

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
INSTITUT RUĐER BOŠKOVIĆ, ZAGREB

POSLIJEDIPLOMSKI SVEUČILIŠNI INTERDISCIPLINARNI ZNANSTVENI STUDIJ
ZAŠTITA PRIRODE I OKOLIŠA

Irena Labak

**Raznolikost u ekspresiji polisijaliziranih proteina u mozgu pravih
koštunjača**

Doktorski rad

Osijek, 2011.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Institut Ruđer Bošković, Zagreb

Doktorski rad

Poslijediplomski sveučilišni interdisciplinarni znanstveni studij Zaštita prirode i okoliša

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

Raznolikost u ekspresiji polisijaliziranih proteina u mozgu pravih koštunjača

Mr.sc Irena Labak

Rad je izrađen: u Neurobiološkom laboratoriju, Medicinski fakultet Osijek, Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: Dr.sc. Marija Heffer, izv.prof. Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Komentor: Dr.sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu

Neuronska stanična adhezijska molekula (NCAM) igra važnu ulogu u procesu neurogeneze. Reverzibilno vezanje polisijalinske kiseline (PSA) na NCAM molekulu utječe na migraciju neurona, izraženu kod riba i tijekom odrasle dobi. Ekspresija PSA-NCAM molekule praćena je u mozgu pet vrsta iz nadreda *Teleostei*, te jedne vrste nadreda (*Chondrostei*) pomoću dva različita protutijela. Po ekspresiji PSA-NCAM molekule odabrane vrste vrlo su slične unatoč filogenetičkoj udaljenosti između dva nadreda i razlikama u ekološkim nišama koje zauzimaju.

Broj stranica: 112

Broj slika: 42

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 134

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: neurogeneza, migracija, neuroni, PSA-NCAM molekula, *Teleostei*, *Chondrostei*.

Datum obrane: 19.srpnja 2011.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. De.sc. Elizabeta Has-Schon, izv.prof. Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, predsjednica
2. Dr.sc. Emin Teskeredžić, znanstveni savjetnik Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, komentor i član
3. Dr.sc. Marija Heffer, izv.prof. Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, mentor i član

Rad je pohranjen u:

u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu (Hrvatske bratske zajednice 4.); Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici u Osijeku (Europske avenije 24); u doktorskom radu treba dodati: Sveučilištu u Zagrebu, (Trg maršala Tita 14); Sveučilištu u Rijeci (Riječke rezolucije 7); Sveučilištu u Splitu (Livanjska 5) i Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Trg Sv. Trojstva 3).

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer Osijek
Institute Ruđer Bošković, Zagreb
University postgraduate interdisciplinary study
Environmental Protection and Nature Conservation

PhD thesis

Scientific Area: Natural science
Scientific Field: Biology

Diversity in expression of polysialic proteins in teleostean brain

Thesis performed at Laboratory for Neurobiology, Medicinski fakultet Osijek, Sveučiliša J.J. Strossmayera u Osijeku

Supervisor: Marija Heffer, Professor, Associate School of Medicine JJ Strossmayer University of Osijek
Co- supervisor: Emin Teskeredži, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

The neural cell adhesion molecule (NCAM) plays important role in neurogenesis. Reversible attachment of polysialic acid (PSA) to NCAM molecule promotes migration which is very high in fishes during adulthood. We compared expression of PSA-NCAM in brain of five species of teleosts and one species of *Chondrostei* with two different antibodies. The expression of PSA-NCAM is very similar in all species despite the differences in ecological specialization and phylogenetic distance.

Number of pages: 112
Number of figures: 42
Number of tables: 1
Number of references: 134
Original in: Croatian

Key words: neurogenesis, migration, neuron, PSA-NCAM molecule, *Teleostei*, *Chondrostei*

Date of the thesis defense: 19.7.2011.

Reviewers:

1. Associate Professor Elizabeta Has-Schon, PhD, Department of Biology, JJ Strossmayer University of Osijek chairmmen of committe.
2. Emin Teskeredži, PhD, Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Co- supervisor.
3. Associate Professor Marija Heffer, MD, PhD, School of Medicine in Osijek, JJ Strossmayer University of Osijek Supervisor.

Thesis deposited in:

National and University Library (Hrvatske bratske zajednice 4.); City and University Library in Osijek (Europske avenije 24); in Ph.D. Thesis additionally: University of Zagreb (Trg maršala Tita 14); University of Rijeka (Riječke rezolucije 7); University of Split (Livanjska 5), and Josip Juraj Strossmayer University of Osijek (Trg Sv. Trojstva 3).

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Opći dio	2
2.1. Evolucija i sistematika riba	2
2.2. Funkcionalna organizacija i specijalizacija pravih koštunjača	5
2.3. Ekološke niše i razlike u anatomskej građi mozga pravih koštunjača	8
2.4. Migracija i diferencijacija prekursora neurona	12
2.5. Adultna neurogeneza	14
3. Materijal i metode	19
3.1. Uzorak	19
3.2. Obrada uzorka	19
3.3. Atlas mozga	20
3.3.1. Histološka metoda bojanja po Nisslu	20
3.3.2. Histološka metoda bojanja po Gallyasu	20
3.3.3. Imunohistokemija s protutijelima na NeuN i SMI 312	22
3.4. Imunohistokemija s protutijelima anti- PSA-NCAM	23
3.5. Western blot metoda	23
3.5.1. Obrada uzorka	23
3.5.2. Izrada Western blot metode	24
4. Rezultati	26
4.1. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u mozgu odabranih vrsta riba	26
4.2. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u prednjem mozgu odabranih vrsta riba	43
4.3. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u međumozgu kod odabranih vrsta riba	46
4.4. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u srednjem mozgu kod odabranih vrsta riba	49
4.5. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u malom mozgu kod odabranih vrsta riba	63
4.6. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u stražnjem mozgu kod odabranih vrsta riba	73
4.7. Detekcija anti-PSA-NCAM epitopa metodom imunoblota u mozgu odabranih vrsta riba	78
5. Rasprava	84
5.1. Ekološki uvjeti i anatomska građa mozga odabranih vrsta riba	84
5.2. Migracijske zone u mozgu odabranih vrsta riba	89
5.3. Ekološki uvjeti i migracijske zone u mozgu odabranih vrsta riba	96

6. Zaključak	98
7.Literatura	99
8. Prilog.....	109
9. Životopis	110

POPIS KRATICA

aur – *auricula cerebelli*

bol – *bulbus olfactorius*

CAM - stanične adhezije molekule (*engl. Cell Adhesion Molecule*)

cbl - *cerebellum*

cho – *chiasma opticum*

cor – *corpus cerebelli*

crcb – *crista cerebelli*

D – *area dorsalis telencephali*

dien – *diencephalon*

ell - *lobus lateralis*

ggl – *stratum ganglionare*

grl – *stratum granulare*

hab – *nucleus habenularis*

hyp - *hypophysis*

hypoth - *hypothalamus*

lih - *lobus inferior hypothalami*

lob tub – *lobus tubularis*

lob VII - *lobus vagi*

lobus IX – *lobus glosopharingeus*

lobus X - *lobus facialis*

MAP- mikrotubulima pridruženi protein (*engl. Microtubul-Associated Protein*)

mll - *lobus lateralis*

mol – *stratum moleculare*

NCAM – neuronske stanične adhezijske molekule (*engl. Neural Cell Adhesion Molecule*)

NeuN - neuron specifični protein

Npt - *nucleus posterior tuberis*

PBS fosfatni pufer (*engl. phosphate buffer saline*)

Ppv – *regio pretektalis periventricularis pars ventralis*

PSA-NCAM - polisijalizirana neuronske stanične adhezije molekule(*engl. Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule*)

Rho - *rhombencephalon*

sac - *stratum album centrale*
sfgs - *stratum fibrosum et griseum superficiale*
sgc - *stratum griseum centrale*
sgc-ip - pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*
sm - *stratum marginale*
so - *stratum opticum*
spv - *stratum periventriculare*
tal- *tractus olfactorius*
tect- *tectum mesencephali*
teg - *tegmentum*
tel – *telecenphalon*
ThD – *thalamus dorsalis*
ThV – *thalamus ventralis*
tl – *torus longitudinalis*
tolm – *tractus olfactorius medialis*
ts – *torus semicircularis*
V- *area ventralis telencephali*
Valv – *valvula cerebelli*

Kralježnjaci se međusobno razlikuju po sposobnosti produkcije novih neurona u odraslom mozgu. Kod sisavaca neurogeneza se pojavljuje u dvije regije prednjeg mozga (Zupanc, 2008), njušnoj lukovici (*bulbus olfactorius*) i hipokampusu (*hippocampus*). Kod ptica, gmazova i vodozemaca produkcija novih neurona i glija stanica više je izražena, a pojavljuje se tijekom života u nekoliko regija (Zupanc i Horschke, 1995). Kod ptica je produkcija neurona i glija stanica, u odnosu na gmazove i vodozemce, najslabije izražena i pojavljuje se samo u prednjem mozgu (*telencephalon*) dok se u hipotalamusu pojavljuje povremeno a može se i eksperimentalno izazvati. Neurogeneza kod gmazova pojavljuje se u prednjem mozgu, njušnim lukovicama i malom mozgu. Idući prema vodozemcima, odnosno evolucijski starijim organizmima, broj regija u kojima je zastupljena neurogeneza se povećava, pa tako kod ovih organizama ona je prisutna u prednjem mozgu, u pojedinim strukturama međumozga kao što je preoptička regija, talamus i hipotalamus, u optičkom tektumu srednjeg mozga i u malom mozgu (Kaslin i sur., 2008). Ribe su, a pogotovo prave koštunjače (*Teleostea*), posebno zanimljive jer pokazuju visoku razinu neurogeneze u gotovo svim regijama odraslog mozga i veliku sposobnost regeneracije središnjeg živčanog sustava nakon lezija (Zupanc i sur., 2005).

Migracija stanica, koja u procesu neurogeneze slijedi nakon proliferacije prekursora, praćena je ekspresijom polisijalizirane neuronske stanične adhezijske molekule (PSA-NCAM, engl. *Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule*). Kao najprisutniji adhezijski protein u centralnom živčanom sustavu NCAM molekule (engl. *Neural Cell Adhesion Molecule*) reguliraju embrionalnu i zrelu neurogenezu, a nalaze se na površini neurona, glija stanica i u stanicama tumora. Reverzibilnim vezanjem polisijalinske kiseline na ekstracelularne domene NCAM molekule slabi adhezija između stanica čime se povećava njihova pokretnost a ovo omogućava i pospješuje migraciju neurona.

Kod istraživanja neurogeneze pravih koštunjača većina znanstvenih radova odabire kao model ribu zebriću (*Danio rerio*) čime je niz drugih vrsta zanemaren kao i njihova jedinstvenost u mogućim molekularnim prilagodbama na različite ekološke niše. Funkcionalne i molekularne razlike opisane između zebriće i ostalih kralježnjaka samo su mali dio širokog spektra neotkrivenih osobitosti riba. Zbog nedostatka sveobuhvatnog neuroanatomskog atlasa mozga pravih koštunjača, do sada detaljan raspored zona u kojima se odvija migracija stanica praćena ekspresijom PSA-NCAM molekule nije napravljen za ribe našeg podneblja.

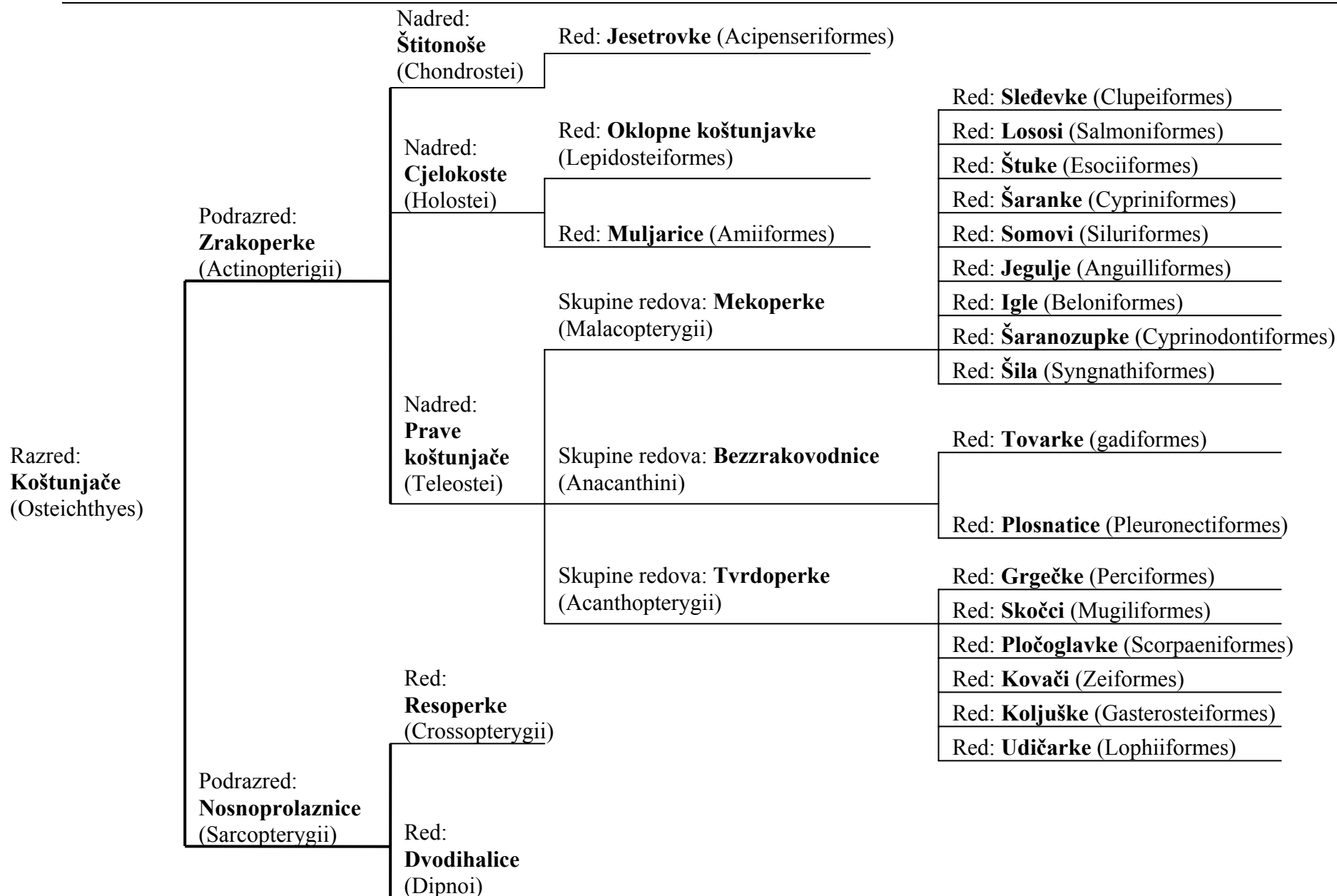
Prave koštunjače različitim ekološkim nišama prilagodile su se građom tijela i organa. Ovakve prilagodbe osobito su vidljive u morfologiji mozga jer su struktura mozga i njegove funkcije pod vrlo jakim utjecajem okoline (Lema i sur., 2005). Različito modificirani mozak razvija se pod utjecajem prirodne selekcije i omogućava ribama prilagodbu na različite ekološke niše. Budući da razlike u morfologiji mozga postoje kod riba koje žive u istim klimatološkim uvjetima, ali u različitim ekološkim nišama, postavlja se pitanje postoje li ovakve razlike i u distribuciji migracijskih regija i koliko navedena distribucija ovisi o ekološkoj i filogenetičkoj specijalizaciji. U okviru ovog doktorskog rada po prvi puta će se napraviti analize i usporedbe migracijskih regija i morfologije mozga u odnosu na ekološke uvjete u kojima riba živi.

2.1. Evolucija i sistematika riba

Ribe su najmnogobrojnija, a ipak najslabije istražena skupina kralježnjaka. Najveći dio riba pripada razredu koštunjača (*Osteichthyes*) kojeg karakterizira barem nekoliko kosti u skeletu, koštani škržni poklopac te plivaći mjehur (Miller i Harley, 2001). Najstariji fosil koštunjača potječe iz kasnog Silura (oko 450 milijuna godina, Paleozoik). Do perioda devona (prije 350 milijuna godina, Paleozoik) odvojila su se dva podrazreda: Nosnoproslaznice (*Sarcopterygii*) i Zrakoperke (*Actinopterygii*) (Slika 1).

Zrakoperke obuhvaćaju 23,700 vrsta (Nelson, 1994), od čega većina (23,637 vrsta) pripada nadredu pravih koštunjače (*Teleostei*) (Nelson, 1994). Kod ostalih redova zrakoperki postoje samo po nekoliko vrsta i većina njih se smatra živućim fosilima jer duži period nisu mijenjale osnovna morfološka obilježja (Eldredge i Stanley, 1984). Prave koštunjače zapravo obuhvaćaju više od 90% današnjih vrsta riba (Treer i sur., 1995). Pojavile su se oko sredine Mezozoika, a do kraja Mezozoika postale su dominantne (Romer, 1959). Dva ključna procesa omogućila su ovoliku raznolikost (Ito, 2007). Prvi proces je duplikacija genoma zajedničkog pretka (Ohno, 1970) čime nastaje različito potomstvo i velika mogućnost diversifikacije (Ito, 2007), a drugi je pojava novih ekoloških niša.

Duplikacija genoma, kojom nastaju tisuće kopija gena, smatra se jednim od glavnih događaja u evoluciji koji je oblikovao genom svih kralježnjaka uključujući ribe i četveronošce (Lundin 1993; Holland et al. 1994; Amores i sur.1998). Nakon duplikacije cijelog genoma dolazi do preuređivanja kromosoma što dovodi do promjena u nasljeđivanju vezanih gena (Ravi i Venkatesh, 2008). Kada u genomu postoje dva gena koji nadziru isto svojstvo, tada jedan gen obično ostaje pod selekcijskim pritiskom i nastavlja vršiti svoju početnu funkciju, a drugi gen nakuplja mutacije (Ohno, 1970). Mutacije mogu biti nepovoljne, povoljne ili neutralne. Nepovoljne mutacije su česte i mogu dovesti do gubitka funkcije gena ili čak i do istrjebljenja jedinki s mutacijom. Ovo se događa ukoliko se nepovoljne mutacije odraze na dominantan gen koji se jako proširio u populaciji (Otto, 2007). Mutacije se mogu i pozitivno odraziti u slučaju da one genu daju novu funkciju (neofunkcionalizacija). Tada se gen održava i daje nosiocu takvog gena prednost u preživljavanju. Dio mutacija su neutralne jer ne mijenja značajnije funkciju gena već doprinose varijabilnosti unutar populacije.



Slika 1. Sistematika koštunjača

Analiza filogenetičkih odnosa mnogih kopija gena u cijelom genomu, komparativna analiza lokacija kromosoma i analiza kariotipova predaka pokazuje da su preci kralježnjaka bili dva puta izloženi duplikaciji genoma (Dehal i Boore 2005; Panopoulou i Poustka 2005; Nakatani i sur. 2007; Putnam i sur., 2008). Analizom genoma pravih koštunjača zaključuje se da su vrste ove skupine riba doživjele dodatnu duplikaciju genoma (Sato, 2010). Duplikacija genoma, mutacije i uvjeti selekcijskih pritisaka doprinijeli su raznolikosti adaptacijskih mehanizama za preživljavanjem u novim ekološkim nišama.

Promjene u okolišu koje omogućavaju nastanak povoljnih staništa za novonastale vrste također su procesi koji su omogućili raznolikost pravih koštunjača (Ito, 2007). One su se novonastalim ekološkim nišama prilagodile građom tijela i organa. Ovakve prilagodbe osobito su vidljive u građi mozga. Morfologija mozga povezana je s ponašanjem riba, načinom života i uvjetima ekološke niše koju zauzimaju (Ito, 2007). Različito modificirani mozgovi pomogli su pravim koštunjačama u prilagodbi na različite ekološke niše (Ito, 2007). Dakle, zbog opisanih procesa i duge evolucije prave koštunjače postale su najzastupljenija skupina kralježnjaka na Zemlji.

2.2. Funkcionalna organizacija i specijalizacija pravih koštunjača

Prave koštunjače, kao i ostale ribe, trajnom načinu života u vodi prilagodile su se na različite načine. Te prilagodbe vidljive su u obliku tijela, unutrašnjoj građi, načinu razmnožavanja i u hranidbi (Bogut i sur., 2006). Oblik tijela ovisi o specifičnim životnim uvjetima u kojima riba živi. Tako kalifornijska pastrva (*Onchorincus mykiss*) ima vretenasto tijelo, specifičan oblik tijela za ribe koje žive u brzim tekućicama i koje su dobri i izdržljivi plivači. Nasuprot tomu, ribe koje žive u sporo tekućim rijekama i stajaćicama, obraslih biljem, imaju visoko tijelo, čunjolikog oblika, jako lateralno spljošteno s dobro razvijenim repnim dijelom. Ovakav oblik susrećemo kod šarana (*Cyprinus capryo*) (Bogut i sur., 2006).

Interakcije između životinje i njenog okruženja koordiniraju se središnjim živčanim sustavom. Te interakcije su vidljive u mišićnom sustavu i osjetilnim organima koji su sa središnjim živčanim sustavom povezani živcima (Nieuwenhuys i sur., 1998).

Mozak ribe, kao dio središnjeg živčanog sustava, nalazi se u lubanjskoj šupljini, a zaštićen je kostima i jakim tvrdim opnama s masnim naslagama (Bogut i sur., 2006). Iako se mozak morfološki razlikuje između ribljih vrsta, što je jedna od prilagodbi na različite uvjete okoliša, općenito se može reći da se sastoji od pet dijelova. Građa mozga riba najbolje je

opisana kod kalifornijske pastrve, tipičnog predstavnika pravih koštunjača. Na njemu je uočljiv veliki stražnji mozak (*rhomencephalon*), veliki neparni mali mozak (*cerebellum*), srednji mozak (*mesencephalon*) sa izraženim krovnom dijelom (*tectum*), međumozak (*diencephalon*), te relativno mali prednji mozak (*telencephalon*) sa izraženim njušnim lukovicama (*bulbus olfactorius*). Njušna lukovica prenosi informacije važne za pronalazak hrane, spolnog partnera ili za prepoznavanje bliskog srodnika (Viljetić i sur., 2009). Zbog regija za različita osjetila, prednji mozak se može opisati kao prvo integracijsko središte različitih osjeta kao što je osjet njuha, vida i sluha. Također se ovdje primaju podražaji izazvani vibracijama koji dolaze putem bočne pruge i osjeti dodira i bola koji dolaze sa cijele površine tijela (Nieuwenhuys i sur., 1998). Srednji mozak, koji dominira u vanjskoj morfologiji mozga, složene je građe, a jedna od njegovih glavnih funkcija je primanje vidnih impulsa i njihova integracija sa svim ostalim vrstama osjeta (Meek, 1990). Ovo je drugo integracijsko središte u kojemu se zapravo događa koordiniranje osjeta i motorike pri usmjerenim pokretima tijela. Ovdje se ističe jedna struktura karakteristična samo za zrakoperke – *torus longitudinalis* (uzdužni nabor) čiji je zadatak usklađivanje pokreta očiju s pokretima tijela. Mali mozak sačinjen je od tri međusobno povezana dijela i svaki od njih ima svoje funkcije. Vestibulolateralna regija malog mozga procesira osjete koji dolaze iz unutarnjeg uha i mehanosenzoričkih receptora cijeloga tijela (Bass, 1982). Slijedeća regija je tijelo malog mozga (*corpus cerebelli*) i vidljiv je na gornjoj vanjskoj površini mozga kao jedina neparna struktura, te *valvula cerebelli*, tipična samo za zrakoperke (Nieuwenhuys, 1967). *Valvula* je rostralno produženje malog mozga u ventrikul srednjeg mozga i povezana je s auditivnim, vestibulatornim, optičkim i mehanosenzoričkim jezgrama pa služi u koordinaciji pokreta tijela (Ito i Yoshimoto, 1990). Zbog opisane građe i funkcija maloga mozga on se smatra trećim integracijskim središtem u mozgu pravih koštunjača.

Koliko će koji dio mozga biti razvijeniji u odnosu na drugi ovisi o stilu života pojedine vrste. Ribe predatori koje žive u skupinama (primjerice ribe iz porodice *Percidae*) imaju bolje razvijen prednji mozak. Vrste koje se hrane tijekom noći ili bentonski kao što su porodice *Cyprinidae* i *Siluridae* imaju dobro razvijenu njušnu lukovicu. Kalifornijska pastrva (porodica *Salmonidae*) hrani se tijekom dana i u lovu se navodi vidom tako da je za ovu vrstu optički tectum vrlo značajna struktura.

Pokrete riba omogućava mišićno-skeletni sustav u kojima su mišići kontrolirani centralnim živčanim sustavom. U svom vodenom sustavu ribe su beztežinske i za pokretanje uglavnom se koriste mišićima trupa i repa (Rome i sur., 1993), dok za koordiniranje koriste peraje i njene mišiće (Nieuwenhuys i sur., 1998). Kako je osnovna funkcija mišića grčenje

(kontrakcija) i opuštanje (relaksacija), upravo na temelju tih funkcija omogućeno je kretanje pojedinih dijelova tijela i tijela kao cjeline. Osim ovih skeletnim mišića trupa i repa, prave koštunjače imaju visceralne glatke mišiće koji grade većinu utrobnih organa i poprečno-prugaste mišiće glave koji omogućavaju pokretanje škrga i škržnih lukova. Glatki mišići osim što sudjeluju u građi probavnog i mokraćno-spolnog sustava, nalaze se u oku gdje omogućavaju pokretanje leće i u plinskom mjehuru (Bogut i sur., 2006).

Prave koštunjače signale iz okoline primaju različitim osjetilnim organima kao što su organ za njuh, okus, vid i sluh te somatosenzorni organ za primanje osjeta dodira i boli sa cijele površine tijela (Nieuwenhuys i sur., 1998).

Organe za njuh koriste za međusobnu komunikaciju i za traženje spolnog partnera te za traženje hrane (Nieuwenhuys i sur., 1998). Informacije o spolno relevantnim mirisima i feromonima prenose se medijalnim olfaktornim putem (Sorensen i sur., 1991), a lateralnim olfaktornim putem prenose se informacije relevantne za hranjenje.

Sustav za interpretaciju okusa povezan je s okusnim pupoljcima i služi za probir hrane u ustima i izvan njih (Nieuwenhuys i sur., 1998). Informacije iz okusnih pupoljaka stižu putem tri kranijalna živca: *facialis*, *glosopharingeus* i *vagus*. Okusni pupoljci se ne pojavljuju samo unutar usne šupljine, nego i na vanjskim specijaliziranim organima kao što su brkovi. Neke ribe (primjerice ribe iz reda *Siluriformes*) okusne pupoljke imaju po cijelom tijelu (Caprio i sur., 1993). Šaran posjeduje palatalni organ, posebni organ za okus, koji omogućava selekciju hrane u usnoj šupljini, njeno razvrstavanje od kamenčića, gutanje hrane i izbacivanje svega što je selektirano kao nejestivo (Finger i Morita, 1985). Za osjet okusa kod nekih vrsta zrakoperki postoje cijeli režnjevi smješteni u stražnjem mozgu. To su facijalni, glosofaringealni i vagalni režanj koji odvajaju osjete što dolaze iz okusnih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine (facijalni), unutar usne šupljine (glosofaringealni) i palatalnog organa (vagalni). Postojanje pojedinog režnja razlikuje se od vrste do vrste i ovi režnjevi razvijeni su kod vrsta koje se pri hranjenju ne oslanjaju na vid. Kod riba koje se hrane tijekom dana i kod traženja plijena navode vidom ovakve strukture nisu utvrđene.

Oko ribe je elipsoidnog oblika, a nalaze se u očnoj šupljini. Oko riba je građom slično oku ostalih kralješnjaka s razlikom da riblje oko nema očnih kapaka ni suznih žlijezda (Bogut i sur., 2006). Važnost osjeta vida kao i veličina očiju razlikuje se od vrste do vrste i ovisi o načinu života i načinu traženja hrane. Relativno velike oči imaju ribe koje se hrane po danu (primjerice štika i kalifornijska pastrva) dok som, koji se hrani noću i više koriste njuh u potrazi za hranom ima male oči (Nieuwenhuys i sur., 1998). U proporciji sa veličinom i

funkcijom u procesu hranjenja je i veličina, a osobito debljina krovnog dijela srednjeg mozga gdje se obrađuje osjet vida.

Statoakustični organ služi za prijam osjeta sluha te za održavanje ravnoteže i položaja tijela. Ovaj organ sastoji se od parnog labirinta koji predstavlja reducirano unutarnje uho (Bogut i sur., 2006). Sacculus i lagena su slušni organi, dok su utriculus i polukružni (semicirkularni) kanali imaju ulogu u održavanju ravnoteže (Nieuwenhuys i sur., 1998). U razvojnom pogledu unutarnje uho je specijalizirani dio senzornog sustava bočne pruge (Bogut i sur., 2006). Osjetilo uha zapaža valove visokih frekvencija većih udaljenosti, dok bočna pruga zapaža kretnje vode niskih frekvencija s manjih udaljenosti. Pojedine funkcije unutarnjeg uha i bočne pruge preklapaju se u smislu da zajedno detektiraju frekvencije čije su vrijednosti između vrijednosti visokih i niskih frekvencija koje zapažaju unutarnje uho odnosno bočna pruga zasebno (Nieuwenhuys i sur., 1998). Prave koštunjače imaju razvijen sustav za interpretaciju električnih i mehanosenzoričkih impulsa. Primjerice som, *Silurus glanis*, detektira električne signale koji nastaju u okolišu uz pomoć elektroleptora razmještenih po cijelom tijelu (Peters i sur., 1974). Njima on samo detektira male struje i razlike potencijala koji se pojavljuju u okolišu slučajno ili su dio geoelektromagnetskog polja. Zbog toga je som pasivno elektroleptivna riba bez specijaliziranih električnih organa kojima bi generirao struju za aktivnu elektroleptciju (Viljetić i sur., 2009). Za razliku od soma, kalifornijska pastrva, *Onchorincus mykiss*, ili šaran, *Cyprinus caprio*, koriste samo mehanosenzoričke receptore kože kojima detektiraju pokrete. Mehanosenzorički i električni impulsi u mozak stižu putem osjetnih vlakana lateralnog živca. Lateralni živac vodi u medijalne jezgre stražnjeg mozga i omogućava interpretaciju pomicanja vode (McCormick, 1982). Ovaj osjet je dobro povezan s auditivnim i vestibularnim organima i zajedno s njima završava u velikoj jezgri srednjeg mozga – *torus semicircularis*. Prema istoj jezgri vodi i osjet specifičan samo za *Siluride* – elektroleptcija (Finger i Tong, 1984).

2.3. Ekološke niše i razlike u anatomskoj građi mozga pravih koštunjača

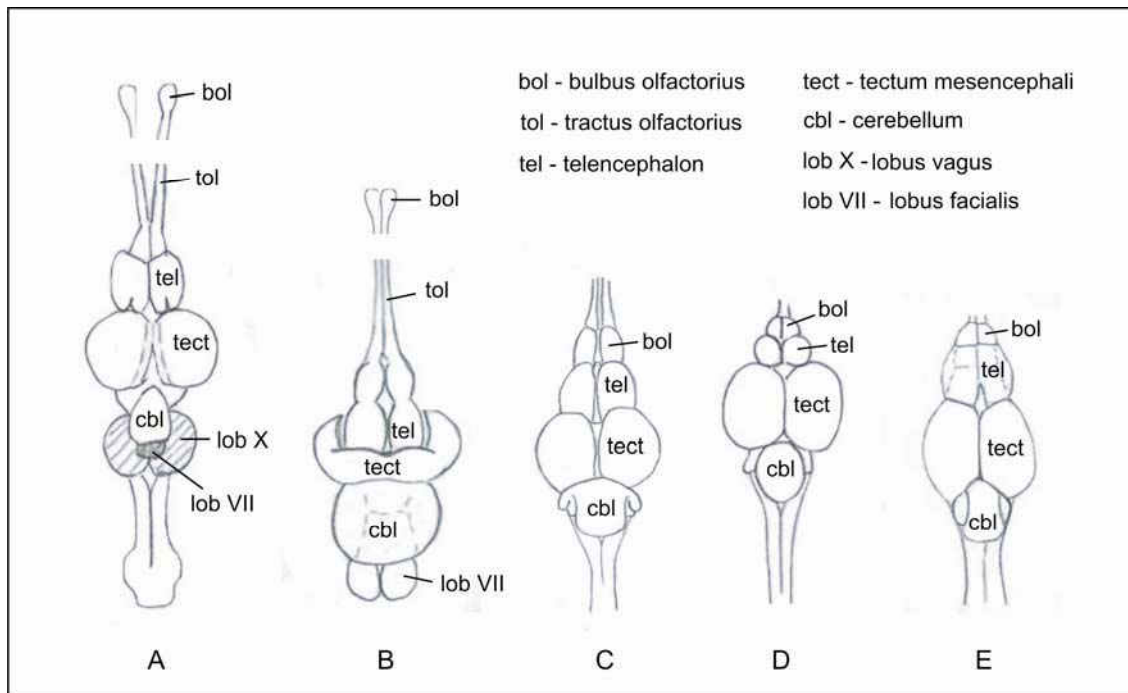
Prave koštunjače odlikuju se velikom raznolikošću u morfologiji mozga. Ova raznolikost posljedica je prilagodbi na različite uvjete ekoloških niša koje zauzimaju i različite stilove života. Uzajamna povezanost između mozga i uvjeta sredine, od svih ostalih kralježnjaka, najviše je izražena kod pravih koštunjača (Uchihashi, 1953).

Odabrane ribe žive u istom klimatološkom području, ali zauzimaju različite ekološke niše. Njima su prilagođene ne samo građom tijela i organa, tako što svaka promatrana vrsta

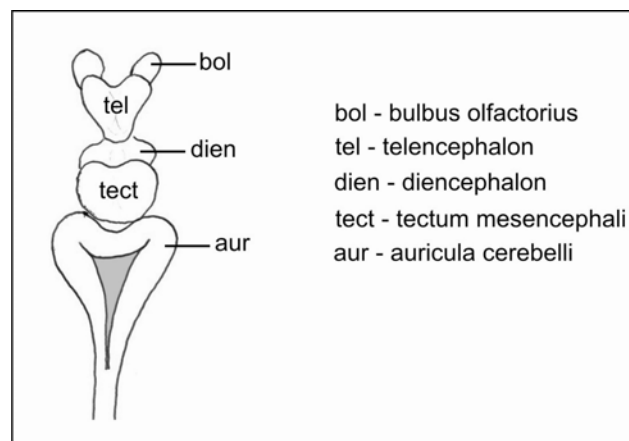
ribe ima druga karakteristična obilježja, nego i osjetima na koje se riba oslanja tijekom života. Tako primjerice vizualni predatori kao što su štika (*Esox lucius*), kalifornijska pastrva (*Onchorincus mykiss*) ili grgeč (*Perca fluviatilis*), imaju posebno dobro razvijen osjet vida. Štika je grabežljiva riba stajaćih i sporotekućih voda i smatra se jednom od najboljih predatora koji love iz zasjede. Živi u vodama obraslom vegetacijom gdje čeka plijen. Slično štuki, kalifornijska pastrva se također hrani uglavnom ribama i živi u čistim i bistrim rijekama. Grgeč je raznolik u hranjenju. Mlađ se hrani sitnim zooplanktonom, algama i euglenama. Veće jedinke hrane se ribljim ličinkama i sitnijom mlađi, a čest je i kanibalizam. Za navedene ribe osjet vida i informacije koje primaju putem tog osjeta važnije su za njihov način života od drugih osjetila. Osjet vida nije od velikog značaja za ribe koje se hrane tijekom noći ili bentonski kao što su som (*Silurus glanis*) ili šaran (*Cyprinus carpio*). Som je grabežljivac koji je obično aktivan noću što je vidljivo i po njegovim malim očima. Živi u mirnim sporotekućim vodama i toplim akumulacijama. Kako se prilikom hranjenja uopće ne oslanja na vid njegova prilagodba ekološkoj niši koju zauzima vidljiva je u razvijenom osjetu mirisa i okusa. Prisutnost malih molekula topljivih u vodi som prepoznaje putem kemoreceptora smještenih u usnoj i nosnoj šupljini. Veliki broj okusnih pupoljaka nalazi se na brkovima i po cijelom tijelu (Atema 1971; Caprio i sur. 1993). Šaran također osjete mirisa i okusa prima preko brkova, ali za razliku od soma ima samo jedan par brkova koji se nalaze na uglovima usta. Za primanje ovih osjeta služi se i okusnim pupoljcima iz usne šupljine. Inače, šaran naseljava tople, sporo tekuće ili stajaće vode s mekanim dnom. Većinom živi u jatima. Svejed je i hrani se zooplanktonom, zoobentosom, algama i dijelovima višeg bilja.

Kečiga (*Acipenser ruthenus*), iako starija i primitivnija vrsta od predstavnika pravih koštunjača po načinu hranjenja slični šaranu i somu. Također se oslanja na osjet njuha, a hrani se vodenim organizmima s dna i ikrom drugih riba. Okusni pupoljci osim u usnoj šupljini nalaze se i na brkovima i resama smještenih oko usta (Nieuwenhuys i sur., 1998).

Kako se promatrane ribe razlikuju s obzirom na osjetila koja koriste tako se razlikuju i s obzirom na morfologiju mozga (Slika 2 i 3).



Slika 2. Shematski prikaz vanjske morfologije mozga pet predstavnika pravih koštunjača (dorzalni prikaz): A – *Cyprinus carpio*, B – *Silurus glanis*, C – *Onchorhynchus mykiss*, D – *Esox lucius*, E – *Perca fluviatilis*.



Slika 3. Shematski prikaz vanjske morfologije mozga *Acipenser ruthenus* predstavnika štitonoša (dorzalni prikaz).

Slike 2. i 3. prikazuju raznolikost u morfologiji mozga. Varijacije u morfologiji mozga utvrđene su između predstavnika pravih koštunjača i skupine štitonoša ali i između pojedinih predstavnika pravih koštunjača.

Gledajući dorzalno mozak se sastoji od nekoliko glavnih dijelova. Idući redom od rostralnog prema kaudalnom dijelu vidljiva je njušna lukovica (*bulbus olfactorius*), prednji mozak (*telencephalon*), optički tektum (*tectum mesencephali*) i mali mozak (*cerebellum*) kod svih promatranih vrsta, te vagalni (*lobus vagus*) i facijalni režanj (*lobus facialis*) kod šarana i soma (Slika 2). Na slici 3 istim redom vidljiva je njušna lukovica, prednji mozak, međumozak, optički tektum i *auricula cerebelli* - bočno zadebljanje stražnjeg mozga (*rhombencephalon*).

Prednji mozak (*telencephalon*) rostralni je dio mozga i kod svih zrakoperki sastoji se od njušne lukovice (*bulbus olfactorius*), te ventralnog i dorzalnog dijela (Nieuwenhuys i sur., 1998). Na slici 1. vidljivo je da je prednji mozak kod vrste *Cyprinus carpio*, *Perca fluviatilis* i *Onchorhynchus mykiss* relativno dobro razvijen u odnosu na ostale dijelove mozga. Njušna lukovica kod pravih koštunjača ili je smještena neposredno uz prednji mozak ili je udaljena od njega (Nieuwenhuys i sur., 1998). Primjer isturene njušne lukovice vidljiv je kod vrste *Cyprinus carpio* i *Silurus glanis*. Kod ovih vrsta njušna lukovica je povezana sa prednjim mozgom dugim njušnim tračkom (*tracus olfactorius*). Ostale četiri promatrane vrste imaju njušnu lukovicu neposredno uz prednji mozak. Prednji mozak nastavlja se međumozgom (*diencephalon*), koji kod promatranih riba prikazanih na slici 2 dorzalno nije vidljiv. Straga se na međumozak nastavlja srednji mozak (*mesencephalon*). Kod pravih koštunjača i štitonoša srednji mozak, za razliku od sisavaca, nije pokriven hemisferama prednjeg mozga. On se bočno izbočuje iza prednjeg mozga i kod svih promatranih vrsta veličinom nadmašuje prednji mozak. Krov srednjeg mozga je optički tektum, parna struktura koja pokriva velike ventrikule srednjeg mozga (Nieuwenhuys i sur., 1998). Tektum se kod pravih koštunjača sastoji od sedam slojeva i stvara obilne veze s retinom oka organizirane poput mape koja se topografski s mrežnice prenosi na tektum (Springer i Gaffney, 1981). Specifična tvorevina srednjeg mozga usko povezana s tektumom je takozvani *torus longitudinalis*. Ovo je struktura karakteristična samo za ribe iz razreda zrakoperki (*Actinopterygian*) i kod pastrve, grgeča i štuke u odnosu na soma i šarana bolje je razvijena.

Mali mozak (*cerebellum*) je rostralna specijalizacija stražnjeg mozga (*rhombencephalona*). Kod pravih koštunjača sastoji se od tri glavna dijela a to su kaudalno smještena vestibulolateralna regija, centralno smješteno tijelo malog mozga (*corpus cerebelli*), vidljiv kao neparna struktura smještena neposredno iza optičkog tektuma i *valvula cerebelli* koja se podvlači ispod optičkog tektuma u ventrikul srednjeg mozga.

Na stražnjem mozgu u njegovom rostralnom dijelu uočljivi su reznjevi kao što su facijalni, glosofaringealni i vagalni režanj. Oni omogućavaju pažljivu diskriminaciju osjeta

koji dolaze iz okusnih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine (facijalni), unutar usne šupljine (glosofaringealni) ili funkciju palatalnog organa (vagalni). Promatrane vrste riba razlikuju se po navedenim reznjevima. Naime navedene tvorbe od odabranih vrsta pravih koštunjača imaju samo som i šaran.

