Ekspresija PSA-NCAM molekule u optičkom tektumu riba koštunjača u odnosu na ekološku nišu

Zjalić, Milorad

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:047904

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

ODJEL ZA BIOLOGIJU
Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU ODJEL ZA BIOLOGIJU

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Milorad Zjalić

EKSPRESIJA PSA-NCAM MOLEKULE U OPTIČKOM TEKTUMU RIBA KOŠTUNJAČA U ODNOSU NA EKOLOŠKU NIŠU

Diplomski rad

OSIJEK, 2016.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku Odjel za biologiju

Diplomski rad

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

EKSPRESIJA PSA-NCAM MOLEKULE U OPTIČKOM TEKTUMU RIBA KOŠTUNJAČA U ODNOSU NA EKOLOŠKU NIŠU

Milorad Zjalić

Rad je izrađen: Odjel za biologiju i Medicinski fakultet, Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku

Mentor: dr.sc. *Valentina Pavić*, doc.

Neposredni voditelj: *Irena Labak*, dr.sc.

Kratak sažetak diplomskog rada (oko 400 znakova)

PSA-NCAM je postranslacijska modifikacija nastala reverzibilnim vezanjem polisijalinske kiseline na ekstracelularne domene neuronske stanične adhezijske molekule. Pod utjecajem brojnih okolišnih stimulacija mozak riba je sposoban za visok stupanj plastičnosti pri čemu višestruku ulogu ima PSA-NCAM molekula. Stoga cilj ovoga rada bio je usporediti ekspresiju PSA-NCAM molekule u optičkom tektumu sedam različitih vrsta riba koštunjača koje zauzimaju različite ekološke niše.

Broj stranica: 43

Broj slika: 4

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 81

Broj priloga: 1

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: ekološka niša, koštunjače, optički tektum, neurogeneza, migracija neurona, PSA-NCAM

Datum obrane: 31. svibnja. 2016.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. dr.sc. *Elizabeta Has-Schön*, red. prof.
2. dr. sc. *Marija Heffer,* red. prof.
3. dr.sc. *Valentina Pavić*, doc.

Rad je pohranjen u: u knjižnici Odjela za biologiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku i u Nacionalnoj sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu, u elektroničkom obliku, te je objavljen na web stranici Odjela za biologiju

BASIC DOCUMENTATION CARD

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek MS thesis Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural science

Scientific Field: Biology

EXPRESSION OF PSA-NCAM IN OPTIC TECTUM OF TELEOSTEI FISH IN RELATION TO OCCUPIED ECOLOGICAL NICHE

Milorad Zjalić

Thesis performed at: Department of Biology and Faculty of Medicine, J. J. Strossmayer, University of Osijek, Croatia

Supervisor: PhD *Valentina Pavić*, Assistant Professor

Assistant in charge: PhD *Irena Labak*

Short abstract:(about 400 characters)

PSA-NCAM is a posttranslational modification, a result of reversible binding of polysialic acid on the extracellular domain of the neural cell adhesion molecules. The fish brain has high degree capacity of plasticity under the influence of a number of environmental stimulation with multiple roles of PSA-NCAM molecules. The goal of this study was to compare the expression of PSA-NCAM molecules in the optical tectum of seven different teleost species that occupy different ecological niches.

Number of pages: 43

Number of figures: 4

Number of tables: 3

Number of references: 81

Original in: Croatian

Key words: ecological niche, teleostei, optic tectum, neurogenesis, neuronal migration, PSA-NCAM

Date of the thesis defence: 31.may 2016

Reviewers:

1. PhD *Elizabeta Has-Schön,* professor
2. PhD *Marija Heffer,* professor
3. PhD *Valentina Pavić*, Assistant Professor

Thesis deposited in: Library of Department of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek and in National university library in Zagreb in elektronic form. It is also disposable on the web site of Departmetnt of Biology, University of J.J. Strossmayer Osijek.

Posebnu zahvalnost upućujem 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 doc.dr.sc. Valentini Pavić na potpori, ohrabrivanju i vođenju kroz znanstveni rad tijekom istraživanja.
Iskreno se želim zahvaliti asistenticama Katedre za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku Vedrani Ivić prof. i mag.bio. Marti Balog, na potpori, razumjevanju i vođenju kroz praktično i nezamjenjivo iskustvo rada u laboratoriju.
Također želim zahvaliti prof. dr. sc. Elizabeti Has Schön na savjetima tijekom pisanja rada.
Želim se zahvaliti svojim roditeljima na razumjevanju i potpori tijekom studija jer bez njih cilj bi ostao samo san.

SADRŽAJ RADA

1. Uvod 1
1.1. Evolucija i sistematika riba.....1
1.2. Biologija istraživanih vrsta.....3
1.2.1 *Danio rerio* – zebrica.....3
1.2.2 *Cyprinus carpio* – šaran.....3
1.2.3. *Oncorhynchus mykiss* - dužičasta, kalifornijska pastrva.....4
1.2.4. *Esox lucius* – štuka.....5
1.2.5. *Sander lucioperca* – smuđ.....5
1.2.6. *Silurus glanis* – som.....6
1.2.7. *Anguilla anguilla* - jegulja.....7
1.3. Anatomska građa mozga pravih koštunjača.....7
1.4. Migracija i diferencijacija neurona, uloga PSA – NCAM molekula.....9
1.5. Hipoteza.....12
1.6. Ciljevi rada 12
2. Materijali i metode.....13
2.1. Uzorkovanje i etičnost.....13
2.2 Određivanje volumnog i masenog udjela tektuma.....14
2.3 Histološko bojanje optičkih živaca toluidinom.....14
2.4 Imunohistokemijska analiza protutijelima PSA-NCAM, NeuN, SMI 312, i GFAP....14
2.5 Western blot.....16
2.6 Analiza preparata.....17
3. Rezultati.....18
3.1. Volumeni optičkih tektuma i brojnost živčanih vlakana u optičkom živcu.....18
3.2. Imunohistokemijski prikaz optičkog tektuma.....19
3.3. Ekspresija PSA-NCAM u optičkom tektumu.....26
3.4. Western blot i tretman sijalidazom.....27
4.Rasprava.....28
5.Zaključci.....35
6.Literatura.....36
7.Prilozi.....43

1. Uvod

Neuroni su osnovne funkcionalne jedinice živčanog sustava živog svijeta. Neuroni nastaju u ventrikularnoj zoni neuralne cijevi koja se formira iz neuroektoderma. Nakon proliferacije, nezrele stanice – neuroblasti, migriraju na krajnje odredište. Migracija je praćena reverzibilnim dodavanjem polisijalizirane kiseline (PSA) na neuronske adhezijeske molekule (NCAM) što povećava negativni naboj stanice te omogućava kretanje i smještanje (Gascon i sur. 2007, Nieuwenhuys i sur. 1998). Ribe, posebice prave koštunjače (*Teleostea*) imaju brojne regije mozga u kojima se odvija neurogeneza (Seki i sur. 2011). Prilagodbe različitim ekološkim nišama, vidljive su u građi tijela i organa. Optički tektum je mjesto integracije vidnih, njušnih, okusnih i somatosenzoričkih signala (Nieuwenhuys i sur. 1998).

Plastičnost mozga riba pojavljuje se kao odgovor na osjetilne podražaje iz ekološke niše koju nastanjuju (Kihslinger i sur. 2006). NCAM je molekula koja pridonosi plastičnosti mozga te sudjeluje u stvaranju stabilne veze između stanica. Reorganizacija mozga stabilizacijom i destabilizacijom neuronskih veza ovisi o sijaliziranom i nesijaliziranom NCAM-u. Nesijalizirana NCAM predstavlja čvrstu povezanost među stanicama i fiksnost u njihovom prostornom odnosu. PSA lanac koji se dodaje na NCAM reducira stabilnost dopuštajući tako dinamične promjene u međumembranskom kontaktu. Prisutnost PSA-NCAM dovodi do slabljenja i gubitka međumembranskih veza, označujući promjene u međustaničnoj interakciji tako pospješujući plastičnost tektuma.

1.1. Evolucija i sistematika riba

Ribe čine veliku grupu unutar pet koljena kralježnjaka i bitan su čimbenik kako u modernoj ekologiji, tako i u evolucijskoj povijesti. Sistematika klasificira pet redova riba. Ribe predstavljaju evolucijski vrlo uspješnu grupu kralježnjaka, brojne su i dobro prilagođene okolišu u kojemu žive (Freyhof 2009). Mogu se pronaći u gotovo svakom vodenom staništu (Shu i sur. 2003). Ribe su prvi kralježnjaci koji su pronađeni u fosilnim zapisima te su okosnica svim kopnenim kralježnjacima, odnosno tetrapodama (Kardong 2006). Gotovo sve moderne ribe većinom pripadaju dvama razredima koštunjača (*Osteichthyes*) i hrskavičnjača (*Chondrichthyes*), od kojih su prve brojnije. Najstariji fosilni pronalasci koštunjača datiraju iz

perioda kasnog silura (450 mlijuna godina, Paleozoik). U prijelaznom periodu silura i devona (420 milijuna godina, Paleozoik) je najranije potvrđeno razdvajanje na dva podrazreda: nosnoprolaznice (*Sarcopterygii*) i zrakoperke (*Actinopterigii*) (Zhu i sur. 2009). Zrakoperke obuhvaćaju oko 32 000 vrsta, od čega oko 26 000 vrsta pripada nadredu pravih koštunjača (Sallan 2014). Koštunjače sačinjavaju više od 90% ukupnih vrsta riba (Treer i sur. 1995). Evoluirale su sredinom mezozoika i doživjele nagli razvoj, poprimajući oblike čiji su se temelji zadržali do danas (Kardong 2006). Nekoliko čimbenika je utjecalo na nagli razvoj; jedan su prazne ekološke niše pogodne za život i razmnožavanje, drugo je udvostručenje genoma te usmjeravanje prema kompetitivnoj strategiji s mnogo potomaka i velikom raznolikošću nastalom iz toga (Ohno 1970). Udvostručenje genoma dovodi do udvostručenja genetske informacije. Ovo omogućuje pojavu mutacija koje za posljedicu imaju neofunkcionalizaciju što potencira stvaranje novih vrsta prilagođenijh okolišu (Volff 2004). Također, udvostručenje genoma i divergentna evolucija vodi u nesparivost među vrstama i sterilnost hibrida. Mobilni elementi genoma su posebice aktivni u razdoblju mejoze, što dodatno rezultira varijacijama (Volff 2004). Tijekom evolucije, geni su podložni udvostručenju. Ona može pogoditi samo jedan set gena, nekoliko gena, kromosoma ili cijeli genom te posljedično odvesti u poliploidiju. Poliploidija se postiže nerazdvajanjem kromosoma u mejozi, bilo u očevoj ili majčinoj liniji. Poliploidija se također postiže udvostručenjem seta gena tjelesnih stanica odrasle jedinke što nije nasljedna mutacija ili udvostručenjem seta gena embrija što je nasljedna mutacija. (Glasauer i Neuhauss 2014). Udvostručenje genoma rezultira utišanjem jednog seta gena, dok drugi set gena ostaje aktivan. Utišani geni su podložni mutacijama više nego aktivni. Nakupljanjem dovoljno promjena u genima mogu se oformiti novi funkcionalni geni ili dovesti do neodrživosti populacije koja ima dominantan mutiran gen (Otto 2007). Posljednja mogućnost jest neutralna mutacija koja rezultira povećanom genskom raznolikošću unutar pojedine populacije. Analizom genoma, pojedinih gena i njihovih lokusa postalo je jasno da su nagloj evoluciji kralježnjaka prethodile dva udvostručenja gena (Cañestro i sur. 2013). Analizom genoma pravih koštunjača utvrđena je dodatno udvostručenje gena koje je specifično samo za njih (Cañestro i sur. 2013). Ekološki pritisak među vrstama i kompeticija za smještanjem u ekološke niše zahtijevale su inovativnost u prilagodbama organa, izgleda tijela, osjetilnih sustava, u konačnici prilagodbu morfologije mozga. Morfologija mozga je uvelike odgovorna za ponašanje unutar ekološke niše koju zauzimaju (Ito i sur. 2007). Velika

plastičnost mozga ključ je prilagodbi na raznolike ekološke niše jer omogućuju brzu prilagodbu novonastalim uvjetima, učinkovito izbjegavanje predatora i hvatanje plijena.

1.2. Biologija istraživanih vrsta

1.2.1 *Danio rerio* – zebrica

Zebrica (*Danio rerio*) je mali pripadnik porodice šaranki (*Cyprinidae*). Izvorno stanište su poplavne doline rijeka Indijskog podkontinenta. Spori tok vode i plićak mjesta su grupiranja i parenja. Tijelo je lateralno spljošteno a uzgojne jedinke ne prelaze 40 mm. Donja čeljust je dulja od gornje, i ima par brkova. Ima tri do pet longitudinalnih šara po tijelu, sa sličnim uzorkom na analnoj peraji. Mužjaci i ženke su sličnih šara, gdje pak mužjaci dominiraju u veličini analne peraje i količini žutog pigmenta (Spence i sur. 2008). Zebrice su omnivori, hrane se zooplanktonom, insektima, nitastim algama i biljnim materijalom. Akvarijske jedinke rastu nekoliko puta brže od onih u prirodi. Mužjaci su teritorijalni što dovodi do kompeticije za ženke i selekcijskog pritiska. Društvenost je urođeno svojstvo kod zebrica i manifestira se združivanjem u plove, ako odrastaju odvojene od ostalih jedinki, udružit će se u plove s drugim sličnim vrstama poput gupija *Poecilia reticulatia*. Njuh je jedno od glavnih načina raspoznavanja vrste i roda. Mehanizam njušne selekcije nije još uvijek poznat. Zebrice preferiraju mračnije prostore, vjerojatno kao rezultat izbjegavanja predacije. Također, ovaj podatak bi se mogao iskoristiti u dizajniranju kasnijih eksperimenata ponašanja (Serra i sur. 1999). Zebrice su važni modelni organizmi u medicini i razvojnoj genetici zbog male veličine, velike stope razmnožavanja i kartiranog genoma. Sve navedeno omogućuje relativno jednostavnu maipulaciju samim organizmom kao modelom i stvaranjem velikog broja varijacija (Spence i sur. 2008).

