

Distribucija markera interneurona u mozgu genetički izmijenjenih miševa St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/3

Jagodić, Matea

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

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:152:739332>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Jagodić

DISTRIBUCIJA MARKERA

INTERNEURONA U MOZGU

GENETIČKI IZMIJENJENIH MIŠEVA

ST3GAL2, ST3GAL3 I ST3GAL2/3

Diplomski rad

Osijek, 2024.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Matea Jagodić

DISTRIBUCIJA MARKERA

INTERNEURONA U MOZGU

GENETIČKI IZMIJENJENIH MIŠEVA

ST3GAL2, ST3GAL3 I ST3GAL2/3

Diplomski rad

Osijek, 2024.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 45 stranica, 12 tablica i 18 slika

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. INTERNEURONI	1
1.1.1. Somatostatin (SST)	3
1.1.2. Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)	3
1.1.3. Neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS)	4
1.2. GANGLIOZIDI	5
1.3. SIJALOTRANSFERAZE	8
1.4. GENETIČKI IZMIJENJENI MIŠEVI	9
1.5. NEUROLOŠKI POREMEĆAJI KAO POSLJEDICA PROMJENE U SASTAVU INTERNEURONA	10
2. HIPOTEZA	12
3. CILJEVI	13
4. MATERIJALI I MEODE	14
4.1. USTROJ STUDIJE	14
4.2. MATERIJALI	14
4.2.1. Pokusne životinje	14
4.2.2. Kemikalije	15
4.3. METODE	16
4.3.1. Žrtvovanje, disekcija i pohrana mozga	16
4.3.2. Priprema rezova mozga na kriostatu	16
4.3.3. Imunohistokemijska analiza	17
4.3.4. Mikroskopiranje i slikanje	18
4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA	18
5. REZULTATI	19
5.1. DISTRIBUCIJA SOMATOSTATINSKIH INTERNEURONA	19
5.1.1. Analiza primarne motoričke regije	19
5.1.2. Analiza primarne osjetne regije	20
5.1.3. Analiza primarne vidne regije	21
5.1.4. Analiza primarne slušne regije	22
5.2. DISTRIBUCIJA VIP INTERNEURONA	24
5.2.1. Analiza primarne motoričke regije	24
5.2.2. Analiza primarne osjetne regije	25
5.2.3. Analiza primarne vidne regije	26

5.2.4.	Analiza primarne slušne regije	27
5.3.	DISTRIBUCIJA nNOS INTERNEURONA.....	29
5.3.1.	Analiza primarne motoričke regije.....	29
5.3.2.	Analiza primarne osjetne regije.....	30
5.3.3.	Analiza primarne vidne regije	31
5.3.4.	Analiza primarne slušne regije	32
6.	RASPRAVA.....	34
7.	ZAKLJUČAK.....	37
8.	SAŽETAK	38
9.	SUMMARY	39
10.	LITERATURA.....	40
11.	ŽIVOTOPIS.....	44

POPIS KRATICA

Au1 – primarna slušna regija neokorteksa

Cer – ceramid

BSA – goveđi serum albumina (engl. *albumin bovine serum*)

GABA – gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*)

GAD - dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*)

HRP – hren peroksidaza

M1 – primarna motorička regija neokorteksa

Neu5Ac, SA – sijalinska kiselina

nNOS – izoforma neuronske sintaze dušikovog oksida

NO – dušikov oksid

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

PV – parvalbumin

S1 – primarna osjetna regija neokorteksa

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

SST – somatostatin

ST – sijalotransferaze

St3Gal2 – genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galaktozid α 2,3-sijalotransferaze 2

St3Gal3 – genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galaktozid α 2,3-sijalotransferaze 3

St3Gal2/3 – genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galaktozid α 2,3-sijalotransferaze 2 i 3

VIP – vazoaktivni intestinalni peptid

V1 – primarna vidna regija neokorteksa

WT – miševi divljeg tipa (engl. *wild type*)

1. UVOD

1.1. INTERNEURONI

Živčani sustav obogaćen je širokim rasponom različitih staničnih vrsta što pruža mogućnost stvaranja kompliciranih mreža koje kao rezultat imaju složena ponašanja. Glavne visoko specijalizirane stanice živčanog sustava jesu neuroni, a raspoređeni su u neuronske krugove. Ovi krugovi podijeljeni su u tri funkcionalno različite vrste neurona: aferentni i eferentni neuroni, te interneuroni (1).

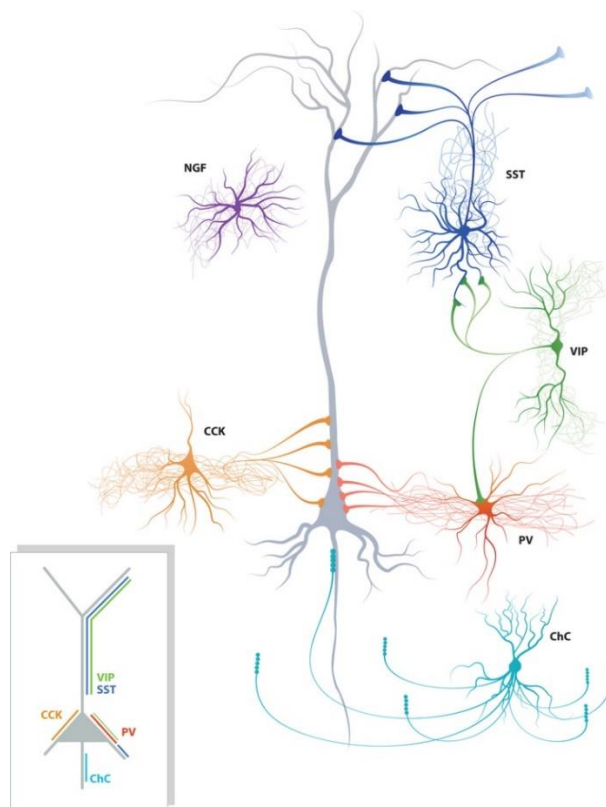
Interneuroni predstavljaju specifične vrste živčanih stanica koje se nalaze isključivo u središnjem živčanom sustavu (SŽS), uključujući mozak i leđnu moždinu. Na eferentnim neuronima formira se sinapsa nakon primanja sinaptičkog signala od osjetnih aferentnih neurona te se tako postiže cjelokupna funkcionalnost interneurona (2). Ovi neuroni, poznati su i kao inhibicijski neuroni lokalnih krugova, kroz funkciju inhibicije osiguravaju ravnotežu suzbijanjem ekscitacije kako bi se omogućila bogata i brza dinamika (3). Interneuroni kao takvi usmjeravaju protok signala te oblikuju dinamiku mreže. Postoje i eksitacijski interneuroni, no inhibicijski su oni koji koriste gama-aminomaslačnu kiselinu (GABA, engl. *gamma-aminobutyric acid*) za postizanje svojih ciljeva (4).

GABA se, osim u interneuronima, nalazi i u Purkinjeovim stanicama malog mozga gdje ima ulogu neurotransmitera projekcijskih neurona. Glutamat predstavlja preteču GABA-e, njegova sinteza odvija se uz pomoć enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline (GAD, engl. *glutamic-acid-decarboxylase*), koji se gotovo isključivo nalazi u GABAergicnim neuronima (5,6). U samom djelovanju interneurona važnu ulogu igra Ca^{2+} kao sekundarni glasnik (7). Kako bi se postigao dobar protok signala pomoću kalcija stanice izražavaju specifične proteine koji osiguravaju protok kalcija kroz staničnu membranu. Radi lakšeg razlikovanja takvi proteini nose naziv puferski proteini koji vežu kalcij (CaBP, engl. *calcium-binding proteins*) te najčešće pripadaju porodici proteina s motivom EF- *hand* (8).

Uzevši u obzir karakteristične proteine, koji ujedno predstavljaju i markere, interneuroni se mogu podijeliti u četiri glavne podskupine: parvalbumin (PV), somatostatin (SST), vazoaktivni intestinalni peptid (VIP) i reelin (RELN). Svaka od podskupina dodatno se može podijeliti u podtipove s jedinstvenom morfologijom, sinaptičkom specifičnošću, fiziološkim karakteristikama i biokemijskim svojstvima (9). Određivanje specifičnih uloga različitih

podtipova GABAergičkih interneurona temeljno je za razumijevanje kortikalne funkcije i same obrade informacija unutar cerebralnog korteksa (10).

Svaka vrsta interneurona sustavno uspostavlja dosljednu morfologiju, te na taj način ostvaruje specifične kombinacije kanala kojim se ostvaruju jedinstvena svojstva. Neuron koji somatski cilja mogu se podijeliti u dvije velike klase košarastih stanica koje eksprimiraju PV ili kolekistokinin (CCK, engl. *cholecystokinin*). Lusterske stanice (ChC, engl. *Chandelier cells*) ciljaju početni segment aksona. SST interneuroni ciljaju dendrite, dok VIP interneuroni uglavnom ciljaju SST te u manjoj mjeri PV interneurone. Neurogliaformne (NGF) stanice koriste prijenos volumena za sporu inhibiciju površinskih slojeva (Slika 1) (3). Raznolikost interneurona može se objasniti kao rezultat različitih dosljednih kombinacija koristeći specifične transkripcijske module tijekom razvoja (11). Ovakva raznolikost daje mogućnost moždanoj kori stvoriti složene operacije.



Slika 1. Prikaz raznolikosti interneurona nekoliko glavnih skupina gdje nije razlika u samom cilju djelovanja, nego i molekularnim markerima, intrinzičnim svojstvima i morfologiji. NGF-neurogliaformne stanice (engl. *neurogliaform cells*); SST-somatostatin; VIP-vazointestinalni peptid; CCK-kolecistokinin; PV-parvalbumin; ChC-lusterske stanice (preuzeto iz reference 3 i prilagođeno)

1.1.1. Somatostatin (SST)

Somatostatin, poznat kao faktor inhibiranja oslobađanja somatotropina (SRIF, engl. *somatotropin-release inhibiting factor*), čini ciklički polipeptid s dvije biološki aktivne izoforme: SRIF-14 i SRIF-28. Biološki učinci SST iskazuju se vezanjem na receptore SST-a povezane s G proteinom u plazma membrani. Ovaj polipeptid ima široki inhibicijski učinak na izlučivanje hormona, poput hormona rasta u hipotalamusu te inzulina i glukagona u gušterači (12). Njegova rasprostranjenost je široka u SŽS-u i perifernom živčanom sustavu te u sljedećim organima: gušterača, crijeva, nadbubrežna žlijezda, štitnjača, a posebno bubrezi (12). Neurpeptid SST eksprimira oko 30 % GABAergičkih interneurona što ga čini drugom najvećom populacijom GABAergičkih interneurona u moždanoj kori. Uglavnom ih povezuju s Martinottičevim stanicama, neuronima koji šalju aksone u supragranularne slojeve i granaju se u sloju 1 (10). Također, poznati su i kao GABAergični neuroni dugog dometa (13). Otkriveno je da se SST interneuroni sloja 4 i slojeva 2/3 u velikoj mjeri razlikuju (10).