Kečiga (*Acipenser ruthenus*) kao predstavnik štitonoša pokazuje sličnosti u morfologiji mozga s predstavnicima pravih koštunjača. Njezin prednji mozak po položaju njušnih lukovica sličan je prednjem mozgu pastrve, štuke i grgeča. Za razliku od promatranih pravih koštunjača kod kojih je prednji mozak manji od srednjeg mozga, prednji mozak kečige slične je veličine kao i srednji mozak. Srednji mozak djelomično prekriva međumozak (*diencephalon*), koji je kod kečige, za razliku od promatranih pravih koštunjača vidljiv dorzalno. Hipotalamus, dio međumozga, smješten ventralno, kod ove je vrste dobro razvijen.

Na srednjem mozgu, isto kao i kod pravih koštunjača, je tektum koji se kod ove vrste sastoji od šest slojeva koji također stvaraju obilne veze s retinom oka (Nieuwenhuys i sur, 1998). Stražnji mozak je relativno velik. Lateralno na stražnjem mozgu su vagalni lobusi, strukture po kojima ova vrsta pokazuje sličnost sa somom i šaranom. Rostralno na stražnjem mozgu je mali mozak koji se odlikuje parom lateralnih izbočenja tzv. *auricula cerebelli*, struktura po kojoj se kečiga razlikuje od promatranih pravih koštunjača. Centralni dio malog mozga isto kao i kod pravih koštunjača sastoji se od tijela malog mozga i *valvule cerebelli* - rostralni dio koji se proteže prema naprijed ispod optičkog tektuma.

2.4. Migracija i diferencijacija prekursora neurona

NCAM molekula je još prije trideset godina opisana kao glikoprotein koji se nalazi na površini stanica (Rutishauser i sur, 1976). Smatra se posrednikom u interakciji između stanica, te između stanica i njihove okoline. NCAM je prva izolirana i detaljno opisana stanična adhezijska molekula (CAM, *engl. Cell Adhesion Molecule*) (Brackenbury i sur., 1977, Cunningham i sur., 1987), prvobitno izolirana iz retine oka i mozga (Rutishauser, 1984).

Strukturalno, NCAM pripada superporodici imunoglobulina (Ig) (Brummendorf i Rathjen, 1995). NCAM je integrirani membranski protein sa jednim polipeptidnim lancem (Rutishauser, 1984). Postoje tri glavne izoforme: NCAM-120, NCAM-140, NCAM-180 (broj se odnosi na njihovu relativnu molekulsku masu). Polipeptidni lanac izgrađen je od sedam uzastopnih domena. Ekstracelularno, sve izoforme NCAM posjeduju pet strukturalnih

domena poznatih kao imunoglobulinske (Ig) domene i dvije fibronektinske domene (FN III domene). Različite domene imaju različite uloge, pa su tako Ig domene uključene u međusobno povezivanje (Cole i sur., 1986), a FNIII domene u signalizaciji rasta neurona. NCAM-120 usidren je u staničnu membranu preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) membranskog sidra, dok su NCAM-140 i NCAM-180 transmembranski proteini koji imaju citoplazmatske domene različitih dužina.

NCAM molekule međusobno se vežu ili na istoj strani membrane (*cis*-vezanje) ili na suprotnim stranama membrane (*trans*-vezanje) (Rutishauser i sur., 1982). Kada se vežu međusobno, govorimo o homofilnom vezanju. Kada se NCAM molekule vežu s drugim molekulama Ig porodice kao što su L1 ili TAG-1 govorimo o heterofilnom vezanju (Brummendorf i Rathjen, 1995). Heterofilno vezanje također se odnosi na interakcije između NCAM molekule i specifičnih molekula intracelularnog miljea i ekstracelularnog matriksa. Intracelularnim domenama NCAM se veže na različite specifične receptore važne za stanično signaliziranje čime se nadzire stanično ponašanje kao što je metabolizam stanice, diferencijacija, preživljavanje i proliferacija.

Ekstracelularne domene NCAM molekule stupaju u interakciju i sa drugim proteinima ekstracelularnog matriksa koji su također uključeni u adheziju između stanica kao što je primjerice neurotrofni faktor glije (GDNF protein, Glial Derived Neurotrophic Factor) (Gascon i sur., 2007).

Zbog mogućnosti raznolikog vezanja, NCAM molekule smatraju se ključnim posrednikom u međusobnom vezanju stanica središnjeg živčanog sustava (Gascon i sur., 2007). NCAM molekule imaju višestruku ulogu tijekom razvoja (Rieger i sur., 2008), uključujući migraciju stanica, proliferaciju i diferencijaciju (Crossin i Krushel, 2000), te rast neurita. Osim embrionalne neurogeneze, reguliraju i adultnu neurogenezu.

U živčanom sustavu kralježnjaka, funkcije NCAM modificiraju se određenim posttranslacijskim modifikacijama od kojih je glikosijalizacija najvažnija. NCAM molekula prolazi kroz opsežnu glikosijalizaciju u endoplazmatskom retikulumu i Golgijevom aparatu. N-glikosijalizacija je najvažnija posttranslacijska modifikacija NCAM molekule i na ekstracelularnim domenama utvrđeno je barem šest N-glikosijalizacijskih mjesta (Albach i sur., 2004). Na petom i šestom glikozilacijskom mjestu koja se nalaze unutar pete Ig-domene veže se polisijalinska kiselina (PSA) (Nelson i sur., 1995; Liedtke i sur., 2001). Polisijalinska kiselina je negativno nabijeni lanac α -2-8-vezanih molekula sijalinskih kiselina koji se može produžiti do dužine od 50 do 100 jedinica (Kiss i Rougon, 1997). Reverzibilnim vezanjem polisijalinske kiseline na ekstracelularne domene nastaje postranslacijska modifikacija PSA-

NCAM (Rieger i sur., 2008) koja se sintetizira dvjema polisialiltransferazama, STX i PST. STX prisutan je tijekom embrionalnog razvoja, dok je PST značajniji u postnatalnom mozgu. Dok je mogućnost modificiranja NCAM molekule reverzibilnim vezanjem dugog polimera sijalinske kiseline (PSA) dobro poznata, posljedica ovakvog vezanja je prilično nepoznata (Gascon i sur., 2007). Smatra se da je dugi negativno nabijen lanac PSA svojevrsan „umetak“ koji reducira privlačne sile između stanica te time omogućava dinamične promjene u kontaktima između membrana (Gascon i sur., 2007). PSA lanac modificira homofilno vezanje NCAM molekula tako da smanjuje mogućnost nakupljanja NCAM molekula (Hinsby i sur., 2004). Prema tome, sijalizacija se može tumačiti kao širokorasprostranjen mehanizama koji reducira adheziju između stanica i povećava međumembranski razmak (Rutishauer, 1998).

Ekspresija PSA na NCAM može promijeniti funkciju NCAM molekula od adhezije ka signalizaciji. Brojne su funkcije PSA-NCAM molekule. Tijekom razvoja, anti-adhezijska funkcija PSA-NCAM omogućava neurogenezu (Bayer i sur., 1982), migraciju neurona, (Ono i sur., 1994; Vitry i sur., 2001) i aksonogenezu - stvaranje, rast i navođenje izdanaka aksona (Williams i sur., 1996). Brojna istraživanja funkcije PSA njegovom selektivnom eliminacijom sa NCAM molekule pomoću enzima Endo-N, pokazuju da PSA-NCAM igra određenu ulogu u grananju aksona i formiranju sinapsi (Bonfanti, 2006; Kiss i Rougon, 1997; Rutishauser i Landmesser, 1996). Ekspresija PSA na NCAM je čvrsto regulirana i vrhunac ekspresije je u ranom razvoju dok u kasnijoj fazi većina NCAM molekula u mozgu ne sadrži PSA.

2.5. Adultna neurogeneza

Poslije-embrionalna neurogeneza je od temeljnog značaja za mozak kralježnjaka. Sve do prije nekoliko desetljeća, mislilo se da u mozgu kralježnjaka prestaje produkcija novih neurona do, ili odmah nakon rođenja (Zupanc, 2006). Tek nakon 1960-tih počela su istraživanja kojima je utvrđeno da se novi neuroni stvaraju u odraslom mozgu kralježnjaka. Tako je zrela neurogeneza utvrđena ne samo u mozgu nižih skupina kralježnjaka uključujući i prave koštunjače već i u mozgu sisavaca. 1998. godine Eriksson i Gage potvrdili su zrelu neurogenezu i u odraslom ljudskom mozgu (Eriksson i sur., 1998).

Među skupinama kralježnjaka postoje razlike u regijama odraslog mozga u kojima se događa neurogeneza odnosno proliferacija, migracija i diferencijacija neurona. Kod sisavaca neurogeneza se odvija samo u točno određenim regijama mozga i te regije čuvaju visoki nivo PSA ekspresije. Spomenute regije su hipotalamus, hipokamus i olfaktorni bulbusi, opisane kao mjesta velike plastičnosti (Gascon i sur., 2007). U olfaktorni bulbus nezreli neuroni

složeni poput lanca gusto poredanih stanica migriraju iz subventrikularne zone putem nekoliko milimetara dugog tzv. rostralnog migratornog puta (Altman 1969b; Luskin, 1993; Curtis i sur., 2007). Iz subgranularne zone *girus dentatusa* nove stanice migriraju u zrnati sloj hipokampusa, odnosno Amonovog roga (Altman i Das, 1965; Eriksson i sur., 1998). Ove stanice se razvijaju u zrele granularne neurone (Zupanc, 2008) i uklapaju se u funkcionalne neuronske krugove. Broj novonastalih neurona je jako malen pogotovo u usporedbi s ukupnim brojem stanica u mozgu (Zupanc, 2006).

Nasuprot sisavcima, kod ostalih skupina kralježnjaka neurogeneza je više izražena i pojavljuje se u barem nekoliko regija mozga tijekom života (Zupanc i Horschke, 1995). Gmazovi, vodozemci i ribe pokazuju bolju neurogenezu u odnosu na ptice kod kojih se proliferacija i neurogeneza odvijaju raspršeno po prednjem mozgu (Kaslin i sur., 2008).

Utvrđena razlika u sposobnosti stvaranja novih neurona između „nižih“ i „viših“ kralježnjaka povezana je i sa sposobnošću regeneracije središnjeg živčanog sustava nakon ozljeda. Zamjena oštećenih neurona nakon ozljeda ili neurodegenerativne bolesti sa novim neuronima kod sisavaca je obično nemoguća (Goldman-Rakić, 1980). Ribe se pak odlikuju velikom sposobnošću regeneracije aksona (Mayer i sur., 1985; Stuermer i sur., 1992; Becker i sur., 1997) ili čak cijelih neurona (Zupanc i Ott, 1999; Cameron, 2000) u središnjem živčanom sustavu nakon ozljeda ili lezija (Stuermer i sur., 1992). Od svih riba, prave koštunjače posebno se ističu jer imaju ogromnu sposobnost regeneracije središnjeg živčanog sustava, leđne moždine i retine (Kirsche 1965; Zupanc 2001b).

U odraslom mozgu pravih koštunjača većina mitotičkih stanica utvrđena je u visokokoncentriranim, malim i dobro definiranim područjima mozga tzv. proliferacijskim zonama (Zupanc, 2006), kojih kod pravih koštunjača ima nekoliko (Zupanc i Horschke, 1995; Zupanc i sur., 2005; Grandel i sur., 2006), a protežu se duž cijelog mozga.

U olfaktornom bulbusu broj proliferacijskih stanica je malen i većina ih je utvrđena u vanjskom glomerularnom sloju dok je manji dio ustanovljen u unutrašnjim slojevima (Zupanc i Horschke, 1995). Od cijelog prednjeg mozga broj proliferacijskih stanica najveći je u dorsolateralnom dijelu i to u dorzalnoj, ventralnoj i stražnjoj regiji dorzolateralnog prednjeg mozga (Zupanc, 2006). Slično olfaktornom bulbusu, broj proliferacijskih stanica u navedenim područjima je malen (Zupanc i Horschke, 1995). Srednji mozak se brojnošću proliferacijskih stanica bitno ne razlikuje od olfaktornog bulbusa i telencefalona. Stanice su raspoređene podjednako u svim slojevima optičkog tektuma. Također su utvrđene i u strukturi *torus longitudinalis*. Prema brojnim istraživanjima, mali mozak je izvor većine novih neurona u odraslom mozgu koštunjača (Zupanc, 2008): u prosjeku 75% progenitorskih stanica kod

Apteronotus leptorhynchus (Zupanc i Horschke, 1995) i oko 60% kod zebrice (*Danio rerio*) (Hinsch i Zupanc, 2007). Ostalih 25% odnosno 40% progenitora rađa su u različitim regijama prednjeg mozga, međumozga, srednjeg i stražnjeg mozga (Zupanc, 2008). Kvalitativne analize pokazuju sličnu dominantnost malog mozga u proliferaciji stanica i kod drugih pravih koštunjača, uključujući gupija (*Poecilia reticulata*) (Kranz i Richter, 1970a), komarču (*Sparus aurata*) (Zikopoulos et.al., 2000) i koljuška (*Gasterosteus aculeatus*) (Ekström i sur., 2001).

Mali mozak pravih koštunjača je sačinjen od tri glavne podjedinice: kaudalne regije malog mozga (sačinjena od dvije podjedinice - *eminentia granularis* i *lobus caudalis*), tijela malog mozga (*corpus cerebelli*) i *valvula cerebelli*. Proliferacija stanica u tijelu malog mozga i *valvuli* ograničena je na molekularni sloj. U *eminentia granularis* kod *A. leptorhynchus* (Zupanc i Horschke, 1995; Zupanc et.al., 1996) odnosno u *lobus caudalis* kod zebrice (Zupanc i sur., 2005) nove stanice se produciraju u granularnom sloju. Postmitotički neuroni migriraju iz svojih proliferacijskih zona unutar molekularnog sloja tijela malog mozga i *valvule* u granularni sloj istih podjedinica (Zupanc i sur., 2005). U *eminentia granularis* dvije trećine stanica migriraju kroz susjedni molekularni sloj ponovo u granularni sloj, dakle migriraju iz središnjeg dijela granularnog sloja u stražnji dio istog sloja. Preostala jedna trećina stanica ostaje u središnjem dijelu granularnog sloja i u molekularnom sloju. Kod zebrice, u *lobusu caudalis*, nema indikacija da neuroni migriraju izvan ove strukture (Zupanc, 2008). Može se zaključiti da se ponašaju kao spomenuta jedna trećina stanica u *eminentia granularis*. Tijekom migracije mlade stanice su vođene radijalnim glijalnim nitima koje stvaraju migratorni put u svim podjedinicama malog mozga (Zupanc i Clint, 2003).

Migracija stanica, kao drugi korak neurogeneze, praćena je ekspresijom PSA-NCAM-a. Poznato je da je nazočnost PSA-NCAM-a u embrionalnom i odraslom mozgu visoko korelirana sa migracijom i diferencijacijom prekursora nerona (Chuong i Edelman, 1984; Ono i sur., 1994; Rousselot i sur., 1995).

PSA sa površine neuroblasta također utječe na diferencijaciju novonastalih neurona (Gascon i sur., 2007). Istraživanja pokazuju da u nedostatku PSA dolazi do preuranjene diferencijacije neuroblasta što se pripisuje NCAM-NCAM interakciji (Petridis i sur., 2004). PSA-NCAM molekule imaju i ulogu reguliranja preživljavanja stanica. Dio stanica, nakon što s mjesta nastanka dođu na svoje ciljano mjesto podliježu apoptozi. Ona se javlja između četvrtog i sedmog tjedna nakon nastanka novih stanica i smatra se mehanizmom kojim se regulira broj mladih stanica nakon što su dosegle svoja odredišta. Pokazano je da odstranjivanjem polisijalinske kiseline sa NCAM molekule enzimom Endo-N, broj

novonastalih neurona dramatično opada (Gascon i sur., 2007). Istraživanja pokazuju da pomanjkanje PSA-NCAM ili NCAM ne utječe na mitotičku aktivnost, nego upravo na povećanje preuranjene smrti nedavno nastalih neurona (Gascon i sur., 2007).

Istraživanja neurogeneze, migracije i regeneracije koje uključuju ekspresiju PSA-NCAM započela su tek nedavno (Rieger i sur., 2008). Funkcionalni značaj polisijalinske kiseline na NCAM molekulu u odrasloj neurogenezi prilično je nepoznat. Općenito, odrasla neurogeneza kod kralježnjaka slabo je istražena pogotovo kod vodozemaca i riba. Saznanja o migraciji odnosno o početku migracije, migratornim putevima i konačnim odredištima novonastalih stanica su vrlo oskudna.

CILJEVI RADA

Temeljni cilj ovog istraživanja je utvrditi u kojim se regijama odraslog mozga pravih koštunjača (*Teleostea*) i štitonoša (*Chondrostei*) odvija neurogeneza odnosno migracija i diferencijacija prekursora neurona.

Specifični ciljevi istraživanja su:

1. histološkom metodom načiniti atlas mozga za svaku odabranu vrstu ribe;
2. na osnovu pozitivnih PSA-NCAM stanica utvrditi u kojim regijama mozga pojedine odabrane vrste se odvija migracija i diferencijacija prekursora neurona;
3. s obzirom na utvrđene migracijske zone, između odabranih vrsta riba izvršiti usporedbu između pojedinih vrsta pravih koštunjača, kao i te između pravih koštunjača i štitonoša;
4. dobivene rezultate interpretirati s obzirom na ekološke uvjete u kojima riba živi i s obzirom na sistematiku.

HIPOTEZE

Na osnovu definiranih ciljeva istraživanja postavljena je sljedeća radna hipoteza:

1. migracija i diferencijacija prekursora neurona praćena je ekspresijom PSA-NCAM;
2. PSA-NCAM pozitivne stanice (neuroni ili glija) koncentrirane su u malim regijama te su prepoznatljive kao migracijske zone koje se razlikuju s obzirom na vrstu riba;
3. između analiziranih šest vrsta riba očekuje se pozitivna reakcija na PSA-NCAM kod svih vrsta te dominantnost jedne moždane regije u odnosu na druge s obzirom na potencijal produkcije neurona.

Provedeno istraživanje dio je projekta pod naslovom „Uloga lipidnih splavi i glikokonjugata u razvoju i regeneraciji živčanog sustava” odobrenog od Ministarstva znanosti, obrazovanja i športa pod brojem #219-0061194-2158 voditelja prof. dr. sc. Marija Heffer.

3.1. Uzorak

Vrste riba korištene u radu su šaran (*Cyprinus carpio*), porodica *Cyprinidae*; som (*Silurus glanis*), porodica *Siluridae*; grgeč (*Perca fluviatilis*), porodica *Percidae*; kalifornijska kalifornijska pastrva (*Onchorincus mykiss*), porodica *Salmonidae*; kečiga (*Acipenser ruthenus*) porodica *Acipenseridae* i štika (*Esox lucius*), porodica (*Esocidae*).

Šaran (*Cyprinus carpio*) i som (*Silurus glanis*) uhvaćeni su na ribnjaku „Grudnjak“, grgeči (*Perca fluviatilis*) u privatnom ribnjaku obitelji Kolak (Opatovac), a kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*) u privatnom ribnjaku „Valis Aurea“ (Požega). Kečige su uhvaćene u Dunavu u Šaregradu, a štuke u Dravi kod Osijeka uz profesionalnu pomoć. Od svake od odabranih vrsta riba žrtvovano je po deset jedinki radi uzimanja mozga. Sekcija mozga napravljena je neposredno nakon izlova ribe. Uzorci su stavljeni u ohlađeni fiksativ (4% puferirani paraformaldehid, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ili pohranjeni u led. Sve vrste korištene u ovom radu uzorkovane su u zimskim mjesecima kako bi uspoređivanje među njima bilo moguće.

3.2. Obrada uzorka

Nakon 48-satne fiksacije na +4°C u 4% paraformaldehidu u 0,1M PBS (fosfatni pufer, *engl.* phosphate buffer saline) i s podešenim pH na fiziološku vrijednost 7,4 svi uzorci mozga su krioprotektirani. Krioprotekcijom uzorak dehidriramo kako bi izbjegli grubu kristalizaciju citoplazmatske vode, čime bi se u procesu smrzavanja tkivo oštetilo. Sama krioprotekcija rađena je na +4°C tako da su uzorci stajali prvo u 10% saharozi u 0,1M PBS kroz 24 sata, a potom u 20% puferiranoj saharozi 48 sati. Nakon krioprotekcije uslijedilo je smrzavanje uzoraka kroz nekoliko sekundi u podhlađenom isopentanu na -80°C te su se na navedenoj temperaturi uzorci čuvali do daljnje analize.

Atlas mozga izrađen je za svaku vrstu riba. Izrada atlasa podrazumijevala je rezanje uzoraka mozga na kriostatu (Leica CM3050S, Germany). Svaki mozak rezan je u serijskim

rezovima u koronarnom, sagitalnom i transverzalnom smjeru debljine 35 μ m. Rezovi su skupljani u označene polistirenske jažice napunjene 0,1M PBS. Svaki deseti rez obojan je istom histološkom, odnosno imunohistokemijskom metodom.

Nakon završenih histoloških odnosno imunohistokemijskih metoda bojanja te nakon sušenja preparati su skenirani na skeneru Super Coolscan 9000 (Nikon, Tokyo, Japan), i na skeneru ScanScope CS (Aperio, Vista, CA, USA). Sve digitalne fotografije su obrađene i pripremljene za tisak u kompjutorskim programima Photoshop i CorelDraw.

3.3. Atlas mozga

3.3.1. Histološka metoda bojanja po Nisslu

Bojanjem po Nissl-u dobiva se prikaz svih jezgara u mozgu. Kako se bojaju jezgre neurona i glija stanica u pojedinim regijama živčanog sustava moguća je osnovna orijentacija prema slojevima mozga.

Svaki deseti kriostatski rez (debljine 35 μ m) navučen je na silanizirano predmetno staklo iz destilirane vode. Rezovi su dobro osušeni na sobnoj temperaturi. Stakalca su uronjena na par minuta u otopinu 0.125% Cresylvioleta (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA) u vodi. Nakon bojanja, preparati su odbojavani ispiranjem u destiliranoj vodi i zakiseljenom etanolu, a zatim dehidrirani uranjanjem u rastuće koncentracije etanola kroz nekoliko minuta i to slijedećim redoslijedom: 70% etanol, 96% etanol te apsolutni alkohol. Postupak je završen uranjanjem preparata u Hystoclear (National Diagnostics, Atlanta, Georgia USA) i pokrivanjem permanentnim pokrivalom Hystamount (National Diagnostics, Georgia USA).

3.3.2. Histološka metoda bojanja po Gallyas-u

Bojanje po Gallyasu je tehnika srebrne impregnacije vlakana. Snopovi vlakana bojaju se ovisno o debljini mijelina tako da boja preparata varira od blijedo žute do tamno smeđe. Bojanje snopova vlakana u različitim slojevima mozga omogućava osnovnu orijentaciju u sustavu vlakana i regijama mozga.

I u ovom slučaju je navučen svaki deseti rez mozga na silanizirano predmetno stakalce i dobro osušeni na sobnoj temperaturi.

Na početku bojanja preparati su kratko isprani u 96% etanolu. Slijedi ekstrakcija lipida ispiranjem 15 minuta u ksilolu i 20 minuta u kloroformu, a zatim ponovno ispiranje u etanolu minutu do dvije, u rastućim koncentracijama alkohola kako bi došlo do rehidracije rezova (redosljedom: 96%, zatim 70%, pa 40%).

Nakon ispiranja u etanolu, rehidracija je završena ispiranjem u destiliranoj vodi tri puta po nekoliko minuta. Zatim su rezovi inkubirani u otopinu amonij-srebro-nitrata kroz 30 minuta, u mraku i uz neprekidno miješanje. Otopina amonij-srebro-nitrata pripremljena je prema slijedećem receptu: 0,1g amonijevog nitrata (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 0,1g srebrovog nitrata (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 0,3mL 4%-tnog NaOH (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA) i do 100 mL dH₂O.

Srebrni-nitrat je ispran u 0,5% octenoj kiselini tri puta po par minuta. Preparati su razvijeni u pripremljenom razvijaju do pojave smeđeg obojenja. Razvijajući je smjesa otopina A, B i C. Otopina A priprema se sa 1000 mL dH₂O i 50g bezvodnog natrijevog karbonata (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA). Otopina B se sastoji od 1000 mL dH₂O i 2g amonijevog nitrata, 2g srebrovog nitrata, te 10g volframosilicijeve kiseline (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), a otopina C je smjesa 1000 mL dH₂O i 2g amonijevog nitrata, 2g srebrovog nitrata, 10g volframosilicijeve kiseline te 7,3mL 37%-tnog formalina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA).

Razvijajući je ispran u tekućoj vodi kroz desetak minuta, a potom su preparati prebačeni vrlo kratko u otopinu za izbjeljivanje i fiksiranje. Otopina je pripremljena prema slijedećem receptu: 30g kalijevog karbonata (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 55g EDTA (Riedel-Haën, Seelze, Germany), 25g željezovog (III) klorida (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 120g natrijevog tiosulfata (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), i 20g kalijevog bromida (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), otopljeni u 1000 mL destilirane vode. Nakon otopine za izbjeljivanje i fiksiranje preparati su isprani u otopini fiksativa u 0,5% octenoj kiselini (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA). Na kraju su preparati ponovo isprani pod tekućom vodom desetak minuta. Bojanje po Gallyas-u završeno je dehidriranjem preparata u rastućim koncentracijama etanola (70%, 96% i absolutus), odnosno ispiranjem sa organskim otapalom Hystoclear i pokrivanjem permanentnim pokrivalom Hystomount.

3.3.3. Imunohistokemija s protutijelima na NeuN i SMI312

Imunohistokemijska analiza je provedena primjenom monoklonskih protutijela NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA) specifičnim za DNA vezujući, neuron specifični protein te SMI 312 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, USA) koji je generalni marker svih aksona te prepoznaje fosforilirani epitop na neurofilamentima. Kod viših kralježnjaka ovo protutijelo obično ne prepoznaje nemijelinizirana vlakna kao što su paralelna vlakna i *substantia gelatinosa* u kralježničkoj moždini te će dalje u tekstu biti komentiran kao marker mijeliniziranih aksona. Korištenjem protutijela NeuN dobiva se prikaz položaja neurona, a uz pomoć protutijela SMI312 vidi se položaj mijeliniziranih snopova vlakana.

Imunohistokemijski postupak rađen je na slobodno plutajućim rezovima debljine 35 μm u polistirenskim jažicama napunjenih 0,1MPBS-om. Postupak je započet tretmanom rezova s 1% otopinom peroksida (Kemika, Zagreb) kako bi se uklonila aktivnost endogenih peroksidaza. Blokiranje nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela napravljeno je otopinom 1% govedjeg serumskog albumina (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA) i 5% kozjeg seruma (Gipco, Invitrogen Auckland N.Z.) u 0,1M PBS u trajanju od 2 sata na $+4^{\circ}\text{C}$ i uz neprekidno treskanje. Rezovi su inkubirani u primarnom protutijelu NeuN, odnosno SMI312, preko noći na $+4^{\circ}\text{C}$ uz neprekidno treskanje. NeuN protutijelo je razrijeđeno u omjeru 1:2000 u pripremljenoj otopini blokiranja, a protutijelo SMI312 u razrijeđenju 1:10000. Nakon toga su isprani u pothlađenom 0,1M PBS tri puta po 10 minuta, te je uslijedilo inkubiranje u sekundarnom protutijelu kroz 4 sata na $+4^{\circ}\text{C}$ uz neprekidno treskanje. Kao sekundarno protutijelo korišten je biotinizirani kozji anti-mišji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) razrijeđen 1:500 u blokingu.

Nakon sekundarnog protutijela preparati su isprani 3 puta po 10 minuta u pothlađenom 0,1M PBS i prebačeni u tercijarni kompleks, Vector Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Budući da se ovaj tercijarni kompleks sastoji od avidina i biotinizirane peroksidaze hrena prije uporabe bilo ga je potrebno prekonjugirati u otopini blokiranja u trajanju od oko pola sata. U tercijarnom protutijelu preparati su inkubirani 2 sata na $+4^{\circ}\text{C}$ uz neprekidno treskanje. Rezovi su ponovno isprani, a potom su razvijeni supstratom SIGMAFAST DAB (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Razvijanjem dolazi do precipitacije supstrata zbog čega se javlja smeđe do sivo obojenje na mjestima gdje je došlo do vezanja primarnog protutijela.

Preparati su još jednom isprani s 0,1M PBS, iz destilirane vode navučeni na predmetna stakalca, osušeni i skenirani na NikonScan skeneru i na skeneru ScanScope CS (Aperio, Vista, CA, USA).

3.4. Imunohistokemija s protutijelima anti-PSA-NCAM i 735

Na odabranim rezovima načinjena je imunodetekcija s protitijelima anti-PSA-NCAM (Chemicon, Temecula, CA, USA) i 735 (dar Rite Gerardy-Schan). Protutijelo 735 prepoznaje poli α -(2,8)-sijalinsku kiselinu (PSA, Frosch i sur., 1985). Anti-PSA-NCAM protutijelo također prepoznaje polisijalinsku kiselinu vezanu na NCAM molekulu (tehnički podatci dobiveni uz komercijalno protutijelo).

Ovisno o primarnom protutijelu korištena su dva sekundarna protutijela, biotinizirani kozji anti-mišji IgG uz 735 i anti-mišji IgM (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) uz anti-PSA-NCAM, oba u razrjeđenju 1:500.

3.5. Western blot metoda

3.5.1. Obrada uzorka

Western blot metodom načinjena je detekcija ostalih mogućih proteinskih antigena koji reagiraju s protutijelima na PSA-NCAM i potvrđena molekulska masa PSA-NCAM glikoproteina kod svake vrste riba.

Svježi uzorci mozгова spremljeni su na led odmah nakon sekcije na terenu, a zatim pohranjeni do daljnje obrade na -80°C . Prije homogenizacije tkiva uzorci su kratko držani na sobnoj temperaturi da se odmrznu, a potom homogenizirani.

Uzorci moždanog homogeniziranog tkiva potom su stavljeni u „sample buffer“ koji je napravljen prema receptu: 4mL 100% glicerola (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 2,4 mL 1M Tris-HCl-a pH =6,8 (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA) 0,8g SDS (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA), 40mg bromfenol blue (Carl Roth, GmbH, Karlsruhe, Germany) 0,5mL beta-merkaptotetanol (Sigma - Aldrich, St.Louis, MO, USA) i 3,1mL H₂O.

Ukupna količinu proteina određena je Biuret reakcijom. Za tu metodu prvo je pripremljena radna otopina na način da se 1 dio biuret reagens (Herbos Dijagnostika, Sisak)

razrijedio u 9 dijelova destilirane vode. Po 50 μ L uzorka svake ribe stavljen je u epruvetu sa 2,5ml radne otopine. U jednu epruvetu, umjesto uzorka, stavljen je standard (Albumin koncentracije 60g/L, Herbos Dijagnostika) u 2,5ml radne otopine. Tako pripremljen standard i uzorci stavljeni su u vodenu kupelj 10 min na 37°C. Ukupna količina proteina određena je pomoću spektrofotometra (PerkinElmer, Waltman, MA, USA) iz 1000 μ L uzorka svakog uzorka i uspoređena s istom količinom standarda. Ukupna koncentracije proteina izražena je u mg/mL homogenata.

3.5.2. Izrada Western blot metode

Western blot metodom načinjena je detekcija proteina iz porodice NCAM na homogenatima svježega tkiva svih šest vrsta riba. Nakon što su uzorci homogenizirani stavljeni su u pufer za uzorke (eng. sample buffer), prokuhani su na 95°C 10 minuta, a potom centrifugirani 3 minute na 13000 rpm u centrifugi (Beckman,Avanti 30 Centifuge). Za SDS page elektroforezu su korišteni gelovi gradijenta 4-15% (BioRad, Hercules, CA, USA) na koje je nanošeno po 10 μ L svakog uzorka te 5 μ L WesternC standarda (BioRad, Hercules, CA, USA). Elektroforeza je trajala oko 1,5 sat na 100V u „running bufferu“ (Biorad Hercules, CA, USA).

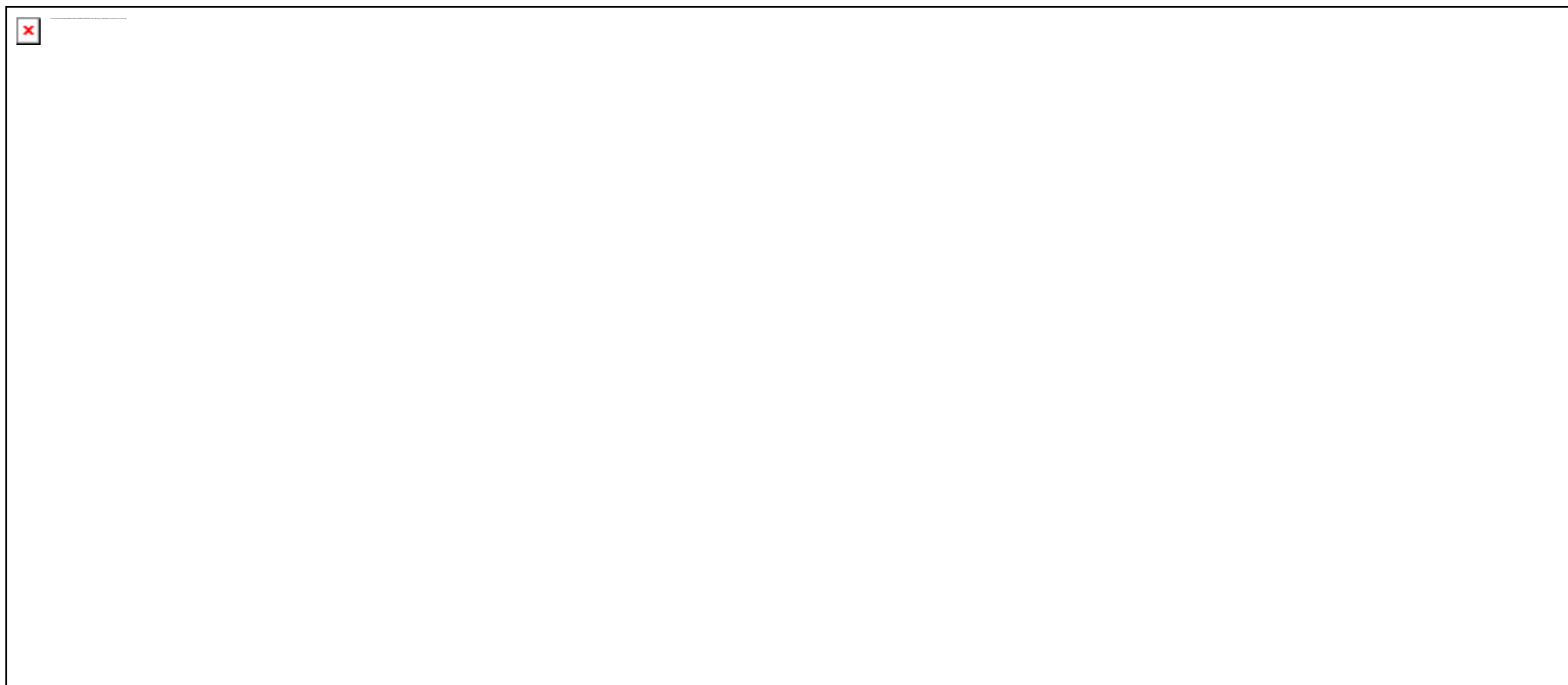
Nakon završene elektroforeze razdvojeni proteini su preneseni na PVFD membranu (BioRad, Hercules, USA) tehnikom Wet blota ili otiska u kadici (Bio rad Hercules, CA, USA). Postupak blotanja trajao je 60 minuta, pri 30V. Nakon prijenosa na membranu slijedio je postupak imunodetekcije. Nespecifične reakcije blokirane su otopinom 5% mlijeka u prahu i dodatkom 10% detergenta Tween (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u omjeru 1:100. Blokiranje je trajalo 1 sat na +4°C uz neprekidno treskanje. Nakon toga je membrana isprana otopinom PBS 3 puta po 5 minuta na treskalici u koju je također dodan 10% Tween u omjeru 1:200. Ta je otopina korištena za sva sljedeća ispiranja. Nakon ispiranja membrana je inkubirana u primarnom protutijelu preko noći na +4°C uz neprekidno treskanje. Za ovu imunodetekciju korištena su visoko specifična protutijela na PSA-NCAM i 735 u omjerima 1: 5 000. Ista otopina za blokiranje nespecifičnih reakcija se koristila i za pripremu protutijela.

Potom je membrana isprana u PBS tri puta po 5 minuta na +4°C na treskalici. Nakon ispiranja slijedilo je inkubiranje sa biotiniziranim sekundarnim protutijelima IgG i IgM klase kroz 1 sat, već korištenim za imunohistokemijski postupak. Nakon ispiranja, membrana je inkubirana sa Strep Tactin-HRP Conjugate (BioRad, Hercules, CA, USA). Membrana je

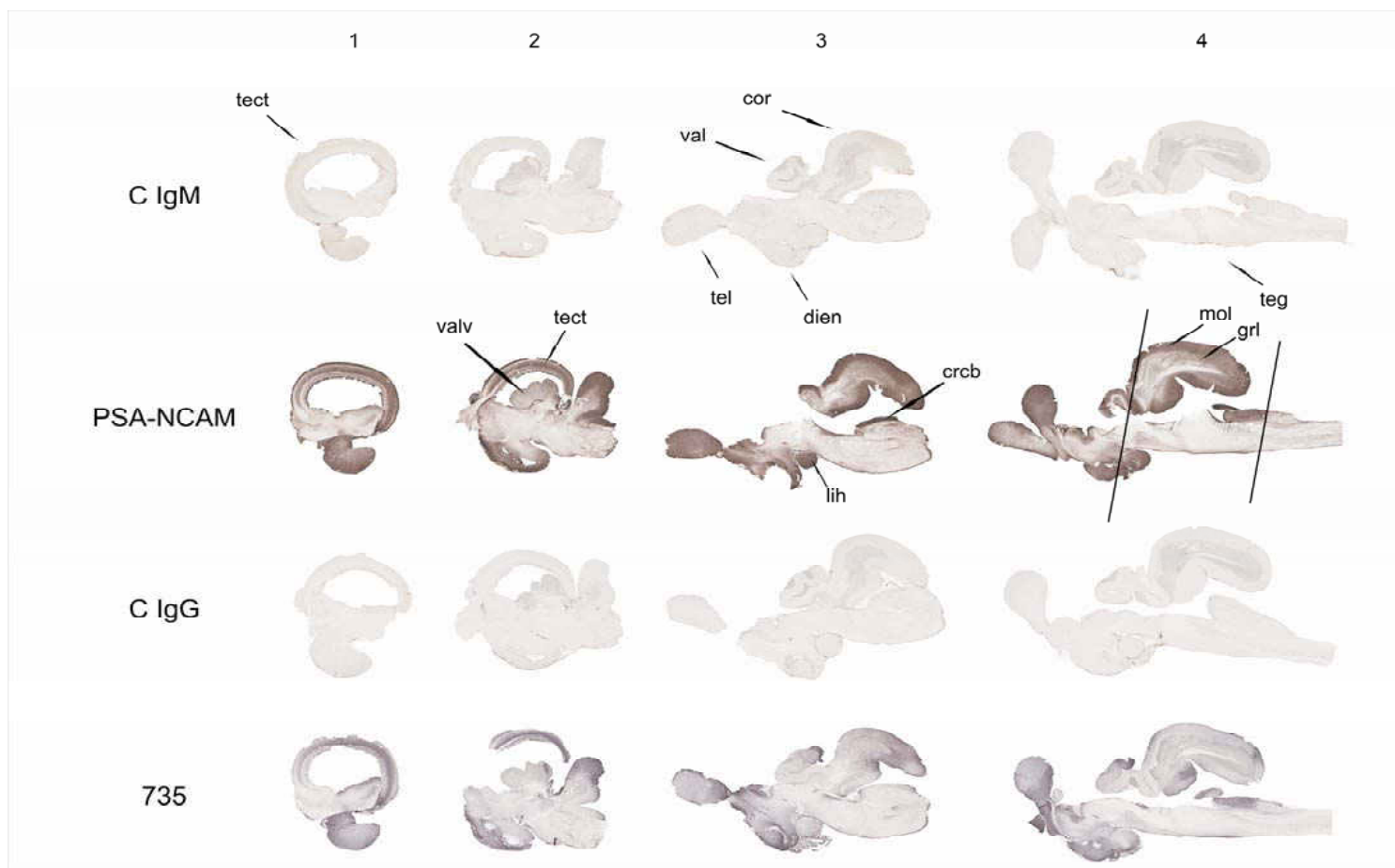
ponovno isprana, a zatim je uslijedilo razvijanje koje je rađeno u mračnoj komori s Chemi glow razvijanjem (Alpha Inotech, USA) pripremljenim prema uputama proizvođača kako bi se razvila kemiluminiscencija. Konačno je, u različitim vremenskim intervalima, fotografski film eksponiran sa kemiluminiscentnom PVDF membranom.

