

Morfometrija slezene kod miševa divljeg tipa i miševa sa isključenim genom B4Galnt1

Kiš, Ana

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

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:152:800242>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Ana Kiš

**MORFOMETRIJA JETRE I SLEZENE
KOD MIŠEVA DIVLJEG TIPRA I MIŠEVA
S ISKLJUČENIM GENOM *B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske
dijagnostike**

Ana Kiš

**MORFOMETRIJA JETRE I SLEZENE
KOD MIŠEVA DIVLJEG TIPRA I MIŠEVA
S ISKLJUČENIM GENOM *B4Galnt1***

Završni rad

Osijek, 2017.

Rad je napravljen na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
u Laboratoriju za neurobiologiju.

Mentor rada: prof.dr.sc. Marija Heffer

Rad ima 32 stranice i 18 slika.

*Hvala mentorici, prof. dr.sc. Mariji Heffer, na svim savjetima,
dostupnosti i pomoći pri izradi ovog rada.*

Hvala Miloradu Zjaliću na stručnoj pomoći i savjetima.

*Hvala mojoj obitelji i prijateljima na razumijevanju, strpljenju,
pomoći i podršci.*

SADRŽAJ

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | UVOD | 1 |
| 1.1 | Opis izgleda, funkcije i građe jetre i slezene | 1 |
| 1.2 | Opis metaboličkog deficita kod miša s isključenim genom B4Galnt1 | 2 |
| 1.3 | Stanična membrana i lipidne splavi..... | 2 |
| 1.4 | Gangliozidi | 3 |
| 1.5 | Kuprizonski model multiple skleroze..... | 4 |
| 2 | HIPOTEZA | 5 |
| 3 | OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA | 6 |
| 3.1 | Opći cilj | 6 |
| 3.2 | Specifični ciljevi..... | 6 |
| 4 | MATERIJALI I METODE..... | 7 |
| 4.1 | Ustroj studije | 7 |
| 4.2 | Materijali | 7 |
| 4.3 | Metode..... | 8 |
| 4.3.1 | Histološka bojenja i obrada slike..... | 8 |
| 4.3.2 | Slikanje preparata | 12 |
| 4.3.3 | Statističke metode..... | 13 |
| 5 | REZULTATI | 14 |
| 6 | RASPRAVA..... | 24 |
| 7 | ZAKLJUČAK | 26 |
| 8 | SAŽETAK..... | 27 |
| 9 | SUMMARY | 28 |
| 10 | LITERATURA..... | 29 |
| 11 | ŽIVOTOPIS | 32 |

POPIS KRATICA

DAB - diaminobenzidin

HE - hemalaun/eozin

K - kontrole

KO - miš s isključenim genom *B4Galnt1* (engl. *knock out*)

NAFLD - nealkoholna boleost masne jetre (engl. *non-alcoholic fatty liver disease*)

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

PFA - paraformaldehid

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

1 UVOD

1.1 OPIS IZGLEDA, FUNKCIJE I GRAĐE JETRE I SLEZENE

Jetra je jedan od najvećih organa, a ujedno je i najveća žlijezda. Smještena je u abdominalnoj šupljini. Posrednik je između probavnog sustava i krvi. Ima važnu ulogu u metabolizmu i obavlja funkcije kao što su uklanjanje otrovnih tvari, odlaganje glikogena, proizvodnja krvnih bjelancevina i proizvodnja žuči koja je važna za probavljanje lipida. Građevne jedinice jetre su jetreni režnjići ili lobuli u čijem središtu se nalazi centralna vena. Oko centralne vene se zrakasto šire jetrene stanice, odnosno hepatociti. Jetreni režnjići su međusobno odvojeni vezivnim tkivom u kojem se nalaze limfne žile, žučni kanali, krvne žile i živci. Venska krv iz portalnih venula u vezivnim pregradama teče jetrenim sinusoidama prema središtu jetrenog režnjića u centralnu venu. Jetrene sinusoida okružuje ovojnica od retikulinskih vlakana izgrađenih od kolagena tipa III koja im daje potporu. Sinusoida sadržavaju Kupfferove stanice, odnosno makrofage, čija je uloga razgradnja starih eritrocita i hemoglobina. Između hepatocita i sinusoida se nalazi Disseov prostor ispunjen krvnom plazmom. U tom prostoru hepatociti pružaju mikrovile kako bi apsorbirali proteine i druge sastojke plazme (1).

Smještena u abdomenu, ispod dijafragme, slezena je najveći sekundarni limfni organ čija veličina, oblik i izgled variraju ovisno o vrsti, starosti i genetskim predispozicijama. Slezenu dijelimo na crvenu i bijelu pulpu. Glavna uloga crvene pulpe je razgradnja starih eritrocita. Crvenu pulpu izgrađuju slezenski tračci, koje izgrađuje mreža retikularnih stanica i retikulinskih vlakna, te sinusi slezene koji su obloženi endotelnim stanicama i retikulinskim vlaknima. Slezenski tračci sadržavaju limfocite, makrofage, plazma-stanice te krvne stanice, kao što su eritrociti, trombociti i granulociti. Bijela pulpa ima ulogu u obrani organizma jer sadržava limfocite B i limfocite T, predočne stanice i fagocite. Izgrađena je od limfnog tkiva koja okružuje centralne arterije i limfne čvoriće koji su nanizani duž periarterijskog limfnog omotača. Između bijele i crvene pulpe se nalazi marginalna zona koja ima ulogu u imunološkom odgovoru slezene (1, 2).

Ako promatramo krvni optok, jetra i slezena su međusobno blisko povezane. Zbog cirkulacijske veze između jetre i slezene, mnogi procesi bolesti utječu na oba organa. Infekcije, bolesti krvnih stanica, bolesti jetre, rak i nasljedni poremećaji mogu nepovoljno utjecati na jetru i slezenu, što može uzrokovati povećanje ili smanjenje oba organa (3). Primjer nasljednih bolesti u kojima su zahvaćeni i jetra i slezena su lizosomske bolesti u kojima se supstrat

mutiranog lizosomskog enzima sfingomijelinaze nakuplja u lizosomima (4). Kod ovih bolesti do povećanja oba organa dolazi uslijed pokušaja imunološkog sustava da ukloni oštećene stanice (5).

1.2 OPIS METABOLIČKOG DEFICITA KOD MIŠA S ISKLJUČENIM GENOM *B4GALNT1*

Miš s isključenim genom *B4Galnt1* ima blok u sintezi glikosfingolipida te uslijed toga ne može sintetizirati složene gangliozide metaboličkih puteva a, b i c. U lizosomskim bolestima nakupljanja, koje predstavljaju suprotno stanje, tih istih gangliozida ima previše jer je blokirana njihova razgradnja pa se nakupljaju u lizosomima (6, 7).

Kod ovih miševa uočena je Wallerova degeneracija aksona što dovodi do demijelinizacije živčanih vlakna i oštećenja motoričke koordinacije. Također su primijećene promjene i u Ranvierovim čvorićima što rezultira smanjenom brzine provođenja signala kroz živčane strukture. Prethodna istraživanja su pokazala da KO *B4Galnt1* model miša ima poremećaj u funkciji limfocita (8). Jetra i slezena ovih miševa do sada nisu opisani.

1.3 STANIČNA MEMBRANA I LIPIDNE SPLAVI

Stanična membrana definira stanične dimenzije, dijeli stanice u zasebne odjeljke, omogućava provedbu složenih reakcijskih puteva te sudjeluje u primanju signala i pretvorbi energije. Osnovna struktura stanične membrane je dvosloj fosfolipida koji se sastoji od dvije vanjske hidrofilne strane i hidrofobne unutrašnjosti. Stanična membrana je izrađena od nekoliko vrsta lipidnih spojeva koje prema kemijskoj strukturi svrstavamo u dvije grupe. Prva sadrži molekule s polarnim čeonim skupinama i nepolarnim lancima masnih kiselina: glicerofosfolipide (fosfolipide) i sfingolipide, a drugu čini steroid kolesterol (9-11). Sfingolipidima pripadaju sfingomijelin i glikosfingolipidi, poput cerebrozida ili gangliozida. Sfingolipidi su, zajedno s kolesterolom, u većoj mjeri zastupljeni u lateralnim membranskim domenama, tzv. lipidnim splavima, u kojima im se pripisuje uloga u procesima stanične signalizacije, te su obilno zastupljeni u mijelinskoj ovojnici živčanih vlakana (12, 13).

Lipidne splavi su visoko-organizirane strukture staničnih membrana koje se sastoje od kolesterola, glikosfingolipida i specifičnih proteina. Unutrašnji dio lipidne splavi formiran je od fosfolipida i kolesterola, a vanjski od glikosfingolipida, sfingomijelina i kolesterola. Lipidne splavi sudjeluju u procesu prijenosa signala te su uključene u patogenezu nekih neurodegenerativnih poremećaja (11-14).

