

Izolacija lipidnih splavi prije i nakon procesa mijelinizacije u mozgu genetički izmijenjenog miša St8sia1

Čupić, Mateo

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:069790>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mateo Čupić

IZOLACIJA LIPIDNIH SPLAVI PRIJE I
NAKON PROCESA MIJELINIZACIJE U
MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENOG
MIŠA *St8sia1*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Mateo Čupić

IZOLACIJA LIPIDNIH SPLAVI PRIJE I
NAKON PROCESA MIJELINIZACIJE U
MOZGU GENETIČKI IZMIJENJENOG
MIŠA *St8sial*

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Rad je izrađen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku.

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 54 listova, 14 tablica i 11 slika.

ZAHVALA

Unatoč velikim izazovima i teškoćama u eksperimentalnom dijelu te u pisanju ovog rada, zaista sam uživao u cijelom procesu, a zasluge i zahvale za to pripadaju dolje nabrojanim osoba.

Prvo, zahvale idu mentorici doc. dr. sc. Barbari Viljetić koja me ponovno uzela pod svoje vodstvo i našla prikladnu temu s metodama s kojima se do tada nisam susreo na praktičan način („Gram prakse vrijedniji je od tone teorije.“). Zaista sam puno naučio radeći na istraživanju i zato Vam hvala.

Hvala prof. dr. sc. Mariji Heffer, voditeljici laboratorija za neurobiologiju u kojemu sam radio te voditeljici projekta kojemu pripada i moj rad. Profesorice, zahvaljujem na korištenju laboratorija i što sam, na kakav-takav način s obzirom na rezultate, indirektno bio dio velikog istraživanja.

Posebne zahvale idu osobama koje vjerojatno imaju više zahvala studenata s kojima su surađivali pri izradi završnih i diplomskih radova nego što ja imam referenci u ovom radu. To su asistent (uskoro dr. sc., čestitke!) Milorad Zjalić i dr. sc. Vedrana Ivić; hvala vam na nesebičnoj pomoći u laboratoriju kad god je bilo potrebno. Zato neka bude još jedna zahvala više od nas studenata, neupitno ste je zaslužili!

Napose hvala i kolegici Mihaeli Ilijašević s kojom sam se družio te koja je pomogla i za vrijeme eksperimentalnog dijela i pri pisanju rada. Pogotovo ti zahvaljujem jer si preuzela ulogu pisanja bilješki iz laboratorija, bez kojih bi metode iz mog rada vjerojatno bile poluprazne te bi izgledalo da pola kemikalija nisam koristio. Jer, kako je neočekivano ispalo, čini se da moje „zapamtiti ću ja to“ ipak ne radi...

Kad je već običaj i kad se mora, teška srca zahvaljujem prijatelju s kojim sam podosta sati programirao te koji me uveo u svijet Pythona i dao dobar uvod u programiranje statistike, odnosno generiranje grafova za ovo istraživanje. Zanimljiva stvar! Hvala, Dionizije, dobar si čovjek kao i ja.

P.S.

S malim zakašnjenjem, hvala kolegici Martini Matanović na pomoći pri izradi završnog rada 2017. godine, a kojoj sam tada zaboravio zahvaliti. Martina, nisam te zaista zaboravio, tako je ispalo i hvala na svemu!

Naglašavam da ovdje prestaju zahvale i nikome se više ne zahvaljujem, a svako naknadno traženje istih bit će odbijeno; hvala...

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Mijelin i proces mijelinizacije | 1 |
| 1.1.1. Mijelinizacija središnjeg živčanog sustava | 2 |
| 1.1.2. Mijelinizacija perifernog živčanog sustava..... | 4 |
| 1.2. Demijelinizacija i remijelinizacija..... | 5 |
| 1.3. Lipidne splavi | 8 |
| 1.4. Gangliozidi | 9 |
| 1.5. Genetički izmijenjeni miševi <i>St8sial1</i> | 11 |
| 2. HIPOTEZA..... | 13 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 14 |
| 4. MATERIJALI I METODE..... | 15 |
| 4.1. MATERIJALI..... | 15 |
| 4.1.1. Pokusne životinje | 15 |
| 4.1.2. Kemikalije | 15 |
| 4.2. METODE..... | 16 |
| 4.2.1 Izolacija DNA i genotipizacija..... | 16 |
| 4.2.2. Žrtvovanje, disekcija i pohrana mozga | 17 |
| 4.2.3. Izolacija lipidnih splavi iz moždanog tkiva (moždanog debla)..... | 17 |
| 4.2.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu | 19 |
| 4.2.4. Elektroforeza i Western blot analiza proteina u lipidnim splavima moždanog debla.. | 20 |
| 4.2.5. Analiza podataka i statistika..... | 21 |
| 4.2.4. Određivanje koncentracije kolesterola | 22 |
| 5. REZULTATI..... | 23 |
| 5.1. Analiza izražaja flotilina u moždanom deblu genetički izmijenjenog <i>St8Sial1</i> miša..... | 25 |
| 5.2. Analiza izražaja transferin u moždanom deblu genetički izmijenjenog <i>St8Sial1</i> miša..... | 28 |
| 5.3. Analiza izražaja MBP biljega u moždanom deblu genetički izmijenjenog <i>St8Sial1</i> miša.. | 31 |
| 5.4. Analiza izražaja GAPDH u moždanom deblu genetički izmijenjenog <i>St8Sial1</i> miša..... | 34 |
| 5.5. Analiza koncentracije kolesterola u moždanom deblu genetički izmijenjenog <i>St8Sial1</i> miša | 36 |
| 6. RASPRAVA | 39 |
| 6.1. Markeri splavi i ne-splavi..... | 39 |
| 6.2. Izražaj GAPDH proteina | 40 |

| | |
|--|----|
| 6.3. Markeri mijelinizacije..... | 40 |
| 6.4. Dodatna provjera kolesterolom i nedostaci istraživanja..... | 42 |
| 7. ZAKLJUČAK..... | 43 |
| 8. SAŽETAK | 44 |
| 9. SUMMARY | 45 |
| 10. LITERATURA | 46 |
| 11. ŽIVOTOPIS..... | 54 |

POPIS KRATICA

| | |
|---------------------------------|---|
| BSA | albumin iz seruma goveda (engl. <i>Bovine Serum Albumin</i>) |
| GAPDH | gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>) |
| HRP | peroksidaza iz hrena (engl. <i>horseradish peroxidase</i>) |
| KO | miševi s poremećenom sintezom (engl. <i>knock-out</i>) |
| MAG | glikoprotein vezan za mijelin (engl. <i>myelin associated glycoprotein</i>) |
| MBP | bazični mijelinski protein (engl. <i>myelin basic protein</i>) |
| Na ₃ VO ₄ | natrijev ortovanadat; inhibitor proteaza |
| NaF | natrijev fluorid; inhibitor proteaza |
| NeuN | marker jezgara svih neurona neuronske jezgre (engl. <i>Neuronal Nuclei</i>) |
| NF | neurofilament (engl. <i>Neurofilament</i>) |
| NG2 | neuron-glija antigen 2 (engl. <i>Neuron-gial antigen 2</i>) |
| OL | oligodendrociti |
| OPC | prekursorske stanice oligodendrocita (engl. <i>oligodendrocyte precursor cells</i>) |
| PBS | fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i>) |
| PBST | fosfatni pufer s detergentom Tween-20 (engl. <i>phosphate buffered saline-Tween-20</i>) |
| PFA | paraformaldehid |
| PFC | prefrontalni korteks (engl. <i>prefrontal cortex</i>) |
| PMSF | fenilmetilsulfonil fluorid (engl. <i>phenylmethylsulphonyl fluoride</i>); inhibitor serinskih proteaza |
| PVDF | polivinilidendifluorid |
| PŽS | periferni živčani sustav |
| SŽS | središnji živčani sustav |
| WT | divlji tip (engl. <i>wild type</i>) |

1. UVOD

1.1. Mijelin i proces mijelinizacije

Mijelin, odnosno složena tvar koja predstavlja sastavni dio mijelinske ovojnice, kao osnovnu ulogu ima provođenje akcijskog potencijala. Točnije, mijelinska ovojnica pomaže povećavajući energetska učinkovitost i brzinu provođenja akcijskog potencijala i tako poboljšava ulogu aksona: efikasno prenošenje živčanih impulsa (1). Navedena je ušteda energije značajna jer se samo određeni dijelovi membrane trebaju depolarizirati i repolarizirati za provođenje impulsa. Istaknuta karakteristika mijelina njegov je biokemijski sastav. Naime, uočen je velik omjer lipida / proteina, pri čemu lipidi čine najmanje 70 % mase mijelinske ovojnice (2), odnosno dvostruko više nego kod drugih plazma membrana (3). Na primjer, u analizi proteoma i lipidoma pokazana je brojka od ukupno 2300 proteina u ljudskom mijelinu, odnosno 692 lipida (4). Kao što će biti prikazano kasnije, mijelinski sastav lipida podložan je promjenama i potencijalno sklon preuređivanju prilikom starenja i bolesti. Kada se mijelin omota oko odsječaka aksona, svaki mijelinizirani odsječak predstavlja internod. Posljedično, brzina je provođenja optimizirana debljinom mijelina te udaljenošću internoda (5). Od ostalih suptilnijih čimbenika koji utječu na brzinu provođenja navodi se promjer aksona, dužina internoda i njihov raspored duž aksona (6). Navedeni proces mijelinizacije – stvaranja mijelinske ovojnice – u kralježnjaka predstavlja evolucijsko unaprjeđenje važno za motoričke, senzorne te takozvane kognitivne funkcije višeg reda (7). Mehanizam navedenog procesa temelji se na uspostavljanju uzajamnog odnosa aksona te glija stanica. Uz stvaranje mijelina glija stanice imaju ulogu zaštite i potpore neuronima te održavanju homeostaze (8). Dodatno, glija stanice imaju ulogu u popravku i remijelinizaciji u bolesti i poremećajima središnjeg živčanog sustava (9, 10). Brojčano, njihov broj i omjer u odnosu na neurone varira od jedne regije mozga do druge, no pretpostavlja se da je ukupan broj od oko 80 milijardi u cijelom mozgu podjednak broju neurona te tako glija stanice čine polovicu volumena mozga i leđne moždine (11, 12). Općenito mogu se podijeliti na mikro- i makroglija stanice, pri čemu potonje imaju ključnu ulogu u stvaranju mijelina. Međutim, budući da se mijelinizacija odvija i u perifernom i u središnjem živčanom sustavu, postoji važna razlika u vrsti makroglije koja obavlja navedenu zadaću te načinu njezina obavljanja.

1.1.1. Mijelinizacija središnjeg živčanog sustava

U središnjem živčanom sustavu (SŽS) specijalizirani su oligodendrociti (OL), općenito manje stanice od astrocita te u usporedbi s njima imaju manje izdanaka i neurofilamenata. Oligodendrociti mogu se podijeliti na dva glavna tipa s obzirom na smještaj u moždanom tkivu: interfascikularni, češći i zaslužni za specifičnu boju bijele tvari u mozgu, te perineuronski sateliti koji, za razliku od prethodno spomenutog, ne sudjeluju u mijelinizaciji pa ga, očekivano, nalazimo u sivoj tvari (13). OL nastaju iz oligodendrocitnih prekursorskih stanica (engl. *oligodendrocyte precursor cells*, OPC), pretežno unipotentnih progenitorskih stanica koji mogu imati dvojaku sudbinu. Pritom ili dolazi do simetrične podjele i proizvodnje dvije OPC stanice kćeri ili asimetrične podjele OPC stanica pri čemu u konačnici nastaje jedna stanica oligodendrocita (14). Tijekom embriogeneze proces mijelinizacije je aktivan te ključan za normalno funkcioniranje živčanog sustava. U normalnom razvoju SŽS-a različite su regije mozga mijelinizirane u različito vrijeme. Proces počinje u četvrtom mjesecu ljudskog embrionalnog razvoja i traje do trećeg ili četvrtog desetljeća života (15, 16). Moždano deblo i leđna moždina mijeliniziraju se ranije u odnosu na, primjerice, amigdalnu, telencefalnu te hipokampus (17). Kao što je rečeno te važno za istaknuti, kod OPC-a njihova je sposobnost dijeljenja i u odrasloj dobi, što je jedan od pokazatelja plastičnosti mijelina. Dokazano je da su OPC stanice široko rasprostranjena stanična populacija u svim regijama razvijenog SŽS-a (18). Lako se identificiraju ekspresijom neuron-glija antigen 2 (engl. *Neuron-gial antigen 2*, NG2) proteoglikana i receptora faktora rasta koji potječu iz trombocita, kao i oligodendroglijalnih biljega loze SOX10 i OLIG2. Nadalje, nekoliko je istraživanja pokazalo da su OPC stanice odraslih miševa sposobne dijeliti se svakih 20 – 40 dana u uvjetima okoliša koji nije obogaćen (19, 20). Međutim, isti autori navode i sporiju proliferaciju OPC-a povezanu sa starenjem, pri čemu je uočen duži stanični ciklus u starijih životinja u odnosu na mlađe. Daljnja istraživanja pokazala su da je neuspjeh diferencijacije u starijih miševa zapravo nemogućnost pretvorbe OPC-a u oligodendrocite, a ne njihov nedostatan ukupni broj (21). Navedenom fenomenu najvjerojatniji su uzrok epigenetske modifikacije koje u konačnici dovode do inhibicije diferencijacije. Oba elementa, dob i epigenetske promjene, primjeri su plastičnosti mijelina, ali su dokazi za mnogo više čimbenika koji utječu na nju brojni. Na bijelu tvar, prisutnu zajedno sa sivom tvari u SŽS-u, koja se sastoji od mijeliniziranih aksona, mikroglija, mijelinizirajućih oligodendrocita i vlaknastih astrocita, ili plastičnost mijelina utječu i određeni regulatori ponašanja te genetički i okolišni čimbenici (6). Primjerice, tjelesna aktivnost (npr.

trčanje) povećava broj zrelih i nezrelih OL-a u leđnoj moždini odraslog miša (22). Drugo je istraživanje pokazalo da veći broj dnevnih sati odgovara pojačanoj mijelinizaciji u srednjem i stražnjem mozgu volova, dok su kraći dani smanjili mijelinizaciju (23). Slično je istraživanje obavljeno na miševima (24) gdje je prikazano da je proliferacija OPC-a podvrgnuta cirkadijalnim varijacijama. Dodatno, u istraživanjima rezus majmuna dokazana je velika važnost socijalizacije koja potiče plastičnost bijele tvari (25). Naime, kada su ti majmuni odgojeni u socijalno bogatom okruženju, njihovo je žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*), struktura koja povezuje lijevu i desnu polovicu mozga, veće te oni postižu bolje rezultate na testovima namijenjenima procjeni kognitivnih sposobnosti (25). Navedeno je istraživanje u korelaciji s eksperimentom na štakorima koji je pokazao da štakori odgajani u obogaćenom okolišu, koje uključuje i socijalizaciju, imaju više OL-a u gornjem sloju vizualnog korteksa u odnosu na štakore koji su lišeni takvog okruženja (26). Slična istraživanja na miševima potvrđuju ovakve rezultate jer je kod njih uočena smanjena mijelinizacija u prefrontalnom korteksu (engl. *prefrontal cortex*, PFC) miševa lišenih socijalizacije (27, 28). Posljednji primjer, i neprijeporni dokaz plastičnosti mijelina jasno je vidljiv, primjerice, kod profesionalnih glazbenika. Uz njihove visoko razvijene motoričke sposobnosti također su uočene promjene u područjima bijele i sive tvari u mozgu (29, 30).

Valja naglasiti, i čini se očitim, da je proliferacija OPC-a u području SŽS-a brža u bijeloj tvari nego u sivoj (31). Kako oligodendrociti sazrijevaju, tako paralelno stvaraju omotač mijelinske membrane koji se nekoliko puta omota oko odsječka aksona te se zbije uza nj. Svaki pojedini OL paralelno može proizvesti do 40 mijeliniziranih odsječaka na nekoliko aksona u vrlo kratkom vremenu (5). Za pravilno i uspješno formiranje i održavanje mijelinske ovojnice oligodendrociti moraju isporučiti velike količine proteina i lipida u mijelin putem takozvanog vezikularnog transporta. S druge strane, aksonska membrana akumulira različite bjelančevine u posebna područja kao što je primjerice Ranvierov čvor ili suženje, mjesto prekida aksona, gdje se naponom regulirani natrijski kanali skupljaju i obnavljaju akcijski potencijal. Nadalje, neuronski signali reguliraju omotavanje mijelinske membrane jer je njezina debljina određena aksonima (32). Iz navedenog slijedi da je komunikacija između neurona i oligodendrocita neophodna za koordinaciju mijelogeneze (5, 33).

