

# Molekularna podloga osjetljivosti na visceralnu bol miševa s isključenim genom B4Galnt1

---

Lulić, Doris

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:806681>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Doris Lulić**

**MOLEKULARNA PODLOGA  
OSJETLJIVOSTI NA VISCERALNU BOL  
MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM**

***B4Galnt1***

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske  
dijagnostike**

**Doris Lulić**

**MOLEKULARNA PODLOGA  
OSJETLJIVOSTI NA VISCERALNU BOL  
MIŠEVA S ISKLJUČENIM GENOM**

***B4Galnt1***

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

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

Mentor rada: prof.dr.sc. Marija Heffer

Rad ima 42 stranice i 15 slika

*Ogromno hvala profesorici i mentorici Mariji Heffer koja mi je omogućila izradu ovog rada. Hvala vam na strpljenju, odgovaranju na moje upite kasno u noći i na velikom znanju koje ste mi pružili. Vaša predanost i ljubav prema poslu u meni su, od prvog predavanja, pobudili još veći interes za znanost i sve ono što njome možemo postići.*

*Posebno hvala i Miloradu Zjaliću koji me svojim velikim znanjem i strpljenjem naučio puno toga o radu u laboratoriju, logičkom razmišljanju i da se uloženi trud isplati. Obi hvala na satima i satima smijeha, novim spoznajama o klasičnoj glazbi :P, hvala što se nisi ljutio kada sam nešto krivo napravila i što si uvijek bio uz nas čak i kada smo duže trebali ostati u labosu.*

*Hvala i mojoj obitelji koja mi je omogućila studiranje i veliku potporu da slijedim svoje snove!*

*Hvala i mom dečku Ivanu, što je vjerovao u mene, kada ja to nisam i bio mi veliki oslonac u svakom trenutku.*

*Katarina i Ljiljo, vama hvala na svim porukama podrške i ohrabrivanja, na svakom trenutku smijeha i svakoj lijepoj riječi koje mi znače jako puno.  
Nastavljamo zajedno u nove pobjede!!!*

## Sadržaj:

<b>1. UVOD</b> .....	1
<b>1.1. Sinteza gangliozida i miševi s isključenim <i>B4Galnt1</i> genom</b> .....	1
1.1.1. Uloga i podjela gangliozida .....	1
1.1.2. Biosinteza gangliozida.....	3
1.1.3. Miševi s isključenim <i>B4Galnt1</i> genom .....	3
<b>1.2. Kuprizonski model demijelinizacije</b> .....	4
1.2.1. Učinak kuprizona na stanice - biokemijska i molekularna podloga .....	4
1.2.2. Imunološki sustav – uloga u apoptozi i remijelinizaciji .....	5
<b>1.3. Bol</b> .....	6
1.3.1. Nociceptori .....	6
1.3.2. Primarna aferentna vlakna za bol.....	6
1.3.3. Visceralna bol.....	7
1.3.4. Imunološki sustav i bol.....	7
<b>1.4. Imunokemijski markeri</b> .....	8
1.4.1. Imunohistokemijske metode .....	8
1.4.2. Imunokemijski markeri u neuroznanosti.....	9
<b>1.5. Povezanost procesa demijelinizacije i osjećaja boli</b> .....	12
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	13
<b>3. CILJEVI</b> .....	14
<b>4. MATERIJALI I METODE</b> .....	15
4.1. Ustroj studije .....	15
4.2. Pokusne životinje .....	15
4.3. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu .....	15
4.4. Imunohistokemijska analiza .....	16
4.5. Statističke metode.....	17
<b>5. REZULTATI</b> .....	18
5.1. Markeri mijelinizacije (MBP, CNP-aza) .....	18
5.2. Markeri mikroubula (SMI312, pTau) .....	20
5.3. Markeri upale (Iba1, GFAP).....	22
5.4. Markeri neurona (nNOS, NeuN) .....	24
<b>6. RASPRAVA</b> .....	27
<b>7. ZAKLJUČCI</b> .....	29

<b>8.SAŽETAK</b> .....	30
<b>9. SUMMARY</b> .....	31
<b>10.LITERATURA</b> .....	32
<b>11.ŽIVOTOPIS</b> .....	42



## POPIS KRATICA:

ATP	adenozin trifosfat (engl. <i>adenosine triphosphate</i> )
Ca <sup>2+</sup>	ion kalcija
CGT	ceramid galaktozil-transferaza (engl. <i>ceramide galactosyltransferase</i> )
CNP-aza	2'3'-ciklički nukleotid-3'-fosfodiesteraza (engl. <i>2'3'-cyclic nucleotide-3'-phosphodiesterase</i> )
CNS	središnji živčani sustav (engl. <i>central nervous system</i> )
CUP	kuprizon (engl. <i>cuprizon</i> )
DAB	3,3'-diaminobenzidin
ER	endoplazmatski retikulum (engl. <i>endoplasmic reticulum</i> )
ETC	transportni lanac elektrona (engl. <i>electron transport chain</i> )
Fab	domena koja veže antigene (engl. <i>fragment antigen binding</i> )
Fc region	kristalizirajuća domena (engl. <i>fragment crystallizable region</i> )
Gal	galaktoza
GalNAc	N-acetil galaktozamin
GFAP	glijalni fibrilarni kiseli protein (engl. <i>Glial fibrillary acid protein</i> )
Glc	glukoza
HMG-CoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-koenzim A (engl. <i>β-Hydroxy β-methylglutaryl-Coenzyme A</i> )
Iba1	adaptorska molekula koja veže kalcij (engl. <i>Ionized calcium-binding molecule1</i> )
IL	interleukin (engl. <i>interleukin</i> )
KO	isključen (gen) (engl. <i>Knocked out; knockout</i> )
Lac	laktoza (engl. <i>lactose</i> )
LacCer	laktozil ceramid
MAG	mijelinu pridruženi glikoprotein (engl. <i>Myelin-associated glycoprotein</i> )
MAP	protein povezan s mikrotubulima (engl. <i>Microtubule-associated protein</i> )

MBP	mijelinski bazični protein (engl. <i>Myelin basic protein</i> )
MHC	glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. <i>major histocompatibility complex</i> )
MT	metalotioneini (engl. <i>Metallothioneins</i> )
NANA	N-acetilneuraminska kiselina (engl. <i>N-acetylneuraminic acid</i> )
Neu(N)Ac	N-acetil-N-neuraminska kiselina
NeuN	neuronski jezgrin protein (engl. <i>neuronal nuclear protein</i> )
NF	neurofilament
NF-H	neurofilament velike molekularne mase (engl. <i>neurofilament high</i> )
NF-L	neurofilament niske molekularne mase (engl. <i>neurofilament low</i> )
NF-M	neurofilament srednje molekularne mase (engl. <i>neurofilament medium</i> )
NGF	čimbenik rasta neurona (engl. <i>nerve growth factor</i> )
nNOS	neuronska nitrid oksid sintetaza (engl. <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NO	dušikov monoksid (engl. <i>nitric oxide</i> )
OPC	prekursorska stanica oligodendrocita (engl. <i>oligodendrocyte precursor cell</i> )
PBS	fosfatni pufer (engl. <i>phosphate buffer saline</i> )
PFA	paraformaldehid (engl. <i>paraformaldehyde</i> )
PLA2	fosfolipaza A2 (engl. <i>phospholipase A2</i> )
PNS	perferni živčani sustav (engl. <i>peripheral nervous system</i> )
RIA	radioimunoesej (engl. <i>radioimmunoassay</i> )
ROS	reaktivne kisikove vrste (engl. <i>reactive oxygen species</i> )
SMI312	Stembergerovo monoklonsko protutijelo klon 312 (engl. <i>Stemberger monoclonals clone 312</i> )
TNF	tumorski faktor nekroze (engl. <i>Tumor necrosis factor</i> )
UPR	odgovor na nesmotane proteine (engl. <i>unfoalded protein response</i> )
WT	divlji tip (engl. <i>wild type</i> )

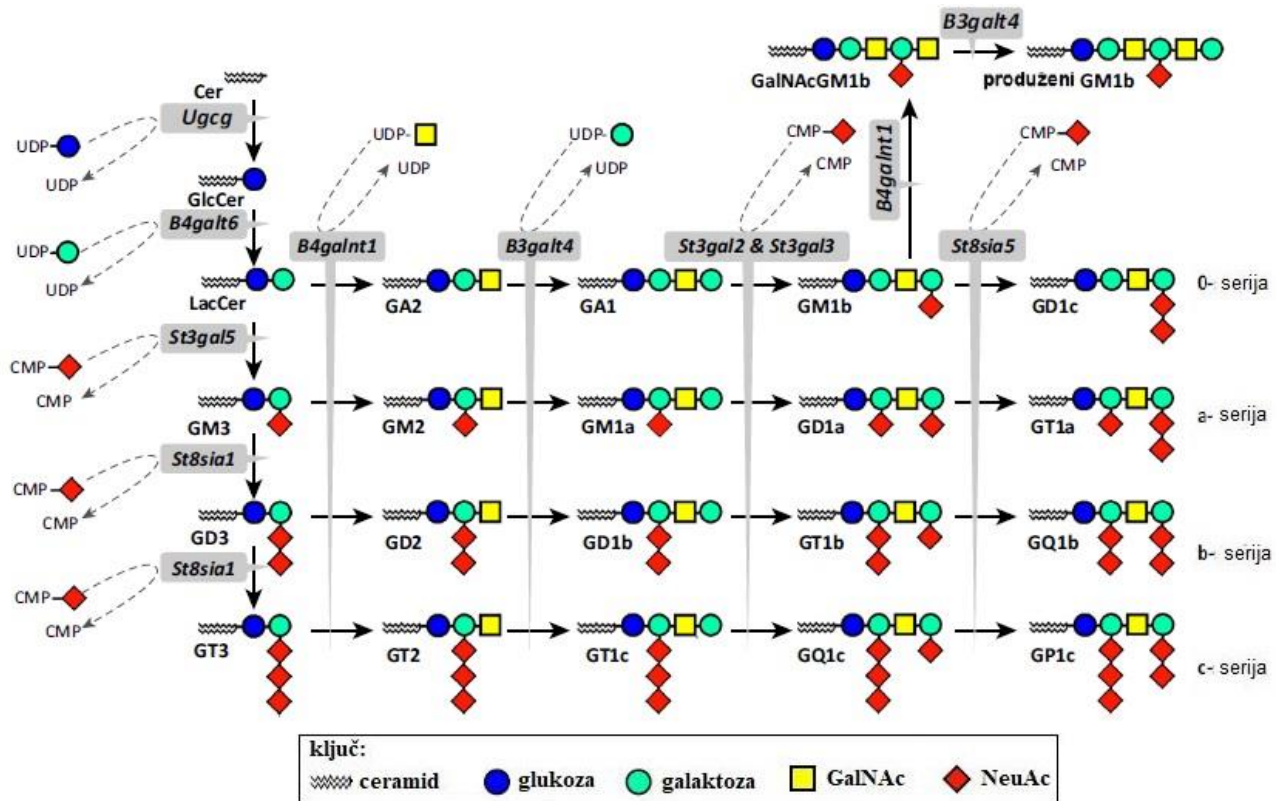
# 1. UVOD

## 1.1. Sinteza gangliozida i miševi s isključenim *B4Galnt1* genom

### 1.1.1. Uloga i podjela gangliozida

Površina eukariotskih stanica pokrivena je slojem ugljikohidrata koji se naziva glikokaliks. Iako u stanicama postoje u mnogobrojnim oblicima, svi ugljikohidrati su sastavljeni od malog broja monomera - monosaharida, koji se međusobno spajaju alfa i beta kovalentnim vezama te izgrađuju veliki broj različitih struktura (1). Na staničnoj membrani nalazimo glikoproteine, glikolipide i proteoglikane koji se zajedničkim imenom nazivaju glikani. Zbog velike strukturne raznolikosti i fizikalno-kemijskih karakteristika najčešće sudjeluju u međustaničnom prepoznavanju, omogućavaju regulaciju poluživota i aktivnosti proteina te sudjeluju u regulaciji staničnih i međustaničnih procesa (2). Gangliozidi, posebna skupina glikosfingolipida prepoznatljiva po sastavu osnovnog lanca na koji se veže jedna ili više sijalinskih kiselina (engl. *N-acetylneuraminic acid*, NANA), nalaze se u vanjskom listu fosfolipidnog dvosloja stanične membrane, ali i nekih drugih staničnih membrana, uključujući endoplazmatsku, Golgijevu i jezgrinu (3). Amfolitne su molekule, negativnog naboja, koje ulaze u interakciju s fosfolipidima, kolesterolom i transmembranskim proteinima te zajedno tvore lipidne splavi (4). Posebno veliki broj i strukturnu raznolikost (više od 60 različitih struktura) nalazimo na neuronima središnjeg (engl. *central nervous system*, CNS) i perifernog živčanog sustava (engl. *peripheral nervous system*, PNS) u čijim staničnim membranama su i desetak puta zastupljenija vrsta molekula nego u membranama ekstraneuralnih tkiva. Najzastupljeniji gangliozidi u živčanom sustavu su GM1, GD1a, GD1b i GT1b koji zajedno čine 97% svih gangliozida (5). Sastavljeni su od polarnog glikana i nepolarnog ceramida, umetnutog u vanjski list citoplazmatske membrane (6). Osnovni glikanski lanac čini sljedeći niz monosaharida: glukoza (engl. *glucose*, Glu), galaktoza (engl. *galactose*, Gal), N-acetilgalaktozamin (engl. *N-acetyl galactosamine*, GalNAc) i još jedan ostatak galaktoze. Nepolarno sidro čine dugolančani aminoalkohol sfingozin (od kojeg potiče naziv sfingolipidi) i masna kiselina vezani preko aminokiseline serina. Gangliozidi sadržavaju jednu ili više sijalinskih kiselina – kiselog monosaharida s 9 ugljikovih atoma, koji određuje njihovu funkciju, odnosno sposobnost interakcije s okolnim molekulama. Jedini oblik sijalinske kiseline koji čovjek sintetizira je N-acetilneuraminska kiselina (engl. *N-acetylneuraminic acid*, NeuNAc) (7). Gangliozide dijelimo obzirom na broj sijalinskih kiselina koje posjeduju – 0, M, D, T, Q, P, gdje 0 znači da sijalinska kiselina nije prisutna,

dok P znači da ih ima 5. S obzirom na položaj sijalinske kiseline u glikanskom lancu, razlikujemo 4 serije – 0, a, b i c, što označava 0, 1, 2 ili 3 sijalinska ostatka na unutarnjem ostatku Gal, osnovnog glikana. Uloge gangliozida u staničnim procesima uključuju: poticanje zauzimanja pravilne konformacije određenih proteina (8), služe kao receptori, ko-receptori i ligandi stanične membrane, sudjeluju u regulaciji stanične signalizacije, vezno mjesto su za neke mikroorganizme (9), mijenjaju aktivnost proteina promjenom konformacije membrane, potpomažu adheziju stanica i tako dalje (10).



Slika 1 Biosinteza gangliozida prema serijama (11).

Prikazani su sljedovi glikozilacije u biosintezi a, b, c i 0 serija. Sinteza gangliozida mozga, onih najzastupljenijih, započinje dodavanjem glukoze na ceramid. U idućim koracima sinteze gangliozida prenosi se jedan šećer sa aktiviranog nukleotidnog donora šećera, odgovarajućim enzimima, na rastući lanac ceramida. Serije gangliozida se razlikuju prema poziciji i broju NeuAc – N-acetil-N-neuraminske kiseline dok im se osnova sastoji, redom, od Cer- ceramida, Gal-galaktoze, GalNAc – N-acetil galaktozamina i još jednog ostatka galaktoze.