4.1. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u mozgu odabranih vrsta riba

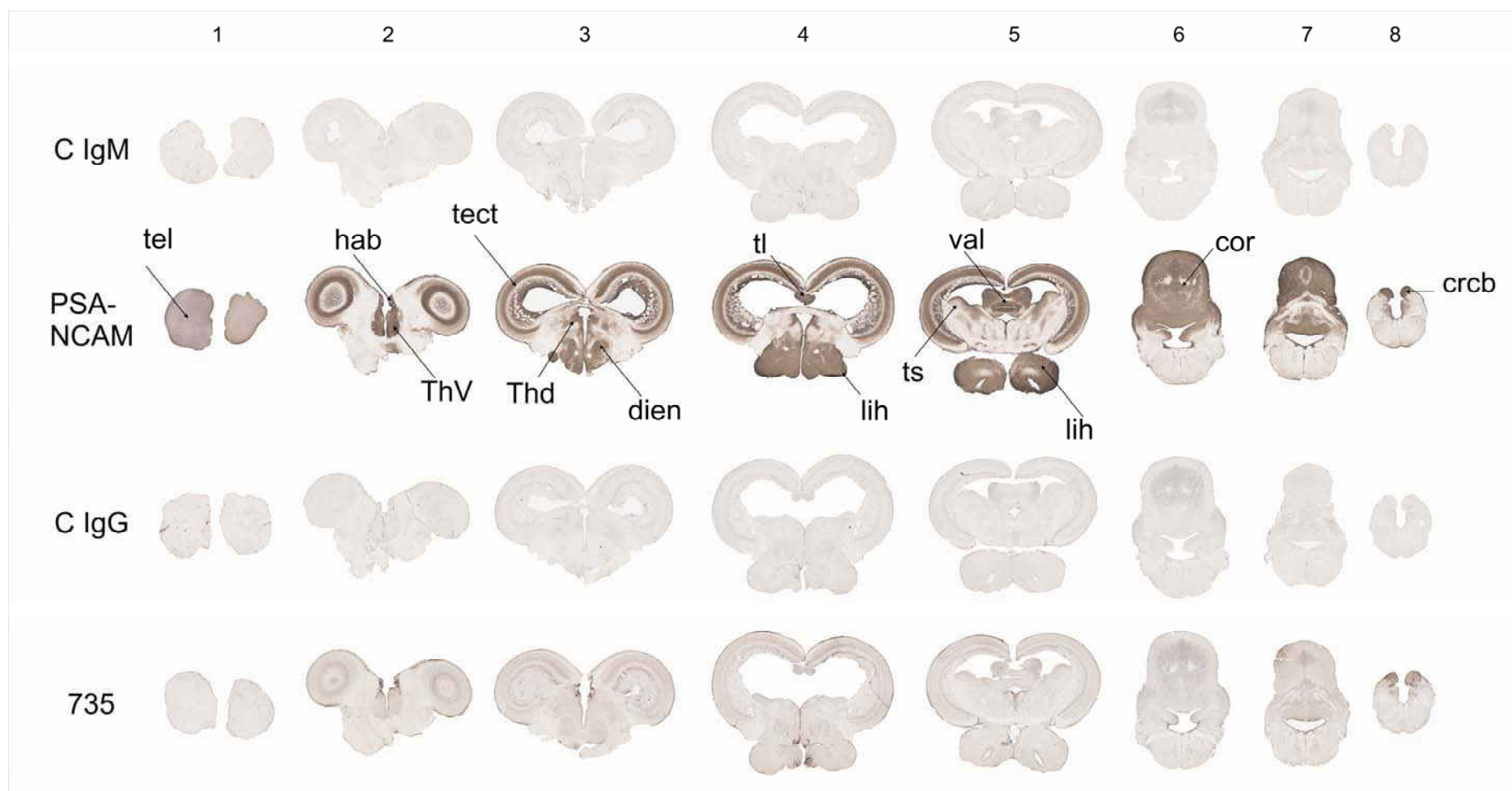
Imunohistokemijom s protutijelima anti-PSA-NCAM i 735 prikazane su široke migracijske zone u odraslom mozgu svih odabranih vrsta pravih koštunjača te jedne vrste štitonoša. Pregled migracijskih zona duž cijelog mozga rezanog u koronarnom i sagitalnom smjeru kod svih odabranih vrsta prikazuju slike od 4 do 15. Radi bližeg tumačenja, migracijske zone su prikazane i opisane na pojedinim regijama, odnosno strukturama mozga, idući redom od njegovog rostralnog dijela prema kaudalnom tj. od prednjeg mozga (*telencephalon*), preko međumozga (*diencephalon*) i srednjeg mozga (*mesencephalon*) do malog mozga (*cerebellum*) i stražnjeg mozga (*rhombencephalon*). Za navedene zone dan je prikaz rezultata dobivenih imunohistokemijom s protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i histološkim bojanjem po Nisslu (slike od 16 do 19, i slike od 26 do 34). Samo za vidni tektum (*optic tectum*, struktura *mesencephalona*) uz navedena protutijela i bojanja, dan je i prikaz rezultata dobivenog imunohistokemijom s protutijelom SMI312 i histološkim bojanjem po Gallyas-u radi bolje orijentacije u njegovim slojevima (slike od 20- 25).



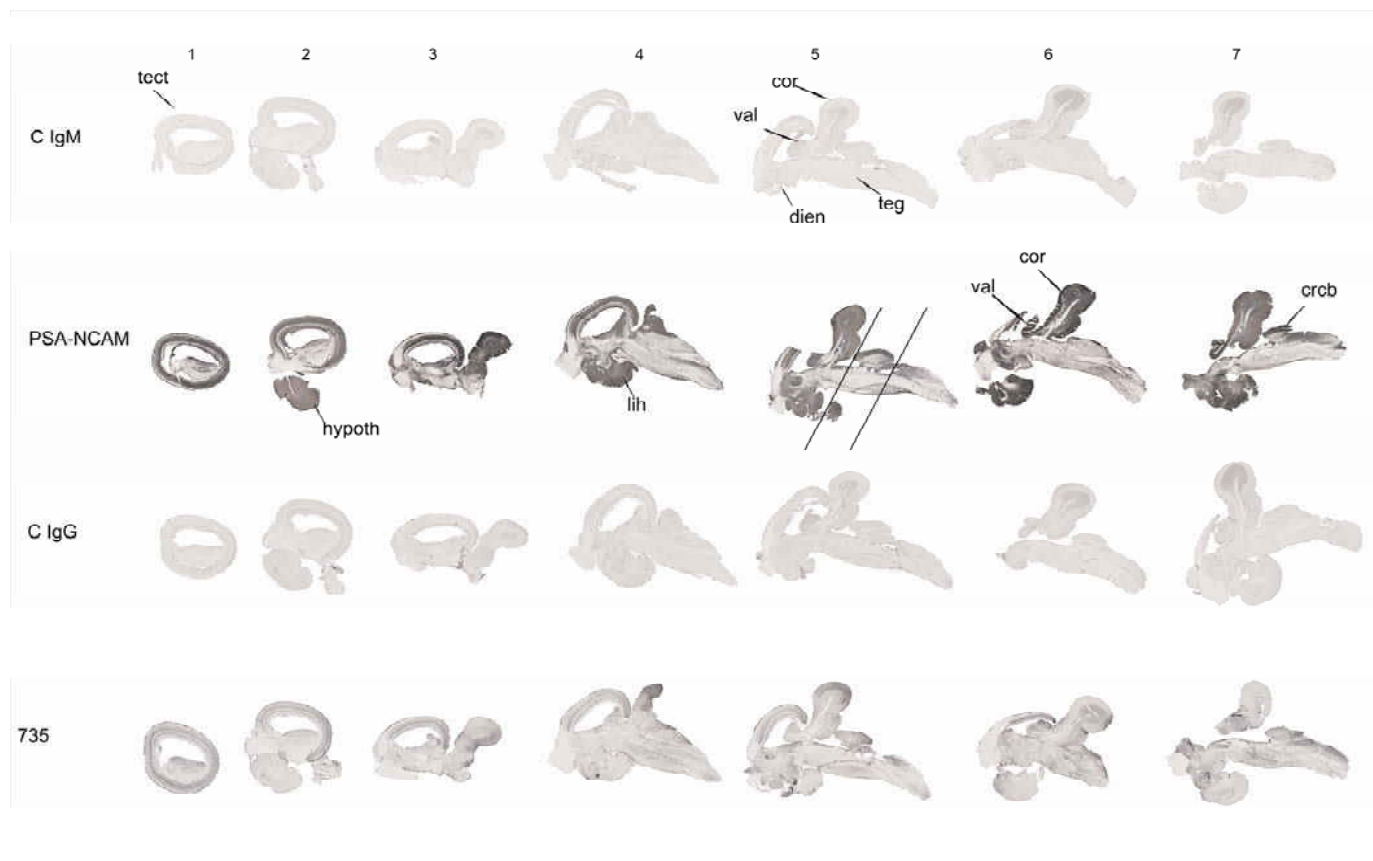
Slika 4. Pregled migracijskih zona kod kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*) (koronarni rezovi). 1) rez kroz prednji mozak; 2) rez kroz rostralni vidni tektum i rostralni međumozak; 3, 4) dvije razine kroz srednji dio međumozga; 5, 6) dvije razine kroz kaudalni međumozak, *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 7) rez kroz kaudalni srednji mozak, kaudalnu *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 8) rez kroz *isthmus* i rostralni mali mozak; 9, 10) dvije razine kroz rostralni stražnji mozak i kaudalni mali mozak; 11, 12) dvije razine kroz kaudalni stražnji mozak. Strelice u drugom redu slike pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelom PSA-NCAM.



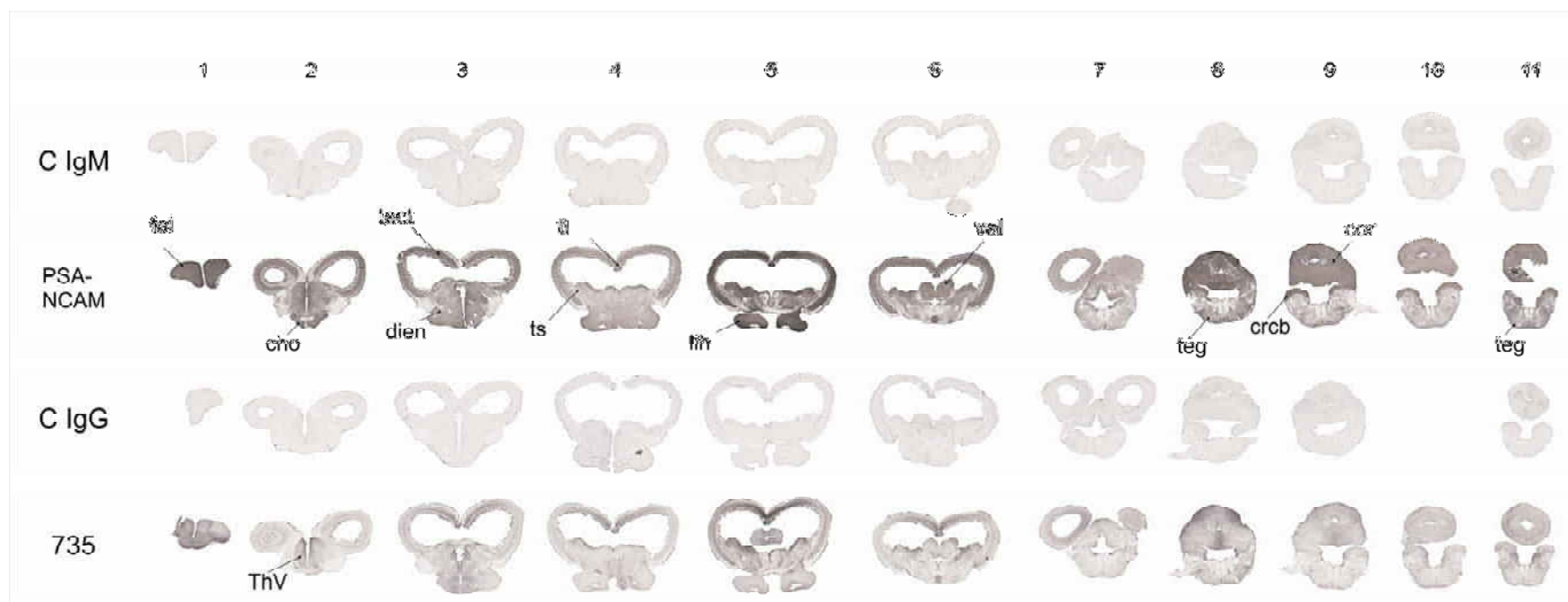
Slika 5. Pregled migracijskih zona kod kalifornijske pastrve (*Onchorhynchus mykiss*) (sagitalni prikaz od lateralno prema medijalno). 1) rez kroz lateralni vidni korteks i hipotalamus; 2) rez kroz lateralni dio *valvule cerebelli*, međumozga i hipotalamusa; 3) rez kroz prednji mozak, međumozak, *valvulu* i *corpus cerebelli*; 4) rez kroz središnju liniju od prednjeg mozga, preko međumozga do stražnjeg mozga. Strelice u gornjem redu slike pokazuju velike anatomske regije, dok strelice u drugom redu slike pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



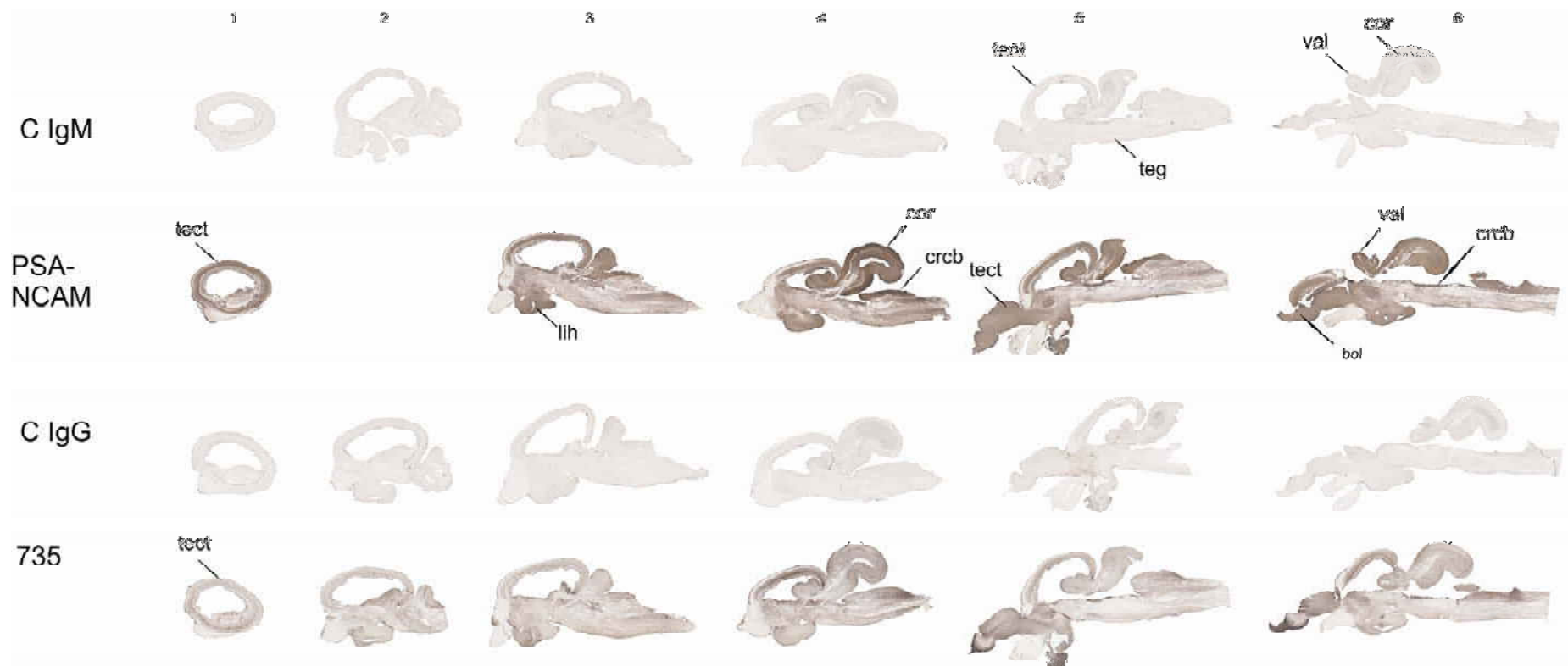
Slika 6. Pregled migracijskih zona kod grgeča (*Perca fluviatilis*) (koronarni rezovi). 1) rez kroz prednji mozak; 2) rez kroz rostralni vidni tektum i rostralni međumozak; 3, 4) dvije razine kroz kaudalni međumozak; 5) rez kroz srednji mozak, *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 6, 7) dvije razine kroz rostralni stražnji mozak i kaudalni mali mozak; 8) rez kroz kaudalni stražnji mozak. Strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



Slika 7. Pregled migracijskih zona kod grgeča (*Perca fluviatilis*) (sagitalni prikaz od lateralno prema medijalno). 1) rez kroz lateralni vidni tektum; 2) rez kroz lateralni vidni tektum i hipotalamus; 3) rez kroz lateralni dio tijela cerebeluma i međumozga; 4) rez kroz međumozak i srednji mozak; 5) rez kroz međumozak, srednji i stražnji mozak; 6) i 7) rez kroz srednji i stražnji mozak u središnjoj liniji. Strelice u gornjem redu slika pokazuju velike anatomske regije, dok strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



Slika 8. Pregled migracijskih zona kod štuke (*Esox lucius*) (koronarni rezovi). 1) rez kroz prednji mozak; 2) rez kroz rostralni vidni tektum i rostralni međumozak; 3, 4) dvije razine kroz kaudalni međumozak i vidni tektum; 5, 6) dvije razine kroz srednji mozak, *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 7) rez kroz *isthmus* i rostralni dio tijela malog mozga; 8, 9) dvije razine kroz rostralni stražnji mozak i kaudalni mali mozak; 10, 11) dvije razine kroz kaudalni stražnji mozak. Strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti a protutijelo PSA-NCAM.



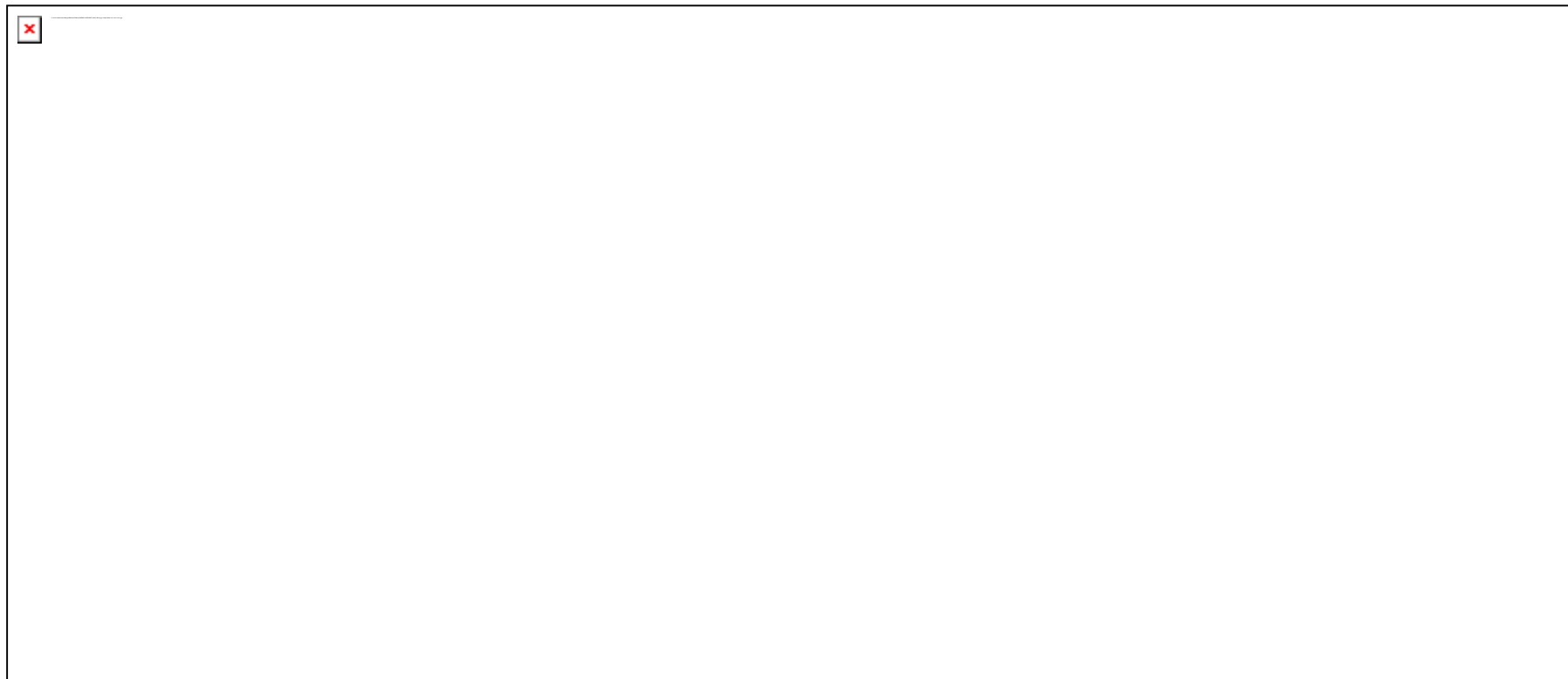
Slika 9. Pregled migracijskih zona kod štuke (*Esox lucius*) (sagitalni prikaz od lateralno prema medijalno). 1) rez kroz lateralni vidni tektum; 2) rez kroz lateralni vidni tektum i hipotalamus; 3) rez kroz međumozak i srednji mozak; 4) rez međumozak, *valvulu cerebelli*, srednji i stražnji mozak; 5, 6) rez kroz središnje strukture od prednjeg mozga do stražnjeg mozga. Strelice u gornjem redu slika pokazuju velike anatomske regije, dok strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.

Slika 4. prikazuje migracijske zone u mozgu odrasle kalifornijske kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*). Idući redom od rostralnog ka kaudalnom dijelu migracijske zone utvrđene imunohistokemijom s protutijelom anti-PSA-NCAM nalaze se u prednjem mozgu, međumozgu odnosno hipotalamusu, srednjem mozgu odnosno vidnom tektumu i strukturi *torusu longitudinalis*, te u strukturama malog mozga kao što su *valvula cerebelli*, *corpus cerebelli* i *crista cerebelli*. Slabija, ali vrlo slična distribucija migracijskih zona utvrđena je i s protutijelom 735. Također, migracijske zone označene ovim protutijelom su uže nego one kod anti-PSA-NCAM. Na slici 5. koja prikazuje mozak kalifornijske kalifornijske pastrve rezan u sagitalnoj ravnini uočava se isti raspored migracijskih zona kroz mozak kalifornijske pastrve. Prisutnost migracijskih zona prati se od rostralnog prema kaudalnom dijelu mozga, gdje se u stražnjem mozgu uočavaju migracijske zone samo u strukturama vezanim za *cerebellum*, odnosno u krovnim strukturama stražnjeg mozga, dok u njegovom bazalnom dijelu više nema reaktivnosti. Reaktivnost potpuno prestaje na granici stražnjeg mozga i kralježnične moždine alarno (suprotno od bazalno), te na granici međumozga i tegmentuma srednjeg mozga bazalno.

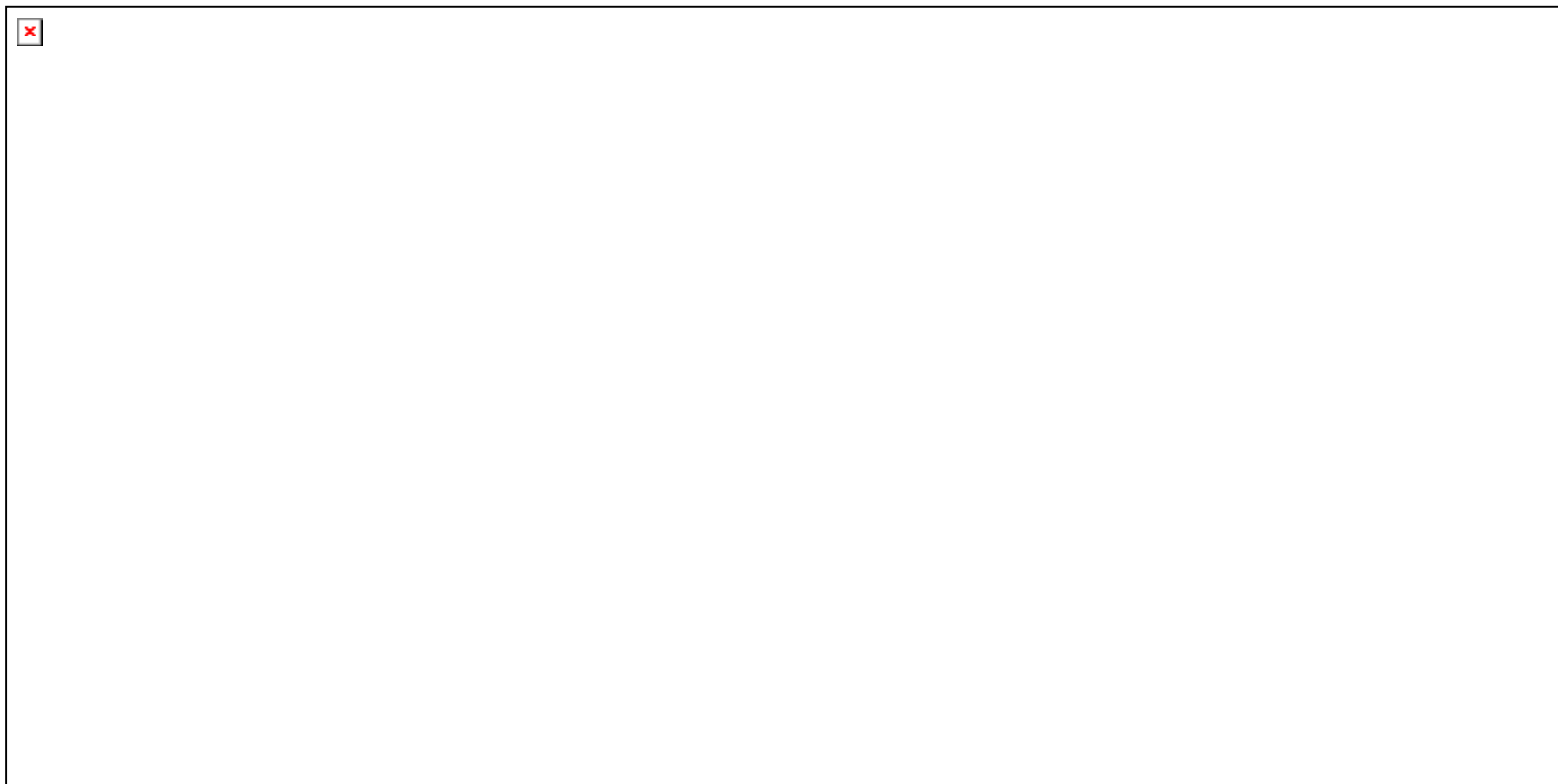
Grgeč (*Perca fluviatilis*) po distribuciji migracijskih zona utvrđenim s protutijelom anti PSA-NCAM slični kalifornijskoj pastrvi gdje su migracijske zone utvrđene u svim regijama mozga. Gledajući rostralno prema kaudalnom dijelu mozga, migracijske zone prisutne su u prednjem mozgu i međumozgu i to u njegovom ventralnom području (*thalamus ventralis*), dorzalnom području (*thalamus dorsalis*) i u području jezgre tzv. *nucelus habenularis* te u strukturi hipotalamusa tzv. *lobus inferior hypothalami*. Nadalje, migracijske zone se protežu u srednjem mozgu te u strukturama vezanim za mali mozak kao što su *valvula cerebelli*, tijelo cerebeluma i *crista cerebelli*. Migracijske zone utvrđene s protutijelom 735 najizraženije su u strukturi *crista cerebelli* a nešto slabija u dijelu međumozga, vidnog tektuma te *corpuse cerebelli* (slika 6). I kod ove vrste uočen je nedostatak migracijskih zona u bazalnim dijelovima stražnjeg mozga što znači da sposobnost migracije neurona idući prema leđnoj moždini opada (slika 7).

Štuka po rasporedu migracijskih zona utvrđenih imunohistokemijom s protutijelom anti-PSA-NCAM slični kalifornijskoj pastrvi u rostralnim strukturama mozga (slika 8). Ove dvije vrste razlikuju se po migracijskim zonama u međumozgu i srednjem mozgu koje su kod štuke, za razliku od kalifornijske pastrve, utvrđene u gotovo cijelom međumozgu i srednjem mozgu, te dopiru od stražnjeg mozga do kralježnične moždine (slika 9). Kod ove vrste, prestanak reaktivnosti u smislu izostanka migracijskih regija u bazalnim dijelovima stražnjeg mozga nije uočen. Također se i kod ove vrste zamjećuje isti raspored migracijskih zona sa

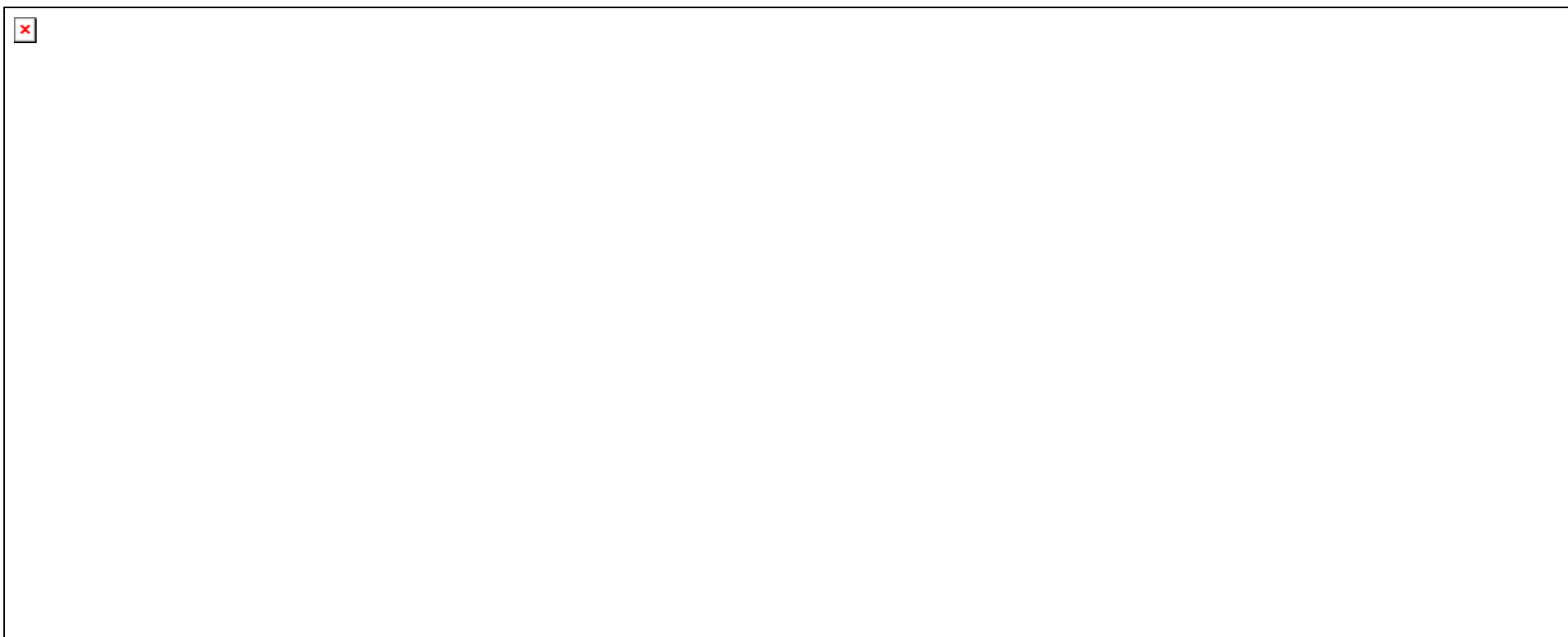
slabijom i specifično naglašenom ekspresijom PSA-NCAM epitopa kojeg prepoznaje protutijelo 735 u prednjem mozgu, svim dijelovima malog mozga i dijelovima hipotalamusa.



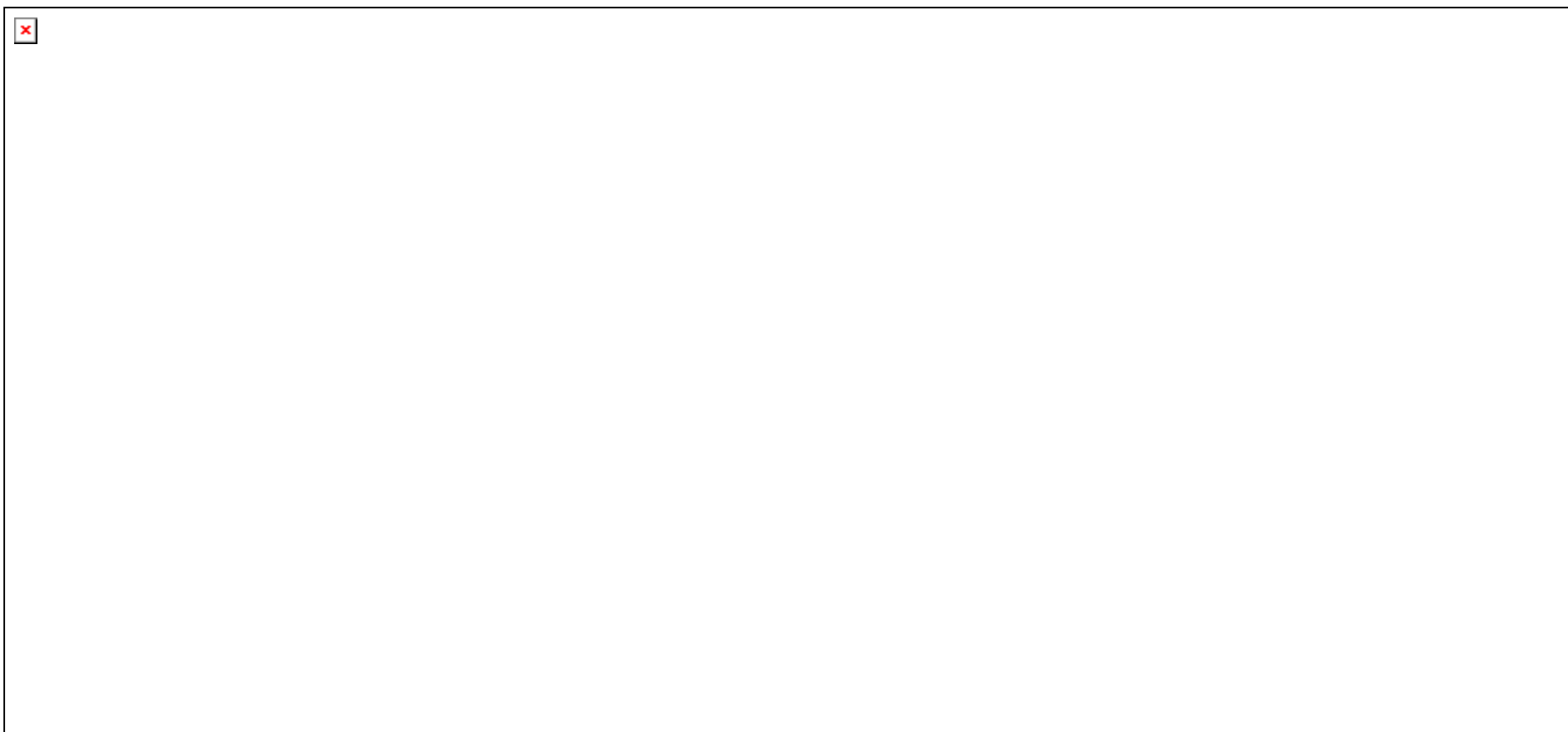
Slika 10. Pregled migracijskih zona kod šarana (*Cyprinus carpio*) (kornarni rezovi). 1) rez kroz prednji mozak; 2, 3) dvije razine kroz rostralni vidni tektum, *valvulu cerebelli* i rostralni međumozak, 4, 5) dvije razine kroz srednji mozak, *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 6, 7) dvije razine kroz mali mozak i rostralni dio stražnjeg mozga; 8, 9, 10) dvije razine kroz rostralni i srednji dio stražnjeg mozga; 11) rez kroz kaudalni stražnji mozak. Strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM, a u četvrtom redu mjesta najveće imonoreaktivnosti na protutijelo 735.



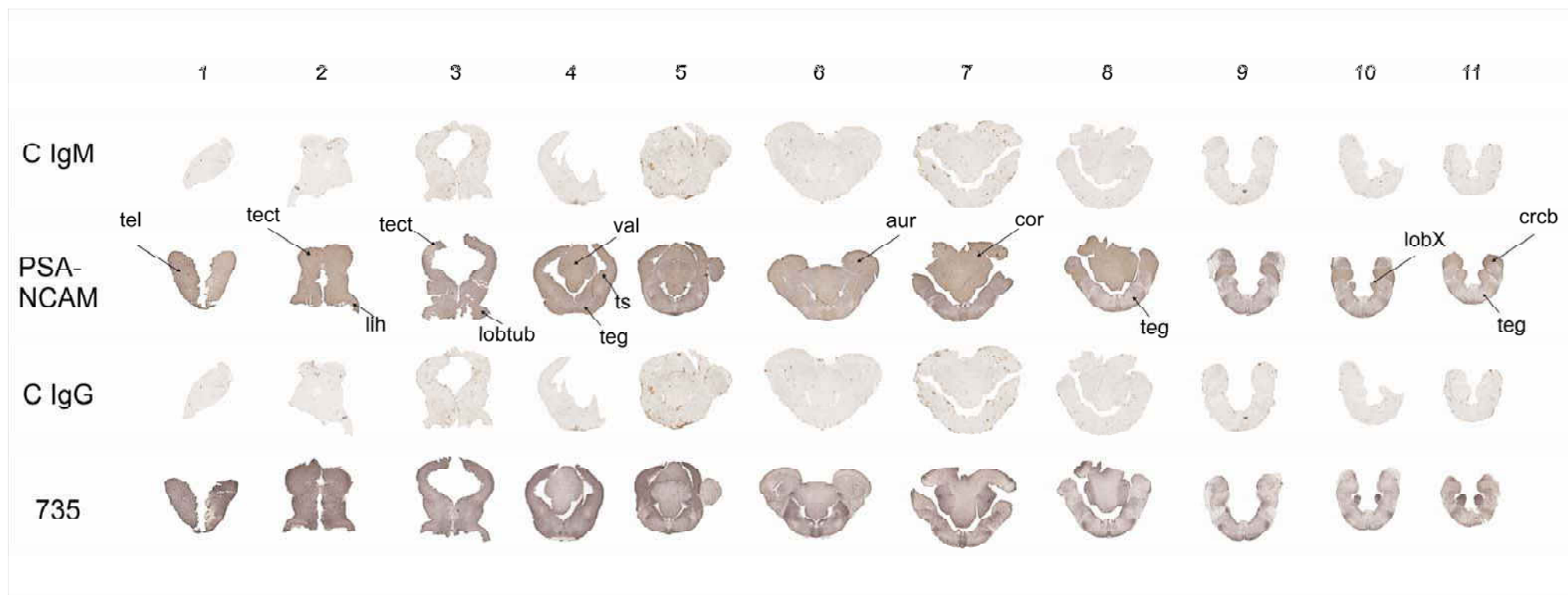
Slika 11. Pregled migracijskih zona kod šarana (*Cyprinus carpio*) (sagitalni prikaz prikaz od lateralno prema medijalno). 1, 2) dvije razine kroz lateralni vidni tektum, hipotalamus, *valvulu cerebelli* i lob X; 3) rez kroz lateralni prednji mozak, *valvulu cerebelli* i tijelo malog mozga te međumozak; 4, 5) dvije razine kroz središnji međumozak, srednji i stražnji mozak. Strelice u gornjem redu slika pokazuju velike anatomske regije, dok strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



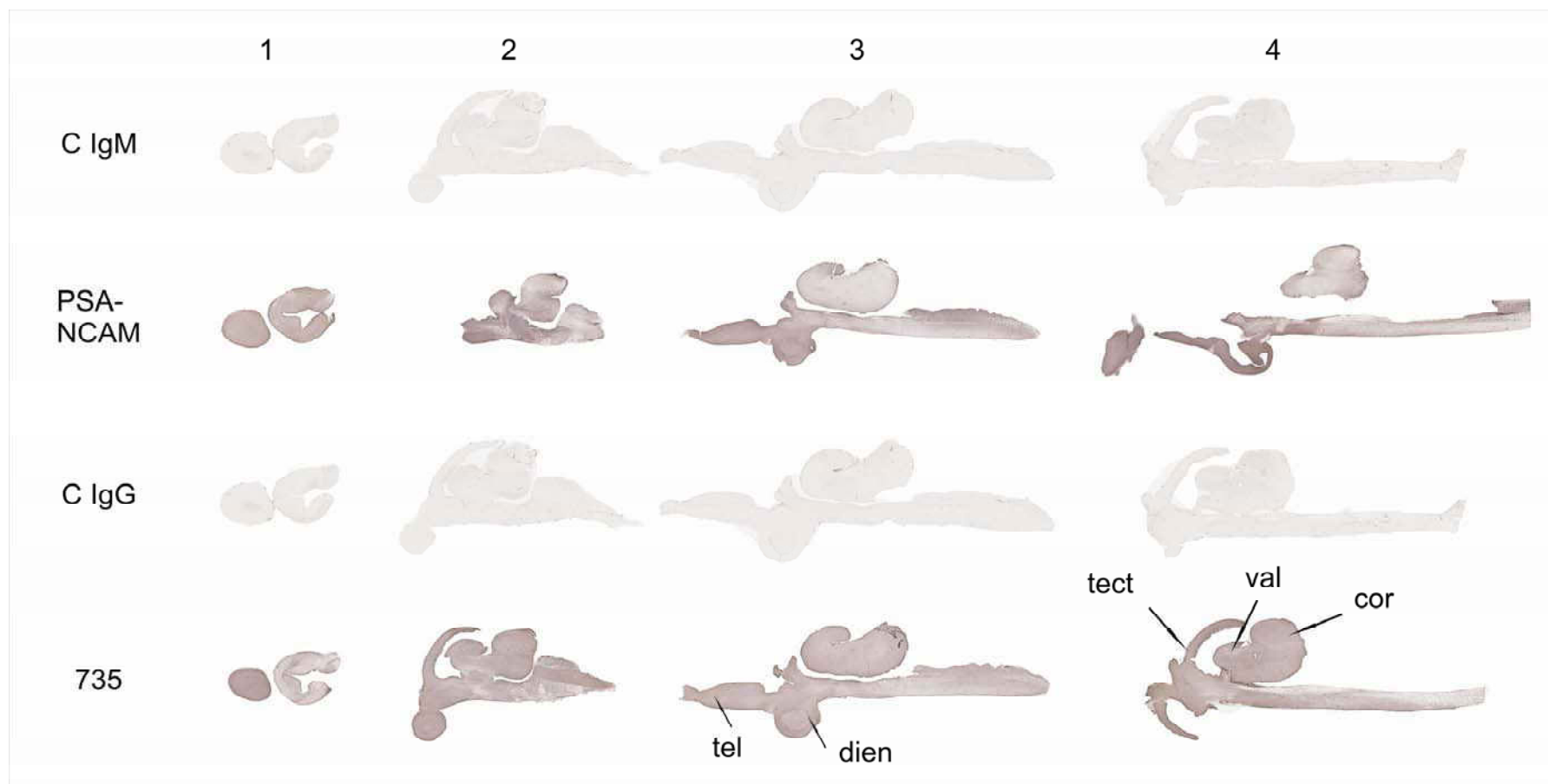
Slika 12. Pregled migracijskih zona kod soma (*Silurus glanis*) (koronarni rez). 1) rez kroz prednji mozak, 2, 3) dvije razine kroz međumozak i rostralni mali mozak; 4, 5) dvije razine kroz srednji mozak, *valvulu cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 6, 7) dvije razine kroz mali mozak i kaudalni srednji mozak; 8, 9, 10) tri razine kroz rostralni, srednji i kaudalni stražnji mozak. Strelice u prvom redu pokazuje anatomsku strukturu, a strelice u drugom redu slike pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



Slika 13. Pregled migracijskih zona kod soma (*Silurus glanis*) (sagitalni prikaz od lateralno prema medijalno). 1, 2) dvije razine kroz lateralni prednji mozak, vidni tektum, hipotalamus i *valvulu cerebelli*; 3) rez kroz prednji mozak, *valvulu cerebelli* i tijelo malog mozga te međumozak; 4, 5 i 6) tri razine kroz središnji prednji mozak, međumozak, srednji i stražnji mozak. Strelice u gornjem redu slika pokazuju velike anatomske regije, dok strelice u drugom redu slike pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



Slika 14. Pregled migracijskih zona kod kečige (*Acipenser ruthenus*) 1) rez kroz prednji mozak; 2) rez kroz međumozak; 3) rez kroz rostralni srednji mozak i kaudalni međumozak; 4, 5) dvije razine kroz središnji dio srednjeg mozga i *valvulu cerebelli*; 6) rez kroz rostralni stražnji mozak i *auriculu cerebelli*; 7, 8) dvije razine kroz stražnji mozak (razina *nervus trigeminus*); 9) rez kroz stražnji mozak (razina *nervus octavus*); 10, 11) dvije razine kroz stražnji mozak (razina *nervus lineae lateralis posterior*). Strelice u drugom redu slika pokazuju mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo PSA-NCAM.



