

# Utjecaj enzimskog uklanjanja fosfolipida na prikaz gangliozida u mozgu miša

---

**Križaić, Karolina**

**Master's thesis / Diplomski 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:152:956946>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJANOSTIKA**

**Karolina Križaić**

**UTJECAJ ENZIMSKOG UKLANJANJA**

**FOSFOLIPIDA NA PRIKAZ**

**GANGLIOZIDA U MOZGU MIŠA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ MEDICINSKO**

**LABORATORIJSKA DIJANOSTIKA**

**Karolina Križaić**

**UTJECAJ ENZIMSKOG UKLANJANJA**

**FOSFOLIPIDA NA PRIKAZ**

**GANGLIOZIDA U MOZGU MIŠA**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2024.**

Rad je ostvaren u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

Mentor rada: Prof. dr. sc. Marija Heffer

Neposredni voditelj: Viktorija Čurila, mag. educ. biol. et chem.

Rad ima 32 lista, 5 tablica i 6 slika.

## SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Glikosfingolipidi.....	1
1.2. Gangliozidi.....	3
1.3. Lipidne splavi.....	6
1.4. Fosfolipaza A1 .....	7
2. HIPOTEZA.....	9
3. CILJ.....	10
4. MATERIJALI I METODE.....	11
4.1. Ustroj studije.....	11
4.2. Materijali (ispitanici) .....	11
4.2.1. Pokusne životinje.....	11
4.2.2. Kemikalije.....	11
4.3. Metode .....	12
4.3.1. Imunohistokemijska analiza.....	12
4.3.2. Kvantifikacija slika.....	13
4.4. Statistička analiza.....	13
5. REZULTATI.....	15
6. RASPRAVA .....	20
7. ZAKLJUČAK.....	24
8. SAŽETAK .....	25
9. SUMMARY .....	26
10. LITERATURA .....	27
11. ŽIVOTOPIS.....	32

## POPIS KRATICA

BDNF	moždani neurotrofni čimbenik (engl. <i>brain-derived neurotrophic factor</i> )
BSA	goveđi serumski albumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CERT	ceramidni transportni protein (engl. <i>ceramide transfer protein</i> )
DAB	3,3'-diaminobenzin
FAPP2	transportni protein (FAPP2), engl. <i>4-phosphate-adaptor-protein-2</i>
GalNAc	N-acetilgalaktozamin
GC	galaktocerebrozid
GD1a	disialo-galaktozil-glukozil-ceramid
GD1b	disialo-laktozil-glukozil-ceramid
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GlcNAc	N-acetilglukozamin
GM1	monosialotetraheksozilganglioizid
GSL	glikosfingolipidi
GT1b	trisialo-galaktozil-glukozil-ceramid
IHC	imunohistokemija (engl. <i>immunohistochemistry</i> )
IUPAC	međunarodna unija za čistu i primijenjenu kemiju (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
LacCer	laktozilceramid
LPL	lizofosfolipid
NeuAc	N-acetilneuraminska kiselina
NGF	čimbenik rasta živaca (engl. <i>nerve growth factor</i> )
PBS	fosfatno puferirana fiziološka otopina (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	paraformaldehid
PLA <sub>1</sub>	fosfolipaza A <sub>1</sub> (engl. <i>phospholipase A<sub>1</sub></i> )
SAP	protein aktivator sfingolipida (engl. <i>sphingolipid activator proteins</i> )
SN	nukleofilna supstitucija
TAG	triacilglicerol
TBS	TRIS-puferirana fiziološka otopina (engl. <i>TRIS-buffered saline</i> )

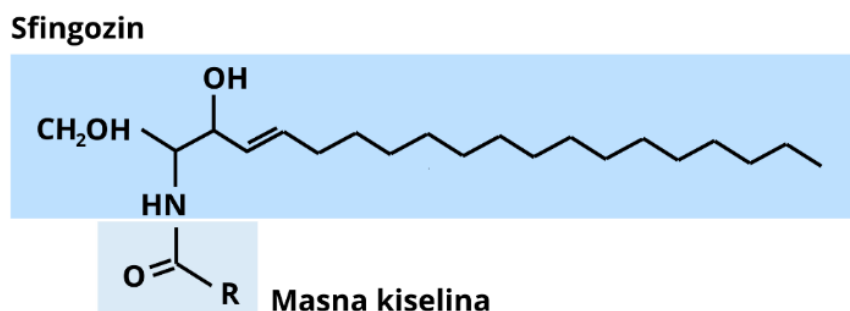
## 1. UVOD

Površinski sloj eukariotskih stanica primarno je građen od glikana, složenih ugljikohidrata koji se na temelju svojih fizičkih i kemijskih svojstava dijele na glikoproteine, proteoglikane i glikolipide. S obzirom na proteine, glikani zauzimaju više prostora po jedinici mase i njihove su konformacije vrlo osjetljive na manje promjene u kemijskoj strukturi. Budući da su veliki, pretežno hidrofilni i često negativno nabijeni, glikani dominiraju arhitekturom i fizičkim svojstvima staničnih površina (1).

### 1.1. Glikosfingolipidi

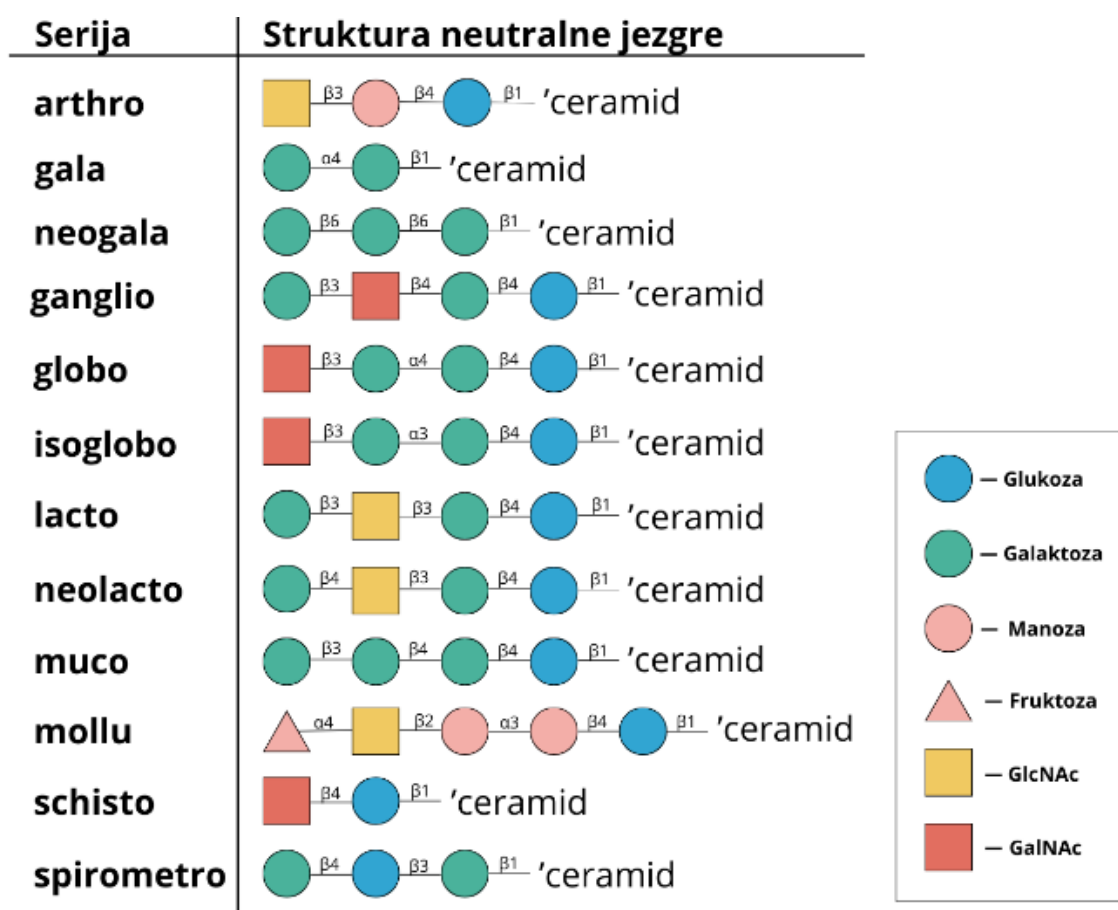
Glikolipidi su vrsta lipida koji na sebe imaju vezane glikane preko glikozidne veze. S obzirom na strukturu mogu se podijeliti na dvije osnovne skupine: glikosfingolipide i glikoglicerolipide. Glikosfingolipidi (GSL) kao okosnicu imaju sfingoidnu lipidnu bazu koja je najčešće sfinganin ili sfingoizin. Sfinganin i sfingoizin se strukturno razlikuju u trans dvostrukoj vezi između C-4 i C-5 koja je odsutna kod sfinganina. Postoji niz drugih sfingoidnih baza kao što su fitosfingoizin, metilsfingoizin i sfingoidne baze koje sadrže 20 ugljikovih atoma. Sfingoidne baze s 20 ugljikovih atoma najzastupljenije su u ganglioizidima mozga, dok je fitosfingoizin učestaliji u tkivima biljaka i gljiva. (1, 2).

Osnovna baza svih GSL-a je ceramid (Slika 1.). Ceramid je najjednostavniji sfingolipid i sastoji se od sfingozina koji na sebe, putem N-acilacije, veže masne kiseline na C-2 amin. Vezane masne kiseline uglavnom su zasićene, međutim mogu biti i nezasićene ili imati  $\alpha$ -hidroksilne skupine a uvelike variraju u veličini, u rasponu od C14 do C30 ili više (3). Dakle, na strukturne i funkcionalne razlike GSL-a utječu sfingoidne baze i različite duljine i stupnjevi hidroksilacije masnih kiselina.