1.4 GANGLIOZIDI

Gangliozidi su glikosfingolipidi građeni od ceramida i polarnog ugljikohidratnog lanca na koji je vezano jedna ili više sijalinskih kiselina. Smješteni su na vanjskom sloju stanične membrane u lipidnim splavima. Morfološke i funkcionalne promjene stanice, kao što su proliferacija stanice, diferencijacija, promjene u fazi staničnog ciklusa te neoplastični rast, dovode do promjena u sastavu i metabolizmu glikosfingolipida, pa tako dolazi i do promjena gangliozida. Gangliozidi su prisutni u svim tkivima, a najviše ih pronalazimo u mozgu, gdje prevladavaju GM1, GD1a, GD1b i GT1. (15, 16)

Biosinteza gangliozida regulirana je aktivnošću glikoziltransferaza i nužno je kontrolirana na razinama transkripcije gena i posttranslacijske modifikacije (17). Za sintezu složenih gangliozida serije a i serije b, potrebne su dvije glikoziltransferaze, GD3-sintaza i GM2/GD-sintaza. Primarno se sintetiziraju u endoplazmatskom retikulu te se poslije modificiraju u Golgijevom aparatu. Sinteza gangliozida započinje dodavanjem glukoze ceramida. Izgradnja osnovnog lanca šećera nastavlja se dodavanjem galaktoze, N-acetilgalaktozamina i krajnje galaktoze (18). Na unutarnju i vanjsku galaktozu mogu se dodati sijalinske kiseline, obično jedna do tri. Ovisno o tome nalazi li se na unutarnjoj galaktozi niti jedna, jedna, dvije ili tri sijalinske kiseline govorimo o 0, a, b ili c seriji gangliozida. Interakcijom s ključnim transmembranskim receptorima koji su u istoj ili nasuprotnoj membrani, gangliozidi sudjeluju u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije, proliferacije i apoptoze (19). Za proučavanje bioloških uloga gangliozida i utjecaja manjka gangliozida na fiziološke procese koriste se miševi kojima su isključeni određeni geni koji sudjeluju u biološkoj sintezi gangliozida.

Razgradnja gangliozida se odvija u liposomima gdje dolazi do odvajanja terminalnih šećera. Ukoliko je razgradnja otežana ili potpuno odsutna, zbog nedostatka enzima, dolazi do nakupljanja gangliozida što rezultira neurodegenerativnim poremećajima. Primjer takvog poremećaja je Tay-Sachova bolest, nasljedna autosomno recesivna bolest, koju karakterizira nakupljanje gangliozida GM2 u mozgu zbog manjka enzima heksozaminidaze A (20).

1.5 KUPRIZONSKI MODEL MULTIPLE SKLEROZE

Multipla skleroza je autoimuna kronična upalna bolest središnjeg živčanog sustava. Karakterizirana je demijelinizacijom živčanih vlakana, upalom, i oštećenjem aksona. Kuprizon je kelator bakra i cilja zrele oligodendrocite, stanice koje čine mijelinsku ovojnici aksona u središnjem živčanom sustavu. Kada se primjenjuje oralno u miševa, kuprizon uzrokuje brzu demijelinizaciju i gliozu ili brzu proliferaciju glija stanica. Model za istraživanje multiple skleroze je divlji tip miša hranjen kuprizonom, a također je i model za induciranje i ispitivanje demijelinizacije i remijelinizacije. Remijelinizacija nastupa kada se iz hrane ukloni navedena supstanca (21). S obzirom da *B4Galnt1* miš fenotipski oponaša multiplu sklerozu, u ovom je istraživanju uspoređen s drugim modelom za multiplu sklerozu – kuprizonskim.

2 HIPOTEZA

Usljed zajedničke cirkulacije jetre i slezene, bolesti koje zahvaćaju jetru odražavaju se na slezeni, pa je pretpostavka ovog rada da kod miševa koji imaju isključen *B4Galnt1* ili su tretirani kuprizonom dolazi do združenih promjena morfologije jetre i slezene.

3 OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

3.1 OPĆI CILJ

Opći cilj ovog rada je napraviti morfometrijski prikaz jetre i slezene - kod odraslih miševa divljeg tipa te miševa s utišane obje kopije gena *B4Galnt1*, odnosno miševa tretiranih kuprizonom - mjerenjem prosječne veličine lobula, odnosno omjera površine crvene prema bijeloj pulpi. Također pretpostavljamo da će klasična histološka bojenja hemalaun/eozin, srebrna impregnacija, bojenja na lipide i željezo ukazati na prirodu opaženih promjena.

3.2 SPECIFIČNI CILJEVI

Specifični ciljevi rada su:

- usporediti morfologiju slezene u 3 skupine miševa uz pomoć hemalun/eozin bojenja
- usporediti broj i veličinu masnih kapljica u jetri kao mjeru steatoze uz pomoć histološkog bojenja na lipide
- usporediti količinu retikulinskih vlakana u jetri i slezeni kao mjere degeneracije korištenjem srebrne impregnacije
- usporediti količinu hemosiderina u jetri i slezeni kao mjere aktivacije makrofaga i upalnih procesa histološkim bojenjem na feritin.

4 MATERIJALI I METODE

4.1 USTROJ STUDIJE

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (životinje divljeg tipa prema životinjama s isključenim genima *B4Galnt1*, životinje divljeg tipa prema životinjama tretiranim kuprizonom, životinje tretirane kuprizonom prema životinjama s isključenim genima *B4Galnt1*).

4.2 MATERIJALI

U studiju je uključeno 6 mužjaka divljeg tipa i 3 mužjaka s isključenim genom *B4Galnt1* u dobi od 12 tjedana. Mužjaci divljeg tipa su razdvojeni na dvije manje grupe po tri životinje. Jedna grupa mužjaka divljeg tipa hranjena je s dodatkom 0.01 % kuprizona (Sigma Aldrich) u hrani, a druga grupa je nastavljena hraniti bez dodataka. Nakon 19 dana trajanja pokusa životinje su žrtvovane, anestetizirane ketaminom intramuskularno (Ketanest, Pfizer Corporation, New York City, NY, USA; koncentracija: 30 mg / kg) i dodatno inhalacijskim plinom izofluranom (Forane®, Abbott Laboratories Ltd, Chicago, IL, USA). Nakon anestetiziranja životinje su transkardijalno perfundirane s 50 ml 1X PBS-a i 50 ml 4 % PFA u 1X PBS-u. Jetre i slezene su izolirane i fiksirane 4 %-tnim paraformaldehidom u trajanju od 48 sati, dio uzoraka je krioprotektiran saharozom, smrznut imerzijom u prethodno ohlađenom 2-metilbutanu i spremljene na -80 °C do analize. Drugi dio uzoraka je prošao postupak dehidracije i uklapanja u parafin prema protokolu:

25 % etanol – 1 sat

50 % etanol – 1 sat

70 % etanol – 1 sat

96 % etanol – 1 sat

100 % etanol – 1 sat

100 % etanol – 1 sat

Histoclear 1. (National Diagnostics) – 30 minuta

Histoclear 2. (National Diagnostics) – 30 minuta

Parafin 1. (Merck)– 2 sata na 59 °C

Parafin 2. (Merck) – 2 sata na 59 °C

Rad je napravljen u sklopu projekta "Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi" (IP-09-2014-2324). Životinje su uzgojene i žrtvovane u Vivariju Medicinskog fakulteta Osijek.

Miševi korišteni u ovom istraživanju uzgajani su, anestetizirani i žrtvovani prema europskim i hrvatskim smjernicama za brigu i upotrebu laboratorijskih životinja. Studija je napravljena na zbirci tkiva koje je uklopljeno u parafin nakon žrtvovanja.

4.3 METODE

4.3.1 Histološka bojenja i obrada slike

Preparati uklopljeni u parafin rezani su na 6 µm debljine na Leica SM2000R mikrotomu. Krioprotektirani preparati rezani su na kriostatu Leica CM3050S. Krioprotektirani preparati su fiksirani uz nosač kriostata medijem za smrzavanje i uklapanje tkiva (Leica). Medij za smrzavanje i uklapanje tkiva ne prodire u tkivo nego ga nepomično fiksira na glavu nosača što omogućuje rezanje. Svi preparati rezani kriostatom su 20 µm debljine.

Postupak deparafinizacije i rehidracije narezanih u parafin uklopljenih preparata:

- HistoClear 1. – 10 minuta
- HistoClear 2. – 5 minuta
- 100 % etanol – 10 minuta
- 96 % etanol – 10 minuta
- 70 % etanol – 10 minuta
- 50 % etanol – 5 minuta
- 25 % etanol – 5 minuta
- destilirana voda – 5 minuta

Nakon deparafinizacije i rehidracije preparati su spremni za histološka bojanja. Postupak dehidracije preparata na staklu je redosljedom obrnut od deparafiniziranja i rehidracije s završnim korakom nanošenja pokrivala i pokrovnice.

Bojanje hemalaun / eozin (HE)

Bojanje hemalaun/eozinom je najvažnije bojanje u histologiji, služi za razlikovanje jezgri i citoplazme: hemalaun je bazična boja koja plavo oboji jezgru, a eozin je kisela boja koja ružičasto oboji citoplazmu stanice. Hemalaun / eozinom obojana je slezena s ciljem određivanja udjela crvene i bijele pulpe. Zbog transkardijalne perfuzije eritrociti u crvenoj pulpi nisu zastupljeni kao u neperfundiranom organu. Preparati korišteni za ovu metodu uklopljeni su u parafin zbog rahlosti tkiva slezene. Nakon deparafinizacije, na preparate je nanešena Mayerova otopina hematoksilina (AppliChem) i ostavljena 5 minuta. Boja je odlicena, preparati su uronjeni u vodovodnu vodu kako bi se razvila boja (15 sekundi). Kada se boja razvije, preparati se stavljaju u kadicu s destiliranom vodom kako bi se isprali. Preparati su preliveni bojom eozin (1 % m/v, u 70 % etanolu) i ostavili 30 sekundi. Nakon toga se eozin ispere u destiliranoj vodi. Nakon što su preparati osušeni na zraku, prosvijetljeni su u Histoclearu 1 minutu i pokriveni Histamount (National Diagnostics) medijem za pokrivanje histoloških preparata. Nakon slikanja na 50 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ. Rub slezene se okružio i izmjerena mu je površina putem *Analyze/Mesure* s namještenim postavkama mjerenja površine. Dobivena vrijednost predstavlja ukupnu površinu slezene. Potom su se okružili svi dijelovi bijele pulpe na istoj fotografiji i na isti način kao i površina cijele slezene. Kako bi se dobila površina crvene pulpe oduzete su vrijednosti zbroja površina bijele pulpe od ukupne površine prereza slezene. Dijeljenjem vrijednosti bijele pulpe s vrijednosti crvene pulpe dobiven je omjer površina koji se dalje koristio u statističkim analizama.

