

# Distribucija kompleksnih gangliozida prije i nakon procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6

---

**Matanović, Martina**

**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:152:653595>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-22**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Martina Matanović**

**DISTRIBUCIJA KOMPLEKSNIH  
GANGLIOZIDA PRIJE I NAKON  
PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU  
DIVLJEG TIPRA MIŠA C57BL6.**

**Diplomski rad**

**Osijek, rujna, 2019.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO  
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

**Martina Matanović**

**DISTRIBUCIJA KOMPLEKSNIH  
GANGLIOZIDA PRIJE I NAKON  
PROCESA MIJELINIZACIJE U MOZGU  
DIVLJEG TIPRA MIŠA C57BL6.**

**Diplomski rad**

**Osijek, rujna, 2019.**

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

Mentor rada: doc.dr.sc. Barbara Viljetić

Rad ima 38 stranica, 10 tablica i 13 slika.

---

# SADRŽAJ

|  |    |
|--|----|
| 1. UVOD .....  | 1  |
| 1.1. Gangliozidi .....   | 1  |
| 1.1.1. Sinteza gangliozida .....   | 2  |
| 1.1.2. Razgradnja gangliozida.....                                       | 3  |
| 1.2. Lipidne splavi .....  | 3  |
| 1.3. Živčana stanica (neuron) .....                                      | 4  |
| 1.4. Mijelinizacija i mijelinska ovojnica .....                          | 5  |
| 1.4.1. Demijelinizacijske bolesti .....                                  | 8  |
| 2. HIPOTEZA .....  | 9  |
| 3. CILJEVI .....   | 10 |
| 4. MATERIJALI I METODE .....   | 11 |
| 4.1. Materijali .....  | 11 |
| 4.2. Kemikalije .....  | 11 |
| 4.3. Metode .....  | 12 |
| 4.3.1. Genotipizacija .....  | 12 |
| 4.3.2. Žrtvovanje miševa.....  | 13 |
| 4.3.3. Imunohistokemija .....  | 13 |
| 4.3.4. Analiza izražaja kompleksnih gangliozida i markera mijelina ..... | 14 |
| 5. REZULTATI.....  | 15 |
| 6. RASPRAVA.....   | 27 |
| 7. ZAKLJUČAK .....   | 30 |
| 8. SAŽETAK.....  | 31 |
| 9. SUMMARY .....   | 32 |
| 10. LITERATURA.....  | 33 |
| 11. ŽIVOTOPIS .....  | 38 |

## POPIS KRATICA

5D - 5 dana stari miševi

15D - 15 dana stari miševi

30D - 30 dana stari miševi

ADHD - poremećaj pažnje s hiperaktivnošću (engl. *attention deficit hiperactivity disorder*)

*B4galnt1* - gen za GM3 sintazu (engl. *Beta-1,4-N-Acetyl-Galactosaminyltransferase 1*)

CC - žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*)

CNPaza - 2',3'-ciklični-nukleotid 3'-fosfodiesteraza (engl. *2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase*)

DAB - diaminobenzidin

GPI - glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

ICP - donji cerebelarni pedunkul (lat. *pedunculus cerebellaris inferior*)

KO - genetički modificirani miš (engl. *knock-out*)

MAG - glikoprotein vezan za mijelin (engl. *myelin-associated glycoprotein*)

MBP - bazični mijelinski protein (engl. *myelin basic protein*)

MOG - mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (engl. *myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

MS - multipla skleroza

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

PCR - lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)

PFA - paraformaldehid

PLP - proteolipidni protein (engl. *proteolipid protein*)

*St3gal5* - gen za ST3-beta-galaktozid-alfa-2,3-sijaliltransferzu 5 (engl. *ST3 Beta-Galactoside Alpha-2,3-Sialyltransferase 5*)

*St8sia1* - gen za GD3 sintazu (engl. *ST8 Alpha-N-Acetyl-Neuraminide Alpha-2,8-Sialyltransferase 1*)

SŽS - središnji živčani sustav

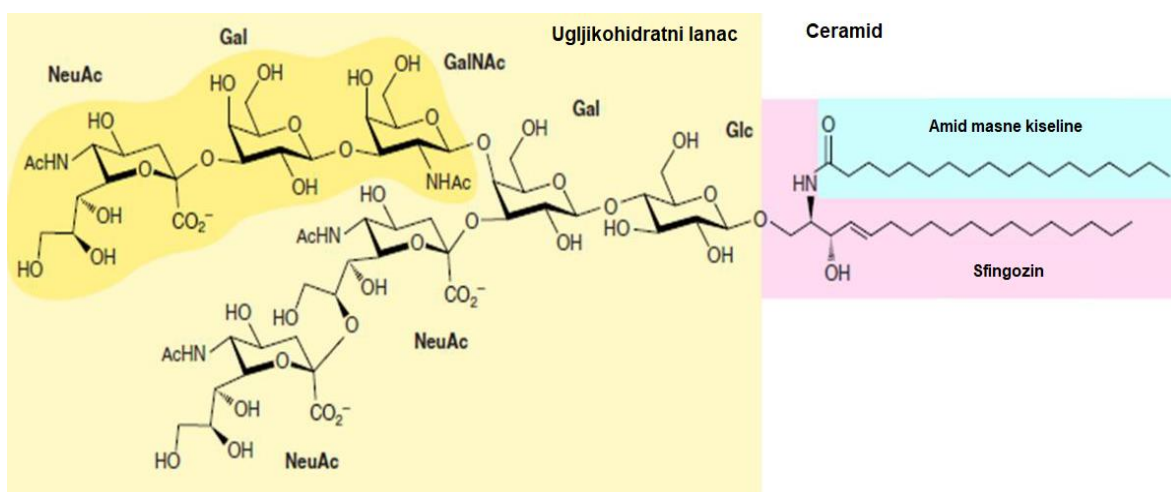
WT - divlji tip miša (engl. *wild type*)

# 1. UVOD

## 1.1. Gangliozidi

Gangliozidi se nalaze u svim tkivima kralježnjaka, ali dominiraju u središnjem živčanom sustavu (SŽS) gdje čine bitnu komponentu stanične membrane (1). Među prvima ih je identificirao Ernst Klenk, 30-ih godina 20. stoljeća te je, s obzirom na njihovu prisutnost u ganglijima mozga, predložio naziv gangliozidi. Daljnja istraživanja, 50-ih i 60-ih godina prošloga stoljeća, potvrdila su njihovu prisutnost u ganglijima i neuronima, ali i u drugim tkivima kralježnjaka, a njihova količina u neuronima (10-ak % ukupnoga neuronskog lipidnog sastava) ukazuje na njihovu bitnu ulogu u živčanom sustavu (2).

Gangliozidi pripadaju porodici složenih glikosfingolipida. U svom sastavu sadržavaju lipidno sidro (ceramid) i hidrofilni ugljikohidratni lanac, a za razliku od ostalih glikosfingolipida sadrže jednu ili više sijalinskih kiselina. Ceramid je sastavljen od aminoalkohola sfingozina s 18 ili 20 ugljikovih atoma te masne kiseline (najčešće stearinske) (3). Ugljikohidratni lanac nalazi se slobodan u izvanstaničnom prostoru, dok je ceramid usidren u vanjskom sloju stanične membrane (Slika 1) (4).



**Slika 1.** Struktura gangliozida GT1b (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Schnaara RL)

(5)



S obzirom na takvu građu, gangliozidima su osigurane različite funkcije i interakcije. Međustaničnim ili *trans* interakcijama glikanski lanci gangliozida vežu se na proteine na drugoj stanici te im je time omogućeno stanično prepoznavanje. Lateralnim ili *cis* interakcijama povezuju se molekule unutar iste membrane. Posljedica je *cis* interakcija reguliranje odgovora signalnih proteina (4).

Budući da je nomenklatura gangliozida izuzetno kompleksna, Lars Svennerholm predložio je upotrebu jednostavnijega načina imenovanja koji je i prihvaćen. Slovo „G“ kratica je za gangliozid, zatim slijedi slovo koje označava broj sijalinskih kiselina koje gangliozid sadrži (M-mono, D-di, T-tri, Q-tetra, P-penta). Sljedeći je broj šećernih ostataka u molekuli (razlika broja 5 i stvarnog broja šećera u lancu). Na kraju se nalazi malo slovo koje predstavlja broj sijalinskih kiselina vezanih na unutrašnju galaktozu (a-1, b-2, c-3) te metabolički put nastanka (6).

U mozgu kralježnjaka najzastupljenija su četiri gangliozida koji čine 97% svih gangliozida u mozgu čovjeka. To su GM1, GD1a, GD1b i GT1b. Iako je dokazano kako imaju bitnu ulogu u održavanju mijeliniziranih živaca, njihova funkcija nije potpuno definirana (7). Poznato je da GM1 ima ulogu u regulaciji stanične interakcije, održavanju vijabilnosti neurona i da se javlja u ranoj mijelinizaciji te raste do zrelosti, nakon čega počinje opadati. GT1b karakterističan je za zrele živčane stanice, a GD1a kao marker sinaptogeneze (8, 9). Osim toga, gangliozidi GD1a i GT1b dobri su ligandi glikoproteina MAG koji je sastavni dio mijelinske ovojnice što upućuje na činjenicu da ovi kompleksni gangliozidi, zajedno s MAG-om, doprinose stabilnosti mijelinske membrane (8, 9). Nadalje, njihova je zastupljenost u regijama mozga različita. Dokazano je kako se u mozgu odrasloga miša GM1 pretežno nalazi u bijeloj tvari, dok GD1a dominira u sivoj tvari. Za razliku od njih, GD1b i GT1b u podjednakim se količinama nalaze i u sivoj i u bijeloj tvari odrasloga mišjeg mozga (10).

### 1.1.1. Sinteza gangliozida

Sinteza gangliozida postupna je te se odvija pomoću enzimskog kompleksa (11). Započinje u endoplazmatskom retikulumu, a potom se nastavlja u Golgijevu aparatu. U početnom koraku dodavanjem glukoze na ceramid nastaje glukozilceramid. Nakon toga dodaje se galaktoza te nastaje prekursor većine gangliozida, laktozil-ceramid. Vezanjem sijalinske kiseline (koja daje negativan naboj i kiseli karakter) nastaje jednostavni gangliozid GM3, a daljnjim dodavanjem sijalinske kiseline i N-acetilgalaktozamina nastaju različite forme gangliozida. Tako nastao

osnovni ugljikohidratni lanac ima strukturu: Gal( $\beta$ 1-3)GalNAc( $\beta$ 1-4)Gal( $\beta$ 1-4)GlcCer. Nakon dodavanja N-acetilgalaktozamina na unutrašnju galaktozu više se ne može vezati sijalinska kiselina. Na taj se način određuje kojoj će seriji gangliozidi pripadati, stoga se to smatra ključnim korakom u sintezi gangliozida. Gangliozidi bez sijalinske kiseline na unutrašnjoj galaktozi spadaju u seriju 0, s jednom sijalinskom kiselinom u seriju a, s dvjema sijalinskim kiselinama u seriju b, a gangliozidi s trima ili više sijalinskih kiselina u seriju c. N-acetilneuraminska kiselina (engl. *N-acetylneuraminic acid*, *NeuNAc*) jedina je sijalinska kiselina koju čovjek sintetizira (11).

### 1.1.2. Razgradnja gangliozida

Za razliku od sinteze, razgradnja gangliozida odvija se u endosomima i lizosomima, uz odgovarajući pH te prisutnost glikozidaza i proteina odgovornih za transport (12, 13). Razgradnja započinje na staničnoj membrani s koje se endocitozom uklanjaju gangliozidi te dolaze do lizosoma u obliku malih vezikula. Tijekom razgradnje uklanjaju se sijalinske kiseline i monosaharidi te formiraju ceramid koji se također može dalje razgrađivati (12, 14). Zbog uzastopnog ponavljanja toga koraka, mogući su defekti i posljedično tome razvoj mnogobrojnih bolesti. Jedan je od primjera Tay- Sachsova bolest (13).