### 1.1.2. Biosinteza gangliozida

Ranije spomenuti gangliozidi mozga nastaju u nekoliko koraka. Sinteza se odvija u Golgijevu aparatu i započinje prijenosom sijalinske kiseline na laktozil-ceramid (LacCer), a nastavlja se enzimima koji su sijalotransferaze: GM3 sintetaza, GD3 sintetaza i GT3 sintetaza koje jedna za drugom koriste produkt iz prethodne enzimske reakcije. Tako iz LacCer nastaje GM3, iz GM3 nastaje GD3, a iz GD3 nastaje GT3. LacCer, GM3, GD3 i GT3 su prekursori 0, a, b, i c serije gangliozida, odnosno početne molekule na koje će djelovati jedan te isti enzim GM2/GD2 sintetaza, odnosno N-acetilgalaktozaminiltransferaza koja na 4 prekursora dodaje GalNAc pa nastaju GA2, GM2, GD2 i GT1. Na ove četiri molekule djeluje sljedeća transferaza koja dodaje završni Gal ostatak na osnovni glikanski lanac pa nastaju GA1, GM1a, GD1b i GT1c. Na ove molekule djeluju dva enzima koji su oba sijalotransferaze i potrebno je ugasiti oba njihova gena (*St3gal2* i *St3gal3*) da bi se zaustavila sinteza preostala 4 gangliozida – GM1b, GD1b, GT1b i GQ1c. Mozak koji se još razvija eksprimira i gen *St8sia5* koji kodira sijalotransferazu za rijetke polisijalogangliozide GD1c, GT1a, GQ1b i GP1c (12, 13).

### 1.1.3. Miševi s isključenim *B4Galnt1* genom

Korištenjem mišjeg modela s isključenim *B4Galnt1* genom (engl. *knock out*, KO) daje uvid u funkciju i metaboličku ulogu gangliozida. Nedostatkom *B4Galnt1* gena, koji kodira enzim GM2/GD2 sintetazu, odgovornu za dodavanje sijalinske kiseline i nastanak složenih gangliozida dolazi do povećane sinteze njihovih prekursora - uglavnom GM3 i GD3 (11, 12, 14). Kako su GD1a i GT1b potrebni za održavanje mijelina, jer služe kao receptori u interakciji s glikoproteinom povezanim s mijelinom (engl. *myelin associated glycoprotein*, MAG), kod ovih miševa postepeno dolazi do demijelinizacije (15, 16, 17, 18). Kod *B4Galnt1* KO miševa dolazi i do progresivne, središnje i periferne, degeneracije aksona, karakteristične za nedostatak mijelina i interakcije mijelin-akson. Pojavljuju se velika nemijelizirana vlakna (19, 20). U početku se promjene ne vide, ali kasnije dolazi do progresivne neurodegeneracije i pojave simptoma vezanih za taj proces. Aksoni kralježnične moždine su vidno demijelizirani. Mijelin oko vlakana je odvojen od aksona što se naziva Wallerianskom degeneracijom (15,21).

## 1.2. Kuprizonski model demijelinizacije

Kuprizon [N, N'-bis(cikloheksil-deamino) etandiamid] je toksin koji se koristi na eksperimentalnim, animalnim modelima u svrhu istraživanja demijelinizacije. Animalni modeli miša, zamorca ili štakora tretirani kuprizonom služe za istraživanje bolesti poput multiple skleroze i Guillain-Barre sindroma koji imaju autoimunu podlogu nastanka. Ovisno o vremenu, tijekom kojeg eksperimentalne životinje konzumiraju hranu u koju je umiješan kuprizon (engl. cuprizone, CUP), možemo pratiti akutni ili kronični oblik demijelinizacije (22).

### 1.2.1. Učinak kuprizona na stanice - biokemijska i molekularna podloga

Učinak kuprizona na CNS se bazira na citotoksičnosti. Točan mehanizma kojim kuprizon uzrokuje demijelinizaciju još nije u potpunosti poznat, ali se toksičan učinak na oligodendrocite i posljedičnu demijelinizaciju, degeneraciju te smrt ovih stanica može pratiti kroz nekoliko staničnih odjeljaka u čije procese kuprizon interferira. Smatra se da je kuprizon kelator bakra te da vezanje  $\text{Cu}^{2+}$  uzrokuje poremećaj homeostaze. Kako je  $\text{Cu}^{2+}$  u sastavu mnogih enzima, također dovodi do njihove inhibicije i nemogućnosti odvijanja ciljnih reakcija (22).

Stanice CNS-a najpodložnije toksičnom utjecaju kuprizona su oligodendrociti, stanice živčanog sustava koje proizvode mijelin. Rizični čimbenici zbog kojih su oligodendrociti podložni toksičnom učinku kuprizona su velika metabolička aktivnost, zbog koje imaju veću potrebu za adenozin trifosfatom (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) (23), niska koncentracija mangan superoksid-dismutaze (24), glutation peroksidaze, visoka koncentracije željeza (25), snižena koncentracija enzima katalaze (engl. *catalase*, CAT) koja je bitna u razgradnji  $\text{H}_2\text{O}_2$  te niska koncentracija antioksidansa metalotioneina (engl. *metallothioneins*, MT). Tokom intoksikacije kuprizonom, na unutarstaničnoj razini, dolazi do stvaranja velikih mitohondrija (engl. *megamitochondria*), koji nastaju kao obrambeni odgovor stanice, zbog nakupljanja reaktivnih kisikovih i dušikovih radikala.

Sve navedeno dovodi do manjka ATP-a, uz već povećan oksidacijski stres, što utječe na funkciju endoplazmatskog retikuluma, kod kojega dolazi do povećane proliferacije, te gubitka funkcije smatanja i doradbe proteina i još se naziva 'endoplazmatskim stresom' (26).

Na molekularnoj razini se smanjuje transkripcija i translacija mRNA kako bi se spriječila akumulacija proteina koji nisu u mogućnosti poprimanja konačne konformacije zbog gubitka funkcije endoplazmatskog retikuluma (engl. *endoplasmic reticulum*, ER) (27). Iako je

smanjena sinteza proteina, dolazi do nakupljanja proteina koji nisu pravilno smotani (28). Dolazi do aktivacije odgovora na nesmotane proteine (engl. *unfolded protein response*, UPR), propuštanja velike količine  $\text{Ca}^{2+}$  iona i smrti oligodendrocita (29).

Kuprizon osim proteina, remeti i proizvodnju lipida. 70% mijelinske ovojnice se sastoji od lipida kojih trećinu čine fosfolipidi čija je funkcija pružanje strukturalne potpore i antioksidativna funkcija. Pod utjecajem kuprizona povećava se koncentracija fosfolipaze A2 (engl. *phospholipase A2*, PLA2) što dovodi do povećanja koncentracije arahidonske kiseline, koja je proupalni intermedijer. Dvije trećine fosfolipida čine cerebrozidi, glikosfingolipidi te kolesterol, čija koncentracija također pada tokom intoksikacije kuprizonom. Normalno se u stanicama događa preokret (eng. *turnover*) mijelinske ovojnice, ali kako u stanicama ne dolazi do sinteze proteina niti lipida, nema zamjene, fagocitozom uklonjenih, oštećenih ovojnica. Zbog disfunkcije ER-a dolazi do inhibicije ceramid galaktozil-transferaze (engl. *ceramide galactosyltransferase*, CGT) i 3-hidroksi-3-metil-glutaril-CoA reduktaze (engl.  $\beta$ -hydroxy  $\beta$ -methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) koje su potrebna u sintezi galaktocerebrozida i kolesterola (dva najvažnija lipida stanične membrane oligodendrocita). Uslijed degradacije ovojnice dolazi do akumulacije tekućine i stvaranja vakuola te na posljetku i do propadanje demijeliniziranog aksona. Treba napomenuti da demijelinizacija izazvana kuprizonom nije ravnomjerna te da neke skupine vlakana trpe veće oštećenje od drugih (30).

#### 1.2.2. Imunološki sustav – uloga u apoptozi i remijelinizaciji

Uključenost imunološkog sustava ima veliku ulogu u apoptozi velikog broja oligodendrocita. U *in vitro* uvjetima, bez uključenosti imunološkog sustava dolazi do vakuolizacije mijelinske membrane, ali ne i do apoptoze oligodendrocita (31). Uključenjem imunološkog sustava dolazi do povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih radikala (engl. *reactive oxygen species*, ROS) i smanjene aktivnosti transportnog lanca elektrona (engl. *electron transport chain*, ETC-a) što inducira apoptozu. Neutrofili imaju veliku ulogu u poticanju apoptoze. Astroцити se aktiviraju na mjestima na kojima se dogodila vakuolizacija stanica i pokušavaju uspostaviti homeostazu apsorpcijom viška nakupljene tekućine (32). Oni imaju ograničenu mogućnost zaštititi okolne stanice od nedostatka ATP-a, oksidativnog stresa i viška  $\text{Ca}^{2+}$  (33). Aktivaciji astrocitа je predhodila aktivacija mikroglija stanica i upalni proces (25). Dodatnu ulogu u zaštiti okolnog tkiva ima mikroglija/makrofagi koji mogu imati proupalni - M1 i antiupalni - M2 fenotip (34). Funkcija im je fagocitoza debrisа i mrtvih stanica, poticanje remodeliranja tkiva, regrutacija prekursorskih stanica oligodendrocita (engl. *oligodendrocyte precursor cell*, OPC) te ponovno korištenje sastavnica mijelina (35).

Fagocitiranjem mijelina dolazi do inicijacije transkripcije gena koji su vezani uz sintezu mijelina, što potiče remijelinizaciju (36).

### 1.3. Bol

Percepcija bolnih podražaja naziva se nocicepcija. Može biti potaknuta upalom, ozljedom, toplinom, kemijskim agensima ili nekim drugim podražajem živčanog sustava, a ima ulogu obrambenog mehanizma i zaštite tijela (37, 38). Opisane su 2 kategorije bolne percepcije. Oštra, prva bol i kasnija, difuzna, dugotrajna senzacija zvana druga bol. A $\delta$  vlakna su odgovorna za prvu bol, dok drugu bol prenose C-vlakna. Putovi odgovorni za bol počinju zajedno s drugim osjetnim neuronima u spinalnom gangliju stražnjeg korijena moždinskih živaca. Ovo su pseudounipolarni neuroni čiji distalni kraj ide na periferiju, a proksimalni ulazi u kralježničnu moždinu kroz stražnji korijen (38). U kralježničnoj moždini dolazi do prekapčanja na neurone drugog reda koji se projiciraju prema različitim strukturama moždanog debla i velikog mozga. Konačno, centralna obrada bolnog osjeta omogućuje doživljaj boli iz više dimenzija, te daje osjetno-diskriminativni i afektivno-motivacijski aspekt boli. Kompleksna modulacija boli se događa u već u dorzalnom rogu kralježnične moždine gdje dolazi do interakcija između aferentnih neurona, ineurona i silaznih modularnih puteva (37, 39).

#### 1.3.1. Nociceptori

Nociceptori su slobodni neuronski završetci primarnih aferentnih vlakana A $\delta$  i C-neurona koji su specijalizirani osjetni receptori za prepoznavanje različitih bolnih podražaja. Potiču ih podražaji iz kože, unutarnjih organa, mišića, zglobova i moždanih ovojnica, a mogu biti mehanički, toplinski ili kemijski (39). Kao i ostali receptori za podražaje, nociceptori provode različite podražaje u receptorski potencijal koji započinje aferentne akcijske potencijale (38). Somatosenzorički receptori koji su odgovorni za percepciju neškodljivih mehaničkih podražaja povezani su s mijeliziranim vlaknima koja imaju razmjerno veliku brzinu vodljivosti, dok su aksoni povezani s nociceptorima razmjerno spori zbog slabije mijeliziranosti, ili nemijeliziranosti. Nociceptivni akson počinje odašiljati podražaj tek kada mu je jačina dovoljno visoka. Postoje dva glavna puta kojima se prenose nociceptivni signali u više centre mozga; jedan završava u jezgrama talamusa, a drugi u retikularnoj formaciji (39).

#### 1.3.2. Primarna aferentna vlakna za bol

Primarna aferentna vlakna za bol su skupina slabo mijeliniziranih A $\delta$  vlakana promjera 1-5  $\mu$ m, brzine provođenja potencijala 5-30m/s i skupina nemijeliniziranih C-vlakana, promjera



manjeg od 1  $\mu\text{m}$ , koji prenose signal brzinom manjom od 2 m/s. Osim  $A\delta$  i C vlakana postoje i  $A\beta$  vlakna koja prenose podražaje koji nisu bolni.  $A\beta$  vlakna su dobro mijelizirana i velikog promjera 5-12  $\mu\text{m}$ , stoga najbrže prenose akcijski potencijal, brzinom 30-70 m/s. Manje intenzivan podražaj je potreban za njihovu aktivaciju (39). Stimulacija velikih brzo provodećih  $A\delta$  i  $A\beta$  aksona perifernih živaca ne uzrokuje osjet boli. Povišenjem intenziteta podražaja prvo se aktiviraju  $A\delta$ , zatim C-vlakna.  $A\delta$  se dijele u 2 skupine:

1. odgovaraju na intenzivne mehaničke i kemijske podražaje, ali prag podražljivosti im je razmjerno visok za toplinu;

2. imaju komplementarnu osjetljivost, manji prag podražljivosti na toplinu, ali visok prag podražljivosti na mehaničke i kemijske podražaje.

C-vlakna odgovaraju na sve oblike bolnih podražaja (37, 38, 39).

### 1.3.3. Visceralna bol

Visceralna bol je bol koja proizlazi iz oštećenih visceralnih organa, ali se opaža kao prenesena bol iz somatskih struktura. Dio sustava dorzalnih kolumni koji prenosi visceralnu nocicepciju naziva se medijalni lemniskus. Visceralna bol ima 5 bitnih kliničkih karakteristika: ne izazivaju je poremećaji u svim unutarnjim organima, nije uvijek povezana s visceralnom ozljedom, difuzna je i slabo lokalizirana, pojavljuje se na mjestima različitim od onih gdje je izvor oštećenja, prate ju mučnina i povraćanje (40). Primarna visceralna aferentna vlakna su većinom C-vlakna (39), koja ulaze u kralješničnu moždinu i prave sinapsu s neuronima drugog reda u dorzalnom rogu lumbosakralnog dijela kralješnične moždine.

### 1.3.4. Imunološki sustav i bol

Ozljeda u perifernom živčanom sustavu izaziva reakciju u imunološkim stanicama periferije i glija stanicama. Odgovor imunološkog sustava u dorzalnim ganglijima vođen je makrofazima, limfocitima i satelitnim stanicama. Aktiviraju se spinalne mikroglia stanice, a nakon njih dolazi do proliferacije astrocita. U perifernoj ozljedi neurona najzastupljeniji su makrofazi. Makrofazi, mikroglia i Schwannove stanice luče metaloproteaze koje se vežu na endotel krvnih žila, gdje dolazi do prekida između barijere krv-živac (41). Vazoaktivni medijatori, među kojima je i NO, otpuštaju se iz stanica te uzrokuju oteknuće i hiperemiju. (42). Signalni putovi između neurona, Schwannovih stanica i infiltriranih makrofaga vrlo su isprepleteni, a kemokini i citokini su centralne komponente u toj složenoj mreži. Aktivacijom imunoloških stanica dolazi i do otpuštanja proinflammatoryh citokina, koji dodatno pridonose oštećenju aksona (43). Komunikacija među stanicama potiče rast aksona i preživljavanje, ali

također potiče razvoj perzistentne boli. Stanice mikrogije igraju ključnu ulogu u odgovoru na direktne ozljede CNS-a prouzrokovanih traumom ili ishemijom te kod autoimunih bolesti kao što su multipla-skleroza i neurodegenerativni poremećaji. Stanice koje sudjeluju u upalnom odgovoru odgovorne su za otpuštanje protona, arahidonske kiseline, ostalih metabolita i lipida, bradikinina, histamina, serotonina, prostanglandina, nukleotida, čimbenika rasta neurona (engl. *nerve growth factor*, NGF) i brojnih citokina – od kojih su najvažniji interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) i faktor nekroze tumora (engl. *tumor necrosis factor*, TNF). Većina tih tvari reagira s receptorima ili ionskim kanalima nociceptivnih vlakana izazivajući odgovor (44).