1.1.2. Mijelinizacija perifernog živčanog sustava

Suprotno prethodno opisanoj mijelinizaciji u SŽS-u, proces koji se odvija u perifernom živčanom sustavu (PŽS) bitno je drugačiji (34). Osnovno obilježje koje karakterizira proces omatanja mijelina u PŽS-u tip je stanice, takozvane Schwannove stanice (engl. *Schwann cells*, SC), koje se dijele na dva tipa: mijelinizirajuće i nemijelinizirajuće (35). Oba tipa imaju središnju ulogu u održavanju i regeneraciji aksona u perifernom živčanom sustavu. Ono što ih čini sličnima oligodendrocitima, odnosno drugačijima od neurona, jest njihova nemogućnost prenošenja sinaptičkih poruka te sposobnost dijeljenja tijekom cijelog života. Važno je spomenuti da Schwannove stanice, za razliku od oligodendrocita, brže ulaze u mitozu nakon pojave ozljede, pritom sugerirajući da bi mogli biti bolji pri liječenju ozljeda leđne moždine ili drugih demijelinizacijskih bolesti (35). Jedna mijelinizirajuća Schwannova stanica mijelinizira jedan periferni akson, što čini glavnu razliku namatanja u perifernom i središnjem živčanom sustavu (36). U PŽS-u mijelin se stvara i održava specijaliziranom staničnom membranom SC-a kao odgovor na uzajamnu signalizaciju i interakciju između aksona i glija stanica (37). S druge strane tijekom razvoja perifernih živaca, stanice neuralnog grebena stvaraju prekursore SC-a koji se prije rođenja razvijaju u nezrele Schwannove stanice (38). Nakon rođenja, nezrele stanice postaju mijelinizirajuće ili nemijelinizirajuće Schwannove stanice. Da bi došlo do sazrijevanja SC-a, potreban je neuregulin 1 tip III (engl. *Neuregulin 1 type III*, NRG1), koji je važan za mijelinizaciju aksona PŽS-a (36). Dodatno, njegova ekspresija određuje debljinu mijelinske ovojnice (32, 39). Još jedna važna razlika između SC-a i OL-a jest činjenica da mijelinizacija Schwannovih stanica ovisi o indukciji aksona, dok oligodendrociti mogu formirati mijelinsku membranu u odsutnosti aksona (36). Nadalje, u PŽS-u Schwannove stanice isključivo mijeliniziraju aksone velikog promjera ($>1 \mu\text{m}$), po principu deblji akson – veći broj koncentričnih nabora SC-a; dok se proces namotavanja odvija na aksonima manjeg promjera gdje jedna SC obavija više malih, nemijeliniziranih aksona razdvajajući ih tankim slojem citoplazme (40). Formirana struktura naziva se Remakov snop. Promjer aksona važan je jer određuje hoće li Schwannova stanica mijelinizirati ili namotati aksone (40).

Ove dvije vrste glija stanica, odnosno oligodendrociti i Schwannove stanice mogu biti zahvaćene u različitim bolestima živčanog sustava. Na primjer, budući da su OL odgovorni za održavanje integriteta aksona i, općenito, preživljavanja neurona, svaki gubitak ove interakcije

aksona i glija stanice potencijalno može dovesti do psihijatrijskih bolesti. S druge strane, SC su pogođeni u demijelinizacijskim bolestima kao što su Charcot – Marie – Tooth i Guillain – Barréov sindrom (35).

1.2. Demijelinizacija i remijelinizacija

Velik broj istraživanja usmjeren je na proučavanje povezanosti glija stanica i mentalnih bolesti, uključujući poremećaje raspoloženja i anksioznosti pa sve do shizofrenije i bipolarnog poremećaja (41, 42). Iz tog razloga sve je veći broj radova koji istražuju odnos poremećaja mijelina i psihijatrijskih bolesti (30). Na primjer, rana posthumna istraživanja kliničke depresije, koja pripada poremećajima raspoloženja, dosljedno pokazuju smanjen volumen regija mozga koje su ključne za razvoj navedene bolesti (41). U objašnjenju ovog fenomena prvotno se isticalo hipotezu koja pretpostavlja promijenjenu neurogenezu i smanjenu veličinu tijela neurona. Međutim, čini se da su prethodno spomenute regije smanjenog volumena u korelaciji sa smanjenim brojem astrocita (43). Nadalje, u istraživanjima koja su uključivala modele glodavaca pod stresom uočeni su veliki deficiti astrocita, koji uključuju gubitak stanica te smanjen unos glutamata iz sinaptičke pukotine (44, 45). Kod posthumno uzetih tkiva pacijenata sa shizofrenijom, uz smanjenu gustoću stanica i poremećen integritet bijele tvari, unutar korteksa i subkortikalnih područja velik niz transkriptomskih analiza dosljedno pokazuje promjene u ekspresiji gena povezanih s mijelinom (46, 47). Specifično, u analizama na 6000 gena prefrontalnog korteksa shizofrenog mozga pronađeno je 89 gena koji su abnormalno regulirani, od kojih je čak 35 uključeno u proces mijelinizacije (30). Osim gena, i okolišni čimbenici imaju jednu od važnih uloga pri pojavi navedene bolesti, od kojih su socijalna izolacija i kronični stres vodeći (48, 49). U odnosu na navedene čimbenike primijećeno je da nepovratno mijenjaju mijelinizaciju u području PFC-a u postnatalnog, odnosno odraslog miša (49). Dodatno je u modelima glodavaca pod stresom zabilježena smanjena gustoća NG2 glija stanica u područjima PFC-a te hipokampusa (50). Osim spomenute povezanosti sa shizofrenijom, linija oligodendrocita ima ulogu i u drugim bolestima mijelina kao što su leukodistrofija i multipla skleroza, koja je najčešća demijelinizacijska bolest (41). Uz proučavanje navedenih stanja, dodatna motivacija u njihovim istraživanjima moguć je uvid u povezanost mijelina s normalnim kognitivnim sposobnostima, kvocijentom inteligencije i učenjem. Kao što je već rečeno, patološki procesi pogađaju i SŽS i PŽS. Etiologija je bolesti, prikazano na primjeru shizofrenije, raznorodna; od genetskih i metaboličkih poremećaja pa do

određenih infekcija i autoimunih mehanizama. Primjer potonjih prethodno su spomenute bolesti; u SŽS-u multipla skleroza, odnosno Guillain – Barréov sindrom u PŽS-u (30). Neuspješno provođenje signala duž živčanih vlakana uzrokovano oštećenim mijelinom može dovesti do paralize, disfunkcije senzornih i motoričkih vještina, kognitivnog oštećenja, mentalne retardacije i smrti (30). Također, mijelin mogu oštetiti i određeni poremećaji u kojima su pogođeni astrociti; glija stanice koje pružaju čimbenike za razvoj oligodendrocita i mijelinizaciju (51). Primjer je takvog stanja malodobna distrofija Aleksandar, genetska bolest koja zahvaća astrocite, a koja dovodi do hipomijelinizacije te posljedično do mentalne retardacije i smrti u ranoj dobi (52). No, treba istaknuti da nisu sve promjene „mijelinskih gena“ uvijek popraćene ispoljavanjem bolesti. Zanimljivo ih je primijetiti tijekom faze spavanja s „brzim pokretima očiju“ (engl. *Rapid Eye Movements*, REM), upućujući na remodulaciju mijelina u stanjima aktivnosti mozga (53). Dodatno, posebno su zanimljive promjene u ekspresiji gena u kontekstu konsolidacije memorije tijekom sna.

Kao antagonist opisanom procesu demijelinizacije i njegovim možebitnim posljedicama, priroda je iznašla nevjerojatan mehanizam regeneracije živčanog sustava – remijelinizaciju. Već prilikom gubitka, odnosno oštećenja mijelina spontano dolazi do učinkovitog odgovora gdje se stvaraju novi oligodendrociti te obnavlja mijelinska ovojnica na ogoljenim aksonima. Kako je dokazano u mnogim radovima, glavnu ulogu u ovom procesu i općenito popravku prilikom bolesti i poremećaja središnjeg živčanog sustava ponovno imaju glija stanice (7). Konkretno, to su mikroglija stanice, tj. makrofagi SŽS-a, koje u mišjem mozgu čine 5 – 12 % ukupnih živčanih stanica, odnosno 0.5 – 16 % u ljudskom mozgu (54). Članovi su urođenog imunološkog sustava s funkcijom ispitivanja mikrookoline zbog otkrivanja znakova ozljede, primjerice tzv. molekularni obrasci prepoznavanja oštećenja (engl. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) – biomolekule koja se oslobađa iz umirućih stanica ili onih koje su pod stresom (54). Osim reakcije na ozljedu važni su i u razvojnim procesima te u održavanju homeostaze. Od drugih stanica važnih za regeneraciju mijelina spominju se makrofagi nastali iz monocita (engl. *monocyte-derived macrophages*, MDM) (54). Na primjer, oni su važni kod uklanjanja debrisa nakon demijelinizacije te tako pomažu u povećanju učinkovitosti remijelinizacije (55). Oba tipa stanica u suradnji koordiniraju regeneraciju mijelina oko aksona u SŽS-u. Istraživanja su također pokazala da makrofagi / mikroglija ispoljavaju dva različita fenotipa nakon ozljede mozga: ili kao pro-upalne M1 stanice ili kao anti-upalne / imunoregulacijske M2 stanice. Na modelima demijelinizacije

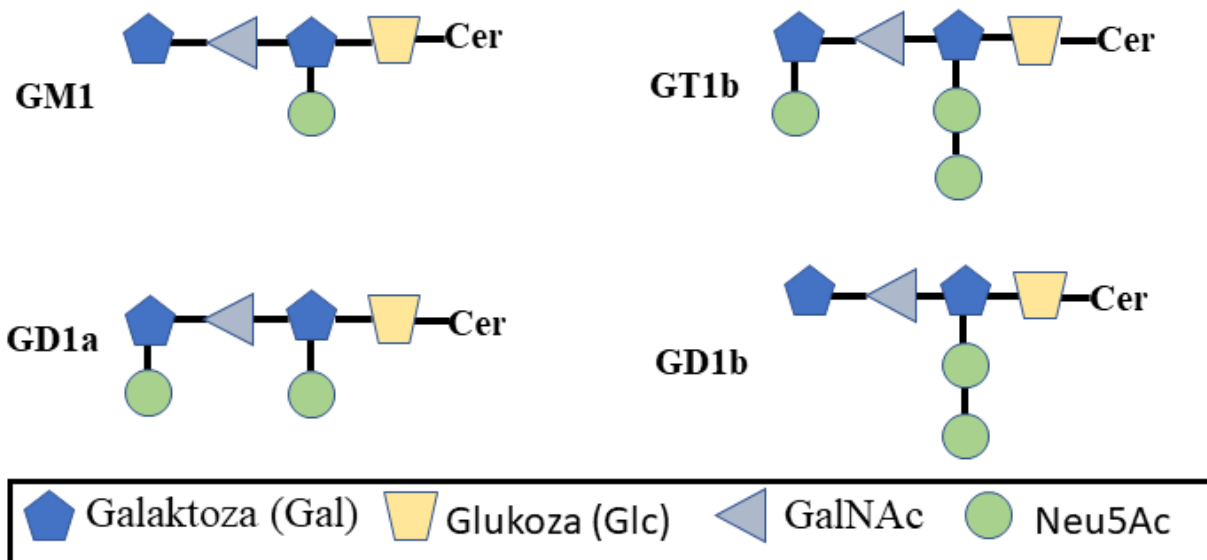
rezultati su upućivali da potonje potiču diferencijaciju OPC-a (55). Kronološki mehanizam remijelinizacije uključuje mobilizaciju i proliferaciju OPC-a, njihovu diferencijaciju u zrele OL te omotavanje aksona mijelinom čime se ponovno uspostavlja i čuva funkcija aksona te, posljedično, zdravlja (54). Za uspješno obavljanje navedene zadaće OPC-a zaslužni su upravo makrofagi i mikroglia stanice. Dodatno, astrociti, endotelne stanice i neuroni također imaju ulogu u popravku, svaki na svoj način (55). Međutim, ono što je većini ovih stanica zajedničko, a dokazano je u reaktivnim astrocitima, moždanim endotelnim stanicama te mikroglia / makrofagima jest lučenje trofičnih faktora. Neki od tih čimbenika potiču, drugi inhibiraju ili pak imaju oba svojstva u procesu diferencijacije, no valja naglasiti da točni mehanizmi još nisu do kraja poznati i trenutno se istražuju. Na primjer, važna je uloga citokina, medijatora upalnog odgovora, pri uklanjanju patogena i već spomenutog debrisa koji nastaje na oštećenom aksonu (56). Kada imunosne stanice potaknute citokinima ne bi obavljale tu zadaću, rezultat bi bio nakupljanje debrisa mijelina i oligodendrocita, što bi konačno vodilo do inhibicije diferencijacije OPC-a (56). Naprotiv, u smislu poticanja diferencijacije ključnu ulogu imaju TNFR2 i TNF- α pa je s te strane važnost citokina također jasno prikazana s obzirom da ih potiču (57). Nadalje, kemokini su jednako važni jer navode imunosne stanice i OPC na migriranje do mjesta ozljede aksona te, kao i citokini, imaju ulogu u uklanjanju debrisa što navodi na dvojni ulogu kemokina u remijelinizaciji: migracija i diferencijacija prekursorskih stanica oligodendrocita (57). Isto istraživanje pokazalo je potencijalnu ulogu određenih gena u razvoju mijelina, primjerice *OLIG1* gena koji kodira istoimeni protein uključen u proces remijelinizacije. Pretpostavlja se da *OLIG1* u suradnji s *NKX2-2* genom, koji blago povećava broj OPC-a, ima ulogu u diferencijaciji i sazrijevanju u oligodendrocite (57). Upravo bi genska ekspresija mogla biti najvažniji čimbenik u razumijevanju remijelinizacije te u mogućem liječenju demijelinizacijskih bolesti. Detaljno je proučena i uloga signalnih puteva u regulaciji remijelinizacije multiple skleroze, inače bolesti u kojoj je ovaj proces blokiran (58, 59). Važni stanični receptori poput LINGO1, Notch-1 i Wnt- β -Catelin signalni put, inhibiraju diferencijaciju OPC-a, dok LINGO1 inhibira i regeneraciju aksona (58). Faktori rasta, citokini i kemokini, te svi ostali čimbenici i molekule koji sudjeluju u procesu obnavljanja mijelina detaljno i temeljito su prikazani u preglednom radu koji se bavi njihovim utjecajem prilikom moždanog udara (55).

1.3. Lipidne splavi

Da bi se točno objasnilo kako i zašto oštećenja mijelina mogu dovesti do patoloških stanja, mora se detaljnije opisati strukturu mijelinske ovojnice. Kao što je rečeno u prvom ulomku (**1.1. Mijelin i mijelinizacija**), mijelin je karakterističan po svojoj strukturi – velik udio proteina i lipida. Upravo taj visoki udio lipida (~70 %) čini mijelin jedinstvenim u odnosu na druge plazma membrane (2, 3). Točnije, to su glikosfingolipidi, fosfolipidi, zasićene dugolančane masne kiseline te kolesterol. Sve nabrojane molekule sudjeluju i u izgradnji lipidnih splavi. Lipidne su splavi uključene u brojne stanične funkcije te sudjeluju, primjerice, u proteolizi stanične površine, sekreciji, endocitozi i signalizaciji (60). Nadalje, jasno se pokazalo da lipidne splavi osiguravaju prikladan okoliš za proteine kao što su obitelj Src kinaza, G-protein i drugi receptorski proteini, osiguravajući prikladan okoliš za njihovo učinkovito djelovanje. (60). Narušena homeostaza lipida može dovesti do otežanog stvaranja mijelina te konačno izazvati promjene u funkcioniranju i strukturi središnjeg živčanog sustava. Na zaključak da su upravo lipidne splavi glavna komponenta mijelina upućivala je mijelinu svojstvena velika koncentracija glikosfingolipida i kolesterola (oko 30 %), za koje je dokazano da potiču lipidni red (60). Općenito, može se reći da je kod sisavaca kolesterol bitan strukturni lipid svih membrana. Također, on je posebno zanimljiv jer kolesterol sudjeluje u sastavljanju mijelinske ovojnice. Funkcija je kolesterola pružiti stabilnost mijelinu regulirajući fluidnost i permeabilnost membrane (61). Primjerice, promjenjivost sadržaja kolesterola u mijelinu kod multiple skleroze posljedično utječe na fluidnost kao i na lipidni sastav membrane (60). *De novo* sinteza kolesterola proizvedena *in situ* u SŽS-u predstavlja složen proces od 37 koraka, koji je isti u svim tipovima stanica. No, valja naglasiti da, u usporedbi s ostalim staničnim tipovima, oligodendrociti ne uzimaju glukozu, nego ketonska tijela kao prekursore za sintezu kolesterola. Također, čini se da je brzina sinteze kolesterola povezana s brzinom mijelogeneze (61). U istraživanju je ciljano obrisan gen za skvalen sintetazu iz oligodendrocita, katalizator ključnog koraka u biosintezi kolesterola, a kao posljedica mijelinizacija SŽS-a i dalje je bila moguća, ali vrlo usporena (62). Za uspješno započinjanje proizvodnje mijelina, takvi, mutirani OL morali su uzimati ekstracelularni kolesterol te je primijećena vrlo spora brzina mijelinizacije jer je ovisila o unosnom kolesterolu.

