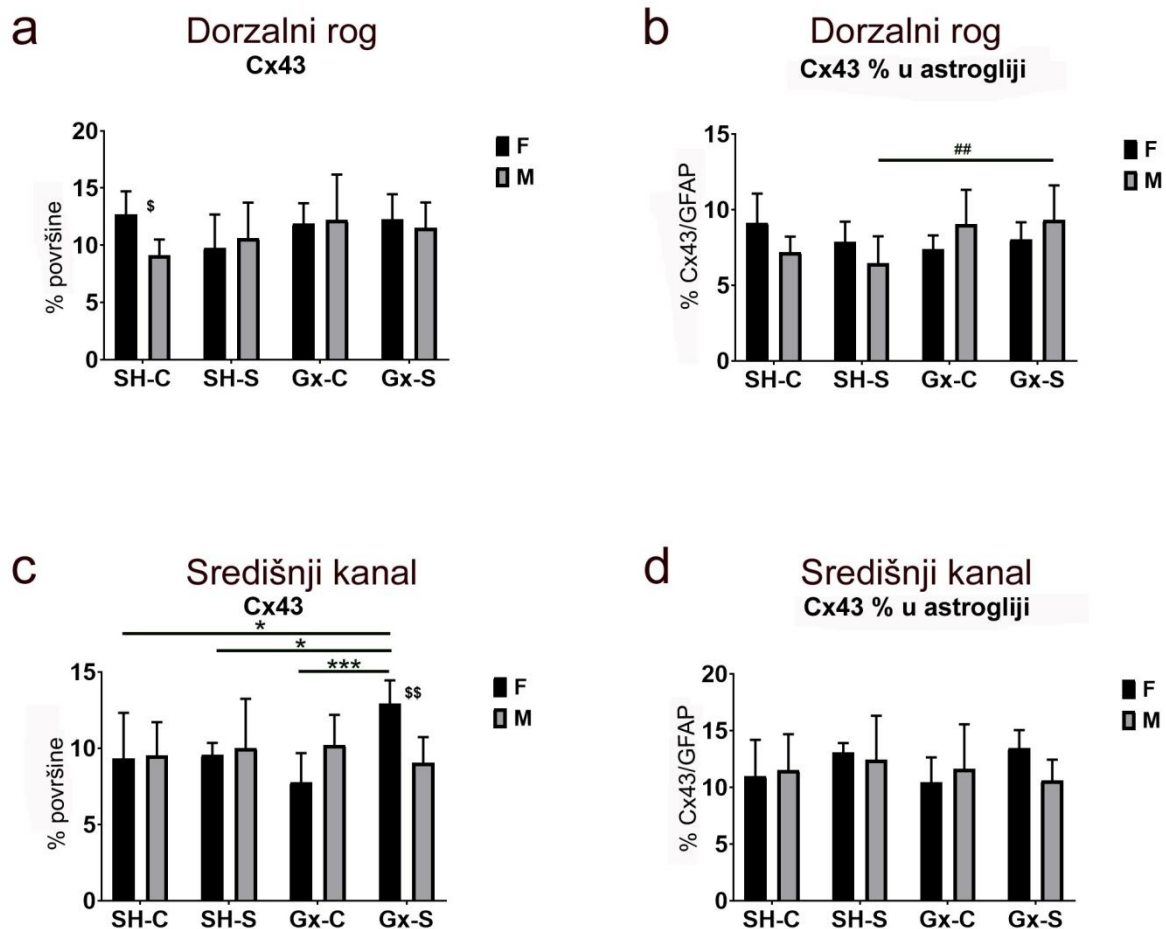
**Slika 24. TEM mikrofotografije kralježnične moždine štakora – imunogold bojenje na Cx40.** a) Izražaj Cx40 u citoplazmi neurona (vrhovi strelice), kao i u aksoaksonskim sinapsama (strelice). b) Uvećan detalj mikrofotografije „a“. c) Izražaj Cx40 u području aksodendritičkih sinapsi (strelice). d) Uvećan detalj mikrofotografije „c“. e) Izražaj Cx40 u području aksoaksonskih sinapsi (strelice) i u citoplazmi neurona (vrhovi strelica). f) Uvećan detalj mikrofotografije „e“.



### 6.4.3 Izražaj koneksina 43 (Cx43)

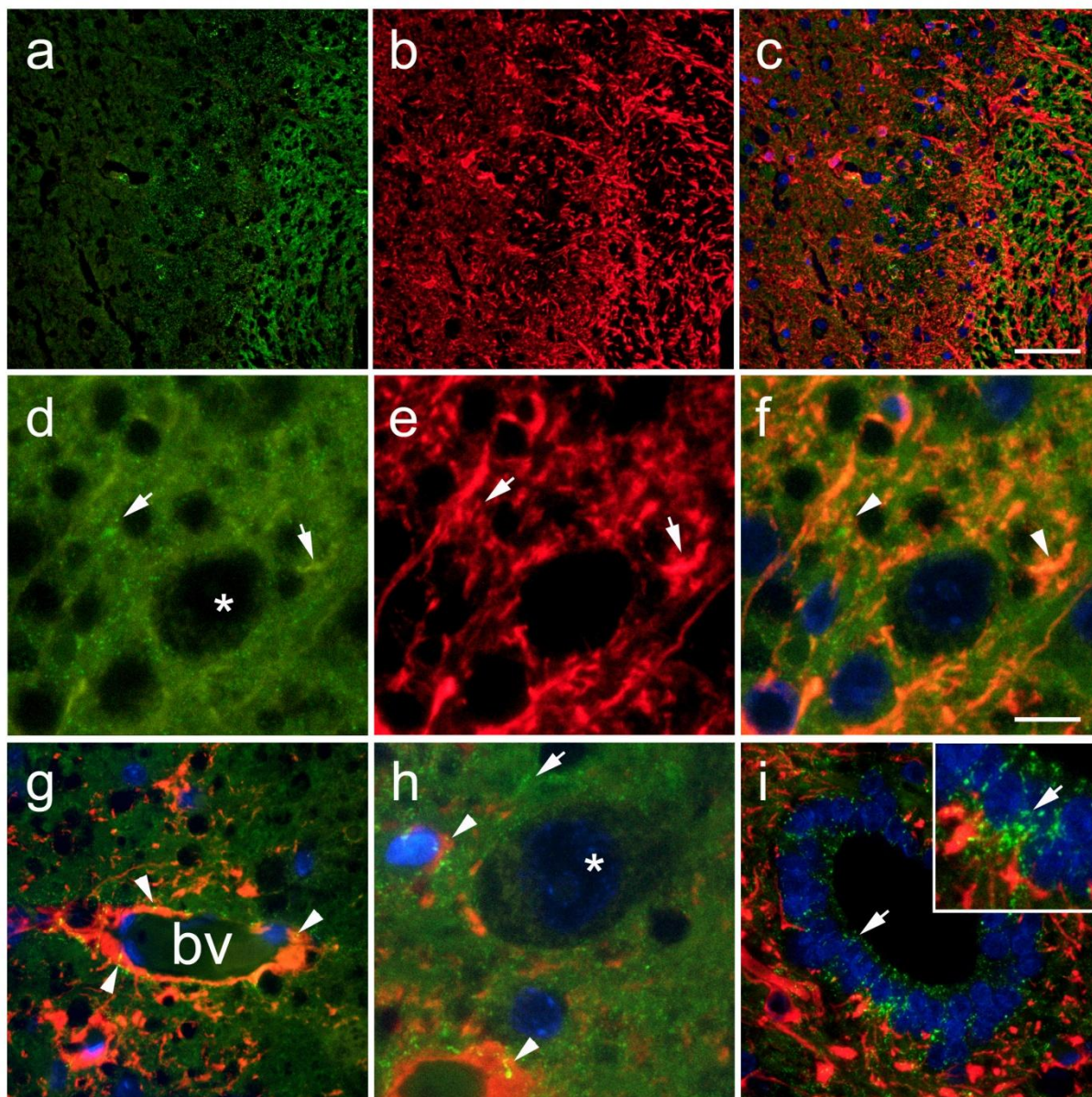
Na histološkim presjecima pronašli smo imunoreaktivnost Cx43 u GFAP-imunoreaktivnim astrocitima (Slike 26d-f), kao i u astrocitima oko krvnih žila (Slike 26g-h). Za razliku od izražaja Cx37 i Cx40, u neuronima se vidi izuzetno rijetka točkasta imunoreaktivnost Cx43 (Slike 26 d-f i h). Također, pronađena je imunoreaktivnost Cx43 u endimskim stanicama CC (Slika 26i). TEM u kombinaciji s imunogold bojenjem na Cx43, otkrio je jako mali izražaj Cx43 u citoplazmi neurona (Slika 27). Uz to, pomoću TEM-a pronašli smo izražaj Cx43 u jezgri i u području jezgrine ovojnice glija stanica.

Nismo pronašli značajni izolirani ili zajednički učinak kroničnog stresa i/ili kastracije na ukupni izražaj Cx43 u dorzalnom rogu (Slika 25a). Međutim, izražaj Cx43 značajno je veći u kontrolnoj skupini ženskog spola u odnosu na kontrolnu skupinu muškog spola (F-SH-C u odnosu na M-SH-C). Kontrolna skupina ženskog spola izložena kroničnom stresu pokazala je lagani pad izražaja Cx43, ali on nije bio statistički značajan. S druge strane, postotak izražaja Cx43 koji se preklapa s astrocitnim biljgom GFAP bio je znatno veći u skupini kastriranih muških štakora izloženih kroničnom stresu u usporedbi s lažno operiranim životinjama (M-Gx-S u odnosu na M-SH-S) (Slika 25b). Uzorak izražaja Cx43 u području koje okružuje CC kod štakora ženskog spola slijedio je sličan obrazac izražaja kao i kod drugih proučavanih koneksina (Cx37 i 40), odnosno vidljivo je značajno povećanje nakon kombiniranog učinka ovarijektomije i izloženosti kroničnom stresu (Slika 25c). U konačnici to je rezultiralo većim izražajem ukupnog Cx43 kod kastriranih štakora ženskog spola izloženih kroničnom stresu u odnosu na štakore muškog spola (F-Gx-S u odnosu na M-Gx-S; Slika 25c). Međutim, taj se porast Cx43 nije dogodio u astrogliji, s obzirom da nisu pronađene značajne promjene u postotku kolokalizacije Cx43 s GFAP (Slika 25d).



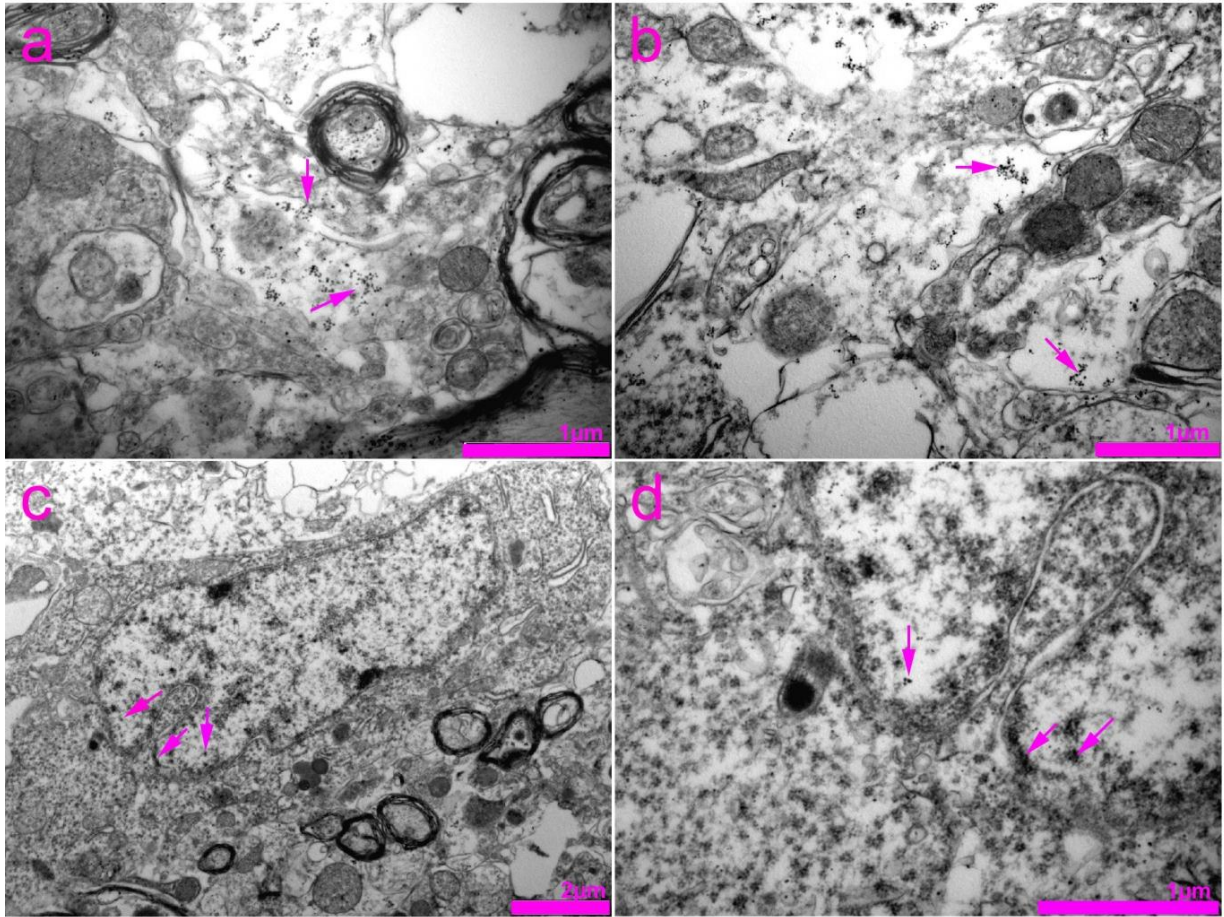
**Slika 25. Promjene u izražaju Cx43 u kralježničnoj moždini štakora nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu.** Postotak površine pod imunofluorescencijom Cx43 i kolokalizacijom Cx43/GFAP u dorzalnom rogu (a i b) i lamini X, uključujući središnji kanal (c i d). \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  između naznačenih skupina ženskog spola; #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$ , ###  $P < 0,001$ , ####  $P < 0,0001$  između naznačenih skupina muškog spola; \$  $P < 0,05$ , \$\$  $P < 0,01$ , \$\$\$  $P < 0,001$  između muških i ženskih skupina.

**Kratice:** **F** – ženke (engl. *female*); **M** – mušjaci (engl. *male*); **SH-C** – lažno operirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); **SH-S** – lažno operirana skupina izložena stresu; **Gx-C** – orhidektomirana/ovarijektomirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); **Gx-S** – orhidektomirana/ovarijektomirana skupina izložena stresu



**Slika 26. Izražaj Cx43 u kralježničnoj moždini štakora.** a-h – dorzalni rog; i – središnji kanal. Torakalni segmenti kralježnične moždine imunohistokemijski obojeni na Cx43 (zeleno; strelice) i GFAP (crveno; strelice). a-c, i – manje povećanje (mjerna ljestvica = 50  $\mu$ m); d-g, detalj na i – veće povećanje (mjerna ljestvica na f slici = 10  $\mu$ m). Vrhovi strelice predstavljaju kolokalizaciju Cx43 i GFAP (žuto); zvjezdica – jezgra neurona.

**Kratice:** bv – krvna žila (engl. *blood vessel*)



**Slika 27. TEM mikrofotografije kralježnične moždine štakora – imunogold bojenje na Cx43. a) i b) Izražaj Cx43 u citoplazmi neurona (strelice). c) Izražaj Cx43 u jezgri i u području jezgrine ovojnice (strelice) stanice glije. d) Uvećan detalj mikrofotografije „c“.**

## **6.5 Promjene izražaja dendrina u KM nakon kastracije i izloženosti kroničnom stresu**

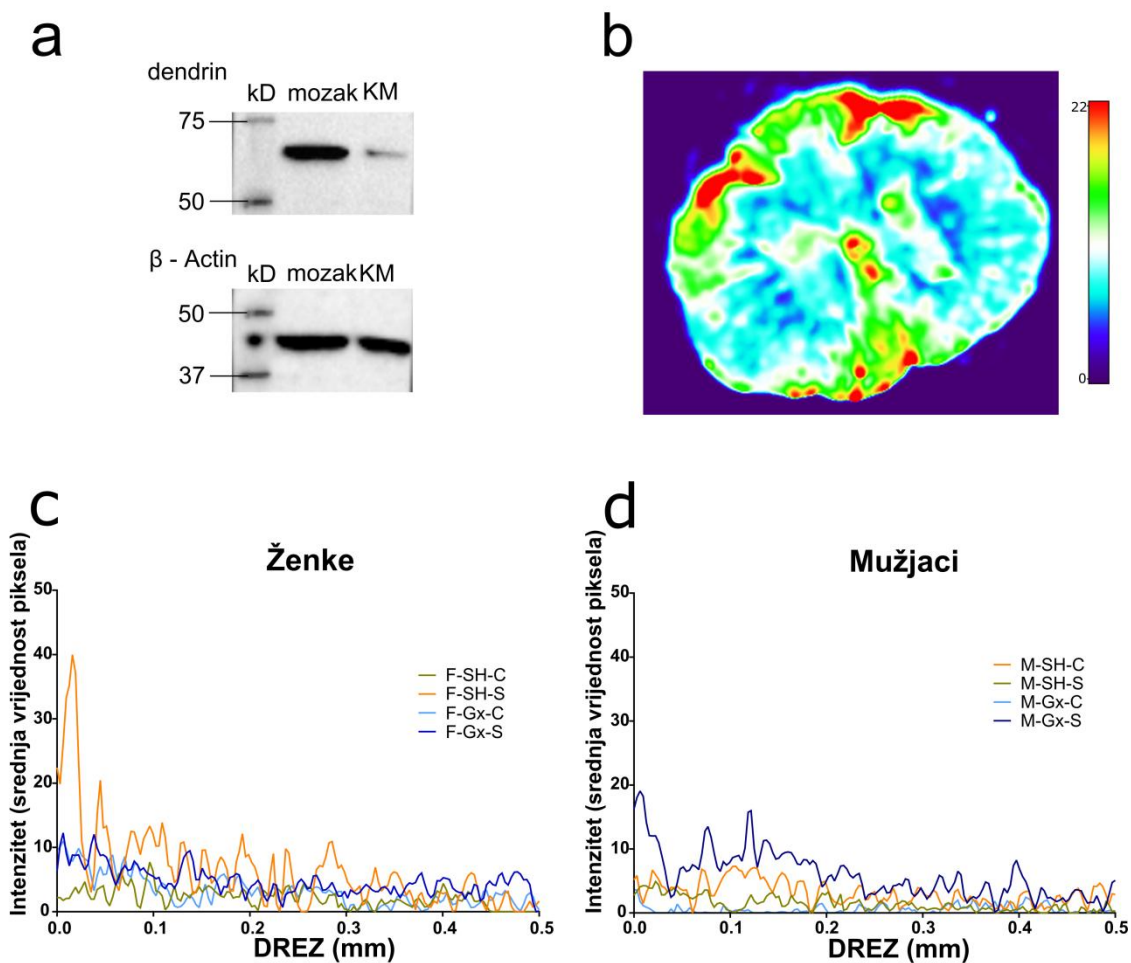
### **6.5.1 Analiza specifičnosti protutijela za dendrin koristeći *Western blot***

Ispitali smo specifičnost protutijela na dendrin pomoću homogenata mozga i KM dvomjesečnih štakora muškog spola koristeći *Western blot* metodu. Specifično jaka traka bila je vidljiva na razini od 72 kDa na dijelu membrane koja odgovara homogenatu mozga, dok je na dijelu membrane koja odgovara homogenatu KM pronađena traka na istoj razini, ali s nešto slabijim intenzitetom (Slika 28a).