#### **1.4. Imunokemijski markeri**

##### **1.4.1. Imunohistokemijske metode**

Imunohistokemijske metode se temelje na specifičnosti vezanja između paratopa na protutijelu i epitopa na antigenu. Antigeni dolaze u različitim oblicima i veličinama. Mogu biti monosaharidi i proteini (45,46). Protutijela, imunoglobulini su proteinski produkti plazma stanica. Građena su u Y obliku, sastavljena iz 2 identična laka i teška lanca. Teški lanci sačinjavaju kristalizirajući fragment (engl. *fragment crystallizable region*, Fc) protutijela, C terminalni kraj, specifičan za vrstu i klasu protutijela. Fc fragment omogućuje vezanje protutijela na drugo protutijelo, komplement ili stanicu (47). Dvije domene koje vežu antigene (engl. *fragment antigen binding*, Fab), na N terminalnom kraju, čine laki i teški lanci, koji određuju specifičnost protutijela na epitop. Protutijela mogu biti poliklonska ili monoklonska ovisno o broju epitopa na koja se mogu vezati. Poliklonska su nastala iz više različitih klonova plazma stanica, mogu se vezati na više epitopa jednog te istog antigena i imaju različit afinitet. Monoklonska su potekla iz jedne plazma stanice i vežu se na samo jedan epitop antigena. Specifičnost vezanja protutijela na antigen određuje hipervarijabilna regija sastavljena od lakog i teškog lanca na N terminalnom kraju protutijela (48). Jedan od najvažnijih kriterija prema kojem će Fab fragment prepoznati antigen je terciarna struktura epitopa. Što se više nekovalentnih veza stvori između tercijarne strukture antigena i protutijela, to je veći afinitet i avidnost (49).

## 1.4.2. Imunokemijski markeri u neuroznanosti

### 1.4.2.1 Mijelinski bazični protein

Mijelinski bazični protein (eng. *myelin basic protein*, MBP) čini 30% proteina mijelina u središnjem živčanom sustavu i jedinstven je za mijelinsku membranu. To ga čini drugim najzastupljenijim proteinom nakon MAG-a. MBP se u CNS-u nalazi u oligodendrocitima, a u PNS u Schwannovim stanicama (50). Brzina akumulacije MBP-a, mjerena uz pomoć radioimunoeseja (engl. *radioimmunoassay*, RIA), tokom razvoja živčanog sustava, proporcionalna je brzini sinteze mijelina (51). Jedna od uloga MBP-a je kompakcija mijelinske membrane oko aksona (52). Kompakcija se događa iz vanjskog lista prema unutarnjem, gdje MBP međusobno povezuje nasuprotna citoplazmatska lica stanične membrane. Kada se povežu obje strane membrane dolazi do polimerizacije MBP-a u mrežu vlakana koja omogućuje kompakciju u jednom smjeru (53). Ako dođe do bilo kakvog poremećaja u ekspresiji MBP-a ili njegova nedostatka, mijelinska ovojnica nije u mogućnosti rasti iznad nekoliko slojeva i postaje nestabilna (54). Zato je MBP klasični marker zrele mijelinizacije. (55)

### 1.4.2.2. Neurofilamenti (NF)

Dva temeljna koraka u razvoju živčanog sustava su proliferacija i migracija. Nakon što su neuroblasti migrirali na svoje konačno odredište, dolazi do diferencijacije. Jedan od prvih koraka pri diferencijaciji je pojava neurofilamenata (56). Neurofilamenti su polipeptidi koji pripadaju skupini intermedijarnih vlakana citoskeleta, a najvećim dijelom su sastavljeni od 3 proteina koji su nazvani prema svojoj molekularnoj težini na neurofilamente velike molekularne mase (engl. *Neurofilament high*, NF-H), neurofilamente srednje molekularne mase (engl. *neurofilamen medium*, NF-M) i neurofilamente male molekularne mase (engl. *neurofilament low*, NF-L) (57). C terminalna domena svakog od ovih proteina može biti fosforilirana. Visoko fosforilirani oblici NF-M i NF-H, nalaze se u aksonu dok se nefosforilirani ili slabo fosforilirani oblici nalaze u perikarionu i dendritima (58). Zbog različite fosforilacije u pojedinim regijama neurona, proizvedena su protutijela koja mogu označiti različite dijelove neurona ovisno o obujmu fosforilacije. Stembergerovo monoklonsko protutijelo klon 312 (engl. *Stemberger monoclonals clone 312*, SMI 312) mješavina je monoklonskih protutijela koja se vežu na visoko fosforilirane izoformne oblike NF-M i NF-H. SMI312 se koristi kao selektivni marker za zrele aksone te se može upotrijebiti i kao alat za usporedbu razvoja aksona te praćenje procesa mijelinizacije. Akson koji oko sebe ima više namotaja mijelina također ima i veću količinu fosforiliranih proteina (59).

Fosforilacijom se štite neurofilamenti od proteolize, konformacijskih promjena i povećava se stabilnost aksona (60). SMI312 se pretežno koristi kao marker napretka i uspješnosti mijelinizacije ciljanih skupina vlakana (58).

#### 1.4.2.3. pTau protein

pTau protein pripada obitelji proteina pridruženih mikrotubulima (eng. *Microtubule-associated proteins*, MAP). Obično ih nalazimo u neuronima (61), iako ih se u patološkim uvjetima može naći u glija stanicama (62). Imaju važnu ulogu udruživanja tubulinskih monomera u mikrotubule (63). pTau proteini se vežu na spektirinske i aktinske filamente (64-66) i kroz te interakcije, pTau proteini omogućavaju mikrotubulima interakciju s neurofilamentima (67) i mitohondrijima (68). Mikrotubuli imaju ulogu u održavanju oblika stanice. Hiperfosforilirane aggregate pTau proteina nalazimo u velikom opsegu u Alzheimerovoj bolesti, što dovodi do neurodegeneracije i smrti stanica, a pTau protein je uvriježeni marker neurodegeneracije (69, 70).

#### 1.4.2.4. Neuronski jezgrin protein

NeuN (engl. *Neuronal nuclear protein*, NeuN) koristi se u neuroznanosti kao neuron specifični marker (71, 72) te u procjeni funkcionalnosti neurona u zdravim i patološkim stanjima (73, 74). Prisutan je samo u postmitotičkim neuronima (75). Nalazi se u jezgri stanice u područjima eukromatima (76, 77). Jedini je od neuron specifičnih markera prisutan primarno u jezgri, a služi za razlikovanje neurona od drugih vrsta stanica u živčanim tkivima (73, 78).

#### 1.4.2.5. Neuronska nitrid oksid sintetaza

Neuronska nitrid oksid sintetaza (engl. *Neuronal nitric oxide synthase*, nNOS) je enzim specifičan za tkivo mozga, odgovoran za sintezu NO (79). NO je slobodni radikal odgovoran za fiziološku vazodilataciju, (80) ali i toksični medijator u upalnim bolestima te ima ulogu neurotransmitera (81). Ima ulogu u indukciji i regulaciji neuroplastičnosti, (82) uključen je u procese kao što su učenje i pamćenje (83), ali i smrt neurona (81, 84) kod ishemije i infekcija (85). nNOS je marker za neuroplastični potencijal tkiva kako u razvoju tako i u patološkim procesima.

#### 1.4.2.6. Adaptorska molekula 1 za vezanje ioniziranog kalcija

Adaptorska molekula 1 za vezanje ioniziranog kalcija (engl. *Ionizide calcium binding adapter molecule 1*, Iba1), kao što mu ime kaže veže  $\text{Ca}^{2+}$ , a uključen je u preraspodjelu aktinskog dijela citoskeleta tijekom pokretanja stanice i fagocitoze (86). Često se koristi kao marker za mikroglia stanice, kao najpokretljivije stanice zrelog mozga (87). Iba1 posreduje u signalizaciji pomoću  $\text{Ca}^{2+}$  u monocitima, uključujući mikroglia stanice (88). Mikroglia stanice su makrofazi živčanog sustava. U stanju zdravlja miruju i ponašaju se kao senzori koji skeniraju svaki mogući štetni podražaj koji prijeti homeostazi. Aktivirane štetnim podražajem mijenjaju svoju morfologiju, povećavaju ekspresiju površinskih molekula, molekula povezanih sa imunološkim sustavom – glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *major histocompatibility complex*, MHC), te otpuštaju kemijske posrednike kao što su proinflamatorni citokini. Kada dolazi do hipertrofije mikroglia stanica i povlačenja ogranaka te do povećane proliferacije stanica kao rezultat imamo povećanu ekspresiju Iba1 koji možemo pratiti pomoću imunohistokemijskog bojenja (89, 90).

#### 1.4.2.7. Kiseli protein glije

Kiseli protein glije (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) spada u skupinu intermedijarnih filamenta., Prisutan je u astrocitima u CNS-a i Schwannovim stanicama PNS-a. Odgovoran je za održavanje homeostaze iona, neurotransmitera, vode i energije (91). Poznato je da se GFAP nalazi i u nemijelinizirajućim Schwannovim PNS-a (92). U stanicama je odgovoran za strukturu citoskeleta, održavanje mehaničke čvrstoće, (93) pružanje potpore susjednim neuronima i održavanje krvno-moždane barijere (94). Same Schwannove stanice odgovorne su za stvaranje mijelina, brzo provođenje impulsa neuronima, a sekundarna uloga im je pružanje potpore spinalnim motoričkim neuronima i neuronima dorzalnog korijena kralješnične moždine te promocija regeneracije u PNS-u (95). Do povećane ekspresije GFAP-a dolazi kod traumatske ozljede mozga (96), Alzheimerove bolesti, Parkinsonove bolesti (97). Povećanje proliferacije i hipertrofija astrocita naziva se *reaktivna astroglia* (94). U tom stanju dolazi do povećane ekspresije GFAP-a, koji se upravo zbog toga koristi kao marker reaktivne astroglie (98). Nedostatak GFAP-a i vimentina, koji je također intermedijarni filament, dovodi do povećanog gubitka sinapsi poslije neurotraume (99) i manje otpornosti na mehanički stres (100, 101, 102).

#### 1.4.2.8. 2', 3' fosfodiesteraza cikličkih nukleotida

2', 3' fosfodiesteraza cikličkih nukleotida (*engl. 2', 3'- cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase*, CNPase) enzim je koji radi hidrolizu cikličkih nukleotida do monofosfata. Prisutan je u oligodendrocitima u područjima bogatima mijelinom (103). Količina ovog proteina se povećava usporedno sa sintezom mijelina (104). Ekspresija je smanjena kod miševa koji imaju smanjenu sintezu mijelina, onih tretiranim kuprizonom i KO miševa s isključenim jednim ili oba gena za ovaj enzim (105). Kako bi se odredio jedan smjer kompaktacije i isključilo formiranje dijelova mijelinske ovojnice koji nisu kompaktirani, ključno je ograničiti kompaktaciju na samo jedno mjesto unutar ovojnice. CNP-aza djeluje kao razmaknica unutar rastuće mijelinske ovojnice, tako da razdvaja dva lista mijelinske ovojnice i sprječava neželjene interakcije (103). Na mjestima gdje imamo njenu pretjeranu ekspresiju kompaktacija izostaje, dok je na mjestima njena manjka kompaktacija brža. Zato se ovaj marker koristi za utvrđivanje nekompaktiranog mijelina (106, 107).

### 1.5. Povezanost procesa demijelinizacije i osjećaja boli

Markeri uključeni u ovo istraživanje nisu prije rađeni na kralješnici miša s isključenim genom *B4Galnt1*, ali mogu se koristiti za razumijevanje razlike u osjetu visceralne boli kod *B4Galnt1* KO miša i miša tretiranim kuprizonom.

Postoji razlika u zahvaćenosti CNS-a demijelinizacijom. Kod kuprizonskog modela zahvaćeni su većinom oligodendrociti, stanice koje su odgovorne za proizvodnju mijelina u CNS-u. Dok je periferija manje zahvaćena zbog prisutnosti Schwannovih stanica. One su odgovorne za stvaranje mijenila u PNS-u, ali nisu zahvaćene kao oligodendrociti zbog drugačijeg podrijetla (108). Miševi s isključenim *B4Galnt1* genom ne mogu sintetizirati složene gangliozide (14,15) i time nisu u mogućnosti stvoriti stabilnu mijelinsku ovojnicu (19). Kod *B4Galnt1* miševa stoga dolazi do progresivne središnje i periferne degeneracije aksona, karakteristične za nedostatak mijelina (19, 20). Upravo proizvodnja mijelina je bitna za osjet boli jer o mijeliziranosti vlakana ovisi brzina provođenja nociceptivnog podražaja. Somatske podražaje prenose jako mijelizirana vlakna velikom brzinom (39). Kod kuprizonskog modela to znači da imaju bolju percepciju somatske od visceralne boli zbog manje zahvaćene periferije (108). Kod KO miševa zbog nedostatka složenih gangliozida i opće demijelinizacije, dolazi do smanjenja osjeta posredovanih brzim A $\beta$  vlaknima jer su demijelizirana, ona više ne utišavaju prenošenje osjeta boli što uzrokuje jači osjećaj, percepciju boli. Dokaz ove pretpostavke pokušali smo dobiti ovim istraživanjem.

## **2. HIPOTEZA**

Hipoteza ove studije je da se genetski (*B4Galnt1* - *null* miš) i kemijski inducirani (tretiran kuprizonom) model miša razlikuje po tipu pogođenih neurona. Kod genetičkog modela prvo propadaju veliki somatosenzorički i motorički neuroni kralješnične moždine, a u kuprizonskom modelu ostaju pošteđeni te se na tome temelji razlika u osjetljivosti na bol.

### **3. CILJEVI**

1. Uz pomoć epitopa NeuN i nNOS kvantificirati neurone u ventralnom, lateralnom i dorzalnom rogu kralježnične moždine lumbalnog segmenta na miševima divljeg tipa, miševima tretiranim kuprizonom i miševima sa isključenim genom *B4Galnt1*.
2. Markerima upale, Iba i GFAP, procijeniti stupanj upale u putovima za bol kod sve tri skupine miševa.
3. Markerima mijelinizacije, maturacije i neurodegeneracije aksona (MBP, SMI312 i pTau) procijeniti oštećenje aksona somatosenzoričkih putova.



## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.1. Ustroj studije

Istraživanje je zamišljeno kao studija parova. Dva modela demijelinizacije, genetički (miševi s isključenim *B4Galnt1* genom, KO miš) i inducirani (demijelinizacija izazvana toksinom kuprizonom, CUP), usporedit će se međusobno te s miševima divljeg tipa (engl. *wild type*, WT) po svakom od analiziranih markera.

### 4.2. Pokusne životinje

Istraživanja opisana ovim završnim radom sastavni su dio HRZZ projekta pod nazivom „Patofiziološke posljedice promjene sastava lipidnih splavi“, odobrenog od strane Etičkog povjerenstva za istraživanje Medicinskog fakulteta Osijek te Ministarstva poljoprivrede. Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (Klasa:602-04/16-08/15; Broj: 2158-61-07-16-143; dana 16.prosinca 2016.) voditelja prof.dr.sc. Marije Heffer.