Određivanje površine masnih kapljica

Za određivanje površine pojedinih masnih kapljica u jetri korišteno je bojenje histološkom bojom Oil Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, otopina u izopropanolu). Preparati korišteni za ovu metodu su krioprotektirani i narezani na kriostatu. Nakon rezanja, preparati su prebačeni u 1 x PBS. Potom se koristila slobodno plutajuća metoda bojenja (engl. *free float*) prema Vacci u trajanju od 15 minuta (22). Preparati su potom navučeni na stakalca te pokriveni Crystal Mountom (Biomeda corp. Foster city, CA). Nakon slikanja na 400 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ. Kvantifikacija se sastojala od određivanja područja veličine 500 x 500 piksela, 5 subkapsularno u jetri i 5 u središnjem dijelu jetre. Subkapsularni dio jetre je određen kao malo područje odmah ispod ruba jetre. Slike su kvantificirane kao broj i veličina

svake čestice u pikselima koja je više od 50 % kružnog oblika, nijanse boje 240 – 255 te svjetline 0 – 170. Nijansa i svjetlina boje dio su određivanja praga boje što je metoda kojom se slika dijeli na dvije (ili više) grupa piksela. U ovom slučaju crveni pikseli navedenih karakteristika predstavljali su masne kapljice, a ostali pikseli druge komponente jetrenog tkiva. Prosječne veličine masnih kapljica zatim su statistički analizirane usporedbom svake od 3 skupine miševa posebno subkapsularno, a posebno u središnjem dijelu jetre.

Bojanje ekstrahemoglobinskog željeza –Perlsovo bojenje

Perlsovo bojenje služi za detekciju željeza u tkivima. Reakcijom feričnog (Fe^{3+}) iona i kisele ferocijanidne otopine nastaje svijetloplavi talog na mjestu gdje se nalazi slobodno željezo. Kada fagociti probavljaju dijelove stanice dolazi do oslobađanja prethodno vezanog željeza koje se nakuplja unutar citoplazme. Perlsovo bojenje koristili smo u slezeni kako bismo odredili brojnost fagocitno aktivnih stanica. Preparati korišteni za ovu metodu uklopljeni su u parafin zbog rahlosti tkiva slezene. Za pripremu ferocijanidne otopine potrebno je pomiješati u menzuri 20 ml 1 % vodene otopine kalijeve ferocijanida i 20 ml 2% vodene otopine hidrokloridne kiseline. Deparafinizirani uzorci su stavljeni u kadicu s priređenom ferocijanidom otopinom i ostavljeni 30 minuta. Isprani su u destiliranoj vodi te je postupak ispiranja ponovljen još jednom. Preparati su dehidrirani u alkoholnom nizu, zatim Histoclearu i pokriveni Histamount smolom za histološke preparate (23, 24). Dobiveni preparati slikani su na 400 x povećanju u regiji bijele pulpe koja se intenzivno obojala. Dobivene fotografije analizirane su u ImageJ programu. Sve fotografije su se prvo razdvojile na osnovne boje – crvenu, zelenu i plavu kako bi se izdvojio samo plavi spektar boja. Potom smo dalje u analizama koristili samo dobivenu fotografiju plavog spektra boja. Fotografije su kvantificirane kao broj i veličina svake čestice u pikselima koja je nijanse boje 240 – 255 te svjetline 0 – 160. Nijansa i svjetlina boje dio su određivanja praga boje što je metoda kojom se slika dijeli na dvije (ili više) grupa piksela. U ovom slučaju plavi pikseli navedenih karakteristika predstavljali su citoplazme fagocitno aktivnih stanica, a ostali pikseli druge komponente tkiva slezene. Ukupna površina pozitivne reakcije je zatim statistički analizirana usporedbom svake od 3 skupine miševa.

Perls-DAB bojenje željeza

Za određivanje feričnog (Fe^{3+}) iona u tkivu jetre koje se ne može detektirati klasičnom Perlsovom metodom koristi se modifikacija te metode s diaminobenzidinom (DAB) kao

pojačivačem signala. Svako slobodno željezo reagirati će s kalijfericijanidnom kiselim otopinom i dati feri-feri cijanid. Feri-feri cijanid ima sposobnost katalize polimerizacije DAB-a što se očituje kao smeđi talog na mjestu gdje se dogodila reakcija željeza i kalijfericijanida. Preparati korišteni za ovu metodu su krioprotektirani i narezani na kriostatu. Preparati jetre su navučeni na želatinizirana stakla i osušeni. Radna otopina kalijfericijanida napravljena je iz: 4% kalijfericijanid (Kemika): 10% polivinil pirolidon (Merck): 0.2N klorovodična kiselina u omjerima (Grammol) 1:2:1. Za negativne kontrole reakcije u radnoj otopini je izostavljen kalijfericijanid, ostatak protokola je identičan za negativne kontrole i pozitivne reakcije. Preparati su zajedno na nosaču uronjeni u radnu otopinu u trajanju 75 minuta, potom su isprani vodom. Preparati su uronjeni u 1 % otopinu vodikova peroksida u metanolu u trajanju 1 sat. Preparati su isprani u destiliranoj vodi. Nakon ispiranja u destiliranoj vodi uronjeni su u otopinu DAB – a (Vector Laboratories) pripremljenu prema uputa proizvođača u trajanju od 20 minuta. Preparati su provučeni kroz dehidracijski niz alkohola, potom kroz Histoclear, i pokriveni Histamount medijem za pokrivanje histoloških preparata. Preparati su fotografirani na povećanju 400 x. Sve fotografije su pretvorene u 8-bitne kako bi se mogao odrediti prag intenziteta obojenja. Kvantifikacija se sastojala od određivanja područja veličine 500 x 500 piksela, 5 subkapsularno u jetri i 5 u središnjem dijelu jetre. Subkapsularni dio jetre je određen kao malo područje odmah ispod ruba jetre. Slike su kvantificirane kao srednja vrijednost intenziteta obojenja koja se kreće između 0 i 255, gdje 0 predstavlja najtamnije, a 255 najsvjetlije obojenje. Na negativnim kontrolama je izmjeren intenzitet obojenja istim principom. Vrijednosti dobivene mjerenjem negativne kontrole oduzete su vrijednosti mjerenja intenziteta pozitivne reakcije kako bi se uklonio pozadinski šum tehnike bojanja. Intenziteti obojenja su potom korišteni u statističkoj analizi usporedbom između 3 grupe miševa.

Gomori srebrna impregnacija za retikulinska vlakna

Preparati su obojeni modificiranim protokolom po Gomoriju za retikulin. Protokol je modificiran za slobodno plutajuće preparate (25, 26). Otopine korištene pri bojenju po Gomoriju bile su: srebrov nitrat (AgNO_3 , Gram-mol, Zagreb, 10 %); amonijev hidroksid (NH_4OH , Gram-mol, Zagreb, 25 %); natrijev hidroksid (NaOH , 10 %); kalijev permanganat (KMnO_4 , TTT, Sveta Nedjelja, 1 %); oksalna kiselina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1 %); željezna stipsa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 2,5 %); formalin (Gram-mol, Zagreb, 5 %); zlatni klorid (Kemika, Zagreb, 0,1 %); natrijev tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 5 %). Amonijakalno srebro pripremljeno je na sljedeći način: u 10 mL 10 %-

tnog srebrovog nitrata dodano je 2,5 mL 10 %-tnog natrijevog hidroksida; nakon što se talog slegnuo, uklonjen je supernatant; talog je ispran dva puta u destiliranoj vodi čekajući oba puta da se talog nanovo slegne i uklanjajući supernatant pipetom; tijekom vrtnje polako su dodavane kapi amonijevog hidroksida dok se talog nije ponovno otopio nakon toga dodana je kap do dvije 10 %-tnog srebrovog nitrata dok otopina nije postala vrlo slabo opalescentna; na kraju je dodana destilirana voda do ukupnog volumena od 20 mL. Preparati su oksidirani 1 %-tnim kalijevim permanganatom 2 minute te isprani. Zatim su izbjeljeni u oksalnoj kiselini u trajanju od 2 minute te isprani vodom iz slavine. Učinjeni su osjetljivima 2,5 %-tnom željeznom stipsom 1 minutu te ponovno isprani vodom iz slavine. Zatim su dobro isprani destiliranom vodom pa 30 sekundi tretirani amonijakalnim srebrom te dobro isprani destiliranom vodom. Reducirani su potom u 5 %-tnom formalinu dok nisu potamnili, dobro isprani vodom iz slavine, dobro isprani destiliranom vodom te zatim tonirani 0,1 %-tnom otopinom zlatnog klorida. Ponovno su isprani destiliranom vodom te fiksirani u 5 %-tnom natrijevom tiosulfatu 3 minute. Na kraju su preparati dobro isprani pod mlazom vode iz slavine te stavljani u 1 x PBS. Zatim su navučeni na želatinozna stakla i osušeni. Dehidrirani su 2 puta 10 minuta u 20 %-tnom, po 10 minuta u 50 pa 70 %-tnom, zatim po 5 minuta u 96 i 100 %-tnom te dvije minute u 100 %-tnom etanolu. Nakon toga 2 puta po 2 minute u ksilenu te pokriveni Histamontom. (Nakon slikanja na 400 x povećanju, slike su analizirane u programu ImageJ, Fiji dodatkom (engl. *plugin*) Weka (Waikato Environment for Knowledge Analysis) Segmentational analysis gdje program naučen prepoznavati strukture na slici potom obrađuje slike kroz dodatak pomoću dobivenog skriptnog jezika. Postotci površine koje zauzimaju retikulinska vlakna zatim su statistički analizirani usporedbom između svake od 3 skupine miševa posebno subkapsularno, a posebno u središnjem dijelu jetre.