1.1.2. Vazoaktivni intestinalni peptid (VIP)

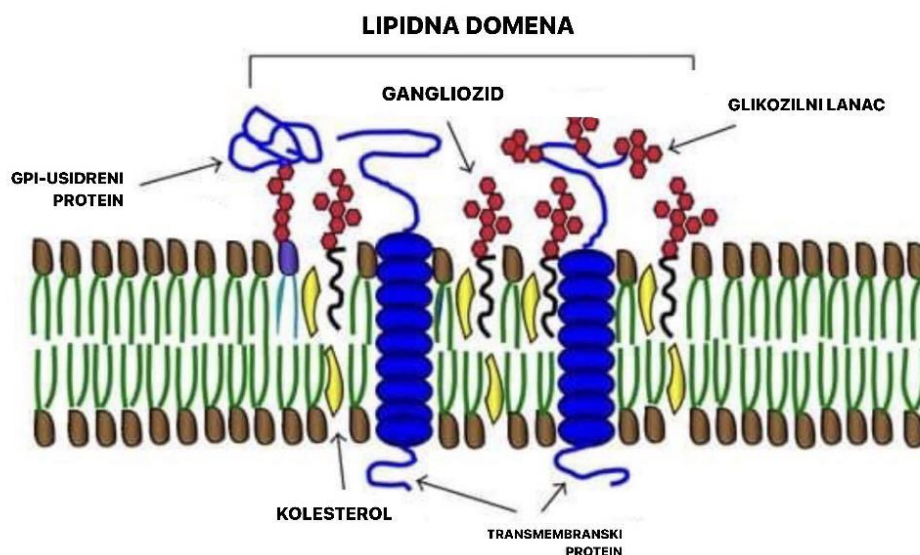
VIP predstavlja neuropeptid od 28 aminokiselina sa širokim spektrom djelovanja u različitim tkivima (14), čini regulatornu molekulu s ulogama neurotransmitera, hormona te faktora rasta i razvoja. Njegova sposobnost da utječe na preživljenje neurona, kao i na proces neurogeneze, čini ga značajnim faktorom rasta i razvoja. Kada se VIP inervira, aktiviraju se signalne kaside preko G proteina što ima značajne učinke na funkciju mozga, posebno unutar hipokampusa. Hipokampus je ključan za procese učenja i pamćenja, a VIP igra važnu ulogu u kontroli sinaptičke plastičnosti, koja uključuje mehanizme kao što su dugotrajna potencijacija (LTP, engl. *long term potentiation*) i dugotrajna depresija (LTD, engl. *long term depression*) (15,16). Otkriveno je da VIP ekspimirajući neuronski krugovi imaju značajnu ulogu u prostornom učenju potaknutom nagradom. Ovisno o stupnju i trajanju, prenatalna hipoksija predstavlja ozbiljan rizik za razvoj niza neuroloških i kognitivnih poremećaja, uključujući one koji utječu na prostorno učenje i radnu memoriju (15).

1.1.3. Neuronska sintaza dušikovog oksida (nNOS)

Izoforma neuronske sintaze dušikovog oksida (nNOS, engl. *neuronal nitric synthase*) eksprimira se različitim populacijama neokortikalnih neurona i igra ključnu ulogu u regulaciji različitih neurofizioloških procesa, posebno je izražen u određenim populacijama GABAergičnih interneurona. nNOS enzim je odgovoran za proizvodnju dušikovog oksida (NO), koji djeluje kao neurotransmiter i signalna molekula u SŽS-u (17). Poznato je da NO igra ključnu ulogu u indukciji ili regulaciji neuronske plastičnosti te je uključen u razne neuronske funkcije kao što su učenje i pamćenje, neuronska smrt i kontrolu cerebralnog protoka krvi (18).

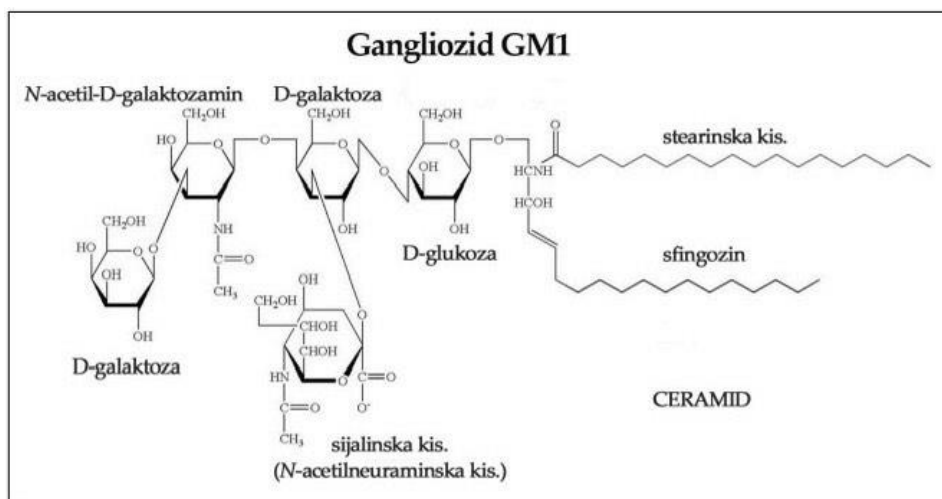
1.2. GANGLIOZIDI

Mozak kralježnjaka značajno je obogaćen glikosfingolipidima koji sadrže sijalinsku kiselinu, poznatima kao gangliozi (19). Oni su nejednako distribuirani u mozgu što zahtijeva detaljno poznavanje strukture stanične membrane i lipidnih splavi (slika 2). Stanična membrana predstavlja organiziranu strukturu proteina i lipida, pri čemu su lipidne splavi, bogate kolesterolom i glikosfingolipidima, ključne za izgradnju membrane, prijenos signala među B i T stanicama te signalizaciju ceramid-sfingomijelin povezanu s rastom, smrću i preživljavanjem stanica (20). Gangliozi čine funkcionalne komponente membranskih lipidnih splavi, koje su ključne u funkcijama kod stanične komunikacije (19).



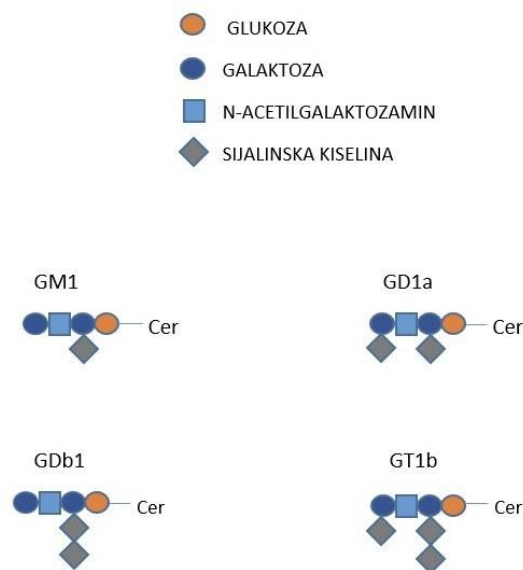
Slika 2. Prikaz strukture lipidnih splavi (preuzeto iz reference 20 i prilagođeno)

Gangliozi u svom sastavu sadržavaju ceramid kao lipidno sidro i hidrofilni ugljikohidratni lanac te jednu ili više sijalinskih kiselina. Ceramid gradi aminoalkohol sfingozin s 18 ili 20 ugljikovih atoma te masne kiseline među kojima je najčešće stearinska. Ugljikohidratni lanac je slobodan u izvanstaničnom prostoru, dok je ceramid usidren u vanjskom sloju stanične membrane (Slika 3) (21).



Slika 3. Prikaz strukturne građa gangliozida GM1 (preuzeto iz reference 22 i prilagođeno)

Među brojnim strukturama gangliozida, prema zastupljenosti se ističu četiri kompleksna gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b, koji zajedno čine oko 97 % ukupnih gangliozida mozga sisavaca, uključujući miševе i ljude (22). Sva četiri gangliozida dijele isti glikanski neutralni dio, dok se razlikuju po broju molekula vezane sialinske kiseline i mjestu njihova vezanja (unutrašnja ili vanjska galaktoza) (slika 4). Njihova sinteza odvija se postepeno, uz pomoć enzima glikotransferaze, prenoseći monosaharid iz aktivne forme u rastući glikanski lanac (23). Poznato je da prilikom nedostataka u sintezi gangliozida dolazi do neurodegenerativnih bolesti (23).



Slika 4. Prikaz strukture četiri osnovna gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u mozgu sisavaca (preuzeto iz reference 24 i prilagođeno). Cer-ceramid

Lars Svennerholm uveo je nomenklaturu gangliozida, prema kojoj slovo „G“ označava gangliozid iza kojeg slijede slova označavajući koliko sijalinske kiseline sadrži gangliozid: „M“ = jedna; „D“ = dvije; „T“ = tri; „Q“ = četiri; „P“ = pet. Brojevi koji slijede predstavljaju duljinu ugljikohidratnog lanca koji je vezan za ceramid, odnosno kromatografsku pokretljivost pojedinog gangliozida. Na kraju stoji malo slovo (-a, b ili c) i govori o kojoj seriji gangliozida je riječ (24).

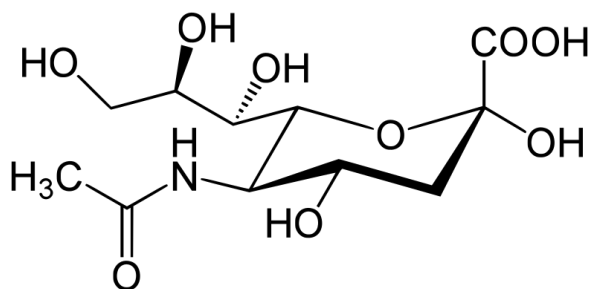
Za razgradnju glikozida potreban je enzim glikozidaza, odgovarajući pH te proteini odgovorni za transport. Sama razgradnja odvija se u endosomima i lizosomima. Na početku se uklanjanju monosaharidi djelovanjem glikozidaze, te ukoliko je prisutan defekt u prvim koracima razgradnje glikozida moguć je nastanak raznih bolesti poput Tay-Sachsova i Sandhoffova bolesti (24).

Gangliozidi igraju glavne uloge u staničnom prepoznavanju, adheziji i prijenosu signala. Posebno su važni kao regulatorne komponente koje pridonose pravilnom razvoju, održavanju i zdravlju živčanog sustava (24).