Slika 1. Shematski prikaz kemijske strukture ceramida. (Sliku je izradila autorica)

Međutim, glavna klasifikacija GSL-a temelji se na varijaciji glikana vezanih na ceramid. Kod većine kralježnjaka prvi monosaharidi vezani na ceramid najčešće su  $\beta$ -vezana glukoza i galaktoza. Opisano je više od 500 različiti struktura glikana kod GSL-a čiji temelj čine glukoza, galaktoza, fukoza, N-acetilglukozamin (GlcNAc), N-acetilgalaktozamin (GalNAc) i sijalinska kiselina (N-acetilneuraminska kiselina) (4 – 6). Glikosfingolipidi se strukturno mogu klasificirati na temelju redoslijeda slaganja monosaharida u uobičajene sekvence od 4 uzastopna šećera koji zajedno čine neutralnu glikansku jezgru određene skupine GSL-a. Na temelju neutralnih glikanski jezgara, glikosfingolipidi se dijele na 12 serija (Slika 2.). Međutim, najčešće se klasificiraju kao neutralni glikosfingolipidi, sulfatidi (sadrže sulfatne skupine) i gangliozi (sadrže sijalinsku kiselinu) (7).

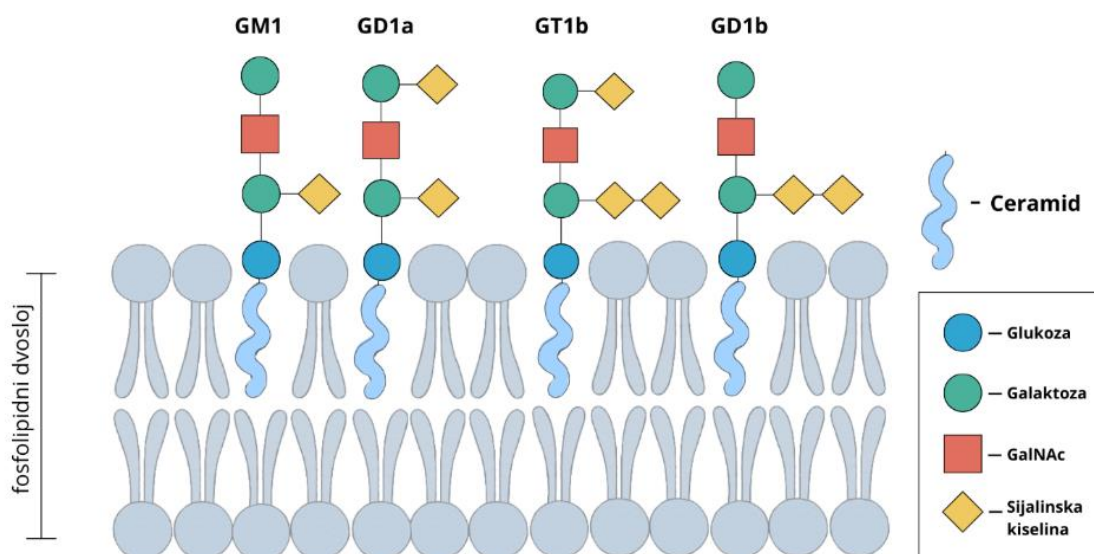


Slika 2. Prikaz serija glikosfingolipida na temelju strukture neutralne jezgre. (Sliku je izradila autorica)



## 1.2. Gangliozidi

Najzastupljenija skupina glikosfingolipida u mozgu čovjeka su gangliozidi, gdje je njihova zastupljenost u sivoj tvari oko pet puta veća nego u bijeloj tvari (8). Većina gangliozida kod odraslih sisavaca pripadaju ganglio, gala, lakto i neolakto serijama (9). Gangliozidi su primarno smješteni u vanjskom sloju stanične membrane neurona u koju su usidreni pomoću hidrofobnog ceramidnog repa i većim dijelom prvog šećera (glukoza ili galaktoza), dok se glikanski dio proteže prema izvanstaničnom prostoru (10). Gangliozidi nose 75 % ukupne sijalinske kiseline u mozgu čovjeka (11). Sijalinska kiselina je monosaharid s 9 ugljikovih atoma koja nastaje sintezom iz N-acetilmanozamina i fosfoenolpiruvata (2, 3). Sijalinska kiselina kod ljudi je N-acetilneuraminska kiselina (NeuAc). Relativno je jaka kiselina ( $pK_a = 2,6$ ) koja kod većine fizioloških pH-vrijednosti ima negativan naboj, zbog čega gangliozidi poprimaju kiselina svojstva (12).



Slika 3. Shematski prikaz kompleksnih gangliozida (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) smještenih u vanjskom sloju stanične membrane. (Sliku je izradila autorica)

Nomenklatura gangliozida prema Međunarodnoj uniji za čistu i primjenjenu kemiju (engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC*) vrlo je kompleksna, pa se u širokoj primjeni koristi pojednostavljeni sustav koji je razvio Lars Svennerholm (13). Prema Svennerholmu, struktura jezgre neutralnih šećera definira ime određene serije i predstavlja prvo slovo u nazivu molekule (G = ganglio, L = lacto itd.). Nakon čega slijedi veliko slovo koje označava ukupan broj vezanih sijalinskih kiselina (A = 0, M = 1, D = 2, T = 3, Q = 4, P = 5, H = 6, S = 7). Zatim se označuje duljina neutralne glikanske jezgre, odnosno broj vezanih neutralnih

ugljikohidrata. U početku se pretpostavljalo da broj vezanih ugljikohidrata ne može biti veći od pet, pa tako broj 1 predstavlja punu jezgru od četiri ugljikohidrata, dok kraće strukture imaju veće brojeve ( $5 - 1 = 4$ ). Broj sijalinskih kiselina povezanih s unutarnjim galaktoznim ostatkom označen je malim slovom ( $a = 1, b = 2$ , itd.), a broj sijalinskih kiselina povezanih s N-acetilgalaktozaminskim ostatkom označen je grčkim slovom ( $\alpha = 1, \beta = 2$ , itd.).

*De novo* biosinteza gangliozida započinje na membranama endoplazmatskog retikuluma, gdje različiti niz enzima katalizira proces nastajanja hidrofobnih ceramidnih sidra. Ceramidi se zatim putem vezikularnog transporta ili prijenosnih proteina (engl. *ceramide transfer protein* – CERT, engl. *4-phosphate-adaptor-protein-2* – FAPP2) transportiraju do membrane Golgijevog tijela, gdje prolaze kroz daljnje modifikacije (14). Glikoziltransferaze glavni su enzimi koji sudjeluju u modifikaciji i stvaranju različitih gangliozidnih struktura, a njihova aktivnost i uloga ovise o vrsti stanice (15). Anabolizam većine gangliozida iniciran je dodavanjem glukoze na ceramid, osim u slučaju sinteze GM4 gangliozida koji započinje dodavanjem galaktoze (16). Daljnjim dodavanjem galaktoze na glukozilceramid nastaje laktozilceramid (LacCer), glavni prekursor različitih GSL serija. U neuronima, biosinteza gangliozida a-serije započinje prijenosom sijalinske kiseline s CMP-sijalinske kiseline na galaktozilni ostatak LacCer-a čime nastaje jednostavan gangliozid GM3 (16). Daljnjom sijalilacijom nastaju GD3 i GT3, prekursori b- i c-serije gangliozida (17). Gangliozidi se zatim vezikulama prenose na staničnu membranu stanice gdje prolaze kroz procese glikozilacije, desijalilacije i remodelacije, ovisno o funkciji i diferencijaciji stanice (18). Sinteza gangliozida specifična je za vrstu stanice i regulirana na razini transkripcije (19).

Katabolizam gangliozida koordiniran je djelovanjem glikozidaza, lipaza i proteina aktivatora sfingolipida (engl. *sphingolipid activator proteins* – SAP), a započinje unošenjem molekula gangliozida u stanicu putem endocitoze. Stvorene endocitozne vezikule se stapaju s ranim endosomima i sazrijevaju u kasne endosome, koji se zatim stapaju s lizosomima. Specifične hidrolaze u lizosomima uzastopno cijepaju ostatke šećera od gangliozida, čime nastaju intermedijarne molekule koje se mogu reciklirati i time održati ravnotežu gangliozida u stanici, ili razgraditi do krajnjeg produkta (20).

Zahvaljujući heterogenosti u sastavu šećera glikanske skupine, postoji više od 200 različitih struktura gangliozida (21). Međutim, u mozgu odraslog čovjeka dominiraju četiri glavna gangliozida koji zajedno predstavljaju 97 % ukupnih gangliozida: GM1

(monosialotetraheksosilgangliozyd), GD1a (disialo-galaktozil-glukozil-ceramid), GD1b (disialo-laktozil-glukozil-ceramid) i GT1b (trisialo-galaktozil-glukozil-ceramid) (22). Tijekom sazrijevanja, njihova se zastupljenost u mozgu mijenja ovisno o fazi razvoja. Za vrijeme prenatalnog razvoja između 5. i 16. tjedna trudnoće čovjeka pretežno su izražene c-serije gangliozida koje su neophodne za rani razvoj mozga. GM3 i GD3 služe kao prekursori za složenije gangliozide i ima ih u izobilju tijekom ranog gestacijskog razdoblja. Nakon 16. tjedna dolazi do porasta koncentracije kompleksnijih gangliozida. GD1a pokazuje značajno povećanje u sloju kortikalne podploče, GD3 u ventrikularnom sloju kore velikog mozga, dok se GM1 počinje pojavljivati sve izraženije kako se mozak dalje razvija. Nakon rođenja, visoke razine GD1a i GM1 zapažane su u frontalnoj kori, što odražava njihovu uključenost u procese sinaptogeneze i mijelinizacij. Vidna kora bogata je GD1b i GT1b gangliozidima. Gangliozid GM1 pretežno je izražen u bijeloj tvari, uključujući područja poput *chiasma opticum* i *corpus callosum*, što ukazuje na njegovu ulogu u mijelinizaciji i cjelovitosti aksona. U odraslom mozgu čovjeka GD1b široko je izražen u sivoj i bijeloj tvari, dok je GM1 uglavnom prisutan u bijeloj tvari, a GD1a i GT1b pretežno su raspoređeni u sivoj tvari. Tijekom starenja koncentracija gangliozida postupno se smanjuje. U frontalnoj kori dolazi do značajnog smanjenja GD1a i GM1, što se može povezati s opadanjem kognitivne funkcije u starijoj dobi. U hipokampusu i cerebelarnoj kori zabilježeno je umjereno smanjenje GM1 i drugih gangliozida, što utječe na pamćenje i motoričke funkcije (23 – 25).

