

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Valentina Pavić

**Varijacije u sastavu lipidnih splavi mozga dužičaste pastrve  
(*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kao  
osnova različite prilagodbe na sezonske promjene temperature**

Doktorski rad

Osijek, 2013.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij  
Molekularne bioznanosti

Valentina Pavić

**Varijacije u sastavu lipidnih splavi mozga dužičaste pastrve  
(*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kao  
osnova različite prilagodbe na sezonske promjene temperature**

Doktorski rad

Doktorski rad predložen Sveučilišnome Vijeću za poslijediplomske interdisciplinarne doktorske studije zbog stjecanja akademskoga stupnja doktora znanosti iz znanstvenog područja prirodnih znanosti, znanstvenog polja biologija, znanstvene grane molekularna biologija i biokemija

Osijek, 2013.

Doktorski rad izrađen je u Neurobiološkom laboratoriju Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, pod vodstvom prof.dr.sc. Marije Heffer, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog interdisciplinarnog doktorskog studija Molekularne bioznanosti pri Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Instituta Ruđer Bošković, Zagreb te Sveučilišta u Dubrovniku.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Institut Ruđer Bošković, Zagreb  
Sveučilište u Dubrovniku  
Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni  
doktorski studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Prirodne znanosti  
Znanstveno polje: Biologija

Varijacije u sastavu lipidnih splavi mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kao osnova različite prilagodbe na sezonske promjene temperature

Valentina Pavić

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu, Osijek

Mentori: dr. sc. Marija Heffer, red.prof.  
dr. sc. Elizabeta Has Schön, red. prof.

Sažetak

Sposobnost prilagodbe kralježnjaka termalnim promjenama u njihovoj okolini uglavnom se temelji na adaptivnim promjenama u središnjem živčanom sustavu. Ovo istraživanje bilo je usmjereno na ulogu gangliozida kao molekula koje sudjeluju u stvaranju uredenih lipidnih domena (splavi) stanične membrane i signalnim procesima važnim za adaptaciju. Pretpostavka je bila da su promjene sastava i količine gangliozida specifične za određene regije mozga koje imaju veze sa sezonskim promjenama ponašanja kao posljedicom promjena u načinu prijenosa signala. Istraživanje ukazuje na specifične razlike u sastavu glikosfingolipida mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*). Opisane promjene praćene su tijekom ekstremnih uvjeta od zimskog do ljetnog razdoblja u prirodnim uvjetima okoliša. Tijekom hladne aklimatizacije uočeno je povećanje polisijaliliranih frakcija gangliozida u mozgu o. šarana, dok je u mozgu d. pastrve uočen rast trisijalogangliozida. Obje vrste pokazuju smanjenje monosijalogangliozida i nastajanje više sijaliliranih struktura zimi, a uočene promjene prisutne su u znatnoj većem razmjeru u mozgu d. pastrve nego o. šarana. U mozgu d. pastrve uočene su veće količine struktura podložnih alkalijskoj razgradnji zimi, dok kod o. šarana promjene ove vrste nisu značajne. Također postoji pomak u biosintetskom putu gangliozida od *a*- prema *b*- seriji. O. šaran kao euritermna vrsta pokazuje manje promjene sastava i distribucije gangliozida od stenotermne vrste d. pastrve. To je u skladu s činjenicom da i sisavci kao dobro prilagođene vrste imaju uniforman sastav i raspodjelu gangliozida tijekom odraslog razdoblja života. Imunohistokemijska lokalizacija gangliozida otkriva različitu distribuciju i specifični sastav gangliozida u pojedinim regijama mozga, što ukazuje na njihove specifične funkcije u tim regijama. Dobiveni rezultati prilog su objašnjenju različite sposobnosti prilagodbe na sezonske promjene temperature kod d. pastrve i o. šarana te ukazuju na važnost metabolizma gangliozida u ovom procesu.

Broj stranica: 152

Broj slika: 61

Broj tablica: 9

Broj literaturnih navoda: 215

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: glikosfingolipidi, signalne domene, mozak, dužičasta pastrva, obični šaran, temperaturne prilagodbe

Datum obrane: 12.srpnja 2013.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. prof.dr.sc. Jerko Barbić, izvanredni profesor Medicinskog fakulteta u Osijeku, predsjednik;
2. prof.dr.sc. Marija Heffer, redovita profesorica na Medicinskom fakultetu u Osijeku, mentorica 1 i član;
3. prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön, redovita profesorica Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku-Odjela za biologiju, mentorica 2 i član;
4. prof.dr.sc. Ivan Bogut, redoviti profesor Poljoprivrednog fakulteta u Osijeku, član
5. prof.dr.sc. Svjetlana Kalanj Bognar, izvanredna profesorica Medicinskog fakulteta u Zagrebu-Hrvatskog instituta za istraživanje mozga, član

Rad je pohranjen u:

Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek;  
Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer Osijek  
Institute Ruder Bošković, Zagreb  
University of Dubrovnik  
University Postgraduate Interdisciplinary  
Doctoral Study Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural sciences  
Scientific Field: Biology

Variations in the brain lipid rafts composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and common carp (*Cyprinus carpio*) as a basis of different adaptations to seasonal temperature changes

*Valentina Pavić*

Thesis performed at Faculty of Medicine, Osijek

Supervisors: *Marija Heffer, PhD, professor*  
*Elizabeta Has Schön, PhD, professor*

### Abstract

The ability of vertebrates to adapt to thermal fluctuations in their environment is mainly based upon adaptive changes within the central nervous system. This investigation focused on gangliosides as molecules that participate in the formation of membrane lipid domains (rafts) and in signal processes crucial for adaptation. We assumed that the composition and quantity changes of gangliosides are specific to particular brain regions that are related with behavior seasonal changes as a result of changed signal transmission. Described changes were observed under seasonal temperature fluctuations in their natural ecosystem. During the cold acclimatization increase of polysialylated ganglioside fractions was observed in common carp, while rainbow trout showed increase of trisialogangliosides. Both species showed decrease of monosialogangliosides, and formation of higher sialylated glycosphingolipid structures in winter and the observed changes were present in significantly larger proportion in the rainbow trout brain than common carp brain. Rainbow trout brain showed higher amounts of alkali labile gangliosides in winter, while in common carp brain no significant changes were observed. We also detected a shift of biosynthetic pathways from *a*- to *b*-pathway. Common carp as eurythermic fish shows less change in the composition and distribution of gangliosides than stenothermic rainbow trout. This is consistent with the fact that mammals that are well adapted species have quite uniform ganglioside composition and distribution during the adult life. Immunohistochemical localization of gangliosides revealed different distribution and specific composition of gangliosides in particular regions, what suggests that they have important and specific functions in these regions. These results contribute to the explanation of different ability to adapt to seasonal temperature changes in rainbow trout and common carp, and emphasize the importance of ganglioside metabolism in this process.

Number of pages: 152

Number of figures: 61

Number of tables: 9

Number of references: 215

Original in: Croatian

Key words: glycosphingolipids, signal rafts, brain, rainbow trout, common carp, temperature adaptations

Date of the thesis defense: 12th July 2013.

### Reviewers:

1. Ph. D. Jerko Barbić, Associate Professor at Faculty of Medicine, Osijek
2. Ph. D. Marija Heffer, Full Professor at Faculty of Medicine, Osijek
3. Ph. D. Elizabeta Has-Schön Full Professor at Josip Juraj Strossmayer University in Osijek- The Department of Biology
4. Ph. D. Ivan Bogut, Full Professor at Faculty of Agriculture in Osijek
5. Ph. D. Svjetlana Kalanj Bognar, Associate Professor at Faculty of Medicine, Zagreb- Croatian Institute for Brain Research

### Thesis deposited in:

National and University Library, Hrvatske bratske zajednice bb, Zagreb  
University Josip Juraj Strossmayer Osijek, Trg Sv. Trojstva 3, Osijek

## PREDGOVOR

---

Posebnu zahvalnost upućujem svojim mentoricama prof. dr. sc. Mariji Heffer, pročelnici Katedre za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku, na potpori i vođenju kroz znanstveni rad kao i upoznavanju sa zanimljivim područjem – neuroznanosti te prof.dr.sc. Elizabeti Has Schön na potpori, ohrabrirvanju i vođenju kroz znanstveni rad tijekom istraživanja.

Želim iskreno zahvaliti prof. dr. sc. Ivanu Bogutu za podršku i razumijevanje tijekom istraživanja.

Želim iskreno zahvaliti i odati priznanje Petru Odvorčiću i njegovoj obitelji na svesrdnoj i bezuvjetnoj podršci te za osiguravanju višemjesečnog izlova dužičaste pastreve u privatnom ribnjaku „Valis Aurea“ (Turnić, Požega) u vlasništvu obitelji Odvorčić tijekom istraživanja.

Želim iskreno zahvaliti Jasni Radaković i radnicima ribnjaka „Grudnjak“ (Orahovica) za osiguravanje višemjesečnog izlova običnog šarana tijekom istraživanja i na velikoj pomoći.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Jerku Barbiću, na zanimanju i pažljivome čitanju doktorskog rada.

Zahvalnost upućujem i prof. dr. sc. Veri Cesar, na korisnim savjetima i primjedbama.

Zahvaljujem doc.dr.sc. Milanu Čačiću na svesrdnoj pomoći i ustupanju materijala za izradu znanstvenog rada.

Zahvaljujem Tomislavu Baliću na potpori i nesebičnoj pomoći oko potrebnih materijala.

Zahvaljujem Neurobiološkom laboratoriju Medicinskog fakulteta u Osijeku, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku što su mi omogućili financijsku pomoć i sredstva pri izvođenju ovoga istraživanja.

Hvala svim kolegicama i kolegama te poslovnim suradnicima na Medicinskom fakultetu u Osijeku i Odjelu za biologiju u Osijeku na njihovoj pomoći, potpori i zanimanju.

Na kraju, posebne zahvale mojoj obitelji, čije mi je razumijevanje i ohrabrirvanje omogućilo da završim doktorski rad.

ARSA – arilsulfataza

$\beta$ -gal –  $\beta$ -galaktozidaza

*bol* – *bulbus olfactorius*

*cbl* – *cerebellum*

Cer – ceramid

*cocb* – *corpus cerebelli*

*crcb* – *crista cerebelli*

CST – cerebrozid-sulfottransferaza (sulfatid-sintaza)

CV - koeficijent varijacije

*dien* – *diencephalon*

*GALC* – galaktozilceramidaza

*GalNAc-T* – *N*-acetilgalaktozaminiltransferaza I (GA2/GM2/GD2/GT2-sintaza)

*GalT-I* – galaktoziltransferaza I (laktozilceramid-sintaza)

*GalT-II* – galaktoziltransferaza II (GA1/GM1/GD1b/GT1c-sintaza)

*GalT-III* – galaktoziltransferaza III (galaktozilceramid-sintaza)

*ggl* – *stratum ganglionare*

*GLCC* – glukozilceramidaza

*GlcT* – glikoziltransferaza (glikozilceramid-sintaza)

*GM2A* – GM2 aktivator protein

*grl* – *stratum granulare*

*HEX* –  $\beta$ -*N*-acetilheksozaminidaza

HPTLC- tankoslojna kromatografija visoke razlučivosti (engl. *high performance thin layer chromatography*)

*lat.val.* – lateralna valvula

*lccb* – *lobus caudalis cerebelli*

*lih* – *lobus inferior hypothalami*

*lob VII* – *lobus vagus*

*lob IX* – *lobus glossopharyngeus*

*lob X* – *lobus facialis*

*med.val.* – medijalna valvula

*mol* – *stratum moleculare*

PBS – fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer saline*)

PUFA – višestrukonezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*)

Rf vrijednost- retencijski faktor, omjer udaljenosti putovanja od starta do centra detektirane mrlje i udaljenosti koju je istovremeno prešlo otapalo pri tankoslojnoj kromatografiji

*rhom* – *rhombencephalon*

SA – sijalinska kiselina (engl. *sialic acid*)

SAP – saposin A, B i C (kofaktori lizosomalnih enzima za hidrolizu sfingolipida)

sr.vr – srednja vrijednost

stdev – standardna devijacija

ST-I – sijaliltransferaza I (GM3-sintaza)

ST-II – sijaliltransferaza II (GD3-sintaza)

ST-III – sijaliltransferaza III (GT3-sintaza)

ST-IV – sijaliltransferaza IV (GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c-sintaza)

ST-V – sijaliltransferaza V (GD1c/GT1a/GQ1b/GP1c-sintaza)

ST-VII – sijaliltransferaza VII (GD1a/GT1a a/GQ1ba/GP1ca-sintaza)

*tol* – *tractus olfactorius*

*tect* – *tectum mesencephali*

*teg* – *tegmentum*

*tel* – *telecenphalon*

*tl* – *torus longitudinalis*

*ts* – *torus semicircularis*

*val* – *valvula cerebelli*



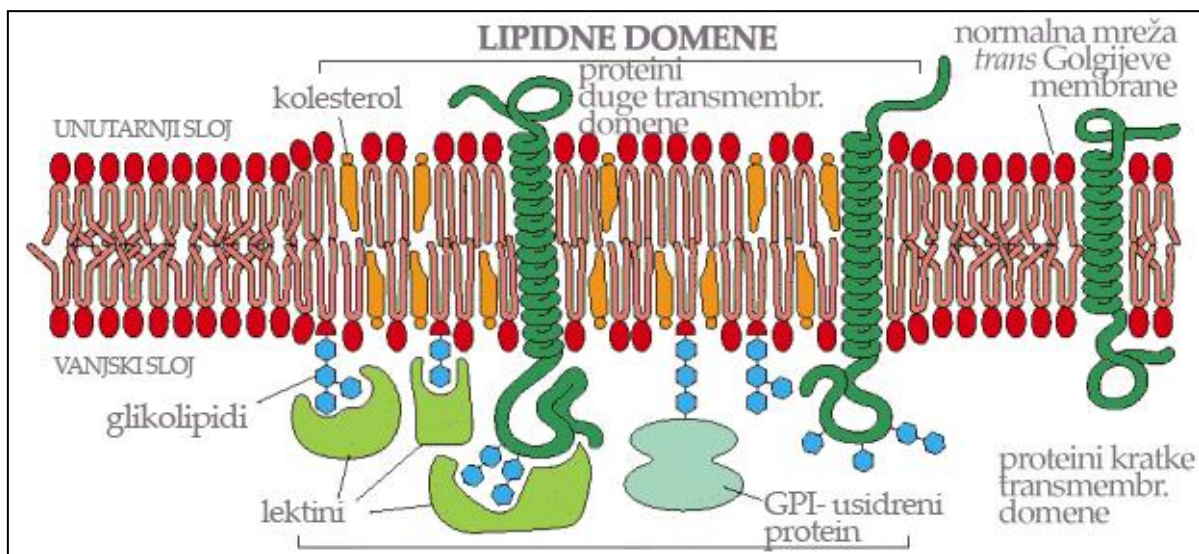
---

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Lipidne splavi .....	1
1.2. Gangliozidi .....	2
1.3. Biosinteza i razgradnja gangliozida .....	7
1.4. Modifikacije gangliozida podložne alkalijskoj razgradnji .....	10
1.5. Sistematika riba .....	11
1.6. Osobitosti građe mozga dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	12
1.7. Glikosfingolipidi mozga dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	14
1.8. Utjecaj temperature okoline na sastav gangliozida mozga riba .....	15
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA</b> .....	19
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	20
3.1. Materijal .....	20
3.2. Metode .....	20
3.2.1. Ekstrakcija gangliozida .....	20
3.2.2. Određivanje koncentracije ekstrahiranih gangliozida .....	21
3.2.3. Tankoslojna kromatografija .....	22
3.2.4. Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija (2D-TLC) .....	22
3.2.5. Imuno-tankoslojna kromatografija .....	24
3.2.6. Priprema histoloških rezova .....	26
3.2.7. Imunohistokemijske metode .....	26
<b>4. REZULTATI</b> .....	28
4.1 Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) iz podrazreda zrakoperki ( <i>Actinopterygii</i> ) .....	28

4.1.1. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) tijekom odabranih mjeseci.....	33
4.1.2. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u krajnjem mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) tijekom odabranih mjeseci .....	37
4.1.3. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u međumozgu i srednjem mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) tijekom odabranih mjeseci .....	42
4.1.4. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u stražnjem mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) tijekom odabranih mjeseci .....	53
4.2. Promjene koncentracije gangliozida u mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) od siječnja do lipnja.....	70
4.3. Promjene sastava gangliozida u mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) od siječnja do lipnja .....	71
4.4. Udio gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji u mozgu dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	76
4.5. Imunospecifičnost protutijela na gangliozide mozga dužičaste pastrve ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> ) i običnog šarana ( <i>Cyprinus carpio</i> ) .....	79
<b>5. RASPRAVA .....</b>	<b>86</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>106</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>108</b>
<b>8. SAŽETAK.....</b>	<b>123</b>
<b>9. SUMMARY.....</b>	<b>125</b>
<b>10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA.....</b>	<b>127</b>
<b>11. PRILOG</b>	

## 1.1. Lipidne splavi

Krajem osamdesetih godina otkriveno je da se dobar dio molekula stanične membrane ne nalazi u stanju stalnog dinamičkog nereda opisanog modelom 'tekućeg mozaika' (Singer i Nicolson 1972). Model je zamišljen kao diskontinuirani viskozni dvosloj fosfolipida u kojem plutaju integrirani odnosno periferni proteini. Prema modelu kojega su razvili Simons i Van Meer na membrani se formiraju organizirane splavi u kojima su molekule znatno čvršće vezane, a koje se mogu predstaviti kao privremene signalne domene odnosno splavi (Simons i Van Meer 1988). U stvaranju signalnih domena sudjeluju kolesterol, sfingomijelin i gangliozidi u vanjskom sloju membrane, a u unutrašnjem (citoplazmatskom) kolesterol i fosfolipidi poput fosfatidilinozitola, fosfatidilserina i fosfatidiletanolamina (Cebecauer i sur. 2009).



**Slika 1 .** Shematski prikaz izgleda lipidne splavi nacrtan prema predlošku [Web 1](#).

U tvorbi splavi sudjeluju i proteini s GPI sidrom: dvostruko acilirani proteini kao što su tirozin i Src kinaze,  $G\alpha$  podjedinica heterotrimernih G proteina, proteini usidreni preko miristilne ili palmitinske kiseline (poput Hedgehog proteina), neki transmembranski proteini (Simons i Eehalt 2002) te proteini koji vežu kolesterol (Slika 1).

Splavi ili domene su lateralno izdvojena područja, nastala kao rezultat selektivnih afiniteta između sfingolipida i membranskih proteina koji djeluju na odjeljivanje membranskih proteina i time odvajaju različite biokemijske funkcije (McMullen i sur. 2004). Splavi ne predstavljaju jednu monolitnu strukturu, već heterogenu zbirku domena različitih po

sastavu proteina i lipida, kao i u stabilnosti u odnosu na vrijeme (Pike 2006). Pakiranje kolesterola sa zasićenim acilnim lancima sfingolipida termodinamički je povoljnije nego s nezasićenim acilnim lancima, a kolesterol je ključan u procesu formiranja splavi. Kako sfingolipidi sadržavaju duge, uglavnom zasićene acilne lance, čvršće se pakiraju zajedno i time imaju mnogo više temperature taljenja od membranskih glicerofosfolipida. Ovo zbijeno pakiranje važno je za organizaciju lipidnih splavi jer pretpostavlja se da razlika sila pakiranja sfingolipida i kolesterola u usporedbi s glicerofosfolipidima dovodi do razdvajanja faza u membrani i nastajanja regije bogate sfingolipidima (tzv., „tekuća uređena faza“) okruženih domenama bogatim glicerofosfolipidima (tzv., „tekuća neuređena“ faza, Brown i London 2000). Ovaj poredak odgovoran je za otpornost na djelovanje deterdženata. Male splavi ponekad mogu biti stabilizirane protein-protein i protein-lipid interakcijama za oblikovanje većih platformi. Smatra se da lipidne splavi moduliraju signalne procese na nekoliko različitih načina prema sastavu pojedinih subpopulacija. Pretpostavka je da splavi omogućavaju okupljanje i modulaciju molekula koje primaju signal na vanjskoj strani stanice, kao i molekula koje pojačavaju i prenose signal na unutrašnjoj strani membrane (Rajendran i Simons 2005). Ispravno formiranje lipidnih splavi preduvjet je normalnog funkcioniranja stanice što se, na razini organizma, konačno iskazuje kao ponašanje usklađeno s podražajima koji dolaze iz okoline. Nakon otkrića lipidnih splavi (Simons i Van Meer 1988) uloga gangliozida u evolucijskoj perspektivi postala je zanimljivija nego ikad. Lipidne splavi opisane su kao prijelazne domene membrana za okupljanje molekula koje sudjeluju u primanju, prijenosu i pojačavanju dolaznih signala (Rajendran i Simons 2005), dok su glavni regulatori njihove dinamike sfingolipidi (Mitsuda i sur. 2002). Vrlo je vjerojatno da najčešće složene gangliozidne strukture posjeduju iste funkcije u splavi svih homotermnih sisavaca (Kappel i sur. 1993) jer dijele isti uzorak raspodjele.

## **1.2. Gangliozidi**

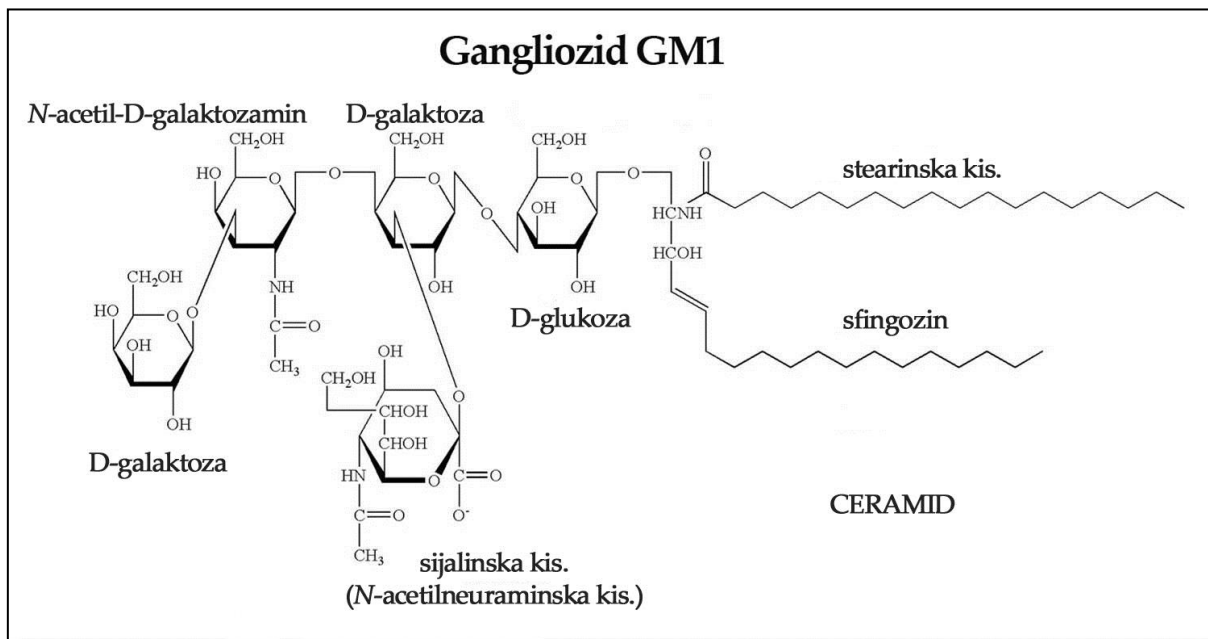
Površinama životinjskih stanica dominiraju glikani. Iako su najbrojniji glikani mnogih životinjskih tkiva glikoproteini i proteoglikani, glikolipidi dominiraju među glikanima mozga, ključne su odrednice na stanicama hematopoetskih linija, a također se nalaze u većem ili manjem opsegu i složenosti i na svim drugim tkivima (Schnaar 2004). Glikolipidi kraljeznjaka su pretežno glikosfingolipidi - glikani s ceramidnim lipidnim sidrom. Gangliozidi su potporodica glikosfingolipida, a odlikuje ih prisutnost jednog ili više ostataka sijalinske kiseline (Kolter i sur. 2002). Amfipatske su molekule sastavljene od ceramidnog lipidnog sidra i hidrofilnog ugljikohidratnog lanca promjenljive duljine i složenosti. Postoje

stotine različitih struktura gangliozida na temelju različitosti njihovih glikana, ali i lipida ceramida. Podrazredi gangliozida definirani su na temelju četiri neutralna šećera vezana na ceramid (Sonnino i sur. 2007). Gangliozidi su usidreni u vanjskom sloju stanične membrane gdje dugi zasićeni lanci ugljikovodika u ceramidnom dijelu molekule dovode do lateralne particije u lipidne splavi - mikrodomene membrana koje sadrže druge sfingolipide, kolesterol i odabrane molekule (Prinetti i sur. 2009).

Glikanski lanci gangliozida pružaju se iz stanične površine i sudjeluju u međumolekularnim interakcijama. Glikani na jednoj stanici vežu se za komplementarne glikan-vezujuće proteine (lektine) na suprotnoj stanici i posreduju u međustaničnim ili *trans* interakcijama. Posljedice ovih interakcija kreću se od međustanične adhezije do kontrole unutarstaničnih signalnih puteva. Gangliozidi su receptori u nekim od tih sustava međustaničnog prepoznavanja (Crocker i sur. 2007). Gangliozidi također sudjeluju u lateralnim interakcijama (*cis*) unutar membrana, regulirajući odgovor signalnih proteina, uključujući inzulina, epidermalnog faktora rasta i receptora faktora rasta vaskularnog endotela. Na ove načine, gangliozidi djeluju kao regulatorni elementi u imunološkom i živčanom sustavu, u regulaciji metabolizma i u napredovanju raka (Lopez i Schnaar 2009).

Iako je najveće obilje i složenost gangliozida u neuralnom tkivu, ovi lipidi prisutni su na svim stanicama sisavaca i koncentrirani u mikrodomene specijalizirane za staničnu signalizaciju (Simons i Toomre 2000). 1925. godine otkrili su ih Lister i Levene u bubregu, a 1927. godine Walz u jetri i mozgu (Svennerholm 1978). Naziv gangliozid prvi je put primijenjen od strane njemačkog znanstvenika Ernsta Klenka 1942. za novo-izolirane lipide iz ganglijskih stanica mozga djece koja su umrla od Tay-Sachove bolesti (Sihoff i Kolter 2003). Utvrđeno je da su to oligoglikozil-ceramidi izvedeni iz laktozil-ceramida koji sadrže ostatke sijalinske kiseline kao što su *N*-acetilneuraminska kiselina ('NANA' ili 'SA' ili Neu5Ac). Kao komponenta gangliozida rjeđe dolazi *N*-glikolilneuraminska kiselina (Neu5Gc) ili Neu5Ac analog u kojem je amino grupa zamjenjena OH skupinom. *O*-acetilacija ili laktonizacija ostataka sijalinske kiseline povećava kompleksnost ovih molekula. Polarne glave lipida pri pH 7,0 nose neto-negativni naboj, te imaju kisela svojstva.

Gangliozidi predstavljaju 10-12% od ukupnog sadržaja lipida (20-25% od vanjskog sloja) membrane neurona. Osim toga, javljaju se u malim količinama (1-2%) u svim životinjskim tkivima. Gangliozidi mlijeka, izvedeni iz apikalne membrane sekretornih stanica mliječnih žlijezda, od velike su važnosti za prehranu novorođenčeta, ali općenito su slabo pronađeni i kvantificirani u hrani (McJarrow i sur. 2009) te ih ne nalazimo izvan životinjskog carstva. Jedan od jednostavnih monosijalogangliozida (GM1) ilustriran je na Slici 2.



**Slika 2.** Struktura gangliozida GM1, slika preuzeta i preuređena prema predlošku [Web 2.](#)

Lipidno sidro gangliozida je ceramid, kojeg čine aminoalkohol sfiingoziin (s 18 ili 20 ugljikovih atoma) i masna kiselina. U sintezi ceramida u prvom koraku sudjeluju palmitoil-coA i serin. Najčešća masna kiselina je stearinska (C18, oko 80%), ne samo kod sisavaca već i kod drugih kralježnjaka, a ostatak čine masne kiseline s C16, C20 i C22 atoma (Palestini i sur. 1990).

Većina uobičajenog raspona gangliozida izvedeni su iz ganglio-i neolakto-serije neutralnih oligoglikosfiingolipida i trebali bi biti imenovani sustavno na isti način, s položaja sijaalinskog ostatka navedena kao kod razgranatih struktura. Međutim, uvriježeno je imenovanje kratkom nomenklaturom koju je predložio Svennerholm. Prema njoj pripadnost ganglio-seriji označava se velikim slovom G, iza kojeg slijedi broj sijaalinskih kiselina označen velikim slovom M, D, T i Q (odnose se na mono-, di-, tri-, odnosno tetrasijaalogangliozide), a broj 1, 2, 3 je broj šećernih ostataka u molekuli, koji se dobiva oduzimanjem stvarnog broja šećera u lancu molekule od broja 5, te se odnosi i na red migracije gangliozida tankoslojnom kromatografijom. Kuhn (Kuhn 1959) je kromatografskim razdvajanjem gangliozida mozga potvrdio sporije kretanje gangliozida sa znatno složenijom strukturom (npr., tako je redosljed migracije monosijaalogangliozida GM3 > GM2 > GM1).

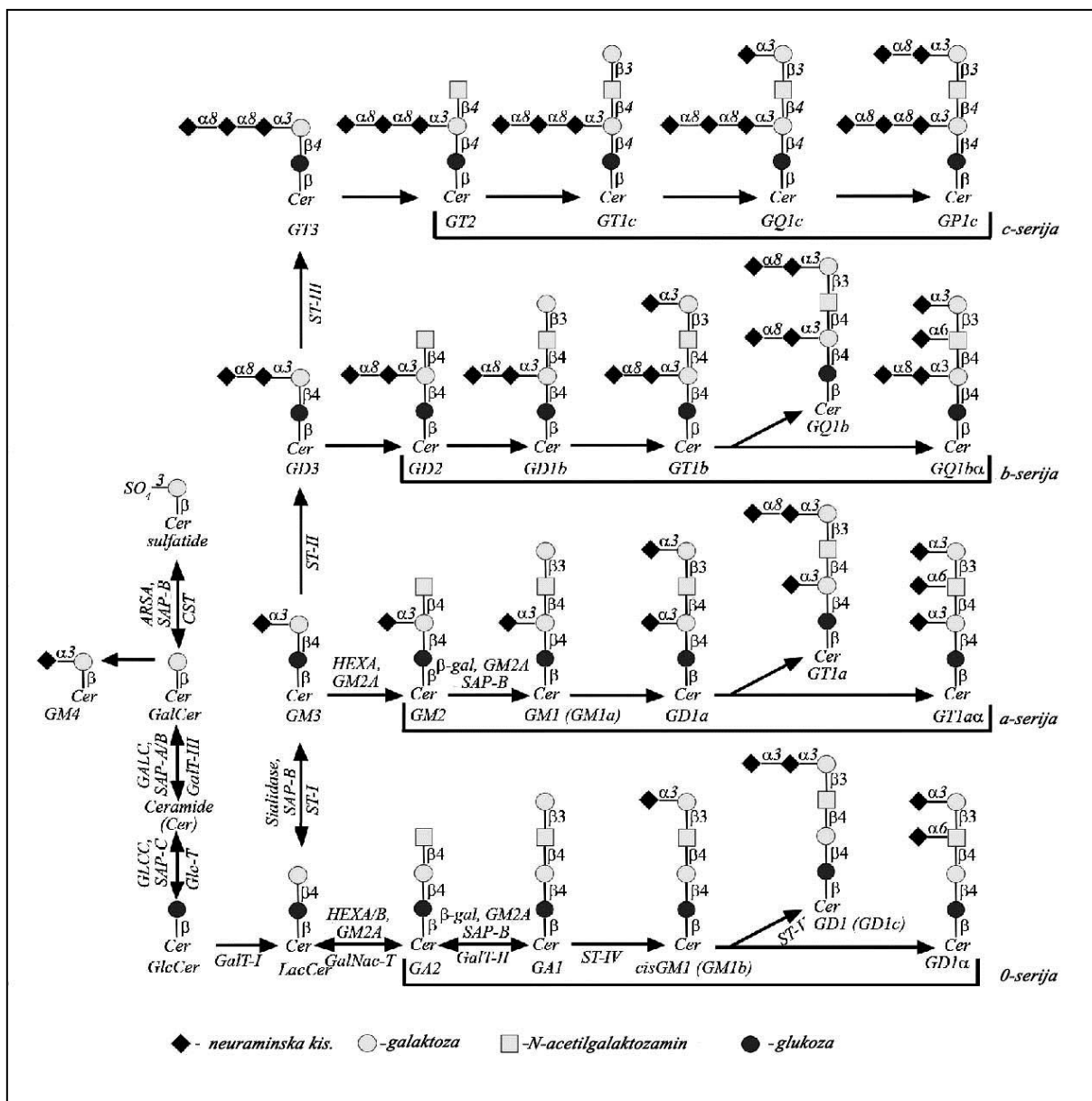
Za prikaz varijacija unutar osnovnih struktura, nadalje, dodaje se subskript koji označava broj sijaalinskih kiselina vezanih na unutrašnju galaktozu (a-jedan, b-dva, c-tri), ali i metabolički put nastanka (a, b ili c), primjerice GM1a, GD1b, itd. Kojoj će seriji pripadati

gangliozidi određuje vezanje sijalinske kiseline. Tako je 0-serija bez sijalinske kiseline na unutrašnjoj galaktozi, a-serija s jednom sijalinskom kiselinom, b-serija s dvije, c-serija s tri ili više sijalinskih kiselina (Slika 3.).

Iako je predloženo uvođenje više sistematizacije u strukturne nazive, Svennerholmova nomenklatura je najčešće korištena u literaturi. Do 2009. određeno je 188 struktura gangliozida s varijacijama ugljikohidratnih lanaca u samih kralježnjaka.

Modifikacije skupina dodaju se imenima, kao što su acetilacija sijalinske kiseline na položaju 9 (9-*O*-acetil-) ili nastajanje estera između hidroksilne skupine i karboksilne kiseline na položaju 1 susjedne sijalinske kiseline, npr. GD1b-lakton, koji se u značajnim količinama nalazi u živčanom sustavu (Sonnino i sur. 2006).

U mozgu svih kralježnjaka od ptica do čovjeka najzastupljeniji su gangliozidi: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Avrova 1985; Rahmann i sur. 1986). Studije koje su pratile razvoj mozga kroz tipične razvojne procese, došle su do konkretnih spoznaja: GD3 je tipičan za ranu proliferaciju neurona i glija stanica, GM3 i GM1 se pojavljuju tijekom rane mijelinizacije, GD1a je marker sinaptogeneze, GT1b je tipičan za sve zrele neurone, dok su polisijalostrukture gangliozida karakteristika neurona koji migriraju na svoja mjesta tijekom razvoja mozga (Rösner 2003, Yu i sur. 1988). Neke vrste glikosfingolipida, kao galaktozilceramidi, prisutni su uglavnom u bazolateralnoj membrani (Le Grimellec i sur. 1988) dok su glukozilceramidi pretežno prisutni u apikalnoj membrani (Van't Hof i sur. 1992, Van Genderen i Van Meer 1995). Također, pronađena je stanična asimetrija u distribuciji gangliozida: većina njih (GM3, GM1 i GD1a) prisutni su u apikalnoj domeni, a GM4 i GD3 pretežno su prisutni u bazolateralnoj domeni membrane (Spiegel i sur. 1988). C-seriju gangliozida karakterizira tri sijalinska ostatka na unutarnoj galaktozi. Nalazi se u većim količinama u odraslom mozgu pojedinih vrsta riba. Mozak bakalara sadržava gangliozide c-serije poput; GT3, GT2, GT1c, GQ1c i GP1c (Io i Yu 1979; Yu i Io 1980). Monoklonsko protutijelo A2B5 za c-seriju gangliozida izvorno je pripremljeno imunizacijom miša uz pomoć pilećih embrionalnih stanica mrežnice (Eisenbarth i sur. 1979). Unatoč prvotnim polemikama oko njegove specifičnosti (Kasai i Yu 1983; Kundu i sur. 1983; Fredman i sur. 1984), kasnije studije potvrdile su specifičnu reaktivnost A2B5 protutijela na c-seriju gangliozida. A2B5 protutijelo reagiralo je s GT3 i GQ1c, ali ne i s GD3, GM3 i GD1b (Fenderson i sur. 1987).



**Slika 3.** Shematski prikaz biosinteze gangliozida. Slika preuzeta i preuređena iz Heffer-Lauc i sur. 2010. Nazivi enzima biosinteze pisani su ispod strelica, dok su enzimi i proteini razgradnje gangliozida pisani iznad strelica.

Priroda ceramidnog sidra važna je za biološke funkcije gangliozida. Promjena komponente masnih kiselina u  $\alpha$ -linolensku sintetskim putem drastično mijenja biološku aktivnost gangliozida *in vitro* (Christie i Han 2010). Međutim, ugljikohidratni lanac ima primarnu važnost za većinu funkcija. U bilo kojem tipu stanica prisutan je relativno mali broj različitih gangliozida, ali njihova priroda i sastav povezani su s funkcijom stanica.



### 1.3. Biosinteza i razgradnja gangliozida

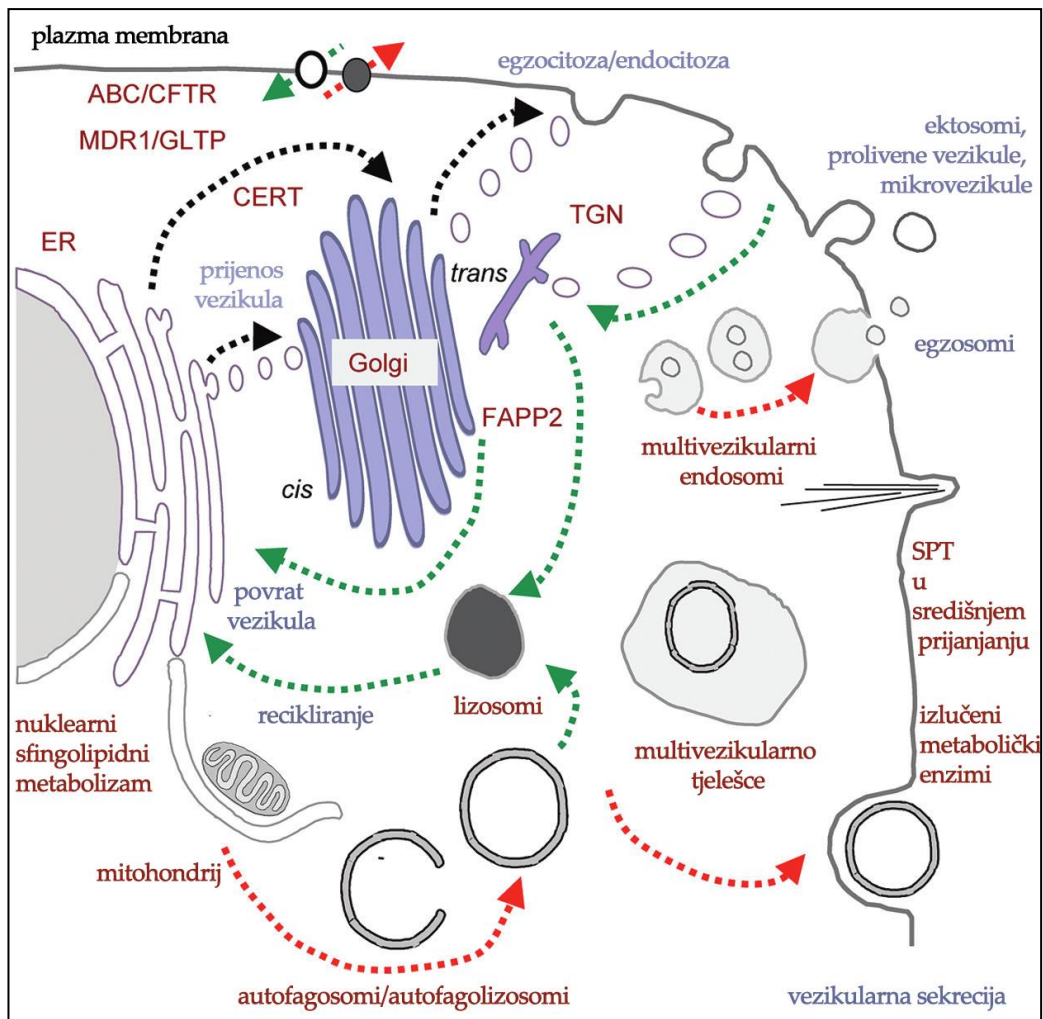
Lipidno sidro gangliozida sintetizira se na membrani endoplazmatskog retikuluma pomoću enzima serin-palmitoil transferaza. Nakon transporta do Golgijevog aparata, glukozilceramid-sintaza (UDPglukoza: ceramid-glukoziltransferaza, GlcT) prenosi ostatke glukoze na ceramid i nastaje glukozilceramid. Ova reakcija događa se na citosolnoj površini Golgijevog aparata. Glukozilceramid se tada prenosi na luminalni listić Golgijevog aparata, gdje se dodaje galaktoza i nastaje laktozil-ceramid (prekursor većine gangliozida). Dodavanjem sijalinske kiseline nastaje jednostavni gangliozid GM3 – široko rasprostranjen lipid stanica i tkiva. GM3 također služi kao ključna temeljna struktura tijekom biosinteze složenijih ugljikohidratnih lanaca koji se nalaze u gangliozidima (Kolter i sur. 2002). Rasvjetljavanje strukture i organizacije glikoziltransferaze pridonijelo je povećanom razumijevanju biosinteze gangliozida. Glukozilceramid-sintaza je integralni membranski protein s aktivnim mjestom izloženim u citosolu, u skladu s citosolnim položajem sinteze glukozilceramida (Marks i sur. 2001). Nedavno je pronađeno da glukozilceramid, osim što služi kao prekursor gangliozida u lumenu Golgijevog aparata, djeluje u citosolu gdje olakšava prijenos proteina u melanosome (Sprong i sur. 2001).

Dva enzima; GM2-sintaza (UDP-GalNAc: laktozilceramid/GM3/GD3  $\beta$ -1,4-N-acetilgalaktozaminiltransferaza, GalNAcT) i GM1-sintaza (UDP-Gal: GA2 /GM2/GD2  $\beta$ -1,3-galaktoziltransferaza) koji djeluju uzastopno na GM3, tvore kompleks. Uz ovaj multienzimski kompleks, GM3 se može učinkovito pretvoriti u GM1 kroz međuprodukt GM2; takav proces mogao bi objasniti obilje GM1, a vrlo malo GM2 u mozgu (Giraud i sur. 2001). Konačno, za razliku od koraka u sintezi glikoproteina koji imaju *N*-glikozilaciju, razmještenih u cisternama Golgijevog aparata, svi koraci *de novo* biosinteze gangliozida nakon nastajanja glukozilceramida smješteni su u distalnom Golgiju (Lannert i sur. 1998, Giraud i sur. 1999, Allende i sur. 2000).

Postupna sinteza započinje dodavanjem glukoze na ceramid (Sihoff i Kolter 2003), a daljnjim dodavanjem galaktoze, sijalinske kiseline i *N*-acetilgalaktozamina (Kolter i sur. 2002) nastaje osnovni lanac za različite forme gangliozida. Konačno izgrađeni osnovni šećerni lanac ganglio-serije ima sljedeću strukturu: Gal( $\beta$ -3)GalNAc( $\beta$ -4)Gal( $\beta$ -4)GlcCer (prema nomenklaturi glikolipida, IUPAC-IUBMB 1998). Ključni korak u sintezi gangliozida mozga je dodavanje sijalinske kiseline i/ili *N*-acetilgalaktozamina (GalNAc) na rastući ugljikohidratni lanac. Nakon što se *N*-acetilgalaktozamin veže, sijalinska kiselina se više ne može dodati na unutrašnju galaktozu. Upravo to određuje kojoj će seriji pripadati gangliozidi:

0-serija bez sijalinske kiseline na unutrašnjoj galaktozi, *a*-serija s jednom sijalinskom kiselinom, *b*-serija s dvije, *c*-serija s tri ili više sijalinskih kiselina (Slika 3). Vežanje sijalinske kiseline gangliozidima daje negativan naboj (Lloyd i Furukawa 1998) i kiseli karakter. Ostaci sijalinske kiseline mogu biti priključeni na temeljni šećerni lanac preko 2-3, 2-6 ili 2-8 glikozidne veze. Za svaki tip veze karakterizirana je jedna ili više sijaliltransferaza.

Postoje dokazi da se potrebne zalihe glukozilceramida i laktozilceramida za biosintezu gangliozida razlikuju od onih za biosintezu neutralnih oligoglikozilceramida. To objašnjava razlike masnih kiselina i sfingozinskih baznih komponenti između te dvije skupine. Otvoreno je pitanje kako prekursori za biosintezu gangliozida ulaze u Golgijev aparat, a čini se da je regulacija unutarstaničnog sfingolipidnog prometa jednako važna kao i kontrola ekspresije i aktivnosti enzima u određivanju konačnog sastava raznih vrsta glikosfingolipida. Putevi za biosintezu gangliozida iz ganglio-serije, na primjer uključuju sekvencijalne aktivnosti sijaliltransferaza i glikoziltransferaza kao što je prikazano na Slici 3. za tri glavne *a*-, *b*- i *c*-serije gangliozida. Potrebni enzimi vezani su na membrane Golgijevog aparata, u slijedu koji odgovara redoslijedu dodavanja različitih ugljikohidratnih komponenti. Sijaliltransferaza koja katalizira sintezu relativno jednostavnog gangliozida GM3 nalazi se u *cis*-regiji Golgijevog aparata, dok se one koje kataliziraju završne korake sinteze nalaze u distalnom dijelu ili *trans*-regiji Golgijevog aparata. GM3-sintaza, koja katalizira prijenos NeuAc iz citidin-monofosfata (CMP)-NeuAc na krajnji ostatak galaktoze od laktozil-ceramida, posebice pokazuje jedinstvenu specifičnost (Merrill 2011).



**Slika 4.** Shematski prikaz lokacija metabolizma i prijenosa sfingolipida unutar i izvan stanice.

Slika preuzeta i preuređena iz Merrill 2011.

Crne isprekidane linije pokazuju tradicionalni početak biosintetskog puta s biosintezom lipidne okosnice u ER i naknadno prijenos kroz Golgijev aparat za daljnji metabolizam, što u konačnici dovodi do kretanja prema staničnoj membrani i drugim dijelovima stanice vezikularnim transportom i transportnim proteinima (npr., GLTP= glikolipidni transportni protein) ili kroz membranu preko crpki (ABC= ATP-binding cassette, itd.). Zelene strelice odražavaju unutarnje kretanje sfingolipida prema lizosomima ili ER putem retrogradnog kretanja. Crvene linije predstavljaju dodatno putovanje sfingolipida, npr. za formiranje autofagosoma, multivezikularnih endosoma i multivezikularnih tjelešaca i fuziju sa staničnom membranom. CRT = ceramidni transportni protein, SPT= serin-palmitoiltransferaza.

Gangliozidi se vežu uz različite receptore (Kabayama i sur. 2007, Fantini i Barrantes 2009), kao dio lipidne ljuske (Ierson i Jacobson 2002), obavljajući uloge poput šaperona, vjerojatno već u Golgijevom aparatu. Nakon transporta gangliozida na površinu stanice, postaju povlašteni pratioci kolesterola u lipidnim splavima za moduliranje aktivnosti membranskih proteina i/ili sudjelovanje u međustaničnim interakcijama (Lopez i Schnaar 2009).

Prisutnost karakteristične sijalidaze koja se razlikuje od lizosomskih enzima u regijama stanične membrane sličnim splavima dovodi do promjena u sastavu gangliozida na površini stanice, uzrokujući pomak prema manje sijaliliranim formama GM1, GM3 i GM2 (Schengrund i Rosenberg 1970; Tettamanti i sur. 1972). Moguće posljedice su promjene u važnim staničnim procesima kao što su apoptoza i diferencijacija neurona. Isto tako, sijalilacija se može dogoditi u nekim membranama neurona, povećavajući omjer polisijaliliranih vrsta.

Razgradnja gangliozida počinje na površini membrane. Nakon što se gangliozidi uklone sa stanične membrane endocitozom, dolaze u obliku malih vezikula (promjera 50 do 100 nm) unutar lizosoma za razgradnju. Degradacija glikosfingolipida s kratkim ugljikohidratnim lancima u vodi topljivom hidrolazom zahtijeva male, neenzimske kofaktore zvane sfingolipidni-aktivator proteini. Čimbenici kao što su zakrivljenost membrane, tlak membrane i sastav lipida (posebice prisutnost anionskih lipida) omogućavaju učinkovitu razgradnju u malim vezikulama (Werth i sur. 2001).

#### **1.4. Modifikacije gangliozida podložne alkalijskoj razgradnji**

Vrsta derivacije gangliozida koja nije prikazana na Slici 3. je *O*-acetilacija, koja se provodi na 7 - ili 9-položaju sijalinske kiseline specifičnom *O*-acetiltransferazom (Shi i sur. 1998), koja također uklanja acetilnu grupu iz 9-*O*-acetiliranih sijalinskih kiselina. Relativno česta modifikacija nakon sinteze sijalinske kiseline je *O*-acetilacija na C-9 položaju. Acetilacija se također događa i na C-7 položaju, otkuda acetilna skupina može spontano migrirati na C-9 pri fiziološkim uvjetima (Cariappa i sur. 2009).

Dodatak *O*-acetilnih grupa u suštini mijenja funkciju sijalinske kiseline u različitim biološkim procesima (Schauer 1982). Međutim, biološka funkcija acetilacije *in vivo* ostala je nepoznanica. Pokušaj rasvjetljavanja biološke funkcije 9-*O*-acetilacije sijalinske kiseline uključio je transgensku ekspresiju Influenza C hemaglutinin-esteraze u miša (Varki i sur. 1991), što je vodilo nedostacima u ranoj embriogenezi, indirektno ukazujući na ključnu funkciju 9-*O*-acetiliranih sijalinskih kiselina tijekom mišjeg razvoja. *In vitro* studije ukazuju

da 9-*O*-acetilacija  $\alpha$ 2-6-vezanih sijalinskih kiselina pogoršava prepoznavanje određenim sijalo-vezujućim lektinima (Sjoberg i sur. 1994), antitijelima i virusima (Cheresh i sur. 1984; Corfield i sur. 1986; Herrler i Klenk 1991; Schauer 1991). Dodatak *O*-acetilnih grupa javlja se nakon prijenosa sijalinske kiseline na glikokonjugat i posredovan je sijalinsko specifičnom *O*-acetiltransferazom ovisnom o acetil-koenzimu A (Chammas i sur. 1996; Hayes i Varki 1993; Higa i sur. 1989; Schauer 1978, 1987; Sjoberg i sur. 1992). To navodi na zaključak da enzim prenosi acetilnu grupu prvenstveno na 7-položaj, s naknadnom migracijom prema položaju 9. Međutim, u dosadašnjim studijama, pronađen je prijenos na oba položaja (Butor i sur. 1993; Diaz i sur. 1989; Schauer 1987). Nažalost, unatoč godinama napora brojnih skupina, dosad se *O*-acetiltransferaza pokazala otpornom na solubilizaciju i pročišćavanja.

Otkrivanje i pročišćavanje *O*-acetiliranih gangliozida otežano je zbog nestabilnosti *O*-esterske veze pri neutralnom pH, te malom udjelu gangliozida sa *O*-acetiliranim ostacima sijalinske kiseline u ukupnim gangliozidima. Objavljeno je specifično prepoznavanje *O*-acetiliranih gangliozida nekolicinom monoklonskih protutijela (Cheresh i sur. 1984; Chou i sur. 1990; Hirabayashi i sur. 1989; Leclerc i sur. 1992). Otkrivanje gangliozida s *O*-acetiliranim sijalinskim kiselinama tim protutijelima znatno je poboljšano tankoslojnim-immuno prepoznavanjem. Međutim, ta monoklonska protutijela selektivno prepoznaju samo nekoliko gangliozida koji sadržavaju *O*-acetilirane sijalinske ostatke. Za detekciju svih *O*-acetiliranih gangliozida, potrebno je proizvesti nova monoklonska protutijela s različitim specifičnošću.

## 1.5. Sistematika riba

Ribe su najstarija i najbrojnija skupina kralježnjaka na Zemlji. Najveći dio danas živućih riba pripada nadrazredu koštunjača (*Osteichthyes*) kojeg karakterizira barem nekoliko kosti u skeletu, koštani škržni poklopac te plivajući mjehur (Miller i Harley 2001).

Razred zrakoperke (*Actinopterygii*) obuhvaćaju 23 700 vrsta (Nelson 2006) koje se mogu podijeliti u dva podrazreda: štitonoše (*Chondrostei*) i novoperke (*Neopterygii*) prema *Integrated Taxonomic Information System*, [ITIS](#)). Prave koštunjače obuhvaćaju više od 90% današnjih vrsta riba (Treer i sur. 1995), a karakterizira ih potpuno okoštali skelet. Od ukupnog broja recentnih ribljih vrsta oko 40% je slatkovodnih (Bogut i sur. 2006). Prvu znanstvenu klasifikaciju prema srodnosti vrsta postavio je Sclater 1858. godine (Bogut i sur. 2006). Temeljitu klasifikaciju, koja je i danas uz neke manje izmjene prihvaćena, dao je 1876. Huxley. Kopnenu ihtiofaunu je podijelio na 6 geografskih oblasti. Porodice šaranki i lososa pripadaju Palearktičkoj oblasti (Huxley 1875). Pastrvske ribe su karakteristične za sjeverni

dio ove oblasti, dok šaranke pripadaju srednjem dijelu, toku Dunava. Taksonomski sustav riba posljedica je njihovog dugog i raznolikog filogenetskog razvoja pa danas postoje različiti pogledi ihtiologa na klasifikaciju riba. Prije gotovo dva desetljeća, 1989. god na temelju genetskih istraživanja i zaključaka međunarodnog ihtiološkog kongresa, promijenjen je naziv dužičaste pastrve *Salmo gairdnerii* u *Oncorhynchus mykiss* (Bogut i sur. 2006).

Prvi fosilni ostaci dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), podrazred *Neopterygii*, red *Salmoniformes*, porodica *Salmonidae* nađeni su još u gornjoj Kredi, a najraniji fosilni ostaci običnog šarana (*Cyprinus carpio*), podrazred *Neopterygii*, red *Cypriniformes*, porodica *Cyprinidae* nalaze se još u Eocenu.