Slika 15. Pregled migracijskih zona kod kečige (*Acipenser ruthenus*) (sagitalni prikaz od lateralno prema medijalno). 1) rez kroz lateralni prednji mozak i međumozak 2) rez kroz vidni tektum, srednji mozak i *valvulu cerebelli*; 3) rez kroz prednji mozak, međumozak i tijelo malog mozga; 4) rez kroz središnji međumozak, srednji i stražnji mozak. Strelice pokazuju velike anatomske regije i mjesta najveće imunoreaktivnosti na protutijelo 735.

Slike 10 i 11 pokazuju raspored migracijskih zona utvrđenih s protutijelom anti- PSA-NCAM i 735 kod šarana (*Cyprinus carpio*). Migracijske zone postoje u svim regijama mozga uz slabiju ekspresiju epitopa kojeg prepoznaje protutijelo 735. U prednjem mozgu migracijske zone utvrđene protutijelom anti-PSA-NCAM (u daljnjem tekstu PSA-NCAM zone) nalaze se difuzno u cijelom tektumu, dok je reaktivnost s protutijelom 735 (u daljnjem tekstu 735 zone) znatno slabija. Međumozak je u cijelosti pozitivan sa oba protutijela, s tim da je kaudalni međumozak jače pozitivan u odnosu na rostralni, a u cijelom mozgu posebno se ekspresijom ističu hipotalamus i *lobus inferior hypothalami*. Epitop protutijela 735 je slabije ekspresije. Vidni tektum je pozitivan i na PSA-NCAM i na 735 protutijelo. Raspored PSA-NCAM zone u strukturi *valvula cerebelli* bitno se razlikuje od 735 zona (slika 11). Dok su PSA-NCAM zone u svim slojevima *valvule*, 735 zone su samo u granularnom sloju *valvule*. Kaudalno od *valvule* pozitivne su strukture *corpus cerebelli* i *crista cerebelli* te, u rostralnom dijelu stražnjeg mozga, posebni režnjevi: glosofaringealni, facijalni i vagalni.

Slično šaranu, i som (*Silurus glanis*) pokazuje raspored migracijskih zona duž cijelog mozga gledajući koronarne (slika 12) i sagitalne rezove mozga (slika 13). Kao i kod šarana uočena je slabija ekspresija epitopa protutijela 735. Također, zamjetna je imunoreaktivnost oba protutijela u posebnoj strukturi ell i lob VII.

Kečiga, iako po sistematici ne pripada skupini pravih koštunjača nego je predstavnik štitonoša, pokazuje veliku sličnost u rasporedu migracijskih zona sa pravim koštunjačama (slike 14 i 15). I kod ove vrste utvrđeno je da su migracijske zone raspoređene duž cijelog mozga. Ekspresija PSA-NCAM epitopa kojeg prepoznaje protutijelo 735 kod ove vrste nije drastično slabija kao kod predstavnika pravih koštunjača. Migracijske zone utvrđene protutijelom PSA-NCAM gotovo su jednako izražene kao i 735 zone u prednjem mozgu, međumozgu i srednjem mozgu. Tek se kod strukture *valvula cerebelli* i ostalih struktura stražnjeg mozga kao što su *corpus* i *crista cerebelli* te *auricula cerebelli* uočavaju razlike u izražaju PSA-NCAM i 735 epitopa. U navedenim strukturama 735 zone su u odnosu na PSA-NCAM zone nešto slabije izražene. U stražnjem mozgu na razini *nervus lineae lateralis posterior* nema znatne razlike u PSA-NCAM i 735 zonama na strukturi *lobus vagus*.

Stražnji mozak kečige pokazuje reaktivnost u smislu da su migracijske zone prisutne u stražnjem mozgu od njegovog rostralnog dijela do njegovog kaudalnog dijela.

Pozitiva ekspresija PSA-NCAM molekule utvrđena s oba protutijela detektirana je u bazalnim dijelovima stražnjeg mozga kod kečige (slika 15) i ostalih vrsta kao što su som i šaran odnosno onih vrsta koje na stražnjem mozgu posjeduju posebne režnjeve za interpretaciju osjeta koji dolaze iz različitih okusnih pupoljaka (slike 11 i 13).

Po imunoreaktivnosti migracijskih zona šaran i som pokazuju sličnost sa štukom, dok ove tri vrste riba pravih koštunjača zajedno pokazuju sličnost sa kečigom kao predstavnikom štitonoša.

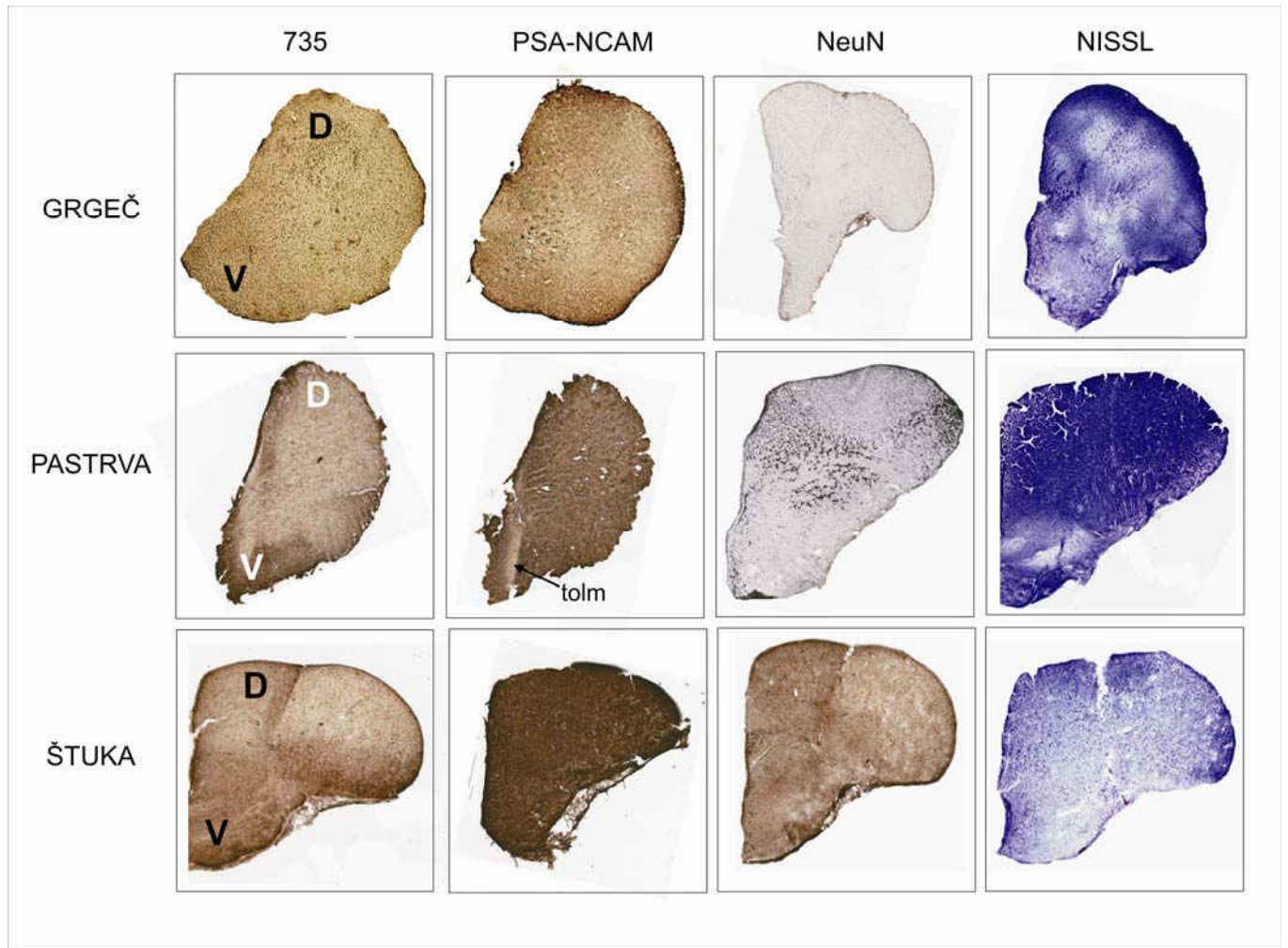
4.2. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u prednjem mozgu odabranih vrsta riba

Migracijske zone u prednjem mozgu (*telencephalon*) grgeča, kalifornijske kalifornijske pastrve i štuke detektirane sa protutijelima 735 i anti-PSA-NCAM prikazuje slika 16. Na slici su migracijske zone uspoređene sa raspodjelom jezgara neurona vizualiziranih protutijelom NeuN te preparatima histološki bojanim po Nisslu koji boja sve jezgre. Sve tri ribe imaju difuzno obojen prednji mozak, nešto intenzivnije sa protutijelom PSA-NCAM. Jedino se kod kalifornijske pastrve uočava izostanak bojenja u predjelu *tractus olfactorius medialis*.

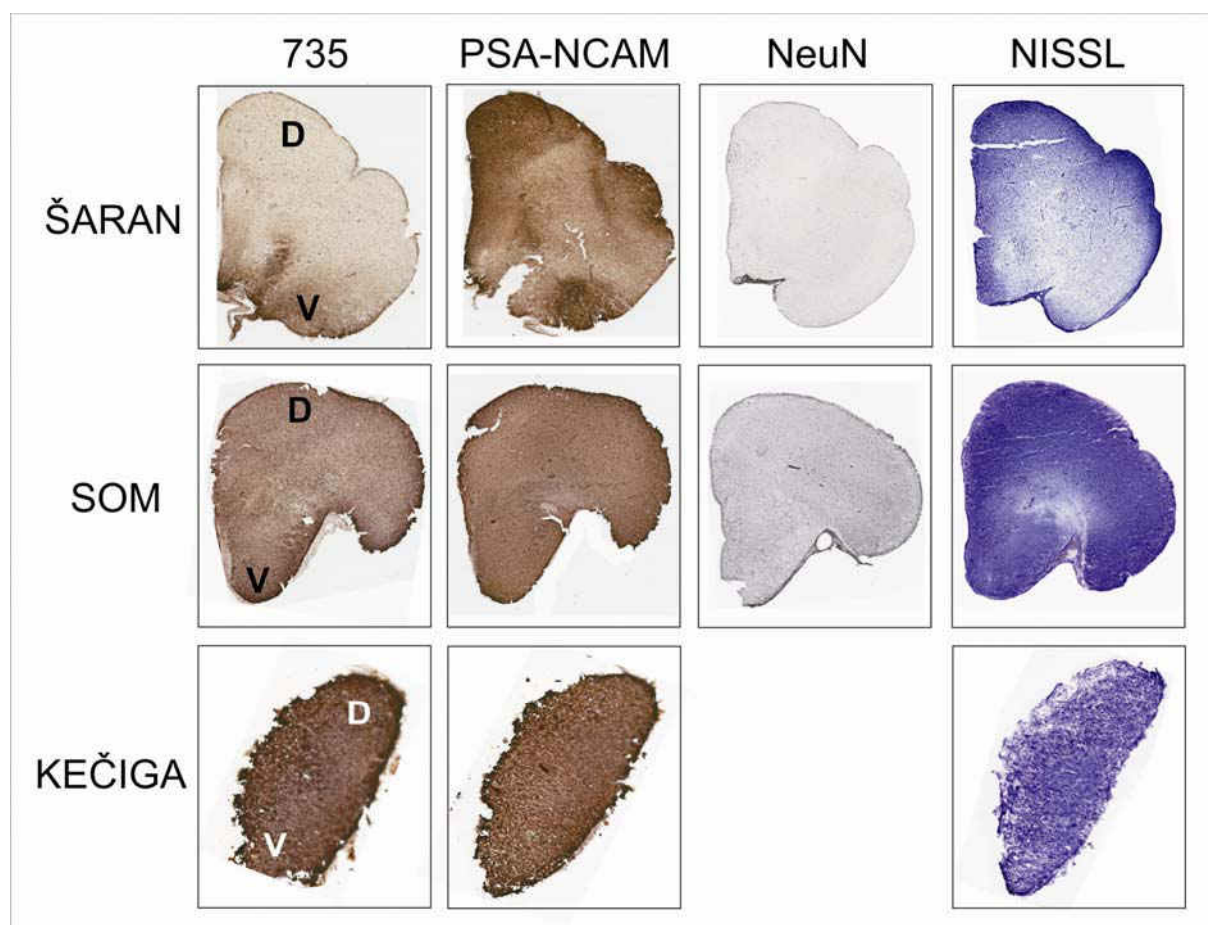
Kod svih riba uočava se slabiji intenzitet bojenja s 735, koji je pogotovo izražen kod grgeča. Kod kalifornijske pastrve je reakcija na 735 jača u predjelu *area ventralis telencephali* (slika 16, oznaka V) nego kod ostalih riba. Kod štuke isti epitop ima difuznu raspodjelu.

Protutijelo NeuN najbolje je reagiralo na tkivu kalifornijske kalifornijske pastrve. Tako ona ima više NeuN pozitivnih neurona u dorzalnom dijelu prednjeg mozga (slika 16, oznaka D) nego u ventralnom dijelu (slika 16, oznaka V).

Slično štuki, kod šarana su jezgre koje su reagirale na cresil violet (plavu boju iz Nisslovog reagensa) smještene na dorsalnim rubovima prednjeg mozga (slika 17). Kod soma i kečige, jezgre su jednoliko raspoređene duž cijelog prednjeg mozga i odgovaraju rasporedu PSA-NCAM i 735 zona. Također PSA-NCAM epitop je izraženiji od epitopa protutijela 735. Kod soma i kečige raspored migracijskih zona pozitivnih na PSA-NCAM i 735 je jednak. Kod šarana 735 pozitivna zona je u ventralnom dijelu prednjeg mozga (slika 17), baš kao kod kalifornijske pastrve (slika 16). Od svih prikazanih vrsta prednji mozak eksprimira marker neurona najjače kod kalifornijske pastrve.



Slika 16. Koronarni rez, razina prednji mozak, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN te histološko bojanje po Nissl-u na mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*). Kraticama i strelicama su označene posebno dobro obojene regije. V – area ventralis telencephali, D - area dorsalis telencephali, tolm – tractus olfactorius medialis.



Slika 17. Koronarni rez, razina prednji mozak, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nissl-u u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*). Kraticama su označene posebno dobro obojene regije. V – area ventralis telencephali, D - area dorsalis telencephali.

4.3. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u međumozgu kod odabranih vrsta riba

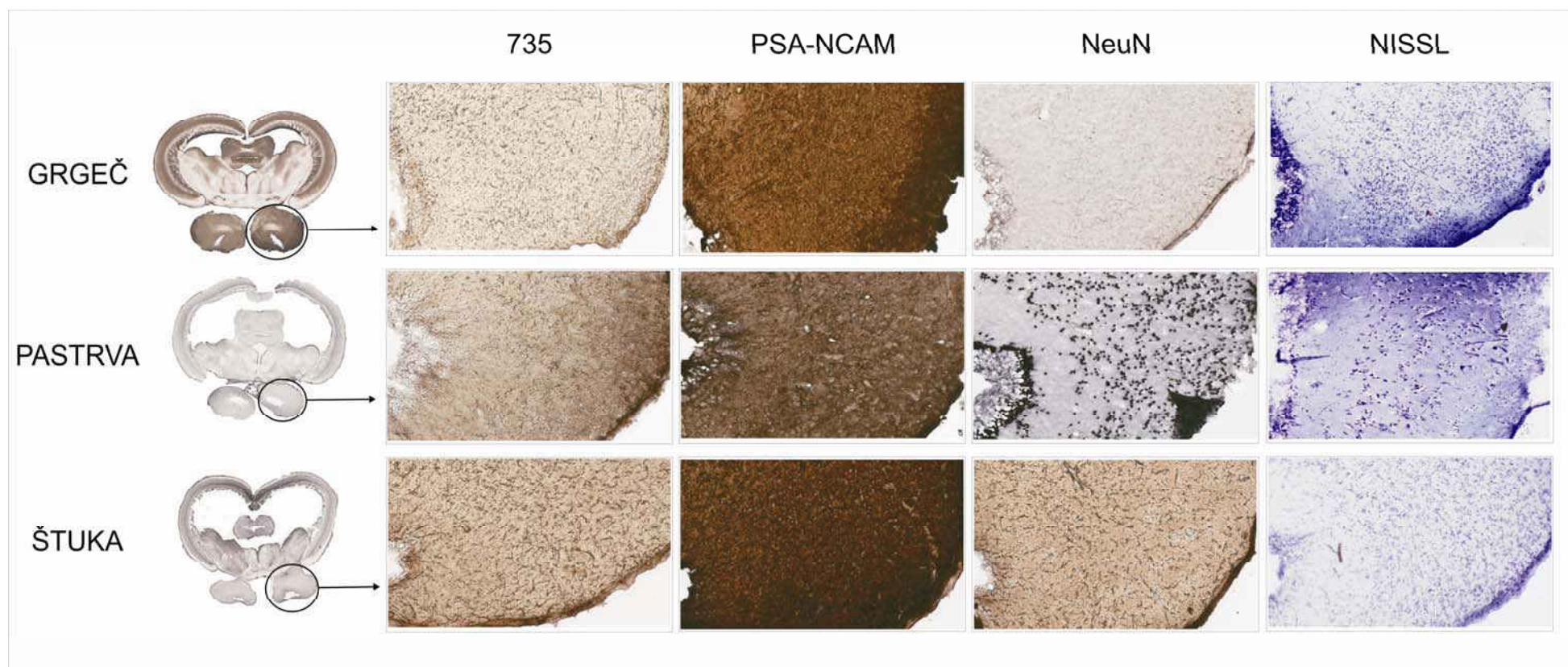
Radi pobližeg utvrđivanja migracijskih zona u međumozgu (*diencephalon*) kod svih šest odabranih vrsta riba izdvojena je struktura *lobus inferior hypothalami*. Ova struktura predstavlja najveći dio hipotalamusa, regije koja je glavni centralni regulator autonomnih živčanih funkcija.

Slika 18. pokazuje navedenu strukturu kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke. Kod svih navedenih vrsta riba migracijske zone utvrđene imunohistokemijom s protutijelom anti-PSA-NCAM pokazuju jaču ekspresiju u odnosu na zone utvrđene protutijelom 735. Iako je ekspresija sa 735 slabija, ipak je utvrđen isti raspored migracijskih neurona kao u regijama detektiranim protutijelom anti-PSA-NCAM. Kod sve tri vrste riba uočena je pozitivna ekspresija markera neurona koja je posebno izražena kod kalifornijske pastrve. Na osnovu ovoga zaključujemo kako cijela struktura *lobus inferior hypothalami* ima reaktivnost na protutijelo PSA-NCAM, 735 i NeuN, te da navedene vrste riba u ovoj strukturi pokazuju visok stupanj sličnosti.

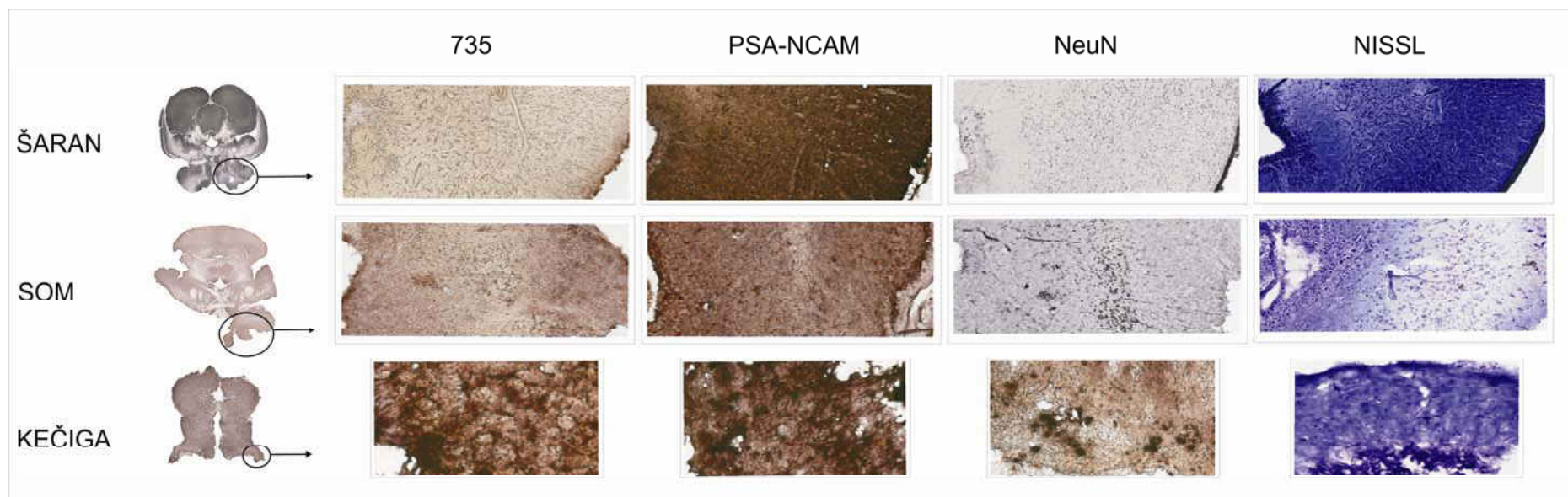
Histološko bojanje po Nisslu kod svih prikazanih vrsta riba na slici 18. pokazuje veću gustoću stanica subventrikularno.

Šaran, som i kečiga pokazuju veliku sličnost po migracijskim zonama unutar strukture *lobus inferior hypothalami* sa grgečom, kalifornijskom pastrvom i štukom (slika 19). I kod ovih vrsta uočena je jača ekspresija epitopa za anti-PSA-NCAM u odnosu na epitop za protutijelo 735, a sve tri prikazane vrste međusobno su slične u rasporedu ovih epitopa. Također, kod sve tri vrste pozitivan je marker neurona NeuN.

Zaključujemo kako je *lobus inferior hypothalami* pozitivan na ekspresiju PSA-NCAM epitopa u svih šest vrsta.



Slika 18. Koronarni rez, razina međumozak, struktura *lobus inferior hypothalami*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*).



Slika 19. Koronarni rez, razina međumozak, struktura *lobus inferior hypothalami*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*).

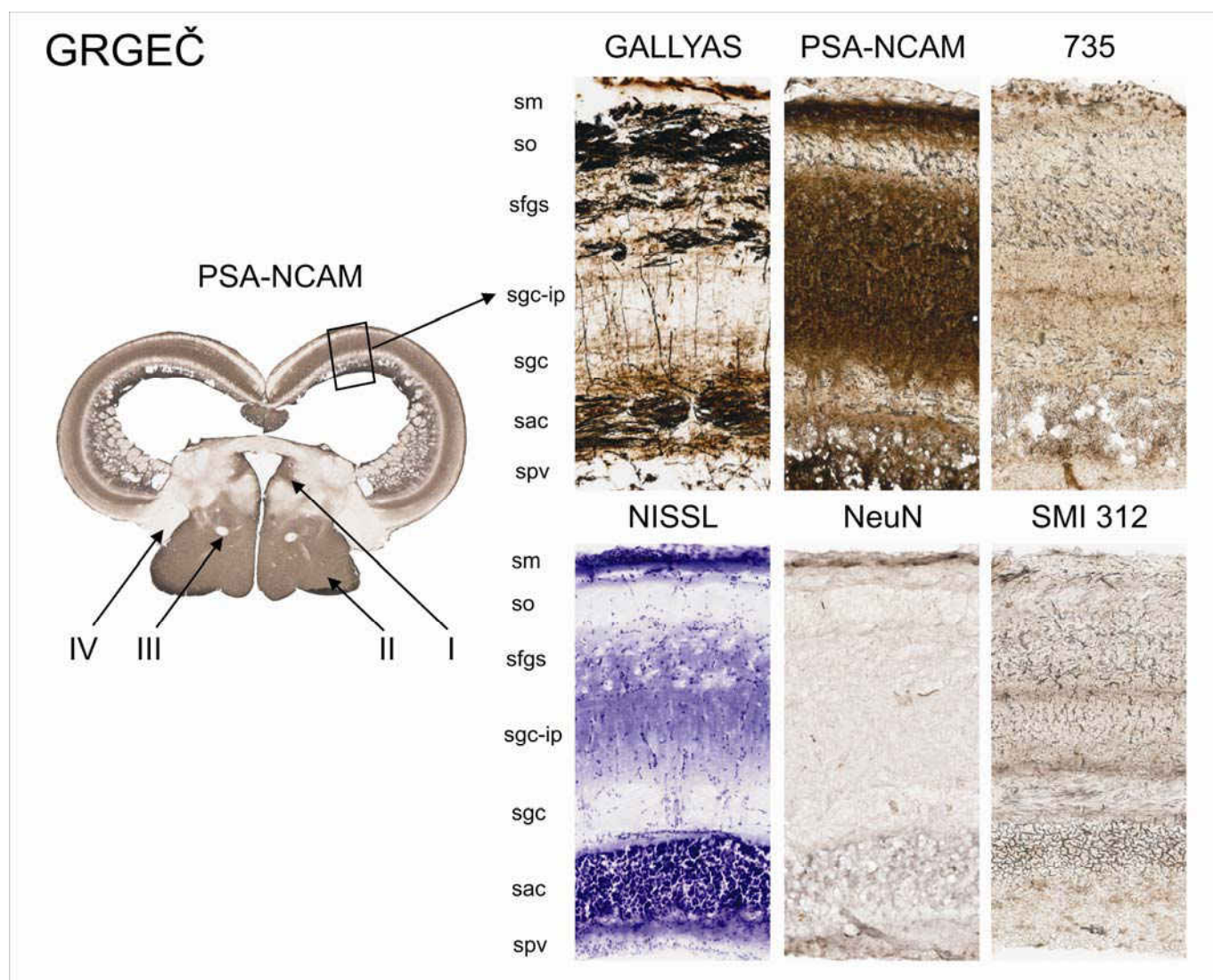
4.4. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u srednjem mozgu kod odabranih vrsta riba

Migracijske zone srednjeg mozga (*mesencephalon*) poblizje su prikazane na sljedećim strukturama: *optic tectum*, *torus longitudinalis* i *torus semicircularis*. Na navedenim strukturama prikazane su migracijske zone utvrđene imunohistokemijom s protutijelima anti-PSA-NCAM (PSA-NCAM regije) i 735 (735 regije). Na istim strukturama, radi bolje orijentacije u utvrđivanju migracijskih zona, prikazana je imunohistokemija s protutijelom NeuN koje pokazuje raspored svih neurona, a na vidnom tektumu i imunohistokemija s protutijelom SMI312 koja pokazuje raspored vlakana. Također je, za sve navedene strukture srednjeg mozga prikazan raspored jezgara histološkim bojanjem po Nisslu, te raspored mijeliniziranih vlakana u vidnom korteksu histološkim bojanjem po Gallyas-u radi bolje orijentacije u njegovom slojevima.

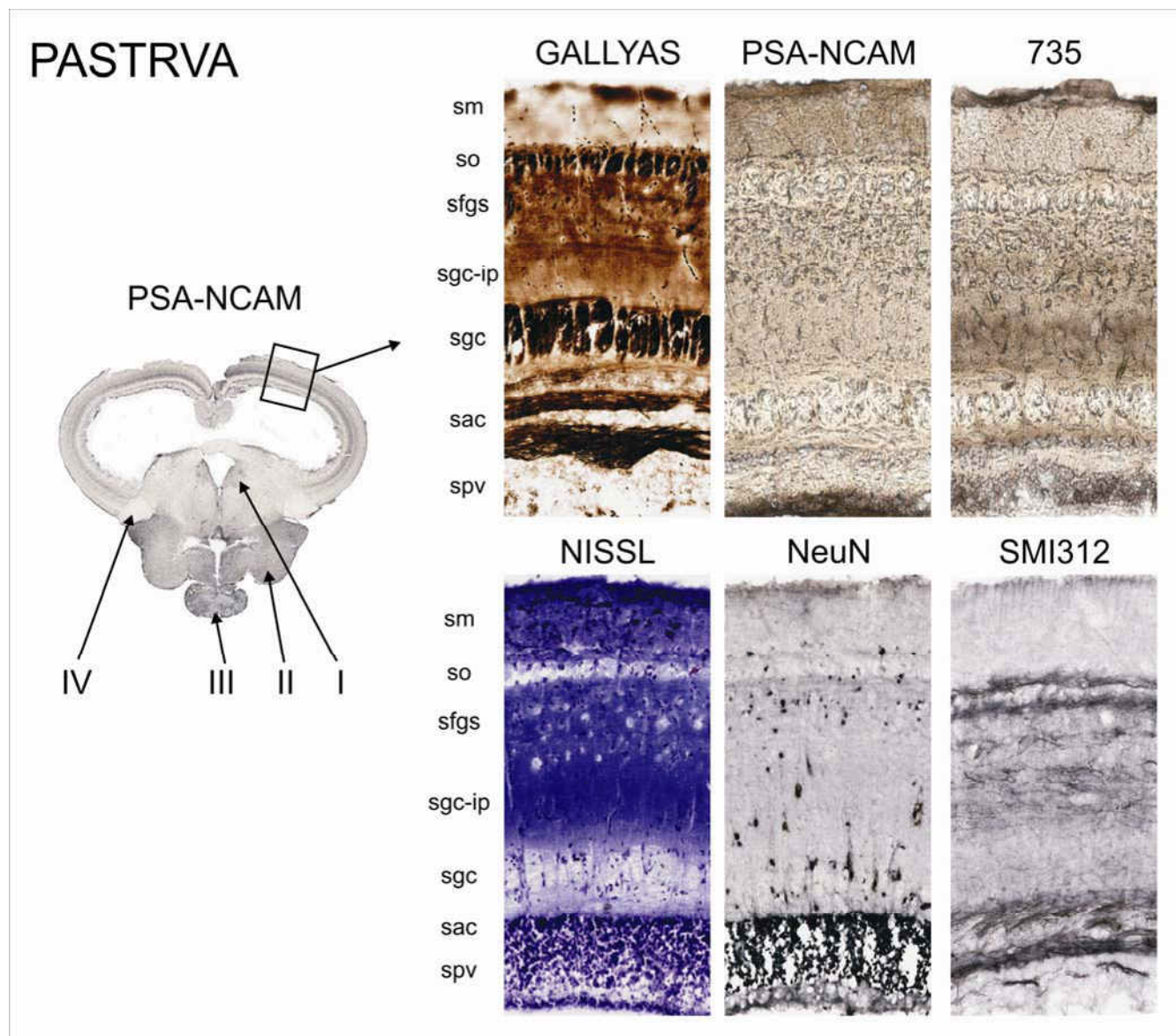
Slike od 20 do 25. predstavljaju migracijske zone u strukturi *optic tectum* kod grgeča, kalifornijske pastrve, štuke, šarana, soma i kečige. Na svim slikama vidljiv je prikaz laminarne građe strukture *optic tectum*, te su skraćenicama označeni njegovi slojevi kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac - *stratum album centrale*, sgc - *duboki sloj stratum griseum centrale*, sgc-ip - *unutrašnji pleksiformni sloj stratum griseum centrale*, sfgs - *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Prvi sloj ili *stratum periventriculare* kao najdublji sloj vidnog tektuma sadrži najveći broj neurona zaduženih za motoriku, odnosno za pokrete očiju. U njemu se nalaze gusto smješteni periventrikularni monopolarni neuroni koji šalju dendrit i njegovo široko razgranjenje u gornje slojeve. Trnovi dendrita ovih neurona reagiraju promjenom oblika i veličine na promjene u socijalnom okolišu ribe (Coss i Globus, 1978, 1979; Burgess i Coss, 1980). Drugi sloj ili *stratum album centrale*, sadrži puno tektalnih eferentnih vlakana i tijela velikih eferentnih multipolarnih tektalnih stanica. Središnji sloj optičkog tektuma, *stratum griseum centrale*, podijeljen je u dublji treći sloj (sgc - *duboki sloj stratum griseum centrale*) i vanjski četvrti sloj (sgc-ip - *unutrašnji pleksiformni sloj stratum griseum centrale*), i sadrži raznolike dendrite, aksone i stanice (Nieuwenhuys i sur., 1998). Peti sloj ili *stratum fibrosum*, izgrađen je od različitih neurona na kojima završava većina retinalnih vlakana šestog sloja. Šesti ili optički sloj (*stratum opticum*) sadrži retinalna vlakna koja završavaju u petom sloju (Nieuwenhuys i sur., 1998). Zadnji marginalni sloj ili sedmi sloj izgrađen je od nemijeliniziranih paralelnih vlakana koja stižu iz *torus longitudinalisa* (Nieuwenhuys i sur.,

1998). Ovakvu laminarnu građu imaju sve odabarene vrste riba osim kečiga. Kod nje se središnji sloj ne dijeli na dublji i vanjski sloj nego predstavlja jednu cjelinu.

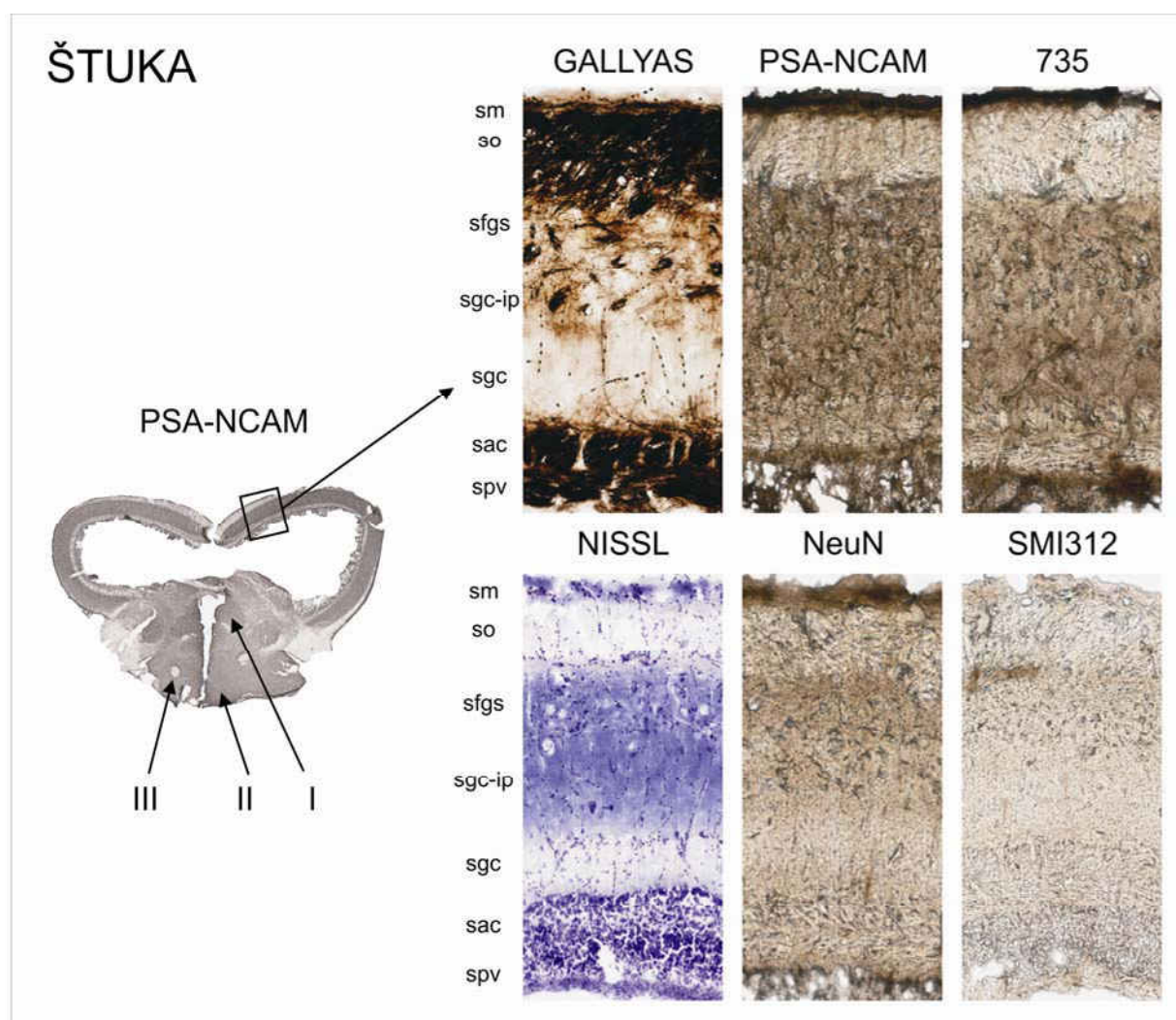
Slika 26. prikazuje migracijske zone strukture *torus longitudinalis*, a slika 27. migracijske zone u strukturi *torus semicircularis*.



Slika 20. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv- *stratum periventriculare*, sac- *stratum album centrale*, sgc- duboki sloj *stratum griseum centrale*, sgc-ip- unutrašnji pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*, sfgs- *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so- *stratum opticum*, sm- *stratum marginale*. Rimskim brojevima označene su pozitivne (desno) i negativne (lijevo) strukture kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *thalamus dorsalis*, II- *lobus inferior hypothalami*, III- *central pretecal nucleus*, IV- *tectum opticum ventralis*.



Slika 21. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu kalifornijske pastrve (*Onchorhynchus mykiss*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac- *stratum album centrale*, sgc- duboki sloj *stratum griseum centrale*, sgc-ip - unutrašnji pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*, sfgs- *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Rimskim brojevima označene su pozitivne (desno) i negativne (lijevo) strukture kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *thalamus dorsalis*, II- *lobus inferior hypothalami*, III- *hypophysis*, IV- *tectum opticum ventralis*.



Slika 22. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu štuke (*Esox lucius*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac - *stratum album centrale*, sgc - duboki sloj *stratum griseum centrale*, sgc-ip - unutrašnji pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*, sfgs- *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Rimskim brojevima označene su pozitivne (desno) i negativne (lijevo) strukture kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *thalamus dorsalis*, II- *lobus inferior hypothalami*, III- *central pretectal nucleus*.