1.2.2 *Cyprinus carpio* - šaran

Šaran *Cyprinus carpio* je slatkovodna vrsta rasprostranjena u eutrofnim vodama Europe i Azije. Pripada porodici šaranki (*Cyprinidae*). Prirodna rasprostranjenost pokriva velike površine Euroazije, posebice u sporim rijekama, jezerima, rukavcima i meandrima s

muljevitom podlogom (Dadebo i sur. 2015). Prirodno stanište šarana je ograničeno na relativno malo područje dunavskog sliva. Duž rijeka ga se može naći u srednjem i donjem dijelu toka, na plitkim mjestima rijeke. Tolerira do 5 ‰ soli u vodi i može se pronaći u brakičnim vodama, iako mu to nije preferirano stanište. Osim povećanog saliniteta, tolerira i niske koncentracije kisika u vodi. Sve ovo omogućuje šaranu preživljavanje u različitim uvjetima i staništima (Vandeputte 2003). Može narasti do 1.5 metara dužine i 40 kg mase. Spolno dvoličje je izraženo tek u vrijeme mrijesta, kada mužjaci dobiju orožnjela uzdignuća na glavi, trupu i perajama. Usta imaju pokretne gubice i dva para brkova. Pokriveni su cikloidnim ljuskama po cijelom tijelu s dugom leđnom perajom (Bogut i sur. 2006). Šaran je omnivorna vrsta, s velikom zastupljenošću bentoskih organizama u prehrani, poput vodenih kukaca i njihovih ličinki, kolutićavaca, mekušaca i zooplanktona. Kopanjem po dnu i muljarenjem hrani se prikrivenim životinjama u bentosu. Šaran je društvena riba koja formira manje plove s izuzetkom velikih odraslih matica koje žive solitarno. Aktivan je tokom dana i predvečer (Kottelat i Freyhof 2007).

1.2.3. *Oncorhynchus mykiss* – dužičasta pastrva

Dužičasta pastrva (*Oncorhynchus mykiss*) je slatkovodna vrsta koja pripada porodici lososki (*Salmonidae*). Karakterističan je predstavnik gornjih tokova rijeka i izvora, hladnih oligo i mezotrofnih jezera, koji joj predstavljaju i glavno stanište. Prirodno je rasprostranjena u Sjevernoj Americi, dok je u Europi donešena kao alternativa potočnoj pastrvi (Bogut i sur. 2006). Ovisno o genetičoj podlozi, razvojnom stadiju i starosti jedinke, dužičasta pastrva će boraviti u svim vodenim staništima duž toka rijeke. Preferira kameni supstrat s ponekim podvodnim deblima i vodenom vegetacijom. Može narasti do 1 m i težiti oko 6 kg (Bogut i sur. 2006). Mužjaci imaju zašiljenu glavu, a ženke zaobljenu. Leđna peraja je kratka u odnosu na tijelo (Bogut i sur. 2006). Ima velike zahtjeve za kisikom i teško podnosi porast temperature. Prehrana je raznolika i sastoji se od malih kukaca, ličinki kukaca, pijavica kolutićavaca i rakova, kojih ima ponajviše u obalnoj vegetaciji. Vrlo je oportunistička vrsta. Dužičasta pastrva je društvena vrsta sa utvrđenom hijerarhijom unutar plove (Petrauskiene 1996.). Najaktivnija je danju kada se i u većini slučajeva hrani, vrlo rijetko prevečer i nikada noću (Boujard i Leatherland 1992). Zbog jednostavnosti uzgoja, relativne dostupnosti i tjelesne veličine koristi

se kao modelni organizam za različita toksikološka i fiziološka istaživanja (Bassity i Clark 2012, Petrauskiene 1996.).

1.2.4. *Esox lucius* – štuka

Štuka (*Esox lucius*) je slatkovodna vrsta koja pripada porodici štuka (*Esocidae*). Rasprostanjena je cirkumpolarno u Sjevernoj Americi i Euroaziji (Bogut i sur. 2006). Izduženog je tijela, s izmještenim leđnim i analnim perajama, što joj omogućuje relativno velika ubrzanja (Harvey i sur. 2009). Preferira priobalni pojas do 4 metra dubine, mezotrofnih do eutrofnih vodenih ekosustava. Može se pronaći u sporim dijelovima rijeka, rukavcima i jezerima bogatih vegetacijom. Tolerira i brakičnu vodu u kojoj može obitavati. Određen dio populacije se mrijesti u brakičnim vodama Baltika, a dio migrira uzvodno u rijeke (Larsson i sur. 2015). Imaju 5 osjetilnih jamica na svakoj strani donje čeljusti i nastavak su bočne pruge. Čeljust je oblo oblikovana te može imati i do 700 zuba. Cijelo tijelo je prekriveno cikloidnim ljuskama, specifičnog zelenog obojenja s točkastim šarama. Oči su vrlo pokretne (Harvey i sur. 2009). Navedene osobine i preferencija staništa ukazuju na predatorsku vrstu, koja napada iz tajnosti te je iznimni vizualni predator (Larsson i sur. 2015). Velike jedinke, koje nemaju pravih predatora, otvoreno se kreću u lovu na plove riba. Kada je drugih ribljih vrsta malo, hrane se oportunistički drugim kralježnjacima ili beskralježnjacima. Kanibalističko ponašanje je također prisutno i vrlo izraženo pri nedostatku hrane (Harvey i sur. 2009). Aktivne su danju i predvečer, vrlo rijetko noću (Cook i Bergersen 1988). Kao modelni organizmi koriste se u toksikološkim istraživanjima bioakumulacije antropogenih zagađivala.

1.2.5. *Sander lucioperca* – smuđ

Smuđ (*Sander lucioperca*) je slatkovodna, nemigrirajuća riba, pripada porodici grgečki (*Percidae*). Prosječne je veličine 130 cm i oko 20 kg mase. Vretenastog je tijela i prilagođen je brzim kretanjima i napadima poput štuke. Ima dvije leđne peraje, od kojih prva ima tvrde žbice, a druga ima meke (Lappalainen i sur. 2003). Sivo zelene je boje sa žućkastim trbuhom te bočno ima 8 do 12 okomitih pruga dobro se uklapajući u okoliš. Kao i kod štuke u čeljustima se nalazi veliki broj zuba (Bogut i sur. 2006). Može se pronaći kako u zamućenim,

tako i u čistim vodama. Unutar pogodnog staništa, ovisno o sezoni, koriste različita mikrostaništa koja im omogućuju najbolju predaciju (Argillier i sur. 2012). Brakične vode ne podnosi dobro (Argillier i sur. 2012). Kasnu aktivnost i lov u zamućenoj vodi mu omogućuje sloj retine *tapetum lucidum*. Ima ulogu u pojačavanju intenziteta svjetlosti u mračnim uvjetima, stavljajući ga u prednost nad plijenom (Poulet i sur. 2005, Ranåker i sur. 2014). Krepuskularan je predator, odnosno najaktivniji u sumrak (Poulet i sur. 2005). Smuđ je vrlo agresivna, primarno piscivorna vrsta, koja ne bira hranu, sa izraženim kanibalizmom. Ima suprotnu tehniku lova od štuke, odnosno lovi aktivno (Ranåker i sur. 2014).

1.2.6. *Silurus glanis* – som

Som (*Silurus glanis*) je slatkovodna vrsta u porodici somova (*Siluridae*). Prirodna staništa su dunavski sliv, sliv rijeke Rajne, Volge, Dnjepara. Može narasti do 5 metara i 300 kg tjelesne mase. Nema ljuske, već je koža zadebljala s brojnim žljezdama (Bogut i sur. 2006). Ima dobro razvijenu bočnu prugu. Glava je dorzoventralno spljoštena. Na gornjoj čeljusti je jedan par pokretnih brkova za osjet okusa. Na donjoj čeljusti, koja prelazi gornju, se nalaze dva para brkolikih izraslina (Copp i sur. 2009). Zadržava se u zonama niske brzine kretanja vode. Zbog velike koncentracije hemoglobina zahtjevi za kisikom su relativno mali i dobro podnosi organska onečišćenja voda. Podnosi slabo bočate vode i može ga se naći na ušćima rijeka (Massabuau i Forgue 1995). Osim usne šupljine, som posjeduje okusne stanice na usnama, brkovima, koži glave i tijela te može osjetit slatko, gorko, kiselo i slano. Također, posjeduje njušne vrećice velike površine s receptorima (Malyukina i Martem'yanov 1981). Njuh je glavni način traganja i otkrivanja plijena. Som je, isto tako, elektroceptivna riba (Bretschneider 1974) i posjeduje dobar sluh pod vodom. Svi nevizualni načini traganja za plijenom su rezultat prilagodbe životu u mutnoj vodi. Posljedično je došlo do smanjenja veličine očiju i ograničenja njihove iskoristivosti pod vodom. Glavninu ishrane mu sačinjavaju šaranke, ponekad se mogu pronaći štuke i grgeči u utrobi. Lovi najčešće noću, kada je plijen u nemogućnosti pobjeći (Copp i sur. 2009).

1.2.7. *Anguilla anguilla* - jegulja

Jegulja (*Anguilla anguilla*) je katadromna vrsta koja spada u porodicu jegulja (*Anguillidae*).

Ima zmijoliko tijelo prekriveno sitnim ljuskama. Glava je klinastog oblika, s terminalnim ustima, a trbušne peraje nedostaju. Ima karakterističnu dificerkalnu repnu peraju (Bogut i sur. 2006, Jacoby i Gollock 2014). Ženke su nekoliko puta veće od mužjaka i mogu doseći 150 cm i 6 kg tjelesne mase. Jegulje migriraju u Sargaško more na parenje. Nakon parenja razvijaju se leptocefalne ličinke, koje potom nošene golfskom stujom migriraju prema europskom kopnu. Približavanjem kopnu, ličinke padaju na dno i prestaju s hranjenjem, metamorfoziraju se u oblik staklaste jegulje, koje počinju uzimati hranu i dobivati pigmente. Staklaste jegulje migriraju dalje u kopno kroz riječna ušća. U brakičnim vodama se zadržavaju mužjaci, a dublje u kontinent migriraju ženke. Tu se razvijaju u žuti stadij jegulje i dobivaju na masi. Netom prije migracije doživljavaju posljednji probražaj u srebrnu formu. Prehrana im je raznolika i sastoji se od rakova, mnogočetinaša, kolutićavaca i manjih riba (Deelder 1984, Jacoby i Gollock 2014). Dok su u rijekama, jegulje su primarno noćni lovci, dok se preko dana skrivaju u prioblanoj vegetaciji (Bogut i sur. 2006).

1.3. Anatomska građa mozga pravih koštunjača

Tipične značajke mozga koštunjača su veliki stražnji mozak (rhombencephalon- rhom), veliki neparni mali mozak (*cerebellum* - cbl), izražen parni optički tektum (*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 (*telencefalon* – tel), te relativno velike njušne lukovice (*bulbus olfactorius* – bol). Specifično kod šarana i soma se mogu pronaći još dvije strukture; vagalni režanj (*lobus vagus*) i lični režanj (*lobus facialis*) (Nieuwenhuys i sur. 1998). Prednji mozak je dobro razvijen u odnosu na ostale dijelove mozga kod C*yprinus carpio, Danio rerio, Anguilla anguilla* i *Onchorincus mykiss*. Njušna lukovica prima ulazni signal iz njušnog epitela. Kod pravih koštunjača njušne lukovice mogu biti povezane sa telencefalonom ili se nastavljaju na njušni tračak (*tractus olfactorius*) (Nieuwenhuys i sur. 1998). Za razliku od sisavaca, srednji mozak zrakoperki nije pokriven hemisferama krajnjeg mozga već se lateralno 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, Zupanc 2006). *Stratum marginale* (***sm***) sačinjen od nemijeliniziranih paralelnih vlakana podrijetlom iz *torus longitudinalis*. *Stratum opticum* (***so***), u koji neuroni retine projiciraju aksone koji se dalje prespajaju u *stratum fibrosum et griseum superficiale* (***sfgs***). Središnji sloj tektuma je sačinjen od *stratum griseum centrale* (***sgc***) koji se može podijeliti na vanjski - pleksiformni dio (***sfgc-ip***) i unutarnji s brojnim aksonima dendritima i tijelima neurona. Potom slijedi *stratum album centrale* (***sac***) sa brojnim tektalnim i izlaznim vlaknima, te jezgrama višepolarnih tektalnih stanica. Posljednji sloj je *stratum periventriculare* (***sp***) građen od gusto zbijenih jednopolarnih neurona koji imaju aksone i dendrite u višim slojevima tektuma. Karakteristika sinapsi aksona retine s neuronima u ***so*** i ***sfgs*** je da su glutaminergične ekscitatorne sinapse koje su povezuju s neuronima u *stratum periventriculare* preko dendritnih ogranaka (Kinoshita i sur. 2005). Ove sinapse se potom spajaju na ogranke periventrikularnih interneurona (PVIN) koji sadrže površinske dendrite, aksonsko stablo unutar tektuma i tijelo u SPV. PVIN posreduju vertiklanom protoku depolarizacijskog signala putem dendrita, kao odgovor na male vidne podražaje aktivirajući drugi set periventrikularnih neurona – projekcijskog tipa koji zatim šalju signal u motoričke centre. Ovako se ostvaruje integracija vidnog podražaja i motoričkog odgovora (Nevin i sur 2010.). *Torus longitudinalis* je specifična tvorevima srednjeg mozga, usko je povezana sa optčkim tektumom, karakteristična za zrakoperke, i služi koordinaciji i integraciji pokreta očiju sa pokretima tijela. *Stratum marginale* je u direktnoj vezi sa torus longitudinalisom koji kontrolira očne sakade (ventrolateralni dio) u manjoj mjeri, a u većoj mjeri zamjećuje sjene (dorzomedijalni dio) te njihovu promjenu u okolišu (Farrell 2011). Som i šaran, u odnosu na ostale ispitivane vrste, imaju slabije razvijenu ovu strukturu. Mali mozak (*cerebellum*) je najrostralnija tvorevina stražnjeg mozga. Kod pravih koštunjača građen je iz tri dijela. Kaudalno je vestibulolateralna regija. Središnje je smješteno tijelo malo mozga koji je neparna struktura iza mezencefaličnog tektuma. Rostralno ispod mezencefaličnog tektuma u ventrikul je smještencebelarni zalistak (*valvula cerebelli*). Rostralni dio stražnjeg mozga posjeduje dodatne uočljive režnjeve poput facijalnog, glosofaringealnog i vagalnog. Njihova funkcija je fino razlučivanje signala iz okusnih pupoljaka lica (facijalni režanj), unutrašnjosti usne šupljine (glosofarengijalni režanj) i palatalnog organa (vagalni režanj). Navedene režnjeve imaju samo som i šaran, također se razlikuju po položaju njušnih lukovica koje su isturene naprijed i

povezane sa telencefalonom preko njušnog tračka, ostale istraživane vrste imaju prisjedne njušne lukovice uz telencefalon (Nieuwenhuys i sur. 1998). Jegulja ima od svih promatranih vrsta najveći telencefalon u odnosu na optički tektum, a štuka najmanji. Som ima relativno mali optički tektum u odnosu na ostale strukture, i usporedivši ga s drugim vrstama čiji optički tektumi zauzimaju značajni volumen mozga (Nieuwenhuys i sur. 1998).