### **6.5.2 Specifični obrazac lokalizacije dendrina u KM**

Lokalizacija i kvantifikacija izražaja dendrina analizirani su u torakalnim segmentima (Th1-Th3) KM štakora muškog i ženskog spola izloženih kastraciji i protokolu kroničnog stresa. Izražaj dendrina pronađen je u neuronima, te ostalim dijelovima sive tvari. Prisutan je i u perikarionu velikih donjih motornih neurona. Najistaknutiji signal imunofluorescencije dendrina, odnosno signal s najvećim intenzitetom, pronađen je u dorzalnog rogu KM, u laminama I i II i u području oko CC (lamina X) (Slika 28b).

Na slici 28c i 28d prikazani su grafovi intenziteta izražaja dendrina kroz KM duž dorzoventralne osi kroz površinske lamine dorzalnog roga, te je u većini skupina zabilježen pad intenziteta. Skupine s najvećim intenzitetom su F-SH-S, F-Gx-C i F-Gx-S (Slika 28c), te M-Gx-S (Slika 28d). Najmanji intenzitet vidljiv je u skupini F-SH-C (Slika 28c), te skupinama M-SH-C, M-SH-S i M-Gx-C (Slika 28d).



**Slika 28.** a) Western blot analiza karakterizacija dendrin antitijela.  $\beta$ -aktin je korišten kao kontrola. b) Toplinska karta raspodjele intenziteta izražaja dendrina u KM štakora (F-SH-S skupina). Raspon intenziteta (vrijednost piksela 0-255): 0-6 (tamno plava), 6-10 (svijetlo plava), 10-12 (bijela), 12-16 (svijetlo zelena), 16-20 (žuta) i 20 -22 (svijetlo crvena). c, d) Grafovi intenziteta izražaja dendrina duž dorzoventralne osi kroz površinske lamine dorzalnog roga za svaku od ženskih skupina c) i muških skupina d). Udaljenost od zone ulaska dorzalnog korijena do središnjeg kanala prikazana je na osi X. Intenzitet izražaja dendrina prikazan je kao srednja vrijednost piksela na osi Y.

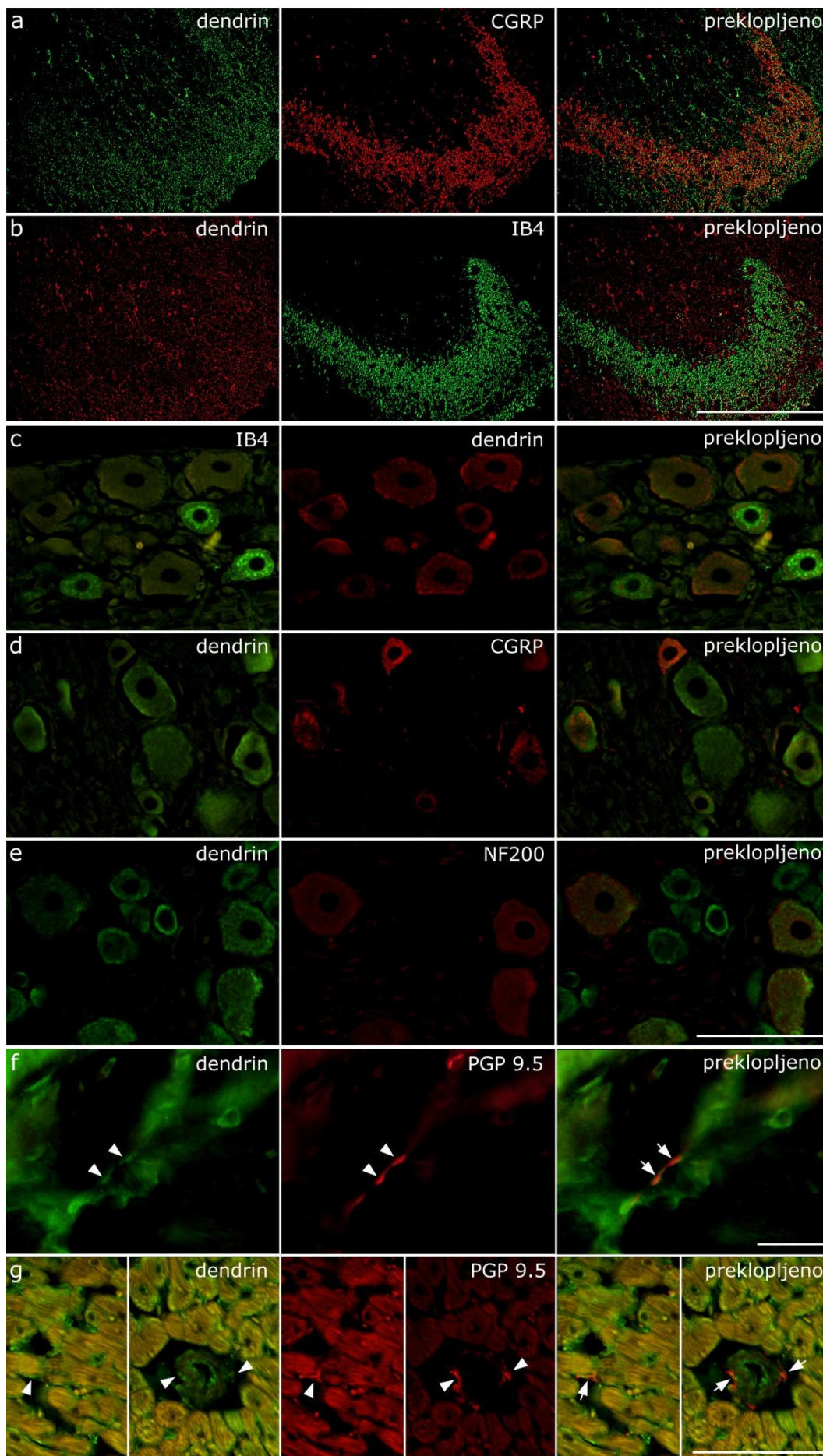
**Kratica:** DREZ – zona ulaska dorzalnog korijena (engl. *dorsal root entering zone*)

### **6.5.3 Preklapanje signala imunofluorescencije dendrina s biljezima primarnih aferentnih nociceptivnih vlakna u dorzalnog rogu i u neuronima spinalnih ganglija**

Kolokalizacija dendrina i izolektina B4 (IB4), odnosno dendrina i peptida povezanog s genom za kalcitonin (engl. *calcitonin gene-related peptide*, CGRP) u središnjim projekcijama neurona spinalnih ganglija, odnosno u primarnim aferentnim nociceptivnim vlaknima dorzalnog roga KM, dobivena je dvostrukim imunofluorescencijskim bojenjem (Slika 29a, b). Kolokalizacija IB4 i dendrina u odnosu na ukupnu površinu područja od interesa iznosila je  $7,43 \pm 3,36\%$ , dok je ona CGRP i dendrina iznosila  $8,47 \pm 4,45\%$ , bez statistički značajnih razlika između skupina. Nadalje, istražili smo i izražaj dendrina u neuronima DRG. Pronašli smo snažnu imunoreaktivnost dendrina u somi neurona DRG imunoreaktivnih na IB4, CGRP i Neurofilament 200 (NF200) (Slika 29c-e). Također, pronašli smo kolokalizaciju dendrina s PGP 9.5 u perifernim neuronskim projekcijama spinalnih ganglija u tkivima kože i srca (Slika 29f, g).

**Slika 29. Izražaj dendrina u dorzalnom rogu KM, u neuronima DRG i perifernim aferentnim živcima.** (a, b) Izražaj dendrina u dorzalnom rogu KM nakon određivanja praga segmentacije imunofluorescencijskih slika. (a) Prikaz izražaja dendrina (zeleno), CGRP (crveno) i kolokalizacije (žuto). (b) Prikaz izražaja dendrina (crveno), IB4 (zeleno) i kolokalizacije (žuto) (povećanje objektiva – 20x; mjerna ljestvica: 200  $\mu$ m). (c, d, e) Prikaz neurona DRG nakon imunofluorescencijskog bojenja i kolokalizacije dendrina s tri neuronska biljega: (c) IB4, (d) CGRP i (e) NF200 (povećanje objektiva – 40x; mjerna ljestvica: 100  $\mu$ m). (f, g) Izražaj dendrina u perifernim aferentnim živčanim završecima kože i srca štakora. Reprezentativni prikaz presjeka (f) kože i (g) srca štakora: dendrin (zeleno) i PGP 9.5 (crveno). U srcu su dendrinska imunoreaktivna neuronska vlakna pronađena između kardiomiocita, u sub-endokardijalnim i sub-epikardijalnim područjima (nije prikazano) te oko krvnih žila (povećanje objektiva – 100x (f); 40x (g); mjerna ljestvica: 100  $\mu$ m). Vrhovi strelica označavaju imunoreaktivna živčana vlakna. (a, b – M-SH-C; c,g – mužjaci Sprague Dawley štakora starosti 3 mjeseca).





#### 6.5.4 Razlike izražaja dendrina između eksperimentalnih skupina

Istražili smo učinke spola, kroničnog stresa, kastracije (orhidektomije ili ovarijektomije) i kombinacije ovih čimbenika na izražaj dendrina u KM štakora. Za procjenu učinaka kroničnog stresa na izražaj dendrina, usporedili smo dvije muške lažno operirane skupine: M-SH-S i M-SH-C. Izražaj dendrina nije se povećao nakon izloženosti kroničnom stresu (relativna razlika = 0,35 puta; 95% interval pouzdanosti [CI] -0,426 do 1,127;  $P=0,4534$ ) (Slike 30, 31). Suprotno tome, kada smo usporedili lažno operirane skupine ženskog spola, izražaj dendrina gotovo se učetverostručio kod F-SH-S skupine u odnosu na F-SH-C skupinu (relativna razlika = 3.669 puta; 95% CI 1,261 do 6,079;  $P=0,0445$ ) (Slike 30, 32).

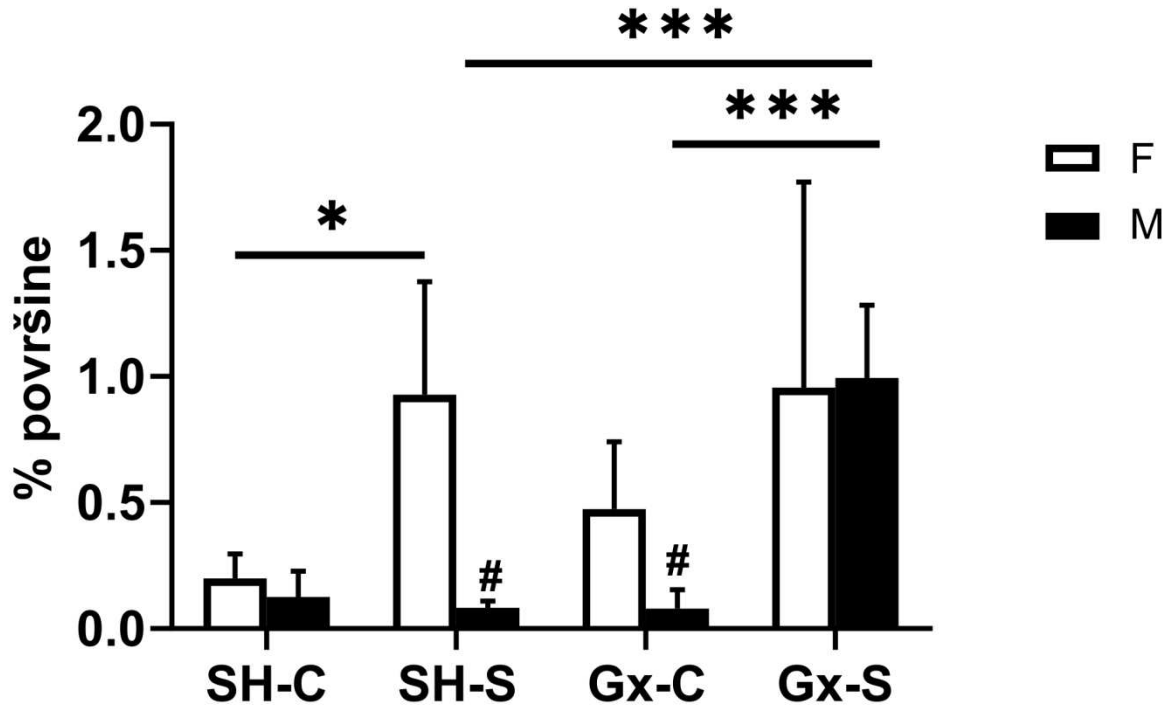
Učinak zahvata kastracije kroz usporedbu kontrolnih skupina (tj. skupina izloženih lažnim stresorima) štakora muškog spola (M-SH-C i M-Gx-C; relativna razlika = 0,376 puta; 95% CI -0,731 do 1,483;  $P=0,4709$ ) i ženskog spola (F-SH-C i F-Gx-C; relativna razlika = 1,387 puta; 95% CI -0,083 do 2,857;  $P=0,0809$ ) nije pokazao značajnu razliku (Slika 30).

Također, izolirani učinak razlike među spolovima nije pokazao značajnu razliku (M-SH-C u odnosu na F-SH-C skupinu; relativna razlika = 0,577 puta; 95% CI -0,673 do 1,827;  $P=0,3170$ ) (Slika 30). Međutim, nakon izlaganja kroničnom stresu štakori ženskog spola imali su deseterostruki porast izražaja dendrina u usporedbi s muškim spolom (F-SH-S u odnosu na M-SH-S skupinu; relativna razlika = 10,358 puta; 95% CI 5,351 do 15,353;  $P=0,0322$ ). Štoviše, kod kastriranih životinja izloženih lažnim stresorima došlo je do peterostrukog povećanja izražaja dendrina kod štakora ženskog spola u odnosu na muški spol (F-Gx-C u odnosu na M-Gx-C skupinu; relativna razlika = 5.034 puta; 95% CI 1,407 do 8,662;  $P=0,0266$ ).

Učinak kroničnog stresa na izražaj dendrina kod životinja podvrgnutih kastraciji istražen je usporedbom kastriranih skupina. Kastrirani štakori muško spola izloženi protokolu kroničnog stresa imali su značajno povećanje izražaja dendrina, za gotovo 12 puta (M-Gx-S u odnosu na M-Gx-C skupinu; relativna razlika = 11,653 puta; 95% CI 7,807 do 15,5;  $P=0,0003$ ) (Slike 30, 31). Suprotno tome, kombinacija kastracije i kroničnog stresa nije značajno utjecala na izražaj dendrina kod štakora ženskog spola (F-Gx-S u odnosu na F-Gx-C skupinu; relativna razlika = 1,015 puta; 95% CI -0,813 do 2,843;  $P=0,2204$ ) (Slike 30, 32).

Gore navedeni rezultati naveli su nas na procjenu utjecaja spolnih hormona na izražaj dendrina kod životinja izloženih kroničnom stresu (M-SH-S u odnosu na M-Gx-S skupinu; F-

SH-S u odnosu na F-Gx-S skupinu). Kod štakora muškog spola kastracija je značajno povećala učinak kroničnog stresa na izražaj dendrina i to 11 puta (relativna razlika = 11,166 puta; 95% CI 7,945 do 14,388; P=0,0005) (Slike 30, 31), dok kastracija kod štakora ženskog spola nije pokazala sinergistički učinak s kroničnim stresom (relativna razlika = 0,029 puta; 95% CI -1,093 do 1,153; P=0,9469) (Slike 30, 32).



**Slika 30. Graf izražaja dendrina u dorzalnom rogu KM u eksperimentalnim skupinama.**

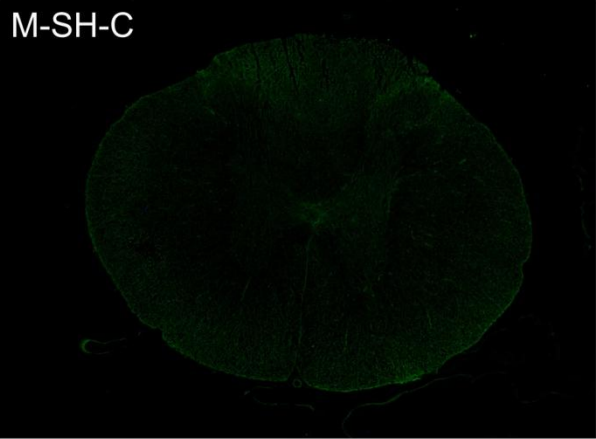
Izražaj dendrina kvantificiran je mjerenjem postotka fluorescencije (% površine); \* P<0,05; \*\*\* P<0,001 - statistički značajna razlika između navedenih skupina; # P<0,05 - statistički značajna razlika između spolova.

**Kratice:** SH-C – lažno operirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); SH-S – lažno operirana skupina izložena stresu; Gx-C – orhidektomirana/ovarijektomirana kontrolna skupina (izložena lažnim stresorima); Gx-S – orhidektomirana/ovarijektomirana skupina izložena stresu

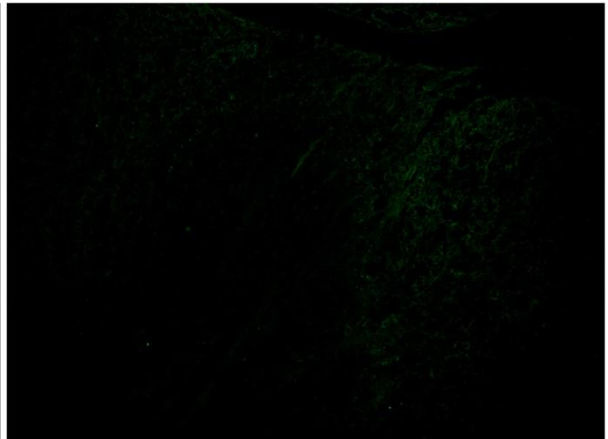
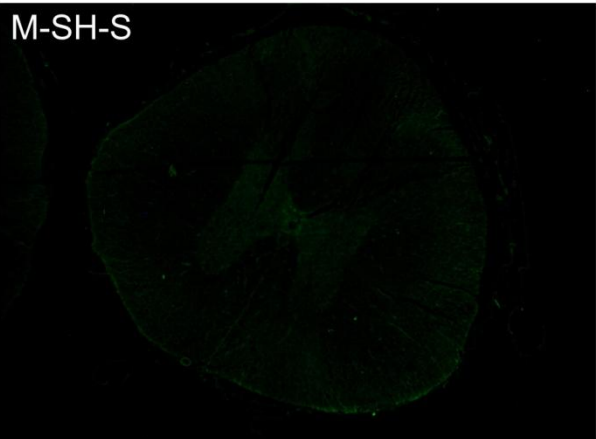
**Slika 31. Reprezentativne mikrofotografije izražaja dendrina u dorzalnog rogu KM eksperimentalnih skupina štakora muškog spola.** (Povećanje objektiva – 4x; mjerna ljestvica: 2 mm; i povećanje objektiva – 20x; mjerna ljestvica: 100  $\mu$ m).