Promatrane su 3 skupine miševa: divlji tipovi (C57BL/6), kuprizonom hranjeni divlji tipovi i C57Bl/6N miševi s isključenim *B4Galnt1* genom. Svaka skupina po 3 životinje, ukupno 9 životinja. Bilo je 6 životinja muškog i 3 ženskog spola sve stare 6 mjeseci, u trenutku eutanazije.

Miševi kod kojih je demijelinizacija inducirana, 20 dana prije žrtvovanja tretirani su kuprizonom koji je dodan hrani. Hranjeni su hranom u prahu sastavljenom od usitnjenih briketa u koju je umješan kuprizon (Sigma-Aldrich St.Louis, MO, USA) masenog udjela 0.2%, što izaziva minimalnu kuprizonom uzrokovanu patologiju (23, 35, 109).

### 4.3. Priprema tkiva za imunohistokemijsku analizu

Nakon što su miševi dosegli 6 mjeseci starosti žrtvovani su od strane za to obučениh djelatnika s Katedre za medicinsku biologiju i genetiku Medicinskog fakulteta Osijek, uz poštovanje svih etičkih načela određenima u Zakonu o zaštiti životinja Republike Hrvatske .

Tkiva prikupljena u svrhu studije „Multidisciplinarna evaluacija razlike između kemijski inducirane te urođene (*B4Galnt1*-null) demijelinizacije“ odobrene od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Osijek ( Klasa: 602-04/18-08/07, Broj: 2158-61-07-18-19, Datum: 12.03.2018.), korištena su uz dopuštenje voditelja studije.

Miševi su eutanazirani 21. dan prema protokolu: omamljivanje sevofuran anestetikom do stadija kome. Nakon omamljivanja miševi su perfundirani kroz srce s 50 ml pothlađenog PBS-a (engl. *Phosphate buffered saline*) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD), a potom s 50 ml pothlađenog 4% paraformaldehida (engl. paraformaldehyd, PFA) (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD) u PBS-u.

Izolirana tkiva su fiksirana u 4%-tnom PFA tokom 24 sata, slijedila je krioprotekcija u gradijentima saharoze (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD) volumnog udjela 10%, 20% i 30% u PBS-u na +4°C, te pothlađena u izopentanu (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, SAD) i smrznuta na -80°C do analize da bi se napravila arhiva tkiva. Nakon što se prikupio dovoljan broj uzoraka, kralješnične moždine, uklapani su u medij za kriostatsko rezanje (Tissue freezing medium; Leica, Nussloch, Germany) te su izrezani kriostatom (Leica, CM3050S, Wetzlar, Njemačka), na debljinu od 35 µm pri temperaturi -18°C. Rezovi su tokom rezanja prikupljeni u deOlmosh otopini (59, 110).

#### 4.4 Imunohistokemijska analiza

Rezovi su prebačeni u PBS iz deOlmosh otopine, isprani za daljnji korak u kojemu uklanjamo aktivnost endogenih peroksidaza pomoću 1% otopine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemika, Zagreb) u PBS-u, dva puta 20 minuta na +4°C na tresilici. Kako bismo spriječili nespecifično vezanje protutijela rezove smo inkubirali 4 sata u otopini za blokiranje koju čine kozji serum u volumnom udjelu od 5% i goveđi serum (engl. *bovine serum albumin*, BSA) u volumnom udjelu od 1% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD). Za imunohistokemijsko bojenje s MBP i SMI 312 protutijelima u postupak blokiranja dodan je 1% triton. Nakon inkubacije rezovi su isprani u PBS-u. Kako bismo mogli pratiti različite pojave kod demijelinizacije koristimo se različitim setovima protutijela. Primarna protutijela korištena u izradi završnog rada pravljena su u otopini za blokiranje bez i s tritonom u razrijeđenjima IbaI 1:1000 (Waco, 016-26461 Chuo-ku, Osaka, Japan ), GFAP 1:4000 (Dako, Agilent Technologies, Z0334, SantaClara, CA, SAD), MBP 1:500 (QED, 24201 San Diego, CA, SAD), SMI312 1:10000 (Stenberg Monoclonals, Baltimore, MD, SAD), nNOS 1:1000 (Chemicon, N74P26 Temecala, CA, SAD), NeuN 1:2000 (Milipore, MAB377, Temecala,CA, SAD, ), pTau 1:500 (Milipore, MAB361 Temecala, CA, SAD ) i CNP-aza 1:2000 (Abcam, 11-5B Cambridge, UK). Inkubacija protutijela i rezova se odvija preko noći u hladnjaku pri +4°C na tresalici. Slijedi ispiranje u PBS-u dva puta tokom 20 minuta, kako bismo uklonili višak primarnih protutijela koja se nisu vezala na epitope, zatim se rezove prebacuje u otopinu sekundarnih protutijela. Upotrijebljena su sekundarna protutijela konjugirana biotinom i to kozji anti-mišji IgG

(Jackson-Imunolaboratories, 115-065-071, Inc. 872 West, Baltimor, PA, SAD 1:500) i kozji anti-zečji IgG (Jackson Immunolaboratories, 111-065-144 Inc. 872 Grove, Baltimor, PA, SAD, 1:500). Inkubacija sekundarnih protutijela se provodila u trajanju 4 sata na +4°C uz neprestano miješanje, a zatim je uslijedilo ispiranje u PBS-u te prebacivanje rezova u tercijski kompleks avidin-biotin konjugiran s peroksidazom iz hrena (ABC-HRP), "VectaStain® abc Kit Elite" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD), pripremljen prema uputama proizvođača. Uslijedila je inkubacija tokom 2 sata u hladnjaku pri +4°C na tresalici nakon koje su rezovi ponovno isprani u PBS-u dva puta i kao zadnji korak u reakciji je uslijedila vizualizacija imunokemijske reakcije supstratom "Vector DAB Substrate Kit®" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, SAD), pripremljenim prema uputama proizvođača. Vizualizacija kompleksa antigen - primarno protutijelo - sekundarno protutijelo - ABC-HRP je moguća dodavanjem 3,3'-diaminobenzidina (DAB-a), koji je supstrat za HRP enzim, čijom razgradnjom će nastati tamno obojenje. Rezovi su zatim navučeni na silanizirana predmetna stakalca i pokriveni medijem – Vectamount (Vector laboratories, Burlingame, CA, SAD) te pokrovnim stakalcem. Imunohistokemijska reakcija je slikana kamerom Olympus D70 na mikroskopu Carl Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju 400x te je kvantificirana u računalnom programu Fiji.

#### 4.5. Statističke metode

Numerički podatci opisani su aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koje slijede normalnu distribuciju, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli koje odstupaju od normalne raspodjele analizirane su Mann-Whitney U testom, a one koje ne odstupaju t-testom za nezavisne uzorke. Povezanost normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli ocijenjena je Pearsonovim koeficijentom korelacije  $r$ , a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Spearmanovim koeficijentom korelacije  $\rho$  (rho). Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na  $\alpha = 0,05$ . Za statističku analizu korišten je statistički program Statistica12 (Quest Software Inc., Aliso Viejo, CA, SAD)

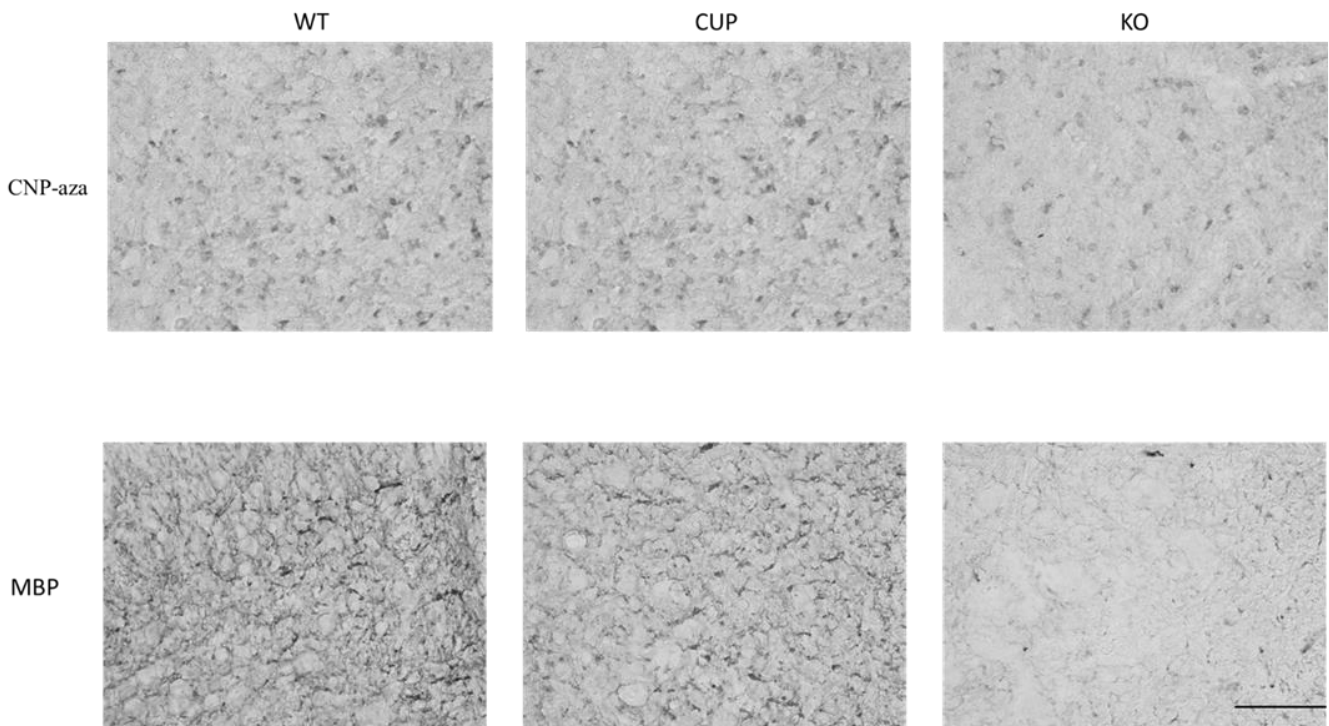
## 5.REZULTATI

### 5.1. Markeri mijelinizacije (MBP, CNP-aza)

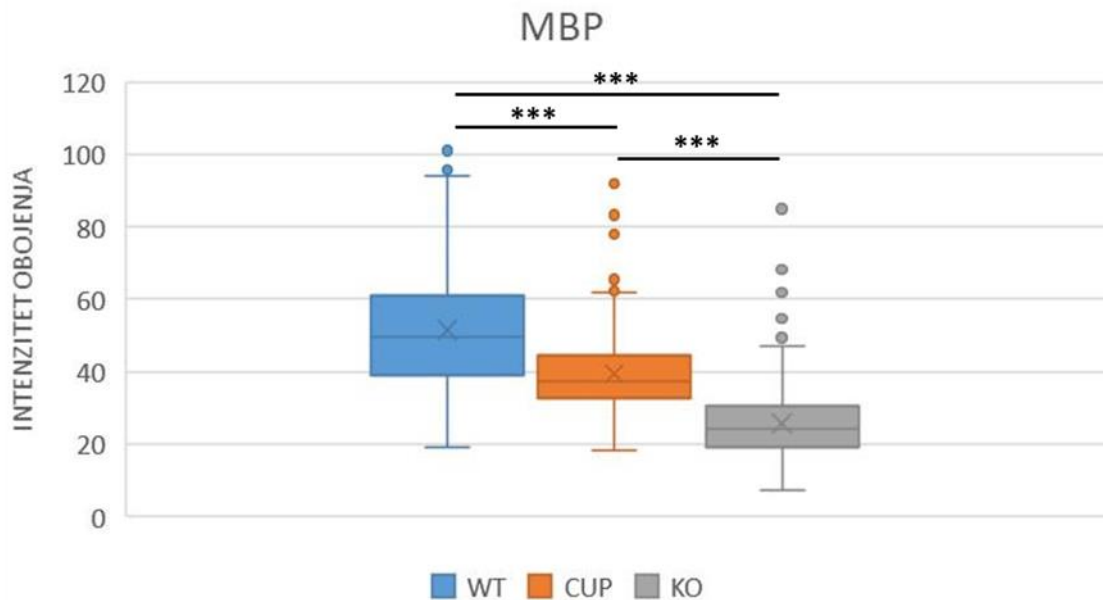
Ekspresija MBP-a, koji je marker zrele mijelinizacije, ne slijedi normalnu distribuciju kod uspoređivanja grupa životinja WT, CUP i WT, KO. Dok kod uspoređivanja između CUP i KO skupina slijedi normalnu distribuciju. Statistički značajno sniženu ekspresiju nalazimo kod CUP i KO skupina u odnosu na WT skupinu ( $P < 0.001$ ) te je statistički značajno veća ekspresija kod CUP životinja u odnosu na KO ( $P < 0.001$ ) (slika 2, slika 3, slika 4).

CNP-aza, marker nekompaktiranog mijelina, odnosno nezrele loze oligodendrocita. Nema statistički značajnu razliku između skupina za ovaj marker. Pogledom na grafički prikaz i rezultate imunohistokemijskog bojenja, vidljiva je razlika u broju stanica po vidnom polju gdje CUP-om tretirana skupina ima veći broj stanica od KO skupine (slika 2, slika 4).

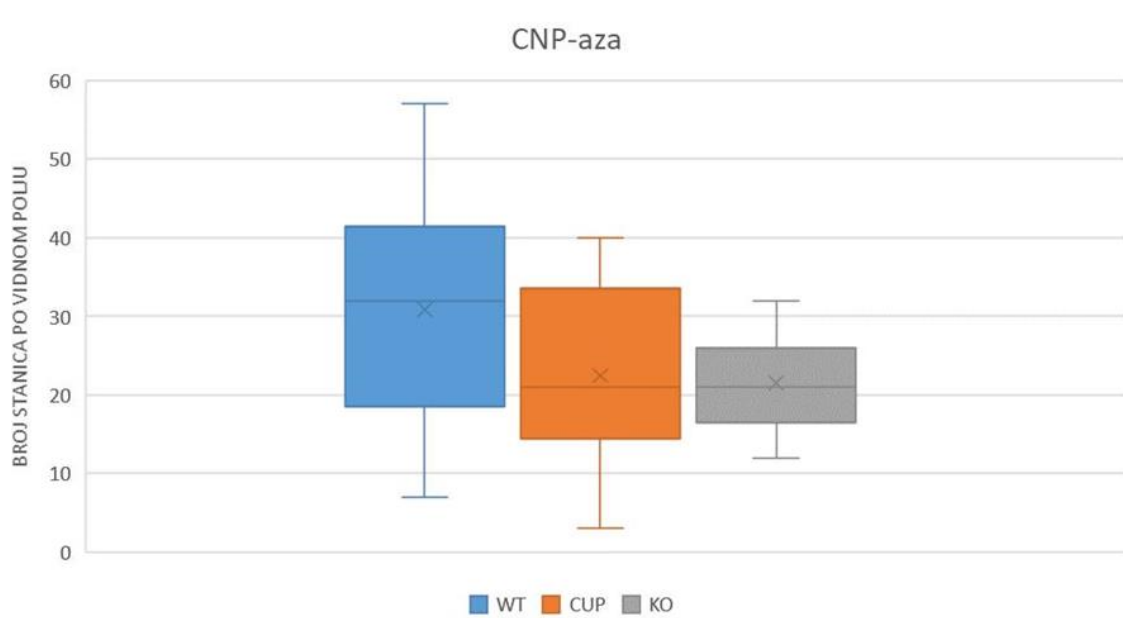
Najnižu ekspresiju oba markera ima KO skupina, što nas navodi na zaključak da je kod te skupine demijelinizacija uzela maha.