1.4. Migracija i diferencijacija neurona, uloga PSA-NCAM molekula

Neuronska adhezijska stanična molekula (NCAM) je membranski vezan glikoprotein koji služi kao receptor i ligand pri stvaranju međustaničnih veza. Otkrivena je i definirana kao glikoprotein prije 40 godina (Gascon i sur. 2007). U međusobne interakcije stupa na dva načina; s NCAM molekulama koje se nalaze na membrani iste stanice (*cis* interakcije) ili s NCAM molekulama na membrani susjedne stanice (*trans* interakcije). Ekspresija je do sada pronađena u neuroepitelnim, glijalnim i mišićnim stanicama. Također je ključna u navođenju rasta aksona u SŽS (Gascon i sur. 2007). Postoje tri glavne izoforme: NCAM-120, NCAM-140, NCAM-180 (broj označava relativnu masu molekule). Strukturno gledano pripada nadporodici imunoglubulina (ima 5 izvanstaničnih Ig domena i dvije fibronektinske, FNIII) te je integrirani membranski protein s jednim polipeptidnim lancem (Gascon i sur. 2007). Različite domene imaju različite uloge, pa su tako Ig domene uključene u međusobno povezivanje (Retzler i sur. 1996, Silver i Rutishauser 1984), a FNIII domene u signalizaciji rasta neurona. NCAM-120 usidren je u staničnu membranu preko glikozilfosfatidilinozitolnog (GPI) membranskog sidra, dok su NCAM-140 i NCAM-180 transmembranski proteini koji imaju citoplazmatske domene različitih dužina. Izvanstanične domene mogu reagirati s drugim proteinima izvanstaničnog matriksa poput fosfana ili neurokana (Cole i Glaser 1986). Glijalni neurotrofni faktor (GDNF) potiče preživljavanje i utječe na proliferaciju, migraciju i diferencijaciju neurona u središnjem i perifernom živčanom sustavu. Signal se potom dalje prenosi vezivanjem glijalnog neurotrofnog faktora na GDNF receptor α (GFRα). Aktivirani GFRα aktivira receptor tirozin kinaze (Ret) što predstavlja glavni put signaliziranja GDNF-a (Paratcha i sur. 2003). Signal će se prenijeti u stanicu neovisno o glavnom putu aktivacije spajanjem GFRα i NCAM-a (Paratcha i sur. 2003).

Od glikozilacijskih modifikacija NCAM-a, jedna od najvažnijih je dodavanje polisijalinske kiseline (PSA) koja je linearni homopolimer α-2,8 povezanih sijalinskih kiselina. PSA može biti

građena od 50 – 100 monomernih jedinica koje sačinjavaju lanac. PSA donosi molekuli negativni naboj koji dodatno povećava vodeni plašt molekule, a ovo onemogućuje *cis* interakcije NCAM-a te onemogućuje ili ometa stanično povezivanje. Oslabljene međustanične veze omogućuju migraciju stanica (Kiss i Rougon 1997). Dodavanje PSA na NCAM je strogo reguliran proces i vrhunac doseže u ranim razvojnim stadijima. Diferencijacijom tkiva i razvojem organizma dolazi do odcjepljivanja PSA i većina NCAM molekula odraslog organizma nije polisijalizirano.

U smislu plastičnosti mozga tri su glavne uloge PSA – NCAM: migracija neurona, stvaranje sinapsi, navođenje aksona. Neurogeneza u odraslom mozgu se relativno nedavno počela intenzivnije proučavati zbog nedostatka uvjerljivih i nepobitnih dokaza (Zupanc 1992, Gage 2002). Brojna istraživanja pokazala su da je sposobnost stvaranja novih neurona u SŽS sisavaca ograničena na dvije regije: prednji dio subventrikularne zone lateralnog ventrikula odakle neuroni odlaze u njušne lukovice i diferenciraju, i u subgranularnoj zoni dentatnog girusa odakle neuroni migriraju u granularni sloj hipokampusa i tamo dozrijevaju. Regije u kojima se odvija migracija i diferencijacija neurona zadržavaju visok stupanje ekspresije PSA-NCAM-a (Grandel i sur. 2006a, Kizil i sur. 2012). Prave koštunjače imaju dobro definirana područja proliferacije neurona tzv. proliferacijske zone. Većina neurona kod *Danio rerio* i *A. leptorhynchus* odrasle dobi nastaje proliferacijom u molekularnom sloju tijela i valvule malog mozga i migrira u granularni sloj gdje se diferenciraju u granularne neurone (Zupanc 2008a). Polovica ostaje aktivna tjekom života ribe, a druga polovica umire apoptozom (Seki i sur. 2011). U optičkom tektumu nove stanice dijele se primarno u kaudalnom polu. Obrazac kaudalnog pola optičkog tektuma je opisan kod zlatnog karasa (*Carassius auratus*), zebrice (*Dannio rerio*), komarče (*Sparus aurata*) i koljuške (*Gasterosteus aculeatus*) (Seki i sur. 2011). Slični raspored odrasle proliferacije matičnih stanica kod ovih taksonomski i evolucijski relativno udaljenih vrsta ukazuje na uniformnost niše namijenjene matičnim stanicama u optičkom tektumu mozga riba, a koja je očuvana neovisno o stupnju korištenja vida kao izvora informacija (Seki i sur. 2011). Nakon proliferacije postmitotičke stanice migriraju vođene radijalnom glijom koja stvara migratorni put u svim podjedinicama malog mozga riba (Zupanc i sur. 2012). Uklanjanjem PSA enzimom Endo-N dolazi do zaustavljanja migracije i prerane diferencijacije neruoblasta te se smanjuje ukupan broj novonastalih neurona. Nedostatak PSA-NCAM ili NCAM-a ne utječe na mitozu, već povećava vjerojatnost preuranjene smrti

neurona (Gascon i sur. 2007). Funkcionalni značaj PSA na NCAM molekulu i cijeli opus signalnih puteva na koje djeluje u neurogenezi nije u potpunosti poznat. Regeneracija je također bitan aspekt održavanja funkcionanosti mozga koštunjača i kod ovih organizama ona ima veliki potencijal. Komparativne spoznaje o migraciji, migratornim putevima i konačnim odredištima koje bi dale uvid u širu evolutivnu sliku su još uvijek oskudne.

1.5. Hipoteza

Kod vrsta kojima je vid primarni izvor signala iz okoliša optički tektum zauzima veći volumni udio mozga, vidni živac ima veću gustoću aksona, a ekspresija molekule PSA-NCAM je manja u slojevima gdje dolazi do kontakta aksona iz retine i neurona optičkog tektuma kao mehanizma stabilizacije retinotopske mape. Vrste koje podjednako koriste vid i ostala osjetila imat će razine ekspresije molekule PSA-NCAM u *stratum opticum* i *stratum fibrosum et griseum superficiale* slične onima u ostalim slojevima tektuma jer nije postojao evolutivni pritisak ili evolutivna prednost zadobivena stabilizacijom retinotopske mape.

1.6. Ciljevi rada

Ciljevi rada

1.Međusobno usporediti istraživane vrste riba s obzirom na stil života, dominaciju vida kao osjetila i ekspresiju molekule PSA-NCAM.

2.Odrediti volumne i masene udjele optičkih tektuma u volumenu/masi cijelog mozga kod sedam riba koštunjača zebrice (*Danio rerio*), pastrve (Oncorhynchus mykiss), štuke (*Esox lucius*), šarana (*Cyprinus carpio*), soma (*Silurus glanis*), smuđa (*Sander lucioperca*) i jegulje (*Anguilla anguilla*)

3.Na presjecima optičkog živca gore navedenih koštunjača odrediti broj aksona u μm^2 površine živca.

4.Imunohistokemijskim markerima neurona (NeuN), glije (GFAP) i vlakana (SMI312) odrediti laminaciju tektuma u navedenih koštunjača, a zatim odrediti ekspresiju molekule PSA-NCAM uz pomoć specifičnog protutijela

2. Materijali i metode

2.1. Uzorkovanje

Vrste riba korištene u radu su šaran (*Cyprinus carpio*), porodica *Cyprinidae*; som (*Silurus glanis*), porodica *Siluridae*; smuđ (*Sander lucioperca*), porodica *Percidae*; dužičasta pastrva (*Onchorincus mykiss*), porodica *Salmonidae*; zebrica (*Danio rerio*), porodica *Ciprinidae*; jegulja (*Anguilla anguilla*), porodica *Anguillidae*; i štuka (*Esox lucius*), porodica *Esocidae*. Zebrice su ustupljene od strane Zavoda za zologiju Prirodoslovno matematičkog fakulteta u Zagrebu, dok su preostale vrste pribavljene iz komercijalnog uzgoja (direktno sa staništa tijekom regularnog izlova) u suradnji sa Poljoprivrednim fakultetom u Osijeku. Životinje su anestezirane klinčićevim uljem, žrtvovane postupkom dekapitacije te je sekcijom izolirano tkivo mozga, uz dozvolu etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Osijeku. Uzorci za određivanje volumena i mase mozga upotrijebljeni su u svježem stanju. Uzorci za analizu proteina metodom Western blot su nakon sekcije direktno smrznuti na -80°C. Uzorci za histološku i imunohistokemijsku analizu su fiksirani u 4% otpini paraformaldehida priređenoj u 0.1 M PBS (PBS engl. *phosphate buffer saline,* fosfatni pufer) i s podešenim pH na fiziološku vrijednost 7.4, u trajanju od 48 sati na +4 °C.

Dehidracija optičkih živaca rađena je prema protokolu za uklapanje tkiva u parafin. Postupkom dehidracije u alkoholnom nizu iz tkiva se izvlači voda i zamjenjuje sa etanolom, te potom sa ksilenom. Uzorci optičkih živaca za histološka bojanja dehidrirani su rastućim gradijentom etanola, uranjanjem i 12-satnom inkubacijom u 50%, 70%, 96% i 100% alkohol. Nakon dehidracije u etoanolu uzorci su prebačeni u ksilen dva sata i potom u parafin zagrijan na 60 °C u trajanju dva sata. Parafin prožima tkivo i hlađenjem otvrdne tvoreći kocku sa uklopljenim tkivom. Uklapanjem u parafin zadržana je struktura optičkog živca i omogućeno je tanko rezanje potrebno za histološko bojanje i prebrojavanje pojedinih aksona.

Uzorci za imunohistokemiju također su dehidrirani, ali prema protokolu za smrzavanje. U tom slučaju se radi krioprotekcija radi izbjegavanja grube kristalizacije citoplazmatske vode, čime bi došlo do oštećenja tkiva u procesu smrzavanja. Sama krioprotekcija rađena je na +4 °C tako da su uzorci stajali prvo u 10 % saharozi u 0,1M PBS kroz 24 sata, a potom u 20 % puferiranoj saharozi 48 sati. Nakon kriopreotekcije uslijedilo je smrzavanje uzoraka kroz

nekoliko sekundi u podhlađenom 2 - metilbutanu na -80° C te su uzorci čuvani na navedenoj temperaturi do daljnje analize.

2.2 Određivanje volumnih i masenih udjela tektuma

Disecirani mozak, odmah po sekciji, izvagan je na preciznoj vagi, a zatim uronjen u graduirani cilindar volumena 2 ml, pri čemu volumen istisnute tekućine predstavlja volumen mozga (Hughes 2005). Zatim je optički tektum kirurški odvojen od ostatka mozga, izvagan i potom zasebno uronjen u graduirani cilindar. Iz dobivenih vrijednosti izračunati su volumni i maseni udjeli.

2.3 Histološko bojanje optičkih živaca toluidinom

Optički živci uklopljeni u parafin narezani su mikrotomom (Leica RM 2125) na 7 mikrometara debljine. Rezovi su prebačeni u posudicu s toplom vodom radi širenja i potom navučeni na stakalca. Nakon isparavanja vode, zagrijani su na 50 °C i zalijepljeni na staklo jer bi u protivnom mogli lako kliznuti prilikom manipulacije u otopinama. Stakla sa rezovima su uronjena u dvije zasebne otopine ksilena u trajanju od 5 minuta, potom uronjena u 100 % etanol u trajanju 3 minute i po jednu minutu u 96 %, 70 % etanolu. Preparati su preliveni toluidinom na 2 minute. Višak boje se ispirao tri puta po jednu minutu u destiliranoj vodi. Obojani preparati su osušeni na zraku i pokriveni HistaMount (*National Diagnostics*) medijem za pokrivanje histoloških preparata.

2.4 Imunohistokemijska analiza protutijelima PSA – NCAM, NeuN, SMI 312 i GFAP

Laminacija tektuma utvrđena je imunohistokemijskim bojanjem na markere neurona, glije i mikrotubula aksona. Imunohistokemijska analiza napravljena je monoklonskim protutijelma; NeuN (Chemicon, Temecula, CA, USA) specifičnim za DNA vezujući neuron specifični protein i SMI312 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, USA) koji je marker svih aksona te prepoznaje fosforilirani epitop na neurofilamentima, GFAP - glijalni nitasti kiseli protein (DAKO, Glostrup, Denmark) prepoznaje radijalnu gliju. Korištenjem protutijela NeuN dobiven

je prikaz položaja diferenciranih neurona. Kod viših kralježnjaka SMI 312 protutijelo obično ne prepoznaje nemijelinizirana vlakna kao što su paralelna vlakna malog mozga i *substantia gelatinosa* u kralježničkoj moždini te će dalje biti spominjan u kontekstu markera mijeliniziranih aksona. Protutijelo GFAP vizualizira intermedijarne filamente koje ispoljavaju astrociti sisavaca i radijalna glija riba i specifični je marker za iste prikazujući njihovu građu i strukturu. NeuN i SMI312 su mišja monoklonska protutijela IgG klase, a GFAP je zečje protutijelo.