4.3.2 Slikanje preparata

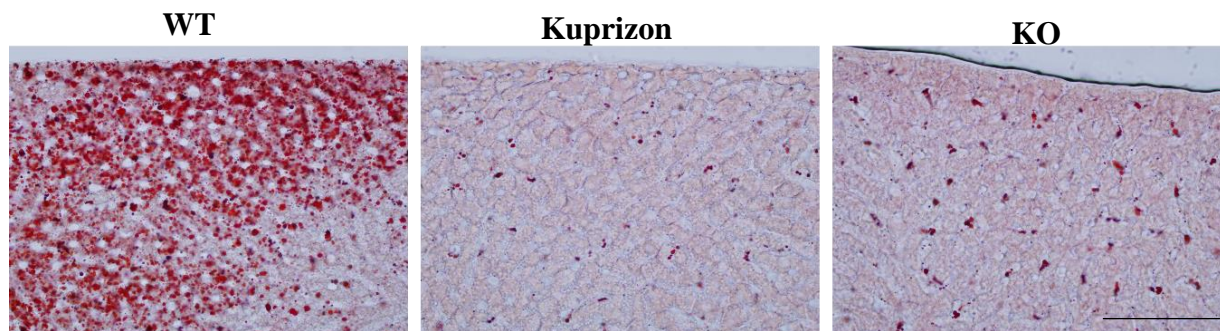
Preparati su mikroskopirani pomoću svjetlosnog mikroskopa (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany) te slikani kamerom Olympus DP70 (OlympusDP70, Optical Olympus, Japan) koja je montirana na mikroskop. Preparati su slikani pod 50x i 400x povećanjem. Slike su analizirane u računalnom programu ImageJ (Fiji 101).

4.3.3 Statističke metode

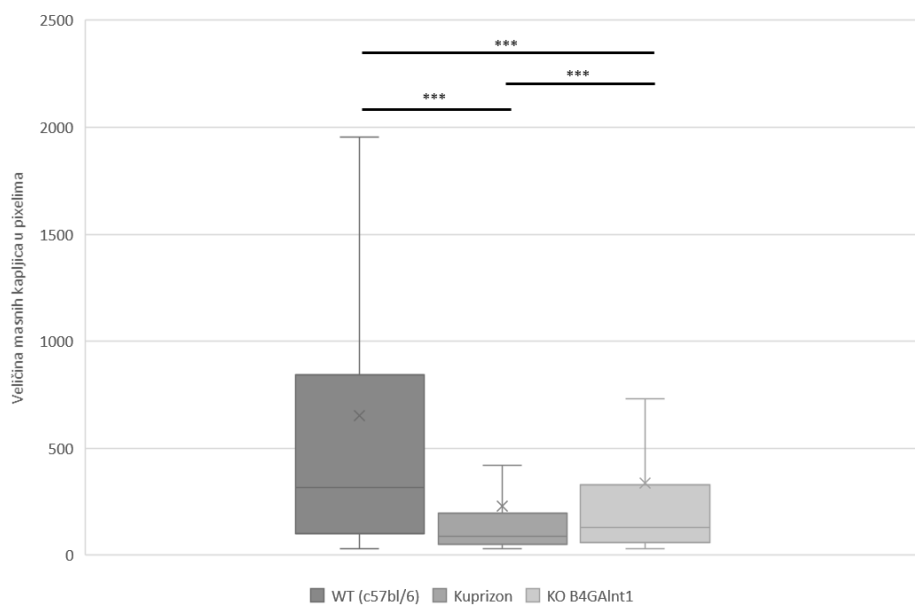
Za statističku analizu koristio se program Statistica 12. (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD). Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim T-testom, a razlike koje odstupaju od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Razina značajnosti je 0,05.

5 REZULTATI

Jetra tri modela miša (WT, kuprizon i KO) obojena je Oil Red O (Slike 1 i 3), Perls – DAB (Slike 5 i 7) i modificiranim bojenjem po Gomoriju (Slike 9 i 11).

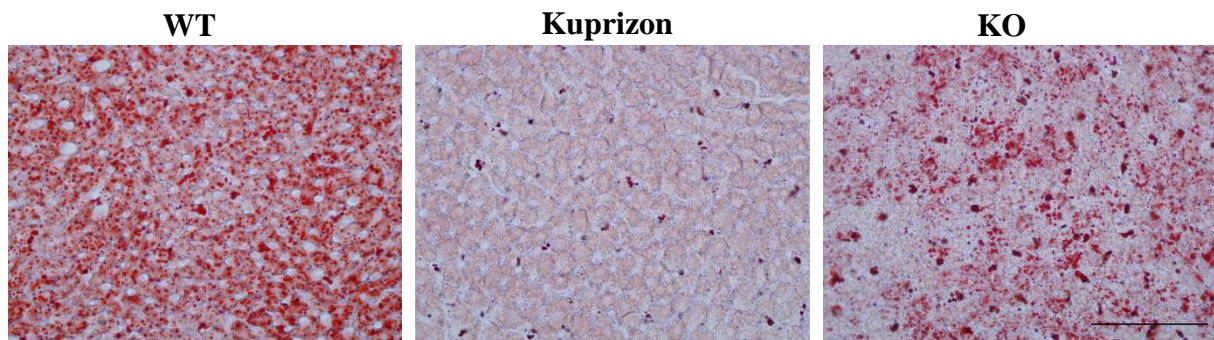


Slika 1. Prikaz masnih kapljica subkapsularno u jetri miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni Oil Red O. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm .

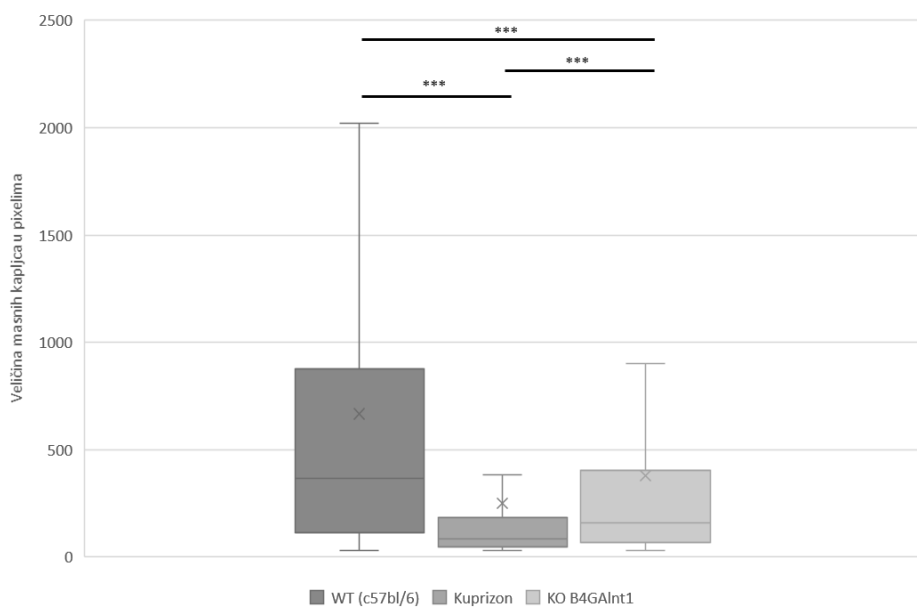


Slika 2. Površina pojedinih masnih kapljica subkapsularno u jetri kod 3 mjeseca starih životinja. WT- divlji tip (C57/bl), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Mann-Whitney-U test za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136 mm^2 ; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Masne kapljice subkapsularnog dijela jetre divljeg tipa miša su značajno veće od masnih kapljica miševa hranjenih kuprizonom i KO *B4Galnt1* mišjeg modela. Također statistički značajno su manje kapljice kod životinja hranjenih kuprizonom u usporedbi s KO *B4Galnt1* mišjim modelom. Divlji tip miša pati od vidljive steatoze jetre koja je u genetičkoj podlozi. (Slike 1 i 2).

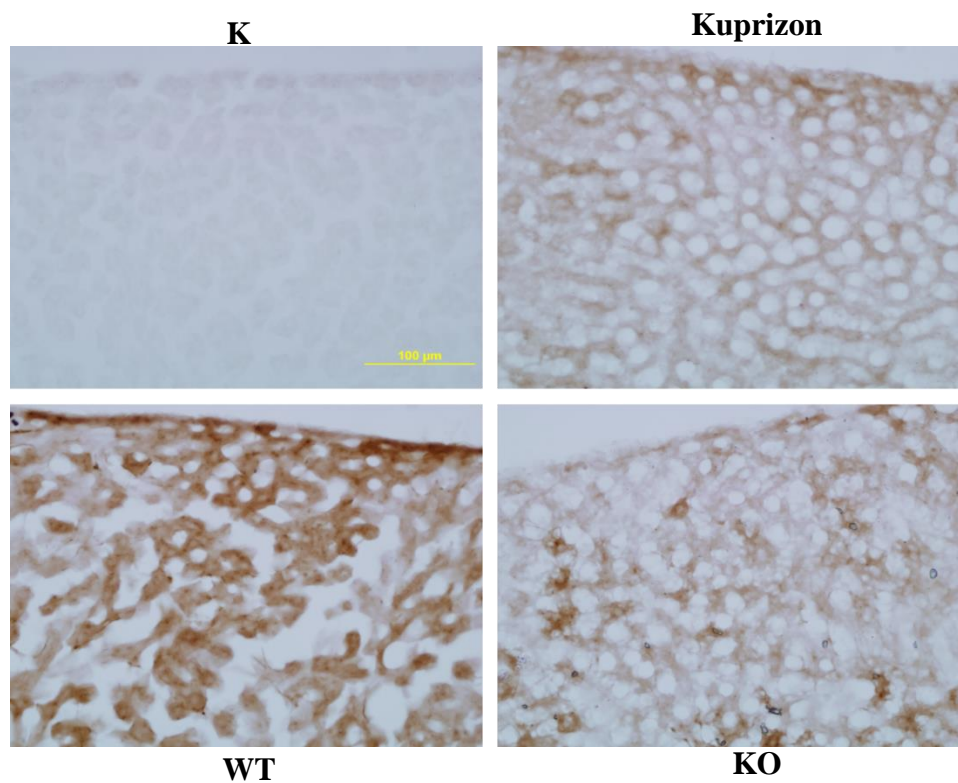


Slika 3. Prikaz masnih kapljica u središnjem dijelu jetre miša starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni Oil Red O. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm .

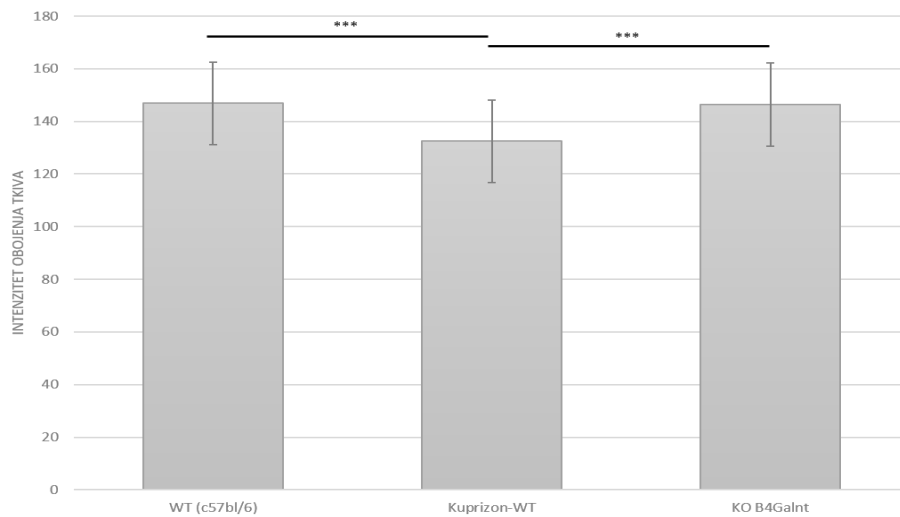


Slika 4. Površina pojedinih masnih kapljica u središnjem dijelu jetre kod 3 mjeseca starih životinja. WT- divlji tip (C57/bl), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt*. *Mann-Withney-U* test za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136mm²
*p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Masne kapljice središnjeg dijela jetre divljeg tipa miša su značajno veće od masnih kapljica miševa hranjenih kuprizonom i KO *B4Galnt1* mišjeg modela. Također statistički značajno su manje kapljice kod miševa hranjenih kuprizonom u usporedbi s KO *B4Galnt1* mišjim modelom (Slike 3 i 4).

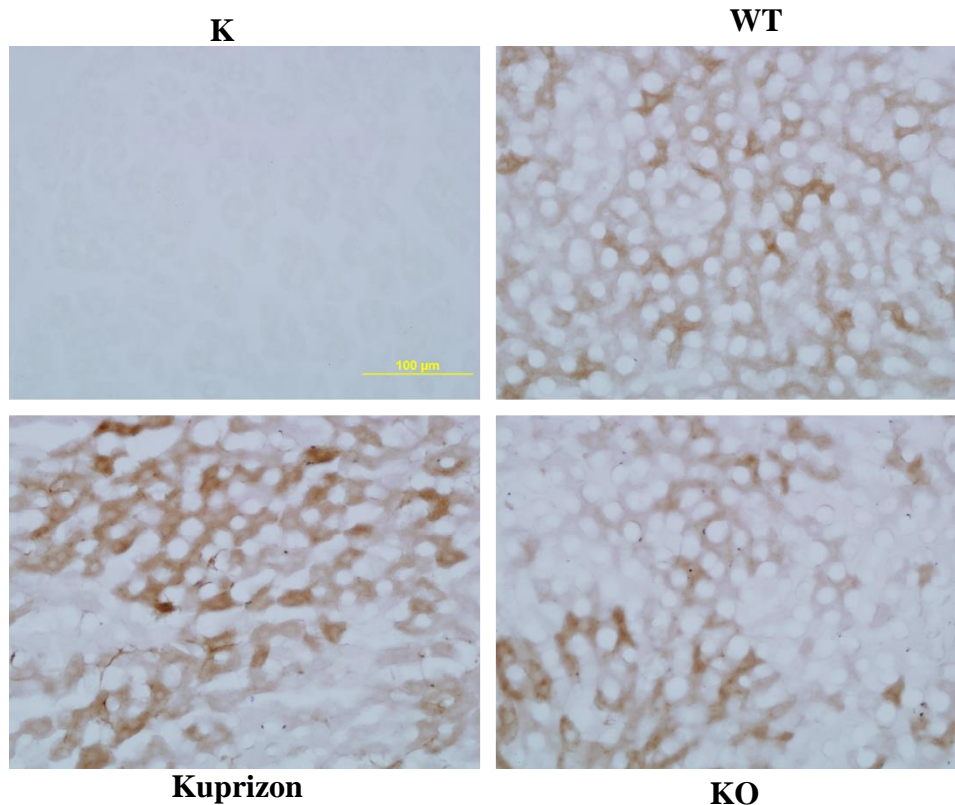


Slika 5. Prikaz željeza (smeđe obojenje) subkapsularno u jetri miševa starih 3 mjeseca. Preparati obojeni Perls-DAB bojenjem. K - negativna kontrola bojenja na tkivu WT životinje, WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 µm.

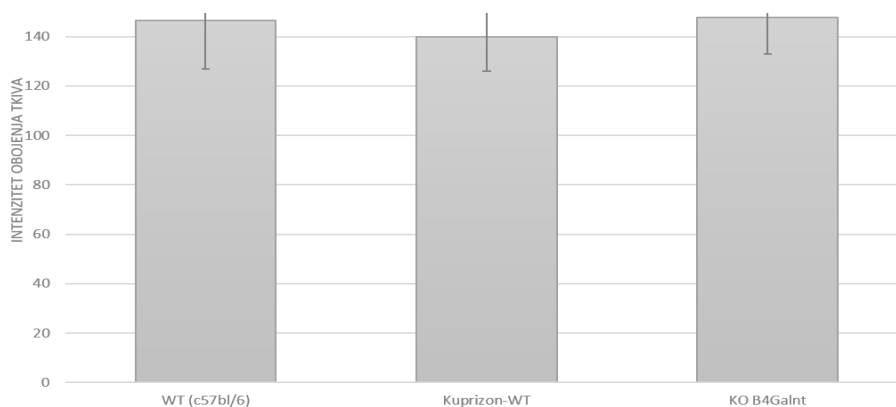


Slika 6. Intenzitet obojenja željeza subkapsularno u jetri kod 3 mjeseca starih životinja. WT-divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. T test za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136 mm² *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Količina željeza subkapsularno u jetri životinja hranjenih kuprizonom je manja u odnosu na divlji tip i KO *B4Galnt1* mišji model što je očekivano zbog kelacijskih svojstava kuprizona (Slike 5 i 6).

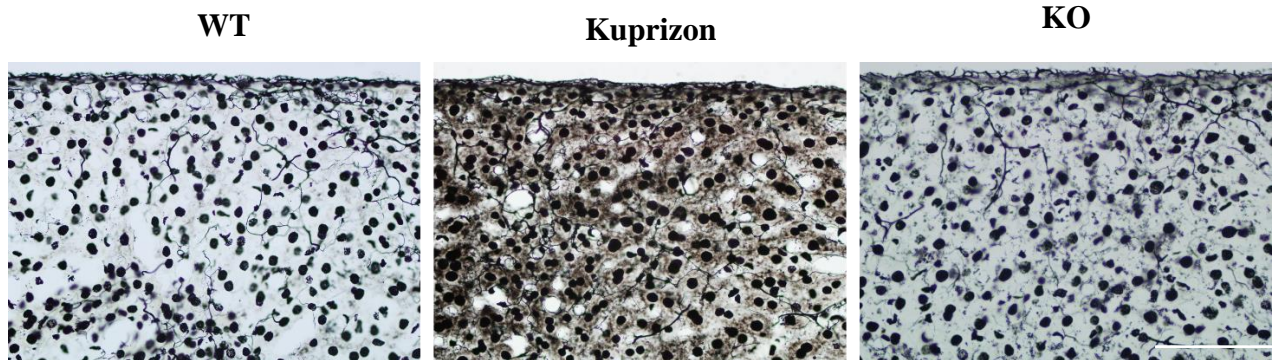


Slika 7. Prikaz željeza (smeđe obojenje) u središnjem dijelu jetre miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni Perls-DAB bojenjem. K- negativna kontrola bojenja na tkivu WT životinje, WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm.