Zbog njihove kompleksne strukture i raspodjele unutar središnjeg živčanog sustava, tjelesnih tekućina i tkiva, gangliozidi sudjeluju u mnogim cis i trans interakcijama koje između ostalog uključuju i staničnu signalizaciju, posebno regulaciju rasta neurona, diferencijaciju i sinaptički prijenos. Također igraju ulogu u modulaciji imunološkog odgovora i prijanjanju stanica, te sudjeluju u zaštiti živčanih stanica od različitih vanjskih učinaka, uključujući toksine i patogene. Različita istraživanja na modelima miševa s isključenim genima, s nedostatkom sinteze gangliozida ili poremećajem u genu *GalNAcT* otkrila su mnogobrojne biološke važnosti gangliozida kod pravilnog razvoja organizma. Pa tako poremećaj u funkciji gangliozidnih sintaza može pridonijeti gluhoći i razvoju poremećaja pažnje i hiperaktivnosti (26, 27). Nedostatak kompleksnih gangliozida, uzrokovan poremećajem u funkciji *GalNAcT* gena, dovodi do značajnog smanjenja brzine provođenja živčanih impulsa (28), poremećene motoričke funkcije kod starijih miševa (29), te demijelinizacije i degeneracije aksona različitih živaca (30,31). Kod istovremenog

oštećenja funkcija *GalNAcT* i gangliozidnih sintaza dolazi do gubitka težine, progresivne motoričke i senzorne disfunkcije, pogoršanja prostornog učenja i pamćenja sa starenjem, te degeneracije Purkinjeovih neurona u kori malog mozga. Ovakvi poremećaji u ekspresiji gena rezultiraju skraćenim životnim vijekom, sa smrtnošću od 50 % do 30. tjedna starosti (32 – 34).

Razumijevanje strukture i funkcije gangliozida ključno je za razotkrivanje njihovog značaja u zdravlju i bolesti. Međutim, zbog ograničenja koja dolaze uz imunohistokemijske (IHC) analize često su rezultati različitih IHC istraživanja međusobno kontradiktorni. Poznato je kako korištenje određenih detergenata, kao što je Triton X – 100, može izazvati redistribuciju gangliozida unutar tkiva i tako utjecati na rezultate IHC metoda (35). Također, dokazano je kako neka protutijela imaju široku specifičnost zbog čega može doći do križnog vezanja i posljedično do varijacija u rezultatima istraživanja. Kako bi se smanjila ograničenja specifičnosti protutijela, koriste se visokospecifična monoklonalna protutijela (36). Ostali čimbenici kao što su temperatura (35) ili način fiksacije uzoraka (37) isto tako mogu utjecati na rezultate. Uz maksimalnu optimizaciju uvjeta, imunoreaktivnost gangliozida još uvijek ovisi o nekoliko čimbenika: gustoći određenog gangliozida u staničnoj membrani, drugim komponentama stanične membrane i ceramidnom dijelu gangliozida (38). Zbog toga je prilikom IHC analiza važno uzeti u obzir da odsustvo obojenja ne znači nužno i odsustvo gangliozida. Nadalje, kemijske i biokemijske analize gangliozida daju različite rezultate u odnosu na IHC analize. Dosadašnja istraživanja pokazala su kako su gangliozidi podjednako izraženi i u mijelinu i u aksonu (39, 40), međutim IHC analiza nije potvrdila navedene rezultate (41). Također analize tkiva pomoću biokemijskih metoda daju uvid u detaljniju i točniju raspodjelu gangliozidnih struktura unutar središnjeg živčanog sustava, koje nisu dostupne IHC metodama (42, 43).

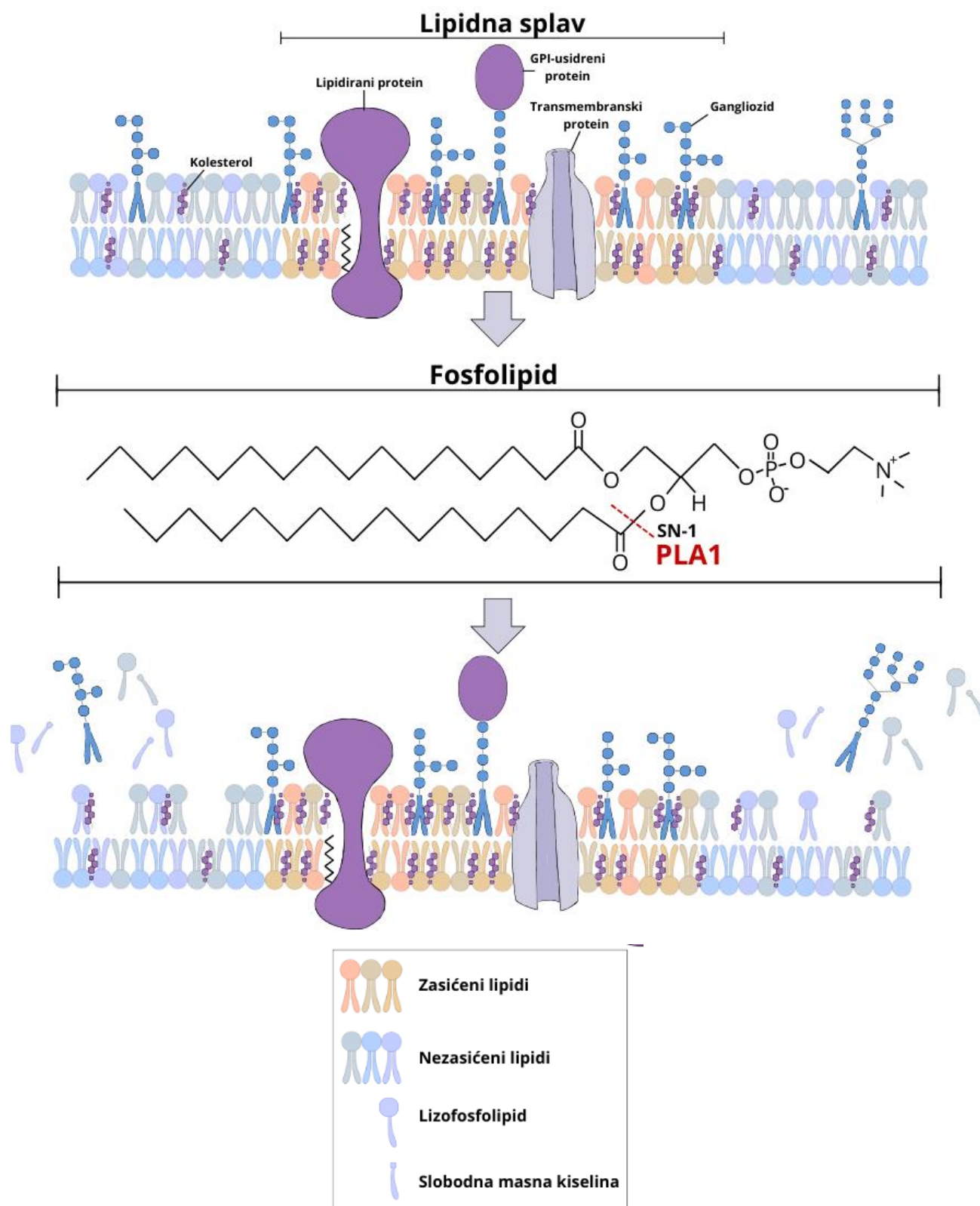
### **1.3. Lipidne splavi**

Sve veći broj istraživanja potvrđuje pretpostavku da komponente lipida i proteina u staničnoj membrani nisu nasumično raspoređene, nego organizirane u specifične domene s dinamičnim rasporedom. Ta je organizacija ključna za razne stanične funkcije, uključujući prijenos signala, promet membranom i održavanje strukturnog integriteta stanice. Lipidne splavi su specijalizirane mikrodomene, odnosno visoko uređena područja koja se nalaze unutar fluidnog i neuređenog fosfolipidnog dvosloja. Sastoje se od kolesterola, sfingolipida (što uključuje sfingomijelin i glikosfingolipide) i glicerofosfolipida. Kolesterol ispunjava prostore između lipida i tako pomaže

u stabilizaciji mikrodomena. Sfingolipidi zahvaljujući svojoj strukturi obogaćenoj dugačkim lancima zasićenih masnih kiselina doprinose čvrstom pakiranju domena i višoj temperaturi taljenja u odnosu na ostatak membrane. Glicerofosfolipidi slabo su zastupljeni u lipidnoj splavi u usporedbi s okolnom membranom. Također sadrže i specifične integralne i periferne proteine, uključujući receptore i signalne molekule. Iako su visoko uređene, lipidne plavi su dinamične i mogu se kretati unutar stanične membrane. Sudjeluju u prijenosu signala, vezikularnom transportu, te staničnoj adheziji i migraciji (44, 45).