U interneuronima, koji su ključni za modulaciju i integraciju živčanih signala, gangliozidi igraju važnu ulogu u moduliranju signalnih puteva, što direktno utječe na njihovu funkciju i sposobnost komuniciranja s drugim neuronima. Biološka važnost gangliozida istaknuta je kroz analize genetički modificiranih miševa s nedostatkom specifičnih enzima za sintezu gangliozida (24).

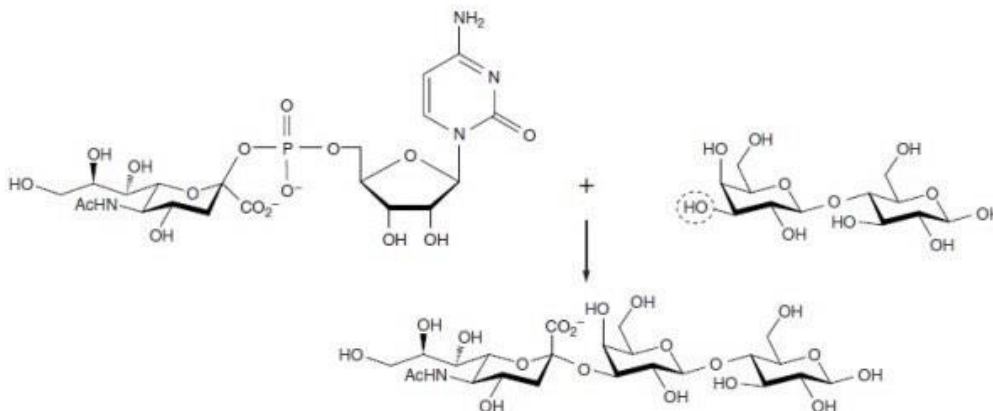
1.3. SIJALOTRANSFERAZE

Velik broj biološki aktivnih glikanskih struktura na kraju nosi esencijalni šećer s devet ugljika, poznat kao sijalinska kiselina (SA) odnosno *N*-acetilneuraminska kiselina (Neu5Ac) (25) (Slika 5).



Slika 5. Prikaz strukture sijalinske kiseline (preuzeto iz reference 26 i prilagođeno)

Sijalotransferaza (ST) pripada skupini glikoziltransferaza pomoću koje se sintetiziraju sijaloglikani. Sijalotransferaze označavaju važnu skupinu enzima s ulogom prenošenja Neu5Ac od citidin monofosfata-Neu5Ac (CMP-Neu5Ac) do različitih akceptorskih supstrata. ST koriste CMP-Neu5Ac da vrši ulogu aktiviranog donora šećera i na taj način kataliziraju prijenos SA na hidroksilnu skupinu terminalnog nereduciranog dijela oligosaharidnog lanca glikoproteina i glikolipida (Slika 6) (26).



Slika 6. Prikaz katalitičke reakcije sijalotransferaza (preuzeto iz reference 26 i prilagođeno)

Do sada je otkriveno 20 različitih ST u sisavaca. Otkrivene ST omogućavaju stvaranje kovalentnih veza te se tako mogu podijeliti u 4 osnovne skupine ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc i ST8Gal (26).

Glavna zadaća ST čini ih prepoznavanje i sinteza sijaliziranih oligosaharidnih lanaca, dok njihova struktura i specifičnost zahtijeva dodatna istraživanja. Genska opažanja u ljudskim bolestima i istraživanja na genetički izmijenjenim miševima pomažu u otkrivanju specifičnosti i funkcije sijalotransferaza te njihovih produkata (27).

1.4. GENETIČKI IZMIJENJENI MIŠEVI

Tijekom vremena razvijali su se modeli genetičkih izmijenjenih miševa s nepravilnom sintezom gangliozida kako bi se mogle istraživati njihove funkcionalne uloge. Postoji nekoliko genetički izmijenjenih mišjih modela s utišanim genima za sintezu gangliozida. Mutacije mogu dovesti do blokade cijele biosinteze gangliozida ili djelomične blokade gdje se ukupna količina gangliozida ne mijenja. Genetički izmijenjeni miševi *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*, uključuju izmjene u genima za sijalotransferaze, odgovorne za terminalnu sijalilaciju te tako i za biosintezu gangliozida. Pripadaju skupini gdje se događa djelomična blokada sinteze, odnosno skupini gdje se zadržava ekspresija gangliozida (26).

Ovi miševi pokazuju različite obrasce izražavanja i distribucije kompleksnih gangliozida u mozgu iz čega se može zaključiti o njihovoj važnosti u biosintezi gangliozida. Istraživanje ovih genetički modificiranih miševa pruža dragocjen uvid u funkciju gangliozida i distribuciju staničnih populacija povezanih s njima. Osim toga, omogućava spoznaje o tome kako promjene u sintezi gangliozida mogu modulirati različite korake u fiziološkim procesima. (28).

1.5. NEUROLOŠKI POREMEĆAJI KAO POSLJEDICA PROMJENE U SASTAVU INTERNEURONA

Poznato je da poremećaji kod funkcije interneurona nose poveznicu s neurološkim i psihijatrijskim bolestima poput autizma i shizofrenije (29). Shizofrenija je složen mentalni poremećaj koji se karakterizira poremećajima u razmišljanju, percepciji i emocionalnom reagiranju. Jedan od potencijalnih mehanizama patogeneze shizofrenije uključuje nepravilnu funkciju kortikalnih interneurona i sustava GABA-e. Istraživanja na osobama oboljelim od shizofrenije pružaju dokaze koji podržavaju hipotezu da nepravilna funkcija kortikalnih interneurona može dovesti do razvoja shizofrenije preko nekoliko mehanizama: smanjen broj sinapsi, manja količina enzima za sintezu GABA-e te promijenjene količine GABA receptora (30). Također, brojni su kongenitalni poremećaji glikozilacije, a do sada su opisana dva poremećaja koji su usko povezani upravo uz mutacije u biosintezi gangliozida. To su nedostatak ST (GM3 sintaza) i nedostatak N-acetilacetil-galaktozaminiltransferaze (GM2/GD2/GA2 sintaza) koji je povezan s kompliciranim poremećajem nasljedne spastične paraplegije (31).

Funkcija cerebralnog korteksa usmjerena je na dinamičke interakcije između ekscitatornih i inhibitornih neurona. Takvim interakcijama vladaju precizni obrasci sinaptičke povezanosti, postavljeni tijekom razvoja te oblikovani neprekinutom aktivnošću, za podršku neuralnim procesima, poput učenja (32). Kod shizofrenije, disfunkcija u ravnoteži između ekscitacije i inhibicije može rezultirati abnormalnim obrascima neuronske aktivnosti. Na primjer, smanjenje funkcije inhibitornih interneurona može dovesti do prekomjerne ekscitacije, što može izazvati simptome kao što su halucinacije i deluzije (30). Zbog složenosti kortikalnih funkcija važno je razumjeti precizne sinaptičke mehanizme koji donose normalnu funkciju te kako njihova disfunkcija može doprinijeti razvoju neuropsihijatrijskih poremećaja (32).

Neuronski krugovi sazrijevaju tijekom postnatalnog razvoja gdje GABAergični neuroni igraju bitnu ulogu, što je važno za sazrijevanje kortikalnih mreža u cjelini kako ne bi rezultiralo raznim poremećajima. Daljnja istraživanja su neophodna za bolje razumijevanje funkcije sijaloglikana u živčanom sustavu, sinteze gangliozida i njihove povezanosti s kongenitalnim poremećajima kod ljudi (28).

2. HIPOTEZA

Utišavanjem gena za pojedine sialoltransferaze doći će do promjena u biosintezi gangliozida što će za posljedicu imati i promjene u distribuciji i broju interneurona.

3. CILJEVI

Ciljevi ovog istraživanja bili su:

1. Ispitati distribuciju i broj interneurona u određenim regijama genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*.
2. Ispitati razlike distribucije i broja interneurona genetički izmijenjenih miševa i miševa divljeg tipa (WT).
3. Ispitati povezanost utišavanja gena za sijalotransferaze s distribucijom i omjerom interneurona u genetički izmijenjenim mišjim modelima.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Studija je ustrojena kao eksperimentalno istraživanje slučajeva i kontrola. Rad je napravljen u sklopu projekta naziva „Patofiziološke posljedice promjene sustava lipidnih splavi“ za što je dobiveno rješenje Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo (klasa: UP/I-322-01/14-01/96, ur. broj: 525-10/0255-15-3). Eksperimentalni dio napravljen je u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku. Za provedbu istraživanja dobiveno je odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku.

4.2. MATERIJALI

4.2.1. Pokusne životinje

Korišteni su uzorci moždanog tkiva genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* koji imaju nedostatnu sintezu gangliozida. Također, istraživanje je provedeno i na kontrolnom mišu (WT, engl. *wild type*) bez genetičkih preinaka.

Uzorci moždanog tkiva genetički preinačenih mišjih modela dobiveni su od prof. dr. sc. Ronalda L. Schnaar, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, SAD.

Korištenjem pokusnih životinja slijedile su se upute Zakona o zaštiti životinja Republike Hrvatske, kao i upute o njezi i uporabi laboratorijskih životinja Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država, Bethesda, MD.

4.2.2. Kemikalije

U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- Izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- Fosfatni pufer (PBS):
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - Na₂HPO₄ x7H₂O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KH₂OPO₄ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- D (+) – saharoza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Izopentan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Medij za kriostatsko rezanje (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan)
- DeOlmos otopina
 - 500 ml 100 mM 1×PBS (pH 7,2)
 - 300g saharoza
 - 10g polivinilpirolidon (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - 300 ml etilenglikol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - dH₂O
- Vodikov peroksid (H₂O₂ Sigma Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
- Otopina za blokiranje:
 - 0,5g BSA (engl. *albumin bovine serum*, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD)
 - 2,5 ml kozjeg seruma
 - 125 µl triton X-100 (Bio-Rad Hercules, CA, SAD)
 - 1× PBS
- Primarna mišja monoklinska protutijela:
 - anti-SST (Sigma-Aldrich)
 - anti-VIP (Sigma-Aldrich)
 - anti-nNOS (Sigma-Aldrich)
- Sekundarno protutijelo:
 - biotinizirani kozji anti-mišji IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA)

- “ABC” reagens iz seta kemikalija “Vectastain ABC Kit Elite” (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- Set kemikalija za vizualizaciju (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji sadrži diaminobenzidin (DAB)
- Vectamount pokrivalo (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)

4.3. METODE

4.3.1. Žrtvovanje, disekcija i pohrana mozga

Miševi su žrtvovani prema propisanim etičkim načelima. Kontrolni miševi, bez genetičkih preinaka, anestetizirani su izofluranom. Nakon anestezije napravljena je transkardijalna perfuzija korištenjem fosfatnog pufera i 4 %-tnog paraformaldehida. Napravljena je disekcija cijelog mozga te su uzorci fiksirani u 4 %-tnom paraformaldehydu 24 sata. Sljedeći korak bio je krioprotekcija u 10 % i 20 %-tnoj saharozi te zamrzavanje uzoraka u pothlađenom izopentanu i pohrana na -80°C do rezanja na kriostatu.