**Kratice:** **M-SH-C** – lažno operirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-Gx-C** – orhidektomirani mužjaci izloženi lažnim stresorima; **M-SH-S** – lažno operirani mužjaci izloženi stresu; **M-Gx-S** – orhidektomirani mužjaci izloženi stresu

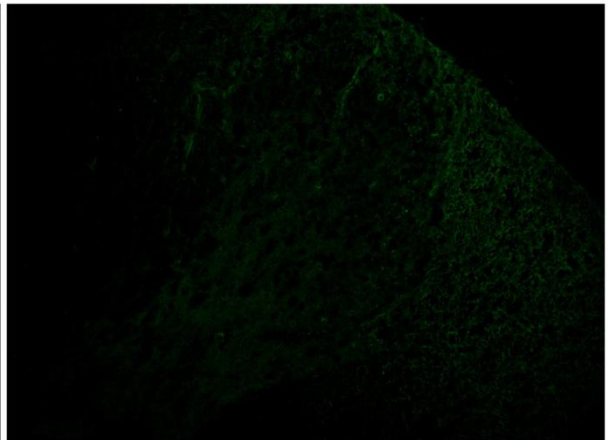
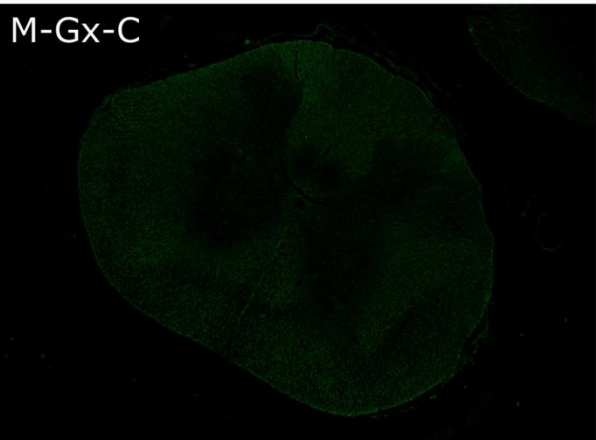
M-SH-C



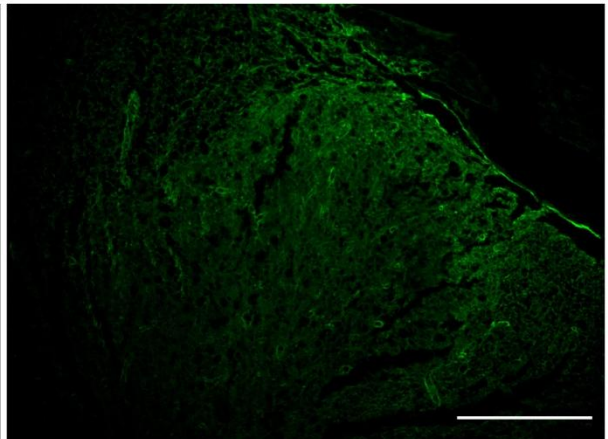
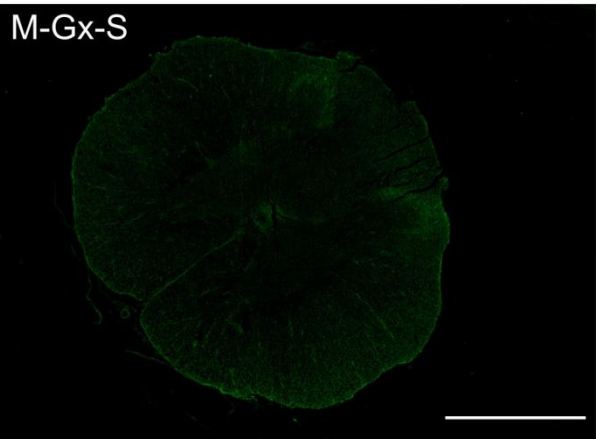
M-SH-S



M-Gx-C



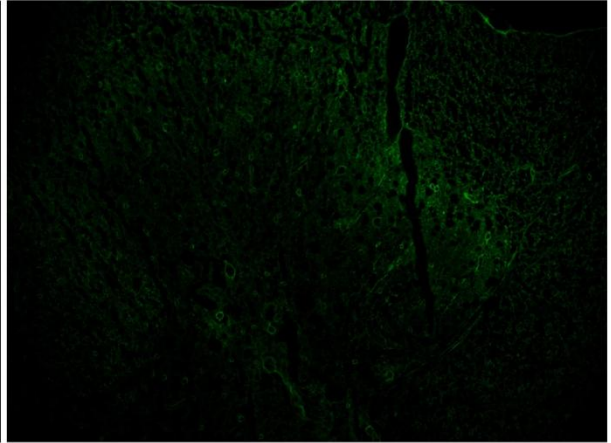
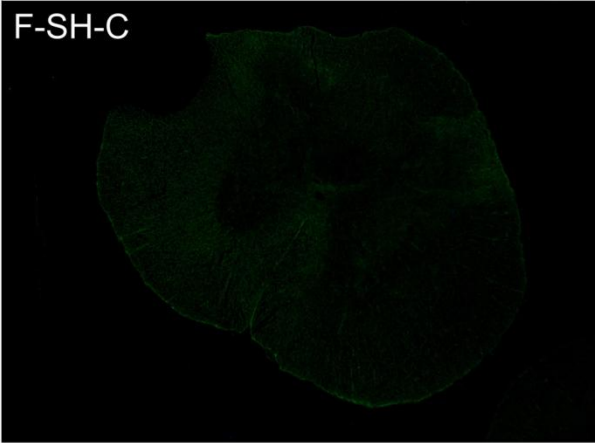
M-Gx-S



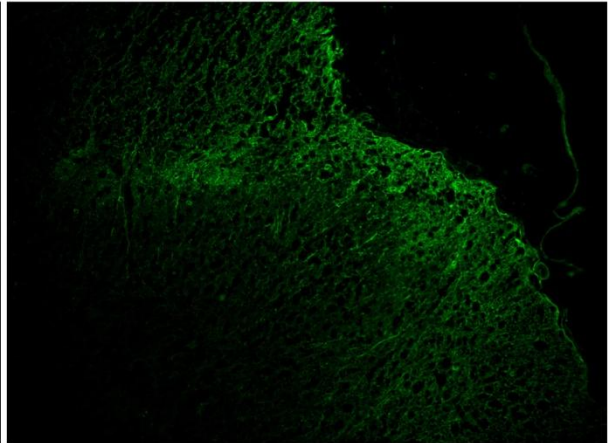
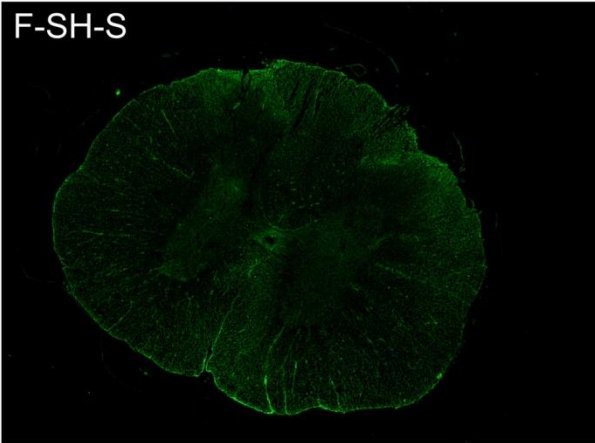
**Slika 32. Reprezentativne mikrofotografije izražaja dendrina u dorzalnom rogu KM eksperimentalnih skupina štakora ženskog spola.** (Povećanje objektiva – 4x; mjerna ljestvica: 2 mm; i povećanje objektiva – 20x; mjerna ljestvica: 100  $\mu$ m).

**Kratice:** **F-SH-S** – lažno operirane ženke izložene stresu; **F-Gx-S** – ovarijektomirane ženke izložene stresu; **F-SH-C** – lažno operirane ženke izložene lažnim stresorima; **F-Gx-C** – ovarijektomirane ženke izložene lažnim stresorima

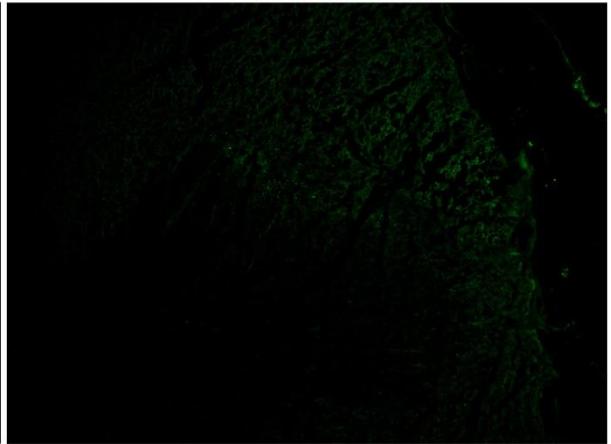
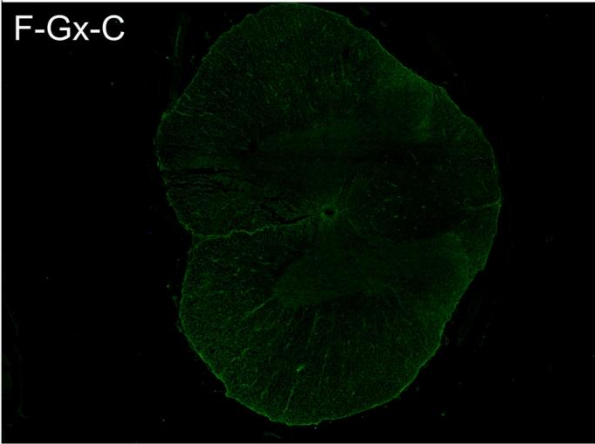
F-SH-C



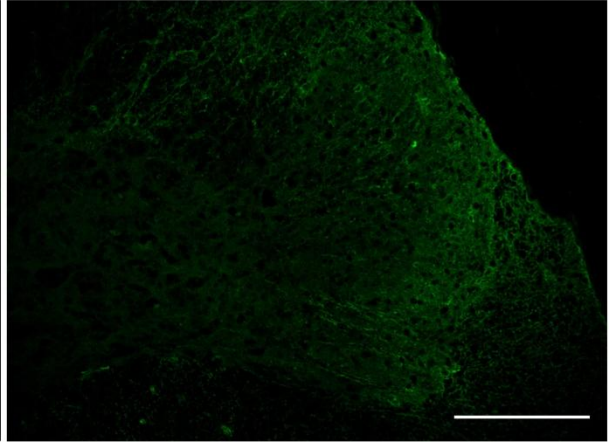
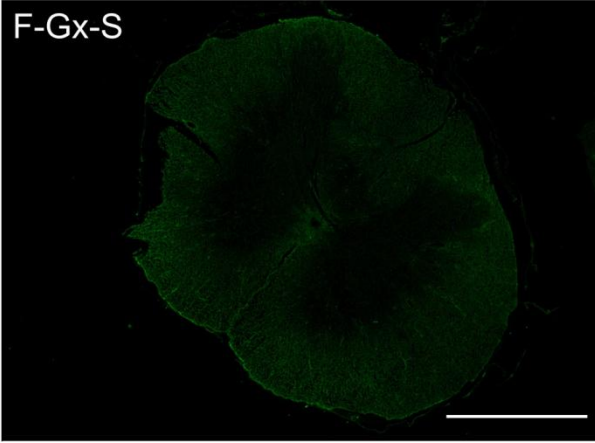
F-SH-S



F-Gx-C

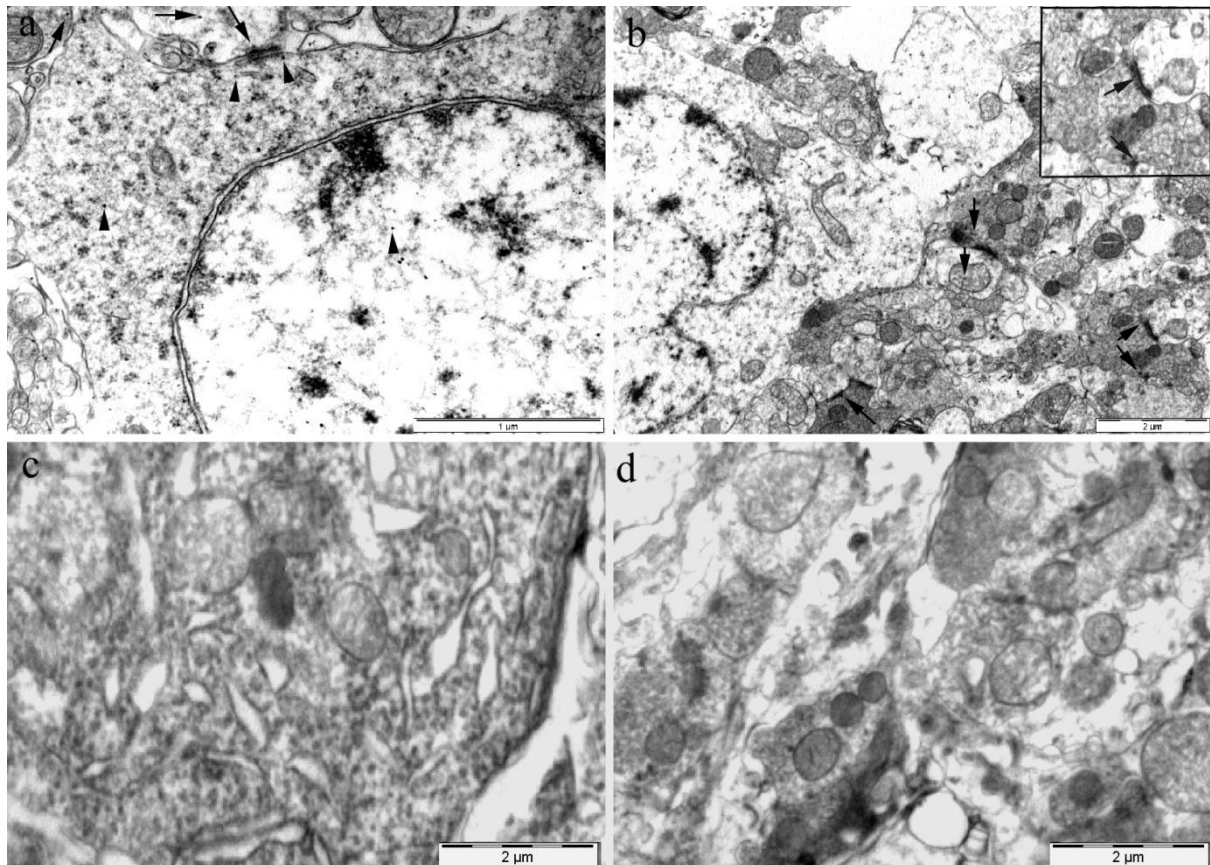


F-Gx-S



### 6.5.5 Ultrastrukturalna karakterizacija izražaja dendrina u dorzalnom rogu KM

TEM-om uz pomoć imunogold bojenja potvrđena je imunoreaktivnost dendrina u neuronima dorzalnog roga KM štakora. Očekivano, čestice zlata pronađene su u postsinaptičkom području, te u perikarionu i jezgri neurona, gdje je imunoreaktivnost dendrina bila nasumce raspršena. Iako rjeđe, čestice zlata pronađene su i u presinaptičkom području i aksonskim završecima. Imunoreaktivnost dendrina u tim područjima obično je bila vidljiva u blizini sinaptičkih vezikula i mitohondrija uz presinaptičku membranu (Slika 33).



**Slika 33. Reprezentativne TEM mikrofotografije imunoreaktivnosti dendrina u neuronima dorzalnog roga KM.** a) Imunogold bojenjem dendrin je vidljiv u aksonskim završecima i presinaptičkom području (strelice), kao i u somi neurona, postsinaptičkom području i jezgri (vrhovi strelica) (mjerna ljestvica: 1  $\mu\text{m}$ ). b) Imunogold bojenjem dendrin je vidljiv u aksonskim završecima i presinaptičkom području (strelice) (mjerna ljestvica: 2  $\mu\text{m}$ ). c) Negativna kontrola u području some neurona (mjerna ljestvica: 2  $\mu\text{m}$ ). d) Negativna kontrola u području aksonskih završetaka (mjerna ljestvica: 2  $\mu\text{m}$ ).



## **7. RASPRAVA**

## **7.1 Izražaj koneksina i dendrina u kralježničnoj moždini i ganglijima tijekom razvoja ljudskog zametka**

Koneksine, transmembranske proteine i građevne elemente pukotinskih spojišta, u KM možemo pronaći u neuronima i glijalnim stanicama. Pukotinska spojišta, kroz ulogu međustaničnog spoja, omogućavaju izravnu električnu i metaboličku komunikaciju između dviju susjednih stanica stvarajući električne sinapse i koordinirajući različite signalne putove, prijenos iona, te širenje upale (123). Smatra se da imaju ulogu i u kontroli glijalne proliferacije, mijelinizaciji neuronskih nastavaka i diferencijaciji matičnih stanica neurona (124-126). Uz to, oslobađanje molekula poput kalija, glutamata i ATP-a u izvanstanični prostor putem hemikanala u fiziološkim uvjetima može modulirati neuronsku aktivnost ili u patološkim stanjima dovesti do indukcije stanične smrti putem autokrine ili parakrine signalizacije (50, 125, 127). Sve tvari koje se mogu razmijeniti putem hemikanala imaju velik utjecaj na različite signalne putove. Stoga su koneksinski kanali presudni za održavanje i koordinaciju aktivnosti SŽS-a (50), te mutacije u genima pojedinačnih izoformi koneksina uzrokuju različita patološka stanja živčanog sustava (50, 62, 128, 129). Sve više neuroloških bolesti povezuje se s poremećajem izražaja koneksina, a samim tim i njihovih kanalnih funkcija. Postoje tri nasljedne bolesti povezane s mutacijama koneksinskih gena. Na primjer, Paznekas i sur. pronašli su mutacije u genu Cx43 kod bolesnika s autosomno dominantnim poremećajem okulodontodigitalne displazije (130). Druge bolesti temelje se na funkcionalnim modifikacijama različitih izoformi koneksina, te su povezane su s velikim spektrom neuroloških bolesti, od epilepsije do Alzheimerove bolesti i bolesti motornog neurona (131). Nadalje, pronađena je veza između autizma i promjena u izražaj Cx43 (132). Tijekom razvoja, neuralno međustanično pukotinsko spojište ima glavnu ulogu u komunikaciji između različitih vrsta stanica SŽS-a, čime se postiže koordinirani električni prijenos kroz električne sinapse (133). Dakle, koneksini imaju utjecaja i u formaciji sinaptičke plastičnosti, te samim time na učenje i pamćenje (50). Uzimajući u obzir sve gore navedeno, prostorno-vremenski izražaj koneksina tijekom embrionalnog razvoja može biti osnova za razumijevanje nastanka patoloških stanja uzrokovanih promjenom u izražaju, odnosno funkciji pojedinih koneksina.

Tijekom razvoja KM, koneksine možemo pronaći u svim vrstama stanica, gdje imaju različite funkcionalne uloge, od migracije stanica i diferencijacije neurona do oblikovanja uzoraka neuralne aktivnosti. To ukazuje na značajnost specifičnog prostorno-vremenskog izražaja različitih vrsta koneksina (58, 134). Unatoč opsežnom istraživanju njihove uloge tijekom razvoja SŽS-a, i dalje ne postoji dovoljno informacija o njihovom izražaju tijekom

embrionalnog i fetalnog razvoja KM kod čovjeka. Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi izražaj različitih vrsta koneksina u KM i ganglijima tijekom ranih faza razvoja čovjeka, a što bi potencijalno moglo ukazati na njihovu ulogu u embrionalnom/ranom fetalnom razvoju. Pronašli smo izražaj Cx37, Cx43 i Cx45 tijekom ranog razvoja čovjeka u svim područjima KM od interesa, u neuroepitelu INL-a, sloju plašta (DIL i VIL), te RP i FP. Također, pronašli smo značajni izražaj svih istraživanih koneksina u spinalnim i paravertebralnim simpatičkim ganglijima. Usporedili smo izražaj koneksina od interesa između različitih embrionalnih/ranih fetalnih razdoblja, tijekom 5 – 6., 7 – 8. i 9 – 10. razvojnog tjedna, ali nismo pronašli značajne razlike u izražaju koneksina između ispitivanih razdoblja ni u jednom od područja KM.