#### **1.4. Fosfolipaza A1**

Postoje dvije vrste skupina fosfolipaza, ovisno o vrsti veze koju cijepaju, to su: acil hidrolaze i fosfodiesteraze. U acil hidrolaze spadaju fosfolipaza  $A_1$ , fosfolipaza  $A_2$ , fosfolipaza B i lizofosfolipaza  $A_{1/2}$ , dok u fosfodiesteraze spadaju fosfolipaza C i D (46). Fosfolipaza  $A_1$  ( $PLA_1$ ) hidrolizira estersku vezu na SN – 1 poziciji glicerofosfolipida, čime nastaje zasićena ili mononezasićena masna kiselina i lizofosfolipid (SN – 2 LPL). Neke  $PLA_1$  ciljaju i neutralne lipide kao što su triacilglicerol (TAG) i diacilglicerol (DAG) (47). Uloge  $PLA_1$  još uvijek nisu dovoljno istražene, međutim poznato je kako  $PLA_1$  sudjeluje u remodeliranju staničnih glicerofosfolipida proizvodnjom bioaktivnih lizofosfolipidnih (LPL) medijatora, kao i enzima za LPL medijatore (48, 49). LPL medijatori kao što su lizofosfatidna kiselina djeluju kao sekundarni glasnici u brojnim procesima poput proliferacije, transporta proteina, diferencijacije, invazije i morfogeneze (50). Pretpostavlja se da će lipidne splavi tijekom izlaganja uzoraka tretmanu  $PLA_1$ , zbog niske koncentracije fosfolipida i zaštitnog učinka kolesterola i sfingolipida, očuvati svoj integritet dok će  $PLA_1$  hidrolizirati fosfolipide u ostatku membrane. Budući da su gangliozidi pretežno lokalizirani u lipidnim splavima (44), pretpostavlja se da bi se uklanjanjem fosfolipida iz uzoraka tkiva IHC signal gangliozida povećao. Koliko nam je poznato, nema drugih istraživačkih studija koje su posebno istraživale upotrebu  $PLA_1$  u imunohistokemijskim metodama. Ova studija predstavlja novi pristup u korištenju  $PLA_1$  za poboljšanje vizualizacije gangliozida u tkivu malog mozga miša.



Slika 4. Shematski prikaz potencijalnog učinka PLA<sub>1</sub> na lipidni dvosloj koji bi mogao dovesti do gubitka gangliozida lokaliziranih izvan lipidnih splavi. (Sliku je izradila autorica)

## **2. HIPOTEZA**

Enzimatsko uklanjanje fosfolipida iz uzoraka tkiva za imunohistokemiju povećati će signal gangliozida.

### **3. CILJ**

Cilj ovog istraživanja je imunohistokemijski pokazati raspodjelu gangliozida GM1a, GD1a, GD1b i GT1b na fiksiranim rezovima mozga miša s i bez tretmana fosfolipazom.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Eksperimentalna studija, ustrojena kao istraživanje parova, provedena je na tkivima pokusnih životinja (miševi divljeg tipa, soj B6/129S). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 641–01/24–01/04, Ur. Broj: 2158–61–46–24–33). Provedena studija zadovoljava etičke standarde Direktive 2010/63/EU Europskog parlamenta i Vijeća o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe.

### 4.2. Materijali (ispitanici)

#### 4.2.1. Pokusne životinje

Kao materijal istraživanja korišteni su uzorci tkiva mozga prikupljenih od miševa starosti 7 mjeseci. Ukupno su žrtvovana tri miša muškog spola postupkom cervikalne dislokacije. Miševi su hranjeni standardnom hranom koja im je uz vodu bila stalno dostupna. Držani su u uzgojnim nastambama temperature 24 °C i vlažnosti 60 %, u uvjetima izmjene svjetlosti 12/12. Proces žrtvovanja životinja u skladu je s propisanim etičkim načelima.

#### 4.2.2. Kemikalije

Kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su visoke čistoće kako bi se osigurala točnost i pouzdanost rezultata. Fosfolipaza A<sub>1</sub> nabavljena je od Sigma – Aldrich (L3295) i ima specifičnu aktivnost od  $\geq 10$  KLU/g, što ukazuje na njenu učinkovitost i prikladnost za eksperimentalne postupke. Korištena su visokospecifična monoklonalna IgG protutijela (proizveo i donirao Odjel za farmakologiju Medicinskog fakulteta Johns Hopkins (Baltimore, MD, SAD) koja omogućuju precizno vezanje protutijela na ciljane epitope gangliozida. Svi ostali reagensi, uključujući sekundarna i tercijarna protutijela i otopine za blokiranje, nabavljeni su od renomiranih dobavljača i bili su analitičke kvalitete kako bi se održao integritet imunohistokemijskih analiza.

Tablica 1. Prikaz korištenih visokospecifičnih monoklonalnih mišjih IgG primarnih protutijela i korištena razrjeđenja.

Protutijela	Originalna koncentracija	Razrjeđenje	Datum proizvodnje
GM1	1,1 mg/ml	1 : 5000	15.06.2021.
GD1a	1,23 mg/ml	1 : 15000	22.06.2022.
GD1b	0,36 mg/ml	1 : 10000	09.06.2021.
GT1b	1,26 mg/ml	1 : 10000	04.06.2021.

### 4.3. Metode

#### 4.3.1. Imunohistokemijska analiza

Mozgovi su nakon žrtvovanja izdvojeni i fiksirani u 4 %-tnom paraformaldehidu (PFA) tijekom 48 sati na 4 °C. Kako bi se očuvala stanična struktura i minimiziralo nastajanje kristala leda, učinjena je krioprotekcija mozгова u 10 %-tnoj saharozu u fosfatno puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *phosphate buffered saline* – PBS) tijekom 24 sata. Uzorci su zamrznuti u pothlađenom izopentanu i pohranjeni na – 80 °C do trenutka analize.

Nakon zamrzavanja, uzorci su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (2 %-tna otopina karboksimetil celuloze) i rezani na kriostatu (LEICA CM3050 S) na rezove debljine 35 µm (temperatura kriostata = – 20 °C, temperatura objekta = – 18 °C). Rezovi su premješteni u mikrotitarsku ploču gdje su pohranjeni u TRIS-puferiranoj fiziološkoj otopini (engl. *TRIS-buffered saline* – TBS) na 10 minuta.

Svi koraci pretretmana i IHC analize slobodno plutajućih rezova provedeni su na 4 °C na tresilici, uz iznimku tretiranja uzoraka s PLA<sub>1</sub> gdje je inkubacija provedena na 37,5 °C. Uzorci su prvo pročišćeni od endogenih peroksidaza u 3 %-tnoj otopini vodikovog peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) u TBS-u 30 minuta i zatim podijeljeni u dvije skupine: uzorci tretirani s PLA<sub>1</sub> i netretirani uzorci. U istraživanju je korištena PLA<sub>1</sub> (*Phospholipase A1 from Aspergillus oryzae*, L3295, Sigma – Aldrich). Korišteno je 10 µl PLA<sub>1</sub> u 490 µl TBS-a po jažici. Uzorci su inkubirani u PLA<sub>1</sub> pet sati na 37,5 °C. Nakon inkubacije, kako bi se inhibirala aktivnost fosfolipaze, provedena je inkubacija u 1 %-tnoj otopini natrijevog azida (NaN<sub>3</sub>) u TBS-u 20 minuta.

Kako bi se minimiziralo nespecifično vezanje primarnih protutijela, obje skupine uzoraka inkubirane su u otopini za blokiranje (5 % kozji serum, 1 % BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*)) tijekom 2 sata. Zatim je slijedila inkubacija rezova preko noći u primarnim protutijelima otopljenim u otopini za blokiranje (Tablica 1.). Uzorci su sljedeće jutro ispirani tri puta po 10 minuta u TBS-u i inkubirani 4 sata u sekundarnom protutijelu (kozje anti-mišje IgG konjugirano s biotinom (teški + laki lanci), cat 115–065–166, Jackson ImmunoResearch Laboratories) pripremljenom u otopini za blokiranje u razrjeđenju 1: 500. Nakon 4 sata, rezovi su ispirani tri puta po 10 minuta u TBS-u i inkubirani 2 sata u tercijarnom kompleksu (VectaStain ABC – HRP kit, ZK0713, Vector Laboratories) pripremljenom prema uputama proizvođača. Nakon ponovnog ispiranja tri puta po 10 minuta u TBS-u, slijedilo je razvijanje boje u DAB (3,3'-diaminobenzidin, engl. *3,3'-diaminobenzidine*) otopini (DAB substrate Kit, ZJ0214, Vector Laboratories) pripremljenoj prema uputama proizvođača. Uzorci su držani u DAB otopini 4 minute. Nakon razvijanja boje, rezovi su nanoseni na želatinizirana stakla, osušeni i pokriveni s pokrovnim stakalcem. Preparati su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) i fotografirani kamerom Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) pod 50× i 100× ukupnim povećanjem.

#### 4.3.2. Kvantifikacija slika

Dobivene slike analizirane su i kvantificirane u Fiji programu (51). Slike su formatirane u 8-bitne fotografije, što nam je omogućilo rad u sivoj ljestvici čije se vrijednosti piksela kreću od 0 do 255 (manji iznos piksela predstavlja jače obojenje). Mjerena područja od interesa (engl. *region of interest* – ROI) bile su konstantne veličine. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost sive boje (engl. *mean gray value*), što predstavlja zbroj vrijednosti piksela sive boje podijeljene s brojem piksela.