4.3.2. Priprema rezova mozga na kriostatu

Rezovi mozga napravljeni su u koronarnom smjeru, pomoću kriostata (Leica, CM3050S, Germany) pri -18 °C. Debljina rezova bila je 35 µm. Prije samog rezanja, rezovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Imunohistokemijska analiza je napravljena na plutajućim rezovima (engl. *free-floating*) te su zbog toga rezovi prikupljeni u otopinu 1xPBS-a u polistirenskim pločicama sa 24 jažice (Costar 24-well Plates, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Rezovi su čuvani na 4 °C nekoliko dana. Za duži period pohrane, rezovi su prebačeni u DeOlmos otopinu i čuvani na -20 °C.

4.3.3. Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijsko bojanje provodilo se dva dana kroz nekoliko koraka:

- Prvi korak čini predtretman rezova u 0,2 % otopini H₂O₂ u 1xPBS-u 30 minuta, na taj način blokirana je aktivnost endogenih peroksidaza u tkivu mozga
- Zatim slijedi inkubacija u otopini za blokiranje (1 % BSA, 5 % kozji serum u 1xPBS-u), tako su blokirana vezna mjesta za protein. Postupak je trajao 2 h na 4 °C uz polagano miješanje.
- Inkubacija rezova se odvijala preko noći u visokospecifičnim primarnim monoklonskim protutijelima IgG klase na 4 °C uz stalno polagano miješanje. Protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:500. Primarna protutijela koju su korištena su: anti-SST (1:500SST), anti-VIP, anti-nNOS
- Ispiranje rezova 3 × 10 min u 1× PBS-u.
- Nakon ispiranja primarnih protutijela, rezovi su inkubirani sa sekundarnim protutijelom. Sekundarno protutijelo, biotinizirano kozje anti-mišje IgG (Jackson Immunoresearch lab., West Grove, PA, USA), pripremljeno je u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1:500. Inkubacija je trajala 2 sata na 4 °C uz stalno miješanje.
- Ispiranje rezova 3 × 10 min u 1× PBS-u.
- Sljedeći korak bila je inkubacija u „ABC“ reagensu iz seta kemikalija “Vectastain ABC Kit Elite” (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Ovaj kompleks sastoji se od avidina i biotinizirane hren peroksidaze (HRP), njegova priprema traje 30 minuta prije korištenja na rezovima, kako bi se navedene komponente međusobno povezale. Avidin je taj koji se veže na biotinizirano sekundarno protutijelo.
- Ispiranje rezova 3 × 10 min u 1× PBS-u.
- Zatim se provodila vizualizacija reaktivnih protutijela inkubacijom rezova u setu kemikalija (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA). Ovaj set sadrži diaminobenzidin (DAB) supstrat za peroksidazu. Peroksidaza stvara netopljivi sivo obojeni produkt i na taj način pokazuje pozitivnu reakciju. Inkubacija traje 5 min.
- Ispiranje rezova 3 × 10 min u 1× PBS-u te jednom u destiliranoj vodi.
- Rezovi su navučeni na sijalizirana predmetna stakalca, osušeni, skenirani u Super Coolscan 9000 skeneru (Nikon, Tokyo, Japan) te pokriveni s Vectamount pokrivalom (Vector Lab, Burlingame, CA, USA).

4.3.4. Mikroskopiranje i slikanje

Pripremljene rezove mozga smo mikroskopirali korištenjem svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2MOT, Jena, Germany) na koji je montirana kamera Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan). Korištenjem montirane kamere napravljene su fotografije rezova, a povećanje pod kojim su slikani je 10x.

4.4. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Kvantifikacija imunohistokemijskog obojenja napravljena je pomoću računalnog programa *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD). Analizom slike određena je količina čestica odnosno broj pozitivnih interneurona. Statistička analiza provodila se u programu TIBCO *Statistica*® 14.1.0 (<https://docs.tibco.com/products/tibco-statistica-14-1-0>). Napravljena je deskriptivna statistika koja je izražena u tablicama kroz aritmetičku sredinu, medijan i standardnu devijaciju. Kako podaci nisu normalno distribuirani, razlike između distribucija dviju nezavisnih varijabli određene su Mann-Whitney testom, granica značajnosti iznosi $p < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. DISTRIBUCIJA SOMATOSTATINSKIH INTERNEURONA

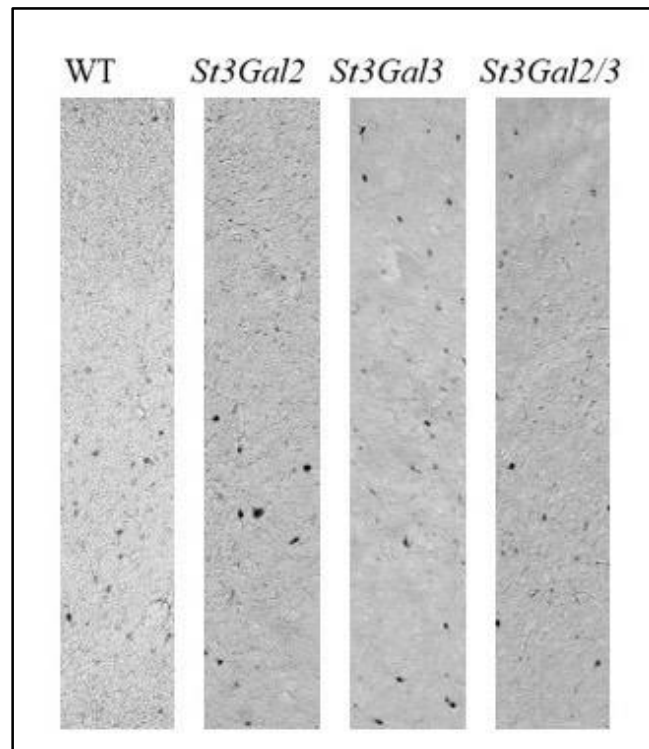
Interneuroni koji eksprimiraju SST imunohistokemijski su detektirani na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (motorička (M1), osjetna (S1), vidna (V1) i slušna regija (Au1)). Ove regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost SST u interneuronima (Slika 7, 8,9,10)

5.1.1. Analiza primarne motoričke regije

Analizom M1 regije uočeno je da *St3Gal2* KO miševi imaju gotovo jednaki broj interneurona u usporedbi sa WT miševima. Također, kod *St3Gal3* KO miševa nema značajne razlike u broju interneurona. Kod *St3Gal2/3* miševa dolazi do smanjenja broja interneurona, ali ono nije statistički značajno ($p = 0,38$) (Slika 7). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na somatostatin kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj motoričkoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
SST	M1	WT	22,67	23,00	8,50
		<i>St3Gal2</i>	21,67	16,00	13,43
		<i>St3Gal3</i>	28,67	28,00	2,08
		<i>St3Gal2/3</i>	14,67	15,00	5,51



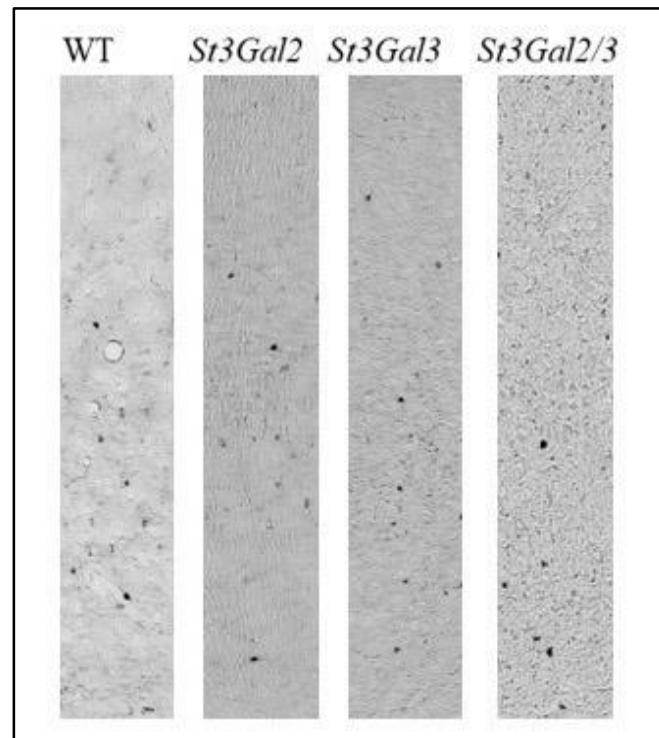
Slika 7. Imunohistokemijska analiza somatostatin interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.1.2. Analiza primarne osjetne regije

Analizom S1 regije vidljivo je povećanje kod *St3Gal2/3* miša u usporedbi sa WT mišem, ali Mann-Whitney testom nije dokazana statistička značajnost ($p = 0,08$) (Slika 8). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 2.

Tablica 2. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na somatostatin kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj osjetnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
SST	S1	WT	20,67	21,00	4,51
		<i>St3Gal2</i>	12,00	12,00	2,00
		<i>St3Gal3</i>	26,33	24,00	11,68
		<i>St3Gal2/3</i>	84,67	77,00	15,04



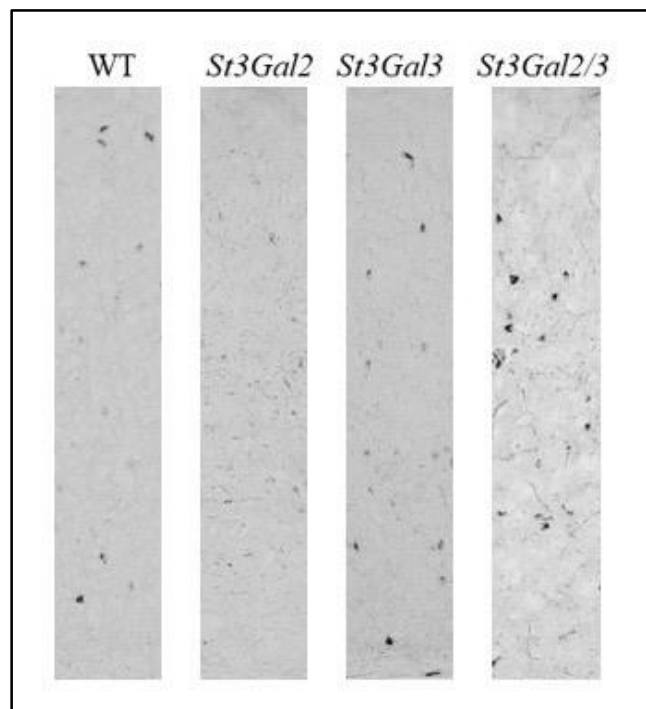
Slika 8. Imunohistokemijska analiza somatostatin interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.1.3. Analiza primarne vidne regije

Analizom V1 regije broj SST interneurona kod WT, *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa je podjednak. Kod *St3Gal2/3* dolazi do povećanja broja interneurona, u odnosu na WT (Slika 9), koje nije statistički značajno ($p = 0,08$). Deskriptivna statistika prikazana je Tablicom 3.