Grgeč (slika 20) u strukturi *optic tectum* ima najjaču pozitivnost protutijelom anti-PSA-NCAM u slojevima projekcionih neurona SGC te u sloju raznolikih neurona (SFGC) na kojima završavaju retinalni neuroni iz optičkog sloja (SO). Ista takva jaka pozitivnost navedenim protutijelom uočljiva je i u vanjskom 7. sloju tzv. *stratum marginale* i zrnatom sloju interneurona SPV. Nešto slabija reakcija prisutna je u 2. sloju tzv. *stratum album centrale*. Jedino u 6. sloju tzv. optičkom sloju (SO) izostaje pozitivnost protutijelom anti-PSA-NCAM. Na osnovu ovakve raspodjele bojenja zaključujemo da kod grgeča u svim slojevima optičkog tektuma dolazi do migracije i plastičnosti neurona osim u optičkom sloju koji sadrži većinu retinalnih vlakana koji završavaju u petom sloju. Specifičnost navedenog sloja je da on neprekidno raste, a njegova vlakna stalno se premještaju. Iz ovoga zaključujemo kako sama retinalna vlakna nemaju veliku plastičnost te su veze retine i tektuma vrlo stabilne, ali krajevi ovih aksona koji završavaju u petom sloju nalaze se u zoni velike plastičnosti.

Istu pozitivnost po slojevima optičkog tektuma pokazuje i protutijelo 735 ali sa znatno slabijim bojanjem što se posebno uočava u 3. sloju (SGC), 4. sloju (SGC-IP), petom sloju (SFGC) i 7. (SM) sloju. Jedino su NeuN pozitivni samo mali zrnati interneuroni u sloju SPV i SAC, a ti neuroni su pozitivni kako s anti-PSA-NCAM tako i sa protutijelom 735. Sa rasporedom pozitivnih neurona s anti-PSA-NCAM i 735 preklapa se i raspored vlakana u svim slojevima osim u 1. najdubljem sloju SPV. Imunoreaktivnost na protutijelo SMI312 prikazuje raspored vlakana od 2. do 5. sloja sa izraženim bojanjem vlakana na granici između 3. i 4. sloja, te na granici između 4. i 5. sloja. Vlakna su utvrđena i u 7. rubnom sloju dok u 6. optičkom sloju nisu.

Na 20. slici osim što je na rezu srednjeg mozga prikazana laminarna građa optičkog tektuma, označene su i strukture kaudalnog međumozga pozitivne i negativne na protutijelo anti-PSA-NCAM. *Thalamus dorsalis* (oznaka I) i *lobus inferior hypothalami* (oznaka II) su PSA-NCAM pozitivne strukture, dok su tzv. jezgra *central pretectal nucleus* (oznaka III) i *tectum opticum ventralis* (oznaka IV) negativne strukture. Ove dvije strukture su vjerojatno sjedišta visoko diferenciranih neurona. *Central pretectal nucleus* smatra se integracijskim središtem između retine, optičkog tektuma i cerebelluma.

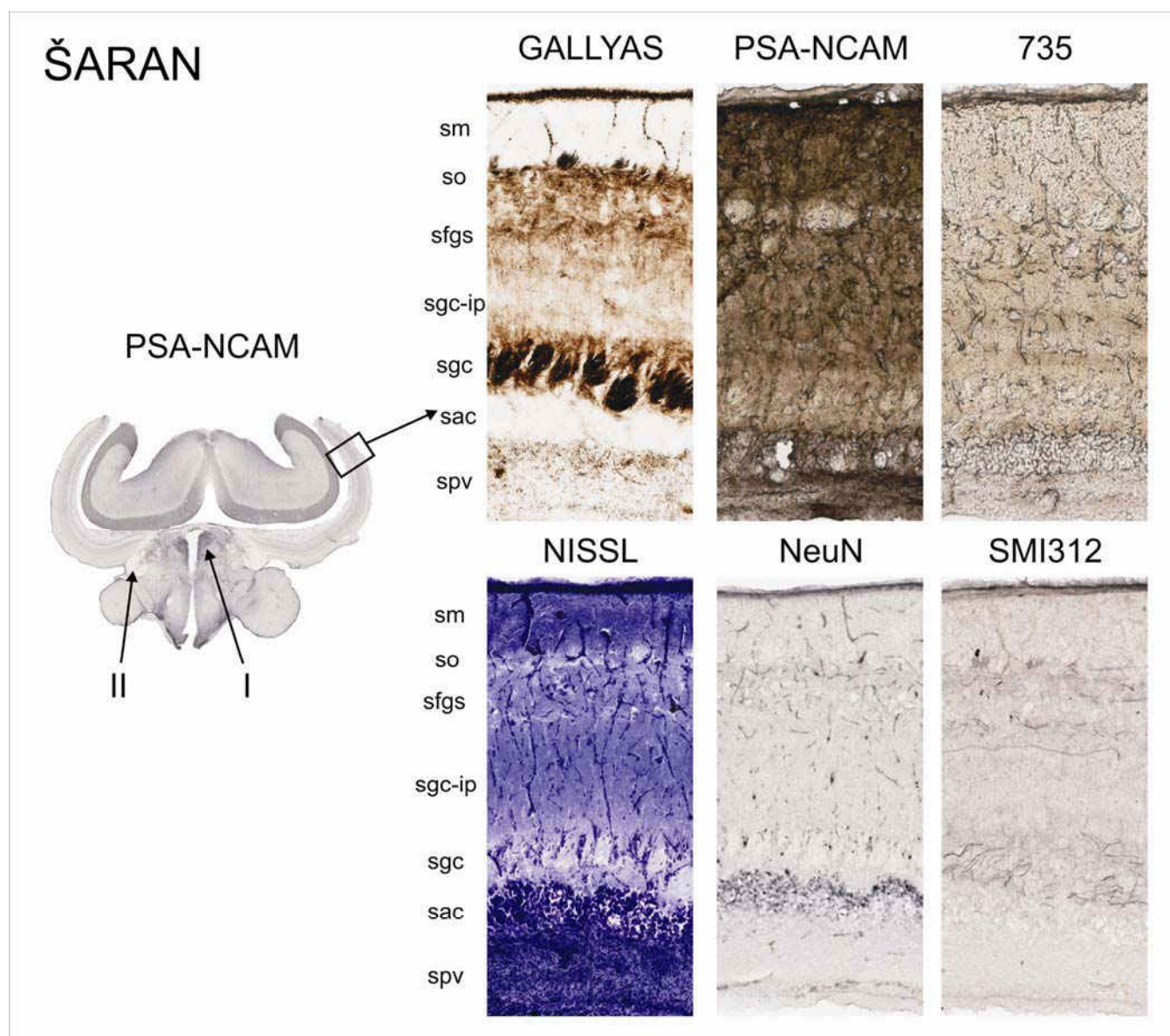
Kod kalifornijske pastrve (slika 21) reaktivnost na protutijelo anti-PSA-NCAM i 735 prisutna je u svim slojevima osim u 2. i 6. sloju. Kada usporedimo PSA-NCAM regiju sa 735 regijom, osim što se uočava slabija ekspresija u 735 regiji (osim u 3. sloju), vidljiva je i razlika u dominantnosti određenog sloju u odnosu na ostale. Naime, od svih slojeva pozitivnih na PSA-NCAM najjače je obojen 7. sloju tzv. *stratum marginale*.

Za razliku od grgeča, kalifornijska pastrva ima NeuN pozitivne neurone od 1. do 6. sloja, s tim da ih je najviše u sloju malih zrnatih interneurona (SPV koji su svi pozitivni, dok su u ostalim slojevima pozitivni mali interneuroni). U sedmom sloju NeuN pozitivni neuroni nisu utvrđeni. Mijeliniziranih vlakana utvrđenih protutijelom SMI312 nema u sedmom sloju izrazito pozitivnog na PSA-NCAM i bogatog nemijeliniziranih vlaknima iz *torusa longitudinalisa*. Također SMI312 pozitivnih vlakana nema ni u 1. i 3. sloju tektuma kalifornijske pastrve, dok ih u ostalima ima.

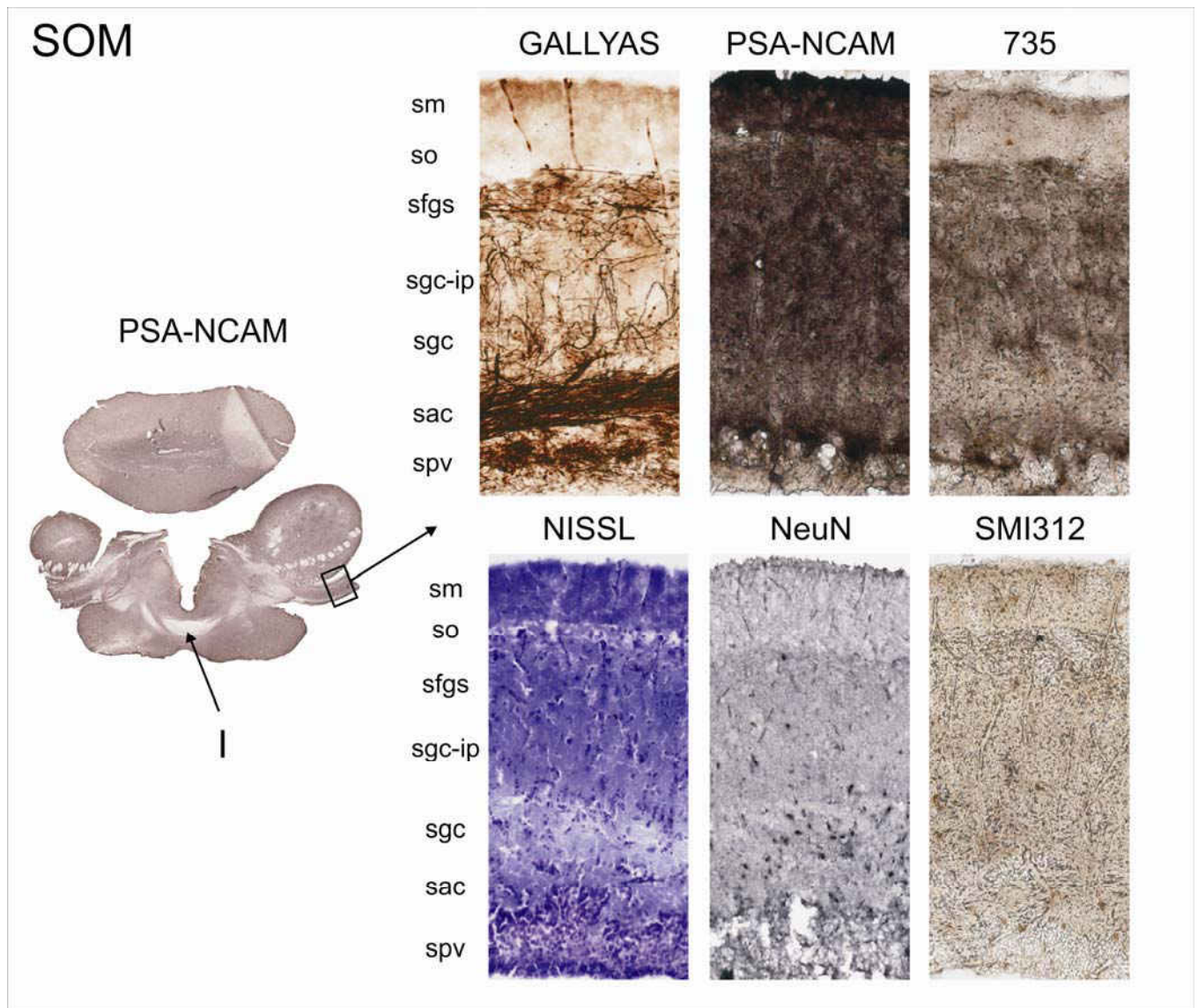
Na slici 21. uočljiva je struktura kaudalnog međumozga koja ne pokazuje pozitivnost s protutijelom anti-PSA-NCAM. Radi se o strukturi *tectum opticum ventralis* (oznaka IV) koja je, kao i kod grgeča, vjerojatno sjedište visoko diferenciranih neurona. Ostale označene strukture (I, II i III) pozitivne su na navedeno protutijelo.

Štuka (slika 22), slično grgeču, pokazuje raspored migracijskih neurona utvrđenih protutijelima anti-PSA-NCAM i 735 od prvog do petog sloja te opet u sedmom sloju. Migracijske zone i kod ove vrste, kao kod grgeča i kalifornijske pastrve, nedostaju u šestom, optičkom sloju. Štuka slični grgeču i po rasporedu NeuN neurona kojih ima samo u prvom sloju. Po dominantnosti jednog sloja u PSA-NCAM i 735 zonama nad ostalim slojevima, štuka pokazuje sličnost i sa pastrvom. Naime, i kod ove vrste sedmi, rubni sloj intenzivnijeg je obojenja od ostalih slojeva što ukazuje na visok potencijal ovog sloja u migraciji neurona i njihovoj plastičnosti. Svim opisanim vrstama riba sedmi sloj tzv. *stratum marginale* dominantan je u bojanju nad ostalim slojevima. Radi se o sloju koji se sastoji od nemijeliniziranih paralelnih vlakana koja pristižu iz strukture *torus longitudinalis*, strukture posebno dobro razvijene kod opisanih vrsta.

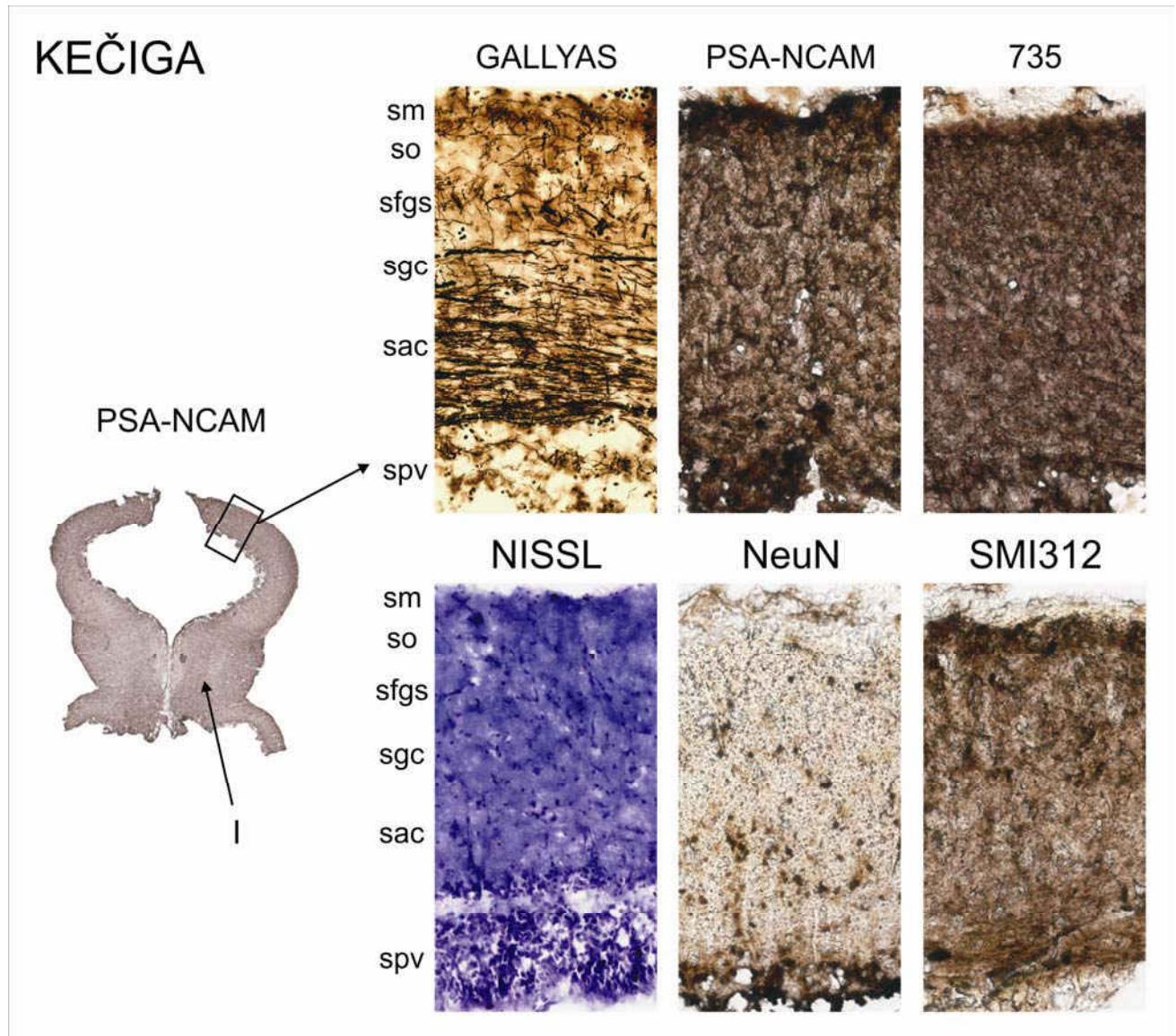
Kod štuke je, kao i kod grgeča, uočena jezgra tzv. *central pretectal nucleus* kao negativna na protutijelo anti- PSA-NCAM. Ostale strukture (*thalamus dorsalis*, oznaka I i *lobus inferior hypothalami* oznaka II) prikazane na slici 22 su pozitivne na navedeno protutijelo.



Slika 23. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu šarana (*Cyprinus caprio*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac - *stratum album centrale*, sgc - duboki sloj *stratum griseum centrale*, sgc-ip - unutrašnji pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*, sfgs - *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Rimskim brojevima označena je pozitivna (desno) i negativna (lijevo) struktura kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *thalamus dorsalis*, II- *tectum opticum ventralis*.



Slika 24. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu soma (*Silurus glanis*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac - *stratum album centrale*, sgc - duboki sloj *stratum griseum centrale*, sgc-ip - unutrašnji pleksiformni sloj *stratum griseum centrale*, sfgs - *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Rimskim brojevima označena je negativna struktura kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *nucleus anterior tuberis*.



Slika 25. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura vidni korteks, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM, NeuN i SMI312 i histološko bojanje po Nisslu i Gallyasu u mozgu kečige (*Acipenser ruthenus*). Skraćenicama su označene pojedine lamine kako slijedi: spv - *stratum periventriculare*, sac - *stratum album centrale*, sgc - duboki sloj *stratum griseum centrale*, sfgs - *stratum fibrosum et griseum superficiale*, so - *stratum opticum*, sm - *stratum marginale*. Rimskim brojevima označena je negativna struktura kaudalnog međumozga na protutijelo PSA-NCAM kako slijedi: I- *hypothalamus*.

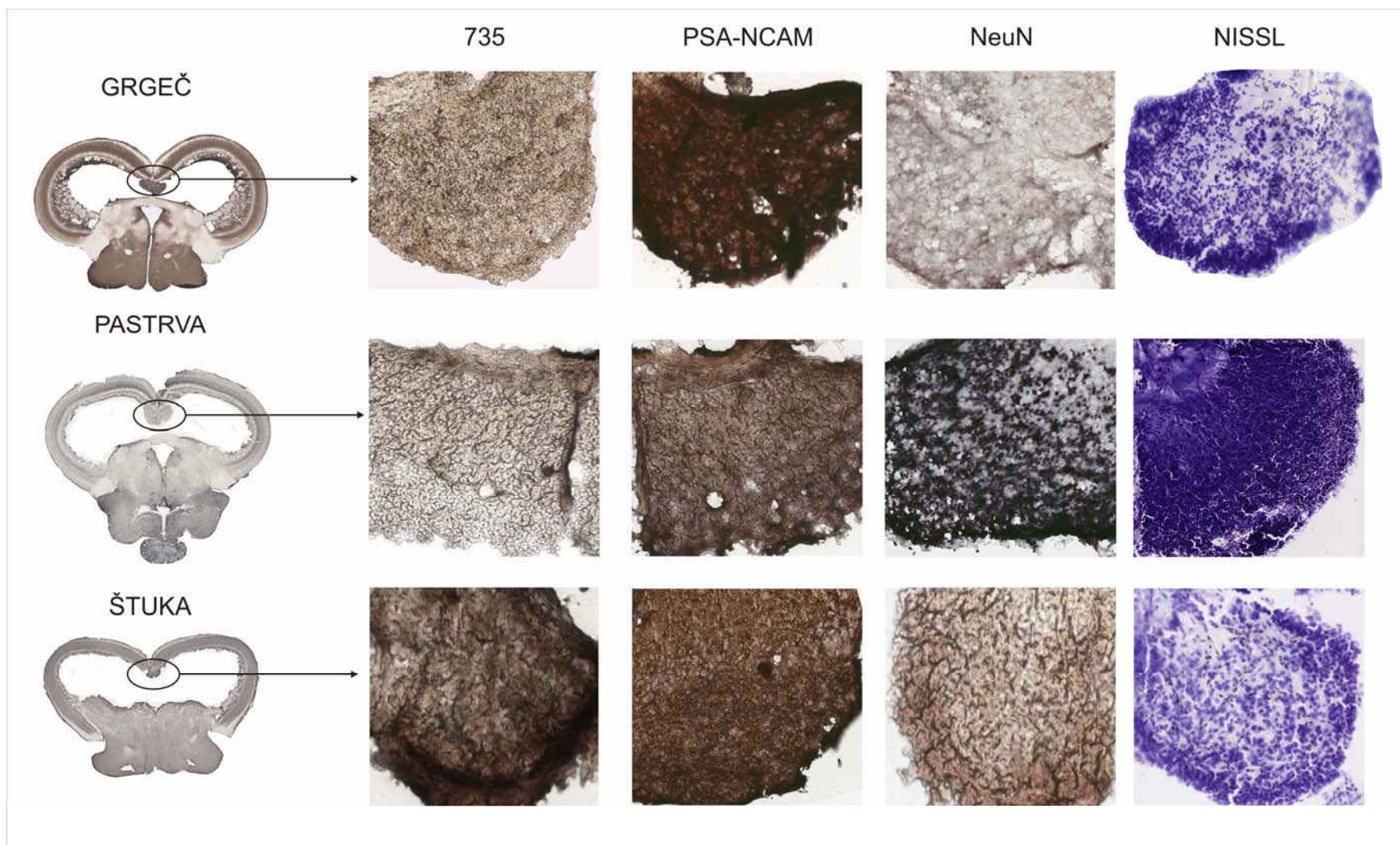
Slika 23. pokazuje migracijske regije vidnog tektuma (*optic tectum*) kod šarana. Imunoreaktivnost na protutijelo anti-PSA-NCAM kod ove ribe prisutna je u svim slojevima, od prvog, najdubljeg do zadnjeg marginalnog sloja ili 7. sloja. Upravo je ovaj sloj najizraženiji po bojanju, dok je drugi sloj, *stratum album centrale*, u odnosu na njega slabijeg obojenja. Kada usporedimo PSA-NCAM zonu sa 735 zonama, uočava se slabija ekspresija u 735 regiji pogotovo u sedmom sloju. Pozitivnih NeuN neurona ima najviše u drugom sloju a još se slabije pojavljuju u trećem i četvrtom sloju. Imunohistokemija protutijelom SMI312 otkriva raspored pojedinačnih vlakana od trećeg do petog sloja.

Na 23. slici osim što je na rezu kroz srednji mozak prikazana laminarna građa optičkog tektuma, označena su i strukture kaudalnog međumozga pozitivne i negativne na protutijelo anti-PSA-NCAM. *Thalamus dorsalis* (oznaka I) je PSA-NCAM pozitivna struktura, dok je *tectum opticum ventralis* (oznaka II) negativna struktura. Po ovim negativnim strukturama koja su sjedišta visoko diferenciranih neurona šaran pokazuje sličnost s međumozgom grgeča i kalifornijske pastrve.

Kod soma (slika 24), isto kao i kod šarana, PSA-NCAM protutijelo boja sve slojeve kao i protutijelo 735, ali opet sa slabijim intenzitetom.

Pozitivnih NeuN neurona ima najviše u prvom sloju a još se pojavljuju kao pojedinačni neuroni u drugom, trećem, četvrtom i petom sloju. Međumozak soma prikazan također na slici 24, ima samo jednu strukturu negativnu na protutijelo anti-PSA-NCAM, a to je *nucleus anterior tuberis* (oznaka I) koja je povezana sa statoakustičkim organom odnosno integracijsko je središte između mehanosenzoričkog dijela *torus semicircularis*, mehanosenzoričkog dijela međumozga, određenih regija prednjeg mozga i preoptičke regije.

Kečiga (slika 25) se po rasporedu PSA-NCAM epitopa bitno ne razlikuje od ostalih vrsta. Oba PSA-NCAM epitopa prisutni su u svim slojevima. Kečiga, također ima pozitivni marker neurona u prvom sloju, dok se u ostalim slojevima pojavljuju pojedinačni NeuN pozitivni neuroni. U zadnjem marginalnom, odnosno šestom sloju koji kod ove vrste odgovara sedmom sloju ostalih opisanih vrsta, nema pozitivnih NeuN neurona. Mijelinizirana vlakna pozitivna na protutijelo SMI312 prisutna su u svim slojevima osim u šestom. Međumozak je kod ove vrste, za razliku od ostalih vrsta, u potpunosti pozitivan na protutijelo anti-PSA-NCAM. Slika 25. prikazuje kaudalni međumozak na kojem je oznakom I označen *hypothalamus* kao pozitivna struktura.



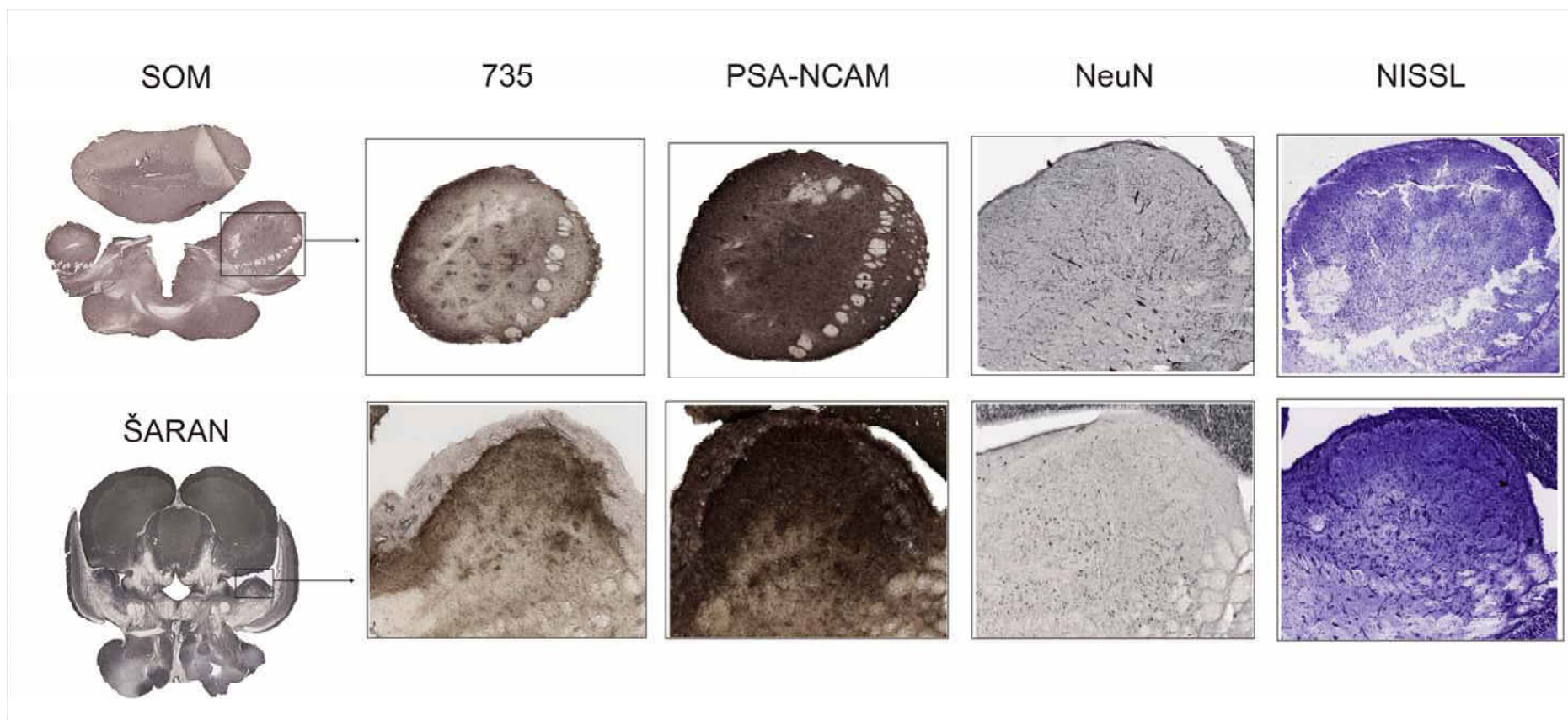
Slika 26. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura *torus longitudinalis*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastrve (*Onchorhynchus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*).

Slika 26. pokazuje uzdužni nabor (*torus longitudinalis*) kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke. Navedena struktura blisko je vezana za otički tektum i karakteristična je tvorevina svih zrakoperki koju ne nalazimo kod ostalih kralježnjaka. Budući je *torus longitudinalis* bolje razvijen kod vrsta koje žive u nemirnim vodama i onih koje se aktivno kreću između dubokih i plitkih slojeva vode, navedena struktura je prikazana samo kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke.

Torus longitudinalis pozitivan je na oba epitopa molekule PSA-NCAM kod štuke, a nešto manje na epitop 735 i više na PSA-NCAM u kalifornijske pastrve. Najizraženiji intenzitet PSA-NCAM je kod grgeča, dok je reakcija na 735 protutijelo jednaka kao i na kontroli IgG-vezanja (slika 6) pa pretpostavljamo da je u ovoj strukturi izostala reakcija s 735 protutijelom.

Ekspresija markera neurona (NeuN) u ovoj strukturi najizraženija je kod kalifornijske pastrve gdje su vidljivi pojedinačni NeuN pozitivni neuroni duž cijele strukture. Kod grgeča, također, postoje NeuN pozitivni neuroni, ali u puno manjoj mjeri nego kod kalifornijske pastrve, dok štuka ima nespecifično vezanje markera neurona. Jezgre detektirane histološkim bojanjem po Nisslu prisutne su duž cijele strukture kod svih opisanih vrsta riba.

Pozitivnost strukture *torus longitudinalis* protutijelom anti-PSA-NCAM dovodi se u vezu sa pozitivnošću sedmog, marginalnog sloja optičkog tektuma. On je kod navedenih vrsta riba sloj najjačeg obojenja, odnosno sloj sa najvećim potencijalom plastičnosti. Upravo je taj sloj izgrađen je od nemijeliniziranih paralelnih vlakana koja stižu iz *torus longitudinalisa*.



Slika 27. Koronarni rez, razina srednji mozak, struktura *torus semicircularis*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu soma (*Silurus glanis*) i šarana (*Cyprinus carpio*).

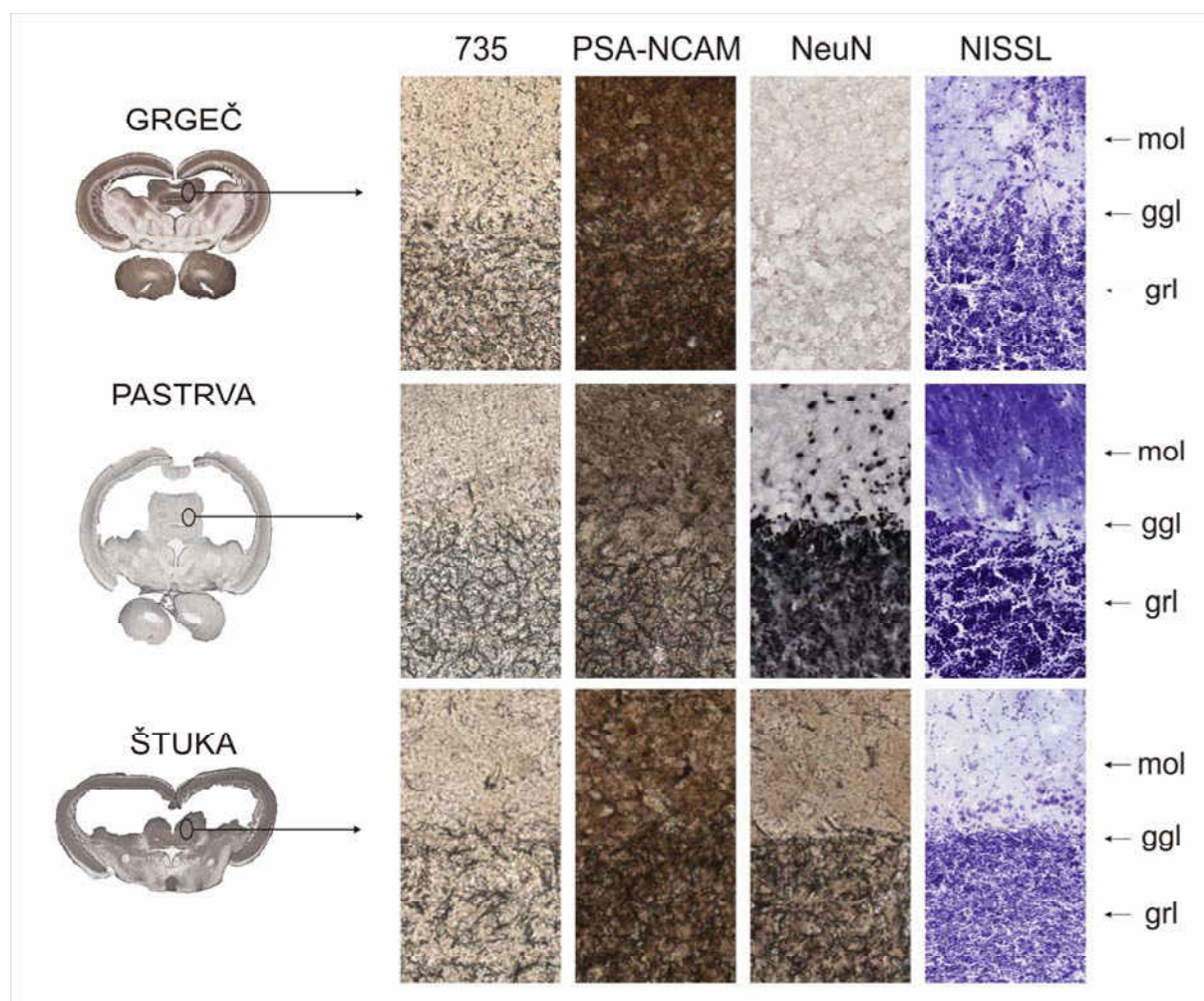
Slika 27 pokazuje raspored migracijskih zona u strukturi srednjeg mozga - *torus semicircularis*. Navedena struktura smještena je dorzolateralno u periventrikularnoj regiji tegmentuma (dno srednjeg mozga). Budući je ova struktura bolje razvijena kod vrsta koje su pasivno elektrosensitivne kao što je primjerice soma, na slici je ova struktura prikazana samo za soma i usporedbe radi za šarana. Slika 27 prikazuje raspored migracijskih zona pozitivnih na PSA-NCAM, raspored NeuN pozitivnih neurona, te položaj strukture *torus semicircularis* u koronarnom rezu kroz srednji mozak. Na tim rezovima može se uočiti odnos veličine navedene strukture kod ove dvije vrste riba.

Torus longitudinalis pozitivan je na oba epitopa molekule PSA-NCAM kod obje vrste sa slabijom reaktivnošću na protutijelo 735. Ekspresija markera neurona (NeuN) u ovoj strukturi izraženija je kod soma.

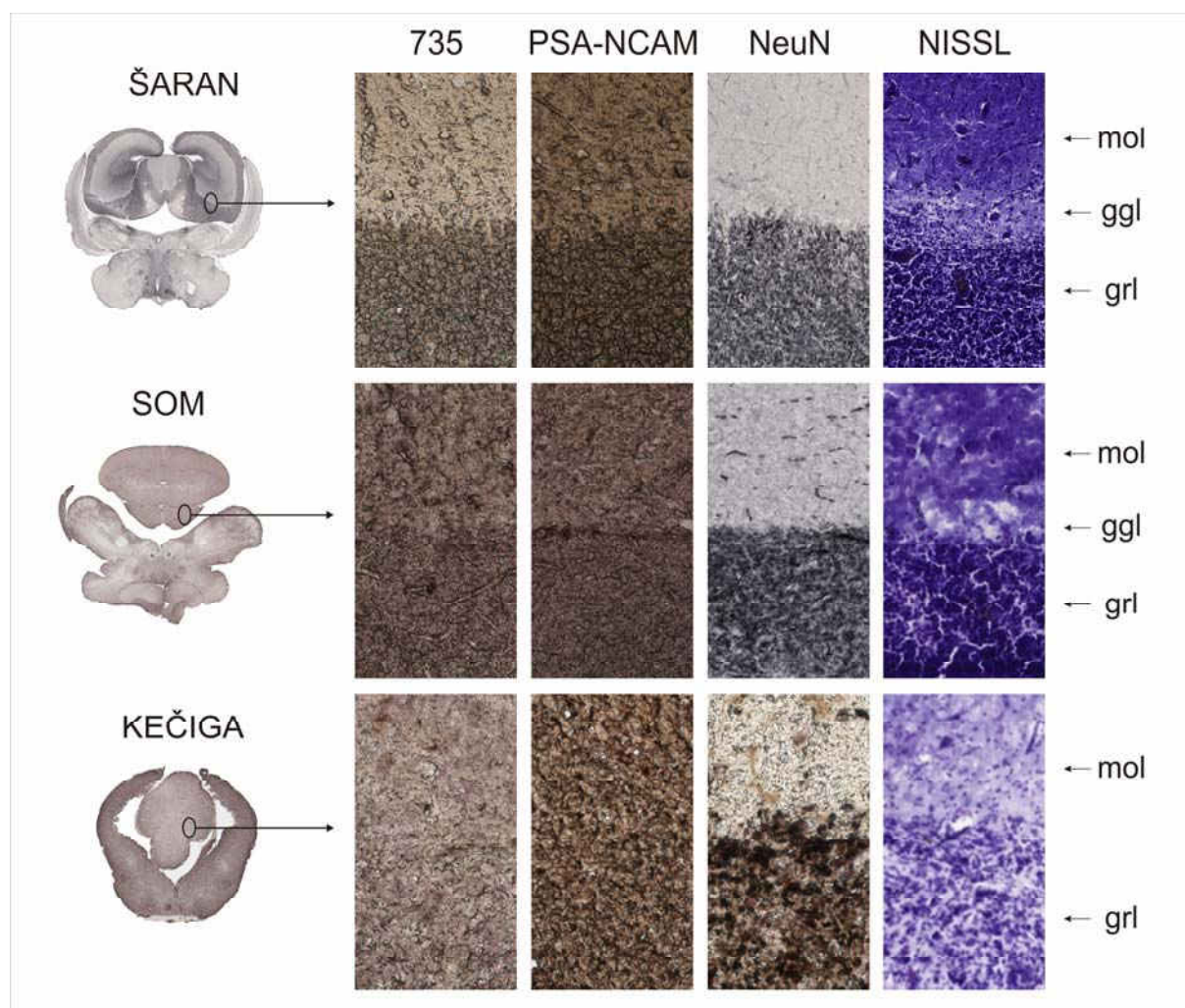
4.5. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u malom mozgu kod odabranih vrsta riba

Migracije zone unutar malog mozga (*cerebellum*) na svim odabranim vrstama riba pobliže su prikazane na tri njegove strukture: *valvula cerebelli*, tijelo malog mozga (*corpus cerebelli*) te *crista cerebelli*.

Slike od 28 do 33 predstavljaju prisutnost migracijskih zona u svim navedenim strukturama malog mozga kod grgeča, kalifornijske pastrve, štuke, šarana, soma i kečiga.



Slika 28. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *valvula cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), pastve (*Onchorincus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*). Skraćenicama su označeni pojedini slojevi kako slijedi: mol - molekularni sloj, ggl - sloj ganglijskih stanica, grl – granularni sloj.



Slika 29. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *valvula cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*). Skraćenicama su označeni pojedini slojevi kako slijedi: mol - molekularni sloj, ggl - sloj ganglijskih stanica, grl – granularni sloj.

Slika 28. prikazuje migracijske zone u *valvuli cerebelli* grgeča, kalifornijske pastrve i štuke. Njeni slojevi raspoznaju se pri pozitivnim obojenjima po Nisslu, odnosno imuoreaktivnošću na NeuN.

Kod svih vrsta riba izraženiju imunoreaktivnost ima protutijelo anti-PSA-NCAM u odnosu na 735. Također je, kod svih vrsta utvrđena veća ekspresija PSA-NCAM epitopa u granularnom sloju u odnosu na molekularni sloj što je posebno dobro vidljivo na 735 obojenim preparatima. Srednji sloj ili sloj ganglijskih stanica je nešto manje pozitivan na PSA-NCA.