Ekspresija molekule PSA-NCAM napravljena je istoimenim protutijelom (Chemicon, Temecula, CA, USA) koje prepoznaje polisijalinsku kiselinu vezanu na NCAM molekulu. Protutijelo PSA-NCAM vizualizira mjesta proliferacije neurona i marker je njihove migracije. Protutijelo je IgM klase i napravljeno je u mišu. Imunohistokemija je rađena na slobodno plutajućim rezovima debljine 35 μm u polistirenskim jažicama napunjenim 0,1M PBS-om. Rezovi su tretirani s 1% otopinom vodikova peroksida (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 (Gipco, Invitrogen Auckland N.Z.) u 0,1M PBS u trajanju od 2 sata na +4 °C i uz neprekidno treskanje. Rezovi su inkubirani zasebno u primarnim protutijelima NeuN, SMI312, GFAP i PSA-NCAM preko noći na +4 °C uz neprekidno treskanje. Primarna protutijela pripremana su u otopini za blokiranje, a korištena su u slijedećim omjerima NeuN 1:2000, SMI312 1:10000, GFAP 1:4000, PSA-NCAM 1:1000. Nakon toga su isprani u pothlađenom 0,1M PBS tri puta po 10 minuta, te je uslijedilo inkubiranje u sekundarnom protutijelu kroz 4 sata na +4 °C uz neprekidno treskanje. Kao sekundarna protutijela korištena su biotinilirani kozji anti-mišji IgG i biotinilirani kozji anti-mišji IgM (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA), biotinilirani kozji anti-zečji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) razrijeđeni 1:500 u blokirajućoj otopini. Nakon sekundarnog protutijela preparati su isprani tri puta po 10 minuta u pothlađenom 0,1M PBS i prebačeni u tercijarni kompleks, Vector Elite kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Budući da se ovaj tercijarni kompleks sastoji od avidina i biotinilirane peroksidaze hrena prije uporabe bilo ga je potrebno prekonjugirati u blokirajućoj otopini u trajanju od pola sata. U tercijarnom kompleksu preparati su inkubirani 2 sata na +4 °C uz neprekidno treskanje. Rezovi su ponovno isprani, a potom su razvijeni supstratom DAB

peroxidase substrate (Vector SK- 4100) koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Razvijanjem dolazi do precipitacije supstrata zbog čega se javlja metaličasto tamno plavo obojenje na mjestima vezanja primarnog protutijela.

2.5 Western blot

Optički tektum šarana (*Cyprinus carpio*) i dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) odvojen je od ostatka mozga. Optički tektum i mozak su zasebno homogenizirani u hladnom puferu za ekstrakciju proteina (T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Fisher, MA, USA) i potom centrifugirani 20 minuta na 15 000×g pri 4 °C. Na poliakrilamidni gel za elektroforezu nanešeno je po 10 µL supernatanta svakog uzorka. Elektroforeza je trajala oko 1,5 sat na 100 V u tzv. „*running buffer*“ (Biorad Hercules, CA, USA). Uzorci su nakon provedene elektroforeze, pomoću električne stuje prebačeni iz gela na PVDF membranu u 1X puferu za prijenos (Blot Transfer Buffer (20X), Thermo Fisher, MA, USA). Prenošenje na membranu je bitan korak jer se onemogućuje daljnje kretanje proteina koji su prethodno razdvojeni u gelu. Membrane su blokirane u blokirajućoj otopini, koja sadrži 5 % bezmasnog mlijeka u prahu, 0.1 % Tween 20 otopljeni u 0.1M PBS-u, u trajanju od 2 sata na sobnoj temperaturi. Dvije membrane su inkubirane s PSA-NCAM protutijelom (Chemicon, Temecula, CA, USA) razrijeđenja 1:1000, od kojih jedna ima uzorak tretiran sijalidazom (44 U/ml) u acetatnom puferu pH= 5.5 u trajanju od 48 sati. Treća membrana je inkubirana s GAPDH protutijelom (Abcam, Cambridge, Uk) 1:1000 preko noći na +4 °C uz stalno treskanje. GAPDH služi kao pozitivna kontrola ispravnosti Western blota jer se protein eksprimira u većini stanica i služi održavanju osnovnog metabolizma stanice. Sljedeći dan membrane su ispirane tri puta po 10 minuta u 0.1M PBS. Membrana inkubirana u GAPDH tada je inkubirana sa sekundarnim kozjim anti – mišjim biotiniliranim protutijelom IgG klase. Membrana s primarnim protutijelom PSA – NCAM inkubirana je sa sekundarnim kozjim anti – mišjim biotiniliranim protutijelom IgM klase (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA) u razrijeđenju 1:500 u trajanju od 4 sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u sekundarnom protutijelu, membrane su ponovno ispirane tri puta po 10 minuta u 0.1M PBS u. Nakon ispiranja uslijedila je inkubacija u tercijarnom kompleksu *Vector Elite kit* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača. Budući da se ovaj tercijarni

kompleks sastoji od avidina i biotinlirane peroksidaze hrena prije uporabe bilo ga je potrebno prekonjugirati u otopini blokinga u trajanju od pola sata. Membrane su ispirane tri puta po 10 minuta u 0.1M PBS-u, a potom su razvijene supstratom *DAB peroxidase substrate* (Vector SK- 4100) koji je pripremljen u skladu s uputama proizvođača.

2.6 Analiza preparata

Imunohistokemijski preparati su fotografirani digitalnom kamerom (Olympus D70, Olympus Corporation, Center Valley, PA; USA) na Zeiss Axioskop 2 MOT mikroskopu (Goettingen, Germany). PSA – NCAM imunoreaktivnost je analizirana kod svake vrste u slojevima optičkog tektuma pomoću *ImageJ* programa (NIH, Bethesda, MD, USA, Image J. Softonic) koristeći skalu u rasponu od 0 (predstavlja najveći intenzitet obojenja) do 255 (predstavlja polje bez obojenja). Zajedno su kvantificirani *stratum album centrale* i *stratum periventriculare* (***sac***+***spv***)*, stratum griseum centrale* unutarnji pleksiformni sloj i *stratum griseum centrale* (***sgc – ip*** + ***sgc***), *stratum opticum* i *stratum fibrosum et griseum superficiale* (***so***+***sfgs***). *Stratum marginale* (***sm***) je analiziran zasebno. Slojevi tektuma su imenovani prema Nieuwenhuys i sur. (1998) nomenklaturi. PSA – NCAM rezovi su anulirani s istim regijama negativne kontrole koja je inkubirana bez primarnog protutijela, čime je eventualno uklonjeno pozadinsko obojenje.

Optički živci su fotografirani na povećanju od 1000× čime su vizualizirana su pojedina vlakna te potom ručno brojana. Dobiveni rezultati su preračunati u broj vlakana optičkog živca po μm^2.

3. REZULTATI

3.1. Volumeni optičkih tektuma i brojnost živčanih vlakana u optičkom živcu

Volumeni optičkih tektuma i njihov udio u ukupnom volumenu mozga razlikuje se između vrsta u ovisnosti o tome koliko pripadnici te vrste koriste vid kao izvor informacija iz okoliša. U istoj ovisnosti mijenja se broj vlakana optičkog živca po površini presjeka.

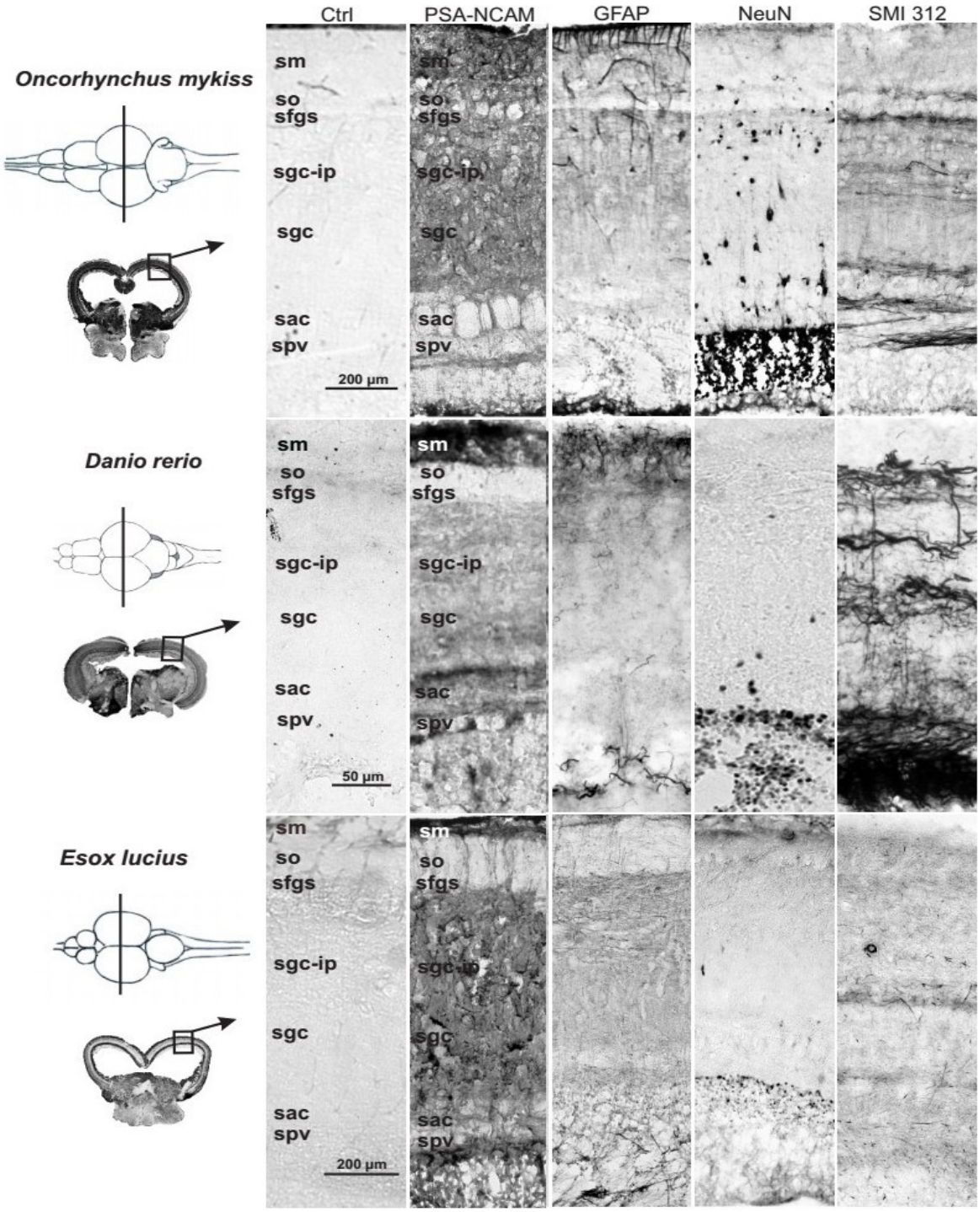
Mjerene vrijednosti	Vrsta	**Zebrica** *Danio rerio*	**Dužičasta pastrva** *Onchorincus mykiss*	**Smuđ** *Sander lucioperca*	**Štuka** *Esox lucius*	**Šaran** *Cyprinus carpio*	**Som** *Silurus glanis*	**Jegulja** *Anguilla anguilla*
Srednji volumen mozga µL		20 ± 0	216.67 ± 28.86	136.6 ± 20.74	450 ± 70.71	966.67 ± 57.73	323.33 ± 49.49	65 ± 5
Srednju volumen optičkog tektuma µL		10 ± 0	100 ± 0	33.33 ± 5.77	175 ± 35.35	200 ± 0	116.6 ± 35.35	21.66 ± 2.88
Volumni omjer optički tektum – mozak		50.00%	46.15%	24.37%	38.80%	20.68%	36.06%	33.32%
Srednja masa mozga (g)		0.0295 ± 0.03	0.213 ± 0.080	0.205 ± 0.026	0.48 ± 0.056	0.933 ± 0.105	0.33 ± 0.056	0.066 ± 0.033
Srednja masa optičkog tektuma (g)		0.0028 ± 0.000	0.0633 ± 0.025	0.042 ± 0.003	0.16 ± 0	0.173 ± 0.025	0.073 ± 0.014	0.017 ± 0.007
Maseni omjer optički tektum – mozak		9.49%	29.71%	20.48%	33.33%	18.54%	22.12%	2.66%
Broj vlakana po µm² optičkog živca		0.00591 ± 0.0004	0.0112 ± 0.0009	0.0187 ± 0.0009	0.0160 ± 0.0011	0.0109 ± 0.0005	0.0833±0.0003	0.0066 ± 0.0003

Tablica 1. Volumeni i mase cijelog mozga i optičkog tektuma

Volumni udio optičkog tektuma izračunat je za sve ribe (Tablica 1). Optički tektumi kod zebrice i dužičaste pastrve zauzimaju polovicu volumena mozga. Volumni udjelii optičkih tektuma preostalih vrsta zauzimaju kako slijedi: štuka 38.8%, som 36.06%, jegulja 33.32% i smuđ 24.37%, dok je kod šarana najmanji od svih odabranih vrsta, samo 20.68%. Može se zamijetiti da broj vlakana po površini vidnog živca nije proporcionalan volumenu tektuma. Smuđ primjerice ima najveći broj vlakana po kvadratnom mikrometru (0.0187), a zebrica najmanje (0.00591).

3.2. Imunohistokemijski prikaz optičkog tektuma

Laminiranost optičkog tektuma određena je uz pomoć tri biljega; GFAP, NeuN i SMI312. GFAP je astrocitni intermedijarni biljeg vlakana. Astrociti su važni u održavanju stabilnih uvjeta u neuronalnom miljeu, također predstavljaju fizičku osnovu migracije novonstalih neurona (Zupanc i sur. 2012). NeuN je specifičan biljeg zrelih i diferenciranih neurona smješten u jezgru stanice te je bez preklapanja kao marker drugih stanica ili struktura (Kim i sur. 2009). SMI 312 specifično boja fosforilirane neurofilamente aksona neurona i prikazuje strukturu stabilnih mijeliniziranih aksona (Lien i sur. 2013). Destabilizaciju retinotektalne mape određena je bojanjem na PSA-NCAM.