Ovim neurodegenerativnim poremećajem bila su zahvaćena djeca na čijim je mozgovima Klenk otkrio gangliozide (1). To je neurodegenerativni poremećaj u kome dolazi do nakupljanja gangliozida GM2 u lizosomima živčanih stanica zbog nepotpunog uklanjanja N-acetilgalaktozaminskog ostataka te nedostatka enzima  $\beta$ -N-acetilheksozaminidaze. Ova se bolest dijagnosticira u vrijeme razvoja ploda, a kao posljedice ima slabost, retardaciju, demenciju te sljepoću tijekom prve i druge godine života djeteta, a prije treće godine najčešće nastupa smrt (13).

## 1.2. Lipidne splavi

Stanična je membrana polupropusna membrana koja odvaja unutrašnjost stanice od izvanstaničnoga prostora. Prema Jonathanu Singeru i Garthu Nicolsonu do određene je mjere fluidna te joj je osnovna struktura fosfolipidni dvosloj (hidrofilne glave i hidrofobni repovi) s uronjenim proteinima, no dokazano je kako ona nije u svim svojim dijelovima jednaka (15). Uređeniji i manje fluidniji dijelovi nazivaju se lipidne splavi (15). Vanjski sloj lipidnih splavi sastoji se od sfingomijelina, glikolipida i kolesterola, dok unutarnji sloj grade kolesterol i

fosfolipidi. Važan sastojak splavi također su i proteini s glikozilfosfatidilinozitolnim sidrom (GPI) (15).

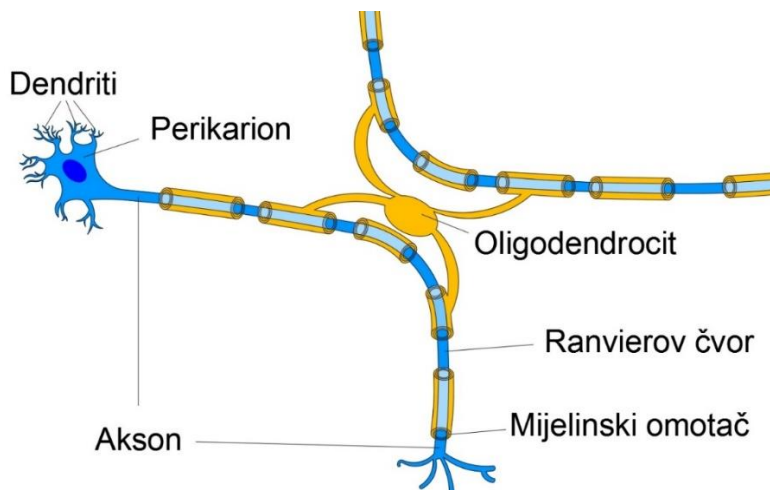
Njihova iznimna važnost pokazana je u različitim biološkim funkcijama kao što su signalna transdukcija, endocitoza, stanična adhezija, usmjeravanje aksona, sinaptički prijenos signala itd. (16, 17). Da bi se navedene funkcije mogle neometano odvijati, ne samo u splavima, nego i u cijelom središnjem živčanom sustavu, jednu od najvažnijih uloga igra kolesterol koji je, osim kod navedenog, važan i u proizvodnji steroidnih hormona te u formiranju mijelinske membrane. Poremećaj u sintezi kolesterola može dovesti do brojnih bolesti koje uključuju metabolizam lipida, kao što je primjerice multipla skleroza, a nedovoljna razina kolesterola može rezultirati odlaganjem procesa mijelinizacije. Osim s multiplom sklerozom, poremećaji u lipidnim splavima povezuju se i s Parkinsonovom te Alzheimerovom bolesti (18).

Stoga, poremećaji u metabolizmu lipida remete proizvodnju mijelina što za posljedicu ima ozbiljne bolesti središnjeg živčanog sustava. Da bi se održala ravnoteža, lipidne splavi imaju ključnu ulogu kontrolirajući biosintezu lipida te posljedično održavajući pravilan razvoj mijelina u mozgu (18).

### 1.3. Živčana stanica (neuron)

Živčani sustav sastoji se od dviju vrsta stanica: živčanih stanica (neurona) i potpornih stanica (glija). Živčane se stanice smatraju osnovnim jedinicama živčanog sustava. Nastaju procesom neurogeneze iz neuralnih matičnih i neuralnih progenitorskih stanica. Zadužene su za primanje, obradu te prijenos podražaja. Do nedavno se smatralo kako se živčane stanice stvaraju samo u prenatalno doba, odnosno da živčani sustav nema mogućnost regeneracije, no utvrđeno je kako su, između ostalih, hipokampus, olfaktorni bulbusi te hipotalamus jedni od rijetkih dijelova odraslog mozga u kojima se odvija adultna neurogeneza (19).

Osnovni su dijelovi živčane stanice tijelo stanice (perikarion) koji je temeljni dio svakog neurona, dendriti koji su zaduženi za primanje podražaja te akson odgovoran za provođenje podražaja. Osim navedenoga, grade ga i oligodendrociti (u SŽS-u), Ranvierovi čvorovi te mijelinska ovojnica (Slika 2) (20).

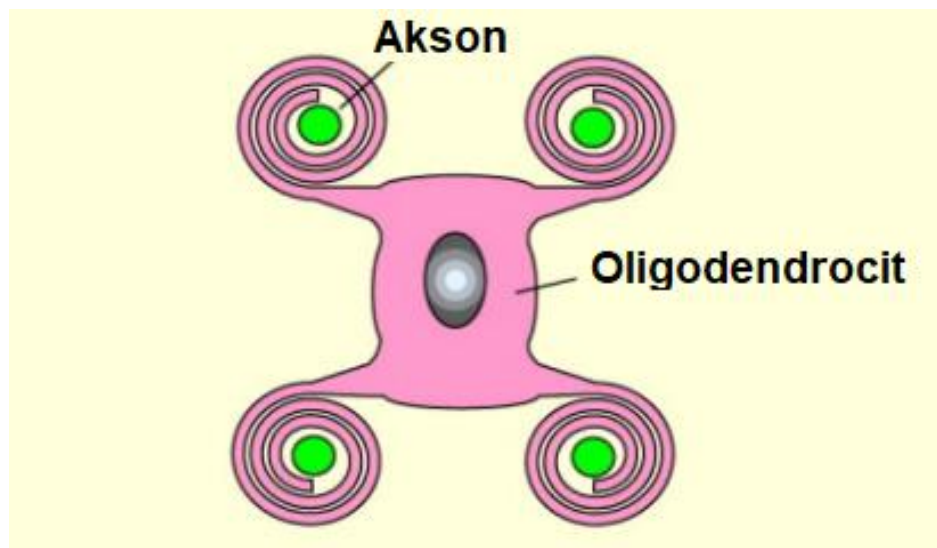


**Slika 2.** Građa neurona. (Slika izrađena prema shemi iz knjige autora Šverka B) (21)

Većina neurona ima samo jedan akson koji je pretežno vrlo dugačak, iako im dužina može varirati od nekoliko centimetara do nekoliko desetaka centimetara (20). Njihova je prisutnost karakteristična za bijelu tvar živčanog sustava kralježnjaka, dok u sivoj tvari dominiraju tijela stanice te dendriti (22). Osnovna je zadaća neurona provođenje podražaja od jedne živčane stanice do druge ili do perifernih dijelova tijela (20). Da bi navedenu funkciju mogao vršiti, neophodna je mijelinska ovojnica koja se formira oko aksona (23).

#### 1.4. Mijelinizacija i mijelinska ovojnica

Aksone u perifernom živčanom sustavu obavijaju Schwannove stanice (23). One tvore mijelinsku ovojnicu oko aksona prilikom čega jedna Schwannova stanica formira jednu mijelinsku ovojnicu. Nasuprot tome, u središnjem živčanom sustavu mijelinska ovojnica oko aksona građena je od oligodendrocita (23). Mijelin se formira u uskoj spirali oko aksona prilikom čega jedan oligodendrocit može mijelinizirati više aksona (Slika 3) (23).



**Slika 3.** Jedan oligodendrocit mijelinizira više aksona. (Slika preuzeta i prilagođena iz rada autora Lee AG) (24)

Donedavno se smatralo kako mijelin samo pasivno sudjeluje u središnjem živčanom sustavu oblažući aksone, no to je demantirano novijim studijama. Osim što količina mijelina određuje koliki će biti promjer aksona (jer su aksoni s manje mijelina tanji, dok su aksoni s više mijelina deblji), također sudjeluje u razvoju i pravilnom funkcioniranju središnjeg živčanog sustava (18).

Mijelinska ovojnica sastoji se od lipida i proteina, a iako je spojena s ostatkom plazma membrane oligodendrocita, razlikuje se od ostalih staničnih membrana zbog visokog sadržaja lipida (70 - 80 %) (18). Od lipida u mijelinskoj ovojnici dominiraju zasićene, dugolančane masne kiseline s glikofosfolipidima (pretežno galaktocerebrozid i galaktosulfocerebrozid) te kolesterolom. Glikosfingolipidi i kolesterol odvojeni su od drugih lipida formirajući lipidne splavi. Strukturu galaktocerebrozida i galaktosulfocerebrozida čini dugački sfingozin dok se cerebrozidi u mijelinu razlikuju od ostalih lipida po tome što sadrže dugačke i normalno zasićene lance. Nadalje, bitan udio u mijelinu zauzima i plazmalogen sa zasićenim masnim kiselinama dugog lanca. Interakcijom između metilenskih skupina ugljikovodičnih lanaca, Van der Waalsove disperzijske sile održavaju molekule na okupu. Ovakva lipidna građa temeljna je molekularna osnova za stabilnost mijelina (24, 25).

Osim lipida, ostalih 20-ak % mijelinske membrane čine proteini. Od ukupnoga sadržaja, čak 85% proteina čine dva tipa: bazični mijelinski protein (MBP) s oko 35% ukupnog proteinskog sastava te proteolipidni protein (PLP) i njegova izoforma DM20 s 30-45% zastupljenosti. Ostatak proteina čine 2', 3'-ciklički nukleotid 3'-fosfodiesteraza (CNP), mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (MOG) i glikoprotein vezan za mijelin (MAG) (18, 24). Konačno, kako bi se mijelinski omotač mogao formirati neophodna je uloga oligodendrocita koji vezikularnim transportom dopremaju velike količine lipida i proteina mijelinu (18, 24).

Mijelinska ovojnica nije u cijeloj svojoj građi kontinuirana, nego sadrži međuprostore koji se nazivaju Ranvierovi čvorovi, a razmaci između njih internodusi (26). Ranvierovi su čvorovi područja u mijelinskoj membrani na kojima se odvija proces proizvodnje akcijskog potencijala zato što ti dijelovi nisu izolirani. Da bi došlo do samoga nastanka akcijskog potencijala, nužni su naponom regulirani Na<sup>+</sup> kanali koji se nalaze samo na Ranvierovim čvorovima. Nakon što struja nastane u jednom čvoru, pasivno teče duž aksona dok ne dođe do sljedećeg čvora. Mijelin djelujući kao električni izolator, sprječava širenje struje preko membrane. Nastala struja izaziva akcijski potencijal. Kao rezultat toga, mijelin ubrzava provođenje akcijskog potencijala kroz akson jer mijelinizirani akson može provoditi akcijski potencijal i do 300 puta brže od nemijeliniziranog aksona. Takav način provođenja akcijskog potencijala naziva se saltatornim (skokovitim) jer potencijal „skače“ s čvora na čvor (26).