1.4. Gangliozidi

Usprkos važnosti kolesterola, tj. njegove uloge i neophodne sinteze u živčanom sustavu, fokus ovog rada bit će stavljen na glikosfingolipide, molekule također uključene u strukturu lipidnih splavi. Konkretno, u kisele glikosfingolipide spadaju gangliozidi, spojevi građeni od glikana koji, zajedno s ceramidom, predstavljaju lipidni dio stanične membrane. U strukturi još imaju jednu ili više jedinica sijalinske kiseline (npr. N-acetilneuraminska kiselina) koja je vezana za oligosaharid-ceramid kompleks (63). Sijaloglikanski elementi gangliozida pružaju se do aksonske membrane gdje sudjeluju u interakciji glije i aksona (61). Nalazimo ih u svim stanicama, odnosno tkivima i tjelesnim tekućinama, ali njima je najbogatiji živčani sustav; obiluju i u perifernim živcima i u mozgu. Za uspješno i brzo provođenje akcijskog potencijala u živčanom sustavu gangliozidi pomažu na nekoliko načina. Premda im uloga nije do kraja razjašnjena, pokazalo se da imaju zadaću regulacije veličine aksona i organizacije ionskih kanala na Ranvierovim čvorovima, oba kritična koraka u spomenutom širenju signala (64). Nadalje, određeni gangliozidi u interakciji su s ključnim transmembranskim receptorima ili provoditeljima signala koji su uključeni u staničnu adheziju i signalizaciju, i na taj način pomažu u regulaciji staničnog rasta, proliferacije i diferencijacije (65). S obzirom na sve navedeno, gangliozidi posljedično osiguravaju pravilnu funkciju lipidnih splavi. Također, budući da predstavljaju veliku skupinu lipida te broje više od 100 vrsta, za istaknuti je one najzastupljenije gangliozide u mozgu čovjeka: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (Slika 1).



Slika 1. struktura četiri najdominantnija gangliozida u mozgu (nacrtao autor prema (66)); GalNAc – N-acetilgalaktozamin; Neu5Ac – N-acetilneuraminska kiselina; Cer – ceramid.

Navedena četiri tipa čine oko 97 % gangliozida u mozgu (61). Pojedini tip gangliozida određuje i njegovu ulogu. Na primjer, GM1 ima važna fiziološka svojstva te utječe na plastičnost neurona i mehanizam popravljivanja (neuroregeneracija) kao i na rast aksona i homeostazu kalcijevih iona (67). Dodatno se pojavljuje tijekom rane mijelinizacije zajedno s GM3, koji uz navedeno ima ulogu u neuronskoj migraciji (67). Nadalje, čini se da GM2 ima ulogu u dendritogenezi piramidalnih neurona, dok je GD1a marker razvoja sinapsi (sinaptogeneze) (67). Također se pokazalo da GT1b promiče stabilnost mijelina i kontrolira neuroregeneraciju tako što sudjeluje u interakciji neurona i oligodendrocita (67). GM3 i GD3, gangliozidi koji sadrže samo glukožu, galaktozu i jednu ili dvije sijalinske kiseline, glavni su gangliozidi u neuralnim matičnim stanicama, dok su GM1a, GD1a, GD1b i GT1b, koji sadrže složenije ugljikohidratne dijelove, jače izraženi tijekom neuro- i astrocitogeneze (68). Prilikom razvoja mozga uz povećanje broja gangliozida dolazi i do povećanja kompleksnosti njihove strukture što se vidi po stupnju glikozilacije (točnije sijalizacije). Za primijetiti je da najveće povećanje gangliozida počinje u kasnom stadiju fetalnog razvoja i nastavlja se u prve dvije godine života, što se podudara s najaktivnijim periodom mijelinizacije (61). Sinteza gangliozida neophodna je za normalno funkcioniranje stanica i tkiva s obzirom na to da su oni važni u osiguravanju pravilne strukture i funkcije splavi. Navedeni proces sinteze obavlja se pomoću enzima glikoziltransferaze te se

nastavlja tijekom cijelog života. Nakon rođenja GM3 i GD3 predstavljaju male komponente, dok su GD1a i GT1b glavni sijaloglikani u mozgu. Kako mozak sazrijeva do odrasle dobi, tako ekspresija GM1 i GD1b raste sve dok razine četiri glavna gangliozida ne postanu podjednake te dok ne preuzmu ulogu dominantnih moždanih gangliozida (69). S druge strane, u starijoj se dobi ukupni broj gangliozida značajno smanjuje. Ključ u otkrivanju njihove funkcije i izuzetne strukturne specifičnosti potrebne za proces biosinteze gangliozida genetički su izmijenjeni miševi; oni kojima su promijenjeni geni za ključne enzime, a koji su odgovorni za normalnu sintezu ovih neosporno važnih spojeva. Nedostatak ili nefunkcionalnost određenih gangliozida dovodi do neurodegeneracije, koja se pak očituje pojačanom aktivacijom sustava komplementa i konačno upalom (70).

1.5. Genetički izmijenjeni miševi *St8sial1*

Sve više istraživanja na genetički modificiranim miševima ukazuje da gubitak specifičnih glikoziltransferaza potrebnih za sintezu određenih gangliozida može kao posljedicu imati raznoliki fenotip. Primjerice, u tipu miševa *St3Gal5*, nazvanoga po istoimenom genu, odnosno enzimu koji sintetizira GM3, nedostatak funkcionalnog enzima ispoljava se kao gubitak sluha uzrokovan degeneracijom Cortijevega organa, ili kao poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (71). Kod ljudi mutacija istog gena nađena je u obiteljima amiških zajednica gdje uzrokuje infantilnu epilepsiju, dok novija istraživanja pokazuju povezanost mutacije s neurološkim poremećajem „sol i papar“ (engl. „*salt and pepper*“ *syndrome*) praćen promijenjenom pigmentacijom (61). Nadalje, budući da je enzim N-acetilglikozilamin transferaza neophodan za sintezu glavnih moždanih gangliozida, miševi kojima nedostaje gen *B4Galnt1* (koji kodira GM2 sintazu) mogli su proizvesti samo jednostavne gangliozide kao što su GM3 i GD3 (72). Premda ovi miševi imaju normalan životni vijek, pokazuju znakove aksonske degeneracije, nešto smanjene mijelinizacije i općenito znakove demijelinizacije. Ovakav iznenađujući i relativno blagi fenotip objašnjava se povećanjem koncentracije GM3 i GD3 gangliozida koji kompenziraju nedostatak kompleksnijih formi. Kod ljudi s istom mutacijom primijećena je neurodegeneracija povezana s nasljednom spastičkom paraplegijom (61). Dodatnu potvrdu da su gangliozidi važni za normalno funkcioniranje živčanog sustava dao je dvostruki mutant *St3Gal5/B4Galnt1*. Naime, u miševa s poremećenom sintezom (engl. *knock-out*, KO) *ST3Gal5* i *B4Galnt1* uočena je neurodegeneracija sa stvaranjem upečatljivih vakuola u bijeloj tvari koja dovodi do smrti nekoliko mjeseci nakon rođenja (71). Takvi miševi

imaju potpuni nedostatak gangliozida, a dodatno akumuliraju abnormalno visoke vrijednosti laktozilceramida i laktozilceramid-3-sulfata. Nama važnije istraživanje, koje se tiče tipa *St8Sial*, pokazalo je da su mutacije u istom genu povezane s povećanim rizikom za razvoj multiple skleroze (73). *St8Sial* kodira GD3 sintazu, transmembranski protein tipa II koji stvara GD3 gangliozid katalizacijom reakcije dodavanja drugog ostatka sijalinske kiseline njegovom neposrednom prethodniku GM3. Navedeni gen *St8Sial*, odnosno enzim koji *St8Sial* gen kodira, sintetizira takozvanu b – seriju gangliozida koja uključuje GD3, GD2, GD1b, GT1b i GQ1b gangliozide (73). Svi nabrojani smatraju se ključnim receptorima bakterijskih toksina, povezuju se s adhezijom, uključeni su u pospješivanje rasta stanica te imaju ulogu kao receptori za apoptoza – posredovane molekule (74). Dodatna uloga b – serije gangliozida i njihova zadaća u živčanom sustavu postala je jasnija u istraživanju na štakorima kojima su presječeni aksoni ili snopovi aksona te naknadno dodani egzogeni gangliozidi iz spomenute serije (GT1b i GD1b) koji su pokazali najveću učinkovitost u regeneraciji (75). Međutim, njihova točna uloga još se uvijek istražuje. Primjerice, u mutiranim miševima *St8Sial* svi gangliozidi b – serije posljedično su izbrisani, no morfologija živčanog sustava gotovo im je potpuno očuvana, dok se njihovo ponašanje čini normalno (74). S druge strane, isti miševi jasno pokazuju smanjenu regeneraciju hipoglosalnih živaca kojima su presječeni aksoni u usporedbi s miševima divljeg tipa (engl. *Wild type*, WT), upućujući na zaključak da je navedena serija gangliozida važnija u popravku nego u diferencijaciji živčanog sustava (74). S obzirom na sve izloženo te na dvoznačnu ulogu b – serije gangliozida, istraživanja na njima neophodna su za bolje razumijevanje spomenutih procesa. Uz to budući da navedeni glikosfingolipidi sudjeluju u izgradnji lipidnih splavi, proučavanje njihovih mehanizama moglo bi dati bolji uvid kako promjene u njihovu sastavu moduliraju određene kritične korake u fiziološkim procesima.

2. HIPOTEZA

- Nedostatak u sintezi kompleksnih gangliozda b – serije u genetički izmijenjenim miševima (KO) dovest će do promjene u organizaciji mijelinskih mikrodomena, odnosno narušavanju sastava lipidnih splavi.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

- Izolirati lipidne splavi, tj. utvrditi njihov sastav koristeći biokemijsku izolaciju lipidnih splavi na miševima prije mijelinizacije, tijekom i nakon nje (odnosno pet, 15 i 30 dana starosti).
- Korištenjem specifičnih protutijela (flotilin, transferin, MBP, MAG) potvrditi uspješnu izolaciju splavi i usporediti razlike između tri prethodno navedene starosne skupine miševa u specifičnim regijama mozga – moždanom deblu – kod miševa s isključenim genom (engl. *knock out*, KO) *St8Sial* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida, odnosno utvrditi kako nedostatak kompleksnih gangliozida utječe na organizaciju mijelinskih mikrodomena, a time i na održavanje njegova integriteta.

4. MATERIJALI I METODE

Rad je napisan u sklopu HRZZ-ova projekta "*Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi*" (IP-09-2014-2324) voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer. Eksperimentalne životinje koje su se koristile nabavljene su u sklopu istog projekta za koje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek.

4.1. MATERIJALI

4.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju je korišteno moždano tkivo (moždano deblo) tri skupine genetički izmijenjenog tipa miševa *St8Sial*, s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida b – serije. U svrhu rada korišteni su miševi starosti pet, 15 i 30 dana.

4.1.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, D-40724)
- SYBR Safe (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, SAD)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- PBS: NaCl, KCl, Na₂HPO₄·x7H₂O, KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Tween – 20 (Fisher Bioreagents, Hampton, New Hampshire, SAD)
- D (+) – saharoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- inhibitori enzimatske aktivnosti:
 - PMSF, NaF (Acros Organics, New Jersey, SAD)
 - Na₃VO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- smjesa inhibitora proteaza¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- proteinski standard (za elektroforezu) (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, SAD)

¹ Sadrži cistein, serin, kisele proteaze, aminopeptidaze.

- Laemmlijev pufer za uzorke (engl. *Sample buffer*) (Bio-Rad, Hercules, CA, SAD)
- pufer za elektroforezu (engl. *Running buffer*):
 - Tris, Glicin (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, SAD)
 - 0,1 % SDS (Acros Organics, New Jersey, SAD)
- homogenizacijski pufer za izolaciju proteina (Raft pufer):
 - Tris (Fisher Bioreagents, Hampton, New Hampshire, SAD)
 - NaCl, MgCl₂, CaCl₂ (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- pufer za prijenos (engl. *Transfer buffer*):
 - Tris, Glicin (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, SAD)
 - 20 % metanol (Gram Mol, Zagreb, Hrvatska)
- set za određivanje kolesterola; standard i reagens (Multipurpose Kits, Greiner Diagnostic, Bahlingen, Njemačka)
- Bradfordov reagens (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD)
- primarna protutijela:
 1. anti-MAG (Chemicon, Temecula, CA, SAD)
 2. anti-MBP (Chemicon, Temecula, CA, SAD)
 3. anti-GAPDH (Proteintech, Manchester, UK)
 4. anti-transferin (Invitrogen, Van Allen Way, Carlsbad CA, SAD)
 5. anti-flotilin (BD Biosciences, San Jose, CA, SAD)
- sekundarno protutijelo:
 - kozje anti-mišje IgG konjugirano s HRP (Santa Cruz Biotechnologa, Texas, SAD)
- set za kemiluminiscentnu detekciju (Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD)

4.2. METODE

4.2.1 Izolacija DNA i genotipizacija

Za dokazivanje *St8Sial* KO gena, odnosno za razlikovanje genetički izmijenjenog i divljeg tipa na miševima je provedena genotipizacija. Da bi se izoliralo DNA, kao uzorak uzet je komadić repa miševa. Korištena je metoda s visokom koncentracijom NaOH (50 mmol/dm³). Potom je uslijedila inkubacija 30 minuta na 95°C, a potom centrifugiranje 5 minuta na 4 000 okretaja. Idući

je korak uklanjanje NaOH, a zatim je na izoliranu DNA dodan AE pufer. Metodom PCR određeni su genotipovi miševa korištenjem specifičnih početnica. Korištene su oligonukleotidne početnice SA269 (GCA AGA CGT TGT CAT AGT AGT), SA270 (CAC AGT TAC ATC TAC ATG CCT) te SA271 (TCG CCT TCT TGA CGA GTT CTT CTG AG. Konačno, elektroforezom na agaroznom gelu razdvojeni su dijelovi DNA, u koji je dodana boja SYBR Safe te su na kraju vizualizirani pomoću UV svjetla.

4.2.2. Žrtvovanje, disekcija i pohrana mozga

Miševi su anestetizirani – sukladno etičkim principima – pomoću izoflurana sve dok im disanje nije postalo sporo, tj. dok se nije smirilo. Potom su žrtvovani, a zatim je uslijedila disekcija cijelog mozga koji se odmah smrzava u tekućem dušiku te se pohranjuje na -80°C do analize.

4.2.3. Izolacija lipidnih splavi iz moždanog tkiva (moždanog debla)

Iz tako smrznutih moždanih tkiva slijedi izolacija lipidnih splavi ultracentrifugiranjem u gradijentu saharoze. Postupak izolacije izveden je po protokolu koji je razvijen u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek te je u postupku objave.

Cijeli postupak obavlja se isključivo na ledu, a prvi je korak u navedenom procesu uzimanje (izoliranje) moždanog tkiva u triplikatu te njegovo vaganje (Tablica 4.1 – 4.3). S obzirom na prirodu istraživanja, odnosno proučavanje mijelinizacije, moždano deblo uzeto je kao adekvatan uzorak jer sadrži visoke količine mijelina. Slijedi postupak homogenizacije tkiva u Whatmanovom staklenom homogenizatoru s tijesnim klipom (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD) koristeći homogenizacijski pufer uz odgovarajuće inhibitore enzimske aktivnosti (1 mM PMSF, 5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1x smjesa inhibitora proteaza). Kada je uzorak tako mehanički homogeniziran, slijedi postupak soniciranja korištenjem ultrazvučnog homogenizatora (Bandelin Sonopuls 2070, BANDELIN, Berlin, Njemačka) što dodatno pomaže smanjenju malih čestica dok ne postanu jednake veličine i ravnomjerno raspoređene u tekućini. Potom uzorke (homogenat) centrifugiramo (centrifuga Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Njemačka) kako bismo odvojili supernatant i *pellet*. Po završetku centrifugiranja *pellet* odbacujemo jer sadrži jezgre i mitohondrije koji nisu homogenizirani, a supernatant dalje obrađujemo prikladnim otopinama saharoze. Na početku navedenog postupka supernatant se pomiješa s 80 %-tnom otopinom saharaze, a 35 %-tnom i 5 %-

tnom otopinom se nadsloji. Tim redom dodane otopine navedenog disaharida važne su zbog formiranja gradijenta, gdje će se odvojiti pojedine komponente smjese. Dodatno, otopina saharoze važna je jer sadrži kalcijeve i magnezijeve ione koji su neophodni za izolaciju splavi, a navedene elemente dobiva jer se za razrjeđivanje saharoznih otopina koristi Raft pufer koji podržava razdvajanje lipidnih splavi od ostatka membrane. Tubice se zatim važu, sparuju i slažu na rotor po uputama u protokolu (Tablica 4.1 – 4.3) te konačno stavljaju u ultracentrifugu (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, BECKMAN COULTER, SAD) na 200 000 g, u trajanju od 20 h pri +4 °C. Sljedeći se dan postupak završi skupljanjem sveukupno 11 frakcija kojima se određuje koncentracija proteina.