Slika 2. Lumbalni segment kralješnične moždine (dorzalni rog, siva tvar). Povećanje 400x, veličina skale 100 $\mu$ m. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja proutijelima CNP-aza i MBP. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom.



Slika 3. Razlike u ekspresiji MBP markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnos  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )



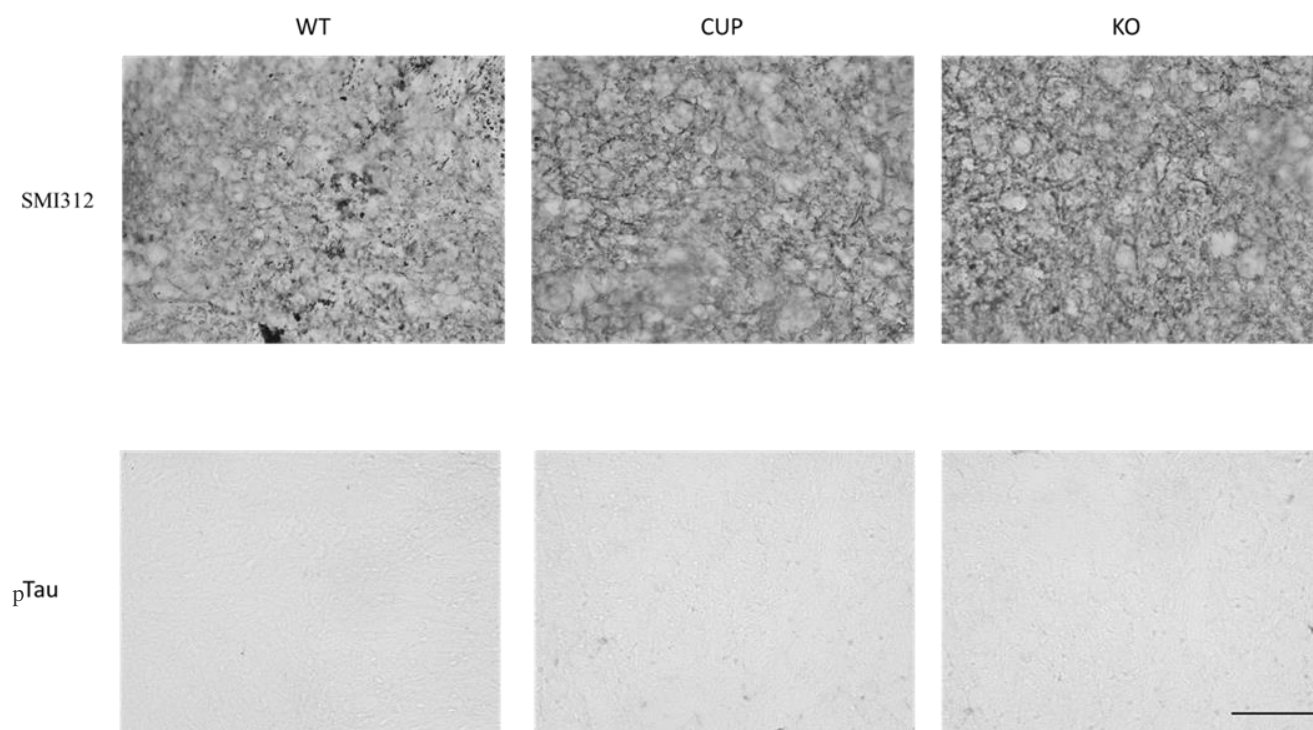
Slika 4. Razlike u ekspresiji CNP-aze u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )

## 5.2. Markeri mikroubula (SMI312, pTau)

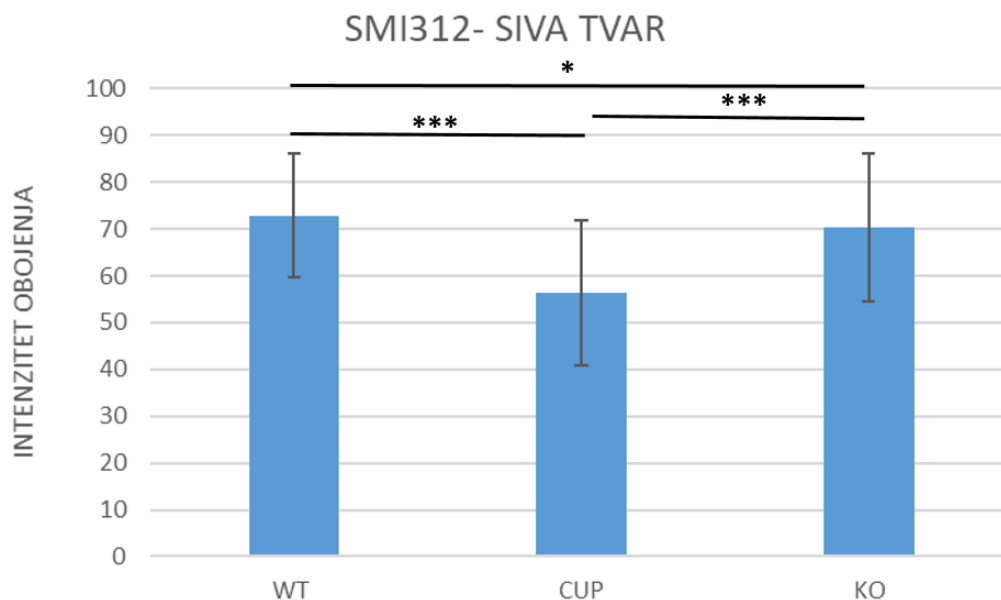
Ekspresija markera sazrijevanja aksona, SMI312, slijedi normalnu distribuciju. Statistički značajno veća je ekspresija u WT životinja u odnosu na KO ( $P < 0.05$ ), te kod WT životinja u odnosu na CUP ( $P < 0.001$ ). Između skupina tretiranih CUP i KO životinja veća je ekspresija kod KO životinja ( $P < 0.001$ ) (slika 5, slika 6).

Marker neurodegeneracije, pTau protein, slijedi normalnu distribuciju. Statistički značajna razlika u ekspresiji je u sve 3 grupe životinja. WT skupina ima statistički značajno veću ekspresiju, kada ju se uspoređi sa CUP i KO skupinama ( $P < 0.001$ ). Kada usporedimo CUP i KO skupinu, veću statistički značajnu ekspresiju ima KO skupina životinja ( $P < 0.001$ ) (slika 5, slika 7).

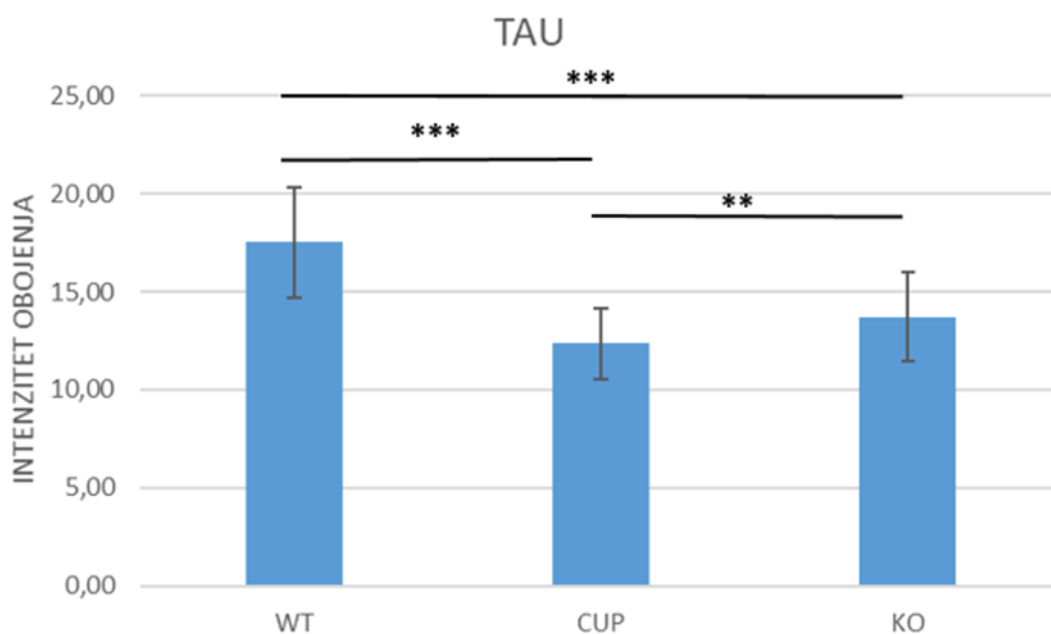
Kod oba markera WT skupina ima najviše vrijednosti što znači i najočuvanije mikrotubule neurona. Kod CUP-om hranjene skupine najbrže degradiraju mikrotubuli.



Slika 5. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja proutjelima SMI312 i pTAU na lumbalnom segmentu kralješnične moždine (dorzalni rog, siva tvar). Povećanje 400x, veličina skale 100μm. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom.



Slika 6. Razlike u ekspresiji SMI312 markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )



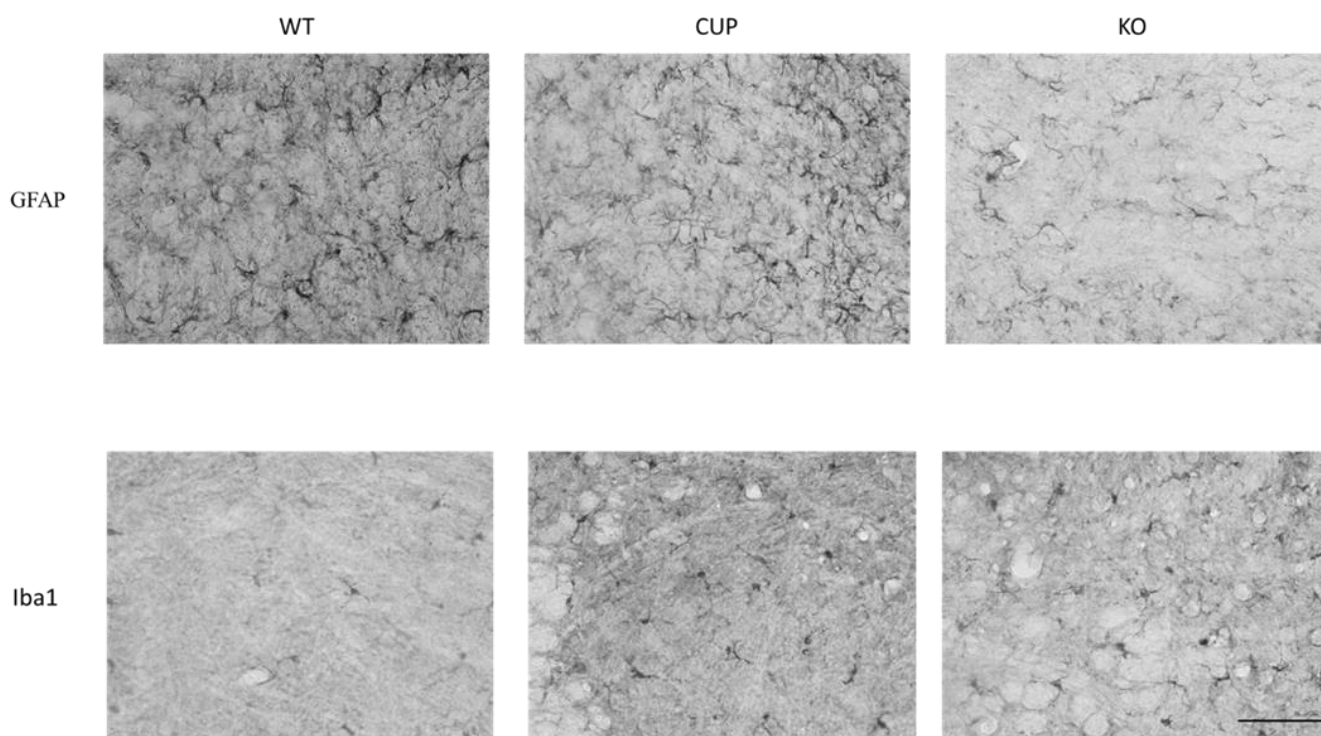
Slika 7. Razlike u ekspresiji pTau proteina u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )

### 5.3. Markeri upale (Iba1, GFAP)

Kod markera upale Iba1 ekspresija ne slijedi normalnu distribuciju. Statistički značajna razlika je između KO i CUP skupine. Iba1 je jače izražena kod KO životinja u odnosu na CUP ( $P < 0.05$ ) (slika 8, slika 9).

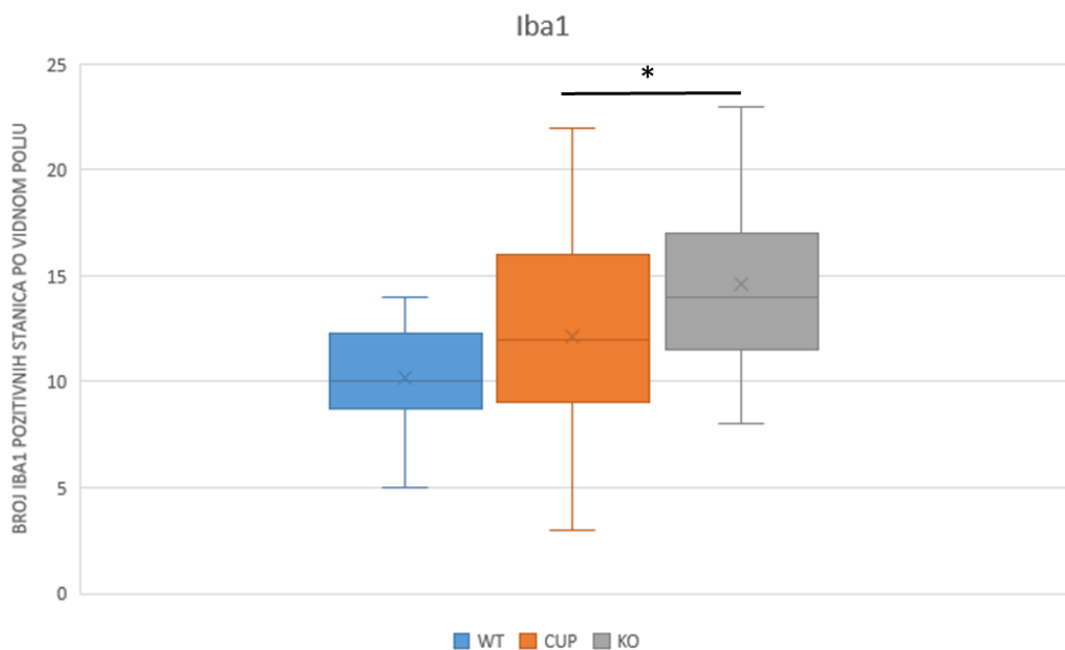
Drugi korišteni marker upale bio je GFAP, čija ekspresija ne slijedi normalnu distribuciju u slučaju usporedbe između skupina WT i KO gdje statistički značajnu ekspresiju ( $P < 0.001$ ) ima WT skupina životinja u usporedbi sa KO skupinom. Normalnu distribuciju slijedi ekspresija GFAP-a između WT i CUP skupina i statistički značajna ekspresija je kod WT skupine u odnosu na CUP ( $P < 0.001$ ) (slika 8, slika 10).

Mikroglija, koju predstavlja Iba1, je čistač lezija. Više je ima u CUP i KO skupini od WT skupine. GFAP je niži u obje pokusne skupine u odnosu na WT jer u toj fazi lezije astrociti ne korigiraju štetu.