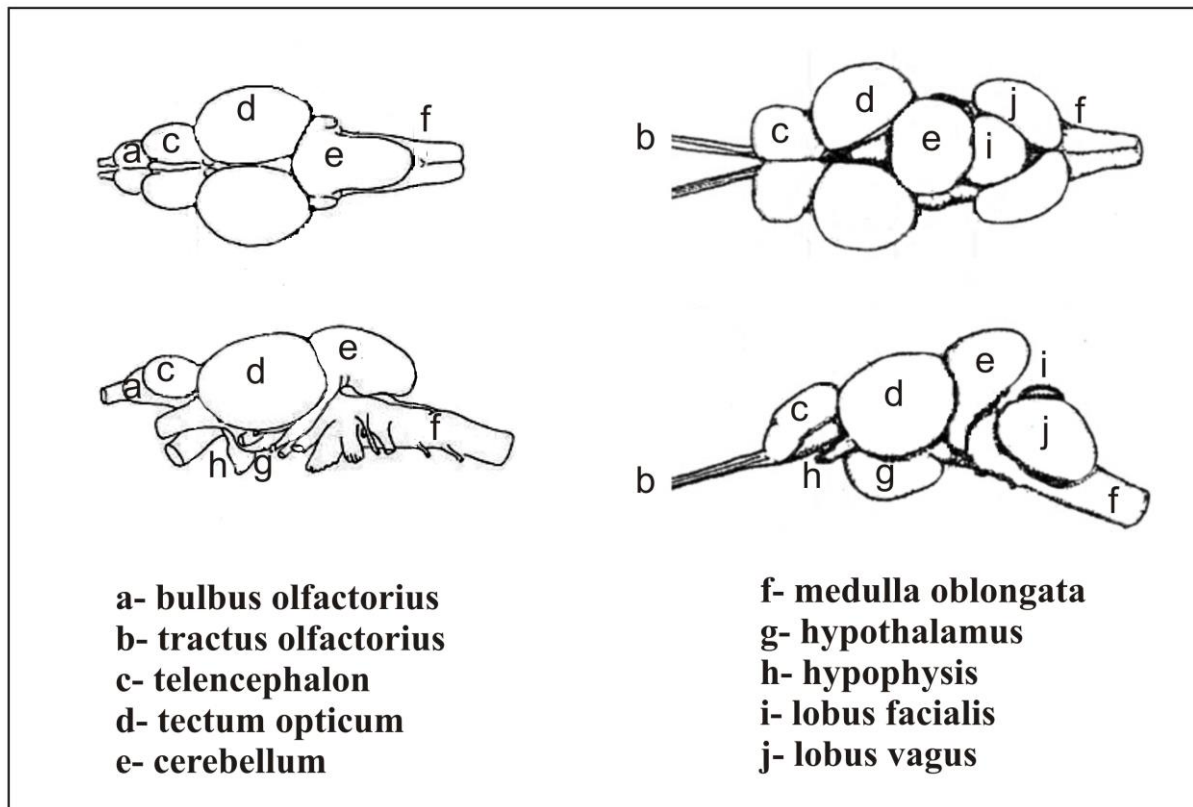
Prilagođene su različitim životnim uvjetima, pa je tako primjerice za red *Cypriniformes* karakteristična šira ekološka valencija s obzirom na raspon temperature i kisika nego u reda *Salmoniformes*. Suprotno tome za red *Salmoniformes* tipična je primjerice anodromnost koja ukazuje na široku ekološku valenciju s obzirom na slanost staništa (količinu otopljenih minerala, a time i osmolarnost i konduktivitet okoliša). U tekućim vodama dužičasta pastrva rasprostranjena je u zoni potočne pastrve, gdje u potocima i rijekama temperatura vode tijekom ljeta ne prelazi 17 do 18 °C, a zimi ne pada ispod 2 °C. Najprikladnija temperatura vode je u rasponu od 12 do 20 °C. Minimalne koncentracije otopljenog kisika su 4 mg/L, a u intenzivnom uzgoju 9 mg/L. Dužičasta pastrva podnosi pH vrijednosti u rasponu 6,5 do 8,2, slobodnog amonijaka do 0,01 mg/L, a alkalitet od 0,5 do 5. Obični šaran naseljava tople, sporo tekuće ili stajaće vode s mekanim dnom u rasponu temperature od 3 do 35 °C (Bogut i sur. 2006).

#### **1.6. Osobitosti građe mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*)**

Tipične značajke mozga koštunjača su veliki stražnji mozak (*rhombencephalon-rhom*), veliki neparni mali mozak (*cerebellum - cbl*), dvije izraženije vidne regije (*tectum opticum- tect*) smještene dorzalno na tegmentumu (*tegmentum- teg*) srednjeg mozga (*mesencephalon- mes*) i međumozak (*diencephalon- dien*), veliki parni inferiorni režanj hipotalamusa koji je ispupčen na ventralnoj površini mozga, razmjerno mali i izvučeni krajnji mozak (*telencephalon- tel*), te relativno velike njušne lukovice (*bulbus olfactorius- bol*) kao što je prikazano na Slici 5.

Mozak dužičaste pastrve jest tipični mozak koštunjača koji ne pokazuje posebnu senzornu ili motoričku specijalizaciju. Na njemu dominira relativno veliki optički *tectum*, funkcionalni dio izvršnog vidnog sustava (Nieuwenhuys i sur. 1998). Mozak običnog šarana

specijaliziran je za osjet kemorepcije (okusa i mirisa), *tectum* vidnog sustava podjednako je velik kao i vagalni režanj stražnjeg mozga koji je u vezi s palatalnim organom – funkcionalnim dijelom sustava za okus. Kod šarana je povećan i facijalni režanj koji obrađuje osjet koji dolazi s kemoreceptornih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine (združeni osjet poimanja osjeta okusa i njuha u sisavaca).



**Slika 5.** Shematski prikaz vanjske morfologije mozga promatranih vrsta riba (dorzalni prikaz gore, a lateralni dolje): lijevo- dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*), desno- obični šaran (*Cyprinus carpio*). Slike preuzete i preuređene iz [Web 3](#) i Barney i sur. 2008).

Dužičasta pastrva ima njušnu lukovicu smještenu neposredno uz krajnji mozak dok se kod šarana može vidjeti isturena njušna lukovica, gdje je dugim njušnim tračkom (*tractus olfactorius- tol*) povezana s krajnjim mozgom. Krajnji mozak (*telencephalon*) je u odnosu na druge dijelove mozga relativno dobro razvijen kod obje vrste riba. Zajedno s međumozgom (*diencephalon*), krajnji mozak se straga nastavlja u srednji mozak (*mesencephalon*). Za razliku od sisavaca, srednji mozak zrakoperki nije pokriven hemisferama krajnjeg mozga već se bočno izbočuje iza krajnjeg mozga i veličinom nadmašuje krajnji mozak. Krov srednjeg mozga čini vidni korteks (*tectum*), parna struktura od sedam slojeva (*stratum marginale*,

*stratum opticum*, *stratum fibrosum et griseum superficiale*, *stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj, *stratum griseum centrale* duboki sloj, *stratum album centrale*, *stratum periventriculare*) unutar koje su veliki ventrikuli srednjeg mozga (Nieuwenhuys i sur. 1998). Specifična tvorevina srednjeg mozga karakteristična samo za ribe iz podrazreda zrakoperki je *torus longitudinalis* - *tl*, parni greben gusto pakiranih malih (granularnih) stanica, longitudinalno smješten duž središnje tektalne margine ispod intertektalne komisure. Ovaj sloj pruža tanka paralelna vlakna do *stratum marginale* sloja tektuma. Posebno je dobro razvijen u vrsta koje žive u turbulentnim vodama ili se aktivno kreću iz plitkih prema dubljim vodama (Kishida 1979) što upućuje na povezanost vidnog sustava i bočne linije (Meek 1992). Kod dužičaste pastrve bolje je razvijen u odnosu na običnog šarana. *Torus semicircularis* - *ts*, također struktura srednjeg mozga, smještena je ispod optičkog korteksa, a ispupčena u ventrikule. Uključena je u obradu akustičnih i mehano-osjetnih informacija koje dolaze iz bočne linije te integraciju vidnih signala. Mali mozak (*cerebellum*), dio stražnjeg mozga (*rhombencephalon*), sastoji se od tri međusobno povezana dijela (Meek 1992): kaudalno smještene vestibulolateralne regije, centralno smještenog tijela cerebeluma (*corpus cerebelli-cocb*) neposredno iza optičkog tektuma te cerebelarne valvule (*valvula cerebelli-val*) koja se podvlači ispod optičkog tektuma u ventrikul srednjeg mozga. Kod običnog šarana plosnatog je oblika s prepoznatljivim medijalnim i lateralnim dijelom, dok je kod dužičaste pastrve uvojnata i predstavlja medijalnu valvulu. Cerebelarna krista (*crista cerebellaris-crcb*) je kaudalni nastavak molekularnog sloja cerebeluma i pokriva područje bočne linije. Granularni sloj se pruža do sloja paralelnih vlakana kriste preklapajući područje bočne linije stražnjeg mozga. Na stražnjem mozgu, kod o. šarana, uočavaju se režnjevi; facijalni (*lob VII-lobus facialis*), glosofaringealni (*lob IX-lobus glossopharyngei*) i vagalni režanj (*lob X-lobus vagus*). Oni omogućavaju razlikovanje osjeta koji dolaze iz okusnih pupoljaka smještenih izvan (facijalni), unutar usne šupljine (glosofaringealni) ili od palatalnog organa (vagalni).

### **1.7. Glikosfingolipidi mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*)**

Tijekom 70-tih godina uočene su velike razlike u ukupnoj količini i raspodjeli gangliozida između pojedinih vrsta riba (Yiamouyiannis i Dain 1968, Ishizuka i sur. 1970, Kostić i sur. 1975), a uočeno je da razlika ovisi o temperaturnom rasponu vrste (Hilbig i Rahmann 1980). Ukupna količina sijalinske kiseline vezane na gangliozide po gramu svježeg tkiva mozga kod sisavaca se kreće od 650 do 1200 µg (Kappel i sur. 1993), a kod riba od 110 do 750 µg (Rahmann i sur. 1983). Te vrijednosti za mozak dužičaste pastrve i običnog šarana



približno su iste ( $196,2 \pm 16,3$ , odnosno  $220,5 \pm 17,6$   $\mu\text{g/g}$ ) dok su dvostruko više primjerice u porodice Mormirida (Hilbig i Rahmann 1980), a trostruko više u rodovima tropskih riba *Tilapia* i *Pseudotropheus* koje žive i na temperaturama iznad 28 °C.

U vrijeme prvih istraživanja nije bila moguća strukturna analiza pa je rezultat izražen udjelima mono-, di-, tri- i polisijalogangliozida. U odraslom mozgu sisavaca najzastupljeniji su mono- i disijalogangliozidi (68-84%), trisijalogangliozida ima 8-22%, a polisijalogangliozidi čine svega 4-12% ukupne količine glikosfingolipida (Ledeen i Yu 1976). Prema Hilbigu i Rahmannu, porodice *Salmonidae* i *Cyprinidae* se ovdje značajno razlikuju (Hilbig i Rahmann 1980). Mozak dužičaste pastrve ima znatno više mono- i disijalogangliozida (51,2% prema 32% kod šarana), istovjetni udio trisijalogangliozida (oko 30% za obje vrste), ali zato znatno manji udio polisijalogangliozida (14,5% u odnosu na 38,1% kod šarana). Antarktičke ribe mogu imati udio polisijalogangliozida i do 40%, dok se on kod sisavaca kreće od 1-9% i tipičan je samo za rane razvojne stadije i neka patološka stanja.

### **1.8. Utjecaj temperature okoline na sastav gangliozida mozga riba**

Presudan čimbenik prilagodbe na temperaturu okoliša nije toliko ukupna količina gangliozida, već prisutnost određenih polisijalogangliozida (Rahmann 1978, Rahmann i Hilbig 1981). Studije sinaptičkih završetaka bogatih gangliozidima pretpostavljaju kako se funkcija gangliozida može povezati sa stupnjem i načinom vezanja  $\text{Ca}^{2+}$  na njih i termalnim uvjetima (Probst i sur. 1979, Probst i Rahmann 1980). Fenomen polisijalilacije, tj. povećanje udjela polisijalogangliozida pri nižim temperatura okoliša, potvrđen je na ribama Weddalskog mora prikupljenih tijekom ekspedicije na Antarktiku (Becker i Rahmann 1995).

Brzina adaptacije na promjene temperature ograničena je brzinom promjena metabolizma gangliozida. Tako organizmi koji imaju različiti metabolizam gangliozida imaju i različitu osjetljivost na promjene temperature i brzinu prilagodbe (Rösner i sur. 1979b).

Sposobnost preživljavanja na nižim temperaturama ovisna je o sposobnosti promjene cijelog metabolizma. Za normalno funkcioniranje procesa koji se odvijaju na staničnoj membrani presudna je fluidnost membrane koja se smanjuje s temperaturom. Organizam se tomu prilagođava kvantitativnim i kvalitativnim promjenama lipidnog sastava membrane: povećava se stupanj nezasićenosti masnih kiselina, udio fosfatidiletanolamina raste u odnosu na fosfatidilkolin, smanjuje se udio kolesterola u odnosu na fosfolipide, mijenja se sastav gangliozida u korist struktura koje imaju nezasićenu masnu kiselinu u lipidnom sidru i struktura koje imaju polarniji hidrofilni dio molekule (Rahmann i sur. 1998a).

Drastične promjene sastava gangliozida mozga između toplih i hladnokrvnih životinja pratile su razlike u aktivnostima sijaliltransferaza u biosintezi gangliozida (Freischütz i sur. 2008). S druge strane, sastav moždanih gangliozida u srodnih vrsta koštunjača, bezrepaca, repaša ili sisavaca, bio je podjednak (Irwin i Irwin 1979, Hilbig i Rahmann 1980, Irwin i Schwartz 1983).

Korelacijom različitih vrsta riba prema optimalnoj temperaturi okoline, u vrsta toplih tropskih voda, kao *Tilapia* i *Pseudotropheus*, utvrđene su tri puta veće koncentracije sijalinske kiseline vezane za lipide (Hilbig i Rahmann 1980; Rahmann i sur. 1983) u odnosu na vrste hladnih voda poput običnog šarana i dužičaste pastrve (Avrova 1980). Iz ovoga se može zaključiti da se prilagodba na više temperature sastoji u povećanoj koncentraciji gangliozida i to u korist manje sijaliliranih formi.

Iako ribe u naglom pothlađivanju za 10 °C aktiviraju senzomotoričke putove za refleksi bijeg u roku od 30 sekundi (Van den Burg i sur. 2006) a stresni odgovor cijelog tijela u roku od 90 sekundi te smanjuju volumen krvi i dreniraju krv iz mozga radi izbjegavanja brzog pothlađivanja (Van den Burg i sur. 2005), prirodna adaptacija većine riba s 20° C na 4° C traje 4-6 tjedana (Hilbig i Rahmann 1980). Zanimljivo je da vrlo spora adaptacija neurobioloških procesa nije u korelaciji s promjenom sastava fosfolipida i kolesterola, za koju je potrebno dva tjedna, već s promjenom sastava gangliozida unutar 4-6 tjedana. Jetra i mišići šarana prilagođavaju se povećanjem stupnja nezasićenosti masnih kiselina i udjela kolesterola te smanjenjem fosfolipida, dok u mozgu dolazi do drastičnih promjena količine i sastava gangliozida (Rahmann i sur. 1998). Suprotno mozgu, fluidnost membrane u jetri regulirana je povećanom ugradnjom nezasićenih masnih kiselina u fosfolipide, smanjenjem udjela fosfolipida, a time i povećanjem volumena stanica jetre. Povećanje fluidnosti membrane postignuto je povećanjem sadržaja kolesterola u mišićima, a smanjenjem sadržaja kolesterola u mozgu. Tijekom termalne aklimatizacije riba, u neuronskim membranama promijenjena je polarnost gangliozida, dok su u jetri i mišićima zabilježene promjene drugih lipida (Rahmann i sur. 1998).

Gangliozidi do sinaptičkih membrana (Wiegit 1967) dopijevaju brzim aksonskim transportom. Na niskim temperaturama sinteza proteina neznatno je smanjena, sinteza glikoproteina gotovo dvostruko smanjena, a sinteza glikosfingolipida može biti smanjena i do pet puta, dok je brzi aksonski transport gotovo potpuno zaustavljen (Rösner i sur. 1979a). Iz ovoga slijedi da je brzina adaptacije na promjene temperature ograničena brzinom promjena metabolizma gangliozida, te da organizmi koji imaju različiti metabolizam gangliozida imaju različitu osjetljivost na promjene temperature i brzinu prilagodbe. Obični šaran i dužičasta

pastrva dobar su primjer za taj fenomen. Ljetna (19-22 °C) i zimska (1-4 °C) aklimatizacija ne dovode do promjene ukupne sijalinske kiseline vezane na glikolipide obiju vrsta, ali dovode do drastične promjene sastava gangliozida.

Mozak d. pastrve se niskim temperaturama prilagođava smanjenjem količine monosijalogangliozida, prvenstveno udjela GM3; ukupna količina glikolipida održava se malim povećanjem di- i trisijalogangliozida zbog nemogućnosti povišenja količine polisijalogangliozida (Hilbig i sur. 1979). Lipidne splavi dužičaste pastrve pri termalnoj aklimatizaciji prolaze kroz promjene sastava ne samo sfingolipida, već kolesterola, receptora i signalnih molekula (Zehmer i Hazel 2004; Zehmer i Hazel 2003). Prilikom takvih promjena moguće su pojave promjena ponašanja ili promjene kompleksnih procesa poput regeneracije.

Nasuprot dužičastoj pastrvi, aklimatizacija mozga običnog šarana na nižu temperaturu praćena je znatnijim povećanjem udjela polisijalogangliozida i smanjenjem monosijalogangliozida (Hilbig i sur. 1979).

Osim promjenom broja sijalinskih kiselina u strukturi gangliozida, aklimatizacija na niže temperature praćena je povećanjem udjela modifikacija gangliozida koje su podložne alkalijskoj razgradnji (najčešće *O*-acetilacija). Prema udjelu modifikacija podložnih alkalijskoj razgradnji može se napraviti sljedeća ljestvica (Becker i Rahmann 1995): antarktičke ribe koje žive ispod 0 °C (61-67%), ribe u zimskoj aklimatizaciji (45-51%), ribe u ljetnoj aklimatizaciji (38-44%), tropske vrste (<35%), hrčak u aktivnom periodu (4%) i svinja (3%). Vrijednosti za šarana u zimskoj aklimatizaciji kreću se oko 50%, a u ljetnoj oko 40%, što je značajna promjena.

Provođenje akcijskog potencijala duž aksona ovisi o broju i vrsti ionskih kanala te njihovoj propusnosti. Tijekom aklimatizacije na različite temperature značajno se ne mijenjaju ni broj niti vrsta ionskih kanala. Kod slabo aklimatiziranih životinja dolazi do usporenog ili ubrzanog provođenja akcijskog potencijala. Ovaj poremećaj izazvan je promjenom propusnosti kanala što je posljedica promjene molekularne okoline u kojem se kanali nalaze. Kanali su smješteni u lipidnim splavima, čiji nastanak moduliraju kolesterol, sfingomijelin i gangliozidi; njihova ujednačena propusnost na različitim temperaturama osigurana je promjenama sastava gangliozida (Kappel i sur. 2000). Kalcij se u visokim koncentracijama nakuplja u sinaptičkoj pukotini. Otpuštanje kalcija s gangliozida sinaptičkih membrana djeluje kao pozitivna povratna sprega. Promjene polarnosti gangliozida omogućavaju jednaku dostupnost kalcija pod različitim temperaturnim uvjetima, jer povećanjem polarnosti povećava se broj veznih mjesta za Ca<sup>2+</sup>, no smanjuje se afinitet vezanja kalcija. Veća polarnost gangliozida podudara se s povišenom izvanstaničnom

koncentracijom kalcija i povišenom količinom kalcijevih iona potrebnih po kvantu otpuštenog transmitera kod ektotermnih kralježnjaka. Kalcij potiče odvajanje uređenih i neuređenih lipidnih domena, odnosno razdvajanje kanalskih proteina u domene njima pridruženih gangliozida. Na taj način gangliozidi ispunjavaju funkciju neuromodulatora koji kontroliraju učinkovitost kanalskih proteina radi osiguranja depolarizacije postsinaptičke membrane (Rahmann i sur. 1998). Osim kanalskih proteina u lipidnim domenama obitavaju receptori te molekule koje su uključene u prijenos signala unutar stanice. Tijekom aklimatizacije pastrve s 20 °C na 5 °C lipidne domene jetre mijenjaju sastav lipida, ali se u njima i dalje nalaze  $\beta$ -adrenergički receptor i adenilat-ciklaza (Zehmer i Hazel 2003). Aklimatizacija u prirodnom okolišu ima sezonski karakter, a regulirana je uglavnom kombinacijom temperature okoliša i duljine dana (Prosser i Nelson 1981). Senzori za količinu svjetla djeluju na hipotalamus koji upravlja promjenama metabolizma preko hipofize. Izvršna molekula koja dovodi do prebacivanja ljetnog prema zimskom metabolizmu gangliozida još uvijek je nepoznata, no poznat je enzimski sustav sijaliltransferaza koji izvršava promjenu (Freischütz i sur. 1994).

Iako postoje izvrsne studije količine i sastava gangliozida prema sistematici riba (Avrova 1985; Hilbig i Rahmann 1980) starije od trideset godina, na žalost studije imunohistokemijske lokalizacije pojedinih struktura po regijama mozga riba objavljene su tek nedavno (Viljetić i sur. 2012). Razlog tomu je relativno nedavna proizvodnja visokospecifičnih protutijela IgG klase (Schnaar i sur. 2002) i pojava vrlo rijetkih struktura koje nisu tipične za više kralježnjake, a za koje još ne postoje protutijela. Viljetić i sur. otkrili su: u mozgu običnog šarana najrasprostranjeniji su GD1a i GT1b, dok su kod dužičaste pastrve najrasprostranjeniji GD1b i GT1b; GD1b je u mozgu običnog šarana tipičan samo za velike motoričke neurone koji pokreću rep, dok ga u dužičaste pastrve imaju i strukture cerebeluma; mozak obiju vrsta riba nema reaktivnost na anti-GM1 iako je taj gangliozid biokemijskim metodama dokazano prisutan u tkivu. Pretpostavljeno je da je 'imunohistokemijski nedostatak' gangliozida GM1 posljedica njegove modifikacije podložne alkalijskoj razgradnji koja toliko mijenja izgled epitopa da ga protutijelo više ne može prepoznati.

Tankoslojnom kromatografijom ustanovljeno je smanjenje monosijalogangliozida, malo povećanje di- i trisijalogangliozida kod dužičaste pastrve, a povećanje udjela polisijalogangliozida kod običnog šarana pri niskim temperaturama (Hilbig i sur. 1979). Međutim, ne postoje studije imunohistokemijske lokalizacije pojedinih struktura gangliozida niti udjela modifikacija gangliozida koje su podložne alkalijskoj razgradnji (najčešće *O*-acetilacija) po regijama mozga riba tijekom temperaturnih aklimatizacija.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

---

Cilj istraživanja bio je utvrditi razlike u regionalnoj raspodjeli, sastavu i količini gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*), podrazred *Neopterygii*, red *Salmoniformes*, porodica *Salmonidae* i običnog šarana (*Cyprinus carpio*), podrazred *Neopterygii*, red *Cypriniformes*, porodica *Cyprinidae* tijekom sezonskih promjena. Ove vrste imaju različitu ekološku valenciju s obzirom na raspon temperature i kisika pa je pretpostavljena drugačija dinamika sezonskih promjena.

Hipoteze postavljene na osnovu cilja istraživanja su: raspodjela, količina i sastav gangliozida mijenjaju se u korelaciji s termalnom adaptacijom poikilotermnih vrsta; niske temperature vode imat će za posljedicu modifikacije gangliozida koji su podložni alkalijskoj razgradnji, smanjenje monosijalogangliozida u mozgu obje vrste, a povećanje di- i trisijalostruktura u mozgu dužičaste pastrve te polisijalostruktura u mozgu običnog šarana. Promjena u sastavu gangliozida odrazit će se na specifičnu raspodjelu gangliozida u pojedinim regijama mozga.

## 3. MATERIJALI I METODE

---

### 3.1. Materijal

Studijom su obuhvaćene dvije vrste riba: dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*, porodica *Salmonidae*) i obični šaran (*Cyprinus carpio*, porodica *Cyprinidae*). Od obje vrste riba žrtvovano je mjesečno po dvadeset odraslih jedinki, podjednake dobi i veličine, od zimskih do ljetnih mjeseci. Sekcije su rađene na terenu neposredno nakon izlova ribe. Deset uzoraka mozga nakon sekcije fiksirano je 2 dana u 4%-tnom puferiranom paraformaldehidu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) na +4°C, krioprotektirano u 10%-tnoj puferiranoj saharozi i smrznuto u 2-metilbutanu (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA). Svi tako pripremljeni uzorci spremljeni su na -80°C do daljnje analize. Po deset uzoraka obje vrste direktno je smrznuto na -80°C za ekstrakciju gangliozida, tankoslojnu i imuno- tankoslojnu kromatografiju.

Dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) izlovljene su u privatnom ribnjaku „Valis Aurea“ (Turnić, Požega) u vlasništvu obitelji Odvorčić, a obični šarani (*Cyprinus carpio*) izlovljeni su na ribnjaku „Grudnjak“ (Ribnjačarstvo PP Orahovica).

### 3.2. Metode

#### 3.2.1. Ekstrakcija gangliozida

Ekstrakcija gangliozida rađena je radi dokazivanja promjene sastava gangliozida mozga riba kod obje vrste riba od zimskih do ljetnih mjeseci.

Ekstrakcija gangliozida izvođena je modificiranim protokolom (Schnaar 1994). Pripremljen je 10%-tni vodeni homogenat mozga od direktno smrznutog uzorka mozga spremljenog na -80°C. Uzorci su nakon vaganja homogenizirani na ledu u ručnom staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom (Wheaton Science Products, NJ, USA) u ledeno hladnoj vodi (izračunat je volumen ledene vode za dobivanje 10%-tnog homogenata (m/V)). Uzorku su dodana hladna, redestilirana otapala za ekstrakciju u omjeru kloroform/metanol/voda (1:2:0,75 (v/v), gdje vodu predstavlja vodeni homogenat tkiva.

Organska otapala, kloroform i metanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) redestilirana su prije upotrebe.

Nakon ekstrakcije na ledu uzorci su centrifugirani 15 minuta na 3000 rpm pri +4°C u centrifugi s hlađenjem (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany). Bistri supernatant je izdvojen, a talog reekstrahiran na sobnoj temperaturi u istom omjeru otapala korištenom za ekstrakciju, ali dvostruko manjem volumenu. Reekstrahirani uzorci ponovno su centrifugirani, a izdvojeni supernatanti spojeni. Ekstrahirani gangliozidi podvrgnuti su razdvajanju od ostalih lipida faznom particijom uz izdvajanje gornje hidrofilne faze koja sadržava gangliozide. Metoda je dizajnirana tako da se osigura maksimalno razdvajanje gangliozida u gornju fazu (metanol/voda), dok samo mala količina gangliozida (uključujući fosfolipide, neutralne lipide i manje polarne strukture kao što su GM4 i GM3) ostaje u donjoj fazi (kloroform/metanol). Volumen vode potreban za particiju gangliozida dobiven je množenjem volumena udruženih supernatanata s faktorom 0,173. Dodatkom vode dolazi do zamućenja ekstrakta. Potom je ekstrakt lagano pomiješan i centrifugiran 15 minuta na 3000 rpm pri sobnoj temperaturi. Gornje faze odvojene su u staklene epruvete i uparene u struji zraka pri temperaturi od +45°C (Sample Concentrator, Techne, Staffordshire, UK). Nakon uparavanja, uzorak je otopljen u malom volumenu destilirane vode, a zatim pročišćen dijalizom. Prije same dijalize membrana za dijalizu (Spectra/Por Dialysis Membrane Tubing 2, Spectrum Laboratories, CA, USA; rad u rukavicama!) je izrezana u crijevo dužine desetak cm i potopljena u čaši s destiliranom vodom do dvije litre kroz 10 minuta. Membrana je rastvorena, iznutra isprana destiliranom vodom i iscijeđena. Na jednom kraju načinjen je čvor, dok se kroz drugi otvor staklenom kapalicom nanosio uparak gornje faze otopljen u 1,5 ml destilirane vode. Nakon utiskivanja zraka, čvor je načinjen i na drugom kraju, nakon čega je dobiveni „balončić“ stavljen plutati u čašu s destiliranom vodom uz miješanje na magnetnoj miješalici 72 h s dnevnom izmjenom vode. Čaša je prekrivena prozirnom folijom. Dijalizirani uzorak izvađen je kapalicom u epruvetu i uparen u struji zraka pri temperaturi od +45°C (Sample Concentrator, Techne, Staffordshire, UK).

### **3.2.2. Određivanje koncentracije ekstrahiranih gangliozida**

Koncentracija ekstrahiranih gangliozida određena je pomoću kvantitativne kolorimetrijske Svennerholmove metode za određivanje koncentracije ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide (Svennerholm 1957). U 20 µl uparka ekstrakta gangliozida dodano je 200 µl destilirane vode i 200 µl Svennerholmovog reagensa. Smjesa je kuhana 20 minuta na 100°C nakon čega je dodano 1 ml butanol/butilacetata (1/4; v/v), snažno promućkana i centrifugirana 2 min pri 3000 g. Gornja faza je odvojena i izmjerena je apsorbancija na spektrofotometru (Lambda 2 UV/VIS Spectrometer, Perkin Elmer & Co

GmbH, Germany) pri 580 nm. Kao standard korištena je sijalinska kiselina koncentracije 0,1 mg/ml. Svennerholmov reagens pripremljen je prema sljedećem receptu: 2,5 mL 2% otopine rezorcinola (Kemika, Zagreb), 62,5  $\mu$ L 0,1 M CuSO<sub>4</sub> (Kemika, Zagreb), 20 mL 36% HCl (VWR International, France) i vode do ukupnog volumena od 25 mL. Reagens je zaštićen od svjetla i čuvan na +4°C. Ukupna koncentracija gangliozida u ispitivanim uzorcima izražena je kao  $\mu$ g sijalinske kiseline / mg svježeg tkiva.

### 3.2.3. Tankoslojna kromatografija

Prije nanošenja na ploču za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti (HPTLC ploča, sa slojem silikagela 60 na staklu, Aldrich, Milwaukee, WI, USA), ploča dimenzija 10×20 cm izrezana je dijamantnim nožem (Desaga, Sarstedt, Nümbrecht Germany) na ploče dimenzija 5×10 cm. Nakon toga provedena je aktivacija ploče zagrijavanjem pri 110°C kroz 20 minuta te hlađenje u eksikatoru s osušenim silikagelom kao indikatorom vlažnosti. Uzorci su prije nanošenja otopljeni u otapalu kloroform/metanol/voda u omjeru 2:43:55 čiji volumen odgovara masi mozga.

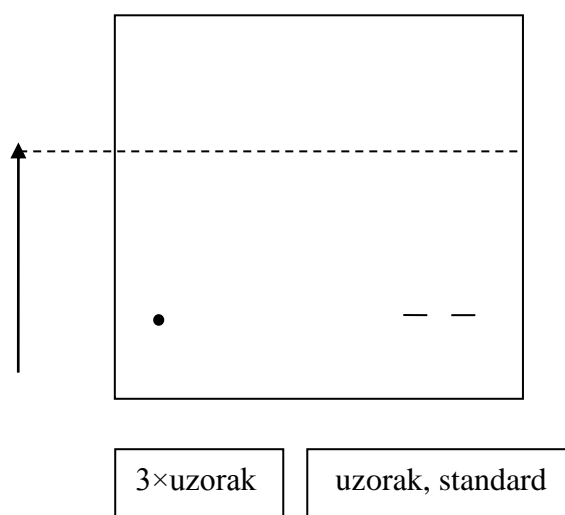
Na pločicu je *Hamilton* štrcaljkom (Hamilton Co., Reno, NV, USA) kao niz mikrokapljica nanošeno 7  $\mu$ g gangliozida iz ekstrakta mozga usporedno sa standardom uz sušenje svakog nanosa uzorka hladnim zrakom. Nakon nanošenja uzoraka kromatografska ploča sušena je u eksikatoru 20 minuta zbog reaktivacije. Za razvijanje pločice s uzorcima korišteno je otapalo kloroform/metanol/0,25% KCl/2,5M NH<sub>4</sub>OH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) u omjeru 60:42:10,5:0,5. Prije detekcije pločica je dobro osušena. Za detekciju gangliozida, pločica je poprskana Svennerholmovim reagensom, prekrivena čistom vrućom staklenom pločom istih dimenzija, učvršćena hvataljkama, a zatim zagrijana u sušioniku (Conterm 19L, J.P.Selecta, Barcelona, Espana) pri 110°C 30 minuta. Uzorci koji sadrže sijalinsku kiselinu poprimili su karakterističnu intenzivno ljubičastu boju, dok drugi glikolipidi manje intenzivnu žuto-smeđu boju. Pločice su skenirane i gangliozidi su kvantificirani kao što je već opisano (Schnaar i Needham 1994).

### 3.2.4. Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija (2D-TLC)

Udio gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji određen je metodom prema Sonnino i sur. 1983. Prije nanošenja na ploču visoke djelotvornosti za tankoslojnu kromatografiju, ploča dimenzija 10×20 cm izrezana je dijamantnim nožem (Desaga, Sarstedt, Nümbrecht Germany) na dvije ploče dimenzija 10×10 cm. Nakon toga provedena je aktivacija ploče zagrijavanjem pri 110°C kroz 20 minuta te ohlađena u eksikatoru sa osušenim silikagelom



kao indikatorom vlažnosti. Uzorak je prije nanošenja otopljen u volumenu koji odgovara masi mozga otapala kloroform/metanol/voda u omjeru 2:43:55. Olovkom je označena linija nanošenja, te fronta mobilne faze za prvu i drugu dimenziju kao što je prikazano na Slici 6. Pomoću *Hamilton* štrcaljke nanošen je uzorak u trostrukoj količini od uobičajene 1×1 cm od lijevog ruba ploče u obliku točke. Pomoću *Hamilton* štrcaljke nanošen je standard i 0,5 cm udesno uzorak, kao niz mikrokapljica 1×1 cm od desnog ruba ploče. Između nanosa mikrokapljica nizovi su sušeni hladnim zrakom. Nakon nanošenja uzoraka kromatografska ploča sušena je u eksikatoru 20 minuta zbog reaktivacije. Za razvijanje pločice u prvoj dimenziji korišteno je otapalo kloroform/metanol/0,25% KCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) u omjeru 60:42:11. Kromatografija je razvijana do 2,5 cm od ruba ploče, kromatogram je izvađen i sušen u sušaču gelova (GelAir Drying System, BIO-RAD Laboratories, CA, USA) hladnim zrakom jedan sat.



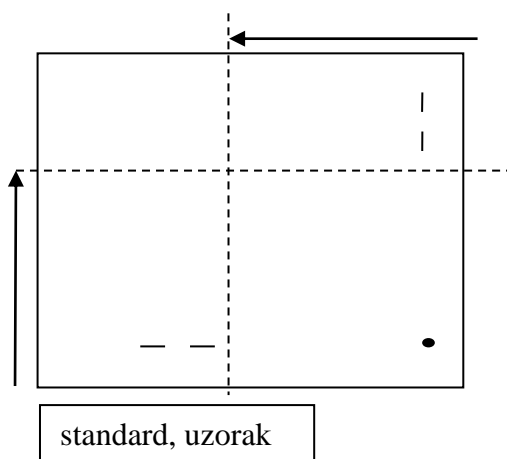
**Slika 6.** Shematski prikaz nanošenja uzorka i standarda u prvoj dimenziji 2D-TLC

Osušena ploča inkubirana je preko noći u parama amonijaka na sobnoj temperaturi (Sonnino i sur. 1983).

Sljedeći dan nakon vađenja iz para amonijaka kromatogram se sušio u sušaču gelova (GelAir Drying System, BIO-RAD Laboratories, CA, USA) hladnim zrakom dva sata radi isparavanja para amonijaka.

Nakon toga pristupilo se drugoj dimenziji. Ploča je okrenuta za 90° suprotno od kazaljke na satu, te 1×1 cm od lijevog ruba ploče (dio gdje nije prošla otapalo u prvoj dimenziji) pomoću *Hamilton* štrcaljke nanošen je standard i 0,5 cm ulijevo uzorak, kao niz

mikrokapljica. Između nanosa mikrokapljica nizovi su sušeni hladnim zrakom. Nakon nanošenja uzorka kromatografska ploča sušila se 20 – 30 min zbog aktivacije. Svježa mobilna faza dodavana je u kromatografsku komoru 30 min prije razvijanja. Kromatografija u drugoj dimenziji razvijana je do 2,5 cm od ruba ploče odnosno do mjesta nanošenja standarda i uzorka u prvoj dimenziji kako je prikazano na Slici 7. Potom se kromatogram izvadio i sušio nad sušionikom. Za detekciju gangliozida, pločica je poprskana Svennerholmovim reagensom, prekrivena čistom vrućom staklenom pločom istih dimenzija, učvršćena hvataljkama, a zatim zagrijana u sušioniku (Conterm 19L, J.P. Selecta, Barcelona, Espana) pri 110°C 30 minuta.



**Slika 7.** Shematski prikaz nanošenja uzorka i standarda u drugoj dimenziji 2D-TLC

### 3.2.5. Imuno-tankoslojna kromatografija

Imuno-tankoslojna kromatografija provedena je u dva glavna stupnja. Prvo su ekstrahirani gangliozidi nanešeni na ploče za tankoslojnu kromatografiju i razvijeni u sustavu otapala radi razdvajanja, nakon čega su razvijene ploče obložene tankim filmom plastične mase i izložene protutijelima na kompleksne gangliozide odabrane za analizu i vizualizirane.

Prije nanošenja na ploču za tankoslojnu kromatografiju visoke djelotvornosti (HPTLC ploča, sa slojem silikagela 60 na aluminiju, Merck, Darmstadt, Germany) koje su dar prof. dr. sc. Milana Čačića, ploča dimenzija 20×20 cm izrezana je na ploče dimenzija 10×7 cm radi dobivanja dvije polovice ploče od 5×7 cm. Nakon toga provedena je aktivacija ploče zagrijavanjem pri 110°C kroz 20 minuta te hlađenje u eksikatoru s osušenim silikagelom kao

indikatorom vlažnosti. Uzorci su prije nanošenja otopljeni u otapalu kloroform/metanol/voda u omjeru 60:30:4,5 čiji volumen odgovara masi mozga.

Na pločicu je *Hamilton* štrcaljkom (Hamilton Co., Reno, NV, USA) kao niz mikrokapljica nanošeno 7 µg gangliozida iz ekstrakta mozga usporedno sa standardom uz sušenje svakog nanosa uzorka hladnim zrakom. Nakon nanošenja uzoraka na obje polovice, kromatografska ploča sušena je u eksikatoru 20 minuta zbog reaktivacije. Za razvijanje pločice s uzorcima korišteno je otapalo kloroform/metanol/0,25% KCl/2,5M NH<sub>4</sub>OH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) u omjeru 60:42:10,5:0,5. Prije detekcije pločica je dobro osušena i prerezana na dvije polovice od 5×7 cm. Za detekciju gangliozida, jedna polovica poprskana je Svennerholmovim reagensom kako je već opisano, a druga je korištena za imunoprepoznavanje modificiranim protokolom prema Schnaaru (Lopez i Schnaar 2006). Uranjanjem u 0,1% poliizobutilmetakrilat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u *n*-heksanu (Carlo Erba Reagent, Val-de-Reuil, France) u vremenu od 90 s izbjegnuto je odvajanje slilika gela s pločica. Pripremljena je 5% (w/v) matična otopina poliizobutilmetakrilata u kloroformu koja je neposredno pred upotrebu razrijeđena u radnu koncentraciju 0,1% w/v u *n*-heksanu. Oblaganje poliizobutilmetakrilatom rezultira manjim pozadinskim vezanjem i znatno poboljšanom osjetljivošću. Pretpostavlja se da hidrofobni plastični premaz reorijentira glikolipide tako da je njihov polarni glikan okrenut od sloja sorbensa, a prema otapalu, gdje je učinkovitije komplementarno vezanje (Karlsson i Stromberg 1987). Nakon sušenja, ploče su uronjene u 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u 0,1M PBS-u (pufer B), a nespecifično vezanje protutijela blokirano je otopinom 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) i 0,05% Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) u 0,1M PBS-u (pufer A) u trajanju od 15 min na +4°C i uz neprekidno lagano treskanje (Heidolph Rotamax 120, Schwabach, Germany). Ploče su inkubirane u primarnom protutijelu preko noći (+4°C uz neprekidno treskanje). Korištena su visokospecifična monoklonska protutijela IgG klase na kompleksne gangliozide GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) koja su dar prof. dr. sc. Ronalda Schnaara te visokospecifično monoklonsko protutijelo IgM klase A2B5 na c-seriju gangliozida (Chemicon International, Temecula, CA, USA), razrijeđena u omjeru 1:10 000 u puferu A. Nakon toga ploče su isprane pet puta uranjanjem 1min u 0,1M PBS s 0,05% Tween 20 (pufer B) te inkubirane u sekundarnom protutijelu kroz 90 min na +4°C uz neprekidno lagano treskanje. Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozji anti-mišji IgG obilježen peroksidazom (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA), odnosno biotinilirano kozje anti-mišje IgM protutijelo (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) razrijeđeno

u omjeru 1:5000 u puferu A. Iz sekundarnog protutijela biotiniziranog kozjeg anti-mišjeg IgM ploče su isprane 3 puta po 1 minutu u pothlađenom puferu B i prebačene u tercijarni kompleks, *Vector Elite kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), pripremljen u skladu s uputama proizvođača u puferu A. Ploče su inkubirane 45 min na +4°C uz neprekidno lagano treskanje. Nakon ispiranja, frakcije koje na sebi imaju vezan kompleks primarnog i sekundarnog protutijela te tercijarnog kompleksa, vizualizirane su smjesom koja sadrži DAB (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Pozitivna reakcija vidljiva je kao smeđe do sivo obojenje. Reakcija je zaustavljena ispiranjem u vodi, nakon čega su ploče dobro osušene i skenirane.

### **3.2.6. Izrada histoloških rezova**

Serijski rezovi fiksiranog tkiva mozga, debljine 35 µm, izrezani su na kriostatu u koronarnom ili sagitalnom smjeru (Leica, CM3050S, Germany). Rezovi su skupljani u označene polistirenske jažice napunjene 0,1M PBS-om. Rezovi koji nisu bojani imunohistokemijskim metodama u roku od tjedan dana prebačeni su u označene polistirenske jažice napunjene DeOlmos otopinom. Otopine za pohranu koriste se za održavanje antigenske aktivnosti tako da imunocitokemijska reakcija može biti izvedena na pohranjenim rezovima pri -20°C na duže vrijeme. Otopine uglavnom sadrže saharozu i etilen-glikol, koji čuvaju tkivo od pucanja pri smrzavanju. DeOlmos otopina je pripremljena prema sljedećem receptu: 300g saharoze, 10g polivinilpirolidona, 300 ml etilenglikola, 500 ml 0,1 M PBS (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA), pH 7,2 i vodom nadopunjeno do 1000 ml.

### **3.2.7. Imunohistokemijske metode**

Imunohistokemija je rađena na slobodno plutajućim rezovima debljine 35 µm. Polovina rezova prethodno su navučeni na nesilanizirana stakalca i preko noći tretirani parama amonijeve lužine radi dokazivanja modifikacija osjetljivih na alkalijsku razgradnju. Sljedeći dan stakalca su izvađena i sušena u sušaču gelova (GelAir Drying System, BIO-RAD Laboratories, CA, USA) hladnim zrakom jedan sat radi isparavanja para amonijaka. Zatim su rezovi skinuti sa stakalaca uranjanjem u destiliranu vodu te prebačeni u polistirenske jažice napunjene 0,1M PBS-om.

Korištena su visokospecifična monoklonska protutijela IgG klase na kompleksne gangliozide GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan) i visokospecifično monoklonsko protutijelo IgM klase anti-A2B5 (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Rezovi su prethodno tretirani 1%-tnim vodikovim peroksidom

(Kemika, Zagreb) radi uklanjanja aktivnosti endogenih peroksidaza. Nespecifično vezanje protutijela blokirano je otopinom koja je sadržavala 1% goveđeg serumskog albumina (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) i 5% kozjeg seruma (Gibco, Invitrogen Auckland, New Zealand) u 0,1M PBS-u u trajanju od 2 sata na +4°C i uz neprekidno treskanje (Heidolph Rotamax 120, Schwabach, Germany). Inkubacija u primarnom protutijelu trajala je preko noći (+4°C uz neprekidno treskanje). Primarna protutijela na gangliozide pripremana su u otopini za blokiranje, a korištena su u slijedećim omjerima: anti-GM1, 1:1000; anti-GD1a, 1:2000; anti-GD1b, 1:2000; anti-GT1b, 1:10000 i A2B5, 1: 300. Nakon toga rezovi su tri puta isprani u pothlađenom 0,1M PBS na rashladnoj ploči pri -4°C (J.P. Selecta, Barcelona, Espana) te inkubirani u sekundarnom protutijelu kroz 4 sata na +4°C uz neprekidno treskanje. Kao sekundarno protutijelo korišten je biotinizirani kozji anti-mišji IgG ili IgM (Jackson ImmunoResearch lab., West Grove, PA, USA) razrijeđen u omjeru 1:500 u otopini za blokiranje. 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), pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Ovaj tercijarni kompleks sastoji se od avidina i biotinizirane peroksidaze te se zbog toga prije upotrebe treba prekonjugirati u otopini za blokiranje u trajanju od oko pola sata. U tercijarnom protutijelu preparati su inkubirani 2 sata na +4°C uz neprekidno treskanje. Rezovi su ponovno isprani, a potom su razvijeni smjesom koja sadrži DAB (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Pozitivna reakcija vidljiva je kao smeđe do sivo obojenje na mjestima gdje je došlo do vezanja primarnog protutijela.

Preparati su još jednom isprani s 0,1M PBS-om, a potom su iz destilirane vode navučeni na silanizirana predmetna stakalca, osušeni i skenirani na skeneru Super Coolscan 9000 (Nikon, Tokyo, Japan). Preparati su pokriveni pokrivalom Vectamount (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) te mikroskopirani mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) uz slikanje aparatom (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Slike su obrađene i pripremljene za tisak programima Photoshop CS2 i CorelDraw X3.

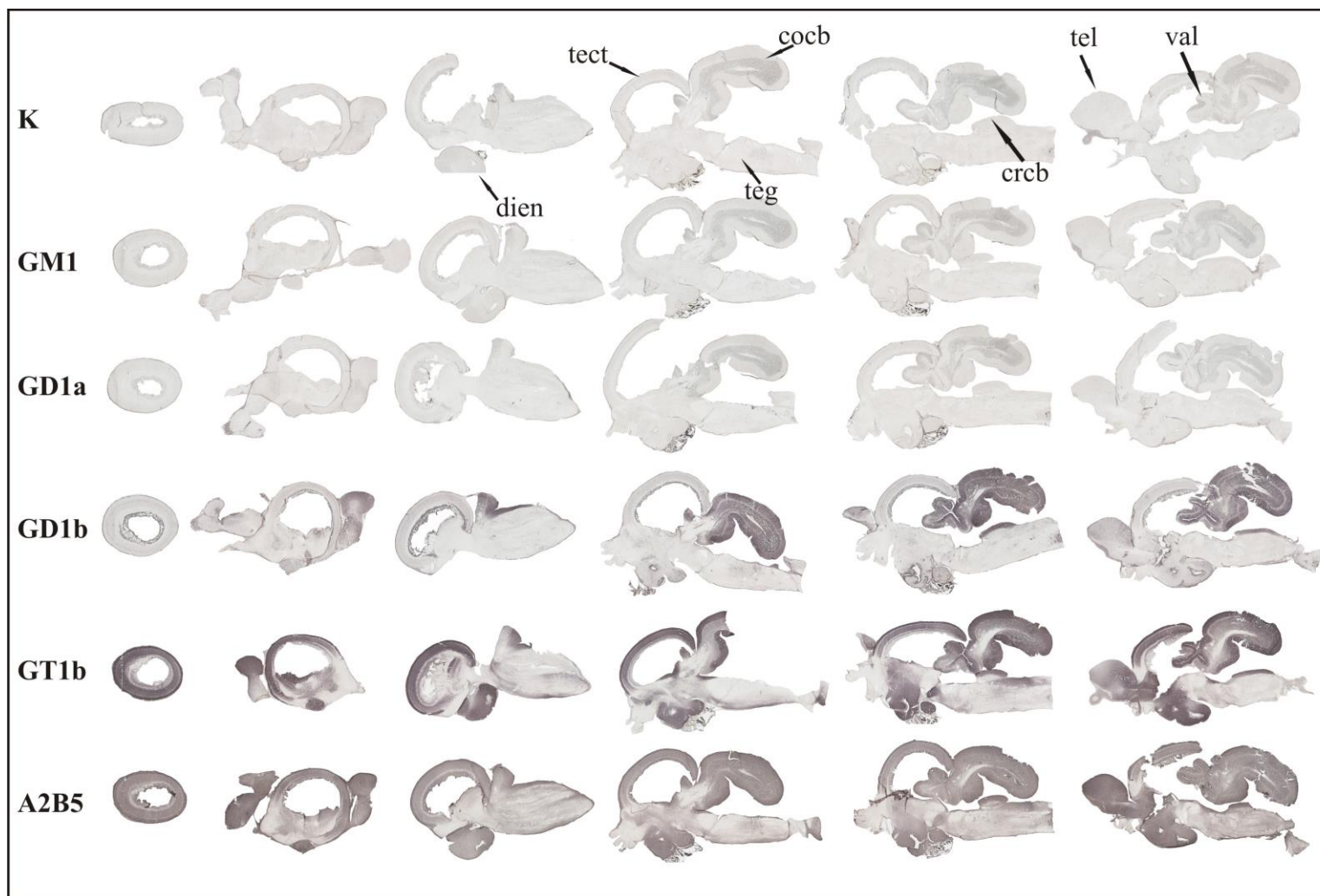
### 4.1. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) iz podrazreda zrakoperki (*Actinopterygii*)

Imunohistokemija s visokospecifičnim monoklonskim protutijelima IgG klase na kompleksne gangliozide GM1, GD1a, GD1b, GT1b i IgM klase A2B5 pokazala je različitu zastupljenost pojedinih kompleksnih gangliozida u mozgu dviju odabranih vrsta riba iz podrazreda zrakoperki (*Actinopterygii*).

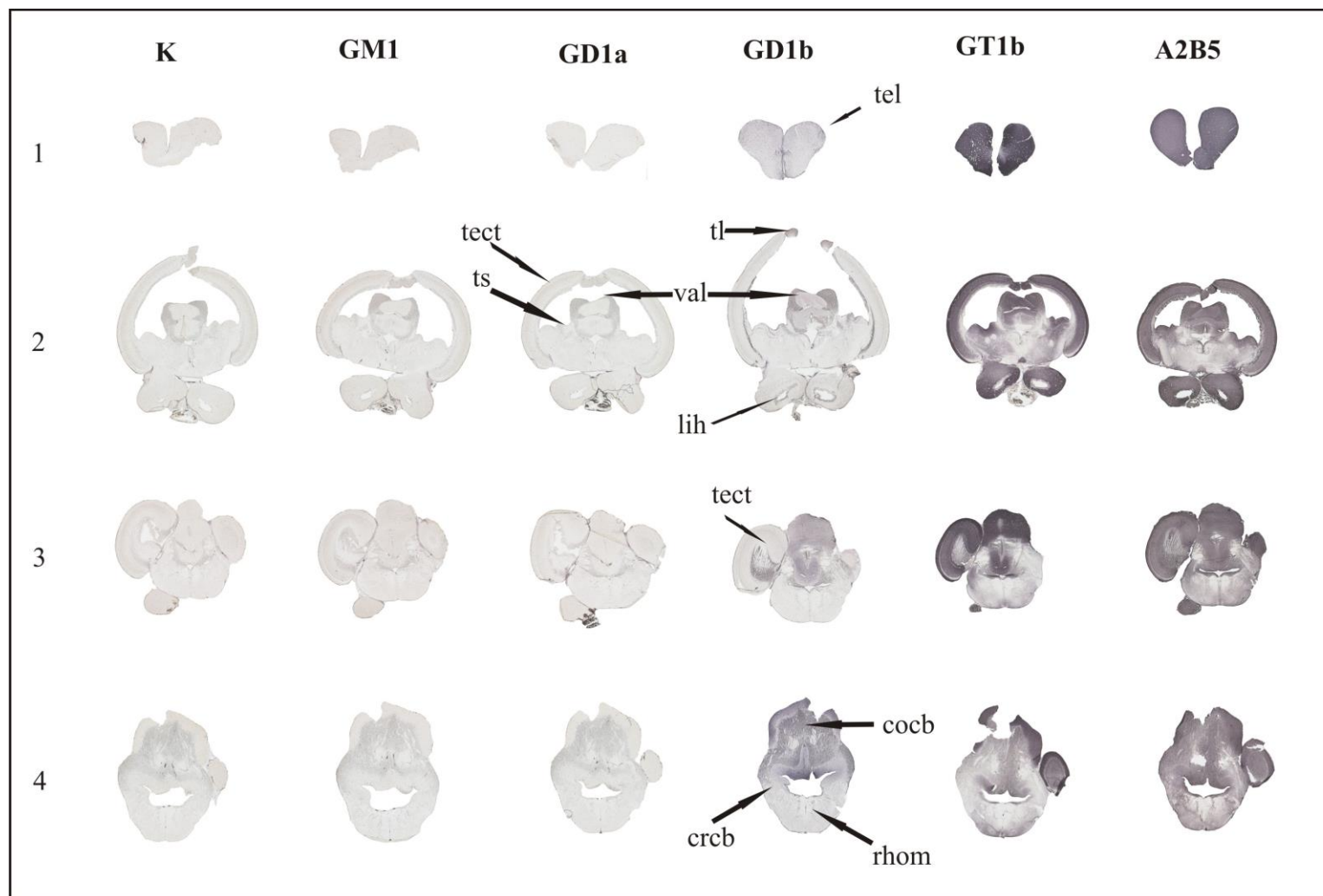
Na slikama od 8. - 11. prikazane su odabrane razine mozga obje ribe pri ekstremnim temperaturnim uvjetima (zima-ljeto) kako bi se dobio opći uvid u regije obuhvaćene u ovom radu. U daljnjim rezultatima prikazuju se promjene tijekom odabranih mjeseci po pojedinim regijama zasebno.

Slika 8. prikazuje ekspresiju kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) na sagitalnim rezovima tijekom siječnja. Na slici 9. nalazi se prikaz mozga dužičaste pastrve rezan u koronarnoj ravnini te se može uočiti ekspresija spomenutih gangliozida tijekom svibnja. Gledajući od rostralnog prema kaudalnom kraju može se uočiti ekspresija gangliozida GT1b u cijelom mozgu. Gangliozid GT1b zastupljen je u krajnjem mozgu, u međumozgu, odnosno hipotalamusu, zatim u srednjem mozgu (*tectum opticum* i *torus longitudinalis*) te u strukturama malog mozga (*valvula cerebelli*, *corpus cerebelli* i *crista cerebelli*). Protutijelo A2B5 imalo je pozitivnu reakciju u cijelom mozgu, a protutijelo na GD1b u sve tri strukture malog mozga.

Slike 10. i 11. pokazuju zastupljenost gangliozida u cijelom mozgu običnog šarana (*Cyprinus carpio*). Gangliozid GD1a zastupljen je u svim dijelovima mozga, od krajnjeg mozga, međumozga i srednjeg mozga pa sve do malog i stražnjeg mozga gdje je u rostralnom dijelu utvrđena ekspresija u glosofaringealnom, facijalnom i vagalnom režnju. Ekspresija gangliozida GD1b utvrđena je u srednjem i malom mozgu (*lateralna valvula cerebelli* i *corpus cerebelli*) te dosta slaba ekspresija u krajnjem mozgu. Utvrđena je jaka ekspresija gangliozida GT1b u svim dijelovima mozga, kao i A2B5-epitopa.