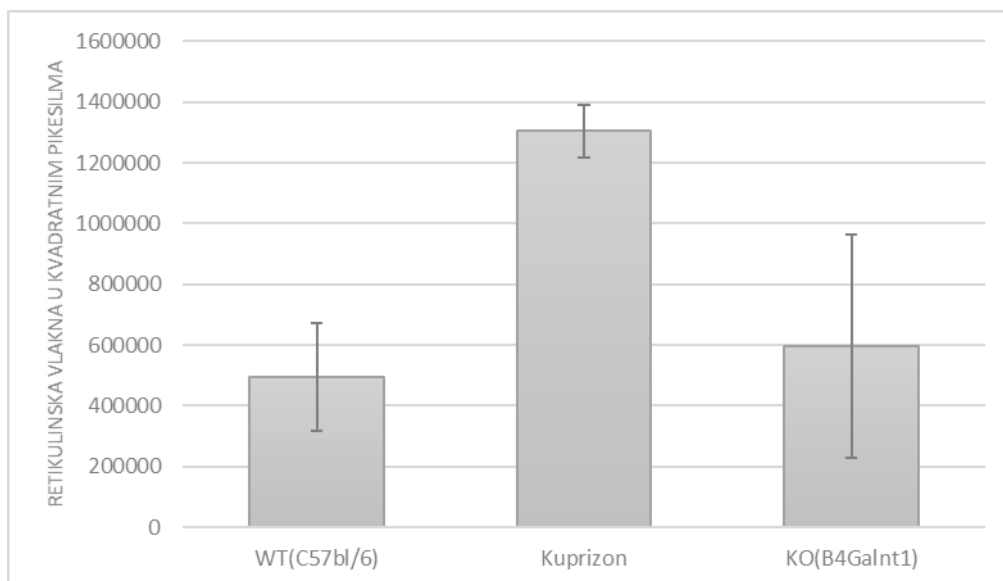


Slika 8. Intenzitet obojenja željeza u središnjem dijelu jetre kod 3 mjeseca starih životinja. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. *T* test za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136 mm² **p*<0,05, ** *p*<0,01, *** *p*<0,001.

Količina željeza u središnjem dijelu jetre kuprizonom hranjenog miša je statistički značajno manja u odnosu na središnji dio jetre KO *B4Galnt1* mišjeg modela (Slika 8).

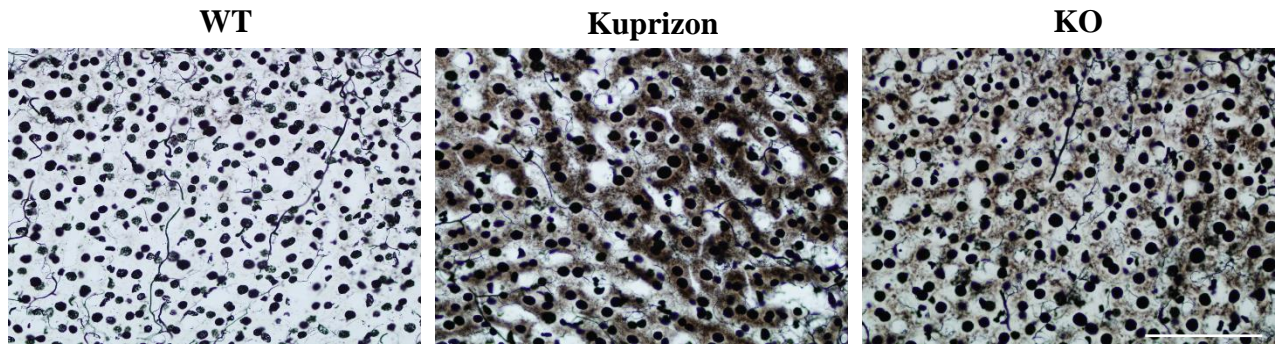


Slika 9. Prikaz retikulinskih vlakana subkapsularno u jetri miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni modificiranom metodom po Gomoriju. Okrugle strukture predstavljaju jezgre koje su vezale srebro, vlasaste strukture su retikulinska vlakna; WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm .

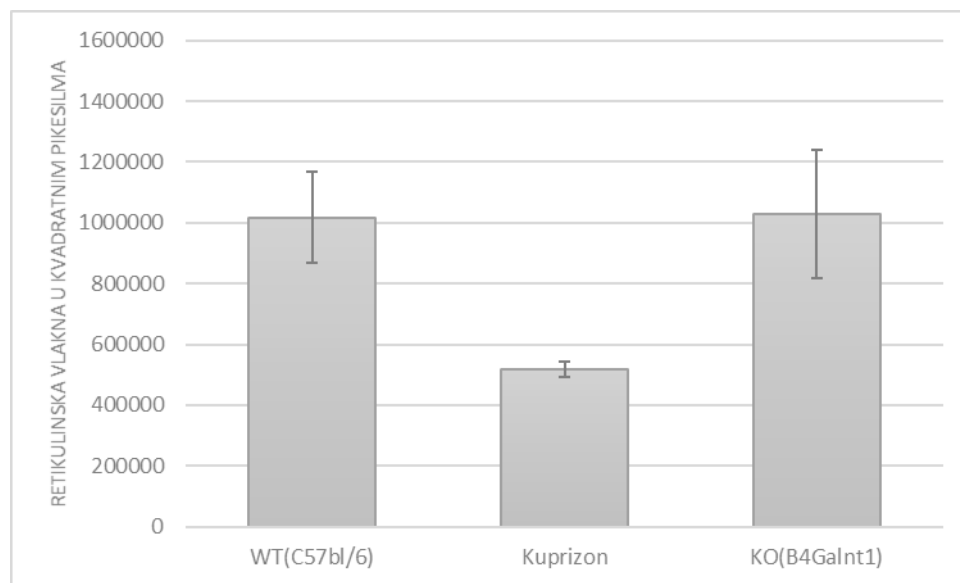


Slika 10. Udio retikulinskih vlakana u subkapsularnom dijelu jetre kod 3 mjeseca starih životinja. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. *T test* za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136 mm^2 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa miševa (Slika 10).



Slika 11. Prikaz retikulinskih vlakana u središnjem dijelu jetre miša starog 3 mjeseca. Preparati su obojeni modificiranom metodom po Gomoriju. Okrugle strukture predstavljaju jezgre koje su vezale srebro, vlasaste strukture su retikulinska vlakna; WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO-miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm .



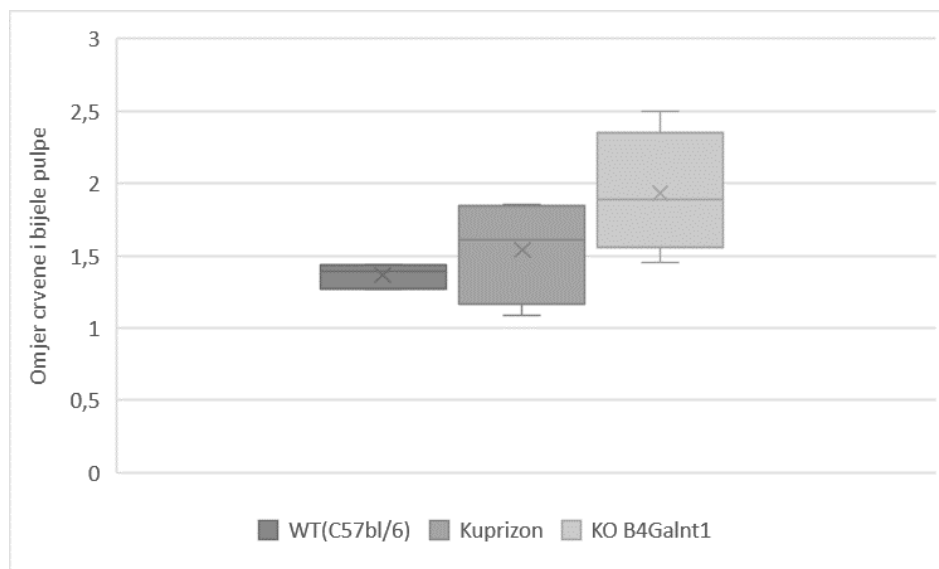
Slika 12. Udio retikulinskih vlakana u središnjem dijelu jetre kod miševa starih 3 mjeseca. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. *T test* za nezavisne uzorke; analizirana površina 0.136 mm^2 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ne postoji statistički značajna razlika između ispitivanih grupa miševa (Slika 12).

Slezena tri modela miša (WT, kuprizon i KO) prvo je obojena klasičnim histološkim bojenjem hemalaun/eozin (Slika 13), zatim Perlsovim bojenjem (Slika 15) i na kraju modificiranim bojenjem po Gomoriju (Slika 17).

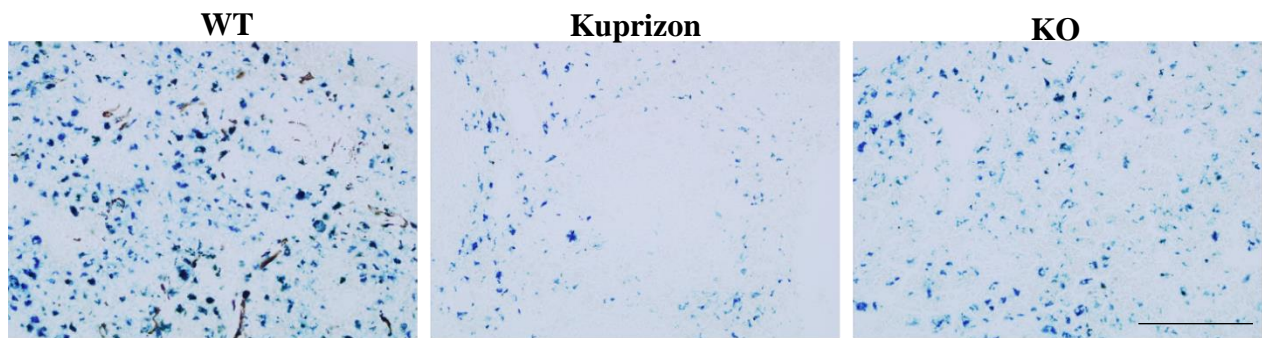


Slika 13. Prikaz slezene miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni hemalaun/eozinom. WT-divlji tip (C57bl/6), Kuprizon, i KO-miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 50x. Skala 1mm.