Izražaj koneksina u neuroepitelu INL-a podudara se s višestrukim dokazima koji ukazuju na to da koneksini imaju jednu od glavnih uloga u regulaciji proliferacije neuronskih matičnih stanica, kao i u diferencijaciji i migraciji neurona tijekom embrionalnog oblikovanja moždane kore. Naime, neuroblasti ili primitivne živčane stanice nastaju isključivo dijeljenjem neuroepitelnih stanica ventrikularnog sloja (1, 135). Ependimske stanice u odrasloj KM su pritajene matične stanice koje reakcijom na ozljedu omogućavaju određeni stupanj endogenog oporavka tkiva. Nadalje, signalizacija putem koneksina uključena je u reaktivaciju latentnih matičnih stanica nakon ozljede KM. S obzirom da se nakon blokade koneksinskih kanala smanjila proliferacija ependimskih stanica izazvana ozljedom, Fabbiani i sur. smatraju da su upravo koneksini ključni za tu ranu reakciju ependimskih stanica na ozljedu, a što predstavlja važnu kariku u poboljšanju razumijevanja načina na koji matične stanice CC sudjeluju u oporavku tkiva (136). Nadalje, Russo i sur. primijetili su u uzorcima tkiva KM kornjače veliku gustoću Cx43 na završecima izdanaka stanica koje su u kontaktu s CC, što podržava ključnu ulogu Cx43 u funkcionalnom grupiranju stanica tijekom neurogeneze KM (137). U postnatalnom hipokampusu, živčane matične stanice jako su dobro povezane pukotinskim spojištima građenim od Cx43, a *in vivo* delecija Cx43 utječe na neurogenezu hipokampusu (138). Označavanje stanica s bromodeoksiuridinom (BrdU) ukazalo je da to vrijedi i za mrežu tancita, stanica koje se smatraju prekursorima neurona hipotalamusa (139). Nadalje, virusno posredovana ablacija koneksina u proliferirajućim živčanim matičnim stanicama u zrelom živčanom sustavu također je uzrokovala smanjenje opsega neurogeneze (140). Model dvostrukog isključivanja gena za Cx30 i Cx43 ukazuje na oprečnu ulogu navedenih koneksina, gdje Cx43 potiče, a Cx30 ograničava preživljavanje novorođenih neurona tijekom neurogeneze u hipokampusu adultnog živčanog sustava (141, 142).

Nema mnogo istraživanja o izražaju koneksina tijekom razvoja KM u čovjeka. U istraživanju Zhan i Liu nije pronađen izražaj Cx43 u dorzalnom rogu KM, već samo u mijelinskim ovojnica tijekom drugog i trećeg mjeseca razvoja zametka, dok je tijekom četvrtog mjeseca razvoja opisan tek u nekim stanicama dorzalnog roga KM (143). Za razliku od njihovih rezultata, u našem istraživanju pronašli smo izražaj Cx43, kao i Cx37 i Cx45 u osjetnim područjima KM (AP) već u 6. tjednu embrionalnog razvoja. Sličan obrazac izražaja pronašli smo i u motoričkim područjima KM (BP). Dobiveni rezultati preklapaju se s rezultatima do sada objavljenih istraživanja provedenih na životinjama. Naime, električne sinapse između motornih neurona SŽS-a imaju posebnu ulogu u neuralnom razvoju. Promatrajući lumbalne motorne neurone u KM novorođenih štakora, Chang i sur., opisali su prostorno-vremenske uzorke izražaja koneksina. Tijekom embrionalnog razvoja pa do odrasle dobi Cx36, Cx37 i Cx43 imali su ravnomjerni izražaj, dok se izražaj Cx40 i Cx45 smanjivao (88). Chang i sur. pronašli su jaki izražaj svih istraživanih koneksina u ventralnom dijelu KM štakora u razvoju, što se podudara s našim rezultatima izražaja za Cx37, Cx43 i Cx45 u BP KM ljudskih zametaka promatrano kroz slična razdoblja embrionalnog/ranog fetalnog razvoja. Razvoj stanice od neuroblasta do neurona u ventralnom dijelu KM, uključuje apolarnu i bipolarnu fazu tijekom stvaranja primitivnog aksona i dendrita. Stvoreni multipolarni neuroblasti daljnjim razvojem postaju zrele živčane stanice, odnosno neuroni (1). Utvrđeno je da prekomjerna izražaj koneksina Cx32 i Cx43 na PC12 stanicama izloženim neuralnim faktorima rasta koji potiču neurogenezu, uzrokuje pojačani rast neuralnih izdanaka PC12 stanica, otpuštajući ATP hemikanalima u okolni medij i pri tome djelujući na purinergičke receptore (144). Stoga bi izražaj koneksina koji smo pronašli u motornim i osjetnim područjima KM u razvoju mogao biti povezan i s njihovom ulogom poticanja rasta izdanaka neurona.

U ovom smo istraživanju pronašli smo dominantan izražaj Cx37 u većini analiziranih područja KM. Nije pronađena značajna razlika između izražaja Cx45 i Cx43. Izražaj Cx37 i Cx45 nije se značajno razlikovao uspoređujući međusobno njihova područja od interesa u KM, te u spinalnom gangliju. Međutim, izražaj Cx43 bio je veći u spinalnom gangliju u odnosu na izražaj u INL, VIL, DIL i FP području. Ovaj specifični prostorni uzorak izražaja potencijalno može ukazivati na njihovu važnu ulogu u razvoju KM i spinalnog ganglija, s naglaskom na Cx37 tijekom diferencijacije neurona i glije u KM, te s približno izražajem sva tri koneksina tijekom diferencijacije stanica spinalnog ganglija.

Cx43 je najopsežnije proučavan član obitelji koneksinskih proteina tijekom razvoja. Jourdeuil i Taneyhill pronašli su izražaj Cx43 u neuralnim naborima i u premigratornim stanicama neuralnog grebena tijekom spajanja neuralnih nabora, kao i u migrirajućim stanicama neuralnog grebena tijekom epitelno-mezenhimske tranzicije (EMT) (145). Gore navedeno ukazuje na ključnu ulogu Cx43 u stanicama neuralnog grebena tijekom EMT-a, migracije i gangliogeneze. S druge strane, prema dosadašnjim podacima, Cx37 je najrasprostranjeniji u endotelnim stanicama zrelog SŽS (78, 86). Tijekom razvoja, Cx37 ima važnu ulogu u vaskulogenezi. Uz to, Cx37 i Cx40 sudjeluju u održavanju endotelne komunikacije omogućavajući pri tome normalan vaskularni razvoj (84). Endotelne stanice neuralnog tkiva kao dio krvno-moždane barijere imaju složeniju ulogu nego bilo gdje drugdje u tijelu. Osiguravaju potpuno odvajanje cirkulirajućih tvari iz krvi od neuralnog tkiva SŽS-a, te na taj način omogućavaju održavanje dobro uravnoteženog mikrookoliša (44). Stoga, promjena u količini Cx37, osim što uzrokuje razne vaskularne abnormalnosti, može potencijalno imati i utjecaj na propusnost krvno-moždane barijere (84, 85).

Tijekom razvoja, stanice spinalnog ganglija nastaju iz stanica neuralnog grebena, te tvore dva izdanka. Središnji izdanci prodiru u dorzalni dio neuralne cijevi, gdje stvaraju sinapsu s drugim neuronima, čiji se izdanci potom uspinju do viših moždanih centara. Periferni izdanci spajaju se s vlaknima ventralnih (motornih) korjenova s kojima tvore spinalne živce preko kojih naposljetku završavaju na osjetnim receptorskim organima (1). Nedavna istraživanja neuropatske boli pokazala su presudnu ulogu hemikanala Cx43, kao i pannexin-1 u neuronima KM i DRG (146). Snažni izražaj koneksina u spinalnim i simpatičkim ganglijima prikazan u našem istraživanju mogao bi se povezati s već spomenutom ulogom poticanja rasta neuralnih izdanaka (144). Uz to, mogli bi imati ulogu i tijekom migracije stanica neuralnog grebena koja se može povezati s do sada već dokazanom ulogom koneksina u migraciji kortikalnih neurona. U svom istraživanju, korištenjem kratke RNA molekule sa strukturom ukosnice (engl. *short hairpin RNA*, shRNA), Elias i sur. su postigli značajno smanjenje izražaja Cx26 i Cx43, te na taj način utjecali na migraciju neurona u kortikalnu ploču štakora. Zaključili su da uzrok poremećaja migracije kortikalnih neurona nije promjena u kanalnoj funkciji pukotinskih spojišta, već u njihovim adhezijskim svojstvima (147). Nadalje, Cina i sur. opisali su prostorno-vremenski izražaj koneksina tijekom radijalne migracije novonastalih neurona u kortikalnu ploču moždane kore u razvoju. U razvojnom korteksu bio je prisutan izražaj Cx26, Cx36, Cx37, Cx43 i Cx45, dok je izražaj Cx30 i Cx32 nedostajao, a Cx40 bio vrlo nizak (148). U drugom istraživanju, Cina i sur.

pokazali su da se migracija neurona neće dogoditi ako se Cx43 ukloni iz radijalne glije miševa, posebno ako Cx43 nedostaje citoplazmatski C-terminalni kraj (149). Ruangvoravat i Lo (150) proučavali su izražaj Cx43 tijekom mišje embriogeneze koristeći hibridizaciju *in situ*, od 4,5 do 12,5 dana trudnoće, pri čemu su otkrili prisutnost transkripata Cx43 u neuralnoj cijevi embrija starog 10,5 dana. Njihovi rezultati upućuju na to da stanice neuralnog grebena i sklerotoma, tj. migrirajuće stanice tijekom razvoja, sadržavaju visoku razinu transkripata Cx43. Štoviše, nalaz različitih koneksina u tkivima porijeklom iz neuralnog grebena u skladu je s prethodnim podacima o važnosti pukotinskih spojišta u preživljavanju stanica neuralnog grebena tijekom razvoja (151). Osim gore spomenutih potencijalnih uloga koneksina, pukotinska spojišta imaju ulogu električnih sinapsi, preko kojih sinkroniziraju aktivnost neuralnih stanica tijekom razvoja, kao i u zreлом SŽS-u, na taj način stvarajući osnovu neuralne aktivnosti i prije formiranja kemijskih sinapsi (53, 54). Upravo tijekom embrionalnog i ranog postnatalnog razvoja količina pukotinskih spojišta je na svom vrhuncu, nakon čega slijedi smanjenje (152). Navedeni podaci su u skladu s našim pronalaskom neuro-neuralnih i neuro-glijalnih pukotinskih spojišta u spinalnom gangliju čovjeka tijekom razvoja uz pomoć TEM-a.

U sloju plašta KM, kao i u spinalnom gangliju, pronađena je značajna kolokalizacija sva tri koneksina s PGP 9.5, biljgom za neurone. Međutim, vidljivo je da izražaj koneksina u KM nije ograničen samo na neurone s PGP 9.5 imunoreaktivnošću, već je bio prisutan i u PGP 9.5 negativnim stanicama, uključujući i stanice neuroepitela INL-a, te stanice koje okružuju neurone spinalnih ganglija, odnosno buduće satelitske stanice. Prisutnost koneksina u neuronima KM tijekom razvoja mogla bi biti povezana s prethodno opisanom ulogom Cx43 u neurogenezi mozga (135). Uz to, mogla bi biti povezana i s ulogom pukotinskih spojišta u staničnoj smrti uzrokovanoj poremećajem funkcije NMDA receptora neurona u razvoju (153). Pored kolokalizacije s PGP 9.5, pronašli smo i kolokalizaciju Cx37, Cx43 i C45 s GFAP u RP području fetusa čovjeka starog 10 tjedana. Međustanično povezivanje glija stanica omogućava stvaranje glijalnog sincicija koji ima ulogu u širenju valova  $Ca^{2+}$ , prijenosu metabolita, te mogućnost utjecaja na izvanstaničnu koncentraciju  $K^+$ , a samim tim na aktivnost neurona (154). Nadalje, uloga koju Cx43 ima u ozljedama mozga čini se posebno važnom, budući da se specifičnim peptidnim inhibitorom Cx43 hemikanala onemogućava migracija astrocita, važan proces potreban za stvaranje glijalnog ožiljka (155). Uz to, utvrđeno je da astrocitni sigma-1 receptori imaju utjecaja na izražaj Cx43, čime mogu potaknuti aktivaciju mehaničke alodinije kod miševa s ozlijeđenom KM (156). Štoviše, podaci ukazuju na to da astrocitni

Cx43-hemikanali negativno utječu na proces remijelinizacije podržavanjem lokalne upale (157). Decrock i sur. opisali su važnost koneksinskih kanala u interakciji između neuronskih, glijalnih i vaskularnih odjeljaka SŽS-a. Koneksinskim kanalima omogućava se fina regulacija različitih signalnih putova, osiguravajući na taj način pravovaljani odgovor na različite podražaje u svrhu očuvanja homeostaze SŽS-a (50). Stoga, prisutnost kolokalizacije konkesina s GFAP-om u KM tijekom razvoja mogla bi biti povezana s ulogom glijalnih koneksina tijekom ranog razvoja fetusa u različitim, gore spomenutim, procesima. S druge strane, postoji i mogućnost stvaranja koneksinskih kanala s heteromernim koneksonima građenim od Cx43 i Cx45. Homomerna/homotipska pukotinska spojišta razlikuju se od heteromernih po vodljivosti, selektivnosti i permeabilnosti (158). Provodljivost, permeabilnost i kanalna svojstva heteromernih pukotinskih spojišta Cx43/Cx45 pronađenih u astrocitima razlikuju se od homomernih kanala građenih od različitih izomera koneksina (159-161). Raznolikost građe koneksinskih kanala potencijalno može imati utjecaja na rafiniranost međustanične komunikacije tijekom razvoja živčanog sustava.

U ovom smo istraživanju pronašli specifičan uzorak izražaja koneksina u moždanim ovojnica tijekom razvoja. Cx37 je bio snažno imunoreaktivan u sva tri meningealna sloja. PM, AM i DM. Međutim, najjači imunofluorescencijski signal Cx37 zamijećen je u AM, dok najslabiji u PM. Za razliku od Cx37, imunoreaktivnost Cx43 nije bila prisutna u PM, ali je bila prisutna u AM i DM, s najjačim imunofluorescencijskim signalom pronađenim u AM. Za razliku od Cx37 i Cx43, imunoreaktivnost Cx45 u meningealnim slojevima bila je samo slabo prisutna u AM i PM, te u potpunosti odsutna u DM. Rezultati izražaja koneksina u moždanim ovojnica ukazuju na važnost međustanične povezanosti i sinkronizacije stanica ljudskih moždanih ovojnica tijekom razvoja.

Na kraju, pronašli smo i snažni izražaj svih istraživanih koneksina u stanicama notokorda, gdje je imunoreaktivnost Cx37 bila najjača, a Cx43 najslabija. Vrijedno je spomenuti da je imunoreaktivnost svih istraživanih koneksina u notokordu bila znatno jača u usporedbi s imunoreaktivnošću u drugim neuralnim tkivima. U notokordu imunoreaktivnost svih istraživanih koneksina kolokalizirala je s jakim izražajem GFAP-a, kao i s još jačom imunoreaktivnošću PGP 9.5. Kao što smo već spomenuli, notokord izlučuje ključni signal, Shh, za indukciju diferencijacije neuralnih stanica podnih ploča, motornih neurona i ventralnih interneurona (3, 7, 8). Međustanično spajanje notokordnih stanica pomoću pukotinskih spojišta potencijalno pruža sinkronizaciju tih stanica, koja je važna u regulaciji

signalizacije i uspostavi gradijenta morfogena presudnih za specijalizaciju podtipova ventralnih stanica KM (7).

Uzimajući u obzir naše rezultate kao i gore spomenute podatke iz literature, izražaj Cx37, Cx43 i Cx45 u KM, DRG i simpatičkim ganglijima tijekom ranog ljudskog razvoja ukazuje na njihovu ulogu u procesima stvaranja, migracije i pozicioniranja neurona u KM i ganglijima. Stoga poremećaji u njihovom izražaju mogu dovesti do patološkog razvoja živčanog sustava, te rezultirati različitim malformacijama i neurološkim bolestima. Pored već opisane izravne uloge koneksina u ženskoj neplodnosti utjecanjem na razvoj zametne linije, oogenezu, implantaciju i decidualizaciju (162, 163), poremećaj izražaja koneksina mogao bi biti uzrok embrionalne smrti uslijed malformacija nastalih tijekom razvoja živčanog sustava.

Jedan od ciljeva istraživanja bio je prikazati prisutnost dendrina u KM tijekom razvoja čovjeka. Tijekom razvoja KM, dendrin smo pronašli u neuroepitelu ventrikularnog sloja, bazalnim pločama i spinalnim i paravertebralnim simpatičkim ganglijima. Imunoreaktivnost dendrina bila je najizraženija u neuroepitelu INL područja tijekom sva tri istraživana razdoblja, što ukazuje na njegov potencijalni značaj u regulaciji proliferacije stanica ovoga sloja čijim dijeljenjem nastaju neuroblasti (1, 135). Jaka imunoreaktivnost dendrina koju smo pronašli u VIL, odnosno području BP – budućim motornim regijama KM u najranijem istraživanom razdoblju (6 tjedana), te njegov slabiji izražaj u spinalnim i simpatičkim ganglijima tijekom razvoja, ukazuje na njegovu potencijalnu ulogu u razvoju, migraciji i pozicioniranju neurona u KM i ganglijima, kao i njegov mogući utjecaj na rano oblikovanje uzoraka neuralne aktivnosti. Ovo je prvo istraživanje koje opisuje izražaj dendrina u KM čovjeka tijekom embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja. Daljnja istraživanja potrebna su da bi se preciznije razjasnila njegova uloga u razvoju KM i živčanog sustava općenito.



## 7.2 Izražaj koneksina u kralježničnoj moždini nakon kastracije i izlaganja kroničnom stresu

Pukotinska spojišta u SŽS-u predstavljaju jednu od važnih karika međustanične komunikacije koja omogućava usklađivanje električne i metaboličke aktivnosti (51). Plastične promjene u izražaju i funkcijama koneksina naposljetku mogu dovesti do razvoja različitih patoloških stanja (57, 86). Njihova uloga, raspodjela i organizacija unutar neuronskih krugova područja KM zaduženih za obradu boli još uvijek je nepoznata. U ovom istraživanju proučavane su promjene izražaja koneksina u dorzalnom rogu KM nakon izlaganja kroničnom stresu i kastraciji. Dobiveni rezultati mogu dati objašnjenje za spolno specifične razlike kod učestalosti stanja kronične boli. Proučavali smo izražaj glijalnog Cx43 (164), te Cx37 i Cx40 kojima je izražaj prethodno utvrđen u endotelnim stanicama SŽS (41, 78, 86), kao i u neuronima KM (88).

Izražaj Cx37 zabilježen je u KM štakora (88, 165) i vodozemaca (*Necturus Maculatus*) (166), ali bez detaljnijeg opisa njegovog smještaja na staničnoj razini. Uz to, snažni izražaj Cx37 pronađen je u motornim područjima KM u razvoju, te u motornim neuronima odraslih štakora (88). Izražaj Cx37 koji smo zapazili u jezgri nije novost. Prisutnost nuklearnog koneksina povezana je s regulacijom izražaja gena za kontrolu rasta i diferencijacije preko mehanizama neovisnih o njegovim kanalskim funkcijama (167-171). Iako su primarno vezani za staničnu membranu (172), koneksine također možemo pronaći u citoplazmi u fiziološkim, ali i u nekim patološkim stanjima (170, 171, 173) upravo zahvaljujući njihovom kratkom poluvijeku života, tijekom kojeg se neprestano sintetiziraju i razgrađuju. Uz izražaj vidljiv u neuronima, imunoreaktivnost Cx37 pronađena je i u GFAP-imunoreaktivnoj astrogliji koja je okružuje krvne žile. Prethodna istraživanja opisala su prisutnost Cx37 uglavnom u vaskularnom endotelu, te u monocitima/makrofazima (174). Imunoreaktivnost Cx37 vidljiva je i u endimskim stanicama CC, kao i u području koje ga okružuje (lamina X). Izloženost kroničnom stresu nije uzrokovala promjene u izražaju Cx37 u dorzalnom rogu. Kod štakora ženskog spola ovarijektomija je rezultirala povećanjem izražaja Cx37, dok je utjecaj kroničnog stresa suzbio taj učinak. Istodobni utjecaj kroničnog stresa i orhidektomije uzrokovao je povećanje izražaja Cx37 kod štakora muškog spola. Promjena u kolokalizaciji Cx37 s GFAP među skupinama bila je paralelna s promjenom ukupnog Cx37 samo kod muških životinja, s najmanjim stupnjem kolokalizacije kod orhidektomiranih štakora. U području oko (i uključujući) CC samo je kombinirana izloženost kroničnom stresu i ovarijektomiji povećala ukupni izražaj Cx37, kao i u područjima gdje Cx37 kolokalizira s

GFAP-om. Opisano je da je povećanje izražaja Cx37 u živčanom tkivu nakon ozljede perifernog živca povezano s hiperekscitabilnošću (165). Stoga se može pretpostaviti da promjene u izražaju Cx37 mogu biti uzrok promjenama ekscitabilnosti neurona KM kod štakora nakon izlaganja kroničnom stresu.