Tablica 4.1. Miševi **5 dana** starosti; pripadajuće oznake i vrijednosti uzorka moždanog debla;

| Oznaka tipa miša (uzorka) | Masa tkiva (u miligramima)* | Masa tube [†] | Broj (položaj) u rotoru [‡] |
|---------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------------------|
| <i>Siat1</i> (S1) | 49,3** | 15,15 | 4 |
| <i>Siat2</i> (S2) | 31,30 | 15,19 | 5 |
| <i>Siat3</i> (S3) | 34,5** | 15,20 | 6 |

* Preporuča se uzeti oko 50 mg tkiva, dok je minimum 30 mg. Oznakom ** naznačeno je gdje je došlo do *pooliranja* dvaju uzoraka zbog nedovoljne količine pojedinačnog tkiva; † Konačne mase tube u ultracentrifugi važne su zbog pravilnog rasporeda, odnosno izjednačavanja masa tijekom centrifugiranja; ‡ Položaj pojedine tube u ultracentrifugi važan iz prethodno opisanog razloga; brojevi 1-6 uparaju se te stavljaju u poziciju: 1,4; 2,5; 3,6. Prve tri tube u eksperimentu koristilo se pri istraživanju divljeg tipa miša (WT)

Tablica 4.2. Miševi **15 dana** starosti; pripadajuće oznake i vrijednosti uzorka moždanog debla

| Oznaka (tip) miša (uzorka) | Masa tkiva (u miligramima) | Masa tube | Broj (položaj) u rotoru |
|----------------------------|----------------------------|-----------|-------------------------|
| S1 | 52** | 15,21 | 4 |
| S2 | 47 | 15,21 | 5 |
| S3 | 46 | 15,22 | 6 |

Tablica 4.3. Miševi **30 dana** starosti; pripadajuće oznake i vrijednosti uzorka moždanog debla

| Oznaka tipa miša (uzorka) | Masa tkiva (u miligramima) | Masa tube | Broj (položaj) u rotoru |
|---------------------------|----------------------------|-----------|-------------------------|
| S1 | 56 | 15,11 | 4 |
| S2 | 47 | 15,23 | 5 |
| S3 | 52 | 15,20 | 6 |

4.2.4. Određivanje koncentracije proteina prema Bradfordu

Budući da koncentracije proteina nisu poznate, a neizostavne su za daljnji postupak elektroforeze, odnosno Western blota, prvi korak nakon ultracentrifugiranja, tj. frakcioniranja jest njihovo određivanje metodom po Bradfordu. Navedena metoda temelji se na promjeni boje iz smeđe u plavu kada se proteini vežu za boju Coomassie Brilliant Blue u kiselim uvjetima. Točnije, mjeri se prisutnost osnovnih aminokiselinskih ostataka: arginina, lizina i histidina, koji doprinose stvaranju navedenog kompleksa s apsorpcijskim maksimumom pri 595 nm.

Na mikrotitarske pločice u duplikatu se stavljaju standard i uzorci koji se pomiješaju s Bradfordovim reagensom (komercijalno dostupan). U prvu se jažicu stavi slijepa proba bez standarda, koja služi za detekciju sustavnih pogrešaka i njihovu kompenzaciju. Sljedeće četiri jažice sadrže prethodno spomenuti standard, odnosno *stock* otopinu BSA prethodno pomiješanu s destiliranom vodom do ukupnog volumena od 50 μ l, na način da se u svakoj idućoj povećava koncentracija otopine (Tablica 4.4). Tako postavljene koncentracije poslužit će za formiranje linearnog pravca, koje se nalaze na osi x (apscisi) koordinatnog sustava, dok su na y osi (ordinati) nanese vrijednosti pridruženih apsorbancija, te se najzad prikazuje jednadžba pravca. U ostale se mikrotitarske jažice doda uzorak, koji prethodno nije razrijeđen, u istom volumenu kao standard i slijepa proba (10 μ l) te se naposljetku u svaku pojedinu jažicu stavi 125 μ l Bradfordovog reagensa. Nakon inkubacije od 15 min na sobnoj temperaturi slijedi očitavanje apsorbancija na spektrofotometru (iMark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pri 595 nm. Dobivene

vrijednosti apsorbancije stavljaju se u spomenutu jednadžbu pravca i naposljetku računaju koncentracije proteina (Tablica 5.1; Slika 2).

Tablica 4.4. Volumeni *stock* otopine, destilirane vode te konačna koncentracija (Blank – slijepe proba; St – standard).

| | Volumen <i>stock</i> otopine BSA (μl) | Volumen dH ₂ O (μl) | Konačni volumen | Koncentracija otopine ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) |
|-------|--|--|--------------------|---|
| Blank | 0 | 50 | 50 | 0 |
| St1 | 1 | 49 | 50 | 0,02 |
| St2 | 5 | 45 | 50 | 0,1 |
| St3 | 10 | 40 | 50 | 0,2 |
| St4 | 50 | 0 | 50 | 1 |

4.2.4. Elektroforeza i Western blot analiza proteina u lipidnim splavima moždanog debla

Prema dobivenim vrijednostima koncentracija proteina slijedi računanje volumena za nanošenje na gel. Točan volumen uzorka prvo se pomiješa s puferom za uzorke (u omjeru 1:5), koji će dati specifično plavo obojenje, a zatim se smjesa inkubira u termostatu (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg, Njemačka) 5 minuta na 95 ° C. Kod nanošenja na gel važno je staviti proteinski standard koji će dati specifične proteinske vrpce poznatih veličina, koje ćemo uspoređivati s našim dobivenim bendovima. Kao što je rečeno ranije, pravilan volumen na gelu i standarda (10 μl) i izračunatog volumena za uzorke ključan je za uspješno razdvajanje proteina. Sve se potom zajedno stavlja u napunjenu kadicu za elektroforezu (Mini gel tank, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) i vozi pri jakosti struje 60 mA 90 minuta.

Po završetku elektroforeze, za postupak Western blota važno je pravilno prenijeti gel, odnosno pravilnim redom poslagati komponente (spužva, filter papir, gel, PVDF membrana, filter papir, spužva) „sendviča“ u Mini Blot sustav za prijenos proteina (Thermofisher, Waltham, MA, SAD). Proteini se prenose na membranu u puferu za transfer pri 200 mA oko 90 minuta na +4 ° C.

Kada prijenos završi, membrana se prenese u Blocking otopinu (3 % BSA u 1 x PBS puferu s Tween deterdžentom (PBST)) jedan sat na sobnoj temperaturi, a u svrhu blokiranja nespecifičnih reakcija. Potom je uslijedila inkubacija membrana s primarnim protutijelima pripremljenima u sljedećim razrjeđenjima: Flotilin 1:2000, Transferin 1:2000, MAG 1:500, MBP 1:500. Tako obrađene membrane stavljaju se na tresilicu (Rotamax 120, Heidolph, Schwabach, Njemačka) preko noći na temperaturi +4° C. Sljedeći dan membrane se ispiru tri puta po 10 minuta u 1 x PBST-u na rotatoru (Bio RS-24, Biosan, Riga, Latvija). Dodatno je napravljena analiza GAPDH protutijelom na membrani ispranoj (3 puta, 10 minuta) od flotilina u omjeru 1:10 000. Zatim se sve membrane osim onih tretiranih na GAPDH inkubiraju sekundarnim protutijelom (pripremljenom u omjeru 1:5000), kojom anti-mišjim IgG-om konjugiranim s HRP-om (engl. *horseradish peroxidase*) na prethodno spomenutom rotatoru, odnosno uz stalno miješanje jedan sat na sobnoj temperaturi. Po završetku inkubacije sekundarnim protutijelom, membrane se ponovno ispiru 1 x PBST-om, tri puta po 10 minuta, nakon čega slijedi razvijanje s kemiluminiscentnim supstratom i slikanje membrana koje je odrađeno Chemidoc MP (Biorad, Hercules, CA, SAD) uređajem.

4.2.5. Analiza podataka i statistika

Za analizu dobivenih rezultata slike su obrađivane u računalnom programu ImageJ (Fiji 101) (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD) gdje je, prema protokolu, obavljena denzitometrija izražaja prethodno spomenutih markera. Prvi korak u tom procesu jest odabrati proteinske vrpce za analizu te prikaz površine koja će se analizirati, a koja uključuje grafički prikaz izražaja navedenih proteinskih vrpce. Potom se ograđuju pojedinačni bendovi te se označene površine ekstrapoliraju zajedno s postotkom. Dobivanjem tih podataka napravljena je statistička obrada u računalnom programu IBM SPSS Statistics v22 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD), dok su svi pripadajući grafovi generirani u računalnom programu Python 3.7.4. Razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli utvrđene su Mann-Whitney-Wilcoxonovim testom, dok se za neparametrijsku analizu kod više nezavisnih uzoraka rabilo Kruskal-Wallisov test; razina značajnosti je 0,05.

4.2.4. Određivanje koncentracije kolesterola

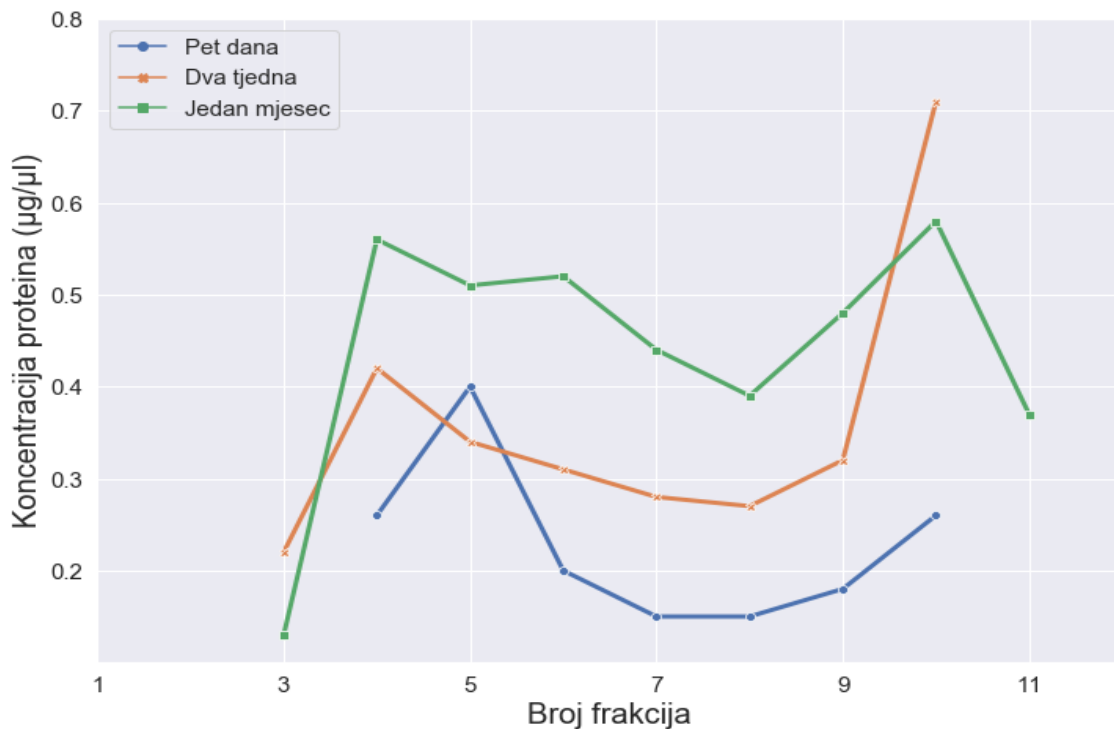
Dodatno je izmjerena koncentracija kolesterola u frakcijama jer je navedeni lipid sadržan velikim udjelom u lipidnim splavima, gdje ima važnu ulogu u strukturi membrane te sudjeluje u sastavljanju mijelinske ovojnice (61). Iz nabrojanih razloga, kolesterol je pokazatelj uspješnosti izoliranja lipidnih splavi.

Postupak se također provodi u duplikatima u mikrotitarskim pločicama na način da prva jažica služi kao slijepa proba. U sljedeću se stavi komercijalno dostupan standard (2 μl) koncentracije 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, dok se u preostale jažice stave uzorci (10 μl) iz frakcija (1-11) te se naposljetku u sve jažice aplicira reagens iz seta za određivanje kolesterola u volumenu 200 μl . Navedeni reagens radi na principu enzimskog kolorimetrijskog testa mijenjajući boju u crvenkastu s apsorpcijskim maksimumom na 500 nm (po preporuci iz protokola; očitavanje se može izvršiti u rasponu 492-550 nm). Mikrotitarska se jažica potom stavi na spektrofotometar (iMark Microplate Reader, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) gdje se očitava apsorbancija pri 490 nm. Dobivene vrijednosti dalje se koriste za računanje koncentracije kolesterola (Tablica 5.10. i Slika 11.) prema formuli:

$$c(\text{uzorka}) = \frac{A(\text{uzorka})}{A(\text{standarda})} * c(\text{standarda})$$

5. REZULTATI

Obrađene su i analizirane frakcije uzorka moždanog debla dobivene ultracentrifugiranjem u mozgu genetički izmijenjenog miša *St8Sia1*. Vrijednosti koncentracija proteina potrebne za analizu membrana na protutijela izračunate su prema dobivenoj formuli jednadžbe pravca te su prikazane grafički, gdje su uspoređivani miševi starosti 5, 15 i 30 dana (Slika 2. i Tablica 5.1.). Sveukupno je korišteno pet protutijela: anti-MAG, anti-MBP, anti-Flot1 (flotilin) i anti-TfR (transferin); odnosno markeri mijelinizacije, markeri splavi i ne-splavi, te anti-GAPDH kao unutarnja kontrola. Tablice 5.2., 5.4., 5.6. i 5.8. prikazuju površine i postotne udjele tako dobivenih područja denzitometrijom. Ovi su se izračuni radili na temelju jačine izražaja bendova nakon vizualizacije pojedinih membrana. Svi spomenuti biljezi ispoljavali su rezultate u sve tri starosne skupine KO miševa, osim u slučaju MBP markera gdje rezultata nije bilo u miševima starima pet dana. Naprotiv, protutijelo na MAG nije dalo rezultate ni u jednoj frakciji, što upućuje na nefunkcionalnost protutijela.



Slika 2. Koncentracija proteina u svim frakcijama dobivenih izolacijom lipidnih splavi iz moždanog debla genetički izmijenjenih miševa *St8sia1*.

Tablica 5.1. Dobivene apsorbancije i izračunate koncentracije proteina za sve tri starosne skupine (A – apsorbancija, c – koncentracija).

| Frakcije uzorka m. debla | <i>St8sia1</i> (5 dana) | | <i>St8sia1</i> (2 tjedna) | | <i>St8sia1</i> (1 mjesec) | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | A | c (µg/µl) | A | c (µg/µl) | A | c (µg/µl) |
| 1 | 0,489 | pnc* | 0,486 | pnc | 0,478 | pnc |
| 2 | 0,569 | pnc | 0,491 | pnc | 0,489 | pnc |
| 3 | 0,506 | pnc | 0,573 | 0,22 | 0,536 | 0,13 |
| 4 | 0,647 | 0,26 | 0,642 | 0,42 | 0,677 | 0,56 |
| 5 | 0,702 | 0,40 | 0,614 | 0,34 | 0,661 | 0,51 |
| 6 | 0,622 | 0,20 | 0,604 | 0,31 | 0,665 | 0,52 |
| 7 | 0,6 | 0,15 | 0,592 | 0,27 | 0,639 | 0,44 |
| 8 | 0,6 | 0,15 | 0,593 | 0,27 | 0,622 | 0,39 |
| 9 | 0,614 | 0,18 | 0,611 | 0,32 | 0,649 | 0,48 |
| 10 | 0,647 | 0,26 | 0,739 | 0,71 | 0,682 | 0,58 |
| 11 | / | / | / | / | 0,615 | 0,37 |

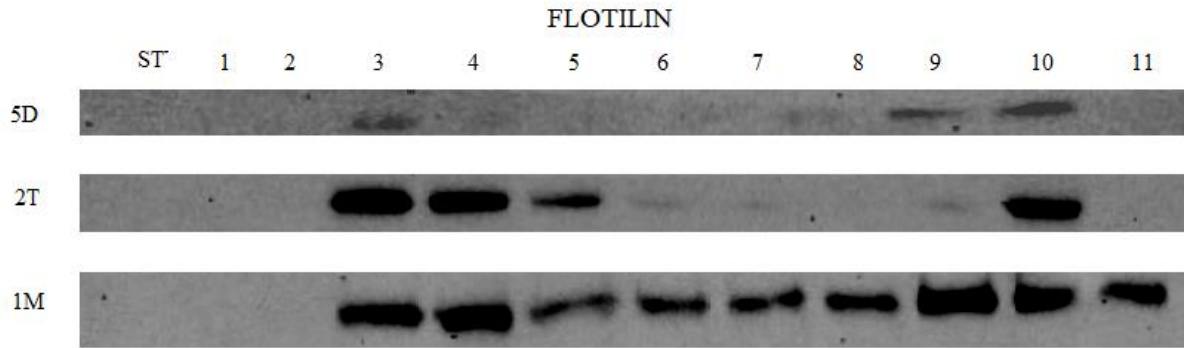
* Preniske vrijednosti koncentracije proteina; uzimati maksimalni volumen (30 µl) uzorka prilikom nanošenja na gel elektroforeze.