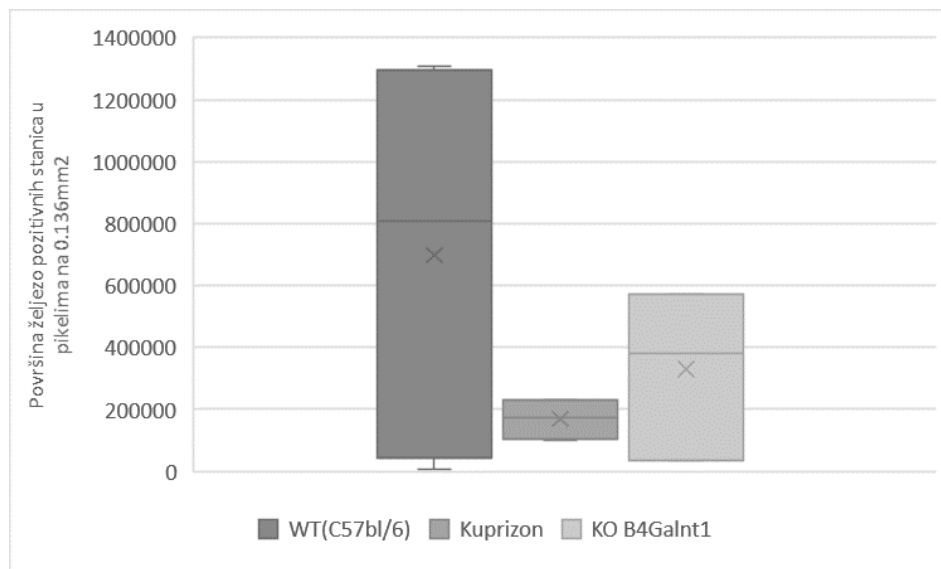


Slika 14. Omjer površina crvene i bijele pulpe slezene, analizirana površina $4,37\text{mm}^2$; WT-divlji tip (C57bl/6), Kuprizon, i KO-miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Mann-Whitney-U test za nezavisne uzorke * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ne postoji statistički značajna razlika između omjera bijele i crvene pulpe slezene kod sve tri grupe miševa (Slika 14).

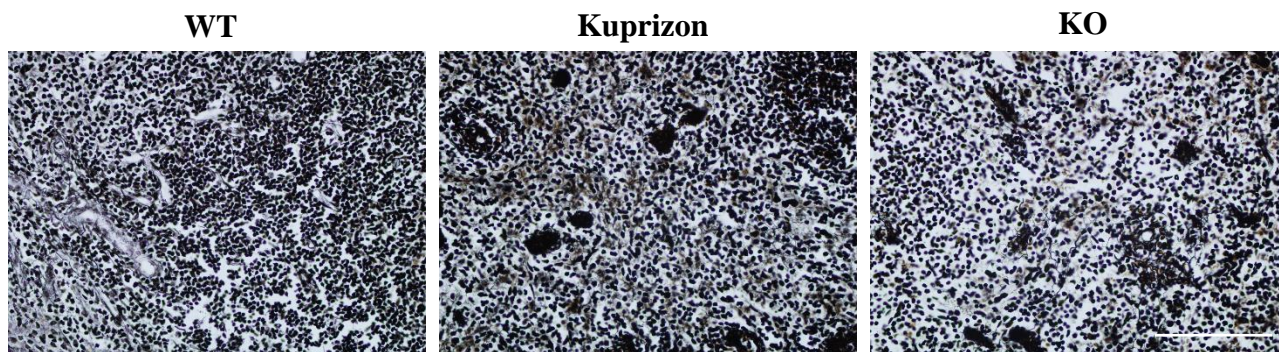


Slika 15. Prikaz ekstrahemoglobinskog željeza (plavo obojenje) u slezeni miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni Perlsovim bojanjem. WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μ m.

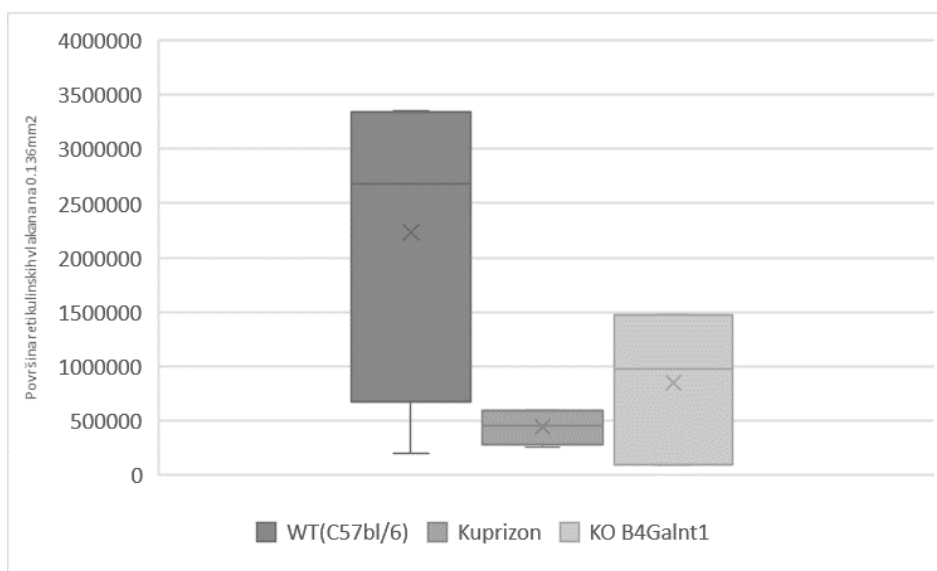


Slika 16. Površina željezo pozitivnih stanica u bijeloj pulpi slezene, analizirana površina 0.136 mm². WT- divlji tip (C57/bl), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. *Mann-Withney-U* test za nezavisne uzorke *p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

Ne postoji statistički značajna razlika u količini željeza u bijeloj pulpi između sve tri grupe miševa (Slika 16).



Slika 17. Prikaz retikulinskih vlakana u slezeni miševa starih 3 mjeseca. Preparati su obojeni modificiranim bojenjem po Gomoriju. Okrugle strukture predstavljaju jezgre koje su vezale srebro, vlasaste strukture su retikulinska vlakna; WT- divlji tip (C57bl/6), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Povećanje 400x. Skala 100 μm .



Slika 18. Površina retikulinskih vlakana u crvenoj pulpi slezene, analizirana površina 0.136 mm^2 . WT- divlji tip (C57/bl), Kuprizon i KO- miš s isključenim genom *B4Galnt1*. Mann-Whitney-U test za nezavisne uzorke * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Ne postoji statistički značajna razlika između količine retikulinskih vlakana u bijeloj pulpi slezene između sve tri grupe (Slika 18).

6 RASPRAVA

Jetra ima važnu ulogu u homeostazi željeza. Kod osoba s kroničnom bolešću jetre, regulacija željeza može biti poremećena. Veće razine željeza prisutne su u nasljednoj hemokromatozi, alkoholnoj bolesti jetre, nealkoholnoj bolesti masne jetre (NAFLD; engl. *non-alcoholic fatty liver disease*) te kod hepatitisa uzrokovanog virusom. Kod tih bolesti dolazi do smanjene sintetske funkcije jetre te do povišenih koncentracija slobodnog nevezanog željeza u krvi (27, 28). Prilikom tretmana kuprizonom, jetre tih miševa su očekivano počele gubiti željezo značajnije više u odnosu na kontrolnu grupu i u odnosu na KO model. Brojni faktori su mogli doprinijeti ovakvom stanju jetre, među kojima je promjena sinteze transferina i apofertina. Progrijom NAFLD-a i daljnjim oštećenjima, uključujući oksidativni stres i mitohondrijske abnormalnosti, dolazi do razvoja sekundarne upale i pojave imunološkog stanja u jetri koja je poznata kao steatohepatitis (29-32). Kronična upala jetre rezultira fibrozom potaknutom aktiviranjem makrofaga u tkivu jetre. Kod kuprizona, osim smanjenja željeza u jetri, prema količini retikulinskih vlakana ova grupa ima trend koji ukazuje na razvijanje fibroze, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se sa sigurnošću mogao prihvatiti ili odbaciti taj trend.

Divlji tip (WT) miša C57bl/6 se koristi u brojnim istraživanjima, uključujući genetička, imunološka, neurobiološka, metabolička i kardiovaskularna istraživanja. Često se koristi kao soj za stvaranje kongenih životinja te za proizvodnju genetski modificiranih modela miševa. Karakteristike ovog soja uključuju: visoku osjeljivost na razvoj pretilosti inducirane hranom, dijabetesa tip 2, i ateroskleroze, visoku učestalost mikrooftalmije i druge očne abnormalnosti, pokazuju otpor na audiogeni stres, imaju nisku gustoću kostiju, gubitak dlake, sklonost razvoja ovisnosti o alkoholu i morfij, gubitak sluha u kasnijoj dobi i povećana učestalost hidrocefalusa i malokluzija (31). Zbog svoje sklonosti pretilosti inducirane hranom, ovaj soj razvija nealkoholnu bolest masne jetre, koja je vidljiva kod naših miševa divljeg tipa. Kuprizon remeti metabolizam jetre keliranjem željeza i bakra koji su glavni kofaktori većine jetrenih enzima. Učinak se očitovao u smanjenju ukupnih masnih kapljica i njihove veličine unutar hepatocita životinja hranjenih kuprizonom. Isti učinak, no ne toliko izražen, vidljiv je i kod KO životinja, najvjerojatnije nedostatak složenih gangliozida remeti aktivnost sintetaze masnih kiselina smanjujući njezinu aktivnost (32-34). Ovo bi mogao biti zaštitni čimbenik kod izloženosti masnoj hrani te je za očekivati da se ove životinje teže debljaju.

Značajnost keliranja željeza iz organizma vidljiva je na miševima tretiranim kuprizonom koji imaju sličnu distribuciju masnih kapljica kao i KO model, no izostaje fibroza. Zanimljivo je napomenuti da unatoč značajnoj steatozi jetre divljeg tipa miša izostala je pojava fibroze.