Proces mijelinizacije započinje u embrionalnom razvoju (prenatalna) (27), no većinom je postnatalan te se nastavlja i u odrasloj dobi (28). Primijećeno je kako obično započinje u stražnjem dijelu mozga te se nastavlja u rostralnom smjeru. Osim toga, uočeno je i kako su prije samog rođenja određeni dijelovi mozga dobro mijelinizirani, a to su periferni živci, cerebelarni pedunkuli te most (lat. *pons*). Nakon 6 mjeseci mijelinizira se žuljevito tijelo (lat. *corpus callosum*) u predjelu koljena, u razdoblju od 8 do 12 mjeseci mijeliniziraju se čeon (lat. *lobus frontalis*), tjemeni (lat. *lobus parietalis*) i zatiljni (lat. *lobus occipitalis*) režanj mozga, dok se u prefrontalnom korteksu mijelinizacija završava u doba adolescencije ili u ranoj odrasloj dobi. Stoga, volumen bijele tvari nije konstantan, nego varira jer u dobi od 4 do 22 godine progresivno raste za oko 12% te ovisi i o načinu života pojedinca (29). Primjerice, prakticiranje određenih vještina može povećati volumen bijele tvari u mozgu, dok smanjena aktivnost i socijalna izolacija mogu dovesti do smanjenja mijelina u mozgu te bitno narušiti kognitivne funkcije (28).

U određenim patološkim uvjetima, ako dođe do demijelinizacije, odnosno propadanja mijelinske ovojnice, akcijski je potencijal na aksonu poremećen i poruke koje se šalju ne dolaze na vrijeme, dolaze s određenim „greškama“ ili potpuno izostaju. Posljedica je toga razvoj brojnih demijelinizirajućih bolesti SŽS-a (22).

#### 1.4.1. Demijelinizacijske bolesti

Multipla skleroza najčešći je oblik demijelinizacijskog poremećaja (18). Procjenjuje se da od ove kronične autoimune bolesti središnjega živčanog sustava danas boluje oko tri milijuna ljudi u svijetu (22). Bolest se odvija kroz nekoliko mehanizama te dolazi do oštećenja aksona i perikariona. Iako etiologija ove bolesti nije poznata, pretpostavka je kako u tome najveću ulogu imaju aktivirani makrofagi i mikroglija stanice (30). Oni luče dušikove i kisikove radikale koji oštećuju proteine, lipide i DNA u oligodendrocitima i živčanim stanicama (31). Odnosno, dolazi do aktivacije imunološkog odgovora prilikom kojega tijelo na mijelinsku ovojnicu reagira kao na stranu tvar, napada ju i razgrađuje te nastaju oštećenja koja se nazivaju plakovi ili lezije. U dijelovima mozga zahvaćenim ovakvim upalnim promjenama dolazi do smanjenja produkcije mijelina, odnosno do demijelinizacije. Moguće je postići remijelinizaciju (iako samo djelomičnu), ali samo u slučajevima kada je na mjestima lezije prisutno dovoljno oligodendrocita. Remijelinizacija postaje teža kako bolest napreduje te tako s vremenom dolazi do brojnih komplikacija (18).

Osim multiple skleroze te optičkog neuromijelitisa i leukodistrofije, poremećaj u mijelinu pokazan je također i kod nekih psihičkih poremećaja, poremećaja autističnog spektra, poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (ADHD) te kod neurodegenerativnih bolesti kao što su Alzheimerova, Parkinsonova te amiotrofična lateralna skleroza (32).

## **2. HIPOTEZA**

Distribucija kompleksnih gangliozida u lipidnim splavima na mijelinskim ovojnicama mijenja se tijekom procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6.



### 3. CILJEVI

Ciljevi ovoga istraživanja bili su:

- odrediti distribuciju kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) i markere mijelina prije, tijekom i nakon završenoga procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6;
- dovesti u vezu ekspresiju pojedinih kompleksnih gangliozida s fazama mijelinizacije.

## 4. MATERIJALI I METODE

Rad je napravljen u sklopu HRZZ projekta *Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi* (IP-09-2014-2324) te je u sklopu projekta dobiveno dopuštenje Etičkoga povjerenstva Medicinskoga fakulteta Osijek.

### 4.1. Materijali

U svrhu istraživanja korištena su tkiva mozgovna divljeg tipa miša C57Bl6 (engl. *wild type*, WT) starosti 5, 15 i 30 dana. Za izradu rada korištena su po tri miša divljeg tipa iz svake dobne skupine.

### 4.2. Kemikalije

- NaOH (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad CA, USA)
- AE pufer (Qiagen, Hilden, Germany)
- agaroz (Lonza, Rockland, ME, USA)
- TBE pufer (Gibco, Life Technologies, Paihley, Scotland)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD)
- PBS:
  - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
  - KCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA),
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Paraformaldehid (PFA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2-metilbutan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- 30%-tni vodikov peroksid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- albumin iz goveđeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen, Auckland, NZ)

- Triton X-100 (Acros Organics, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- primarna protutijela:
  - GM1 (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
  - GD1a (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
  - GD1b (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
  - GT1b (Mišje IgG, Zavod za farmakologiju Medicinskoga fakulteta Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, SAD)
  - CNPaza (Chemicon, Temecula, CA, SAD)
  - MAG (Milipore, Temecula, CA, SAD)
  - MBP (QED Bioscience Inc., San Diego, CA, SAD)
- sekundarno protutijelo: kozje anti-mišje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- terciarni kompleks ABC kompleks avidina i biotina (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- TBS pufer (pH= 7,4):
  - Tris (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
  - HCl (Fisher Bioreagents, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
  - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- diaminobenzidin (DAB) (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA)
- Vectamount pokrivalo (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Genotipizacija

Da bi se potvrdio genotip životinja, za početak je napravljena genotipizacija za koju su korišteni uzorci repova. Za izolaciju deoksiribonukleinske kiseline (DNA) upotrijebljen je NaOH (50mM) visokih koncentracija koji je postavljen direktno na uzorke inkubirane 30 minuta na 95°C. Na izoliranu je DNA, nakon otklanjanja NaOH, dodan AE pufer. Za utvrđivanje genotipa miševa

divljev tipa, korištena je metoda lančane reakcije polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*, *PCR*) te su, korištenjem specifičnih početnica 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), umnoženi kratki odsječci DNA i uspoređivani s genotipom miša *St8sial1* (jer su iz iste linije). Segmenti DNA razdvojeni su elektroforezom u agaroznom gelu (uz dodatak Syber Safe boje) te su vizualizirani pod UV svjetlom.

#### 4.3.2. Žrtvovanje miševa

Životinje su žrtvovane nakon što su dosegle potrebnu starost (tri miša 5 dana, tri miša 15 dana te tri miša 30 dana starosti) u skladu sa svim etičkim načelima. Anestezirane su izofluranom nakon čega je napravljena transkardijalna perfuzija za miševe stare 30 dana. Miševi su perfundirani u trenutku duboke anestezije uvođenjem igle u lijevu klijetku srca, dok je desna pretklijetka prerezana škarama. Za ispiranje krvi iz organizma korišten je 1xPBS. Nadalje, ponovno u područje lijeve klijetke, uvedena je igla s fiksativom (4%-tni PFA), a indikator uspješne fiksacije u početku je grčenje mišića, a na kraju perfuzije potpuna ukočenost tijela. Izolirani uzorci mozgovia miševa starih mjesec dana fiksirani su 24 sata u 4%-tnom PFA na +4°C. Miševima starim 5 i 15 dana nije napravljena transkardijalna perfuzija, nego su uzorci odmah nakon žrtvovanja stavljeni u 4%-tni PFA na 24 sata. Za krioprotekciju uzoraka korištena je 10%-tna i 20%-tna otopina saharoze. Smrzavanje je izvršeno u pothlađenom izopentanu te su do rezanja uzorci skladišteni na -80°C. Tkiva mozga uklopljena su u medij za kriostatsko rezanje (engl. *Tissue freezing medium*; Leica, Nussloch, Germany) i potom rezana u koronarnom smjeru na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany) pri temperaturama CT -18°C i OT -16°C. Debljina reza iznosila je 35 µm te su prikupljeni uzorci pohranjeni u 1xPBS na +4°C.

#### 4.3.3. Imunohistokemija

Imunohistokemija je provedena metodom slobodno plutajućih rezova u mikrotitarskim pločicama s 24 jažice. Početni je korak tretiranje rezova 1%-tnim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u 1xPBS-u kako bi došlo do inhibicije endogenih peroksidaza. Nadalje, potrebno je blokirati nespecifična vezanja protutijela te se u tu svrhu koristi otopina za blokiranje, tzv. blokiranje (1% albumin iz goveđeg seruma i 5% kozji serum u 1xPBS-u) u trajanju od dva sata na +4°C. Kod pripreme blokiranja za markere mijelina dodaje se 1%-tni Triton x-100, također u trajanju od dva sata na +4°C. Nakon toga pripremljena su primarna protutijela u otopini za blokiranje. Za gangliozide su korištena GM1, GD1a, GD1b i

GT1b primarna protutijela. GM1 priprema se u omjeru 1:500, GD1a 1:5000, GD1b 1:1000 te GT1b u omjeru 1:4000. Kao markeri mijelina korišteni su CNPaza u omjeru 1:750 te MAG i MBP u omjeru 1:500. Inkubiranje u primarnim protutijelima odvija se tijekom noći, na tresilici, na temperaturi od +4°C. Slijedi niz ispiranja (3 x 10 minuta) u 1xPBS-u te inkubacija u sekundarnom protutijelu u trajanju od četiri sata na +4°C, također na tresilici. Sekundarno protutijelo je kozje anti-mišje IgG konjugirano s biotinom u razrjeđenju 1:500. Prije inkubacije u tercijarnom protutijelu ponovno slijedi niz ispiranja (3 x 10 minuta) u 1xPBS-u. Tercijarni kompleks ABC (kompleks avidina i biotina) priprema se u 1xPBS-u u omjeru 1:250 te inkubacija traje dva sata, na tresilici, na +4°C. Posljednje ispiranje provodi se u 1xTBS-u (pH=7,4) 3 x 10 minuta nakon čega se koristi supstrat diaminobenzidina (DAB) pripremljen prema priloženom protokolu. Pomoću supstrata DAB se vizualizira do pojave obojenja te se rezovi ponovno vraćaju u 1xTBS kako bi se reakcija zaustavila. Imunohistokemija završava navlačenjem rezova na silanizirana predmetna stakalca te pokrivanjem Vectamount pokrivalom i pokrovnim stakalcem.

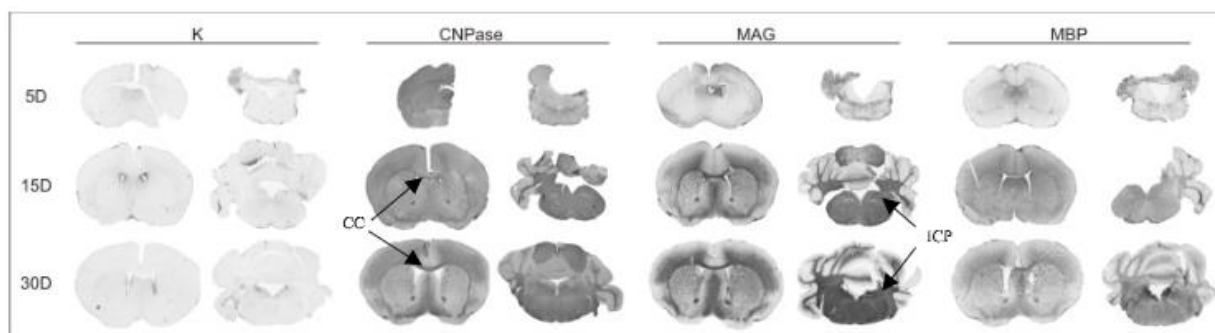
#### 4.3.4. Analiza izražaja kompleksnih gangliozida i markera mijelina

Nakon što je odrađeno imunohistokemijsko bojanje, preparati su slikani kamerom *Olympus DP70* (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) koja je montirana na svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany). Korišteno je slikovno područje 200x200 µm i povećanje 100x i 200x. Računalni program *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD) korišten je za kvantifikaciju slika prema modificiranom protokolu (33).