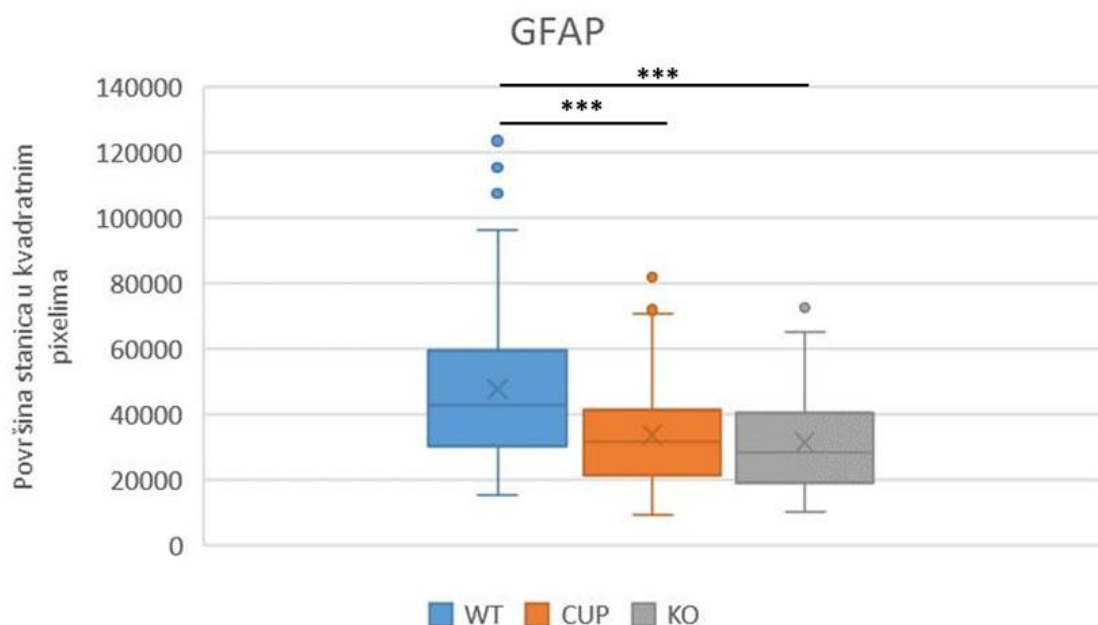


Slika 8. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja proutijelima GFAP i Iba1 na lumbalnom segmentu kralješnične moždine (dorzalni rog, siva tvar). Povećanje 400x, veličina skale 100 $\mu$ m. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom.





Slika 9. Razlike u ekspresiji Iba1 markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )



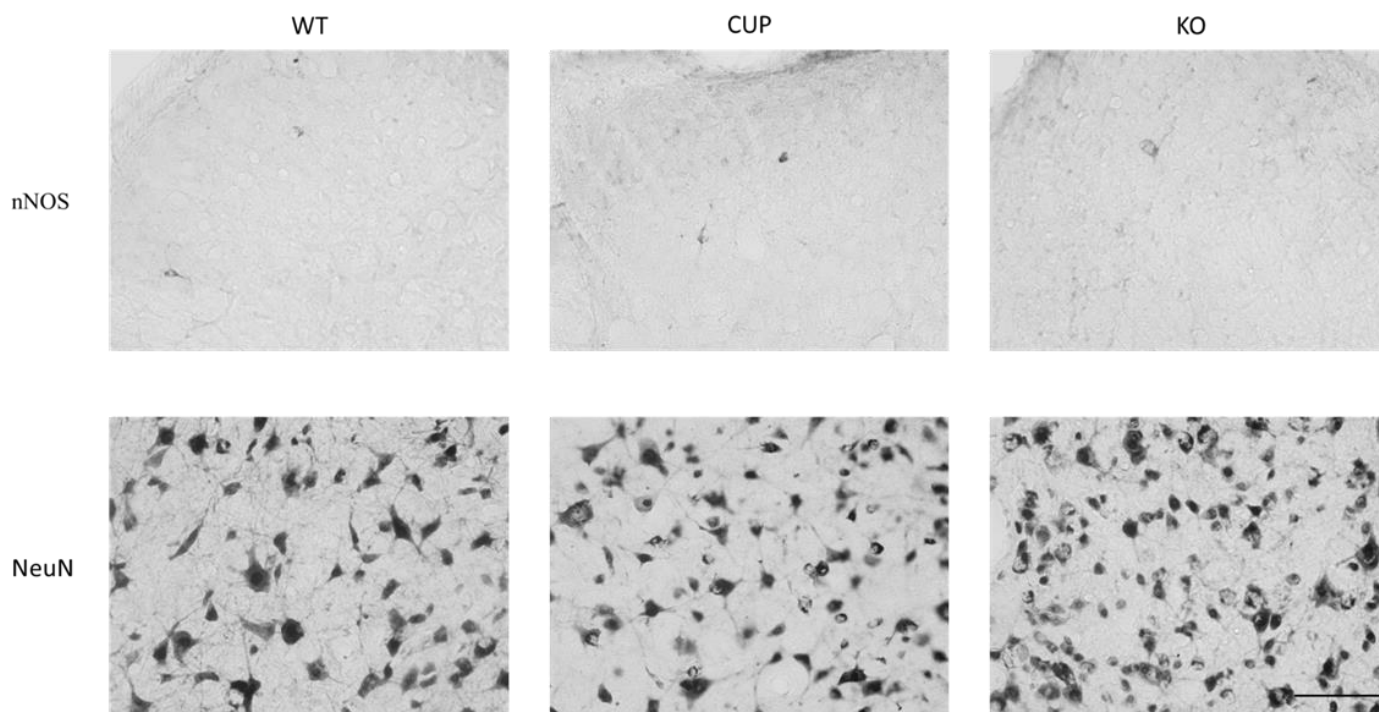
Slika 10. Razlike u ekspresiji GFAP markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )

#### 5.4. Markeri neurona (nNOS, NeuN)

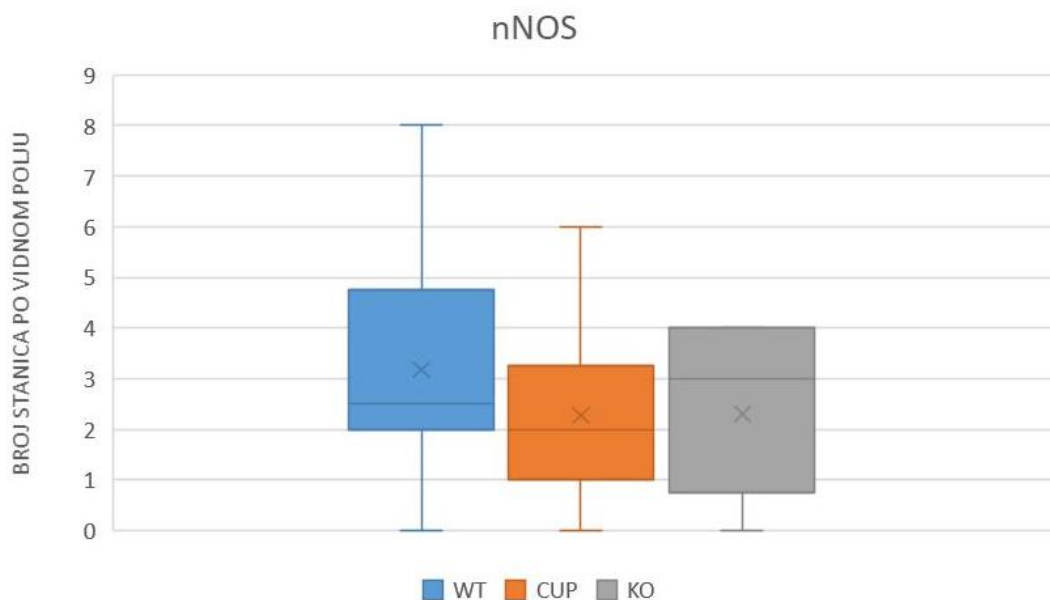
Marker neuroplastičnog potencijala tkiva, nNOS, ne pokazuje statistički značajnu razliku u ekspresiji. Iako se iz grafičkog prikaza (slika 8.) vidi da je veći broj stanica po vidnom polju prisutan u WT skupini u odnosu na CUP i KO skupinu, te da je u KO skupini veći broj u odnosu na CUP (slika 11, slika 12).

Ekspresija NeuN-a, markera specifičnog za neurone, nema statistički značajnu razliku između skupina ni u broju stanica po vidnom polju niti u površini neurona u pikselima kvadratnim (slika 11, slika 13, slika 14).

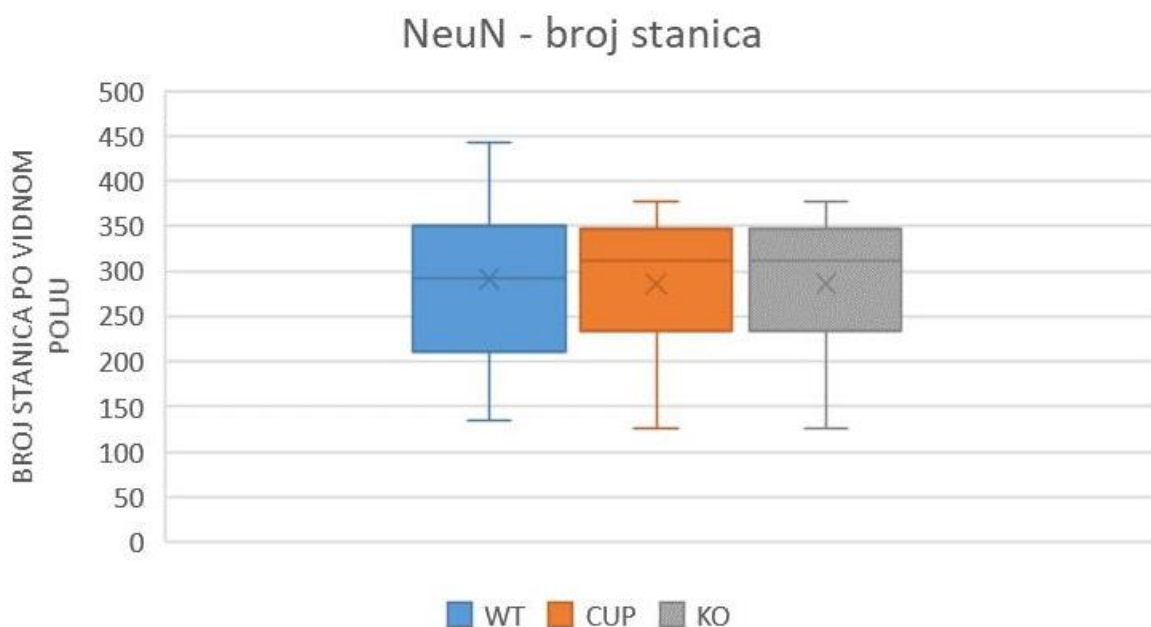
Oba markera pokazuju da još nema gubitka neurona u promatranom segmentu kralješnične moždine, mada je prisutan fenotip. Time fenotip, visceralnu bol, možemo pratiti samo preko demijelinizacije i smatramo da je podloga funkcionalna, a ne još organska (tj. nastala radi neurodegeneracije).



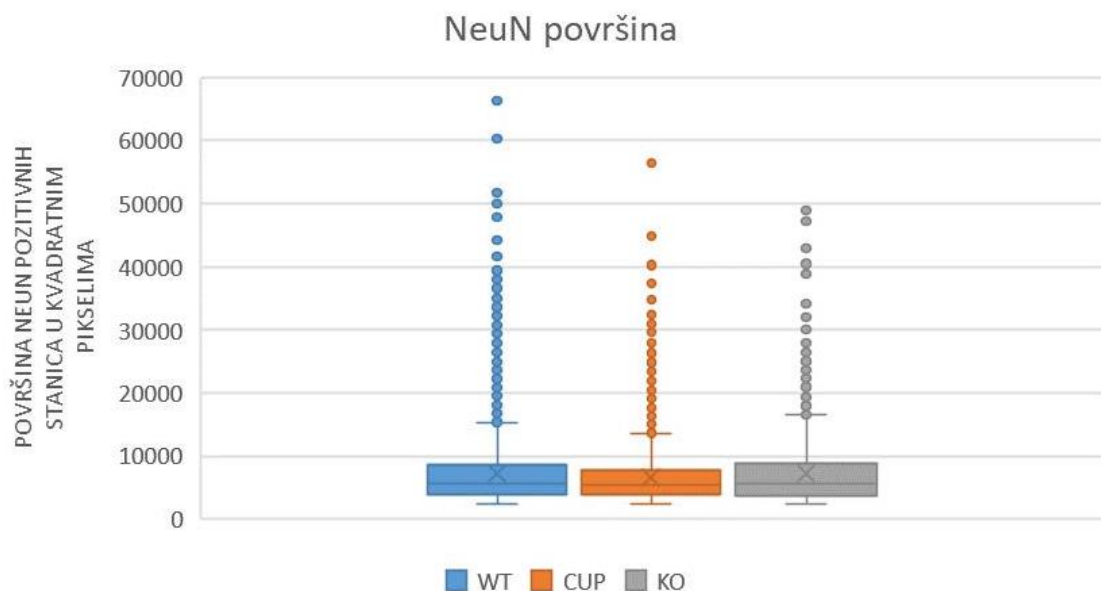
Slika 11. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja proutjelima GFAP i Iba1 na lumbalnom segmentu kralješnične moždine (dorzalni rog, siva tvar). Povećanje 400x, veličina skale 100μm. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupini s isključenim *B4Galnt1* genom.



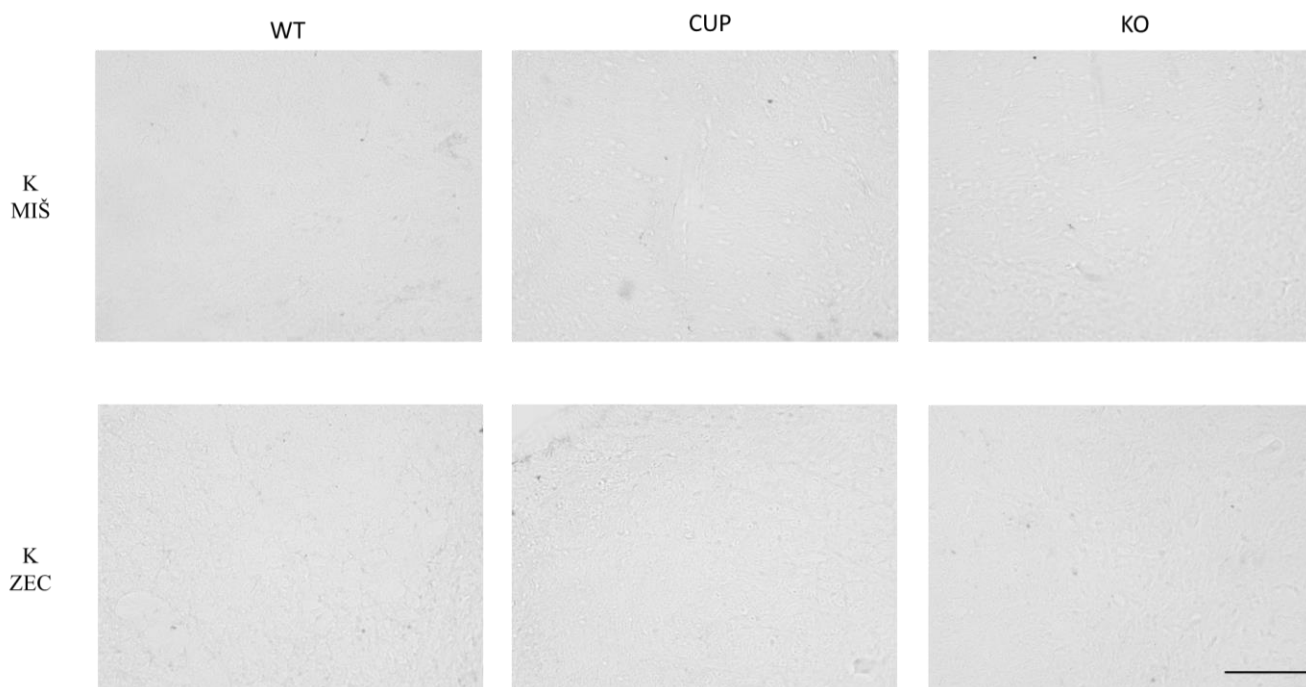
Slika 12. Razlike u ekspresiji nNOS markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )



Slika 13. Razlike u ekspresiji NeuN markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\*statistička značajnost  $P < 0.001$ )



Slika 14. Razlike u ekspresiji NeuN markera u 3 skupine životinja. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $P < 0.05$ ; \*\* statistička značajnost  $P < 0.005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $P < 0.001$ )



Slika 15. Prikaz rezultata imunohistokemijskog bojenja negativnih kontrola na lumbalnom segmentu kralješnične moždine (dorzalni rog, siva tvar). Povećanje 400x, veličina skale 100 $\mu$ m. WT – kontrolna skupina, CUP – skupina tretirana kuprizonom i KO – skupina s isključenim *B4Galnt1* genom.