Tablica 3. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na somatostatin kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj vidnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
SST	V1	WT	9,00	10,00	2,65
		<i>St3Gal2</i>	10,67	10,00	1,15
		<i>St3Gal3</i>	14,00	13,00	2,65
		<i>St3Gal2/3</i>	22,67	24,00	5,13



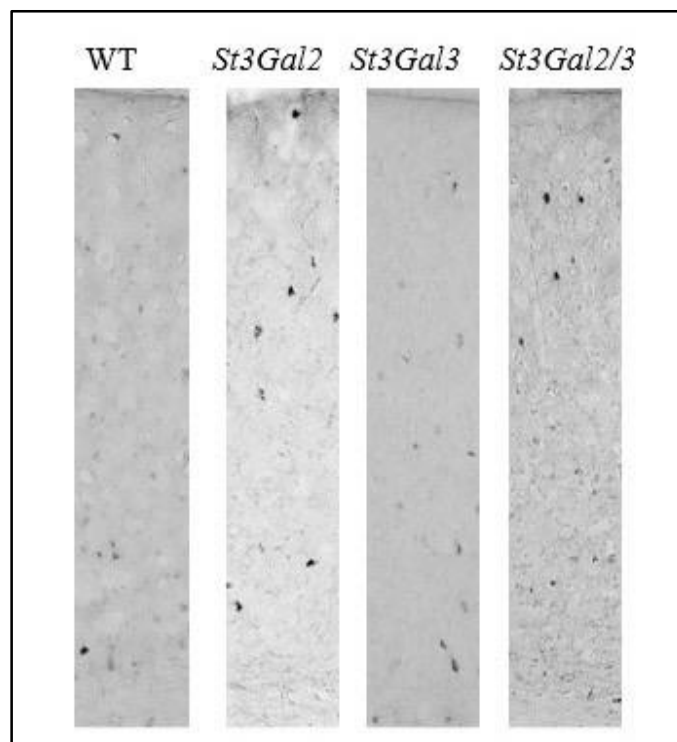
Slika 9. Imunohistokemijska analiza somatostatin interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.1.4. Analiza primarne slušne regije

Analizom Au1 regije kod genetički izmijenjenih mišjih modela *St3Gal 2* i *St3Gal3* nije došlo do značajne promjene broja interneurona u usporedbi s WT. Kod *St3Gal2/3* makroskopski je vidljivo povećanje broja interneurona, no ono nije statistički značajno ($p = 0,08$) (Slika 10). Tablica 4 prikazuje deskriptivnu statistiku.

Tablica 4. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na somatostatin kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Ga2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj slušnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
SST	Au1	WT	13,00	11,00	6,24
		<i>St3Gal2</i>	17,67	16,00	5,69
		<i>St3Gal3</i>	12,00	13,00	1,73
		<i>St3Gal2/3</i>	49,67	32,00	36,83



Slika 10. Imunohistokemijska analiza somatostatin interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.2. DISTRIBUCIJA VIP INTERNEURONA

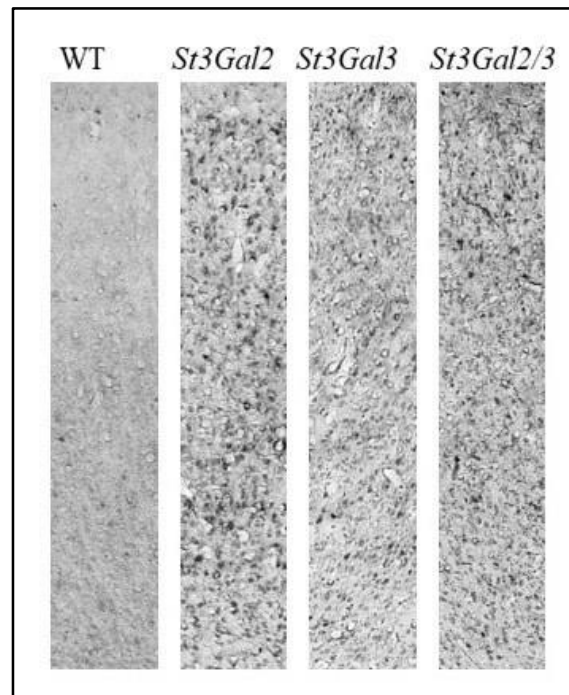
VIP interneuroni imunohistokemijski su detektirani na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1). Ove regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost VIP u interneuronima (Slika 11, 12, 13, 14)

5.2.1. Analiza primarne motoričke regije

Analizom M1 regije kod miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* vidljivo je povećanje (Slika 11), Mann-Whitney test pri usporedbi WT s genetički izmijenjenim miševima nije pokazao statističku značajnost ($p = 0,08$). U Tablici 5 prikazana je deskriptivna statistika.

Tablica 5. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na VIP kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj motoričkoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
VIP	M1	WT	12,00	12,00	1,00
		<i>St3Gal2</i>	162,33	154,00	29,40
		<i>St3Gal3</i>	146,67	144,00	23,12
		<i>St3Gal2/3</i>	176,33	180,00	66,58



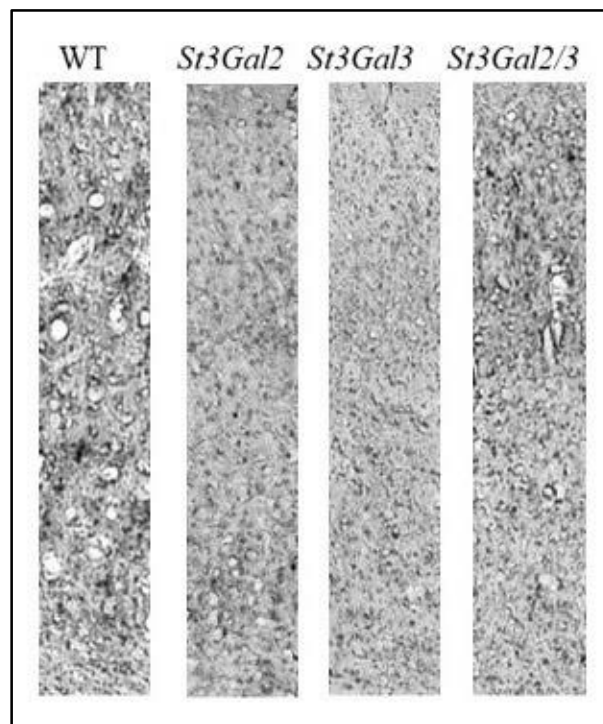
Slika 11. Imunohistokemijska analiza VIP interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.2.2. Analiza primarne osjetne regije

Analizom S1 regije vidljivo je povećanje broja VIP pozitivnih interneurona kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* (Slika 12). Usporedbom dobivenih rezultata s WT miševima, Mann-Whitney test nije pokazao statistički značajnu razinu ($p = 0,08$). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 6.

Tablica 6. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na VIP kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj osjetnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
VIP	S1	WT	31,00	33,00	4,36
		<i>St3Gal2</i>	95,67	106,00	18,77
		<i>St3Gal3</i>	115,33	119,00	20,74
		<i>St3Gal2/3</i>	131,67	132,00	22,50



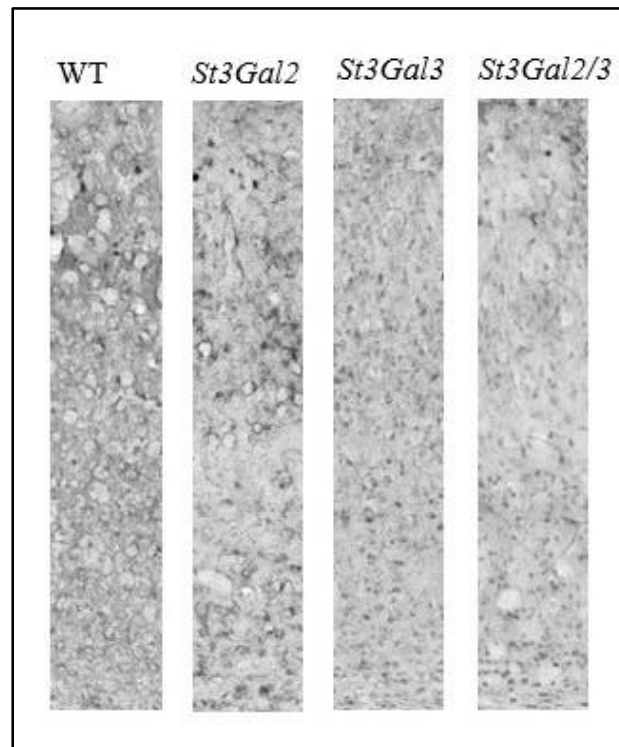
Slika 12. Imunohistokemijska analiza VIP interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.2.3. Analiza primarne vidne regije

V1 regija pokazuje povećanje broja VIP interneurona u genetički izmijenjenim mišjim modelima *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* (Slika 13), međutim dobiveni rezultati Mann-Whitney testa gdje su uspoređeni s WT nisu statistički značajni ($p = 0,08$). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 7.

Tablica 7. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na VIP kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj vidnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
VIP	V1	WT	8,67	9,00	2,52
		<i>St3Gal2</i>	22,33	19,00	7,57
		<i>St3Gal3</i>	59,00	61,00	10,15
		<i>St3Gal2/3</i>	60,00	60,00	16,00



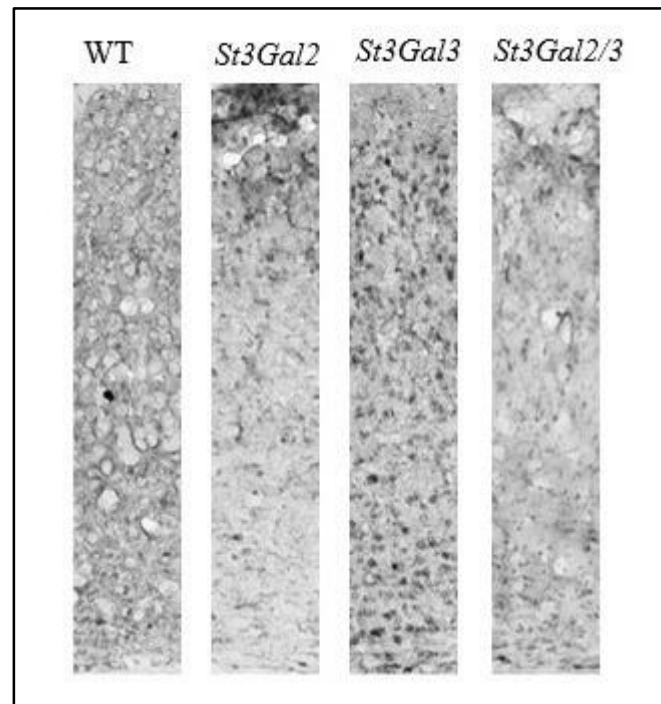
Slika 13. Imunohistokemijska analiza VIP interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.2.4. Analiza primarne slušne regije

Au1 regija uočava povećanje broja VIP interneurona kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* (Slika 14), Mann-Whitney testom povećanje broja VIP pozitivnih interneurona u odnosu na WT nije statistički značajno ($p = 0,08$). Deskriptivna statistika prikazana je Tablicom 8.