Slezena, kao jedan od glavnih imunoloških organa sisavaca, podložna je molekularnim i makroskopskim promjenama uslijed izlaganja toksinima. Osim kemijskim putem, povećanje slezene se može potaknuti poremećajem u putevima signalizacije limfocita uslijed čega dolazi do prekomjernog nakupljanja stanica u bijeloj pulpi slezene i njezina rasta. Prethodna istraživanja su pokazala da KO *B4Galnt1* model miša ima poremećaj u funkciji limfocita (8). Izlaganje kuprizonu nije pokazalo značajne pomake u omjeru crvene i bijele pulpe slezene. Mogući razlozi su prekratko izlaganje kuprizonu ili nedovoljna doza za ispoljenje morfoloških promjena na slezeni. Nema statistički značajnih razlika između količine retikulina niti u količini željeza iako postoji trend smanjenja željezo-pozitivnih stanica unutar bijele pulpe slezene.

Potrebna su daljna istraživanja kako bi se sa sigurnošću moglo reći razvija li model kuprizona fibrozu jetre. Značajno bi bilo istražiti do koje mjere tretman kuprizonom aktivira makrofage u jetri u odnosu na divlji tip i KO model jer se dobiveni rezultati kose s dosadašnjim istraživanjima u kojima suvišak željeza uzrokuje upalno stanje jetre. Također u nastavku istraživanja vrijedno bi bilo ispitati postoji li promjena populacije limfocita unutar slezene te ponoviti pokus na većem broju životinja. S obzirom da je istraživanje napravljeno na mladim životinjama, a da fenotip postaje očitiji tek kod starih životinja (preko 6 mjeseci) istraživanje bi trebalo ponoviti na starim životinjama.

7 ZAKLJUČAK

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih podataka može se zaključiti da:

- divlji tip miša, zbog svoje sklonosti pretilosti inducirane hranom, razvija NAFLD koja se očituje povećanim brojem masnih kapljica, u odnosu na miševe hranjene kuprizonom i KO *B4Galnt1* model
- kod miševa s isključenim genom *B4Galnt1* i miševa hranjenih kuprizonom dolazi do smanjenja ukupnog broja masnih kapljica u jetri
- količina željeza u jetri miševa hranjenih kuprizonom je statistički značajno manja u odnosu na divlji tip i KO *B4Galnt1* mišji model
- nema statistički značajnih razlika u količini retikulinskih vlakana kod sva tri modela miša
- nema statistički značajnih morfoloških promjena slezene kod sva tri modela miša

8 SAŽETAK

Cilj istraživanja: Napraviti morfometrijski prikaz jetre i slezene kod odraslih miševa divljeg tipa, miševa s isključenim genima *B4Galnt1* i miševa hranjenih kuprizonom.

Nacrt studije: Istraživanje je provedeno kao studija parova.

Materijali i metode: Za provedeno istraživanje se koristilo tkivo jetre i slezene miševa divljeg tipa (WT), WT miševi hranjeni kuprizonom i genetički izmijenjenih miševa *B4Galnt1* (KO). Tkiva jetre i slezene su bojana klasičnim histološkim bojanjima te su preparati pogledani pod mikroskopom i slikani. Dobiveni rezultati su se obrađivali u računalnim programima Fiji i Statistica 12.

Rezultati: Kod miševa s isključenim genom *B4Galnt1* i miševa hranjenjih kuprizonom dolazi do smanjenja ukupnog broja masnih kapljica u jetri. Količina željeza u jetri životinja hranjenih kuprizonom je statistički značajno manja u odnosu na divlji tip i *KO B4Galnt1* mišji model. Nema morfoloških promjena slezene kod sva tri modela miša.

Zaključak: Kod miševa hranjenih kuprizonom i *KO* miševa dolazi do promjena u jetri, no promjene u slezeni nisu zapažene.

Ključne riječi: gangliozidi; *KO B4Galnt1* miš; jetra; slezena

9 SUMMARY

Morphometry of liver and spleen in wild type mice and *B4Galnt1* knockouts

Aims: To do morphometric survey of liver and spleen in wild type adult mice, *B4Galnt1* knockouts and cuprizone - fed mice.

Study scheme: A case- control study.

Materials and methods: Liver and spleen tissue of wild type mice (WT), cuprizone - fed wild type mice and genetically modified mice (KO) were included in the conducted research. Liver and spleen tissue samples were stained with the classical histological stain dye, the tissue samples were examined under a light microscope and photographed by camera. The obtained results were processed in Fiji and Statistica 12 computer programmes.

Results: In KO *B4Galnt1* mice and cuprizone – fed mice, the total number of fat drops in the liver is reduced. The amount of iron in the liver of cuprizone-fed animals has statistically been significantly lower compared to the wild type and the KO *B4Galnt1* mouse model. There are no morphological changes in the spleen of all three mouse models.

Conclusion: There have been changes taking place in the liver of the cuprizone - fed and KO *B4Galnt1* mice. There have not been any noticed spleen changes though.

Key words: gangliosides; KO *B4Galnt1* mice; liver; spleen

10 LITERATURA

1. Junqueira LC, Carneiro J: Osnove histologije, udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju. Školska knjiga, Zagreb, 2005.
2. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):455-65.
3. Li L, Duan M, Chen W, et al. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *Journal of Translational Medicine.* 2017;15:111.
4. Walkley SU1, Vanier MT. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1793(4):726-36.
5. Li L, Duan M, Chen W, et al. The spleen in liver cirrhosis: revisiting an old enemy with novel targets. *Journal of Translational Medicine.* 2017;15:111.
6. Kolter T. Ganglioside Biochemistry. *ISRN Biochemistry.* 2012;2012:506160
7. Yamaguchi T, Yamauchi Y, Furukawa K, et al. Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing. *Scientific Reports.* 2016;6:34505.
8. Van Dyken SJ, Green RS, Marth JD. Structural and mechanistic features of protein O-glycosylation linked to CD8+ T cell Apoptosis, *Molecular and cellular biology.* 2007.
9. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biokemija.* 6. izd. Zagreb: Školska knjiga; 2013.
10. Cooper GM, Hausman RE. *Stanica, molekularni pristup.* 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
11. Simons K,ampaio JL. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(10):a004697.
12. Yu RK, Tsai Y-T, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. *Journal of oleo science.* 2011;60(10):537-544.
13. Anheuser S, Breiden B, Schwarzmann G, Sandhoff K. Membrane lipids regulate ganglioside GM2 catabolism and GM2 activator protein activity. *Journal of Lipid Research.* 2015;56(9):1747-1761.
14. Pike LJ. Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. *Biochem J* 2004;378(Pt 2):281-292.
15. Zhang, X. & Kiechle, F. L. Review: Glycosphingolipids in health and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 34, 3–13 (2004).

16. Fishman PH, Brady RO. Biosynthesis and function of gangliosides. *Science*. 1976;194(4268):906-15.
17. Anheuser S, Breiden B, Schwarzmann G, Sandhoff K. Membrane lipids regulate ganglioside GM2 catabolism and GM2 activator protein activity. *Journal of Lipid Research*. 2015;56(9):1747-1761.
18. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, HildebranWT H. Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration *Physiological Reviews* 2014;94 (2) 461-518.
19. Sonnino S, Mauri L, Chigorno V, Prinetti A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology*. 2007; 17:1R -13R.
20. Lew RM, Burnett L, Proos AL, Delatycki MB. Tay-Sachs disease: current perspectives from Australia. *The Application of Clinical Genetics*. 2015;8:19-25.
21. Torkildsen O1, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L. The Kuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2008;188:72-6.
22. Vacca. *Laboratory manual of Histochemistry*, Raven Press. 1985.;235-7.
23. Moos, T. & Møllgård, K. *Histochemistry* 1993;99: 471.
24. C.F.A., Allison, R.T. and Barr, W.T. *Cellular Pathology Technique*, Ed.4. Butterworth, London, UK.
25. Drury, R A, and Wallington, E A, *Carleton's histological technique.*, Ed. 5. Oxford University Press, London, England; 1996.
26. Culling, C F A, Allison, R T, Barr, W T. *Cellular pathology technique.*, Ed. 4. Butterworths, London, England; 1985.
27. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*. 2017;241(1):36-44.
28. Milic S, Mikolasevic I, Orlic L, et al. The Role of Iron and Iron Overload in Chronic Liver Disease. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2016;22:2144-2151.
29. Tsushima, Y. & Endo, K. Spleen enlargement in patients with nonalcoholic fatty liver- Correlation between degree of fatty infiltration in liver and size of spleen. *Dig Dis Sci* 2000;45, 196–200.
30. Uchida T, Kronborg I, Peters RL. Giant mitochondria in the alcoholic liver diseases-- their identification, frequency and pathologic significance. *Liver*. 1984;4(1):29-38.

31. Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y., Yoshiki, A. (2009). Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*, Vol. 58: 141-149.
32. Nakamura A, Terauchi Y. Lessons from Mouse Models of High-Fat Diet-Induced NAFLD. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013;14(11):21240-21257.
33. Lau JKC, Zhang X, Yu J. Animal models of non-alcoholic fatty liver disease: current perspectives and recent advances. *The Journal of Pathology*. 2017;241(1):36-44.
34. Suzuki K. Giant hepatic mitochondria: production in mice fed with Kuprizonone. *Science*. 1969 163(3862):81-2.

11 ŽIVOTOPIS

Ime i prezime:

Ana Kiš

Datum i mjesto rođenja:

25.12.1995., Našice

Obrazovanje:

- 2014. - 2017. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu u Osijeku
- 2010. - 2014. Opća gimnazija Donji Miholjac
- 2002. - 2010. Osnovna škola August Harambašić Donji Miholjac