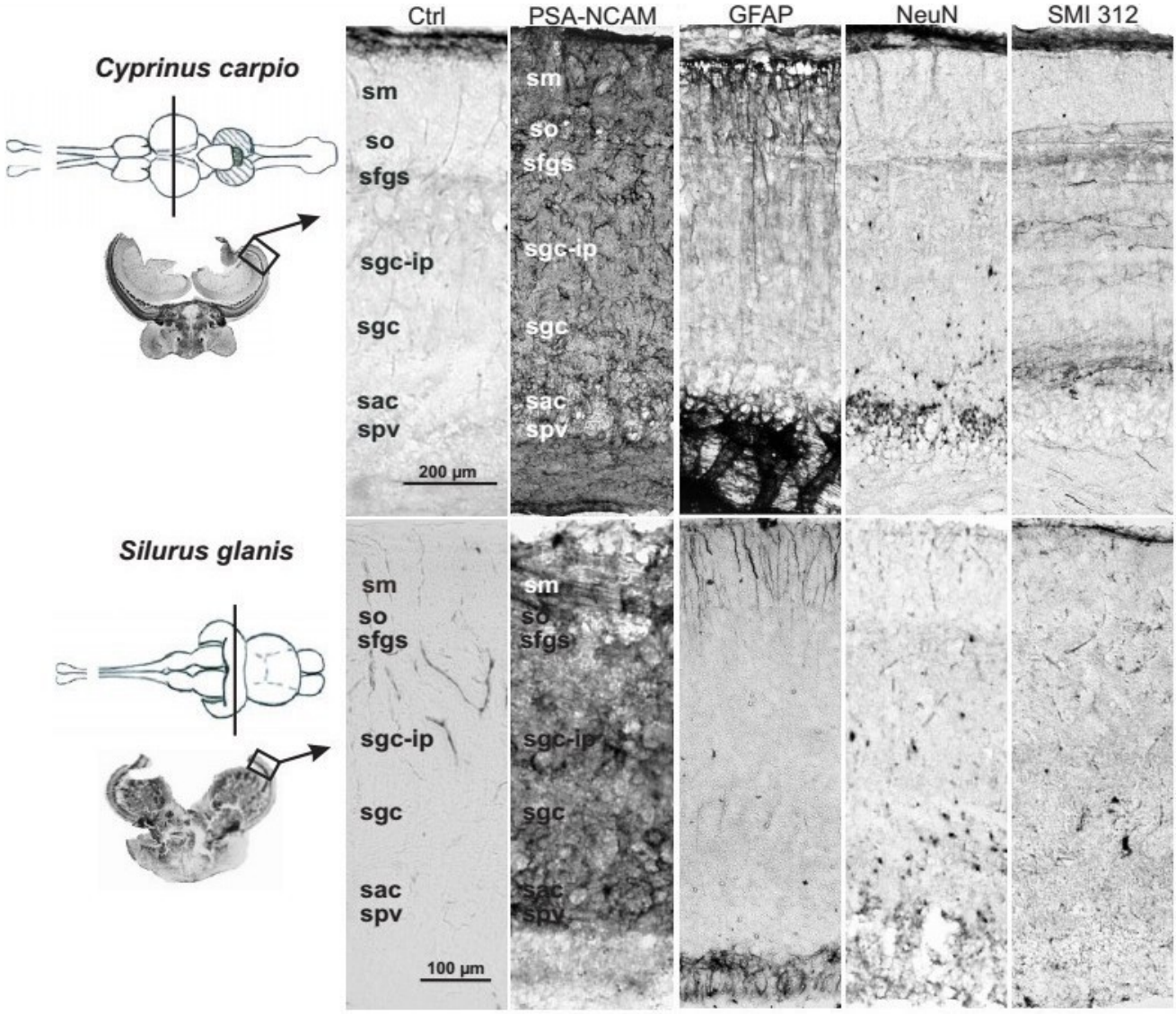
Slika 1. Koronarni rezovi optičkog tektuma obojanog na PSA-NCAM, GFAP, NeuN i SMI312 u dužičaste pastrve(*Onchorincus mykiss*), zebrice (*Danio rerio)* i štuke (*Esox lucius*)

Kratice: *spv = stratum periventriculare; sac = stratum album centrale; sgc = stratum griseum centrale duboki sloj; sgc-ip = stratum griseum centrale unutarnji pleksiformni; sfgs = stratum fibrosum et griseum superficiale; so = stratum opticum; sm = stratum marginale.*

Dužičasta pastrva ima brojne zrele NeuN$^+$ neurone u *stratum periventriculare*, dok su kroz ostale slojeve, osim *stratum marginale,* nasumično i rijetko raspoređeni. Mijelinizirani aksoni kolokoaliziraju s zrelim neuronima i vrlo gusto su smješteni u *stratum perivnetriculare*, te nešto manje brojni u *stratum album centrale,* dok ih u *stratum marginale* nema. Radijalna glija GFAP$^+$ je smještena samo u stratum marginale. PSA-NCAM je lokalizirana u svim slojevima a najmanje u *stratum album centrale* i *stratum periventiculare*. (Slika 1)

Zebrica ima zrele NeuN$^+$ neurone u *stratum periventriculare*, a kroz ostale slojeve osim *stratum marginale* su nasumično i rijetko raspoređeni. Debeli brojni mijelinizirani aksoni su prisutni u svim slojevima osim *stratum marginale.* Zebrica ima glijalne GFAP$^+$ glijalne stanice u *stratum marginale* i *stratum perivnetriculare.* PSA-NCAM je zabilježena u svim slojevima a najmanje u *stratum opticum i stratum album centrale*. (Slika 1)

Štuka ima zrele NeuN$^+$ neurone samo u *stratum periventriculare.* Tanka mijelinizirana vlakna su raspoređena od *stratum perivnetriculare* do *stratum griseum centrale – inner pelxiform.* GFAP$^+$ radijalna glija je zabilježena samo u *stratum perivnetriculare.* PSA-NCAM je zabilježena u svim slojevima a najmanje u *stratum opticum i stratum album centrale*. (Slika 1)

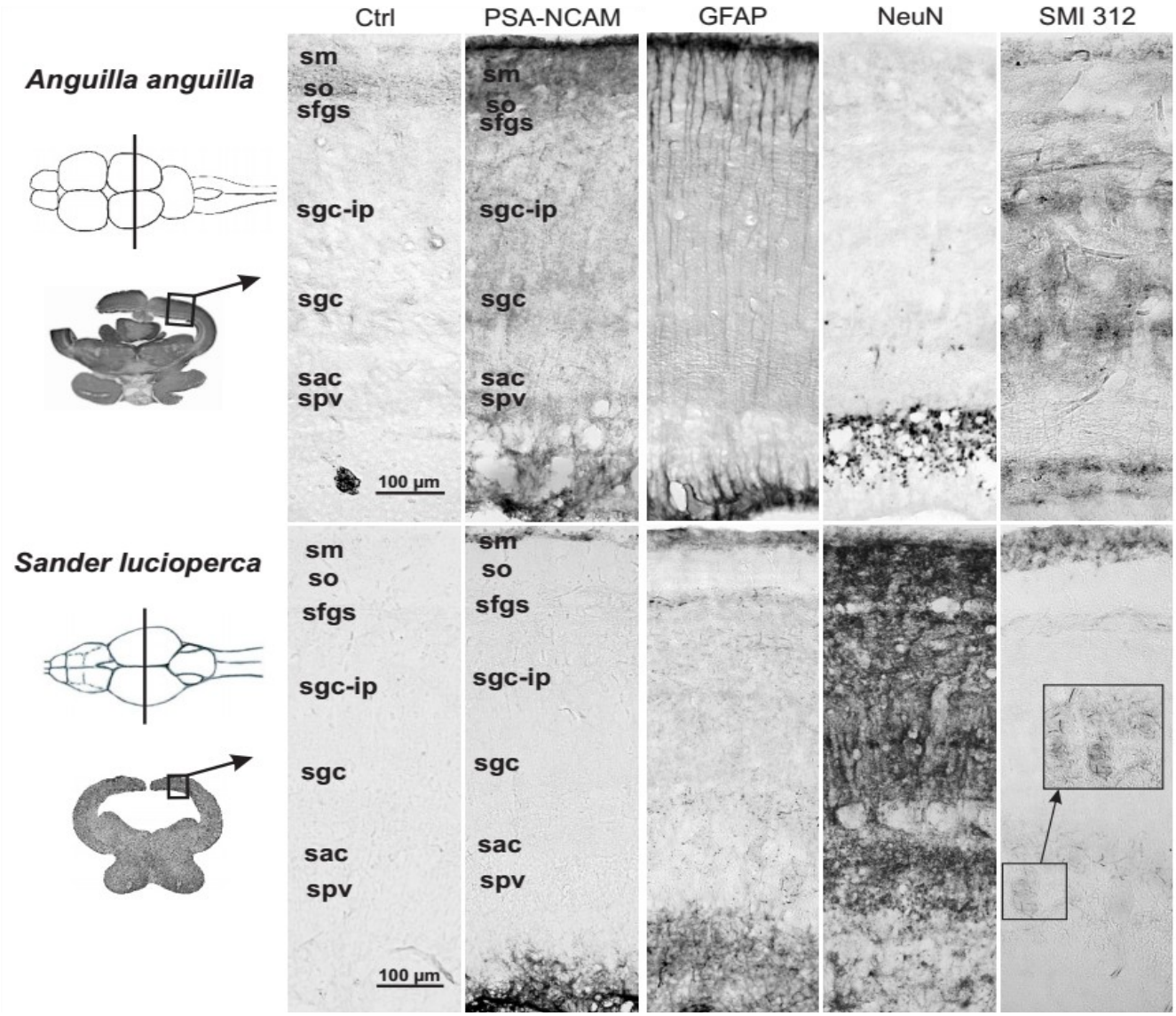


Slika 2. Koronarni rezovi optičkog tektuma obojanog na PSA-NCAM,GFAP, NeuN i SMI312 u šarana (*Cyprinus carpio*) i soma (*Silurus glanis*).

Kratice: *spv = stratum periventriculare; sac = stratum album centrale; sgc = stratum griseum centrale duboki sloj; sgc-ip = stratum griseum centrale unutarnji pleksiformni; sfgs = stratum fibrosum et griseum superficiale; so = stratum opticum; sm = stratum marginale.*

Šaran ima brojne zrele $NeuN^+$ neurone u *stratum periventriculare*, te su mjestimično raspoređeni do *stratum fibrosum et griseum centrale*. U *stratum marginale* nema $NeuN^+$ neurona. Tanki mijelinizirani aksoni su raspoređeni kroz sve slojeve osim u *stratum marginale,* a najviše ih ima u *stratum griseum centrale*. Kroz šaranov cijeli optički tektum $GFAP^+$ glijalne stanice se vertikalno pružaju i međusobno povezuju *stratum marginale* i *stratum periventriculare*. PSA-NCAM je zabilježena u svim slojevima. (Slika 2)

Som nema gusto pakirane $NeuN^+$ neurone u *stratum perivnetriculare* već su raspoređeni kroz cijeli optički tektum osim u *stratum marginale*. Mijelinizirani aksoni nisu zabilježeni. Som ima glijalne stanice prisutne u *stratum marginale* i *stratum periventriculare.* $GFAP^+$ glijalne stanice iz *stratum marginale* radijalno se pružaju prema *stratum opticum,* ali ne prolaze kroz cijeli tektum. PSA-NCAM je zabilježena u svim slojevima a najmanje u *stratum griseum centrale*. (Slika 2)



Slika 3. Koronarni rezovi optičkog tektuma obojanog na PSA-NCAM,GFAP, NeuN i SMI312 jegulje (*Anguilla anguilla*) i smuđa (*Sander lucioperca*).

Kratice: *spv = stratum periventriculare; sac = stratum album centrale; sgc = stratum griseum centrale duboki sloj; sgc-ip = stratum griseum centrale unutarnji pleksiformni; sfgs = stratum fibrosum et griseum superficiale; so = stratum opticum; sm = stratum marginale.*

Jegulja ima brojne zrele NeuN$^+$ neurone u *stratum perivneticulare* koji se ne nalaze u ostalim slojevima optičkog tektuma. Mijelinizirana vlakna nisu zabilježena već su na slici vidljive krvne žile. Brojne GFAP$^+$ glijalne stanice se protežu cijelom duljinom od *stratum marginale* do *stratum periventriculare*. PSA-NCAM je zabilježena u svim slojevima, najviše u *stratum marginale.* (Slika 3)

Smuđ ima brojne i zbijene NeuN$^+$ neurone u *stratum periventriculare,* s izuzetkom u drugim slojevima. Zabilježena su tanka mijelinizirana vlakna samo u *stratum periventiculare,* kao i brojne GFAP$^+$ glijalne stanice. PSA-NCAM je vidljiv u s*tratum marginale. (*Slika 3)

3.3. Ekspresija PSA-NCAM u optičkom tektumu

Pozitivna reakcija na PSA-NCAM je obojala membrane neurona koji proliferiraju i migriraju prikazujući tako regije destabilizacije retinotektalne mape (Gascon i sur. 2007). Niske razine ekspresije PSA-NCAM protumačili smo u smislu čvrstu povezanosti među stanicama i fiksiranu retinotektalnu mapu. Prednost fiksirane mape je brza obrada informacija koje dolaze iz retine i brzi odgovor na podražaje iz okoline. Ekspresija PSA-NCAM je mjerena u svim slojevima optičkog tektuma.

Sloj u kojemu su mjerene vrijednosti PSA-NCAM	Vrsta	**Zebrica** *Danio rerio*	**Dužičasta pastrva** *Onchorincus mykiss*	**Smuđ** *Sander lucioperca*	**Štuka** *Esox lucius*	**Šaran** *Cyprinus carpio*	**Som** *Silurus glanis*	**Jegulja** *Anguilla anguilla*
Sm		+++	++	++	+++	+++	++	++
So + Sfgs		+	++	+	+	+++	++	+
Sgc – ip + Sgc		++	++	+	++	++	++	+
Sac + Spv		+	+	+	++	++	++	+

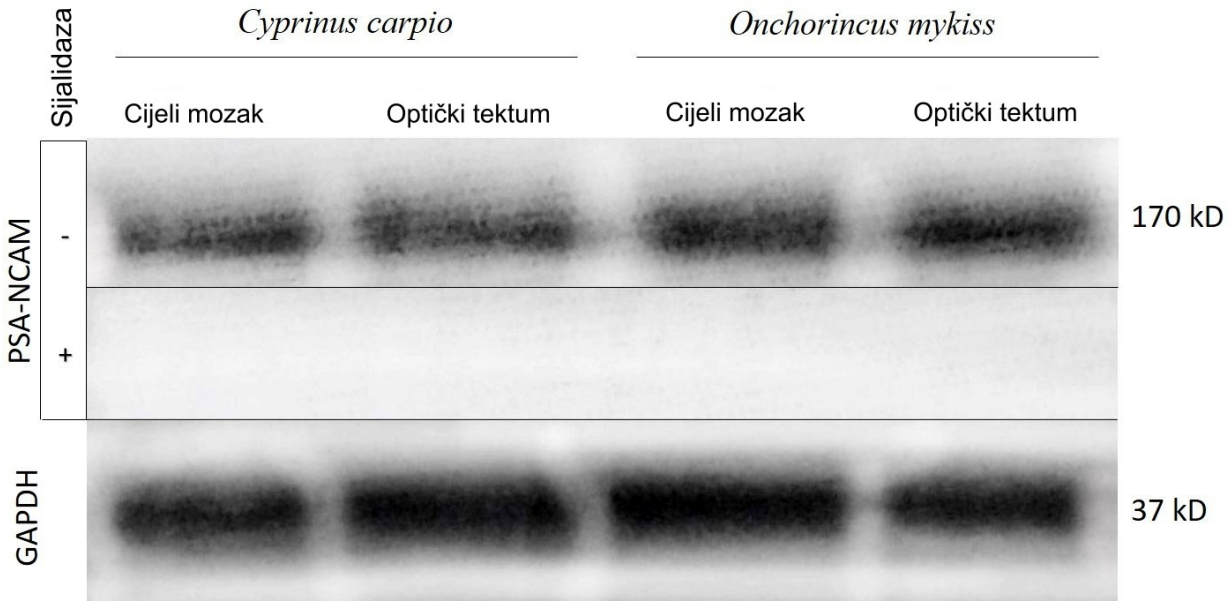
Tablica 2. Relativne vrijednosti ekspresije PSA-NCAM-a kroz slojeve optičkog tektuma
Kratice: spv = *stratum periventriculare*; sac = *stratum album centrale*; sgc = *stratum griseum centrale* sgc-ip = *stratum griseum centrale duboki sloj* ; sfgs = *stratum fibrosum et griseum superficiale*; so = *stratum opticum*; sm = *stratum marginale;* 0 predstavlja najveći intenzitet obojenja a 255 najmanji; 0-60 = ++++; 61-120 = +++; 121-180 = ++; 181-255 = + ; *ImageJ* programa (NIH, Bethesda, MD, USA, Image J. Softonic)

Zebrica ima veliku ekspresiju (+++) PSA-NCAM u ***sm,*** a slabu (+) u ***so*** i ***sfgs*** gdje ulaze projekcijski aksoni retine u tektum, i ***sac*** i ***spv*** slojevima u kojima je smještena glavnina tijela neurona. Dužičasta pastrva ima podjednaku ekspresiju PSA-NCAM kroz cijeli optički tektum (++) osim u ***sac*** i ***spv*** slojevima u kojima je izmjerena manja vrijednost ekspresije u usporedbi sa ostalim slojevima (+). Smuđ samo u ***sm*** ima umjerenu ekspresiju PSA-NCAM-a, ostali slojevi slabu ekspresiju (+). ***Sm*** je sloj prostorne memorije kod riba i u uskoj je povezanosti sa ***sgc i sfgc*** (Farrell 2011). Oba sloja (***sgc i sfgc***) integriraju signale retine i tvore zatvoreni krug preko ***sm*** s torus longitudinalisom. Štuka poput zebrice ima veliku ekspresiju (+++) PSA-NCAM-a u ***sm***, ***so*** i ***sfgs*** ima slabu ekspresiju (+). Šaran, poput štuke, ima visoku ekspresiju PSA-NCAM-a u ***sm.*** Suprotno od štuke, šaran ima visoku ekspresiju također u ***so*** i ***sfgs.*** U

preostalim slojevima optičkog tektuma šaran ima umjerenu ekspresiju (++). Som nema razlike između pojedinih slojeva i kroz cijeli optički tektum ekspresija je umjerena (++). Jegulja je slična smuđu i samo u ***sm*** ima umjerenu ekspresiju PSA-NCAM-a (++) dok u preostalim slojevima je slaba (+).

3.4. Western blot i tretman sijalidazom

Analiza ekspresije epitopa PSA-NCAM *western blot* tehnikom iz homogenata mozga i optičkog tektuma šarana i pastrve pokazala je isti intenzitet obojenja u obje ribe. Radi potvrde ekspresije PSA-NCAM molekule, uzorci su tretirani sijalidazom koja cijepa sijalinske kiseline sa PSA-NCAM.



Slika 4. Western blot na PSA-NCAM optičkog tektuma i cijelog mozga, šarana (*Cyprinus carpio*) i dužičaste pastrve (*Onchorincus mykiss*). Jedan blot je inkubiran sa sijalidazom (+) drugi bez sijalidaze (-); GAPDH je pozitivna kontrola ispravnosti western blot tehnike.

Nakon tretmana sijalidazom nije bilo vidljivog pozitivnog obojenja što potvrđuje specifičnost protutijela u prepoznavanju isključivo polisijaliziranog oblika NCAM (Slika 4).

4. RASPRAVA

Veličina tektuma određuje stupanj integracije vidnih signala sa somatosenzoričkim signalima drugih osjetila. Veći tektum omogućuje bolju integraciju ulaznih signala, te koordinaciju pokreta u stalno promjenjivom okolišu. Omjer veličina optičkog tektuma pastrve i zebrice je sličan, odnosno tektum zauzima oko polovice ukupnog volumena mozga (Tablica 1). Iz ovog zaključujemo da je tektum glavno integrativno središte somatosenzoričkih signala za ove dvije ribe. Pastrva i šaran žive u dijametralno suprotnim staništima. Stanište pastrve su izvorišta rijeka najčešće šljunkovite podloge ili kamenjari koji su siromašni okolišnim podražajima. Naprotiv, šaran živi u vrlo bogatom okolišu. Zanimljivo je da šaran ima najmanji omjer volumena optičkog tektuma i mozga od svih vrsta pa se iz toga može pretpostaviti da tektum nije njegovo glavno integrativno središte somatosenzoričkih signala. S obzirom da koristi i brkove prilikom traženja hrane te da lovi u mulju, njegova integrativna središta su vjerojatno veliki *lobus facialis* i *vagus*. S druge strane, prema brojnosti vlakana optičkog živca šaran je vrlo sličan pastrvi, a njegovo oko je veliko i vrlo sofisticirano. Iz toga se može zaključiti da je vid u ove vrste izuzetno bitan te da su informacije koje dolaze iz oka brojne i precizne. Zanimljiv je odnos omjera veličina optičkih tektuma i mozga kod soma i štuke. Som se vrlo slabo služi vidom u navigaciji okolinom, a ima sličan omjer volumena optičkog tektuma poput štuke te samo polovicu broja vlakana po milimetru kvadratnom optičkog živca štuke (Tablica 1). Iz ovoga se može zaključiti da informacije koje dolaze iz oka soma nisu brojne, ali su izvrsno integrirane s drugim somatosenzoričkim signalima koji se po svemu sudeći svi integriraju baš u optičkom tektumu. Nije isključeno niti da je som vrsta koja se u nekoj evolutivnoj povijesti značajno više koristila vidom te da je od tog vremena optički tektum ostao glavno integrativno središte. Od soma, s trećinom manjim optičkim tektumom i dva i pol puta većim brojem vlakana optičkog živca odskače smuđ. Smuđ je iznimno vizualna vrsta, s posebnim prilagodbama oka za gledanje u nepovoljnim uvjetima, a obje vrste su aktivne u isto vrijeme. Pretpostavljamo da je u evolutivnoj povijesti ova vrsta prošla period manjeg oslanjanja na vid te da se uslijed toga integracija somatosenzoričkih signala vjerojatno zadržala u *stratum album centrale* i *stratum griseum centrale.* Jegulja je aktivna u periodu kada je oštar vid onemogućen odnosno predvečer i po noći te ne posjeduje posebne prilagodbe oka te vjerojatno razlikuje samo svjetlo i sjene. Broj vlakana optičkog živca jegulje

ne prati veličinu optičkog tektuma. Optički tektum jegulje zauzima trećinu volumena mozga dok je broj vlakana optičkog živca relativno mali te ona, baš kao i som, usprkos malom broju informacija koje dolaze iz oka vjerojatno integrira somatosenzoričke signale u optičkom tektumu (Tablica 1).

Neuroni u proliferaciji i tjekom migracije ne ispoljavaju NeuN. Zreli diferencirani neuroni koji su ostvarili sinapse sa susjednim stanicama i tako se integrirali u neuronsku mrežu ga ispoljavaju. Stoga NeuN se koristi kao marker zrelih diferenciranih neurona. Jezgre zrelih NeuN pozitivnih neurona su smještene kod svih riba većinom u *stratum periventriculare* i većina stanica u tom sloju pripada XIV. tipu neurona odnosno interneuronima (Nieuwenhuys i sur. 1998). Ovo su vjerojatno glavni integrativni neuroni u većine riba. Pastrva i šaran imaju NeuN pozitivne neurone i u drugim slojevima tektuma koji su uglavnom interneuroni ili projekcijski eferentni neuroni (Nieuwenhuys i sur. 1998). Radi ovoga pretpostavljamo da ove dvije ribe mogu napraviti puno kompleksniju integraciju raznih signala na razini tektuma. Ostale vrste iznad *stratum periventriculare* imaju nekolicinu stanica slabog obojenja i vjerojatno značajno zaostaju u sposobnosti integracije signala na razini tektuma. Sličnost u distribuciji stanica kroz optički tektum između pastrve i šarana može također biti povezana sa sličnom brojnošću vlakana optičkog živca. Iako žive u različitim staništima razina vidnih podražaja bi mogla biti sličnog intenziteta, posebice jer šaran živi u zoni sa drugim piscivornim ribljim vrstama poput štuke. Pastrvi je potrebna integracija vidnih signala zbog brže rekacije na pojavu plijena koji je rijedak pa je to vjerojatno bio selektivni pritisak za razvoj vida kod ove vrste.

Radijalna glija je nužna za razvoj, ali i za regeneraciju mozga kod odraslih riba (Kroehne i sur. 2011). Radijalna glija pruža osnovu po kojoj će stanice migrirati radijalno kroz optički tektum te je stoga nužna za popunjavanje slojeva optičkog tektuma iznad *stratum periventriculare* (Seki i sur. 2011). Sve proučavane vrste riba su pokazale postojanje glijalnih stanica. Radijalnu gliju razapetu od donjih do gornjih slojeva tektuma, tipičnu za migratorne faze razvoja mozga, imaju šaran i jegulja te zato mogu napraviti funkcionalno nadomještanje svih vrsta neurona tijekom odrasle dobi. Pastrva i som imaju također dobro razvijenu radijalnu gliju, ali ne u tolikoj mjeri kao šaran i jegulja. Štuka, zebrica i smuđ nemaju radijalno raspoređenu gliju kroz cijeli tektum već se ona može pronaći u *stratum periventiculre.* Na ovom mjestu je radijalna glija također potrebna zbog migracije neurona, no radi se o vrlo

ograničenoj migraciji. Šaran uz radijalnu gliju ima i brojna slabo mijelinizirana vlakna kroz optički tektum pa se može pretpostaviti da bi ona mogla poslužiti za tangencijalnu migraciju interneurona čija funkcija je integracija ulaznih signala. Može se opaziti sličan obrazac između struktura tektuma pastrve i šarana gdje obje vrste imaju raspoređene $NeuN^+$ stanice kroz cijeli tektum i radijalno usmjerenu gliju u *stratumu marginale*. Jegulja ima najizraženiju radijalnu gliju koja se, za razliku od svih ostalih promatranih riba, proteže cijelim tektumom. Ona ima i vlakna koja bi poslužila za tangencijalnu migraciju, a većina neurona tektuma je relativno nediferencirana. Netom prije i tijekom migracije u Sargaško more veličina očiju jegulje se mijenja, odnosno oči rastu (Pankhurst i Lythgoe 1983). Povećanje očiju mijenja raspored retinotektalne mape (Nieuwenhuys i sur. 1998). Ne postoje istraživanja radijalne glije tijekom života jegulje, no mogućnost stalnog postojanja radijalne glije u u žutom stadiju mogao bi biti preduvjet za dovoljno brzu prilagodbu retinotektalne mape u periodima migracije i metamorfoze.

Marker SMI312 prikazuje mijelinizirane aksone. Prisustvo debelih mijeliniziranih vlakana pozitivnih na SMI312 vjerojatno je znak stabilizacije vidne mape u optičkom tektumu i protumačili smo ga kao znak intenzivnijeg korištenja vida prilikom hranjenja i snalaženja u okolišu. U tektumu slojevi *stratum album centrale, stratum griseum centrale i stratum opticum* građeni su od vlakana. *Stratum opticum* sadrži ulazna vlakna koja dolaze iz retine, a *stratum album centrale* i *stratum griseum centrale* ulazna sometosenzorička vlakna iz telencefalona i strukture *torus semicircularis*. Izlazna vlakna se nalaze u istim slojevima kao i ulazna vlakna. Kod istraživanih vrsta pozitivno bojenje na SMI312 pronašli smo kod svih vrsta osim kod soma i jegulje. Debela mijelinizirana vlakna u slojevima ulaska retinalnih aksona ukazuju da je vid primarno osjetilo zebrice i pastrve. Brojna tanka i mijelinizirana vlakna štuke i smuđa omogućuju složeniju integraciju vidnih signala, što je posebice važno za ove ribojedne vrste (Bogut i sur. 2006). Štuka i smuđ slično šaranu imaju brojna tanka mijelinizirana vlakana u optičkom tektumu i pretežno se oslanjaju na vid. Šaran, poput soma, ima i brkove koje koristi u lovu, no za razliku od soma aktivan je cijeli dan te aktivno traga po bentosu za plijenom (Bogut i sur. 2006). Može se reći da šaran kombinira vid sa ostalim osjetilima, ali sudeći prema debljini vlakana optičkog tektuma stabilna vidna mapa nije toliko izražena kao kod zebrice ili pastrve. Nedostatak mijeliniziranih vlakana kod soma i jegulje bi ukazivalo na to da se vrlo slabo koriste vidom, odnosno drugi izvori informacija iz okoliša su dominantni kod njih.

U prilog tome još govori i mala brojnost vlakana u optičkom živcu.

Prethodna istraživanja pokazuju povezanost ekspresije PSA – NCAM i reorganizacije retinotektalnih aksona (Williams i sur.,1996). Za održavanje funkcinalnosti i stabilnosti ovako složene mreže potrebne su NCAM molekule bez PSA na aksonima i dendritima, jer NCAM stabilizira međumembranske veze (Gascon i sur. 2007). S druge strane, stalna prilagodba mozga, posebice optičkog tektuma koji je mjesto integracije somatosenzoričkih informacija (Butler i Hodos 2005, Seki i sur. 2011), s ciljem što boljeg odgovora životinje na podražaje iz okoliša, može biti povezana sa ekspresijom PSA – NCAM u pojedinim slojevima optičkog tektuma. Dodavanje PSA na NCAM molekulu je također potrebno za održavanje plastičnosti dendritičkih trnova, odnosno stvaranje i zadržavanje prostorne memorije koja olakšava reagiranje životinja na podražaje iz okoline (Guirado i sur. 2014, Mahmmoud i sur. 2015). Primjećena je smanjena ekspresija PSA-NCAM u slojevima vlakana *stratum opticum* i *stratum fibrosum et griseum superficiale* optičkih tektuma riba koje se navode vidom tj. pastrve, zebrice, štuke i smuđa. Šaran ima najveću ekspresiju PSA-NCAM od svih promatranih riba i sličnu raspodjelu PSA-NCAM-a kroz optički tektum kao som. Jegulja ima sličnu ekspresiju PSA-NCAM kao i smuđ koji je predatorska vrsta navođena vidom. Zebrica uzgojena u akvariju, spada u porodicu šaranki i ima brkove na donjoj čeljusti (Bogut i sur. 2006), ali pokazuje sličan obrazac u ekspresiji PSA - NCAM kao štuka i pastrva koje nemaju brkove.

Ribe koje žive u bogatijem okolišu imaju veću plastičnost mozga. Primjerice mlade jedinke lososa koje su živjele dva mjeseca u obogaćenom okolišu odnosno sa dovoljno mjesta za skrivanje i istraživanje, imaju povećanu plastičnost telencefalona i neurogenezu (Salvanes i sur. 2013), slično je opaženo i kod zebrice (Lindsey i Tropepe 2014). Također ribe koje žive u bogatom okolišu imaju *stratum marginale* mnogo veći nego ribe u siromašnom okolišu (Farrell 2011). Drugi razlozi ispoljavanja PSA-NCAM-a su migracija neurona koja ne zauzima veliki udio tektuma jer većina postmitotičkih neurona migrira samo kroz *stratum periventriculare* (Zupanc 2008b, Zupanc i sur. 2005) te održavanjem prostorne memorije. Stabilizacija veza odnosno mala ekspresija PSA-NCAM na relaciji *torus longitudinalis – striatum marginalis* mogla bi biti rezultat aktivnosti po mraku. U uvjetima mraka životinja zamjećuje promjene u sjenama koje su jedan ako ne i jedini izvora informacija po kojemu se usmjeravaju (Luchiari i sur. 2006). Ovo posebice vrijedi za ribe koje se koriste isključivo vidom, a aktivne su

predvečer. Značenje nedostatka PSA-NCAM u *stratum marginale* moguće je objasniti lovom po noći. Noćni lov simulira izrazito siromašan okoliš i ne stvara pritisak na optički tektum, odnosno ne prisiljava ga na promjene što čini *stratum marginale* tankim i slabo eksprimira PSA-NCAM. Ekspresija PSA-NCAM u *stratum marginale* mala je kod jegulje i soma posebice kod smuđa. Suprotno, ekspresija PSA-NCAM je velika kod pastrve, štuke, šarana i zebrice. Drugi razlog za ekspresiju PSA-NCAM je omogućavanje migracije radijalnom glijom. Pastrva, zebrica i šaran su vrste koje imaju radijalno usmjerenu gliju i ekspresija PSA-NCAM-a je veća u *stratum opticumu* i *stratum fibrosum et griseum superficiale* odnosno u slojevima ulaska aferentih vlakana retine. Suprotno se uočava kod vrsta bez radijalno usmjerene glije koje u navedenim slojevima imaju malu ekspresiju PSA-NCAM-a. Jegulja je posebice zanimljiva jer ima radijalnu gliju kroz cijeli tektum, ali malu ekspsresiju PSA-NCAM molekule u svim slojevima optičkog tektuma osim u marginalnom sloju. Ovakav pronalazak je suprotan dosadašnjim razumjevanjima neurogeneze odnosno prisutnost radijalne glije bi trebala korelirati sa ekspresijom PSA-NCAM-a (Zupanc 2006). Zato je naša pretpostavka da ekspresija PSA-NCAM ustvari nije povezana sa radijalnom migracijom neurona već sa održavanjem plastičnosti i dendritogenezom.

Šaran poput štuke i smuđa ima tanke mijelinizirane aksone, istovremeno i veliku razinu ekspresije PSA-NCAM u optičkom tektumu što bi moglo ukazivati na korištenje dodatnih osjetila u traganju za hranom, a ne dominantno vida, posebice prilikom kopanja po bentosu gdje vid nije od velike pomoći. Slojevi u kojima se pojavljuje SMI312 su ujedino i mjesta na kojima je potrebno utišati ekspresiju PSA-NCAM-a jer ova molekula smanjuje i usporava mijelinizaciju aksona (Charles i sur. 2000). Sudeći prema smanjenoj ekspresiji PSA-NCAM u slojevima mijeliniziranih vlakana kod zebrice, pastrve, smuđa, štuke i jegulje navedene vrste imaju stabilnije veze među neuronima od šarana i soma, te bolju integraciju vidnih signala. Som je evoluirao i prilagodio se okolišu na sasvim drugi način od primjerice štuke, pastrve ili zebrice, koristeći pasivno elektrocepciju i osjetila okusa i njuha za lov (Bretschneider 1974). Som nema mijeliniziranih aksona u tektumu i ima podjednako raspoređenu ekspresiju PSA-NCAM-a kroz optički tektum što govori u prilog da ne koristi vid u aktivnom traganju za plijenom. Ovo potvrđuje i zapažanje da se obrazac traganja za hranom kod soma ne promijeni kada mu se onemogući vid (Pohlmann i sur. 2001). Održavanje nemijeliniziranosti aksona u mozgu miša zahtjeva ekspresiju PSA-NCAM-a (Charles i sur. 2000) i može se reći

da je ekspresija PSA-NCAM karakteristična za *stratum marginale* jer se ovdje nalazi glavnina nemijeliniziranih vlakana. Zebrica i pastrva su uzgajane u okolišno siromašnom okruženju, no ekspresija PSA-NCAM u *stratum marginale* je veća nego u istom sloju kod smuđa koji lovi predvečer i noću. U našoj studiji nismo imali protutijelo koje prepoznaje samo NCAM bez PSA modifikacije, iz tog razloga smo napravili kontrolu specifičnosti našeg protutijela. Ovo je posebno bitno kod molekula kod kojih postranslacijska modifikacija mijenja funkciju molekule. Pomoću western blot metode smo pokazali specifičnost protutijela na isključivo NCAM molekulu koja ima na sebi vezanu polisijalinsku kiselinu.

Originalnost naše studije je što se prvi puta promatra stvaranje novih neurona i reorganizacija retinotektalne mape kroz ekspresiju PSA-NCAM-a u odnosu na ekološku nišu koju istraživane vrste zauzimaju. Ekspresija PSA-NCAM opisana je u nekoliko radova u kojima se kao model koristila isključivo zebrica *Danio rerio* (Adolf i sur. 2006, Grandel i sur. 2006b, Kaslin i sur.) . Trajna neurogeneza u periventrikularnoj sivoj tvari (PGZ) optičkog tektuma odraslih riba već je prije zabilježena kod sablasne nož-ribe *Apteronotus leptorhynchus (*Zupanc i Horschke 1995)*,* zebrice *Danio rerio* (Zupanc 2008b), zlatnog karasa *Carassius auratus* (Raymond i Easter 1983), komarče *Sparus aurata* (Zikopoulos i sur. 2000) i koljuške *Gasterosteus aculeatus* (Ekström i sur. 2001).

Predatori moraju procijeniti brojne čimbenike koji doprinose uspješnosti lova (Dugatkin 2013), a posebice predatori koji se primarno navode vidom. Razvoj životinje u određenom okolišu stvarat će trajni ekološki pritisak što će u konačnici dovesti do prilagodbi u građi cijelog tijela, a osobito mozga koji je sučelje između životinje i okoliša.

Ograničenje naše studije je činjenica da neke ribe dolaze iz komercionalnog uzgoja. Tako je recimo šaran prije izlova živio u bogatijem okolišu nego pastrva, jer su principi uzgoja drugačiji (Vandeputte 2003). Šarani se uzgajaju u velikim ribnjacima, s bogatom florom poput trske uz rubove, biljnog detritusa i prisutnim predatorima (Dadebo i sur. 2015). Pastrve se uzgajaju u betoniranim protočnim bazenima koji za razliku od ribnjaka imaju relativno malu raznolikost i nemaju velike sličnosti s prirodnim okolišem. U obzir također treba uzeti činjenicu da je stanje retinotektalne mape specifično za period uzorkovanja riba i da postoji mogućnost utjecaja sezonskih promjena na strukturu retinotektalne mape zbog različitog intenziteta rasta životinje i shodno tome intenziteta rasta optičkog tektuma. Dosadašnja istraživanja migracije neurona i neurogeneze obuhvaćala su injiciranje analoga timidina – 5-bromodeoksiuridina

kao markera stanica u diobi (Zupanc 2008b, Zupanc i sur. 2005) stoga naše istraživanje, koje nije koristilo ovaj marker, ne može u potpunosti odgovoriti na pitanje u kojim zonama mozga je održana neurogena.

U narednom istraživanju bilo bi korisno uz pomoć markera za diobu stanica, 5-bromodeoksi uridina, pratiti distribuciju matičnih stanica te ju dovesti u vezu s ekspresijom PSA-NCAM-a u pojedinom sloju. Također, praćenjem promjene distribucije radijalne glije i mijelinizacije tjekom sezone mogao bi se odrediti stupanj utjecaja sezonskih promjena na reorzanizaciju i laminaciju optičkog tektuma. Jegulje su zbog svog polifazičnog životnog ciklusa iznimno zanimljive jer su drastične morfološke promjene koje doživljavaju, tako se može očekivati i drastična promjena u građi mozga tjekom ciklusa metamorfoze. Injiciranjem 5-bromodeoksi uridina jegulji u različitim dijelovima sezone dobili bi smo odgovor na pitanje uloge radijalne glije u tektumu ove ribe tijekom sezonske migracije. S druge strane, markeri plastičnosti neurona, osobito dendritogeneze, objasnili bi ulogu PSA-NCAM molekule u lokalnoj reorganizaciji neurona. Prave koštunjače su izvrstan model za proučavanje utjecaja okoliša na organizaciju mozga.

5. GLAVNI REZULATI I ZAKLJUČCI

Smanjenja ekspresija PSA-NCAM-a u *so* i *sfgs* u odnosu na druge slojeve optičkog tektuma kod zebrice, štuke i smuđa ukazuje na intenzivno korištenje vida odnosno retinotektalna mapa u tim područijima je stabilnija. Pastrvi koja je prema stupnju mijeliniziranosti u optičkom tektumu također vizulani predator, zbog manjeg ekološkog pritiska i vizualno nestimulirajućeg okoliša ekspresija PSA-NCAM u *so* i *sfgs* je smanjena i podjednaka kao i u ostalim slojevima tektuma. Izostanak mijelinizacije i podjednaka ekspresija PSA-NCAM kroz optički tektum soma ukazuje na dominantno korištenje somatosenzornih osjetila u lovu i navigaciji kroz muljeviti bentos.

Šaran je vrsta koja je dobro integrirala vid i somatosenzorna osjetila. Udjel optičkog tektuma u mozgu šarana ukazuje na dobro razvijene oči što mu je omogućilo smanjenje optičkog tektuma. Postojanje brkova na gubici i dodatnih režnjeva rostralnog dijela stražnjeg mozga, slaba mijeliniziranost u optičkom tektumu i visoke ekspresije PSA-NCAM u optičkom tektumu ukazuju na dominantno korištenje i drugih osjetila u navigaciji i lovu.

Udio optičkog tektuma u volumenu cijelog mozga veći je u vrsta koje se služe vidom i kojima je vid primarno integrativno središte kao što su zebrica i pastrva. Razvijeni osjet kemorecepcije (šaran, som) i elektrocepcije (som) umanjuje udio tektuma u volumenu mozga u ovisnosti o razvijenosti očiju i vidnog živca.

Jedino jegulja ima radijalnu gliju razapetu kroz sve slojeve tektuma, a radi toga i mogućnost migracije postmitotičkih neurona u sve slojeve tektuma. Vrste koje se navode vidom (pastrva, šaran, zebrica) održavaju radijalnu gliju samo u marginalnoj zoni.

Prisutnost mijeliniziranih vlakana (SMI312 pozitivna) u tektumu znak je stabilizacije retinotektalne mape i najobimnija je u zebrice, zatim pastrve pa šarana. Mijeliniziranih vlakana nema u tektumu jegulje.

6. LITERATURA

Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhäuser B, et al. 2006. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev. Biol.* 295(1):278–93

Argillier C, Barral M, Irz P. 2012. Growth and diet of the pikeperch Sander lucioperca (L.) in two French reservoirs. *Arch. Pol. Fish.* 20(3):191–200

Bassity E, Clark TG. 2012. Functional Identification of Dendritic Cells in the Teleost Model, Rainbow Trout (Oncorhynchus mykiss). *PLOS ONE*. 7(3):e33196

Bene FD, Wyart C, Robles E, Tran A, Looger L, et al. 2010. Filtering of Visual Information in the Tectum by an Identified Neural Circuit. *Science*. 330(6004):669–73

Bogut I, Novoselić D, Pavličević J. 2006. Biologija riba. *Udžb. Sveučilišta JJ Strosmayera U Osijeku Sveučilišta U Most. Manualia Univ. Stud. Most. Poljopr. Fak. U Osijeku*

Bretschneider F. 1974. Electroreceptive properties ofSilurus glanis (L.). *Experientia*. 30(9):1035–1035

Brusés JL, Rutishauser U. 2001. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development. *Biochimie*. 83(7):635–43

Butler AB, Hodos W. 2005. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy: Evolution and Adaptation*. John Wiley & Sons

Cañestro C, Albalat R, Irimia M, Garcia-Fernàndez J. 2013. Impact of gene gains, losses and duplication modes on the origin and diversification of vertebrates. *Semin. Cell Dev. Biol.* 24(2):83–94

Charles P, Hernandez MP, Stankoff B, Aigrot MS, Colin C, et al. 2000. Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(13):7585–7590

Cole GJ, Glaser L. 1986. A heparin-binding domain from N-CAM is involved in neural cell-substratum adhesion. *J. Cell Biol.* 102(2):403–12

Copp GH, Robert Britton J, Cucherousset J, García-Berthou E, Kirk R, et al. 2009. Voracious

invader or benign feline? A review of the environmental biology of European catfish Silurus glanis in its native and introduced ranges*. *Fish Fish.* 10(3):252–82

Corbo CP, Othman NA, Gutkin MC, Alonso ADC, Fulop ZL. 2012. Use of different morphological techniques to analyze the cellular composition of the adult zebrafish optic tectum. *Microsc. Res. Tech.* 75(3):325–33

Dadebo E, Eyayu A, Sorsa S, Tilahun G. 2015. Food and Feeding Habits of the Common Carp (Cyprinus carpio L. 1758) (Pisces: Cyprinidae) in Lake Koka, Ethiopia. *Momona Ethiop. J. Sci.* 7(1):16–31

Deelder CL. 1984. *Synopsis of Biological Data on the Eel Anguilla Anguilla (Linnaeus, 1758)*. Food and Agriculture Organization of the United Nations

Dugatkin LA. 2013. *Principles of Animal Behavior (Third Edition)*. W. W. Norton

Ekström P, Johnsson C-M, Ohlin L-M. 2001. Ventricular proliferation zones in the brain of an adult teleost fish and their relation to neuromeres and migration (secondary matrix) zones. *J. Comp. Neurol.* 436(1):92–110

Farrell A. 2011. *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*. Academic Press

Freyhof J. 2009. Fish, Systematics and Evolution. In *Encyclopedia of Inland Waters*, pp. 482–88. Elsevier

Gage FH. 2002. Neurogenesis in the Adult Brain. *J. Neurosci.* 22(3):612–13

Gahtan E, Tanger P, Baier H. 2005. Visual Prey Capture in Larval Zebrafish Is Controlled by Identified Reticulospinal Neurons Downstream of the Tectum. *J. Neurosci.* 25(40):9294–9303

Gascon E, Vutskits L, Kiss JZ. 2007. Polysialic acid–neural cell adhesion molecule in brain plasticity: From synapses to integration of new neurons. *Brain Res. Rev.* 56(1):101–18

Gerhard D. 2013. Neuroscience. 5th Edition. *Yale J. Biol. Med.* 86(1):113–14

Glasauer SMK, Neuhauss SCF. 2014. Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Mol. Genet. Genomics*. 289(6):1045–60

Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006a. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295(1):263–77

Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. 2006b. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295(1):263–77

Guirado R, Perez-Rando M, Sanchez-Matarredona D, Castillo-Gómez E, Liberia T, et al. 2014. The Dendritic Spines of Interneurons Are Dynamic Structures Influenced by PSA-NCAM Expression. *Cereb. Cortex*. 24(11):3014–24

Harvey BJ, Microlog - York University, Canada: Dept. of Fisheries and Oceans.: Pacific Region., Pacific Biological Station. 2009. *A Biological Synopsis of Northern Pike (Esox Lucius)*. Nanaimo, B.C: Fisheries and Oceans Canada, Science Branch, Pacific Region, Pacific Biological Station

Hughes SW. 2005. Archimedes revisited: a faster, better, cheaper method of accurately measuring the volume of small objects. *Phys. Educ.* 40(5):468

Hunter CJ. 1990. *Better Trout Habitat: A Guide To Stream Restoration And Management*. Island Press

Ito H, Ishikawa Y, Yoshimoto M, Yamamoto N. 2007. Diversity of Brain Morphology in Teleosts: Brain and Ecological Niche. *Brain. Behav. Evol.* 69(2):76–86

Jacoby D, Gollock M. 2014. *Anguilla Anguilla. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2*

Kardong KV. 2006. *Vertebrates: Comparative Anatomy, Function, Evolution*. McGraw-Hill Higher Education

Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2008. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 363(1489):101–22

Kihslinger RL, Lema SC, Nevitt GA. 2006. Environmental rearing conditions produce forebrain differences in wild Chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha. *Comp. Biochem.*

Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. 145(2):145–51

Kim KK, Adelstein RS, Kawamoto S. 2009. Identification of Neuronal Nuclei (NeuN) as Fox-3, a New Member of the Fox-1 Gene Family of Splicing Factors. *J. Biol. Chem.* 284(45):31052–61

Kinoshita M, Fukaya M, Tojima T, Kojima S, Ando H, et al. 2005. Retinotectal transmission in the optic tectum of rainbow trout. *J. Comp. Neurol.* 484(2):249–59

Kiss JZ, Rougon G. 1997. Cell biology of polysialic acid. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7(5):640–46

Kitazume-Kawaguchi S, Kabata S, Arita M. 2001. Differential Biosynthesis of Polysialic or Disialic Acid Structure by ST8Sia II and ST8Sia IV. *J. Biol. Chem.* 276(19):15696–703

Kizil C, Kaslin J, Kroehne V, Brand M. 2012. Adult neurogenesis and brain regeneration in zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72(3):429–61

Kohlmann K, Kersten P, Flajšhans M. 2005. Microsatellite-based genetic variability and differentiation of domesticated, wild and feral common carp (Cyprinus carpio L.) populations. *Aquaculture*. 247(1–4):253–66

Laale HW. 1977. The biology and use of zebrafish, Brachydanio rerio in fisheries research. *J. Fish Biol.* 10(2):121–73

Lappalainen J, Dörner H, Wysujack K. 2003. Reproduction biology of pikeperch (Sander lucioperca (L.)) – a review. *Ecol. Freshw. Fish*. 12(2):95–106

Larsson P, Tibblin P, Koch-Schmidt P, Engstedt O, Nilsson J, et al. 2015. Ecology, evolution, and management strategies of northern pike populations in the Baltic Sea. *AMBIO*. 44(3):451–61

Lien TL, Ban J, Tormen M, Migliorini E, Grenci G, et al. 2013. Can hippocampal neurites and growth cones climb over obstacles? *PloS One*. 8(9):e73966

Lindsey BW, Tropepe V. 2014. Changes in the social environment induce neurogenic plasticity predominantly in niches residing in sensory structures of the zebrafish brain independently of cortisol levels. *Dev. Neurobiol.* 74(11):1053–77

Luchiari AC, De Morais Freire FA, Koskela J, Pirhonen J. 2006. Light intensity preference of

juvenile pikeperch Sander lucioperca (L.). *Aquac. Res.* 37(15):1572–77

Mahmmoud RR, Sase S, Aher YD, Sase A, Gröger M, et al. 2015. Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines. *PLOS ONE*. 10(10):e0139739

Malyukina GA, Martem'yanov VI. 1981. An electrocardiographic study of chemical sensitivity in some freshwater fishes. *J. Ichthyol.* 21:77–84

Massabuau J-C, Forgue J. 1995. Les capacités d'adaptation du silure glane en hypoxie : un cas exemplaire d'homéostasie du milieu intérieur. *Aquat. Living Resour.* 8(4):423–430

Nevin LM, Robles E, Baier H, Scott EK. 2010. Focusing on optic tectum circuitry through the lens of genetics. *BMC Biol.* 8:126

Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ ten, Nicholson C. 1998. *The Central Nervous System of Vertebrates*. Springer

Ohno DS. 1970. Duplication for the Sake of Producing More of the Same. In *Evolution by Gene Duplication*, pp. 59–65. Springer Berlin Heidelberg

Otto SP. 2007. The Evolutionary Consequences of Polyploidy. *Cell*. 131(3):452–62

Pankhurst NW, Lythgoe JN. 1983. Changes in vision and olfaction during sexual maturation in the European eel Anguilla anguilla (L.). *J. Fish Biol.* 23(2):229–40

Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. 2003. The Neural Cell Adhesion Molecule NCAM Is an Alternative Signaling Receptor for GDNF Family Ligands. *Cell*. 113(7):867–79

Pohlmann K, Grasso FW, Breithaupt T. 2001. Tracking wakes: The nocturnal predatory strategy of piscivorous catfish. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98(13):7371–74

Poulet N, Arzel C, Messad S, Lek S, Argillier C. 2005. Diel activity of adult pikeperch Sander lucioperca (L.) in a drainage canal in the Mediterranean basin during spring. *Hydrobiologia*. 543(1):79–90

Ranåker L, Persson J, Jönsson M, Nilsson PA, Brönmark C. 2014. Piscivore-Prey Fish Interactions: Mechanisms behind Diurnal Patterns in Prey Selectivity in Brown and Clear Water. *PLOS ONE*. 9(11):e102002

Raymond PA, Easter SS. 1983. Postembryonic growth of the optic tectum in goldfish. I. Location of germinal cells and numbers of neurons produced. *J. Neurosci.* 3(5):1077–91

Retzler C, Göhring W, Rauch U. 1996. Analysis of Neurocan Structures Interacting with the Neural Cell Adhesion Molecule N-CAM. *J. Biol. Chem.* 271(44):27304–10

Sallan LC. 2014. Major issues in the origins of ray-finned fish (Actinopterygii) biodiversity. *Biol. Rev.* 89(4):950–71

Salvanes AGV, Moberg O, Ebbesson LOE, Nilsen TO, Jensen KH, Braithwaite VA. 2013. Environmental enrichment promotes neural plasticity and cognitive ability in fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280(1767):20131331–20131331

Seki T, Sawamoto K, Parent JM, Alvarez-Buylla A. 2011. *Neurogenesis in the Adult Brain I: Neurobiology*. Springer Science & Business Media

Serra EL, Medalha CC, Mattioli R. 1999. Natural preference of zebrafish (Danio rerio) for a dark environment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32(12):1551–53

Shu D-G, Morris SC, Han J, Zhang Z-F, Yasui K, et al. 2003. Head and backbone of the Early Cambrian vertebrate Haikouichthys. *Nature*. 421(6922):526–29

Silver J, Rutishauser U. 1984. Guidance of optic axons in vivo by a preformed adhesive pathway on neuroepithelial endfeet. *Dev. Biol.* 106(2):485–99

Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, Danio rerio. *Biol. Rev.* 83(1):13–34

Sytnyk V, Leshchyns'ka I, Nikonenko AG, Schachner M. 2006. NCAM promotes assembly and activity-dependent remodeling of the postsynaptic signaling complex. *J. Cell Biol.* 174(7):1071–85

Treer T, Safner R, Aničić I, Lovrinov M. 1995. *Ribarstvo*.

Vandeputte M. 2003. Selective breeding of quantitative traits in the common carp (Cyprinus carpio): a review. *Aquat. Living Resour.* 16(5):399–407

Volff J-N. 2004. Genome evolution and biodiversity in teleost fish. *Heredity*. 94(3):280–94

Zhu M, Zhao W, Jia L, Lu J, Qiao T, Qu Q. 2009. The oldest articulated osteichthyan reveals mosaic gnathostome characters. *Nature*. 458(7237):469–74

Zikopoulos B, Kentouri M, Dermon CR. 2000. Proliferation Zones in the Adult Brain of a Sequential Hermaphrodite Teleost Species <i>(Sparus aurata)</i> *Brain. Behav. Evol.* 56(6):310–22

Zupanc GK, Zupanc MM. 1992. Birth and migration of neurons in the central posterior/prepacemaker nucleus during adulthood in weakly electric knifefish (Eigenmannia sp.). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89(20):9539–43

Zupanc GKH. 2006. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the teleost fish brain: implications for the evolution of a primitive vertebrate trait. *Evol. Nerv. Syst. Non-Mamm. Vertebr. Acad. Press Oxf.* 485–520

Zupanc GKH. 2008a. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *J. Physiol.-Paris*. 102(4–6):357–73

Zupanc GKH. 2008b. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. *J. Physiol.-Paris*. 102(4–6):357–73

Zupanc GKH, Hinsch K, Gage FH. 2005. Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* 488(3):290–319

Zupanc GKH, Horschke I. 1995. Proliferation zones in the brain of adult gymnotiform fish: A quantitative mapping study. *J. Comp. Neurol.* 353(2):213–33

Zupanc GKH, Sîrbulescu RF, Ilieş I. 2012. Radial glia in the cerebellum of adult teleost fish: implications for the guidance of migrating new neurons. *Neuroscience*. 210:416–30

7. PRILOZI

	Zebrica 1	Zebrica 1	Zebrica 1	Zebrica 2	Zebrica 2	Zebrica 2	Zebrica 3	Zebrica 3	Zebrica 3		sr.vrijednost
sm	40	87	165	6	107	9	124	134	135	807	89.67
so+sfgs	235	234	236	222	234	207	135	133	142	1778	197.56
sgc-ip + sgc	169	178	187	137	141	144	148	170	153	1427	158.56
sac + spv	150	122	149	182	228	200	225	198	191	1645	182.78
	594	621	737	547	710	560	632	635	621	5657	
	Pastrva 1	Pastrva 1	Pastrva 1	Pastrva 2	Pastrva 2	Pastrva 2	Pastrva 3	Pastrva 3	Pastrva 3		
sm	104	89	106	109	125	93	177	174	179	1156	128.44
so+sfgs	176	142	113	129	152	142	196	205	197	1452	161.33
sgc-ip + sgc	134	143	154	130	132	135	197	199	200	1424	158.22
sac + spv	183	186	197	234	236	235	212	217	219	1919	213.22
										5951	661.22
	Smuđ 1	Smuđ 1	Smuđ 1	Smuđ 2	Smuđ 2	Smuđ 2	Smuđ 3	Smuđ 3	Smuđ 3		
sm	174	175	173	180	134	162	220	184	221	1623	180.33
so+sfgs	214	213	215	214	215	217	219	219	219	1945	216.11
sgc-ip + sgc	224	225	225	225	225	225	224	224	224	2021	224.56
sac + spv	227	236	232	229	229	229	224	225	224	2055	228.33
										7644	849.33
	Štuka 1	Štuka 1	Štuka 1	Štuka 2	Štuka 2	Štuka 2	Štuka 3	Štuka 3	Štuka 3		
sm	234	109	152	19	24	74	116	113	100	941	104.56
so+sfgs	222	216	213	204	222	215	218	203	200	1913	212.56
sgc-ip + sgc	173	175	159	125	125	121	123	122	121	1244	138.22
sac + spv	199	193	201	142	133	141	129	144	144	1426	158.44
	Šaran 1	Šaran 1	Šaran 1	Šaran 2	Šaran 2	Šaran 2	Šaran 3	Šaran 3	Šaran 3		
sm	20	22	35	123	120	114	113	117	117	781	86.78
so+sfgs	58	40	84	130	124	124	133	120	121	934	103.78
sgc-ip + sgc	94	87	69	152	151	157	138	131	141	1120	124.44
sac + spv	135	129	139	126	130	121	126	130	121	1157	128.56
	Som 1	Som 1	Som 1	Som 2	Som 2	Som 2	Som 3	Som 3	Som 3		
sm	123	174	155	83	142	127	138	119	114	1175	130.56
so+sfgs	163	142	167	129	151	129	138	138	127	1284	142.67
sgc-ip + sgc	161	163	160	129	129	129	138	127	127	1263	140.33
sac + spv	155	147	160	130	129	97	132	122	130	1202	133.56
	Jegulja 1	Jegulja 1	Jegulja 1	Jegulja 2	Jegulja 2	Jegulja 2	Jegulja 3	Jegulja 3	Jegulja 3		
sm	154	135	113	184	175	145	118	116	121	1261	140.11
so+sfgs	200	213	215	224	217	216	210	201	208	1904	211.56
sgc-ip + sgc	216	220	255	218	221	215	198	204	213	1960	217.78
sac + spv	233	215	217	212	218	223	213	214	220	1965	218.33

Tablica 3. Mjerenja vrijednosti PSA-NCAM u pojedinim slojevima optičkog tektuma kod istraživanih vrsta