5.1. Analiza izražaja flotilina u moždanom deblu genetički izmijenjenog *St8Sial1* miša

Analizom rezultata ekspresije flotilina, biljega splavi (Tablica 5.2), napravljena je usporedba Kruskal-Wallisovim testom među više nezavisnih uzoraka, to jest među tri starosne skupine genetički izmijenjenog *St8sial1* miša. Usporedbom svih frakcija među tri skupine (Slika 3.) test je pokazao statistički značajnu razliku ($p = 0,021$), koja je primijećena usporedbom starosti unutar pojedine frakcije, pri čemu vrijednost p u frakcijama 3 – 11 iznosi 0,018. Slika 4. prikazuje razliku među sve tri starosne skupine miševa, odnosno ekspresiju flotilina, čiji su podaci dobiveni testom Mann-Whitney. Taj je test pokazao statističku značajnost usporedbom moždanog debla starog pet dana i onoga od jedan mjesec (Tablica 5.3.) ($p = 0,023$). U istoj su tablici ispisane vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona dobivene za flotilin.

Tablica 5.2. Denzitometrijski određena područja i pripadajući postotci frakcija prema kojima je odrađena statistička analiza **flotilina**. (Dijagonalni obrub predstavlja područje bez dobivenih podataka, odnosno bendova)

| Standard/ Broj frakcije | <i>St8sial1</i> (5 dana) | | <i>St8sial1</i> (2 tjedna) | | <i>St8sial1</i> (1 mjesec) | |
|-------------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|----------|
| | Područje | Postotak | Područje | Postotak | Područje | Postotak |
| Standard | / | / | / | / | / | / |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | 4427,18 | 18,90 | 17247,9 | 29,38 | 12057,4 | 13,59 |
| 4 | 2255,95 | 9,63 | 14883,5 | 25,35 | 12815,3 | 14,45 |
| 5 | | | 8050,9 | 13,71 | 7166,3 | 8,08 |
| 6 | | | 1406,7 | 2,39 | 7186,7 | 8,11 |
| 7 | | | 623,2 | 1,06 | 8124,6 | 9,16 |
| 8 | 2943,37 | 12,56 | | | 8404,1 | 9,48 |
| 9 | 3932,83 | 16,79 | 957,9 | 1,63 | 13621,2 | 15,36 |
| 10 | 9865,89 | 42,12 | 15532,4 | 26,46 | 10582,9 | 11,94 |
| 11 | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | 8706,9 | 9,82 |

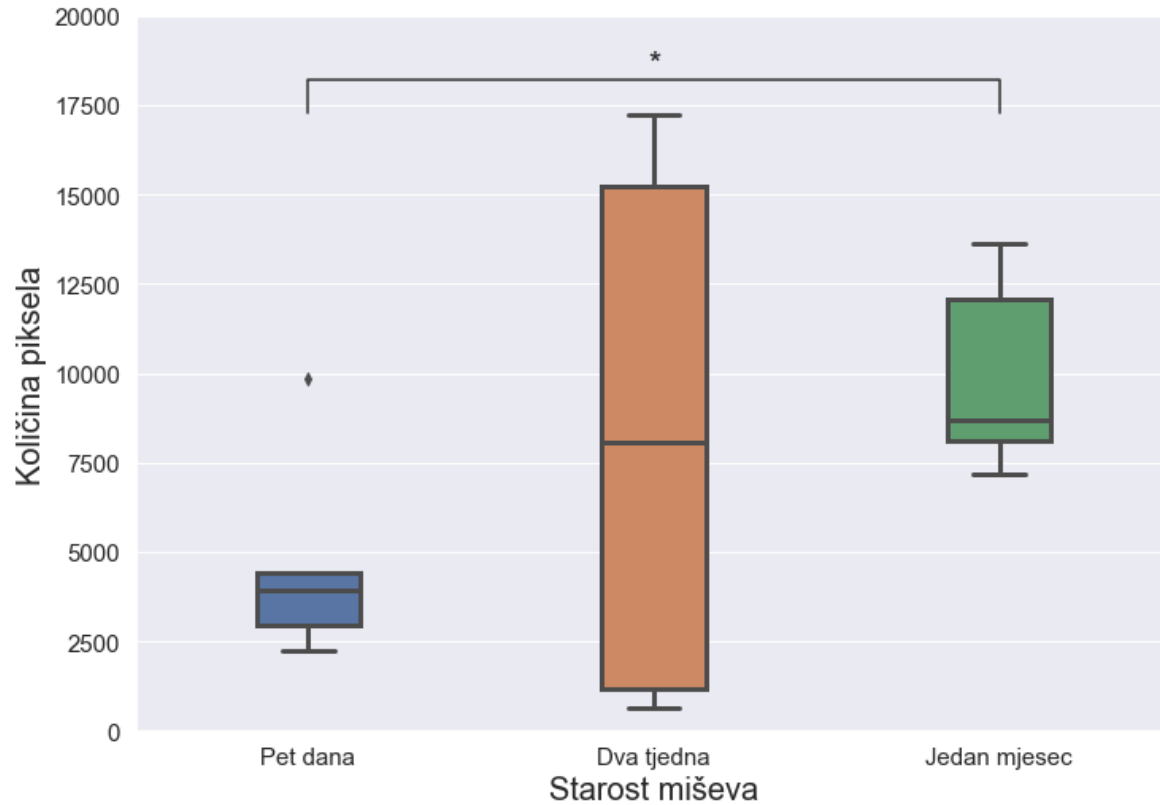


Slika 3. Izražaj **flotilina** metodom Western blot uspoređujući tri starosne skupine genetički izmijenjenih *St8Sial1* miševa; ST – standard veličine 47 kDa, 1 – 11 broj frakcija u uzorku moždanog debla gdje frakcije tri i četiri predstavljaju frakcije lipidnih splavi, dok 10 i 11 frakcije nesplavi; 5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec.

Tablica 5.3. Vrijednosti medijana izraženih količinom piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelom **flotilin** u genetički izmijenjenom mišu. (5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec). Prikazane i vrijednosti interkvartilnog raspona te, dodatno, p vrijednosti dobivene usporedbom starosnih skupina.

| Marker | Starost | Medijan | Interkvartilni raspon | | P vrijednost* |
|----------|---------|---------|-----------------------|----|---------------|
| flotilin | 5D | 3932,83 | 1483,81 | 5D | 0,87 |
| | | | | 2T | |
| | 2T | 8050,93 | 14025,64 | 5D | 0,023 |
| | | | | 1M | |
| | 1M | 8706,86 | 3932,78 | 2T | 0,83 |
| | | | | 1M | |

* Dobivene testom Mann-Whitney



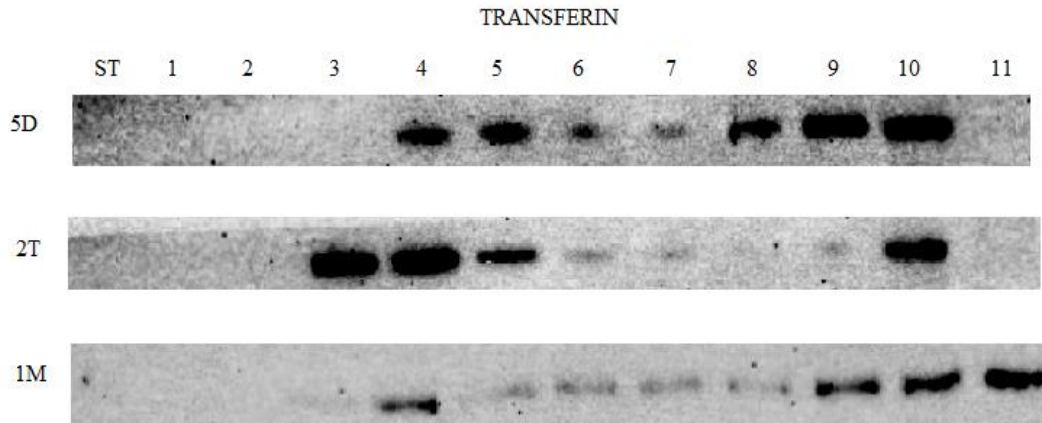
Slika 4. Kvantitativni prikaz razlika u ekspresiji **flotilina** među genetički izmijenjenim *St8Sial1* miševima starih pet, 15 (Dva tjedna) i 30 (Jedan mjesec) dana. Primjenjujući test Mann-Whitney statistička značajnost pokazana je usporedbom miševa starih pet i 30 dana (oznaka *). Grafički prikaz „kutija s brkovima“ ili kutijasti dijagram (engl. *box and whisker plot*) prikazuju podatke: medijan – crta u kutiji, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka.

5.2. Analiza izražaja transferin u moždanom deblu genetički izmijenjenog *St8Sia1* miša

S druge strane, analiza takozvanog markera ne-splavi (Tablica 5.4.), odnosno biljega ostatka stanične membrane – transferina (tj. transferinskog receptora), Kruskal-Wallisovim testom pokazao je istu razinu značajnosti uspoređujući tri starosne skupine (Slika 5.) ($p = 0,021$), te istu statističku značajnost usporedbom starosti unutar pojedine frakcije za frakcije 3 – 11 ($p = 0,018$). Međutim, podaci dobiveni testom Mann-Whitney u kojem se uspoređuju dvije po dvije grupe starosti nisu pokazali statistički značajnu razliku ni među jednom uspoređivanom grupom. Popis navedenih vrijednosti p zajedno sa vrijednostima medijana i interkvartilnog raspona na transferinski receptor prikazan je u Tablici 5.5, dok je grafički prikaz prikazan na slici 6.

Tablica 5.4. Denzitometrijski određena područja i pripadajući postotci frakcija prema kojima je odrađena statistička analiza **transferina**. (Dijagonalni obrub predstavlja područje bez dobivenih podataka, odnosno bendova.)

| Standard/ Broj frakcije | <i>St8sia1</i> (5 dana) | | <i>St8sia1</i> (2 tjedna) | | <i>St8sia1</i> (1 mjesec) | |
|-------------------------------|-------------------------|------------|---------------------------|------------|---------------------------|----------|
| | Područje | Postotak | Područje | Postotak | Područje | Postotak |
| Standard | / | / | / | / | / | / |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | 12116,4 | 23,81 | 1073,4 | 1,64 |
| 4 | 10172,1 | 15,11 | 11945,5 | 23,48 | 8092,9 | 12,35 |
| 5 | 9412,4 | 13,99 | 6222,8 | 12,23 | 2828,9 | 4,32 |
| 6 | 3826,2 | 5,69 | 2670,6 | 5,25 | 3798,7 | 5,8 |
| 7 | 2802,8 | 4,16 | 1780,3 | 3,5 | 2972,1 | 4,54 |
| 8 | 9733,4 | 14,46 | 1636,3 | 3,22 | 2955,7 | 4,51 |
| 9 | 14899,7 | 22,14 | 1467 | 2,88 | 18865,5 | 28,79 |
| 10 | 16452 | 24,45 | 13045,6 | 25,64 | 11137,3 | 17 |
| 11 | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | 13793,1 | 21,05 |

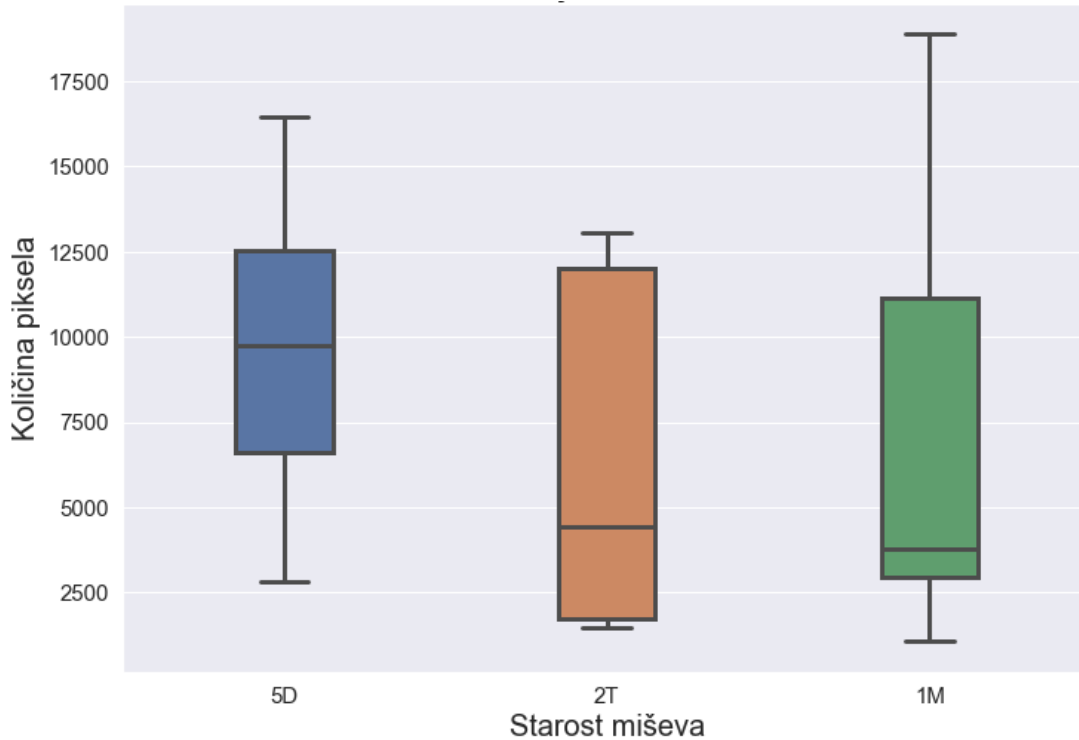


Slika 5. Izražaj **transferina** (transferinskog receptora) metodom Western blot uspoređujući tri starosne skupine genetički izmijenjenih *St8Sial1* miševa; ST – standard veličine 85 kDa, 1 – 11 broj frakcija u uzorku moždanog debla gdje frakcije tri i četiri predstavljaju frakcije lipidnih splavi, dok 10 i 11 frakcije nesplavi; 5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec.

Tablica 5.5. Vrijednosti medijana izraženih količinom piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelom **transferina** u genetički izmijenjenom mišu. (5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec). Prikazane i vrijednosti interkvartilnog raspona te, dodatno, p vrijednosti dobivene usporedbom starosnih skupina.

| Marker | Starost | Medijan | Interkvartilni raspon | | P vrijednost* |
|------------|---------|---------|-----------------------|----|---------------|
| transferin | 5D | 9733,45 | 5916,57 | 5D | 0,22 |
| | | | | 2T | |
| | 2T | 4446,72 | 10243,98 | 5D | 0,39 |
| | | | | 1M | |
| | 1M | 3798,68 | 8181,59 | 2T | 0,60 |
| | | | | 1M | |

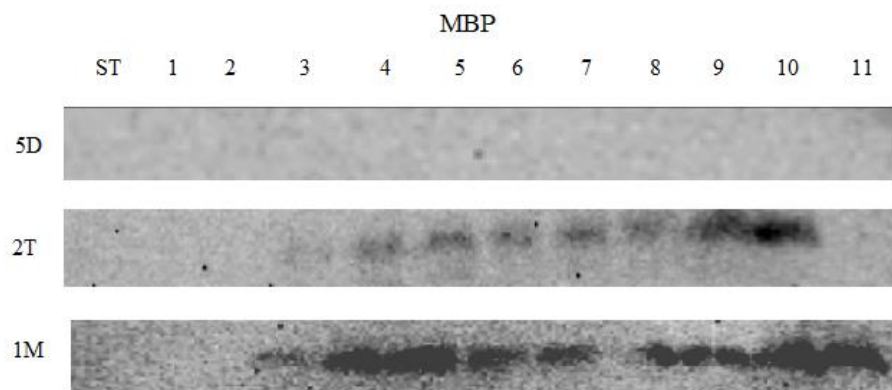
*Dobivene testom Mann-Whitney



Slika 6. Kvantitativni prikaz razlika u ekspresiji transferinskog receptora među genetički izmijenjenim *St8Sial1* miševima starim pet (5D), 15 (2T) i 30 (1M) dana. Grafički prikaz „kutija s brkovima“ ili kutijasti dijagram (engl. *box and whisker plot*) prikazuju podatke: medijan – crta u kutiji, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka.