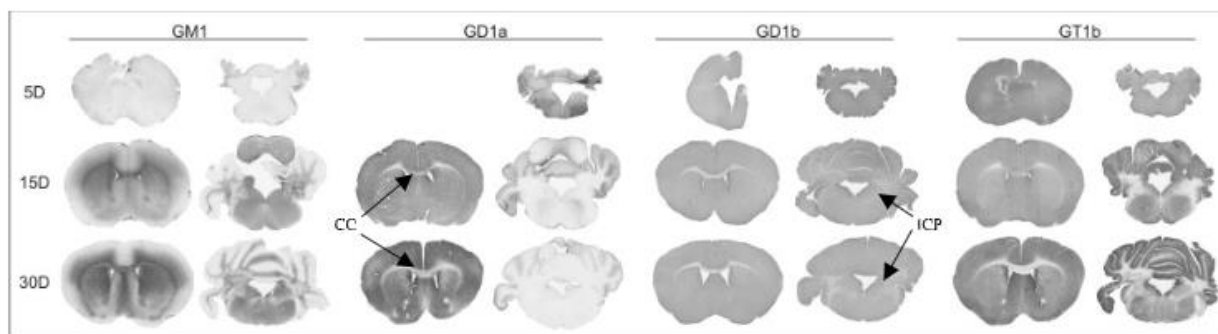
Statistička analiza odrađena je u programu *Statistica v22* (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Da bi se utvrdila normalnost distribucije podataka korišten je Shapiro-Wilk test. S obzirom da distribucija nije bila normalna, Mann-Whitney U test korišten je za utvrđivanje razlika između dviju grupa, a Kruskal Wallis test između više grupa. Razina značajnosti iznosila je 0,05.

## 5. REZULTATI

Distribucija markera mijelina i kompleksnih gangliozida promatrana je na dvjema regijama mozga: *Pedunculus cerebellaris inferior* (ICP) i *Corpus callosum* (CC) kod miševa različite dobne skupine: 5 (5D), 15 (15D) i 30 (30D) dana. Rezovi velikog i malog mozga nakon imunohistokemijskog bojanja skenirani su skenerom (Expression 11000XL, Epson, München, Germany) te su na njima vidljive promjene u ekspresiji pojedinih markera mijelina (Slika 4) te kompleksnih gangliozida (Slika 5). Očito je povećanje u ekspresiji kompleksnih gangliozida između mozgova starih 5 dana u odnosu na 15 i 30 dana, dok je za markere mijelina povećanje u distribuciji također vidljivo kod svih protutijela osim kod MBP-a gdje je povećanje vidljivo, ali znatno manje u odnosu na ostale markere. Kontrolni su rezovi imunonegativni što dokazuje kako nije bilo nespecifičnih vezanja protutijela.

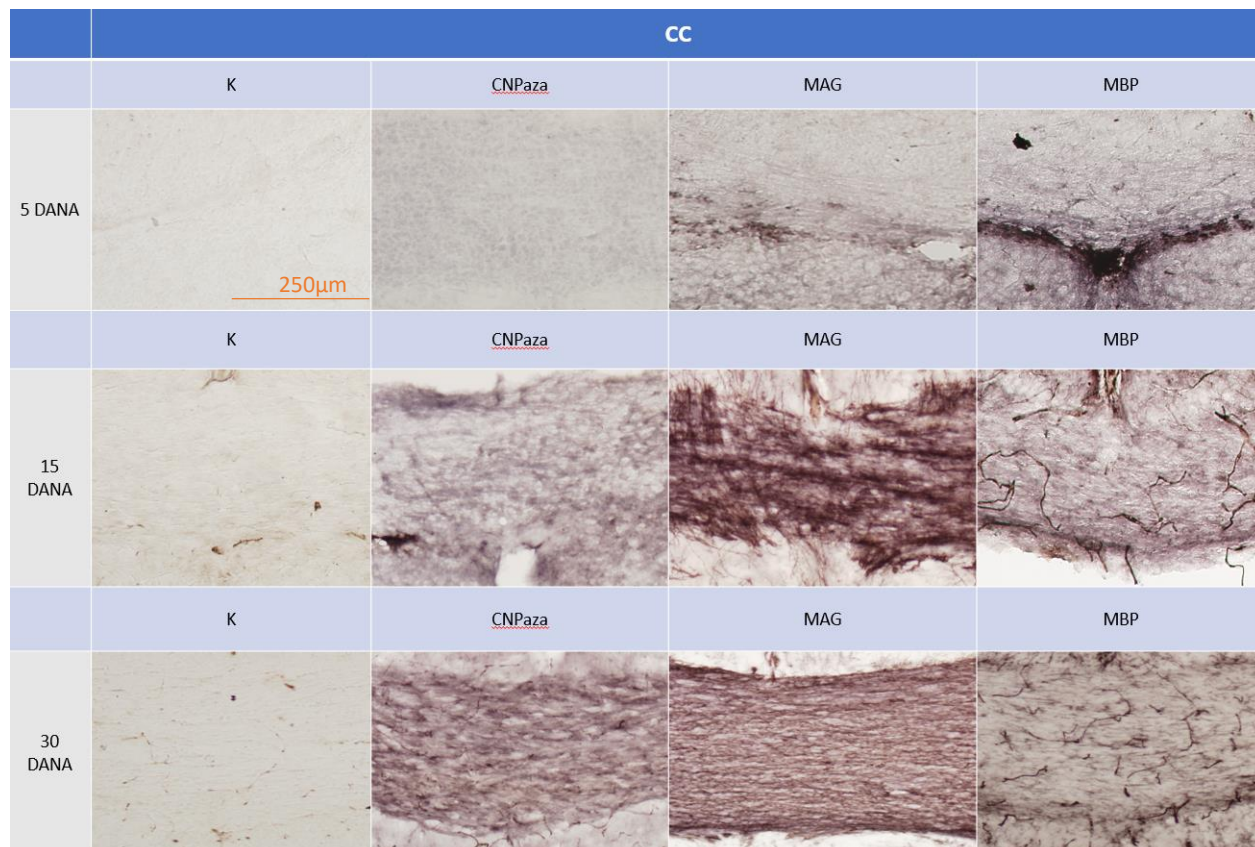


**Slika 4.** Skenirani rezovi s prikazom analiziranih regija (CC i ICP) obilježenih markerima mijelina. K označava kontrolu.



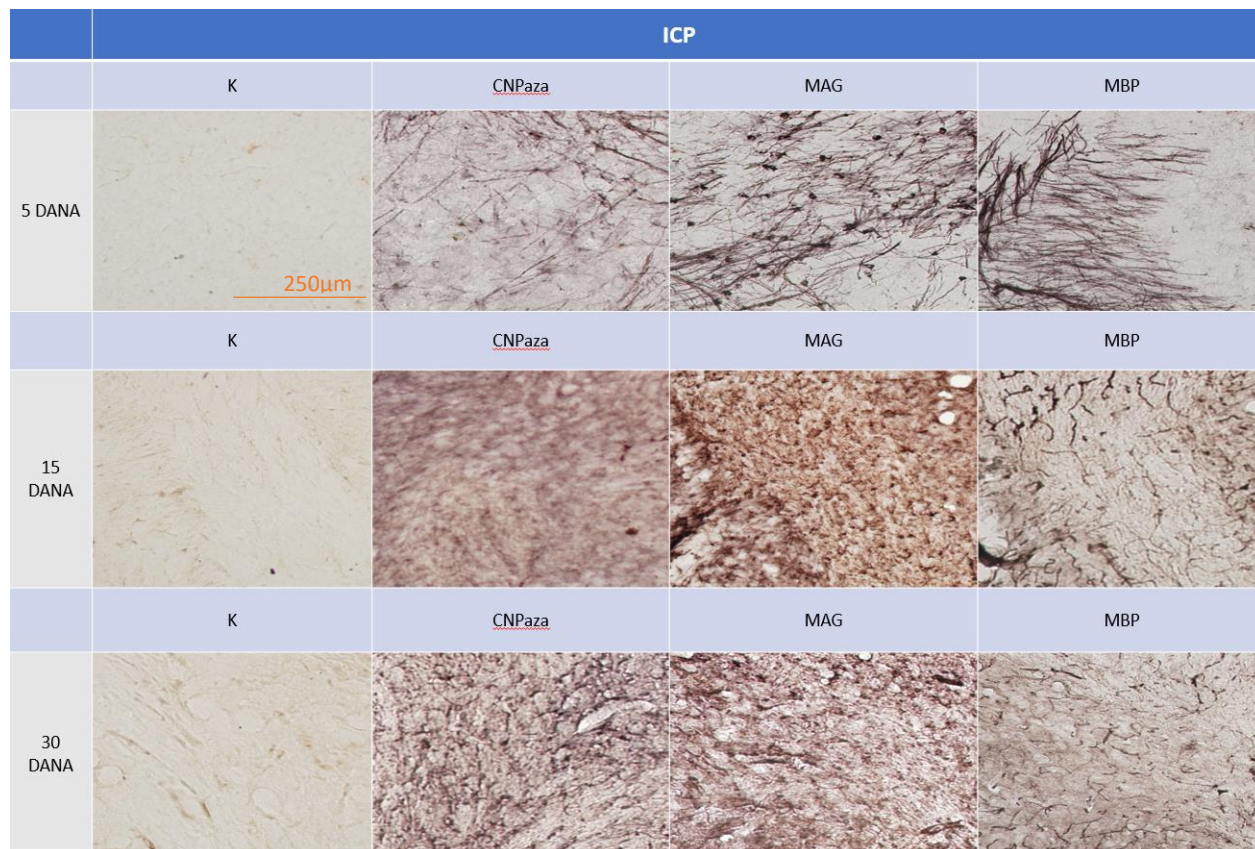
**Slika 5.** Skenirani rezovi s prikazom analiziranih regija (CC i ICP) obilježenih kompleksnim gangliozidima.

U programu *Fiji* kvantificirani su markeri mijelina te su prilikom obrade rezultata pri povećanju 100x napravljene slike rezova CC-a (Slika 6) i ICP-a (Slika 7) na kojima su vidljive promjene u ekspresiji pojedinih markera mijelina prema starosti miševa.



**Slika 6.** Prikaz imunohistokemijskog bojanja CC-a mozga divljeg tipa miša (WT) starosti 5, 15 i 30 dana protutijelima CNPaza, MAG i MBP u usporedbi s kontrolnim rezovima (K).

Povećanje je 100x.



**Slika 7.** Prikaz imunohistokemijskog bojanja ICP-a mozga divljeg tipa miša (WT) starosti 5, 15 i 30 dana protutijelima CNPaza, MAG i MBP u usporedbi s kontrolnim rezovima (K). Povećanje je 100x.

Prilikom analize slika određena je količina piksela za svaku dobnu skupinu (Tablica 1, Tablica 2, Tablica 3) koja odgovara količini pozitivnog obojenja protutijelima CNPaza, MAG i MBP. Rezultati su statistički obrađeni u programu *IBM SPSS Statistics v22*. Nakon što je utvrđeno da raspodjela podataka nije normalna za testiranje razlike između varijabli korišten je Mann-Whitney-Wilcoxonov test. Prilikom statističke obrade rezultata također je korišten Kruskal Wallis test koji se upotrebljava kao neparametrijska analiza za više nezavisnih uzoraka.