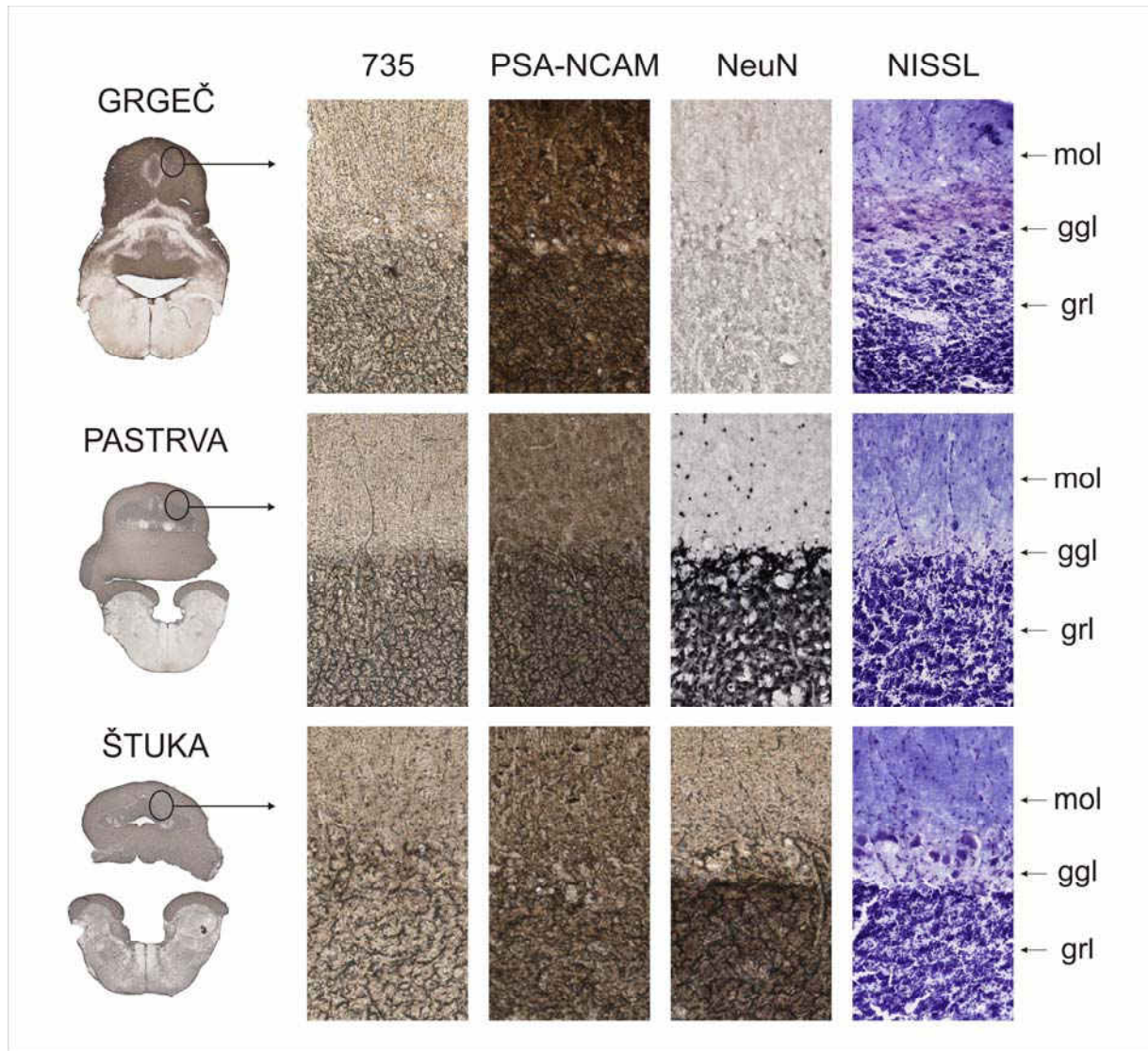
Ekspresija NeuN pozitivnih neurona kod grgeča je u odnosu na ostale dvije vrste slabo izražena. Za razliku od njega, kalifornijska pastrva ima jaku ekspresiju NeuN neurona koja je posebno izražena u granularnom sloju. U sloju ganglijskih stanica kod kalifornijske pastrve nema NeuN pozitivnih neurona kao i kod štuke koja NeuN pozitivne neurone ima samo u granularnom sloju.

Inače, *valvula cerebelli* zapravo predstavlja rostralno produženje malog mozga u ventrikul srednjeg mozga i prisutna je kod svih zrakoperki i ujedno je i to njihova specifična karakteristika. Kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke približno je istog zaobljenog oblika i veličine (slike 4,6, i 8).

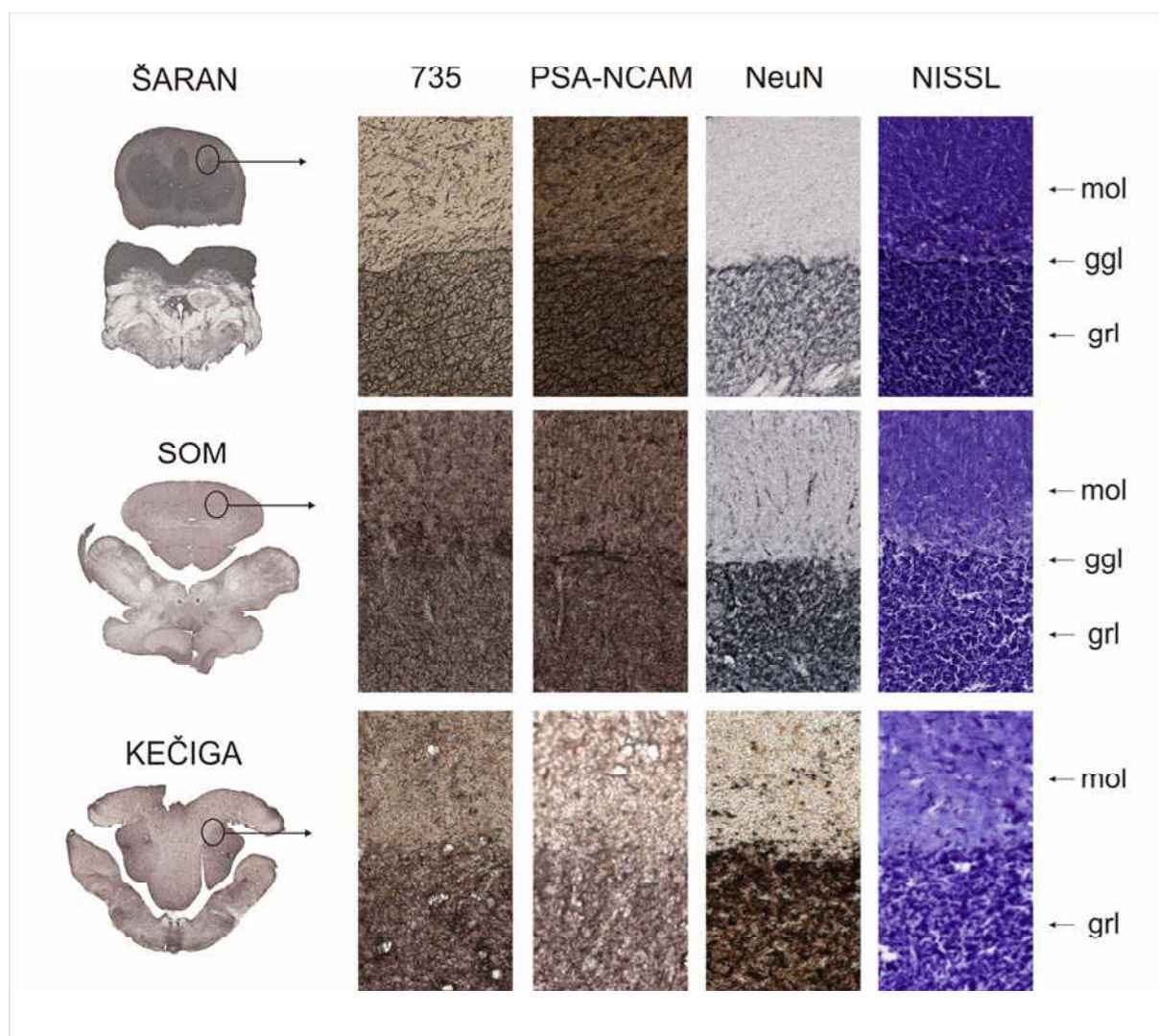
Slika 29 također prikazuje migracijske zone u strukturi *valvula cerebelli* kod šarana, soma i kečige. Šaran pokazuje sličnost sa pastrvom štukom i grgečom. Vanjski, granularni sloj pokazuje veću PSA-NCAM pozitivnost u odnosu na molekularni sloj. Po pozitivnoj ekspresiji granularnih nerona detektiranih markerom neurona šaran slični kalifornijskoj pastrvi. Šaran se razlikuje od kalifornijske pastrve, grgeča i štuke po obliku i veličini valvule. Kod njega je ona puno veća nego kod spomenutih vrsta i više je istegnutog i plosnatog oblika (slika 10).

Som (slika 29) u odnosu na šarana ima puno manju *valvulu cerebelli* (slika 12). PSA-NCAM i 735 zone ne pokazuju dominantnost određenog sloja u odnosu na drugi. Čak je kod ove vrste uočena podjednako dobra ekspresija PSA-NCAM epitopa. Imunohistokemijskom analizom s protutijelom NeuN uočava se pozitivna ekspresija markera neurona u molekularnom sloju u kojem se nalaze pojedinačni neuroni i u granularnom sloju.

Kečiga, kao predstavnik štitonoša, pokazuje razliku u građi valvule u odnosu na vrste pravih koštunjača. *Valvula cerebelli* kod ove vrste je građena je od dva sloja – vanjskog granularnog i unutrašnjeg molekularnog čiji se raspored najbolje uočava na NeuN preparatima, odnosno histološkim bojanjem po Nisslu. Intenzitet 735 i PSA-NCAM epitopa je približno međusobno jednak, ali je i jednak u molekularnom i granularnom sloju. Valvula je kod ove vrste prilično velika i oblikom je drugačija od oblika valvule pravih koštunjača (slika 14). Po rasporedu pozitivnih NeuN neurona kečiga kao predstavnik štitonoša slični štuki tj. NeuN pozitivni neuroni su u granularnom sloju dok ih u molekularnom sloju nema.



Slika 30. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *corpus cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastrve (*Onchorhynchus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*). Skraćenicama su označeni pojedini slojevi kako slijedi: mol - molekularni sloj, ggl - sloj ganglijskih stanica, grl – granularni sloj.



Slika 31. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *corpus cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*). Skraćenicama su označeni pojedini slojevi kako slijedi: mol - molekularni sloj, ggl - sloj ganglijskih stanica, grl – granularni sloj.

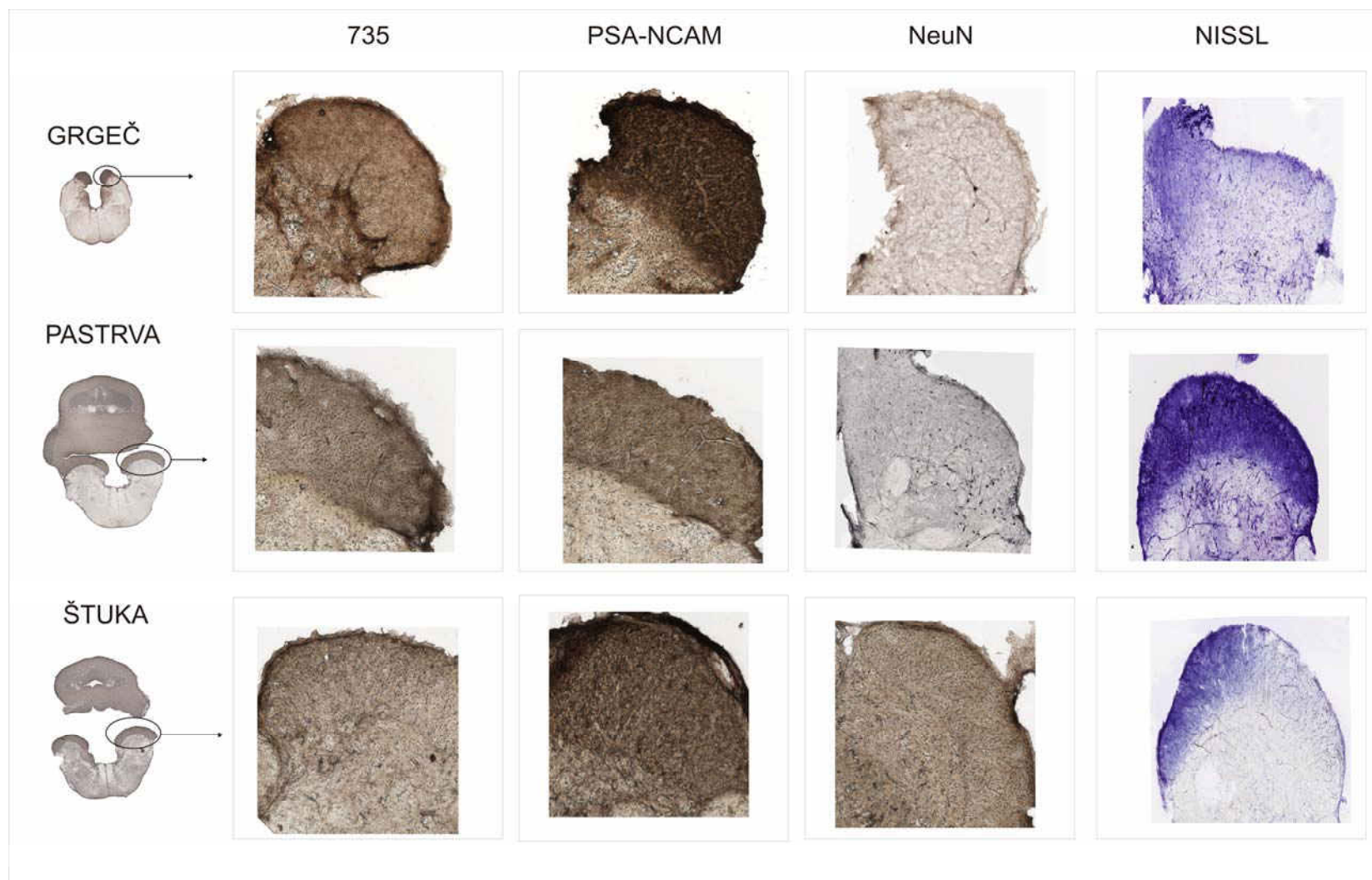
Slika 30. predstavlja migracijske zone u tijelu malog mozga (*corpus cerebelli*) kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke. Suprotno od valvule, u ovoj strukturi molekularni sloj nalazi se s vanjske strane a granularni s unutarnje strane. Između ta dva sloja nalazi se sloj ganglijskih stanica. Za sve navedene vrste napravljena je također imunohistokemija protutijelom NeuN i histološko bojanje po Nisslu.

Grgeč, u odnosu na kalifornijsku pastrvu i štuku, ima veću ekspresiju epitopa PSA-NCAM, a molekularni i granularni sloj podjednaki su po intenzitetu obojenja. Jedino je u sloju ganglijskih stanica slaba ekspresija PSA-NCAM epitopa. Kod kalifornijske pastrve i

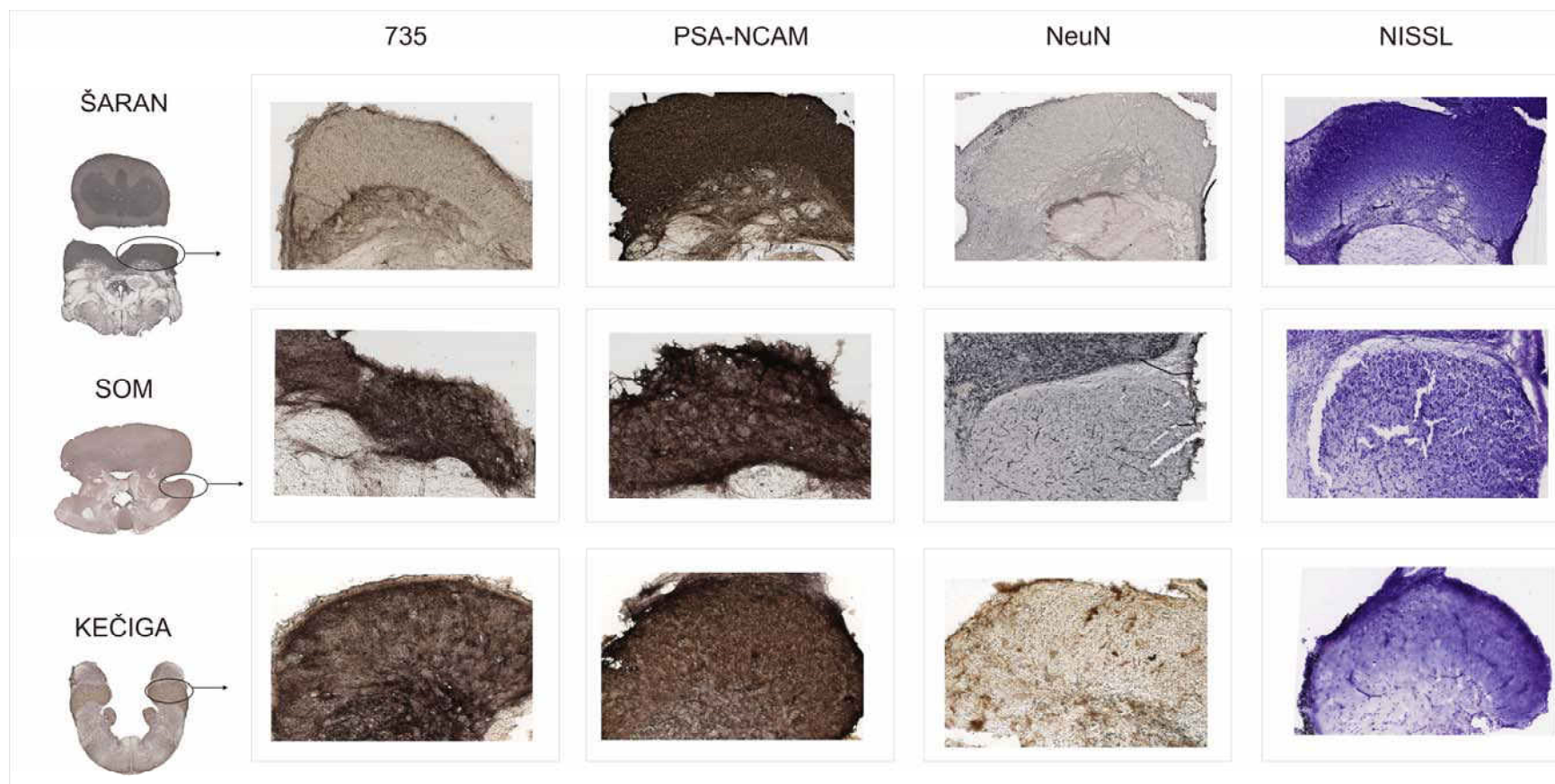
štuke granularni sloj PSA-NCAM zone je intenzivnije obojen od molekularnog sloja iste zone. Kod sve tri vrste 735 je slabijeg intenziteta a granularni sloj je većeg intenziteta bojenja u odnosu na molekularni. Ekspresija NeuN-a razlikuje se kako među vrstama tako i među slojevima corpusa. Grgeč i štuka u molekularnom sloju pokazuju nespecifičnu reakciju s navedenim protutijelom. U granularnom sloju corpusa postoje pozitivni NeuN neuroni kojih ima znatno manje u odnosu na granularni sloj neurona u corpusu kalifornijske pastrve. Kod kalifornijske pastrve u molekularnom sloju corpusa su pozitivni pojedinačni stelarni neuroni. Kod sve tri vrste, nema pozitivnih NeuN neurona u sloju ganglijskih stanica.

Šaran i som po pozitivnoj ekspresiji markera neurona pokazuje sličnost s pastrvom (slika 31). U kečiga nalazimo pojedinačne NeuN pozitivne neurone u molekularnom sloju.

Kod šarana su i molekularni i granularni sloj pozitivni na PSA-NCAM epitope. Kod soma su također oba sloja pozitivna, a intenzitet bojenja je podjednak, dok je kod kečiga opet naglašeniji granularni sloj. Kečiga (slika 31), za razliku od predstavnika pravih koštunjača, ima raspored slojeva unutar strukture *corpus cerebelli* isti kao kod valvule sa vanjskim granularnim slojem i unutarnjim molekularnim. Ni u ovoj strukturi kečiga, za razliku od pravih koštunjača, nema sloj ganglijskih stanica. Također i po ekspresiji NeuN neurona kečiga liči pravim koštunjačama, odnosno pastravi, šaranu i somu, jer se i kod nje najveća ekspresija NeuN uočava u granularnom sloju dok se u molekularnom sloju nalaze pojedinačni NeuN neuroni.



Slika 32. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *crista cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastrve (*Onchorincus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*).

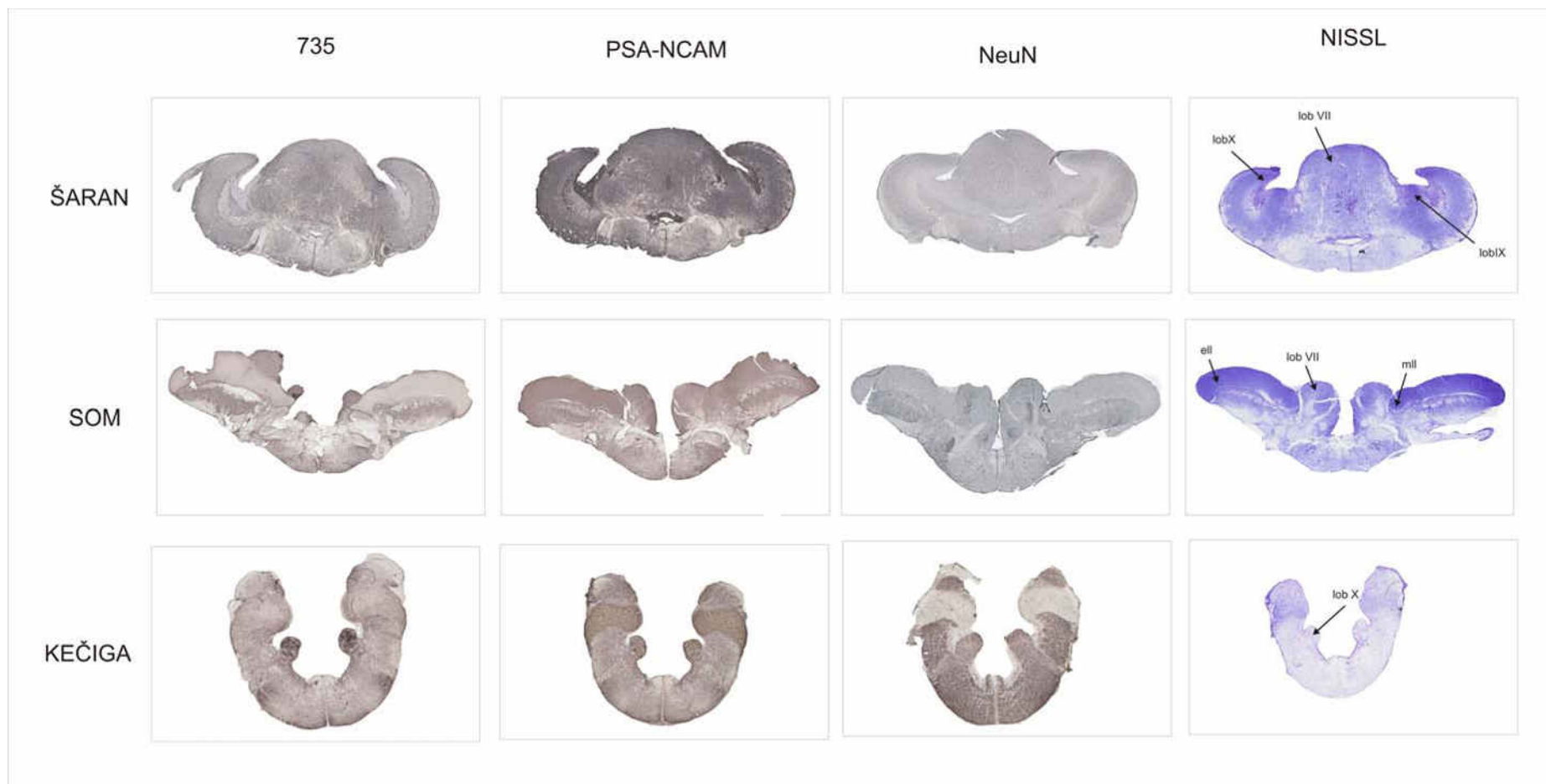


Slika 33. Koronarni rez, razina mali mozak, struktura *crista cerebelli*, imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*).

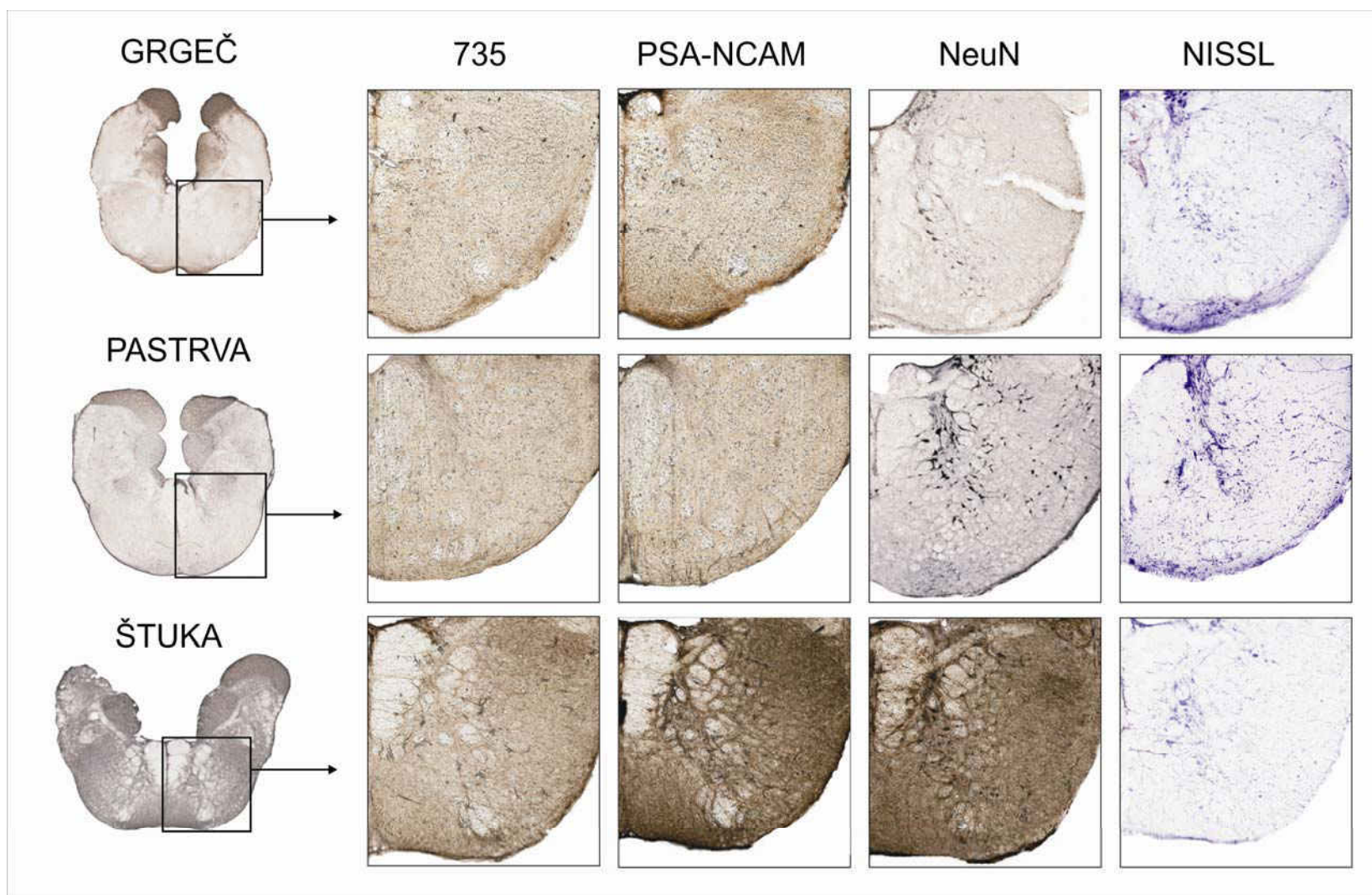
Slika 32. prikazuje strukturu *crista cerebelli* i u njoj detektirane migracijske zone pozitivne na PSA-NCAM i 735 epitope kod grgeča, kalifornijske pastrve i štuke. Kod grgeča je, u odnosu na pastrvu i štuku, intenzitet PSA-NCAM zone najveći. Nešto slabijeg intenziteta je 735 zona kod grgeča i štuke, dok kalifornijska pastrva ima isti intenzitet obojenja sa oba protutijela. Općenito *crista cerebelli* je kod grgeča struktura mozga kod koje je pozitivnost na protutijelo 735 najveće (slika 6). Ekspresija markera neurona (NeuN) postoji na specifičnim neuronima kod kalifornijske pastrve a kod štuke je bojanje intenzivno, ali ne i specifično. Kod grgeča u ovoj strukturi nema epitopa ekspresije markera neurona. Slika 33 prikazuje migracijske zone pozitivne na PSA-NCAM i 735 u strukturi *crista cerebelli* kod šarana, soma i kečige. Sve prikazane ribe na slici 33 imaju pozitivnu reakciju na protutijelo anti-PSA-NCAM i 735. Međusobno se razlikuju po intenzitetu ekspresije u PSA-NCAM regiji koja je kod šarana najizraženija. Kod ove vrste postoji najveća razlika u imunoreaktivnosti na 735 i PSA-NCAM. Kod ostale dvije vrste navedena razlika nije uočljiva u tolikoj mjeri. Osim po migracijskim zonama, ove vrste se razlikuju i po ekspresiji markera neurona (NeuN). Som u odnosu na šarana ima veću ekspresiju. Kod šarana NeuN pozitivni neuroni su detektirani samo u rubnim dijelovima strukture *crista cerebelli*. Naime, kod soma su na NeuN pozitivna ne samo tijela granularnih neurona (vidi sliku 31) već i paralelna vlakna koja ovi neuroni šalju do *cristae cerebelli*. To nije slučaj kod šarana kod kojeg su pozitivna samo tijela neurona.

4.6. Imunohistokemijski prikaz migracijskih zona u stražnjem mozgu kod odabranih vrsta riba

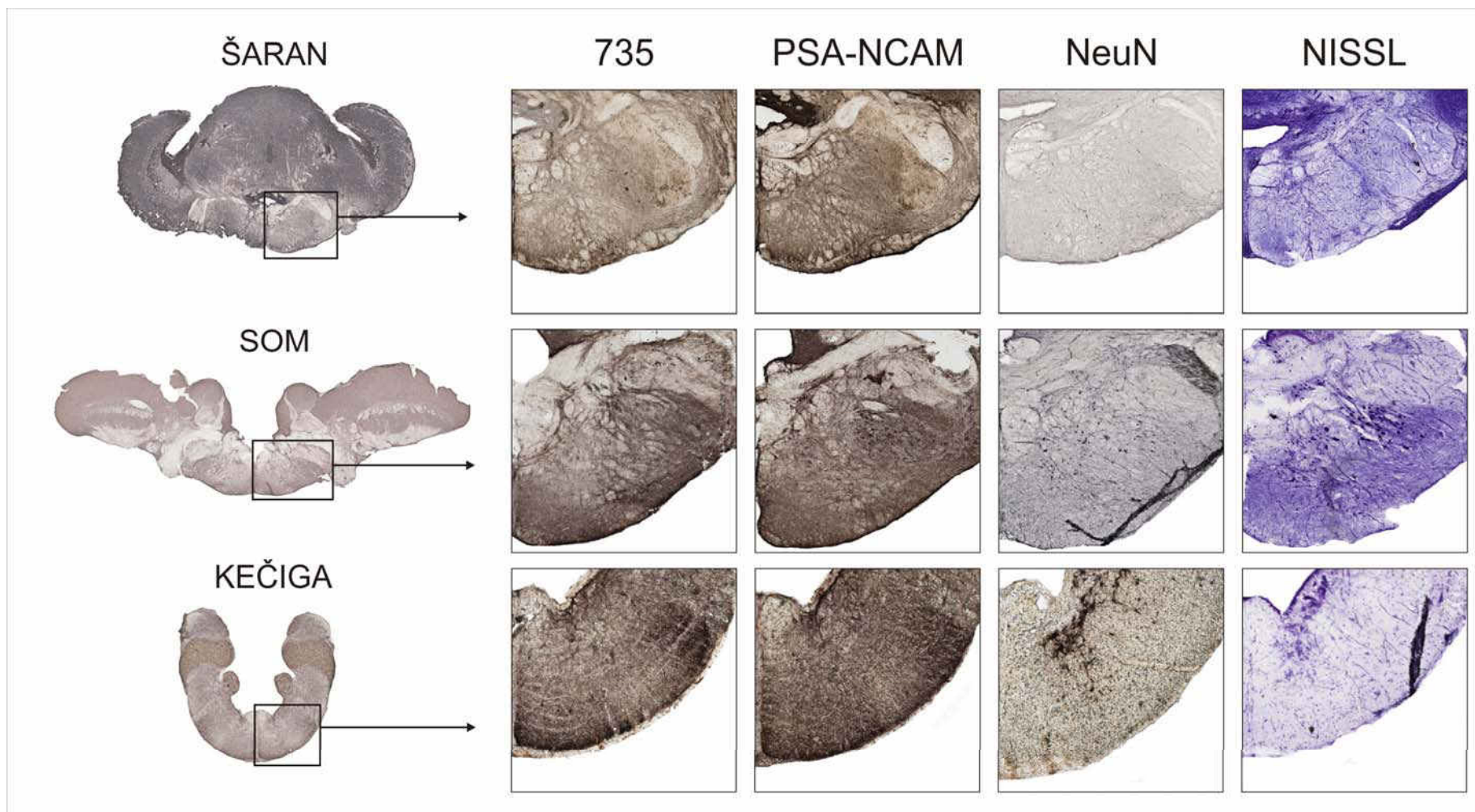
Specifične strukture stražnjeg mozga kod šarana, soma i kečige prikazane su na slici 34. Radi se o strukturama, odnosno reznjevima zaduženih za interpretaciju okusa, koje su tipične samo za ove ribe: facijalni (*lobus facialis* - lob VII), glosofaringealni (*lobus glosophatingeus* - lob IX) i vagalni režanj (*lobus vagus* - lob X). Kod svih vrsta riba ove strukture pozitivne su na epitope protutijela 735 i anti-PSA-NCAM s razlikom da je kod šarana ekspresija PSA-NCAM molekule utvrđena protutijelom PSA-NCAM najizraženija. Riba se razlikuju po navedenim strukturama utoliko što šaran ima sve tri strukture, a u građi vagalnog reznja (lob X) pokazuje sličnost s kečigom dok u građi facijalnog reznja (lob VII) pokazuje sličnost sa somom. Kečiga u stražnjem mozgu ima samo vagalni režanj. Som koji je pasivno elektrosenzitivan, umjesto vagalnog i glosofaringealnog reznja ima lateralni režanj (ll) koji svojim medijalnim dijelom interpretira somatosenzoriku (mll), a lateralnim dijelom električne signale iz okoline (ell).



Slika 34. Koronarni rez, razina rostralni stražnji mozak, strukture *lobus facialis* (lob VII), *lobus glosophatingeus* (lob IX) i *lobus vagus* (lob X), i imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*).



Slika 35. Koronarni rez, razina rostralni stražnji mozak, struktura *tegmentum* imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu grgeča (*Perca fluviatilis*), kalifornijske pastreve (*Onchorincus mykiss*) i štuke (*Esox lucius*).



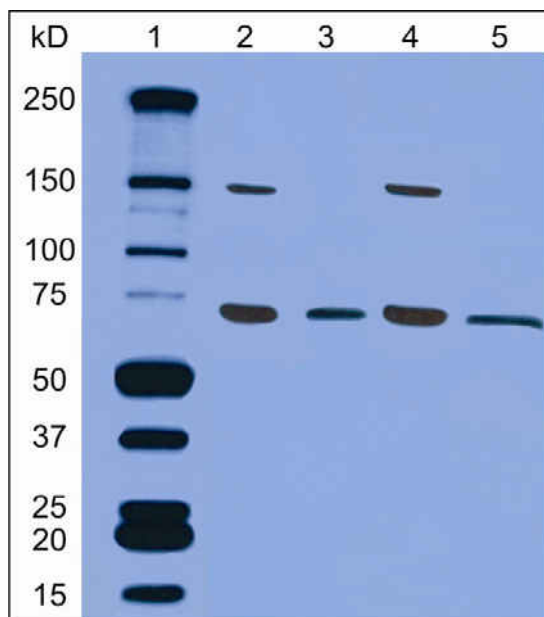
Slika 36. Koronarni rez, razina rostralni stražnji mozak, struktura *tegmentum* imunohistokemija protutijelima 735, anti-PSA-NCAM i NeuN i histološko bojanje po Nisslu u mozgu šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*) i kečige (*Acipenser ruthenus*).

U tegmentumu grgeča, kalifornijske pastrve i štuke raspoznajemo nekoliko NeuN pozitivnih neurona koje su označene na slici 35. To su visoko diferencirani neuroni, vjerojatno male plastičnosti. U grgeča i kalifornijske pastrve nalaze se u miljeu koji nije pozitivan na PSA-NCAM epitope, ali je zato kod štuke ova skupina neurona unutar PSA-NCAM pozitivne zone.

Jedino šaran (slika 36) nema u tegmentumu stražnjeg mozga NeuN pozitivnih neurona, mada je cijeli bazalni dio tegmentum pozitivan na oba PSA-NCAM epitopa. Kečiga i som imaju NeuN pozitivne neurone i ovi su unutar PSA-NCAM pozitivne zone. Ribe koje imaju stražnji mozak pozitivan na PSA-NCAM epitope (štuka, šaran, som i kečiga) imaju mogućnost njegovog obnavljanja koja im je potrebna da bi održavali posebne režnjeve, odnosno osjete vezane uz njih. Štuka nema posebne režnjeve za interpretaciju okusa pa je pozitivnost tegmentuma na PSA-NCAM epitope vjerojatno povezana sa isthmus regijom koja sadrži između ostalih jezgara i dobro razvijene sekundarne osjetilne jezgre tzv. *tectal satellite* ili vizualne jezgre isthmus regije. Ove jezgre za način života su od posebne važnosti jer je ona vizualni predator koja lovi iz zasjede.

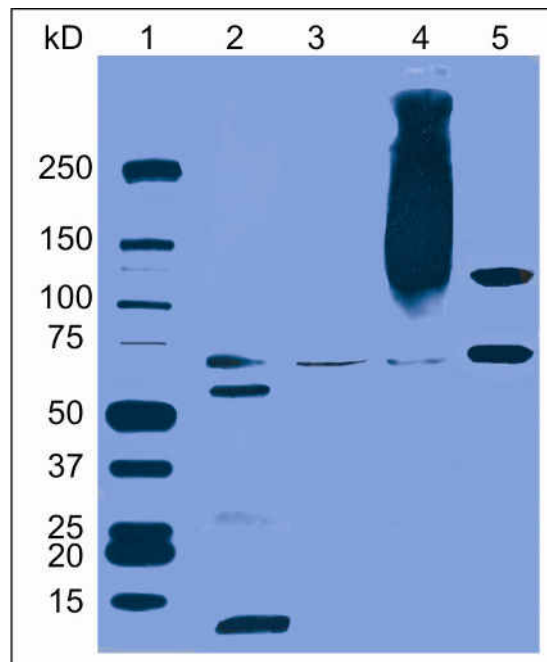
4.7. Detekcija anti-PSA-NCAM epitopa metodom imunoblota u mozgu odabranih vrsta riba

Za sve odabrane vrste riba napravljena je detekcija mogućih proteinskih antigena koji reagiraju s protutijelima na PSA-NCAM molekulu (anti-PSA-NCAM i 735). Radi utvrđivanja nespecifičnosti vezanja protutijela imunoblot je napravljen i samo sa sekundarnim, IgG i IgM protutijelom bez prethodne inkubacije s primarnim protutijelom.



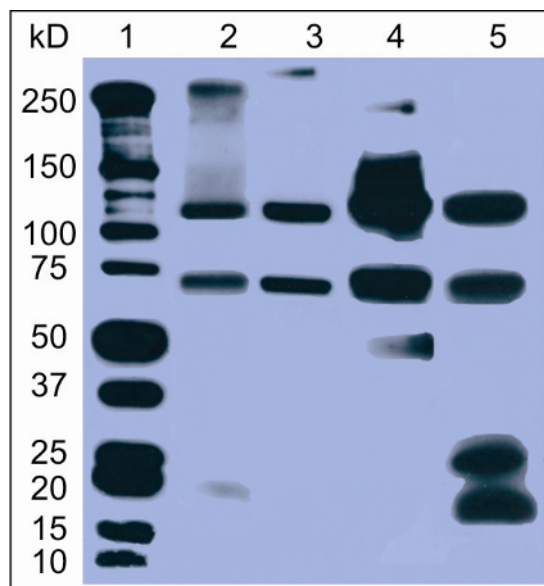
Slika 37. Imunoreaktivnost homogenata mozga grgeča. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

Na slici 37 prikazane su vrpce proteina dobivene imunoblotom homogenata tkiva mozga grgeča. Oba protutijela na PSA-NCAM epitop (anti-PSA-NCAM i 735) prepoznaju dva proteina, molekulske mase oko 75 kD i 150 kD (linija 2 i 4). Sekundarna protutijela IgM i IgG protutijela prepoznaju samo jedan protein molekulske mase oko 75 kD.