5.3. Analiza izražaja MBP biljega u moždanom deblu genetički izmijenjenog *St8Sial1* miša

Nakon analize membrana biljezima na splavi i nesplavi iste su membrane tretirane protutijelima na biljege mijelina: MBP (engl. *myelin basic protein*), odnosno mijelinski bazični protein te na MAG (engl. *myelin-associated glycoprotein*) protein, tj. glikoprotein vezan za mijelin. Za potonje protutijelo već je rečeno da izostaje izražaj navedenog biljega u svim starosnim skupinama i u svim analiziranim frakcijama. U analizi MBP-a (Slika 7., Tablica 5.6.) rezultata nije bilo u miševima starim pet dana, dok su u dvije preostale starosne skupine (15 i 30 dana) miševa pokazali statistički značajnu razliku ($p = 0,039$) između dvije navedene nezavisne varijable testom Mann-Whitney (Tablica 5.7. i Slika 8.).



Slika 7. Izražaj **MBP-a** metodom Western blot uspoređujući dvije starosne skupine genetički izmijenjenih *St8Sial1* miševa; ST – standard veličine 42,5 kDa, 1 – 11 broj frakcija u uzorku moždanog debla gdje frakcije tri i četiri predstavljaju frakcije lipidnih splavi, a frakcije 10 i 11 nesplavi; 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec.

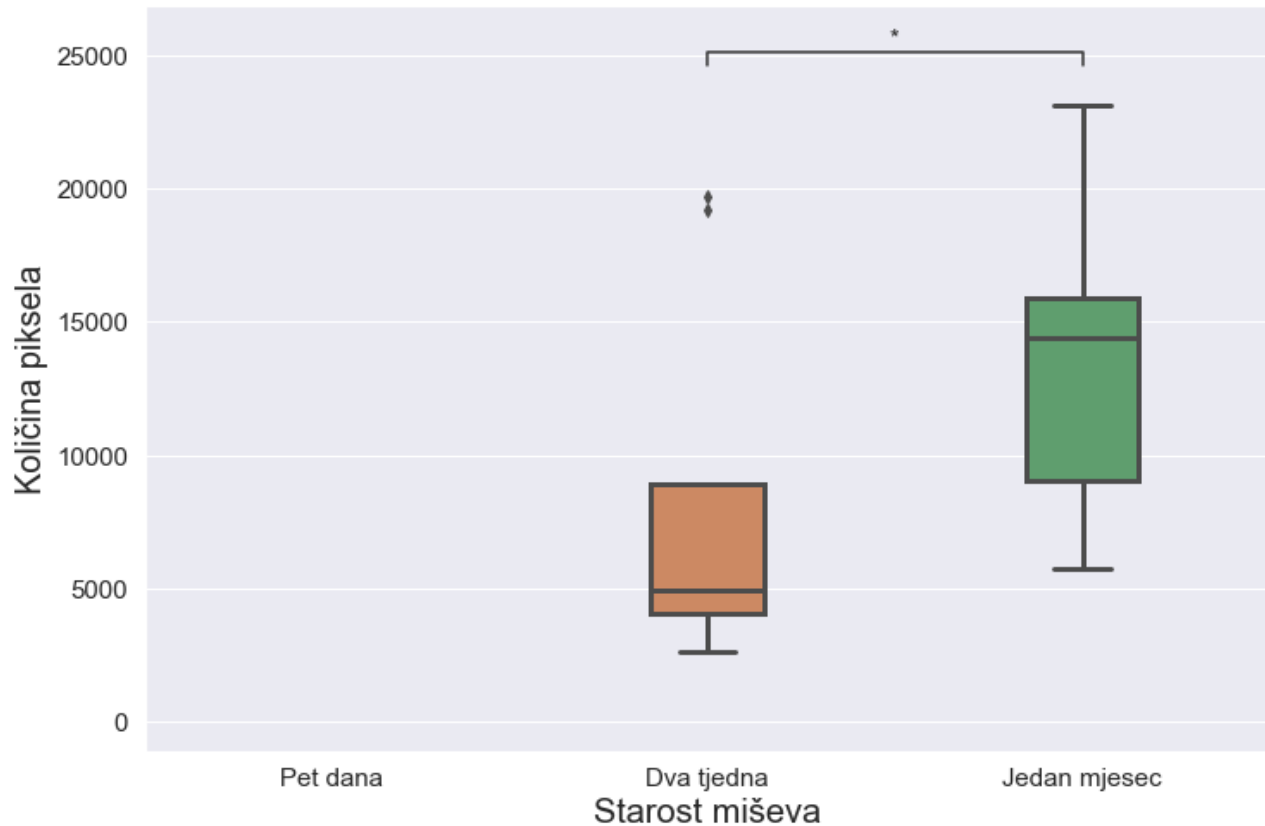
Tablica 5.6. Denzitometrijski određena područja i pripadajući postotci frakcija prema kojima je odrađena statistička analiza **MBP**-a. (Dijagonalni obrub predstavlja područje bez dobivenih podataka, odnosno bendova); rezultata nema za miševne stare pet dana.

| Standard/ Broj frakcije | <i>St8sial</i> (2 tjedna) | | <i>St8sial</i> (1 mjesec) | |
|----------------------------|---------------------------|------------|---------------------------|----------|
| | Područje | Postotak | Područje | Postotak |
| Standard | / | / | / | / |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | 2596,2 | 4,01 | 7608,2 | 6,17 |
| 4 | 4128,8 | 6,38 | 21717,3 | 17,62 |
| 5 | 4627,9 | 7,15 | 15896,7 | 12,9 |
| 6 | 3720,8 | 5,75 | 14406,6 | 11,69 |
| 7 | 5248,4 | 8,1 | 10979,8 | 8,91 |
| 8 | 5497,2 | 8,49 | 5759 | 4,67 |
| 9 | 19715,5 | 30,44 | 9032,7 | 7,33 |
| 10 | 19228 | 29,69 | 23124,9 | 18,76 |
| 11 | Bez peleta | Bez peleta | 14745,5 | 11,96 |

Tablica 5.7. Vrijednosti medijana izraženih količinom piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelom na **MBP** u genetički izmijenjenom mišu. (2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec). Prikazane su i vrijednosti interkvartilnog raspona te p vrijednost dobivene usporedbom starosnih skupina.

| Marker | Starost | Medijan | Interkvartilni raspon | P vrijednost* |
|--------|---------|----------|-----------------------|---------------|
| MBP | 2T | 4938,15 | 4903,03 | 0,039 |
| | 1M | 14406,57 | 6863,93 | |

* Dobivene testom Mann-Whitney



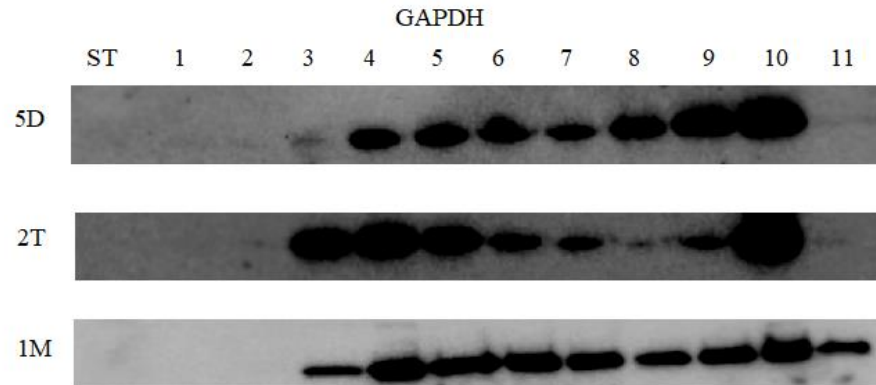
Slika 8. Odnosi starosnih skupina u izražaju **MBP**-a. Miševi stari pet dana nisu dali rezultate ni u jednoj frakciji. Primjenjujući test Mann-Whitney statistička značajnost pokazana je usporedbom miševa starih dva tjedna i jedan mjesec (15 i 30 dana) (oznaka *). Grafički prikaz „kutija s brkovima“ ili kutijasti dijagram (engl. *box and whisker plot*) prikazuju podatke: medijan – crta u kutiji, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka.

5.4. Analiza izražaja GAPDH u moždanom deblu genetički izmijenjenog *St8Sial1* miša

Naposljetku je odrađena analiza membrana na izražaj GAPDH proteina (Tablica 5.8. i Slika 9.), koji je korišten kao unutarnja kontrola, kako bi se potvrdilo da rezultati nisu dobiveni zbog neispravnog nanošenja proteina ili pogreške u njegovu transferu. Rezultati su pokazali statistički značajnu razliku usporedbom svih frakcija među tri starosne skupine miševa ($p = 0,032$) Kruskal – Wallisovim testom, dok je uspoređujući dvije po dvije grupe testom Mann-Whitney dobivena statistički značajna razlika između miševa koji su stari pet i 30 dana (Slika 10.) ($p = 0,011$), dok među ostalim miševima nema statistički značajne razlike. No, valja naglasiti da su rezultati blizu razlike u statističkoj značajnosti između miševa 15 i 30 dana starosti ($p = 0,092$). Navedene vrijednosti uz pripadajuće vrijednosti medijana i interkvartilnog raspona ispisani su u Tablici 5.9.

Tablica 5.8. Denzitometrijski određena područja i pripadajući postotci frakcija prema kojima je odrađena statistička analiza **GAPDH**-a. (Dijagonalni obrub predstavlja područje bez dobivenih podataka, odnosno bendova.)

| Standard/ Broj frakcije | <i>St8Sial1</i> (5 dana) | | <i>St8Sial1</i> (2 tjedna) | | <i>St8Sial1</i> (1 mjesec) | |
|----------------------------|--------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|----------|
| | Područje | Postotak | Područje | Postotak | Područje | Postotak |
| Standard | / | / | / | / | / | / |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | 1503,2 | 1,4 | 14447,3 | 15,01 | 4141,8 | 7,73 |
| 4 | 8106,3 | 7,54 | 18999,5 | 19,73 | 7856 | 14,66 |
| 5 | 11969,3 | 11,14 | 14034,7 | 14,58 | 4154,1 | 7,75 |
| 6 | 14148,6 | 13,17 | 8390,2 | 8,71 | 5287,6 | 9,86 |
| 7 | 10008 | 9,31 | 5612,7 | 5,83 | 7441,5 | 13,88 |
| 8 | 15925,1 | 14,82 | 915,1 | 0,95 | 6373,4 | 11,89 |
| 9 | 20790,1 | 19,35 | 6015,2 | 6,25 | 5681,3 | 10,6 |
| 10 | 24995,5 | 23,26 | 27860,6 | 28,94 | 7956,1 | 14,84 |
| 11 | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | Bez peleta | 4708,1 | 8,78 |

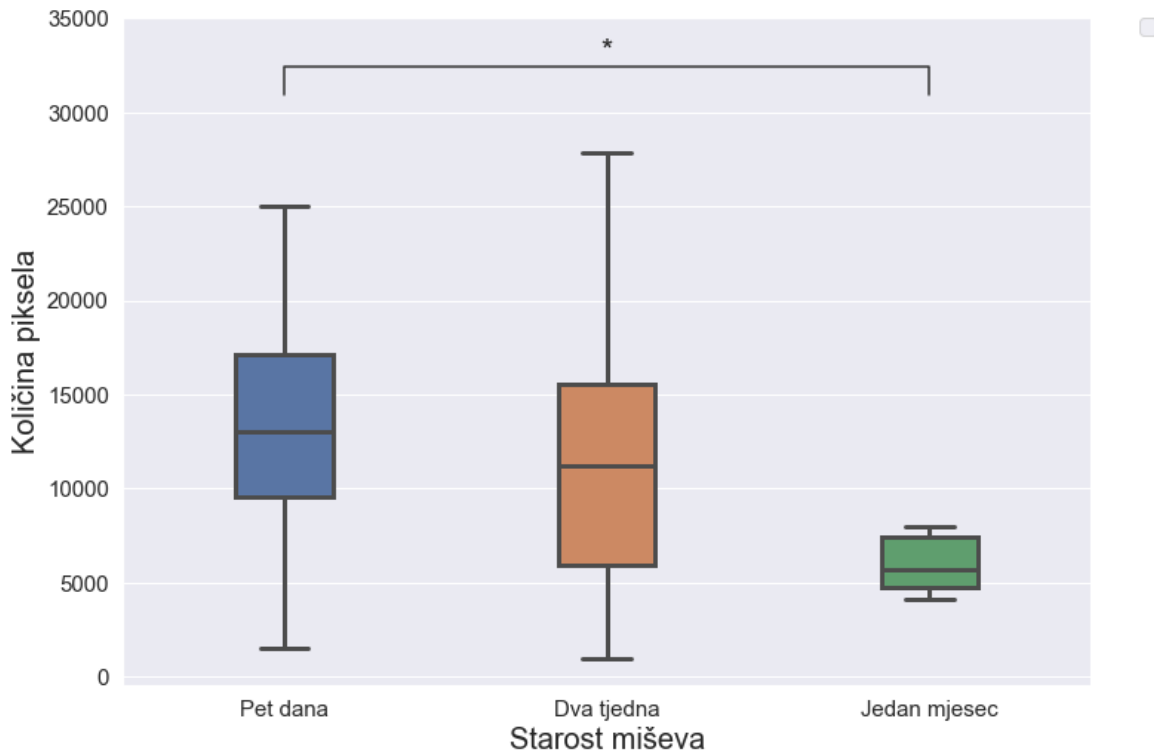


Slika 9. Izražaj **GAPDH-a** metodom Western blot uspoređujući tri starosne skupine genetički izmijenjenih *St8Sial* miševa; ST – standard veličine 37 kDa, 1 – 11 broj frakcija u uzorku moždanog debla gdje frakcije tri i četiri predstavljaju frakcije lipidnih splavi, dok 10 i 11 frakcije nesplavi; 5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec.