## 6.RASPRAVA

Nociceptivna bol je nastala kao posljedica neke ozljede ili bolesti. Dijeli se na somatsku i visceralnu bol. (38) Kako bi razumjeli utjecaj demijelinizacije na percepciju boli i razlike između percepcije somatske i visceralne boli u ovom istraživanju upotrebljeni su markeri koji nisu prije rađeni na kralješnici miša s isključenim *B4Galnt1* genom. Sada su upotrebljeni za razumijevanje razlike u osjetu visceralne i somatske boli kod *B4Galnt1* KO miša i miša tretiranog CUP-om, zbog različitih modela demijelinizacije koje te dvije skupine predstavljaju (16, 17, 18, 22). Razlika u percepciji i provođenju bolnih podražaja praćena je markerima mijelinizacije (MBP, CNP-aza), mikrotubula (pTau), neurofilamenata (SMI312), upale (Iba1, GFAP) i neurona (nNOS, NeuN).

Marker kompaktnog mijelina – MBP (55) i CNP-aza, marker nekompaktiranog mijelina (106, 107) pokazuju najnižu ekspresiju u KO skupini životinja u usporedbi s CUP-om tretiranoj skupini životinja i WT skupinom. Razlog tomu je nedostatak enzima GM2/GD2 sintetaze, koja je produkt transkripcije gena *B4Galnt1* (14, 15). Isključenjem GM2/GD2 sintetaze onemogućeno je dodavanje sijalinske kiseline i nastanak složenih gangliozida (19, 20). Kako su gangliozidi GD1a i GT1b, čija sinteza izostaje nakon isključenja *B4Galt1* gena, receptori za mijelinu pridruženi protein (MAG), a MAG je ključan za kompakciju mijelina – do iste ne dolazi. Naprotiv, dolazi do destabilizacije u mijelinskoj membrani i nemogućnosti interakcije između aksona i mijelina, te progresivne demijelinizacije i neurodegeneracije (21). Demijelinizacija u KO skupini životinja zahvaća sve djelove živčanog sustava podjednako, dok se kod CUP-om tretirane skupine životinja demijelinizacija primarno odvija u CNS-u (19, 23). PNS je pogođen u manjoj mjeri zbog različitog podrijetla mijelin sintetizirajućih stanica. Oligodendrociti CNS-a su osjetljiviji na utjecaj kuprizona od Schwannovih stanica u PNS-u (108).

Za razliku od markera mijelinizacije, marker mikrotubula – pTau i marker neurofilamenata - SMI312 pokazuju najnižu ekspresiju u CUP-om tretiranoj skupini životinja u usporedbi s KO i WT skupinama, što ukazuje na najbržu degradaciju mikrotubula i neurofilamenata, koja je uzrokovana drugačijim mehanizmom upale prisutnim u CUP skupini u usporedbi sa KO skupini kod koje se upala razvija postepeno i treba joj dulji vremenski period (19, 29).

Markeri upale Iba1 i GFAP naizgled govore različitu priču. Iba1 najveću ekspresiju ima u KO skupini dok GFAP u WT skupini životinja. Razlika u ekspresiji, iako su oba markera upale, moguća je zbog prisutnosti ta dva markera u različitim stanicama. Iba1 je marker

mikroglija stanica koje su rezidencionalni makrofazi živčanog sustava i prvi dolaze na mjesto lezije te započinju proces čišćenja debrisa i aktivacije imunološkog sustava (34, 35). GFAP s druge strane predstavlja marker koji pripada skupini intermedijarnih filamenata, prisutan u astrocitima koji se javljaju u kasnijoj fazi odgovora na leziju (32, 33).

Svi prijašnji markeri su markeri stanica koje okružuju neurone ili su markeri potpornih struktura neurona kao što je mijelin. Markeri samih neurona nNOS i NeuN nemaju značajnu razliku između skupina i govore o tome da još nema gubitka neurona iako je prisutan fenotip, visceralna bol, uočen na životinjama uključenima u istraživanje.

Kako nema gubitka neurona, fenotip, visceralnu bol možemo pripisati procesu demijelinizacije. Najizraženija demijelinizacija nakon analize rezultata imunohistokemijskog bojenja vidljiva je u KO skupini životinja. Demijelinizacijom somatskih vlakana na periferiji, ona nisu u mogućnosti provoditi nociceptivni signal istom brzinom kao i u fiziološkom stanju dobre mijeliziranosti, niti su u mogućnosti utišati signal druge tupe boli iz šupljih organa. Zbog toga dolazi do pojačavanja osjeta visceralne boli, prenošene nemijeliniziranim C-vlaknima (38, 39).

Hipoteza studije je dokazana uz analizu navedenih markera i njihovu interpretaciju. Postoji razlika u pogođenosti somatosenzoričkih neurona između KO i CUP skupine životinja.

Ograničenje ove studije je starost životinja. Istraživanje je rađeno na životinjama starim 6 mjeseci. Potrebno je napraviti novu studiju u kojoj će biti moguće usporediti prije navedene markere na životinjama starim 6 i 12 mjeseci te pratiti razvoj percepcije visceralne boli praćenjem procesa demijelinizacije, upale i moguće smrti neurona koja u ovom istraživanju nije primijećena. Također, životinje se mogu dulje vremenski razdoblje hraniti kuprizonom kako bi se vidio utjecaj kao u drugim studijama u kojima su hranjeni kroz dulje vremenski razdoblje.

Istraživanje visceralne boli ima veliki značaj u razumijevanju autoimunih bolesti kao što su mutipla skleroza i Guillain-Barre sindrom. Aksoni neurona ljudi koji boluju od tih bolesti također prolaze kroz proces demijelinizacije, ostavljaju osobe sa jakom percepcijom boli i vidno smanjenom kvalitetom života. Razumijevanje procesa, nastanka, prijenosa i percepcije boli omogućuje daljnim istraživanjima podlogu u razvoju potencijalnog lijeka koji će ublažiti bol jer konvencionalni analgetici često ne pomažu (23).

## 7.ZAKLJUČCI:

- Najnižu ekspresiju markera mijelinizacije (MBP, CNP-aza) i najvišu ekspresiju markera upale (Iba1) imaju miševi s isključenim *B4Galt1* genom u odnosu na miševe divljeg tipa i one tretirane kuprizonom.
- Od tri skupine miševa najveću degradaciju neurofilamenata i gubitak fosforilacije na mikrotubulima pridruženim proteinima (SMI312 i pTAU) imaju miševi tretirani kuprizonom
- Markeri neurona (nNOS, NeuN) nemaju statistički značajnu razliku u ekspresiji između skupina, što znači da u ovoj dobnoj skupini životinja starih 6 mjeseci još ne dolazi do neurodegeneracije niti kod miševa tretiranih 20 dana kuprizonom niti kod miša s isključenim genom *B4Galt1*.
- Somatosenzorička vlakna su pogođenija u KO skupini u odnosu na onu tretiranu CUP-om.
- Fenotip pojačane visceralne boli posljedica je specifičnog mijelinskog oštećenja i pojave upale, a ne gubitka neurona.

## 8.SAŽETAK

**Uvod:** Visceralna bol je bol koja proizlazi iz oštećenja visceralnih organa. Prenosi se nemijeliziranim, C-vlaknima. Uzrokuje veliko smanjenje kvalitete života u bolesnika koji pate od autoimunih demijelinizirajućih bolesti. Pomoću pokusnih modela demijelinizacije, miševa hranjenih kuprizonom i miševa sa isključenim genom *B4Galnt1*, moguće je pratiti pojavu i molekularnu podlogu fenotipa visceralne boli.

**Ciljevi:** Markerima mijelinizacije, maturacije i neurodegeneracije aksona procijeniti oštećenje aksona somatosenzoričkih putova. Uz pomoć epitopa NeuN i nNOS kvantificirati neurone u ventralnom, lateralnom i dorzalnom rogu kralježnične moždine lumbalnog segmenta na sve tri skupine životinja. Markerima upale, Iba1 i GFAP, procijeniti stupanj upale u putovima za bol.

**Materijali i metode:** U istraživanje su uključena tri tipa miševa - genetički modificirani *B4Galnt1* (KO), tretirani kuprizonom (CUP) i miševi divljeg tipa (WT). Imunohistokemijskom analizom pomoću protutijela MBP, CNP-aza, Iba1, GFAP, SMI312, pTau, NeuN i nNOS detektirani su pripadaući biljezi.

**Rezultati:** KO i CUP skupina imaju nižu ekspresiju svih markera mijelinizacije, upale, neurodegeneracije i neurofilamenata u odnosu na WT skupinu. Niti u jednoj skupini nema umiranja neurona uslijed demijelinizacije.

**Zaključak:** Procesi demijelinizacije i upale dovode do demijelinizacije somatosenzoričkih vlakana i pojačanja fenotipa visceralne boli.

**Ključne riječi:** visceralna bol, *B4Galnt1*, kralježnična moždina, kuprizon, demijelinizacija



## 9. SUMMARY

Molecular basis for sensitivity to visceral pain in *B4Galnt1* knock-out mice

**Introduction:** Visceral pain is the one that derives from visceral organs. It is conducted by unmyelinated, C-fibers. Visceral pain causes degradation in quality of life in patients who suffer from autoimmune demyelinating diseases. With the help of two demyelination models, mice that are fed with cuprizone and the one with knock-out gene, *B4Galnt1*, it is possible to follow perception and molecular basis of sensitivity to visceral pain.

**Goals:** With the help of markers of myelination, maturation and degeneration in axons estimate the damage in axons of somatosensory pathways. With epitopes NeuN and nNOS quantify neurons in ventral, lateral and dorsal horn in lumbar part of the spinal cord in all three groups of animals. With the markers of inflammation, Iba1 and GFAP, determine level of inflammation in the pain pathways.

**Materials and methods:** In this research were included three groups of animals – genetically modified *B4Galnt1* knock-out, group treated with cuprizone and wild type group.

Immunohistochemical analysis with antibodies MBP, CNPase, Iba1, GFAP, SMI312, pTau, NeuN and nNOS was used to detect belonging epitops of interest.

**Results:** Collected results show lower expression of all markers in comparison with WT group, except neuron markers, which in this group of animals do not die.

**Conclusion:** Process of demyelination causes demyelination of somatosensory neurons and increased perception of visceral pain.

**Key words:** visceral pain, *B4Galnt1*, spinal cord, cuprizone, demyelination

## 10.LITERATURA

1. Varki A. Evolutionary forces shaping the Golgi glycosylation machinery: why cell surface glycans are universal to living cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011.;3:1-15.
2. Ronald L. Schnaar, 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.;94:461–518.
3. Tettamanti G, Bonali F, Marchesini S, Ledeen R, Wu G. *Gangliosides of the Nervous System.* Springer New York;Humana Press.2018.;1:19-55.
4. Hakomori S.I. The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 99:225-232.
5. Zambotti V. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochim Biophys Acta.* 1973.; 296:160–170.
6. 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.;94:461–518.
7. Chou HH, Hayakawa T, Diaz S, Krings M, Indriati E, Leakey M, Paabo S, Satta Y, Takahata N, Varki A. Inactivation of CMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase occurred prior to brain expansion during human evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002.;99:11736-11741.
8. Martinez Z, Zhu M, Han S, Fink AL. GM1 specifically interacts with  $\alpha$ -synuclein and inhibits fibrillation. *Biochemist.* 2007.;46:1868–1877.
9. Wu G, Lu Z-H, Andre S, Gabius H-J, Ledeen RW. Functional interplay between ganglioside GM1 and cross-linking galectin-1 induces axon-like neuritogenesis via integrin-based signaling and TRPC5-dependent Ca influx. *J. Neurochem.* 2016.;136:550–563.
10. Posse de Chaves E., Sipion S. , Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction.*FEBS Letters.* 2010.;584:1748–1759.
11. Robert W, Wu L, Wu G. The multi-tasked life of GM1 ganglioside,a true factotum of nature. *Cell.Press.* 2015.;40:407-418.

12. Zeng G, Yu R.K, Cloning and Transcriptional Regulation of Genes Responsible for Synthesis of Gangliosides. *Curr Drug Targets*. 2008.; 9:317-324
13. Fishman P.H. Normal and abnormal biosynthesis of gangliosides. *Chemistry and Physics of Lipids*. 1974.;13:305-326.
14. Liu Y, Wada R, Kawai H, Sango K, Deng C, Tai T, McDonald MP, Araujo K, Crawley JN, Bierfreund U, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid storage disorder. *J Clin Invest*. 1999.;103: 497–505.
15. Takamiya K, Yamamoto A, Furukawa K, Yamashiro S, Shin M, Okada M, Fukumoto S, Haraguchi M, Takeda N, Fujimura K, Sakae M, Kishikawa M, Shiku H, Aizawa S. Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996.;93: 10662–10667.
16. Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, Furukawa K, Furukawa K, Sugiura Y. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol*. 2003.;66: 37–44.
17. Pan B, Fromholt SE, Hess EJ, Crawford TO, Griffin JW, Sheikh KA, Schnaar RL. Myelin-associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology and behavioral deficits in single- and double-null mice. *Exp Neurol*. 2008.;195: 208–217.
18. Tanaka J, Garcia JH, Max SR, Vilorio JE, Kamijyo Y, McLaren NK, Cornblath M, Brady RO. Cerebral sponginess and GM3 gangliosidosis; ultrastructure and probable pathogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1975.;34: 249–262.
19. Sheikh KA, Sun J, Liu Y, Kawai H, Crawford TO, Proia RL, Griffin JW, Schnaar RL. Mice lacking complex gangliosides develop Wallerian degeneration and myelination defects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999.;96:7532–7537.
20. Ma Q, Kobayashi M, Sugiura M, Ozaki N, Nishio K, Shiraishi Y, Furukawa K, Furukawa K, Sugiura Y. Morphological study of disordered myelination and the degeneration of nerve fibers in the spinal cord of mice lacking complex gangliosides. *Arch Histol Cytol*. 2003.;66:37–44.