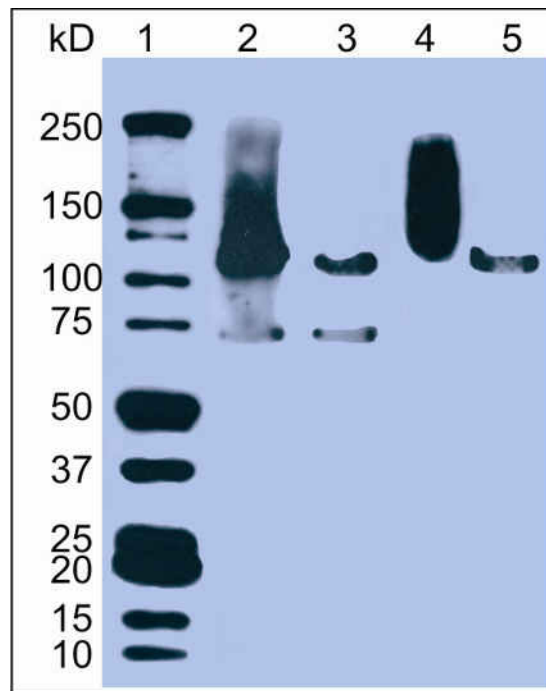
Slika 38. Imunoreaktivnost homogenata mozga kalifornijske pastrve. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

Slika 38 prikazuje vrpce proteina u mozgu kalifornijske pastrve. Protutijelo na PSA-NCAM epitop prepoznaje tri proteina, jedan molekulske mase manje od 15 kD, te dva između 50 i 75 kD (linija 2). Protutijelo na 735 epitop prepoznaje proteine molekulske mase između 50 i 75 kD te između 100 kD do iznad 250 kD i ovo protutijelo pokazalo je tzv. „smear“, odnosno razmaz, u rasponu navedenih vrijednosti (linija 4). Sekundarno protutijela IgM prepoznaje samo jedan protein molekularne mase između 50 i 75 kD (linija 3) a IgG protutijelo dva proteina molekularne mase između 50 i 75 kD te između 100 i 150 kD (linija 5).



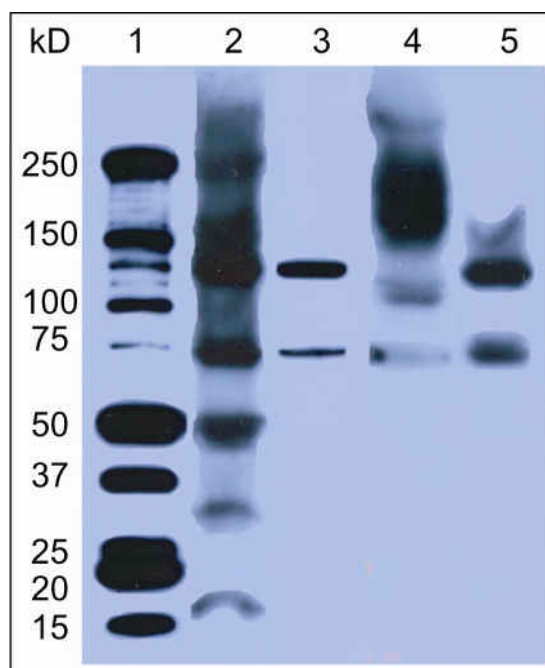
Slika 39. Imunoreaktivnost homogenata mozga štuhe. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

U mozgu štuhe protutijelo na PSA-NCAM epitop (anti-PSA-NCAM) prepoznaje proteine molekulske mase od oko 75 kD, oko 100 kD te iznad 250 kD (linija 2). Protutijelo na 735 epitop prepoznaje proteine molekulske mase oko 50 i 75 kD te između 100 kD i 150 kD (linija 4) u čijem rasponu proteini pokazuju „smear“, odnosno razmaz. Sekundarno protutijelo IgM prepoznaje proteine molekulske mase između 75 kD i 100 kD (linija 3) a IgG protutijelo proteine molekulske mase oko 75 kD i 100 kD, te manje molekulske mase tj. molekulske mase 20 i 25 kD (linija 5).



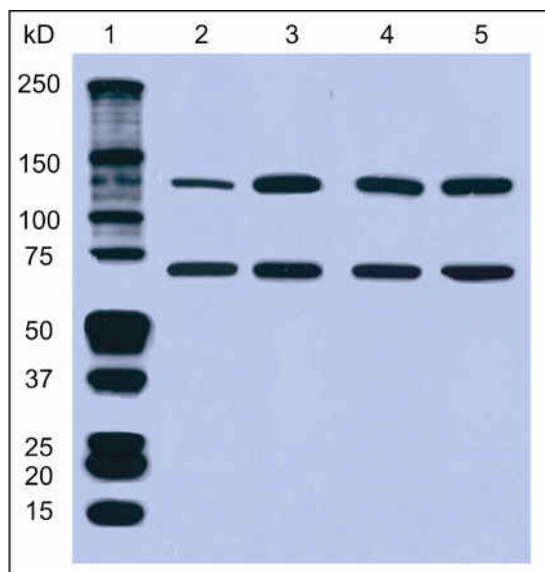
Slika 40. Imunoreaktivnost homogenata mozga šarana. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

U mozgu šarana protutijelo na PSA-NCAM epitop (anti-PSA-NCAM) prepoznaje proteine molekulske mase od oko 75 kD, te u rasponu između 100 i 250 kD (linija 2) u kojem je uočen razmaz. Protutijelo na 735 epitop prepoznaje proteine molekulske mase u rasponu vrijednosti od oko 100 kD do oko 250 kD (linija 4). Sekundarno protutijelo IgM prepoznaje proteine molekulske mase oko 75 kD i 100 kD (linija 3), dok IgG protutijelo prepoznaje proteine molekulske mase oko 100 kD (linija 5).



Slika 41. Imunoreaktivnost homogenata mozga soma. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

U mozgu soma proteini koje prepoznaje protutijelo na PSA-NCAM epitop (anti-PSA-NCAM) molekularnih su masa oko 15 kD, zatim između 25 i 37 kD, te oko 50 kD. Također, ovo protutijelo prepoznaje i proteine molekularne mase u rasponu vrijednosti od 100 do iznad 250 kD (linija 2). Protutijelo na 735 epitop prepoznaje proteine molekularne mase oko 75 i 100 kD, te između 150 i 250 kD (linija 4). Sekundarno protutijelo IgM prepoznaje proteine molekularne mase oko 75 kD te između 100 i 150 kD (linija 3), dok IgG protutijelo prepoznaje proteine molekularne mase oko 75 te između 100 i 150 kD (linija 5).



Slika 42. Imunoreaktivnost homogenata mozga kečige. 1) standard; 2) imunoreaktivnost sa anti-PSA-NCAM; 3) imunoreaktivnost sa IgM protutijelom; 4) imunoreaktivnost sa 735; 5) imunoreaktivnost sa IgG protutijelom.

Na slici 42 prikazane su vrpce proteina dobivene imunoblotom homogenata tkiva mozga kečige. Oba protutijela na PSA-NCAM epitop (anti-PSA-NCAM i 735) prepoznaju dva proteina, molekularne mase oko 75 kD i 150 kD (linija 2 i 4). Sekundarna protutijela IgM i IgG prepoznaju dva proteina molekularne mase oko 75 kD i 150kD.

5.1. Ekološki uvjeti i anatomska građa mozga odabranih vrsta riba

Prave koštunjače odlikuju se brojnim varijacijama u morfologiji mozga. Struktura mozga i njegove funkcije povezani su sa ekološkim nišama koje vrsta zauzima. Kod riba je ova povezanost jače izražena nego kod ostalih kralježnjaka (Lissner, 1932; Evans, 1940; Uchihashi, 1953). Istraživane vrste pravih koštunjača slične su po sistematici (slika 1) i klimatskim uvjetima u kojima žive, ali zauzimaju različite ekološke niše i s tim u vezi razvile su razlike u morfologiji mozga. Osim što se međusobno razlikuju, prave koštunjače razlikuju se i od ostalih skupina zrakoperki poput štitonoša (slike 2 i 3) kako uslijed prilagodbe različitim ekološkim nišama, tako i s obzirom na sistematiku.

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi u kojim regijama odraslog mozga pravih koštunjača (*Teleostea*) i štitonoša (*Chondrostei*) se odvija neurogeneza, odnosno migracija i diferencijacija prekursora neurona, te dobivene rezultate interpretirati s obzirom na ekološke uvjete u kojima riba živi i s obzirom na sistematiku.

Varijacije u građi tijela i mozga posljedica su selekcijskih pritisaka koji su vladali tijekom duge evolucije. Na selekcijske pritiske nadovezala se duplikacija cijelog genoma i promjene u nasljeđivanju vezanih gena. Prave su koštunjače, za razliku od ostalih kralježnjaka, bile tri puta izložene duplikaciji genoma (Sato, 2010) u kojima su nastali brojni „suvišni“ geni koji lakše podliježu mutacijama. Za promjene u izgledu mozga posebno su zadužene mutacije unutar *Hox* gena koje su potakle regionalno specifičnu proliferaciju stanica usporedno s njihovim povećanim preživljavanjem (Ito i sur., 2007). Mehanizam koji omogućuje pojavljivanje različitih oblika mozga je morfogeneza, proces u kojem su regionalizacija mozga i proliferacija stanica čvrsto povezani. Svaka mutacija koja se dogodi u genu uključenom u morfogenezu mozga, može doprinijeti poboljšanju regionalno specifične proliferacije stanica i preživljavanju stanica u odgovornim regijama mozga (Ito, 2007). Sve ovo vodilo je do pojave velike raznolikosti u građi mozga koje pak omogućavaju prilagodbe ponašanja životinja različitim ekološkim nišama. Ponašanje životinja povezano je s različitim vrstama osjeta na koje se ribe oslanjaju tijekom brojnih životnih aktivnosti kao što je traženje hrane, izbjegavanje predatora, komunikacija ili mrijest. Da bi se životinja uspješno prilagodila ekološkoj niši, mora razviti ponašanje prikladno osjetilnim informacijama iz vanjskog okoliša, tj. mora razviti što bolje adaptacijske mehanizme. Sve mutacije u genu koje daju bolje adaptacijske mehanizme, brzo se šire unutar cijele populacije. Tako si vrste osiguravaju

prednosti u preživljavanju i postaju dominantne u zauzimanju određene ekološke niše (Ito i sur, 2007).

Primjer uspješne prilagodbe ekološkoj niši pokazuju odabrane vrste riba za koje su ovim istraživanjem utvrđene specifičnosti i razlike u vanjskoj morfologiji mozga.

Prednji mozak (*telencephalon*) imaju bolje razvijene ribe koje žive u skupinama. Za razliku od sisavaca, prednji mozak pravih koštunjača i štitonoša je evertiran, odnosno ventrikuli se ne nalaze unutar hemisfera mozga, već iznad njih. Primjerice grgeč ima bolje razvijen prednji mozak od štuke jer on, za razliku od nje, lovi u grupama. Primjer dobro razvijenog prednjeg mozga ima i kečiga, koja se u vrijeme mrijesta i tijekom zimskog razdoblja skuplja u veća jata (Bogut et al., 2006), te šaran koji ima razvijenu taktiku lova. Također je i važnost njušne lukovice drugačija kod grgeča nego kod štuke u smislu komunikacije putem feromona. Od njušne lukovice prema prednjem mozgu informacije o feromonima i spolno relevantnim mirisima prenose se medijalnim olfaktornim putem (Sorensen et al., 1991). Važnost feromona osim što je izražena tijekom mrijesta, važna je i kod prepoznavanja bliskih srodnika kod riba koje love u skupini (grgeč).

Za interpretaciju okusa postoji cijeli sustav smješten na stražnjem mozgu. Čine ga facijalni, glosofaringealni i vagalni režanj. Ovi režnjevi od svih promatranih vrsta postoje samo kod soma, šarana i kečige tj. riba koje se u pronalaženju hrane oslanjaju na okus. Svi okusni pupoljci bez obzira na smještaj inervirani su facijalnim, glosofaringealnim i vagalnim živcima (Ito et al, 2007). Ribe s brkovima imaju dobro razvijen facijalni režanj jer je na njima smješten veliki broj okusnih pupoljka (Sato, 1936a,b, 1937). Informacije iz pojedinog reda brkova *n. facialis* dolaze u facijalni režanj koji je homologan rostralnom dijelu jezgre *n. tractus solitarii* viših kralježnjaka (Finger, 1983). Kako šaran ima samo dva para brkova na uglovima usana njegov facijalni režanj, koji omogućava razlikovanje osjeta koji dolaze iz okusnih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine, nije razdijeljen na dodatne režnjeve kao kod soma koji ima šest pari brkova. Kod soma facijalni režanj može biti podijeljen i na šest režnjića - četiri prednja interpretiraju okus koji dolazi s brkova, a dva stražnja one koji dolaze od okusnih pupoljaka razmještenih po cijelom tijelu (Hayama i Caprio, 1989). Kod obje vrste navedeni moždani putovi vrše funkciju probira hrane, a kako je režanj dobro povezan s jezgrama hipotalamusa, ovo utječe i na sezonske promjene u režimu hranjenja. Glosofaringealni režanj, koji prima informacije iz osjetnih pupoljaka usne šupljine, utvrđen je samo kod šarana. Ovaj režanj omogućava selekciju hrane u usnoj šupljini, gutanje hrane i izbacivanje svega nejestivog uz pomoć palatalnog organa (Finger i Morita, 1985). Vagalni režanj, koji je homologan kaudalnom dijelu *n. tractus solitarii*, kontrolira gutanje i žvakanje

(Atema, 1971). Utvrđen je samo kod šarana i kečige (slika 34). Som, kao pasivno elektrosenzitivna vrsta, umjesto vagalnog i glosofaringealnog režnja ima lateralni režanj (ll) koji svojim medijalnim dijelom interpretira somatosenzoriku (mll), a lateralnim dijelom električne signale iz okoline (ell) (slika 34). Som ne posjeduje specijalizirane električne organe kojima bi generirao struju u svrhu aktivne elektrorepcije, već samo detektira male struje i razlike potencijala koji se pojavljuju u okolišu (Nieuwenhuys i sur., 1998). Elektrosenzorički impulsi stižu u mozak putem osjetnih vlakana lateralnog živca i završavaju u električnom režnju, posebno razvijenoj strukturi koja se izbočuje na površini mozga. Praktično su sve ribe izvan reda pravih koštunjača elektrosenzitivne, ali su njihovi elektrosenzitivni organi i pripadajuće projekcijske regije u mozgu nastale neovisnom evolucijom i ne smatraju se homolognima s istima u koštunjača (Bullock i sur., 1982).

Kod kalifornijske pastrve, štuke i grgeča navedene strukture nisu utvrđene jer se one prilikom pronalaska hrane navode vidom i od velikog im je značaja dobro razvijen vidni tektum. Primjerice štuca, zbog taktike lova smatra se tipičnim grabežljivcem i vizualnim predatorom. Za njen način života vidni tektum, odnosno cijeli srednji mozak je od velikog značenja. Jedna od glavnih funkcija srednjeg mozga primanje je vidnih informacija i njihova integracija sa svim ostalim vrstama osjeta (Meek, 1990). To je središte gdje se koordiniraju osjeti i motorika pri usmjerenim pokretima tijela (Viljetić et.al., 2009). Optički tektum prisutan je kod svih promatranih vrsta čak i kod soma koji ima rudimentarni vid. Vidni korteks riba je slojevite građe, a broj slojeva varira među različitim skupinama. Gornji slojevi su aferentni i integriraju razne modalitete osjeta, prvenstveno vida (Wallace i sur., 1998) dok su donji slojevi eferentni i integriraju motoriku, prije svega pokrete očiju. Kod pravih koštunjača optički tektum se sastoji od sedam slojeva i stvara obilne veze s retinom oka organiziranom poput mape (Springer i Gaffney, 1981) dok je kod štitonoša izgrađen od šest slojeva te također stvara obilne veze s retinom oka (Nieuwenhuys i sur., 1998). Kod slijepih riba i onih s rudimentarnim vidom optički tektum se isto kao i kod ostalih riba sastoji od sedam slojeva, ali nedostaju ili su jako reducirani oni koji stvaraju veze s mrežnicom (Voneida i Fish, 1984).

Slično tektumu, kalifornijska pastrva, štuca i grgeč imaju i bolje razvijenu strukturu srednjeg mozga tzv. *torus longitudinalis* ili uzdužni nabor koji je dio vidnog sustava (slika 26). Inače je ova struktura posebno dobro razvijena kod riba koje žive u nemirnim vodama i kod onih koje se aktivno kreću između dubokih i plitkih slojeva vode (Kishida, 1979). Smatra se da je zadatak ove strukture usklađivanje pokreta očiju s pokretima tijela. Izgrađena je od

granularnih neurona koji šalju paralelna nemijelinizirana vlakna u marginalni sloj optičkog tektuma (Ito i Kishida, 1978) te upravo po njima slični malom mozgu sisavaca.

Još jedna struktura srednjeg mozga kojeg imaju sve odabrane vrste riba je *torus semicircularis*. U navedenoj strukturi završavaju mehanosenzorički osjeti koje prenosi lateralni živac, a potječu od mehanoreceptora kože lateralne linije, koji omogućavaju interpretaciju pomicanja vode (McCormick, 1982). Ovaj osjet je dobro povezan s auditivnim i vestibularnim organima čije projekcije također završavaju u ovoj strukturi (Finger i Tong, 1984). *Torus semicircularis* se dijeli na dvije regije, lateralnu i medijalnu. Lateralna regija je prvenstveno uključena u procesiranje signala lateralne linije i laminarne je građe. Medijalna regija je uključena u procesiranje akustičnih signala (Fay i sur., 1982; Echterler, 1984; Cuadrado, 1987, 1989). Prvi sloj lateralne regije je subependimalni sloj, u drugom sloju se nalaze male gusto pakirane stanice čiji su dendriti smješteni u trećem sloju, a u četvrtom sloju su raspršene srednje i velike stanice (Cuadrado, 1987, 1989). Veći *torus semicircularis*, složenije građe, imaju pasivno elektrosenzorne ribe tako da najbolje razvijenu ovu strukturu od svih odabranih vrsta riba ima som (slika 27). Inače, struktura *torus semicircularis* je najveća i najsloženije je građe kod aktivno elektrosenzornih riba.

Mali mozak je kompleksne građe i kod svih promatranih vrsta posjeduje tri funkcionalne cjeline: kaudalno smještena vestibulolateralna regija, neparno tijelo malog mozga, te *valvula* malog mozga. Mali mozak kečige, osim navedenih struktura, posjeduje još jednu koja se naziva *auricula cerebelli*. Uz prednji i srednji mozak, mali mozak se smatra trećim integracijskim središtem različitih osjeta. Tijelo *cerebeluma* povezano je s prednjim mozgom, jezgrama koje su vezane uz retinu, jezgrama srednjeg mozga i retikularnim jezgrama stražnjeg mozga (Wullimann i Northcutt, 1988). Zbog navedenih veza, mali mozak integrira pokrete očiju i glave s pokretima tijela. Ovakva integracija osobito je važna za ribe koje se hrane danju i u traženju hrane navode se vidom (kalifornijska pastrva, štika i grgeč). Kod soma je tijelo *cerebeluma*, zavaljeno prema naprijed za razliku od kalifornijske pastrve, grgeča, štuke, šarana i kečige kod kojih je zavaljeno prema natrag (slika 13).

Statoakustični organ služi za prijam osjeta sluha te za održavanje ravnoteže i položaja tijela. Unutarnje uho riba sastoji se od parnog labirinta u kojem nema pužnice, ali ima dijelova za interpretaciju ravnoteže (vestibulatorni sustav). Sacculus i lagena su slušni organi i imaju dvostruku ulogu – akustičnu i gravitacijsku (Popper i Fay, 1993), dok utriculus i polukružni (semicirkularni) kanali imaju ulogu u održavanju ravnoteže (Nieuwenhuys et al., 1998). Polukružni kanali detektiraju kutnu akceleraciju, a utrikulus je gravitacijski organ. S ovim sustavom vezana je jedna od cjelina maloga mozga tzv. vestibulolateralna regija koja

sudjeluje u procesiranju osjeta iz unutarnjeg uha i mehanosenzoričkih receptora cijeloga tijela (Bass, 1982). Ova regija je aferentnim i eferentnim vezana povezana s oktavolateralnom regijom stražnjeg mozga (Pouwels, 1978; Bass, 1982; Murakami i Morita, 1987). Kaudalna vestibulolateralna regija riba može se podijeliti na dva dijela, kaudalni režanj i granularna eminencija (Nieuwenhuys i sur., 1998). Granularnu eminenciju čini masa granularnih neurona čiji nastavci čine greben malog mozga (*crista cerebelli*) (Meek, 1992a). *Crista cerebelli* prima projekcije iz vestibularnog aparata te se smatra najprimitivnijim dijelom malog mozga (Finger, 1983). Vestibulolateralna regija od velikog je značaja za ribe koje love u skupini i pokazuju sposobnost koordiniranih promjena smjera svih članova skupine.

Valvula cerebelli cijeli je jedan dio malog mozga koji je tipičan samo za zrakoperke (Nieuwenhuys, 1967). Povezana je s auditivnim, vestibularnim, optičkim i mehanosenzoričkim jezgrama i služi za koordinaciju pokreta tijela (Ito i Yoshimoto, 1990). Odabrane vrste razlikuju se po obliku i veličini *valvule*. Grgeč, kalifornijska pastrva i štika (slika 28) imaju otprilike *valvulu* iste veličine i sličnog, naboranog oblika. *Valvula* kod soma je nešto manja, pogotovo u odnosu na šarana čija je *valvula* najveća od svih odabranih vrsta. Kečiga veličinom *valvule* slični šaranu dok se po obliku *valvule* razlikuje od svih predstavnika pravih koštunjača (slika 29).

Kao i kod ostalih kralježnjaka, mali mozak riba je slojevite građe te se sastoji od tri sloja. Granularni neuroni šalju paralelna vlakna u molekularni sloj, a završavaju na trnovitim lateralno orijentiranim dendritima Purkinjeovih stanica. Ovakav raspored slojeva je isti za *valvulu* i *corpus*, međutim zanimljivo je da u većem dijelu *valvule* dolazi do neobične organizacije Purkinjeovih i granularnih neurona. Granularni neuroni nisu smješteni ispod sloja Purkinjeovih neurona nego se nalaze lateralno u odnosu na molekularni sloj te šalju paralelna vlakna koja onda nemaju tzv. T-grananje (Meek, 1992).

Opisane specifičnosti i razlike u morfologiji mozga povezane su sa činjenicom da kod pravih koštunjača mozak tijekom života ne dostiže konačnu veličinu. Ova pojava povezana je s neurogenezom odraslog mozga koja je kod ove skupine posebno izražena. Neurogenezom nastaju novi neuroni koji se nakon proliferacije, migracije i diferencijacije ugrađuju u već postojeću mrežu neurona. Tako se broj neurona povećava sa starošću ribe u većini regija mozga (Kaslin, 2008), što vodi do neprekidnog rasta mozga koji se usporava tek kad jedinka dosegne poodmaklu dob (Zupanc i Horschke, 1995). Brojna istraživanja pokazuju da se broj stanica u mozgu pravih koštunjača povećava ne samo sa godinama, nego i tjelesnom težinom i dužinom (Leonard i sur., 1978; Birse i sur., 1980; Leyhausen i sur., 1987; Brandstätter i Kotrschal 1989, 1990; Zupanc i Horschke 1995). Poznato je da kod pravih koštunjača optički

sustav i retina rastu neprekidno tijekom života (Straznicky i Gaze 1971, 1972; Johns i Easter 1977; Beach i Jacobson 1979; Raymond i Easter 1983; Marcus i sur., 1999). Koje regije mozga će se više povećavati ovisi o načinu života, odnosno o primarnim osjetilnim podražajima. Ribama kojima je vid presudan u traženju hrane bolje će se povećati vidni tektum, i u skladu s tim retina oka. Ribama koje se tijekom traženja hrane navode kemoreceptorima više će se povećati vagalni režanj (Evans 1952; Brandstatter i Kotschal, 1990; Marcus et al. 1999), specifični režanj na stražnjem mozgu koji omogućava funkciju palatalnog organa.

Da razlike u morfologiji mozga postoje i među vrstama koje pripadaju istoj porodici, pokazuju istraživanja rađena na ribama iz porodice *Cyprinidae*. I kod ovih vrsta dokazano je da je povećavanje određenih regija mozga, odnosno njegova morfologija, povezana sa načinom života odrasle jedinke. Naime, istraživanja pokazuju da jedinke koje se hrane bentonski pokazuju proširene kemosenzorne regije mozga, dok jedinke koje se hrane na površini vode ne pokazuju proširenje u ovim regijama (Brandstatter i Kotschal 1989; Kortschal i Palzenberger 1992). Nadalje, kod ovih vrsta dokazano je da specifične strukture mozga postaju vidljive tek tijekom kasnijeg juvenilnog perioda, u razdoblju kada su razlike u rastu mozga posebno izražene.

5.2. Migracijske zone u mozgu odabranih vrsta riba

Osim po građi mozga, opisane vrste razlikuju se i po ekspresiji PSA-NCAM molekule. Ekspresija navedene molekule izražena je u regijama mozga u kojima se odvija migracija prekursora neurona. Kod svih šest odabranih vrsta riba ekspresija PSA-NCAM molekule praćena je imunoreaktivnošću protutijelima anti-PSA-NCAM i 735. Navedena protutijela prepoznaju isti epitop proteina odnosno prepoznaju polisijalinsku kiselinu koja je vezana za proteinski dio molekule PSA-NCAM. Razlikuju se po klasi u smislu da je anti-PSA-NCAM protutijelo IgM klase, a 735 IgG klase. Radi lakšeg orijentiranja u utvrđivanju migracijskih zona u pojedinoj strukturi mozga za svih šest odabranih vrsta riba izrađen je i atlas uz pomoć protutijela NeuN i SMI312 te histološkim bojanjem po Nisslu i Gallyas-u. Atlas daje jasan prikaz tijela neurona (NeuN) i vlakana (SMI312), odnosno raspored jezgara (Nissl) i mijeliniziranih vlakana (Gallyas).

Imunohistokemijom s protutijelima anti-PSA-NCAM i 735 pokazane su široke migracijske zone u odraslom mozgu svih odabranih vrsta pravih koštunjača te jedne vrste štitonoša.

Idući redom od rostralnog prema kaudalnom dijelu mozga migracijske zone se pojavljuju u prednjem mozgu (*telencephalon*), međumozgu (*diencephalon*), srednjem mozgu (*mesencephalon*), te u malom mozgu (*cerebellum*) i stražnjem mozgu (*rhombencephalon*) odnosno njegovom bazalnom dijelu (*tegmentum rhombencephalon*).

Imunohistokemijska studija napravljena u ovom radu pokazala je da prednji mozak svih šest odabranih vrsta riba pokazuje imunoreaktivnost na protutijela anti-PSA-NCAM i 735. Najslabiju pozitivnost na PSA-NCAM protutijelo pokazuje grgeč. Kalifornijska pastrva pokazuje izostanak bojenja strukture *tractus olfactorius medialis*, a reakcija na 735 jača je u predjelu *area ventralis telencephali*. Kod štuke je također pozitivna *area ventralis telencephali* na protutijelo 735 (slika 16, oznaka V), dok se u PSA-NCAM pozitivnoj zoni prednjeg mozga razlikuje od kalifornijske pastrve po jednolikom obojenju duž cijele navedene strukture (slika 16). Migracijski neuroni soma i kečige jednoliko su raspoređeni duž cijelog prednjeg mozga, a intenzitet obojenja PSA-NCAM i 735 zone je jednak. Šaran pokazuje slabiju imunireaktivnost na 735 protutijelo u odnosu na anti-PSA-NCAM protutijelo, što se posebno očituje u predjelu *area dorsalis telencephali* (Slika 17).

Odabrane vrste riba razlikuju se i po ekspresiji markera neurona koji je protein neuronskih jezgara. Marker neurona u prednjem mozgu najizraženiji je kod kalifornijske pastrve i štuke. Kod kalifornijske pastrve je veliki broj NeuN pozitivnih neurona pronađen u svim dijelovima prednjeg mozga osim u centralnoj regiji zaduženoj za integraciju svih osjeta koji dolaze u prednji mozak. Kod štuke je uočeno difuzno bojanje neuropila s protutijelom NeuN i to u cijelom prednjem mozgu (slika 16).

U području međumozga imunohistokemijska studija rađena je na strukturi *lobus inferior hypothalami*. Ovi donji režnjevi dio su najveće i lateralno smještene regije hipotalamusa koji se još sastoji i od periventrikularne zone te medijalno smještene tuberalne regije (Braford i Northcutt, 1983). *Lobus inferior hypothalami* služi za integraciju vida i okusa koja im pomaže u traganju za hranom. Ova regija hipotalamusa, dakle prima projekcije iz vizualnih centara srednjeg mozga (Demski i sur., 1975) te iz sekundarnih gustatornih centara (Sakamoto i Ito, 1982; Wullimann i Meyer, 1990).

Cijela struktura *lobus inferior hypothalami* ima reaktivnost, odnosno pozitivna je na PSA-NCAM epitop kod svih šest vrsta riba. Pozitivnost ove strukture jača je na protutijelo anti-PSA-NCAM nego na 735, kod svih riba, osim kod kečige. Po ekspresiji PSA-NCAM epitopa sve navedene vrste riba vrlo su slične. Opisane vrste razlikuju se po jačini ekspresije markera neurona. Naime, kod grgeča je ekspresija markera neurona najslabija dok je kod kalifornijske pastrve najjača (slika 18, tablica 1).

U području kaudalnog međumozga utvrđene su određene strukture i jezgre koje su PSA-NCAM negativne. *Central pretectal nucleus*, jezgra je negativna na navedeno protutijelo kod grgeča i štuke (oznaka III, slike 20 i 22). Nadalje, *tectum opticum ventralis* (oznaka IV, slika 20 i 21 i oznaka II, slika 23) sljedeća je negativna struktura nađena kod grgeča, kalifornijske pastrve i šarana. Kod soma je PSA-NCAM negativna jezgra *nucleus anterior tuberis* (oznaka I, slika 24). Međumozak kečige je, za razliku od ostalih vrsta, u potpunosti pozitivan na protutijelo anti-PSA-NCAM (slika 25). U navedenim strukturama međumozga izostanak reaktivnosti objašnjava se činjenicom što se u njima neuroni ne obnavljaju u smislu da se zamjenjuju novim, već ti neuroni imaju veliku sposobnost samoodržavanja.

Imunohistokemijska analiza migracijskih zona srednjeg mozga pokazuje razlike između vrsta u vidnom tektumu koje se očituju kao kvantitativne i kvalitativne razlike u reakciji na PSA-NCAM i 735 između slojeva. Po izostanku reaktivnosti na navedena protutijela u šestom, optičkom sloju, grgeč, kalifornijska pastrva i štuca pokazuju veliku sličnost. To su vrste već opisane kao one koje se prilikom hranjenja navode vidom. Šesti ili optički sloj (*stratum opticum*) sadrži retinalna vlakna koja završavaju u petom sloju (Nieuwenhuys i sur., 1998). Ta vlakna stalno se premještaju i neprekidno rastu. Također je kod ovih vrsta sedmi, rubni sloj optičkog tektuma najizraženiji. Radi se o sloju koji je izgrađen od nemijeliniziranih paralelnih vlakana koja stižu iz *torus longitudinalis* (Nieuwenhuys i sur., 1998). Dominantnost rubnog sloja optičkog tektuma dovodi se u vezu sa strukturom *torus longitudinalis* koja je kod ovih riba posebno dobro razvijena opet zbog načina lova odnosno života općenito.

Za razliku od njih, kod soma i šarana, mada je rubni marginalni sloj obojen, on nije dominantan zato što su optički slojevi vidnog tektuma također pozitivni. Imunoreaktivnost svih slojeva soma i šarana jača je na epitop protutijela PSA-NCAM u odnosu 735 (slike 23 i 24, tablica 1). Kečiga, kao predstavnik štitonoša, ima šest slojeva optičkog tektuma, jer se unutrašnji sloj ne dijeli na dublji i vanjski sloj nego predstavlja jednu cjelinu. Kečiga pokazuje sličnosti sa pravim koštunjačama, pogotovo sa šaranom i somom, jer su i kod nje svi slojevi pozitivni na oba PSA-NCAM epitopa. Od pravih koštunjača razlikuje se jedino po intenzitetu ekspresije 735 epitopa (slika 25, tablica 1).

Grgeč, kalifornijska pastrva i štuca slične su i po rasporedu pozitivnih NeuN neurona. Kod grgeča i štuke tih neurona ima samo u prvom, najdubljem sloju optičkog tektuma zaduženom za motoriku, odnosno za pokrete očiju. Kod kalifornijske pastrve, ima ih u svim slojevima izuzev sedmog marginalnog sloja, ali je i dalje najveći broj tih neurona u prvom sloju. Upravo se u najdubljem, prvom sloju tektuma nalaze gusto smješteni periventrikularni

monopolarni neuroni koji šalju dendrite i njihovo široko razgranjenje u gornje slojeve. Trnovi dendrita ovih neurona reagiraju promjenom oblika i veličine na promjene u socijalnom okolišu ribe (Coss i Globus, 1978, 1979; Burgess i Coss, 1980). Znatno manji broj NeuN neurona detektiran je i u svim ostalim slojevima osim u zadnjem marginalnom sloju izgrađenom od nemijeliniziranih paralelnih vlakana koja stižu iz *torus longitudinalis*. Ovakav raspored pozitivnih NeuN neurona suprotan je od rasporeda PSA-NCAM pozitivne zone. Kod šarana je po ekspresiji markera neurona najdominantniji drugi sloj a kod soma prvi, dok je PSA-NCAM pozitivna zona u slojevima iznad prva dva. Zaključujemo kako je NeuN marker za diferencirane neurone tektuma koji više ne migriraju (tablica 1).

U srednjem mozgu kao migracijske zone označene su i strukture *torus longitudinalis* i *torus semicircularis*. Navedene strukture pozitivne su na protutijela anti-PSA-NCAM, 735 i NeuN kod svih riba na kojima je rađena imunohistokemijska analiza. Najizraženiji intenzitet PSA-NCAM u strukturi *torus longitudinalis* je kod grgeča, dok je reakcija na 735 protutijelo jednaka kao i na kontroli IgG-vezanja (slika 6) pa pretpostavljamo da je u ovoj strukturi izostala reakcija s 735 protutijelom. Marker neurona najizraženiji je kod kalifornijske pastrve dok se kod štuke u ovoj strukturi radi o nespecifičnom vezanju markera neurona (slika 26). Ova struktura neprekidno reorganizira paralelna vlakna, ali su njeni neuroni dobro diferencirani i više ne migriraju pa zaključujemo kako se PSA-NCAM epitop zadržava i na diferenciranim neuronima ako su skloni čestoj reorganizaciji neurita. U strukturi *torus semicircularis* šaran i som pokazuju veliku sličnost po intenzitetu obojenja u PSA-NCAM regiji kao i u 735 regiji (slika 27).

Na malom mozgu radi utvrđivanja migracijskih zona rađena je imunohistokemija PSA-NCAM epitopa u *corpusu*, *valvuli* i *cristi cerebelli*. *Valvula* i *crista* pravih koštunjača sastoji se od tri sloja. To su molekularni sloj koji se kod *valvule* nalazi sa unutrašnje strane a kod *corpuse* sa vanjske, granularni sloj koji je smješten nasuprot molekularnom sloju i sloj ganglijskih stanica koji se nalazi ispod molekularnog odnosno između ova dva sloja.

Imunohistokemijska analiza pokazala je kod svih šest vrsta riba pozitivnost navedenih struktura u svim njihovom slojevima sa dominantnim granularnim slojem što se posebno dobro očituje kod kalifornijske pastrve, šarana i kečige kada govorimo o *corpusu*, odnosno kod šarana i štuke kada govorimo o *valvuli*. Sloj ganglijskih stanica jedino kod grgeča ima slabiju ekspresiju PSA-NCAM epitopa i to u *corpusu*. Ovaj sloj razlikuje se kod pravih koštunjača i štitonoša. Prave koštunjače uz Purkinjeove stanice imaju zastupljene i velike euridendroidne stanice, a zajedno čine sloj ganglijskih stanica smješten između molekularnog i granularnog sloja (Pouwels, 1978; Meek i Nieuwenhuys, 1991). Euridendroidne stanice su

eferentne, a Purkinjeove stvaraju sinapse sa slojem ganglijskih stanica, odnosno s dendroidnim i Purkinjeovim neuronima (Pouwels, 1978; Meek i Nieuwenhuys, 1991) te sa stelarnim neuronima (Meek i Nieuwenhuys, 1991). Za razliku od pravih koštunjača, štitonoše nemaju euridendroidne stanice. Njihove Purkinjeove stanice u *valvuli* i *corpusu* smještene su medijalno u molekularnom sloju, a samo se u prijelaznom području između *corpusa* i *auricule* mogu pronaći Purkinjeove stanice koje formiraju sloj (Nieuwenhuys i sur., 1998). Prema ovome kečiga pokazuje znatne razlike sa srodnicima - pravim koštunjačama.

Po markeru neurona u *corpusu* i *valvuli* odabrane vrste riba razlikuju se u određenoj mjeri. Marker neurona i ekspresija PSA-NCAM epitopa u slučaju ove strukture se preklapaju što znači da je najveći broj NeuN pozitivnih neurona u granularnom sloju kod svih vrsta. U *valvuli* grgeč ima NeuN pozitivnih neurona samo u granularnom sloju dok su kalifornijska pastrva i štuka po ovome slične i imaju NeuN neurona najviše u granularnom, ali postoji i mali broj pojedinačnih neurona u molekularnom sloju. Kalifornijskoj pastrvi i štuki po rasporedu NeuN pozitivnih neurona liči šaran, som i kečiga. U *corpusu*, NeuN pozitivnih neurona kod grgeča i štuke ima najviše u granularnom sloju dok su u molekularnom sloju utvrđeni nespecifični neuroni.

Crista cerebelli, također tvorevina malog mozga, je također pozitivna na epitope anti-PSA-NCAM i 735 kod svih vrsta riba. Kod grgeča i šarana intenzitet PSA-NCAM zone je najveći. Kod njih je ujedno i najizraženija razlika imunoreaktivnosti na 735 i PSA-NCAM. Ekspresija markera neurona zastupljena je kod kalifornijske pastrve na specifičnim neuronima. Kod grgeča u ovoj strukturi nema epitopa ekspresije markera neurona dok je kod štuke bojanje intenzivno, ali ne i specifično (slika 32). Som ima najjaču ekspresiju i kod ove vrste su na NeuN pozitivne ne samo tijela granularnih neurona već i paralelna vlakna koje ovi neuroni šalju u strukturu *crista cerebelli*. To nije slučaj kod šarana kod kojeg su pozitivna samo tijela neurona (slika 33). Kako se uvijek radi o visoko diferenciranim neuronima, zaključujemo kako su zadržali PSA-NCAM radi vlastite sposobnosti reorganizacije, ali i zato što je *cerebellum* mjesto intenzivne proliferacije neurona koji odavde putuju na svoja krajnja odredišta.

Stražnji mozak, odnosno njegov bazalni dio tzv. *tegmentum rhombencephali* kod grgeča i kalifornijske pastrve nije pozitivan na PSA-NCAM i 735 epitope. Iz ovoga se zaključuje da kod ovih vrsta proliferacija novih neurona i njihova sposobnost migracije opada idući prema kralježničnoj moždini (slika 35). U njihovom *tegmentumu* kao i u *tegmentumu* štuke raspoznaje se nekoliko NeuN pozitivnih skupina neurona. To su visoko diferencirani neuroni, vjerojatno male plastičnosti. Kod šarana, soma i kečige cijeli bazalni *tegmentum*

pozitivan je na oba PSA-NCAM epitopa. Šaran u ovoj strukturi nema NeuN pozitivnih neurona dok ih kečiga i som imaju. Pozitivnost stražnjeg mozga na PSA-NCAM epitope kod šarana soma i kečige u vezi je sa održavanjem posebnih režnjeva zaduženih za interpretaciju okusa (lobus VII, IX i X, slika 34). Svi navedeni režnjevi kod ovih riba pozitivni su na epitope protutijela 735 i anti-PSA-NCAM. Obnavljanje ovih struktura važno je za život riba jer se one prilikom pronalaska hrane oslanjaju na okus.

U svim strukturama mozga svih riba uglavnom je uočen jači intenzitet ekspresije PSA-NCAM epitopa u odnosu na 735 epitop. Kod grgeča je najuočljivija razlika u intenzitetu PSA-NCAM i 735 epitopa. Naime, kod ove vrste jedino struktura *crista cerebelli* pokazuje značajniju ekspresiju PSA-NCAM molekule utvrđenu protutijelom 735. Nešto slabija ekspresija utvrđena je u dijelu međumozga, vidnog tektuma te *corpusa* (slike 6. i 7).

Razlog slabije ekspresije 735 epitopa može se potražiti u njegovoj dostupnosti kojeg prepoznaju oba protutijela. 735 protutijelo kao visoko specifično protutijelo IgG klase prepoznaje jedan specifičan epitop. Anti-PSA-NCAM, stvara komplekse i zbog toga ima mogućnost prepoznavanja vrlo sličnih epitopa pa je imunohistokemija rađena tim protutijelom jačeg intenziteta.

Do sada za odabrane vrste riba nije rađeno utvrđivanje migracijskih zona ekspresijom PSA-NCAM molekule. Naša istraživanja nadovezuju se na istraživanja proliferacije stanica u odraslom mozgu pravih koštunjača. Proliferacija stanica detaljno je istražena na samo tri vrste pravih koštunjača: kod koljuške (*Gasterosteus aculeatus*), vrste *Apteronotus leptorhynchus* i zebrice (*Danio rerio*) (Zupanc i Horschke, 1995; Zupanc i sur., 2005; Ekström i sur., 2001; Grandel i sur., 2006). Kod ovih vrsta riba duž cijelog mozga detektirano je preko deset proliferacijskih zona. Tako su zone detektirane u njušnoj lukovici, prednjem mozgu, strukturama međumozga (talamus, epitalamus, preoptička regija i hipotalamus), u vidnom tektumu srednjeg mozga, malom mozgu te u stražnjem mozgu i leđnoj moždini (Kaslin i sur., 2007). Raspored navedenih proliferacijskih zona odgovara rasporedu PSA-NCAM pozitivnih migracijskih zona utvrđenih našim istraživanjem (izuzev leđne moždine koja istraživanjem nije obuhvaćena). Proliferacija prekursora neurona i migracija neurona procesi su usko povezani jer u neurogenezi idu jedan za drugim.