**Tablica 1.** Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima CNPaza, MAG i MBP u područjima CC i ICP kod miševa starih 5 dana.

| <b>5D</b>  |        | <b>Srednja vrijednost količine piksela</b> |
|------------|--------|--|
| <b>CC</b>  | K      | 42,99                                      |
|            | CNPaza | 67,69                                      |
|            | MAG    | 57,87                                      |
|            | MBP    | 61,44                                      |
| <b>ICP</b> | K      | 52,70                                      |
|            | CNPaza | 89,92                                      |
|            | MAG    | 80,80                                      |
|            | MBP    | 80,94                                      |

**Tablica 2.** Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima CNPaza, MAG i MBP u područjima CC i ICP kod miševa starih 15 dana.

| <b>15D</b> |        | <b>Srednja vrijednost količine piksela</b> |
|------------|--------|--|
| <b>CC</b>  | K      | 60,87                                      |
|            | CNPaza | 130,86                                     |
|            | MAG    | 159,51                                     |
|            | MBP    | 127,38                                     |
| <b>ICP</b> | K      | 47,71                                      |
|            | CNPaza | 105,64                                     |
|            | MAG    | 113,81                                     |
|            | MBP    | 77,81                                      |

**Tablica 3.** Srednje vrijednosti količine piksela koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima CNPaza, MAG i MBP u područjima CC i ICP kod miševa starih 30 dana.

| <b>30D</b> |        | <b>Srednja vrijednost količine piksela</b> |
|------------|--------|--|
| <b>CC</b>  | K      | 54,22                                      |
|            | CNPaza | 141,81                                     |
|            | MAG    | 148,89                                     |
|            | MBP    | 136,49                                     |
| <b>ICP</b> | K      | 55,52                                      |
|            | CNPaza | 91,29                                      |
|            | MAG    | 107,98                                     |
|            | MBP    | 81,39                                      |

Kruskal Wallis testom testirane su razlike između 5, 15 i 30 dana starih miševa (grupirajuća varijabla starost). Analizom je utvrđeno postojanje statistički značajne razlike ( $p < 0.05$ ) u navedenim regijama mozga, s obzirom na starost, kod svih korištenih markera, osim MBP u ICP području (Tablica 4).

**Tablica 4.** Rezultati statističke analize CNPaze, MAG-a i MBP-a u CC-u i ICP-u s obzirom na starost.

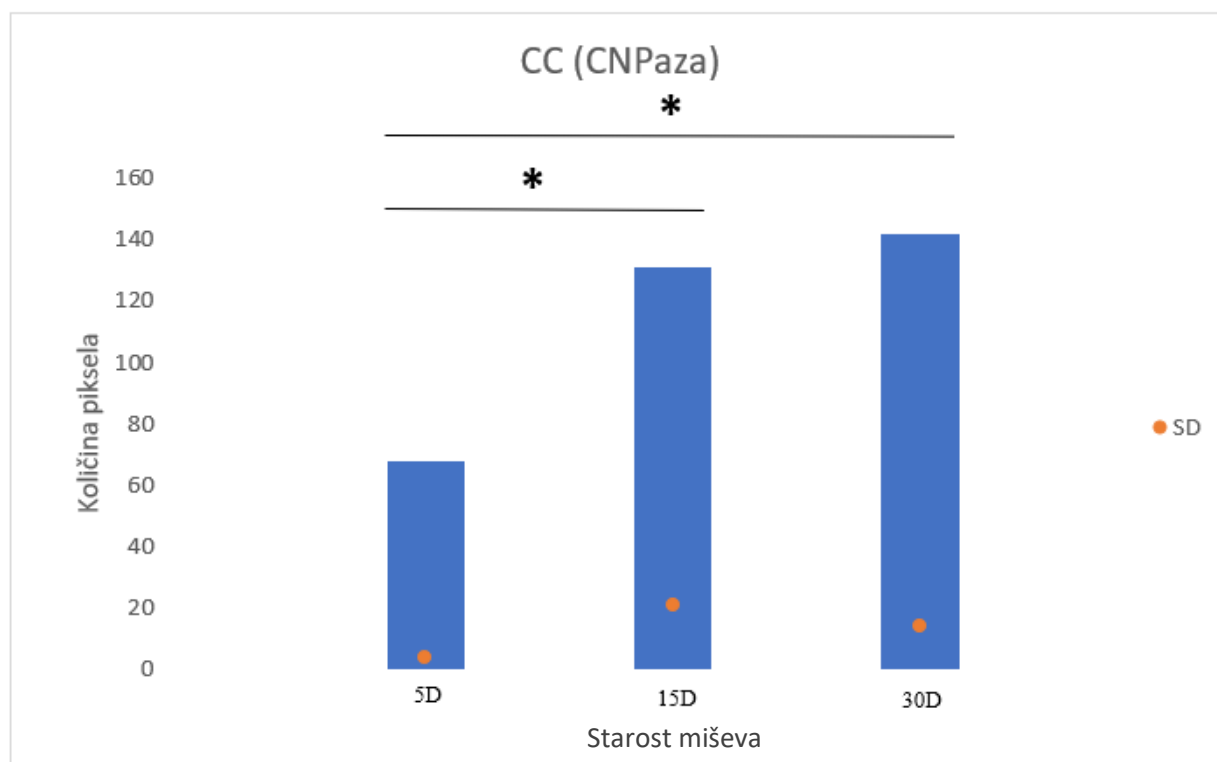
|   | CC<br>CNPaza | ICP<br>CNPaza | CC<br>MAG    | ICP<br>MAG   | CC<br>MBP    | ICP<br>MBP |
|---|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|------------|
| p | <b>0,000</b> | <b>0,004</b>  | <b>0,006</b> | <b>0,002</b> | <b>0,002</b> | 0,416      |

Kruskal Wallis test također je korišten za utvrđivanje mogućih razlika između CC-a i ICP-a kod korištenih markera. Kod CNPaze pokazana je statistički značajna razlika između CC-a i ICP-a za sve dobne skupine ( $p < 0.05$ ) (Tablica 5).

**Tablica 5.** Usporedba CC-a i ICP-a za CNPazu kod miševa starih 5, 15 i 30 dana.

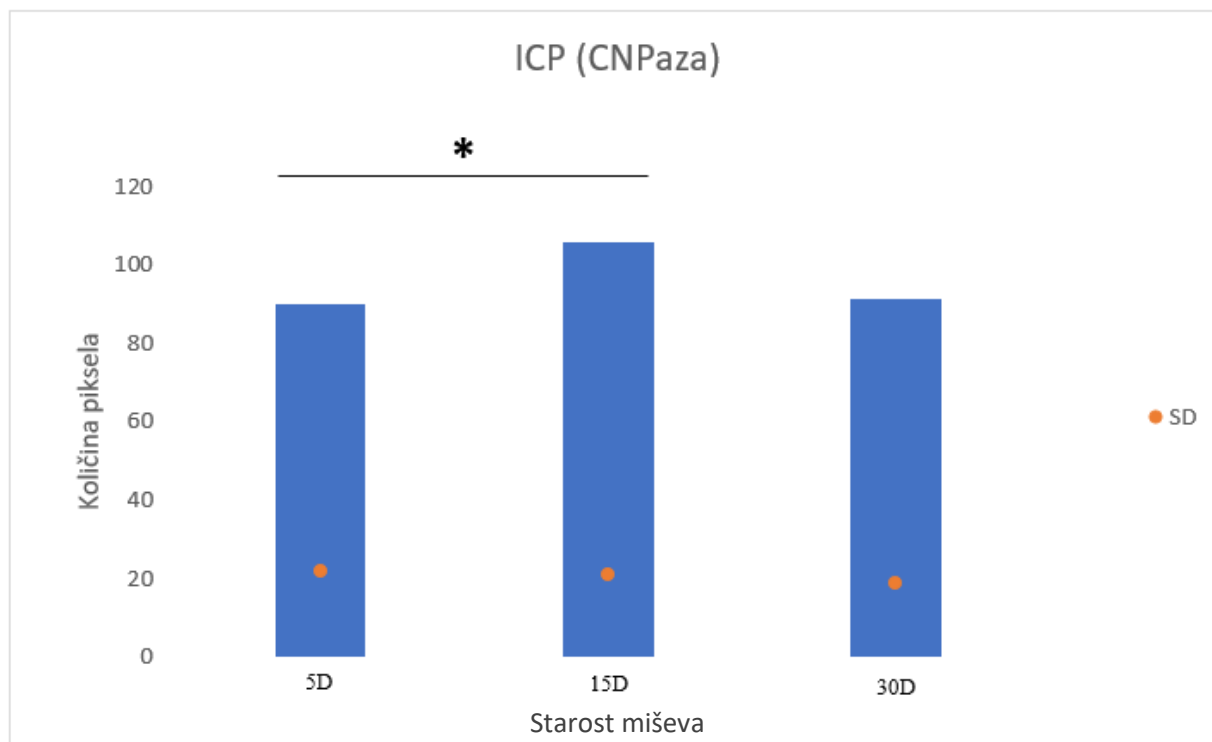
|   | 5D    | 15D   | 30D   |
|---|-------|-------|-------|
| p | 0,025 | 0,025 | 0,025 |

Nadalje, u području CC-a CNPaza ima najjači izražaj kod miševa starih 30 dana. Količina piksela iznosi 141,81 (SD= 14,09). Kod miševa starih 15 dana izražaj je nešto slabiji te količina piksela iznosi 130,86 (SD= 20,68), a kod miševa starih 5 dana 67,69 (SD= 3,92). Statistički značajna razlika pronađena je između miševa starosti 5 i 30 dana te između miševa 5 i 15 dana starosti (Slika 8).



**Slika 8.** Usporedba ekspresije CNPaze kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području CC-a. \* označava statistički značajnu razliku

Za razliku od CC-a, u ICP-u je najjači izražaj CNPaze kod miševa starih 15 dana gdje količina piksela iznosi 105,64 (SD= 20,74), dok je najslabiji izražaj kod miševa starih 5 dana gdje iznosi 89,92 (SD= 21,78). Kod miševa starih 30 dana količina piksela je 91,29 (SD= 18,72) (Slika 9). Statistički značajna razlika uočena je samo između miševa starosti 5 i 15 dana.