S druge strane, vidljiva je snažna imunoreaktivnost Cx40 u citoplazmi neurona KM. TEM-om smo potvrdili prisutnost Cx40 u citoplazmi, kao i u aksodendritičnim i aksoaksonskim sinapsama. Za razliku od Cx37, Cx40 nije bio prisutan u jezgrama neurona. Do danas je izražaj Cx40 proučavan samo u motornim neuronima štakora tijekom razvoja i u odrasloj dobi (88). Na modelu miša s isključenim genom za Cx40 utvrđena je uloga međustaničnih spojeva građenih od Cx40 u moduliranju aktivnosti neuromuskularnih sinapsi (175). Pronašli smo snažnu imunoreaktivnost Cx40 u citoplazmi svih promatranih motornih neurona i brojnih drugih neurona u dorzalnog rogu KM, sa sličnim uzorkom imunoreaktivnosti kao u prethodno spomenutoj studiji Changa i sur., u vidu znatog intenzivnog bojenja u citoplazmi i membrani (88). Imunoreaktivnost Cx40 preklapa se s imunoreaktivnošću GFAP-a u astrocitima uz krvne žile, kao i u astrocitima ne vezanim uz njih. Intenzivna imunoreaktivnost Cx40 pronađena je i u endodimskim stanicama CC.

Izolirano djelovanje kastracije ili kroničnog stresa nije uzrokovalo promjene u ukupnom izražaju Cx40, kao ni u područjima dorzalnog roga u kojima Cx40 kolokalizira s GFAP-om. Međutim, i kod štakora muškog i ženskog spola kombinirani učinak kroničnog stresa i kastracije djelovao je na ukupni izražaj Cx40 u dorzalnog rogu, ali sa suprotnim smjerom promjene. U kombinaciji s kroničnim stresom, ovarijektomija je uzrokovala porast, dok je orhidektomija uzrokovala smanjenje izražaja Cx40. Izražaj Cx40 u područjima kolokalizacije s GFAP značajno se povećao samo u ženki ovarijektomiranih štakora. U području CC kastracija je rezultirala povećanjem ukupnog izražaja Cx40 u štakora ženskog spola i smanjenjem izražaja Cx40 (ukupnog i astroglijalnog) u štakora muškog spola. Ovi rezultati ukazuju da estrogen može suzbiti, dok s druge strane, testosteron može povećati izražaj Cx40. Smanjeni izražaj Cx40 u dijabetesu dovodi do patološke komunikacije između stanica, prvenstveno neadekvatnog spajanja astrocita i neurona, što uzokuje vaskularnu disfunkciju u SŽS-u (176). Stoga bismo mogli pretpostaviti da bi sličnim mehanizmima uočene promjene u izražaju Cx40 u KM, uzrokovane združenim učinkom kastracije i kroničnog stresa, mogle rezultirati poremećajem somatske i visceralne percepcije boli.

Imunoreaktivnost Cx43 u KM štakora većinski kolokalizira s GFAP-imunoreaktivnim astrocitima, uključujući i astrocitate oko krvnih žila. Dobiveni podaci u skladu su s prethodnim

istraživanjem koje opisuje dominantan izražaj Cx43 u KM u stanicama mikroglije i astrocitima, gdje ima važnu ulogu u njihovoj interakciji i prijenosu iona (123). Vrlo rijedak izražaj Cx43 viđen je u neuronima, odnosno u somi neurona, što je i potvrđeno TEM-om. Imunoreaktivnost Cx43 bila je prisutna u ependimskim stanicama CC. Uspoređujući izražaj istraživanih koneksina u KM vidljiv je dominantan izražaj Cx43, što je u skladu s prethodnim istraživanjima (172, 177). Iako je izražaj Cx43 u dorzalnom rogu bio veći u štakora ženskog spola u odnosu na štakore muškog spola, učinak kroničnog stresa ili kastracije, pojedinačno ili u kombinaciji, nije utjecao na ukupni izražaj Cx43. Međutim, izražaj Cx43 u dorzalnom rogu štakora muškog spola u kolokalizaciji s GFAP se povećao nakon združenog učinka kroničnog stresa i kastracije. S druge strane, izražaj Cx43 u području oko CC značajno se povećao samo kod štakora ženskog spola nakon kastracije i izlaganja kroničnom stresu. Budući da nisu pronađene značajne promjene u postotku kolokalizacije Cx43 s GFAP-om, može se zaključiti da se ovaj porast Cx43 javlja u stanicama koje nisu astroglia. Mnoga istraživanja ukazuju na to da se povećanje izražaja Cx43 u astrocitima i mikrogliji KM javlja u raznim patološkim stanjima poput upale, nakon moždanog udara, kao i nakon ozljede KM, te da pri tome ima ulogu u održavanju aktivacije astrocita, modulaciji prijenosa signala i pokretanju upalne kaskade (53, 89). Svi ti događaji u konačnici mogu dovesti do oštećenja živčanog tkiva i nastanka kronične boli (178).

Razlika u izražaju Cx43 između kontrolnih skupina štakora muškog i ženskog spola u skladu je s podacima o utjecaju spola na izražaj Cx43 u kardiomiocitima (179). Za razliku od naših rezultata, Golovatscka i sur. prikazali su smanjenje ukupne količine Cx43 u KM štakora nakon ponovljenog izlaganja testu izbjegavanja vode (45). Uzrok razlike između njihovog i našeg rezultata istraživanja može se objasniti kroz upotrebu različitih vrsta stresora, te različitim vremenom izloženosti pojedinom stresoru.

Hormoni, općenito, igraju važnu ulogu u funkciji živčanog tkiva. Spolni hormoni imaju neuroprotektivnu ulogu, koja se očituje u djelovanju na propusnost krvno-moždane barijere. Stanice krvno-moždane barijere imaju kompleksnu ulogu osiguravajući odvajanje cirkulirajućih tvari u krvi od živčanog tkiva, te pružajući na taj način dobro uravnoteženo mikrookruženje moždanog parenhima (44). Uz endotelne stanice, tu ulogu imaju i druge pridružene stanice, uključujući astroglia i pericite. Funkciju krvno-moždane barijere omogućavaju tijesni i prijanjajući spojevi između endotelnih stanica, koji čvrsto zatvaraju svoje međustanične pukotine osiguravajući rigoroznu regulaciju prolaska tvari (180). Prijašnja istraživanja ukazuju na to da su koneksini jedan od ključnih elemenata za održavanje

funkcionalnosti krvno-moždane barijere (86). Smatra se da je upravo međustanična razmjena informacija preko koneksinskih kanala važna za održavanje barijere, kao i njihovo djelovanje na proteine tijesnih spojeva kojim reguliraju propusnost krvno-moždane barijere (86, 180, 181). Međutim, uloga koneksina u funkciji krvno-moždane barijere u različitim fiziološkim i patološkim stanjima još nije u potpunosti razjašnjena. Neka od istraživanja ukazuju da sudjelovanje koneksina u oslobađanju proupalnih medijatora utječe na propusnost krvno-moždane barijere u patološkim stanjima (180).

S druge strane, smatra se da neuroprotektivna uloga spolnih hormona proizlazi iz utjecaja na endotelne stanice, pri čemu, mijenjajući njihove funkcije, pojačavaju tijesne spojeve između endotelnih stanica i pružaju protuupalni odgovor koji ograničava ekstravazaciju limfocita (182). Kastracijom uzrokovano smanjenje razine spolnih hormona dovodi do veće propusnosti krvno-moždane barijere, što bi s obzirom na naše rezultate moglo biti, barem djelomično, objašnjeno promjenom izražaja koneksina (76, 182-184). U skladu s tim, promjene u izražaju koneksina koje smo pronašli u KM štakora nakon izlaganja kastraciji i kroničnom stresu mogu potencijalno uzrokovati promjene u percepciji boli, kao i promjene u funkciji i cjelovitosti krvno-moždane barijere.

Nadalje, izlaganje stresu uzrokuje aktivaciju neuroendokrinog sustava, što je glavni odgovor na bilo koji poremećaj homeostaze, a što posljedično rezultira promjenom sastava cirkulirajuće plazme (185). Neuroendokrini odgovor uključuje oslobađanje glukokortikoida. Uloga glukokortikoida smatra se protuupalnom i imunosupresivnom kada je posredovana upalom. Međutim, u uvjetima kroničnog stresa, s kronično povećanim koncentracijama glukokortikoida, smatra se da glukokortikoidi povećavaju izražaj proupalnih čimbenika (186, 187). Ovisno o vrsti podražaja, individualnoj osjetljivosti i proučavanoj regiji, odgovori na kronični stres mogu na kraju dovesti do promjena SŽS-a (41). Rezultati našeg istraživanja pokazali su povećanu osjetljivost KM na stres nakon kastracije, što je uzrokovalo dodatne promjene u izražaju koneksina.

Svi istraživani koneksini pokazali su snažnu imunoreaktivnost u endodimskim stanicama CC. Dokazano je da su endodimske stanice CC zapravo pritajene matične stanice, koje se reaktiviraju nakon ozljede KM (136). Također, pukotinska spojišta građena od Cx26 i Cx43 važna su za reaktivaciju endodimske proliferacije (136), te neurogenezu u KM (137). Uz to, Cx50, čija se razina smanjuje nakon ozljede KM (168), ima utjecaja na izražaj Sox2, koji je presudan za samoobnavljanje pluripotentnosti neuronskih matičnih stanica i pretvorbu

glija stanica u neurone (188). Stoga, naši rezultati ukazuju na potencijalni učinak kroničnog stresa i kastracije na potencijal ependimskih stanica CC u regeneraciji KM.

Uzimajući u obzir glavnu ulogu površinskih lamina dorzalnog roga u percepciji i modulaciji boli (189), te spektar različitih uloga pripisanih neuronima lamine X (oko CC), uključujući i put visceralne nocicepcije (190), može se pretpostaviti da promjene u izražaju koneksina u tim područjima koje smo utvrdili nakon izlaganja kroničnom stresu i kastraciji, mogu imati ulogu u maladaptaciji somato- i viscerosenzornih putova.

Na kraju, naše istraživanje pokazuje da kronični stres udružen sa smanjenjem razine spolnih hormona može uzrokovati poremećaj izražaja koneksina KM. Ove promjene mogu biti jedan od vodećih mehanizama koji dovodi do poremećaja percepcije boli nakon kroničnog izlaganja stresu.

### **7.3 Izražaj dendrina u kralježničnoj moždini ljudskog zametka i nakon kastracije štakora i izlaganja kroničnom stresu**

Kronični stres često se povezuje sa stanjima kronične boli, poput fibromijalgije, sindroma iritabilnog crijeva ili neuropatske boli (43, 46). Uzrok tim bolnim stanjima su neuroplastične izmjene električnih svojstava koje uzrokuju povećanu ekscitabilnost neurona, kao i značajne promjene u propusnosti krvno-moždane barijere (41, 44). Epidemiološka istraživanja i sustavni pregledi ukazali su na veću učestalost stanja kronične boli kod žena, međutim nema dovoljno informacija o mehanizmima na kojima se temelje te spolno specifične razlike (59, 177, 191). Tijekom proteklog desetljeća posvetila se veća pozornost fluktuaciji spolnih hormona kao glavnom razlogu spolnih razlika u odgovorima na stres i bol (48, 49, 192-194). Spolni hormoni važni su modulatori neuronskih krugova, te imaju utjecaj na aktivaciju mikroglije, proizvodnju proupalnih citokina, oksidativni stres i propusnost krvno-moždane barijere (44, 195, 196). Iako su mnoga istraživanja opisuju pro-nociceptivnu ulogu estradiola u modelima somatske i visceralne boli (197, 198), postoje istraživanja koja opisuju suprotno djelovanje (199, 200). Na primjer, u modelu visceralne distenzije kolorektalnog kanala nociceptivna uloga estradiola ovisila je o tome koji je receptor aktiviran (alfa ili beta) (197, 201). S druge strane, nema podjele mišljenja oko uloge testosterona u nocicepciji, njegovo je djelovanje zaštitno (antinociceptivno) (178, 202-204). Pro-nociceptivna uloga estradiola i antinociceptivna uloga testosterona rezultat su različitih promjena spinalnih ekscitacijskih ili inhibitornih glutamatergičnih receptora pod stresom (205).

Cilj istraživanja bio je prikazati potencijalno međudjelovanje kroničnog stresa i spolnih hormona na promjene u izražaju dendrina u području dorzalnog roga KM štakora. U KM štakora izloženih protokolu kroničnog stresa pronađena je značajna razlika u izražaju dendrina. Koliko znamo, do sada nema podataka o izražaju dendrina u području KM. Pronašli smo specifično nakupljen izražaj dendrina u području KM povezano s obradom boli, točnije u površinskim laminama dorzalnog roga i području koje okružuje CC (lamina X). Uz to, prikazali smo kolokalizaciju dendrina s IB4 i CGRP, biljezima središnjih projekcija primarnih osjetnih neurona, u površinskim laminama dorzalnog roga. Nadalje, prikazali smo jaku imunoreaktivnost dendrina u somi neurona DRG, kao i u perifernim projekcijama primarnih osjetnih neurona, u tkivima srca i kože. Uzimajući sve navedeno u obzir, promjene u izražaju dendrina mogu potencijalno imati učinka na modulaciju osjetnih informacija, posebice na obradu boli. U prijašnjim istraživanjima opisan je smještaj dendrina u malim izbočinama

dendrita, dendritičkim bodljama, što ga svrstava u skupinu proteina s dendritički lokaliziranom mRNA (206). Iako je njegov smještaj povezan sa sinapsama, prisutnost dendrina opisana je i na poliribosomima u somi neurona (96). Korištenjem TEM-a prikazali smo izažaj dendrina u somi, ali i u jezgri neurona dorzalnog roga. Mehanizam koji posreduje nakupljanju dendrina u jezgri neurona se potencijalno zasniva na modulaciji njegove interakcije s proteinom koji čini strukturnu potporu presinaptičkog elementa sinapse, membranska gvanilat kinaza obrnute orijentacije (engl. *membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation*, MAGI/S-SCAM). Promjena u interakciji s MAGI/S-SCAM može biti odgovorna za oslobađanje dendrina iz sinapse i njegovog premještanja u jezgru neurona gdje može imati ulogu retrogradnog glasnika (98). Međutim, nije najjasnija presinaptička prisutnost dendrina u središnjim projekcijama neurona DRG. Na presinaptičkom elementu dendrin može pridonijeti modulaciji LTP ili pak oslobađanju neurotransmitera kroz međudjelovanja koja tek treba istražiti, te potencijalno na taj način imati utjecaj na reorganizaciju neuronskih krugova (30).

Unatoč dosadašnjim saznanjima, točna uloga dendrina u neuronima još uvijek nije u potpunosti jasna. Smatra se da je uloga dendrina u mozgu usko povezana s plastičnim promjenama na razini sinapse, uglavnom zbog njegove povezanosti s proteinom KIBRA koji ima ulogu u regulaciji učenja i pamćenja (103, 207). Utvrđeno je da je upravo priroda interakcije između KIBRA-e i dendrina važna za procese učenja i pamćenja (103). Nakon primjene peptidnog inhibitora veze KIBRA-dendrin, došlo je do znatnog smanjenja sinaptičkog AMPA receptora što može biti uzrok slabljenju ekscitacijskog sinaptičkog prijenosa i LTP-a (103), kao i sinaptičke snage i plastičnosti (97, 98, 100, 101, 208, 209). Kroz prijašnja istraživanja utvrđeno je da izloženost kroničnom stresu uzrokuje neprilagođene odgovore na bol zbog utjecaja na izražaj glutamatnih receptora u područjima odgovornim za obradu boli (210). Pronašli smo značajno povećanje izražaja dendrina u dorzalnom rogu štakora izloženih kroničnom stresu. Međutim, ta promjena u izražaju bila je spolno ovisna, porast je uočen samo kod štakora ženskog spola. Štoviše, muški spolni hormoni imaju potencijalno supresivni učinak s obzirom da je povećanje izražaja dendrina nakon izlaganja kroničnom stresu vidljivo samo kod štakora muškog spola nakon kastracije, odnosno nakon posljedičnog smanjenja razine testosterona. Ovi rezultati mogu potencijalno objasniti i različite učinke spolnih hormona na gustoću i grananje dendritičkih bodlji. Testosteron izaziva grananje ali nema utjecaja na gustoću dendritičkih bodlji, dok estradiol s druge strane, povećava njihovu gustoću (211). Učinci spolnih hormona na dendritičke bodlje povezani su

s utjecajem na premještanje AMPA receptora. Nadalje, postoji naznaka da žene imaju veću mogućnost stvaranja sjećanja povezanih sa strahom pod utjecajem akutnih stresora od muškaraca, zahvaljujući povećanju LTP indukcije i AMPA receptora (GluR1) u lateralnoj jezgri amigdale (212). S druge strane, smanjene testosterona nakon kastracije rezultiralo je poboljšanjem ekscitabilnosti i plastičnosti putem LTP-a u CA3 području hipokampusa kao odgovor na smanjenu količinu dendritičkih bodlji (213, 214). Regulacija sinaptičke ekscitabilnosti neurona u KM može biti od velike važnosti za ispravnu diskriminaciju štetnih podražaja, te može biti povezana s promjenama u izražaju dendrina. S druge strane, spolno ovisne razlike izražaja dendrina, pogotovo nakon kastracije, mogu ovisiti o aromataznoj aktivnosti. U istraživanju Roselli i sur. opisana je ovisnost aromatazne aktivnosti u hipotalamusu o kastraciji. Dok kod štakora ženskog spola estrusni ciklus i kastracija ne utječu na aromataznu aktivnost, u štakora muškog spola kastracija je drastično smanjuje (215). Nadalje, Dickens i sur. su opisali promjene u aktivnosti aromataze kod japanske prepelice nakon izloženosti akutnom stresu koje su ovisile o spolu i području mozga (216).

Na kraju, bolje razumijevanje neurobiologije koja leži u pozadini međudjelovanja kroničnog stresa i boli može nam pomoći u razumijevanju brojnih patoloških promjena koje čine osnovu različitih bolnih stanja povezanih sa stresom. Prisutnost dendrina u nociceptivnim područjima dorzalnog roga KM, kao i u neuronima DRG, te u njihovim perifernim projekcijama, ukazuje na njegovu moguću ulogu u modulaciji nociceptivnog puta. Daljnja istraživanja su potrebna kako bi se objasnila uloga povećanog izražaja dendrina nakon izlaganja stresu kod neovarijektomiranih i orhidektomiranih štakora, odnosno njegova uloga u spolno specifičnoj preosjetljivosti na bol izazvanoj stresom.



## **8. ZAKLJUČCI**

1. U našem istraživanju okarakteriziran je prostorno-vremenski izražaj Cx37, 43 i 45 tijekom ranih razvojnih faza KM i spinalnih ganglija čovjeka, što upućuje na njihovu potencijalno važnu ulogu u procesima stvaranja, migracije i pozicioniranja neurona u razvoju i ukazuje da poremećaj u njihovom izražaju može dovesti do patološkog razvoja živčanog sustava.
2. Izražaj dendrina tijekom razvoja KM i ganglija čovjeka upućuje na njegovu ulogu u procesima stvaranja, migracije i pozicioniranja neurona te ukazuje da poremećaj u njegovom izražaju može dovesti do patološkog razvoja živčanog sustava.
3. Izlaganje kroničnom stresu i kastraciji dovodi do promjene izražaja i distribucije koneksina u KM.
4. Prisutnost dendrina u nociceptivnim područjima KM štakora te njegov izražaj u spinalnim ganglijima i njihovim perifernim aksonima ukazuje na njegovu moguću ulogu u modulaciji nociceptivnog puta.
5. Izlaganje kroničnom stresu uzrokuje porast izražaja dendrina u stražnjem rogu KM štakora, što bi se moglo očitovati i promjenom sinaptičke plastičnosti.
6. Porast izražaja dendrina nakon izloženosti kroničnom stresu ovisan je o spolu, jer je primijećen samo kod ženki štakora. Muški spolni hormoni imaju supresivni učinak jer se povećanje izražaja dendrina izazvano kroničnim stresom pojavilo kod muških štakora tek nakon orhidektomije.
7. Ovisnost izražaja koneksina i dendrina u KM o spolnim hormonima i izloženosti kroničnom stresu ukazuje na njihovu moguću ulogu u modulaciji percepcije boli povezane sa stresom.