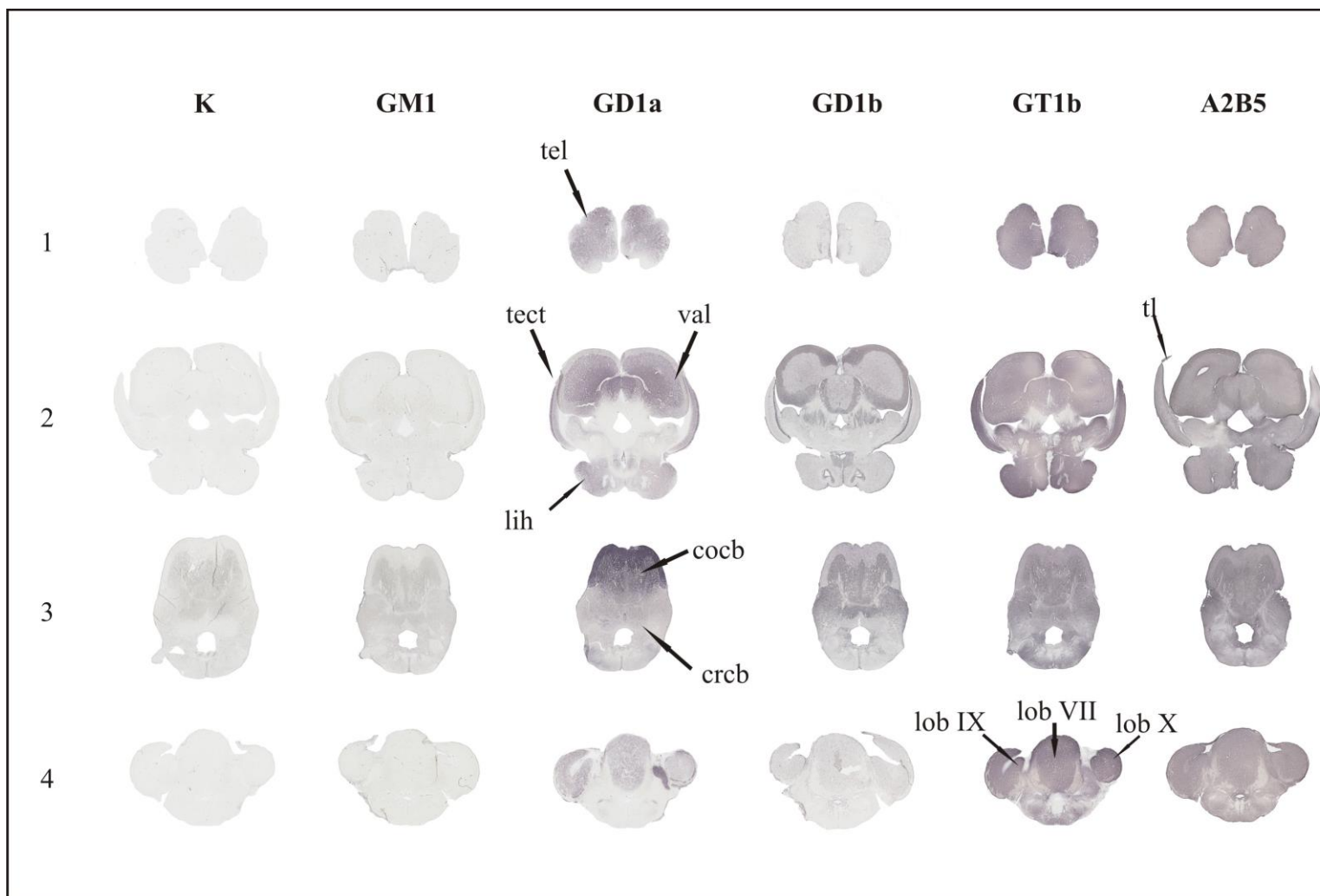


**Slika 8.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom siječnja.

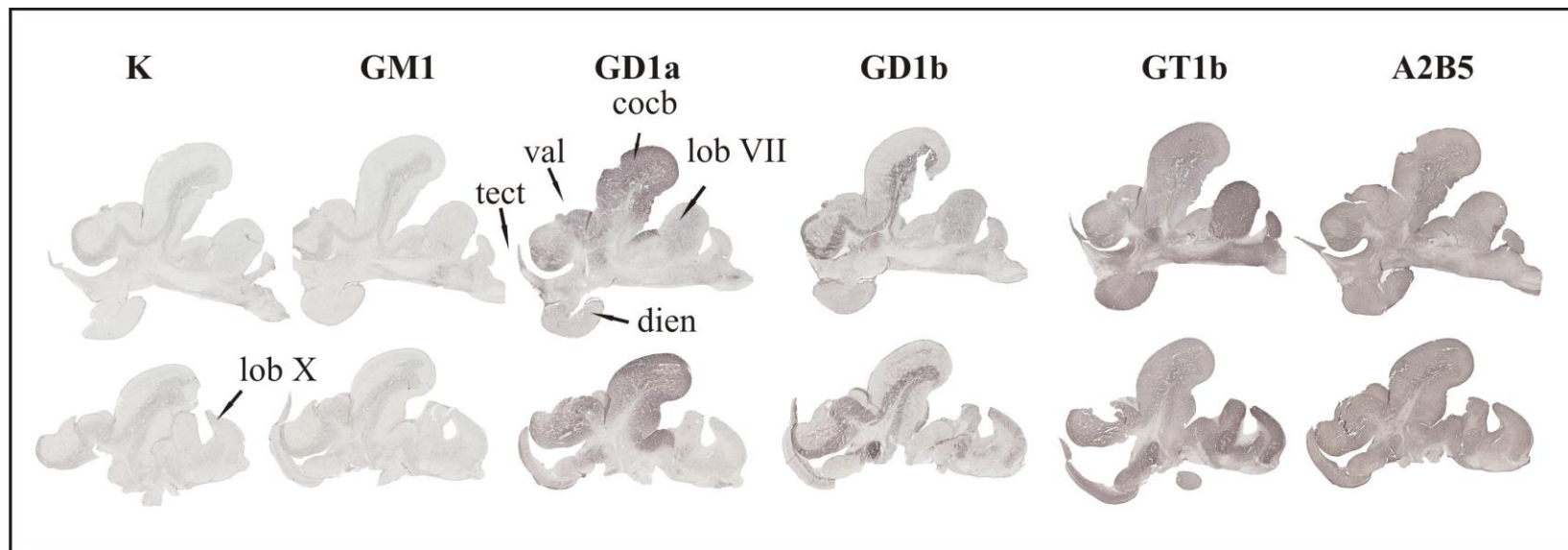


**Slika 9.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom svibnja. 1) *telencephalon*; 2) kaudalni *mesencephalon*, kaudalna *valvula cerebelli* i kaudalni hipotalamus; 3) rez kroz *isthmus* regiju i rostralni *cerebellum*; 4) rostralni *rhombencephalon* i kaudalni *cerebellum*.





**Slika 10.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom siječnja. 1) telencephalon; 2) mesencephalon, valvula cerebelli i hipotalamus; 3) cerebellum; 4) rostralni rhombencephalon.

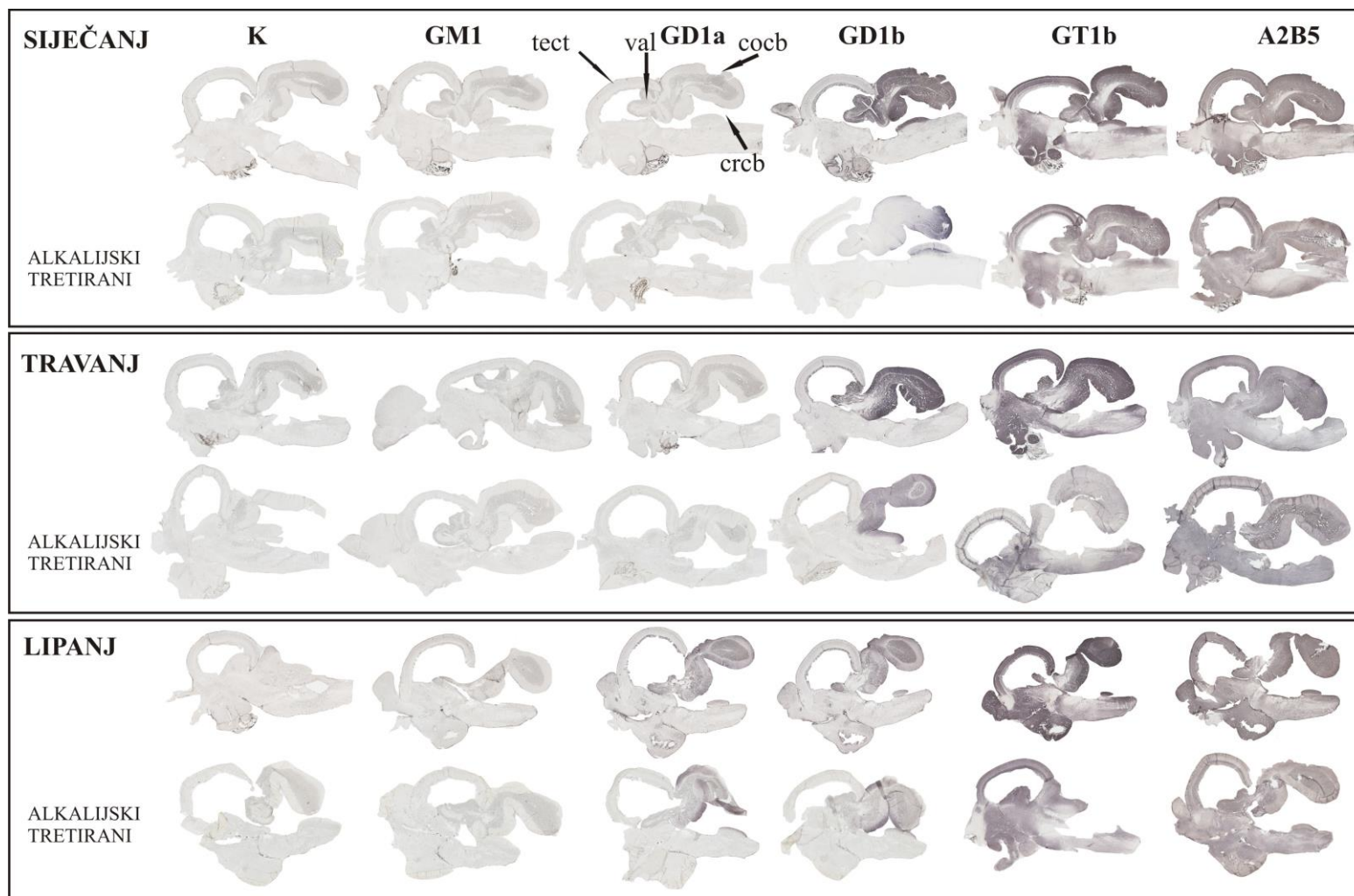


**Slika 11.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom lipnja.

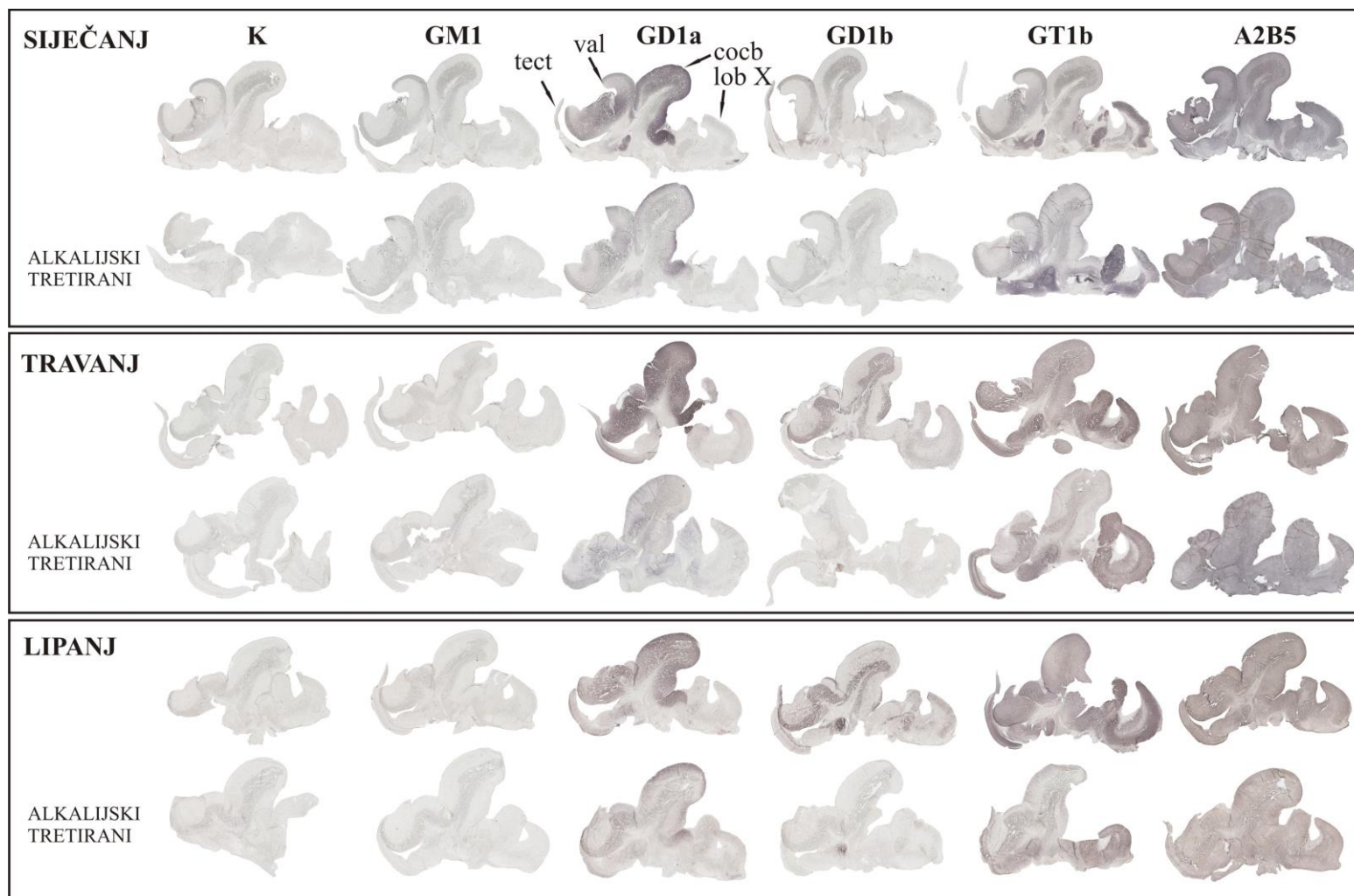
#### 4.1.1. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci

Slika 12. prikazuje ekspresiju kompleksnih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) na sagitalnim rezovima tijekom odabranih mjeseci. Može se uočiti pojava ekspresije gangliozida GD1a tek tijekom lipnja u strukturama malog mozga (*valvula cerebelli*, *corpus cerebelli* i *crista cerebelli*) i u srednjem mozgu (*tectum opticum*). Protutijelom na GD1b može se uočiti smanjenje ekspresije u strukturama malog mozga tijekom lipnja u odnosu na siječanj. Tretiranje parama amonijaka smanjuje reaktivnost protutijela anti-GD1b na rezovima mozгова u svim sezonama, ali je reaktivnost relativno najveća u lipnju. GT1b ima široku ekspresiju od rostralno prema kaudalno, a nakon tretiranja parama amonijaka reakcija na rezovima je slabija. Protutijelo A2B5 imalo je pozitivnu reakciju u cijelom mozgu sa i bez tretiranja amonijakom.

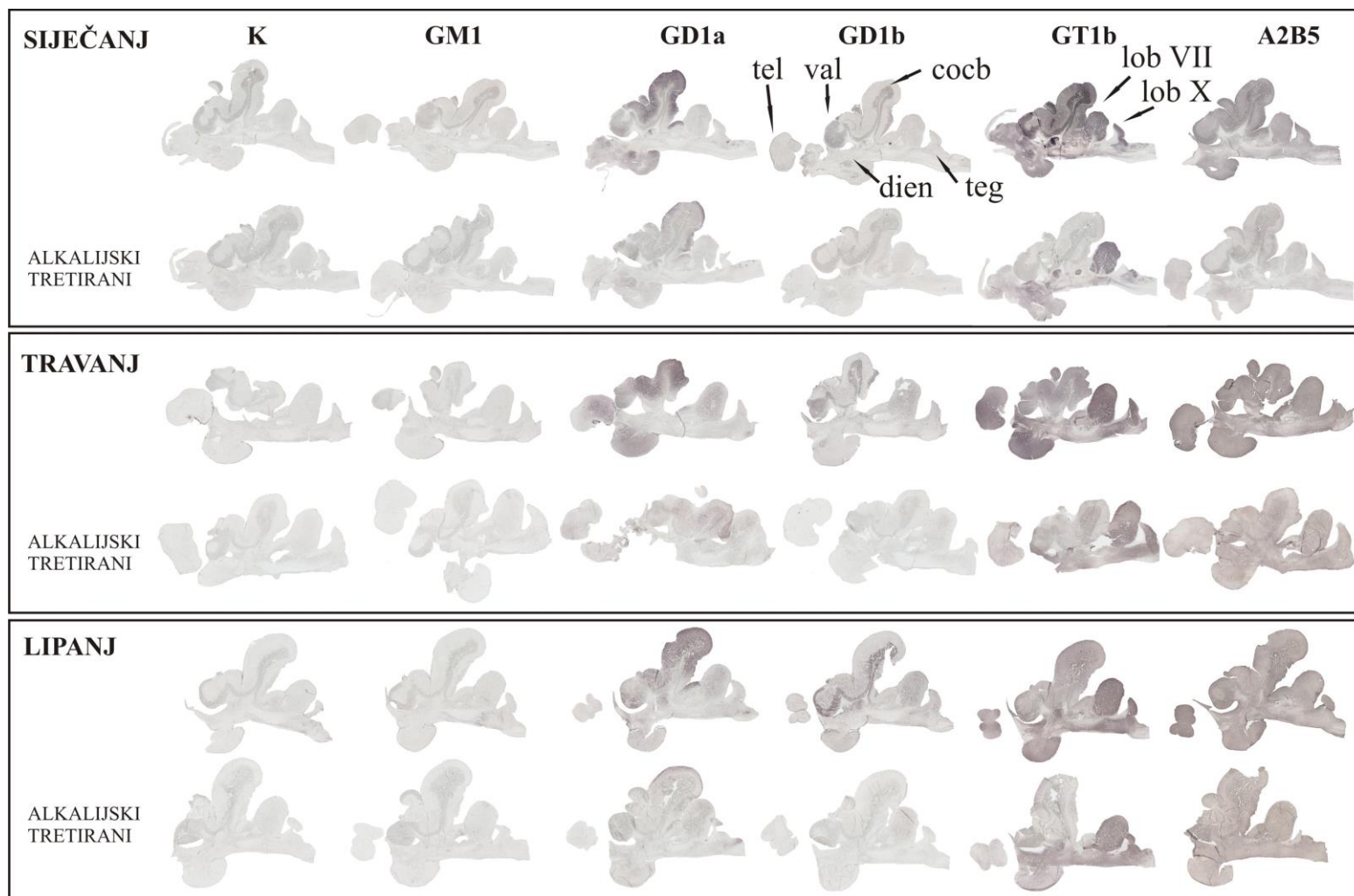
Slike 13a. i 13b. prikazuju ekspresiju kompleksnih gangliozida u mozgu običnog šarana (*Cyprinus carpio*) na sagitalnim rezovima tijekom odabranih mjeseci s napomenom da Sl. 13a. prikazuje mediosagitalni rez, dok 13b. parasagitalni rez radi prikazivanja dodatnih lateralnih struktura mozga o. šarana. U toplijim mjesecima vidljivo je smanjenje jačine ekspresije gangliozida GD1a u *corpus cerebelli*, a povećanje u optičkom tektumu. Može se uočiti opća zastupljenost gangliozida GT1b u cijelom mozgu tijekom svi mjeseci, a posebno i u facijalnom (*lob VII-lobus facialis*) i vagalnom režnju (*lob X-lobus vagus*) stražnjeg mozga. Gangliozid GT1b ima jaču ekspresiju u zimskim mjesecima u *corpus cerebelli*, a manju u optičkom tektumu. Gangliozid GD1a je zastupljeniji u molekularnom sloju korpusa malog mozga (*corpus cerebelli*), dok je gangliozid GD1b utvrđen u granularnom sloju. A2B5- epitop široko je eksprimiran od rostralnog prema kaudalnom dijelu, a nakon tretiranja amonijakom distribucija se ne mijenja te je nešto slabija na rezovima od lipnja.



**Slika 12.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci.



**Slika 13a.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci.



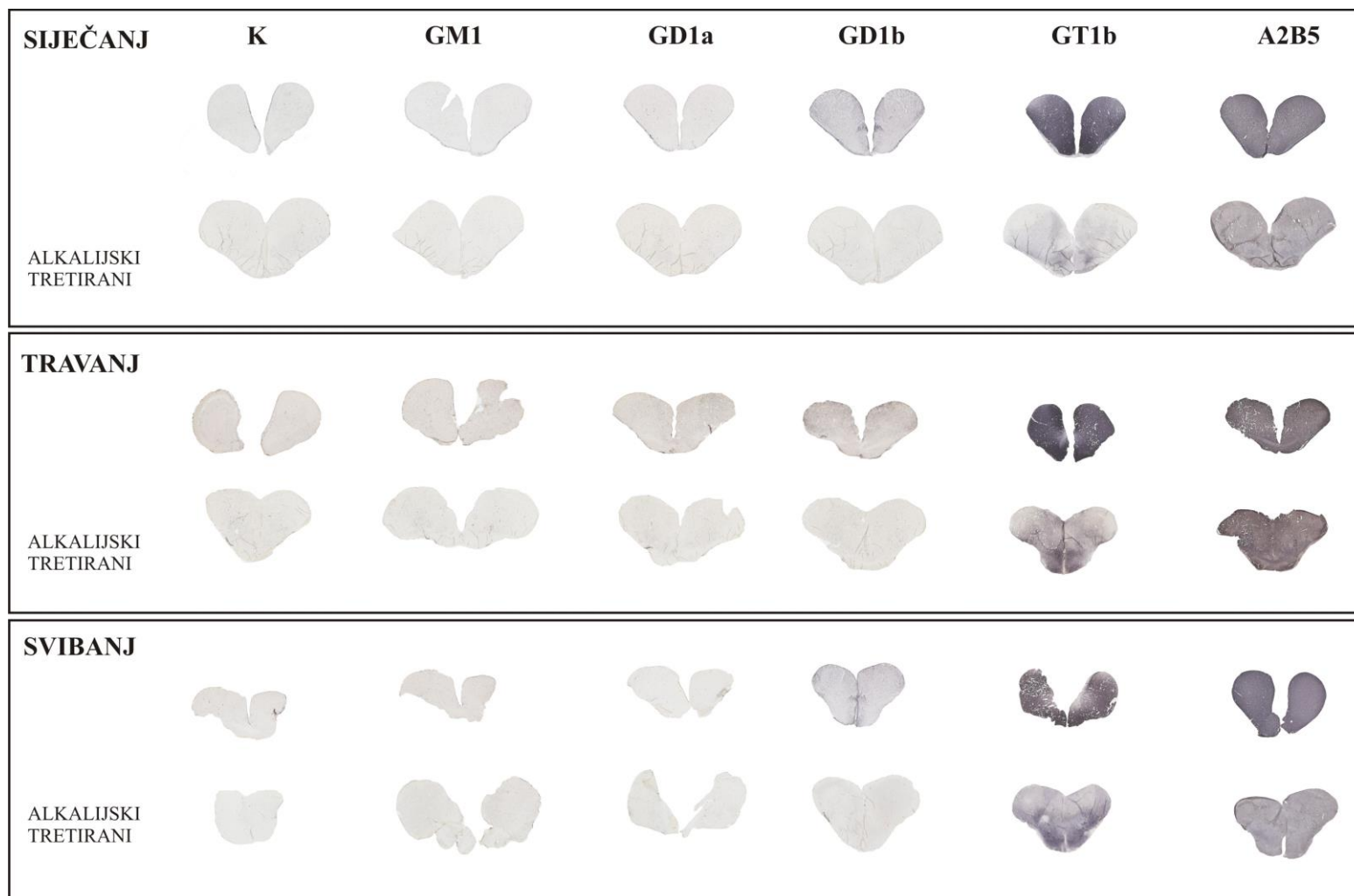
**Slika 13b.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci.

#### **4.1.2. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u krajnjem mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci**

Krajnji mozak (*telencephalon*) je najviše rostralni, razmjerno mali i izvučeni dio mozga koštunjača. Ključna razlika krajnjeg mozga riba od ostalih kralježnjaka rezultat je morfogenetskog razvoja nazvanog everzija. Kod koštunjača *telencephalon* se ne sastoji od šupljih hemisfera oko lateralnih ventrikula, već od masivnih hemisfera s ventrikularnim područjem smještenim na samoj površini, zbog čega je teško odrediti homologiju s ostalim kralježnjacima (Nieuwenhuys i Meek 1990). Iz bazalnog dijela krajnjeg mozga rostralno se pružaju njušne lukovice (*bulbus olfactorius*) koje su povezane s bočnim komorama (*ventriculus laterales, ventriculus primus et secundus*) čija veličina ovisi o korištenju njuha, pa su kod o. šarana razvijenije nego u d. pastrve (Bogut i sur. 2006).

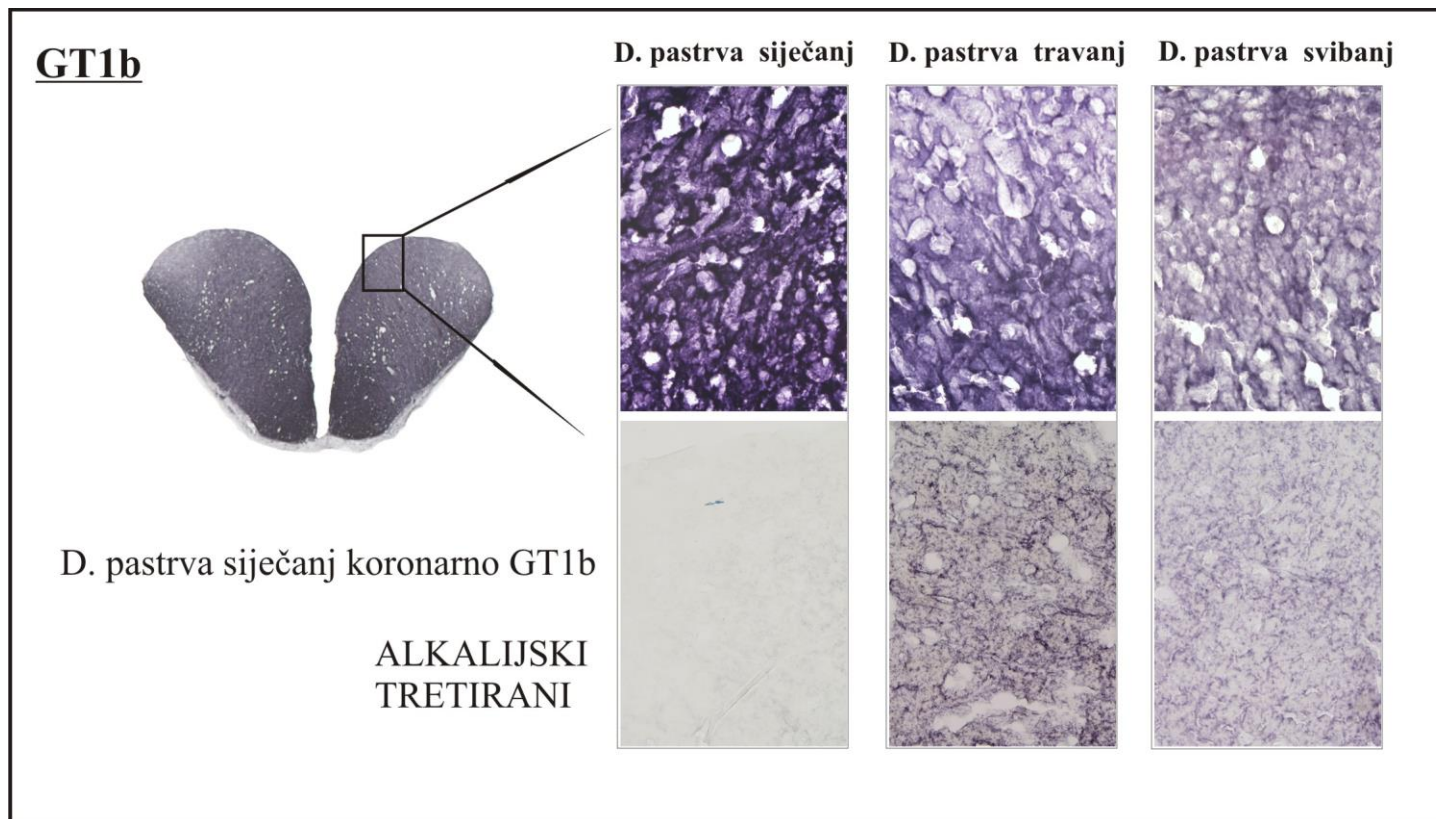
Krajnji mozak dužičaste pastrve nema nikakvu reaktivnost na GM1 i GD1a, a pozitivan je na gangliozide GD1b i GT1b, te A2B5 (Sl. 14). Nakon tretiranja amonijakom gubi se reaktivnost GD1b protutijela, a smanjuje reaktivnost na anti-GT1b. Gangliozid GT1b ima jaču ekspresiju tijekom siječnja, osobito u mediobazalnom dijelu, a u narednim mjesecima reaktivnost se smanjuje (Sl. 15.).

O. šaran u krajnjem mozgu ima jaču ekspresiju gangliozida GD1a, GT1b i A2B5 i slabiju ekspresiju GD1b te nema reaktivnost na GM1 (Sl. 16). Gangliozid GD1a ima jaču ekspresiju ljeti (Sl. 17.). Nisu vidljive znatnije promjene ekspresije ostalih gangliozida u telencefalonu tijekom odabranih mjeseci.

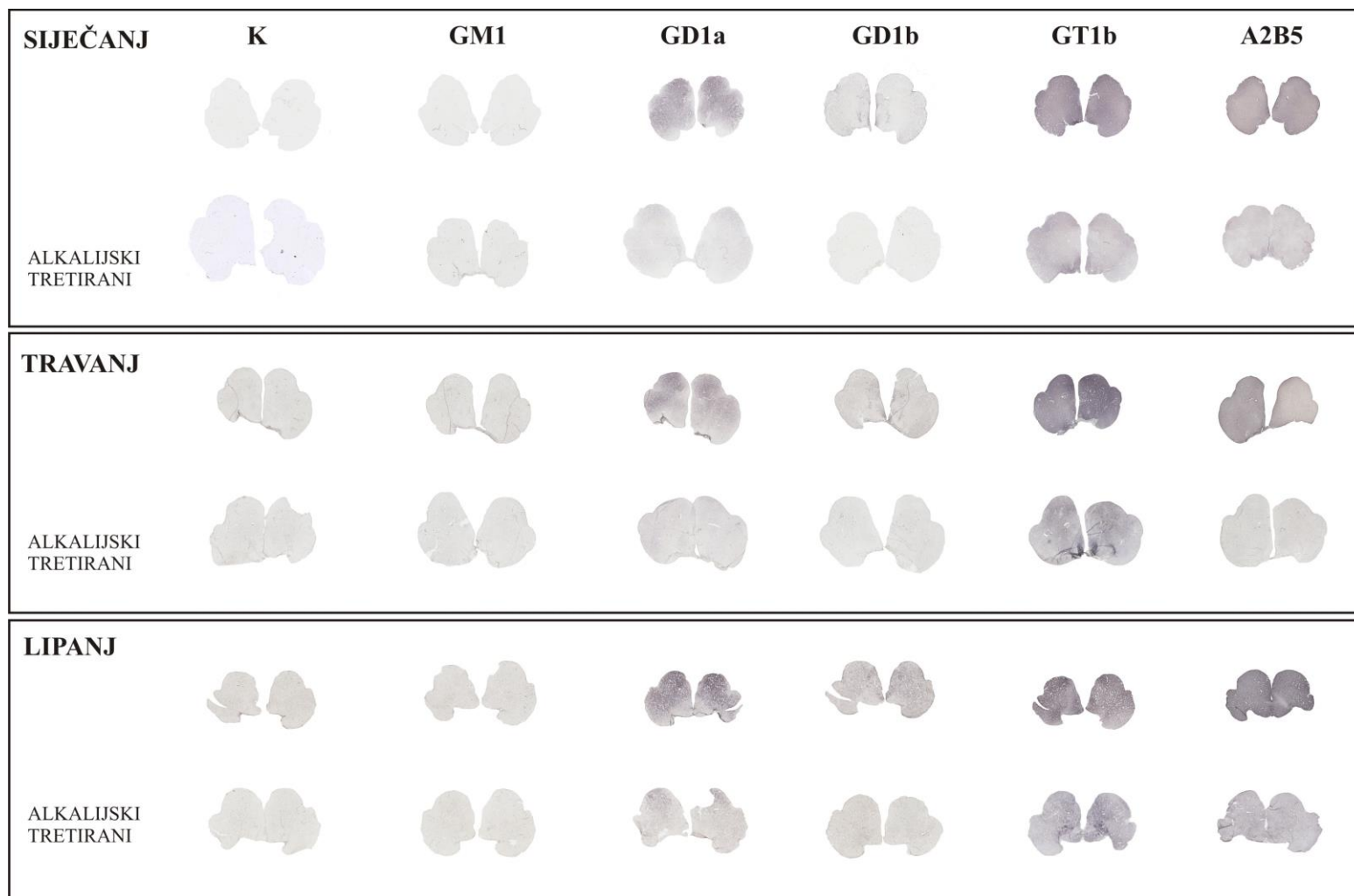


**Slika 14.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, regija *telencephalon*.

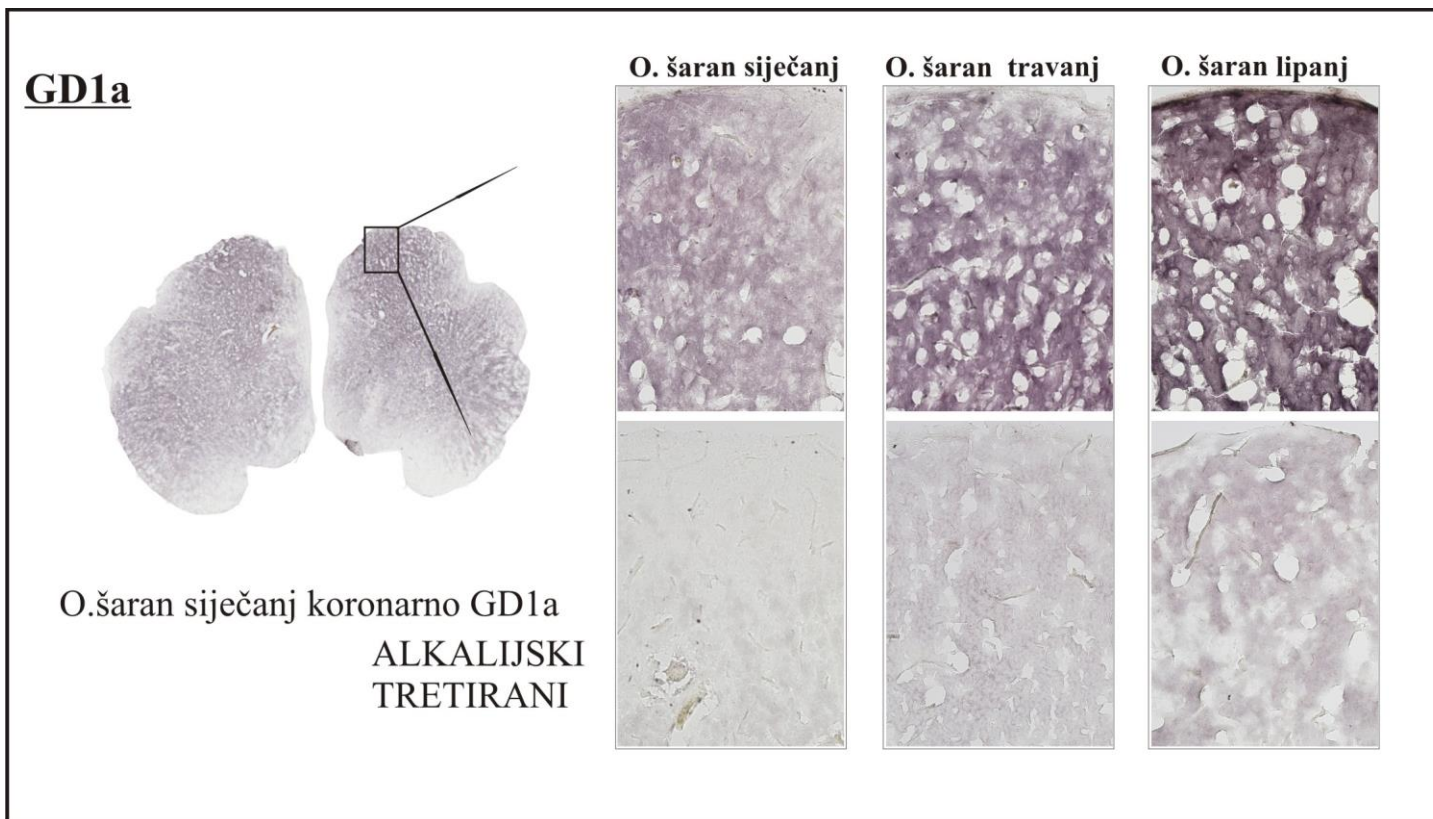




**Slika 15.** Ekspresija gangliozida GT1b prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, regija *telencephalon, pars dorsalis* pod povećanjem 200×.



**Slika 16.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *telencephalon*.



**Slika 17.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *telencephalon, pars dorsalis* pod povećanjem 200×.

#### **4.1.3. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u međumozgu i srednjem mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci**

Međumozak (*diencephalon*) je relativno mali dio mozga na ventralnoj strani, smješten između mezencefalona i telencefalona koji kod odraslih koštunjača nema oštre granice. U međumozgu je smještena treća moždana komora (*ventriculus tertius*). Može se podijeliti na epitalamus, dorzalni (mali) i ventralni talamus te hipotalamus, no radi nejasnih granica uključene su i pretektalna i preoptička regija (Nieuwenhuys i Meek 1990, Braford i Northcutt 1983). Dio epitalamusa je epifiza (*corpus pineale*) koja upravlja reakcijom riba na svjetlo i tamu (Bogut i sur. 2006), koja je ključna za sinkronizaciju ritma dana i noći (Ekström 1987). Hipotalamus je najveći dio te služi za integraciju endokrinog i živčanog sustava. Ispod njega u turskom sedlu (*sella turcica*) klinaste kosti nalazi se hipofiza (*glandula pituitaria*). Hipotalamus je izgrađen od tri regije: periventrikularna zona, medijalno smještena tuberalna regija te najveća lateralno smještena regija donjih režnjeva (*lobus inferior hypothalami- lih*) (Braford i Northcutt 1983).

Srednji mozak (*mesencephalon*) je razmjerno najveći dio mozga koštunjača. Nastavlja se iz talamusa, a kaudalno se proteže do leđne moždine (*medulla oblongata*). Sastoji se od ventromedijalno smještenog tegmentuma, ventrolateralno smještenog torus semicircularisa i dorzalno krova, odnosno vidnog tektuma (*tectum opticum*). Krovni dio srednjeg mozga brazdom je podijeljen na dva jednaka režnja, te predstavlja vidni korteks (*tectum mesencephali*) koji pokriva velike ventrikule srednjeg mozga (Nieuwenhuys i sur. 1998). Slojevite je građe te sve prave koštunjače imaju 7 slojeva, a debljina slojeva varira među vrstama.

Srednji mozak (*mesencephalon*) dužičaste pastrve nema nikakvu reaktivnost na GM1, a pozitivan je na gangliozide GD1b i GT1b, te A2B5-epitop (Sl. 18). Cerebelarna valvula se podvlači ispod optičkog tektuma rostralno u ventrikul srednjeg mozga, no zapravo je dio malog mozga (*cerebellum*) te će biti opisana kasnije.

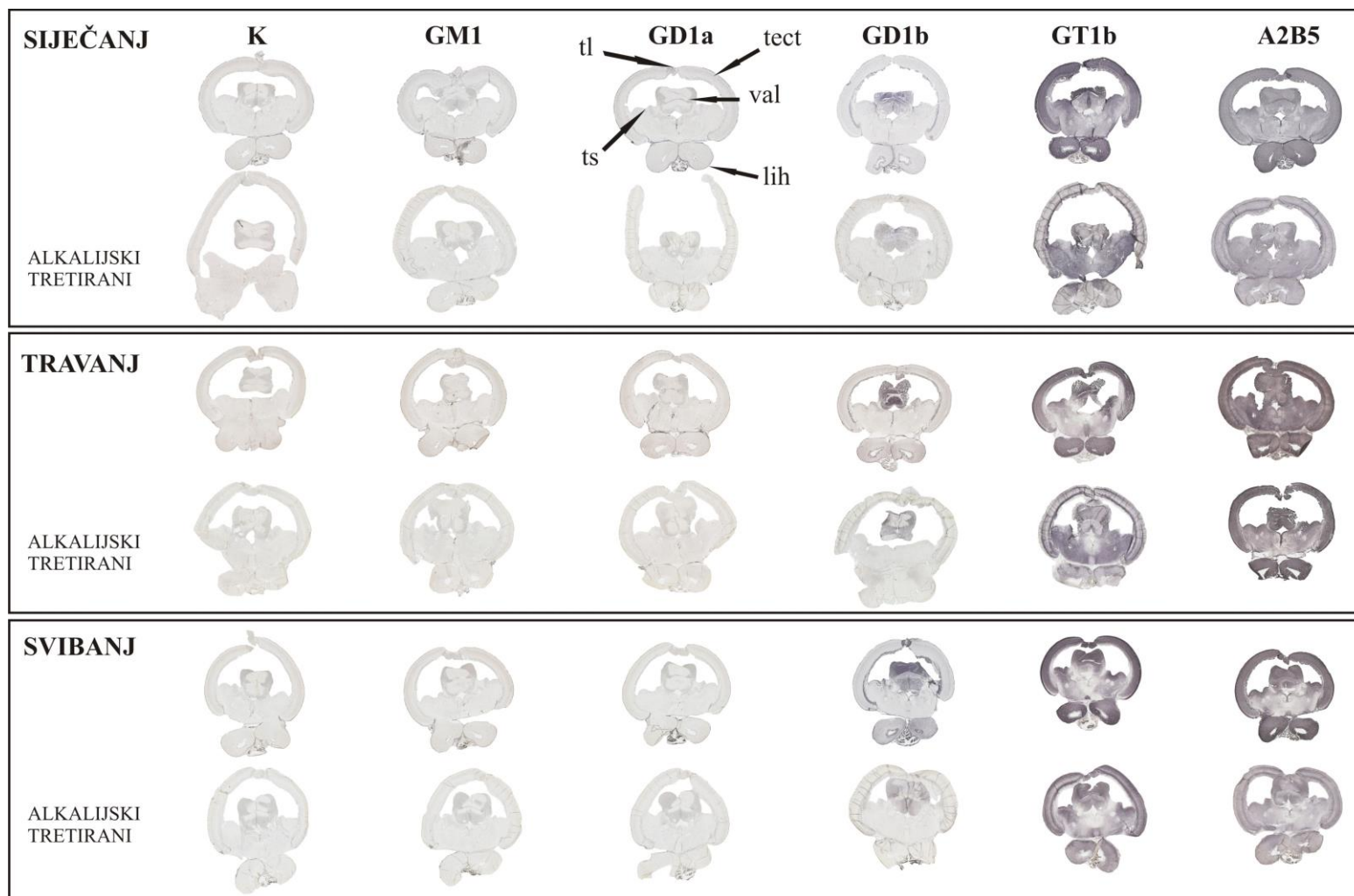
Optički tektum dužičaste pastrve pozitivan je na GD1a, GD1b i GT1b gangliozide, te A2B5. Ekspresija gangliozida GD1b slabija je u odnosu na GT1b kod kojeg su prisutne neznatne promjene tijekom mjeseci, ali i nepromijenjena reakcija alkalijski labilnih gangliozida u svim mjesecima (Sl. 19). Na slici 19. vidljiva je jača ekspresija GT1b u 2. i 7. sloju tektuma tijekom svibnja. GD1a i GD1b gangliozidi najzastupljeniji su u prvom sloju, dok manju zastupljenost pokazuju u trećem i šestom sloju. Ekspresija gangliozida GD1a u 1.

sloju tektuma može se uočiti tek tijekom lipnja za razliku od GD1b koji je prisutan u svim promatranim mjesecima (Sl. 20. i 21.).

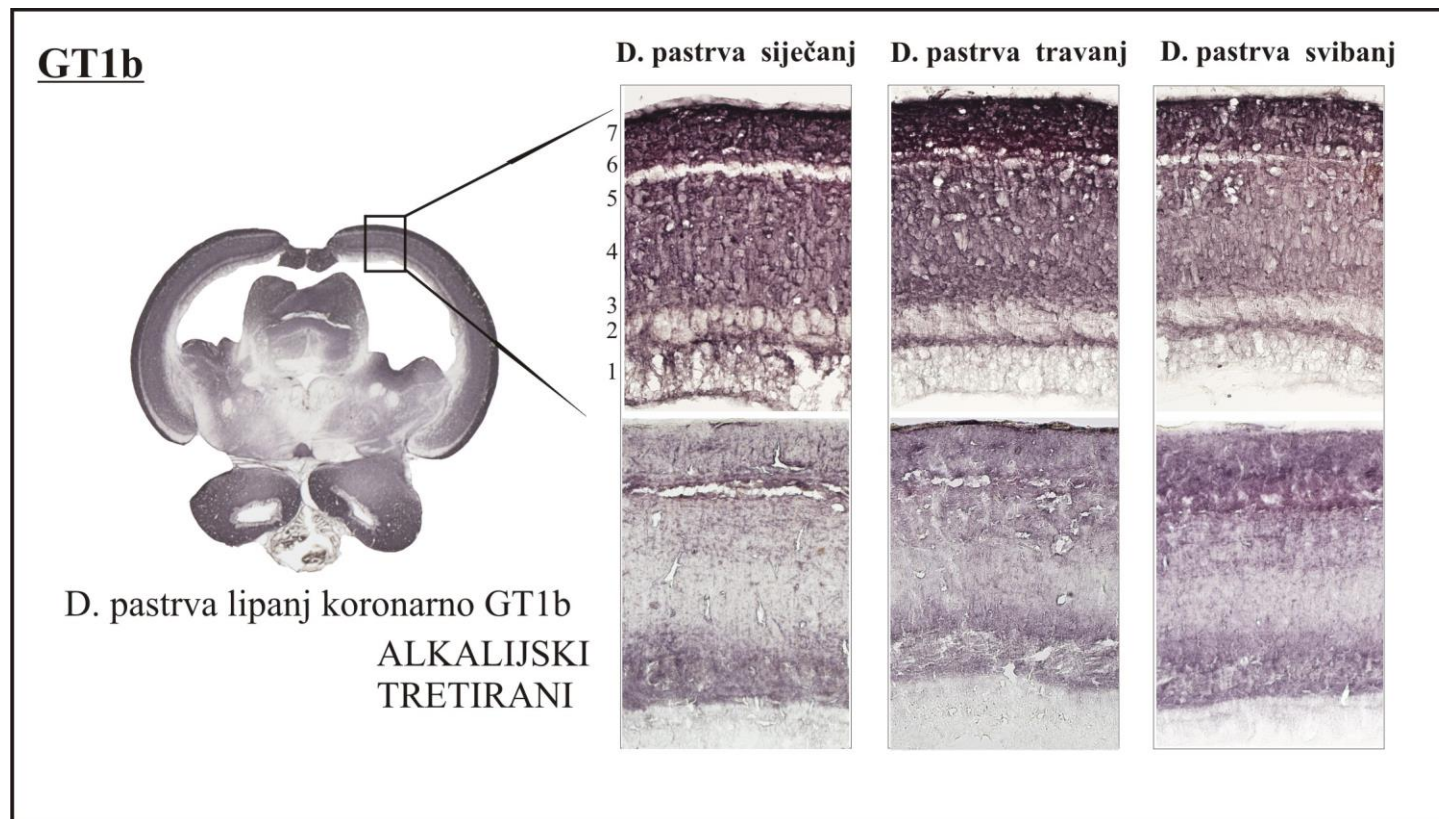
*Lobus inferior hypothalami* čini najveći dio hipotalamusa, odnosno međumozga kod riba. Jasno je vidljiv na ventralnoj površini mozga. Rezanjem u koronarnoj ravnini srednjeg mozga zahvaćen je i taj dio međumozga, pa će se protumačiti u ovom potpoglavlju. U ovoj strukturi d. pastrva ima distribuciju gangliozida GD1b i GT1b, te A2B5-epitopa (Sl. 18). Ekspresija gangliozida GT1b jača je u odnosu na GD1b kod kojeg su prisutne neznatne promjene tijekom mjeseci, ali i veliku količinu alkalijski labilnih gangliozida u svim mjesecima (Sl. 22). Pozitivna reakcija na GD1a prisutna je tek u lipnju (rezano u sagitalnoj ravnini, Sl. 12. i Sl. 23.).

O. šaran u srednjem mozgu ima jaču ekspresiju gangliozida GD1a, GT1b i A2B5-epitopa, slabiju ekspresiju GD1b te nema reaktivnost na GM1 (Sl. 24). Optički tektum zimi ima slabiju ekspresiju GD1a i GT1b u odnosu na ljetu (Sl. 25. i 26.). Gangliozid GD1a u siječnju nalazimo u 4., 5. i 7. sloju, dok se ljeti ekspresija pojačava u 7. sloju. Gangliozid GT1b je prisutan u 4. i 5. sloju. Nisu vidljive znatnije promjene ekspresije ostalih gangliozida tijekom odabranih mjeseci.

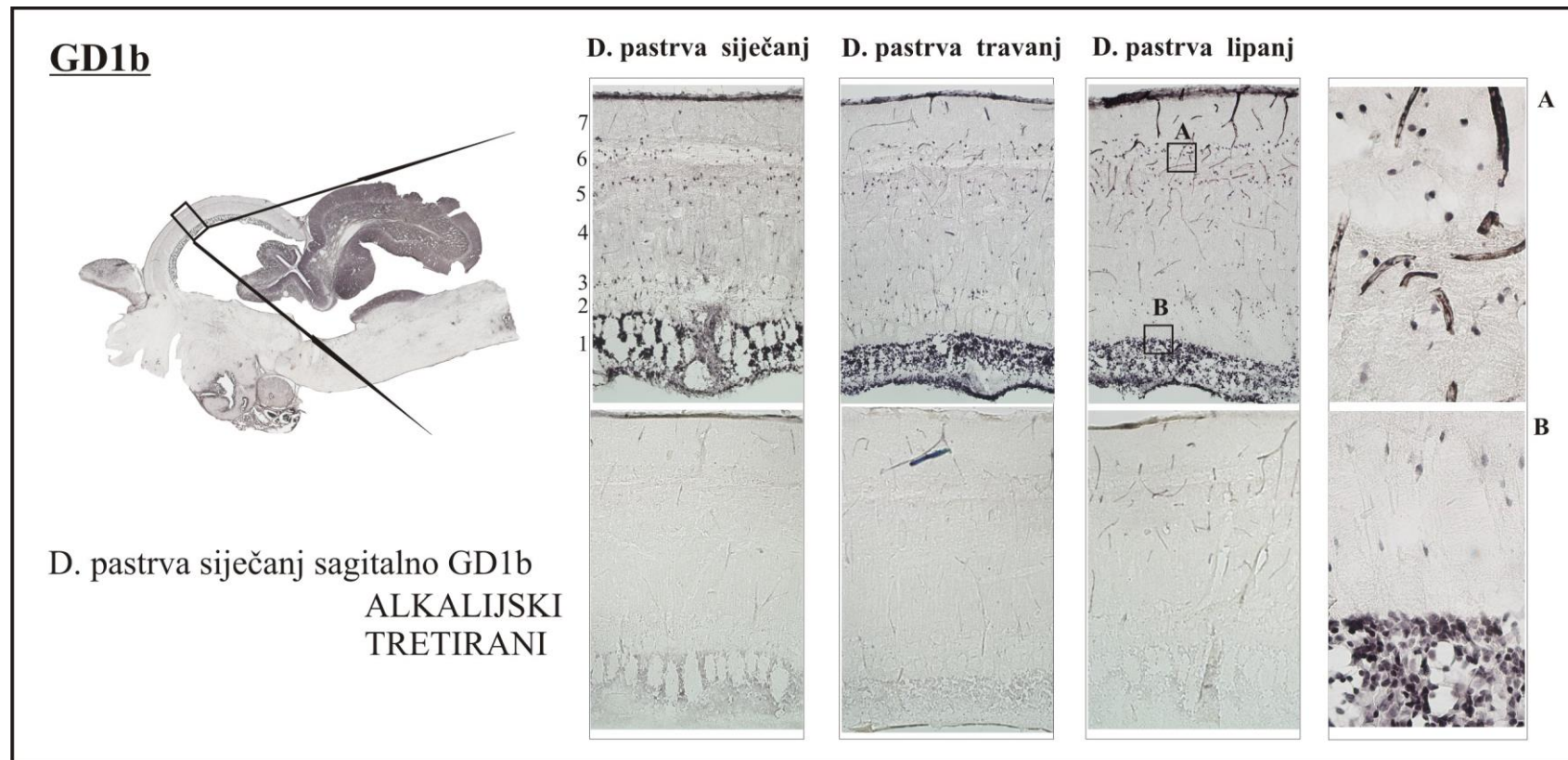
O. šaran u *lobus inferior hypothalami* ima prisutnu distribuciju gangliozida GD1a i GT1b, te A2B5-epitop (Sl. 21). Ekspresija gangliozida GT1b jača je u odnosu na GD1a.



**Slika 18.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *mesencephalon*.

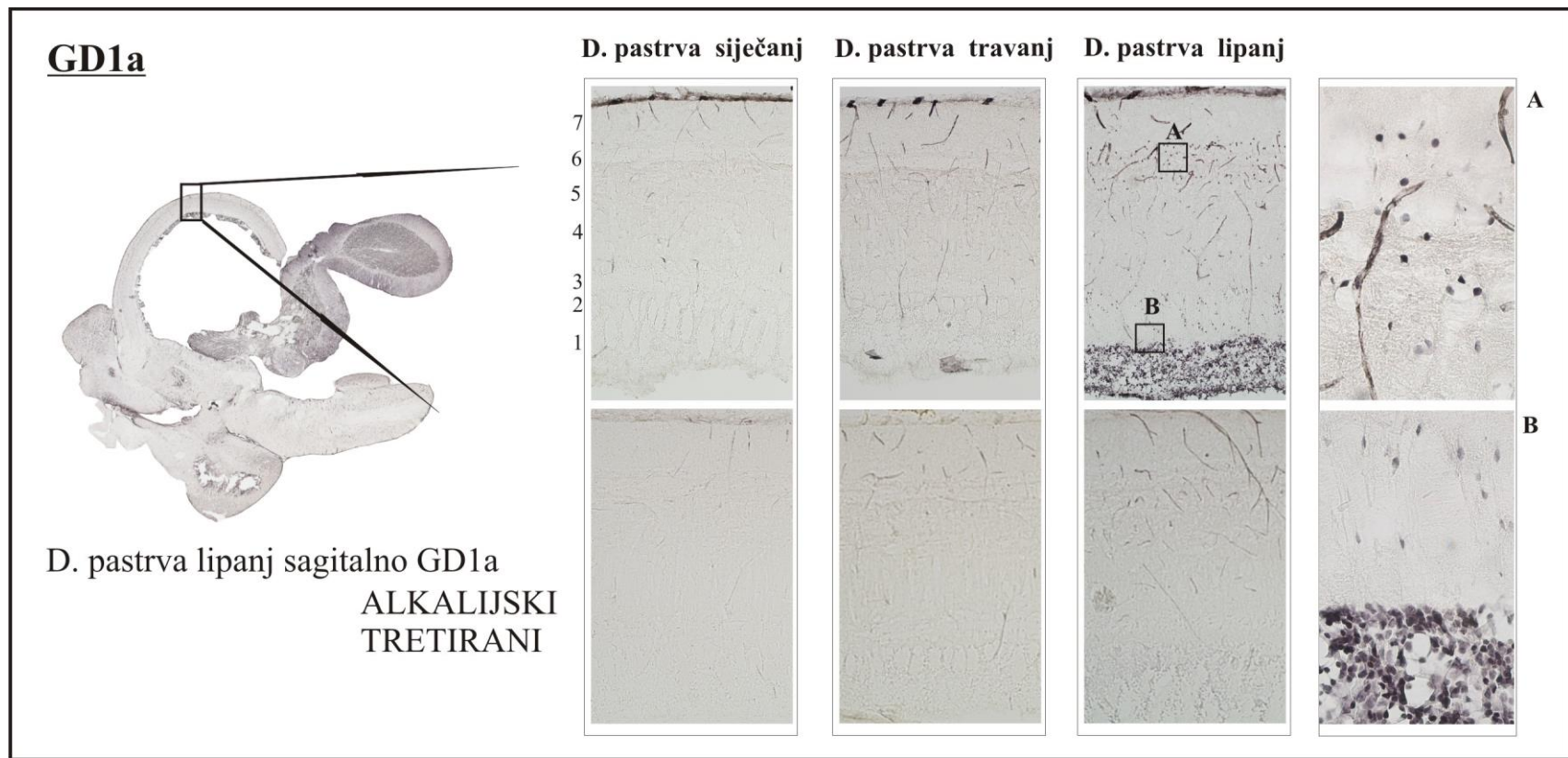


**Slika 19.** Ekspresija gangliozida GT1b prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *tectum opticum* pod povećanjem 100×. 1-*stratum periventriculare*; 2-*stratum album centrale*; 3-*stratum griseum centrale* duboki sloj; 4-*stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj; 5-*stratum fibrosum et griseum superficiale*; 6-*stratum opticum*; 7-*stratum marginale*.