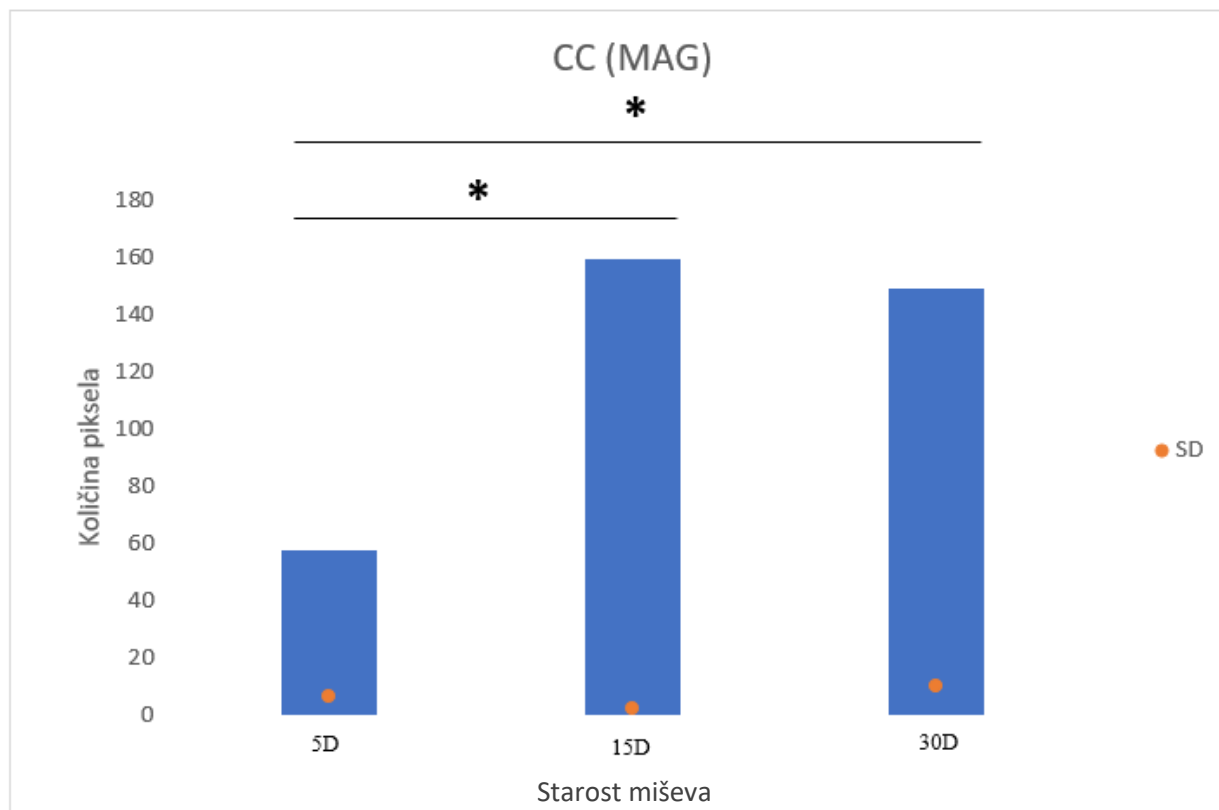
**Slika 9.** Usporedba ekspresije CNPaze kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području ICP-a. \* označava statistički značajnu razliku

Sljedeći marker bio je MAG kod kojeg je Kruskal Wallis testom također utvrđena statistički značajna razlika između CC-a i ICP-a (Tablica 6).

**Tablica 6.** Usporedba CC-a i ICP-a za MAG kod miševa starih 5, 15 i 30 dana.

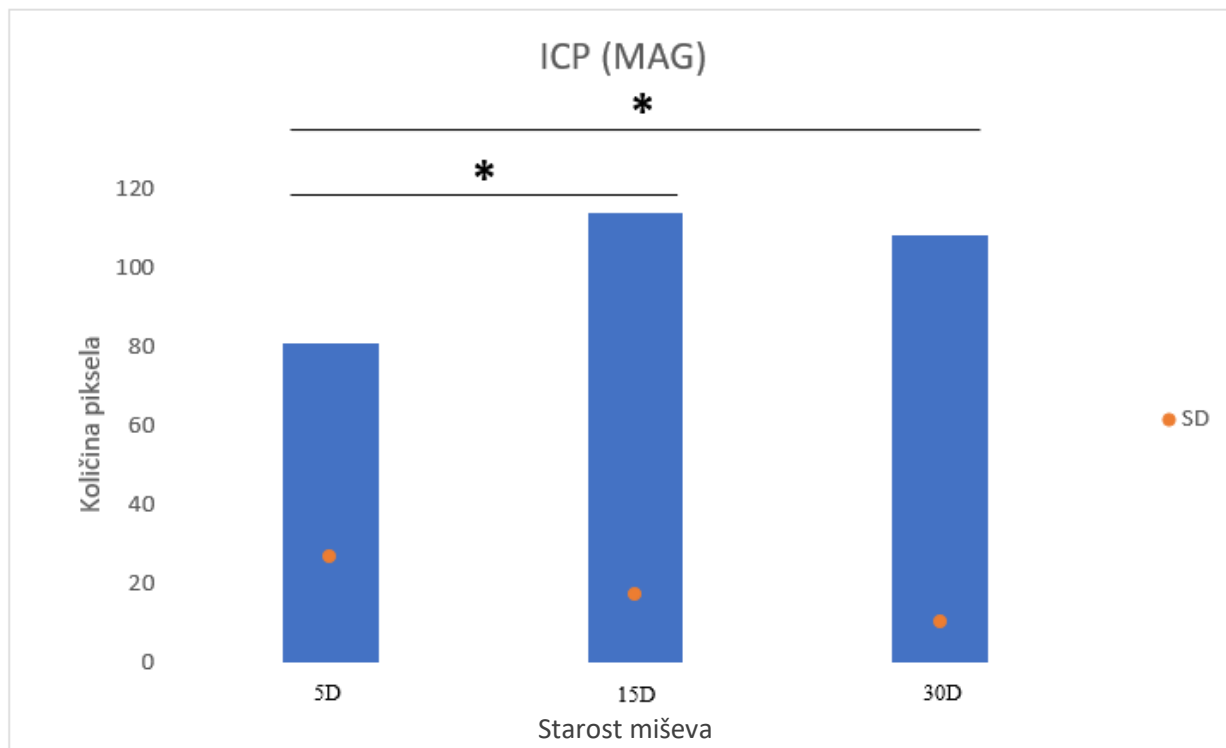
|   | 5D    | 15D   | 30D   |
|---|-------|-------|-------|
| p | 0,025 | 0,025 | 0,025 |

Pojedinačno gledano, u CC-u je korištenjem MAG-a količina piksela kod 30 i 15 dana starih miševa neznatno različita - kod miševa starih 30 dana iznosi 148,89 (SD= 9,88) dok kod miševa starih 15 dana iznosi 159,51 (SD= 2,07). Obradom podataka pronađena je statistički značajna razlika između miševa 5 i 15 dana starosti te 5 i 30 dana starosti ako se uzme u obzir da kod miševa 5 dana starosti količina piksela iznosi 57,87 (SD= 6,3) (Slika 10).



**Slika 10.** Usporedba ekspresije MAG-a kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području CC-a. \* označava statistički značajnu razliku

Kao i kod CC-a, najveći izražaj MAG-a u ICP-u je kod 15 dana starih miševa gdje količina piksela iznosi 113,81 (SD= 17,13). U odnosu na 5 dana stare miševe kod kojih je količina piksela 80,80 (SD= 26,39) postoji statistički značajna razlika. Statistički značajna razlika postoji također i između 5 i 30 dana starih miševa. Količina piksela kod miševa starosti 30 dana je 107,98 (SD= 10,18) (Slika 11).



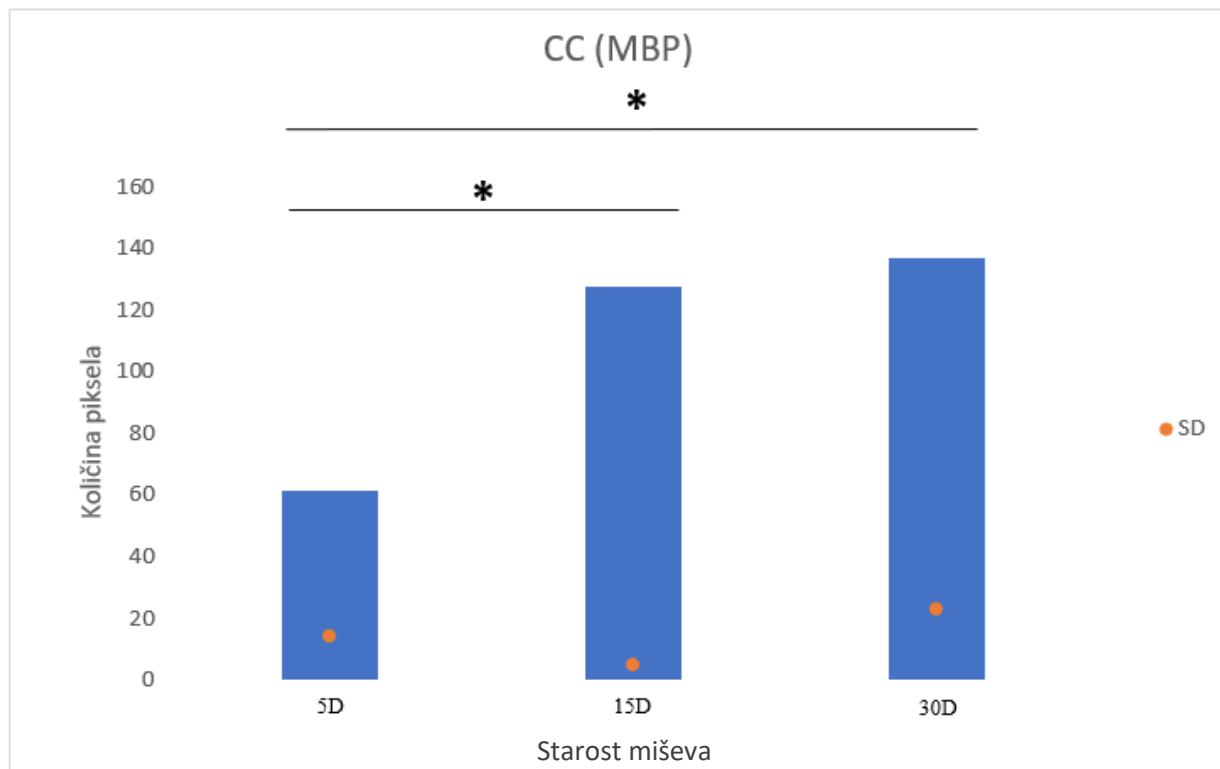
**Slika 11.** Usporedba ekspresije MAG-a kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području ICP-a. \* označava statistički značajnu razliku

Kao i kod ostalih dvaju markera, i MBP je pokazao statistički značajnu razliku između CC-a i ICP-a (Tablica 7).

**Tablica 7.** Usporedba CC-a i ICP-a za MBP kod miševa starih 5, 15 i 30 dana.

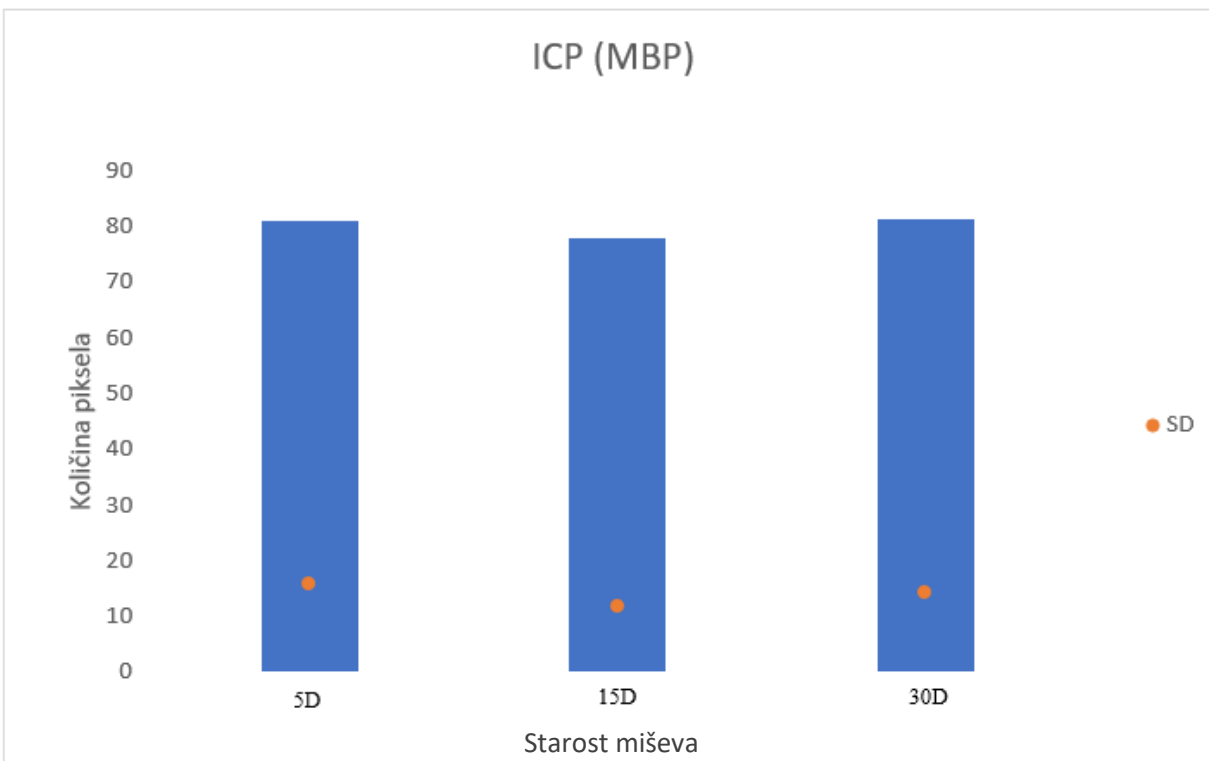
|   | 5D    | 15D   | 30D   |
|---|-------|-------|-------|
| p | 0,025 | 0,025 | 0,025 |