Tablica 8. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na VIP kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj slušnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
VIP	Au1	WT	5,67	5,00	2,08
		<i>St3Gal2</i>	51,33	57,00	10,69
		<i>St3Gal3</i>	161,33	159,00	37,55
		<i>St3Gal2/3</i>	20,33	20,00	2,52



Slika 14. Imunohistokemijska analiza VIP interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.3. DISTRIBUCIJA nNOS INTERNEURONA

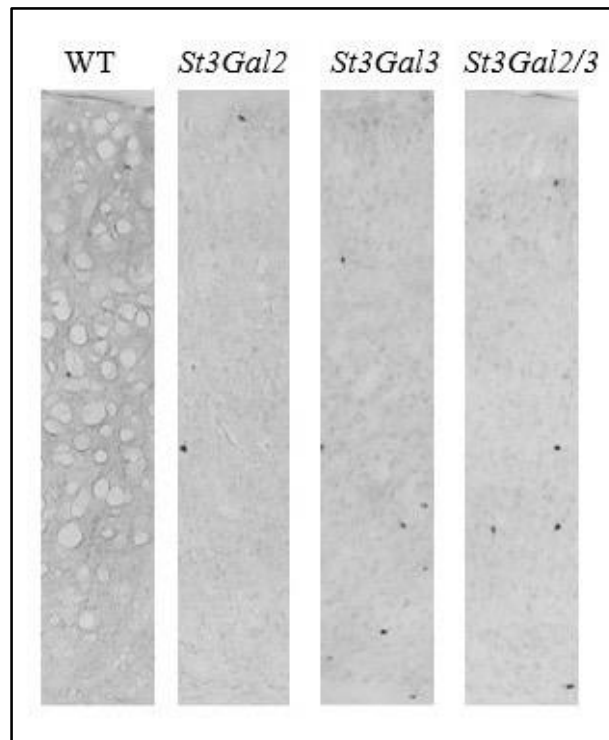
nNOS interneuroni imunohistokemijski su detektirani na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1). Ove regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost nNOS u interneuronima (slika 15, 16, 17, 18).

5.3.1. Analiza primarne motoričke regije

Napravljena je deskriptivna statistika, koja je prikazana u Tablici 9. Promjene u broju interneurona kod promatranih genetički izmijenjenih miševa nisu uočene (Slika 15), Man-Whitney testom nije dobivena statistički značajna razlika između genetički izmijenjenih miševa i WT ($p_{St3Gal2} = 0,66$; $p_{St3Gal3, St3Gal2/3} = 0,27$).

Tablica 9. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na nNOS kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj motoričkoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
nNOS	M1	WT	3,00	3,00	1,00
		<i>St3Gal2</i>	3,00	3,00	1,00
		<i>St3Gal3</i>	6,00	6,00	3,00
		<i>St3Gal2/3</i>	6,00	5,00	3,60



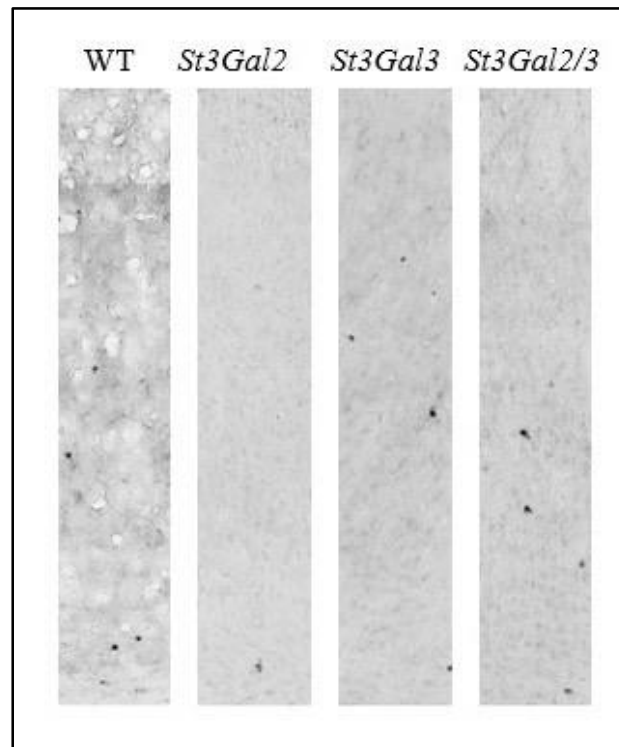
Slika 15. Imunohistokemijska analiza nNOS interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.3.2. Analiza primarne osjetne regije

Analizom S1 regije promjene u broju interneurona nisu uočene (Slika 16). Podaci dobiveni Mann-Whitney testom u kojem se uspoređuju WT s genetički izmijenjenim miševima nisu pokazali statističku značajnu razliku niti među jednom uspoređivanom grupom ($p_{St3Gal2} = 0,38$, $p_{St3Gal3} = 0,83$, $p_{St3Gal2/3} = 0,66$). Tablica 10 prikazuje deskriptivnu statistiku.

Tablica 10. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na nNOS kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj osjetnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
nNOS	S1	WT	4,33	4,00	2,51
		<i>St3Gal2</i>	2,33	2,00	0,58
		<i>St3Gal3</i>	5,33	4,00	3,21
		<i>St3Gal2/3</i>	7,33	4,00	5,77



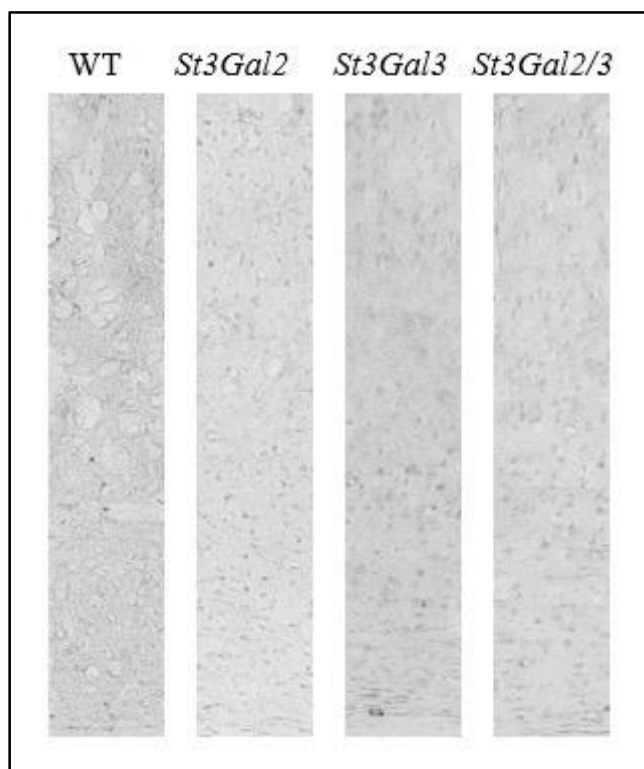
Slika 16. Imunohistokemijska analiza nNOS interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.3.3. Analiza primarne vidne regije

Analizom V1 regije vidljive su promjene u broju interneurona kod *St3Gal2* i *St3Gal2/3* u odnosu na WT (Slika 17). Deskriptivnu statistiku prikazuje Tablica 11. Mann-Whitney testom nije dobivena niti jedna statistički značajna razlika između WT i genetički izmijenjenih mišjih modela ($p_{St3Gal2} = 0,08$, $p_{St3Gal3} = 0,83$, $p_{St3Gal2/3} = 0,08$).

Tablica 11. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na nNOS kod genetički preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj vidnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
nNOS	V1	WT	6,33	6,00	1,53
		<i>St3Gal2</i>	77,33	77,00	16,50
		<i>St3Gal3</i>	12,00	7,00	10,44
		<i>St3Gal2/3</i>	28,67	32,00	10,41



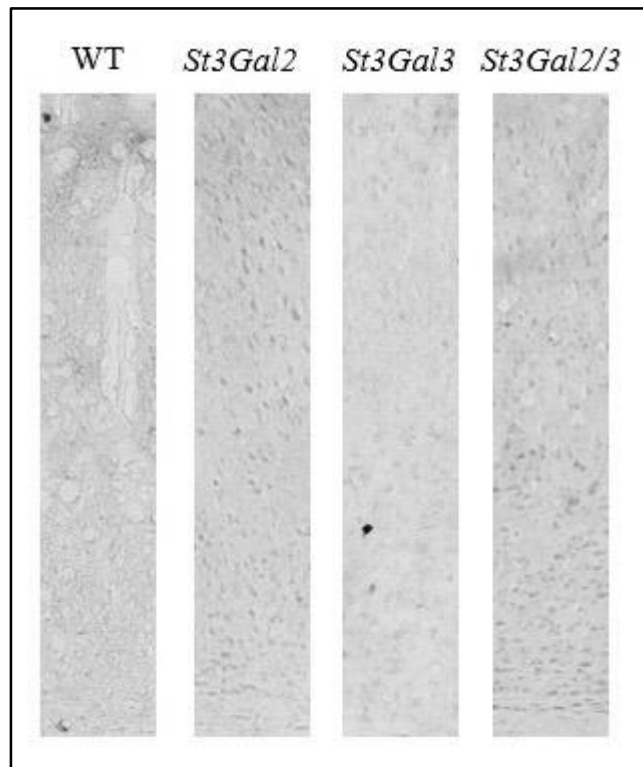
Slika 17. Imunohistokemijska analiza nNOS interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

5.3.4. Analiza primarne slušne regije

Analizom Au1 regije vidljivo je povećanje broja nNOS interneurona kod *St3Gal2* te *St3Gal2/3* genetski preinačenih mišjih modela usporedno s WT (Slika 18), razlike nisu statistički značajne ($p = 0,08$). Deskriptivna statistika prikazana je u Tablici 12.