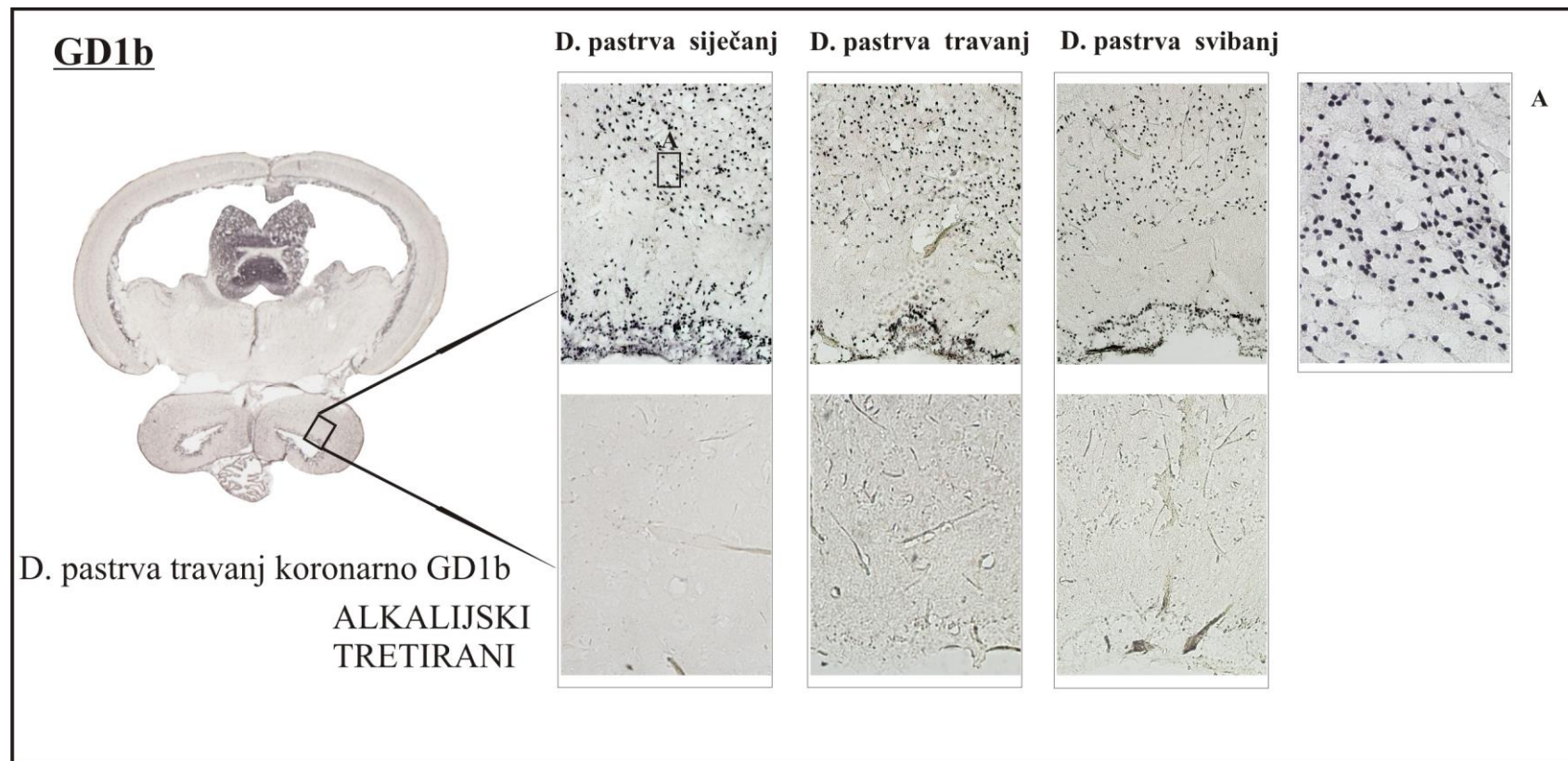


**Slika 20.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *tectum opticum* pod povećanjem 100×, uz detaljan uvid u pojedine slojeve (A,B) pod povećanjem 400×. 1-*stratum periventriculare*; 2-*stratum album centrale*; 3-*stratum griseum centrale* duboki sloj; 4-*stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj; 5-*stratum fibrosum et griseum superficiale*; 6-*stratum opticum*; 7-*stratum marginale*.

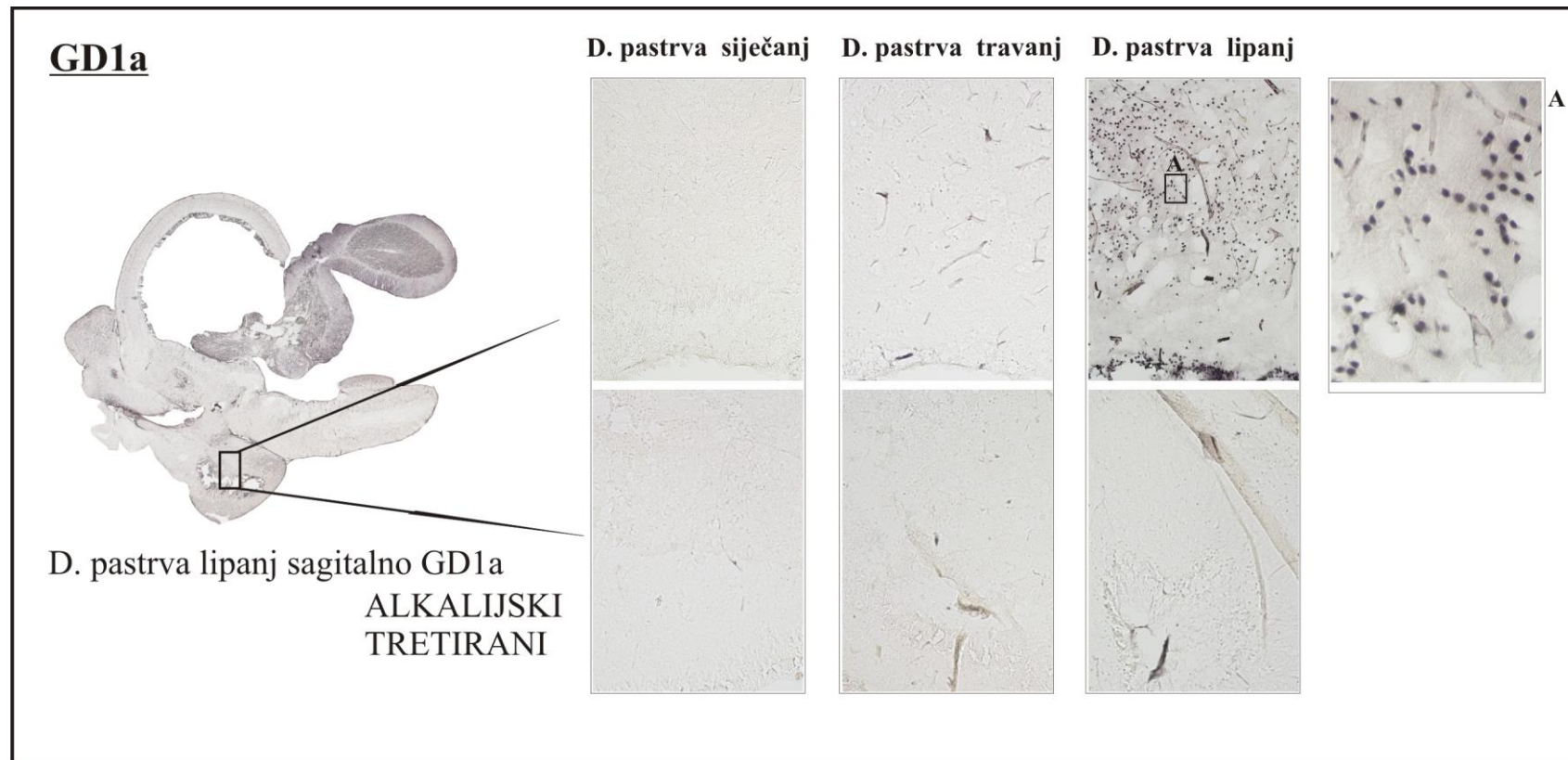




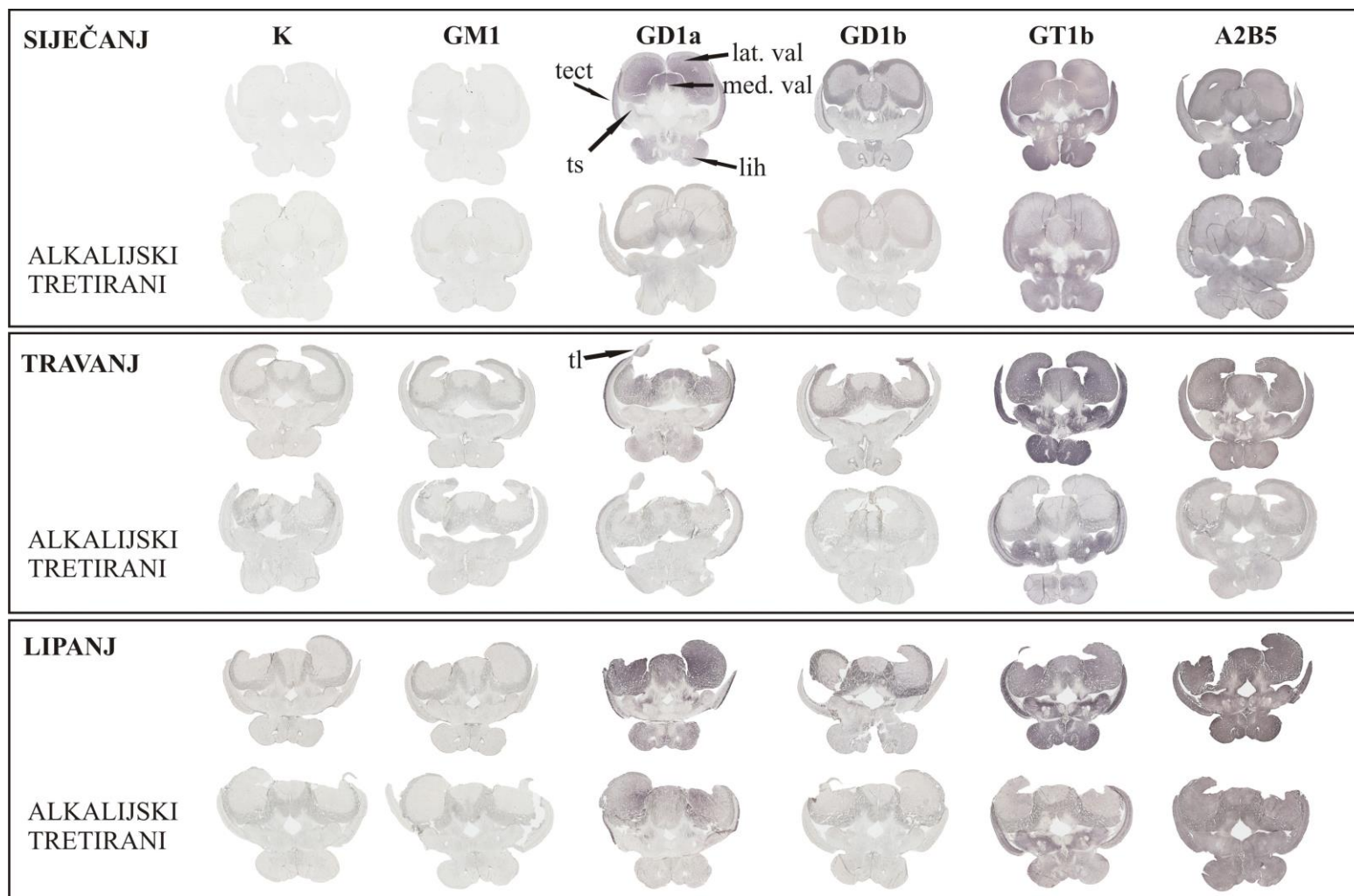
**Slika 21.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *tectum opticum* pod povećanjem 100×, uz detaljan uvid u pojedine slojeve (A,B) pod povećanjem 400×. 1-*stratum periventriculare*; 2-*stratum album centrale*; 3-*stratum griseum centrale* duboki sloj; 4-*stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj; 5-*stratum fibrosum et griseum superficiale*; 6-*stratum opticum*; 7-*stratum marginale*.



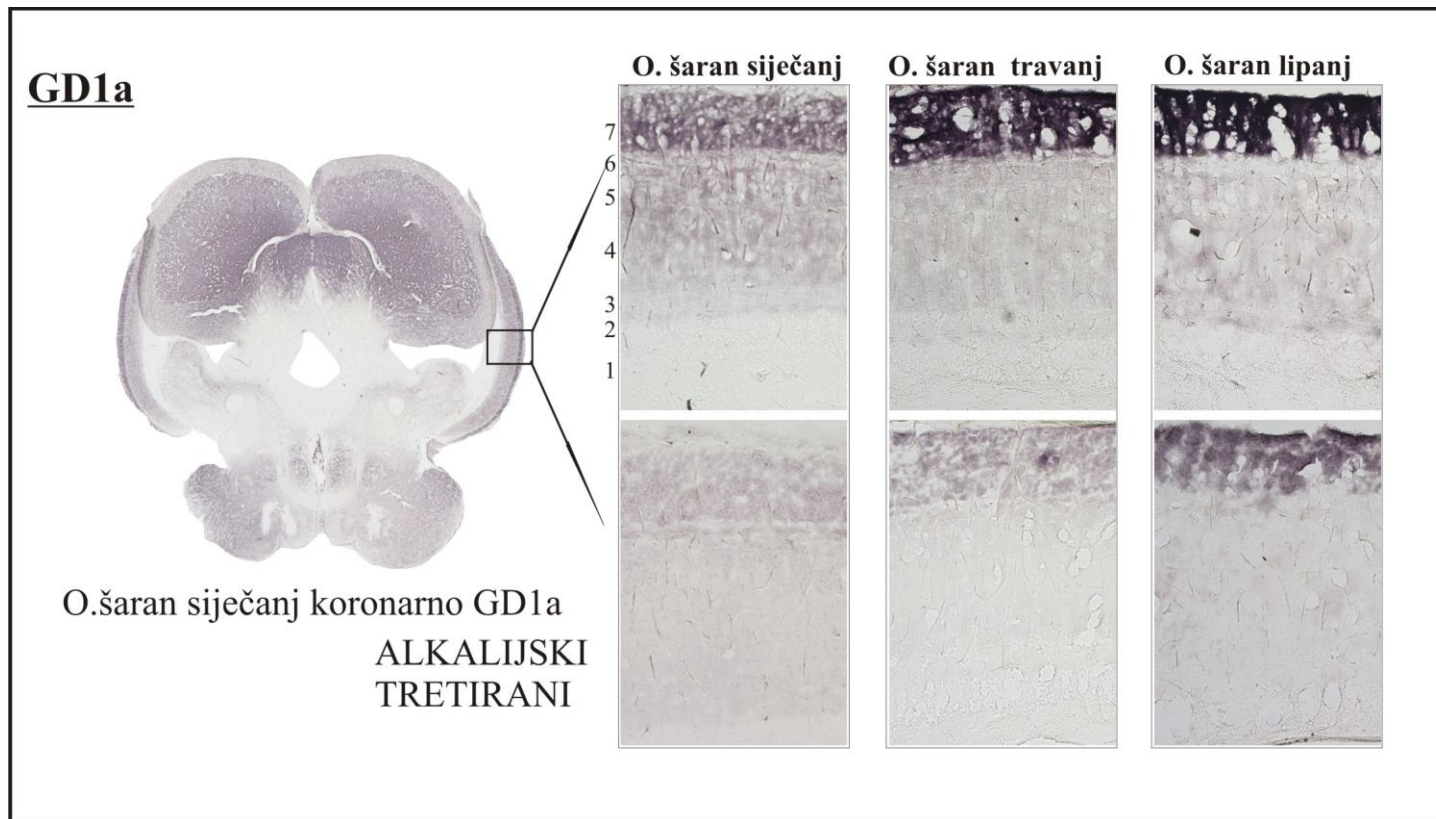
**Slika 22.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *lobus inferior hypothalami* pod povećanjem 100×, uz detaljan uvid (A) pod povećanjem 200×.



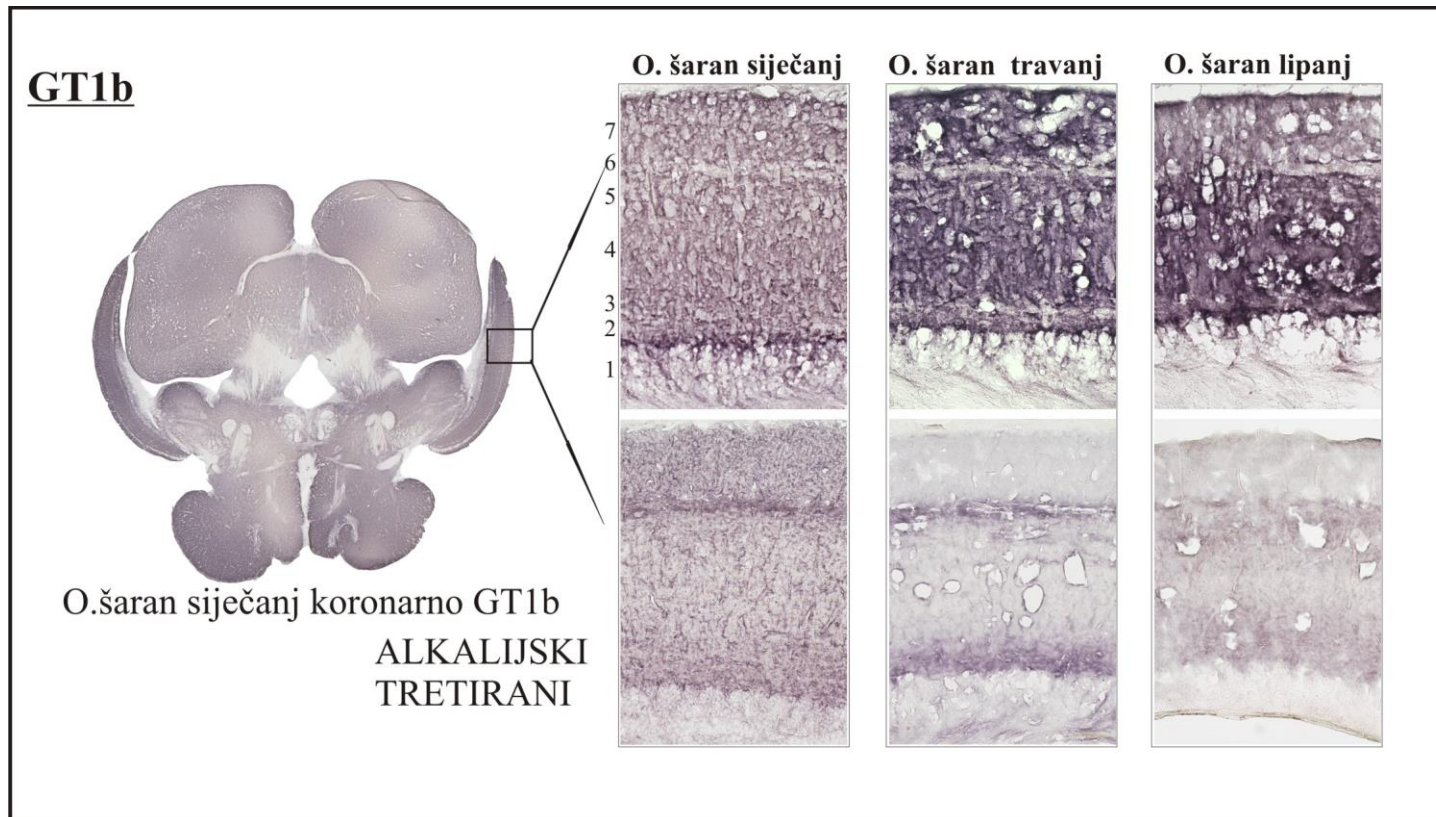
**Slika 23.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *lobus inferior hypothalami* pod povećanjem 100×, uz detaljan uvid (A) pod povećanjem 200×.



**Slika 24.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, *mesencephalon* regija.



**Slika 25.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, razina *tectum opticum* pod povećanjem 100×. 1-*stratum periventriculare*; 2-*stratum album centrale*; 3-*stratum griseum centrale* duboki sloj; 4-*stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj; 5-*stratum fibrosum et griseum superficiale*; 6-*stratum opticum*; 7-*stratum marginale*.



**Slika 26.** Ekspresija gangliozida GT1b prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, razina *tectum opticum* pod povećanjem 100×. 1-*stratum periventriculare*; 2-*stratum album centrale*; 3-*stratum griseum centrale* duboki sloj; 4-*stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj; 5-*stratum fibrosum et griseum superficiale*; 6-*stratum opticum*; 7-*stratum marginale*.

#### 4.1.4. Imunohistokemijska lokalizacija kompleksnih gangliozida u stražnjem mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci

Stražnji mozak (*rhombencephalon*) gradi kaudodorzalni dio mozga, prostire se iznad produžene moždine, a povezan je s leđnom moždinom. Podijeljen je u četiri zone: ventralna (retikularne st.), intermedioventralna (viscero-osjetni živci), intermediodorzalna (facijalni i vagalni režanj) i dorzalna (regija bočne linije). Ventralni dio rombencefalona odvojen je ventrikularnim sulkusom, koji odvaja motornu od osjetne zone (Nieuwenhuys i sur. 1998). Mali mozak (*cerebellum*) je najrostralniji dio dorzalne zone rombencefalona, nalazi se iznad četvrte moždane komore (*ventriculus quartus*) te je jasno vidljiv na površini mozga. Sastoji se od tri funkcionalne jedinice: kaudalno smještene vestibulolateralne regije, neparnog tijela malog mozga, te valvule malog mozga koja se podvlači ispod optičkog tektuma u ventrikul srednjeg mozga. Kaudalna regija primarno je mjesto projekcije oktavolateralnog osjetilnog sustava (Nieuwenhuys 1967), a sastoji se od kaudalnog režnja (*lobus caudalis- lccb*) i granularnog ispupčenja (*eminentia granularis*) koja se nastavlja u cerebelarnu kristu ili greben (*crista cerebellaris*), koju čini sloj paralelnih vlakana koja prekrivaju regiju bočne linije. *Crista cerebelli* prima projekcije iz vestibularnog aparata te se smatra najprimitivnijim dijelom malog mozga (Finger, 1983). Kaudalni režanj razlikuje se od kaudalnog dijela korpusa raspodjelom Purkinjeovih stanica, koje su slobodno raspršene u molekularnom sloju, a ne u monosloju između molekularnog i granularnog sloja. *Valvula* malog mozga je rostralno ispupčenje cerebeluma u ventrikul srednjeg mozga, tj. treću moždanu komoru (*ventriculus tertius*) i tipična je samo za podrazred zrakoperki (Nieuwenhuys, 1967). Izgrađena je od tri sloja, vanjskog granularnog (*stratum granulare- grl*), srednjeg sloja ganglijskih stanica (*stratum ganglionare- ggl*) i unutarnjeg molekularnog sloja (*stratum moleculare- mol*). Kod o. šarana *valvula* je plosnatog oblika s prepoznatljivim medijalnim i lateralnim dijelom, dok je kod d. pastrve uvojita i predstavlja medijalnu valvulu.

Tijelo malog mozga (*corpus cerebelli*) riba sastoji se od tri sloja: vanjski molekularni, srednji sloj ganglijskih stanica i duboki granularni. Ganglijski sloj se smatra slojem Purkinjeovih stanica koje imaju sagitalno orijentirane trnovite dendrite do molekularnog sloja. Granularni neuroni pružaju paralelna vlakna u molekularni sloj, a završavaju na trnovitim dendritima Purkinjeovih stanica. Ovakav raspored slojeva je isti za *valvulu* i *corpus*, no u većem dijelu *valvule* dolazi do promjene organizacije Purkinjeovih i granularnih neurona. Granularni neuroni nisu smješteni ispod sloja Purkinjeovih neurona već se nalaze lateralno u

odnosu na molekularni sloj te šalju paralelna vlakna koja onda nemaju tzv. T-grananje (Meek 1992).

Mali mozak d. pastrve u sve tri strukture pozitivan je na GD1a, GD1b i GT1b, te A2B5-epitop uz napomenu da se GD1a gangliozid javlja tek u lipnju što je vidljivo na slikama 12., 27., 28. i 29.

Pozitivnu reakciju na GD1a gangliozid u lipnju nalazimo u molekularnom i granularnom sloju *corpus cerebelli* d. pastrve, dok se u molekularnom sloju alkalijskim tretmanom gubi pozitivna reakcija (Sl. 29.). Gangliozid GD1b ima jaču ekspresiju u cerebelarnoj valvuli (*valvula cerebelli*) ljeti kada je vidljiv i manji udio alkalijski podložnih modifikacija gangliozida te dosta jača reakcija u ganglijskom sloju (Sl. 30.). Općenito se alkalijskim tretmanom gubi najveći dio reaktivnosti na protutijelo anti-GD1b.

Vidljivo je povećanje ekspresije gangliozida GD1b ljeti u granularnom sloju i sloju Purkinjeovih stanica, a smanjenje u molekularnom sloju kaudalnog režnja (*lobus caudalis*). Tijekom siječnja jasno je vidljiva manja reaktivnost nakon alkalijskog tretmana u molekularnom sloju (Sl. 31.).

U cerebelarnoj kristi ljeti vidljivo je smanjenje ekspresije gangliozida GD1b (Sl. 33.), a pojava ekspresije GD1a (Sl. 32.). Tijekom siječnja jasno je vidljiva manja reaktivnost nakon alkalijskog tretmana.

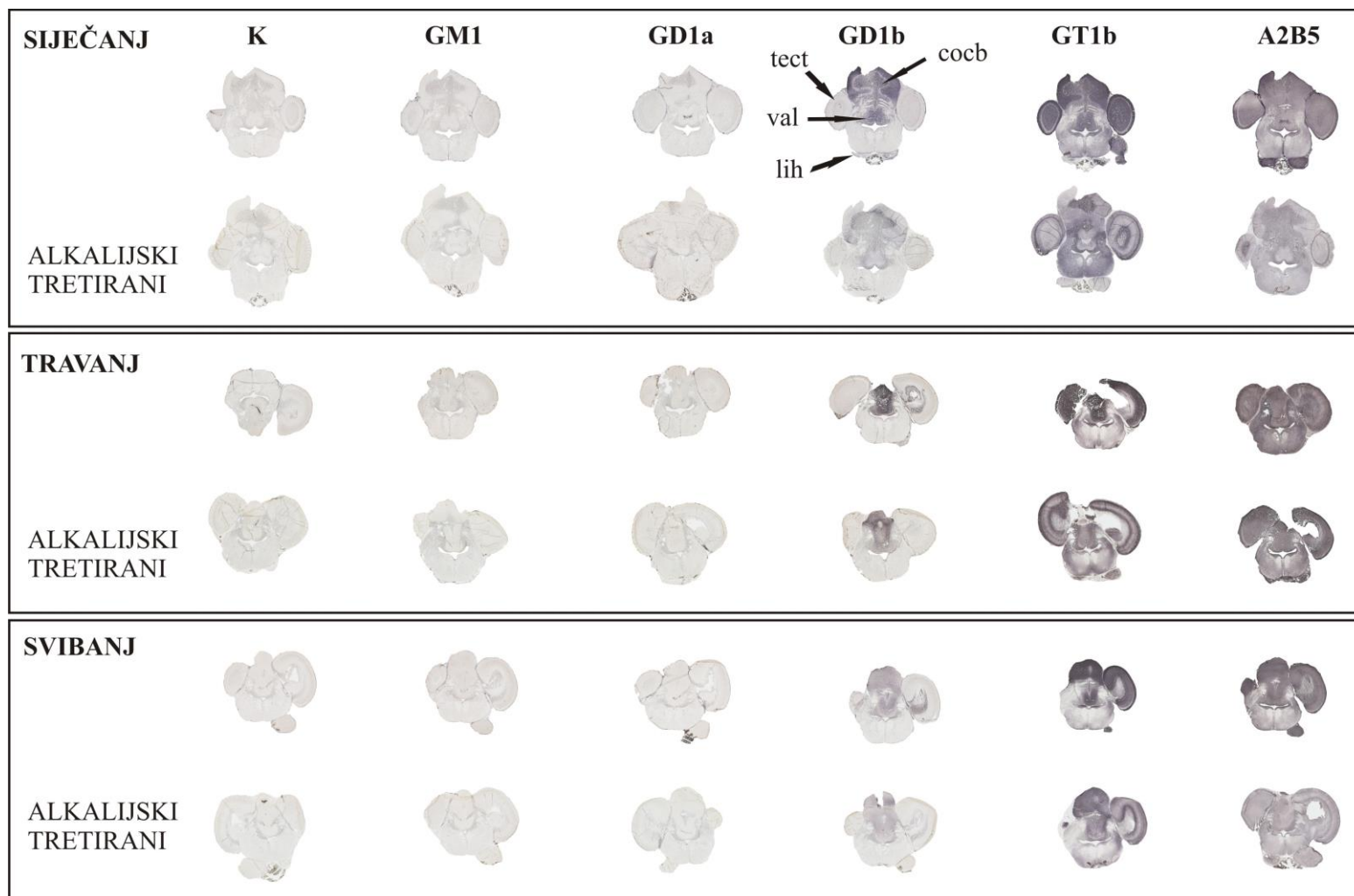
U sve tri strukture dominira gangliozid GT1b, a u *valvuli* i *corpusu cerebelli* jača ekspresija prisutna je u molekularnom sloju.

U mozgu šarana dinamika promjena je nešto drugačija. Smanjenje ekspresije gangliozida GD1a u *corpus cerebelli* mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) ljeti vidljivo je na slikama 13., 34. i 35. Gangliozid GD1a je zastupljeniji u molekularnom sloju korpusa malog mozga (*corpus cerebelli*), dok je gangliozid GD1b eksprimiran u granularnom sloju, kao i u *cristi cerebelli*. GT1b je smješten u neuropilu te je vidljivo smanjenje ekspresije ljeti (Sl. 36.). Ekspresija A2B5-epitopa u *corpus cerebelli* smanjuje se ljeti što je vidljivo na slici 37.

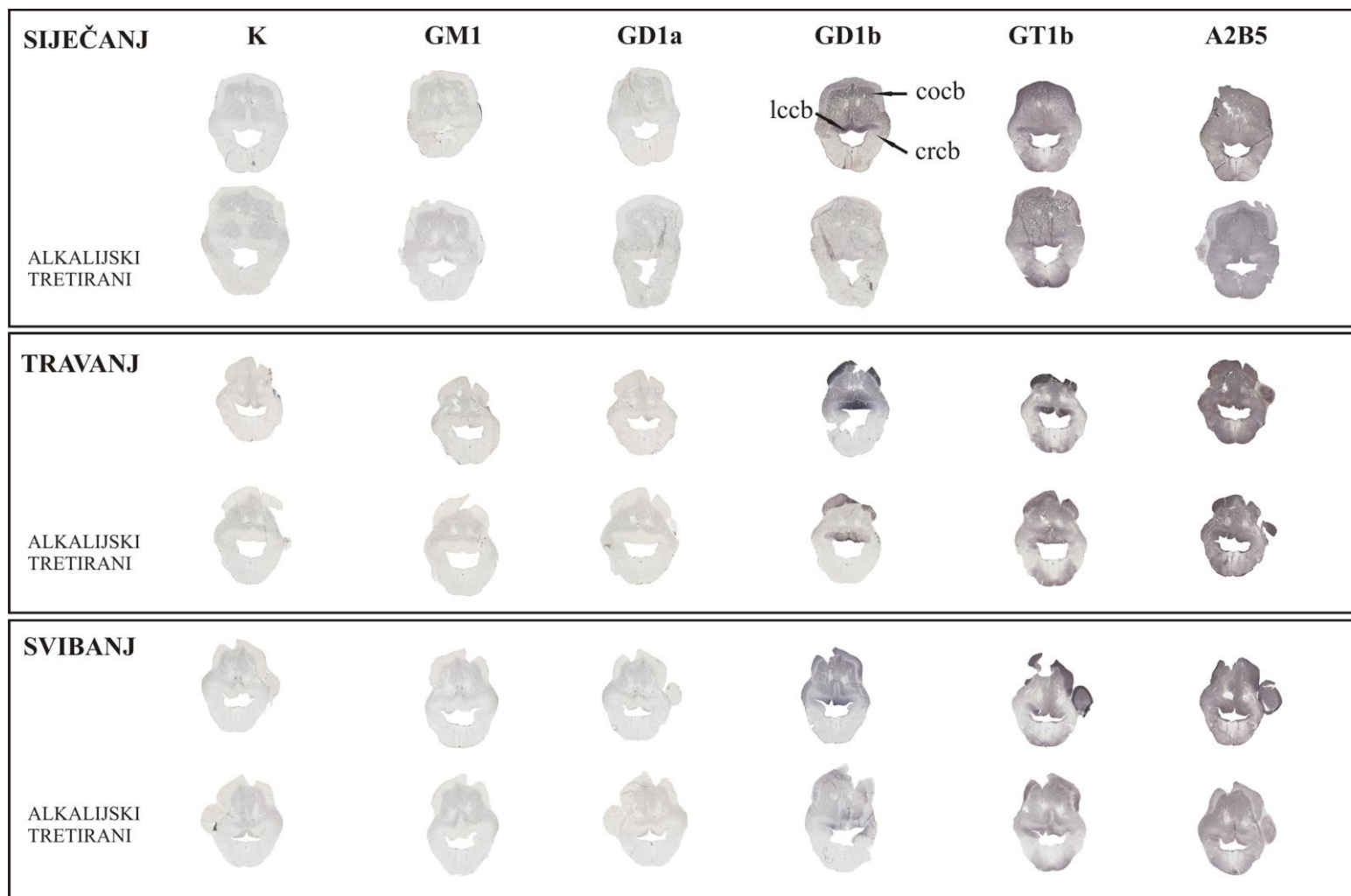
Može se uočiti ekspresija GD1b gangliozida unutar granularnog sloja medijalne i lateralne valvule (rezultati nisu prikazani). Granularni sloj lateralne valvule formira ploču s grebenima paralelnih vlakana i okomito orijentiranim Purkinjeovim stanicama pružajući tako jednostran smještaj granuliranim stanicama, dok su Purkinjeove stanice raspršene unutar molekularnog sloja. Gangliozid GT1b u lateralnoj valvuli ima jaču ekspresiju zimi (Slika 38.), a nakon tretmana rezova parama amonijaka gubi se reaktivnost.



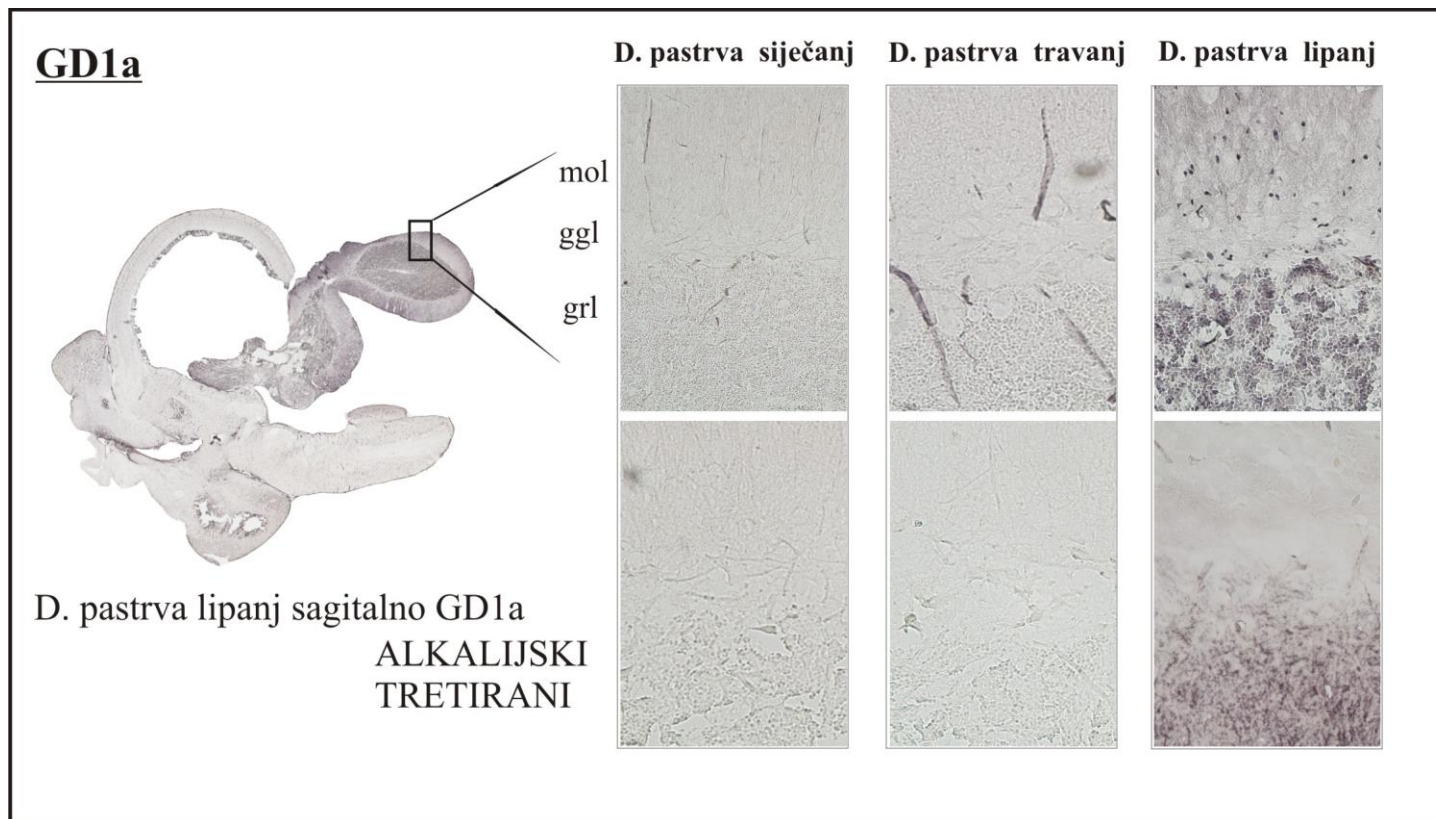
Na stražnjem mozgu o. šarana uočavaju se facijalni (*lob VII-lobus facialis*), glosofaringealni (*lob IX-lobus glossopharyngei*) i vagalni režanj (*lob X-lobus vagus*) zaduženi za interpretaciju okusa. Sve tri strukture pozitivne su na gangliozide GD1a (slabija ekspresija u zimskim mjesecima), GT1b i A2B5-epitop (jača ekspresija), uz pojavu gangliozida GD1b u ljetnim mjesecima (Sl. 39.). Vidljivo je smanjenje ekspresije gangliozida GT1b u vagalnom režnju porastom temperature vode u toplijim mjesecima (Sl. 40.).



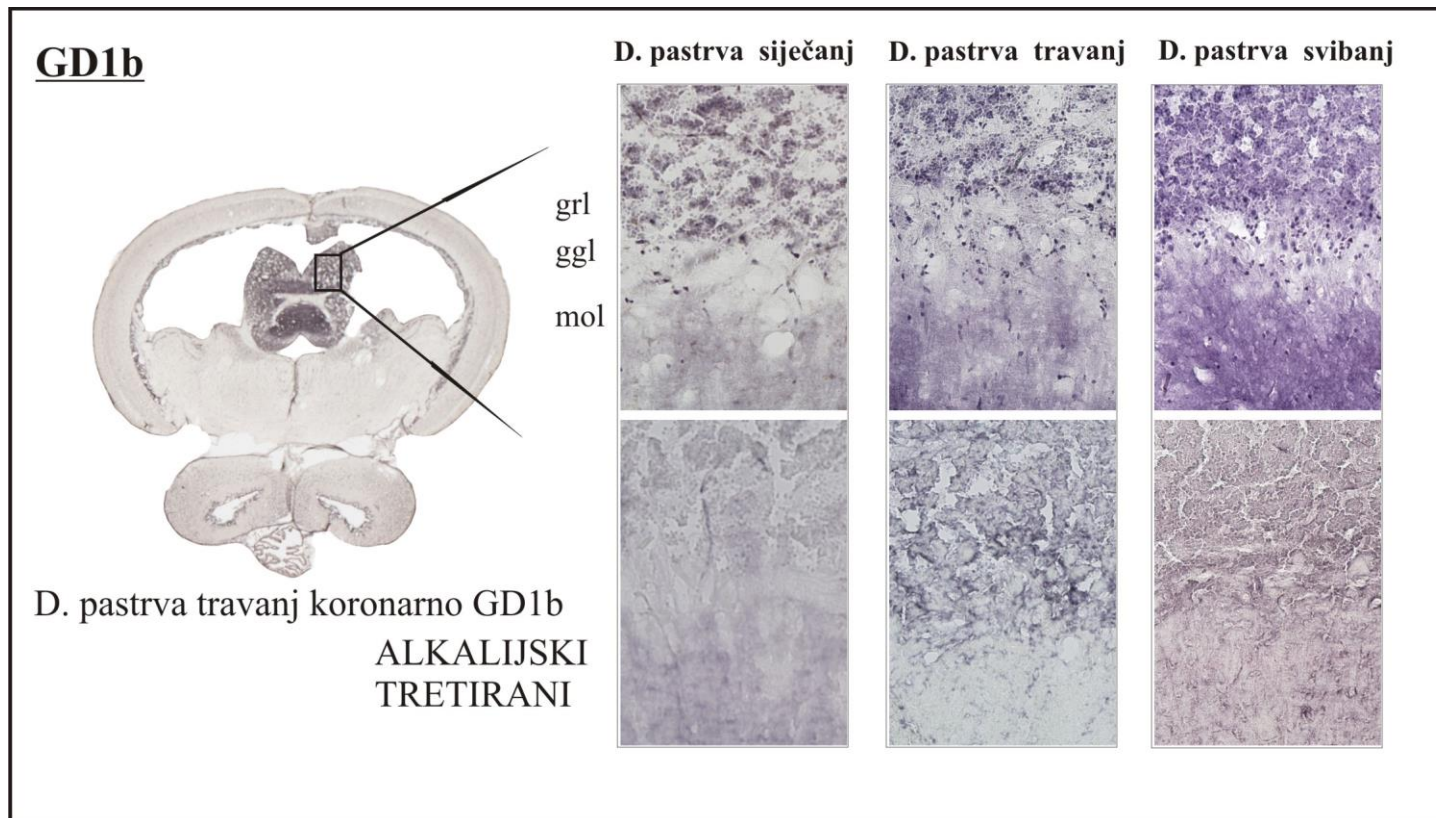
**Slika 27.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, regija *isthmus* i rostralni *cerebellum*.



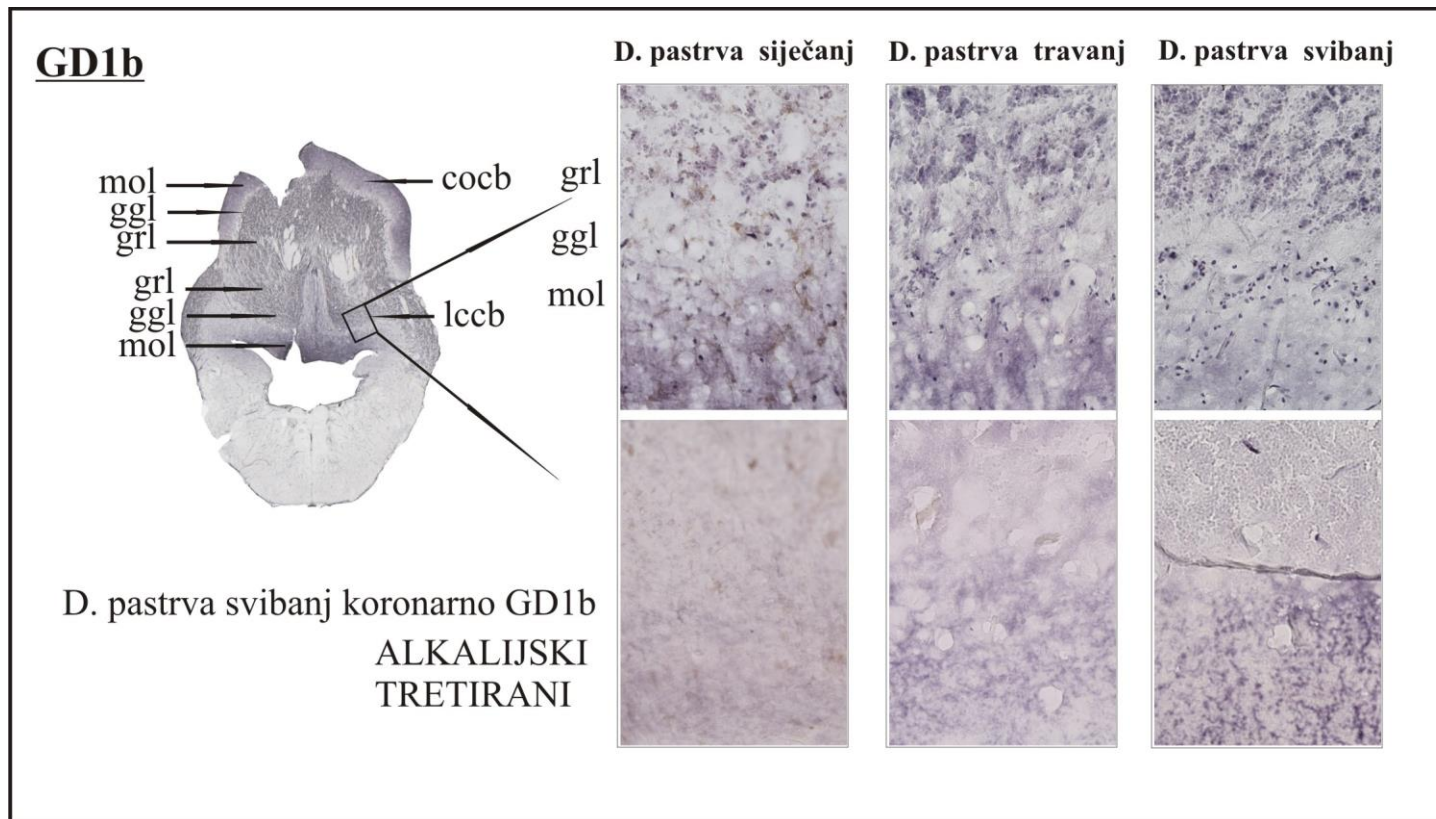
**Slika 28.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, regija *rhombencephalon*.



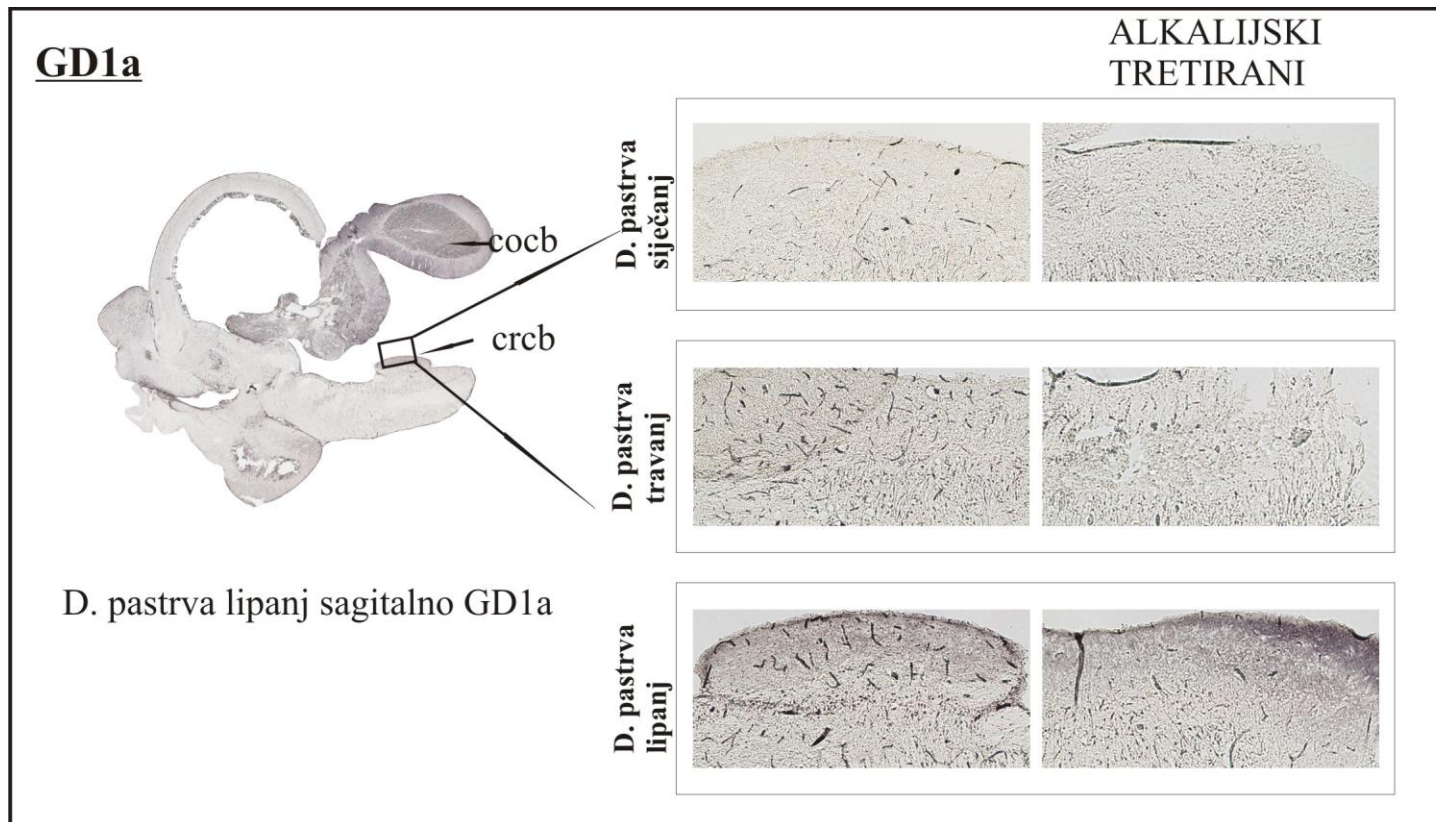
**Slika 29.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *corpus cerebelli* pod povećanjem 200×.



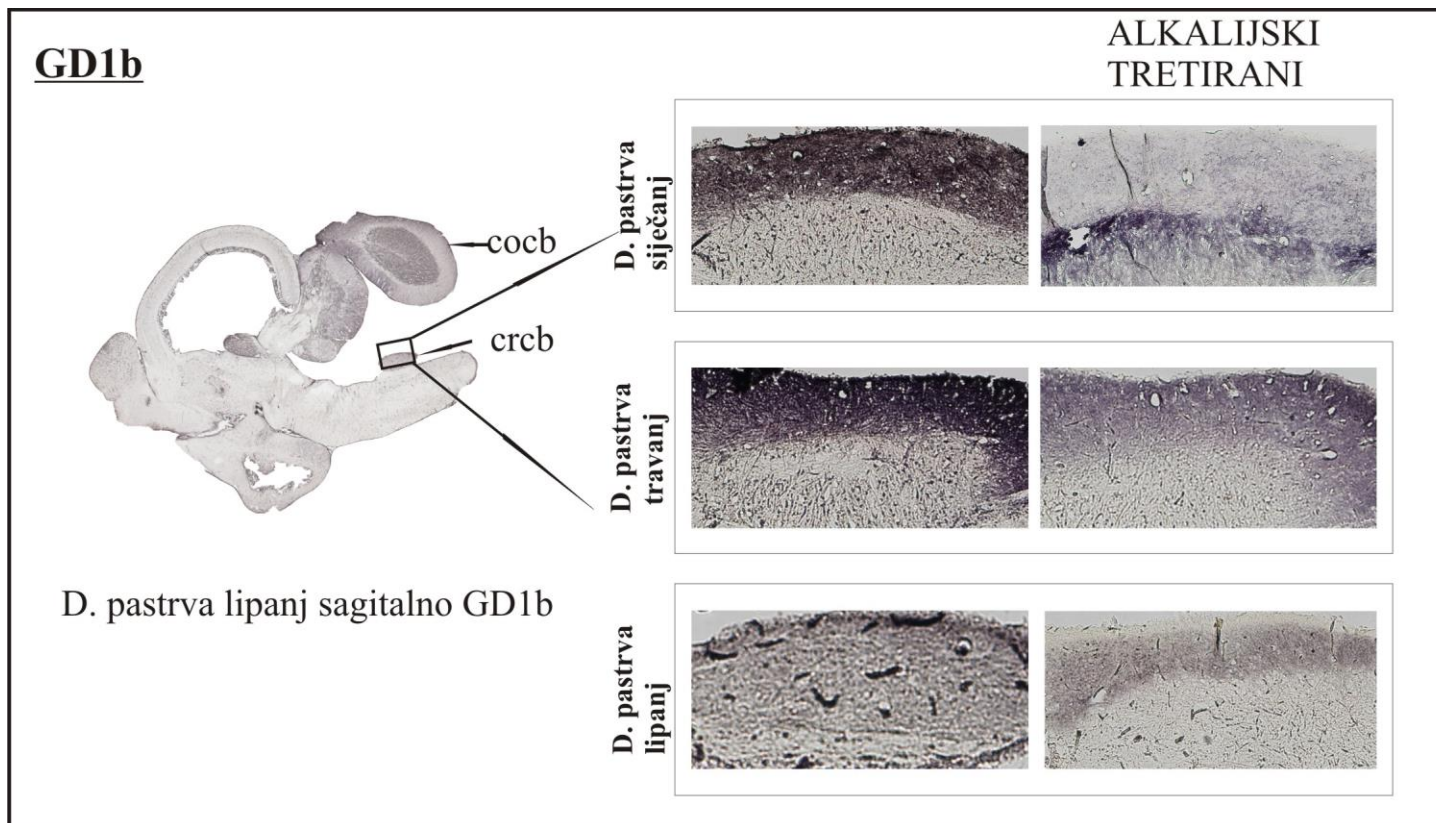
**Slika 30.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *valvula cerebelli* pod povećanjem 200×.



**Slika 31.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na koronarnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *lobus caudalis cerebelli* pod povećanjem 200×.