## **9. SAŽETAK**

Ciljevi doktorske disertacije su bili opisati i usporediti specifične prostorno-vremenske uzorke izražaja koneksina (Cx) 37, 43 i 45 i dendrina u kralježničnoj moždini (KM) i ganglijima čovjeka tijekom razvoja, kao i prikazati promjene u izražaju koneksina Cx37, 40 i 43 i dendrina, u KM nakon izlaganja štakora kroničnom stresu i/ili kastraciji uz pomoć dvostruke imunofluorescencije i transmisivne elektronske mikroskopije (TEM).

Izravna međustanična komunikacija putem pukotinskih spojišta ima važnu ulogu u razvoju živčanog sustava, od migracije stanica i diferencijacije neurona do stvaranja obrazaca neuronske aktivnosti, te bi mogla biti potencijalno objašnjenje spolnih razlika u stanjima kronične boli povezane sa stresom. Dendrin je sinaptički protein za kojeg se smatra da ima ulogu u jačanju sinapsi. Njegov specifični izražaj u područjima KM za obradu boli ukazuje na njegovu moguću ulogu u percepciji i modulaciji boli.

Pronašli smo izražaj Cx37, 43 i 45 tijekom ranog razvoja čovjeka u svim područjima od interesa, u KM, spinalnom gangliju, paravertebralnim ganglijima simpatičkog lanca, notokordu i u sve tri meningealne ovojnice, s dominantnim izražajem Cx37. Nismo pronašli značajne razlike uspoređujući izražaj različitih koneksina između razvojnih razdoblja. Nadalje, dendrin je tijekom ranog ljudskog razvoja bio prisutan u ventrikularnom sloju i bazalnoj ploči KM, kao i u spinalnom i simpatičkom gangliju. S druge strane, kastrirane ili lažno operirane štakore izložili smo protokolu kroničnog ili lažnog stresa koji se sastojao od tri odvojena razdoblja primjene, svako u trajanju od 10 dana. Kastracija je rezultirala povećanjem izražaja Cx37 u dorzalnom rogu štakora ženskog spola, dok je izloženost kroničnom stresu potisnula učinke kastracije. U štakora muškog spola samo je združeni učinak kastracije i kroničnog stresa povećao izražaj Cx37. Utjecaj kroničnog stresa na izražaj Cx40 imao je obrnuti učinak nakon kastracije, doveo je do porasta kod ovarijektomiranih ženki, te do smanjenja kod orhidektomiranih mužjaka. Nismo pronašli nikakav učinak kroničnog stresa i kastracije na izražaj Cx43 u dorzalnom rogu, ali postotak Cx43 koji se preklapao s astrocitnim biljgom, glijalnim fibrilarnim kiselim proteinom (GFAP), povećao se u skupini kastriranih mužjaka štakora izloženoj stresu. Specifičan izražaj dendrina u KM vidljiv je u površinskim laminama dorzalnog roga i lamini X (oko CC). Značajno povećanje izražaja dendrina u području dorzalnog roga nakon izlaganja kroničnom stresu ovisi o spolu i primijećeno je samo kod štakora ženskog spola. Štoviše, muški spolni hormoni imaju potencijalno supresivni učinak, s obzirom na to da je povećanje izražaja dendrina nakon izlaganja kroničnom stresu vidljivo samo kod štakora muškog spola nakon kastracije, tj. nakon smanjenja količine testosterona. Kolokalizacija dendrina s izolektinom B4 (IB4) u

središnjim projekcijama neurona spinalnog ganglija bila je  $7,43 \pm 3,36\%$ , dok je s kalцитонин gen-povezanim peptidom (CGRP) bila  $8,47 \pm 4,45\%$ . Uz to, prisutnost dendrina vidljiva je u somi i jezgrama neurona dorzalnog roga KM.

Specifični prostorno-vremenski uzorak izražaja koneksina mogao bi ukazivati na njihovu važnu ulogu u razvoju svih istraživanih područja od interesa putem međustaničnog povezivanja i sinkronizacije tijekom kasnog embrionalnog i ranog fetalnog razdoblja ljudskog razvoja. Osim toga, međusobni učinci kroničnog stresa i smanjenja spolnih hormona koji dovode do poremećaja izražaja koneksina i dendrina u područjima KM odgovornima za obradu boli mogu biti mogući mehanizam koji uzrokuje poremećaj percepcije boli nakon izlaganja kroničnom stresu.

## **10. SUMMARY**

The objectives of the doctoral thesis were to characterize and compare the specific spatio-temporal expression patterns of connexins (Cxs) 37, 43 and 45 and dendrin during early human developmental stages of the spinal cord (SC) and ganglia, as well as to determine whether the exposure to chronic stress and/or performance of gonadectomy might lead to disturbance in the expression of connexin Cx37, 40 and 43 and dendrin in the SC using double immunofluorescence and transmission electron microscopy (TEM).

Direct intercellular communication via gap junctions has an important role in the development of the nervous system, ranging from cell migration and neuronal differentiation to the formation of neuronal activity patterns and could be a potential explanation for sex differences in stress-related chronic pain conditions. Dendrin is synapse strengthening protein and its specific expression in the pain-processing areas of the SC indicates its possible role in pain perception and modulation.

We found the expression of all three investigated Cxs during early human development in all the areas of interest, in the SC, spinal and developing paravertebral ganglia of the sympathetic trunk, notochord and all three meningeal layers, with predominant expression of Cx37. Comparing the expression of different Cxs between distinct developmental periods, we did not find significant differences. Dendrin, on the other hand, during early human development was present in ventricular layer and basal plate of the SC, as well as in spinal and sympathetic ganglia. Furthermore, we applied three 10-day-sessions stress or sham stress protocol after the rats were sham-operated or gonadectomized. The gonadectomies resulted in an increase of Cx37 expression in the dorsal horn of the female rats, but exposure to chronic stress suppressed the effects of castration. In male rats, only the combined effects of castration and chronic stress increased Cx37 expression. The influence of chronic stress on the dorsal horn Cx40 expression was inversely evident after the castration: increased in the ovariectomized female rats, while decreased in the orchidectomized male rats. We did not find any effect of chronic stress and castration, alone or together, on Cx43 expression in the dorsal horn, but the percentage of Cx43 overlapping the astrocyte marker glial fibrillary acidic protein (GFAP) increased in the male stressed group after the castration. Dendrin expression in the SC was prominent in the superficial laminae of the dorsal horn and lamina X (around central canal). A significant increase in dendrin expression in the dorsal horn after exposure to chronic stress was dependent on sex and only observed in female rats. Moreover, male sex hormones have a potentially suppressive effect, given that the increase in dendrin expression after exposure to chronic stress is seen only in male rats after castration,

i.e. after a decrease in testosterone. Co-localization with the  $\alpha$ -d-galactosyl-specific isolectin B4 (IB4) in central projections of the DRG neurons was  $7.43 \pm 3.36\%$ , while with the calcitonin gene-related peptide (CGRP) was  $8.47 \pm 4.45\%$ . Furthermore, localization of dendrin was observed in soma and nuclei of neurons in the dorsal horn.

Specific spatio-temporal pattern of Cxs expression might reflect their relevance in the development of all areas of interest via cellular interconnectivity and synchronization during the late embryonic and early fetal period of human development. In addition, an association of the chronic stress with sex hormone depletion results in disturbances of Cxs and dendrin expression in pain-processing areas of the SC and might be a possible mechanism of disturbed pain perception after chronic stress exposure.



## **11. LITERATURA**

1. Gilbert SF. *Developmental Biology*. 6. izd. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.
2. Carpenter MB, Sutin J. *Human neuroanatomy*. 8. izd. Baltimore: Williams & Wilkins; 1983. str. 67-8.;232-7.
3. Jessell TM. Neuronal specification in the spinal cord: inductive signals and transcriptional codes. *Nat Rev Genet*. 2000;1(1):20-9.
4. Lu DC, Niu T, Alaynick WA. Molecular and cellular development of spinal cord locomotor circuitry. *Front Mol Neurosci*. 2015;16;8:25.
5. Restović I, Bočina I, Vukojević K, Kero D, Filipović N, Raonić J i sur. Time course and expression pattern of the neuronal markers in the developing human spinal cord. *Int J Dev Neurosci*. 2019;74:1-10.
6. Muhr J, Graziano E, Wilson S, Jessell TM, Edlund T. Convergent inductive signals specify midbrain, hindbrain, and spinal cord identity in gastrula stage chick embryos. *Neuron*. 1999;23(4):689-702.
7. Sadler TW, Langman J. *Langman's medical embryology*. 12. izd. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2012.
8. Wilson L, Maden M. The mechanisms of dorsoventral patterning in the vertebrate neural tube. *Dev Biol*. 2005;282(1):1-13.
9. Rexed B. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol*. 1952;96(3):414-95.
10. Vukojevic K, Skobic H, Saraga-Babic M. Proliferation and differentiation of glial and neuronal progenitors in the development of human spinal ganglia. *Differentiation*. 2009;78(2-3):91-8.
11. Kasemeier-Kulesa JC, Kulesa PM, Lefcort F. Imaging neural crest cell dynamics during formation of dorsal root ganglia and sympathetic ganglia. *Development*. 2005;132(2):235-45.
12. Armati PJ, Mathey EK. An update on Schwann cell biology--immunomodulation, neural regulation and other surprises. *J Neurol Sci*. 2013;333(1-2):68-72.
13. Kiernan JA. Vascular permeability in the peripheral autonomic and somatic nervous systems: controversial aspects and comparisons with the blood-brain barrier. *Microsc Res Tech*. 1996;35(2):122-36.
14. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D. Human Dorsal Root Ganglia. *Front Cell Neurosci*. 2019;13:271.

15. Kandel ER, Siegelbaum SA, Schwartz JH. Synaptic Transmission. U: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM 3rd, ur. Principles of neural science. Norwalk, Connecticut: Appleton & Lange; 1991. str. 123-34.
16. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, White LE. Neuroscience. 5. Izd. Sunderland, (MA): Sinauer Associates, Inc.; 2012.
17. Whitlock JR, Heynen AJ, Shuler MG, Bear MF. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus. *Science*. 2006;313(5790):1093-7.
18. Cheng Q, Song SH, Augustine GJ. Molecular Mechanisms of Short-Term Plasticity: Role of Synapsin Phosphorylation in Augmentation and Potentiation of Spontaneous Glutamate Release. *Front Synaptic Neurosci*. 2018;10:33.
19. Citri A, Malenka RC. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms. *Neuropsychopharmacology*. 2008;33(1):18-41.
20. Steele RJ, Morris RG. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*. 1999;9(2):118-36.
21. Ling DS, Benardo LS, Serrano PA, Blace N, Kelly MT, Crary JF i sur. Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat Neurosci*. 2002;5(4):295-6.
22. Kauer JA, Malenka RC, Nicoll RA. A persistent postsynaptic modification mediates long-term potentiation in the hippocampus. *Neuron*. 1988;1(10):911-7.
23. Pastalkova E, Serrano P, Pinkhasova D, Wallace E, Fenton AA, Sacktor TC. Storage of spatial information by the maintenance mechanism of LTP. *Science*. 2006;313(5790):1141-4.
24. Silva AJ, Stevens CF, Tonegawa S, Wang Y. Deficient hippocampal long-term potentiation in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science*. 1992;257(5067):201-6.
25. Irvine EE, von Herten LS, Plattner F, Giese KP. alphaCaMKII autophosphorylation: a fast track to memory. *Trends Neurosci*. 2006;29(8):459-65.
26. Mulkey RM, Malenka RC. Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron*. 1992;9(5):967-75.
27. Beattie EC, Carroll RC, Yu X, Morishita W, Yasuda H, von Zastrow M i sur. Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD. *Nat Neurosci*. 2000;3(12):1291-300.
28. Hirano T. Long-term depression and other synaptic plasticity in the cerebellum. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2013;89(5):183-95.

29. Bliss TV, Cooke SF. Long-term potentiation and long-term depression: a clinical perspective. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66 Suppl 1(Suppl 1):3-17.
30. Yang Y, Calakos N. Presynaptic long-term plasticity. *Front Synaptic Neurosci*. 2013;5:8.
31. Ben Achour S, Pascual O. Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. *Neurochem Int*. 2010;57(4):440-5.
32. Henneberger C, Papouin T, Oliet SH, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature*. 2010;463(7278):232-6.
33. Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ i sur. Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell*. 2011;144(5):810-23.
34. Filosa A, Paixão S, Honsek SD, Carmona MA, Becker L, Feddersen B i sur. Neuron-glia communication via EphA4/ephrin-A3 modulates LTP through glial glutamate transport. *Nat Neurosci*. 2009;12(10):1285-92.
35. Carmona MA, Murai KK, Wang L, Roberts AJ, Pasquale EB. Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(30):12524-9.
36. Kelović Z, Šimić G. *Systema Nervosum Centrale, Središnji Živčani Sustav*. U: Krmpotić-Nemanić J, Marušić A 2. korigirano izd, ur. *Anatomija čovjeka*. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. str. 399-474.
37. Sengupta JN. Visceral pain: the neurophysiological mechanism. *Handb Exp Pharmacol*. 2009;(194):31-74.
38. Sikandar S, Dickenson AH. Visceral pain: the ins and outs, the ups and downs. *Curr Opin Support Palliat Care*. 2012;6(1):17-26.
39. La J-H, Gebhart GF. Visceral Pain. U: Michael J. Aminoff, Robert B. Daroff 2nd, ur. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Academic Press; 2014. str. 672-6.
40. Myslivecek J, Kvetnanský R. The effects of stress on muscarinic receptors. Heterologous receptor regulation: yes or no? *Auton Autacoid Pharmacol*. 2006;26(3):235-51.
41. Lunde CE, Sieberg CB. Walking the Tightrope: A Proposed Model of Chronic Pain and Stress. *Front Neurosci*. 2020;14:270.
42. Abdallah CG, Geha P. Chronic Pain and Chronic Stress: Two Sides of the Same Coin? *Chronic Stress (Thousand Oaks)*. 2017;1:2470547017704763.

43. Woda A, Picard P, Dutheil F. Dysfunctional stress responses in chronic pain. *Psychoneuroendocrinology*. 2016;71:127-35.
44. Hampl R, Bičíková M, Sosvorová L. How hormones influence composition and physiological function of the brain-blood barrier. *Physiol Res*. 2015;64(Suppl 2):S259-64.
45. Golovatscka V, Ennes H, Mayer EA, Bradesi S. Chronic stress-induced changes in pro-inflammatory cytokines and spinal glia markers in the rat: a time course study. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19(6):367-76.
46. Greenwood-Van Meerveld B, Johnson AC. Stress-Induced Chronic Visceral Pain of Gastrointestinal Origin. *Front Syst Neurosci*. 2017;11:86.
47. Ji Y, Hu B, Li J, Traub RJ. Opposing Roles of Estradiol and Testosterone on Stress-Induced Visceral Hypersensitivity in Rats. *J Pain*. 2018;19(7):764-776.
48. Elzahaf RA, Johnson MI, Tashani OA. The epidemiology of chronic pain in Libya: a cross-sectional telephone survey. *BMC Public Health*. 2016;16(1):776.
49. Mills SEE, Nicolson KP, Smith BH. Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. *Br J Anaesth*. 2019;123(2):e273-e283.
50. Decrock E, De Bock M, Wang N, Bultynck G, Giaume C, Naus CC i sur. Connexin and pannexin signaling pathways, an architectural blueprint for CNS physiology and pathology? *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(15):2823-51.
51. Yeager M. Gap Junction Channel Structure. U: Harris A, Locke D. *Connexins: A Guide*. Totowa (NJ): Humana Press; 2009. str. 27-75.
52. Beilharz TH, See MM, Boag PR. 3'-UTRs and the Control of Protein Expression in Space and Time. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1203:133-148.
53. Tonkin RS, Mao Y, O'Carroll SJ, Nicholson LF, Green CR, Gorrie CA i sur. Gap junction proteins and their role in spinal cord injury. *Front Mol Neurosci*. 2015;7:102.
54. Bennett MV, Zukin RS. Electrical coupling and neuronal synchronization in the Mammalian brain. *Neuron*. 2004;41(4):495-511.
55. Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T i sur. Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(8):2002-8.
56. Pfenniger A, Wohlwend A, Kwak BR. Mutations in connexin genes and disease. *Eur J Clin Invest*. 2011;41(1):103-16.

57. Brocardo L, Acosta LE, Piantanida AP, Rela L. Beneficial and Detrimental Remodeling of Glial Connexin and Pannexin Functions in Rodent Models of Nervous System Diseases. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:491.
58. Swayne LA, Bennett SA. Connexins and pannexins in neuronal development and adult neurogenesis. *BMC Cell Biol.* 2016;17 Suppl 1(Suppl 1):10.
59. Decrock E, Vinken M, Bol M, D'Herde K, Rogiers V, Vandenabeele P i sur. Calcium and connexin-based intercellular communication, a deadly catch? *Cell Calcium.* 2011;50(3):310-21.
60. Rimkute L, Kraujalis T, Snipas M, Palacios-Prado N, Jotautis V, Skeberdis VA, Bukauskas FF. Modulation of Connexin-36 Gap Junction Channels by Intracellular pH and Magnesium Ions. *Front Physiol.* 2018;9:362.
61. Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 2003;83(4):1359-400.
62. Bergoffen J, Scherer SS, Wang S, Scott MO, Bone LJ, Paul DL, Chen K, Lensch MW, Chance PF, Fischbeck KH. Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Science.* 1993;262(5142):2039-42.
63. Abrams CK, Scherer SS. Gap junctions in inherited human disorders of the central nervous system. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):2030-47.
64. Garbern JY. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(1):50-65.
65. Loddenkemper T, Grote K, Evers S, Oelerich M, Stögbauer F. Neurological manifestations of the oculodentodigital dysplasia syndrome. *J Neurol.* 2002;249(5):584-95.
66. Yamasaki H, Mesnil M, Omori Y, Mironov N, Krutovskikh V. Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutat Res.* 1995;333(1-2):181-8.
67. Temme A, Buchmann A, Gabriel HD, Nelles E, Schwarz M, Willecke K. High incidence of spontaneous and chemically induced liver tumors in mice deficient for connexin32. *Curr Biol.* 1997;7(9):713-6.
68. Plante I, Stewart MK, Barr K, Allan AL, Laird DW. Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease. *Oncogene.* 2011;30(14):1681-92.