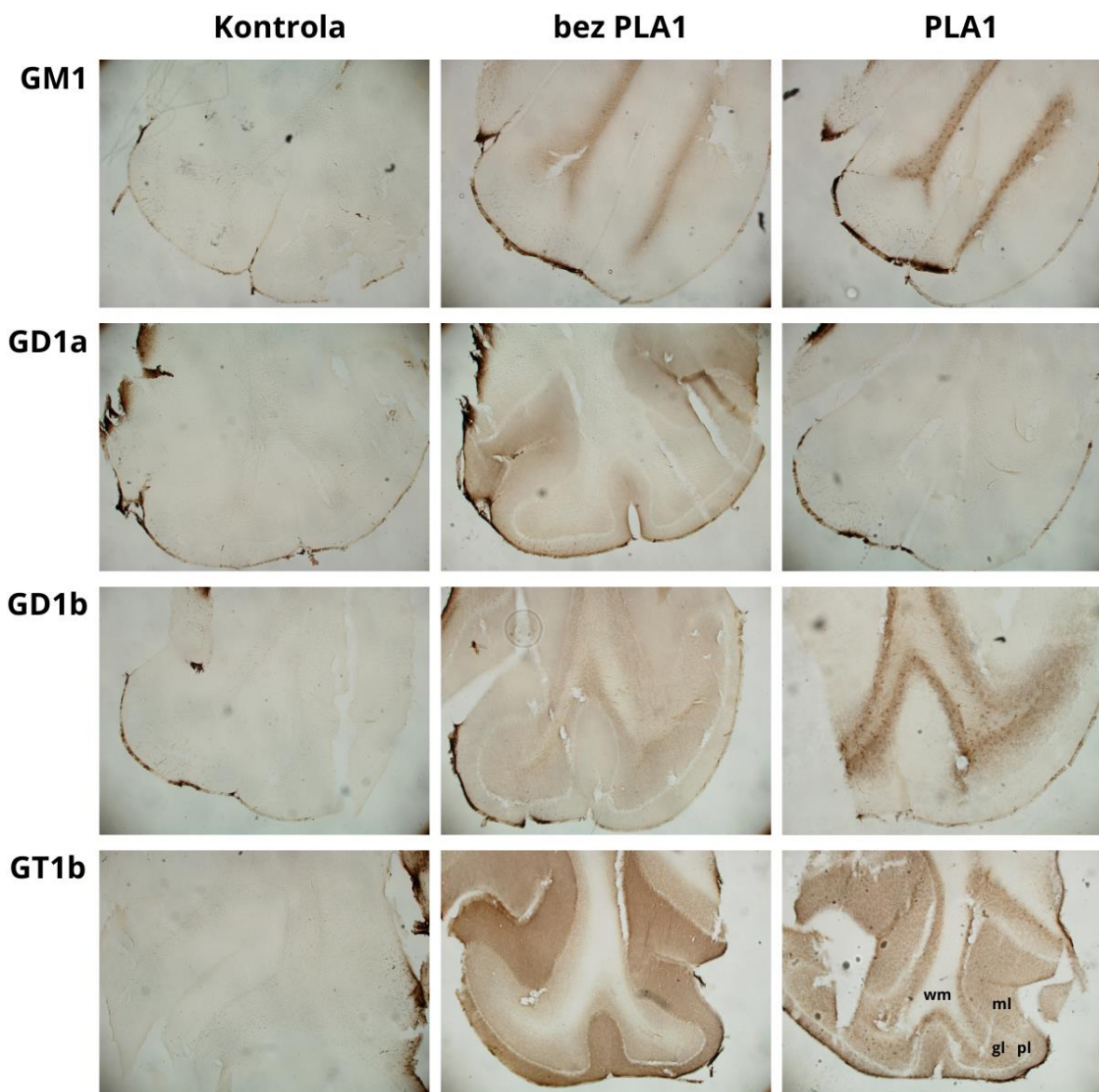
#### 4.4. Statistička analiza

Kategorijski podatci predstavljani su apsolutnim i relativnim frekvencijama. Za provjeru normalne raspodjele podataka korišten je Shapiro-Wilksov test. Numerički su podatci, zbog lakše usporedbe prikazani medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim T-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyjevim U testom. Sve p-vrijednosti su

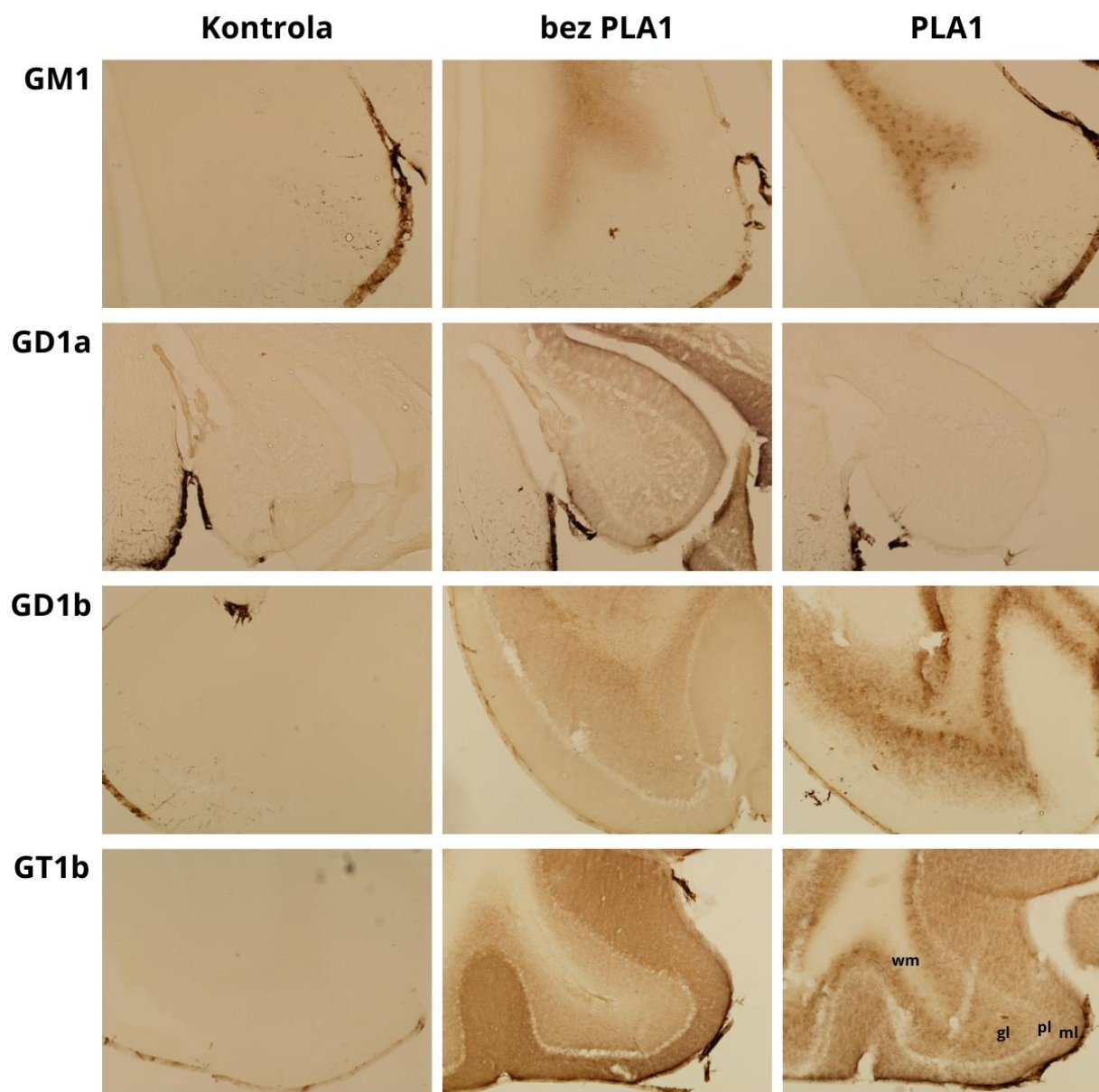
dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha = 0,05$ . Korišten je statistički program RStudio (inačica 4.4.1, Posit Software, PBC, Boston, MASS, SAD).

## 5. REZULTATI

Imunohistokemijska analiza ekspresije gangliozida GM1, GD1a, GD1b, GT1b promatrana je na regijama maloga mozga: bijela tvar, zrnasti sloj i molekularni sloj. Preparati su nakon analize pregledani i fotografirani na ukupnom povećanju 50× i 100× (Slika 2.1., Slika 2.2.).



Slika 5.1. Prikaz imunohistokemijskog obojenja kompleksnih gangliozida na rezovima maloga mozga miša netretiranih (bezPLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) uzoraka s fosfolipazom A<sub>1</sub> pod povećanjem 50×. Oznake: ml – molekularni sloj, pl – sloj Purkinjeovih stanica, gl – zrnasti sloj, wm – bijela tvar.



Slika 5.2. Prikaz imunohistokemijskog obojenja kompleksnih gangliozida na rezovima maloga mozga miša netretiranih (bezPLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) uzoraka s fosfolipazom A<sub>1</sub> pod povećanjem 100×. Oznake: ml – molekularni sloj, pl – sloj Purkinjeovih stanica, gl – zrnasti sloj, wm – bijela tvar.

Ekspresija GM1 gangliozida izražena je isključivo u bijeloj tvari netretiranih i tretiranih uzoraka. Kod tretiranih uzoraka naglašena su intenzivna okrugla obojenja.

IHC analiza GD1a gangliozida kod tretiranih uzoraka nije pokazala nikakva obojenja i dala rezultate slične kontroli, dok je kod netretiranih uzoraka prisutna očekivana raspodjela GD1a kroz zrnasti i molekularni sloj.

GD1b je kod netretiranih uzoraka izražen u sva tri sloja kore maloga mozga. Kod tretiranih uzoraka prisutno je intenzivnije obojenje zrnastog sloja, dok u molekularnom sloju dolazi do smanjenja intenziteta obojenja. U bijeloj tvari prisutna su naglašena okrugla obojenja.

Ekspresija GT1b gangliozida prisutna je u sva tri sloja tretiranih i netretiranih uzoraka, međutim kod tretiranih uzoraka dolazi do promjene obrasca obojenja u zrnastom i molekularnom sloju.

Dobivene slike su se zatim analizirale u programu Fiji. Za svaku regiju maloga mozga izmjereni su intenziteti obojenja i prikazani kao medijan i interkvartilni raspon.

Na temelju dobivenih vrijednosti, pomoću Shapiro-Wilksovog testa testirala se normalnost distribucije. U slučaju raspodjela koja slijede normalu za statističku analizu korišten je Studentov T-test, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyjev U test. Testirane su razlike u intenzitetu obojenja između netretiranih i tretiranih uzoraka za svaki sloj kore maloga mozga, pri čemu je postavljena p-vrijednost  $\alpha < 0,05$ .