Moguća je detaljnija usporedba proliferacijskih stanica i migracijskih zona naših istraživanja s istraživanjem koje su proveli Zupanc i Horschke (1995). Oni su istražili mitotičku aktivnosti stanica u mozgu odrasle jedinke *Apteronotus leptorhynchus*. Inkorporacijom spoja analognog timidinu, 5-bromo-2'-deoksiuridin (BrdU), u novosintetiziranu DNA tijekom S faze mitoze, detektirali su označene stanice (BrdU stanice)

te na taj način prikazali distribuciju proliferacijskih stanica pojedine strukture mozga navedene vrste. U prednjem mozgu vrste *Apteronotus leptorhynchus* mitotička aktivnost izražena brojem BrdU označenih stanica je mala i one su raspršene po cijelom prednjem mozgu.

Proliferacija i migracija neurona praćena je i u prednjem mozgu zebrice (*Danio rerio*). Kod ove vrste utvrđena je proliferacija stanica u ventralnom dijelu prednjeg mozga nakon čega dio stanica migrira prema njušnim lukovicama (Byrd i Brunjes, 2001; Adolf i sur., 2006; Grandel i sur., 2006), a dio se raspršuje unutar jezgara prednjeg mozga (Kaslin i sur., 2007). U njušnim lukovicama također postoji svojstvena populacija proliferacijskih stanica (Grandel i sur., 2006) i migrirajućih neurona (Kaslin i sur., 2007). Mala mitotička aktivnost utvrđena je i u međumozgu, srednjem mozgu odnosno vidnom tektumu i *torus longitudinalis* te *torus semicircularis*, te u malom mozgu koji ima najveću količinu proliferacijskih stanica od svih ostalih struktura. BrdU stanice u ovoj strukturi utvrđene su u tri njegove podstrukture. To su *corpus cerebelli*, *valvula cerebelli* i *eminentia granularis*. U *corpusu* BrdU stanice su najbrojnije u molekularnom sloju dok je samo nekoliko stanica detektirano u granularnom sloju. Slično *corpusu*, *valvula* također ima najveći broj BrdU obilježenih stanica u molekularnom sloju (Zupanc i Horschke, 1995). Upravo suprotno mitotičkoj aktivnosti koja se u *corpusu* i *valvuli* odvija u molekularnom sloju, PSA-NCAM pozitivne zone su u granularnom sloju točno tamo gdje ovi novonastali neuroni trebaju stići. Zupanc i sur. (2005) dokazali su to kod *A. leptorhynchus* i zebrice kod kojih postmitotički neuroni migriraju iz svojih proliferacijskih zona unutar molekularnog sloja *corpusa* i *valvule* u granularni sloj istih podjedinica.

Prema brojnim istraživanjima, mali mozak je izvor većine novih neurona u odraslom mozgu koštunjača (Zupanc, 2008). Naprotiv, utvrđene moguće migracijske zone pozitivne na PSA-NCAM epitop kod svih odabranih vrsta riba protežu su duž cijelog mozga, u svim njegovim strukturama a da niti jedna od njih nije dominantna. Također, prema ekspresiji PSA-NCAM molekule, odabrane ribe pokazuju visok stupanj sličnosti, a osobito su slične ribe koje zauzimaju slične ekološke niše grgeč i kalifornijska pastrva (kao ribe bistrih voda) te šaran, som i kečiga kao bentonske vrste.

Kako bi se utvrdila specifičnost korištenih monoklonalnih protutijela anti-PSA-NCAM i 735, napravljena je i metoda imunoblota. Razlike između vrsta temelje se razlici u molekularnoj masi proteina koji nose PSA-NCAM epitop. Epitopi protutijela PSA-NCAM kod svih riba raspona su od 50 do više od 250 kD. Samo kod kalifornijske pastrve i soma radi

se o molekulama manjih molekularnim masa od 50 kD koje prepoznaje protutijelo 735. Rezultati imunoblota najzanimljiviji su kod grgeča pogotovo kada ih usporedimo sa rezultatima imunohistokemije: protutijelo anti-PSA-NCAM i 735 reagirali su sa proteinima iste molekularne mase u homogenatu mozga. Imunohistokemijom su pak upravo kod ove vrste utvrđene najintenzivnije razlike u ekspresiji PSA-NCAM molekule rađene protutijelom anti-PSA-NCAM i 735. Navedene razlike u rezultatima imunohistokemije i Western blot-a tumače se s već opisanom dostupnošću epitopa. Treba imati na umu kako je prije imunoblota mozak homogeniziran čime su oslobođeni proteini iz potencijalno kriптиčnog položaja pa je epitet postao dostupniji i lakše je reagirao sa protutijelom 735. Prikazani smir koji se javlja kod određenih vrsta vidljiv na filmu posljedica je vezanja korištenih protutijela na glikane drugačije od polisijalinske kiseline.

5.3. Ekološki uvjeti i migracijske zone u mozgu odabranih vrsta riba

Iako je povezanost u morfologiji mozga sa ekološkim uvjetima u kojima riba živi dobro istražena, ovisnost ekoloških uvjeta i proliferacije stanica, odnosno migracije neurona, je slabo ili nikako istražena. Tek nedavno su započela ovakva istraživanja i to u mozgu sisavaca, odnosno na odraslim miševima (pregledni prikaz u Lemma, 2005). Dok se većina radova bazira na glodavce, stvaranje novih neurona u mozgu riba daleko je brojnije nego kod svih sisavaca koji su bili istraživani (Zupanc, 201a). Kvantitativnim analizama proliferacijskih stanica utvrđena je znatna razlika između mozga riba i sisavaca. Inkorporacijom BrdU u novosintetiziranu DNA tijekom S faze mitoze, utvrđeno je da kod ribe *Apteronotus leptorhynchus* u periodu od dva sata nastaje prosječno 100 000 stanica tijekom S faze mitoze u cijelom mozgu (Zupanc i Horschke 1995), što čini oko 0, 2% stanica od ukupnog broja neurona odraslog mozga navedene vrste (Zupanc, 2006). Za usporedbu, procjenjuje se da kod odraslog miša dnevno nastaje oko 30 000 stanica što odgovara 0,03% od procijenjenih 110 milijuna stanica u cijelom odraslom mozgu miša (Zupanc, 2006; Williams 2000).

Ovako velika proliferacijska aktivnost povezana je s rastom mozga tijekom života ribe (Mueller i Wullimann, 2002) ali i sa sposobnošću oblikovanja mozga prema uvjetima ekološke niše koju vrsta zauzima (Lemma i sur., 2005). Nedavna istraživanja pokazuju da kod kalifornijske pastrve koja se razmnožava u zatočeništvu postoji utjecaj okoliša na promjenu u fenotipu mozga ribe (Marchetti i Nevitt, 2003; Kihskinger i sur., 2003). Slična istraživanja kalifornijske pastrve pokazuju da su prednji mozak i ostale strukture mozga značajno

reducirane kod riba koje žive u mrjestilištima u odnosu na one koje žive u divljini (Marchetti i Nevitt, 2003).

Vrste koje zauzimaju različite ekološke niše razlikuju se po ponašanju koje je usklađeno sa različitim vrstama osjeta na koje se riba oslanja tijekom života. Ponašanje prikladno ekološkoj niši vodi do razvoja specifičnog oblika i veličine mozga a s tim u vezi promjena u proliferaciji stanica. Genetičke razlike među vrstama također pridonose varijaciji u veličini i obliku mozga (Ishikawa i sur., 1999). Ekološki uvjeti sredine u kojem vrsta živi utječu i na genetičku osnovu koja oblikuje mozak (Lema i sur., 2005).

Koliko ekološki uvjeti u kojima riba živi utječu na migraciju stanica za ribe odabrane našim istraživanjem, kao i za ostale ribe našeg podneblja, nije dokazano. Iako se neurogeneza u odraslom mozgu intenzivno proučava, posebice otkako je dokazana neurogeneza u humanom mozgu (Eriksson i sur., 1998), još uvijek je proliferacija stanica, a s tim u vezi i migracija neurona, nedovoljno istražena. Kod pravih koštunjača detaljan raspored proliferacijskih zona u cijelom mozgu utvrđen je u samo tri vrste od poznatih preko 23 000 vrsta pravih koštunjača.

Unatoč ovom ograničenju, zaključuje se da je izražena proliferacija odlika svih pravih koštunjača i štitonoša. One, za razliku od ostalih skupina kralježnjaka pokazuju visoku razinu neurogeneze i postojanju širokih migracijskih zona u odraslom mozgu što je povezano sa velikom sposobnošću regeneracije središnjeg živčanog sustava. Iako se razlikuju po morfologiji mozga, prave koštunjače po distribuciji migracijskih zona pokazuju visoku sličnost što osobito vrijedi za ribe koje žive u istoj ekološkoj niši. Unatoč filogenetičkoj udaljenosti kečiga po distribuciji migracijskih zona pokazuju visoku sličnost sa pravim koštunjačama.

Proliferacija, migracija i uklapanje neurona u funkcionalne neuronske mreže preduvjet su uspješne regeneracije. Nije isključeno da bi se usprkos velikoj međusobnoj sličnosti vrsta koje zauzimaju istu ekološku nišu, proces regeneracije mogao značajno razlikovati. Zato je ovo početna studija za studije potencijala regeneracije koštunjača u različitim uvjetima okoliša, ali i za usporedbu regeneracije u viših i nižih kralježnjaka.

- Kod svih riba nadreda *Teleostei* (grgeč, pastrva, štika, šaran i som) i *Chondrostei* (kečiga) vidljive su prilagodbe u morfologiji mozga prema ekološkim nišama;
- Odabrane vrste nadreda *Teleostei* međusobno se razlikuju po morfologiji mozga;
- Odabrane vrste nadreda *Teleostei* po morfologiji mozga razlikuju se od nadreda *Chondrostei*;
- Odabrane vrste nadreda *Teleostei* međusobno slične po raspodjeli migracijskih zona koje su zastupljene u svim strukturama mozga;
- Odabrane vrste nadreda *Teleostei* slične i kečigi kod koje su migracijske zone također zastupljene u svim strukturama mozga;
- Migracijske zone detektirane imunohistokemijom protutijela na PSA-NCAM epitop kod svih vrsta jačeg su intenziteta od migracijskih zona detektiranih imunohistokemijom protutijela na 735 epitop;
- Metodom imunoblota dokazano je da se odabrane vrste razlikuju po molekularnoj masi PSA-NCAM molekule;
- Migracijske zone kod grgeča i pastrve nisu utvrđene u stražnjem mozgu što znači da sposobnost migracije neurona opada idući prema kralježničnoj moždini;
- Ostale odabrane vrste riba imaju migracijske zone u stražnjem mozgu što je važno za obnavljanje i održavanje posebnih režnjeva (šaran, som i kečiga) odnosno jezgara (štuka) koji su od posebne važnosti za način života ovih vrsta;
- U stražnjem mozgu kod svih odabranih vrsta riba izuzev šarana ima visoko diferenciranih neurona;
- PSA-NCAM epitopi su eksprimirani u regijama mozga koje podliježu često reorganizaciji vlakana (šesti sloj tektuma), a nisu u slojevima vlakana koja uspostavljaju stabilne veze sa svojim ciljnim regijama (drugi sloj tektuma);
- Dominantnost sedmog sloja optičkog tektuma u ekspresiji PSA-NCAM molekule kod pastrve i štuke pokazatelj je dobre prilagodbe na ekološke niše;
- One regije u kojima je najveća mitotska aktivnost imaju i očuvanu ekspresiju PSA-NCAM epitopa u odrasloj dobi;
- Regije u kojima nema mitotske aktivnosti, ali je održana ekspresija PSA-NCAM epitopa potencijalno zadržavaju mogućnost regeneracije u odrasloj dobi nakon lezije (štuka, šaran, som i kečiga);

1. Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhäuser B, Strähle U, Götz M, Bally-Cuif L. 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol* 295:278-293.
2. Albach C, Damoc E, Denzinger T, Schachner M, Przybylski M, Schmitz B. 2004. Identification of n-glycosylation sites of the murine neural cell adhesion molecule ncam by maldi-tof and maldi-fticr mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry* 378:1129-1135.
3. Altman J, Das GD. 1965. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J. comp. Neurol* 124:319-335.
4. Altman J. 1969. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. iv. cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J. comp. Neurol* 137:433-457.
5. Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A, Ho RK, Langeland J, Prince V, Wang YL, Westerfield M, Ekker M, Postlethwait JH. 1998. Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science* 282:1711-1714.
6. Atema J. 1971. Structures and functions of the sense of taste in the catfish (*ictalurus natalis*). *Brain Behav. Evol* 4:273-294.
7. Bass AH. 1982. Evolution of the vestibulolateral lobe of the cerebellum in electroreceptive and nonelectroreceptive teleosts. *J. Morphol.* 174:335-348.
8. Bayer S, Yackel J, Puri P. 1982. Neurons in the rat dentate gyrus granular layer substantially increase during juvenile and adult life. *Science* 216:890-892.
9. Becker C, Artola A, Gerardy-Schahn R, Becker T, Welzl H, Schachner M. 1996. The polysialic acid modification of the neural cell adhesion molecule is involved in spatial learning and hippocampal long-term potentiation. *J. Neurosci. Res.* 45:143-152.
10. Becker T, Wullimann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. 1997. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J. comp. Neurol* 377:577-595.
11. Birse SC, Leonard RB, Coggeshall RE. 1980. Neuronal increase in various areas of the nervous system of the guppy, *lebistes*. *J. comp. Neurol* 194:291-301.
12. Bogut I, Novoselić D, Pavličević J. 2006. *Biologija riba*. Osijek: Poljoprivredni fakultet.
13. Bonfanti L. 2006. Psa-ncam in mammalian structural plasticity and neurogenesis. *Progress in neurobiology* 80:129-164.
14. Brackenbury R, Thiery J, Rutishauser U, Edelman GM. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. i. an immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *The Journal of Biological Chemistry* 252:6835-6840.

15. Braford M, Northcutt R. 1983. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. In: Fish neurobiology. 2. Higher brain areas and functions. University of Michigan Press, Ann Arbor
16. Brandstätter R, Kotrschal K. 1990. Brain growth patterns in four european cyprinid fish species (cyprinidae, teleostei): roach (*rutilus rutilus*), bream (*abramis brama*), common carp (*cyprinus carpio*) and sabre carp (*pelecus cultratus*). Brain behav evol 35:195-211.
17. Brandstätter R, Kotrschal K. 1989. Life history of roach, *rutilus rutilus* (cyprinidae, teleostei). a qualitative and quantitative study on the development of sensory brain areas. Brain behav. evol 34:35-42.
18. Brümmendorf T, Rathjen F. 1995. Cell adhesion molecules 1: immunoglobulin superfamily. Protein profile 2:963-1108.
19. Byrd CA, Brunjes PC. 2001. Neurogenesis in the olfactory bulb of adult zebrafish. Neuroscience 105:793-801.
20. Bullock TH, Northcutt RG, Bodznick DA. 1982. Evolution of electroreception. Trends in Neurosciences 5:50-53
21. Burgess JW, Coss R. G. 1980. Crowded jewel fish show changes in dendritic spine density and spine morphology. Neurosci. Lett 17:277-281
22. Cameron DA. 2000. Cellular proliferation and neurogenesis in the injured retina of adult zebrafish. Visual neuroscience 17:789-797.
23. Caprio J, Brand JG, Teeter JH, Valentincic T, Kalinoski DL, Kohbara J, Kumazawa T, Wegert S. 1993. The taste system of the channel catfish: from biophysics to behavior. Trends neurosci 16:192-197.
24. Chuong C, Edelman G. 1984. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of different regions of the nervous system. J. neurosci. 4:2354-2368.
25. Cole G, Loewy A, Cross N, Akeson R, Glaser L. 1986. Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule n-cam. J cell biol 103:1739-1744.
26. Coss R, Globus A. 1978. Spine stems on tectal interneurons in jewel fish are shortened by social stimulation. Science 200:787 -790
27. Coss Richard G., Globus A. 1979. Social experience affects the development of dendritic spines and branches on tectal interneurons in the jewel fish. Dev. Psychobiol. 12:347-358
28. Crossin KL, Krushel LA. 2000. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. Dev. dyn. 218:260-279.

29. Cuadrado MI. 1989. A quantitative study of the torus semicircularis of *Barbus meridionalis* Risso. *J Hirnforsch* 30:371-374
30. Cuadrado MI. 1987. The cytoarchitecture of the torus semicircularis in the teleost *Barbus meridionalis*. *J. Morphol.* 191:233-245
31. Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM. 1987. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative rna splicing. *Science* 236:799-806.
32. Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelse C, Holtas S, van Roon-Mom WMC, Bjork-Eriksson T, Nordborg C, Frisen J, Dragunow M, Faull RLM, Eriksson PS. 2007. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science* 315:1243-1249.
33. Dehal P, Boore JL. 2005. Two rounds of whole genome duplication in the ancestral vertebrate. *Plos biol* 3:e314.
34. Demski LS, Evan AP, Saland LC. 1975. The structure of the inferior lobe of the teleost hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 161:483-497
35. Ekström P, Johnsson CM, Ohlin LM. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. comp. neurol* 436:92-110.
36. Eldredge N, Stanley S. 1984. *Living fossils* Springer-Verlag. New York.
37. Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. 1998. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat. med* 4:1313-1317.
38. Echter SM. 1984. Connections of the auditory midbrain in a teleost fish, *Cyprinus carpio*. *J. Comp. Neurol* 230:536-551
39. Evans HE. 1952. The correlation of brain pattern and feeding habits in four species of cyprinid fishes. *J. comp. neurol* 97:133-142.
40. Evans H. 1940. *Brain and body of fish; a study of brain pattern in relation to hunting and feeding in fish.*
41. Fay FR, Hillery CM, Bolan K. 1982. Representation of sound pressure and particle motion information in the midbrain of the goldfish. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 71:181-191
42. Finger TE, Morita Y. 1985. Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science* 227:776-778.

43. Finger TE, Tong S. 1984. Central organization of eighth nerve and mechanosensory lateral line systems in the brainstem of ictalurid catfish. *J. comp. neurol.* 229:129-151.
44. Finger T. 1983. Organization of the teleost cerebellum. In: *Fish Neurobiology. 1. Brainstem and sense organs.*
45. Frosch M, G6rger I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D. 1985. Nzb mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an igg antibody to the polysaccharide capsules of escherichia coli k1 and group b meningococci. *Proc. natl. acad. sci. u.s.a* 82:1194-1198.
46. Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2007. Polysialic acid-neural cell adhesion molecule in brain plasticity: from synapses to integration of new neurons. *Brain res rev* 56:101-118.
47. Goldman-Rakic PS. 1980. Morphological consequences of prenatal injury to the primate brain. *Prog. brain res* 53:1-19.
48. Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Developmental biology* 295:263-277.
49. Hayama T, Caprio J. 1989. Lobule structure and somatotopic organization of the medullary facial lobe in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Comp. Neurol.* 285:9-17
50. Hinsby A, Berezin V, Bock E. 2004. Molecular mechanisms of ncam function. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 9:2227-2244.
51. Hinsch K, Zupanc G. 2007. Generation and long-term persistence of new neurons in the adult zebrafish brain: a quantitative analysis. *Neuroscience* 146:679-696.
52. Holland PW, Garcia-Fernàndez J, Williams NA, Sidow A. 1994. Gene duplications and the origins of vertebrate development. *Dev. suppl:*125-133.
53. Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N, Ito H. 1999. Different brain morphologies from different genotypes in a single teleost species, the medaka (*oryzias latipes*). *Brain behav. evol* 53:2-9.
54. Ito H, Kishida R. 1978. Afferent and efferent fiber connections of the carp torus longitudinalis. *J. Comp. Neurol* 181:465-475
55. Ito H, Yoshimoto M. 1990. Cytoarchitecture and fiber connections of the nucleus lateralis valvulae in the carp (*cyprinus carpio*). *J. comp. neurol* 298:385-399.
56. Ito H, Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N. 2007. Diversity of brain morphology in teleosts: brain and ecological niche. *Brain behav. evol* 69:76-86.

57. Johns PR, Easter SS. 1977. Growth of the adult goldfish eye. ii. increase in retinal cell number. *J. comp. neurol* 176:331-341.
58. Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. trans. r. soc. lond., b, biol. sci* 363:101-122.
59. Kihlslinger R, Nevitt G. 2003. The early rearing environment produces variation in the size of brain subdivisions in steelhead trout (*oncorhynchus mykiss*). *Integr. comp. biol* 43.
60. Kirsche W. 1965. Regenerative processes in the brain and spinal cord. *Ergeb anat entwicklungsgesch* 38:143-194.
61. Kishida R. 1979. Comparative study on the teleostean optic tectum. lamination and cytoarchitecture. *J hirnforsch* 20:57-67.
62. Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. 2001. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain res. brain res. rev* 36:175-184.
63. Kiss J, Rougon G. 1997. Cell biology of polysialic acid. *Current opinion in neurobiology* 7:640-646.
64. Kotrschal K, Palzenberger M. 1992. Neuroecology of cyprinids: comparative, quantitative histology reveals diverse brain patterns. *Environ biol fish* 33:135-152.
65. Lema SC, Hodges MJ, Marchetti MP, Nevitt GA. 2005. Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comp. biochem. physiol., part a mol. integr. physiol* 141:327-335.
66. Leonard RB, Coggeshall RE, Willis WD. 1978. A documentation of an age related increase in neuronal and axonal numbers in the stingray, *dasyatis sabina*, leseuer. *J. comp. neurol.* 179:13-21.
67. Leyhausen C, Kirschbaum F, Szabo T, Erdelen M. 1987. Differential growth in the brain of the weakly electric fish, *apteronotus leptorhynchus* (gymnotiformes), during ontogenesis. *Brain behav. evol* 30:230-248.
68. Liedtke S, Geyer H, Wuhler M, Geyer R, Frank G, Gerardy-Schahn R, Zähringer U, Schachner M. 2001. Characterization of n-glycans from mouse brain neural cell adhesion molecule. *Glycobiology* 11:373 -384.
69. Lundin LG. 1993. Evolution of the vertebrate genome as reflected in paralogous chromosomal regions in man and the house mouse. *Genomics* 16:1-19.
70. Luskin MB. 1993. Restricted proliferation and migration of postnatally generated neurons derived from the forebrain subventricular zone. *Neuron* 11:173-189.
71. Marchetti M, Nevitt GA. 2003. Effects of hatchery rearing on brain structures of rainbow trout, *oncorhynchus mykiss*. *Environmental biology of fishes* 66:9-14.

72. Marcus RC, Delaney CL, Easter SS. 1999. Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*danio rerio*). *off. Vis. neurosci* 16:417-424.
73. McCormick CA. 1982. The organization of the octavolateralis area in actinopterygian fishes: a new interpretation. *J. morphol.* 171:159-181.
74. Meek J. 1992. Why run parallel fibers parallel? Teleostean Purkinje cells as possible coincidence detectors, in a timing device subserving spatial coding of temporal differences. *Neuroscience* 48:249-283
75. Meek J, Nieuwenhuys R. 1991. Palisade pattern of mormyrid Purkinje cells: a correlated light and electron microscopic study. *J. Comp. Neurol* 306:156-192
76. Meek J. 1990. Tectal morphology: connections, neurons and synapses. In: Douglas, R, Djamgoz, M, editors. *The visual system of fish*. London: Chapman and Hall. p. 239-277.
77. Meyer RL, Sakurai K, Schauwecker E. 1985. Topography of regenerating optic fibers in goldfish traced with local wheat germ injections into retina: evidence for discontinuous microtopography in the retinotectal projection. *J. comp. neurol* 239:27-43.
78. Miller A, Harley J. 2001. *Zoology*. chapter 18: the fishes: vertebrate success in water 8th ed. McGraw-Hill College.
79. Mueller T, Wullimann MF. 2002. Brdu-, neurod (nrd)- and hu-studies reveal unusual non-ventricular neurogenesis in the postembryonic zebrafish forebrain. *Mech. dev* 117:123-135.
80. Murakami T, Morita Y. 1987. Morphology and distribution of the projection neurons in the cerebellum in a teleost, *Sebastiscus marmoratus*. *J. Comp. Neurol* 256:607-623
81. Nakatani Y, Takeda H, Kohara Y, Morishita S. 2007. Reconstruction of the vertebrate ancestral genome reveals dynamic genome reorganization in early vertebrates. *Genome res* 17:1254-1265.
82. Nelson J. 1994. *Fishes of the world*. New York: Wiley.
83. Nelson RW, Bates PA, Rutishauser U. 1995. Protein determinants for specific polysialylation of the neural cell adhesion molecule. *J. biol. chem* 270:17171-17179.
84. Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C. 1998. *The central nervous system of vertebrates*. Springer.
85. Nieuwenhuys R. 1967. Comparative anatomy of the cerebellum. In: *The cerebellum*. Elsevier. Vol. Volume 25, p. 1-93.
86. Ohno S. 1970. *Evolution by gene duplication*. Heidelberg: Springer-Verlag.

87. Ono K, Tomasiewicz H, Magnuson T, Rutishauser U. 1994. N-cam mutation inhibits tangential neuronal migration and is phenocopied by enzymatic removal of polysialic acid. *Neron* 13:595-609.
88. Otto SP. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131:452-462.
89. Panopoulou G, Poustka AJ. 2005. Timing and mechanism of ancient vertebrate genome duplications -- the adventure of a hypothesis. *Trends genet* 21:559-567.
90. Peters RC, Loos WJG, Gerritsen A. 1974. Distribution of electroreceptors, bioelectric field patterns, and skin resistance in the catfish, *ictalurus nebulosus* les. *J. comp. physiol.* 92:11-22.
91. Petridis AK, El-Maarouf A, Rutishauser U. 2004. Polysialic acid regulates cell contact-dependent neuronal differentiation of progenitor cells from the subventricular zone. *Dev. dyn* 230:675-684.
92. Popper AN, Fay RR. 1993. Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain behav. evol* 41:14-38.
93. Pouwels E. 1978. On the development of the cerebellum of trout, *Onchorincus mykiss*. *Anat Embryol* 153:55-65
94. Putnam NH, Butts T, Ferrier DEK, Furlong RF, Hellsten U, Kawashima T, Robinson-Rechavi M, Shoguchi E, Terry A, Yu J, Benito-Gutierrez E, Dubchak I, Garcia-Fernandez J, Gibson-Brown JJ, Grigoriev IV, Horton AC, de Jong PJ, Jurka J, Kapitonov VV, Kohara Y, Kuroki Y, Lindquist E, Lucas S, Osoegawa K, Pennacchio LA, Salamov AA, Satou Y, Sauka-Spengler T, Schmutz J, Shin-I T, Toyoda A, Bronner-Fraser M, Fujiyama A, Holland LZ, Holland PWH, Satoh N, Rokhsar DS. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. *Nature* 453:1064-1071.
95. Ravi V, Venkatesh B. 2008. Rapidly evolving fish genomes and teleost diversity. *Curr opin gen dev* 18:544-550.
96. Raymond P, Easter S. 1983. Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. i. location of germinal cells and numbers of neurons produced. *The journal of neuroscience* 3:1077 -1091.
97. Rieger S, Volkmann K, Köster RW. 2008. Polysialyltransferase expression is linked to neuronal migration in the developing and adult zebrafish. *Dev. dyn.* 237:276-285.
98. Rome L, Swank D, Corda D. 1993. How fish power swimming. *Science* 261:340-343.
99. Romer A. 1959. *The vertebrate story*. Chicago: IL: Univ Chicago Press.
100. Rousselot P, Lois C, Alvarez-Buylla A. 1995. Embryonic (psa) n-cam reveals chains of migrating neuroblasts between the lateral ventricle and the olfactory bulb of adult mice. *J. comp. neurol.* 351:51-61.

101. Rutishauser U, Hoffman S, Edelman GM. 1982. Binding properties of a cell adhesion molecule from neural tissue. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 79:685 -689.
102. Rutishauser U, Thiery JP, Brackenbury R, Sela BA, Edelman GM. 1976. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 73:577 -581.
103. Rutishauser U, Landmesser L. 1996. Polysialic acid in the vertebrate nervous system: a promoter of plasticity in cell-cell interactions. *Trends in neurosciences* 19:422-427.
104. Rutishauser U. 1984. Developmental biology of a neural cell adhesion molecule. *Nature* 310:549-554.
105. Rutishauser U. 1998. Polysialic acid at the cell surface: biophysics in service of cell interactions and tissue plasticity. *J. cell. biochem.* 70:304-312.
106. Sakamoto N, Ito H. 1982. Fiber connections of the corpus glomerulosum in a teleost, *Navodon modestus*. *J. Comp. Neurol.* 205:291-298
107. Sato M. Primary report on the barbels of a goatfish, *upeneoides bensasi* (t. & s.). *Sci rep tohoku imp univ biol* 11.
108. Sato M. 297. Further studies on the barbels of a goatfish, *upeneoides bensasi*, (t. & s.). *Sci rep tohoku imp univ biol* 11.
109. Sato M. 1937. On the barbels of a japanese sea catfish, *plotosus anguillaris* (lacepede). *Sci. rep. tohoku imp. univ. biol.* 11:323-332.
110. Sato Y, Nishida M. 2010. Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environ biol fish* 88:169-188.
111. Sorensen PW, Hara TJ, Stacey NE. 1991. Sex pheromones selectively stimulate the medial olfactory tracts of male goldfish. *Brain research* 558:343-347.
112. Springer AD, Gaffney JS. 1981. retinal projection in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J comp Neurol* 203: 401-424.
113. Straznicky K, Gaze RM. 1971. The growth of the retina in *xenopus laevis*: an autoradiographic study. *J embryol exp morphol* 26:67-79.
114. Stuermer CA, Bastmeyer M, Bähr M, Strobel G, Paschke K. 1992. Trying to understand axonal regeneration in the cns of fish. *J. neurobiol* 23:537-550.
115. Treer T, Safner R, Aničić I, Lovrinov M. 1995. *Ribarstvo*. Zagreb: Nakladni zavod Globus.
116. Uchihashi K. 1953. Ecological study of the japanese teleosts in relation to the brain morphology. *Bull japan sea regional fisheries res lab* 2:1-166.

117. Viljetić B, Krajina V, Đikić D, Mojsović A, Pavić V, Večeslav Degmečić I, Radaković J, Bogut I, Heffer-Lauc M. 2009. Komparativne razlike u anatomskoj građi mozga slatkovodnih riba. Zbornik radova 3. savjetovanja o slatkovodnom ribarstvu republike hrvatske s međunarodnim sudjelovanjem:71-85.
118. Vitry S, Avellana-Adalid V, Lachapelle F, Evercooren AB. 2001. Migration and multipotentiality of *psa-ncam*⁺ neural precursors transplanted in the developing brain. *Mol. cell. neurosci* 17:983-1000.
119. Voneida TJ, Fish SE. 1984. Central nervous system changes related to the reduction of visual input in a naturally blind fish (*astyanax hubbsi*). *American zoologist* 24:775 -782.
120. Wallace MT, Meredith MA, Stein BE. 1998. Multisensory Integration in the Superior Colliculus of the Alert Cat. *Journal of Neurophysiology* 80:1006 -1010
121. Williams D, Gannon-Murakami L, Rougon G, Udin S. 1996. Polysialylated neural cell adhesion molecule and plasticity of ipsilateral connections in *xenopus* tectum. *Neuroscience* 70:277-285.
122. Williams RW. 2000. Mapping genes that modulate mouse brain development: a quantitative genetic approach. *Results probl cell differ* 30:21-49.
123. Wullimann MF, Meyer DL. 1990. Phylogeny of putative cholinergic visual pathways through the pretectum to the hypothalamus in teleost fish. *Brain Behav. Evol* 36:14-29
124. Wullimann MF, Northcutt RG. 1988. Connections of the corpus cerebelli in the green sunfish and the common goldfish: a comparison of perciform and cypriniform teleosts. *Brain behav. evol* 32:293-316.
125. Zikopoulos B, Kentouri M, Dermon C. 2000. Proliferation zones in the adult brain of a sequential hermaphrodite teleost species (*Sparus aurata*). *Brain behav evol* 56:310-322.
126. Zupanc GK. 2001a. A comparative approach towards the understanding of adult neurogenesis. *Brain behav. evol* 58:246-249.
127. Zupanc GK. 2001b. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain behav. evol* 58:250-275.
128. Zupanc GKH. 2006. Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult fish brain. *J. comp. physiol. a neuroethol. sens. neural. behav. physiol* 192:649-670.
129. Zupanc G, Hinsh K, Gage F. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. comp. neurol* 488:290-319.
130. Zupanc GKH, Horschke I. 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: a quantitative mapping study. *J. comp. neurol.* 353:213-233.
131. Zupanc GK, Clint SC. 2003. Potential role of radial glia in adult neurogenesis of teleost fish. *Glia* 43:77-86.

132. Zupanc GK, Horschke I, Ott R, Rascher GB. 1996. Postembryonic development of the cerebellum in gymnotiform fish. *J. comp. neurol.* 370:443-464.
133. Zupanc GKH, Ott R. 1999. Cell proliferation after lesions in the cerebellum of adult teleost fish: time course, origin, and type of new cells produced. *Experimental neurology* 160:78-87.
134. Zupanc GK. 2008. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *Journal of physiology-paris* 102:357-373.

Prilog 1. Tablice sa sažetim prikazima imunohistokemije na protutijela anti-PSA-NCAM, 735 i NeuN

+ - slabo, ++ - umjereno, +++ - jako, ? – nespecifično bojanje, * - dominantnost

	Grgeč			Pastrva			Štuka			Šaran			Som			Kečiga		
	735	PSA-NCAM	NeuN	735	PSA-NCAM	NeuN	735	PSA-NCAM	NeuN	735	PSA-NCAM	NeuN	735	PSA-NCAM	NeuN	735	PSA-NCAM	NeuN
Prednji mozak	+	++	+	++	+++	++	++	+++	++	+	+++	+	+++	+++	+	+++	+++	Nema reza
<i>Lobus inferior hypothalami</i>	+	+++	+	+	++	+++	++	+++	++	+	+++	++	+	++	++	+++	+++	++
Vidni tektum																		
sm	+	+++	-	++	+++*	-	+++	+++*	-	+++	+++	-	+	+++	-	+++	+++	++
so	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++	+++	-	+	+++	-	+++	+++	++
sfgc	+	+++	-	++	++	+	+++	+++	-	++	++	-	++	+++	+	+++	+++	++
sgc-ip	+	+++	-	++	++	+	+++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+			
sgc	+	+++	-	+++	++	+	+++	+++	-	++	+++	+	++	+++	+	+++	+++	++
sac	+	++	+	-	-	+	++	++	-	++	++	+++	+	+++	+	+++	+++	++
spv	+	+++	+	+	+	+++	+++	+++	+	++	+++	-	++	++	++	+++	+++	+++
<i>Torus longitudinalis</i>	-	+++	+	+	++	+++	++	++	?									
<i>Torus semicircularis</i>										+	+++	+	+	+++	++			
<i>Valvula cerebelli</i>																		
<i>mol</i>	+	+++	-	+	+	+	++	+	-	++	++	+	++	++	+	+	++	+
<i>ggl</i>	++	+++	-	++	++	-	+++	++	-	++	++	-	++	+++	-			
<i>grl</i>	++	+++	+	++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	++	+++
<i>Corpus cerebelli</i>																		
<i>mol</i>	+	+++	?	+	++	+	+	++	?	+	++	+	++	++	+	++	+	+
<i>ggl</i>	++	++	-	++	+++	-	++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	-			
<i>grl</i>	++	+++	+	++	+++	+++	++	+++	+	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	+++
<i>Crista cerebelli</i>	++	+++	-	++	++	+	+	++	?	+	+++	+	+	++	++	++	++	+
<i>Lobus VII</i>										+	++	+++	+++	+++	+			
<i>Lobus IX</i>										-	+++	-						
<i>Lobus X</i>										+	+++	++				+++	+++	++
<i>ell</i>													+	+++	-			
<i>mll</i>													+	+++	-			
<i>Tegmentum rhombencephali</i>	-	-	+	-	-	++	+	+++	++	++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	++

Irena Labak rođena je 21. 9.1979. u Đakovu. Nakon završenog osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja upisala je Pedagoški fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Na istom je diplomirala 2002. godine i stekla zvanje profesora biologije i kemije. Godine 2007. magistrirala je na Poslijediplomskom sveučilišnom interdisciplinarnom znanstvenom studiju Zaštita prirode i okoliša Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, na temu „Epifitski lišajevi Parka prirode Papuk“.

Od akad. god. 2002./2003. radi na Zavodu za biologiju Pedagoškog fakulteta u Osijeku Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera kao vanjski stručni suradnik na kolegiju Praktikum iz eksperimentalne nastave biologije, a akad. god. 2004./2005. i na kolegiju Seminar iz metodike nastave biologije.

Tijekom školske godine 2005./2006. na Učiteljskom fakultetu u Osijeku radi kao vanjski stručni suradnik na vježbama iz kolegija Metodika prirode i društva i na vježbama iz kolegija Prirodoslovlje.

Od svibnja 2006. radi na Odjelu za biologiju u Osijeku kao asistent na kolegiju Praktikum iz eksperimentalne nastave biologije i Seminar metodike nastave biologije i Metodičke vježbe iz biologije.

Od ak.godine 2008./2009. nastavna djelatnost uključuje kolegije Metodika nastave biologije, Praktikum iz metodike nastave biologije, Metodičke vježbe iz biologije, a od 2009/2010. i vježbe iz Zoogeografije.

Studentima Odjela za biologiju pomagala je u izradi diplomskih radova temom vezanih za kolegij Metodika nastave biologije.

Od 2003. godine provođenjem pedagoških radionica pomaže u edukaciji vodiča za vođenje nastavnih ekskurzija u Kopačkom ritu. Sudjelovala je u izradi prvih odgojno-obrazovnih programa "Odgojno obrazovni programi u Kopačkom ritu" za učenike osnovnih škola. Prošla je edukaciju projekta "*Čitanje i pisanje za kritičko mišljenje*" Foruma za slobodu odgoja 2003. godine. U svrhu stručnog usavršavanja sudjelovala je na brojnim stručnim skupovima za nastavnike biologije a i u nekim pedagoškim radionicama sudjelovala je i kao voditelj. Šk.god. 2003./2004. volontira na biologiji u prirodoslovno-matematičkoj gimnaziji u Osijeku radi polaganja stručnog ispita za zanimanje profesora biologije-kemije, kojeg je položila 10. studenog 2005.

Od akademske godine 2004./2005. aktivno sudjeluje u projektu Znanosti mladima u sklopu Festivala znanosti Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku kao organizator i voditelj studentskih radionica .

2007. sudjelovala je na malom europskom projektu voditelja prof.dr.sc. Marije Heffer *Welcome to Leonardo's World of Handiness*, kojeg dodjeljuje The Dana Foundation- Unity for knowledge, 2009. godine na malom europskom projektu *Think unthinkable* , a 2011. sudjeluje na *Knowledge seeking genes*.

Od 2008. godine na projektu je „Kompetencije učenika u nastavi prirode i biologije“ pod vodstvom izv. prof.dr.sc. Ines Radanović na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Od 2009. godine član je Hrvatskog društva za neuroznanost.

U sklopu izrade svoje doktorske disertacije boravila je mjesec dana na Department of Neurobiology, School of Medicine, Yale University, New Haven u Americi.

Autor odn. koautor je jednog znanstvenog rada objavljenog u CC časopisu. U ostalim časopisima publicirala je još četiri rada. Na kongresima aktivno je sudjelovala s ukupno sedam priopćenja.

Znanstveni radovi u CC časopisima:

LABAK,I., ŠNAJDER,D., KOSTOVIĆ-SRZENTIĆ,M., BENŠIĆ,M., NIŠT,M., ILAKOVAC,V., HEFFER-LAUC,M.

„ Usefulness of drawing and writing test with both hands in subjective and objective determination of dominant hemisphere“, Coll. Antropol. 35 (2011) Suppl. 1:65-71

Znanstveni radovi u ostalim časopisima:

LABAK, I., OZIMEC, S., DUMBOVIĆ, V., TOPIĆ, J. (2011): Contribution to the knowledge of lichens of Papuk Nature park (Slavonia, Eastern Croatia) (in press)

OZIMEC, S., BOŠKOVIĆ, I., FLORIJANČIĆ, T., JELKIĆ, D., OPAČAK, A., PUŠKADIJA, Z., **LABAK, I.**: The lichen flora of Risnjak National Park (Croatia), Acta Botanica Croatica **69** (2010) ; 19-29 (članak, znanstveni).

BARIŠIĆ, I., BORIĆ, E., KARDO, I.(2005): Učenje biologije u zoološkom vrtu, **Metodika**, br.11, Vol. 6, (2/2005).

BARIŠIĆ, I., BOGUT, I., BORIĆ, E. (2005): Education for schools at the Kopački rit Nature Park in Croatia. **Period. biol.**, 107(1), 123-127.

BORIĆ, E., **BARIŠIĆ, I.**, MUNJIZA , E. (2004): Ekološka izobrazba nastavnika o zavičaju, **Život i škola**, br. 11 (1/2004).