Nadalje, u području CC-a najveća je ekspresija MBP-a kod miševa starosti 30 dana gdje je izmjerena količina piksela 136,49 (SD= 22,76). Slijede ih miševi 15 dana starosti s količinom piksela 127,38 (SD= 4,77) te miševi stari 5 dana 61,44 (SD= 13,99). Jednako kao kod MAG-a, statistički značajna razlika postoji između 5 i 15 te 5 i 30 dana starih miševa (Slika 12).



**Slika 12.** Usporedba ekspresije MBP-a kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području CC-a. \* označava statistički značajnu razliku

Suprotno tome, nije pronađena statistički značajna razlika u izražaju MBP-a u ICP-u s obzirom na starost miševa. U ICP-u je najveći izražaj MBP-a kod 30 dana starih miševa, a količina piksela iznosi 81,39 (SD= 14,05). Kod miševa starih 15 dana iznosi 77,81 (SD= 11,58), a kod miševa 5 dana starosti 80,94 (SD= 15,62). (Slika 13).



**Slika 13.** Usporedba ekspresije MBP-a kod miševa starih 5, 15 i 30 dana u području ICP-a.

Mann Whitney U testom testirano je postoji li razlika za svako tkivo s istim protutijelom kod 5D i 15D, 15D i 30D te 5D i 30D starosti miševa. Usporedbom miševa 5D i 30D starosti (Tablica 8) utvrđena je statistički značajna razlika gledajući *corpus callosum* kod svih triju markera te ICP uz MAG. Kod CNPaze i MBP-a u ICP-u razlika nije statistički značajna.

**Tablica 8.** Usporedba miševa starosti 5 dana i 30 dana u području CC i ICP korištenjem CNPaze, MAG-a i MBP-a.

|   | CC<br>CNPaza | ICP CNPaza | CC MAG       | ICP MAG      | CC MBP       | ICP MBP |
|---|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| p | <b>0,001</b> | 0,108      | <b>0,004</b> | <b>0,002</b> | <b>0,001</b> | 0,231   |



Usporedbom miševa 5D i 15D starosti (Tablica 9) utvrđena je statistički značajna razlika gledajući *corpus callosum* kod svih triju markera te ICP uz MAG i CNPazu. Kod MBP-a u ICP-u nije pronađena statistički značajna razlika.

**Tablica 9.** Usporedba miševa starosti 5 dana i 15 dana u području CC i ICP korištenjem CNPaze, MAG-a i MBP-a.

|   | CC<br>CNPaza | ICP CNPaza   | CC MAG       | ICP MAG      | CC MBP       | ICP MBP |
|---|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------|
| p | <b>0,002</b> | <b>0,001</b> | <b>0,020</b> | <b>0,005</b> | <b>0,013</b> | 0,340   |

Usporedbom miševa 15D i 30D starosti (Tablica 10) nije pronađena statistički značajna razlika u niti jednom promatranom području niti za jedno od korištenih protutijela.

**Tablica 10.** Usporedba miševa starosti 15 dana i 30 dana u području CC i ICP korištenjem CNPaze, MAG-a i MBP-a.

|   | CC<br>CNPaza | ICP CNPaza | CC MAG | ICP MAG | CC MBP | ICP MBP |
|---|--------------|------------|--------|---------|--------|---------|
| p | 0,289        | 0,093      | 0,439  | 0,396   | 0,796  | 0,664   |

## 6. RASPRAVA

Značajan problem u svijetu medicine danas predstavljaju demijelinizacijske bolesti. U sve su većem porastu, a i različiti načini na koje se manifestiraju stvaraju veliki izazov stručnjacima na tom području. Procjene su da od multiple skleroze, koja je samo jedan oblik demijelinizacijske bolesti, trenutno boluje više od tri milijuna ljudi u svijetu (18, 22). U ovoj bolesti imunološki sustav razgrađuje mijelinsku ovojnicu prilikom čega dolazi do nastanka plakova ili lezija te posljedično tome do demijelinizacije (18). Osim multiple skleroze, poremećaj u mijelinu značajan je i kod optičkog neuromijelitisa, leukodistrofije, poremećaja autističnog spektra, poremećaja pažnje s hiperaktivnošću (ADHD), kod neurodegenerativnih bolesti poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti te amiotrofične lateralne skleroze (32). Potpuna etiologija nije im poznata, a s ciljem njihova boljeg upoznavanja nužno je detaljno poznavanje procesa mijelinizacije u mozgu zdravih sisavaca.

Dokazano je kako u pravilnom održavanju mijelinske membrane sudjeluju lipidne splavi (18), a bitan su element lipidnih splavi gangliozidi (15), stoga proizlazi kako je pravilna distribucija i organizacija kompleksnih gangliozida u mijelinskoj ovojnici tijekom mijelinizacije neophodna za ispravno funkcioniranje središnjega živčanog sustava.

U ovom istraživanju korišteni su WT miševi stari 5, 15 i 30 dana te je ispitivana i uspoređivana distribucija kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) i markera mijelina (CNPaza, MAG i MBP) prije, tijekom i nakon završenog procesa mijelinizacije.

Poznato je da je *corpus callosum* glavna komisura (snop živčanih vlakana) velikog mozga koja omogućuje prenošenje informacija među polutkama, dok su za mali mozak poveznica s ostatkom SŽS-a krakovi malog mozga (*pedunculus cerebellaris*) (34). Mali mozak s produženom i leđnom moždinom povezan je ICP-om. S obzirom da je veliki mozak zadužen za senzorne, motoričke i kognitivne funkcije, a mali mozak za ravnotežu i finu motoriku neophodna je njihova međusobna komunikacija te putevi prijenosa signala među njima kako bi SŽS ispravno funkcionirao (34). Prijašnja istraživanja pokazala su kako mijelinizacija započinje u stražnjem dijelu mozga u kojemu je uočena dobra mijeliniziranost cerebelarnih pedunkula prije samog rođenja i u ranoj životnoj dobi te se nastavlja u rostralnom smjeru gdje se naknadno mijelinizira, uz ostala područja, i područje CC-a (29). To je potvrđeno i u ovom radu jer je kod miševa starih 5

dana, kod kojih je mijelinizacija u početnom stadiju, veći izražaj markera mijelina uočen u području ICP-a u odnosu na područje CC-a.

Nadalje, najviša ekspresija MAG-a zabilježena je u CC-u kod 15 dana starih miševa, dok je najviša ekspresija MBP-a kod 30 dana starih miševa. Takvi rezultati poklapaju se sa starijim istraživanjima rađenim na perifernom živčanom sustavu u kojima se MAG pokazao najviše izražen kod životinja starosti 13 dana, dok je MBP pokazao porast tjedan dana kasnije (35). Samo povećanje ekspresije MAG-a tijekom mijelinizacije od iznimne je važnosti za daljnji razvoj mozga jer su prijašnji radovi pokazali kako miševi s nedostatkom MAG-a imaju odgođenu mijelinizaciju zato što oligodendrociti manje učinkovito formiraju mijelin te starenjem brže propadaju (36). Osim toga, mijelinizacija je dovedena u vezu i s epilepsijom gdje je pokazano kako se kod epileptičnih napada javlja demijelinizacija, odnosno smanjen sadržaj mijelinskih proteina (37).

Nadalje, pokazana je i značajna prisutnost CNPaze tijekom procesa mijelinizacije što igra bitnu ulogu ako se uzme u obzir da su starija istraživanja pokazala njegovu pojavu prije početka samog procesa mijelinizacije i njegovu konstantnost za vrijeme samoga procesa (38). MBP u SŽS-u služi za zbijanje mijelinske membrane koje započinje vrlo rano u razvoju te se kreće od najudaljenijih slojeva prema aksonu (39). Sam proces mora biti dobro reguliran i ograničen na određena mjesta mijelinske ovojnice kako ne bi došlo do zbijanja slojeva koji su još u fazi razvoja. Da bi se to postiglo dokazana je bitna funkcija CNPaze prilikom čijega nedostatka dolazi do ubrzanog zbijanja mijelina dok se kod prekomjerne ekspresije CNPaze javlja nedostatan zbijanje mijelina (39). Pretpostavka je stoga da se MBP sintetizira u unutarnjim dijelovima, a tek kada započne zbijanje difundira u vanjske slojeve membrane te stvara mrežu koja je ključna za stabilnost i zbijenost mijelinske membrane (39).

Osim kod markera mijelina, značajno povećanje u ekspresiji vidljivo je i u kompleksnim gangliozidima između 5 i 15 te 5 i 30 dana starih miševa, no između 15 i 30 dana starih miševa povećanje nije toliko očito. To bi moglo značiti kako je proces mijelinizacije ubrzan u prvim danima života miševa, dok kasnije nije podložan većim promjenama, što se moglo i očekivati ako uzmemo u obzir da je prilikom proučavanja mijelina u mozgu dojenčadi lipidni sastav kod djece već od 24 dana bio sličan onome iz mozga odraslih osoba (40). Ovakav sadržaj gangliozida u mijelinu od iznimne je važnosti za normalan razvoj jer je kod KO miševa, *St3gal5* i *B4galnt1*, koji nemaju značajne količine kompleksnih gangliozida u mozgu dokazano kako dolazi do rane

aksonske degeneracije te poremećaja u interakciji između aksona i mijelina što potvrđuje prijašnju tezu kako gangliozidi GD1a i GT1b (gangliozidi koji vežu MAG) djeluju na stabilnost aksona i mijelina (41). Također, ovakvo povećanje ekspresije gangliozida bilo je i očekivano s obzirom na činjenicu da se u početku embrionalnog razvoja u mozgu pojavljuju jednostavniji oblici gangliozida kao što su GM3 i GD3 prilikom čega dolazi do dramatičnog porasta gangliozida u mozgu u 10. gestacijskom tjednu, a potom rastom dolazi do razvoja složenijih oblika (GM1a, GD1a, GD1b i GT1b) (7).

Ograničenja su ove studije brojnost i starost životinja. U idućim istraživanjima trebalo bi uz navedenu starost uključiti i starije miševе kako bi se vidjelo daljnje napredovanje mijelinizacije u usporedbi s tek rođenim miševima jer su dosadašnja istraživanja pokazala kako je proces mijelinizacije najaktivniji tijekom prvih pet godina života te kako se porast gangliozida u mozgu nastavlja upravo do te dobi (7).