Tablica 5.9. Vrijednosti medijana izraženih količinom piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelom **GAPDH** u genetički izmijenjenom mišu. (5D – pet dana, 2T – dva tjedna, 1M – jedan mjesec). Prikazane i vrijednosti interkvartilnog raspona te, dodatno, p vrijednosti dobivene usporedbom starosnih skupina.

| Marker | Starost | Medijan | Interkvartilni raspon | | P vrijednost* |
|--------|---------|----------|-----------------------|----|---------------|
| GAPDH | 5D | 13058,96 | 7608,76 | 5D | 0,64 |
| | | | | 2T | |
| | 2T | 11212,47 | 9670,8 | 5D | 0,011 |
| | | | | 1M | |
| | 1M | 5681,27 | 2733,36 | 2T | 0,092 |
| | | | | 1M | |

* Dobivene testom Mann-Whitney



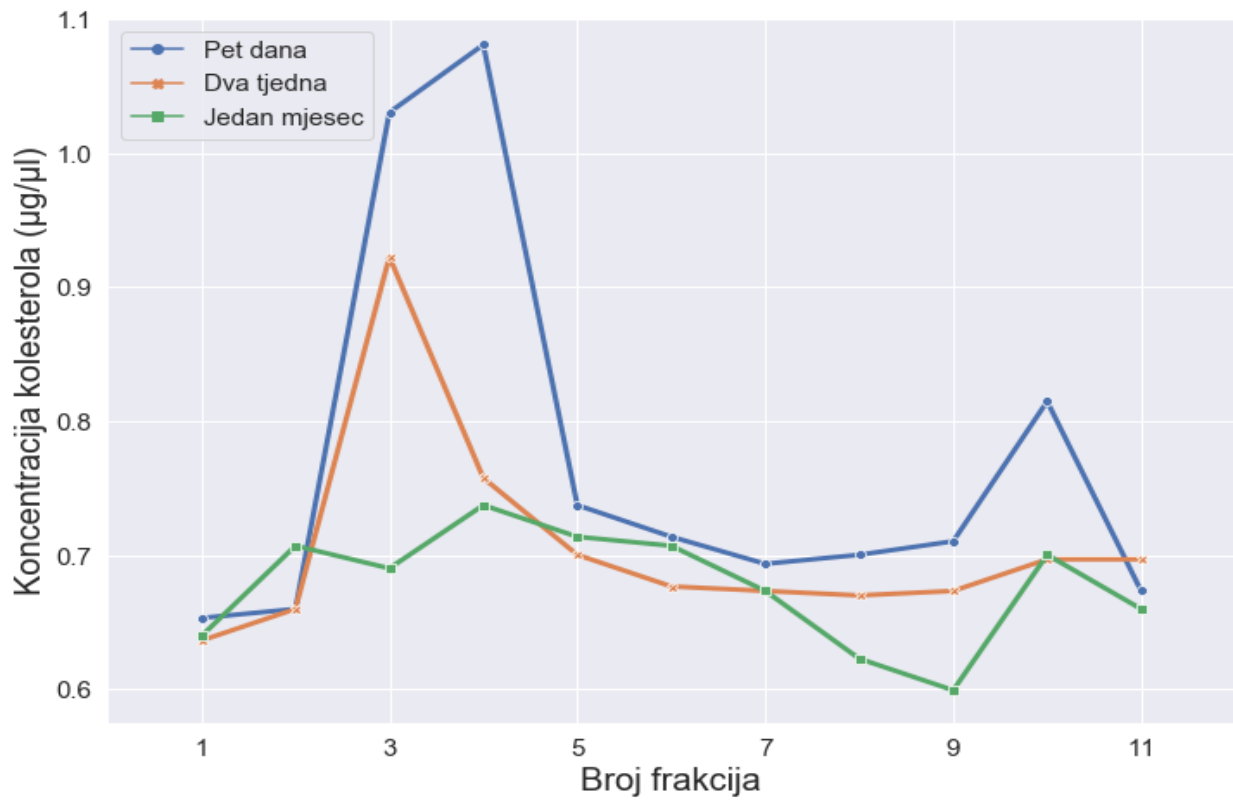
Slika 10. Kvantitativni prikaz razlika u ekspresiji **GAPDH** biljega među genetički izmijenjenim *St8Sial1* miševima starim pet, 15 (dva tjedna) i 30 (jedan mjesec) dana. Primjenjujući test Mann-Whitney statistička značajnost pokazana je usporedbom miševa starih pet i 30 dana (oznaka *). Grafički prikaz „kutija s brkovima“ ili kutijasti dijagram (engl. *box and whisker plot*) prikazuju podatke: medijan – crta u kutiji, gornja kvartila – gornji rub kutije, donja kvartila – donji rub kutije, maksimum – vrh gornjeg brka, minimum – donja granica donjeg brka.

5.5. Analiza koncentracije kolesterola u moždanom deblu genetički izmijenjenog *St8Sial* miša

Kao što je rečeno (poglavlje 4.2.4.) te s obzirom na dobivene rezultate, naknadno je analiziran sadržaj, odnosno koncentracija kolesterola u uzorcima, jer se kolesterol očekuje u visokom udjelu u frakcijama u kojima smo trebali dobiti lipidne splavi, odnosno frakcijama tri i četiri. U tablici 5.10. ispisane su vrijednosti apsorbancije (i formulom izračunate koncentracije) dobivene metodom određivanja kolesterola, dok su, dodatno, navedene vrijednosti koncentracija prikazane i grafički na slici 11. Kao što se može vidjeti, do povećanja je došlo u trećoj i četvrtoj frakciji miševa starih pet i 30 dana, dok se kod miša starog 15 dana povećanje primijeti u trećoj, a dalje slijedi pad vrijednosti sve do zadnjih frakcija u kojima se nalaze ostaci stanice.

Tablica 5.10. Dobivene apsorbancije i izračunate koncentracije kolesterola za sve tri starosne skupine (A – apsorbancija, c – koncentracija)

| Frakcije uzorka m. debla | <i>St8sial</i> (5 dana) | | <i>St8sial</i> (2 tjedna) | | <i>St8sial</i> (1 mjesec) | |
|--------------------------------|-------------------------|-----------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| | A | c (µg/µl) | A | c (µg/µl) | A | c (µg/µl) |
| 1 | 0,095 | 0,64 | 0,095 | 0,64 | 0,097 | 0,65 |
| 2 | 0,105 | 0,71 | 0,098 | 0,66 | 0,098 | 0,66 |
| 3 | 0,103 | 0,69 | 0,137 | 0,92 | 0,153 | 1,03 |
| 4 | 0,110 | 0,74 | 0,113 | 0,76 | 0,161 | 1,08 |
| 5 | 0,106 | 0,71 | 0,104 | 0,70 | 0,110 | 0,74 |
| 6 | 0,105 | 0,71 | 0,101 | 0,68 | 0,106 | 0,71 |
| 7 | 0,100 | 0,67 | 0,100 | 0,67 | 0,103 | 0,69 |
| 8 | 0,093 | 0,62 | 0,099 | 0,67 | 0,104 | 0,70 |
| 9 | 0,089 | 0,60 | 0,100 | 0,67 | 0,106 | 0,71 |
| 10 | 0,104 | 0,70 | 0,104 | 0,70 | 0,121 | 0,81 |
| 11 | 0,098 | 0,66 | 0,104 | 0,70 | 0,100 | 0,67 |



Slika 11. Koncentracija kolesterola u svim frakcijama dobivenih izolacijom lipidnih splavi iz moždanog debla genetički izmijenjenih miševa *Stδsia1*.

6. RASPRAVA

Temelj ovog rada bio je naglasiti važnost mijelina, preciznije rečeno strukturu koja čini njegovu glavnu komponentu – lipidne splavi – te pokazati kako mijenjanje molekularnih mehanizama u takvim sustavima može dovesti do određenih patofizioloških procesa u organizmu. Funkcija im je podrobno istražena te se pokazalo da su splavi uključene u brojne stanične funkcije kao što su sekrecija, endocitoza, proteoliza stanične površine i signalizacija, uključujući iniciranje kaskada MAP kinaze (engl. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) (60, 77). Uz ostale molekule koje sudjeluju u izgradnji lipidnih splavi, nama su najvažniji glikosfingolipidi kojima su splavi bogate. Naime, jedan su od tipova glikosfingolipida i gangliozidi, spojevi koji utječu na neurološku funkciju modulirajući staničnu signalizaciju. Budući da je istraživanje provedeno na miševima koji su genetički modificirani (KO), to jest s isključenim *St8Sial* genom odgovornim za biosintezu GD3 sintaze (koja proizvodi b – seriju gangliozida), po prvi je puta analizirana takva promjena u organizaciji mijelinskih mikrodomena i njene moguće promjene u izražavanju markera splavi / ne-splavi (flotilin i transferin) te markera mijelinizacije (MAG i MBP). Konkretno, radilo se na miševima koji su bili u stadiju prije procesa mijelinizacije, tijekom i nakon njega, odnosno pet, 15 i 30 dana stari.

6.1. Markeri splavi i ne-splavi

Analizirajući ekspresiju biljega splavi – flotilina – primijećena je (statistički) značajna razlika među pojedinim frakcijama te među sve tri starosne skupine KO miševa, što upućuje na razliku u izražaju navedenog biljega splavi u različitim fazama mijelinizacije. Dodatno, ista je razlika uočena analizom usporedbe miševa starih pet dana u odnosu na one stare jedan mjesec, što je također u korelaciji s očekivanom razlikom u izražaju flotilina prije mijelinizacije i nakon nje. Međutim, valja naglasiti da je, neočekivano, izražaj istog biljega primjetan jednako u trećoj i četvrtoj frakciji kao i u zadnjim frakcijama 10 i 11, u kojima se nalaze ostaci stanica i koji predstavljaju mjesta vezanja biljega transferina, to jest transferinskog receptora poznatog i kao markera ne-splavi. Potonji se također očitovao u izražavanju statistički značajne razlike uspoređujući sve tri starosne skupine, no nje nije bilo usporedbom dviju grupa miševa. No, iako specifičan isključivo kao biljeg ostatka stanične membrane te inače prisutan u zadnjim frakcijama, jednako kao u slučaju flotilina, transferin je uočen u gotovo svim frakcijama uzorka moždanog

debla, a napose u mišu starom dva tjedna, odnosno tijekom mijelinizacije. S obzirom na sveukupni izražaj flotilina i transferina, pripadajući su im rezultati upućivali na neuspjeh cijelog postupka izolacije lipidnih splavi.

6.2. Izražaj GAPDH proteina

Za dodatnu potvrdu proučili smo ekspresiju drugog proteina u našem genetički izmijenjenom *St8Sial1* mišu; odnosno gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH). Općenito govoreći GAPDH predstavlja enzim veličine 37 kDa koji sudjeluje u procesu glikolize i na taj način pomaže u oslobađanju energije razlaganjem glukoze. GAPDH je inače stabilan i eksprimiran u visokim udjelima u citoplazmi većine stanica i tkiva te zbog navedenih karakteristika služi kao unutarnja kontrola, odnosno kao potvrda kvalitete frakcija citoplazme nakon substaničnog frakcioniranja. Protutijelo je na spomenuti protein korišteno na istoj membrani ispranoj od flotilina kako bi se potvrdilo da su prisutni i neželjeni dijelovi iz citoplazme, to jest kao dodatna potvrda da postupak izolacije splavi nije uspio. Dobiveni su rezultati upućivali na pretpostavljeno jer je izražaj GAPDH-a bio očit u svim frakcijama, tj. čak i u frakcijama splavi te je pokazivao i statistički značajnu razliku među miševima starim pet, 15, odnosno 30 dana, što je i očekivano za tipičan citoplazmatski enzim dok traje proces rasta i sazrijevanja. Drugim riječima, tako dobivene količine GAPDH prisutne i u frakcijama lipidnih splavi pokazuju da je postupak izolacije doveo do nespecifične relokalizacije citoplazmatskih proteina u frakcije, odnosno na mjesta u kojima se očekuju samo splavi. Dakle, s obzirom na rezultate markera splavi i ne-splavi te GAPDH, zaključno se može reći da je izgledna izolacija stanične membrane umjesto lipidnih splavi.

6.3. Markeri mijelinizacije

Naknadno su analizirani markeri mijelina, tj. glikoprotein vezan za mijelin (MAG) i mijelinski bazični protein (MBP), oba markera koji se odnose na zrelu lozu oligodendrocita te oba specifična za Schwannove stanice (37). U slučaju MAG-a, 100 kDa velikog glikoproteina člana SIGLEC (engl. *Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins*) obitelji, uočena je korelacija u njegovoj ekspresiji s početkom mijelinizacije tijekom postnatalnog razvoja te je dodatno dokazano da je zadužen za stvaranje i održavanje mijelinske ovojnice (77). Navedeni je protein lokaliziran na unutarnjoj membrani mijelina, gdje stupa u interakciju s proteinima aksonske membrane kako

bi se mijelinska ovojnica pričvrstila na akson (77). Važnost ovih uloga MAG-a potvrđena je proučavanjem mutacije istoimenog gena uključene u demijelinizacijske bolesti poput multiple skleroze, a dodatne potvrde pokazali su genetički izmijenjeni miševi s aksonskom degeneracijom kasnog početka (engl. *late-onset*) u PŽS-u te kasnije studije u opažanjima SŽS-a (79 – 82). Nadalje, u genetički izmijenjenom mišu *B4Galnt1* s manjkom gena u sintezi GM2 / GD2 gangliozida, nedostatak GD1a i GT1b, koji su važni u održavanju mijelina i koji služe kao receptori u interakciji s MAG-om, vodi do destabilizacije mijelinske membrane te posljedično do demijelinizacije i neurodegeneracije (72, 83, 84). U našem je pak istraživanju proučavan MAG kod *St8Sial1* miševa, ali ovdje valja ponoviti da MAG protutijelo nije dalo rezultate niti u jednoj frakciji kao ni u jednoj starosnoj skupini eksperimentalnih miševa, što se može objasniti činjenicom da se izolacijom nisu dobile očekivane lipidne splavi, nego membrane. Međutim, ipak se čini da korištena protutijela nisu ispravna, s obzirom na to da se u frakcijama 10 i 11, odnosno u frakcijama gdje se nalaze ostaci stanice, neminovno očekuje izražaj navedenog markera, čak i u pretpostavljenoj izolaciji stanične membrane. Naprotiv, rezultati su drugačiji korištenjem MBP protutijela, jednog od glavnih strukturnih proteina mijelina u središnjem živčanom sustavu (s udjelom od 30 %) uz proteolipidni protein (engl. *Proteolipid protein*, PLP) (84). Uz ulogu zbijanja mijelina oko aksona (85) MBP je i jedan od glavnih razloga većinskog udjela lipida u splavima jer navedeni protein istiskuje ostale proteine iz tako zbijene mijelinske ovojnice (61, 87). Kao što je najčešće slučaj s opažanjem fenotipskih karakteristika koje ispoljavaju geni neophodni za normalne fiziološke procese, rezultati se dobivaju na mišjim modelima te gen koji kodira MBP protein nije iznimka. Najzanimljivije takvo istraživanje dobiveno je na takozvanim *Shiverer* miševima koji su pokazivali niz osobina povezanih s ovom mutacijom među kojima su drhtanje, tonični napadaji i rana smrt, uz ostale (85). Kao i u slučaju MAG-a mijelinski bazični protein marker je zrele mijelinizacije, odnosno do njegova povećavanja dolazi sazrijevanjem SŽS-a i progresijom mijelogeneze (84), što se slaže s našim rezultatima gdje je primijećen izostanak njegova izražaja kod miševa starih pet dana, odnosno u miševima u kojima još nije došlo do procesa mijelinizacije. Uspoređujući preostale miševe, stare 15 i 30 dana, razlika je vidljiva vizualno i kvantitativno, a rezultati su dodatno pokazali i statistički značajnu razliku. Oba rezultata u korelaciji su s pretpostavkom da će se MBP pojavljivati u drugačijem omjeru tijekom mijelinizacije i nakon nje.

6.4. Dodatna provjera kolesterolom i nedostaci istraživanja

Da bi se potvrdila premisa neuspješnog izoliranja splavi, na samom kraju istraživanja dodatno je napravljeno određivanje koncentracije kolesterola, koja je pak morala pokazati najveće vrijednosti u frakcijama u kojima su izolirane lipidne splavi, naime u trećoj i četvrtoj frakciji. Rezultati su potvrdili očekivanja s obzirom na to da, iako veće u prethodno spomenutim frakcijama splavi u odnosu na ostale, vrijednosti kolesterola u pretpostavljenim frakcijama nisu pokazivale dovoljno visok udio navedenog lipida. Slijedom svega navedenog može se pretpostaviti da su dobivene, to jest izolirane stanične membrane te je izgledno da cjelokupni postupak izoliranja lipidnih splavi nije bio uspješan. No, valja naglasiti da, uzimajući u obzir rezultate prva dva biljega (flotilina i transferina) izraženih i u pravovaljanim frakcijama, postupak ima potencijal te je razmatranje modifikacije metode poželjno. S obzirom na sve nabrojane analize i rezultate, istraživanje je preporučljivo podvrgnuti drugoj metodi izoliranja lipidnih splavi, primjerice korištenjem detergenata TX-100 (Triton X-100), najčešće korištenog u izolaciji splavi, iako nisu preporučljivi jer mogu proizvesti artefakte u raspodjeli gangliozida (87). Tako dobiveni rezultati mogli bi se usporediti s dobivenim rezultatima ove studije, no dodatnu se metodu nije napravilo što predstavlja glavni nedostatak našeg istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

- Upotrijebljena metoda izolacije lipidnih splavi ne daje jasnu razliku između područja splavi i ne-splavi.
- Marker flotilin, transferin i MBP pokazali su statistički značajnu razliku usporedbom 5., 15. i 30. dana razvoja *St8Sial1* miševa koja se podudara s početkom mijelinizacije.
- Rezultati mjerenja vrijednosti kolesterola ne pokazuju dovoljno visoke vrijednosti da bi se dokazala izolacija lipidnih splavi.
- Vidljiva je statistički značajna razlika kod MBP biljega u moždanom deblu KO miševa starih 5, 15 i 30 dana, koja se podudara s procesom mijelinizacije.