69. Zhang A, Hitomi M, Bar-Shain N, Dalimov Z, Ellis L, Velpula KK i sur. Connexin 43 expression is associated with increased malignancy in prostate cancer cell lines and functions to promote migration. *Oncotarget*. 2015;6(13):11640-51.
70. Wang A, Xu C. The role of connexin43 in neuropathic pain induced by spinal cord injury. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2019;51(6):555-561.
71. Morioka N, Fujii S, Kondo S, Zhang FF, Miyauchi K, Nakamura Y i sur. Downregulation of spinal astrocytic connexin43 leads to upregulation of interleukin-6 and cyclooxygenase-2 and mechanical hypersensitivity in mice. *Glia*. 2018;66(2):428-444.
72. Tonkin RS, Bowles C, Perera CJ, Keating BA, Makker PGS, Duffy SS i sur. Attenuation of mechanical pain hypersensitivity by treatment with Peptide5, a connexin-43 mimetic peptide, involves inhibition of NLRP3 inflammasome in nerve-injured mice. *Exp Neurol*. 2018;300:1-12.
73. Hang LH, Li SN, Luo H, Shu WW, Mao ZM, Chen YF i sur. Connexin 43 Mediates CXCL12 Production from Spinal Dorsal Horn to Maintain Bone Cancer Pain in Rats. *Neurochem Res*. 2016;41(5):1200-8.
74. Spray DC, Hanani M. Gap junctions, pannexins and pain. *Neurosci Lett*. 2019;695:46-52.
75. Zupanc GKH. Development of a sexual dimorphism in a central pattern generator driving a rhythmic behavior: The role of glia-mediated potassium buffering in the pacemaker nucleus of the weakly electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *Dev Neurobiol*. 2020;80(1-2):6-15.
76. Wilson AC, Clemente L, Liu T, Bowen RL, Meethal SV, Atwood CS. Reproductive hormones regulate the selective permeability of the blood-brain barrier. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1782(6):401-7.
77. Söhl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(3):191-200.
78. Bautista W, Rash JE, Vanderpool KG, Yasumura T, Nagy JI. Re-evaluation of connexins associated with motoneurons in rodent spinal cord, sexually dimorphic motor nuclei and trigeminal motor nucleus. *Eur J Neurosci*. 2014;39(5):757-70.
79. Nielsen MS, Axelsen LN, Sorgen PL, Verma V, Delmar M, Holstein-Rathlou NH. Gap junctions. *Compr Physiol*. 2012;2(3):1981-2035.
80. Unwin PN, Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. *Nature*. 1980;283(5747):545-9.

81. Gollob MH, Jones DL, Krahn AD, Danis L, Gong XQ, Shao Q i sur. Somatic mutations in the connexin 40 gene (GJA5) in atrial fibrillation. *N Engl J Med.* 2006;354(25):2677-88.
82. Boerma M, Forsberg L, Van Zeijl L, Morgenstern R, De Faire U, Lemne C i sur. A genetic polymorphism in connexin 37 as a prognostic marker for atherosclerotic plaque development. *J Intern Med.* 1999;246(2):211-8.
83. Wong CW, Christen T, Roth I, Chadjichristos CE, Derouette JP, Foglia BF, Chanson M, Goodenough DA, Kwak BR. Connexin37 protects against atherosclerosis by regulating monocyte adhesion. *Nat Med.* 2006;12(8):950-4.
84. Simon AM, McWhorter AR. Role of connexin37 and connexin40 in vascular development. *Cell Commun Adhes.* 2003;10(4-6):379-85.
85. De Bock M, Culot M, Wang N, Bol M, Decrock E, De Vuyst E i sur. Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(9):1942-57.
86. Zhao Y, Xin Y, He Z, Hu W. Function of Connexins in the Interaction between Glial and Vascular Cells in the Central Nervous System and Related Neurological Diseases. *Neural Plast.* 2018;2018:6323901.
87. De Bock M, Vandembroucke RE, Decrock E, Culot M, Cecchelli R, Leybaert L. A new angle on blood-CNS interfaces: a role for connexins? *FEBS Lett.* 2014;588(8):1259-70.
88. Chang Q, Gonzalez M, Pinter MJ, Balice-Gordon RJ. Gap junctional coupling and patterns of connexin expression among neonatal rat lumbar spinal motor neurons. *J Neurosci.* 1999;19(24):10813-28.
89. Xing L, Yang T, Cui S, Chen G. Connexin Hemichannels in Astrocytes: Role in CNS Disorders. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:23.
90. Scemes E, Spray DC. Extracellular K<sup>+</sup> and astrocyte signaling via connexin and pannexin channels. *Neurochem Res.* 2012;37(11):2310-6.
91. Freitas-Andrade M, Naus CC. Astrocytes in neuroprotection and neurodegeneration: The role of connexin43 and pannexin1. *Neuroscience.* 2016;323:207-21.
92. Maxeiner S, Krüger O, Schilling K, Traub O, Urschel S, Willecke K. Spatiotemporal transcription of connexin45 during brain development results in neuronal expression in adult mice. *Neuroscience.* 2003;119(3):689-700.
93. Zhang C, Restrepo D. Expression of connexin 45 in the olfactory system. *Brain Res.* 2002;929(1):37-47.



94. Chapman RJ, Lall VK, Maxeiner S, Willecke K, Deuchars J, King AE. Localization of neurones expressing the gap junction protein Connexin45 within the adult spinal dorsal horn: a study using Cx45-eGFP reporter mice. *Brain Struct Funct*. 2013;218(3):751-65.
95. Johnson CM, Kanter EM, Green KG, Laing JG, Betsuyaku T, Beyer EC i sur. Redistribution of connexin45 in gap junctions of connexin43-deficient hearts. *Cardiovasc Res*. 2002;53(4):921-35.
96. Neuner-Jehle M, Denizot JP, Borbély AA, Mallet J. Characterization and sleep deprivation-induced expression modulation of dendrin, a novel dendritic protein in rat brain neurons. *J Neurosci Res*. 1996;46(2):138-51.
97. Herb A, Wisden W, Catania MV, Maréchal D, Dresse A, Seeburg PH. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. *Mol Cell Neurosci*. 1997;8(5):367-74.
98. Kremerskothen J, Kindler S, Finger I, Veltel S, Barnekow A. Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem*. 2006;96(6):1659-66.
99. Steward O. Targeting of mRNAs to subsynaptic microdomains in dendrites. *Curr Opin Neurobiol*. 1995;5(1):55-61.
100. Kawata A, Iida J, Ikeda M, Sato Y, Mori H, Kansaku A i sur. CIN85 is localized at synapses and forms a complex with S-SCAM via dendrin. *J Biochem*. 2006;139(5):931-9.
101. Schochet TL, Bremer QZ, Brownfield MS, Kelley AE, Landry CF. The dendritically targeted protein Dendrin is induced by acute nicotine in cortical regions of adolescent rat brain. *Eur J Neurosci*. 2008;28(10):1967-79.
102. Danielson E, Zhang N, Metallo J, Kaleka K, Shin SM, Gerges N i sur. S-SCAM/MAGI-2 is an essential synaptic scaffolding molecule for the GluA2-containing maintenance pool of AMPA receptors. *J Neurosci*. 2012;32(20):6967-80.
103. Ji Z, Li H, Yang Z, Huang X, Ke X, Ma S i sur. Kibra Modulates Learning and Memory via Binding to Dendrin. *Cell Rep*. 2019;26(8):2064-2077.e7.
104. Johannsen S, Duning K, Pavenstädt H, Kremerskothen J, Boeckers TM. Temporal-spatial expression and novel biochemical properties of the memory-related protein KIBRA. *Neuroscience*. 2008;155(4):1165-73.
105. Vogt-Eisele A, Krüger C, Duning K, Weber D, Spoelgen R, Pitzer C i sur. KIBRA (Kidney/BRAin protein) regulates learning and memory and stabilizes Protein kinase M $\zeta$ . *J Neurochem*. 2014;128(5):686-700.

106. Willsey AJ, Fernandez TV, Yu D, King RA, Dietrich A, Xing J i sur. De Novo Coding Variants Are Strongly Associated with Tourette Disorder. *Neuron*. 2017;94(3):486-499.e9.
107. Corneveaux JJ, Liang WS, Reiman EM, Webster JA, Myers AJ, Zismann VL i sur. Evidence for an association between KIBRA and late-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2010;31(6):901-9.
108. Williams JR. The Declaration of Helsinki and public health. *Bull World Health Organ*. 2008;86(8):650-2.
109. O'Rahilly R, Gardner E. The timing and sequence of events in the development of the human nervous system during the embryonic period proper. *Z Anat Entwicklungsgesch*. 1971;134(1):1-12.
110. Li LH, Wang ZC, Yu J, Zhang YQ. Ovariectomy results in variable changes in nociception, mood and depression in adult female rats. *PLoS One*. 2014;9(4):e94312.
111. Rodríguez-Landa JF, Hernández-López F, Cueto-Escobedo J, Herrera-Huerta EV, Rivadeneyra-Domínguez E, Bernal-Morales B i sur. Chrysin (5,7-dihydroxyflavone) exerts anxiolytic-like effects through GABAA receptors in a surgical menopause model in rats. *Biomed Pharmacother*. 2019;109:2387-2395.
112. Idris AI. Ovariectomy/Orchidectomy in Rodents. U: Helfrich M., Ralston S, ur. *Bone Research Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 816., Totowa (NJ): Humana Press; 2012. str. 545-51.
113. Balog M, Miljanović M, Blažetić S, Labak I, Ivić V, Viljetić B i sur. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. *Croat Med J*. 2015;56(2):104-13.
114. Balog M, Mlinarević D, Šerić V, Miljanović M, Blažeković R, Degmečić IV i sur. Plasma Content of Glucose, C-reactive Protein, Uric Acid and Cholesterol in Male, Female and Ovariectomized Rats upon Acute and Chronic Stress--a Path for Development of Cardiovascular Diseases. *Coll Antropol*. 2015;39(2):385-92.
115. Ivić V, Blažetić S, Labak I, Balog M, Vondrak L, Blažeković R i sur. Ovariectomy and chronic stress lead toward leptin resistance in the satiety centers and insulin resistance in the hippocampus of Sprague-Dawley rats. *Croat Med J*. 2016;57(2):194-206.
116. Agnic I, Filipovic N, Vukojevic K, Saraga-Babic M, Grkovic I. Isoflurane post-conditioning influences myocardial infarct healing in rats. *Biotech Histochem*. 2018;93(5):354-363.

117. Filipovic N, Vukojevic K, Bocina I, Saraga M, Durdov MG, Kablar B i sur. Immunohistochemical and electronmicroscopic features of mesenchymal-to-epithelial transition in human developing, postnatal and nephrotic podocytes. *Histochem Cell Biol.* 2017;147(4):481-495.
118. Poljicanin A, Filipovic N, Vukusic Pusic T, Soljic V, Caric A, Saraga-Babic M i sur. Expression pattern of RAGE and IGF-1 in the human fetal ovary and ovarian serous carcinoma. *Acta Histochem.* 2015;117(4-5):468-76.
119. Henderson CJ, Wolf CR. Immunodetection of proteins by Western blotting. *Methods Mol Biol.* 1992;80:221-33.
120. Kosovic I, Filipovic N, Benzon B, Vukojevic K, Saraga M, Glavina Durdov M i sur. Spatio-temporal patterning of different connexins in developing and postnatal human kidneys and in nephrotic syndrome of the Finnish type (CNF). *Sci Rep.* 2020;10(1):8756.
121. Vitlov Uljević M, Starčević K, Mašek T, Bočina I, Restović I, Kević N i sur. Dietary DHA/EPA supplementation ameliorates diabetic nephropathy by protecting from distal tubular cell damage. *Cell Tissue Res.* 2019;378(2):301-317.
122. Filipović N, Bočina I, Restović I, Grobe M, Kretzschmar G, Kević N i sur. Ultrastructural characterization of vitamin D receptors and metabolizing enzymes in the lipid droplets of the fatty liver in rat. *Acta Histochem.* 2020;122(2):151502.
123. Lapato AS, Tiwari-Woodruff SK. Connexins and pannexins: At the junction of neuroglial homeostasis & disease. *J Neurosci Res.* 2018;96(1):31-44.
124. Dong A, Liu S, Li Y. Gap Junctions in the Nervous System: Probing Functional Connections Using New Imaging Approaches. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:320.
125. Rouach N, Avignone E, Mème W, Koulakoff A, Venance L, Blomstrand F i sur. Gap junctions and connexin expression in the normal and pathological central nervous system. *Biol Cell.* 2002;94(7-8):457-75.
126. Fukuda T. Structural organization of the gap junction network in the cerebral cortex. *Neuroscientist.* 2007;13(3):199-207.
127. Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J.* 2006;397(1):1-14.
128. Kelsell DP, Dunlop J, Stevens HP, Lench NJ, Liang JN, Parry G i sur. Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness. *Nature.* 1997;387(6628):80-3.

129. Belousov AB, Fontes JD, Freitas-Andrade M, Naus CC. Gap junctions and hemichannels: communicating cell death in neurodevelopment and disease. *BMC Cell Biol.* 2017;18(Suppl 1):4.
130. Paznekas WA, Boyadjiev SA, Shapiro RE, Daniels O, Wollnik B, Keegan CE i sur. Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2003;72(2):408-18.
131. Yamasaki R. Connexins in health and disease. *Clin Exp Neuroimmunol.* 2018;9:30-6.
132. Fatemi SH, Folsom TD, Reutiman TJ, Lee S. Expression of astrocytic markers aquaporin 4 and connexin 43 is altered in brains of subjects with autism. *Synapse.* 2008;62(7):501-7.
133. Xie HY, Cui Y, Deng F, Feng JC. Connexin: a potential novel target for protecting the central nervous system? *Neural Regen Res.* 2015;10(4):659-66.
134. Kotini M, Mayor R. Connexins in migration during development and cancer. *Dev Biol.* 2015;401(1):143-51.
135. Guerra MM, Henzi R, Orloff A, Lichtin N, Vío K, Jiménez AJ i sur. Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(7):653-71.
136. Fabbiani G, Reali C, Valentín-Kahan A, Rehermann MI, Fagetti J, Falco MV i sur. Connexin Signaling Is Involved in the Reactivation of a Latent Stem Cell Niche after Spinal Cord Injury. *J Neurosci.* 2020;40(11):2246-2258.
137. Russo RE, Reali C, Radmilovich M, Fernández A, Trujillo-Cenóz O. Connexin 43 delimits functional domains of neurogenic precursors in the spinal cord. *J Neurosci.* 2008;28(13):3298-309.
138. Genet N, Bhatt N, Bourdieu A, Hirschi KK. Multifaceted Roles of Connexin 43 in Stem Cell Niches. *Curr Stem Cell Rep.* 2018;4(1):1-12.
139. Recabal A, Elizondo-Vega R, Philippot C, Salgado M, López S, Palma A i sur. Connexin-43 Gap Junctions Are Responsible for the Hypothalamic Tanycyte-Coupled Network. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:406.
140. Cassé F, Richetin K, Toni N. Astrocytes' Contribution to Adult Neurogenesis in Physiology and Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci.* 2018;12:432.
141. Nagy JI, Rash JE. Electrical Synapses: New Rules for Assembling an Old Structure Asymmetrically. *Curr Biol.* 2017;27(22):R1214-R1216.

142. Mayorquin LC, Rodriguez AV, Sutachan JJ, Albarracín SL. Connexin-Mediated Functional and Metabolic Coupling Between Astrocytes and Neurons. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:118.
143. Zhang Y, Liu XH. [Expression of nNOS, Pax3 and Cx43 proteins in early developing posterior horn of embryonic and fetal human spinal cord]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2009;29(8):1651-3.
144. Belliveau DJ, Bani-Yaghoub M, McGirr B, Naus CCG, Rushlow WJ. Enhanced neurite outgrowth in PC12 cells mediated by connexin hemichannels and ATP. *J Biol Chem.* 2006;281(30):20920-20931.
145. Jourdeuil K, Taneyhill LA. Spatiotemporal expression pattern of Connexin 43 during early chick embryogenesis. *Gene Expr Patterns.* 2018;27:67-75.
146. Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Iwatsuki K i sur. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun.* 2016;7:12529.
147. Elias LA, Wang DD, Kriegstein AR. Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature.* 2007;448(7156):901-7.
148. Cina C, Bechberger JF, Ozog MA, Naus CC. Expression of connexins in embryonic mouse neocortical development. *J Comp Neurol.* 2007;504(3):298-313.
149. Cina C, Maass K, Theis M, Willecke K, Bechberger JF, Naus CC. Involvement of the cytoplasmic C-terminal domain of connexin43 in neuronal migration. *J Neurosci.* 2009;29(7):2009-21.
150. Ruangvoravat CP, Lo CW. Connexin 43 expression in the mouse embryo: localization of transcripts within developmentally significant domains. *Dev Dyn.* 1992;194(4):261-81.
151. Bannerman P, Nichols W, Puhalla S, Oliver T, Berman M, Pleasure D. Early migratory rat neural crest cells express functional gap junctions: evidence that neural crest cell survival requires gap junction function. *J Neurosci Res.* 2000;61(6):605-15.
152. Belousov AB, Fontes JD. Neuronal gap junctions: making and breaking connections during development and injury. *Trends Neurosci.* 2013;36(4):227-36.
153. de Rivero Vaccari JC, Corriveau RA, Belousov AB. Gap junctions are required for NMDA receptor dependent cell death in developing neurons. *J Neurophysiol.* 2007;98(5):2878-86.

154. Nagy JI, Rash JE. Astrocyte and oligodendrocyte connexins of the glial syncytium in relation to astrocyte anatomical domains and spatial buffering. *Cell Commun Adhes.* 2003;10(4-6):401-6.
155. Lagos-Cabré R, Brenet M, Díaz J, Pérez RD, Pérez LA, Herrera-Molina R i sur. Intracellular Ca<sup>2+</sup> Increases and Connexin 43 Hemichannel Opening Are Necessary but Not Sufficient for Thy-1-Induced Astrocyte Migration. *Int J Mol Sci.* 2018;19(8):2179.
156. Choi SR, Roh DH, Yoon SY, Kwon SG, Choi HS, Han HJ i sur. Astrocyte sigma-1 receptors modulate connexin 43 expression leading to the induction of below-level mechanical allodynia in spinal cord injured mice. *Neuropharmacology.* 2016;111:34-46.
157. Li HL, Huang Y, Zhou YL, Teng RH, Zhou SZ, Lin JP i sur. C-X-C Motif Chemokine 10 Contributes to the Development of Neuropathic Pain by Increasing the Permeability of the Blood-Spinal Cord Barrier. *Front Immunol.* 2020;11:477.
158. Beyer EC, Gemel J, Martínez A, Berthoud VM, Valiunas V, Moreno AP i sur. Heteromeric mixing of connexins: compatibility of partners and functional consequences. *Cell Commun Adhes.* 2001;8(4-6):199-204.
159. Elenes S, Martinez AD, Delmar M, Beyer EC, Moreno AP. Heterotypic docking of Cx43 and Cx45 connexons blocks fast voltage gating of Cx43. *Biophys J.* 2001;81(3):1406-18.
160. Dermietzel R, Gao Y, Scemes E, Vieira D, Urban M, Kremer M i sur. Connexin43 null mice reveal that astrocytes express multiple connexins. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000;32(1):45-56.
161. Martinez AD, Hayrapetyan V, Moreno AP, Beyer EC. Connexin43 and connexin45 form heteromeric gap junction channels in which individual components determine permeability and regulation. *Circ Res.* 2002;90(10):1100-7.
162. Winterhager E, Kidder GM. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2015;21(3):340-52.
163. Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature.* 1997;385(6616):525-9.
164. Khosla K, Naus CC, Sin WC. Cx43 in Neural Progenitors Promotes Glioma Invasion in a 3D Culture System. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):5216.
165. Lin SH, Lu CY, Muhammad R, Chou WY, Lin FC, Wu PC i sur. Induction of connexin 37 expression in a rat model of neuropathic pain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002;99(2):134-40.