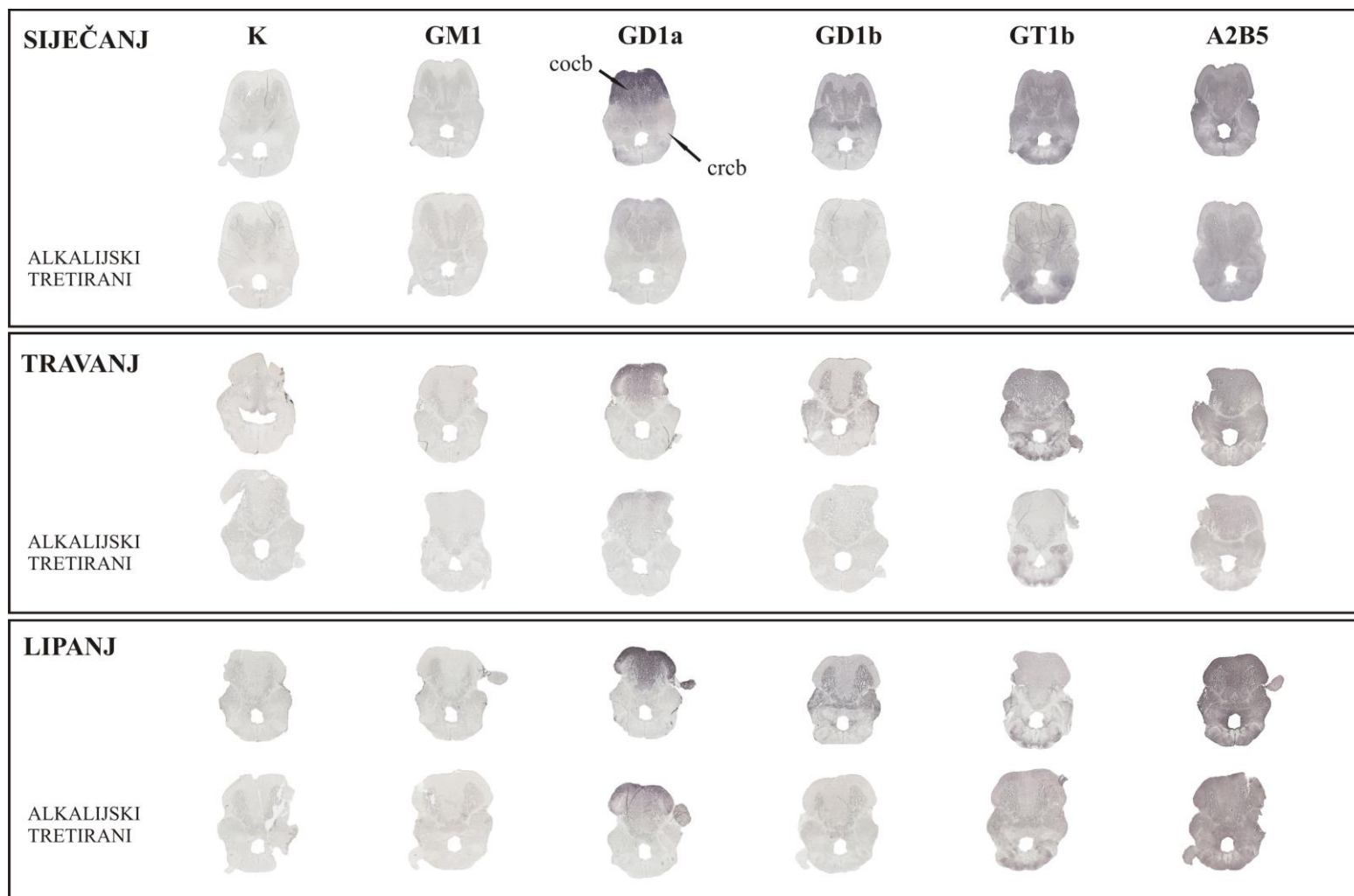


**Slika 32.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *crista cerebelli* pod povećanjem 50×.

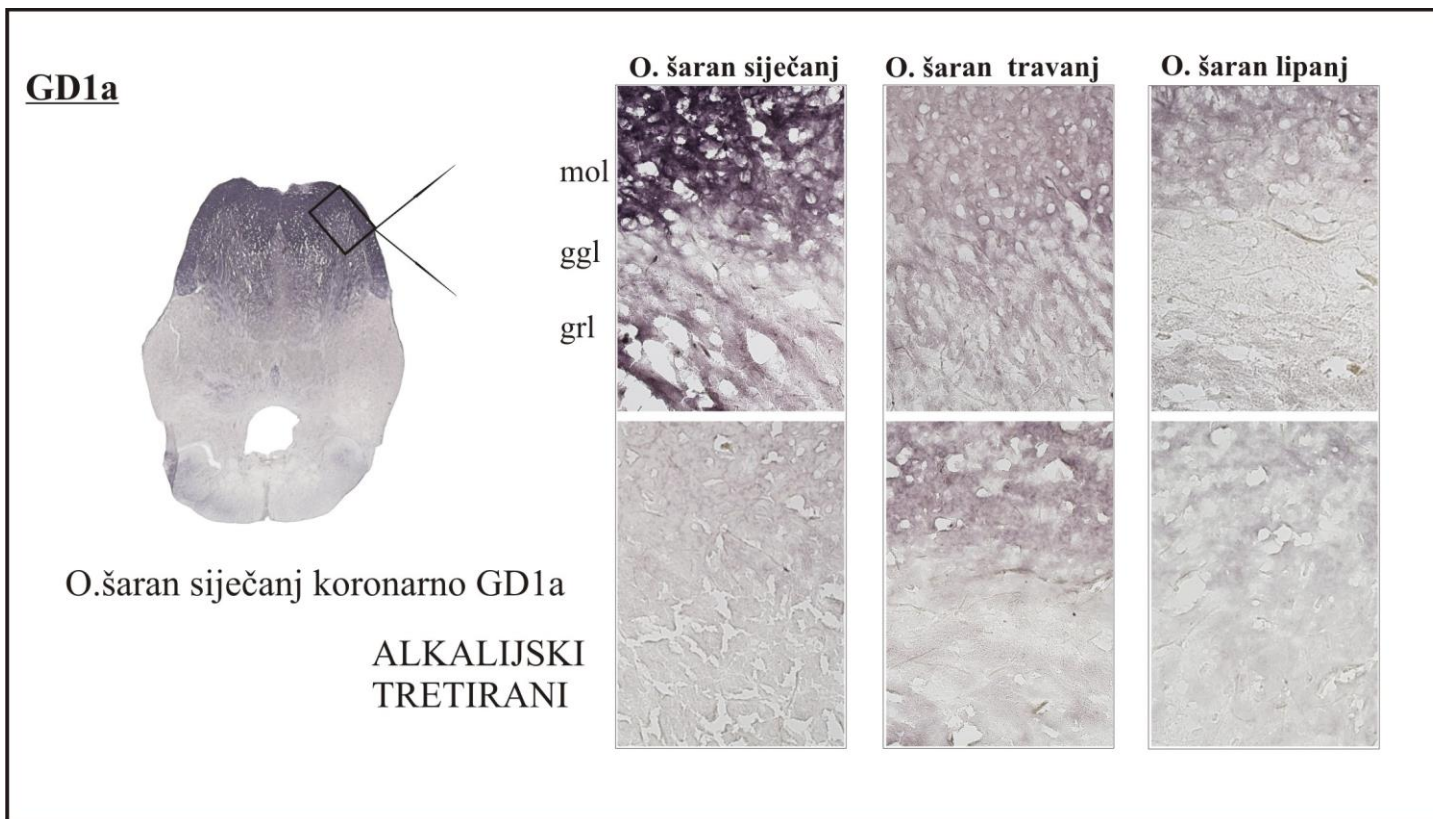


**Slika 33.** Ekspresija gangliozida GD1b prikazana na sagitalnim rezovima mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) tijekom odabranih mjeseci, razina *crista cerebelli* pod povećanjem 50×.

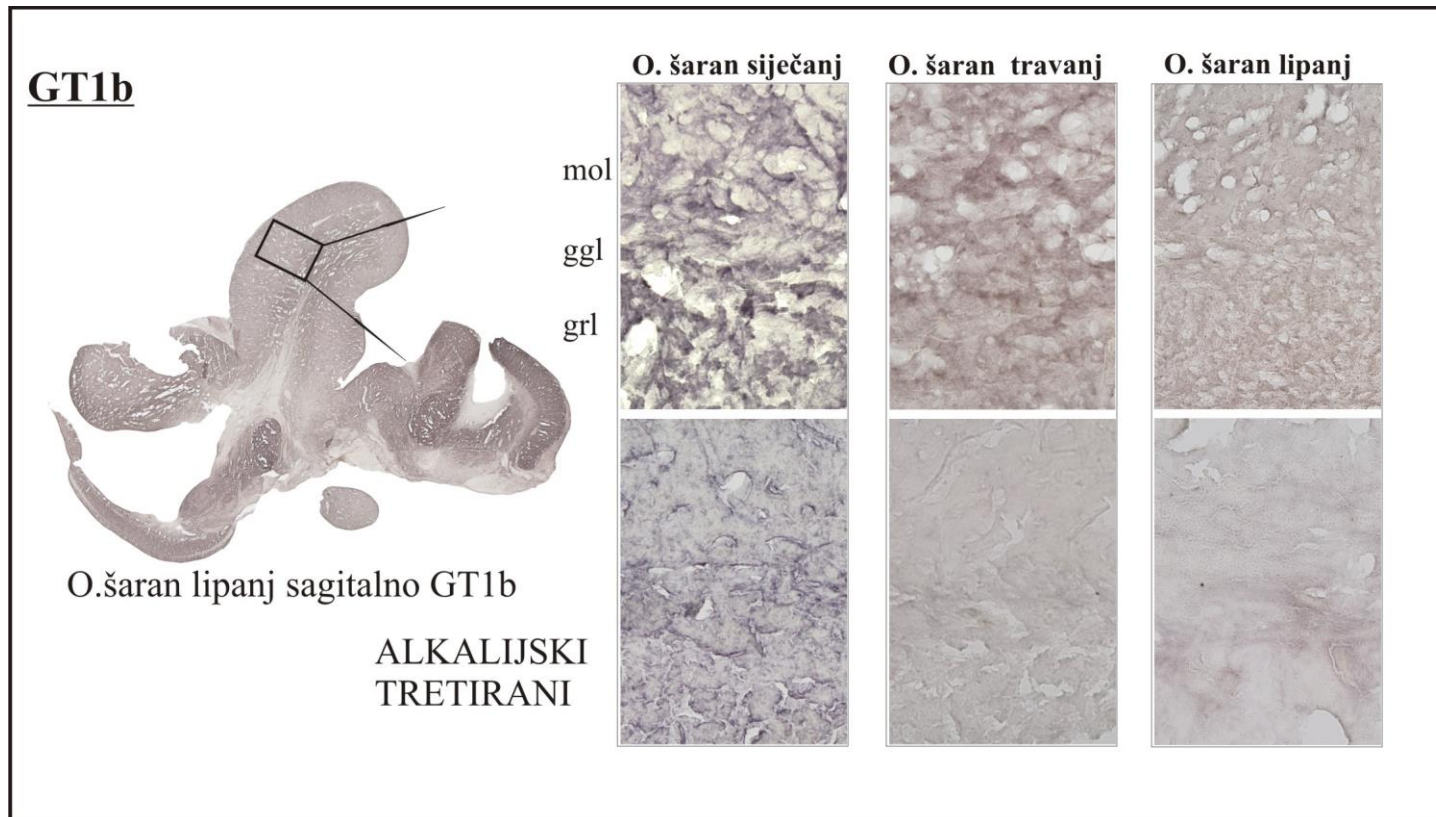




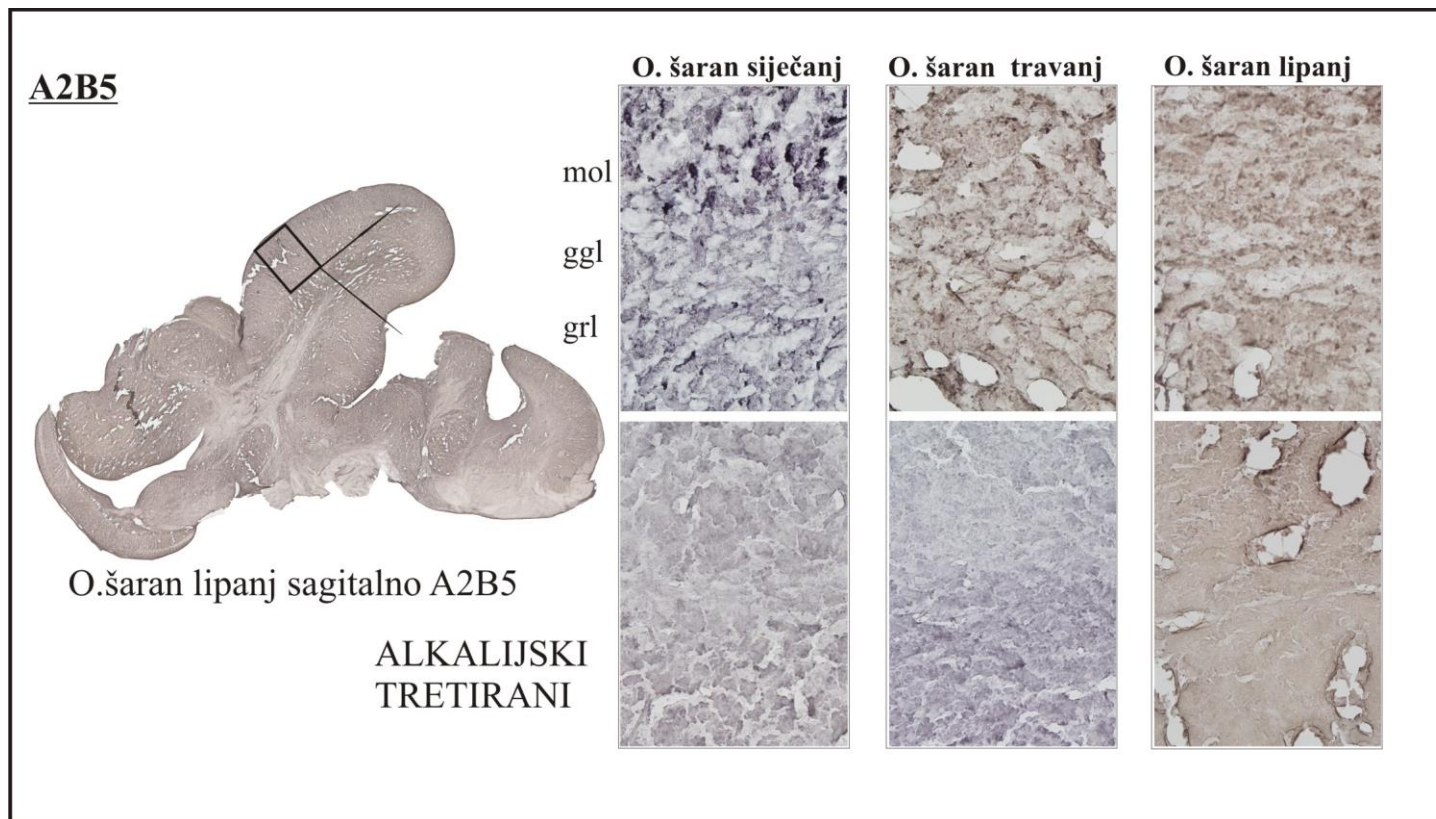
**Slika 34.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *cerebellum*.



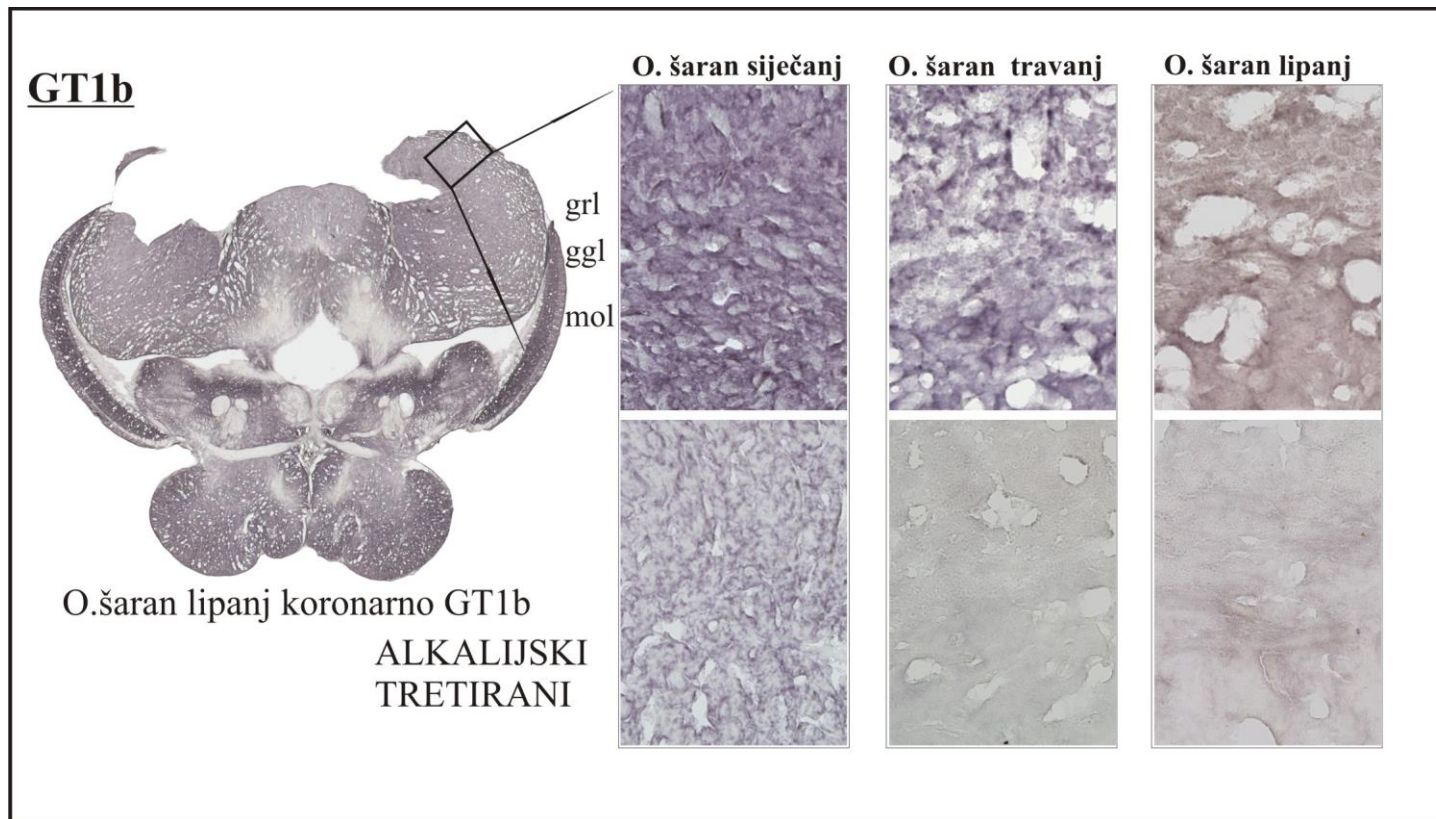
**Slika 35.** Ekspresija gangliozida GD1a prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *corpus cerebelli* pod povećanjem 200×.



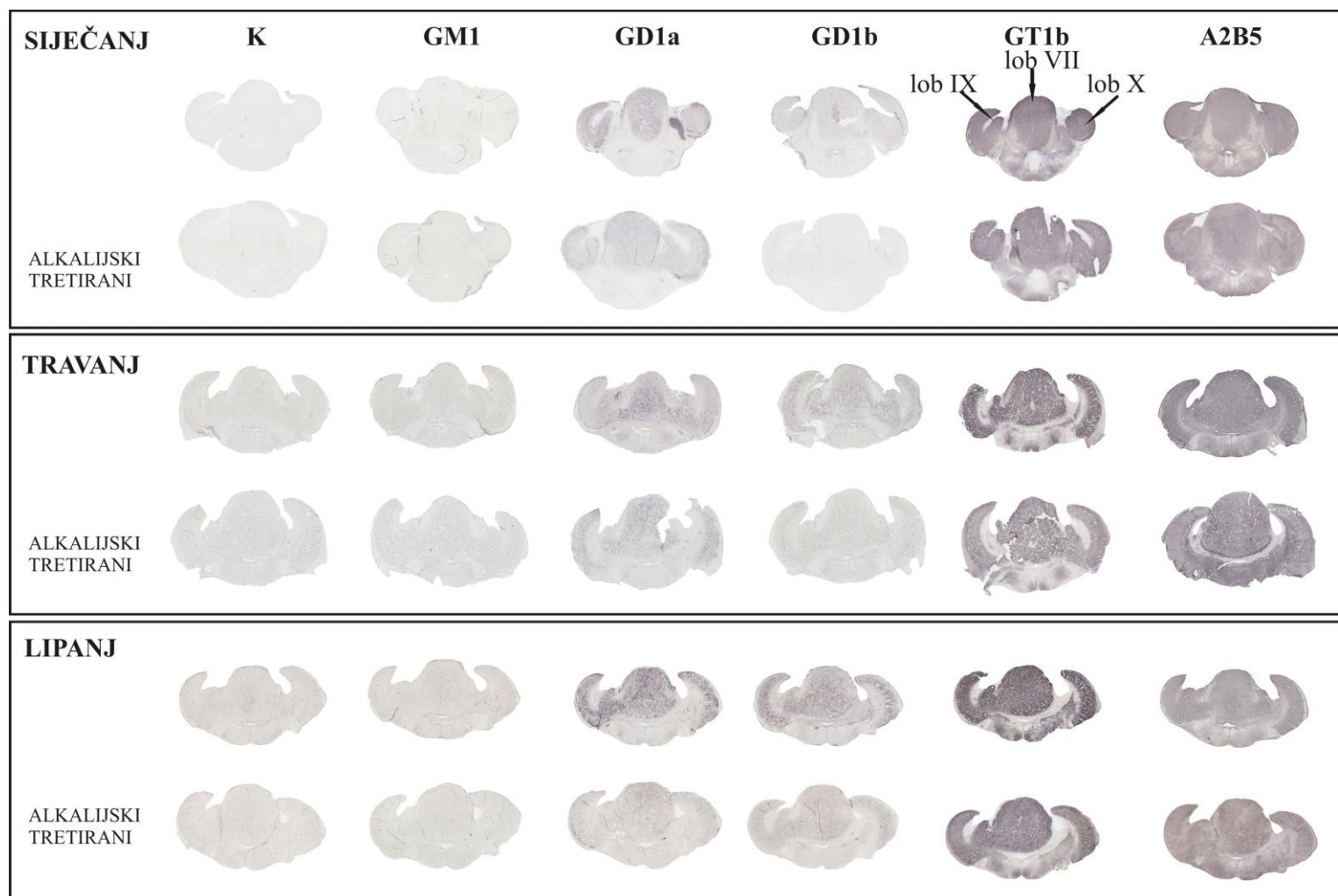
**Slika 36.** Ekspresija gangliozida GT1b prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *corpus cerebelli* pod povećanjem 200×.



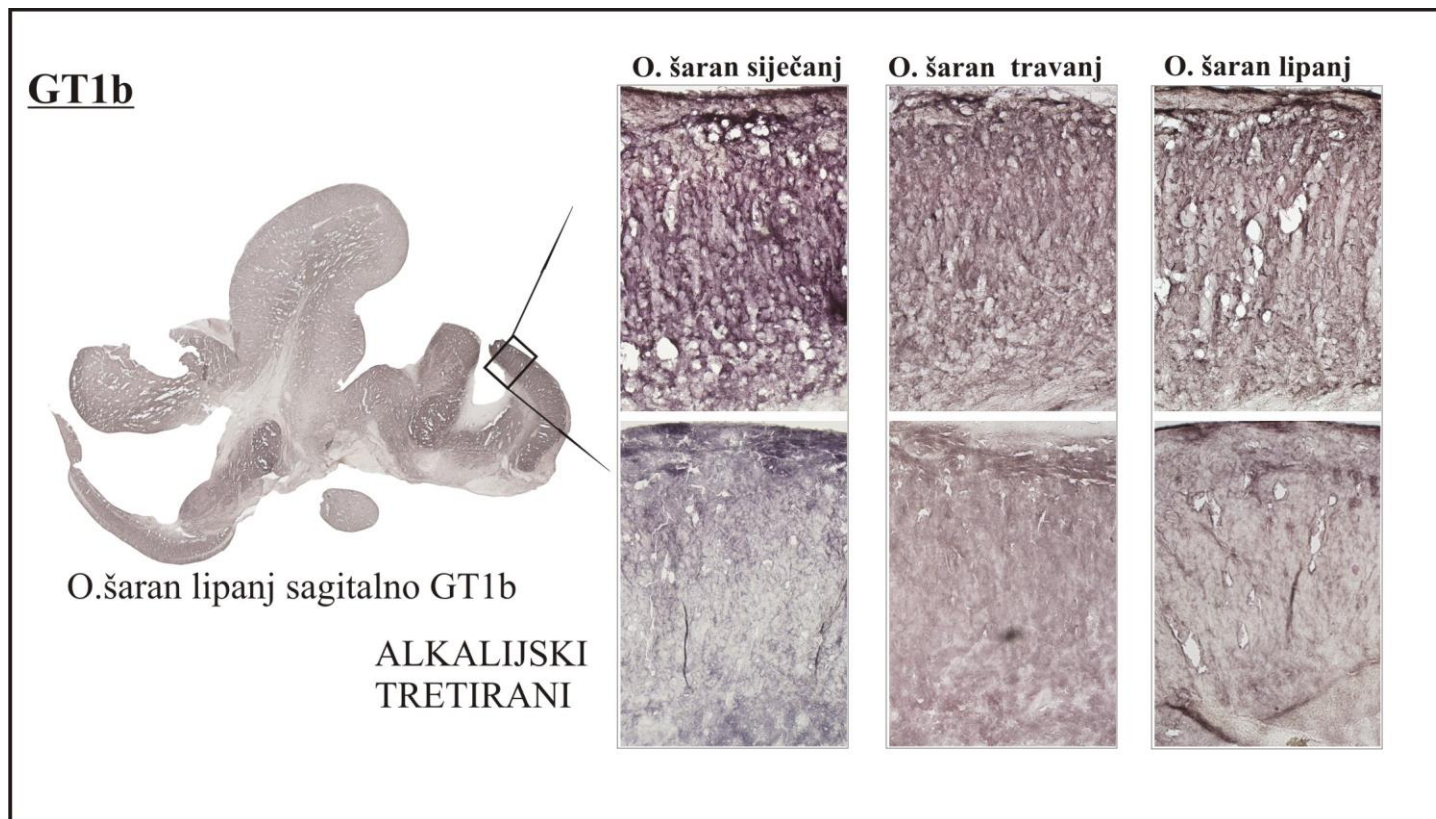
**Slika 37.** Ekspresija A2B5-epitopa prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *corpus cerebelli* pod povećanjem 200×.



**Slika 38.** Ekspresija gangliozida GT1b prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija lateralna *valvula cerebelli* pod povećanjem 200×.



**Slika 39.** Ekspresija gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b i A2B5-epitopa prikazana na koronarnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, razina rostralni *rhombencephalon* s prikazom struktura *lobus vagus* (lob X), *lobus glossopharyngeus* (lob IX) i *lobus facialis* (lob VII).



**Slika 40.** Ekspresija GT1b gangliozida prikazana na sagitalnim rezovima mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) tijekom odabranih mjeseci, regija *lob X-lobus vagus* pod povećanjem 100×.

#### 4.2. Promjene koncentracije gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) od siječnja do lipnja

Nakon ekstrakcije gangliozida, koncentracija ekstrahiranih gangliozida određena je pomoću kvantitativne kolorimetrijske Svennerholmove metode za određivanje koncentracije ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide (Svennerholm 1957), što je prikazano u Tablici 1. Gangliozidi su ekstrahirani iz uzoraka mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) od siječnja do lipnja.

**Tablica 1.** Koncentracija ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide određena pomoću kvantitativne kolorimetrijske Svennerholmove metode (N=10).

UZORAK	m( $\mu$ gSA/g tkiva)	UZORAK	m( $\mu$ gSA/g tkiva)
D. pastrva siječanj	197	O. šaran siječanj	221
D. pastrva veljača	199	O. šaran veljača	216
D. pastrva ožujak	196	O. šaran ožujak	213
D. pastrva travanj	189	O. šaran travanj	219
D. pastrva svibanj	198	O. šaran svibanj	211
D. pastrva lipanj	195	O. šaran lipanj	219
sr.vr.	<b>195,7</b>	sr.vr.	<b>216,5</b>
stdev	3,56	sdev	3,88
median	196,5	median	217,5
CV/ %	1,82	CV/ %	1,79

Kod obje vrste riba nisu pronađene promjene u sadržaju ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide tijekom svih šest mjeseci. Mozak d. pastrve sadržavao je  $195,7 \pm 3,56$   $\mu$ gSA/g tkiva, a mozak o. šarana  $216,5 \pm 3,88$   $\mu$ gSA/g tkiva. Može se uočiti veći sadržaj ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide u mozgu o. šarana u odnosu na mozak d. pastrve za 9,62%, što je prema rezultatima *t*-testa značajna razlika ( $P=0,00044$ ).

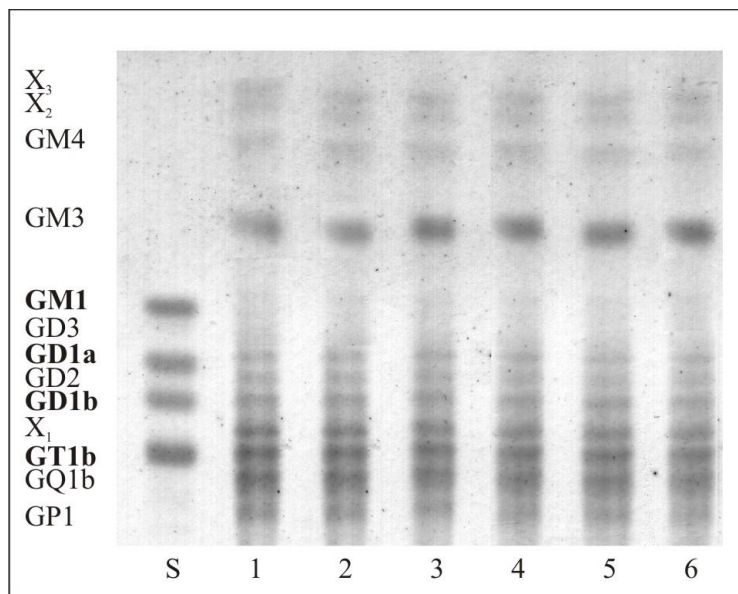


### 4.3. Promjene sastava gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) od siječnja do lipnja

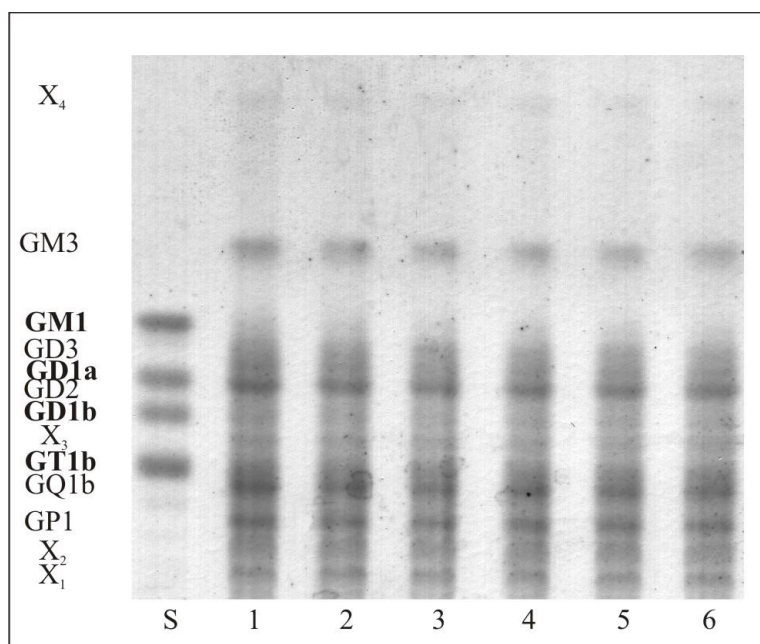
Nakon određivanja koncentracije ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide ekstrakti su razdvojeni tankoslojnom kromatografijom što je prikazano na Slikama 41., odnosno 42. Gangliozidi su izolirani iz uzoraka uzorkovanih u šest odabranih mjeseci: od siječnja do lipnja, a na pločicu je nanesen i standard koji je sadržavao četiri kompleksna gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b u količini od 0,25 nmol sijalinske kiseline. Udio pojedinih izoliranih gangliozida semikvantitativno je određen uz pomoć računalnog programa ImageJ, a rezultati su izraženi u postocima u odnosu na ukupnu količinu gangliozida u uzorku, detektiranih tankoslojnom kromatografijom i prikazani na Sl. 43., odnosno Sl. 44.

Tankoslojnom kromatografijom utvrđena je frakcija GM1 gangliozida kod d. pastrve u tragovima (1,64%), dok kod o. šarana nije detektirana u svih šest promatranih mjeseci. Gangliozid GD1a detektiran je u svim odabranim mjesecima kod obje ribe, s tim da je kod d. pastrve zastupljen manjim udjelom (3,58%) nego kod o. šarana (18,16%). D. pastrva ima veći sadržaj gangliozida GD1b (5,38%) u odnosu na o. šarana (2,1%). Gangliozid GT1b čini 29,7% kod šarana, a 7,8% kod d. pastrve. Polisijalilirane forme gangliozida vrlo su zastupljene kod obje vrste riba te čine 35,54% (d. pastrva) i 33,62% (o. šaran) od ukupnih gangliozida. Obje vrste u velikoj količini eksprimiraju gangliozid GM3 (d. pastrva 44,3%, o. šaran 21,20%). Kod obje vrste utvrđeni su i ostali gangliozidi GM4, GD3 i GD2 te neidentificirani gangliozidi X. Ostalih gangliozida d. pastrva posjeduje 21,9%, a o. šaran 16,34% u odnosu na sve izolirane gangliozide detektirane na pločici.

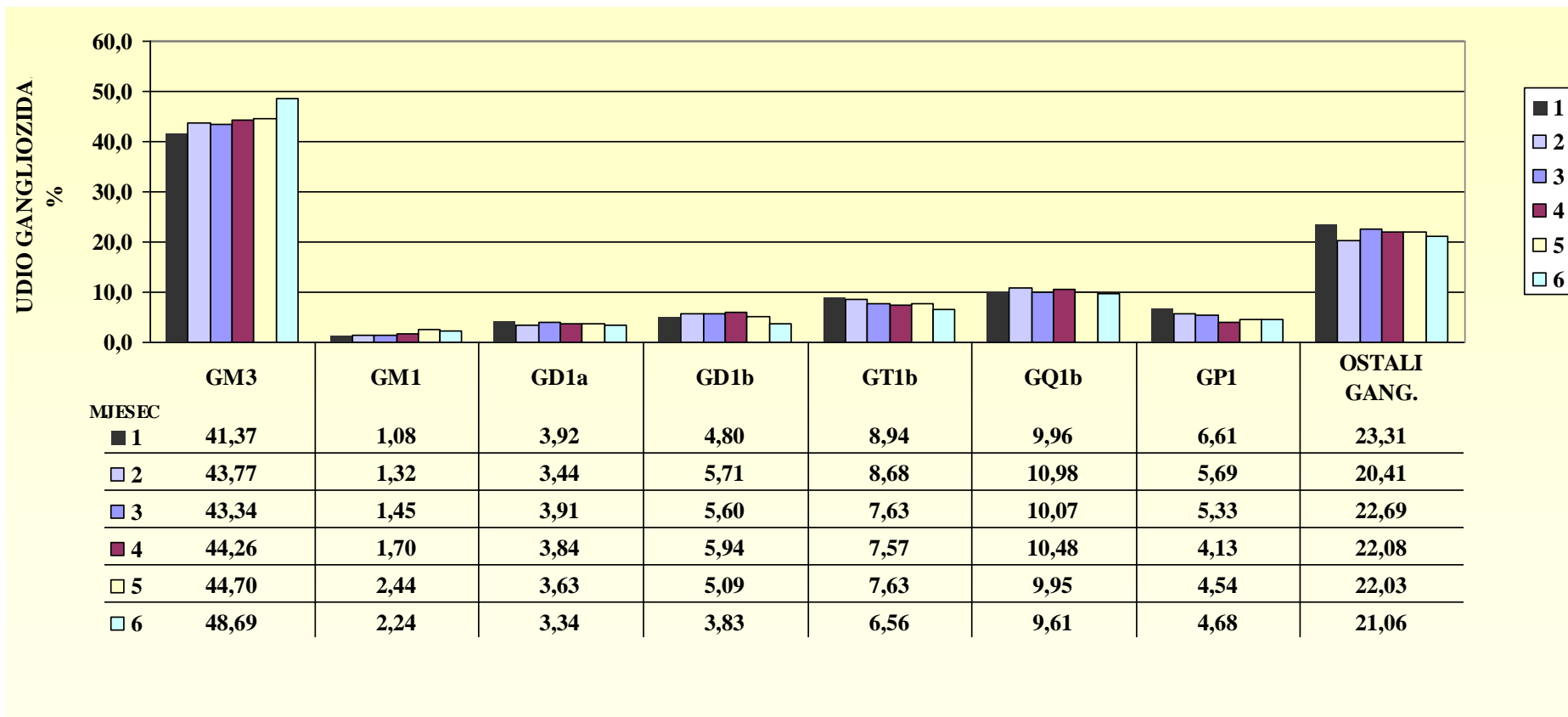
Na slici 43. mogu se uočiti promjene sastava gangliozida kod d. pastrve tijekom odabranih mjeseci. Promjena sadržaja monosijalogangliozida GM3 može se uočiti kao porast ljeti (48,69%) u odnosu na zimu (41,37%). Gangliozid GM1 pronađen je u tragovima, ali je vidljiv porast ljeti (2,24%) u odnosu na zimu (1,08%). Gangliozidi GD1a i GD1b ne mijenjaju znatno sadržaj tijekom mjeseci te su u rasponu od 3,34 do 3,92% (GD1a), odnosno 3,83 do 5,94% (GD1b). Gangliozid GT1b se u većim količinama nalazi zimi (8,94%) nego ljeti (6,56%). Ostali gangliozidi ne pokazuju znatnije promjene tijekom odabranih mjeseci.



**Slika 41.** Tankoslojna kromatografija gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). S) standard; 1) siječanj; 2) veljača; 3) ožujak; 4) travanj; 5) svibanj; 6) lipanj.

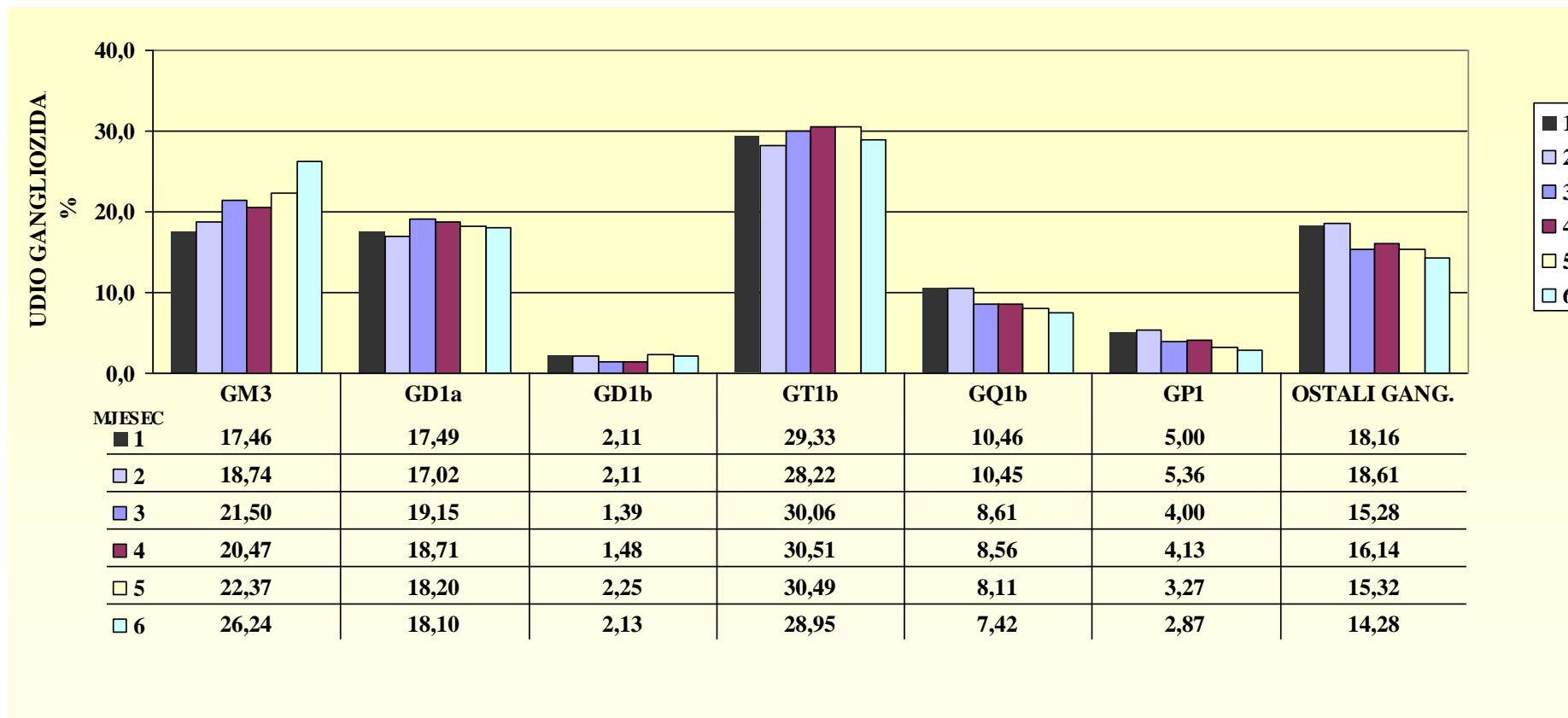


**Slika 42.** Tankoslojna kromatografija gangliozida izoliranih iz mozgova običnog šarana (*Cyprinus carpio*). S) standard; 1) siječanj; 2) veljača; 3) ožujak; 4) travanj; 5) svibanj; 6) lipanj.



**Slika 43.** Grafički prikaz zastupljenosti pojedinih gangliozida u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). 1) siječanj; 2) veljača; 3) ožujak; 4) travanj; 5) svibanj; 6) lipanj.

Na slici 44. mogu se uočiti promjene sastava gangliozida kod o. šarana tijekom odabranih mjeseci. Promjena sadržaja monosijalogangliozida GM3 može se uočiti kao rast ljeti (26,24%) u odnosu na zimu (17,46%). Gangliozid GM1 nije pronađen. Gangliozid GD1a, GD1b i GT1b ne mijenjaju znatno sadržaj tijekom mjeseci te su u rasponu od 17,02 do 18,9% (GD1a), 1,38 do 2,25% (GD1b) i 28,2 do 30,5% (GT1b). Polisijalilirane forme gangliozida pokazuju znatnije promjene tijekom odabranih mjeseci. Gangliozid GQ1b utvrđen je u većim količinama zimi (10,46%) nego ljeti (7,42%), kao i GP1 koji se zimi nalazi u 5% ukupnih gangliozida, dok ga ljeti nalazimo u 2,87%. Ostali gangliozidi također pokazuju smanjenje sadržaja ljeti u odnosu na zimu.



**Slika 44.** Grafički prikaz zastupljenosti pojedinih gangliozida u mozgu običnog šarana (*Cyprinus carpio*). 1) siječanj; 2) veljača; 3) ožujak; 4) travanj; 5) svibanj; 6) lipanj.

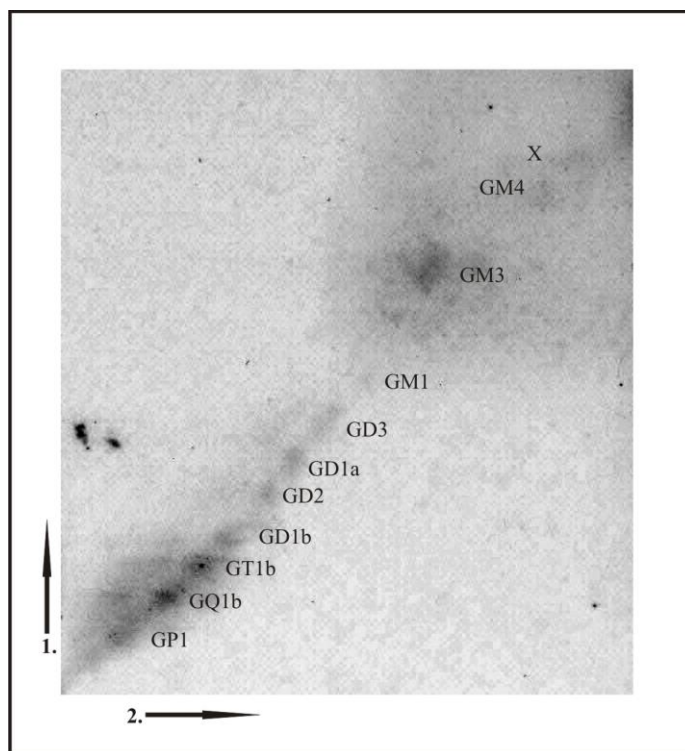
#### **4.4. Udio gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji u mozgu dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*)**

Radi utvrđivanja udjela alkalijski labilnih gangliozida u odnosu na alkalijski stabilne, urađene su dvodimenzionalne tankoslojne kromatografije gangliozida izoliranih iz zimskih i ljetnih uzoraka mozgova dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) prikazane na slikama 45. i 46., odnosno 47. i 48. U svakoj dimenziji na pločicu je nanesen i standard koji je sadržavao četiri kompleksna gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b u količini od 0,25 nmol sijalinske kiseline. Udio pojedinih alkalijski labilnih gangliozida semi-kvantitativno je određen uz pomoć računalnog programa ImageJ, a rezultati su izraženi u postocima u odnosu na ukupnu količinu gangliozida u uzorku detektiranog dvodimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom.

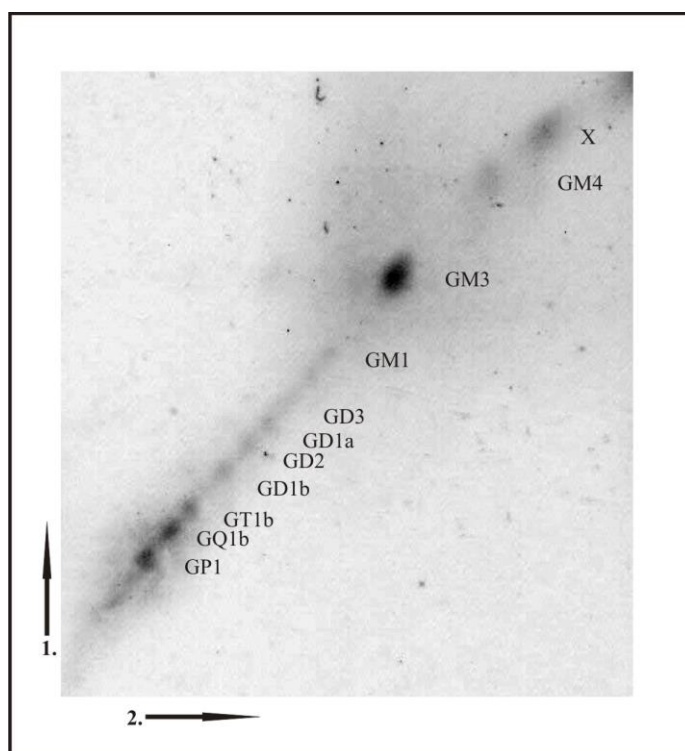
Alkalijski labilni gangliozidi mogu se uočiti izvan dijagonale koju formiraju alkalijski stabilni gangliozidi, jer nakon tretmana amonijakom alkalijski labilni prelaze u derivate gangliozida koji imaju različitu brzinu kretanja kromatografskom pločicom od nativnih gangliozida.

Kod d. pastrve u siječnju (Sl. 45.) utvrđene su veće količine alkalijski labilnih gangliozida (40,56%), dok su u lipnju (Sl. 46.) utvrđeni u manjem udjelu (33,14%).

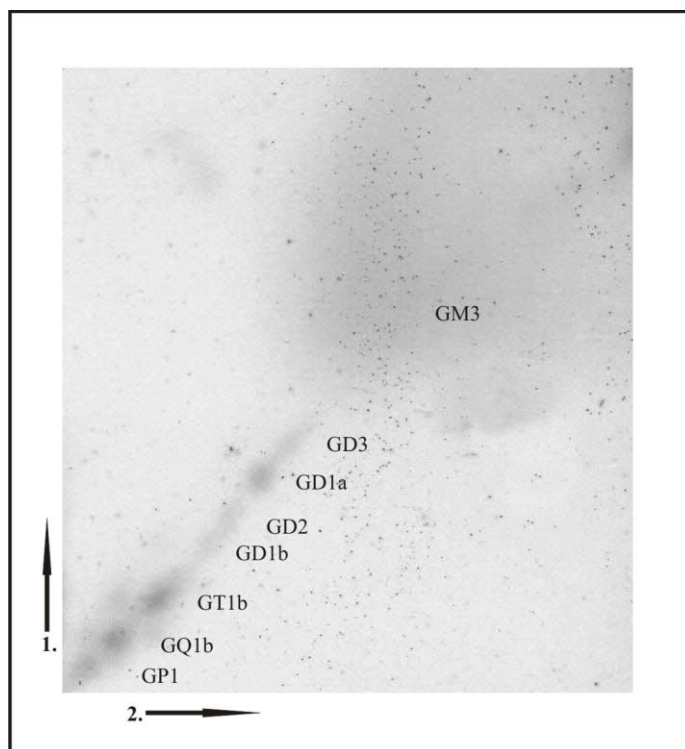
Kod o. šarana u siječnju (Sl. 47.) utvrđene su količine alkalijski labilnih gangliozida (30,86%), što je približno jednako onima u lipnju kada iznose 30,88% (Sl. 48.).



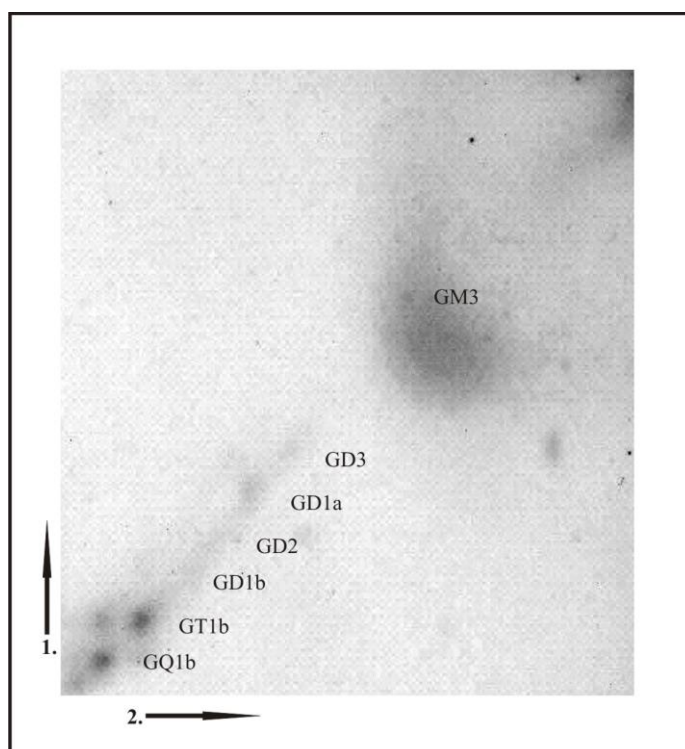
**Slika 45.** Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija gangliozida ekstrahiranih iz mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) uzorkovanog u siječnju. 1) smjer prve dimenzije; 2) smjer druge dimenzije



**Slika 46.** Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija gangliozida ekstrahiranih iz mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) uzorkovanog u lipnju. 1) smjer prve dimenzije; 2) smjer druge dimenzije.



**Slika 47.** Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija gangliozida ekstrahiranih iz mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) uzorkovanog u siječnju. 1) smjer prve dimenzije; 2) smjer druge dimenzije.



**Slika 48.** Dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija gangliozida ekstrahiranih iz mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*) uzorkovanog u lipnju. 1) smjer prve dimenzije; 2) smjer druge dimenzije.



#### 4.5. Imunospecifičnost protutijela na gangliozide mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*)

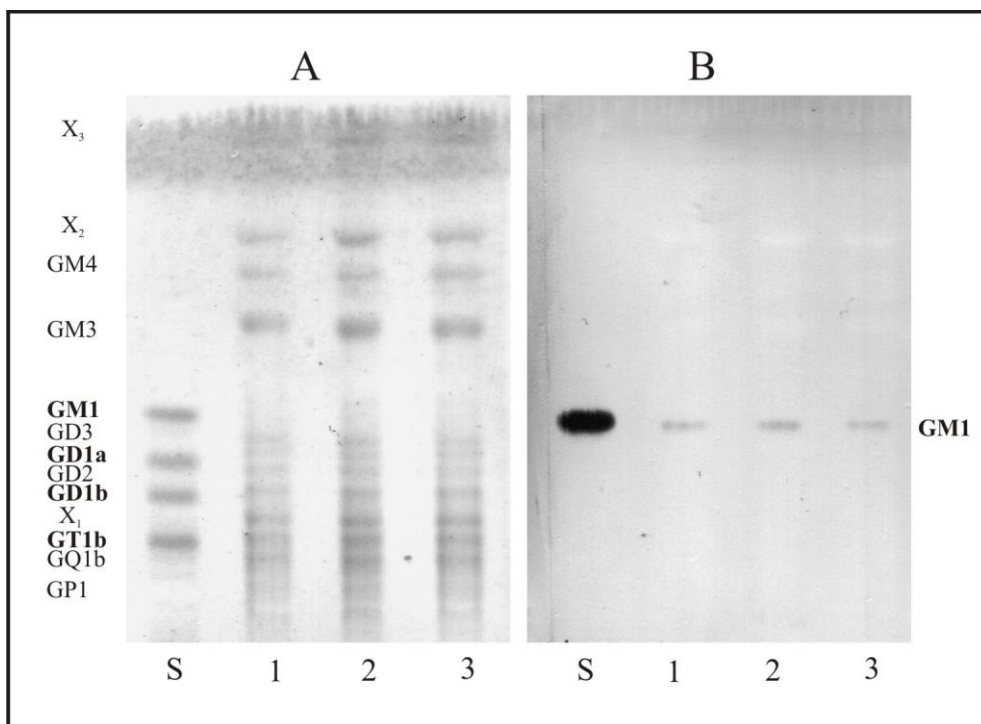
Imunoprepoznavanje na pločama za tankoslojnu kromatografiju urađeno je u svrhu dokazivanja specifičnosti vezanja protutijela korištenih za imunohistokemiju za pojedine strukture gangliozida izoliranih iz zimskih i ljetnih uzoraka mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*). Na svakoj polovici pločice nanesen je standard koji je sadržavao četiri kompleksna gangliozida GM1, GD1a, GD1b i GT1b u količini od 0,25 nmol sijalinske kiseline i gangliozidi izolirani iz siječanjkih, travanjskih i lipanjskih uzoraka mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*). Za detekciju gangliozida, jedna polovica ploče poprskana je Svennerholmovim reagensom kako je već opisano, a druga je korištena za imunoprepoznavanje. Sadržaj gangliozida semikvantitativno je određen uz pomoć računalnog programa ImageJ, a rezultati su izraženi u razlikama u odnosu na količinu gangliozida u uzorcima iz siječnja koji predstavljaju referentne vrijednosti (100%) kao što je prikazano na Sl. 59. i 60.

Unatoč tome što paralelno razvijenom tankoslojnom kromatografijom nije utvrđen gangliozid GM1 kod obje ribe (Sl. 49A. i 50A.), imunoprepoznavanjem se može uočiti pozitivna reakcija protutijela GM1 u tragovima kod d. pastrve (Sl. 49B.), a još slabija kod o. šarana (Sl. 50B.). Na slici 49B. vidljivo je blago povećanje imunoreaktivnosti GM1 u lipnju ( $\sim 1,24\times$ ) u odnosu na siječanj.

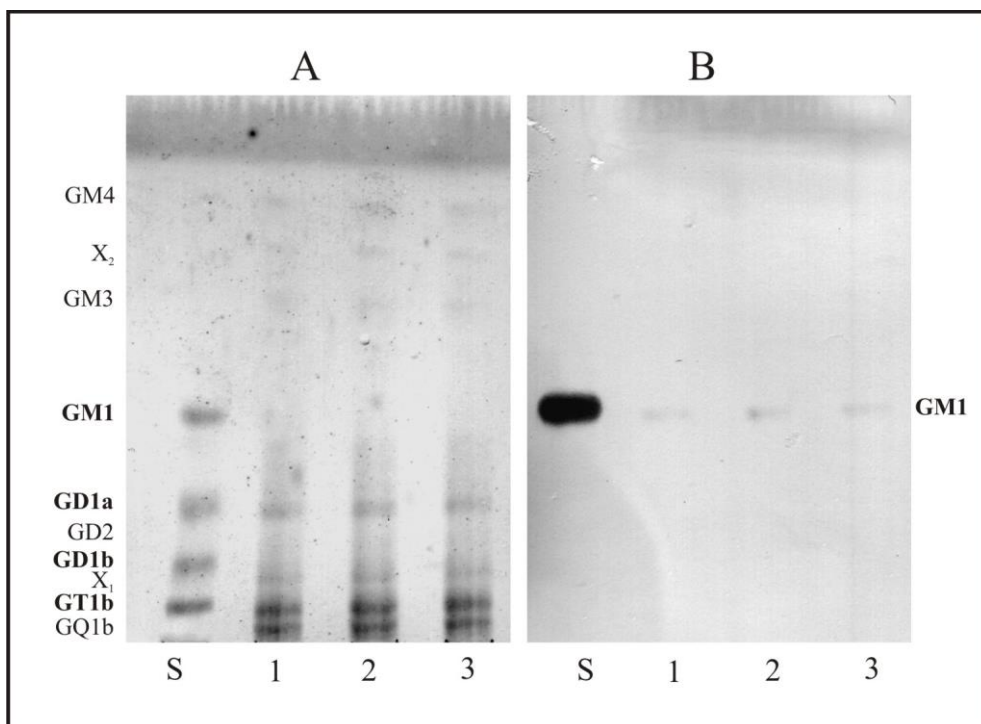
Detekcija gangliozida GD1a pokazala je znatnije promjene kod obje ribe. Tijekom lipnja kod d. pastrve utvrđena je jača imunoreaktivnost ( $\sim 6\times$ ) u odnosu na siječanj (Sl. 51B.). Tijekom lipnja kod o. šarana utvrđena je umanjena imunoreaktivnost ( $\sim 1,2\times$ ) u odnosu na siječanj (Sl. 52B.).