Tablica 12. Deskriptivna statistika interneurona pozitivnih na nNOS kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i WT miša u primarnoj slušnoj regiji korteksa.

MARKER	REGIJA	TIP MIŠA	ARITMETIČKA SREDINA	MEDIJAN	STANDARDNA DEVIJACIJA
nNOS	Au1	WT	6,00	5	1,73
		<i>St3Gal2</i>	50,67	47	11,93
		<i>St3Gal3</i>	4,67	4	1,15
		<i>St3Gal2/3</i>	58	60	3,46



Slika 18. Imunohistokemijska analiza nNOS interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

6. RASPRAVA

Interneuroni igraju ključnu ulogu u modulaciji neuronskih mreža i održavanju ravnoteže između ekscitacijskih i inhibicijskih signala u mozgu. Njihovi poremećaji često su povezani s različitim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima (3). Ova raznolika skupina neurona dijeli se prema morfologiji, funkciji i ekspresiji specifičnih markera, poput VIP-a i SST te igra ključnu ulogu u regulaciji neuronske aktivnosti (9). Poremećaji funkcije interneurona povezani su s bolestima kao što su autizam i shizofrenija. Jedan od mogućih mehanizama nastanka shizofrenije uključuje disfunkciju kortikalnih interneurona i GABA sustava. Provođenjem istraživanja na osobama sa shizofrenijom dobivaju se dokazi koji podržavaju hipotezu da disfunkcija kortikalnih interneurona može dovesti do razvoja shizofrenije putem nekoliko mehanizama (30). Nedavna istraživanja na životinjama također sugeriraju da molekularni temelji poremećaja poput shizofrenije, autizma i intelektualne teškoće mogu biti povezani sa specifičnim nedostacima u razvoju i funkciji interneurona (35).

Interneuroni mogu biti pod utjecajem gangliozida, na način da promjene u njihovom sastavu ili funkciji doprinose disfunkciji interneuronskih mreža, što je povezano s različitim neurodegenerativnim bolestima. Promjene u sastavu ili količini gangliozida uočene su u neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti (37). Kako bi se razjasnile funkcije gangliozida, razvijeni su različiti genetski modificirani mišji modeli sa smanjenom ili povećanom sintezom gangliozida, kao i modeli s izmijenjenim genima koji kodiraju enzime odgovorne za biosintezu ili razgradnju gangliozida (26). Prethodnim istraživanjima utvrđeno je da su produkti gena *St3Gal2* i *St3Gal3* u velikoj mjeri odgovorni za terminalnu sijalilaciju α 2-3 u mozgu te na taj način sintetiziraju glavne moždane gangliozide GD1a i GT1b (33). Ovim radom istražuje se postoje li promjene u distribuciji interneurona specifičnih markera kod genetički izmijenjenih miševa čije su preinake upravo u genima koji su odgovornim za biosintezu gangliozida, te se na taj način omogućava dublje razumijevanje utjecaja genetičkih modifikacija na strukturalnu organizaciju neuronskih mreža.

U ovom su radu analizirane četiri primarne regije neokorteksa M1, S1, V1 i Au1 i tri markera interneurona SST, VIP i nNOS. Rezultati dobiveni na genetički izmijenjenim miševima *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* uspoređivani su s miševima divljeg tipa - WT.

Markeri poput SOM, VIP i nNOS su ključni alati za istraživanje i razumijevanje kompleksnih neuralnih mreža u mozgu, pružajući važne uvide u raznolikost i funkcionalnu

specifičnost interneurona. Proučavani markeri SST, VIP i nNOS zabilježeni su u sve četiri primarne regije mozga što potvrđuje značajnost navedenih markera u neuronskim krugovima i samoj funkciji.

Poznato je da SST pozitivni interneuroni čine 30 % svih inhibicijskih stanica u korteksu te sudjeluju u inhibicijskim mrežama (13). VIP pozitivni interneuroni čine samo 1-2 % svih kortikalnih stanica. Kako bi otkrili koja je uloga VIP pozitivnih interneurona u regulaciji modulacije stanja lokalnih krugova provedeno je istraživanje koje koristi V1 regiju kao model funkcije lokalnog kruga. Otkrivena je ključna uloga u regulaciji selektivnosti kortikalnih vidnih značajki, ovo ide u prilog pojavnosti VIP interneurona u V1 regiji te samom značaju VIP interneurona (34).

Usporedbom s WT, kod *St3Gal2/3* miševa uočava se povećanje SST interneurona u S1, V1, Au1 regiji, jedino je u M1 regiji vidljivo smanjenje. Kod *St3Gal2/3* miševa pojačana je ekspresija GM1 gangliozida, što je također jedan od mogućih faktor koji utječe na promjene u neurološkoj funkciji (1). Potrebno je dodatno odrediti na kojim se točno stanicama eksprimira GM1. Ovo je potkrijepljeno istraživanjem koje je pokazalo da ubrizgavanje GM1 gangliozida u motoričku i senzoričku regiju korteksa štakora uzrokuje nastanak reverzibilnih epileptičkih napada (36).

U sve četiri promatrane regije uočava se povećanje interneurona pozitivnih na marker VIP kod *St3Gal2*, *St3Gal3*, a posebice kod *St3gal2/3* u usporedbi s WT miševima. Broj interneurona koji eksprimiraju nNOS nije pokazao promjene u motoričkoj i osjetnoj regiji, međutim njihovo je povećanje uočeno u vidnoj i slušnoj regiji kod *St3Gal2* i *ST3Gal2/3* miševa. Vidljive promjene između genetički izmijenjenih miševa i WT u broju interneurona statistički su uspoređene Mann-Whitney testom te nije uočena statistička značajnost, odnosno p vrijednost usporedbe ne prelazi prag značajnosti $p < 0,05$.

Istraživanja poput ovih imaju nekoliko nedostataka, a jedan od njih je upravo broj uzorka jer se radi o genetički izmijenjenim mišjim modelima. Ujedno i glavni nedostatak ovog istraživanja. Uočena je i varijabilnost u podacima unutar skupine što dodatno otežava analizu. S obzirom na analizu nekoliko regija neokorteksa i tri markera, istraživanje bi trebalo ponoviti na većem broju uzoraka. Također, kako je korteks slojevita struktura, analizu interneurona bi trebalo napraviti po slojevima. Tada bi usporedba između genetički izmijenjenih mišjih modela i WT imala veći broj varijabli te tako bila reprezentativnija. Ujedno se preporuča provođenje funkcionalnih studija kako bi se razumjelo na koji način promjene u broju VIP i nNOS

interneurona utječu na ponašanje i neurofiziološke procese. Takva istraživanja mogu uključivati elektrofiziološka ispitivanja, ponašajne testove i analize mrežne aktivnosti.

Inhibicijski interneuroni su od presudne važnosti za funkciju moždane kore i ponašanje. Mehanizmi koji kontroliraju raznolikost i raspodjelu inhibitornih neurona u različitim regijama korteksa još su uvijek nedovoljno istraženi. Ovo istraživanje, kao i sva buduća istraživanja na ovu temu, doprinose razjašnjavanju tih mehanizama.

Ovakvo istraživanje pruža korisne uvide koji mogu poslužiti kao polazna točka za buduće istraživanje sa širim i raznovrsnijim uzorkom. Također, naglašava ključnu ulogu *St3Gal* gena u regulaciji distribucije interneuronskih markera. Rezultati ovog istraživanja mogli bi doprinijeti razumijevanju funkcije sialoglikana u živčanom sustavu, sinteze gangliozida i njihove povezanosti s kongenitalnim poremećajima kod ljudi.

7. ZAKLJUČAK

- Primjenom specifičnih protutijela SST, VIP, nNOS uočena je distribucija interneurona u četiri primarne regije neokorteksa M1, S1, V1, Au1

- Usporedbom genetički izmijenjenih mišjih modela s WT uočene su promjene u broju i distribuciji interneurona, međutim promjene u broju pozitivnih interneurona nisu toliko velike da bi bile statistički značajne:
 - SST marker u svim promatranim regijama uočava povećanje broja interneurona kod *St3Gal2/3*, jedino je u motoričkoj regiji vidljivo smanjenje
 - nNOS marker ne prikazuje promjene u broju interneurona u motoričkoj i osjetnoj regiji, međutim uočeno je povećanje interneurona vidne i slušne regije kod *St3Gal2* i *ST3Gal2/3* miševa
 - VIP marker prikazuje povećanje broja interneurona kroz sve četiri promatrane regije kod *St3Gal2*, *St3Gal3*, a posebice kod *St3gal2/3*

- Utišavanjem gena za sijalotransferaze genetički izmijenjenih mišjih modela distribucija i omjer interneurona se mijenja ovisno o markeru koji je korišten

8. SAŽETAK

Ciljevi: Ispitati distribuciju i broj interneurona u određenim regijama genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* korištenjem specifičnih protutijela (SST, VIP i nNOS). Ispitati postoje li razlike distribucije i broja interneurona genetički izmijenjenih miševa i miševa divljeg tipa (WT) te ispitati povezanost utišavanja gena za sijalotransferaze s distribucijom i omjerom interneurona u genetički izmijenjenim mišjim modelima.

Nacrt studije: Eksperimentalno istraživanje slučajeva i kontrola.

Materijali i metode: U istraživanju su korišteni uzorci moždanoga tkiva genetički izmijenjenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3gal3*, *St3Gal2/3* s nedostatkom u sintezi kompleksnih gangliozida te kontrolni miš divljeg tipa (WT). Imunohistokemijska analiza provedena je koristeći protutijela SST, VIP, nNOS. Fotografije su analizirane u programu *Fiji*, a statistika je napravljena u programu *TIBCO Statistica* ® 14.1.0

Rezultati: Analiziranjem distribucije markera SST, VIP i nNOS interneurona u mozgu genetički izmijenjenih miševa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* distribucija interneurona uočena je sve u četiri primarne regije neokorteksa M1, S1, V1, Au1. Usporedbom genetički izmijenjenih mišjih modela s WT uočene su promjene u broju i distribuciji interneurona, međutim promjene u broju pozitivnih interneurona nisu toliko velike da bi bile statistički značajne.

Zaključak: U sve četiri primarne regije neokorteksa uočena je distribucija markera interneurona SST, VIP i nNOS. Usporedbom s WT nije dokazana statistička značajnost.

Ključne riječi: gangliozidi; genetički izmijenjeni miševi; interneuroni

9. SUMMARY

Distribution of interneuron markers in the brains of genetically modified mice *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3*

Objectives: To examine the distribution and number of interneurons in specific regions of genetically altered mice *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3* using specific antibodies (SST, VIP and nNOS). To examine whether there are differences in the distribution and number of interneurons between genetically modified mice and wild-type (WT) mice, and to examine the association of sialotransferase gene silencing with the distribution and ratio of interneurons in genetically modified mouse models.