166. Lavrov I, Fox L, Shen J, Han Y, Cheng J. Gap Junctions Contribute to the Regulation of Walking-Like Activity in the Adult Mudpuppy (*Necturus Maculatus*). *PLoS One*. 2016;11(3):e0152650.
167. Dang X, Doble BW, Kardami E. The carboxy-tail of connexin-43 localizes to the nucleus and inhibits cell growth. *Mol Cell Biochem*. 2003;242(1-2):35-8.
168. Rodriguez-Jimenez FJ, Alastrue-Agudo A, Stojkovic M, Erceg S, Moreno-Manzano V. Connexin 50 Expression in Ependymal Stem Progenitor Cells after Spinal Cord Injury Activation. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):26608-18.
169. Ke Q, Li L, Cai B, Liu C, Yang Y, Gao Y i sur. Connexin 43 is involved in the generation of human-induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet*. 2013;22(11):2221-33.
170. Krutovskikh VA, Troyanovsky SM, Piccoli C, Tsuda H, Asamoto M, Yamasaki H. Differential effect of subcellular localization of communication impairing gap junction protein connexin43 on tumor cell growth in vivo. *Oncogene*. 2000;19(4):505-13.
171. Kanczuga-Koda L, Sulkowski S, Koda M, Sulkowska M. Alterations in connexin26 expression during colorectal carcinogenesis. *Oncology*. 2005;68(2-3):217-22.
172. Laird DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*. 2006;394(Pt 3):527-43.
173. Menecier G, Derangeon M, Coronas V, Hervé JC, Mesnil M. Aberrant expression and localization of connexin43 and connexin30 in a rat glioma cell line. *Mol Carcinog*. 2008;47(5):391-401.
174. Morel S, Burnier L, Kwak BR. Connexins participate in the initiation and progression of atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2009;31(1):49-61.
175. Personius KE, Chang Q, Mentis GZ, O'Donovan MJ, Balice-Gordon RJ. Reduced gap junctional coupling leads to uncorrelated motor neuron firing and precocious neuromuscular synapse elimination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11808-13.
176. Makino A, Platoshyn O, Suarez J, Yuan JX, Dillmann WH. Downregulation of connexin40 is associated with coronary endothelial cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295(1):C221-30.
177. Zeng O, Li F, Li Y, Li L, Xiao T, Chu C i sur. Effect of Novel Gasotransmitter hydrogen sulfide on renal fibrosis and connexins expression in diabetic rats. *Bioengineered*. 2016;7(5):314-320.
178. White HD, Robinson TD. A novel use for testosterone to treat central sensitization of chronic pain in fibromyalgia patients. *Int Immunopharmacol*. 2015;27(2):244-8.

179. Stauffer BL, Sobus RD, Sucharov CC. Sex differences in cardiomyocyte connexin43 expression. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2011;58(1):32-9.
180. De Bock M, Leybaert L, Giaume C. Connexin Channels at the Glio-Vascular Interface: Gatekeepers of the Brain. *Neurochem Res.* 2017;42(9):2519-2536.
181. Nagasawa K, Chiba H, Fujita H, Kojima T, Saito T, Endo T i sur. Possible involvement of gap junctions in the barrier function of tight junctions of brain and lung endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2006;208(1):123-32.
182. Maggioli E, McArthur S, Mauro C, Kieswich J, Kusters DHM, Reutelingsperger CPM i sur. Estrogen protects the blood-brain barrier from inflammation-induced disruption and increased lymphocyte trafficking. *Brain Behav Immun.* 2016;51:212-222.
183. Atallah A, Mhaouty-Kodja S, Grange-Messent V. Chronic depletion of gonadal testosterone leads to blood-brain barrier dysfunction and inflammation in male mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(9):3161-3175.
184. Bake S, Sohrabji F. 17beta-estradiol differentially regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats. *Endocrinology.* 2004;145(12):5471-5.
185. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Horm Behav.* 1994;28(4):464-76.
186. Duque Ede A, Munhoz CD. The Pro-inflammatory Effects of Glucocorticoids in the Brain. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:78.
187. Munhoz CD, Lepsch LB, Kawamoto EM, Malta MB, Lima Lde S, Avellar MC, Sapolsky RM, Scavone C. Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor-kappaB in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion. *J Neurosci.* 2006;26(14):3813-20.
188. Rodriguez-Jimenez FJ, Alastrue A, Stojkovic M, Erceg S, Moreno-Manzano V. Connexin 50 modulates Sox2 expression in spinal-cord-derived ependymal stem/progenitor cells. *Cell Tissue Res.* 2016;365(2):295-307.
189. Todd AJ, Wang F. Central Nervous System Pain Pathways. U: Wood JN, ur. *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain.* Oxford University Press; 2020.
190. Krotov V, Tokhtamysh A, Kopach O, Dromaretsky A, Sheremet Y, Belan P i sur. Functional Characterization of Lamina X Neurons in ex-Vivo Spinal Cord Preparation. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:342.



191. Sullivan BP, Wang R, Tawfik O, Luyendyk JP. Protective and damaging effects of platelets in acute cholestatic liver injury revealed by depletion and inhibition strategies. *Toxicol Sci.* 2010;115(1):286-94.
192. Aloisi AM. Why We Still Need To Speak About Sex Differences and Sex Hormones in Pain. *Pain Ther.* 2017;6(2):111-114.
193. Melchior M, Poisbeau P, Gaumond I, Marchand S. Insights into the mechanisms and the emergence of sex-differences in pain. *Neuroscience.* 2016;338:63-80.
194. Heck AL, Handa RJ. Sex differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis' response to stress: an important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology.* 2019;44(1):45-58.
195. Zavvari F, Nahavandi A, Shahbazi A. Neuroprotective effects of cerium oxide nanoparticles on experimental stress-induced depression in male rats. *J Chem Neuroanat.* 2020;106:101799.
196. Zhai X, Liu J, Ni A, Ye J. MiR-497 promotes microglia activation and proinflammatory cytokines production in chronic unpredictable stress-induced depression via targeting FGF2. *J Chem Neuroanat.* 2020;110:101872.
197. Ji Y, Tang B, Traub RJ. Spinal estrogen receptor alpha mediates estradiol-induced pronociception in a visceral pain model in the rat. *Pain.* 2011;152(5):1182-1191.
198. Spooner MF, Robichaud P, Carrier JC, Marchand S. Endogenous pain modulation during the formalin test in estrogen receptor beta knockout mice. *Neuroscience.* 2007;150(3):675-80.
199. Coulombe MA, Spooner MF, Gaumond I, Carrier JC, Marchand S. Estrogen receptors beta and alpha have specific pro- and anti-nociceptive actions. *Neuroscience.* 2011;184:172-82.
200. Craft RM. Modulation of pain by estrogens. *Pain.* 2007;132 Suppl 1:S3-S12.
201. Cao DY, Ji Y, Tang B, Traub RJ. Estrogen receptor  $\beta$  activation is antinociceptive in a model of visceral pain in the rat. *J Pain.* 2012;13(7):685-94.
202. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P. Gonadectomy affects hormonal and behavioral responses to repetitive nociceptive stimulation in male rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1007:232-7.
203. Aloisi AM, Ceccarelli I, Fiorenzani P, De Padova AM, Massafra C. Testosterone affects formalin-induced responses differently in male and female rats. *Neurosci Lett.* 2004;361(1-3):262-4.

204. Fanton LE, Macedo CG, Torres-Chávez KE, Fischer L, Tambeli CH. Activational action of testosterone on androgen receptors protects males preventing temporomandibular joint pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 2017;152:30-35.
205. Ji Y, Hu B, Li J, Traub RJ. Opposing Roles of Estradiol and Testosterone on Stress-Induced Visceral Hypersensitivity in Rats. *J Pain.* 2018;19(7):764-776.
206. Pinkstaff JK, Chappell SA, Mauro VP, Edelman GM, Krushel LA. Internal initiation of translation of five dendritically localized neuronal mRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2770-5.
207. Kremerskothen J, Plaas C, Büther K, Finger I, Veltel S, Matanis T i sur. Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;300(4):862-7.
208. Diering GH, Haganir RL. The AMPA Receptor Code of Synaptic Plasticity. *Neuron.* 2018;100(2):314-329.
209. Makuch L, Volk L, Anggono V, Johnson RC, Yu Y, Duning K i sur. Regulation of AMPA receptor function by the human memory-associated gene KIBRA. *Neuron.* 2011;71(6):1022-9.
210. Yuen EY, Wei J, Yan Z. Estrogen in prefrontal cortex blocks stress-induced cognitive impairments in female rats. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;160:221-6.
211. Todd BJ, Schwarz JM, Mong JA, McCarthy MM. Glutamate AMPA/kainate receptors, not GABA(A) receptors, mediate estradiol-induced sex differences in the hypothalamus. *Dev Neurobiol.* 2007;67(3):304-15.
212. Chen LS, Tzeng WY, Chuang JY, Cherng CG, Gean PW, Yu L. Roles of testosterone and amygdaloid LTP induction in determining sex differences in fear memory magnitude. *Horm Behav.* 2014;66(3):498-508.
213. Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G i sur. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology.* 2009;150(11):5106-12.
214. Skucas VA, Duffy AM, Harte-Hargrove LC, Magagna-Poveda A, Radman T, Chakraborty G i sur. Testosterone depletion in adult male rats increases mossy fiber transmission, LTP, and sprouting in area CA3 of hippocampus. *J Neurosci.* 2013;33(6):2338-55.
215. Roselli CE, Resko JA. Aromatase activity in the rat brain: hormonal regulation and sex differences. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;44(4-6):499-508.

216. Dickens MJ, Cornil CA, Balthazart J. Acute stress differentially affects aromatase activity in specific brain nuclei of adult male and female quail. *Endocrinology*. 2011;152(11):4242-51.

## **12.ŽIVOTOPIS**

## **OSOBNI PODACI**

Ime i prezime: **Marija Jurić, dr. med.**

E-pošta: [majuric@mefst.hr](mailto:majuric@mefst.hr)

Datum rođenja: 04. svibnja 1994.

Matični broj znanstvenika (MZO): 382515

### **Školovanje:**

2012. – 2018.                    Medicinski fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, integrirani preddiplomski i diplomski studij, smjer doktor medicine
2021.                                Opća bolnica Šibensko-kninske županije, pripravnički staž doktora medicine
2019. – danas                    Medicinski fakultet u Splitu, Sveučilište u Splitu, poslijediplomski studij Biologija novotvorina (BN)

### **Radno iskustvo:**

2018. – danas                    Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu, Zavod za anatomiju, histologiju i embriologiju – asistentica za područje Biomedicine i zdravstva, polje Temeljne medicinske znanosti, grana Anatomija na Katedri za anatomiju

### **Nastavne aktivnosti:**

2018. – danas                    Anatomija (studij Medicina)
2018. – danas                    Anatomija (Studij Dentalna medicina)
2018. – danas                    Anatomy (Medical studies in English)
2018. – danas                    Anatomija (Sveučilišni odjel za zdravstvene studije, Sveučilište u Splitu)
2018. – danas                    Anatomija (studij Farmacija)
2020. – danas                    Anatomija (Sveučilišni odjel za zdravstvene studije – izvanredni studij

sestrinstva, Sveučilište u Splitu)

2018. – danas Principles of radiological anatomy (Medical studies in English)

**Profesionalno usavršavanje:**

1. RECOOP 14th Bridges in the Life Sciences and 2nd RECOOP - KFSD International Student Conference, Bratislava, Slovačka, aktivni sudionik (2019.)
2. 1<sup>st</sup> Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, aktivni sudionik (2019.)
3. 18<sup>th</sup> International Pediatric Nephrology Association Congress, Venice, Italy (2019.)
4. suradnik na projektu „Karakterizacija kandidat gena za kongenitalne anomalije bubrega i urotrakta (CAKUT) tijekom razvoja u miša i čovjeka“, voditeljica projekta: prof. dr. sc. Katarina Vukojević
5. Vještine medicinske edukacije i znanstvenog rada (2019.)
6. Znanost o laboratorijskim životinjama (2019.) – tečaj
7. SpliTech konferencija, Bol, Brač, pasivni sudionik (2019.)
8. 13. Kongres Hrvatskog pedijatrijskog društva s međunarodnim sudjelovanjem, Solaris, Hrvatska (2018.)
9. Međunarodna razmjena studenata IFMSA – Institute for Biomedical Imaging and Life Sciences – IBILI, Faculty of Medicine, University of Coimbra, Portugal; Project: Developmental programming by gestational diabetes: focus on microglia as dynamic mediators of synapse formation (2018.)
10. Međunarodna razmjena studenata IFMSA – Department of Public Health and Infectious Diseases Section of Parasitology, Sapienza University of Rome, Italy (2016.)
11. Članica CroMSIC (Croatian Medical Students International Committee) – Local Officer on Human Rights and Peace (LORP) (2016. – 2018.)
12. Kongres 'The future of the healthcare industry', Zagreb, Hrvatska (2015.)

**Članstva u stručnim udruženjima:**

2018. – Hrvatsko društvo morfologa

2018. – Udruga Znanost, Split

2021. – Hrvatska liječnička komora

## Publikacije:

1. **Jurić M**, Zeitler J, Vukojević K, Bočina I, Grobe M, Kretschmar G, Saraga-Babić M, Filipović N. Expression of Connexins 37, 43 and 45 in Developing Human Spinal Cord and Ganglia. *International journal of molecular sciences* 2020; 21 (24), 9356, 21 doi:10.3390/ijms21249356.
2. **Jurić M**, Balog M, Ivić V, Benzon B, Racetin A, Bočina I, Kević N, Konjevoda S, Szűcs KF, Gáspár R, Heffer M, Vukojević K, Vari SG, Filipović N. Chronic Stress and Gonadectomy Affect the Expression of Cx37, Cx40 and Cx43 in the Spinal Cord. *Life*. 2021; 11(12):1330. <https://doi.org/10.3390/life11121330>
3. **Jurić M**, Balog M, Ivić V, Bošković M, Benzon B, Racetin A, Vukojević K, Bočina I, Kević N, Restović I, Szűcs KF, Gáspár R, Heffer M, Vari SG, Filipović N. Increased expression of dendrin in the dorsal horn of the spinal cord during stress is regulated by sex hormones. *Neuropeptides* 2021; 86, 102126, 11 doi:10.1016/j.npep.2021.102126.
4. Lozić M, Filipović N, **Jurić M**, Kosović I, Benzon B, Šolić I, Kelam N, Racetin A, Watanabe K, Katsuyama Y, Ogata M, Saraga-Babić M, Vukojević K. Alteration of Cx37, Cx40, Cx43, Cx45, Panx1, and Renin Expression Patterns in Postnatal Kidneys of Dab1<sup>-/-</sup> (yotari) Mice. *International journal of molecular sciences* 2021; 22 (3), 1284, 18 doi:10.3390/ijms22031284.
5. Filipović N, Bočina I, Restović I, Grobe M, Kretschmar G, Kević N, Mašek T, Vitlov Uljević M, **Jurić M**, Vukojević K i sur. Ultrastructural characterization of vitamin D receptors and metabolizing enzymes in the lipid droplets of the fatty liver in rat. *Acta Histochemica* 2020; 122, 2; 151502, 11 doi:10.1016/j.acthis.2020.151502
6. Racetin A, **Jurić M**, Filipović N, Šolić I, Kosović I, Glavina Durđov M, Kunac N, Zekić Tomaš S, Saraga M, Šoljić V i sur. Expression and localization of DAB1 and Reelin during normal human kidney development // *Croatian medical journal*, 60 (2019), 6; 521-531 doi:10.3325/cmj.2019.60.521
7. Lasić V, Kosović I, **Jurić M**, Racetin A, Čurčić J, Šolić I, Lozić M, Filipović N, Šoljić V, Martinović V, Saraga-Babić M, Vukojević K. GREB1L, CRELD2 and ITGA10 expression in the human developmental and postnatal kidneys: an immunohistochemical study. *Acta histochemica* 2021; 123 (2), 151679, 7 doi:10.1016/j.acthis.2021.151679.

8. Arapović A, Vukojević K, Glavina Durov M, Benzon B, Šolić I, Racetin A, **Jurić M**, Čujić T, Kosović I, Lozić M, Borić Škaro D, Ljutić D, Saraga-Babić M, Simičić Majce A, Saraga M, Filipović N. Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. *Acta histochemica* 2021; 123, 151740, 7 doi:10.1016/j.acthis.2021.151740
9. Borić Škaro D, Filipović N, Mizdrak M, Glavina Durov M, Šolić I, Kosović I, Lozić M, Racetin A, **Jurić M**, Ljutić D, Vukojević K. SATB1 and PTEN expression patterns in biopsy proven kidney diseases. *Acta histochemica* 2020; 122 (8), 151631, 6 doi:10.1016/j.acthis.2020.151631

#### **Sažetci i prezentacije na znanstvenim skupovima:**

1. **Jurić M**, Benzon B, Balog M, Ivić V, Gaspar R, Heffer M, Vukojević K, Vari SG, Filipović N. Expression of Cx40 and Cx43 in dorsal horn of the spinal cord after exposure to chronic stress and castration. U: Prunchunas, E., Vari, S., Gaspar, R. & Laureova S (ur.) 3rd RECOOP International Student and 15th RECOOP Bridges in Life Sciences Video Conferences Abstract Book. Los Angeles, 2020. str. 69-69.
2. **Jurić M**, Bota I, Racetin A, Balog M, Ivić V, Gaspar R, Heffer M, Vukojević K, Vari SG; Filipović N. Expression of dendrin in dorsal horn of the spinal cord is increased in stress and regulated by sex hormones // Oral presentation, RECOOP 14th Bridges in the Life Sciences and 2nd RECOOP - KFSD International Student Conference 2019 Bratislava, Slovačka, 2019. str. 126-126
3. Domazet Bugarin J, **Jurić M**, Bota I, Balog M, Ivić V, Heffer M, Gaspar R, Vukojević K, Vari SG, Filipović N. Effects of chronic stress and gonadectomy on expression of serotonin receptors in dorsal horn of the spinal cord // 10th RECOOP Annual Project Review Meeting, Abstracts Vroclav, Poljska, 2019. str. 35-35
4. Kosovic I, Solic I, **Juric M**, Racetin A, Lozic M, Lasic Arapovic L, Filipovic N, Lozic B, Vukojevic K, Saraga-Babic M. Cx37, Cx40, Cx43 and Cx45 gene expression in developing, postnatal and nephrotic human kidneys. 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Listopad 2-4, 2019. *Genetics Applications*, Svezak 3, Broj 2, Listopad 2019.
5. Racetin A, Lozic M, **Juric M**, Solic I, Kosovic I, Kolobaric A, Barbaric M, Cloarec M, Filipovic N, Saraga-Babic M, Vukojevic K. CrkL gene expression in kidneys of yotari mice. 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International



Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Listopad 2-4, 2019. Genetics Applications, Svezak 3, Broj 2, Listopad 2019.

6. **Juric M**, Racetin A, Lozic M, Solic I, Kosovic I, Filipovic N, Saraga-Babic M, Vukojevic K. AIFM3 gene expression in kidneys of yotari mice. Poster presentation. 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Listopad 2-4, 2019. Genetics Applications, Svezak 3, Broj 2, Listopad 2019.
7. Solic I, Kosovic I, **Juric M**, Racetin A, Lozic M, Lasic Arapovic L, Filipovic N, Saraga-Babic M, Vukojevic K. Gene expression of  $\alpha$ -tubulin, Inversin and Dishvelled-1 in postnatal kidney tissue. 1st Congress of Geneticists in Bosnia and Herzegovina with International Participation, Sarajevo, Bosna i Hercegovina, Listopad 2-4, 2019. Genetics Applications, Svezak 3, Broj 2, Listopad 2019.
8. Racetin A, **Juric M**, Filipovic N, Solic I, Kosovic I, Saraga-Babic M, Vukojevic K. IPN10281-83 Normal human kidney development expression and localization of DAB1 and REELIN. IPNA 2019, Listopad 17-21, 2019, Venecija, Italija. Pediatric Nephrology, Heidelberg: Springer, Svezak 34, Broj 10, Listopad 2019.
9. Solic I, Racetin A, Kosovic I, **Juric M**, Filipovic N, Saraga-Babic M, Saraga M, Arapovic A, Vukojevic K. IPN10380-83 Expression of Inversin and Dvl-1 in developing kidneys. IPNA 2019, Listopad 17-21, 2019, Venecija, Italija. Pediatric Nephrology, Heidelberg: Springer, Svezak 34, Broj 10, Listopad 2019.
10. Arapovic A, Solic I, Racetin A, **Juric M**, Cujic T, Kosovic I, Boric D, Ljutic D, Saraga-Babic M, Vukojevic K, Glavina Durdov M, Prgomet S, Simicic Majce A, Saraga M, Filipovic N. IPN10957-93 Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. IPNA 2019, Listopad 17-21, 2019, Venecija, Italija. Pediatric Nephrology, Heidelberg: Springer, Svezak 34, Broj 10, Listopad 2019.