21. Conforti L, Gilley J, P.Coleman M. Wallerian degeneration: an emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 2014;15:394–409.
22. Praet J, Guglielmettia C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: Clinical relevance for multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014.;47:485–505.
23. Witherick J, Wilkins A, Scolding N, Kemp K. Mechanisms of oxidative damage in multiple sclerosis and a cell therapy approach to treatment. *Autoimmune Dis*. 2011.;1-12.
24. Bernardo A , Greco A, Levi G, Minghetti L. Differential lipid peroxidation, Mnsuperoxide, and bcl-2 expression contribute to the maturation-dependent vulnerability of oligodendrocytes to oxidative stress. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 2003.;62:509–519.
25. Praet J, Guglielmettia C, Berneman Z, Van der Linden A, Ponsaerts P. Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model. *Neurosci Biobehav Rev*. 2014;47:485–505.
26. Hemm RD, Carlton WW, Welser JR., Ultrastructural changes of cuprizone encephalopathy in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1971.;18:869–882..
27. Seiwa C, Yamamoto M, Tanaka K, Fukutake M, Ueki T, Takeda S, i sur. Restoration of FcRgamma/Fyn signaling repairs central nervous system demyelination. *J. Neurosci. Res*. 2007.;85:954–966.
28. Hesse A, Wagner M, Held J, Bruck W, Salinas-Riester G, Hao Z, i sur. Intoxic demyelination oligodendroglial cell death occurs early and is FAS independent. *Neurobiol. Dis*. 2010.;37:362–369.
29. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal*. 2007.;9:2277–2293.
30. WU YC, Field AS, Duncan ID, Samsonov AA, Kondo Y, Tudorascu D, i sur. High b-value and diffusion tensor imaging in a canine model of dysmyelination and brain maturation. *J Exp Neurosci*. 2011.;58:829-37
31. Cammer W. The neurotoxicant, cuprizone, retards the differentiation of oligodendrocytes in vitro. *J. Neurol. Sci*. 1999.; 168:116–120.

32. Hibbits N, Yoshino J, Le TQ, Armstrong RC. Astrogliosis during acute and chronic cuprizone demyelination and implications for remyelination. *ASN Neuro*. 2012.;4:393–408
33. Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison W. Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *J. Neurochem*. 2004.;89:1092–1100.
34. Olah M, Amor J, Brouwer N, Vinet J, Eggen B, Biber K, et al. Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*. 2012.;60:306–321.
35. Hiremath MM, Saito Y, Knapp GW, Ting JP, Suzuki K, Matsushima GK, et al. Microglial/macrophage accumulation during cuprizone-induced demyelination in C57BL/6 mice. *J. Neuroimmunol*. 1998.;92:38–49.
36. Jha S, Srivastava SY, Brickey WJ, Iocca H, Toews A, Morrison JP, et al. The inflammasome sensor, NLRP3, regulates CNS inflammation and demyelination via caspase-1 and interleukin-18. *J. Neurosci*. 2010.;30:15811–15820.
37. De Winter BY, Deiteren A, & J. G. DeMan JG. Novel nervous system mechanisms in visceral pain. *Neurogastroenterol motil*. 2016.;28:309–315.
38. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, White LF. *Neuroznanost*, 5. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb, 2016.; poglavlje 10 Bol:209-256.
39. Reddi D, Curran N, Stephens R. An introduction to pain pathways and mechanisms. *Br J Hosp Med*. 2013.;74:188-191.
40. Cervero F, M A Lardi J. Visceral pain. *The Lancet*. 1999.;353:2145-2148.
41. Shubayev VI, et al. TNF $\alpha$ -induced MMP-9 promotes macrophage recruitment into injured peripheral nerve. *Mol. Cell. Neurosci*. 2006.;31:407–415.
42. Zochodne DW, et al. Evidence for nitric oxide and nitric oxide synthase activity in proximal stumps of transected peripheral nerves. *Neuroscience*. 1999.; 91:1515–1527.
43. Keswani SC, et al. Schwann cell chemokine receptors mediate HIV-1 gp120 toxicity to sensory neurons. *Ann. Neurol*. 2003.;54: 287–296.
44. Scholz J, Woolf Clifford J. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Pub*. 2007.; 10:1361-1368.
45. Hewitt S, Robinowitz M, Boenisch T, Bogen S, Gown A, Kalra K, Otis C, Spaulding B, Taylor C. Quality assurance for design control and implementation of

- immunohistochemistry assays; Approved guideline second edition Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011.;31:1-156.
46. Ramos Vara JA, Miller MA. When tissue antigens and antibodies get along. *Vet Pathol*, 2014.;51:42-87.
47. Ramos-Vara JA, Borst LB. *Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology. Tumors in Domestic Animals, Fifth Edition.* John Wiley & Sons, Inc. 2017.;44-87.
48. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005.;42:405–426.
49. Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ, i dr. Monoclonal versus polyclonal antibodies: distinguishing characteristics, applications, and information resources. *Inst Lab Anim Res J*. 2005.;46:258–26.
50. Smith GST, Samborska B, Hawley SP, Klaiman JM, Gillis TE, Jones N, et al. Nucleus localized 21.5-kDa myelin basic protein promotes oligodendrocyte proliferation and enhances neurite outgrowth in coculture, unlike the plasma membrane-associated 18.5-kDa isoform. *J Neurosci Res*. 2013.;913:394-62.
51. Sternberg NH, Itoyama Y, Kies MW, Webster H. Myelin basic protein demonstrated immunocytochemically in oligodendroglia prior to myelin sheath formation. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1978.;75:2521-2524.
52. Readhead C, Popko B, Takahashi N, Shine HD, Saavedra RA, Sidman, RL, Hood L. Expression of a myelin basic protein gene in transgenic shiverer mice: correction of the dysmyelinating phenotype. *Cell*. 1987.;48:703-712.
53. White, R. and Kramer-Albers EM. Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Front Cell Neurosci*. 2014.;7;1-8.
54. Inoue Y, Nakamura R, Mikoshiba K, Tsukada Y. Fine structure of the central myelin sheath in the myelin deficient mutant Shiverer mouse, with special reference to the pattern of myelin formation by oligodendroglia. *Brain Res*. 1981.;219:85-94.
55. Yandava BD, Billingham LL, Snyder EY. ‘Global’ cell replacement is feasible via neural stem cell transplantation: Evidence from the dysmyelinated shiverer mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1999.;96:7029–7034.

56. Cochard P, Paulin D. Initial expression of neurofilaments and vimentin in the central and peripheral nervous system of the mouse embryo in vivo. *J Neurosci.* 1984.;4:2080-2094.
57. Hirokawa N, Glicksman MA, Willard MB. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neural cytoskeleton. *J Cell Biol.* 1984.;98:1523-1536.
58. Lee VM-J, Carden MJ, Schlaepfer WW, Trojanowski JQ. Monoclonal antibodies distinguish several differentially phosphorylated states of the two largest rat neurofilament subunits (NF-H and NF-M) and demonstrate their existence in the normal nervous system of adult rats. *J Neurosci.* 1987.;7:3474-3488.
59. Ulfing N, Nickel J, Bohl J. Monoclonal antibodies SMI 311 and SMI 312 as tools to investigate the maturation of nerve cells and axonal patterns in human fetal brain. *Cell tissue Res.* 1998.;291:433-443.
60. Lee MK, Cleveland DW. Neurofilament function and dysfunction: involvement in axonal growth and neuronal disease. *Curr Opin Cell Biol.* 1994.;6:34-40.
61. Schoenfeld TA, Obar RA. Diverse distribution and function of fibrous microtubule-associated proteins in the nervous system. *Int Rev. Cytol.* 1994.; 151:67–137.
62. Chin SS, Goldman JE. Glial inclusions in CNS degenerative diseases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996.;55:499–508.
63. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad Sci.* 1975.;72:1858–1862.
64. Sattilaro RF, Dentler WL, LeCluyse EL. Microtubule-associated proteins (MAPs) and the organization of actin filaments in vitro, *J. Cell Biol.* 1981.;90:467–473.
65. Selden SC, Pollard TD. Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J. Biol. Chem.* 1983.;258:7064–7071.
66. Correas I, Padilla R, Avila J. The tubulin-binding sequence of brain microtubule-associated proteins, tau and MAP-2, is also involved in actin binding. *Biochem. J.* 1990.; 269:61–64.
67. Aamodt EJ, Williams RCJ. Microtubule-associated proteins connect microtubules and neurofilaments in vitro. *Biochemistry.* 1984.;23:6023–6031.

68. Rendon A, Jung D, Jancsik V, Interaction of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs) with rat brain mitochondria, *Biochem. J.* 1990.;269:555–556.
69. Brion JP, Couck AM, Passareiro E, Flament-Durand J. Neuro-fibrillary tangles of Alzheimer's disease: an immunohistochemical study. *J. Submicrosc. Cytol.* 1985.;17:89–96.
70. Delacourte A, De'fossez A. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments, *J. Neurol. Sci.* 1986.;76:173–186.
71. Verdiev BI, Poltavtseva RA, Podgornyi OV, Marei MV, Zinovyeva RD, Sukhikh GT Aleksandrova MA. *Bull Exp Biol Med.* 2009.;148:697–704.
72. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992.;116:201–211.
73. Gusel- Nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta neturae.* 2015.;25:42-47.
74. Maxeiner S, Glassmann A, Kao HT, Schilling K. The molecular basis of the specificity and cross-reactivity of the NeuN epitope of the neuron-specific splicing regulator, Rbfox3. *Histochem Cell Biol.* 2014.;141:43–55.
75. Duan W, Ping Zhang Y, Hou Z, Huang C, Zhu H, Qing Zhang C, Yin Q. Novel insights into NeuN: from neuronal marker to splicing regulator. *Mol Neurobiol.* 2015.;1-11.
76. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.* 1992.;116:201–211.
77. Saranat HB, Nochlin D, Born DE. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain & Development.* 1998.;20:88–94.
78. Matevossian A, Akbarian S. Neuronal Nuclei Isolation from Human Postmortem Brain Tissue. *Journal of Visualized Experiments.* 2008.; 20:1-2.
79. Knowles RG, Palacios M, Palmer R., Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989.;86: 5159– 5162.



80. Iadecola C, Beitz AJ, Renno W, Xu X, Mayer B, Zhang F. Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral micro vessels. *Brain Res.* 1993.;606:148–155.
81. Dawson TM, Snyder SH. Gases as biological messengers: Nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 1994;14: 5147–5159.
82. Garthwaite J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *Eur J Neurosci.* 2008;27:2783–2802.
83. Rancillac A, Crepel F. Synapses between parallel fibres and stellate cells express long-term changes in synaptic efficacy in rat cerebellum. *J Physiol.* 2004.;554, 707–720.
84. Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (1998). Nitric oxide in neuronal degeneration. *Prog Brain Res.* 2004;118:215–229.
85. Castillo J, Rodriguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischaemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovasc Dis.* 2004;17:7–18.
86. Pierezan F, Mansell J, Ambrus A, Rodrigues Hoffmann A. Immunohistochemical expression of ionized calcium binding adapter molecule 1 in cutaneous histiocytic proliferative, neoplastic and inflammatory disorders of dogs and cats. *Sci direct.* 2014.;151:347-351.
87. Kohler C. Allograft inflammatory factor-1/ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis. *Cell and Tiss Res.* 2007.;330:291-302.
88. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Molecular brain research.* 1998.;57:1–9.
89. M. Tsuda, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in ‘small’ glia. *Trends in Neurosciences.* 2005.;28:101-107.
90. Tsuda M. Microglia in the spinal cord and neuropathic pain. *J Diabetes Investig.* 2016.;7:17–26.
91. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 2011.; 34:76-87.

92. Gulbransen BD, Sharkey KA. Novel functional roles for enteric glia in the gastrointestinal tract. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2012;9:625–63.
93. Pekny M, Pekna M. Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J Pathol.* 2004; 204:428-437.
94. Eng, L.F. et al. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years. *Neurochem. Res.* 2000.;25:1439–1451.
95. Stewart Gillespie C, Sherman DL., Fleetwood-Walker SM, Cottrell DF, Tait S, Garry EM, Wallace VCJ, Ure J, Griffiths IR, Smith A, Brophy PJ. Peripheral Demyelination and Neuropathic Pain Behavior in Periaxin-Deficient Mice. *Neuron.* 200.;26:523–531.
96. Zhang, Z, i sur. Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products. *Plos one.* 2014.;1-16.
97. Lopategui Cabezas I, i sur. The role of glial cells in Alzheimer’s disease: potential therapeutic implications. *Neurologia.* 2014.;29:305–309.
98. Orre M, Kamphuis W, Osborn LM, Jansen AH, Kooijman L, Bossers K, Hol EM. Isolation of glia from Alzheimer’s mice reveals inflammation and dysfunction. *Neurobiol Aging.* 2014;1-15.
99. Wilhelmsson U, Li L, Pekna M, Berthold CH, Blom S, Eliasson C, Renner O, Bushong E, Ellisman M, Morgan TE, Pekny M. Absence of glial fibrillary acidic protein and vimentin prevents hypertrophy of astrocytic processes and improves post- traumatic regeneration. *J Neurosci.* 2004.;24:5016-5021.
100. Lundkvist A, Reichenbach A, Betsholtz C, Carmeliet P, Wolburg H, Pekny M. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci.* 2004.;117:3481-3488.
101. Pekny M, Lane EB. Intermediate filaments and stress. *Exp Cell Res.* 2007.;313:2244-2254.
102. Wilhelmsson U, Bushong EA, Price DL, Smarr BL, Phung V, Terada M, Ellisman MH, Pekny M. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc Natl Acad Sci.* 2006.;103:17513-17518.

103. Kurihara, T. and Tsukada, Y. The regional and subcellular distribution of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphohydrolase in the central nervous system, *J. Neurochem.* 1976.; 14:1167-1174.
104. Sprinkle TJ, Zaruba ME, McKhann G. Activity of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in regions of rat brain during development: Quantitative relationship to myelin basic protein. *J. Neurochem.* 1978;30:309-314.
105. Pfeiffer SE, Wechsler W. Biochemically differentiated neoplastic clone of schwann Cellst. *Proc nat acad sci.* 1972.;69:2885-2889.
106. Snaidero N, Mobius W, Czopka T, Hekking LH, Mathisen C, Verkleij D, Goebbels S, Edgar J, Merkler D, Lyons DA, et al. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell.* 2014.;156:277-290.
107. Nicolas Snaidero N, Simons M. Myelination at a glance. *Journal of Cell Science.* 2014;127:2999–3004.
108. Lühers Graça D, Fernandes Bondan E, Dias Pereira LA, Gevehr Fernandes C, César Maiorka P. Behaviour of oligodendrocytes and Schwann cells in an experimental model of toxic demyelination of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr.* 2001.;59:358-361.
109. Matsushima GK, Morell P. The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain Pathol.* 2001.;11:107-16.
110. Beesley JE. Histochemical synthase methods for detecting nitric oxide synthase. *Histochemical Journal.* 1995.;27: 757-769.

## **11.ŽIVOTOPIS**

**Ime i prezime:** Doris Lulić

**Datum rođenja i mjesto rođenja:** 13. srpnja 1996, Osijek.

**Adresa stanovanja:** Ante Starčevića 124, Kuševac

**Kontakt:** 095/398-0009

### **Obrazovanje:**

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijske dijagnostike na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Prirodoslovna gimnazija, Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića, Osijek

2003. – 2011. Osnovna škola Josipa Antuna Čolnića Đakovo

### **Sudjelovanje na projektima:**

2013. - "Youth for EU – Mladi za Europu"

2014. – "Popeye – promoting organic production"

### **Volontiranje:**

2013. – Centar za rehabilitaciju, odgoj i obrazovanje djece, Zlatni cekin