Tablica 2. Medijani srednjih vrijednosti sive boje (interkvartilni raspon) koji odgovaraju intenzitetu obojenja GM1 gangliozida kod uzoraka netretiranih (bez PLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) s fosfolipazom A<sub>1</sub> u analiziranim slojevima, te njihove odgovarajuće p-vrijednosti dobivene Studentovim T-testom.

Gangliozid	Sloj	Medijan (IR)		p-vrijednost
		bez PLA <sub>1</sub>	PLA <sub>1</sub>	
GM1	Bijela tvar	124,964 (6,245)	119,028 (6,118)	0,01318
	Zrnasti sloj	161,223 (2,856)	166,075 (6,188)	0,09331
	Molekularni sloj	165,160 (6,84)	168,448 (3,194)	0,2428

Kod GM1 zabilježena je statistički značajna razlika u intenzitetu obojenja u bijeloj tvari, gdje je kod tretiranih uzoraka došlo do pojačanog intenziteta obojenja gangliozida.

Tablica 3. Medijani srednjih vrijednosti sive boje (interkvartilni raspon) koji odgovaraju intenzitetu obojenja GD1a gangliozida kod uzoraka netretiranih (bez PLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) s fosfolipazom A<sub>1</sub> u analiziranim slojevima, te njihove odgovarajuće p-vrijednosti.

Gangliozid	Sloj	Medijan (IR)		p-vrijednost
		bez PLA <sub>1</sub>	PLA <sub>1</sub>	
GD1a	Bijela tvar	163,799 (1,823)	162,517 (1,898)	0,03051 **
	Zrnasti sloj	154,174 (2,804)	161,971 (2,263)	6,06 × 10 <sup>-6</sup> *
	Molekularni sloj	143,090 (9,305)	163,011 (2,881)	0,000348 **

\* – Studentov T-test

\*\* – Mann-Whitneyjev U test

Statistički značajna razlika kod GD1a zabilježena je u sva tri sloja maloga mozga. U bijeloj tvari došlo je do jačeg intenziteta obojenja GD1a. Intenzitet obojenja GD1a u zrnastom i molekularnom sloju tretiranih rezova je snižen.

Tablica 4. Medijani srednjih vrijednosti sive boje (interkvartilni raspon) koji odgovaraju intenzitetu obojenja GD1b gangliozida kod uzoraka netretiranih (bez PLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) s fosfolipazom A<sub>1</sub> u analiziranim slojevima, te njihove odgovarajuće p-vrijednosti.

Gangliozid	Sloj	Medijan (IR)		p-vrijednost
		bez PLA <sub>1</sub>	PLA <sub>1</sub>	
GD1b	Bijela tvar	163,379 (20,468)	162,560 (1,993)	0,5078 **
	Zrnasti sloj	147,957 (4,703)	135,292 (5,774)	0,000287 **
	Molekularni sloj	163,129 (19,31)	180,132 (4,487)	0,02807 *

\* – Studentov T-test

\*\* – Mann-Whitneyjev U test

Kod GD1b statistički značajna razlika postoji u zrnastom i molekularnom sloju. U zrnastom sloju kod tretiranih rezova došlo je do povišenja intenziteta obojenja GD1b, dok je u molekularnom sloju intenzitet obojenja GD1b snižen kod tretiranih uzoraka.



Tablica 5. Medijani srednjih vrijednosti sive boje (interkvartilni raspon) koji odgovaraju intenzitetu obojenja GT1b ganglioziida kod uzoraka netretiranih (bez PLA<sub>1</sub>) i tretiranih (PLA<sub>1</sub>) s fosfolipazom A<sub>1</sub> u analiziranim slojevima, te njihove odgovarajuće p-vrijednosti dobivene Mann-Whitneyjevim U testom.

Ganglioziid	Sloj	Medijan (IR)		p-vrijednost
		bez PLA <sub>1</sub>	PLA <sub>1</sub>	
GT1b	Bijela tvar	178,991 (24,533)	179,780 (2,033)	0,6048
	Zrnasti sloj	150,396 (16,94)	131,724 (7,628)	0,01061
	Molekularni sloj	115,657 (15,515)	131,080 (9,48)	0,02443

Kod GT1b zabilježena je statistički značajna razlika u intenzitetu obojenja u zrnastom i molekularnom sloju, gdje je kod tretiranih uzoraka u zrnastom sloju intenzitet obojenja povišen, a u molekularnom sloju snižen.

## 6. RASPRAVA

IHC je važna laboratorijska tehnika koja nam pomaže u boljem razumijevanju strukturne organizacije tkiva vizualizacijom specifičnih proteina ili antigena. Međutim, IHC dolazi uz određena ograničenja koja mogu uzrokovati lažno negativne ili lažno pozitivne rezultate (35 – 38). Pronalazak alternativnih metoda koje će poboljšati specifičnost i pouzdanost rezultata IHC metoda, te njihovu interpretaciju od velikog su značaja.

Poznato je da je lokalizacija gangliozida visoko specifična za vrstu stanica i sloj u regijama mozga, međutim dosadašnja IHC istraživanja ekspresije gangliozida u malom mozgu međusobno su kontradiktorna. Molander i sur. otkrili su prisutnost GM1 samo u bijeloj tvari, dok su Kotani i sur. zabilježili prisutnost GM1 u glijalnim stanicama bijele tvari, zrnastog i molekularnog sloja u malom mozgu štakora (52, 53). U Kotanijevom i Molanderovom radu korištena su mišja IgM protutijela koja imaju manju specifičnost od IgG protutijela koja su korištena u ovom radu što potencijalno objašnjava razliku u rezultatima. Rezultati ovog istraživanja ukazuju na pojavnost GM1 isključivo u bijeloj tvari kod tretiranih i netretiranih uzoraka. Kod tretiranih uzoraka zabilježena su intenzivna obojenja zvjezdastog oblika koja predstavljaju moguće obojenje glija stanica (oligodendrocita ili plazmatske astroglije). Ovo se slaže s dosadašnjim istraživanjima koja su potvrdila uključenost GM1 u stanične signalne putove ključne za diferencijaciju i sazrijevanje oligodendrocita. GM1 stupa u interakciju s neurotrofnim čimbenicima kao što su BDNF (engl. *brain-derived neurotrophic factor* – moždani neurotrofni čimbenik) i NGF (engl. *nerve growth factor* – čimbenik rasta živaca) te sudjeluje u signalnim putovima koji podržavaju rast i mijelinizaciju aksona. Također, GM1 ima neuroprotektivna svojstva, te podržava regeneraciju živčanog tkiva sudjelovanjem u mehanizmima popravka mijelina putem receptora za ove neurotrofne čimbenike, ali i drugim signalnim putevima. Da bi se potvrdila povezanost GM1 signala s oligodendrocitima potrebno je provesti dvostruko imunološko bojenje s protutijelima na galaktocerebrozid (GC) i glijalni fibrilarni kiseli protein (GFAP) – proteine koji se smatraju specifičnim biljezima za oligodendrocite i protoplazmatsku astrogliju (54 – 56). Dodatno vrijedi komentirati kako je intenzitet GM1 obojenja u bijeloj tvari malog mozga bio veći kod tretiranih uzoraka, što sugerira na pretežnu lokalizaciju GM1 gangliozida unutar domena lipidnih splavi, a ne izvan njih. Pretpostavka je da lipidno i proteinsko okruženje lipidnih splavi GM1 čini nedostupnim za PLA<sub>1</sub> dok izvan splavi ne postoji ova zaštita.

Rezultati različitih istraživanja o ekspresiji GD1a također nisu sukladni. Vajn i sur. zabilježili su obojenje GD1a u sva tri sloja kore maloga mozga, dok Kotani i sur. nisu otkrili njegov signal u bijeloj tvari. Kao što je prije navedeno Kotani je koristio mišja monoklonska protutijela IgM klase, koja su manje specifična od mišjih IgG protutijela koja su koristili Vajn i sur. što je samo za sebe dovoljno da objasni dobivenu razliku.

Također je utvrđeno da su obojenja GD1a prisutna u molekularnom sloju povezana s nemijeliniziranim paralelnim vlaknima (38, 52, 53). U ovom istraživanju, nakon tretmana s PLA<sub>1</sub> signal GD1a se gubi iz molekularnog sloja. Ovo bi govorilo u prilog za veću pojavnost GD1a izvan lipidnih splavi na nemijeliniziranim aksonima i tijelima neurona. Hidroliza fosfolipida pomoću PLA<sub>1</sub> rezultira lizofosfolipidima i slobodnim masnim kiselinama, koje mogu poremetiti strukturu membrane i posljedično dovesti do gubitka GD1a (47 – 49), što je utvrđeno na nefiksiranim uzorcima, ali ne i na fiksiranim uzorcima. Da bi smo točno utvrdili što se dogodilo s GD1a na fiksiranim rezovima tkiva trebalo bi medij u kojem su tretirani rezovi podvrći biokemijskoj ekstrakciji gangliozida. Za očekivati je da je količina gangliozida u mediju vrlo mala pa bi se nakon ekstrakcije gangliozida trebao napraviti i imunoblot s visokospecifičnim protutijelima na GD1a. Budući da su gangliozidi glija stanica pretežno koncentrirani u lipidnim splavima, obojenja u molekularnom i zrnastom sloju netretiranih uzoraka vjerojatno je vezano za membrane neurona (57). Iz ovoga se postavlja pitanje je li GD1a na staničnim membranama astroglije i oligodendroglji doista u lipidnim splavima *in vivo* ili se dokazi o njenoj uključenosti u lipidne splavi odnose samo na *in vitro* uzgojene stanice.