8. SAŽETAK

Ciljevi istraživanja: Izolirati lipidne splavi i utvrditi njihov sastav koristeći biokemijsku izolaciju splavi na miševima prije procesa mijelinizacije, tijekom i nakon njega (pet, 15 i 30 dana starosti) te uporabom specifičnih protutijela potvrditi uspješnu izolaciju splavi i usporediti razlike u mijelinizaciji među prethodno navedenim starosnim skupinama u moždanom deblu miševa s isključenim genom *St8Sial1* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida; odnosno utvrditi kako nedostatak istih utječe na organizaciju mijelinskih mikrodomena, a time i na održavanje njegova integriteta.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni KO miševi *St8Sial1* stari pet, 15 i 30 dana s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida b – serije, što je dokazano genotipizacijom pomoću specifičnih početnica. Po još neobjavljenom protokolu izolirati lipidne splavi i uzorke najzad frakcionirati. Odrediti koncentracije proteina prema Bradfordu potrebnih za Western blot analizu. Elektroforezom odvojiti proteine te ih prenijeti na membrane. Korištenjem primarnih i sekundarnih protutijela odrediti izražaj na markere flotilina i transferina, tj. markere splavi, odnosno ne-splavi te na mijelinu pridruženi glikoprotein (MAG) i mijelinski bazični protein (MBP), markere mijelinizacije. Membrane vizualizirati i slikati, a dobivene rezultate analizirati denzitometrijski pomoću računalnog programa Fiji.

Rezultati: Statistički značajnu razliku usporedbom svih triju starosnih skupina miševa pokazuju flotilin i transferin, dok MBP razliku pokazuje usporedbom miševa 15 i 30 dana starosti. Međutim, prva se dva biljege, neočekivano, nalaze u svim frakcijama umjesto u specifičnim frakcijama za navedene biljege.

Zaključak: S obzirom na rezultate flotilina i transferina izgledno je da izolacija splavi nije bila potpuna te da su izolirane stanične membrane.

Ključne riječi: lipidne splavi; mijelinizacija; *St8Sial1*

9. SUMMARY

Lipid rafts isolation before and after myelination process in the brain of a genetically modified mouse *St8sia1*.

Objectives: To isolate lipid rafts and determine their composition by using biochemical isolation in mice before, during and after the myelination process (5, 15 and 30 days old, respectively) and by using specific antibodies to confirm successful raft isolation. Furthermore, to compare the differences in myelination amongst aforementioned mice age groups in the brain stem of mice with the knock-out *St8Sial1* gene with a defect in the synthesis of complex gangliosides. To determine how the lack thereof affects the organization of the myelin microdomains, and hence the maintenance of its integrity.

Materials and methods: *St8Sial1* KO mice that are 5, 15 and 30 days old were used in the study, with a deficiency in the synthesis of complex b – series gangliosides, as confirmed by genotyping using specific primers. Lipid rafts were isolated and the samples were fractionated using a yet unpublished protocol. Determination of protein concentration using Bradford method was needed for Western blot analysis. Proteins were separated in the sample by electrophoresis and then transferred to membranes. Using the primary and secondary antibodies, the expression of flotillin and transferrin, that is raft and non-lipid-raft markers were determined; and additionally myelin-associated glycoprotein (MAG) and myelin basic protein (MBP), markers of myelination. The membranes were visualized and imaged, and the results obtained were then subjected to densitometric analysis using Fiji software.

Results: A statistically significant difference between all three age groups of mice was shown with flotillin and transferrin, while in MBP a significant difference was shown between 15 and 30 day old mice. However, the first two markers, unexpectedly, were found in all fractions, instead of the marker-specific fractions.

Conclusion: Given the results of both markers, flotillin and transferrin, it seems likely that the raft isolation was incomplete and that the cell membranes were isolated instead.

Keywords: lipid, rafts; myelination; *St8Sial1*

10. LITERATURA

1. Coggan JS, Bittner S, Stiefel KM, Meuth SG, Prescott SA. Physiological Dynamics in Demyelinating Diseases : Unraveling Complex Relationships through Computer Modeling. 2015;21215–36.
2. Norton WT, Poduslo SE. MYELINATION IN RAT BRAIN: CHANGES IN MYELIN COMPOSITION DURING BRAIN MATURATION. *J Neurochem.* 1973;
3. Chrast R, Saher G, Nave K-A, Verheijen MHG. Lipid metabolism in myelinating glial cells: lessons from human inherited disorders and mouse models. *J Lipid Res.* 2011;
4. Gopalakrishnan G, Awasthi A, Belkaid W, Jr ODF, Liazoghli D, Colman DR, et al. Lipidome and Proteome Map of Myelin Membranes. 2013;334(May 2012):321–34.
5. Boespflug-tanguy O. Inborn errors of brain myelin formation [Internet]. 1st ed. Vol. 113, *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2013. 1581–1592 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00027-7>
6. Wang S, Young KM. White matter plasticity in adulthood. *Neuroscience* [Internet]. 2014;276:148–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.10.018>
7. Bercury KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell* [Internet]. 2015;32(4):447–58. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>
8. Jessen KR, Mirsky R. Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature.* 1980;
9. Barres BA. The Mystery and Magic of Glia: A Perspective on Their Roles in Health and Disease. *Neuron.* 2008.
10. Gallo V, Deneen B. Glial development: The crossroads of regeneration and repair in the CNS. *Neuron.* 2014.
11. von Bartheld CS, Bahney J, Herculano-Houzel S. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *Journal of Comparative Neurology.* 2016.
12. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* 2009;

13. Judaš M KI. Temelji neuroznanosti, 1. izdanje. 1997. 750 p.
14. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nat Neurosci.* 2013;
15. Brody BA, Kinney HC, Kloman AS, Gilles FH. Sequence of central nervous system myelination in human infancy. I. An autopsy study of myelination. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1987;
16. Lebel C, Beaulieu C. Longitudinal Development of Human Brain Wiring Continues from Childhood into Adulthood. *J Neurosci.* 2011;
17. Nasrabady SE, Rizvi B, Goldman JE, Brickman AM. White matter changes in Alzheimer's disease: a focus on myelin and oligodendrocytes. *Acta Neuropathol Commun.* 2018;6(1):22.
18. Dawson J, Hotchin N, Lax S, Rumsby M. Lysophosphatidic acid induces process retraction in CG-4 line oligodendrocytes and oligodendrocyte precursor cells but not in differentiated oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2003;
19. Psachoulia K, Jamen F, Young KM, Richardson WD. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol.* 2009;
20. Simon C, Götz M, Dimou L. Progenitors in the adult cerebral cortex: Cell cycle properties and regulation by physiological stimuli and injury. *Glia.* 2011;
21. Woodruff RH, Fruttiger M, Richardson WD, Franklin RJM. Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination. *Mol Cell Neurosci.* 2004;
22. Krityakiarana W, Espinosa-Jeffrey A, Ghiani CA, Zhao PM, Topaldjikian N, Gomez-Pinilla F, et al. Voluntary exercise increases oligodendrogenesis in spinal cord. *Int J Neurosci.* 2010;
23. Spears N, Meyer JS, Whaling CS, Wade GN, Zucker I, Dark J. Long day lengths enhance myelination of midbrain and hindbrain regions of developing meadow voles. *Dev Brain Res.* 1990;
24. Matsumoto Y, Tsunekawa Y, Nomura T, Suto F, Matsumata M, Tsuchiya S, et al. Differential Proliferation Rhythm of Neural Progenitor and Oligodendrocyte Precursor Cells in the Young Adult Hippocampus. *PLoS One.* 2011;
25. Sánchez MM, Hearn EF, Do D, Rilling JK, Herndon JG. Differential rearing affects

- corpus callosum size and cognitive function of rhesus monkeys. *Brain Res.* 1998;
26. Sirevaag AM, Greenough WT. Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. III. Neuronal and glial nuclei, boutons, dendrites, and capillaries. *Brain Res.* 1987;
 27. Bechler ME, Swire M, French-Constant C. Intrinsic and adaptive myelination—A sequential mechanism for smart wiring in the brain. *Dev Neurobiol.* 2018;78(2):68–79.
 28. Liu J, Dupree JL, Gacias M, Frawley R, Sikder T, Naik P, et al. Clemastine enhances myelination in the prefrontal cortex and rescues behavioral changes in socially isolated mice. *J Neurosci.* 2016;
 29. Gaser C, Schlaug G. Brain Structures Differ between Musicians and Non-Musicians. *J Neurosci.* 2003;
 30. Fields RD. White matter in learning , cognition and psychiatric disorders. 2008;(June):361–70.
 31. Dimou L, Simon C, Kirchhoff F, Takebayashi H, Gotz M. Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 2008;
 32. Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current Opinion in Neurobiology.* 2006.
 33. Simons M, Trotter J. Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 2007;17(5):533–40.
 34. Patzig J, Jahn O, Tenzer S, Wichert SP, de Monasterio-Schrader P, Rosfa S, et al. Quantitative and Integrative Proteome Analysis of Peripheral Nerve Myelin Identifies Novel Myelin Proteins and Candidate Neuropathy Loci. *J Neurosci.* 2011;31(45):16369–86.
 35. Bhatheja K, Field J. Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2006.
 36. Osso LA, Chan JR. Architecting the myelin landscape. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2017;47:1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.06.005>
 37. Kangas SM, Ohlmeier S, Sormunen R, Jouhilahti EM, Peltonen S, Peltonen J, et al. An approach to comprehensive genome and proteome expression analyses in Schwann cells and neurons during peripheral nerve myelin formation. *J Neurochem.* 2016;
 38. Jessen KR, Mirsky R. The origin and development of glial cells in peripheral nerves.

- Nature Reviews Neuroscience. 2005.
39. Michailov G V., Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TH, Haug B, Birchmeier C, et al. Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. *Science* (80-). 2004;
 40. Voyvodic JT. Target size regulates calibre and myelination of sympathetic axons. *Nature*. 1989;
 41. Birey F, Kokkosis AG, Aguirre A. Oligodendroglia-lineage cells in brain plasticity, homeostasis and psychiatric disorders. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2017;47:93–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.016>
 42. Elsayed M, Magistretti PJ. A new outlook on mental illnesses: Glial involvement beyond the glue. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015.
 43. Öngür D, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in the subgenual prefrontal cortex in mood disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;
 44. Banasr M, Chowdhury GMI, Terwilliger R, Newton SS, Duman RS, Behar KL, et al. Glial pathology in an animal model of depression: Reversal of stress-induced cellular, metabolic and behavioral deficits by the glutamate-modulating drug riluzole. *Mol Psychiatry*. 2010;
 45. Bechtholt-Gompf AJ, Walther H V., Adams MA, Carlezon WA, Ngür D, Cohen BM. Blockade of astrocytic glutamate uptake in rats induces signs of anhedonia and impaired spatial memory. *Neuropsychopharmacology*. 2010;
 46. Roussos P, Katsel P, Davis KL, Siever LJ, Haroutunian V. A system-level transcriptomic analysis of schizophrenia using postmortem brain tissue samples. *Arch Gen Psychiatry*. 2012;
 47. Katsel P, Davis KL, Haroutunian V. Variations in myelin and oligodendrocyte-related gene expression across multiple brain regions in schizophrenia: A gene ontology study. *Schizophr Res*. 2005;
 48. Pedersen CB, Mortensen PB. Evidence of a dose-response relationship between urbanicity during upbringing and schizophrenia risk. *Arch Gen Psychiatry*. 2001;
 49. Lehmann ML, Weigel TK, Elkahloun AG, Herkenham M. Chronic social defeat reduces myelination in the mouse medial prefrontal cortex. *Sci Rep*. 2017;
 50. Banasr M, Valentine GW, Li XY, Gourley SL, Taylor JR, Duman RS. Chronic Unpredictable Stress Decreases Cell Proliferation in the Cerebral Cortex of the Adult Rat.

- Biol Psychiatry. 2007;
51. Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov S V., Stewart CL, et al. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*. 2006;
 52. Messing A. Alexander disease. In: *Handbook of Clinical Neurology*. 2018.
 53. Cirelli C, Gutierrez CM, Tononi G. Extensive and Divergent Effects of Sleep and Wakefulness on Brain Gene Expression. *Neuron*. 2004;
 54. Lloyd AF, Davies CL, Miron VE. Microglia: origins, homeostasis, and roles in myelin repair. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2017;47:113–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2017.10.001>
 55. Itoh K, Maki T, Lok J, Arai K. Mechanisms of cell – cell interaction in oligodendrogenesis and remyelination after stroke. *Brain Res* [Internet]. 2015;1623:135–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2015.04.039>
 56. Franklin RJM, Ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: From biology to therapy. *Nature Reviews Neuroscience*. 2008.
 57. Patel JR, Klein RS. Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination. *FEBS Letters*. 2011.
 58. Hanafy KA, Sloane JA. Regulation of remyelination in multiple sclerosis. *FEBS Letters*. 2011.
 59. Takebayashi H, Ikenaka K. Oligodendrocyte generation during mouse development. *Glia*. 2015;63(8):1350–6.
 60. Appadu AR. Lipid raft formation and peptide-lipid interactions in myelin model membranes. 2012;
 61. Schmitt S, Cantuti Castelvetti L, Simons M. Metabolism and functions of lipids in myelin. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* [Internet]. 2015;1851(8):999–1005. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.12.016>
 62. Saher G, Brügger B, Lappe-Siefke C, Möbius W, Tozawa RI, Wehr MC, et al. High cholesterol level is essential for myelin membrane growth. *Nat Neurosci*. 2005;
 63. Kolter T, Proia RL, Sandhoff K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry*. 2002.
 64. Lopez PHH, Báez BB. Gangliosides in Axon Stability and Regeneration. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2018;156:383–412.

65. Zhang X, Kiechle FL. Review: Glycosphingolipids in Health and Disease. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2004.
66. Wang Y, Kraut R, Mu Y. A β 1-25-derived sphingolipid-domain tracer peptide sbd interacts with membrane ganglioside clusters via a coil-helix-coil motif. *Int J Mol Sci*. 2015;
67. Rösner H. Developmental expression and possible roles of gangliosides in brain development. *Progress in molecular and subcellular biology*. 2003.
68. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipid metabolism in the developing brain. *Journal of Lipid Research*. 2009.
69. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev*. 2014;94(2):461–518.
70. Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Mori A, Sugiura Y, Furukawa K, et al. Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;
71. Schengrund CL. Gangliosides: Glycosphingolipids essential for normal neural development and function. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2015;40(7):397–406. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2015.03.007>
72. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, et al. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Chemtracts*. 1998.
73. Husain S, Yildirim-Toruner C, Rubio JP, Field J, Schwalb M, Cook S, et al. Variants of ST8SIA1 are associated with risk of developing multiple sclerosis. *PLoS One*. 2008;
74. Okada M, Itoh MI, Haraguchi M, Okajima T, Inoue M, Oishi H, et al. b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J Biol Chem*. 2002;277(3):1633–6.
75. Itoh MI, Fukumoto S, Iwamoto T, Mizuno A, Rokutanda A, Ishida HK, et al. Specificity of carbohydrate structures of gangliosides in the activity to regenerate the rat axotomized hypoglossal nerve. *Glycobiology*. 2001;
76. Dupree JL, Pomicter AD. Myelin, DIGs, and membrane rafts in the central nervous

- system. Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 2010.
77. Lopez PHH. Role of Myelin-Associated Glycoprotein (Siglec-4a) in the Nervous System. In 2014.
 78. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu PH, Lee VMY, Li C, et al. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci.* 1998;
 79. Weiss MD, Luciano CA, Quarles RH. Nerve conduction abnormalities in aging mice deficient for myelin-associated glycoprotein. *Muscle and Nerve.* 2001;
 80. Marcus J, Dupree JL, Popko B. Myelin-associated glycoprotein and myelin galactolipids stabilize developing axo-glia interactions. *J Cell Biol.* 2002;
 81. Pronker MF, Lemstra S, Snijder J, Heck AJR, Thies-Weesie DME, Pasterkamp RJ, et al. Structural basis of myelin-associated glycoprotein adhesion and signalling. *Nat Commun.* 2016;
 82. Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, et al. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol.* 2003;
 83. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, et al. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: Neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol.* 2005;
 84. Hartman BK, Agrawal HC, Agrawal D, Kalmbach S. Development and maturation of central nervous system myelin: Comparison of immunohistochemical localization of proteolipid protein and basic protein in myelin and oligodendrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982;
 85. Readhead C, Popko B, Takahashi N, David Shine H, Saavedra RA, Sidman RL, et al. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: Correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell.* 1987;
 86. Aggarwal S, Yurlova L, Snaidero N, Reetz C, Frey S, Zimmermann J, et al. A size barrier limits protein diffusion at the cell surface to generate lipid-rich myelin-membrane sheets. *Dev Cell.* 2011;
 87. Persaud-Sawin DA, Lightcap S, Harry GJ. Isolation of rafts from mouse brain tissue by a

detergent-free method. J Lipid Res. 2009;

11. ŽIVOTOPIS

Mateo Čupić rođen je 11. ožujka 1995. godine u Vinkovcima. Završio je OŠ Ivana Mažuranića, a potom i Prirodoslovno-matematičku gimnaziju u Vinkovcima. Godine 2014. upisuje preddiplomski studij Medicinsko-laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku, koji završava kao prvostupnik medicinsko-laboratorijske dijagnostike 2018. godine. Iste godine upisuje diplomski studij te je trenutno student druge godine.