Detekcija gangliozida GD1b također pokazuje znatnije promjene kod obje ribe. Tijekom lipnja kod d. pastrve utvrđena je manja imunoreaktivnost ( $\sim 9\times$ ) u odnosu na siječanj (Sl. 53B.). Tijekom lipnja kod o. šarana utvrđena je manja imunoreaktivnost ( $\sim 1,5\times$ ) u odnosu na siječanj (Sl. 54B.). Pri imunoprepoznavanju gangliozida GD1b prisutno je i GD1b-povezano bojanje vrpce standarda u visini između GD1a i GM1 u iznosu od 10%.

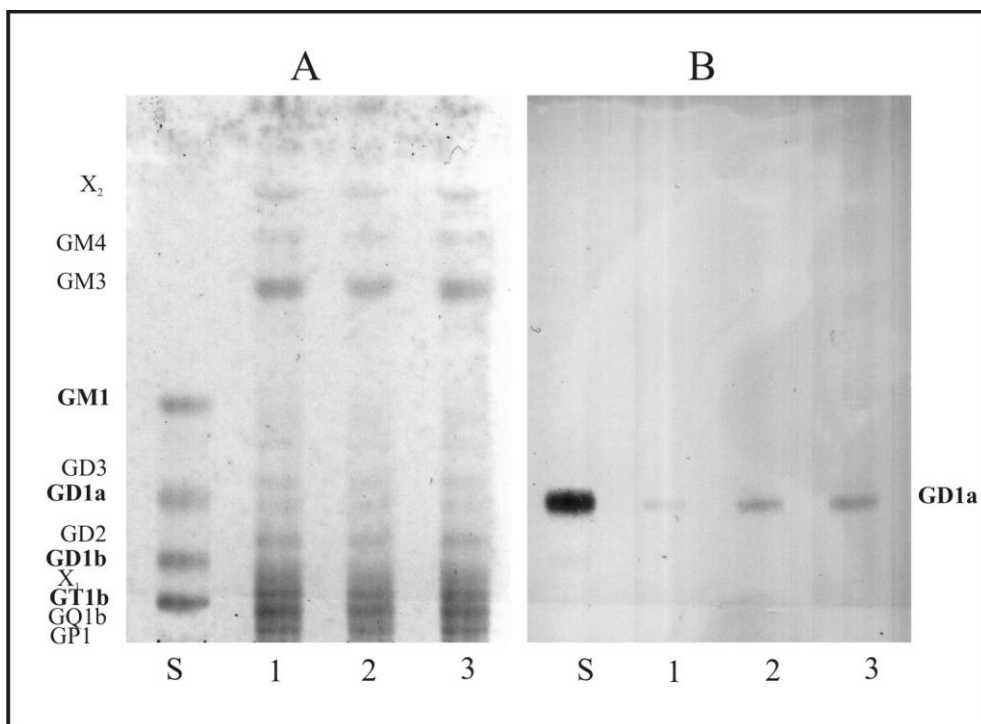
Detekcija GT1b i A2B5- epitopa nisu vidljive znatnije promjene kod obje ribe. Vidljivo je da o. šaran ima jaču imunoreaktivnost od d. pastrve kod obje reakcije imunoprepoznavanja (Sl. 55. i 56., odnosno 57. i 58.).



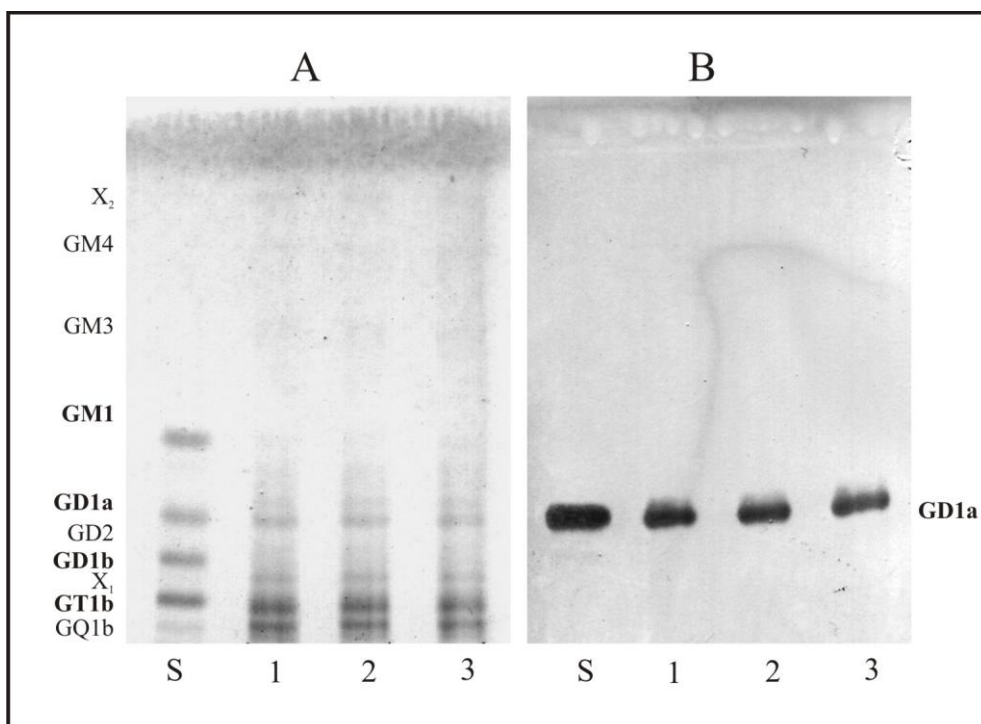
**Slika 49.** Imunoprepoznavanje gangliozida GM1 na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GM1; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



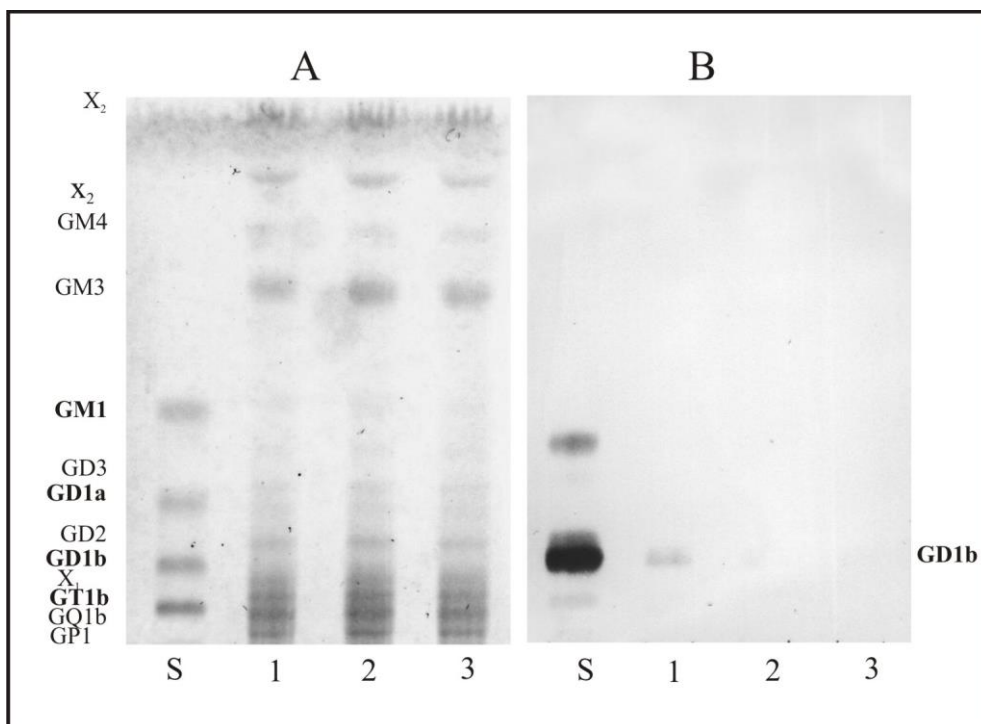
**Slika 50.** Imunoprepoznavanje gangliozida GM1 na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова običnog šarana (*Cyprinus carpio*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GM1; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



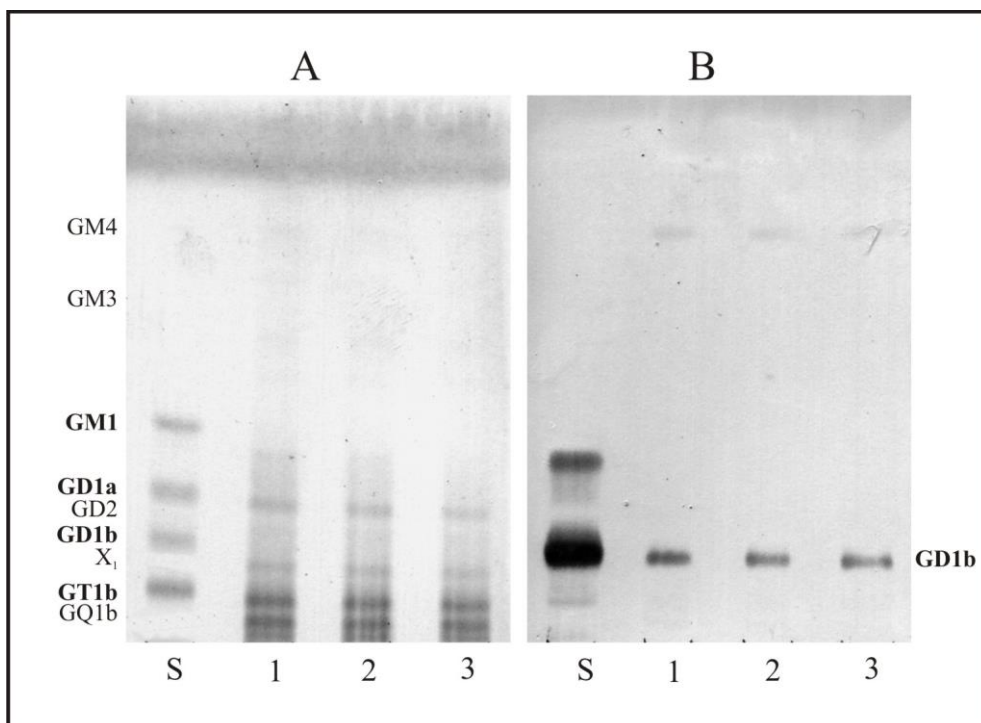
**Slika 51.** Imunoprepoznavanje gangliozida GD1a na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GD1a; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



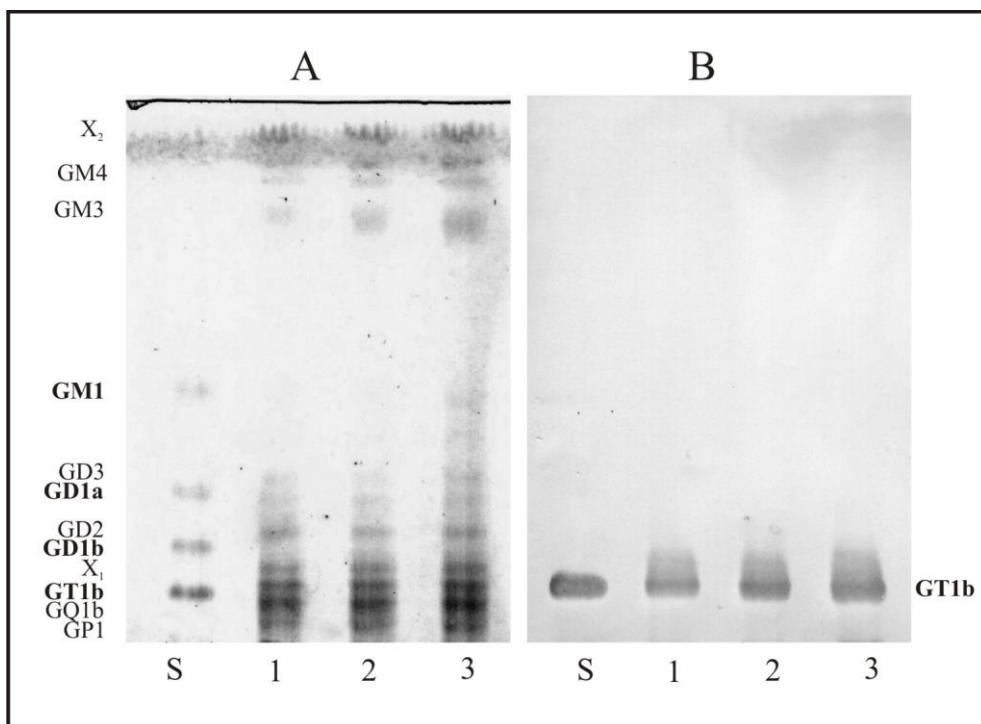
**Slika 52.** Imunoprepoznavanje gangliozida GD1a na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова običnog šarana (*Cyprinus carpio*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GD1a; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



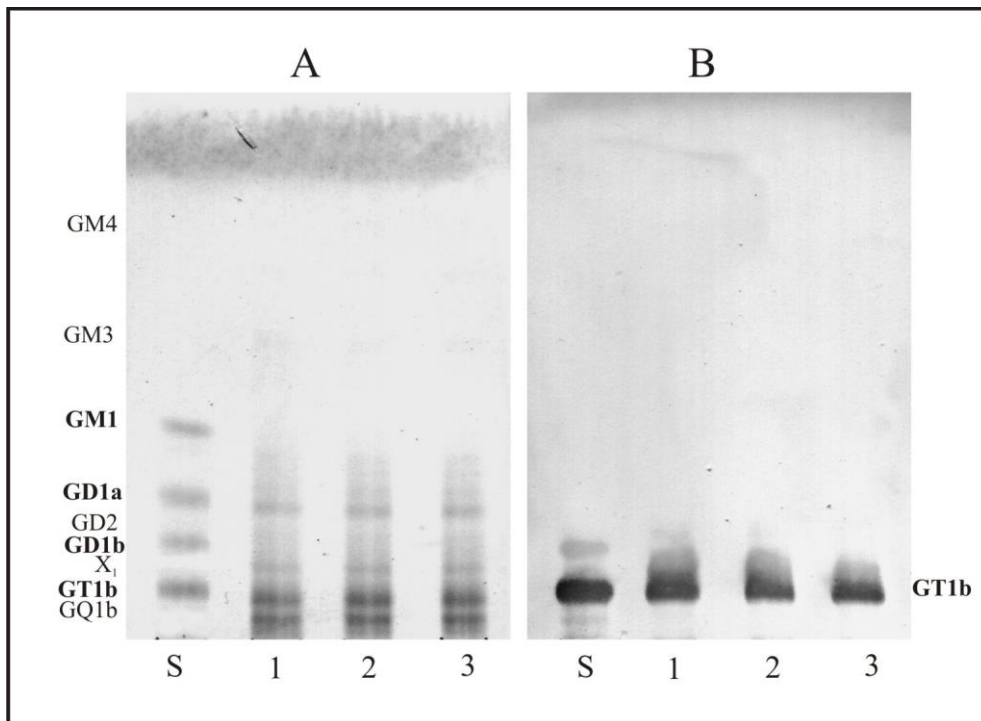
**Slika 53.** Imunoprepoznavanje gangliozida GD1b na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GD1b; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



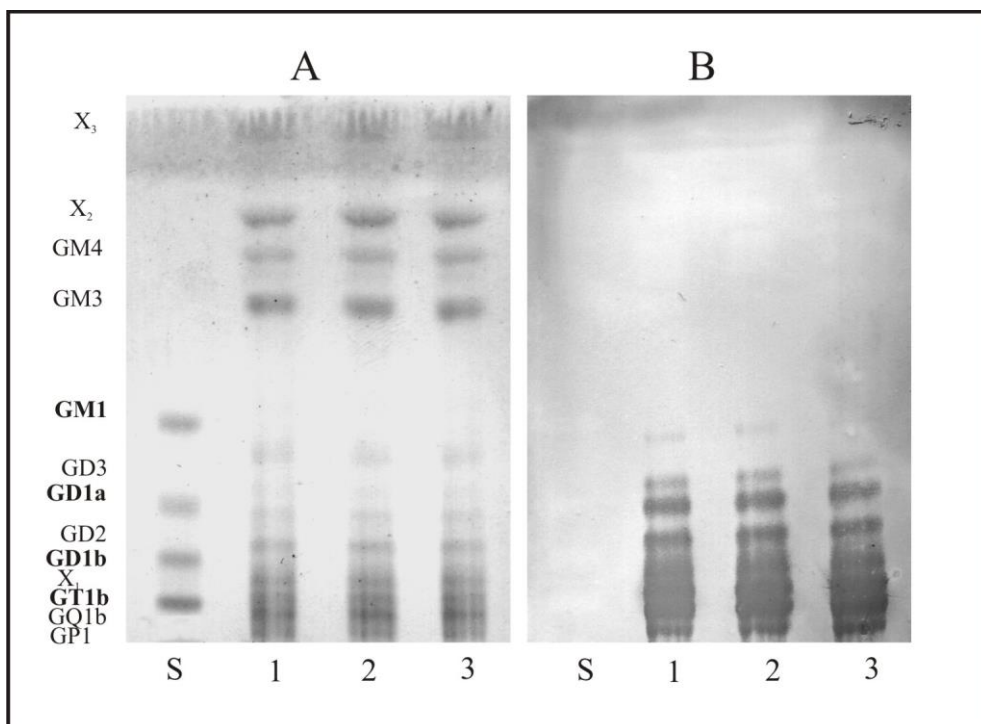
**Slika 54.** Imunoprepoznavanje gangliozida GD1b na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова običnog šarana (*Cyprinus carpio*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GD1b; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



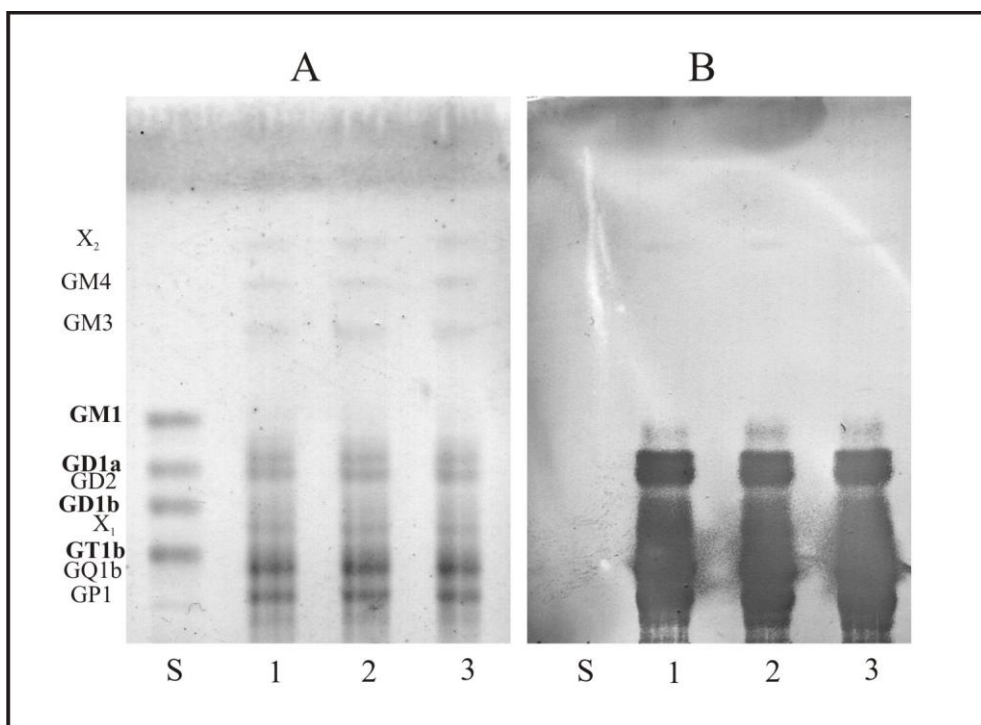
**Slika 55.** Imunoprepoznavanje gangliozida GT1b na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GT1b; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



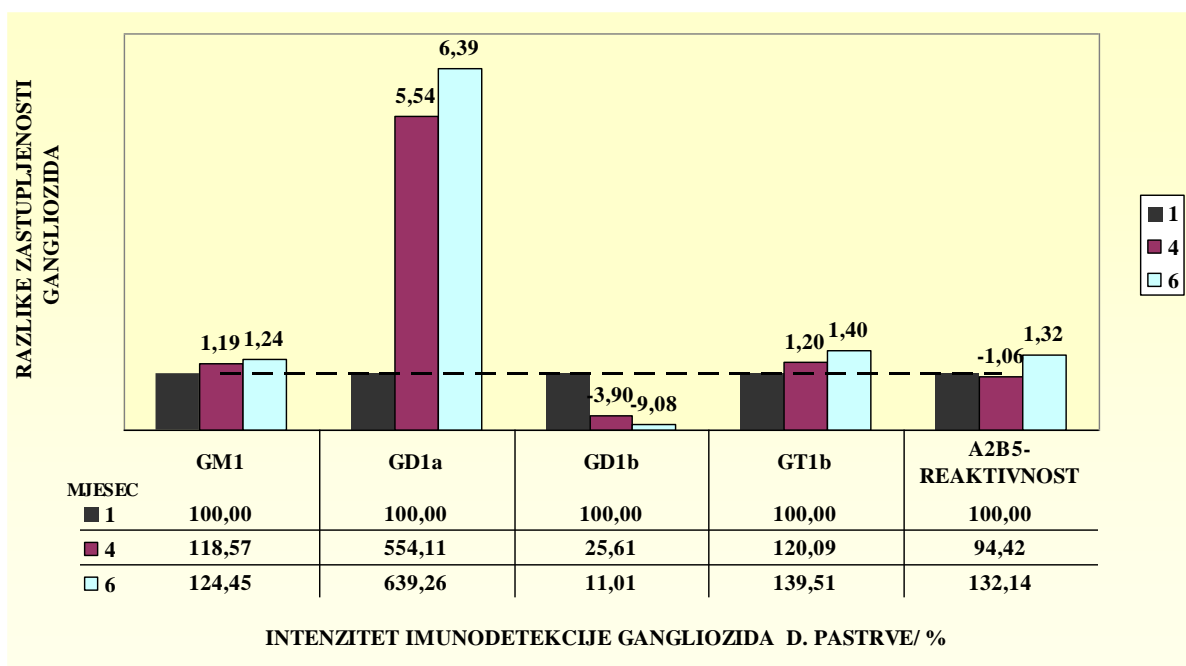
**Slika 56.** Imunoprepoznavanje gangliozida GT1b na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова običnog šarana (*Cyprinus carpio*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom anti-GT1b; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



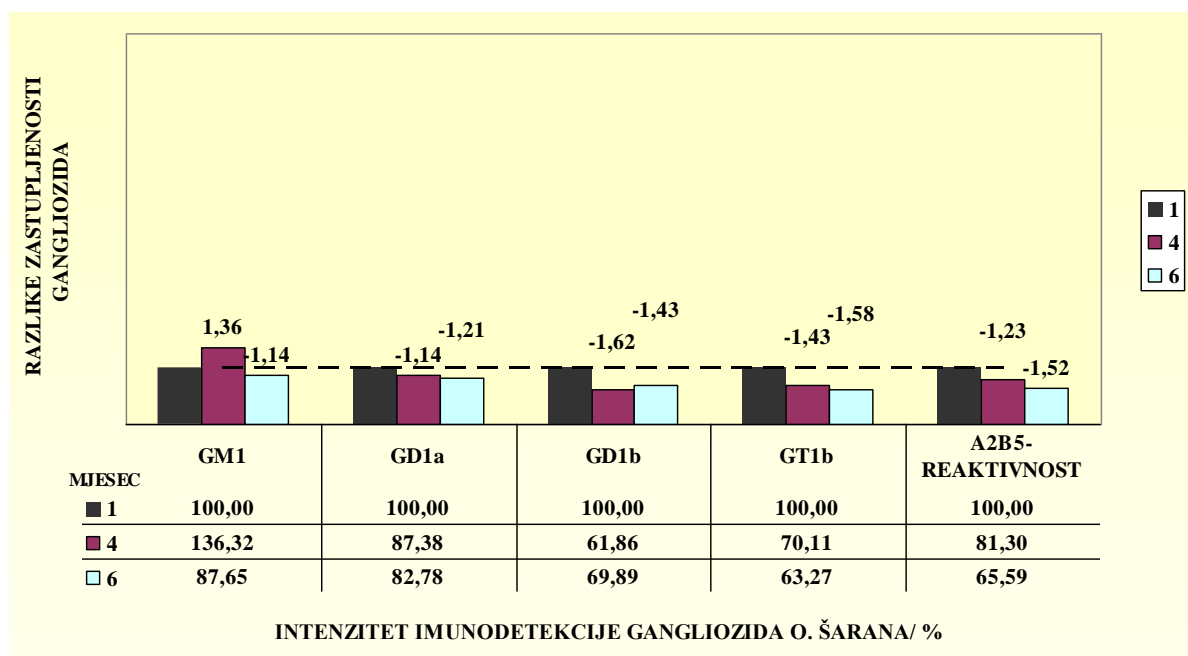
**Slika 57.** Imunoprepoznavanje A2B5-epitopa na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom A2B5; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



**Slika 58.** Imunoprepoznavanje A2B5-epitopa na pločama za tankoslojnu kromatografiju gangliozida izoliranih iz mozгова običnog šarana (*Cyprinus carpio*). **A)** vizualizirani rezorcinol/HCl reagensom; **B)** imunoprepoznavanje protutijelom A2B5; S) standard; 1) siječanj; 2) travanj; 3) lipanj.



**Slika 59.** Grafički prikaz razlika pojedinih gangliozida izoliranih iz mozgov dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) dobivenih imuno-prepoznavanjem. Referentne vrijednosti predstavljaju uzorke iz siječnja, dok su dane razlike uzoraka iz travnja i lipnja. 1) siječanj; 4) travanj; 6) lipanj.



**Slika 60.** Grafički prikaz razlika pojedinih gangliozida izoliranih iz mozgov običnog šarana (*Cyprinus carpio*) dobivenih imuno-prepoznavanjem. Referentne vrijednosti predstavljaju uzorke iz siječnja, dok su dane razlike uzoraka iz travnja i lipnja. 1) siječanj; 4) travanj; 6) lipanj.

Prema dobivenim rezultatima u ovom radu prikazane su promjene sadržaja, sastava i distribucije kompleksnih gangliozida te udjela modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji po regijama mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kako međusobno tako i tijekom sezonskih temperaturnih prilagodbi tijekom odabranih mjeseci. Mjeseci su odabrani na način da obuhvate ključne temperaturne ekstreme (siječanj i lipanj) te promjene u režimu aktivnosti (travanj). Naime, za razliku od d. pastrve koja ne podliježe velikim promjenama temperature, hranidbe ni aktivnosti, o. šaran nakon prezimljavanja bez hrane doživljava preokret u temperaturnom i hranidbenom režimu. O. šarani su u ovom istraživanju počeli s hranidbom u travnju, nakon tzv. „buđenja“ ribnjaka (osobno priopćenje J. Radaković, Ribnjak Grudnjak, Zdenci, Orahovica) izazvanog miješanjem vode nakon otapanja leda te postizanjem temperature vode više od 12 °C.

Kod obje vrste riba pomoću kvantitativne kolorimetrijske Svennerholmove metode nisu pronađene promjene u sadržaju ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide, a mozak o. šarana sadržavao je 10% više ukupne sijalinske kis. od mozga d. pastrve.

Međutim, tankoslojnom kromatografijom ustanovljeno je smanjenje monosijalogangliozida kod obje vrste, malo povećanje di- i trisijalogangliozida kod dužičaste pastrve, a povećanje udjela polisijalogangliozida kod običnog šarana pri niskim temperaturama.

Zimi se kod d. pastrve može uočiti smanjeni sadržaj monosijalogangliozida GM3. Gangliozid GM1 pronađen je u tragovima, ali je vidljiva manja količina zimi u odnosu na ljeto. Gangliozidi GD1a i GD1b ne mijenjaju znatno sadržaj tijekom mjeseci. Gangliozid GT1b se u neznatno većim količinama nalazi zimi, dok ostali gangliozidi ne pokazuju znatnije promjene tijekom odabranih mjeseci. Ekstrakti gangliozida d. pastrve imaju frakcije koje migriraju paralelno s GD1a sisavaca u svim promatranim mjesecima, no gangliozid GD1a nije utvrđen sve do lipnja imunohistokemijskim bojanjem s odgovarajućim i provjerenim antitijelima, vjerojatno zbog različitih promjena u ceramidnom sidru (Tagawa i sur. 2002) tijekom zime ili zbog promjene aktivnosti sijaliltransferaze GD1a-sintaze (Freischütz i sur. 2008).

Zimi se kod o. šarana može uočiti smanjeni sadržaj monosijalogangliozida GM3, gangliozid GM1 nije pronađen, dok gangliozidi GD1a, GD1b i GT1b ne mijenjaju znatno



sadržaj tijekom odabranih mjeseci. Polisijalilirane forme gangliozida prikazuju znatnije promjene: GQ1b utvrđen je u većim količinama zimi, kao i GP1. Ostali gangliozidi također pokazuju smanjenje sadržaja ljeti u odnosu na zimu.

Dvodimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom kod d. pastrve zimi utvrđene su veće količine modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji (40,56%), dok su ljeti utvrđeni u manjem udjelu (33,14%). Kod o. šarana utvrđene su približno podjednake količine modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji zimi (30,86%) i ljeti (30,88%).

Imunotankoslojnom kromatografijom potvrđeni su prethodni rezultati našeg istraživanja te je provjerena imunospecifičnost korištenih protutijela. Unatoč tome što paralelno razvijenim tankoslojnim kromatografijama nije utvrđen gangliozid GM1 kod obje ribe, imunoprepoznavanjem se uočila pozitivna reakcija protutijela GM1, ali u tragovima kod d. pastrve, a još slabija kod o. šarana. Razlog tome je vjerojatno nedovoljna količina GM1 za detekciju Svennerholmovim reagensom te veća izloženost epitopa prepoznavanju protutijelom zbog hidrofobnog plastičnog premaza za koji se smatra da reorijentira glikolipide tako da je njihov polarni glikan okrenut od sloja sorbensa, a prema otapalu, gdje je učinkovitije komplementarno vezanje (Karlsson i Stromberg 1987).

Imunodetekcijom gangliozida GD1a mogu se uočiti znatnije promjene kod obje ribe tijekom aklimatizacije, ali i međusobno. Kod d. pastrve utvrđena je manja imunoreaktivnost zimi, a kod o. šarana jača.

Imunodetekcijom gangliozida GD1b također su vidljive znatnije promjene kod obje ribe. Zimi je kod d. pastrve utvrđena jača imunoreaktivnost, kao i kod o. šarana, ali ne tolikim intenzitetom.

Kod detekcije GT1b i A2B5-reaktivnih gangliozida nisu vidljive znatnije promjene kod obje ribe. Vidljivo je da o. šaran ima jaču imunoreaktivnost od d. pastrve kod obje reakcije imunoprepoznavanja.

Sva korištena visokospecifična monoklonska protutijela na kompleksne gangliozide imala su pozitivnu reakciju na rezovima mozгова, osim protutijela na GM1 gangliozid. Imunohistokemijskom lokalizacijom gangliozida u mozgu d. pastrve i o. šarana nije utvrđen gangliozid GM1 niti u jednom od odabranih mjeseci, za što je moguće objašnjenje kriptični položaj epitopa u tkivu. Naime, kriptotop ili kriptični epitop je antigensko mjesto ili epitop skriven u polimernim proteinima jer je prisutan na površini podjedinica koje su postale zaklonjene. Kriptotopi postaju antigenski aktivni tek nakon disocijacije proteinskih agregata (Van Regenmortel 2008) ili upotrebom raznih deterdženata (Heffer-Lauc i sur. 2007).

Ekspresija gangliozida tkivno je i razvojno specifična. GD1a i GT1b gangliozidi su izvrsni ligandi glikoproteina pridruženoga mijelinu, MAG (engl. *myelin associated glycoprotein*) koji je sastavni dio mijelinskih ovojnica, poznat kao inhibitor regeneracije u središnjem živčanom sustavu (Yang i sur. 1996; Collins i sur. 1997) pa će se rezultati ekspresije tih gangliozida skupno tumačiti. Osim toga, GD1a je marker sinaptogeneze, a GT1b je tipičan za sve zrele neurone.

Imunohistokemijskom lokalizacijom gangliozida u mozgu d. pastrve zimi utvrđena je slijedeća distribucija gangliozida po pojedinim regijama mozga.

Na protutijelo GD1a nije prisutna pozitivna reakcija u niti jednoj regiji mozga, dok je prisutna jaka ekspresija gangliozida GT1b u krajnjem mozgu, optičkom tektumu i to najjača u 7. sloju (paralelna vlakna iz *torus longitudinalisa*), zatim molekularnom sloju korpusa cerebeluma, granularnom sloju cerebelarne valvule te molekularnom sloju kaudalnog režnja i paralelnim vlaknima cerebelarne kriste. Zanimljivo je kako su sve ovo nemijelinizirana vlakna te da se GT1b pojavljuje na nemijeliniziranim vlaknima i u mozgu viših kralježnjaka npr. miša i štakora ( npr. na paralelnim vlaknima cerebeluma).

Gangliozid GD1b pokazuje slabu ekspresiju u krajnjem mozgu, dok je prisutna jaka ekspresija u optičkom tektumu i to u 1., odnosno najdubljem sloju zaduženom za motoriku, odnosno pokrete očiju, dok manju zastupljenost pokazuje u trećem (smještena mijelinizirana vlakna) i 6. sloju dok ga u 7. sloju nema. Umjerena ekspresija prisutna je u molekularnom sloju korpusa cerebeluma, granularnom sloju cerebelarne valvule te jaka ekspresija u molekularnom sloju kaudalnog režnja i paralelnim vlaknima cerebelarne kriste.

A2B5-epitop pokazuje umjerenu difuznu reakciju u krajnjem mozgu, optičkom tektumu i to u 1. i 7. sloju, zatim molekularnom sloju korpusa cerebeluma. Jaka ekspresija prisutna je u granularnom sloju cerebelarne valvule te molekularnom sloju kaudalnog režnja, dok je u paralelnim vlaknima cerebelarne kriste prisutna umjerena ekspresija.

Imunohistokemijskom lokalizacijom gangliozida u mozgu o. šarana zimi utvrđena je slijedeća distribucija gangliozida po pojedinim regijama mozga.

Gangliozid GD1a pokazuje umjerenu difuznu reakciju u krajnjem mozgu, dok jaku ekspresiju pokazuje GT1b. Prisutna je umjerena reakcija na GD1a u optičkom tektumu i to u 4., 5. i 7. sloju, a odsutna u 1. i 3. sloju, dok GT1b pokazuje umjerenu reakciju u 2. sloju. GD1a pokazuje jaku ekspresiju u molekularnom sloju korpusa cerebeluma za razliku od GT1b koji jaku ekspresiju pokazuje u granularnom sloju. Zatim, umjerenu ekspresiju GD1a nalazimo u molekularnom sloju cerebelarne lateralne valvule, dok jaku ekspresiju GT1b u svim njenim slojevima. Naposljetku, prisutna je slaba ekspresija GD1a, a jaka ekspresija

GT1b u vagalnom režnju. Iako se ova dva gangliozida pojavljuju zajedno na većini struktura, razlikuju se jačinom ekspresije što nas navodi na zaključak kako imaju nešto drugačiju ulogu u ovim regijama.

Gangliozid GD1b pokazuje slabu ekspresiju u krajnjem mozgu, dok je prisutna umjerena ekspresija u 1. sloju optičkog tektuma, a slabu u 5. i 6. sloju, dok ga u 2., 3., 4. i 7. sloju nema. Jaka ekspresija prisutna je u granularnom sloju korpusa cerebeluma i cerebelarne lateralne valvule te slaba ekspresija u vagalnom režnju.

A2B5-epitop pokazuje umjerenu difuznu reakciju u krajnjem mozgu, jaku u 1. sloju optičkog tektuma, zatim granularnom sloju korpusa cerebeluma i cerebelarne lateralne valvule te jaka ekspresija u vagalnom režnju.

Imunohistokemijskom lokalizacijom gangliozida u mozgu d. pastrve ljeti utvrđene su slijedeće promjene distribucije gangliozida po pojedinim regijama mozga.

Ljeti se javlja pozitivna reakcija na GD1a gangliozid. Prisutna je slaba reakcija u krajnjem mozgu i donjem režnju hipotalamusa, dok je prisutna jaka ekspresija u 1. sloju optičkog tektuma. Umjerena ekspresija prisutna je u granularnom sloju korpusa cerebeluma, te granularnom i molekularnom sloju cerebelarne valvule, dok je odsutna u ganglijskom sloju. Identična distribucija ovog gangliozida tipična je za cerebelum viših vertebrata. Umjerena ekspresija prisutna je i u molekularnom i granularnom sloju kaudalnog režnja te paralelnim vlaknima cerebelarne kriste. Ekspresija gangliozida GT1b se smanjuje u krajnjem mozgu, optičkom tektumu s napomenom da za razliku od zime izostaje u 1. i 3. sloju, a javlja se u 6. sloju gdje nije bio prisutan zimi. U molekularnom i granularnom sloju korpusa cerebeluma i cerebelarne valvule se smanjuje ekspresija. U paralelnim vlaknima cerebelarne kriste i granularnom sloju kaudalnog režnja smanjena je ekspresija, dok u molekularnom sloju kaudalnog režnja ostaje nepromijenjena.

Gangliozid GD1b ne pokazuje promjenu ekspresije u krajnjem mozgu i optičkom tektumu. Povećanje ekspresije prisutno je u granularnom sloju korpusa cerebeluma i svim slojevima cerebelarne valvule. Distribucija u kaudalnom režnju pokazuje zanimljive promjene. Naime, vidljivo je povećanje u granularnom, a smanjenje u molekularnom sloju, kao i u paralelnim vlaknima cerebelarne kriste.

A2B5-epitop ne pokazuje značajniju promjenu ekspresije u niti jednoj promatranoj regiji mozga.

Imunohistokemijskom lokalizacijom gangliozida u mozgu o. šarana ljeti utvrđene su slijedeće promjene distribucije gangliozida po pojedinim regijama mozga.

Gangliozid GD1a pokazuje povećanje ekspresije u krajnjem mozgu, dok GT1b pokazuje smanjenje ekspresije. Prisutno je smanjenje ekspresije GD1a u 4. i 5. sloju optičkog tektuma, gubi se u 6. sloju, dok u 7. sloju pokazuje povećanje ekspresije. GT1b pokazuje povećanje ekspresije u 3., 4. i 5. sloju, dok se gubi u 1. i 6. sloju. GD1a i GT1b pokazuju smanjenje ekspresije u svim slojevima korpusa cerebeluma uz napomenu da se GD1a gubi u ganglijskom sloju. U svim slojevima cerebelarne lateralne valvule nalazimo pojačanu ekspresiju GD1a, a smanjenu ekspresiju GT1b. U vagalnom režnju GD1a ne pokazuje značajnije promjene, dok GT1b pokazuje smanjenje ekspresije.

Gangliozid GD1b pokazuje povećanje ekspresije u krajnjem mozgu, dok u slojevima optičkog tektuma ne pokazuje promjene. U molekularnom sloju korpusa cerebeluma gubi se pozitivna reakcija, dok u ganglijskom i granularnom sloju ne pokazuje promjene. U svim slojevima cerebelarne lateralne valvule pokazuje smanjenje ekspresije, dok u vagalnom režnju promjene nisu uočene.

A2B5-epitop ne pokazuje značajnije promjene ekspresije u krajnjem mozgu. Prisutno je smanjenje u 1. i 7. sloju optičkog tektuma, dok se u 2. sloju ekspresija gubi. U ganglijskom i granularnom sloju korpusa cerebeluma i cerebelarne lateralne valvule uočeno je smanjenje ekspresije, kao i u vagalnom režnju.

Promjene distribucije gangliozida u pojedinim regijama mozga dužičaste pastrve i običnog šarana tijekom sezonske prilagodbe na povišenje temperature vode razlikuju se prema tkivu i vrsti. Naime, generalno govoreći, krajnji mozak i optički tektum pokazuju iste promjene ekspresije gangliozida, dok se ključne razlike uočavaju u razinama stražnjeg mozga. Korpus i valvula cerebeluma d. pastrve pokazuju istu promjenu distribucije koja uključuje povećanje ekspresije GD1a i GD1b, a smanjenje GT1b, dok je kod o. šarana uočena različita promjena distribucije među ovim strukturama i to suprotna za GD1a i GD1b. Naime, u korpusu cerebeluma prisutno je smanjenje GD1a, a povećanje GD1b, dok je u cerebelarnoj valvuli prisutno povećanje GD1a, a smanjenje GD1b. U obje strukture smanjuje se ekspresija GT1b gangliozida ljeti.

Rezultati imunohistokemijske lokalizacije gangliozida nakon alkalijskog tretmana podudaraju se s rezultatima dvodimenzionalne tankoslojne kromatografije.

Biokemijskom i imunohistokemijskom metodom utvrđen je veći sadržaj modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji kod d. pastrve zimi, dok kod o. šarana nisu uočene značajnije promjene. Najuočljivije promjene bojanja kod d. pastrve nakon alkalijskog tretmana su kod bojanja GT1b gangliozida u krajnjem mozgu.

Rezultati imunohistokemijske lokalizacije gangliozida podudaraju se s rezultatima tankoslojne kromatografije, dvodimenzionalne tankoslojne kromatografije i imunoprepoznavanja na pločama za tankoslojnu kromatografiju.

Imunohistokemijska studija napravljena u ovom radu pokazala je razliku u promjeni distribucije kompleksnih gangliozida u pojedinim regijama mozga d. pastrve i o. šarana tijekom odabranih mjeseci. Razlog različitih promjena distribucije gangliozida u ove dvije vrste može biti mnogostruk.

Dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) i obični šaran (*Cyprinus carpio*) pripadaju razredu zrakoperki (*Actinopterygii*), podrazredu novoperki (*Neopterygii*), nadredu pravih koštunjača (*Teleostei*) (prema [ITIS, Integrated Taxonomic Information System](#), vidi Prilog, Tablica 1. i 2.). Iako su obje vrste poikilotermne s nižim stupnjem homeostaze (Bogut i sur. 2006), prilagođene su različitim životnim uvjetima. O. šaran je euritermna (gr. *eury*–širok + *therme*– toplina; sposoban za rast u širokom rasponu temperatura), a d. pastrva stenotermna vrsta (gr. *steno*–uzak + *therme*–toplina; sposoban za razvoj samo u vrlo uskom rasponu temperatura).

D. pastrva živi u hladnim tekućim vodama u najpovoljnijem rasponu od 10-15 °C. Za pronalaženje hrane najprije koristi vid, iako je osjet njuha dobro razvijen. Nasuprot tome, o. šaran je vrsta toplih, mirnih i stajaćih voda u najpovoljnijem rasponu od 20-25 °C. Bentopelagička je vrsta, nalazimo ga u blatnim, eutrofičnim vodama mekog sedimenta (Pflieger 1975) gdje se hrani na dnu, zbog čega se za pronalaženje hrane koristi njuhom. O. šaran zaustavlja kretanje i hranjenje pri niskim temperaturama vode zimi, grupira se u velike skupine koje formiraju depresije na dnu ribnjaka gdje prezimljavaju bez kretanja ili hranjenja ispod 4 °C (Heckel i Kner 1858; Michaels 1988), dok je pri 4 °C utvrđeno ograničeno kretanje mjereno radio-telemetrijom (Bauer i Schlott 2004).

Građa i specijaliziranost pojedinih regija mozga ovih dviju vrsta riba znatno se razlikuje. Mozak dužičaste pastrve ne pokazuje posebnu senzoričku ili motoričku specijalizaciju. Na njemu dominira relativno veliki optički *tectum*, funkcionalni dio izvršnog vidnog sustava (Nieuwenhuys i sur. 1998). Mozak običnog šarana specijaliziran je za osjet kemorecepcije (okusa i mirisa), *tectum* vidnog sustava podjednako je velik kao i vagalni režanj stražnjeg mozga koji je u vezi s palatalnim organom – funkcionalnim dijelom sustava za okus. Kod o. šarana je povećan i facijalni režanj koji obrađuje osjet koji dolazi s kemoreceptornih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine.

Krajnji mozak (*telencephalon*) koštunjača služi za interpretaciju osjeta njuha koje riba prima iz njušnih lukovica (*bulbus olfactorius*) koje se pružaju rostralno iz bazalnog dijela

krajnjeg mozga. Njihova veličina ovisi o korištenju njuha, pa su kod o. šarana razvijenije nego u d. pastrve (Bogut i sur. 2006).

Povećanje ekspresije GD1a (kod sisavaca marker neurona i sinaptogeneze) u krajnjem mozgu o. šarana s porastom temperature može se objasniti činjenicom da se o. šaran tada počinje hraniti, a poznato je da se za pronalaženje hrane koristi osjetom njuha kojeg prima iz njušnih lukovica do krajnjeg mozga.

Međumozak (*diencephalon*) je relativno mali dio mozga na ventralnoj strani, smješten između mezencefalona i telencefalona koji kod odraslih koštunjača nema oštre granice. Hipotalamus je najveći dio te služi za integraciju endokrinog i živčanog sustava. *Lobus inferior hypothalami* služi za integraciju vida i okusa radi traganja za hranom. Prima signale iz vizualnih centara pretektuma (Wullimann i Meyer 1990) te iz sekundarnih gustatornih centara (Kanwal i sur. 1988). Međumozak prima signale i iz tegmentuma srednjeg mozga, te ima povratne veze s telencephalomom (Wullimann i sur. 1991).

Srednji mozak (*mesencephalon*) zajedno s malim mozgom usklađuje usmjerene pokrete i ravnotežu tijela te regulira tonus mišića (Bogut i sur. 2006; Meek 1990; Nieuwenhuys i sur. 1998). Gornji slojevi vidnog korteksa (*tectum mesencephali*) primaju vidne signale iz mrežnice (*retina*), torus longitudinalisa i pretektuma, dok donji slojevi primaju signale koji nisu vidni iz telencephalona, torus semicircularisa i drugih struktura (Meek 1983).

Obje vrste u optičkom tektumu pokazuju veće količine GD1a, a manje GT1b ljeti, no mijenja se prisutnost u različitim slojevima. Kod d. pastrve ljeti GT1b dominira u 7., a kod o. šarana u 4. i 5. sloju. Kod d. pastrve ljeti GD1a dominira u 1. i 6., a kod o. šarana u 7. sloju.

Moguće objašnjenje za ovu pojavu je činjenica da je d. pastrva riba koja je cijelo vrijeme aktivna, više puta dnevno se hrani te se za pronalaženje hrane služi vidom pa su gangliozidi smješteni u slojevima za vidno-motoričku integraciju, dok je o. šaran riba smanjene aktivnosti i metabolizma zimi, koja hranu traži njuhom, pa su gangliozidi smješteni u slojevima koji obrađuju signale koji nisu u vezi s vidom.

Stražnji mozak (*rhombencephalon*) je važan za prostornu orijentaciju riba, održavanje položaja i ravnoteže, te koordiniranih pokreta. U skladu s time, dobro je razvijen u brzih i ustrajnih plivača (Bogut i sur. 2006). Kaudalna regija malog mozga primarno je mjesto projekcije oktavolateralnog osjetilnog sustava (Nieuwenhuys 1967). Mali mozak nije ključan za motoričke radnje, već kontrolira jednostavne pokrete malog broja mišića, poput integracije pokreta očiju i glave s pokretima tijela, što je važno za ribe poput d. pastrve koja se za potragu hrane koristi vidom (Wullimann i Northcutt 1988). No, dokazano je da cerebelarne lezije

remete samo određeni set parametara plivanja kod d. pastrve (Roberts i sur. 1992). *Valvula* malog mozga služi za koordinaciju pokreta tijela (Ito i Yoshimoto 1990).

Zanimljivo je povećanje ekspresije gangliozida GD1b ljeti u granularnom sloju i Purkinjeovim st., a smanjenje u molekularnom sloju kaudalnog režnja (*lobus caudalis*) d. pastrve.

Kod o. šarana vidljiva je ekspresija GD1b gangliozida unutar granularnog sloja medijalne i lateralne valvule. Granularni sloj lateralne valvule formira ploču s grebenima paralelnih vlakana i okomito orijentiranim Purkinjeovim stanicama pružajući tako jednostran smještaj granuliranim stanicama, dok su Purkinjeove stanice raspršene unutar molekularnog sloja. Gangliozid GT1b u lateralnoj valvuli o. šarana ima jaču ekspresiju zimi. Razlog tomu možda je u činjenici da je GT1b tipičan za zrele neurone, uključen u mijelinizaciju, a šaran zimi miruje. Mijelinska ovojnica, osim što ima ulogu zaštite živčanoga tkiva, omogućuje vrlo brzo širenje električnog impulsa živčanim vlaknom. Živčani impuls se živčanim vlaknom s neoštećenom mijelinskom ovojnicom širi vrlo velikom brzinom, što omogućuje normalno funkcioniranje tijekom zimovanja.

O. šaran kao riba koja se za traženje hrane služi njuhom i okusom, posjeduje sustav za obradu okusa smješten u stražnjem mozgu, a čine ga facijalni (*lob VII-lobus facialis*, glosofaringealni (*lob IX-lobus glossopharyngei*) i vagalni (*lob X-lobus vagus*) režanj (Nieuwenhuys i sur. 1998) koji odvajaju osjete što dolaze iz okusnih pupoljaka smještenih izvan usne šupljine (facijalni), unutar usne šupljine (glosofaringealni) ili palatalnog organa (vagalni).

Palatalni organ omogućava selekciju hrane u usnoj šupljini, njeno razvrstavanje od kamenčića, gutanje hrane i izbacivanje nejestivog (Finger i Morita 1985). Pored facijalnog režnja o. šaran ima i dobro razvijen glosofaringealni režanj koji interpretira osjet koji dolazi od okusnih pupoljaka iz usne šupljine (Morita i sur. 1983), što je tipično samo za porodicu *Cyprinidae*, te vagalni režanj za probir hrane koja je već u ustima, izbacivanju neprobavljivog sadržaja i gutanju probranoga (Finger i Morita 1985). Riba, dakle hranu najprije traži, zatim je lokalizira te probire i guta (Bogut i sur. 2006).

Vidljivo je smanjenje ekspresije gangliozida GT1b u vagalnom režnju porastom temperature vode u toplijim mjesecima. Ranija istraživanja pokazuju da je brzina vodljivosti X. (vagalnog) moždanog živca šarana u pozitivnoj korelaciji s temperaturom (Harper i sur. 1990).

Prema dobivenim rezultatima u ovom radu vidljivo je da prilikom sezonske prilagodbe na povišenje temperature vode ne dolazi do promjene ukupnog sadržaja gangliozida u mozgu

obje vrste riba, već da dolazi do promjene distribucije gangliozida i modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji po pojedinim regijama mozga.

Prilikom sezonske prilagodbe u toplijim mjesecima prisutno je povišenje temperature vode u stajaćim vodama ribnjaka u kojima obitava o. šaran, dok u hladnim protočnim vodama staništa d. pastrve nema značajnijih promjena temperatura, te one nikada ne prelaze 13 °C.

Međutim, uočene su značajnije promjene distribucije gangliozida u mozgu d. pastrve. Između ostalog gangliozid GD1a kod d. pastrve u ovom radu utvrđen je samo u mozgu uzorkovanom u lipnju i to u krajnjem mozgu, međumozgu, srednjem i malom mozgu. Na koronarnim rezovima u svibnju još ne nalazimo pozitivnu reakciju na gangliozid GD1a. Naime, mjerene vrijednosti temperature u lipnju se znatno ne razlikuju od onih svibnju, dok se razlikuje količina otopljenog kisika. U lipnju je izmjerena količina otopljenog kisika iznosila 6,9 g/L, što je ispod granice optimalnih vrijednosti za intenzivni uzgoj d. pastrva. U to je vrijeme dovedena mlada riba koja troši velike količine kisika. Iz navedenog može se zaključiti da je za promjenu distribucije gangliozida u mozgu d. pastrve uz temperaturu ključan i otopljeni kisik.

Tijekom toplijih mjeseci dolazi i do promjene duljine dana i noći. Senzori za količinu svjetla djeluju na hipotalamus koji upravlja promjenama metabolizma preko hipofize. Kod d. pastrve uočena je pojava ekspresije GD1a gangliozida u lipnju u donjem režnju hipotalamusa. D. pastrva pri visokim temperaturama vode bježi u dublje dijelove vode u potrazi za hladnijom vodom, osim ako je uzgajana u betonskim bazenima. GD1a je u sisavaca poznat kao marker sinaptogeneze, pa se može zaključiti da se mozak d. pastrve bori s nedostatkom kisika promjenom puta biosinteze gangliozida od *b*- prema *a*-putu.

Izvršna molekula koja dovodi do prebacivanja ljetnog prema zimskom metabolizmu gangliozida još uvijek je nepoznata, no poznat je enzimski sustav sijaliltransferaza koji izvršava promjenu (Freischütz i sur. 1994). Stoga je moguće zaključiti da se različita prilagodba ovih dviju vrsta riba zasniva i na različitoj regulaciji aktivnosti sijaliltransferaza, odnosno različitom položaju sijaliltransferaza (*cis*-regiji ili *trans*-regiji Golgijevog aparata).

Rezultati dvodimenzionalne tankoslojne kromatografije objašnjavaju male razlike u promjenama udjela frakcija dobivenih jednodimenzionalnom kromatografijom. Naime, iako jednodimenzionalnom kromatografijom nisu otkrivene značajnije promjene GT1b i polisijaliliranih formi, dvodimenzionalnom kromatografijom utvrđene su veće količine alkalijski labilnih formi tih gangliozida zimi koje jednodimenzionalnom kromatografijom daju pozitivno bojanje Svennerholmovim reagensom u istom području migracije kao i nativni gangliozidi.



Rezultati dobiveni dvodimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom potvrđuju i rezultate dobivene imunohistokemijskim bojanjem prethodno tretiranih rezova parama amonijeve lužine. Naime, najveće promjene bojanja nakon alkalijskog tretmana u obje ribe su bile tijekom zime, te su kod d. pastrve uočene u znatno većem razmjeru nego kod rezova o. šarana. Razlog tome su moguće razlike u aktivnosti vezno-specifičnih *O*-acetiltransferaza kod d. pastrve i o. šarana. Naime, pri *O*-acetilaciji *b*-serije gangliozida *O*-acetiltransferaze prepoznaju samo krajnju  $\alpha$ 2-8 povezanu sijalinsku kiselinu, dok za 9-*O*-acetilirani GD1a gangliozid 9-*O*-acetil-ester može biti samo na krajnjoj  $\alpha$ 2-3 sijalinskoj kiselini (Gowda i sur. 1984). Kao što je ranije opisano, u mozgu d. pastrve gangliozid imunohistokemijskim bojanjem je utvrđen tek u uzorcima iz lipnja, dok ga biokemijskim metodama utvrđujemo u manjim količinama. Moguće je da su kod d. pastrve zimi uz *O*-acetiltransferaza za *O*-acetilaciju *b*-serije gangliozida, povećane aktivnosti i *O*-acetiltransferaza koje prepoznaju samo krajnju  $\alpha$ 2-3 povezanu sijalinsku kiselinu, pa bi sav ionako mali sadržaj gangliozida GD1a bio u obliku 9-*O*-acetil-estera.

U ovom je radu prvi puta izvedeno imunohistokemijsko bojanje prethodno tretiranih rezova parama amonijeve lužine u svrhu utvrđivanja raspodjele modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji. Dosadašnja istraživanja uključivala su dvodimenzionalnu tankoslojnu kromatografiju (Haverkamp i sur. 1977; Ledeen i sur. 1981; Sonnino i sur. 1983; Becker i Rahmann 1995; Ghidoni i sur. 1984) te alkalijski tretman koji uključuje otapanje uparka ekstrakta mozga u amonijevoj lužini te razvijanje na pločama za tankoslojnu kromatografiju kako je opisano (Vukelic i sur. 2001).

U prisutnosti amonijaka, esterska veza, za koju je potvrđeno da uključuje karboksilnu skupinu sijalinske kiseline (Suzuki 1965), prolazi kroz proces amonolize uz formiranje amidnog derivata sijalinske kiseline, što je u skladu s prisutnošću unutarnjeg ili vanjskog estera (Riboni i sur. 1986). Unatoč prisutnosti dva ostatka sijalinske kiseline u molekuli GD1b-lakton, na koloni ispunjenoj DEAE-sefarozum ispire se natrijevim acetatom kao monosijalogangliozid, što pokazuje da je samo jedna karboksilna skupina sijalinske kiseline zapravo na raspolaganju za interakciju (Riboni i sur. 1986). Također, utvrdili su otpornost GD1b-laktona na djelovanje sijalidaze koja se gubi tretiranjem lužinom. Za djelovanje sijalidaze ključna je prisutnost slobodne karboksilne skupine sijalinske kiseline (Corfield i sur. 1986). Stoga, iz otpornosti GD1b-laktona na sijalidaznu aktivnost za razliku od podložnosti GD1b, može se zaključiti da se međusobno razlikuju u vanjskom ostatku sijalinske kiseline. Mogućnost smanjenja broja negativnih naboja na površini stanice bez promjene broja ostataka sijalinskih kiselina može biti posebno važna u nekim pojavama

membranskih prepoznavanja i međustaničnim događajima. Tako je utvrđena povezanost negativnog naboja sijalinske kiseline s vezivanjem  $Ca^{2+}$  iona i procesima otpuštanja neurotransmitera na živčanim završetcima (Rahmann 1983).

Pretpostavljamo da tretiranjem rezova parama amonijeve lužine dolazi do promjene epitopa kojeg prepoznaje protutijelo kod alkalijski labilnih gangliozida, te je prisutna samo pozitivna reakcija na alkalijski stabilne gangliozide. Visokospecifična monoklonska protutijela na kompleksne gangliozide korištena u ovom radu prepoznaju i acetilirane i native forme gangliozida (Schnaar i sur. 2002). Međutim, smatramo da alkalijskim tretmanom dolazi do promjene esterskih veza u epitopu alkalijski labilnih gangliozida te ih protutijelo ne prepoznaje. Na taj način imunohistokemijskim bojanjem rezova prethodno tretiranih parama amonijeve lužine moguće je dobiti uvid u raspodjelu modifikacija gangliozida podložnih alkalijskoj razgradnji te usporedbom s pozitivnom reakcijom kod netretiranih uzoraka uvid u raspodjelu alkalijski stabilnih gangliozida.

Otkrivanje gangliozida s *O*-acetiliranim sijalinskim kiselinama najtočnije bi bilo alkalijskim tretmanom ekstrakta mozga u amonijevoj lužini nakon čega bi slijedilo razvijanje na pločama za tankoslojnu kromatografiju kako je opisano (Vukelic i sur. 2001); ili imunoprepoznavanjem na pločama za tankoslojnu kromatografiju monoklonskim protutijelima ili imunohistokemijskim bojanjem protutijelima koja za glavni epitop imaju acetilirane forme gangliozida, poput JONES protutijela za 9-*O*-acetil GD3 (Blum i Barnstable 1987). Međutim, ta protutijela selektivno prepoznaju samo nekoliko gangliozida koji sadrže *O*-acetilirane sijalinske kiseline, te nismo bili u posjedu takvih protutijela. Unutarnji laktoni gangliozida također mogu uzrokovati alkalijski-labilne pomake pri migraciji na pločama za tankoslojnu kromatografiju (Riboni i sur. 1986; Io i sur. 1989; Gross i sur. 1980) te se mogu zamijeniti s *O*-acetiliranim spojevima (Sjoberg i sur. 1992).

Ranije su utvrđene promjene u sadržaju i sastavu gangliozida mozga kod pravih hibernatora s dugim periodima torpora (Geiser i sur. 1981; Sonnino i sur. 1984; Geiser i sur. 1981; Beitinger i sur. 1987; Robert i sur. 1982) koje otkrivaju opće pravilo povećanja polarnosti gangliozida mozga pri adaptaciji na hibernaciju. Prema ovim nalazima u posebnom je interesu uvidjeti promjene gangliozida mozga kralježnjaka koji su sposobni prilagoditi tjelesnu temperaturu prema temperaturi okoliša. Rađena su istraživanja sastava i sadržaja gangliozida mozga riba (Becker i Rahmann 1995; Becker i sur. 1995; Becker i Rahmann 1996; Hilbig i sur. 1979) pri ekstremnim temperaturnim uvjetima, no ne uključuju imunohistokemijske lokalizacije gangliozida u mozgu riba.

Premda postoje izvrsne studije imunohistokemijske lokalizacije pojedinih gangliozida po regijama mozga riba (Viljetić i sur. 2012), ne postoje studije imunohistokemijske lokalizacije pojedinih struktura gangliozida niti udjela alkalijski labilnih gangliozida u regijama mozga riba tijekom sezonskih temperaturnih prilagodbi. Cilj ovog istraživanja bio je usporediti i utvrditi promjene sastava i distribucije kompleksnih gangliozida u mozgu dvije vrste riba različitih po optimalnom rasponu temperature.

U ovome radu po prvi su puta praćene promjene sastava i distribucije kompleksnih gangliozida u mozgu dvije vrste riba različitih po optimalnom rasponu temperature tijekom sezonskih prilagodbi od zimskog do ljetnog razdoblja. Opisane promjene po prvi su puta praćene u prirodnim uvjetima okoliša.

No, u svom prirodnom okruženju, ribe podliježu kompleksnim promjenama. Naime kako se uvjeti tijekom vremena mijenjaju, ribe se kretanjem između dijelova staništa mogu stalno zadržavati unutar pogodnog raspona uvjeta. Temperatura pojedinih dijelova jezera mijenja se i tijekom dana, pa ribe aktivnim kretanjem mogu preko cijelog dana birati optimalnu temperaturu. No, te reakcije su regulacijski odgovori koji ne zahtijevaju morfološke i biokemijske modifikacije. Aklimatizacijski odgovori uključuju dugotrajnije morfološke i biokemijske modifikacije. Dugotrajniji nepovoljni uvjeti sredine kao što su niska temperatura vode, nedostatak hranjivih organizama, bolesti uzrokovane fizikalno-kemijskim parametrima, zatim zarazne i nametničke bolesti, očituju se smanjenjem intenziteta cjelokupnog rasta organizma (Popović 1994) te mogu imati utjecaj na rezultate ovog istraživanja. Kako istraživanje nije provedeno u kontroliranim uvjetima, nije moguće razlučiti zasebni utjecaj promjene temperature, duljine dana i noći, pH-vrijednosti, koncentracije otopljenog kisika u vodi, prehrane, buke, prisutnosti predatora te egzaktno temperature sloja vode kojeg riba odabire pri promjeni temperature.

Ribe su poikilotermne životinje čiji je intenzitet metabolizma u izravnoj vezi s temperaturom okoliša, to jest vode (Bogut i sur. 2006). Postoje mnoga izvješća o prilagodbama euritermnih vrsti riba koštunjača na nekoliko razina organizacije: od molekularne do integriranog ponašanja cijelog organizma. Primjerice, skeletni mišići pokazuju promjene u aktivnosti miofibrilarne ATP-aze, rezultirajući bržim i učinkovitijim kontrakcijama kod mišića prilagođenih na hladnoću (Davison i sur. 1975; Johnston i Altringham 1985; Heap i sur. 1987). Dugotrajna izloženost hladnim temperaturama izaziva promjene u kontraktilnim svojstvima mišića i enzimskih aktivnosti, što je tumačeno kao jačanje lokomotorne izvedbe pri niskim temperaturama (Crockford i Johnston 1990; Rome i sur. 1985).

Voda ima visok toplinski kapacitet što uvjetuje njezino sporo zagrijavanje i hlađenje (Olden i Naiman 2010). To s jedne strane uvjetuje prilično spore promjene temperature vode, ali s druge strane dovodi do velike ovisnosti temperature organizama o temperaturi vode.

Nakon smrzavanja ribnjaka, temperatura vode blizu dna viša je od površinske temperature te temperaturni režim može ostati stabilan sve do topljenja. Tako mjerene temperature (vidi Prilog, Tablica 6.) u ovom istraživanju ne daju egzaktnu temperaturu koju o. šaran odabire pri mirovanju, iako su ribnjaci uključeni u ovo istraživanje relativno plitki u kojima temperaturna stratifikacija nije velika. U proljeće, odmah nakon topljenja leda, vodeni je stupac hladan i gotovo izotermalan s dubinom. Apsorbira intenzivno sunčevo svjetlo, te se zagrijava s porastom dnevne temperature zraka.

Strogo ektotermne ribe mogu zaštititi mozak od brzog pada temperature smanjenjem moždanog volumena krvi. Na taj način, ograničena je izloženost mozga hladnoj krvi iz škrge, a pad temperature u mozgu je postupan (van den Burg i sur. 2005). Istovremeno, aktivira se preoptičko područje (van den Burg i sur. 2005), gdje su smješteni termolabilni neuroni (Nelson i Prosser 1981). Preoptičko područje sadrži kortikotropin-otpuštajuće hormon-pozitivne stanice (CRH stanice) koje reguliraju endokrini odgovor na stres (Bonga 1997). CRH stanice šalju signale do hipofize, koja se aktivira prilikom temperaturnog stresa (van den Burg i sur. 2005). Hipofiza oslobađa adrenokortikotropni hormon (ACTH) u krv, što dovodi do porasta razine kortizola u krvnoj plazmi (Tanck i sur. 2000; van den Burg i sur. 2005). Općenito, uzastopna aktivacija preoptičkog područja, hipofize i porast razine kortizola rezultira korištenjem energije iz internih izvora u borbi s čimbenicima stresa (Bonga 1997).

Reakcija bijega na pad temperature ovisi o brzom otkrivanju promjene temperature i pouzdanom prijenosu do mozga. Brza aktivacija područja koje pružaju osjetilni korijen trigeminalnog živca pokazuje da je termalna transdukcija posredovana receptorima za hladnoću koji su dio trigeminalnog sustava. Glava riba koštunjača gusto je inervirana trigeminalnim živčanim završetcima, a tu je i najmanje pet različitih tipova trigeminalnih somatosenzoričkih receptora za mehaničke, kemijske i toplinske stimulacije (Sneddon 2003). Receptori za hladnoću razlikuju se od receptora za toplinu u tome što reagiraju na promjene temperature, umjesto na apsolutnu temperaturu (McCleskey 1997). Kod o. šarana, osjetni trigeminalni nukleus Puzdrowski vjerojatno odgovara posteromedialnom dijelu lateralnog valvularnog nukleusa (Ito i Yoshimoto 1990), pružajući anatomske dokaze za put od trigeminalnog osjetnog sustava do valvule cerebeluma koji je aktivan pri suočavanju šarana s padom temperature (van den Burg i sur. 2006). Smatra se da informacije iz osjetnog korijena trigeminalnog živca do valvule potječu iz bukalne šupljine, te da je ovaj put uključen u režim

hranjenja (Wullimann i Northcutt 1988; Ikenaga i sur. 2002). Kada riba ne može pobjeći od promjene temperature, mora se prilagoditi na novu temperaturu. Preoptičko područje pokreće aklimatizacijske odgovore na pad temperature (van den Burg i sur. 2005). Sadrži termolabilne neurone koji mijenjaju svoju brzinu okidanja kako se temperatura mijenja. Neki od tih neurona nemaju očite sinaptičke ulaze i stoga se smatraju pravim „termodetektorima“, jer oni mogu promijeniti samo svoju brzinu okidanja kao odgovor na promjenu temperature mozga, iako se ne može isključiti endokrini i drugi humoralni utjecaj (Nelson i Prosser 1981).

Od ranije je poznato da prilagodbe riba na promjene temperature uključuju kvantitativne i kvalitativne promjene sastava membranskih lipida. Gracey i sur. 2004. dokazali su povećani metabolizam lipida u jetri i mozgu o. šarana tijekom prilagodbe na hladnoću. U jetri su bili jače izraženi geni uključeni u metabolizam masnih kiselina i sinteze kolesterola, dok je u mozgu bila prisutna povećana sinteza dugolančanih nezasićenih masnih kis. U jetri, značajnost ovih prilagodbi je u osiguravanju građevnih blokova lipida i kolesterola ključnih za dokazanu reorganizaciju membrana kod prilagodbe na hladnoću (Hazel i Williams 1990), a u mozgu za postizanje tkivno-specifičnih potreba za lipidnim signalnim molekulama (Gracey i sur. 2004).

Niske temperature mogu ugroziti opstanak stanica smanjenjem membranske fluidnosti, raspadanjem citoskeleta, smanjenjem enzimskih aktivnosti, inhibicijom sekretornih procesa te usporavanjem metabolizma. Životinje odgovaraju na okolišni stres kroz niz fizioloških i razvojnih promjena (Johnston i Dunn 1987). Osim toga, geni koji štite stanice od promjene temperature otkriveni su u nedavnim studijama (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 1996). Ekspresija tih gena omogućuje prilagodbu na hladnoću dvjema strategijama: strukturna aklimatizacija inducira ekspresiju gena desaturaze za desaturaciju fosfolipida vodeći ka povećanju membranske fluidnosti (Hazel 1995; Tiku i sur. 1996). Funkcionalna aklimatizacija uključuje ekspresiju metaboličkih izoenzima, zaštitu proteina, poput šaperonima potpomognuto uvijanje enzima pod hladnim stresom (Matz i sur. 1995; Somero 1995).

Između ostalog, pri niskim temperaturama mijenja se sastav gangliozida u korist struktura koje imaju nezasićenu masnu kiselinu u lipidnom sidru i struktura koje imaju polarniji hidrofilni dio molekule (Rahmann i sur. 1998a). Tako organizmi koji imaju različiti metabolizam gangliozida imaju i različitu osjetljivost na promjene temperature i brzinu prilagodbe (Rösner i sur. 1979). Pri niskim temperaturama pojačana ekscitabilnost živaca postignuta je na trošak stabilnosti membrane što rezultira povećanjem fluidnosti lipida, a time i više neuređenim stanjem moždanih membrana u odnosu na ribe prilagođene na više temperature (Behan-Martin i sur. 1993; Farkas i sur. 2000). Adaptacija fizikalnog stanja

sinaptičkih vezikula, mitohondrija i frakcija mijelina opisana je u mozgu nekoliko vrsta riba (Cossins i Macdonald 1989; Buda i sur. 1994). Postoje najmanje dva različita mehanizma uključena u povećanje fluidnosti živčanih membrana. S jedne strane, ektotermne ribe hladnih voda imaju veći sadržaj PUFA (višestrukonezasićenih masnih kiselina- eng. *polyunsaturated fatty acids*) u živčanom tkivu (Tocher i Harvie 1988; Farkas i sur. 2000). PUFA su glavne molekule odgovorne za reguliranje stanične diferencijacije i apoptoze (Rudolph i sur. 2001). Većina istraživanja starenja kod sisavaca utvrdila je značajan pad u razini i preokretu PUFA (Favrelère i sur. 2000; Pu i sur. 1999; Ulmann i sur. 2001; Yehuda i sur. 2000), osobito u hipokampusu, korteksu, strijatumu i hipotalamusu. Među značajnim komponentama stanične membrane su fosfolipidi, koji sadrže masne kiseline. Vrste masnih kiselina u prehrani određuju vrste masnih kiselina dostupnih za sastav stanične membrane. Fosfolipid izgrađen od zasićenih masnih kiselina ima manju fluidnost od fosfolipida izgrađenog od esencijalnih masnih kiselina. Osim toga, linolna i alfa-linolenska kiselina same po sebi imaju utjecaj na fluidnost membrane neurona. U stanju su smanjiti razinu kolesterola u membrani neurona, koji bi u protivnom smanjio fluidnost membrane (Yehuda i sur. 2002).

S druge strane, sadržaj i sastav moždanih gangliozida utječe na osnovna fizikalno-kemijska svojstva živčanih membrana. Dakle, kod riba prilagođenih na hladnoću gangliozidi imaju veće udjele sijalinske kiseline i polarnih skupina u odnosu na ribe prilagođene na umjerene temperature (Ushio i sur. 1996). Vrlo visoka polarnost osnovnih gangliozida riba prilagođenih na hladnoću olakšava sinaptički prijenos pri adaptaciji njihovom temperaturnom okolišu (Becker i sur. 1995).

Osim promjenom broja sijalinskih kiselina u strukturi gangliozida, aklimatizacija na niže temperature praćena je i povećanjem udjela alkalijski labilnih gangliozida (Becker i Rahmann 1995). Iako je nakon uvođenja dvodimenzionalne HPTLC za detekciju alkalijski labilnih gangliozida prema Sonnino i sur. 1983. ubrzano njihovo otkrivanje, uloga alkalijski labilnih gangliozida još nije utvrđena. *O*-acetilacija sijalinske kiseline i laktonizacija gangliozida (Riboni i sur. 1986) modifikacije su koje se gube pod utjecajem lužine. Gangliozidni laktoni sadrže polisijalilirane lance, gdje su sijalinske kiseline povezane esterskim vezama (Riboni i sur. 1986). Ostatak sijalinske kiseline može biti priključen na temeljni šećerni lanac putem  $\alpha$ 2-3,  $\alpha$ 2-6 ili  $\alpha$ 2-8 veze. Za svaki tip veze identificirana je jedna ili više sijaliltransferaza (Beyer i sur. 1981; Paulson i sur. 1989; Tsuji i sur. 1996; Harduin-Lepers i sur. 2001). Ostaci sijalinske kiseline mogu biti izmijenjeni dodavanjem *O*-acetil-estera djelovanjem vezno-specifičnih *O*-acetiltransferaza (Iwersen i sur. 1998; Chammas i sur. 1996; Krishna i Varki 1997), posebice na položaju 9. Prijašnja istraživanja dokazuju da su

GD2 i GD3 akceptori gangliozidne *O*-acetiltransferaze (Sjoberg i sur. 1992). Utvrđeno je postojanje sedam gangliozida u obliku 9-*O*-acetiliranog derivata: GD3, GD2, GT1b, GQ1b, GT3, disijalil-paraglobozid i GD1a (Thurin i sur. 1985; Ghidoni i sur. 1980; Sonnino i sur. 1982; Cheresh i sur. 1984b; Chou i sur. 1990; Dubois i sur. 1990; Gowda i sur. 1984). Mogu se uočiti dva obrasca: prvi- svi gangliozidi *b*-serije s izuzetkom GD1b imaju 9-*O*-acetiliranog derivata, te drugi- *O*-acetil esteri na gotovo svim 9-*O*-acetiliranim derivatima gangliozida (9-*O*-AcGD3, 9-*O*-AcGD2, 9-*O*-AcGT1b i 9-*O*-AcGQ1b, 9-*O*-AcGT3 i 9-*O*-Ac-disijalilparaglobozid) nalaze se na krajnjoj  $\alpha$ 2-8 povezanoj sijalinskoj kiselini podrijetlom iz unutarnje  $\beta$ 1-4-povezane galaktoze laktozilceramida (Sjoberg i sur. 1992). Može se zaključiti da *O*-acetiltransferaze prepoznaju samo krajnju  $\alpha$ 2-8 povezanu sijalinsku kiselinu podrijetlom iz unutarnje  $\beta$ 1-4-povezane temeljne galaktoze. Jedina iznimka od ovog obrasca je 9-*O*-acetilirani GD1a gangliozid, u kojem 9-*O*-acetil-ester može biti samo na krajnjoj  $\alpha$ 2-3 sijalinske kiseline (Gowda i sur. 1984).

Dodatak *O*-acetilnih skupina može bitno promijeniti funkciju sijalinske kiseline u različitim biološkim procesima (Schauer 1991). Pretpostavlja se da imaju ulogu u embriogenezi, odnosno razvoju mozga. Varki i sur. 1991. su ukazali na ključnu funkciju 9-*O*-acetiliranih sijalinskih kiselina tijekom mišjeg razvoja. *In vitro* studije ukazuju da 9-*O*-acetilacija  $\alpha$ 2-6-vezanih sijalinskih kiselina glikokonjugata pogoršava prepoznavanje određenim sijalo-vezujućim lektinima (Sjoberg i sur. 1994), antitijelima i virusima (Cheresh i sur. 1984; Corfield i sur. 1986; Herrler i Klenk 1991; Schauer 1991). Povećane količine 9-*O*-acetiliranih gangliozida otkrivene su kod melanoma i bazalioma u usporedbi s količinama kod normalne kože (Kohla i sur. 2002), kod glioma i neuroblastoma (Bosslet i sur. 1989; Ariga i sur. 1996). 9-*O*-acetilacija gangliozida složeno je regulirana na prostorni i vremenski način kroz razvoj tkiva dobivenih iz neuroektoderma (Levine i sur. 1984; Ghidoni i sur. 1984). Može se pretpostaviti da su 9-*O*-acetilirani gangliozidi uključeni u razvoj neuroektodermalnih tkiva posredovanjem u međustaničnim adhezijskim događajima. Najistaknutiji je 9-*O*-AcGD3, koji se smatra onkofetalnim markerom životinjskih i ljudskih tumora poput neuralnih tumora, melanoma, bazalioma ili raka dojke, te u lezijama psorijaze (Kohla i sur. 2002). Međutim, također se mogu naći u normalnim tkivima mozga, primjerice pri rastu i razvoju tkiva, kao što su GM4 lakton i GD3 lakton u Minke kitova (Terabayashi i Kawanishi 1998) te GD1b lakton kod ljudi (Riboni i sur. 1986). GD1b lakton prisutan je u tragovima u mozgu dojenčadi, dok u dobi od 51 do 70 godina doseže 3,5% ukupne sijalinske kiseline.

Rezultati sadržaja ukupne sijalinske kiseline vezane na gangliozide su u suglasnosti s dosadašnjim istraživanjima, u kojima također nisu utvrđene promjene sadržaja ukupne

sijalinske kiseline vezane na gangliozide, te su iznosile za d. pastrvu  $205,6 \pm 10,2$   $\mu\text{gSA/g}$  tkiva, a za o. šarana  $206,7 \pm 12,5$   $\mu\text{gSA/g}$  tkiva (Hilbig i sur. 1979). Rezultati tankoslojne kromatografije su u potpunosti u skladu s prethodnim istraživanjima gdje je utvrđeno smanjenje monosijalogangliozida, malo povećanje di- i trisijalogangliozida kod dužičaste pastrve, a povećanje udjela polisijalogangliozida kod običnog šarana pri niskim temperaturama (Hilbig i sur. 1979), te veći udio alkalijski labilnih gangliozida (Becker i Rahmann 1995). Ekstrakti gangliozida d. pastrve imaju frakcije koje migriraju paralelno s GD1a sisavaca u svim promatranim mjesecima, no gangliozid GD1a nije utvrđen sve do lipnja imunohistokemijskim bojanjem s odgovarajućim i provjerenim antitijelima, vjerojatno zbog različitih promjena u ceramidnom sidru (Tagawa i sur. 2002) tijekom zime ili zbog promjene aktivnosti sijaliltransferaze GD1a-sintaze (Freischütz i sur. 2008).

Rezultati pokazuju različite promjene u sastavu gangliozida mozga kod dviju istraživanih riba. U skladu su s prijašnjim istraživanjima u kojima je već prikazana neka vrsta „polisijalilacije“ pri prilagodbi na niske temperature (Breer 1975; Breer i Rahmann 1976; Hilbig i sur. 1979; Hilbig i sur. 1979) kada su utvrdili smanjenje frakcije GM3 kod d. pastrve zimi za 24,3% u odnosu na ljeto, što je u skladu s našim rezultatima, dok kod o. šarana uopće nisu utvrdili frakciju GM3. Na kraju, rezultati odgovaraju ontogenetskom i filogenetskom principu (Rahmann 1978) koji govori da što je niža temperatura okoliša, to je polarniji sastav gangliozida, to jest veći udio polisijalogangliozida.

Ponekad je teško kemijskom vizualizacijom na tankoslojnoj kromatografiji prepoznati ostale gangliozide zbog niske količine ili preklapanja  $R_f$  vrijednosti s kompleksnim gangliozidima. Stoga smo pristupili analizi ekspresije gangliozida uzoraka imunotankoslojnom kromatografijom.

Imunotankoslojnom kromatografijom potvrđeni su ostali rezultati našeg istraživanja, dok prethodna istraživanja nisu uključivala analizu ekspresije gangliozida riba imunotankoslojnom kromatografijom.

Imunotankoslojnom kromatografijom s monoklonskim protutijelom Q211, koje prepoznaje tri ostatka sijalinske kiseline na unutarnjoj galaktozi (Rösner i sur. 1988) i otkriva prisutnost *c*-puta biosinteze gangliozida (uključujući GT1c, GQ1c i GP1c, Letinić i sur. 1998) otkrili su nekoliko Q211-pozitivnih sustava tijekom razvoja velikog mozga.

Hirabayashi i sur. 1989. su razvili mišje protutijelo 493D4, koje s velikim afinitetom prepoznaje 9-*O*-acetil GT3 i široki raspon ostalih 9-*O*-acetiliranih gangliozida, ali ne i native gangliozide. Zhang i sur. 1997. su utvrdili razvojno regulirane *O*-acetilirane sijaloglikane



središnjeg živčanog sustava protutijelom 493D4 koje je prepoznalo frakcije od disijalogangliozida do tetrasijalogangliozida nakon kromatografije na Q-sefarozi.

Zaključno, mozak d. pastrve zimi pokazuje smanjenje GD1a u *telencefalonu*, *corpus cerebelli*, *tectum opticum*, *lobus inferior hypothalami* i *crista cerebelli*, dok je kod GD1b i GT1b prisutno povećanje u istim regijama.

Mozak o. šarana zimi pokazuje smanjenje GD1a u *telencefalonu* i *tectum opticum*, dok je u *corpus cerebelli* vidljivo povećanje. To je u skladu s dosadašnjim istraživanjima gdje je utvrđeno da kod euritermne ribe smuđ (*Tilapia mariae*) povećanje praga osjetljivosti na hladnoću započinje sa subtektalnom regijom preko *tectum opticum* do *bulbus olfactorius*. Naprotiv, za mali mozak je utvrđena osjetljivost na toplinu (Hilbig 1983). Bojanje na GD1b gangliozid nije pokazalo razlike, dok je kod GT1b vidljivo suprotno bojanje od GD1a u istim regijama (povećanje). Nespecifično bojanje je vidljivo s A2B5 protutijelom, ali velikog intenziteta kod obje vrste.

Ranije su utvrđene promjene u prisutnosti dvaju glavnih gangliozida GD1a i GT1b (promjena *a*-puta prema *b*-putu biosinteze), što je u korelaciji s termalnom adaptacijom te se omjer GD1a/GT1b smatra indikatorom polarosti (manji omjer=veća polarost Rahmann i sur. 1998). O pomaku sinteze najjednostavnijih gangliozida *a*- i *b*-serije prema sintezi kompleksnih gangliozida tijekom razvoja štakora izvijestili su Yu i sur. 1988. Promjena sastava gangliozida tijekom razvoja mozga štakora smatra se strogo reguliranom aktivnostima dvaju ključnih enzima: glikoziltransferaze, ST-II (GD3-sintaze) i *N*-acetilgalaktozaminiltransferaze (GalNAcT, GM2/GD2-sintaze), koje su na točki grananja puteva biosinteze gangliozida (Sl. 3). Yu i sur. 1988. su utvrdili povećanje gangliozida *b*-puta (GQ1b, GT1b i GD1b) ranije nego *a*-puta (GD1a i GM1), a naglo smanjenje jednostavnih gangliozida (GM3 i GD3). Primjer pomaka biosintetskih puteva od *c*- prema *b*- do *a*- puta pronađen je u embrionalnim optičkim režnjevima pilića koje je (Rösner 1980) povezo s uspješnim periodima cito- i histogeneze. Ranije je dokazana prisutnost gangliozida *c*-puta u mozgu riba (Io i Yu 1979; Yu i Io 1980) uz pretpostavku da je u odraslom mozgu riba zadržan embrijski uzorak, kao moguća posljedica mogućnosti nastavka rasta i regeneracije mozga riba (Kasai i Yu 1983).

Unatoč činjenici da su neke studije pokazale specifičnu reaktivnost A2B5 protutijela na *c*-seriju gangliozida (Fenderson i sur. 1987), specifičnost protutijela A2B5 još je uvijek sporna u mnogim istraživanjima. Iako je GQ1c određen kao jedan od njegovih gangliozidnih antigena (Kasai i Yu 1983) te GT3 i GQ1c koji je derivat GT3 (Yu i Ando 1980), ostala izvješća pokazuju reaktivnost s drugim gangliozidima kao što su GQ1b i disijalogangliozidi

(Kundu i sur. 1983; Fredman i sur. 1984) ili mnogi ostali gangliozidi koji nisu glavni gangliozidi moždanog tkiva (Fredman i sur. 1984). Drugi glavni antigen A2B5 utvrđen je kao 9-*O*-acetilirani GT3 koji pri razvijanju tankoslojne kromatografije putuje brže od GT3 (Dubois i sur. 1990) što se može objasniti povećanom hidrofobnosti zbog prisutnosti *O*-acetilne supstitucije na hidroksilnom položaju ostataka sijalinske kiseline. Vežanje protutijela A2B5 zahtijeva trisijalil-strukturu s  $\alpha$ 2-8 vezama, koje nalazimo u GT3 i njegovom derivatu GQ1c. Epitop kojeg prepoznaje protutijelo A2B5 ne uključuje ugljike na polialkoholnom lancu u GT3 (Dubois i sur. 1990). Osim GT3 i 9-*O*-acetiliranog GT3, A2B5 prepoznaje druge gangliozide, no ti antigeni nisu utvrđeni, ali vjerojatno sadrže šećerni slijed GT3 ili (i) 9-*O*-acetilirani GT3 kao epitop kojeg prepoznaje protutijelo. Acetilirani gangliozidi javljaju se u različitim tkivima (Ishizuka i sur. 1970; Haverkamp i sur. 1977). *O*-acetilacija *N*-acetilneuraminske kiseline povećava mogući broj gangliozidnih vrsta što dovodi do veće raznolikosti u obrascu gangliozida na površini stanice. Ovaj fenomen može biti uključen u mehanizam staničnog prepoznavanja i utjecati na promet i antigenost gangliozida (Ghidoni i sur. 1980). Stoga je utvrđivanje epitopa koje prepoznaje A2B5 protutijelo važno za istraživanje metabolizma i biološke uloge te tkivne raspodjele tih gangliozida.

Izrada ovog doktorskog rada doprinosi razumijevanju prilagodbi dvaju vrsta riba na sezonske promjene temperature te ukazuje na moguće posljedice većih klimatskih poremećaja na adaptacijske mogućnosti sličnih vrsta. Značaj ovog rada vidljiv je u specifičnom za vrstu pristupu prema preživljavanju u različitom okolišu. Promjena okoliša za vrstu predstavlja određeni stres, kojem se ona prilagođava odgovorima na svim razinama organizacije i skupno čine integriranu reakciju na stres. Razumijevanje mehanizama aklimatizacijskih odgovora, nudi temeljne uvide u prirodu prilagodbe na okoliš koji nude nove pravce eksperimentalnih manipulacija okolišne tolerancije. Namjera ovoga istraživanja bila je doprinijeti spoznajama na znanstvenom polju konzervacijske biologije radi očuvanja bioraznolikosti.

Za daljnje istraživanje bilo bi poželjno provesti istraživanje u kontroliranim uvjetima, sa kontroliranim različitim promjenama temperature, duljine dana i noći, pH-vrijednosti, koncentracije otopljenog kisika u vodi i prehrane. Za detaljnija istraživanja od našeg je interesa posegnuti za više specifičnim protutijelima na *c*-seriju gangliozida i *O*-acetilirane gangliozide. Poželjno je provesti blagu alkalnu hidrolizu uparka ekstrakta gangliozida prije razdvajanja tankoslojnom kromatografijom, pratiti promjene drugih komponenti lipidnih splavi, poput kolesterola, te provesti paralelne imunohistokemijske lokalizacije sa upotrebom deterdženata, što u ovom istraživanju nije bilo moguće izvesti zbog opširnosti posla. Različite distribucije i specifični sastav gangliozida u različitim regijama mozga snažno ukazuju na to

da imaju važne i specifične funkcije u spomenutim regijama. Zato bi bilo poželjno uključiti ekstrakciju gangliozida pojedinih regija mozga, kako bi se dobio detaljan uvid u promjene sastava gangliozida tijekom temperaturnih prilagodbi, jer je iz dobivenih rezultata jasno da se ukupna količina gangliozida ne mijenja tijekom temperaturnih prilagodbi, već sastav i raspodjela po pojedinim regijama mozga.

## 6. ZAKLJUČCI

---

1. Dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) i obični šaran (*Cyprinus carpio*) pokazuju razliku u količini glikosfingolipida mozga, te je mozak o. šarana sadržavao 10% više ukupne sijalinske kis. od d. pastrve. Dužičasta pastrva i obični šaran pokazuju međusobnu razliku u sastavu glikosfingolipida u mozgu.
2. Dužičasta pastrva i obični šaran pokazuju razliku u raspodjeli glikosfingolipida po pojedinim regijama mozga.
3. Dužičasta pastrva i obični šaran ne pokazuju promjenu količine gangliozida u mozgu tijekom prilagodbe na sezonske promjene temperature. Međutim, uočene su promjene sastava gangliozida. Obje vrste pri niskim temperaturama vode pokazuju smanjenje monosijalogangliozida i nastajanje više sijaliliranih homologa, iako su uočene promjene u znatno većem razmjeru u mozgu d. pastrve nego o. šarana. Tijekom hladne aklimatizacije uočeno je povećanje polisijaliliranih frakcija gangliozida u mozgu o. šarana, dok je u mozgu d. pastrve uočen rast trisijalogangliozida.
4. Dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) i obični šaran (*Cyprinus carpio*) pokazuju različite promjene raspodjele glikosfingolipida mozga tijekom prilagodbe na sezonske promjene temperature. Pri niskim temperaturama vode uočen je pomak biosintetskih puteva gangliozida od *a-* prema *b-* putu. Pri niskim temperaturama vode kod d. pastrve uočene su veće količine modifikacija gangliozida podložnih na alkalijску razgradnju, dok kod o. šarana nisu uočene odgovarajuće značajnije promjene. U mozgu d. pastrve zimi prisutno je smanjenje GD1a u *corpus cerebelli*, *tectum opticum*, *lobus inferior hypothalami* i *crista cerebelli*, a povećanje GD1b i GT1b u istim regijama. U mozgu o. šarana zimi prisutno je smanjenje GD1a u telencefalonu i *tectum opticum*, dok je u *corpus cerebelli* prisutno povećanje. Različite distribucije i specifični sastav gangliozida u pojedinim regijama mozga snažno ukazuje na to da imaju važne i specifične funkcije u tim regijama.

5. O. šaran kao euritermna vrsta pokazuje manje promjene sastava i raspodjele gangliozida od stenotermne vrste d. pastrve, što je u skladu sa činjenicom da i sisavci kao dobro prilagođene vrste imaju dosta uniformni raspored gangliozida. Za promjenu raspodjele gangliozida u mozgu d. pastrve uz temperaturu ključna je koncentracija otopljenog kisika i duljina dana.
  
6. Dobiveni rezultati objašnjavaju različitu sposobnost prilagodbe na sezonske promjene temperature kod d. pastrve i o. šarana te ukazuju na važnost metabolizma gangliozida.

## 7. LITERATURA

---

- Allende ML, Li J, Darling DS, et al. (2000) Evidence supporting a late Golgi location for lactosylceramide to ganglioside GM3 conversion. *Glycobiology* 10:1025–1032.
- Anderson RGW, Jacobson K (2002) A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296:1821–1825. doi: 10.1126/science.1068886
- Ando S, Yu RK (1979) Isolation and characterization of two isomers of brain tetrasialogangliosides. *J Biol Chem* 254:12224–12229.
- Ando S, Yu RK, Scarsdale JN, et al. (1989) High resolution proton NMR studies of gangliosides. Structure of two types of GD3 lactones and their reactivity with monoclonal antibody R24. *J Biol Chem* 264:3478–3483.
- Ariga T, Bhat S, Kanda T, et al. (1996) Expression and localization of Lewis(x) glycolipids and GD1a ganglioside in human glioma cells. *Glycoconj J* 13:135–145.
- Avrova NF (1980) Gangliosides in fish brain. *Adv Exp Med Biol* 125:177–183.
- Avrova NF (1985) Evolutionary approach to the analysis of structure and function of gangliosides. *Neurochem Res* 10:1547–1554. doi: 10.1007/BF00988866
- Barney ML, Patil JG, Gunasekera RM, Carter CG (2008) Distinct cytochrome P450 aromatase isoforms in the common carp (*Cyprinus carpio*): Sexual dimorphism and onset of ontogenic expression. *Gen Comp Endocrinol* 156:499–508.
- Bauer C, Schlott G (2004) Overwintering of farmed common carp (*Cyprinus carpio* L.) in the ponds of a central European aquaculture facility—measurement of activity by radio telemetry. *Aquaculture* 241:301–317. doi: 10.1016/j.aquaculture.2004.08.010
- Becker K, Rahmann H (1996) Polysialylation of brain gangliosides as a possible molecular mechanism for survival of Antarctic ice fish below the freezing point. *Adv Space Res* 18:129–133. doi: DOI: 10.1016/0273-1177(96)00008-7
- Becker K, Rahmann H (1995) Influence of ambient temperature on content and composition of brain gangliosides in vertebrates. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 111:299–310. doi: doi: DOI: 10.1016/0305-0491(94)00223-H
- Becker K, Wöhrmann APA, Rahmann H (1995) Brain gangliosides and cold-adaptation in high-antarctic fish. *Biochem Syst Ecol* 23:695–707. doi: doi: DOI: 10.1016/0305-1978(95)00086-0
- Behan-Martin MK, Jones GR, Bowler K, Cossins AR (1993) A near perfect temperature adaptation of bilayer order in vertebrate brain membranes. *Biochim Biophys Acta* 1151:216–222.
- Beitinger H, Probst W, Hilbig R, Rahmann H (1987) Seasonal variability of sialoglycoconjugates in the brain of the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*). *Comp*

Biochem Physiol Part B Comp Biochem 86:377–384. doi: doi: DOI: 10.1016/0305-0491(87)90309-9

- Beyer TA, Sadler JE, Rearick JI, et al. (1981) Glycosyltransferases and their use in assessing oligosaccharide structure and structure-function relationships. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 52:23–175.
- Blum AS, Barnstable CJ (1987) O-acetylation of a cell-surface carbohydrate creates discrete molecular patterns during neural development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:8716–8720.
- Bogut I, Novoselić D, Pavličević J (2006) *Biologija riba I*. Poljoprivredni fakultet u Osijeku
- Bonga SEW (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77:591–625.
- Bosslet K, Mennel HD, Rodden F, et al. (1989) Monoclonal antibodies against epitopes on ganglioside GD2 and its lactones. Markers for gliomas and neuroblastomas. *Cancer Immunol Immunother Cii* 29:171–178.
- Braford M, Northcutt R (1983) Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. *Fish Neurobiol. 2 High. Brain Areas Funct.*
- Breer H (1975) Ganglioside pattern and thermal tolerance of fish species. *Life Sci* 16:1459–1463. doi: 10.1016/0024-3205(75)90042-9
- Breer H, Rahmann H (1976) Involvement of brain gangliosides in temperature adaptation of fish. *J Therm Biol* 1:233–235. doi: doi: DOI: 10.1016/0306-4565(76)90021-8
- Buda C, Dey I, Balogh N, et al. (1994) Structural order of membranes and composition of phospholipids in fish brain cells during thermal acclimatization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:8234–8238.
- Van den Burg EH, Peeters RR, Verhoye M, et al. (2005) Brain Responses to Ambient Temperature Fluctuations in Fish: Reduction of Blood Volume and Initiation of a Whole-Body Stress Response. *J Neurophysiol* 93:2849–2855. doi: 10.1152/jn.01113.2004
- Van den Burg EH, Verhoye M, Peeters RR, et al. (2006) Activation of a sensorimotor pathway in response to a water temperature drop in a teleost fish. *J Exp Biol* 209:2015–2024. doi: 10.1242/jeb.02240
- Butor C, Diaz S, Varki A (1993) High level O-acetylation of sialic acids on N-linked oligosaccharides of rat liver membranes. Differential subcellular distribution of 7- and 9-O-acetyl groups and of enzymes involved in their regulation. *J Biol Chem* 268:10197–10206.
- Cariappa A, Takematsu H, Liu H, et al. (2009) B cell antigen receptor signal strength and peripheral B cell development are regulated by a 9-O-acetyl sialic acid esterase. *J Exp Med* 206:125–138. doi: 10.1084/jem.20081399

- Cebecauer M, Owen DM, Markiewicz A, Magee AI (2009) Lipid order and molecular assemblies in the plasma membrane of eukaryotic cells. *Biochem Soc Trans* 37:1056–1060. doi: 10.1042/BST0371056
- Chammas R, McCaffery JM, Klein A, et al. (1996) Uptake and incorporation of an epitope-tagged sialic acid donor into intact rat liver Golgi compartments. Functional localization of sialyltransferase overlaps with beta-galactosyltransferase but not with sialic acid O-acetyltransferase. *Mol Biol Cell* 7:1691–1707.
- Cheresh DA, Reisfeld RA, Varki AP (1984a) O-acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant. *Science* 225:844–846.
- Cheresh DA, Varki AP, Varki NM, et al. (1984b) A monoclonal antibody recognizes an O-acetylated sialic acid in a human melanoma-associated ganglioside. *J Biol Chem* 259:7453–7459.
- Chou DK, Flores S, Jungalwala FB (1990) Identification of disialosyl paragloboside and O-acetyldisialosyl paragloboside in cerebellum and embryonic cerebrum. *J Neurochem* 54:1598–1607.
- Christie WW, Han X (2010) Lipid analysis: isolation, separation, identification and lipidomic analysis. Oily Press, an imprint of PJ Barnes & Associates, Bridgwater, England
- Collins BE, Yang LJ, Mukhopadhyay G, et al. (1997) Sialic acid specificity of myelin-associated glycoprotein binding. *J Biol Chem* 272:1248–1255.
- Corfield AP, Sander-Wewer M, Veh RW, et al. (1986) The action of sialidases on substrates containing O-acetylsialic acids. *Biol Chem Hoppe Seyler* 367:433–439.
- Cossins AR, Macdonald AG (1989) The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: fish from the deep and cold. *J Bioenerg Biomembr* 21:115–135.
- Crocker PR, Paulson JC, Varki A (2007) Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* 7:255–266. doi: 10.1038/nri2056
- Crockford T, Johnston IA (1990) Temperature acclimation and the expression of contractile protein isoforms in the skeletal muscles of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *J Comp Physiol B* 160:23–30. doi: 10.1007/BF00258759
- Davison W, Goldspink G, Johnston IA (1975) Adaptations in Mg<sup>2+</sup>-activated myofibrillar ATPase activity induced by temperature acclimation. *Febs Lett* 50:293–295.
- Diaz S, Higa HH, Hayes BK, Varki A (1989) O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. 7- and 9-o-acetylation of alpha 2,6-linked sialic acids on endogenous N-linked glycans in rat liver Golgi vesicles. *J Biol Chem* 264:19416–19426.
- Dubois C, Manuguerra JC, Hauttecoeur B, Maze J (1990) Monoclonal antibody A2B5, which detects cell surface antigens, binds to ganglioside GT3 (II3 (NeuAc)<sub>3</sub>LacCer) and to its 9-O-acetylated derivative. *J Biol Chem* 265:2797–2803.
- Eisenbarth GS, Walsh FS, Nirenberg M (1979) Monoclonal antibody to a plasma membrane antigen of neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4913–4917.



- Ekström P (1987) Photoreceptors and CSF-contacting neurons in the pineal organ of a teleost fish have direct axonal connections with the brain: an HRP-electron-microscopic study. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 7:987–995.
- Fantini J, Barrantes FJ (2009) Sphingolipid/cholesterol regulation of neurotransmitter receptor conformation and function. *Biochim Biophys Acta* 1788:2345–2361. doi: 10.1016/j.bbamem.2009.08.016
- Farkas T, Kitajka K, Fodor E, et al. (2000) Docosahexaenoic acid-containing phospholipid molecular species in brains of vertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6362–6366. doi: 10.1073/pnas.120157297
- Favrelère S, Stadelmann-Ingrand S, Huguet F, et al. (2000) Age-related changes in ethanolamine glycerophospholipid fatty acid levels in rat frontal cortex and hippocampus. *Neurobiol Aging* 21:653–660.
- Fenderson BA, Andrews PW, Nudelman E, et al. (1987) Glycolipid core structure switching from globo- to lacto- and ganglio-series during retinoic acid-induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev Biol* 122:21–34.
- Finger TE, Morita Y (1985) Two gustatory systems: facial and vagal gustatory nuclei have different brainstem connections. *Science* 227:776–778.
- Fredman P, Magnani JL, Nirenberg M, Ginsburg V (1984) Monoclonal antibody A2B5 reacts with many gangliosides in neuronal tissue. *Arch Biochem Biophys* 233:661–666.
- Freischütz B, Saito M, Rahmann H, Yu RK (1994) Activities of five different sialyltransferases in fish and rat brains. *J Neurochem* 62:1965–1973.
- Freischütz B, Saito M, Rahmann H, Yu RK (2008) Activities of Five Different Sialyltransferases in Fish and Rat Brains. *J Neurochem* 62:1965–1973. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.62051965.x
- Geiser F, Hilbig R, Rahmann H (1981) Hibernation-induced changes in the ganglioside composition of dormice (*Glis glis*). *J Therm Biol* 6:145–151. doi: 10.1016/0306-4565(81)90049-8
- Van Genderen I, van Meer G (1995) Differential targeting of glucosylceramide and galactosylceramide analogues after synthesis but not during transcytosis in Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 131:645–654.
- Ghidoni R, Sonnino S, Chigorno V, et al. (1984) Comparative and developmental behavior of alkali labile gangliosides in the brain. *Adv Exp Med Biol* 174:307–318.
- Ghidoni R, Sonnino S, Tettamanti G, et al. (1980) Isolation and characterization of a trisialoganglioside from mouse brain, containing 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid. *J Biol Chem* 255:6990–6995.
- Giraud CG, Daniotti JL, Maccioni HJF (2001) Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus. *Proc Natl Acad Sci* 98:1625–1630. doi: 10.1073/pnas.98.4.1625

- Giraud CG, Rosales Fritz VM, Maccioni HJ (1999) GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-golgi network of CHO-K1 cells. *Biochem J* 342 Pt 3:633–640.
- Gowda DC, Reuter G, Shukla AK, Schauer R (1984) Identification of a disialoganglioside (GD1a) containing terminal N-acetyl-9-O-acetylneuraminic acid in rat erythrocytes. *Hoppe-Seylers Z Für Physiol Chem* 365:1247–1253.
- Gracey AY, Fraser EJ, Li W, et al. (2004) Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16970–16975. doi: 10.1073/pnas.0403627101
- Le Grimellec C, Friedlander G, Giocondi MC (1988) Asymmetry of plasma membrane lipid order in Madin-Darby Canine Kidney cells. *Am J Physiol* 255:F22–32.
- Gross SK, Williams MA, McCluer RH (1980) Alkali-labile, sodium borohydride-reducible ganglioside sialic acid residues in brain. *J Neurochem* 34:1351–1361.
- Harduin-Lepers A, Vallejo-Ruiz V, Krzewinski-Recchi MA, et al. (2001) The human sialyltransferase family. *Biochimie* 83:727–737.
- Harper AA, Watt PW, Hancock NA, Macdonald AG (1990) Temperature Acclimation Effects on Carp Nerve: a Comparison of Nerve Conduction, Membrane Fluidity and Lipid Composition. *J Exp Biol* 154:305–320.
- Haverkamp J, Veh RW, Sander M, et al. (1977) Demonstration of 9-O-acetyl-N-acetylneuraminic acid in brain gangliosides from various vertebrates including man. *Hoppe-Seylers Z Für Physiol Chem* 358:1609–1612.
- Hayes BK, Varki A (1993) Biosynthesis of oligosaccharides in intact Golgi preparations from rat liver. Analysis of N-linked glycans labeled by UDP-[6-3H]galactose, CMP-[9-3H]N-acetylneuraminic acid, and [acetyl-3H]acetyl-coenzyme A. *J Biol Chem* 268:16155–16169.
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57:19–42. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.000315
- Hazel JR, Williams EE (1990) The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res* 29:167–227.
- Heap SP, Watt PW, Goldspink G (1987) Contractile properties of goldfish fin muscles following temperature acclimation. *J Comp Physiol B* 157:219–225. doi: 10.1007/BF00692366
- Heckel J, Kner R (1858) Die Süßwasserfische der Österreichischen Monarchie, mit Rücksicht auf die angrenzenden Länder. Engelmann, Leipzig
- Heffer-Lauc M, Mojsovic-Cuic A, Hrabac P, et al. (2010) The quest for the ganglioside functions; what did we learn more from «evo-devo» or signaling of long-term maintenance? *Biopolym Cell* 26:105–114.

- Heffer-Lauc M, Viljetic B, Vajn K, et al. (2007) Effects of Detergents on the Redistribution of Gangliosides and GPI-anchored Proteins in Brain Tissue Sections. *J Histochem Cytochem* 55:805–812. doi: 10.1369/jhc.7A7195.2007
- Herrler G, Klenk HD (1991) Structure and function of the HEF glycoprotein of influenza C virus. *Adv Virus Res* 40:213–234.
- Higa HH, Butor C, Diaz S, Varki A (1989) O-acetylation and de-O-acetylation of sialic acids. O-acetylation of sialic acids in the rat liver Golgi apparatus involves an acetyl intermediate and essential histidine and lysine residues--a transmembrane reaction? *J Biol Chem* 264:19427–19434.
- Hilbig R (1983) Regional differences in brain gangliosides of a teleost fish following thermal acclimations. *J Therm Biol* 8:469–470. doi: DOI: 10.1016/0306-4565(83)90059-1
- Hilbig R, Rahmann H (1980) Variability in Brain Gangliosides of Fishes. *J Neurochem* 34:236–240. doi: 10.1111/j.1471-4159.1980.tb04649.x
- Hilbig R, Rahmann H, Rösner H (1979) Brain gangliosides and temperature adaptation in eury- and stenothermic teleost fish (carp and rainbow trout). *J Therm Biol* 4:29–34. doi: DOI: 10.1016/0306-4565(79)90042-1
- Hirabayashi Y, Hirota M, Suzuki Y, et al. (1989) Developmentally expressed O-acetyl ganglioside GT3 in fetal rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 106:193–198.
- Van't Hof W, Silvius J, Wieland F, van Meer G (1992) Epithelial sphingolipid sorting allows for extensive variation of the fatty acyl chain and the sphingosine backbone. *Biochem J* 283 ( Pt 3):913–917.
- Huxley TH (1875) Remarks on the classification of the animal kingdom. From the Journ., Linnean society.
- Ikenaga T, Yoshida M, Uematsu K (2002) Efferent connections of the cerebellum of the goldfish, *Carassius auratus*. *Brain Behav Evol* 60:36–51. doi: 64120
- Irwin LN, Irwin CC (1979) Phylogenetic and regional variations in brain gangliosides of tetrapods. *Comp Biochem Physiol B* 64:121–123.
- Irwin LN, Schwartz K (1983) Amphibian brain gangliosides: pattern analysis by two-dimensional thin-layer chromatography. *Comp Biochem Physiol B* 76:649–651.
- Ishizuka I, Kloppenburg M, Wiegandt H (1970) Characterization of gangliosides from fish brain. *Biochim Biophys Acta Bba - Lipids Lipid Metab* 210:299–305. doi: 10.1016/0005-2760(70)90174-8
- 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. doi: 10.1002/cne.902980402
- IUPAC-IUBMB (1998) Nomenclature of Glycolipids. Recommendations 1997. *Carbohydr. Res.*, pp 167–175

- Iwersen M, Vandamme-Feldhaus V, Schauer R (1998) Enzymatic 4-O-acetylation of N-acetylneuraminic acid in guinea-pig liver. *Glycoconj J* 15:895–904.
- Johnston IA, Altringham JD (1985) Evolutionary adaptation of muscle power output to environmental temperature: force-velocity characteristics of skinned fibres isolated from antarctic, temperate and tropical marine fish. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 405:136–140.
- Johnston IA, Dunn J (1987) Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Soc Exp Biol* 67–93.
- Kabayama K, Sato T, Saito K, et al. (2007) Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13678–13683. doi: 10.1073/pnas.0703650104
- Kanwal JS, Finger TE, Caprio J (1988) Forebrain connections of the gustatory system in ictalurid catfishes. *J Comp Neurol* 278:353–376. doi: 10.1002/cne.902780306
- Kappel T, Anken RH, Hanke W, Rahmann H (2000) Gangliosides affect membrane-channel activities dependent on ambient temperature. *Cell Mol Neurobiol* 20:579–590.
- Kappel T, Hilbig R, Rahmann H (1993) Variability in brain ganglioside content and composition of endothermic mammals, heterothermic hibernators and ectothermic fishes. *Neurochem Int* 22:555–566. doi: DOI: 10.1016/0197-0186(93)90030-9
- Karlsson K-A, Stromberg N (1987) [17] Overlay and solid-phase analysis of glycolipid receptors for bacteria and viruses. In: Victor Ginsburg (ed) *Methods Enzymol.* Academic Press, pp 220–232
- Kasai N, Yu RK (1983) The monoclonal antibody A2B5 is specific to ganglioside GQ1c. *Brain Res* 277:155–158. doi: 10.1016/0006-8993(83)90918-6
- Kishida R (1979) Comparative study on the teleostean optic tectum. Lamination and cytoarchitecture. *J Für Hirnforsch* 20:57–67.
- Kohla G, Stockfleth E, Schauer R (2002) Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin. *Neurochem Res* 27:583–592.
- Kolter T, Proia RL, Sandhoff K (2002) Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* 277:25859–25862. doi: 10.1074/jbc.R200001200
- Kostić D, Vranesević A, Vrbaski S, Rakić L (1975) [Gangliosides in various brain structures of the electric fish *Torpedo ocellata*]. *Acta Med Jugosl* 29:289–295.
- Krishna M, Varki A (1997) 9-O-Acetylation of Sialomucins: A Novel Marker of Murine CD4 T Cells that Is Regulated during Maturation and Activation. *J Exp Med* 185:1997–2013.
- Kuhn R (1959) *Carbohydrate Chemistry of Substances of Biological Interest.* Lond Pergamon Press Inc Vol 1:67.

- Kundu SK, Pleatman MA, Redwine WA, et al. (1983) Binding of monoclonal antibody A2B5 to gangliosides. *Biochem Biophys Res Commun* 116:836–842.
- Leclerc N, Schwarting GA, Herrup K, et al. (1992) Compartmentation in mammalian cerebellum: Zebrin II and P-path antibodies define three classes of sagittally organized bands of Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:5006–5010.
- Ledeen R, Yu R (1976) Gangliosides of the nervous system. *Ganglioside Funct.*
- Ledeen RW, Haley JE, Skrivanek JA (1981) Study of ganglioside patterns with two-dimensional and thin-layer chromatography and radioautography; detection of new fucogangliosides and other minor species in rabbit brain. *Anal Biochem* 112:135–142.
- Letinić K, Heffer-Lauc M, Rosner H, Kostović I (1998) C-pathway polysialogangliosides are transiently expressed in the human cerebrum during fetal development. *Neuroscience* 86:1–5.
- Levine JM, Beasley L, Stallcup WB (1984) The D1.1 antigen: a cell surface marker for germinal cells of the central nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 4:820–831.
- Lloyd KO, Furukawa K (1998) Biosynthesis and functions of gangliosides: recent advances. *Glycoconj J* 15:627–636. doi: 10.1023/A:1006924128550
- Lopez PH, Schnaar RL (2009) Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* 19:549–557. doi: 10.1016/j.sbi.2009.06.001
- Lopez PHH, Schnaar RL (2006) Determination of Glycolipid–Protein Interaction Specificity. *Methods Enzymol* 417:205–220. doi: 10.1016/S0076-6879(06)17015-9
- Marks DL, Dominguez M, Wu K, Pagano RE (2001) Identification of active site residues in glucosylceramide synthase. A nucleotide-binding catalytic motif conserved with processive beta-glycosyltransferases. *J Biol Chem* 276:26492–26498. doi: 10.1074/jbc.M102612200
- Matz JM, Blake MJ, Tatelman HM, et al. (1995) Characterization and regulation of cold-induced heat shock protein expression in mouse brown adipose tissue. *Am J Physiol* 269:R38–47.
- McCleskey EW (1997) Thermoreceptors: recent heat in thermosensation. *Curr Biol Cb* 7:R679–681.
- McJarrow P, Schnell N, Jumpsen J, Clandinin T (2009) Influence of dietary gangliosides on neonatal brain development. *Nutr Rev* 67:451–463. doi: 10.1111/j.1753-4887.2009.00211.x
- McMullen TPW, Lewis RNAH, McElhaney RN (2004) Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 8:459–468. doi: 10.1016/j.cocis.2004.01.007

- 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.
- Meek J (1990) Tectal morphology: connections, neurons and synapses. In: Douglas R, Djamgoz M (eds) *Vis. Syst. Fish.* Chapman and Hall, London, pp 239–277
- Meek J (1983) Functional anatomy of the tectum mesencephali of the goldfish. An explorative analysis of the functional implications of the laminar structural organization of the tectum. *Brain Res* 287:247–297.
- Merrill AH (2011) Sphingolipid and Glycosphingolipid Metabolic Pathways in the Era of Sphingolipidomics. *Chem Rev* 111:6387–6422. doi: 10.1021/cr2002917
- Michaels VK (1988) *Carp farming.* Fishing News Books, Farnham, UK
- Miller AS, Harley JP (2001) *Zoology.* Chapter 18: The Fishes: Vertebrate Success in Water, 8th Edition. McGraw-Hill College
- Mitsuda T, Furukawa K, Fukumoto S, et al. (2002) Overexpression of ganglioside GM1 results in the dispersion of platelet-derived growth factor receptor from glycolipid-enriched microdomains and in the suppression of cell growth signals. *J Biol Chem* 277:11239–11246. doi: 10.1074/jbc.M107756200
- Morita Y, Murakami T, Ito H (1983) Cytoarchitecture and topographic projections of the gustatory centers in a teleost, *Carassius carassius*. *J Comp Neurol* 218:378–394. doi: 10.1002/cne.902180403
- Nelson DO, Prosser CL (1981) Intracellular recordings from thermosensitive preoptic neurons. *Science* 213:787–789.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world,* Fourth Edition. John Wiley & Sons, New York
- Nieuwenhuys R (1967) *Comparative Anatomy of the Cerebellum.* The Cerebellum. Elsevier, pp 1–93
- Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C (1998) *The central nervous system of vertebrates.* Springer
- Nieuwenhuys R, Meek J (1990) The telencephalon of actinopterygian fishes. *Comp. Struct. Evol. Cereb. Cortex Part.* Plenum Press, New York, pp 31–73
- Olden JD, Naiman RJ (2010) Incorporating thermal regimes into environmental flows assessments: modifying dam operations to restore freshwater ecosystem integrity. *Freshw Biol* 55:86–107. doi: 10.1111/j.1365-2427.2009.02179.x
- Palestini P, Masserini M, Sonnino S, et al. (1990) Changes in the Ceramide Composition of Rat Forebrain Gangliosides with Age. *J Neurochem* 54:230–235. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb13305.x
- Paulson JC, Weinstein J, Schauer A (1989) Tissue-specific expression of sialyltransferases. *J Biol Chem* 264:10931–10934.

- Pflieger WL (1975) *The Fishes of Missouri*. Missouri Department of Conservation, Columbia, p 343 pp
- Pike LJ (2006) Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. *J Lipid Res* 47:1597–1598. doi: 10.1194/jlr.E600002-JLR200
- Popović J (1994) Značajke ljuške ilirskog klena. *Ribarstvo* 52:1–11.
- Prinetti A, Loberto N, Chigorno V, Sonnino S (2009) Glycosphingolipid behaviour in complex membranes. *Biochim Biophys Acta* 1788:184–193. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.09.001
- Probst W, Rahmann H (1980) Influence of temperature changes on the ability of gangliosides to complex with Ca<sup>2+</sup>. *J Therm Biol* 5:243–247. doi: doi: DOI: 10.1016/0306-4565(80)90028-5
- Probst W, Rösner H, Wiegandt H, Rahmann H (1979) [The complexing ability of gangliosides for Ca<sup>2+</sup>, I. Influence of mono- and divalent cations and of acetylcholin (author's transl)]. *Hoppe-Seylers Z Für Physiol Chem* 360:979–986.
- Prosser CL, Nelson DO (1981) The Role of Nervous Systems in Temperature Adaptation of Poikilotherms. *Annu Rev Physiol* 43:281–300. doi: 10.1146/annurev.ph.43.030181.001433
- Pu L, Igbavboa U, Wood WG, et al. (1999) Expression of fatty acid binding proteins is altered in aged mouse brain. *Mol Cell Biochem* 198:69–78.
- Rahmann H (1978) Gangliosides and thermal adaptation in vertebrates. *Jpn J Exp Med* 48:85–96.
- Rahmann H (1983) Functional implication of gangliosides in synaptic transmission. *Neurochem Int* 5:539–547. doi: doi: DOI: 10.1016/0197-0186(83)90044-X
- Rahmann H, Hilbig R (1981) The possible functional role of neuronal gangliosides in temperature adaptation of vertebrates. *J Therm Biol* 6:315–319. doi: doi: DOI: 10.1016/0306-4565(81)90020-6
- Rahmann H, Hilbig R, Geiser F (1986) Brain gangliosides in monotremes, marsupials and placentals: Phylogenetic and thermoregulatory aspects. *Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem* 83:151–157. doi: 10.1016/0305-0491(86)90345-7
- Rahmann H, Hilbig R, Probst W, Mühleisen M (1983) Involvement of temperature in the composition of fish brain gangliosides. *J Therm Biol* 8:107–109. doi: doi: DOI: 10.1016/0306-4565(83)90087-6
- Rahmann H, Jonas U, Kappel T, Hildebrandt H (1998a) Differential Involvement of Gangliosides versus Phospholipids in the Process of Temperature Adaptation in Vertebrates: A Comparative Phenomenological and Physicochemical Study. *Ann N Y Acad Sci* 845:72–91. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09663.x
- Rahmann H, Jonas U, Kappel T, Hildebrandt H (1998b) Differential Involvement of Gangliosides versus Phospholipids in the Process of Temperature Adaptation in

- Vertebrates: A Comparative Phenomenological and Physicochemical Study. *Ann N Y Acad Sci* 845:72–91. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09663.x
- Rajendran L, Simons K (2005) Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118:1099–1102. doi: 10.1242/jcs.01681
- Van Regenmortel MHV (2008) Antigenicity and Immunogenicity of Viral Proteins. In: Editors-in-Chief: B.W.J. Mahy, M.H.V. van Regenmortel (eds) *Encycl. Virol*. Third Ed. Academic Press, Oxford, pp 137–142
- Riboni L, Sonnino S, Acquotti D, et al. (1986) Natural occurrence of ganglioside lactones. Isolation and characterization of GD1b inner ester from adult human brain. *J Biol Chem* 261:8514–8519.
- Robert J, Montaudon D, Dubourg L, et al. (1982) Changes in lipid composition of the brain cellular membranes of an hibernating mammal during its circannual rhythm. *Comp Biochem Physiol B* 71:409–416.
- Roberts BL, van Rossem A, de Jager S (1992) The influence of cerebellar lesions on the swimming performance of the trout. *J Exp Biol* 167:171–178.
- Rome LC, Loughna PT, Goldspink G (1985) Temperature acclimation: improved sustained swimming performance in carp at low temperatures. *Science* 228:194–196. doi: 10.1126/science.228.4696.194
- Rösner H (2003) Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. *Prog Mol Subcell Biol* 32:49–73.
- Rösner H (1980) Ganglioside changes in the chicken optic lobes and cerebrum during embryonic development. *Wilhelm Rouxs Arch Dev Biol* 188:205–213. doi: 10.1007/BF00849050
- Rösner H, Breer H, Hilbig R, Rahmann H (1979) Temperature effects on the incorporation of sialic acid into gangliosides and glycoproteins of fish brain. *J Therm Biol* 4:69–73. doi: DOI: 10.1016/0306-4565(79)90048-2
- Rösner H, Greis C, Henke-Fahle S (1988) Developmental expression in embryonic rat and chicken brain of a polysialoganglioside-antigen reacting with the monoclonal antibody Q 211. *Dev Brain Res* 42:161–171. doi: 10.1016/0165-3806(88)90234-9
- Rudolph IL, Kelley DS, Klasing KC, Erickson KL (2001) Regulation of cellular differentiation and apoptosis by fatty acids and their metabolites. *Nutr Res New York* N 21:381–393.
- Sandhoff K, Kolter T (2003) Biosynthesis and degradation of mammalian glycosphingolipids. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:847–861. doi: 10.1098/rstb.2003.1265
- Schauer R (1982) Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem* 40:131–234.
- Schauer R (1991) Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glycobiology* 1:449–452.



- Schauer R (1978) Biosynthesis of sialic acids. *Methods Enzymol* 50:374–386.
- Schauer R (1987) Sialic acids: metabolism of O-acetyl groups. *Methods Enzymol* 138:611–626.
- Schengrund CL, Rosenberg A (1970) Intracellular location and properties of bovine brain sialidase. *J Biol Chem* 245:6196–6200.
- Schnaar RL (2004) Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration. *Arch Biochem Biophys* 426:163–172. doi: 10.1016/j.abb.2004.02.019
- Schnaar RL (1994) Isolation of glycosphingolipids. *Guide Tech. Glycobiol.* Academic Press, pp 348–370
- Schnaar RL, Fromholt SE, Gong Y, et al. (2002) Immunoglobulin G-class mouse monoclonal antibodies to major brain gangliosides. *Anal Biochem* 302:276–284. doi: 10.1006/abio.2001.5540
- Schnaar RL, Needham LK (1994) Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol* 230:371–389.
- Shi WX, Chammas R, Varki A (1998) Induction of sialic acid 9-O-acetylation by diverse gene products: implications for the expression cloning of sialic acid O-acetyltransferases. *Glycobiology* 8:199–205.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol* 7:161–167. doi: 10.1016/S0958-1669(96)80007-3
- Simons K, Ehehalt R (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest* 110:597–603. doi: 10.1172/JCI16390
- Simons K, Van Meer G (1988) Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry (Mosc)* 27:6197–6202. doi: 10.1021/bi00417a001
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:31–39. doi: 10.1038/35036052
- Singer SJ, Nicolson GL (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175:720–731.
- Sjoberg ER, Manzi AE, Khoo KH, et al. (1992) Structural and immunological characterization of O-acetylated GD2. Evidence that GD2 is an acceptor for ganglioside O-acetyltransferase in human melanoma cells. *J Biol Chem* 267:16200–16211.
- Sjoberg ER, Powell LD, Klein A, Varki A (1994) Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta can be masked by 9-O-acetylation of sialic acids. *J Cell Biol* 126:549–562.
- Sneddon LU (2003) Trigeminal somatosensory innervation of the head of a teleost fish with particular reference to nociception. *Brain Res* 972:44–52.

- Somero GN (1995) Proteins and temperature. *Annu Rev Physiol* 57:43–68. doi: 10.1146/annurev.ph.57.030195.000355
- Sonnino S, Ghidoni R, Chigorno V, et al. (1983) Recognition by two-dimensional thin-layer chromatography and densitometric quantification of alkali-labile gangliosides from the brain of different animals. *Anal Biochem* 128:104–114. doi: 10.1016/0003-2697(83)90350-0
- Sonnino S, Ghidoni R, Chigorno V, Tettamanti G (1982) Chemistry of gangliosides carrying o-acetylated sialic acid. *Adv Exp Med Biol* 152:55–69.
- Sonnino S, Ghidoni R, Malesci A, et al. (1984) Nervous system ganglioside composition of normothermic and hibernating dormice (*Glis glis*). *Neurochem Int* 6:677–683. doi: DOI: 10.1016/0197-0186(84)90049-4
- Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A (2007) Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* 17:1R–13R. doi: 10.1093/glycob/cwl052
- Sonnino S, Prinetti A, Mauri L, et al. (2006) Dynamic and structural properties of sphingolipids as driving forces for the formation of membrane domains. *Chem Rev* 106:2111–2125. doi: 10.1021/cr0100446
- Spiegel S, Matyas GR, Cheng L, Sacktor B (1988) Asymmetric distribution of gangliosides in rat renal brush-border and basolateral membranes. *Biochim Biophys Acta* 938:270–278.
- Sprong H, Degroote S, Claessens T, et al. (2001) Glycosphingolipids are required for sorting melanosomal proteins in the Golgi complex. *J Cell Biol* 155:369–380. doi: 10.1083/jcb.200106104
- Suzuki K (1965) The pattern of mammalian brain gangliosides. II. Evaluation of the extraction procedures, postmortem changes and the effect of formalin preservation. *J Neurochem* 12:629–638.
- Svennerholm L (1978) Structure and biology of cell membrane gangliosides. 43rd Nobel Symp Stockh 80–87.
- Svennerholm L (1957) Quantitive estimation of sialic acids: II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 24:604–611. doi: 10.1016/0006-3002(57)90254-8
- Tagawa Y, Laroy W, Nimrichter L, et al. (2002) Anti-ganglioside antibodies bind with enhanced affinity to gangliosides containing very long chain fatty acids. *Neurochem Res* 27:847–855.
- Tanck MWT, Booms GHR, Eding EH, et al. (2000) Cold shocks: a stressor for common carp. *J Fish Biol* 57:881–894. doi: 10.1111/j.1095-8649.2000.tb02199.x
- Terabayashi T, Kawanishi Y (1998) Naturally occurring ganglioside lactones in Minke whale brain. *Carbohydr Res* 307:281–290.

- Tettamanti G, Morgan IG, Gombos G, et al. (1972) Sub-synaptosomal localization of brain particulate neuraminidase. *Brain Res* 47:515–518.
- Thurin J, Herlyn M, Hindsgaul O, et al. (1985) Proton NMR and fast-atom bombardment mass spectrometry analysis of the melanoma-associated ganglioside 9-O-acetyl-GD3. *J Biol Chem* 260:14556–14563.
- Tiku PE, Gracey AY, Macartney AI, et al. (1996) Cold-induced expression of delta 9-desaturase in carp by transcriptional and posttranslational mechanisms. *Science* 271:815–818.
- Tocher DR, Harvie DG (1988) Fatty acid compositions of the major phosphoglycerides from fish neural tissues; (n-3) and (n-6) polyunsaturated fatty acids in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and cod (*Gadus morhua*) brains and retinas. *Fish Physiol Biochem* 5:229–239. doi: 10.1007/BF01874800
- Treer T, Safner R, Aničić I, Lovrinov M (1995) Ribarstvo. Nakladni zavod Globus, Zagreb
- Tsuji S, Datta AK, Paulson JC (1996) Systematic nomenclature for sialyltransferases. *Glycobiology* 6:v–vii.
- Ulmann L, Mimouni V, Roux S, et al. (2001) Brain and hippocampus fatty acid composition in phospholipid classes of aged-relative cognitive deficit rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64:189–195. doi: 10.1054/plef.2001.0260
- Ushio H, Ohshima T, Koizumi C (1996) Fatty acid compositions in glycerophospholipids from brain lobes of rainbow trout [*Oncorhynchus mykiss*], carp [*Cyprinus carpio*] and skipjack tuna [*Katsuwonus pelamis*]. *Fish. Sci.* v. 62(1) p. 126-133:
- Varki A, Hooshmand F, Diaz S, et al. (1991) Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetyltransferase. *Cell* 65:65–74.
- Viljetić B, Labak I, Majić S, et al. (2012) Distribution of mono-, di- and trisialo gangliosides in the brain of Actinopterygian fishes. *Biochim Biophys Acta* 1820:1437–1443. doi: 10.1016/j.bbagen.2011.12.010
- Vukelic Z, Metelmann W, Müthing J, et al. (2001) Anencephaly: Structural Characterization of Gangliosides in Defined Brain Regions. *Biol Chem* 382:259–274. doi: 10.1515/BC.2001.033
- Werth N, Schuette CG, Wilkening G, et al. (2001) Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by beta -hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J Biol Chem* 276:12685–12690. doi: 10.1074/jbc.M007970200
- Wiegandt H (1967) The subcellular localization of gangliosides in the brain. *J Neurochem* 14:671–674. doi: 10.1111/j.1471-4159.1967.tb09571.x
- 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.

- Wullimann MF, Meyer DL, Northcutt RG (1991) The visually related posterior pretectal nucleus in the non-percomorph teleost *Osteoglossum bicirrhosum* projects to the hypothalamus: a DiI study. *J Comp Neurol* 312:415–435. doi: 10.1002/cne.903120309
- 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.
- Yang LJ, Zeller CB, Shaper NL, et al. (1996) Gangliosides are neuronal ligands for myelin-associated glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:814–818.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI (2000) Fatty acid mixture counters stress changes in cortisol, cholesterol, and impair learning. *Int J Neurosci* 101:73–87.
- Yehuda S, Rabinovitz S, Carasso RL, Mostofsky DI (2002) The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging* 23:843–853.
- Yiamouyiannis JA, Dain JA (1968) The appearance of ganglioside during embryological development of the frog. *J Neurochem* 15:673–676. doi: 10.1111/j.1471-4159.1968.tb08966.x
- Yu RK, Ando S (1980) Structures of some new complex gangliosides of fish brain. *Adv Exp Med Biol* 125:33–45.
- Yu RK, Macala LJ, Taki T, et al. (1988) Developmental Changes in Ganglioside Composition and Synthesis in Embryonic Rat Brain. *J Neurochem* 50:1825–1829. doi: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb02484.x
- Zehmer JK, Hazel JR (2003) Plasma membrane rafts of rainbow trout are subject to thermal acclimation. *J Exp Biol* 206:1657–1667.
- Zehmer JK, Hazel JR (2004) Membrane order conservation in raft and non-raft regions of hepatocyte plasma membranes from thermally acclimated rainbow trout. *Biochim Biophys Acta* 1664:108–116. doi: 10.1016/j.bbamem.2004.04.008
- Zhang G, Ji L, Kurono S, et al. (1997) Developmentally regulated O-acetylated sialoglycans in the central nervous system revealed by a new monoclonal antibody 493D4 recognizing a wide range of O-acetylated glycoconjugates. *Glycoconj J* 14:847–857.

Internet stranice korištene u pisanju doktorskog rada:

Web1- <http://www.mpipks-dresden.mpg.de/~manoj/res.html>, zadnji pristup 26.03.2013.

Web2- <http://www.freepatentsonline.com/6602991-0-large.jpg>, zadnji pristup 26.03.2013.

Web3- <http://www.monsterfishkeepers.com/forums/showthread.php?72999-Polypterids-fossil-records-natural-history-and-anatomy>, zadnji pristup 26.03.2013.

ITIS- <http://www.itis.gov/>, zadnji pristup 22.03.2013.

Sposobnost prilagodbe kralježnjaka termalnim promjenama u njihovoj okolini uglavnom se temelji na adaptivnim promjenama u središnjem živčanom sustavu. Promjene u fizikalno-kemijskim svojstvima membrane neurona odgovorne su za temperaturnu ovisnost sinaptičkog transporta. Naše istraživanje je usmjereno na sastavne dijelove membrana neurona, gangliozide. Gangliozidi su sijalilirani glikosfingolipidi izgrađeni od šećernog lanca i lipidnog sidra kojim su usidreni u vanjski list stanične membrane. Aktivno sudjeluju u stvaranju lipidnih domena - splavi staničnih membrana koje omogućuju prijenos signala iz vanjskog okruženja u unutrašnjost stanice. Male promjene sastava i količine molekula lipidnih splavi značajno mijenjaju način prijenosa signala. Heterotermni organizmi održavaju fluidnost svojih membrana mijenjanjem količine kolesterola i glikosfingolipida na različitim temperaturama, što je preduvjet termalne adaptacije. Prema ovim nalazima u posebnom je interesu uvidjeti promjene gangliozida mozga kralježnjaka koji su sposobni prilagoditi tjelesnu temperaturu prema temperaturi okoliša. Rađena su istraživanja sastava i sadržaja gangliozida mozga riba pri ekstremnim temperaturnim uvjetima, no ne uključuju imunohistokemijske lokalizacije gangliozida u mozgu riba.

Naše istraživanje ukazuje na razliku u sastavu glikosfingolipida mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*). Opisane promjene praćene su tijekom ekstremnih uvjeta od zimskog do ljetnog razdoblja u prirodnim uvjetima okoliša. Prema dobivenim rezultatima u ovom radu prikazane su promjene sastava, distribucije kompleksnih gangliozida i udjela alkalijski labilnih gangliozida po regijama mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kako međusobno tako i tijekom sezonskih temperaturnih prilagodbi tijekom odabраниh mjeseci. U studiji su izvođene ekstrakcije, tankoslojne kromatografije gangliozida, imunoprepoznavanje na pločama tankoslojne kromatografije te imunohistokemijske metode.

Tijekom hladne aklimatizacije uočeno je povećanje polisijaliliranih frakcija gangliozida u mozgu o. šarana, dok je u mozgu d. pastrve uočen rast trisijalogangliozida. Obje vrste pokazuju smanjenje monosijalogangliozida i nastajanje više sijaliliranih homologa zimi, iako su uočene promjene u znatnoj većem razmjeru u mozgu d. pastrve nego o. šarana. Kod d. pastrve uočene su veće količine alkalijski labilnih gangliozida zimi, dok kod o. šarana nisu uočene promjene. Također je uočen pomak biosintetskih puteva gangliozida od *a*- prema *b*-putu, što je ranije uočeno i pri embrionalnom razvoju sisavaca. O. šaran kao euritermna vrsta

pokazuje manje promjene sastava i distribucije gangliozida od stenotermne vrste d. pastrve, što je u skladu s činjenicom da i sisavci kao dobro prilagođene vrste imaju dosta uniforman raspored gangliozida.

Imunohistokemijska lokalizacija otkriva različite promjene u različitim dijelovima mozga. U mozgu d. pastrve zimi prisutno je smanjenje GD1a u *corpus cerebelli*, *tectum opticum*, *lobus inferior hypothalami* i *crista cerebelli*, a povećanje GD1b i GT1b u istim regijama. U mozgu o. šarana prisutno je smanjenje GD1a u telencefalonu i *tectum opticum*, dok je u *corpus cerebelli* prisutno povećanje. Kod GD1b gangliozida nisu uočene značajnije razlike, dok je kod GT1b uočena suprotna ekspresija od GD1a u istim regijama. A2B5 antitijelo je pokazalo nespecifično bojanje, ali u velikoj količini u obje vrste. Rezultati imunoprepoznavanja potkrepljuju ove rezultate. Različite distribucije i specifičan sastav gangliozida u različitim regijama mozga snažno sugerira da imaju važne i specifične funkcije u tim regijama. Za daljnje istrage od našeg je interesa posegnuti za više specifičnim protutijelom na c-seriju gangliozida, uključiti ekstrakciju gangliozida pojedinih regija mozga, kako bi se dobio detaljan uvid u promjene sastava gangliozida tijekom temperaturnih prilagodbi, jer je iz rezultata jasno da se ukupna količina gangliozida ne mijenja tijekom temperaturnih prilagodbi, već sastav i raspodjela po različitim regijama mozga. Dobiveni rezultati objašnjavaju različitu sposobnost prilagodbe na sezonske promjene temperature kod d. pastrve i o. šarana te ukazuju na važnost metabolizma gangliozida.

## 9. SUMMARY

---

The ability of vertebrates to adapt to thermal fluctuations in their environment is mainly based upon adaptive changes within the central nervous system. Changes in the physico-chemical properties of neuronal membranes are responsible for temperature dependence of synaptic transport. Our investigation focused on constituents of neuronal membrane, gangliosides. These amphiphilic glycosphingolipids contain a different number of negatively charged sialic acids and are highly concentrated in synaptic membranes. They are located in the outer surface of the ordered lipid signal domains of neuronal membranes in order to create selectivity in membrane transport, important in the spatial organization of cells. Sphingomyelin and glycosphingolipids with saturated acyl chains associate with each other and are more tightly packed than the surrounding bilayer. Cholesterol, the major structural component of these domains, fills gaps between saturated fatty acids and is required in establishing proper membrane fluidity over the range of physiological temperatures. Comparative studies on brain gangliosides of many poikilotherms (cold-blooded) showed correlation between composition of brain gangliosides and state of thermal adaptation. Fishes being adapted to habitats with extreme cold temperatures showed domination of high polar fractions. In this investigation, the concentration, composition and distribution of brain gangliosides in two poikilothermic fish species belonging to the class of *Actinopterygii* were investigated under seasonal temperature fluctuations in their natural ecosystem (acclimatization). Eurythermic common carp (*Cyprinus carpio*) and stenothermic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were used for the experiments in order to get further information concerning the biological function of gangliosides with respect to seasonal thermal adaptation. The variability of brain gangliosides in two observed fish species with different strategies for survival in the cold was investigated by means of biochemical analysis and immunohistochemical localization with newly developed antibodies. The data support the hypothesis that the composition and distribution of brain gangliosides vary with the state of thermal adaptation to maintain optimum rates of neuronal transmission. Composition and distribution of brain gangliosides changes differently in eurythermic common carp and stenothermic rainbow trout. During the cold acclimatization, increase of polysialylated ganglioside fractions was observed in common carp, while rainbow trout showed increase of trisialogangliosides. Rainbow trout showed decrease in GD1a content against GD1b, leading

to increase in the biosynthesis of the higher sialylated fractions of the *b*- pathway during cold acclimation. Both species showed decrease of monosialogangliosides, and formation of higher sialylated glycosphingolipid homologues. In both species no seasonal changes in the total amount of ganglioside-bound sialic acid occurred. The ganglioside extracts of rainbow trout contain gangliosides that co-migrate with GD1a of mammals by thinlayer chromatography in all observed months, but we found no reaction in the fixed sections with appropriate antibody until June, probably due to different modifications in the ceramide anchor during winter.

In order to separate alkali labile gangliosides from alkali-stabile we have performed two-dimensional thin layer chromatography. Rainbow trout brain in winter showed large quantities of alkali labile ganglioside (40.56%), while in the summer established in a small proportion (33.14%). Common carp brain showed approximately equal amounts of alkali labile ganglioside in winter (30.86%) and summer (30.88%). The percentage of alkali-labile gangliosides was found to be related to the ecophysiological state of thermal adaptation.

Immunohistochemical localization revealed different changes in various parts of brain. Rainbow trout brain in winter showed decrease of GD1a in *corpus cerebelli*, *tectum opticum*, *lobus inferior hypothalami* and *crista cerebelli*, while GD1b and GT1b showed contrary effect in the same regions. Common carp brain in winter showed decrease of GD1a in *telencephalon* and *tectum opticum*, while in *corpus cerebelli* showed increase. GD1b showed no differences and GT1b showed contrary effect against GD1a in the same regions. A2B5 antibody showed non-specific staining, but in great amount in both species. Immunoverlay results support these findings. Different distribution and the specific pattern of gangliosides in various brain regions strongly suggests that they have important and specific functions in these regions. For further investigation it would be of our interest to reach out for more specific antibody to c-series gangliosides, include ganglioside extraction of selected regions of brain according to our results.



## 10. ŽIVOTOPIS I POPIS PUBLIKACIJA

---

**Valentina Pavić** rođena je 07. siječnja, 1981. u Bjelovaru kao četvrto od petero djece. Nakon završenog osnovnog i srednjoškolskog obrazovanja 1999. upisala je Pedagoški fakultet Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku. Diplomirala je 2004. godine na Filozofskom fakultetu i stekla zvanje profesora biologije i kemije.

Za vrijeme akad. god. 2004./2005. radi na Zavodu za kemiju Filozofskog fakulteta u Osijeku Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera kao vanjski stručni suradnik na kolegijima Opća kemija, Metode nastave kemije. Od srpnja 2005. radi na Odjelu za biologiju u Osijeku kao asistent na Zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka. Sudjeluje u organizaciji i realizaciji nastave na nekoliko kolegija u sklopu sveučilišnog preddiplomskog studija: Biokemija I, Biokemija II, Enzimska kinetika i Neurobiologija.

Istraživač je na projektima: „Nutrienti i razvoj plutajućih makrofita i alga u Istočnoj Hrvatskoj“ pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Janje Horvatić na Odjelu za biologiju u Osijeku i „Skracenje uzgojnog razdoblja šarana (*Cyprinus carpio*) i poboljšanje kakvoće mesa“ pod vodstvom prof.dr.sc. Ivana Boguta na Poljoprivrednom fakultetu u Osijeku.

Od 2009. godine član je Hrvatskog društva za neuroznanost i Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju.

Majka je troje djece, Ante 4 godine, Božo i Mirko 2 godine.

Autor je i koautor šest znanstvenih radova objavljenih u CC časopisu. U ostalim časopisima publicirala je još četiri rada. Na kongresima je aktivno sudjelovala s ukupno sedam priopćenja.

### **Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Current Contents:**

1. Kralik, Gordana; **Pavić, Valentina**; Galović, Dalida; Škrtić, Zoran; Kralik, Zlata; Has-Schön, Elizabeta. Fatty Acid Composition and Lipid and Protein Oxidation Products in Muscles of Broilers Fed with Different Plant Oils. // Archiv für Geflügelkunde / European Poultry Science. 76 (2012) , 4; 259-269 (članak, znanstveni).

2. Antunović, Zvonko; Novoselec, Josip; Šperanda, Marcela; Vegara, Mensur; **Pavić, Valentina**; Mioč, Boro; Djidara, Mislav. Changes in biochemical and hematological parameters and metabolic hormones in Tsigai ewes blood in the first third of lactation. //

Archiv fur Tierzucht - Archives of Animal Breeding. 54 (2011) , 5; 535-545 (članak, znanstveni).

3. Čačić, Milan; Molnar, Maja; Šarkanj, Bojan; Has-Schön, Elizabeta; **Rajković, Valentina**. Synthesis and Antioxidant Activity of Some New Coumarinyl- 1, 3-Thiazolidine-4-ones. // Molecules. 15 (2010) , 10; 6795-6809 (članak, znanstveni).

4. Čačić, Milan; Molnar, Maja; Balić, Tomislav; Draca, Nela; **Rajković, Valentina**. Design and Synthesis of Some Thiazolidin-4-ones Based on (7-Hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl) Acetic Acid. // Molecules. 14 (2009) , 7; 2501-2513 (članak, znanstveni).

5. Gajčević, Zlata; Kralik, Gordana; Has-Schön, Elizabeta; **Pavić, Valentina**. Effects of organic selenium supplemented to layer diet on table egg freshness and selenium content. // Italian journal of animal science. 8 (2009) , 2; 189-199 (članak, znanstveni).

6. Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ivan; **Rajković, Valentina**; Bogut, Stjepan; Čačić, Milan; Horvatić, Janja. Heavy Metal Distribution in Tissues of Six Fish Species Included in Human Diet, Inhabiting Freshwaters of the Nature Park "Hutovo Blato" (Bosnia and Herzegovina). // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 54 (2008) , 1; 75-83 (članak, znanstveni).

#### **Znanstveni radovi objavljeni u časopisima koji se indeksiraju u Science Citation Indeks Expanded:**

1. Antunović, Zvonko; Novoselec, Josip; Sauerwein, Helga; Šperanda, Marcela; Vegara, Mensur; **Pavić, Valentina**. Blood Metabolic Profile and some of Hormones Concentration in Ewes During Different Physiological Status. // Bulgarian journal of agricultural science. 17 (2011) , 5; 687-691 (članak, znanstveni).

2. Bogut, Ivan; Has-Schön, Elizabeta; Adámek, Zdeňek; **Rajković, Valentina**; Galović, Dalida. Chironomus plumosus larvae – a suitable nutrient for freshwater farmed fish. // Poljoprivreda (Osijek). 13 (2007) , 1; 159-162 (članak, znanstveni).

3. Bogut, Ivan; Magovac, Ružica; Sabo, Davor; Bodakoš, Dragutin; Galović, Dalida; Arežina, Marko; **Rajković, Valentina**. Rezultati kaveznog tova šarana (*Cyprinus carpio*) u akumulaciji Grabovo kod Vukovara. // *Krmiva: časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*. 49 (2007) , 4; 207-214 (članak, znanstveni).

4. Kopic, Branko; Antunović, Zvonko; Šperanda, Marcela; Steiner, Zdenko; Matanić, Ivica; **Rajković, Valentina**. Primjena organskog selena u hranidbi janjadi. // *Krmiva - časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme*. 49 (2007) , 2; 73-78 (članak, znanstveni).

### **Objavljena pozvana predavanja na skupovima**

1. Viljetić, Barbara; Krajina, Vinko; Đikić, Domagoj; Mojsović, Ana; **Pavić, Valentina**; Radaković, Jasna; Bogut, Ivan; Heffer-Lauc, Marija. Komparativne razlike u anatomske građi i sadržaju glikolipida mozga slatkovodnih riba // 3. međunarodno savjetovanje o slatkovodnom ribarstvu Republike Hrvatske s međunarodnim sudjelovanjem : zbornik radova / Bogut, Ivan (ur.). Vukovar : Hrvatska gospodarska komora, 2009. 71-85 (pozvano predavanje,domaća recenzija,objavljeni rad,znanstveni).

2. **Pavić, Valentina**; Viljetić, Barbara; Bogut, Ivan; Mojsović, Ana; Đikić, Domagoj; Has-Schön, Elizabeta; Radaković, Jasna; Odvorčić, Petar; Heffer-Lauc, Marija. Razlike u signalnim lipidnim domenama mozga pastrve i šarana kao osnova razlike u njihovu ponašanju na različitim temperaturama // 2. savjetovanje o slatkovodnom ribarstvu Republike Hrvatske s međunarodnim sudjelovanjem Uzgoj slatkovodne ribe, stanje i perspektive : zbornik radova / Bogut, Ivan (ur.).Vukovar : Hrvatska gospodarska komora, Sektor za poljoprivredu, prehrambenu industriju i šumarstvo, 2008. 103-118 (pozvano predavanje,domaća recenzija,objavljeni rad,znanstveni).

### **Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunarodnom recenzijom**

1. Antunović, Zvonko; Klavec, Tomislav; Čavar, Suzana; Šperanda, Marcela; **Pavić, Valentina**; Novoselec, Josip; Klir, Željka. Status selena u koza iz ekološkog uzgoja // *Proceedings: 47th Croatian and 7th International Symposium on Agriculture* / Pospisil, M. (ur.). Zagreb, 2012. 645-649 (predavanje,međunarodna recenzija,objavljeni rad,znanstveni).

## Sažeci u zbornicima skupova

1. **Pavić, Valentina**; Galović, Dalida; Has-Schön, Elizabeta. Utjecaj prehrambenih lipida na lipidni metabolizam riba // Proceeding Summary. Vukovar, 2012. 6-7 (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
2. **Pavić Valentina**; Galović, Dalida; Has-Schön Elizabeta; Bogut, Ivan. Control of algae using barley straw // Proceeding Summary. Vukovar, 2011. 21-22 (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
3. **Pavić, Valentina**; Pavličević, Jerko; Galović, Dalida; Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ante; Bogut, Ivan. Heavy metal accumulation (lead, mercury, cadmium and arsenic) in muscles of five fish species in the Neretva River, Bosnia and Herzegovina // Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with International Participation, Book of Abstracts / Kovarik, Zrinka ; Varljen, Jadranka (ur.). Opatija : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2010. 139-139 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
4. **Pavić, Valentina**; Pavličević, Jerko; Petrović, Danijela; Galović, Dalida; Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ivan. Akumulacija teških metala (olovo, živa, kadmij i arsen) u tkivima sunčanice (*Lepomis gibbosus*) i dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) hidroakumulacije Rama, Bosna i Hercegovina // Proceeding Summary / Bogut, Ivan (ur.). Vukovar : Hrvatska gospodarska komora, 2010. 21-22 (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
5. Viljetić, Barbara; Krajina, Vinko; Đikić, Domagoj; Mojsović, Ana; **Pavić, Valentina**; Vajn, Katarina; Heffer-Lauc, Marija. Raspodjela gangliozida u središnjem živčanom sustavu pastrve (*Salmo gairdneri*) // 10. hrvatski biološki kongres s međunarodnim sudjelovanjem : Zbornik radova. (predavanje,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).
6. **Pavić, Valentina**; Has-Schön, Elizabeta; Kralik, Gordana. Effect of dietary oils on lipid and protein oxidation of broilers tissues // Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology with International Participation, Book of Abstracts / Strelec, Ivica ; Glavaš-Obrovac, Ljubica (ur.). Osijek : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2008. 95-95 (poster,domaća recenzija,sažetak,znanstveni).

7. Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ivan; **Rajković, Valentina**; Horvatić, Janja; Bogut, Stjepan; Čačić, Milan. Heavy metal concentration in fish tissues inhabiting waters of "Buško Blato" reservoir // The 5th International Conference on Reservoir Limnology and Water Quality: "Reservoir - establishing the balance between human use and biotic integrity"-Brno, Czech Republic : Academy of Science of the Czech Republic, Institute of Botany, 2006. 213-216 (poster, sažetak, znanstveni).

## **Diplomski rad**

### **1. Rajković, Valentina.**

Sinteza i određivanje strukture nekih ariliden hidrazida na bazi (4-metil- 2-okso-2H- kromen-7-iloksi) octene kiseline / diplomski rad. Osijek : Filozofski fakultet, 08.07. 2004., 88 str. Voditelj: Čačić, Milan.

**Tablica 1.** Taksonomija vrste *Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758 – obični šaran, preuzeto sa [ITIS, Integrated Taxonomic Information System](#)

<b>Carstvo</b>	<b><i>Animalia</i> – životinje</b>
Koljeno	<i>Chordata</i> – svitkovci
Podkoljeno	<i>Vertebrata</i> – kralježnjaci
Nadrazred	<i>Osteichthyes</i> – koštunjače
Razred	<i>Actinopterygii</i> – zrakoperke
Podrazred	<i>Neopterygii</i> – novoperke
Infrarazred	<i>Teleostei</i> – prave koštunjače
Nadred	<i>Ostariophysi</i>
Red	<i>Cypriniformes</i> – šaranke
Superporodica	<i>Cyprinoidea</i>
Porodica	<i>Cyprinidae</i> – šarani
Rod	<i>Cyprinus</i> Linnaeus, 1758 – obični šarani
<b>Vrsta</b>	<b><i>Cyprinus carpio</i> Linnaeus, 1758 – obični šaran, europski šaran</b>

**Tablica 2.** Taksonomija vrste *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792– dužičasta pastrva, preuzeto sa [ITIS, Integrated Taxonomic Information System](#)

<b>Carstvo</b>	<b><i>Animalia</i> – životinje</b>
Koljeno	<i>Chordata</i> – svitkovci
Podkoljeno	<i>Vertebrata</i> – kralježnjaci
Nadrazred	<i>Osteichthyes</i> – koštunjače
Razred	<i>Actinopterygii</i> – zrakoperke
Podrazred	<i>Neopterygii</i> – novoperke
Infrarazred	<i>Teleostei</i> – prave koštunjače
Nadred	<i>Protacanthopterygii</i>
Red	<i>Salmoniformes</i>
Porodica	<i>Salmonidae</i> - zlatovčice, lososi i pastrve
Podporodica	<i>Salmoninae</i>
Rod	<i>Oncorhynchus</i> Suckley, 1861 – Tihooceanski losos
<b>Vrsta</b>	<b><i>Oncorhynchus mykiss</i> (Walbaum, 1792) – dužičasta pastrva</b>

**Tablica 3.** Odvage uzorkovanih mozгова d. pastrve tijekom eksperimentalnog razdoblja

<b>SIJEČANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>VELJAČA</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	0,20	0,23	1	0,32	0,25
2	0,37	0,24	2	0,22	0,19
3	0,39	0,18	3	0,23	0,18
4	0,27	0,34	4	0,20	0,23
5	0,38	0,40	5	0,17	0,17
6	0,35	0,42	6	0,35	0,20
7	0,34	0,40	7	0,40	0,10
8	0,40	0,41	8	0,38	0,35
9	0,48	0,51	9	0,46	0,42
10	0,40	0,45	10	0,42	0,43
<b>OŽUJAK</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>TRAVANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	0,60	0,40	1	0,40	0,35
2	0,35	0,33	2	0,35	0,37
3	0,40	0,35	3	0,35	0,40
4	0,38	0,28	4	0,33	0,49
5	0,37	0,40	5	0,31	0,38
6	0,34	0,39	6	0,31	0,32
7	0,33	0,29	7	0,29	0,35
8	0,39	0,30	8	0,50	0,36
9	0,41	0,30	9	0,30	0,34
10	0,37	0,28	10	0,43	0,35
<b>SVIBANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>LIPANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	0,33	0,33	1	0,23	0,43
2	0,16	0,25	2	0,25	0,26
3	0,35	0,22	3	0,28	0,26
4	0,25	0,25	4	0,24	0,25
5	0,21	0,36	5	0,22	0,27
6	0,22	0,27	6	0,31	0,26
7	0,24	0,33	7	0,28	0,28
8	0,29	0,21	8	0,28	0,38
9	0,43	0,18	9	0,33	0,20
10	0,22	0,26	10	0,28	0,31

**Tablica 4.** Odvage uzorkovanih mozгова o. šarana tijekom eksperimentalnog razdoblja

<b>SIJEČANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>VELJAČA</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	1,39	1,86	1	1,31	1,15
2	1,32	1,03	2	1,06	1,24
3	1,29	1,56	3	1,46	1,05
4	1,38	1,37	4	1,05	1,28
5	1,41	1,09	5	1,14	1,25
6	1,62	1,25	6	1,13	1,56
7	1,42	1,46	7	1,06	1,19
8	1,27	1,31	8	1,25	0,94
9	1,56	1,14	9	1,48	0,98
10	1,14	1,86	10	1,23	1,04
<b>OŽUJAK</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>TRAVANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	1,55	1,25	1	1,52	1,13
2	1,12	1,30	2	0,92	1,14
3	1,66	1,07	3	0,90	1,09
4	1,33	1,37	4	1,02	1,17
5	1,47	1,15	5	1,31	1,48
6	1,06	1,04	6	0,97	1,43
7	1,44	1,42	7	1,30	1,40
8	1,30	1,17	8	1,11	1,25
9	1,33	1,22	9	1,22	1,45
10	1,40	1,13	10	1,05	1,17
<b>SVIBANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>	<b>LIPANJ</b> r.br.	<b>fiksirani</b>	<b>svježe</b> <b>smrzavani</b>
1	1,27	0,92	1	1,10	1,47
2	1,11	0,96	2	1,15	1,14
3	0,97	1,25	3	1,27	1,20
4	1,05	0,97	4	1,33	1,16
5	1,49	1,29	5	1,39	1,08
6	1,19	1,53	6	0,94	1,23
7	1,11	1,08	7	1,07	1,14
8	1,53	1,19	8	1,04	1,02
9	0,92	1,24	9	1,22	1,17
10	1,11	1,55	10	1,18	0,96



**Tablica 5.** Izmjerene vrijednosti temperature vode (Tv) i zraka (Tz) te koncentracije otopljenog kisika (O<sub>2</sub>) u vodi u 9h tijekom eksperimentalnog razdoblja, **lokacija Turnić, Požega, označeni dani uzorkovanja.**

Siječanj	Tz u 9h / °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Veljača	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Ožujak	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
1	-2	10,8	10,8	1	4	11,5	9,1	1	3,7	10	9,9
2	-4	10,9	10	2	4	11,4	9,2	2	3	11,2	9
3	-2	10,7	10,8	3	0	11	9,3	3	3,5	11,1	9
4	-3	10,5	10,6	4	0	11	9,3	4	3	11,3	9,1
5	1	10,9	10,4	5	0,5	11	9,2	5	4	11	9,5
6	0	10,7	10,4	6	1	11,2	9,1	6	1	11,1	9,4
7	0	11	10,4	7	2	11	9	7	1	11	9,2
8	-1	11,1	10,2	8	2,5	10	9,5	8	5	11	9,6
9	3	11	10,3	9	3	11,2	9	9	4	11	9,8
10	1	11	10,3	10	3	11,1	9,5	10	3	11,2	9,9
11	0	11	10,2	11	3,5	11,3	9	11	0	10	10,5
12	1	11,2	8	12	2	11	9	12	4	11,2	9
13	0	11	9,8	13	2	11,1	9,1	13	5	11,1	9
14	-2	10	9,9	14	3	11	9,5	14	6	11,3	9,1
15	1	11,2	10	15	3	11	9,4	15	6	11	9,5
16	3	11,1	9,8	16	2,5	11	9,2	16	7	11,1	9,4
17	3	11,3	9,4	17	3	11,2	9,6	17	5	10	10,4
<b>18</b>	<b>5,6</b>	<b>11,6</b>	<b>9,1</b>	18	3	11	9,8	18	4	11,2	9,8
19	6	11	9,6	19	4	11,1	9,9	19	2	10	10
20	6	11,5	9,4	<b>20</b>	<b>3,9</b>	<b>11</b>	<b>10</b>	20	5	11,3	10
21	4	11,5	9,1	21	2	11	10	21	4	11	10
22	4	11,4	9	22	2	11	9,9	22	6	11,1	10
23	3	11,6	9	23	1	11,2	9,6	23	7	11	10,2
24	7	11,5	9,6	24	2	11	9,9	24	7,5	11	10,3

Siječanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Veljača	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Ožujak	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
25	4	11,6	8,9	25	4	11,2	10	25	6,3	11	10,4
26	5	11,7	8,8	26	4	11,3	10,6	26	6,5	11,2	9,8
27	5	11,8	8,9	27	3	11,1	10,8	27	5,9	10	10
28	4	11,6	8,7	28	2	11	10,9	28	7	11,3	9,6
29	5	11,4	8,9	29	3	11	11	29	7,3	11	9,4
30	5	11,6	8,7		-	-	-	30	8	11,1	8,9
31	7	11,9	8,9		-	-	-	31	8,5	11,4	8,9
Travanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Svibanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Lipanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
1	7	11,2	9	1	11	11,6	9,1	1	15	10,5	8,4
2	7,8	11,1	9	2	11,5	11,5	9,2	2	16	11,6	8,2
3	7,9	11,3	9,1	3	11,9	11,9	9,4	3	16,5	11,8	8,1
4	7,9	11	9,5	4	12	11,6	10,4	4	16,4	11,5	8,4
5	8	11,1	9,4	5	12	11,5	9,8	5	17	11,6	8,4
6	8	10	10,4	6	11	11,6	9,1	6	17,5	11,6	8,3 *
7	9	11,2	9,8	7	11,5	11,5	9,2	7	15	10,5	7,5
8	3	10	10	8	11,9	11,9	9,4	8	16	11,6	7,2
9	8	11,3	10	9	12	11,6	10,4	9	18	11,8	7,1
10	9	11	10	10	13	11,5	10,2	10	16	11,8	7,1
11	9	11,1	10	11	10	11	10	11	17	11,6	7,4
12	10	11	10,2	12	5	10	10,3	12	17,5	11,6	7,3
13	9	11,2	9,5	13	10	11	10,2	13	15	10,5	7,5
14	7	11	9,6	14	9	11,2	9,1	14	16	11,6	7,2
15	11	11,6	9,1	15	8	11	9	15	18	11,8	7,1
16	11,5	11,5	9,2	16	13	11,5	8,9	16	16	12,1	7,1
17	11,9	11,9	9,4	17	10	11	9,5	17	17,9	12,2	6,9
18	12	11,6	10,4	18	14,5	11,5	8,4	18	17,5	11,6	7,3 **
19	12	11,5	9,8	19	17	12	8,5	19	15	10,5	8,5

Travanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Svibanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Lipanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
20	11	11,2	10	20	11	10	9,1	20	18	11,8	8,1
21	10	11,1	10	21	13	10,3	9	21	16	11,8	8,1
22	12,6	11,6	10	22	11	10,2	9,4	22	17	11,6	8,4
23	13	11,5	10,2	23	11,2	9,1	9,5	23	17,5	11,6	8,8
24	10	11	10	24	13	10	8,4	24	15	10,5	8,8
25	5	10	10,3	25	14	10,5	8,5	25	16	11,6	8,6
26	10	11	10,2	26	15	10,5	8,4	26	18	12,1	8,1
27	9	11,2	9,5	27	16	11,6	8,2	27	12	11	9
28	7	11	9,6	28	16,5	11,8	8,1	28	10	11	10
29	10	11	10,2	29	16,4	11,5	8,4	29	16	11,5	9,4
30	9	11,2	9,8	30	17	11,6	8,4	30	18	11,8	9,1
	-	-	-	31	17,5	11,6	8,3		-	-	-

\*- dovedena mlada riba u vodni sustav

\*\* - uključenje aeratora

**Tablica 6.** Izmjerene vrijednosti temperature vode (Tv) i zraka (Tz) te koncentracije otopljenog kisika (O<sub>2</sub>) u vodi na dubini od 50 cm, u 9h tijekom eksperimentalnog razdoblja, lokacija Grudnjak, Orahovica, **označeni dani uzorkovanja**

Siječanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Veljača	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Ožujak	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
1	-3	6	13	1	10	5	12,5	1	2	6,5	12
2	-3,5	5,8	13	2	10	4,9	12,2	2	2	6,5	12
3	-2	5	12,8	3	6	5	12	3	1	6,3	12,1
4	0	5,1	12,5	4	5	6	11,7	4	2	6,5	12
5	3	5	12,4	5	2	6	12	5	3	6,5	12,2
6	3	5	12,4	6	3	5	12	6	2	6,5	12
7	3	5	12,4	7	4	4,5	12,6	7	-1	6	12,2
8	3	5	12,4	8	6	5	12	8	2	6,5	12
9	3	6,1	12	9	4	5	11,7	9	2	6,5	12
10	3	5	12,1	10	2	6	12	10	2	6,5	12
11	3	6	12	11	3	5	12	11	3	6,5	12
12	-3	4,4	12,6	12	4	4,5	12,6	12	2	6,5	12
13	-1	3,7	13,7	13	3	5	12	13	3	7	11,7
14	-1	3,7	13,6	14	3	5	12	14	4	8	11,5
15	-1	3,6	13,7	15	4	5,2	12	15	4	8,2	11,5
16	2	4,5	13,2	16	3	5	12,1	16	4,5	8	11,3
17	2	4,5	13,2	17	3	5	12,3	17	5	8,5	11,5
<b>18</b>	<b>2</b>	<b>4,5</b>	<b>13,2</b>	18	2	5,1	12	18	4	8	11,3
19	2	4,5	11,6	19	0	3,5	12,5	19	4	8	11,2
20	2	4,3	12	<b>20</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>12</b>	20	4	8	11,5
21	2	4,5	12,1	21	0	5	11,8	21	7	10	11
22	0	4,1	12	22	-1	5	11,9	22	7	10	11,2
23	2	4,5	11,5	23	0	3,5	12,5	23	7	10,5	11,1
24	2	4,5	11,5	24	2	5	12	24	7	10,5	11

Siječanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Veljača	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Ožujak	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
25	0	3	13,5	25	0	3,5	12,5	25	7	10	11
26	2	4,5	12,3	26	2	5	12	26	7	10	11,2
27	0	3	13,5	27	0	5	11,8	27	7,5	10,5	11,1
28	4	3,3	12,7	28	1	6	12	28	8	11,5	11
29	4	3,3	12,5	29	2	6,5	12,4	29	7	10	11
30	6	4	12,5		-	-	-	30	7	10	11,2
31	10	5,5	11,5		-	-	-	31	7	10,5	11,1
Travanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Svibanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Lipanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
1	7,5	10,5	11	1	8	14	11	1	20	21,5	9,8
2	7	10,5	11,2	2	8	16	10,7	2	21	22	9,6
3	8	11,5	11,1	3	7	17	10,5	3	21	20,5	9,7
4	8	12,5	10,9	4	8	16	10,9	4	23	21,5	9,6
5	8	11,5	11,1	5	1	11	12	5	19	20,5	10
6	8	12,5	10,9	6	5	11	11,5	6	19	20,5	10
7	8	12,5	11	7	10	12	11,5	7	21	22	9,8
8	8	12,5	10,9	8	15	14	10,8	8	21	22	9,6
9	9	12,5	11	9	13	16	10,6	9	21	21,5	9,4
10	10	13	11	10	13	16,5	11	10	18	21,5	9,4
11	10	13,5	10,8	11	13	18	11	11	17	20,5	9,5
12	9	12,5	11	12	15	18,5	10,8	12	16	20,5	9,4
13	10	13	11	13	13	16,5	11	13	19	20	9,8
14	10	13,5	10,8	14	13	18	11	14	23	22,5	9,4
15	9	12,5	11	15	15	18,5	10,8	15	24	22	9,2
16	10	13	11	16	13	16,5	11	16	25	22,5	9,2
17	5	12	11,6	17	13	16,5	11	17	27	24,5	9,5
18	4	12	11,8	18	15	18	11	18	22	23,5	9,3
19	8	14	11,3	19	15	18,5	10,8	19	23	23,5	9,2

Travanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Svibanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>	Lipanj	Tz u 9h/ °C	Tv/ °C	O <sub>2</sub> / mg L <sup>-1</sup>
20	8	11,5	11,1	20	17	19	10,5	20	16	20,5	9,8
21	8	12,5	10,9	21	18	20	10,4	21	19	21,5	9,6
22	8	12,5	11	22	20	20,5	10	22	23	22,5	9,3
23	8	12,5	10,9	23	21	20,5	10,2	23	26	23,5	9,1
24	9	12,5	11	24	21	21	9,8	24	22	23,5	9,5
25	8	11,5	11,1	25	23	21	10	25	20	21,5	9,4
26	10	13	10,8	26	25	22	9,6	26	22	22,5	9,6
27	10	13,2	10,8	27	21	21,5	10,2	27	20	23	9,8
28	10	13	10,8	28	23	21,5	10	28	16	20	10,2
29	10	13,2	10,8	29	24	22	9,6	29	19	21	9,6
30	11	13,5	10,7	30	21	22,5	10,2	30	23	22	9,5
	-	-	-	31	23	22,5	10		-	-	-

NAPOMENA: Korišten mjerač za otopljeni kisik i temperaturu, HI 9146, Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA

**Tablica 7.** Sažeti prikazi rezultata imunohistokemijske analize u pojedinim regijama mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*).

+ - slabo, ++ - umjereno, +++ - jako, \* - difuzno bojanje.

GANGLIOZID		GM1			GD1a			GD1b			GT1b			EPITOP A2B5		
REGIJA	slaj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj
TELENCEFALON		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+++	++	++	++*	++*	++*
OPTIČKI TEKTUM		1	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	++	-	-	++*	++*	++*
	2	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
	3	-	-	-	-	-	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+	+	++*
	5	-	-	-	-	-	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
	6	-	-	-	-	-	++	++	++	++	-	++	++	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	++*	++*	++*
KORPUS CEREBELUMA		mol	-	-	-	-	+	++	+++	+++*	+++	+++	++	++*	++*	++*
	ggl	-	-	-	-	-	+	+	+	-	++	+	+	+	+	+
	grl	-	-	-	-	-	++	++	+++	+++	++	++	+	+++*	+++*	+++*
VALVULA		grl	-	-	-	-	++	++	++	+++	+++	+++	++	+++*	+++*	+++*
	ggl	-	-	-	-	-	-	+	++	+++	++	+	+	+++*	+++*	+++*
	mol	-	-	-	-	-	++	+	+++*	+++*	+++	++	++	+	+++*	+++*
KAUDALNI REŽANJ		grl	-	-	-	-	++	+	++	+++	++	++	+	+++*	+++*	+++*
	ggl	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	++	++	++	+++*	+++*	+++*
	mol	-	-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	+++	+++	+++*	+++*	+++*
KRISTA CEREBELUMA			-	-	-	-	++	+++	++	+	+++	+++	++	+++*	+++*	+++*

**Tablica 8.** Sažeti prikazi rezultata imunohistokemijske analize u pojedinim regijama mozga običnog šarana (*Cyprinus carpio*).

+ - slabo, ++ - umjereno, +++ - jako, \* - difuzno bojanje.

GANGLIOZID		GM1			GD1a			GD1b			GT1b			EPITOP A2B5		
REGIJA	slajd	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj	siječanj	travanj	lipanj
TELENCEFALON		-	-	-	++*	++*	+++*	+	+	++*	+++*	++*	++*	++*	++*	++*
OPTIČKI TEKTUM	1	-	-	-	-	-	-	++	++	++	+	-	-	+++	++	++
	2	-	-	-	+	+	+	-	-	-	++*	++*	++*	++	+	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++*	++*	+	+	+
	4	-	-	-	++*	+	+	-	-	-	+	++*	++*	+	+	+
	5	-	-	-	++*	+	+	+	+	+	+	++*	++*	+	+	+
	6	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	7	-	-	-	++*	+++*	+++*	-	-	-	-	-	-	++	++	+
KORPUS CEREBELUMA	mol	-	-	-	+++	++	+	+	-	-	++	++	+	++*	++*	++*
	ggl	-	-	-	++	+	-	++	++	++	++	++	+	++*	++*	+
	grl	-	-	-	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++	+	+++*	++*	+++*
LATERALNA VALVULA	grl	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	++	+++*	++*	++*	+++*	++*	+++*
	ggl	-	-	-	++	++	++	++	+	+	+++*	++*	++*	++*	++*	+
	mol	-	-	-	++	++	+++	++	+	+	+++*	++*	++*	++*	++*	+++*
VAGALNI REŽANJ		-	-	-	+	+	+	+	+	+	+++*	++*	++*	+++*	++*	+++*