Signal GD1b bez tretmana PLA<sub>1</sub> prisutan je u sva tri sloja maloga mozga, što se slaže s dosadašnjim rezultatima (38, 53). Prethodna istraživanja zabilježila su izražaj GD1b pretežno u neuropilu zrnastog sloja, dok je obojenje tijela zrnastih stanica bilo slabo. Također, dokazano je da radijalno obojenje u molekularnom sloju odgovara astrocitnim nastavcima (52, 53). Tretman s PLA<sub>1</sub> mijenja obrazac obojenja u svim slojevima i on od homogenog postaje zrnast. U zrnastom sloju tretiranih uzoraka pojavljuje se obojenje stanica koje ne odgovara zrnastim neuronima. Za pretpostaviti je da se radi o glija stanicama i za razliku od obrasca koji se pojavljuje nakon tretmana s PLA<sub>1</sub> i imunohistokemije s anti-GM1 protutijelom ovdje bi se prije radilo o astrogliji nego oligodendroglji. Pretpostavka je da upravo astroglija ima GD1b koji je smješten u lipidnim splavima što bi trebalo dodatno dokazati biljezima za astrogliju (npr. GFAP), ali i biljezima za

lipidne splavi. Od biljega za lipidne splavi vrijedilo bi istražiti kolokalizaciju GD1b i flotilina 1 i flotilina 2 (58). Također, do smanjenja i pojave zrnastog obrasca bojenja nakon tretmana s PLA<sub>1</sub> i IHC s anti-GD1b došlo je i u molekularnom sloju malog mozga. S obzirom da molekularni sloj sadržava više različitih struktura (paralelna vlakna, dendrite Purkinjevih neurona, stanice Bergmanove glije, zrnate i košaraste interneurone) za točno objašnjenje promjene obrasca obojenja vrijedilo bi napraviti kolokalizaciju s biljezima svih ovih struktura kao i s biljezima za same lipidne splavi.

Većina IHC obojenja s anti-GT1b u ovom istraživanju odgovara zrnastim stanicama ili cerebelarnim glomerulima, dok je u molekularnom sloju obojen neuropil. I dok su obojenja molekularnog i zrnastog sloja homogena, obojenje bijele tvari je diskretno i moglo bi odgovarati vitičastim vlaknima koja dolaze iz olivarne jezgre (52) ili aksonima dubokih jezgara malog mozga. Kod tretiranih uzoraka došlo je do promjene obrasca obojenja u sva tri sloja. Za razliku od GD1a i GD1b, očuvano je obojenje paralelnih vlakana u molekularnom sloju, iz čega možemo pretpostaviti kako je GT1b u drugim domenama stanične membrane (potencijalno u lipidnim splavima) od GD1a i GD1b. U zrnastom sloju, također je došlo do promjene izražaja GT1b, uz naglašena okrugla obojenja koja vjerojatno predstavljaju same zrnaste neurone koji su u ovom sloju najbrojniji. Bijela tvar je slabo obojana, međutim prisutno je nekoliko okruglih obojenja koja bi mogla odgovarati oligodendrocitima. Za točnu identifikaciju staničnih struktura na kojima je preostalo obojenje potrebno je učiniti IHC s biljezima za zrnaste neurone, astrogliju i oligodendrocite. Pored već spomenutih biljega za glija stanice potencijalni biljezi zrnastih neurona su neurogranin (citoplazmatski protein) ili podjedinica alfa 6 GABA receptora (engl. *Gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor Subunit Alpha6* – GABRA6) koja je smještena u staničnoj membrani (59).

Tijela Purkinjeovih stanica nisu pozitivna ni na jedan gangliozid kod obje skupine uzoraka, što se poklapa s rezultatima zabilježenih u istraživanju Kotani i sur. (52).

Zaključno možemo reći kako PLA<sub>1</sub> tretman mijenja distribuciju četiri glavna kompleksna gangliozida u malom mozgu. Za niti jedan od istraživanih gangliozida nije otkriveno isključivo povećanje signala već je distribucija bila veća ili manja specifično za promatrani gangliozid i sloj malog mozga. Ovo vjerojatno odražava razliku u distribuciji promatranih gangliozida u najmanje dvije lipidne faze stanične membrane – lipidnim splavima i područjima izvan njih. Za bolje

razumijevanje i interpretaciju dobivenih rezultata potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se utvrdila vrsta stanica na kojima je promijenjeno obojenje. Također, studije kolokalizacije dale bi odgovor na razlike u distribuciji kompleksnih gangliozida unutar lipidnih splavi i drugih membranskih mikrodomena. Kako bi smo bili sigurni da uz tretman s PLA<sub>1</sub> ne dolazi do premještanja gangliozida između različitih stanica uzorka trebalo bi IHC reza tkiva miša divljeg tipa raditi u istoj jažici s rezom tkiva miša koji nema ekspresiju ovih gangliozida (miš s isključenim *B4Galnt1* genom), a dodatno se može napraviti ekstrakcija gangliozida iz medija u kojemu su rezovi tretirani. Nakon ovih dodatnih studija moći će se procijeniti je li PLA<sub>1</sub> korisno oruđe za povezivanje distribucije kompleksnih gangliozida s lipidnim splavima točno određenih staničnih struktura mozga.

## 7. ZAKLJUČAK

- Enzimatsko uklanjanje fosfolipida pomoću PLA<sub>1</sub> iz fiksiranih rezova tkiva malog mozga miša dovelo je do promjene obrasca imunohistokemijskog signala sva četiri najčešća kompleksna gangliozida mozga – GM1, GD1a, GD1b i GT1b.
- Enzimatsko uklanjanje fosfolipida pomoću PLA<sub>1</sub> iz fiksiranih rezova tkiva malog mozga miša dovelo je do povećanog signala GM1 i GD1a u bijeloj tvari i GD1b i GT1b u zrnastom sloju.
- Nakon tretmana s PLA<sub>1</sub> distribucija gangliozida u malom mozgu miša bila je specifična za sloj i promatrani gangliozid.

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Cilj ovog istraživanja je utvrditi utjecaj fosfolipaze A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) na imunohistokemijsku vizualizaciju gangliozida u malom mozgu miša.

**Nacrt studije:** Eksperimentalna studija, ustrojena kao istraživanje parova, provedena na tkivu mozga miša.

**Materijali i metode:** Istraživanje je provedeno na tkivu maloga mozga prikupljenog od miševa divljeg tipa (soj B6/129S). Ukupno su žrtvovana tri miša muškog spola starosti 7. mjeseci. Fiksirani uzorci malog mozga podijeljeni su u dvije skupine, gdje je eksperimentalna skupina bila izložena tretmanu fosfolipaze A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>). Imunohistokemija slobodno plutajućih rezova tkiva tretiranih ili ne tretiranih s PLA<sub>1</sub> napravljena je uz pomoć visokospecifičnih monoklonalnih IgG protutijela za GM1, GD1a, GD1b i GT1b gangliozide. Rezultati su kvantificirani u Fiji programu.

**Rezultati:** Kod sva četiri istraživana gangliozida, nakon tretmana s PLA<sub>1</sub>, promijenjen je obrazac obojenja slojeva malog mozga. Intenzitet obojenja GM1 bio je veći kod tretiranih uzoraka, ali je rezultirao gubitkom obojenja GD1a. Isti je tretman doveo do sniženja signala GD1b i GT1b u molekularnom sloju i povišenja u zrnastom sloju.

**Zaključak:** Tretman fiksiranih rezova tkiva s PLA<sub>1</sub> značajno je promijenio količinu i distribuciju signala za sva četiri istraživana gangliozida što bi moglo biti povezano s razlikama u distribuciji ovih gangliozida u lipidnim domenama membrane.

**Ključne riječi:** fosfolipaza A1; gangliozidi; imunohistokemija; lipidne splavi

## 9. SUMMARY

The influence of enzymatic removal of phospholipids on the representation of gangliosides in mouse brain

**Objectives:** The aim of this research is to determine the influence of phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) on the immunohistochemical visualization of gangliosides in the mouse cerebellum.

**Study design:** An experimental study, designed as a pair study, conducted on mouse brain tissue.

**Materials and methods:** The research was conducted on cerebellar tissue collected from wild-type mice (strain B6/129S). A total of three 7-month-old male mice were sacrificed. Fixed cerebellum samples were divided into two groups, where the experimental group was exposed to phospholipase A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>) treatment. Immunohistochemistry of free-floating tissue sections treated or not treated with PLA<sub>1</sub> was performed using highly specific monoclonal IgG antibodies to GM1, GD1a, GD1b and GT1b ganglioside. The results are quantified in the Fiji program.

**Results:** With all four investigated gangliosides, after treatment with PLA<sub>1</sub>, the staining pattern of the layers of the cerebellum changed. GM1 staining intensity was higher in treated samples but resulted in loss of GD1a staining. The same treatment led to a decrease in GD1b and GT1b signals in the molecular layer and an increase in the granular layer.

**Conclusion:** Treatment of fixed tissue sections with PLA<sub>1</sub> significantly changed the amount and distribution of signals for all four investigated gangliosides, which could be related to differences in the distribution of these gangliosides in the lipid domains of the membrane.