## 7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenoga istraživanja doneseni su sljedeći zaključci:

- distribucija kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) u lipidnim splavima na mijelinskim ovojnicama povećava se tijekom procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6;
- distribucija markera mijelina, CNPaze i MAG-a, značajno se povećava kod miševa 15 i 30 dana starosti u odnosu na 5 dana stare miševе divljeg tipa u području ICP-a i CC-a, a razlika između 15 i 30 dana starih miševa nije statistički značajna;
- uspoređujući starosne dobi dokazano je kako se distribucija MBP-a mijenja s obzirom na starost miševa u područjima CC i ICP, ali razlika nije statistički značajna.

## 8. SAŽETAK

**Uvod:** Procesom mijelinizacije nastaje mijelinska ovojnica koja je u SŽS-u građena od oligodendrocita. Sastoji se od proteina (MBP, PLP, DM20, CNP, MOG i MAG) i velike količine lipida (dominiraju glikofosfolipidi i kolesterol). Ulogu u formiranju mijelinske membrane imaju lipidne splavi, visokouređene domene čiji su glavni organizatori gangliozidi.

**Ciljevi:** Odrediti distribuciju kompleksnih gangliozida i markere mijelina prije, tijekom i nakon završene mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6.

**Materijali i metode:** Korišteni su miševi divljeg tipa starosti 5, 15 i 30 dana. Nakon genotipizacije, životinje su žrtvovane, a mozgovi izolirani, fiksirani i krioprotektirani. Napravljena je imunohistokemijska analiza korištenjem protutijela CNPaza, MAG, MBP, GM1, GD1a, GD1b i GT1b na rezovima debljine 35µm. Rezultati su promatrani svjetlosnim mikroskopom, fotografirani, analizirani u programu *Fiji*, a statistika je napravljena u programu *Statistica v22*.

**Rezultati:** S obzirom na starost, statistički značajna razlika pronađena je u svim područjima, za sve markere mijelina, osim MBP-a u ICP području. Između CC-a i ICP-a, kod svih navedenih markera, uočena je statistički značajna razlika za sve starosne dobi. Kod kompleksnih gangliozida očita je promjena između mozgova starih 5 dana u odnosu na 15 i 30 dana. Između 15 i 30 dana starih miševa razlike postoje, ali nisu statistički značajne.

**Zaključak:** Distribucija kompleksnih gangliozida na mijelinskim ovojnica povećava se tijekom procesa mijelinizacije u mozgu divljeg tipa miša C57Bl6. Izražaj markera mijelina statistički se razlikuje kod miševa 5 dana starosti u odnosu na 15 i 30 dana stare miševe.

**Ključne riječi:** *Corpus callosum*; gangliozidi; lipidne splavi; mijelinska ovojnica; *Pedunculus cerebellaris inferior*

## 9. SUMMARY

Distribution of complex gangliosides before and after myelination process in brain of wild type mouse C57Bl6.

**Introduction:** The process of myelination produces the myelin sheath, which is made by oligodendrocytes in the CNS. It is composed of proteins (MBP, PLP, DM20, CNP, MOG and MAG) and a large amount of lipids (glyphospholipids and cholesterol dominate). Lipid rafts, high-order domains whose main organizers are gangliosides, play a role in the formation of the myelin membrane.

**Goals:** To determine the distribution of complex gangliosides and myelin markers before, during, and after completion of myelination in the brain of a wild type of mouse C57Bl6

**Materials and Methods:** Wild-type mice aged 5, 15 and 30 days were used. After genotyping, the animals were sacrificed and the brains isolated, fixed and cryoprotected. Immunohistochemical analysis was performed using CNPase, MAG, MBP, GM1, GD1a, GD1b and GT1b antibodies at 35 $\mu$ m sections. The results were observed with a light microscope, photographed, analyzed in *Fiji*, and statistics was made in *Statistica v22*.

**Results:** Considering the age, a statistically significant difference was found in all areas, for all myelin markers except MBP in the ICP area. There was a statistically significant difference between CC and ICP for all markers at all ages. In complex gangliosides, there is an apparent change between brains which were 5 days old compared to brains which were 15 and 30 days old. There are differences between 15 and 30 days old mice, but they are not statistically significant.

**Conclusion:** The distribution of complex gangliosides on myelin sheaths increases during the myelination process in the brain of a wild type of mouse C57Bl6. The expression of myelin markers was statistically different in mice which were 5 days old compared to mice which were 15 and 30 days old.

**Key words:** *Corpus callosum*; gangliosides; lipid rafts; myelin sheath; *Pedunculus cerebellaris inferior*

---

## 10. LITERATURA

1. Svennerholm L. Structure and Biology of Cell Membrane Gangliosides. In: Cholera and Related Diarrheas [Internet]. S. Karger AG; 1980. p. 80–7. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/403251>
2. Mocchetti I. Exogenous gangliosides, neuronal plasticity and repair, and the neurotrophins. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2005 Oct 15;62(19–20):2283–94. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-005-5188-y>
3. Palestini P, Masserini M, Sonnino S, Giuliani A, Tettamanti G. Changes in the ceramide composition of rat forebrain gangliosides with age. *J Neurochem* [Internet]. 1990 Jan;54(1):230–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2293613>
4. Lopez PH, Schnaar RL. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr Opin Struct Biol* [Internet]. 2009 Oct;19(5):549–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19608407>
5. 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* [Internet]. 2014 Apr;94(2):461–518. Available from: <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00033.2013>
6. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* [Internet]. 2007 Jan 1;17(1):1R–13R. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16982663>
7. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The role of gangliosides in neurodevelopment. *Nutrients* [Internet]. 2015 May 22;7(5):3891–913. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26007338>
8. Rösner H. Developmental Expression and Possible Roles of Gangliosides in Brain Development. In Springer, Berlin, Heidelberg; 2003. p. 49–73. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55557-2\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-55557-2_3)
9. McGonigal R, Barrie JA, Yao D, McLaughlin M, Cunningham ME, Rowan EG, et al.



- Glial Sulfatides and Neuronal Complex Gangliosides Are Functionally Interdependent in Maintaining Myelinating Axon Integrity. *J Neurosci* [Internet]. 2019 Jan 2;39(1):63–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30446529>
10. Takashima S, Matsumoto T, Tsujimoto M, Tsuji S. Effects of amino acid substitutions in the sialylmotifs on molecular expression and enzymatic activities of  $\alpha$ 2,8-sialyltransferases ST8Sia-I and ST8Sia-VI. *Glycobiology* [Internet]. 2013 May;23(5):603–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315426>
  11. Chou H-H, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, et al. Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2002 Sep 3;99(18):11736–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12192086>
  12. Werth N, Schuette CG, Wilkening G, Lemm T, Sandhoff K. Degradation of membrane-bound ganglioside GM2 by beta -hexosaminidase A. Stimulation by GM2 activator protein and lysosomal lipids. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Apr 20;276(16):12685–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11278374>
  13. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biokemija*. 1. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
  14. Kolter T. Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochem* [Internet]. 2012;2012:1–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25969757>
  15. Cooper GM, Hausman RE, Lauc G, Zoldoš V. *Stanica : molekularni pristup* [Internet]. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010. Available from: <http://www.ljevak.hr/knjige/knjiga-3285>
  16. Simons K, Sampaio JL. Membrane Organization and Lipid Rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2011 Oct 1;3(10):a004697–a004697. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21628426>
  17. Tsui-Pierchala BA, Encinas M, Milbrandt J, Johnson EM. Lipid rafts in neuronal signaling and function. *Trends Neurosci* [Internet]. 2002 Aug;25(8):412–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12127758>
  18. Appadu A. Lipid raft formation and peptide-lipid interactions in myelin model membranes

- [Internet]. Theses and Dissertations (Comprehensive). 2012. Available from:  
<https://scholars.wlu.ca/etd/1124>
19. Grubić Kezele T, Fužinac-Smojver A, Ćurko-Cofek B, Jakovac H, Turković K. Adult neurogenesis – accent on subgranular and subventricular zone in mammals. *Med Flum.* 2017 Jun 1;53(2):136–46.
  20. Junqueira LC, Carneiro J. *Osnove histologije*. 10th ed. Zagreb: Školska knjiga; 2006.
  21. Šverko B, Zarevski P, Szabo S, Kljaić S, Kolega M, Turudić Čuljak T. *Psihologija*. 6. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
  22. Coggan JS, Bittner S, Stiefel KM, Meuth SG, Prescott SA. Physiological Dynamics in Demyelinating Diseases: Unraveling Complex Relationships through Computer Modeling. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Sep 7;16(9):21215–36. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26370960>
  23. Salzer JL, Zalc B. Myelination. *Curr Biol* [Internet]. 2016 Oct 24;26(20):R971–5. Available from: [https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822\(16\)30868-5?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982216308685%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/current-biology/fulltext/S0960-9822(16)30868-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0960982216308685%3Fshowall%3Dtrue)
  24. Lee AG. Myelin: Delivery by raft. *Curr Biol* [Internet]. 2001 Jan 23 [cited 2019 Apr 10];11(2):R60–2. Available from:  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982201000082>
  25. Simons M, Nave K-A. Oligodendrocytes: Myelination and Axonal Support. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2016 Jun 22;8(1):a020479. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101081>
  26. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White Leonard E. *Neuroznanost*. 5th ed. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.
  27. Tadinac M, Hromatko I. *Uvod u biološke osnove doživljavanja i ponašanja*. Dominović d.o.o., editor. Zagreb; 2012.
  28. Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, Alkass K, et al. Dynamics

- of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell* [Internet]. 2014 Nov 6;159(4):766–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25417154>
29. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2014 Sep 1;1843(9):1917–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488914001360?via%3Dihub>
30. Lassmann H. Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models [Internet]. Vol. 225, *Experimental Neurology*. 2010. p. 2–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840788>
31. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain* [Internet]. 2011 Jul 1;134(7):1914–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21653539>
32. Bercury KK, Macklin WB. Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Dev Cell* [Internet]. 2015 Feb 23;32(4):447–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25710531>
33. Ivić V. Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2017.
34. Bajek S, Bobinac D, Jerković R, Malnar D, Marić I. Sustavna anatomija čovjeka. Rijeka; 2007.
35. Stahl N, Harry J, Popko B. Quantitative analysis of myelin protein gene expression during development in the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res* [Internet]. 1990 Aug;8(3):209–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1699107>
36. Rasband MN, Macklin WB. Myelin Structure and Biochemistry. In: *Basic Neurochemistry* [Internet]. Elsevier; 2012. p. 180–99. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123749475000109>
37. Hu X, Wang J-Y, Gu R, Qu H, Li M, Chen L, et al. The relationship between the occurrence of intractable epilepsy with glial cells and myelin sheath - an experimental

- study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* [Internet]. 2016;20(21):4516–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27874947>
38. Yin X, Peterson J, Gravel M, Braun PE, Trapp BD. CNP overexpression induces aberrant oligodendrocyte membranes and inhibits MBP accumulation and myelin compaction. *J Neurosci Res* [Internet]. 1997 Oct 15;50(2):238–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373033>
39. Snaidero N, Simons M. Myelination at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2014 Jul 15;127(Pt 14):2999–3004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25024457>
40. Poduslo SE, Jang Y. Myelin development in infant brain. *Neurochem Res* [Internet]. 1984 Nov;9(11):1615–26. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00964595>
41. Schnaar RL. Brain gangliosides in axon-myelin stability and axon regeneration. *FEBS Lett* [Internet]. 2010 May 3;584(9):1741–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822144>

## 11. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Martina Matanović

Datum i mjesto rođenja:

30.10.1995., Požega

Obrazovanje:

- 2017. – 2019. Diplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2014. - 2017. Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2010. - 2014. Gimnazija Požega, prirodoslovno-matematički smjer
- 2002. - 2010. Osnovna škola Julija Kempfa u Požegi