Study Design: An experimental case-control study.

Material and methods: Brain tissue samples from genetically altered mouse models *St3Gal2*, *St3gal3*, *St3Gal2/3* with a deficiency in the synthesis of complex gangliosides and a control wild-type mouse (WT) were used in the research. Immunohistochemical analysis was performed using SST, VIP, and nNOS antibodies. Photos were analyzed in the *Fiji* program, and the statistics were made in the program TIBCO *Statistica* ® 14.1.0

Results: By analyzing the distribution of SST, VIP and nNOS interneuron markers in the brains of genetically modified mice *St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/3*, the distribution of interneurons was observed in all four primary regions of the neocortex M1, S1, V1, Au1. By comparing genetically modified mouse models with WT, changes in the number and distribution of interneurons were observed, however, the changes in the number of positive interneurons were not so large as to be statistically significant.

Conclusion: The distribution of interneuron markers SST, VIP and nNOS was observed in all four primary regions of the neocortex. Comparison with WT did not demonstrate statistical significance.

Key words: gangliosides; genetically modified mice; interneurons

10. LITERATURA

1. Blažetić S, Distribucija osnovnih kemijskih fenotipova interneurona u mozgu 3 genetski preinačena mišja modela s isključenim genima St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/St3Gal3, doktorska disertacija, Odjela za biologiju, Osijek, 2015.
2. Blažetić S, Krajina V, Labak I, Viljetić B, Pavić V, Ivić V, Balog M, Schnaar RL, Heffer M. Sialyltransferase Mutations Alter the Expression of Calcium-Binding Interneurons in Mice Neocortex, Hippocampus and Striatum. *Int J Mol Sci.* 2023 Dec 7;24(24):17218.
3. Fishell G, Kepecs A. Interneuron Types as Attractors and Controllers. *Annu Rev Neurosci.* 2020 Jul 8;43:1-30.
4. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron.* 2016 Jul 20;91(2):260-92.
5. Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology.* 2012 Mar;62(3):1574-83.
6. Ferando I, Mody I. Interneuronal GABAA receptors inside and outside of synapses. *Curr Opin Neurobiol.* 2014 Jun;26:57-63.
7. Berridge M, Bootman M, Roderick H., Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003. Jul; 517-529.
8. Kawasaki H, Nakayama S, Kretsinger R.H., Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals.* 1998. Dec; 11, 277–295.
9. Yang J, Yang X, Tang K. Interneuron development and dysfunction. *The FEBS Journal.* 2021. Apr; 289, 2318-2336.
10. Xu H, Jeong HY, Tremblay R, Rudy B. Neocortical somatostatin-expressing GABAergic interneurons disinhibit the thalamorecipient layer 4. *Neuron.* 2013 Jan 9;77(1):155-67.
11. Lim L, Mi D, Llorca A, Marín O. Development and Functional Diversification of Cortical Interneurons. *Neuron.* 2018 Oct 24;100(2):294-313.
12. Bhandari S, Watson N, Long E, Sharpe S, Zhong W, Xu SZ, Atkin SL. Expression of somatostatin and somatostatin receptor subtypes 1-5 in human normal and diseased kidney. *J Histochem Cytochem.* 2008 Aug;56(8):733-43.

13. Liguz-Lecznar M, Dobrzanski G, Kossut M. Somatostatin and Somatostatin-Containing Interneurons-From Plasticity to Pathology. *Biomolecules*. 2022 Feb 15;12(2):312.
14. Qiu J, Xiao J, Han C, Li N, Shen X, Jiang H, Cao X. Potentiation of tumor necrosis factor-alpha-induced tumor cell apoptosis by a small molecule inhibitor for anti-apoptotic protein hPEBP4. *J Biol Chem*. 2010 Apr 16;285(16):12241-7.
15. Runko V. Utjecaj akutne neonatalne hipoksije na ekspresiju gena za vazoaktivni intestinalni peptid u hipokampusu adolescentnih štakora [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet; 2022 [pristupljeno 10.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:992252>
16. Utiger, Robert D. "Vasoactive intestinal polypeptide". *Encyclopedia Britannica*, 20 Mar. 2023. Datum pristupa: 15.05.2024. Dostupno na: <https://www.britannica.com/science/vasoactive-intestinal-peptide>
17. Wan, C., Xia, Y., Yan, J. *et al.* nNOS in Erbb4-positive neurons regulates GABAergic transmission in mouse hippocampus. *Cell Death Dis*, 2024 Feb 15, 167.
18. Perrenoud Q, Geoffroy H, Gauthier B, Rancillac A, Alfonsi F, Kessar N, Rossier J, Vitalis T, Gallopin T. Characterization of Type I and Type II nNOS-Expressing Interneurons in the Barrel Cortex of Mouse. *Front Neural Circuits*. 2012 Jun 29;6:36.
19. Fantini J. Lipid rafts and human diseases: why we need to target gangliosides. *FEBS Open Bio*. 2023 Sep;13(9):1636-1650.
20. Malchiodi-Albedi F, Paradisi S, Matteucci A, Frank C, Diociaiuti M. Amyloid Oligomer Neurotoxicity, Calcium Dysregulation, and Lipid Rafts. *International Journal of Alzheimer's Disease*. 2011 Feb; 2011:17.
21. Matanović M. Distribucija kompleksnih gangliozida prije i nakon procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6 [Diplomski rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek; 2019 [pristupljeno 13.05.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:65359>
22. Pavić, Valentina. Varijacije u sastavu lipidnih splavi mozga dužičaste pastrve (*Oncorhynchus mykiss*) i običnog šarana (*Cyprinus carpio*) kao osnova različite prilagodbe na sezonske promjene temperature, doktorska disertacija, Sveučilišni poslijediplomski interdisciplinarni doktorski studij Molekularne bioznanosti, Osijek, 2013.
23. Žiroš A. Distribucija gangliozida u mozgu štakora oboljelih od dijabetesa tipa 2 [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za

- biologiju; 2018 [pristupljeno 07.05.2024.] Dostupno na:
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:184246>
24. Vuković K. Sastav gangliozida u staničnim linijama glioblastoma [Završni rad].
Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek;
2018 [pristupljeno 11.05.2024.] Dostupno na:
<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:260055>
25. Audry M, Jeanneau C, Imberty A, Harduin-Lepers A, Delannoy P, Breton C. Current trend sin the structure-activity relationships of sialyltransferases, *Glycobiology*, 2011 Jun; 21(6):716-726.
26. 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 Apr;94(2):461-518.
27. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest*. 2007 Sep;87(9):851-7.
28. Hu H, Eggers K, Chen W, Garshasbi M, Motazacker MM, Wrogemann K, Kahrizi K, Tzschach A, Hosseini M, Bahman I, Hucho T, Mühlenhoff M, Gerardy-Schahn R, Najmabadi H, Ropers HH, Kuss AW. ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *Am J Hum Genet*. 2011 Sep 9;89(3):407-14.
29. Llorca A, Deogracias R. Origin, Development, and Synaptogenesis of Cortical Interneurons. *Front Neurosci*. 2022 Jun 27;16:929469.
30. Prkačin MV. Uloga kortikalnih interneurona u patogenezi shizofrenije [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2020 [pristupljeno 15.06.2024.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:826371>
31. Trinchera M, Parini R, Indelicato R, Domenighini R, dall'Olio F, Diseases of ganglioside biosynthesis: An expanding group of congenital disorders of glycosylation. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2018 Aug; 124(4): 230-237.
32. Exposito-Alonso D, Osório C, Bernard C, Pascual-García S, Del Pino I, Marín O, Rico B. Subcellular sorting of neuregulins controls the assembly of excitatory-inhibitory cortical circuits. *Elife*. 2020 Dec 15;9:e57000.
33. turgill ER, Aoki K, Lopez PH, Colacurcio D, Vajn K, Lorenzini I, Majić S, Yang WH, Heffer M, Tiemeyer M, Marth JD, Schnaar RL. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology*. 2012 Oct;22(10):1289-301.

34. Ferguson KA, Salameh J, Alba C, Selwyn H, Barnes C, Lohani S, Cardin JA. VIP interneurons regulate cortical size tuning and visual perception. *Cell Rep.* 2023 Sep 26;42(9):113088.
35. Marín, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci*, 2012 Jan 13, 107–120
36. Río, J. A. D., Martínez, A., Auladell, C. & Soriano, E. Developmental History of the Subplate and Developing White Matter in the Murine Neocortex. Neuronal Organization and Relationship with the Main Afferent Systems at Embryonic and Perinatal Stages. *Cereb. Cortex*, 2000 Aug 10, 784–801
37. Guo Z. Ganglioside GM1 and the Central Nervous System. *Int J Mol Sci.* 2023 May 31;24(11):9558.

11. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Matea Jagodić

Datum i mjesto rođenja: 06.10.2000., Osijek

Adresa stanovanja: Punitovačka 7, Gorjani

E-mail: jagodicmatea4@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2015. – 2019. – Zdravstvena gimnazija. Medicinska škola Osijek

2019. – 2022. – Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet, Sveučilišni preddiplomski studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2022. – 2024. - Sveučilište u Osijeku, Medicinski fakultet, Sveučilišni diplomski studij
Medicinsko laboratorijska dijagnostika

AKTIVNOSTI TIJEKOM STUDIJA

Član udruge CMLDSA

Radionice i aktivnosti:

Radionica Osnove znanstvenog istraživanja (4. i 5. prosinca 2020.)

Radionica Hematologija (15. travnja 2021.)

Pasivni sudionik 3rd Student Congress OSCON (19.-20. ožujka 2021.)

Voditeljica radionice „Život“ na festivalu znanosti (2.-7. svibnja 2022.)

Radionica Prva pomoć 18.1.2023.

Okrugli stol "Radni dan MLD-ovca" 12.4.2023.

Radionica Venepunkcija 18.4.2023.

Sudjelovanje na javnoj akciji mjerenja glukoze u krvi i krvnog tlaka u sklopu obilježavanja dana medicinsko laboratorijskih djelatnika 13.4. 2023.

Predavač na tjednu mozga: "Milky way for our brain" (13.-19.3.2023)

Volonter na 5rd Student Congress OSCON (30.3.-1.4.2023.)

Voditelj radionice "Priroda i društvo" na festivalu znanosti (24.4.-28.4.2023.)

Radionica Prva pomoć 23.1.2024.

Predavač na tjednu mozga „Nemam fibru, a u meni antibiotik“ (11.3.-15.3.2024.)

Sudjelovanje na javnoj akciji mjerenja glukoze u krvi i krvnog tlaka u sklopu obilježavanja dana medicinsko laboratorijskih djelatnika 15.4. 2024.

Voditelj radionice „Pametni laboratorij“ na festivalu znanosti (22.4.-26.4.2024.)