**Key words:** gangliosides; immunohistochemistry; lipid rafts; phospholipases A<sub>1</sub>



**10. LITERATURA**

1. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, i sur. Essentials of Glycobiology, 4. izdanje. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2022.
2. Menaldino DS, Bushnev A, Sun A, Liotta DC, Symolon H, Desai K, i sur. Sphingoid bases and de novo ceramide synthesis: enzymes involved, pharmacology and mechanisms of action. *Pharmacol Res.* 2003;47(5):373–81.
3. Goñi FM, Contreras F-X, Montes L-R, Sot J, Alonso A. Biophysics (and sociology) of ceramides. *Biochem Soc Symp.* 2005;72(72):177–88.
4. Ishizuka I. Chemistry and functional distribution of sulfoglycolipids. *Prog Lipid Res.* 1997;36(4):245–319.
5. Schwarz A, Futerman AH. The localization of gangliosides in neurons of the central nervous system: the use of anti - ganglioside antibodies. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1286:247–67.
6. Kolter T, Proia RL, Sandhoff K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem.* 2002;277(29):25859–62.
7. Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem.* 2012;2012:1–36.
8. Kračun I, Rösner H, Cosović C, Stavljenić A. Topographical atlas of the gangliosides of the adult human brain. *J Neurochem.* 1984;43(4):979–89.
9. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F. Stagespecific embryonic antigens (SSEA - 3 and - 4) are epitopes of a unique globo - series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *The EMBO Journal.* 1983;12.
10. Demarco ML, Woods RJ. Atomic - resolution conformational analysis of the GM3 ganglioside in a lipid bilayer and its implications for ganglioside - protein recognition at membrane surfaces. *Glycobiology.* 2009;19:344–55.
11. Schnaar RL. Glycolipid - mediated cell - cell recognition in inflammation and nerve regeneration. *Arch Biochem Biophys.* 2004;426:163–72.
12. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev.* 2014;94(2):461–518.

13. Svennerholm L. Ganglioside Designation. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Boston, MA: Springer US; 1980. p. 11–11.
14. Yamaji T, Hanada K. Sphingolipid metabolism and interorganellar transport: localization of sphingolipid enzymes and lipid transfer proteins: Sphingolipid metabolism and transport. *Traffic*. 2015;16(2):101–22.
15. Giraud CG, Maccioni HJ. Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO - K1 cells. *J Biol Chem*. 2003;278:40262–71.
16. Ishii A, Ohta M, Watanabe Y, Matsuda K, Ishiyama K, Sakoe K, et al. Expression cloning and functional characterization of human cDNA for ganglioside GM3 synthase. *J Biol Chem*. 1998;273(48):31652–5.
17. Kono M, Yoshida Y, Kojima N, Tsuji S. Its substrate specificity is similar to that of SAT - V/III, which synthesize GD1c, GT1a, GQ1b and GT3. *J Biol Chem*. 1996;271:29366–71.
18. Schnaar RL. Gangliosides of the vertebrate nervous system. *J Mol Biol*. 2016;428(16):3325–36.
19. Sandhoff R. Very long chain sphingolipids: tissue expression, function and synthesis. *FEBS Lett*. 2010;584(9):1907–13.
20. Kolter T, Sandhoff K. Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21(1):81–103.
21. Sonnino S, Chigorno V. Ganglioside molecular species containing C18- and C20-sphingosine in mammalian nervous tissues and neuronal cell cultures. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1469(2):63–77.
22. Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, Zambotti V. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta*. 1973;296(1):160–70.
23. Lannert H, Bünning C, Jeckel D, Wieland FT. Lactosylceramide is synthesized in the lumen of the Golgi apparatus. *FEBS Lett*. 1994;342(1):91–6.
24. Guo Z. Ganglioside GM1 and the central nervous system. *Int J Mol Sci*. 2023;24(11).
25. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Heffer-Lauc M, Cosović C, Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. *Int J Dev Biol*. 1991;35(3):289–95.

26. Yoshikawa M, Go S, Takasaki K, Kakazu Y, Ohashi M, Nagafuku M, i sur. Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(23):9483–8.
27. Niimi K, Nishioka C, Miyamoto T, Takahashi E, Miyoshi I, Itakura C, i sur. Impairment of neuropsychological behaviors in ganglioside GM3 - knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;406:524–8.
28. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, i sur. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(20):10662–7.
29. Chiavegatto S, Sun J, Nelson RJ, Schnaar RL. A functional role for complex gangliosides: motor deficits in GM2/GD2 synthase knockout mice. *Exp Neurol*. 2000;166(2):227–34.
30. Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, i sur. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7532–7.
31. Sugiura Y, Furukawa K, Tajima O, Mii S, Honda T. Sensory nerve - dominant nerve degeneration and remodeling in the mutant mice lacking complex gangliosides. *Neuroscience*. 2005;135:1167–78.
32. Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, i sur. Reduced motor and sensory functions and emotional response in GM3 - only mice: emergence from early stage of life and exacerbation with aging. *Behav Brain Res*. 2009;198:74–8.
33. Tajima O, Egashira N, Ohmi Y, Fukue Y, Mishima K, Iwasaki K, i sur. Dysfunction of muscarinic acetylcholine receptors as a substantial basis for progressive neurological deterioration in GM3 - only mice. *Behav Brain Res*. 2010;206:101–8.
34. Ohmi Y, Tajima O, Ohkawa Y, Yamauchi Y, Sugiura Y, Furukawa K. Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside - deficient mutant mice. *J Neurochem*. 2011;116:926–35.
35. Heffer - Lauc M, Viljetić B, Vajn K, Schnaar RL, Lauc G. Effects of detergents on the redistribution of gangliosides and GPI - anchored proteins in brain tissue sections. *J Histochem Cytochem*. 2007;55(8):805–12.

36. Laev H, Mahadik SP. Topography of monosialoganglioside (GM1) in rat brain using monoclonal antibodies. *Neurosci Lett*. 1989;102(1):7–14.
37. De Baecque C, Johnson AB, Naiki M, Schwarting G, Marcus DM. Ganglioside localization in cerebellar cortex: an immunoperoxidase study with antibody to GM1 ganglioside. *Brain Res*. 1976;114(1):117–22.
38. Vajn K, Viljetić B, Degmečić IV, Schnaar RL, Heffer M. Differential distribution of major brain gangliosides in the adult mouse central nervous system. *PLoS One*. 2013;8(9):e75720.
39. Ogawa - Goto K, Funamoto N, Abe T, Nagashima K. Different ceramide compositions of gangliosides between human motor and sensory nerves. *J Neurochem*. 1990;55(5):1486–93.
40. Svennerholm L, Boström K, Fredman P, Jungbjer B, Lekman A, Månsson J-E, i sur. Gangliosides and allied glycosphingolipids in human peripheral nerve and spinal cord. *Biochim Biophys Acta*. 1994;1214(2):115–23.
41. Gong Y, Tagawa Y, Lunn MPT, Laroy W, Heffer-Lauc M, Li CY, i sur. Localization of major gangliosides in the PNS: implications for immune neuropathies. *Brain*. 2002;125(Pt 11):2491–506.
42. Colsch B, Jackson SN, Dutta S, Woods AS. Molecular microscopy of brain gangliosides: Illustrating their distribution in hippocampal cell layers. *ACS Chem Neurosci*. 2011;2(4):213–22.
43. Colsch B, Woods AS. Localization and imaging of sialylated glycosphingolipids in brain tissue sections by MALDI mass spectrometry. *Glycobiology*. 2010;20(6):661–7.
44. Prinetti A, Chigorno V, Tettamanti G, Sonnino S. Sphingolipid - enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture. A compositional study. *J Biol Chem*. 2000;275(16):11658–65.
45. Simons K, Sampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(10):a004697.
46. Richmond GS, Smith TK. Phospholipases A<sub>1</sub>. *Int J Mol Sci*. 2011;12(1):588–612.
47. Yaginuma S, Kawana H, Aoki J. Current knowledge on mammalian phospholipase A<sub>1</sub>, brief history, structures, biochemical and pathophysiological roles. *Molecules*. 2022;27(8):2487.
48. Sonoda H, Aoki J, Hiramatsu T, Ishida M, Bandoh K, Nagai Y, i sur. A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A<sub>1</sub> That produces lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*. 2002;277(37):34254–63.

49. Bandoh K, Aoki J, Taira A, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. Lysophosphatidic acid (LPA) receptors of the EDG family are differentially activated by LPA species. Structure - activity relationship of cloned LPA receptors. *FEBS Lett.* 2000;478(1–2):159–65.
50. Hla T, Lee MJ, Ancellin N, Paik JH, Kluk MJ. Lysophospholipids - - receptor revelations. *Science.* 2001;294(5548):1875–8.
51. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676–82.
52. Kotani M, Kawashima I, Ozawa H, Terashima T, Tai T. Differential distribution of major gangliosides in rat central nervous system detected by specific monoclonal antibodies. *Glycobiology.* 1993;3(2):137–46.
53. Molander M, Berthold CH, Persson H, Fredman P. Immunostaining of ganglioside GD1b, GD3 and GM1 in rat cerebellum: cellular layer and cell type specific associations. *J Neurosci Res.* 2000;60(4):531–42.
54. Ledeen RW, Wu G. The multi - tasked life of GM1 ganglioside, a true factotum of nature. *Trends Biochem Sci.* 2015;40(7):407–18.
55. Chiricozzi E, Lunghi G, Di Biase E, Fazzari M, Sonnino S, Mauri L. GM1 ganglioside is A key factor in maintaining the mammalian neuronal functions avoiding neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2020;21(3):868.
56. Kim SU. Neurobiology of human oligodendrocytes in culture. *J Neurosci Res.* 1990;27(4):712–28.
57. Hamberger A, Svennerholm L. Composition of gangliosides and phospholipids of neuronal and glial cell enriched fractions. *J Neurochem.* 1971;18(10):1821–9.
58. Bitsikas V, Riento K, Howe JD, Barry NP, Nichols BJ. The role of flotillins in regulating  $\alpha\beta$  production, investigated using flotillin 1<sup>-/-</sup>, flotillin 2<sup>-/-</sup> double knockout mice. *PLoS One.* 2014;9(1):e85217.
59. Bahn S, Jones A, Wisden W. Directing gene expression to cerebellar granule cells using  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor  $\alpha 6$  subunit transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(17):9417–21.

## **11. ŽIVOTOPIS**

### **OSOBNI PODATCI:**

Ime i prezime: Karolina Križaić

Datum i mjesto rođenja: 22.03.2001., Čakovec, Hrvatska

Telefon: 098/ 133 9271

E-mail: karolina.krizaic@gmail.com

### **OBRAZOVANJE:**

2015. – 2019. Opća gimnazija, Srednja škola Čakovec, Čakovec

2019. – 2022. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijek

2022. – 2024. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek, Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijek