

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti

Senka Blažetić

Distribucija osnovnih kemijskih fenotipova interneurona u mozgu 3 genetski preinačena mišja modela s isključenim genima *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/St3Gal3*

Doktorska disertacija

Osijek, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorska disertacije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

DISTRIBUCIJA OSNOVNIH KEMIJSKIH FENOTIPOVA INTERNEURONA U MOZGU 3 GENETSKI PREINAČENA MIŠJA MODELA S ISKLJUČENIM GENIMA *St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/St3Gal3*

Senka Blažetić

Disertacija je izrađena u: Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku i na Odjelu za biologiju Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor/i: Prof.dr.sc. Marija Heffer i Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön

Kratki sažetak doktorske disertacije: Nedostatak većine ili svih kompleksnih gangliozida u miševa uzrokuju ozbiljne poremećaje i različita neurodegenerativna stanja. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi postoji li povezanost osnovnih kemijskih fenotipova interneurona i ekspresije pojedinih gangliozida na genetički preinačenim mišjim modelima (*St3Gal2, St3Gal3 i St3Gal2/St3Gal3*). Utvrđeno je da su *St3Gal2/3* miševi najosjetljiviji, a ujedno je kod njih u svim regijama vidljiv i najveći porast u broju interneurona koji ekspimiraju proteine koji vežu kalcij, dok kod *St3Gal2* miševa dolazi do najvećeg smanjenja količine navedenih interneurona. Ovi rezultati podupiru teoriju koja se odnosi na to da gangliozidi služe kao modulatori dostupnosti divovalentnih kation nizu različitih kalcij ovisnih adhezijskih sustava i time utječu na vezanje liganda.

Broj stranica: 125

Broj slika: 81

Broj tablica: 4

Broj literaturnih navoda: 141

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: Gangliozidi, interneuroni, parvalbumin, kalretinin, kalbindin, miševi

Datum obrane: 10/07/2015

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Prof.dr.sc. Jerko Barbić, član, predsjednik
2. Prof.dr.sc. Marija Heffer, mentor i član
3. Prof.dr.sc. Elizabeta Has-Schön, komentator i član
4. Prof.dr.sc. Svjetlana Kalanj-Bognar, član
5. Prof.dr.sc. Ivna Štolfa, član

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruder Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Natural Sciences

Scientific Field: Biology

DISTRIBUTION OF BASIC CHEMICAL PHENOTYPES OF INTERNEURONS IN THE BRAIN OF SIALYLTRANSFERASE KNOCKOUT MICE (*St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/St3Gal3*)

Senka Blažetić

Thesis performed at: Faculty of Medicine, J. J. Strossmayer University of Osijek and Department of Biology, J. J. Strossmayer University of Osijek

Supervisor/s: PhD. Marija Heffer, Full Professor; PhD. Elizabeta Has-Schön, Full Professor

Short abstract: Lack of most or all complex gangliosides in mice cause serious disorders and various neurodegenerative conditions. The aim of this study would be to determine whether there is a connection between the basic chemical interneuron phenotypes and expression of individual ganglioside in genetically modified mouse models (*St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/St3Gal3*). It was found that *St3Gal2/3* mice are the most sensitive, and they have the greatest increase in the number of calcium binding interneurons in all regions, while *St3Gal2* mice have the biggest reduction in the amount interneurons. This result indicates the important role of ganglioside GD1a and GT1b in the process of migration of neurons and interneurons, same as process of their maturation. Those results support our theory that relates to gangliosides as modulators of the availability of divalent cation of a variety of calcium -dependent adhesion.

Number of pages: 125

Number of figures: 81

Number of tables: 4

Number of references: 141

Original in: Croatian

Key words: Gangliosides, interneurons, parvalbumin, calretinin, calbindin, mice

Date of the thesis defense: 10/07/2015

Reviewers:

1. PhD Jerko Barbić, Full Professor,
2. PhD Marija Heffer, Full Professor
3. PhD Elizabeta Has-Schön, Full Professor
4. PhD Svjetlana Kalanj-Bognar, Associate Professor
5. PhD Ivna Štolfa, Assistant Professor
6. PhD Željka Vukelić, Full Professor

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

Doktorska disertacija izrađena je u Laboratoriju za neurobiologiju na Medicinskom fakultetu u Osijeku i u Laboratoriju za biokemiju na Odjelu za biologiju Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku. Disertacija je rađena pod vodstvom mentorica Prof.dr.sc. Marije Heffer i Prof.dr.sc. Elizabete Has-Schön

Zahvala

- *Hvala* metorici Prof.dr.sc. Mariji Heffer na prenesenom znanju, savjetima, pomoći, inspiraciji, razumjevanju i vječitom optimizmu tijekom izrade ovog rada, kao i na prilici da postanem dijelom njenog tima.

- *Hvala* komentorici Prof.dr.sc. Elizabeti Has-Schön na prenesenom znanju, pomoći, savjetima i ukazanom povjerenju.

- *Hvala* Prof.dr.sc. Ronaldu L. Schnaru na "gerilskoj obuci", te na miševima i uzorcima bez kojih ovaj doktorat ne bi bio moguć. Zahvaljujem se i Kristini Mlinac koja je uljepšala moj boravak u Americi.

- *Hvala* Prof.dr.sc. Jerku Barbiću, Prof.dr.sc. Svojetlani Kalanj Bognar, Doc.dr.sc. Ivni Štolfa i Prof.dr.sc. Željki Vukelić jer su pristali biti članovima Povjerenstva za ocjenu i obranu ovog doktorata

- *Hvala* Ireni, Barbari, Marti i Vedrani na ohrabrivanju, ugodnoj radnoj atmosferi i uskakanju kad "zaškripi". Zahvaljujem se i Vinku Krajini koji je kroz svoj diplomski rad sudjelovao u ovom istraživanju.

- *Hvala* Ani i Mariu koji su mi pružili dom za vrijeme mog boravka u Zagrebu. Bez vas bi sve puno više koštalo ☺

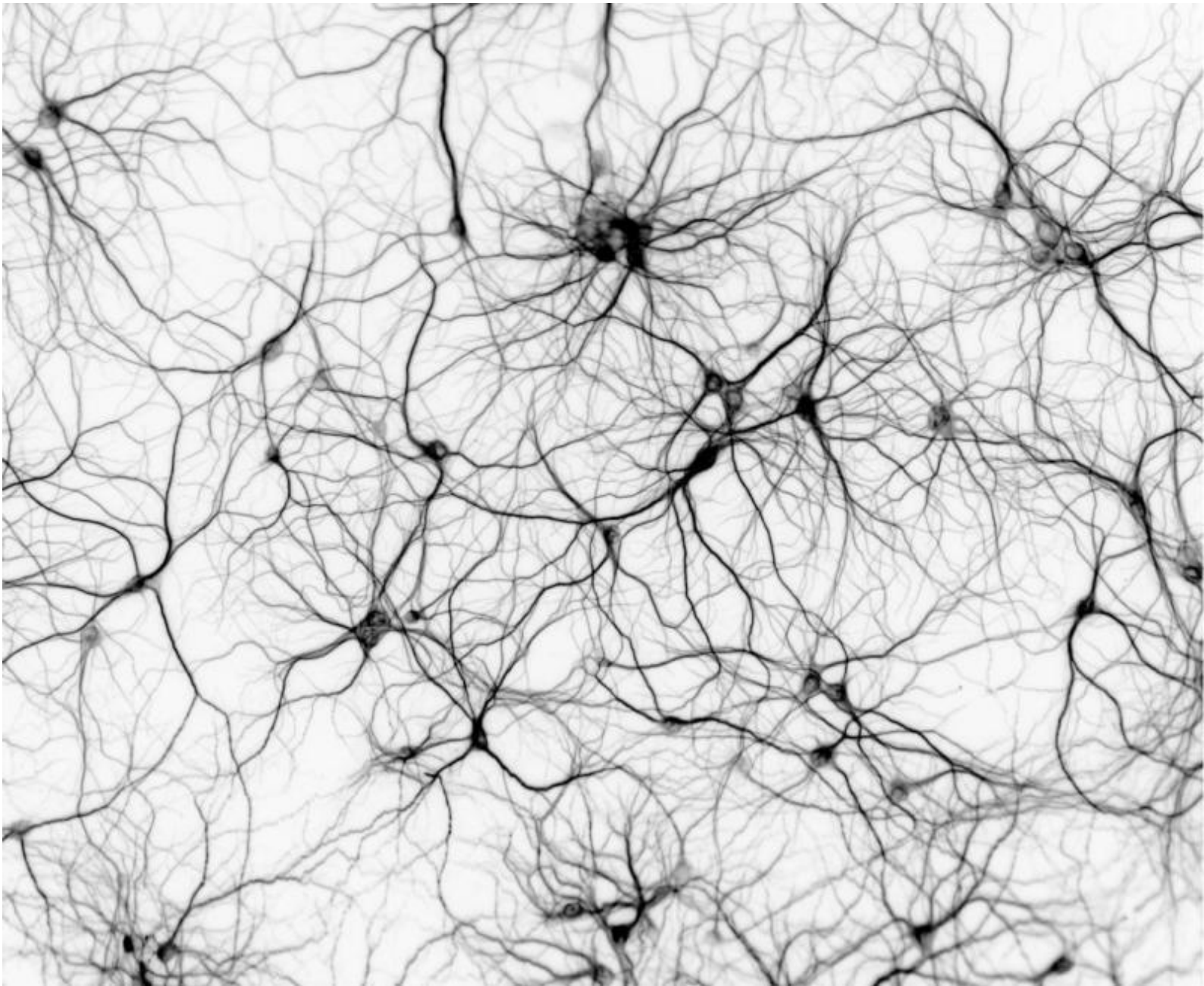
- Cijeloj mojoj obitelji, posebno mojoj mami, od sveg srca zahvaljujem na beskrajnom strpljenju, razumijevanju i pomoći koju su mi pružili

- *Hvala* mom suprugu Mariu na podršci tijekom ovih godina i sinu Marku jer je bio dobrica uz koju se ovaj rad mogao napisati

- *Hvala* kolegama i djelatnicima Odjelu za biologiju Sveučilišta J.J.Strossmayer u Osijeku i Katedre za medicinsku biologiju Medicinskog fakulteta u Osijeku, te svim prijateljima na zanimanju i ohrabrivanju

- *Hvala* i svima ostalima koji su neposredno sudjelovali u izradi ove doktorske disertacije

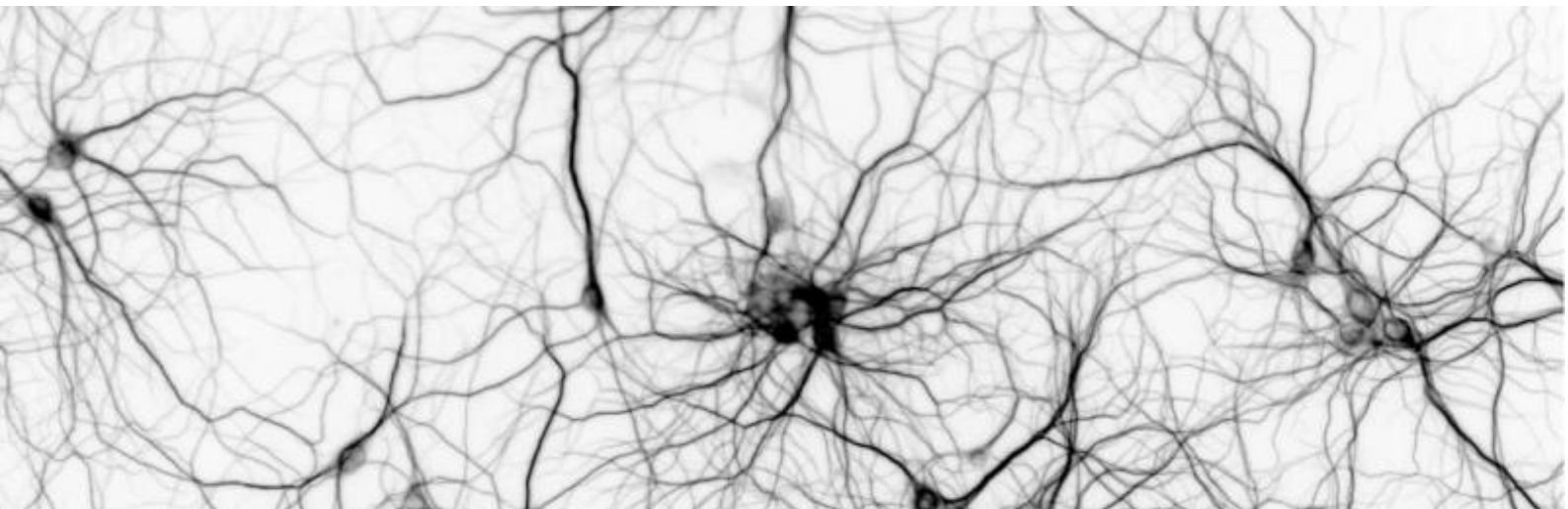
Senka



*"In order to succeed, we must first believe that we can, because
the only way to do great work is to love what you do!"*

Stay hungry, stay foolish"

Steve Jobs



SADRŽAJ

1. UVOD	4
1.1. Interneuroni	1
1.1.1. GABA-ergični interneuroni	1
1.1.1.1. Interneuronski puferski proteini koji vežu kalcij	2
1.1.2. Karakteristike interneurona u pojedinim regijama mozga	5
1.1.2.1. Interneuroni neokorteksa	5
1.1.2.2. Interneuroni malog mozga	6
1.1.2.3. Striatalni interneuroni	6
1.1.2.4. Hipokampalni interneuroni	6
1.3. Gangliozidi	7
1.3.1. Biosinteza gangliozida	7
1.3.2. Sijalotransferaze	11
1.3.3. Razgradnja gangliozida	14
1.4. Genetički preinačeni mišji modeli	14
1.5. Neurološki poremećaji kao posljedica promjene u sastavu interneurona	16
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	18
3. MATERIJAL I METODE	20
3.1. Materijal	21
3.1.1. Pokusne životinje	21
3.2. Metode	22
3.2.1. Izolacija i analiza gangliozida	22
3.2.1.1. Izolacija gangliozida	22
3.2.1.2. Kvalitativna analiza gangliozida	23
3.2.2. Imunohistokemijska analiza	24
3.2.2.1. Prikupljanje uzoraka, disekcija i krioprotekcija mozga	25
3.2.2.2. Priprema rezova mozga za analizu	26
3.2.2.3. Imunohistokemija	26
3.2.3. Western blot analiza	28
3.2.3.1. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)	28
3.2.3.2. Prijenos proteina na membranu	29
3.2.3.3. Imunodetekcija proteina i vizualizacija membrane	29
3.2.4. Statistička analiza podataka	30

4. REZULTATI	31
4.1. Analiza gangliozida u mozgu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	32
4.1.1. Imunohistokemijska distribucija gangliozida	32
4.1.2. TLC i 2D-TLC analiza gangliozida	35
4.2. Analiza interneurona u neokorteksu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	37
4.2.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona	37
4.2.1.1. Analiza primarne motoričke regije	38
4.2.1.2. Analiza primarne osjetne regije	39
4.2.1.3. Analiza primarne vidne regije	40
4.2.1.4. Analiza primarne slušne regije	42
4.2.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona	44
4.2.2.1. Analiza primarne motoričke regije	45
4.2.2.2. Analiza primarne osjetne regije	46
4.2.2.4. Analiza primarne vidne regije	47
4.2.2.3. Analiza primarne slušne regije	48
4.2.3. Distribucija kalbindinskih interneurona	49
4.2.3.1. Analiza primarne motoričke regije	49
4.2.3.2. Analiza primarne osjetne regije	50
4.2.3.3. Analiza primarne vidne regije	51
4.2.3.4. Analiza primarne slušne regije	52
4.2.4. Distribucija kalretininskih interneurona	53
4.2.4.1. Analiza primarne motoričke regije	53
4.2.4.2. Analiza primarne osjetne regije	55
4.2.4.3. Analiza primarne vidne regije	56
4.2.4.4. Analiza primarne slušne regije	57
4.3. Analiza interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	60
4.3.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona	60
4.3.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona	62
4.3.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona	63
4.3.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininskih interneurona	64
4.4. Analiza interneurona u striatumu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	66
4.4.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona	66
4.4.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona	68
4.4.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona	69
4.4.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininskih interneurona	70

4.5. Analiza interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	71
4.5.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona	71
4.5.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona	74
4.5.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona	74
4.5.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininskih interneurona	75
4.6. Western blot analiza proteina koji vežu kalcij u mozgu genetski preinačenih mišjih modela <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	77
5. RASPRAVA	78
5.1. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne motoričke regije neokorteksa <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i> miševa	80
5.2. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne osjetne regije neokorteksa <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	81
5.3. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne vidne regije neokorteksa <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	82
5.4. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne slušna regije neokorteksa <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i>	83
5.5. Analiza proteina koji vežu kalcij u malom mozgu WT, <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i> miševa	85
5.6. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima hipokampusa <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i> miševa.....	88
5.7. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima striatuma <i>St3Gal2</i>, <i>St3Gal3</i> i <i>St3Gal2/3</i> miševa.....	89
6. ZAKLJUČCI	90
7. LITERATURA	92
8. SAŽETAK.....	104
13. SUMMARY.....	106
10. POPIS KRATICA	108
11. PRILOZI	110
11.1 Popis kemikalija korištenih u istraživanju	111
11.2. Postupak priprema otopina korištenih u istraživanju	112
12. ŽIVOTOPIS.....	113

1. UVOD

1. Uvod

1.1. Interneuroni

Živčani sustav ima veći raspon različitih staničnih vrsta nego bilo koji drugi organski sustav. Ljudski mozak izgrađuje najmanje 100 milijardi neurona. Upravo ta činjenica odražava sposobnost živčanog sustava da stvara komplicirane mreže koje pogoduju sve složenijem ponašanju. Neuroni su organizirani u neuronske krugove koji predstavljaju osnovu osjeta, percepcije, kretanja i ponašanja. Svi neuronski krugovi sastoje se od tri funkcionalno različite vrste neurona: aferentnih neurona (prenose informacije od periferije prema mozgu ili leđnoj moždini) i eferentnih neurona (odvode informacije iz mozga), te od **interneurona**. Funkcionalnost interneurona, koje još nazivamo i inhibicijskim neuronima lokalnih krugova, očituje se u stvaranju sinapsi na određenim eferentnim neuronima nakon primanja sinaptičkog signala od strane osjetnih aferentnih neurona. U većini regija središnjeg živčanog sustava (SŽS) postoje različite porodice inhibicijskih interneurona koje imaju specifične uloge u pojedinim neuronskim krugovima¹. Neki od interneurona su ekscitacijski (trnasti neuroni IV sloja moždane kore) - no većina interneurona je inhibicijska. Glavni neurotransmiter interneurona je GABA, a uz to se često služe neuropeptidima kao kotransmiterima². Integracija složenih informacija unutar živčanog sustava zahtjeva koordinirano djelovanje interneurona i ostalih vrsta neurona. Da bi se lakše razjasnila uloga pojedinih interneurona, oni se dijele prema anatomskim obilježjima, funkciji, električnim i kemijskim karakteristikama, odnosno prema genskoj ekspresiji³.

1.1.1. GABA-ergični interneuroni

Interneuroni SŽS-a su većinom inhibicijski i djeluju preko inhibicijskih neurotransmitera gama-aminomaslačne kiseline (engl. *γ-Aminobutyric acid*, GABA) i glicina. Osim u interneuronima GABA se nalazi i u Purkinjeovim stanicama malog mozga gdje predstavlja neurotransmiter projekcijskih neurona. GABA se sintetizira iz glutamata pomoću enzima dekarboksilaze glutaminske kiseline (engl. *glutamic-acid-decarboxylase*, GAD) koji se nalazi gotovo isključivo u GABA-ergičnim neuronima. U mnogim regijama mozga sisavaca GABA-ergični interneuroni imaju odlučujuću ulogu u održavanju funkcionalne ravnoteže, kompleksnosti i građe neuronskih krugova. Nadalje, interneuroni stvaraju i održavaju promjene u neuronskim krugovima, koje osiguravaju strukture za koordinaciju aktivnosti različitih populacija neurona. Velika raznolikost i detalji inhibicije postižu se pomoću različitih tipova interneurona koji imaju specifičnu morfologiju, fiziologiju, sposobnost povezivanja i različite profile genske ekspresije.

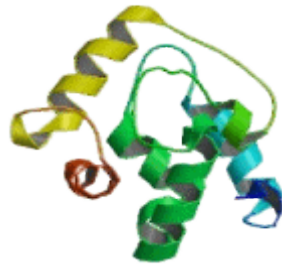
1.1.1.1. Interneuronski puferski proteini koji vežu kalcij

Kalcijevi ioni (Ca^{2+}) koriste se kao važni sekundarni glasnici u mnogim vitalnim staničnim funkcijama. Procesi kao što su oplodnja, kontrakcija mišića, neuronska signalizacija, regulacija staničnog ciklusa i apoptoza ovise o prostorno i vremenski točnoj signalizaciji ovisnoj o kalciju⁴. U neuronima, kalcij ima važnu ulogu u unutrašnjem pobuđivanju stanica, transkripciji gena, otpuštanju neurotransmitera, pokretljivosti i morfologiji neurona, što uključuje rast i grananje dendrita⁵. Kako bi se postigla preciznost u signalizaciji pomoću kalcija, stanice izražavaju specifične proteine koji osiguravaju protok kalcija kroz staničnu membranu. Takve proteine nazivamo puferski proteini koji vežu kalcij (engl. *calcium-binding proteins* - CaBP). Među proteinima koji imaju sposobnost vezanja kalcija, najučestaliji su oni koji pripadaju *EF-hand* porodica proteina⁶. Analizom ljudskog genoma do danas utvrđeno je postojanje 242 takva proteina⁷. Strukturno i funkcionalno *EF-hand* skupina proteina dijeli se u dvije kategorije: Ca^{2+} osjetni/modulatorni (npr. kalmodulin i S100 proteini) i Ca^{2+} puferski proteini (npr. parvalbumin i kalbindin)⁸. Osnovna razlika između modulatornih i puferskih proteina je u strukturnim konformacijskim promjenama nakon vezanja Ca^{2+} . Modulatorni proteini imaju značajne strukturne promjene nakon vezanja kalcija, dok puferski proteini tek male strukturne promjene, što im, uz veliki afinitet prema kalciju, osigurava pufersku aktivnost⁹. Osim navedenog, puferski proteini sudjeluju u kontroli prostorno vremenskog opsega djelovanja Ca^{2+} signalizirajućih domena¹⁰, dok modulatorni osim u kontroli slobodnog unutarstaničnog Ca^{2+} , sudjeluju i u pokretanju Ca^{2+} ovisne signalizacije¹¹. Najčešći puferski proteini za kalcij koji ujedno pripadaju GABA-ergičnoj potporodici interneurona su: parvalbumin (PV)¹², kalbindin (CB) i kalretinin (CR)¹³. Ujedno, navedena tri proteina služe i kao klasični markeri različitih potporodica interneurona. Novija istraživanja ukazuju da navedeni proteini osim puferske imaju i određenu modulatornu funkciju.

1. Uvod

Parvalbumin

Parvalbumin je protein (MW 9-11 kDa) koji osim kalcija ima i sposobnost vezanja magnezija. Građen je od tri domene: AB, CD i EF od kojih svaka ima 2 α uzvojnice (Slika 1), a samo EF domena ima sposobnost vezanja¹⁴. Prisutan je u mišićima, mozgu, bubrezima, testisima i masnom tkivu. Osnovna funkcija PV je zaštita stanice od prevelikog nakupljanja kalcija što bi na kraju dovelo do značajnog oštećenja stanice, posebno u živčanom sustavu. Osim toga, ima indirektnu ulogu u određivanu brzine nastajanja i dužine trajanja signala, a moguća je njegova uloga i u staničnom ciklusu i rastu stanica. Većinom se nalazi u neuronima koji odašilju akcijske potencijale velikom učestalošću gdje PV brzo puferira Ca^{2+} i na taj način sprječava aktivaciju posebne skupine K^+ kanala ovisnih o Ca^{2+} jer bi u suprotnom aktivacija tih kanala dovela do smanjenja podražljivost i produljenja refrakternog razdoblja. Također PV-ska protutijela generalno označavaju stanice sa debelim, mijeliziranim aksonima koji imaju ciljane projekcije¹⁵.

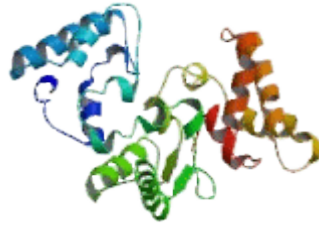


Slika 1. Struktura parvalbumina. (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://www.uscnk.com/>)

Kalbindin D-28k

Kalbindin, kalcij vezujući protein građen od ukupno šest *EF-hand* domena od kojih četiri imaju sposobnost vezanja Ca^{2+} ¹⁶. Prvo je otkriven u crijevima ptica. Kod sisavaca je prisutan u većini tkiva, posebno u bubrezima, mozgu i leđnoj moždini. Protutijela na CB generalno označavaju stanice s tankim, nemijeliniziranim aksonima koje imaju difuznu projekciju¹⁷. Do sada je dokazano da CB ima tri funkcije: predstavlja mobilni ili dijelomično imobilizirani Ca^{2+} pufer s afinitetnom aktivnošću, puferira difuziju i transport Ca^{2+} , te ostvaruje interakciju s ciljanim proteinima koji sudjeluju u procesima modulacije, kao što je blokada različitih pro-apoptičkih signalnih putova¹¹.

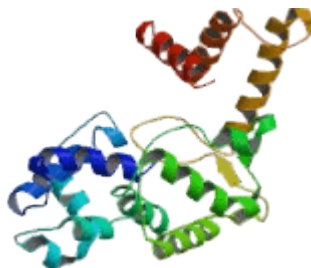
1. Uvod



Slika 2. Struktura kalbindina. (Slika preuzeta i prilagođena sa <http://www.uscnk.com/>)

Kalretinin

Kalretinin je visoko konzervirani protein koji se još naziva i kalbindin-D29k jer je u 58% homologan sa kalbindinom-D28k. Građen je od ukupno šest *EF-hand* domena: pet aktivnih kalcij vezujućih domena¹⁸ i jedne koja je izgubila sposobnost vezanja Ca^{2+} ¹⁹. Osim kalcija, CR ima sposobnost vezanja cinka i bakra²⁰. CR je prisutan u udaljenim neuronskim populacijama u različitim regijama mozga. Najviše ga se može pronaći u retini i granularnom sloju malog mozga. Biokemijske karakteristike su dobro poznate, dok su funkcije još uvijek slabo istražene. Neuroprotektivna uloga CR jako je dobro istražena²¹⁻²³. Funkcija CR-a ovisi o različitim parametrima kao što su tip neurona i razvojni stadij. Najviše je istražena funkcija CR-a u malom mozgu, gdje je CR izražen u granularnom sloju. Nedostatak CR-a uzrokuje povećanu ekscitaciju²⁴, što u konačnici dovodi do poremećaja u motoričkoj koordinaciji²⁵.

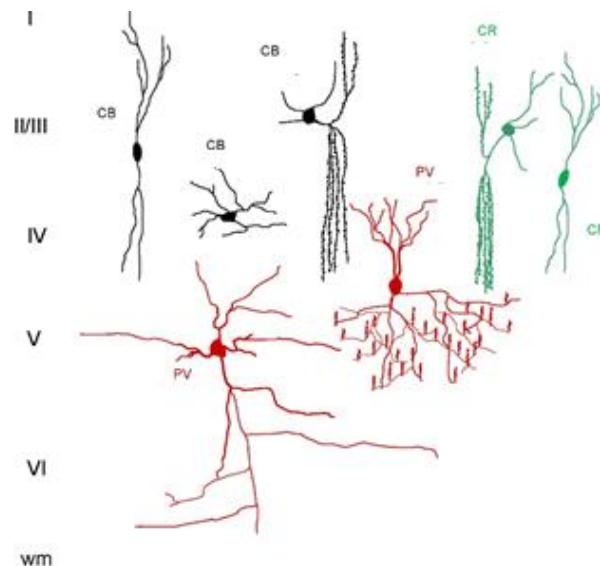


Slika 3. Struktura kalretinina. (Slika preuzeta i prilagođena s <http://www.uscnk.com/>)

1.1.2. Karakteristike interneurona u pojedinim regijama mozga

1.1.2.1. Interneuroni neokorteksa

U kori velikog mozga nalazimo dva tipa neurona: ekscitacijske piramidalne stanice (70-80%) i inhibicijske interneurone (20-30%)²⁶, koji u većini slučajeva koriste glutamat i GABA-u kao neurotransmitere. Interneuroni kore velikog mozga su stanice s kratkim aksonima, odnosno s aksonima koji ne izlaze iz neokorteksa³. Tijelo neurona je smješteno u kori velikog mozga, a imaju ulogu u kontroli i sinkronizaciji signala koji dolazi od piramidalnih stanica. Smješteni su u svim slojevima kore velikog mozga, posebno u IV. sloju. Utjecaj GABA-ergičnih interneurona na piramidalne stanice ovisi o podvrsti interneurona i njihovom smještaju unutar kore velikog mozga²⁷. Postoje različite podjele interneurona, jedna od njih temelji se na neuropeptidima koje sintetiziraju uz GABA-u. Na temelju prisutnosti proteina koji vežu kalcij dijelimo ih na: parvalbuminske košaraste i Chandelier stanice koje odašilju akcijske potencijalne velikom učestalošću i nalaze se u IV. i V. sloju kore, kalbindinske bipolarne i multipolarne stanice smještene u I., II i III. sloju i CR-ske bipolarne stanice smještene I-IV sloju kore. PV-ski interneuroni sudjeluju u signalizaciji između kolumni, dok su CB-ski i CR-ski interneuronu uključeni u signalizaciju unutar pojedinačnih kolumni²⁸. Morfološki različiti tipovi stanice izražavaju različite protein koji vežu kalcij, ali se i međusobno preklapaju²⁹.



Slika 4. Shematski prikaz osnovnih tipova interneurona koji sadrže proteine koji vežu kalcij (Slika preuzeta i prilagođena od Raghathi, 2010).

1.1.2.2. Interneuroni malog mozga

Mali mozak kontrolira motoričku aktivnost. Živčane stanice malog mozga s brzim okidanjem imaju visoki priljev Ca^{2+} iona, te je zbog toga regulacija kalcija esencijalna u izbjegavanju brze smrti neurona kao posljedica prevelike ekscitacije³⁰. Većina Purkinjeovih stanica u aksonima, tijelima stanica, dendritima i sinapsama izražava PV i CB³¹, dok košaraste, zvjezdaste i Golgi stanice izražavaju samo PV. Pojava ovih proteina u neuronima prati sazrijevanje neurona. CB se javlja prije početka migracije i diferencijacije, dok se PV pojavljuje povećanjem neuronske aktivnosti³⁰. CR nalazimo u granularnim stanicama malog mozga i njihovim projekcijskim aksonima. Ishodišne stanice GABA-ergičnih interneurona nisu ograničene u svom razvojnom potencijalu i stvaraju različite zrele fenotipove prikladne za dob i položaj³¹.

1.1.2.3. Striatalni interneuroni

Striatum je glavni dio bazalnog ganglija povezan sa motoričkim i kognitivnim funkcijama. Striatalni projekcijski neuroni čine gotovo 95% svih neurona u striatumu glodavaca, dok kolinergični interneuroni čine samo 0,5% neurona. Ostatak od 3-4% čine različite podporodice GABA-ergičnih interneurona, od čega PV interneuroni čine 0,7%, a CR 0,5%³². PV interneuroni nisu homogeno raspoređeni u striatumu i svi su brzo okidajući. Interneuroni prisutni u striatumu su većinom aspinozni, a oni koji imaju aksone ne projiciraju izvan striatuma, te čine 5-10% od ukupnih neurona striatuma. GABA-ergični striatalni interneuroni karakteristični su po tome što izražavaju istovremeno PV i CR³³. Striatum je glavno ciljno mjesto aferentnih neurona kore velikog mozga i talamusa. 90% striatalnih neurona su projekcijski od čega oko 45% projicira u *globus pallidus*, a ostatak uglavnom u *substantia nigra*.

1.1.2.4. Hipokampalni interneuroni

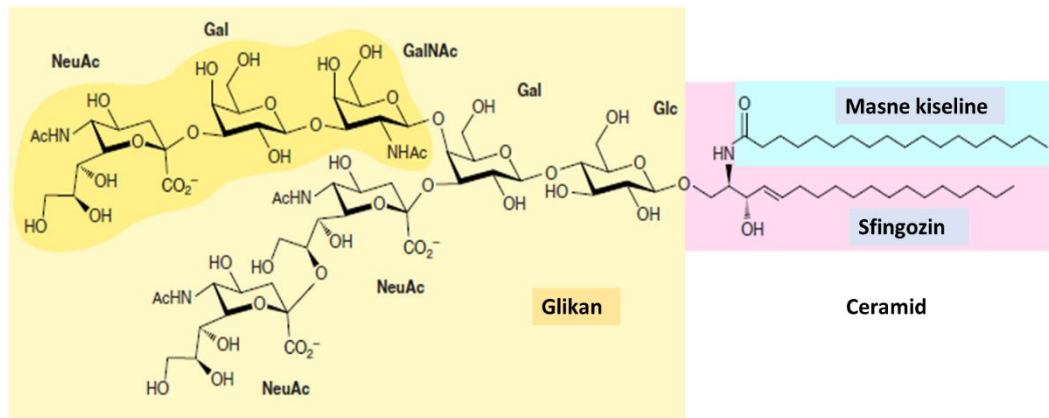
Hipokampus je dio mozga povezan s emocijama i dugoročnim pamćenjem. Interneuroni hipokampusa djeluju inhibicijski u razvijenom mozgu, kontrolirajući tako aktivnost ekscitatornih stanica³⁴. Interneuroni koji eksprimiraju proteine koji vežu kalcij (PV, CB i CR) u razvijenom hipokampusu se međusobno ne preklapaju. Košaraste i Chandelier stanice izražavaju PV³⁵, a CB se nalazi u interneuronima koji se spajaju s dendritima piramidalnih stanica³⁶. Određeni interneuroni hipokampusa izražavaju i CR.

1. Uvod

1.3. Gangliozidi

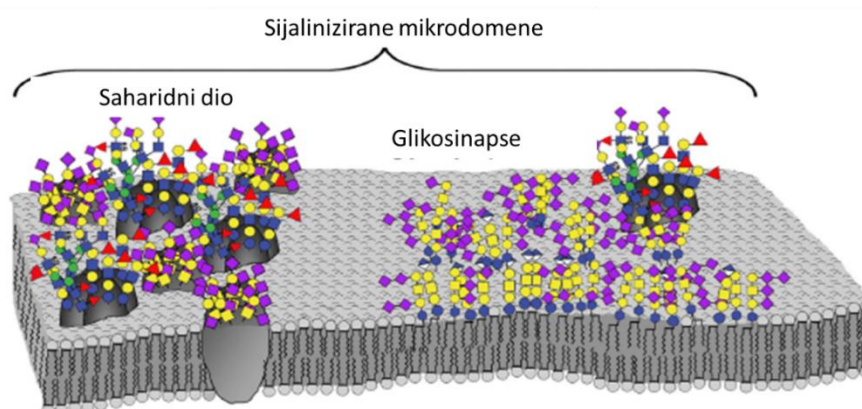
1.3.1. Biosinteza gangliozida

Gangliozidi su glikosfingolipidi građeni od glikana (polarne ugljikohidratne jedinice) spojenih sa ceramidom koji predstavlja lipidni dio molekule kojim su gangliozidi usidreni u vanjski sloj stanične membrane. Ceramid je izgrađen od sfingozinske baze, koja na sebi ima vezane različite dugolančane masne kiseline (Slika 5).



Slika 5. Strukturna građa gangliozida GT1b. (Slika preuzeta i prilagođena od Schnaar i sur., 2014).

Na glikan su vezane jedna ili više molekula sialinske kiseline (SA)³⁷ što predstavlja osnovnu razliku između gangliozida i ostalih glikosfingolipida. Karakteristike sfingolipida ovise o prirodi njihovih lipidnih domena. Sfingozidni lanac gangliozida u mozgu sisavaca obično je građen od 18-20 ugljikovih atoma. Takva građa omogućava postojanje relativno čvrste strukture uzduž vanstaničnog dijela stanične membrane i time osigurava međusobne lateralne interakcije (Slika 6).



Slika 6. Prostorna organizacija sialiniranih mikrodomena (Slika preuzeta i prilagođena od Schnaar i sur., 2014).

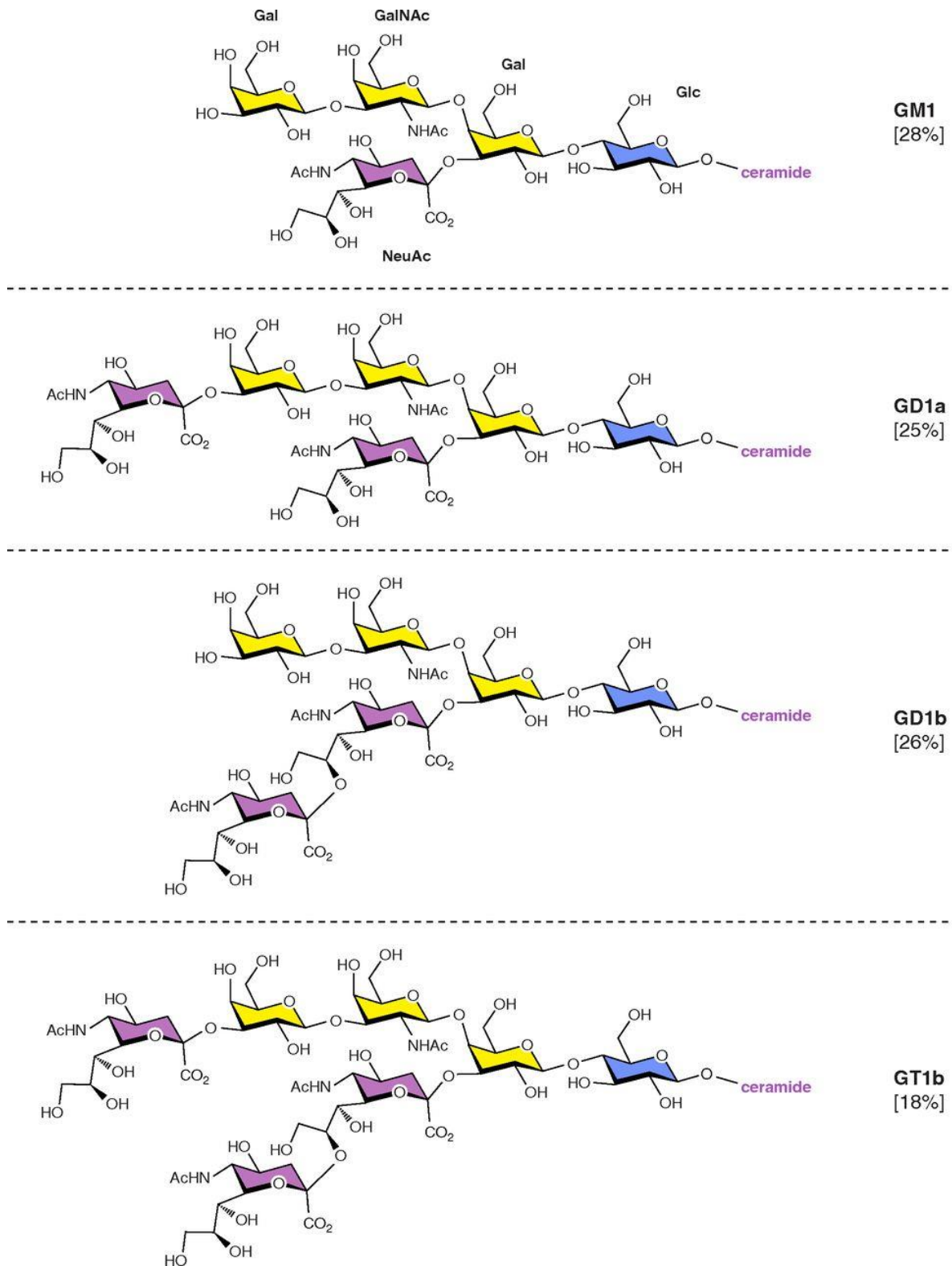
1. Uvod

Domene bogate gangliozidima sadrže i druge sfingolipide, kolesterol, glikozilfosfatidilinozitol vezane membranske proteine i transmembranske protein³⁸. Ta područja nazivamo lipidnim raftovima, glikolipidima bogate mikrodomene ili membrane otporne na deterdžente³⁹. Gangliozidi su prisutni u svim tkivima kralježnjaka, ali količinom i strukturnom raznolikošću dominiraju u mozgu. Gangliozidi imaju dio usidren u staničnu membranu i glikan koji je slobodan u izvanstaničnom prostoru što im osigurava različite funkcije.

Glikolipidi predstavljaju 80% ukupne mase glikana u mozgu od čega gangliozidi nose 75% SA. U mozgu odraslih sisavaca i ptica dominiraju četiri osnovna gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b, koji zajedno čine 97% gangliozida mozga⁴⁰. Navedeni gangliozidi dijele isti glikanski neutralni dio (Gal β 1–3 GalNAc β 1–4 Gal β 1–4 Glc β 1–1 Cer), a međusobno se razlikuju po broju molekula vezane SA i mjestu njihova vezanja – na unutrašnjoj ili vanjskoj galaktozi (slika 7). Biosinteza gangliozida odvija se u koracima, pomoću glikoziltransferaza (Slika 8) koje su tipične samo za glikolipide ili supstrat dodaju i na glikoproteine. Prvi korak je sinteza ceramida (Cer) pomoću enzima serin-palmitoil transferaze na membrani endoplazmatskog retikuluma⁴¹. Pomoću enzima glukozilceramid-sintaze nastaje glukozilceramid (GlcCer). Daljnjim dodavanjem galaktoze (Gal) pomoću enzima galaktoziltransferaze nastaje laktozilceramid⁴² iz kojeg se onda sintetizira većina gangliozida koje karakterizira prisutnost SA. Razlikujemo nekoliko serija gangliozida ovisno o broju molekula SA na unutrašnjoj galaktozi. 0-serija nema vezanu SA na unutrašnjoj galaktozi, a-serija ima jednu, b-serija dvije, a c-serija ima tri.

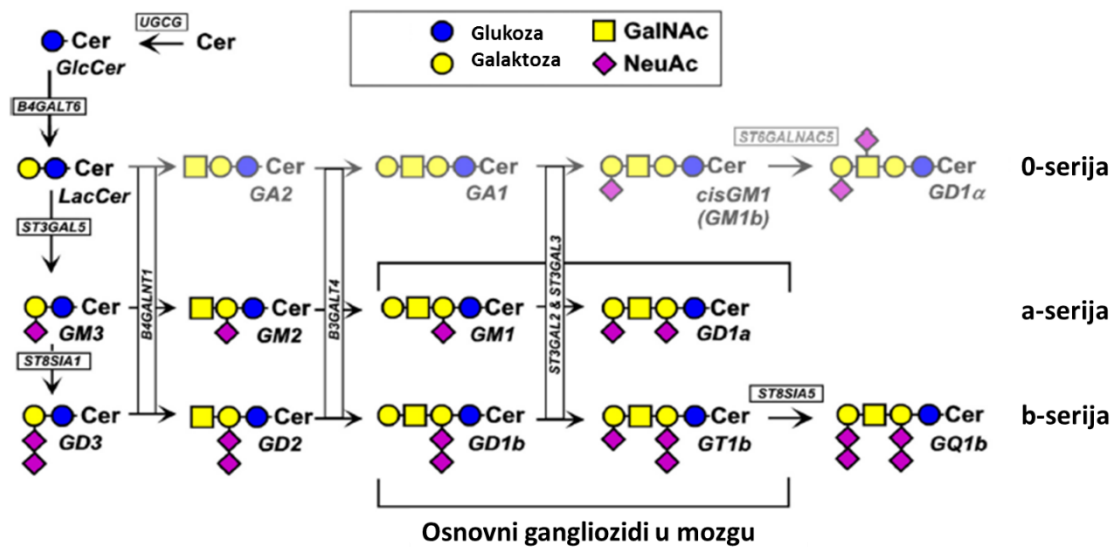
S obzirom na složenost gangliozida Lars Svennerholm uveo je jednostavniju nomenklaturu od IUPAC imena. Prema tome označavanju slovo „G“ označa gangliozid, iza čega su slova koja označavaju broj SA koje gangliozid sadrži: „M“ = jedna; „D“ = dvije; „T“ = tri; „Q“ = četiri ; „P“ = pet. Brojevi nakon toga označavaju duljinu ugljikohidratnog lanca koji je vezan za ceramid, odnosno kromatografsku pokretljivost pojedinog gangliozida: 1 = Gal-GalNAc-Gal-Cer; 2 = GalNAc-Gal-Glc-Cer; 3 = Gal-Glc-Cer. Na kraju je malo slovo (a, b ili c) koje označava seriju gangliozida. Za svaki tip koji nastaje između supstrata i SA karakteristična je jedna ili više sijalotransferaza.

1. Uvod



Slika 7. Struktura 4 osnovna gangliozida u mozgu sisavaca⁴⁰.

1. Uvod



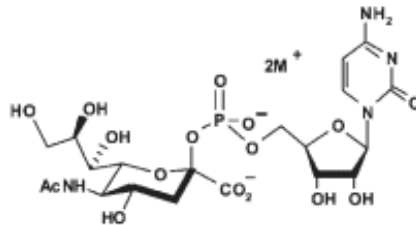
Slika 8. Biosinteza gangliozida mozga.

U mozgu sisavaca i ptica dominiraju 4 gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b) koji ujedno čine 97% gangliozida u mozgu čovjeka⁴³. Za gangliozide je karakteristična raspodjela ovisna o dobi i regiji mozga, te se mogu koristiti kao biljezi razvojnih faza⁴⁴. Gangliozidi nisu ravnomjerno raspoređeni u membranama. Većinu nalazimo unutar posebnih membranskih mikrodomena – lipidnih splavi. Smještaj gangliozida unutar membrane omogućava širok raspon njihovih funkcija. U literaturi prevladava mišljenje da je biosinteza gangliozida od vitalnog značenja za normalno funkcioniranje stanica i tkiva⁴⁵. Specifični gangliozidi stupaju u interakcije s transmembranskim receptorima i provoditeljima signala koji su ključni za staničnu adheziju i signalizaciju sa svrhom reguliranja staničnog rasta, proliferacije, diferencijacije i apoptoze⁴⁶. Također su bitni u interakcijama između stanica i izvanstaničnog matriksa, međustaničnim interakcijama, te interakcijama između stanica i drugih molekula. Primjerice, vezanje MAG (engl. *myelin associated glycoprotein*) i gangliozida osigurava optimalnu interakciju između aksona i mijelina, pojačava dugoročnu stabilnost veze aksona i mijelina i inhibira aksonsko izrastanje nakon ozljede⁴⁷, dok nedostatak određenih gangliozida dovodi do neurodegeneracije putem pojačane aktivacije sustava komplementa i posljedične upale⁴⁸. Nedostatak većine ili svih kompleksnih gangliozida u miševa uzrokuju ozbiljne poremećaje i različita neurodegenerativna stanja.

1. Uvod

1.3.2. Sijalotransferaze

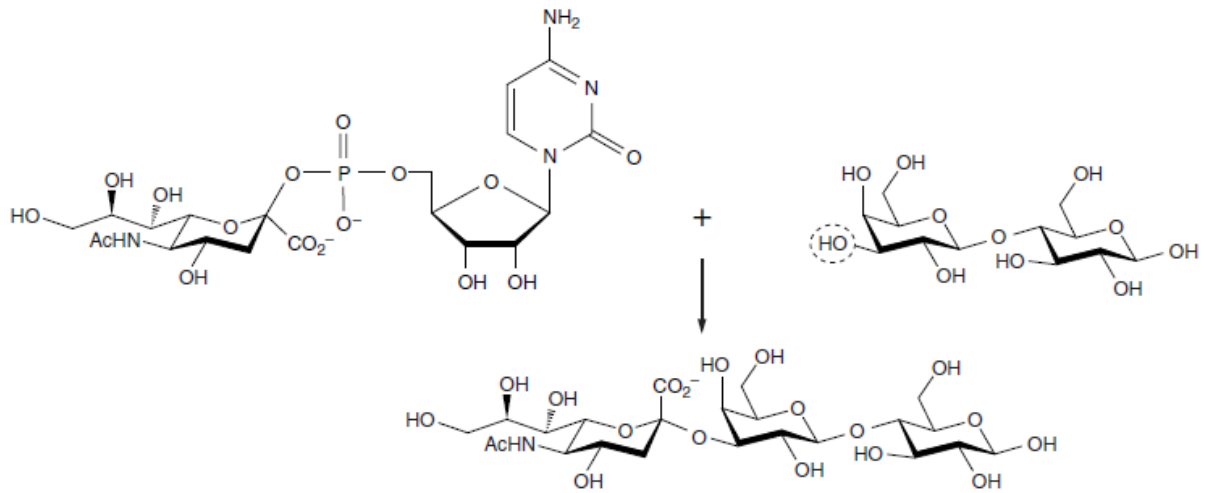
Sijalotransferaze predstavljaju važnu grupu enzima koja prenosi sijalinsku kiselinu s citidin monofosfat – Neu5-Ac na različite supstrate. Mišji i ljudski genom kodira šest α 2-3 sijalotransferaza (ST3Gal1 do ST3Gal6)⁴⁹. Sijaloglikani se sintetiziraju pomoću enzima sijalotransferaza (ST). One pripadaju skupini glikoziltransferaza koje koriste CMP-Neu5Ac (Slika 9) kao aktivirani donor šećera kako bi katalizirali prijenos SA na hidroksilnu skupinu terminalnog nereduciranog dijela oligosaharidnog lanca glikoproteina i glikolipida (Slika 10). Reakcija djelovanja ST može se prikazati formulom:



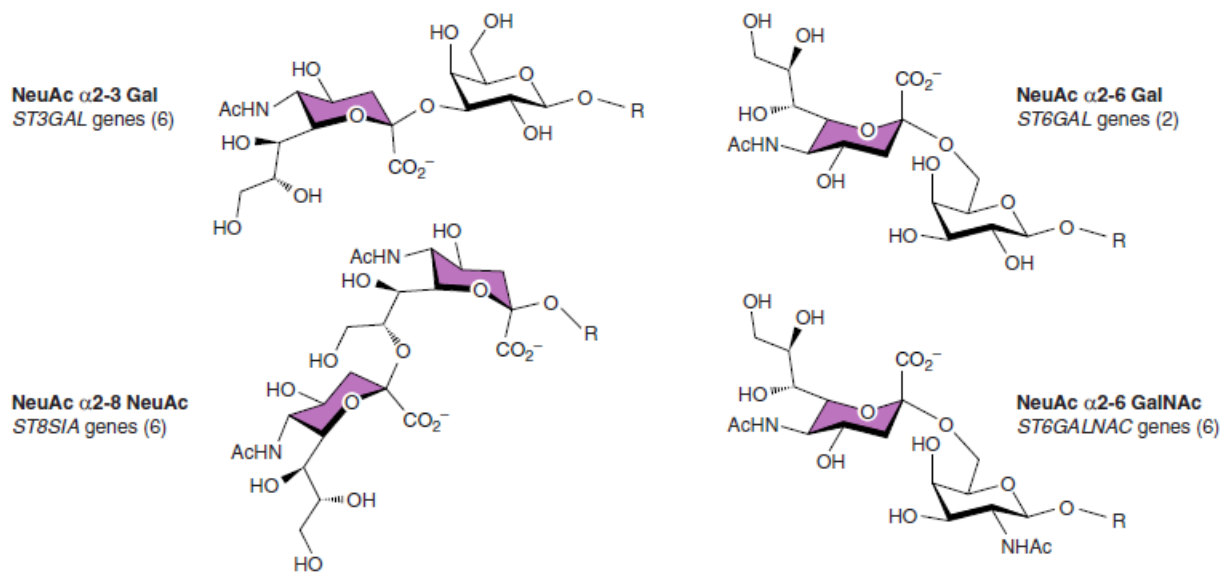
Slika 9. Strukturna formula CMP-Neu5Ac, $K_m = 46 \mu\text{M}$.

Kod sisavaca je do sada otkriveno 20 različitih ST koje omogućavaju stvaranje različitih kovalentnih veza (α 2-3, α 2-6 i α 2-8) temeljem čega ih dijelimo u 4 osnovne skupine: ST3Gal, ST6Gal, ST6GalNAc i ST8Gal (Slika 11 i 12a) koje su specifične s obzirom na substrat⁵⁰. Godine 1996., Horenstein je postavio teoriju prema kojoj se reakcija dodavanja ST odvija preko S_N1 mehanizma (Slika 10), prema kojem se CMP grupa, većinom, odvaja prije nukleofilnog napada.

1. Uvod



Slika 10. Mehanizam katalitičke reakcije sijalotransferaza ³⁹

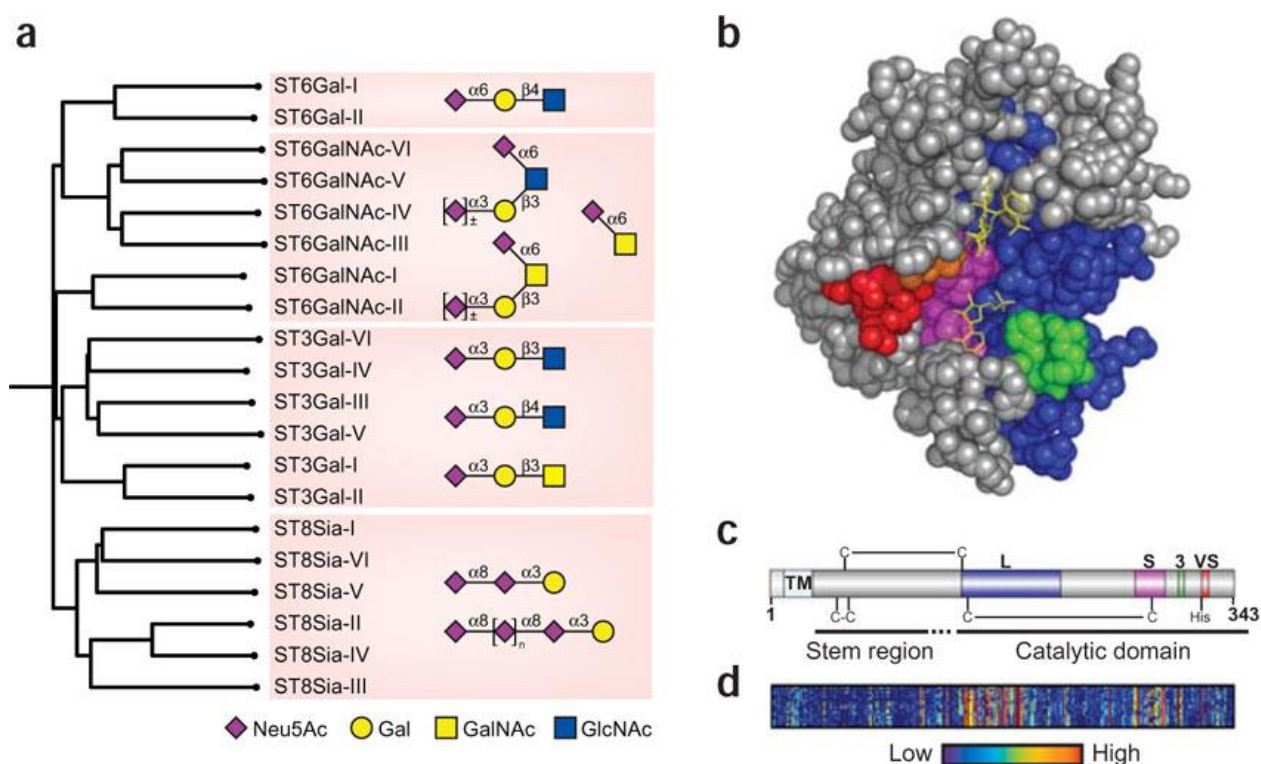


Slika 11. Prikaz strukturnih razlika između 4 osnovne skupine ST na temelju veze koju stvaraju³⁹.

1. Uvod

Osnovna funkcija ST je prepoznavanje i sinteza različitih sijaliziranih oligosaharidnih lanaca, dok su njihova struktura i specifičnost za supstrat još uvijek nedovoljno istražene.

Pripadaju tipu II transmembranskih glikoproteina koje se prvenstveno nalaze u *trans*-Golgi mreži⁵¹. Sve ST kralješnjaka imaju sličnu građu (Slika 12b). Građene su od četiri iste domene: velike, male, jako male i domene 3. Navedene domene uključene su u formiranje osnovnih disulfidnih veza, prepoznavanje donorskog i akceptorskog substrata⁵², te u katalitičku aktivnost. Imaju kratki N-terminalni citoplazmatski dio, jedinstvenu transmembransku domenu, varijabilnu osnovu (20 – 200 aminokiselina) i dugačku katalitičku domenu (Slika 12c). Domene služe za identifikaciju ST kod animalnih modela. Geni ST građeni su od različitih egzona koji su prisutni u humanom⁵³ i mišjem genomu⁵⁴. ST su klonirane od različitih organizama, od bakterije do čovjeka⁵¹. Sve životinjske ST pripadaju istoj CAZy obitelji glikoziltransferaza.



Slika 12. (a) Dendrogramski prikaz 20 enzima koji pripadaju obitelji sijalotransferaza sisavaca. Produkti četiri osnovne grupe sijalotransferaza prikazani su u obliku simbola. (b) CPK prikaz građe 4 osnovne zajedničke sijalotransferaza: velika (L, plavo); mala (S, magenta); 3 (3, zeleno) i jako mala (VS, crveno). Vezani akceptorski ligand (žuto) i katalitički dio His319 (narančasto). (c) Lokalizacija domena u primarnoj sekvenci pST3Gal1; boje označavaju isto kao na slici b)⁵⁵.

1.3.3. Razgradnja gangliozida

Lizosomalna razgradnja gangliozida odvija se nakon endocitoze dijelova membrane na površini luminarnih unutarlizosomalnih vezikula i membrana. Proces zahtjeva interakciju nespecifičnih hidrolaza i proteina koji vežu lipide⁵⁶. Razgradnja započinje djelovanjem sialidaza i egzoglikohidrolaza koje uklanjaju pojedinačne SA i monosaharidne jedinice s nereducirajućeg kraja glikanskog lanca gangliozida formirajući Cer koji se naknadno može razdvojiti na dugi osnovni lanac i masne kiseline pomoću ceramidaza. Navedeni postupak se uzastopno ponavlja, što objašnjava različite bolesti koje su povezane s poremećajem u ovom signalnom putu⁵⁷. Takva razgradnja odvija se preko endocitozno-endosomno-lizosomskog puta te zahtijeva kiseli pH unutar organela. Uz sialidaze i egzoglikohidrolaze različite reakcije zahtijevaju i raznovrsne efektorne molekule koje nazivamo “sfingolipidni aktivacijski proteini” kao što su saponini i specifični GM2 aktivacijski protein⁵⁸.

Poznate su 4 sialidaze kod čovjeka, kodirane genima NEU1-NEU4⁵⁹. Za razliku od ST, sialidaze nisu toliko specifične s obzirom na vezu i smještaj u stanici. NEU1 koja je najzastupljenija u sisavaca, nalazi se prvenstveno unutar lizosoma i katalizira reakcije na glikolipidima, oligosaharidima, ali ne i gangliozidima. NEU2 je citoplazmatska, aktivna oko neutralnog pH i uklanja SA s različitih glikana. NEU3 je karakteristična za gangliozide i nalazi se u staničnoj membrani.

1.4. Genetički preinačeni mišji modeli

Budući da gangliozidi dominiraju površinom živčanih stanica i njihova struktura se mijenja tijekom razvoja mozga, te se smatra da su regulatori unutarstaničnih interakcija u mozgu. Gangliozidi mogu stupiti u lateralne interakcije, unutar lipidnih splavi (*cis* interakcije), te u interakcije s molekulama na drugim stanicama (*trans* interakcije)⁶⁰. Neke od glavnih funkcija gangliozida su ostvarivanje interakcije između aksona i mijelina, regulacija procese rasta i stanične diferencijacije^{61,62}, sudjelovanje u dugoročnoj potencijaciji (engl. *long-term-potentiation*, LTP)⁶³, poticanje ili suzbijanje migracije stanica⁶⁴ i vezanje patogena⁶⁵. Gangliozidi GD1a i GT1b su funkcionalni ligandi za mijelinu pridruženi glikoprotein MAG (eng. *myelin-associated glycoprotein*)⁶⁶. Kako bi se istražile funkcionalne uloge gangliozida razvijeni su genetički preinačeni mišji modeli sa deficijentnom sintezom gangliozida⁶⁷. Postoji nekoliko različitih mišjih modela s utišanim genima za sintezu gangliozida. Postoje mutacije koje dovode do blokade u sintezi svih gangliozida (*Ugcg-null*, *B4galnt1/St3gal5-double null*), te one koje blokiraju sintezu samo određenih gangliozida (*St3gal5*, *St8sia1*, *B4galnt1*, *St3gal2*,

1. Uvod

St3gal3). Kod djelomične blokade u sintezi gangliozida ukupna količina gangliozida se ne mijenja³⁹. Kod divljeg tipa miša (*WT*, eng. wild tipe) eksprimiraju se sva četiri osnovna gangliozida (GM1, GD1a, GD1b i GT1b).

U ovom istraživanju korišteni su genetski modificirani miševi koji imaju utišane gene za pojedine sialotransferaze, te iz tog razloga ne sintetiziraju specifične gangliozide. Genetske preinake odnosi se na isključivanje pojedinih gena odgovornih za sintezu enzima α 2-3 sialotransferaze. Geni *St3Gal1* do *St3Gal4* odgovorni su za sintezu enzima koji sudjeluju u sintezi GD1a i GT1b iz GM1 i GD1b³⁹. Kada je ekspresija gangliozida analizirana u odraslih miševa sa isključenim genima *St3Gal1* do *St3Gal4* primjećeno je da se samo oni s isključenim genom *St3Gal2* bitno razlikuju od *WT*-a, eksprimirajući samo pola od ukupnog broja GD1a i GT1b³⁹. Istovremeno kod njih se javlja povećana ekspresija GM1 i GD1b. *St3Gal2* miševi nemaju vidljivih neuroloških deficita. *St3Gal3* miševi se po sastavu gangliozida ne razlikuju od *WT* miševa, ali kod njih dolazi do nesindromskih intelektualnih smetnji⁶⁸ i razvoja West sindroma⁶⁹. Miševi sa isključena oba gena *St3Gal2* i *St3Gal3* imaju 97% smanjenu ekspresiju gangliozida sa sialinskom kiselinom na terminalnoj galaktozi⁷⁰. Kod njih se javlja potpuni nedostatak GT1b i GQ1b, smanjena ekspresija GD1a, te izrazito povećana ekspresija GM1 i GD1b. Temeljem toga, jasno je da enzim ST3Gal-III sudjeluje u biosintezi *in vivo*, te da je prvenstveno odgovoran za terminalnu α 2-3 sijalizaciju gangliozida u nedostatku enzima ST3Gal-II. Ukupna ekspresija gangliozida u miševa s isključenim oba gena *St3Gal2/3* je bila jednaka kao u *WT* miševa, ali je sializacija bila smanjena za pola⁷⁰. Zaključak svega je da su produkti gena *St3Gal2* i *St3Gal3* uvelike odgovorni za terminalnu alfa2-3 sializaciju, sintetizirajući glavne gangliozide u mozgu, GD1a i GT1b⁷⁰. Otprilike polovina ukupne količine sialinske kiseline u mozgu vezana je za gangliozide GD1a i GT1b. Mišje mutacije koje rezultiraju nedostatkom određenih gangliozida variraju od blagog do letalnog fenotipa⁷¹. Fenotipski *St3Gal2* miševi su robusni, slični divljem tipu, dok su *St3Gal3* miševi slabiji od njih, manji kod dojenja i loši roditelji. U usporedbi sa *St3Gal3* miševima, *St3Gal2/3* miševi su još manji, slabiji, rijetki preživljavaju više od 8 tjedana te se jako teško razmnožavaju ukoliko i dođu u reprodukcijisku dob⁷⁰. Gledajući i uspoređujući reflekse stražnjih nogu, u onih s isključenim *St3Gal2* genom su normalni u usporedbi s *WT* miševima. U onih s isključenim *St3Gal3* genom su bili djelomično umanjeni, dok su kod miševa s isključena oba gena, *St3Gal2* i *St3Gal3*, refleksi stražnjih nogu su jako umanjeni, gotovo ih nema. Pretpostavlja se da neke od stanica koje tangencijalno migriraju koriste dolazna kortikofugalna vlakna kao vodiče.

1. Uvod

U mozgu WT miševa *O*-acetilirane forme GD1b su jako slabo zastupljene, dok *O*-acetiliranih formi GT1b i GQ1b ima više. Kod *St3Gal2/3* miševa značajno se povećava *O*-acetilacija GD1b⁷⁰. Do sada je u nekoliko studija dokazano da je distribucija gangliozida 9-*O*-acetyl GD3 vremenski i prostorno u korelaciji sa migracijom i rastom neurona centralnog i perifernog živčanog sustava te je na temelju toga postavljena hipoteza kako gangliozidi imaju važnu ulogu u kritičnim koracima u procesu migracije neurona². Također, dokazano je da je gangliozid 9-*O*-acetyl GD3 visoko izražen u lateralnom ventrikulu subventrikularne zone i kroz cijeli put tangencijalne migracije u olfaktorni bulbus tijekom razvoja. Druga mogućnost je da je ovih genetičkih mutacija deficitarno tangencijalno navođenje posredovano c-serijom polisijalogangliozida. Ova serija polisijalogangliozida dobiva se u nastavku 'b' i 'c' sintetskih putova, a ima ulogu u navođenju stanica koje pužu duž 'sub-plate' neurona.

1.5. Neurološki poremećaji kao posljedica promjene u sastavu interneurona

Poremećaji u funkciji interneurona povezani su sa različitim neurološkim i psihijatrijskim poremećajima kao što su epilepsija, shizofrenija i autizam⁷². Gangliozidi su uključeni u patologiju mnogih bolesti, kao što su Alzheimerova bolest, Parkinsonova bolest, Tay-Sach-ove bolesti, epilepsija⁵⁸. Studije na glodavcima, modelima epilepsije, predlažu da progenitorni graftovi GABA-ergičnih interneurona imaju sposobnost redukcije hiperekscitabilnosti i napada kod epilepsije temporalnog režnja⁷³. Transplantacija inhibitornih neurona u hipokampus odraslog miša koji boluje od epilepsije u vrijeme graftinga značajno smanjuje napade i obnavlja bihevioralne deficite vezane za prostorno snalaženje, hiperaktivnost i agresiju⁷⁴. GABA-ergični neuroni imaju bitnu ulogu u pravilnom sazrijevanju neuronskih krugova tijekom postnatalnog razvoja. Određena istraživanja ukazuju na to da su neuroni bogati proteinima koji vežu kalcij relativno otporni na degeneraciju kod različitih akutnih i kroničnih poremećaja, dok druga istraživanja podupiru tezu da nedostatak proteina koji vežu kalcij također može imati neuroprotektivnu ulogu⁷⁵.

Epilepsija

Razvoj epilepsije je možda jedna od najvažnijih intuitivnih posljedica disfunkcije interneurona. Kod pacijenata sa kroničnom epilepsijom javlja se gubitak hipokampalnih PV interneurona⁷⁶ te dolazi do promjena aksonalnih projekcija PV pozitivnih Chandelier stanica⁷⁷. Još uvijek nije točno utvrđeno jesu li ove promjene uzrok ili posljedica učestalih epileptičkih napada.

Shizofrenia

Shizofrenija je kompleksni psihijatrijski poremećaj koji se javlja kod 1% svijetske populacije⁷⁸. Budući da još uvijek nije otkriven gen odgovoran za shizofreniju, smatra se da je bolest posljedica interakcije genetičkih, razvojnih i okolišnih čimbenika². Mogućnost da poremećaj u GABA-ergičnom prijenosu signala utječe na pojavu shizofrenije temelji se na istraživanjima koja su pokazala da su kod oboljelih u kori velikog mozga smanjene koncentracija GABAe⁷⁹ i GADa⁸⁰. Smanjenje GABAe ne utječe jednako na ekspresiju svih tipova interneurona⁸¹. Inhibicija projekcija od košarastih interneurona koji eksprimiraju PV prema perisomatskim regijama ekscitacijskih neurona ključna je za sinkronizaciju neuronske aktivnosti⁸². Kod shizofrenije dolazi do smanjenja broja interneurona koji eksprimiraju PV².

Autizam

Autizam je razvojni poremećaj mozga koji pripada grupi poremećaja iz autističnog spektra, koje karakteriziraju abnormalnosti u socijalnoj interakciji i komunikaciji, ograničenim interesima i ponavljajućim postupcima⁸³. Uloga interneurona u autizmu prvi put je spomenuta 2003.g. uočavanjem poremećaja u ravnoteži između ekscitacije i inhibicije⁸⁴. Postmortalne analize oboljelih od autizma dokazale su povećanu količinu PV interneurona i smanjenu količinu i promjenu u distribuciji GABA-ergičnih receptora u hipokampusu⁸⁵. Osim u hipokampusu abnormalnosti u distribuciji GABA-ergičnih neurona uočene su i u Purkinjeovim stanicama u malom mozgu⁸⁶. Takve abnormalnosti potvrđuju i genetička istraživanja koja su pokazala da oboljeli od autizma imaju promjene na kromosomu 15, na kojem se nalaze regije koje kodiraju GABA-ergične receptore⁸⁷. Osobe oboljele od autizma imaju povećani broj CB pozitivnih interneurona u *girus dentatusu* hipokampusa, dok se povećanje CR pozitivnih interneurona vidi u CA1 regiji hipokampusa.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

2. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja je odrediti potencijalni utjecaj nedostatka pojedinačnog gena *St3Gal2* i *St3Gal3*, odnosno dvostrukog nedostatka *St3Gal2/St3Gal3* na diferencijaciju i distribuciju interneurona (parvalbuminskih, kalbindinskih i kalretininskih) u slojevima motoričke, osjetne, slušne i vidne kore te u malom mozgu, striatumu i hipokampusu.

Specifični ciljevi ovog rada su:

- Odrediti distribuciju osnovnih gangliozida u mozgu miševa (GM1, GD1a, GD1b, GT1b) u 4 primarne regije korteksa (M1, S1, V1 i Au1), malom mozgu, striatumu i hipokampusu.
- Odrediti distribuciju svih neurona (NeuN) i interneurona (GABA) koji vežu kalcij korištenjem protutijela PV, CB i CR u 4 primarne regije korteksa (M1, S1, V1 i Au1), malom mozgu, striatumu i hipokampusu.
- Odrediti postoji li razlika između distribucije i broja interneurona kod tri genetski preinačena mišja modela s isključenim genima (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/St3Gal3*)
- Odrediti postoji li povezanost u distribuciji interneurona i biheviorističkih karakteristika kod tri genetski preinačena mišja modela s isključenim genima (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/St3Gal3*)
- Odrediti potencijalni utjecaj gena *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/St3Gal3* na razvoju distribuciju interneurona, te njihov utjecaj na pojavu određenih biheviorističkih promjena

Postavljena **hipoteza** je da sposobnost biosinteze gangliozida u razvojno specifičnim odnosima sudjeluje u usmjeravanju diferencijacije neurona prema tipičnom anatomskom i kemijskom fenotipu, te da će se posljedice nedostatka sinteze vidjeti kao promjene u broju zrelih tipova interneurona.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Pokusne životinje

U istraživanju su korišteni uzorci moždanog tkiva tri genetski preinačena mišja modela s nedostatnom sintezom gangliozida⁸⁸⁻⁹⁰. Genotipovi su određeni PCR metodom korištenjem oligonukleotidnih početnica 5'-CTTTGCGACAGGGTTTCATT i 5'-CAGGGTTGCTCAACAAGTG za *St3Gal2* te 5'-GGGGATCTGAGGTCCTCTTCTGGAC i 5'-TAACCCCGAGGACTATGCTGGCTTG za *St3Gal3* miševe.

Osim navedenih miševa istraživanje je provedeno i na kontrolnom mišu (engl. *wild type*, WT) koji nema nikakve genetske preinake.

Svi miševi korišteni u istraživanju kao i uzorci moždanog tkiva dobiveni su ljubaznošću prof.dr.sc. Ronalda L. Schnaara, School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD, SAD.

Prilikom rada s uzorcima pokusnih životinja slijedile su se upute Zakona o zaštiti životinja Republike Hrvatske, te upute o njezi i uporabi laboratorijskih životinja Nacionalnog instituta za zdravlje Sjedinjenih Američkih Država, Bethesda, MD. Za istraživanje je dobiveno odobrenje etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta J.J.Strossmayera u Osijeku u sklopu projekta " Uloga lipidnih splavi i glikokonjugata u razvoju i regeneraciji živčanog sustava" (219-0061194-2158) voditeljice prof.dr.sc. Marije Heffer.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija i analiza gangliozida

Gangliozidi su izolirani i analizirani iz moždanog tkiva ukupno 12 životinja (6-12 tjedana starosti). Svaki od genetički modificiranih miševa (*ST3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) kao i WT analizirani su u triplikatima. Životinje su žrtvovane dekapitacijom, nakon čega je uslijedila brza disekcija i zamrzavanje tkiva u tekućem dušiku. Uzorci su čuvani na -80°C do analize.

3.2.1.1. Izolacija gangliozida

Izolacija gangliozida napravljena je iz svježije zamrznutih uzoraka, prema modificiranom protokolu kojeg je opisao Schnaar⁹¹. Metoda se sastoji od nekoliko koraka tijekom kojih se pomoću organskih otapala ekstrahiraju gangliozidi iz moždanog tkiva.

Postupak izolacije gangliozida:

- Izvaganim uzorcima dodala se hladna destilirana voda, kako bi se dobio 10% vodeni homogenat. Uzorak je ručno homogeniziran u Potter-Elvehjem staklenom homogenizatoru s teflonskim tučkom. Cijeli postupak rađen je u hladnoj sobi na $+4^{\circ}\text{C}$.
- Vodnom homogenatu dodan je redestilirani metanol (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) u omjeru metanol-voda 8:3. Ostatak ekstrakcije proveden je na sobnoj temperaturi.
- Dodan je redestilirani kloroform (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) kako bi se dobio omjer kloroform-metanol-voda 4:8:3. Redosljed dodavanja otapala je bitan kako bi se osigurala maksimalna precipitacija hidrofobnih proteina.
- Netopljivi dio smjese odvojen je 15 minutnim centrifugiranjem na 2500 g (Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Supernatant je odvojen i napravljena je reekstrakcija taloga u dvostruko manjem volumenu otapala korištenog za ekstrakciju. Supernatant čini oko 80% otopine.
- Izmjeren je volumen ukupno dobivenog supernatanta (ekstrakcija + reekstrakcija) u koji je dodan 0,173 volumen vode, što je rezultiralo dobivanjem dvofazne otopine. Faze su razdvojene centrifugiranjem (15 min, 2500 g). Gornja (polarna) faza u kojoj su gangliozidi odvojena je i korištena za daljnju ekstrakciju. Faznom particijom gangliozidi su odvojeni od ostatka lipida.

- Polarna faza je uparena u struji tekućeg dušika u koncentratoru uzoraka (Sample

Concentrator, Techne, Staffordshire, UK) na 45 ° C. Dobiveni talog je otopljen u najmanjem volumenu vode potrebnom za potpuno otapanje. Dobivena otopina je dijalizirana preko noći u vodi korištenjem membrane za dijalizu (Spectra/Por Dialysis Membrane Tubing 2, Spectrum Laboratories, CA, USA).

- Nakon dijalize, uzorak se ponovno upario i otopio u određenom volumenu kloroform-metanol-voda (4:8:3) kako bi se dobila koncentracija 0.5mg/μl tkiva. Za duže čuvanje, uzorci se otapaju neposredno prije korištenja zbog očuvanja koncentracije.

3.2.1.2. Kvalitativna analiza gangliozida

Kvalitativna analiza gangliozida provedena je modificiranom metodom tankoslojne kromatografije (eng. *Thin-Layer Chromatography*, TLC) prema Schnaar-u and Needham-u⁹² na silica-gel pločicama visoke sposobnosti razlučivanja (engl. *High Performance Thin-Layer Chromatography*, HPTLC). Kao standard korištena je sijalinska kiselina koncentracije 0.1 mg/ml.

Postupak izvođenja TLC:

- Aktivacija HPTLC pločica (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) napravljena je zagrijavanjem pločica (15 min, 110 ° C) i hlađenjem u eksikatoru.
- Uzorci moždanog tkiva (0.5mg/ul) nanešeni su na kromatografsku pločicu u volumenu koji sadrži 0.5 mg svježeg tkiva. Uz uzorke na pločicu je nanešen i standard.
- Uzorci su nanešeni na pločicu kao mikrokapljice pomoću *Hamilton* igle. Nanošenje se odvija postepeno, kako bi pločica prije razvijanja bila potpuno suha.
- Pločica je razvijena u sustavu otapala kloroform-metanol-0,2% CaCl₂ u omjeru 60:35:8
- Nakon razvijanja pločica je dobro osušena u uspravnom položaju.
- Razvijene pločice poprskane su Svennerholm reagensom, pokrivene vrućom staklenom pločicom jednakih dimenzija i zagrijana u sušioniku (110 ° C, 15 min). Gangliozidi, odnosno sijalinska kiselina, nakon reakcije poprimaju intenzivno ljubičastu boju.
- Pločice su skenirane, a intenzitet obojenja analiziran je korištenjem besplatnog Image J programu (NIH, Bethesda, MD, USA).

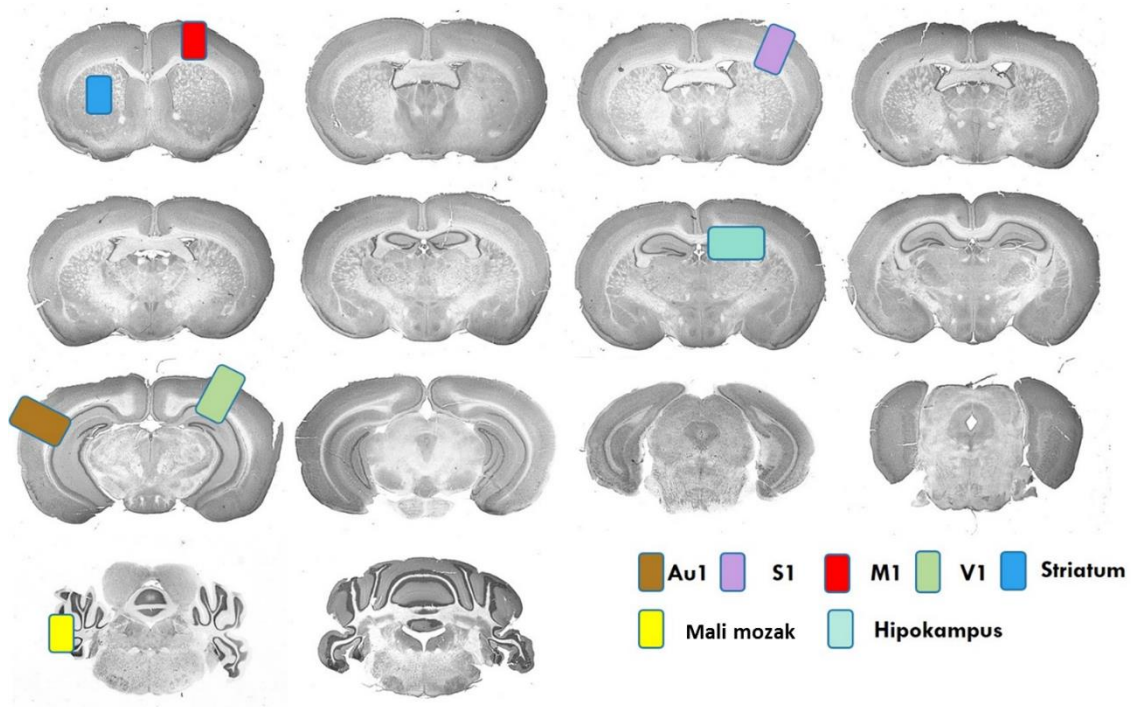
Osim TLC metode, gangliozidi su analizirani i metodom dvodimenzionalne tankoslojne kromatografije (2D-TLC) prema Sonnino i sur.⁸³, kako bi se utvrdilo postojanje *O*-acetiliranih formi gangliozida. Gangliozidi čija je sijalinska kiselina *O*-acetilirana, putuju brže od neacetiliranih oblika, što se ne može uočiti kod jednodimenzionalne TLC metode. Karakteristika 2D-TLC metode je i to da se može analizirati samo jedan uzorak po pločici.

Postupak izvođenja 2D-TLC:

- 2D-TLC analiza rađena je na HPTLC pločicama (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) 10x10 cm.
- Prvi dio analize, tj. razvijanje u prvoj dimenziji u potpunosti odgovara prethodno opisanom TLC postupku osim što se u jednom kutu pločice nanosi samo jedan uzorak.
- Nakon razvijanja i sušenja, pločica se izlaže parama amonijaka u zatvorenoj staklenoj komori. Postupak se odvija preko noći i njime se hidroliziraju nestabilne alkalne grupe.
- Nakon tretmana amonijakom, pločice se suše u sušaču gelova (GelAir Drying System, BIO-RAD Laboratories, CA, USA) kako bi amonijak u potpunosti ispario.
- Nakon toga pločica se razvija u istom otapalu u drugoj dimenziji prilikom čega se razdvajaju *O*-acetilirani gangliozidi.
- Nakon sušenja pločice gangliozidi su vizualizirani Svennerholm reagensom.

3.2.2. Imunohistokemijska analiza

Imunohistokemijska analiza provedena je na uzorcima moždanog tkiva ukupno 12 životinja (6-12 tjedana starosti). Svaki od genetički modificiranih miševa (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) kao i WT miševi, analizirani su u triplikatima (po 3 reza od svakog mozga). Na Slici 13 prikazan je položaj analiziranih regija u mozgu: 4 primarne regije korteksa (M1, S1, V1 i Au1), malom mozgu, striatumu i hipokampusu. Regije su određene prema Bergmann-u.



Slika 13. Shematski prikaz lokalizacije imunohistokemijski analiziranih regija u koronarnom presjeku mozga miša određena prema Bergmann-u. (Au1 = primarna slušna regija, S1 = primarna osjetna regija, M1 = primarna motorička regija, V1 = primarna vidna regija).

3.2.2.1. Prikupljanje uzoraka, disekcija i krioprotekcija mozga

Životinje su anestetizirane izofluranom (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD) nakon čega je napravljena transkardijalna perfuzija.

Postupak perfuzije:

- U trenutku duboke anestezije životinje (disanje plitko i sporo) uvela se igla za perfuziju u lijevu klijetku srca.
- Škarama se napravio rez na desnoj predklijetki i lagano se kroz iglu za perfuziju ubrizgalo 50 ml 1×PBS-a. Postupak treba raditi dok 1×PBS u potpunosti ne zamjeni krv (koža, sluznica i jetra proplijede).
- Nakon potpunog ispiranja krvi, kroz istu iglu ubrizgava se 50 ml 4%-tnog paraformaldehida (PFA), pH=7.4. Indikator uspješno napravljene perfuzije je potpuna ukočenost tijela miša.

Nakon perfuzije napravljena je disekcija cijelog mozga, koji je pohranjen u 4%-tni PFA slijedeća 24h. Nakon završene fiksacije, mozak je prebačen u 30%-tnu otopinu saharoze na 24h. Krioprotektirani mozak brzo je smrznut u izopentanu i pohranjen na -80°C do analize.

3.2.2.2. Priprema rezova mozga za analizu

Rezanje mozгова izvršeno je u koronarnom i sagitalnom smjeru, debljine 35 μm na kriostatu (Leica, CM3050S, Germany) pri -18°C . Prije rezanja rezovi su uklopljeni u medij za kriostatsko rezanje (Tissue-Tek OCT Compound, Sakura Finetek, Tokyo, Japan). Budući da je imunohistokemija napravljena na plutajućim rezovima (*free-floating*), rezovi su prikupljeni u otopinu 1xPBS-a u polistirenskim pločicama sa 24 jažice (Costar 24-well Plates, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Tako prikupljeni rezovi čuvani su na $+4^{\circ}\text{C}$ nekoliko dana. Rezovi koji su čuvani duži period prebačeni su u DeOlmos otopinu i pohranjeni na -20°C . Navedena otopina onemogućava HRP aktivnost na rezovima i smrzavanje istih.

3.2.2.3. Imunohistokemija

Imunohistokemijska analiza napravljena je korištenjem slobodno plutajućih rezova, *free-floating* metodom na $+4^{\circ}\text{C}$ ⁹³. Kod analize korištena su visokospecifična primarna monoklonska protutijela IgG klase u svrhu detekcije gangliozida svih neurona i interneurona. Popis i karakteristike svih primarnih protutijela prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Popis svih primarnih protutijela korištenih za imunohistokemijsku analizu

Naziv protutijela	Organizam u kojem je napravljeno protutijelo	Klasa protutijela	Proizvođač
Anti-GM1-1	miš	IgG	Department of Pharmacology, The Johns Hopkins School of Medicine ⁹⁴
Anti- GD1a-1	miš	IgG	
Anti-GD1b-1	miš	IgG	
Anti- GT1b-1	miš	IgG	
Anti-NeuN	miš	IgG	Abcam
Anti-GABA	zec	IgG	Abcam
Anti-Parvalbumin	miš	IgG	Abcam
Anti-Calbindin	miš	IgG	Abcam
Anti-Calretinin	miš	IgG	Abcam

Postupak imunohistkemijske vizualizacije trajao je dva dana i odvijao se u više koraka:

- Predtretman rezova napravljen je u 0.2% otopini H₂O₂ u 1xPBS-u 30 min. Time su blokirane aktivnosti endogenih peroksidaza u tkivu mozga.
- Inkubacija rezova u otopini za blokiranje (1% BSA, 5% kozji serum u 1xPBS-u) čime su se blokirala nespecifična vezna mjesta za protein. Inkubacija je trajala 2h na +4 °C uz miješanje.
- Nakon blokiranja uslijedila je inkubacija rezova u visokospecifičnim primarnim monoklonskim protutijelima IgG klase preko noći na +4 °C uz stalno miješanje. Protutijela su pripremljena u otopini za blokiranje u različitim razrijeđenjima koja su prethodno određena. Anti-GM1 (1:1000); anti-GD1a (1:2000); anti-GD1b (1:2000); anti-GT1b (1:10000), anti-Neu (1:2000); anti-GABA (1:1000); anti-PV (1:500); anti-CB (1:200) i anti-CR (1:50).
- Idući dan rezovi su isprani 3 × 10 min u 1 × PBS-u.
- Nakon ispiranje uslijedila je inkubacija rezova u sekundarnom protutijelu, 2h na +4 °C uz stalno miješanje. Kao sekundarno protutijelo korišten je biotinizirani kozji anti-mišji IgG (Jackson ImmunoResearch lab., West Grove, PA, USA), pripremljen u otopini za blokiranje u omjeru 1:500.
- Rezovi su isprani 3 × 10 min u 1 × PBS-u-
- Nakon ispiranja rezovi su inkubirani 2h na +4 °C uz stalno miješanje u "ABC" reagensu iz seta kemikalija "Vectastain ABC Kit Elite" (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Navedeni tercijarni kompleks sastoji se od avidina i biotiniziranog HRP-a, te ga je potrebno pripremiti 30 min prije korištenja kako bi se međusobno povezali. Avidin se tijekom inkubacije veže na biotinizirano sekundarno protutijelo.
- Nakon inkubacije uslijedilo je ispiranje, 3 × 10 min u 1 × PBS-u.
- Vizualizacija reaktivnih protutijela postinuta je inkubacijom rezova u setu kemikalija (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji sadrži diaminobenzidin (DAB), substrat za peroksidazu. Peroksidaza stvara netopljivi sivo obojeni produkt, koji ukazuje na pozitivnu reakciju. Inkubacija traje 5 min.
- Obojeni rezovi su isprani, 3 × 10 min u 1 × PBS-u i jednom u destiliranoj vodi.
- Nakon ispiranja rezovi su navučeni na prethodno sijalizirana predmetna stakalca i osušeni nakon čega su skenirani u Super Coolsan 9000 skeneru (Nikon, Tokyo, Japan).
- Nakon skeniranja stakalca su pokrivena s Vectamount pokrivalom (Vector Lab, Burlingame, CA, USA) i analizirana na mikroskopu (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT,

Jena, Germany) koji je spojen sa aparatom za fotografiranje (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan).

- Slike su analizirane i složene korištenjem programa Image J, Photoshop CS5 i CorelDraw X3.

3.2.3. Western blot analiza

Nakon imunohistokemijske analize prisutnost proteina koji vežu kalcij potvrđena je i *Western blot* metodom. Za analizu su korištena ista protutijela kao i kod imunohistokemije.

Mozgovi su homogenizirani u otopini za ekstrakciju proteina CellLytic MT (Sigma Aldrich) u koncentraciji 50 mg/ml otopine. Homogenat je centrifugiran 10 min na 38500 g. Supernatant u kojem su proteini odvojen je i pohranjen na -80 °C do analize.

3.2.3.1. Denaturirajuća poliakrilamidna gel elektroforeza (SDS-PAGE)

Na početku analize izolat proteina prvo je razdvojen denaturirajućom poliakrilamidnom gel elektroforezom.

Postupak SDS-PAGE:

- Uzorak za nanošenje na gel pripremljen je miješanjem 10 µl izolata proteina (18 µg svježeg tkiva), 2.5 µl NuPAGE LDS Sample Buffer-a (4x) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD), 1µl NuPAGE LDS Red. Ag. (10×) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) i 1.5 µl dH₂O.
- Uzorak je zagrijan na 70 °C 10 min. neposredno prije korištenja.
- Uzorci su nanešeni u volumenu od 10 µl po jažici na komercijalnim gradijent gelovima, koncentracije 4-12%, Bis-Tris NuPAGE (Invitrogen, Carlsbad, CA; SAD). Razdvajanje proteina odvijalo se u komercijalnom puferu za razdvajanje 20X Bolt® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) u trajanju od 1h na 150 V.

3.2.3.2. Prijenos proteina na membranu

Po završetku elektroforeze uslijedilo je prenošenje proteina s gela na membranu. Prijenos je napravljen koristeći Mini Trans-Blot sustav (Bio-Rad) za mokri prijenos proteina.

- Prije početka prijenosa PVDF membrana uronjena je 2 min u metanol radi aktivacije, nakon čega je ispirana u dH₂O.
- Prijenos proteina na membranu odvijao se u NuPAGE® Transfer Buffer (20×) (Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD) 1h na 50V.
- Nakon prijenosa membrana je prebačena u otopinu za blokiranje, 1h na sobnoj temperature uz stalno miješanje kako bi se blokirala nespecifična vezna mjesta za proteine.

3.2.3.3. Imunodetekcija proteina i vizualizacija membrane

- Nakon blokiranja membrana je isprana 2 puta u 1× PBST puferu.
- Inkubacija u visokospecifičnim monoklonskim primarnim protutijelima trajala je preko noći na +4° C uz stalno miješanje. Protutijela su u različitim razrijeđenjima; Neu (1:2000); anti-PV (1:500); anti-CB (1:200) i anti-CR (1:50) pripremljena u otopinu za blokiranje koja je prethodno opisana.
- Nakon inkubacije u primarnim protutijelima membrane je isprana 3 × 5 min u 1×PBST puferu.
- Uslijedila je inkubacija membrane u sekundarnom protutijelu. Za reakciju je korišteno IgG anti- mišje sekundarno protutijelo dobiveno iz kože obilježeno peroksidazom iz hrena (Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate, Bio-Rad, Hercules, CA, SAD) pripremljeno u otopini za blokiranje 1:500. Inkubacija je trajala 1h na sobnoj temperature uz miješanje.
- Nakon inkubacije membrane je isprana 5 × 5 min u 1×PBST pufru i 1 x u dH₂O.
- Postupak vizualizacije signala napravljen je korištenjem seta kemikalija (Peroxidase Substrate System, Vector Lab, Burlingame, CA, USA) koji sadrži diaminobenzidin (DAB), substrat za peroksidazu. Peroksidaza stvara netopljivi sivo obojeni produkt, koji ukazuje na pozitivnu reakciju. Inkubacija traje 15 min.
- Membrana je nakon vizualizacije osušena, skenirana i anlizirana korištenjem besplatnog Image J programa (NIH, Bethesda, MD, USA) i CorelDraw X3.

3.2.4. Statistička analiza podataka

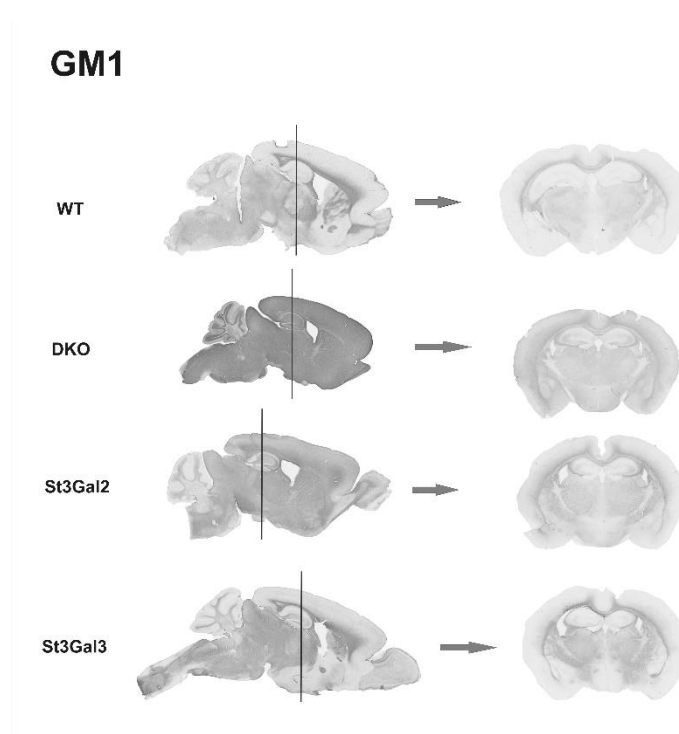
Statistička analizu dobivenih podataka napravljena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) za normalnu distribuciju podataka i Kruskal-Wallis test za nepravilnu distribuciju. Razina značajnosti je 0.05. Analiza je napravljena u programu IBM SPSS Statistika 2015.

4. REZULTATI

4.1. Analiza gangliozida u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

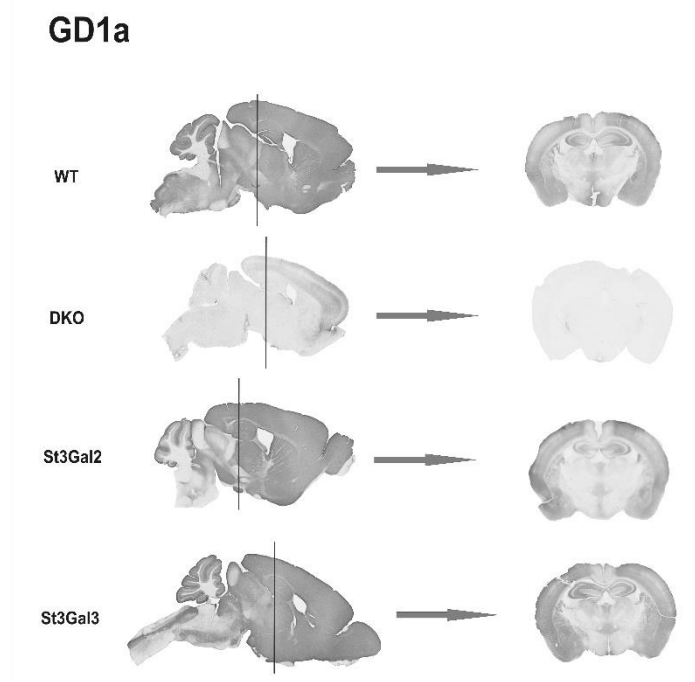
4.1.1. Imunohistokemijska distribucija gangliozida

Imunohistokemijska analiza pokazala je različitu ekspresiju kompleksnih gangliozida u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* u usporedbi sa kontrolnim miševima (WT). Na slici 14 prikazana je ekspresija GM1 gangliozida u sagitalnom i koronarnom prerezu mozga miševa. Kod WT miševa GM1 je prisutan u mijeliniziranim vlaknima nižih slojeva kore velikog mozga, jezgrama talamusa i bijeloj tvari malog mozga. GM1 prisutan je u mozgu svih analiziranih genetički preinačenih mišjih modela, ali je vidljiva različita distribucija u pojedinim regijama mozga. *St3Gal3* miš pokazuje najmanju razliku u ekspresiji u usporedbi s WT, dok je kod *St3Gal2* i *St3Gal2/3* miševa vidljiva pojačana ekspresija GM1. Kod *St3Gal2* i *St3Gal2/3* miševa GM1 je prisutan u svim slojevima neokorteksa, te u CA1 i CA3 regijama hipokampusa. Za razliku od njih kod WT i *St3Gal3* miševa u neokorteksu i hipokampusu nije zabilježena pozitivna reakcija na GM1. *St3Gal2/3* miševi imaju značajno povećanu ekspresiju GM1 u svim regijama u usporedbi s WT. Najintenzivnija ekspresija GM1 kod svih miševa prisutna je u *corpus callosum*-u.



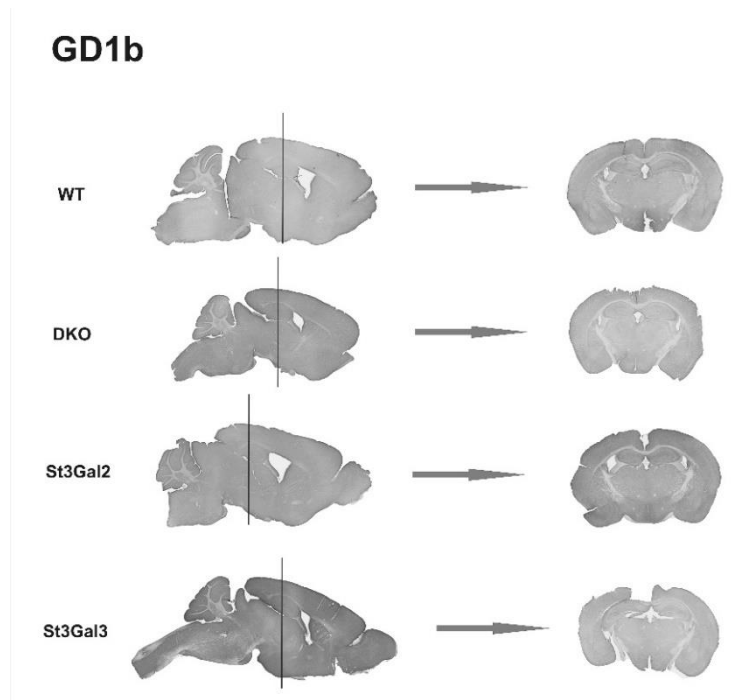
Slika 14. Distribucija gangliozida GM1 prikazana na sagitalnim i koronarnim rezovima genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

Slika 15 prikazuje distribuciju GD1a gangliozida u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* u usporedbi sa WT miševima. Kod WT miševa GD1a općenito je prisutan u sivoj tvari mozga, te u određenim putevima u bijeloj tvari mozga. Svi slojevi neokorteksa, striatum, *globus pallidus*, amigdala, svi slojevi hipokampusa i *dentate gyrus*, jezgre talamusa i hipotalamusa, kao i molekularni, granularni i sloj Purkinjeovih stanica malog mozga pozitivni su na GD1a. Kod *St3Gal2* miševa vidljivo je smanjenje u ekspresiji GD1a, dok je kod *St3Gal2/3* vidljiv gotovo potpuni nedostatak GD1a. Pozitivna reakcija na GD1a kod *St3Gal2/3* miševa vidljiva u neokrteksu (IV. sloj) na sagitalnim rezovima zapravo predstavlja acetilirani oblik GD1b gangliozida, što je dokazano 2D-TLC metodom. Na koronarnom presjeku pozitivna reakcija nije vidljiva jer je prikazan prekaudalni rez. Možemo reći da je najzastupljeniji u područjima gdje je najmanja količina GM1.

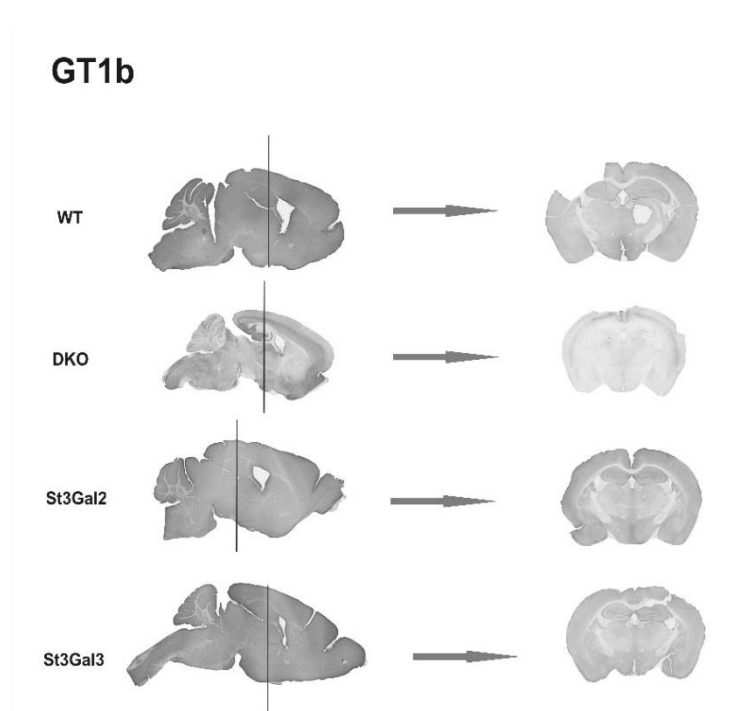


Slika 15. Distribucija gangliozida GD1a na sagitalnim i koronarnim rezovima genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

GD1b i GT1b gangliozidi prisutni su u svim regijama mozga podjednako (bijela i siva tvar), osim u *corpus callosum*-u koji pokazuje negativnu reakciju na GD1b i GT1b (Slika 16 i 17). Kod *St3Gal2* miševa vidljivo je povećanje u ekspresiji GD1b, koje se dodatno povećava kod *St3Gal2/3* miševa. Ekspresija GT1b smanjena je kod *St3Gal2* miševa, dok se kod *St3Gal2/3* gotovo u potpunosti gubi. GT1b kod *St3Gal2/3* ostaje prisutan samo u V. sloju kore velikog mozga i CA3 regiji hipokampusa.



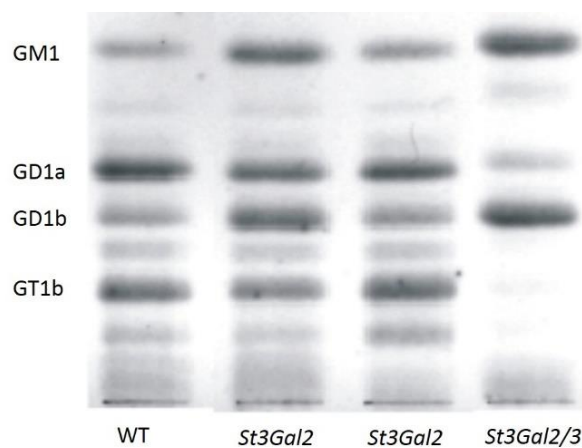
Slika 16. Distribucija gangliozida GD1b na sagitalnim i koronarnim rezovima genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



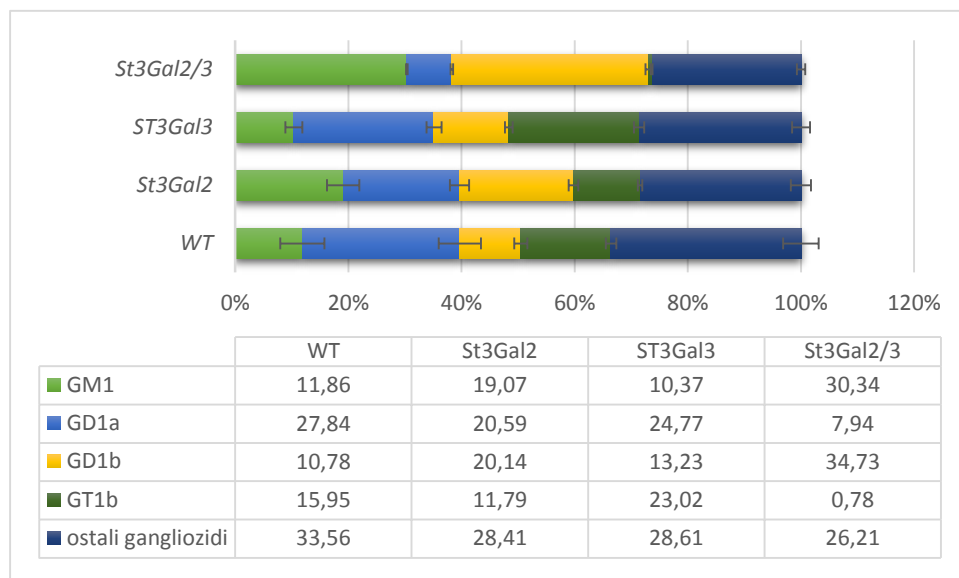
Slika 17. Distribucija gangliozida GT1b na sagitalnim i koronarnim rezovima genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.1.2. TLC i 2D-TLC analiza gangliozida

Na slici 18 prikazana je TLC analiza gangliozida u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3*, *St3Gal2/3* i WT miša. Analiza je napravljena nakon ekstrakcije gangliozida organskim otapalima. Kao i imunohistokemijski utvrđena je prisutnost osnovnih kompleksnih gangliozida - GM1, GD1a, GD1b i GT1b. WT miševi imaju veliki udio GD1a, dok je udio GM1, GD1b i GT1b duplo smanjeni. U usporedbi s WT mišem, vidljiva je promjena u količini navedenih gangliozida i postoji statistički značajna razlika između miševa. Kod *St3Gal2/3* miševa dolazi do značajnog povećanja količine GM1 ($p = 0.025$) i GD1b ($p = 0.016$), te smanjenja količine GD1a ($p = 0.025$) i GT1b ($p = 0.015$). Metodom TLC detektirani su i ostali gangliozidi čija se ukupna ekspresiji statistički značajno smanjuje kod *St3Gal2/3* miševa ($p = 0.016$). *St3Gal3* miševi pokazuju najmanju razliku u usporedbi s WT. Kod *St3Gal2* količina GD1a i GT1b je dvostruko manja, dok se koncentracija GM1 i GD1b udvostručila. *St3Gal2/3* miševi pokazuju gotovo potpuni nedostatak GD1a i GT1b, ali četverostruko povećanje GM1 i GD1b (Slika 19). Značajno je da ukupna količina SA vezane za ganglioside ostaje ista. Rezultati TLC analize podudaraju se sa imunohistokemijski dobivenim podacima.

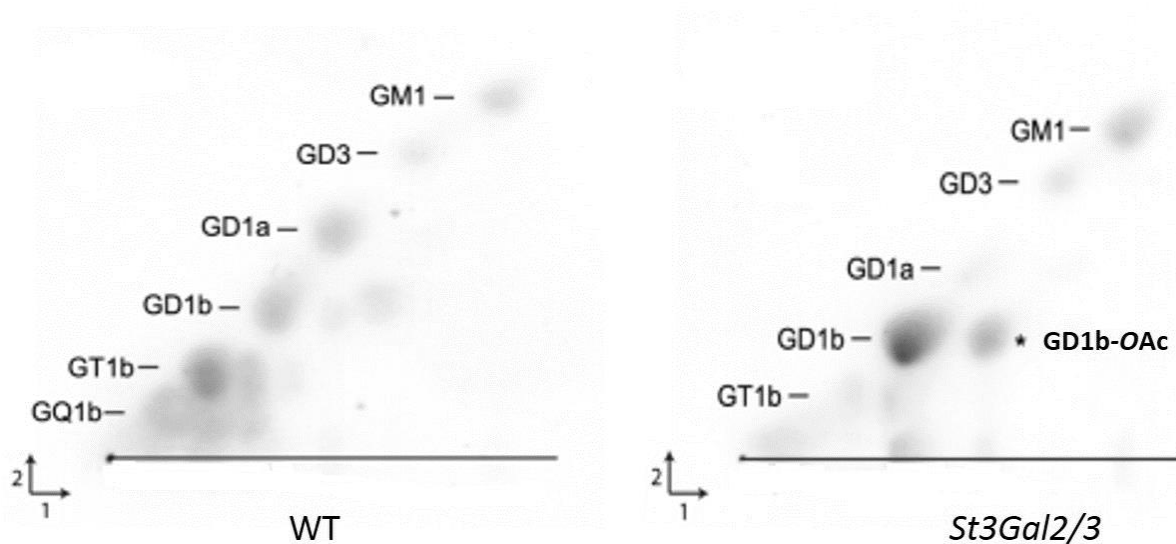


Slika 18. Gangliozidi moždanog tkiva genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT) razdvojeni tankoslojnom kromatografijom (TLC).



Slika 19. Grafički prikaz udjela pojedinog gangliozida u ukupnom sastavu gangliozida u mozgu WT, *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa.

Osim analize gangliozida TLC metodom, dodatno je napravljena i analiza 2D-TLC metodom koja omogućava određivanje alkalijski labilnih gangliozida (*O*-acetilirane grupe). Alkalijski stabilne grupe migriraju jednako u obe dimenzije i stvaraju dijagonale. Alkalno osjetljive grupe migriraju sporije u drugoj dimenziji pojavljujući se izvan dijagonale. Kod WT miša su vidljive stabilne forme GM1, GD1a, GD1b i GT1b gangliozida, kao i alkalno osjetljive forme GD1b, GT1b i GQ1b. Razlika je vidljiva između WT i *St3Gal2/3* miša. Kod *St3Gal2/3* vidljive su stabilne forme GM1 i GD1b koje dominiraju, dok se GD1a pojavljuje u tragovima. Također, vidljiva je prisutnost i *O*-acetilirani GD1b koji na jednodimenzionalnom TLC migrira kao GD1a pa daje krivu sliku prisutnosti ovog gangliozida (Slika 20).



Slika 20. Gangliozidi moždanog tkiva genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2/3* i divljeg tipa (WT) razdvojeni dvodimenzionalnom tankoslojnom kromatografijom (2D-TLC).

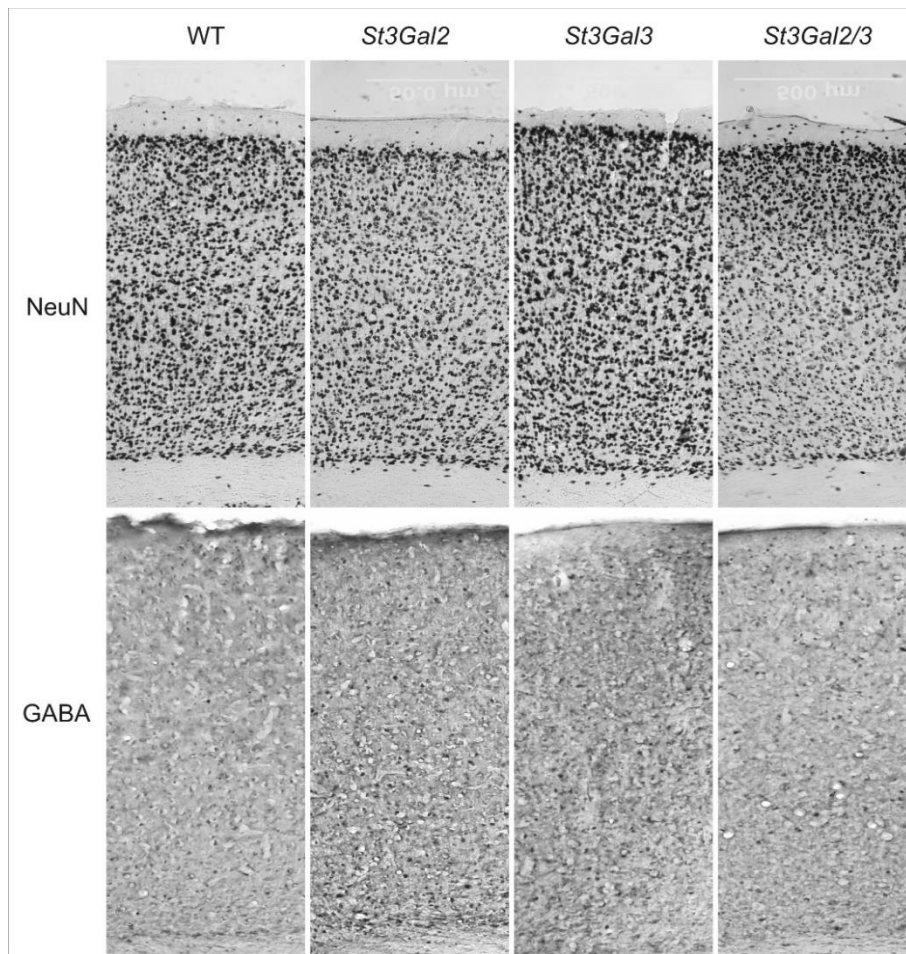
4.2. Analiza interneurona u neokorteksu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

4.2.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona

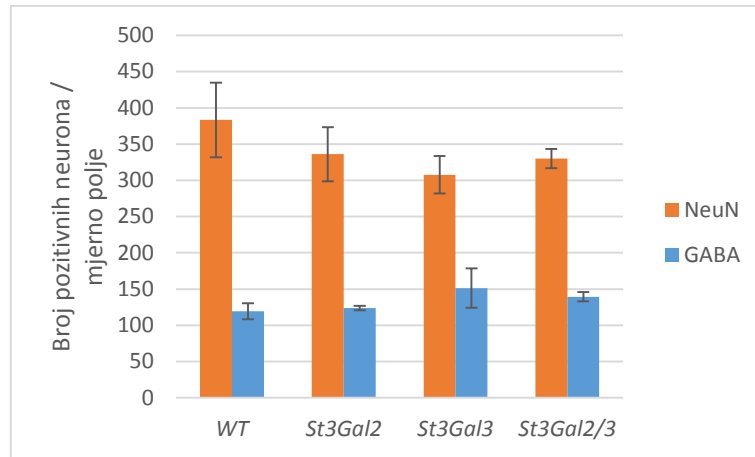
Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost GABA-ergičnih interneurona u svim regijama neokorteksa (Slika 21, 24, 25 i 27). Kako bi odredili koliki udio GABA-ergični interneuroni čine u ukupnom broju neurona, napravljena je dodatna analiza svih neurona neokorteksa pomoću NeuN protutijela. Nakon kvantitativne analize regija neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1) utvrđeno je postoji li razlika u distribuciji NeuN pozitivnih neurona i GABA-ergičnih interneurona. Također, analizirana je razlika u broju PV, CB i CR pozitivnih interneurona u pojedinoj regiji neokorteksa. Kvantitativna analiza rađena je brojanjem cijele kolumne širine 500 μm , tj. u izračun su uključeni svi slojevi neokorteksa.

4.2.1.1. Analiza primarne motoričke regije

Kod WT miševa u primarnoj motoričkoj regiji (M1) broj NeuN pozitivnih neurona po mjernom polju iznosi 386 ± 51 . Genetski modificirani mišji modeli *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* se statistički značajno ne razlikuju u ukupnim broju NeuN pozitivnih neurona od WT miševa. Također, ne postoji statistički značajna razlika ni u broju GABA-ergičnih interneurona između genetski preinačenih mišjih modela i WT miševa (Slika 22).



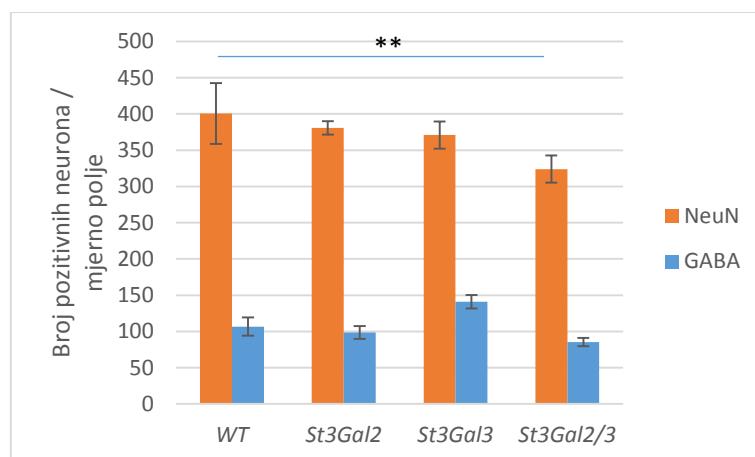
Slika 21. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



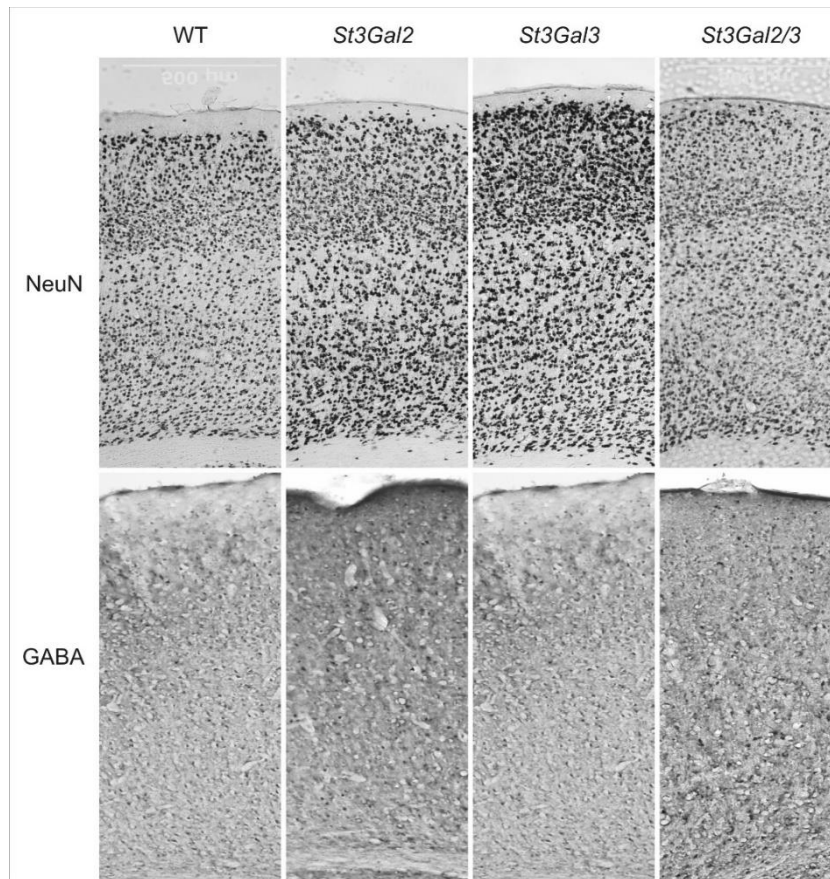
Slika 22. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.1.2. Analiza primarne osjetne regije

Analiza primarne osjetne regije (S1) WT miševa pokazala je da su NeuN pozitivni neuroni zastupljeni sa $400,66 \pm 42$ neurona po mjernom polju. Od toga $106,66 \pm 12,74$ neurona pripadaju GABA-ergičnim interneuronima. Kod *St3Gal2/3* miševa dolazi do statistički značajnog smanjenja broja neurona NeuN pozitivnih neurona ($p = 0.024$). Između miševa ne postoji razlika u broju GABA-ergičnih interneurona (Slika 23).



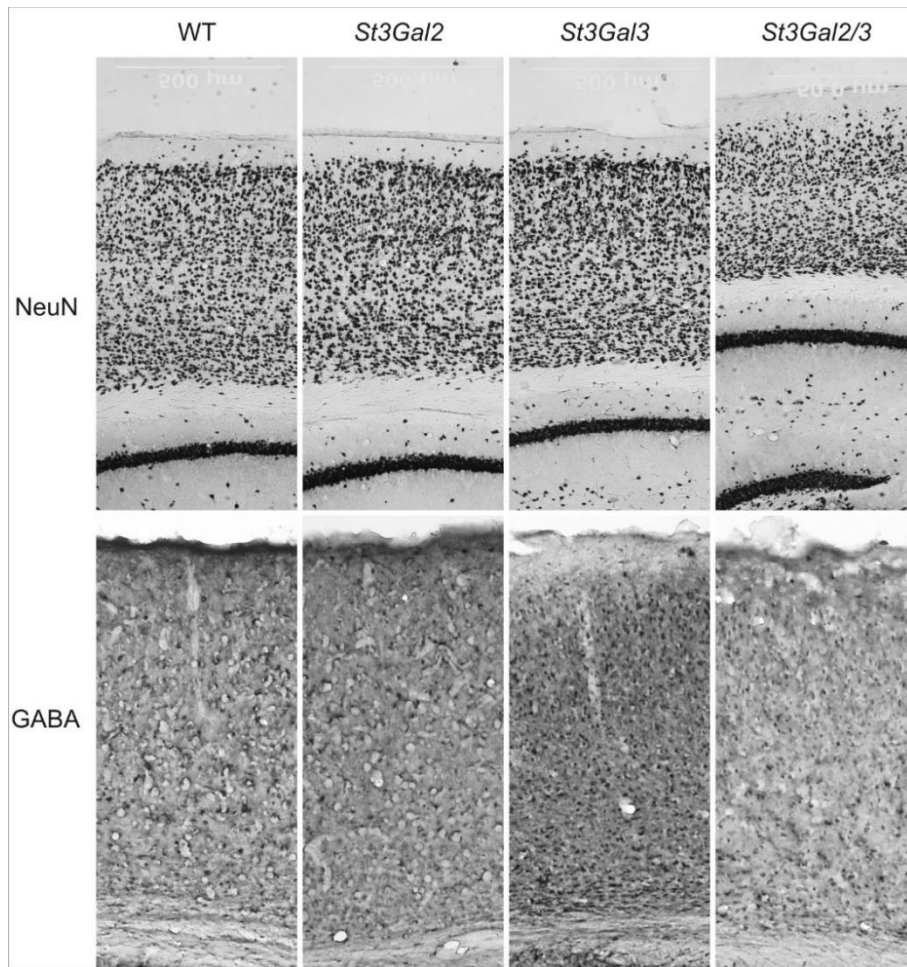
Slika 23. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



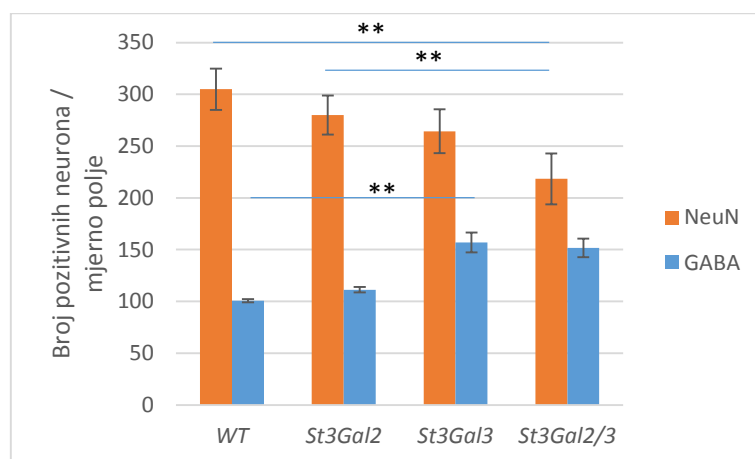
Slika 24. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.1.3. Analiza primarne vidne regije

Analiza primarne vidne regije (V1) pokazala je da su NeuN pozitivni neuroni zastupljeni sa 305 ± 19 neurona po mjernom polju. Od toga $100,66 \pm 1,52$ neurona pripadaju GABA-ergičnim interneuronima. Statistički značajna razlika između genetički preinačenih mišjih modela postoji u ukupnim broju NeuN pozitivnih neurona, kao i u broju GABA-ergičnih interneurona. Kod *St3Gal2/3* miševa dolazi do značajnog smanjenja u ukupnom broju neurona u usporedbi s WT miševima ($p = 0.005$). Osim toga značajna je razlika između *St3Gal2* i *St3Gal2/3* ($p = 0.031$). *St3Gal3* miševi imaju statistički značajno više GABA-ergični interneurona u usporedbi s WT miševima ($p = 0.024$) (Slika 26).



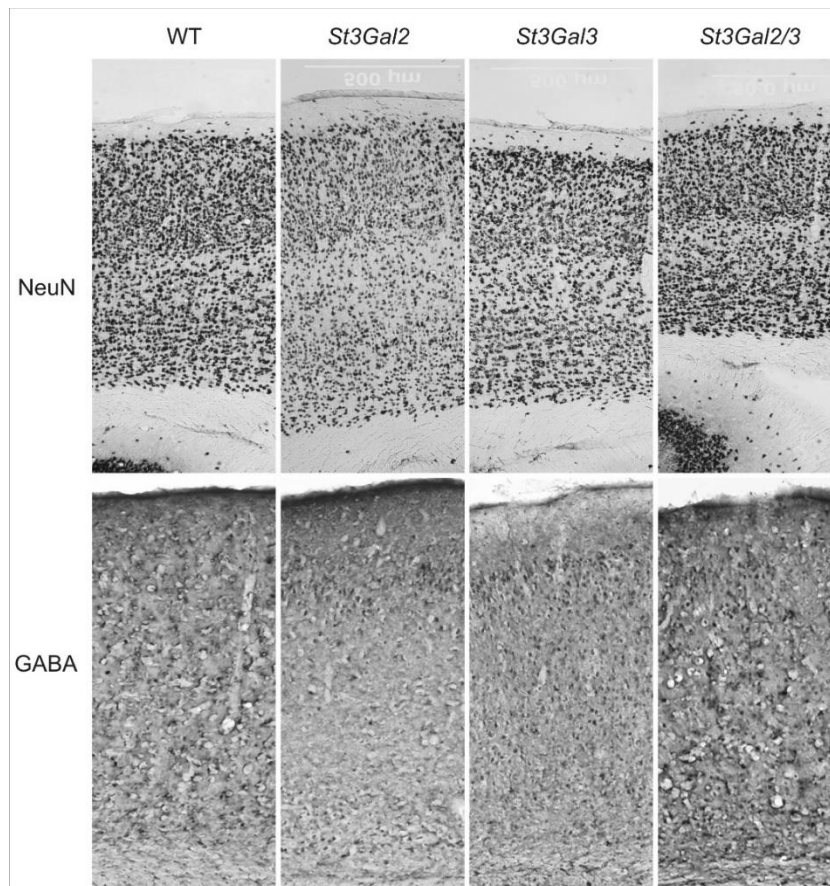
Slika 25. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



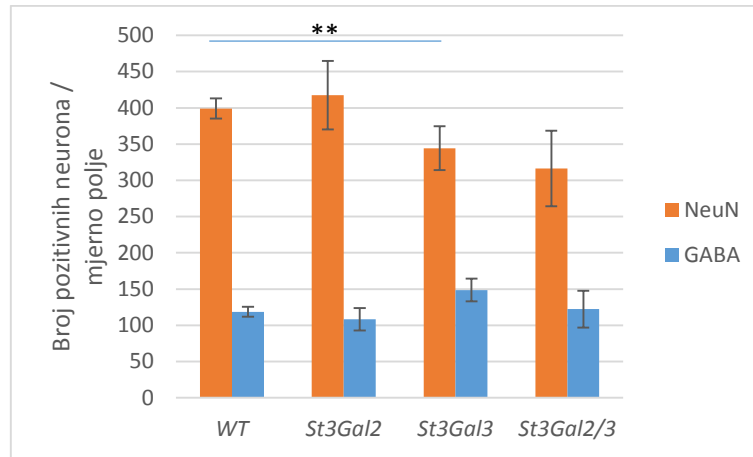
Slika 26. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.1.4. Analiza primarne slušne regije

Analiza primarne slušne regije (Au1) pokazala je da su NeuN pozitivni neuroni zastupljeni sa 399 ± 14 neurona po mjernom polju. Od toga $118,66 \pm 6,65$ neurona pripadaju GABA-ergičnim interneuronima. *St3Gal2/3* miševi se statistički značajno razlikuju u ukupnim broju NeuN pozitivnih neurona od WT miševa ($p = 0.024$). Između miševa ne postoji razlika u broju GABA-ergičnih interneurona (Slika 28).

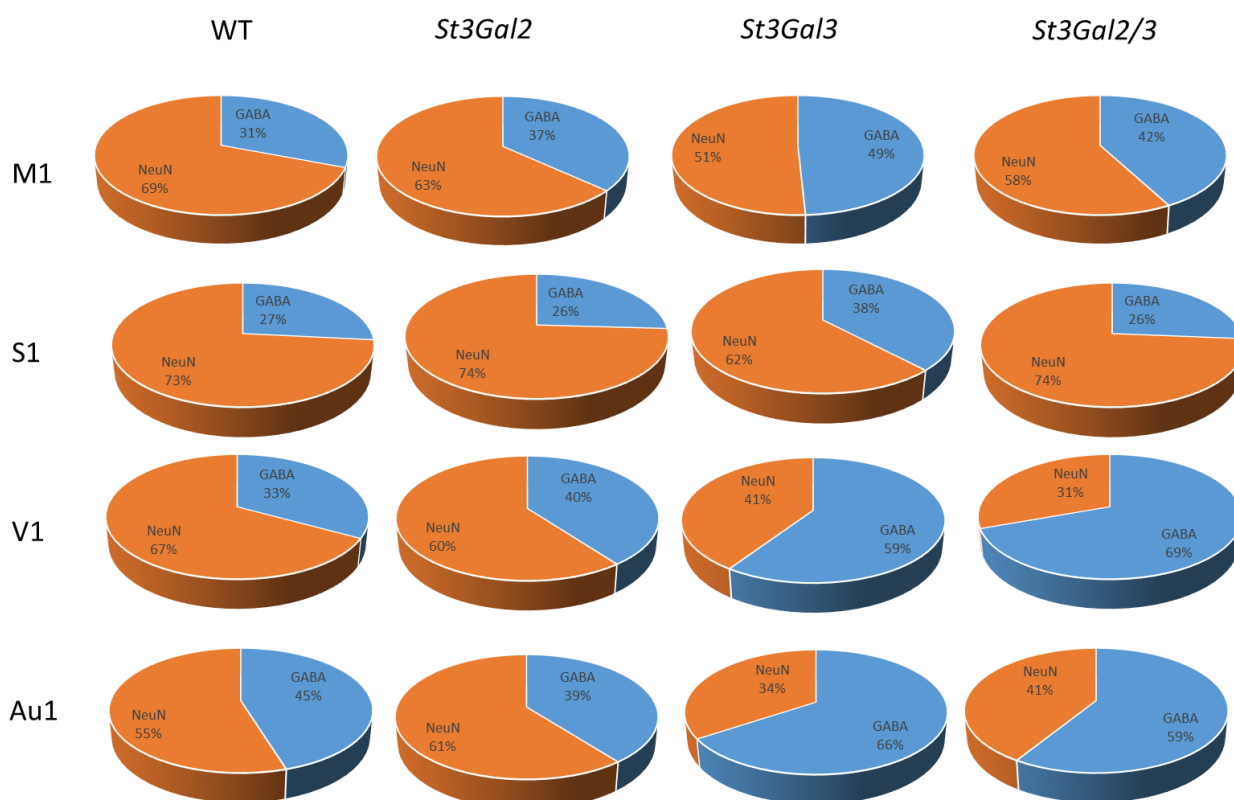


Slika 27. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



Slika 28. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

U M1 regiji WT miševa 31% neurona pripada GABA-ergičnim neuronima. Kod svih genetski preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela, a povećanje je najveće kod *St3Gal3* miševa (49%). U S1 regiji WT miševa 27% neurona pripada GABA-ergičnim neuronima. Jedina razlika javlja se kod *St3Gal3* miševa gdje dolazi do povećanja udjela na 38%. U V1 regiji WT miševa 33% neurona pripada GABA-ergičnim neuronima. Kod svih genetski preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela, a povećanje je najveće kod *St3Gal2/3* miševa (69%). GABA-ergični neuroni čine 45% od ukupnog broja neurona u Au1 regiji. Kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa udio se povećava, dok se kod *St3Gal2* miševa smanjuje (Slika 29).



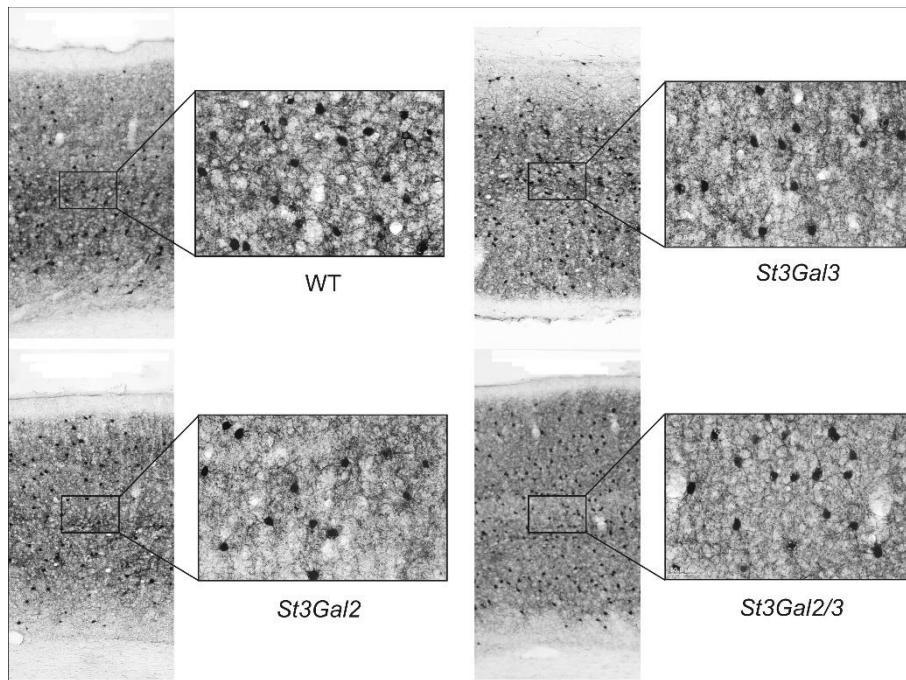
Slika 29. Udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju NeuN pozitivnih neurona u regijama neokorteksa genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona

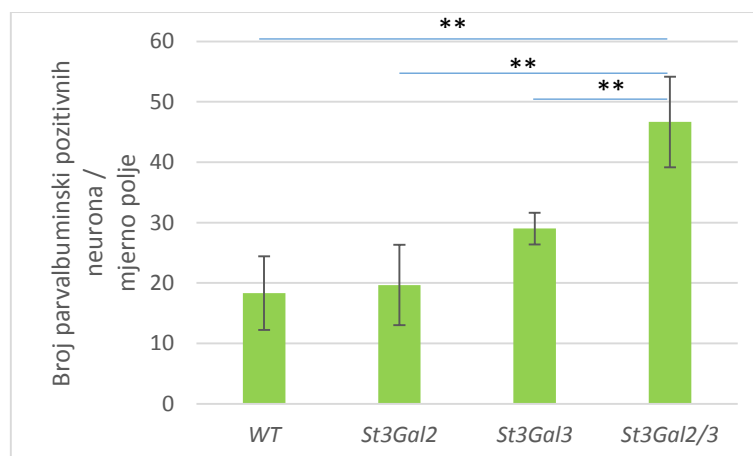
Parvalbuminski pozitivni interneuroni detektirani su imunohistokemijski na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1). Sve regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost PV u interneuronima (Slika 30, 32, 34 i 36). Kvantitativna analiza rađena je brojanjem cijele kolumne širine 500 μm , tj. u izračun su uključeni svi slojevi neokorteksa.

4.2.2.1. Analiza primarne motoričke regije

Kod WT miševa broj parvalbuminski pozitivnih interneurona u M1 regiji iznosi $18,33 \pm 6,11$ interneurona po mjernom polju. *St3Gal2/3* miševi se statistički značajno razlikuju od WT ($p = 0.002$). Osim s WT miševima, *St3Gal2/3* miševi razlikuju se od *St3Gal2* ($p = 0.003$) i *St3Gal3* ($p = 0.029$) miševa (Slika 31). Kod svih genetički modificiranih miševa, osim *St3Gal2*, uočava se povećanje broja PV pozitivnih interneurona.



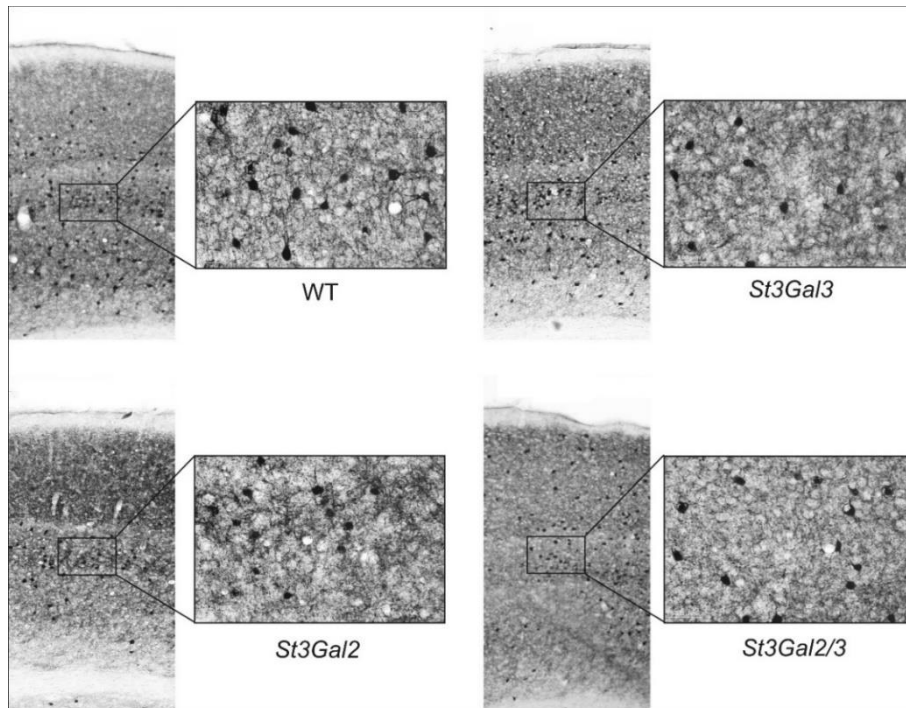
Slika 30. Imunohistokemijska analiza parvalbuminskih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



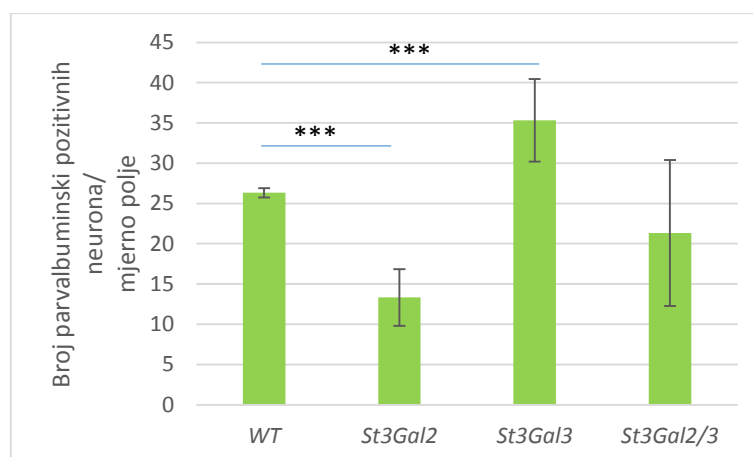
Slika 31. Grafički prikaz broja parvalbuminski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.2.2. Analiza primarne osjetne regije

WT miševi u S1 regiji imaju $26,33 \pm 0,57$ interneurona po mjernom polju. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do statistički značajnog smanjenja broja PV pozitivnih interneurona ($p = 0.007$), dok kod *St3Gal3* miševa dolazi do značajnog povećanja broja PV pozitivnih interneurona ($p = 0.005$) (Slika 33).



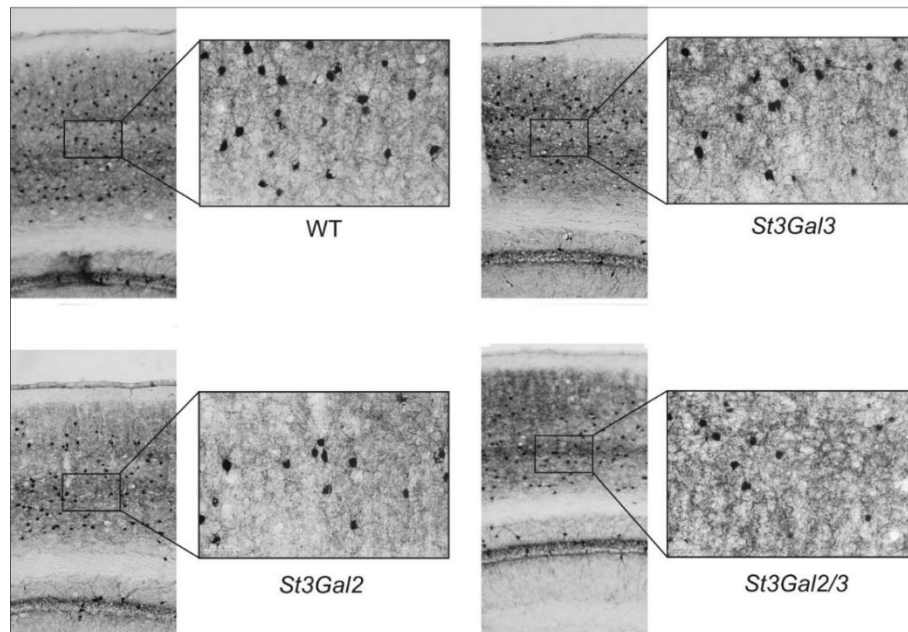
Slika 32. Imunohistokemijska analiza parvalbuminskih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



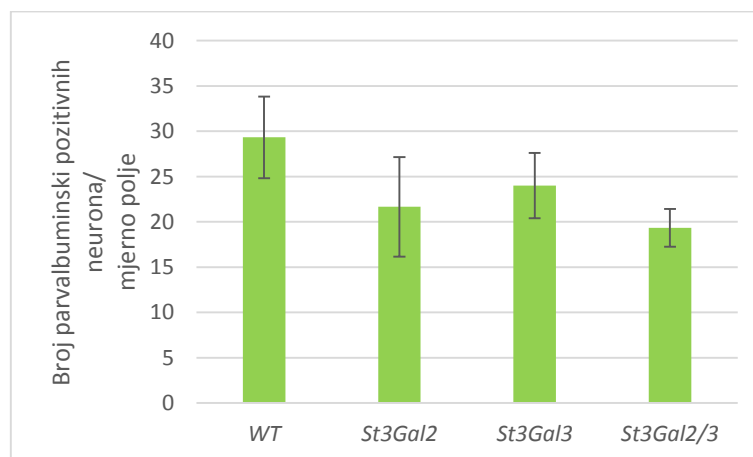
Slika 33. Grafički prikaz broja parvalbuminski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.2.4. Analiza primarne vidne regije

Kod WT miševa broj parvalbuminski pozitivnih interneurona u V1 regiji iznosi $29,33 \pm 4,5$ interneurona po mjernom polju. Kod svih genetički preinačenih mišjih modela u V1 regiji vidljiva je tendencija smanjenja broja PV pozitivnih interneurona, ali razlike nisu statistički značajne (Slika 35).



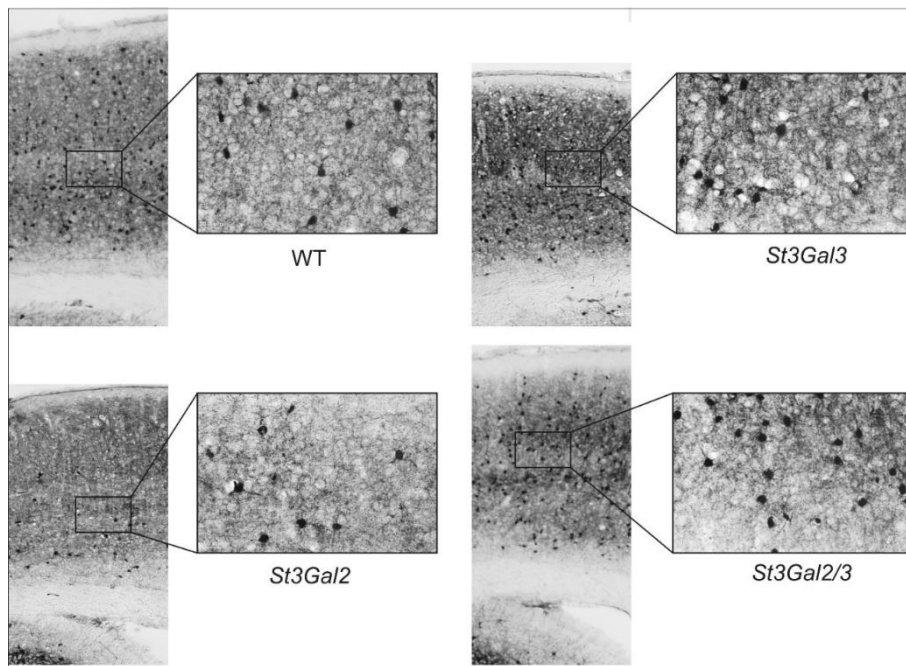
Slika 34. Imunohistokemijska analiza parvalbuminskih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



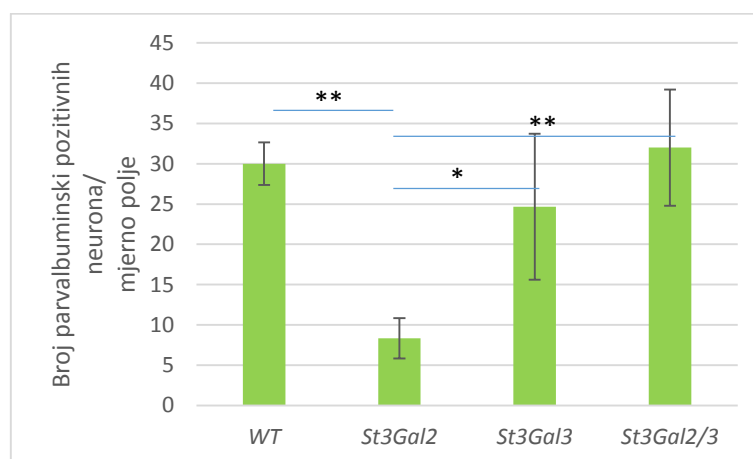
Slika 35. Grafički prikaz broja parvalbuminski pozitivnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.2.3. Analiza primarne slušne regije

WT miševi u Au1 regiji imaju $30 \pm 2,64$ interneurona po mjernom polju. Kod *St3Gal2* miševa vidljivo je značajno smanjenje broja interneurona ($p = 0.010$). Također, *St3Gal2* miševi se statistički značajno razlikuju od *St3Gal3* ($p = 0.044$) i *St3Gal2/3* miševa ($p = 0.006$). Između WT, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa nema statistički značajne razlike (Slika 37).



Slika 36. Imunohistokemijska analiza parvalbuminskih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



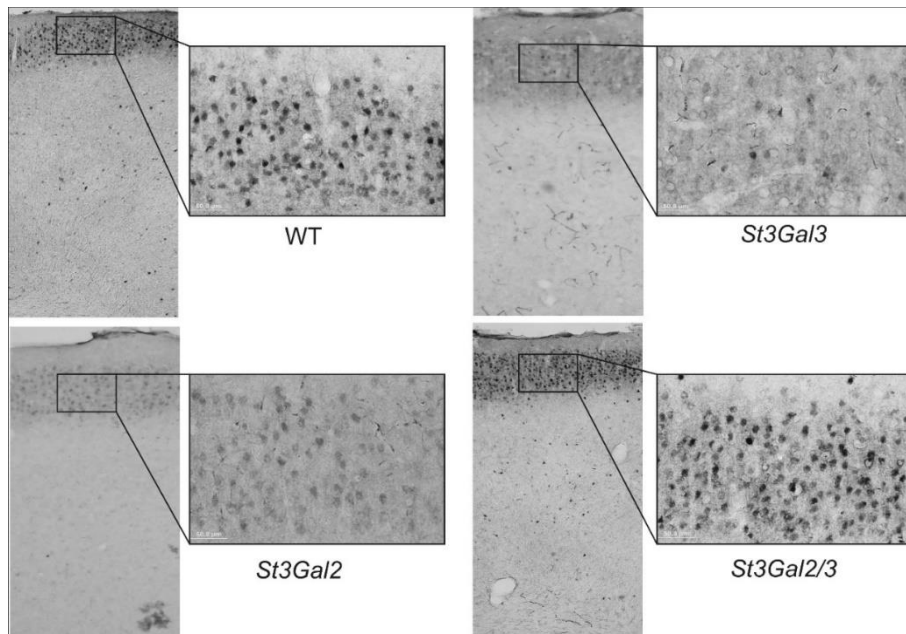
Slika 37. Grafički prikaz broja parvalbuminski pozitivnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.3. Distribucija kalbindinskih interneurona

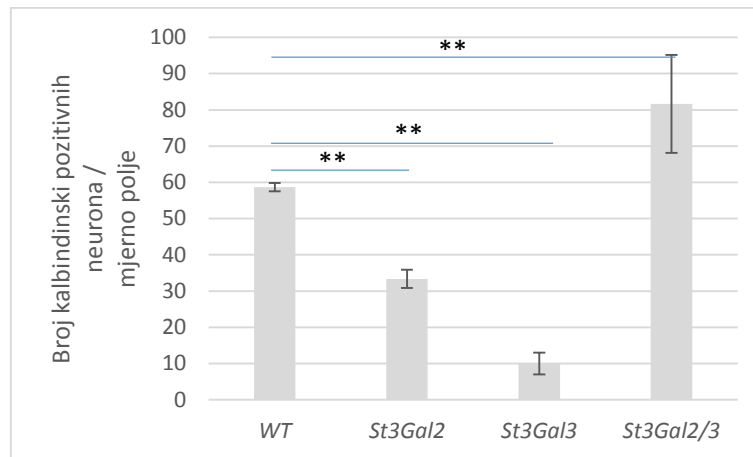
Kalbindinski pozitivni interneuroni detektirani su imunohistokemijski na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1). Sve regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost CB u interneurona (Slika 38, 40, 42 i 44). Kvantitativna analiza rađena je brojanjem cijele kolumne širine 500 μm , tj. u izračun su uključeni svi slojevi neokorteksa.

4.2.3.1. Analiza primarne motoričke regije

Kod WT miševa broj CB pozitivnih interneurona u M1 regiji iznosi $58,66 \pm 1,15$ interneurona po mjernom polju. Do statistički značajnog smanjenja u broju CB interneurona dolazi kod *St3Gal2* ($p = 0,045$) i *St3Gal3* ($p = 0,037$) miševa, dok se kod *St3Gal2/3* miševa vidi značajno povećanje ($p = 0,015$) (Slika 39).



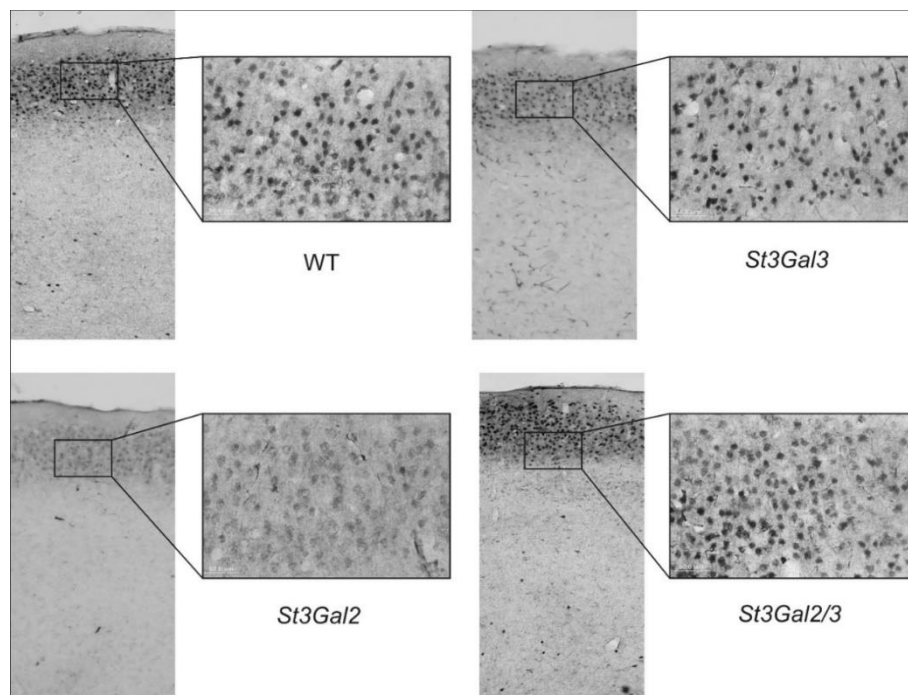
Slika 38. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



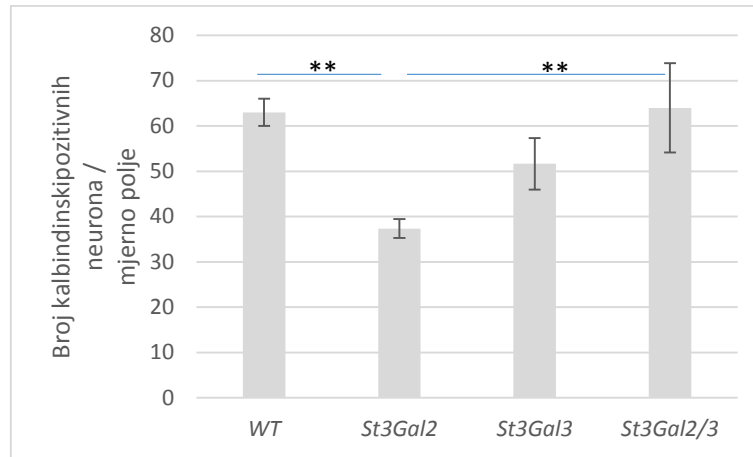
Slika 39. Grafički prikaz broja kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.3.2. Analiza primarne osjetne regije

Imunohistokemijskom analizom CB pozitivnih interneurona u S1 regiji utvrđeno je da WT miševi imaju 63 ± 3 interneurona po mjernom polju. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do značajnog smanjenja broja CB pozitivnih interneurona ($p = 0.003$). Osim toga, značajna razlika javlja se i između *St3Gal2* i *St3Gal2/3* miševa ($p = 0.003$) (Slika 41).



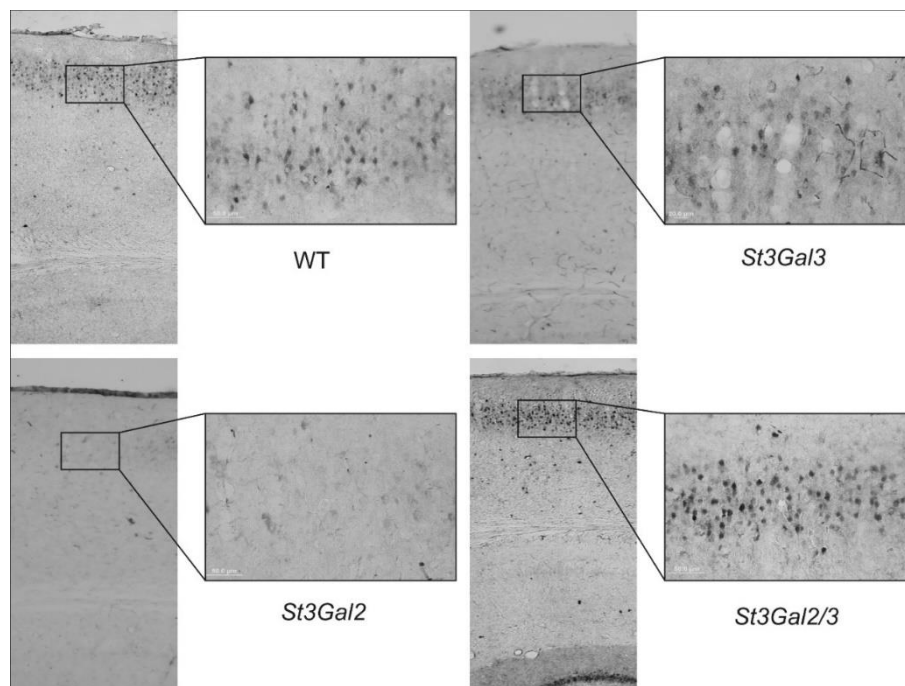
Slika 40. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



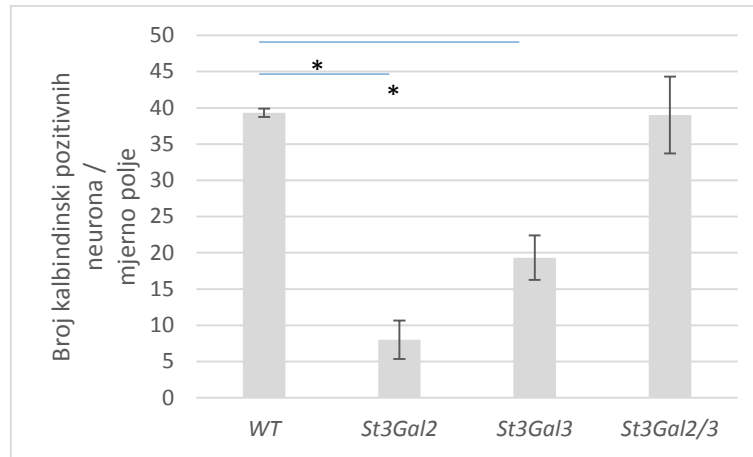
Slika 41. Grafički prikaz broja kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.3.3. Analiza primarne vidne regije

Kod WT miševa broj CB pozitivnih interneurona u V1 regiji iznosi $39,33 \pm 0,57$ interneurona po mjernom polju. Statistički značajno smanjenje u broju CB pozitivnih interneurona vidljivo je kod *St3Gal2* ($p = 0,023$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0,046$). *St3Gal2/3* miševi se ne razlikuju od WT miševa, kao ni od ostalih genetički modificiranih miševa (Slika 43).



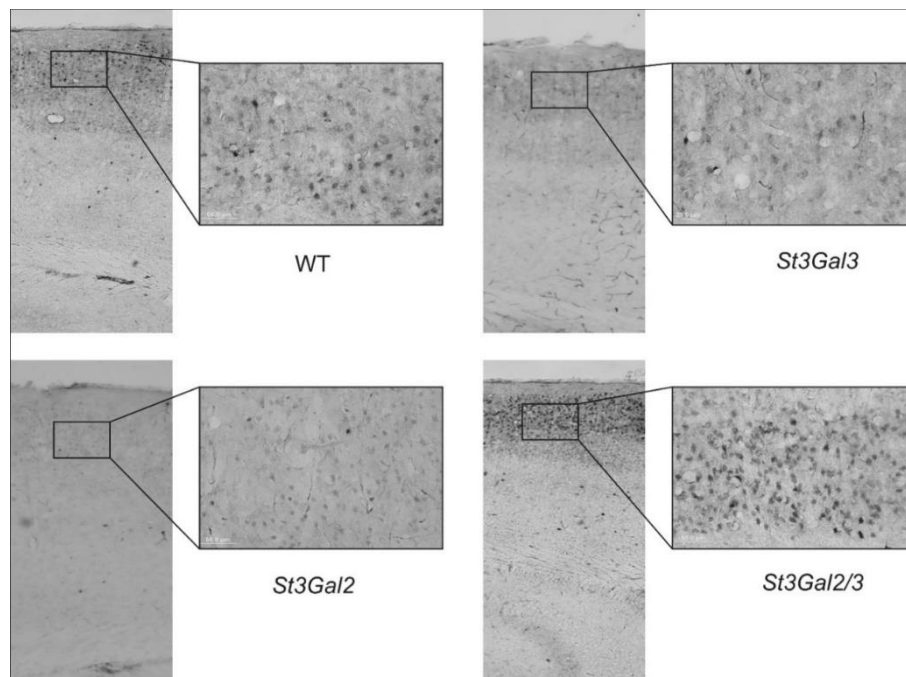
Slika 42. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



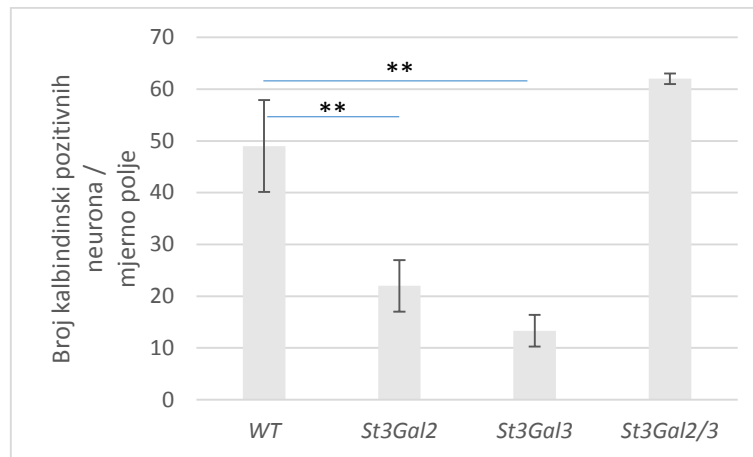
Slika 43. Grafički prikaz broja kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.3.4. Analiza primarne slušne regije

Imunohistokemijskom analizom CB pozitivnih interneurona u Au1 regiji utvrđeno je da WT miševi imaju $49 \pm 8,8$ interneurona po mjernom polju. Statistički značajno smanjenje u broju CB pozitivnih interneurona vidljivo je kod *St3Gal2* ($p = 0.001$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0,005$). Pad broja CB pozitivnih interneurona je veći kod *St3Gal3* miševa. Kod *St3Gal2/3* miševa vidljiva je tendencija povećanja broja CB interneurona, ali nema značajne razlike (Slika 45).



Slika 44. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



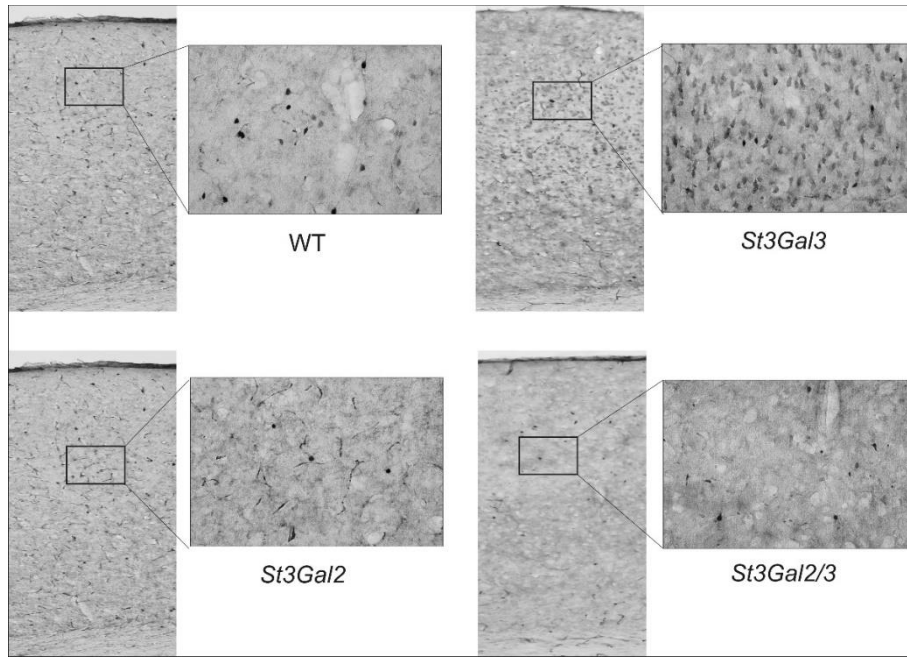
Slika 45. Grafički prikaz broja kalbindinski pozitivnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.4. Distribucija kalretininskih interneurona

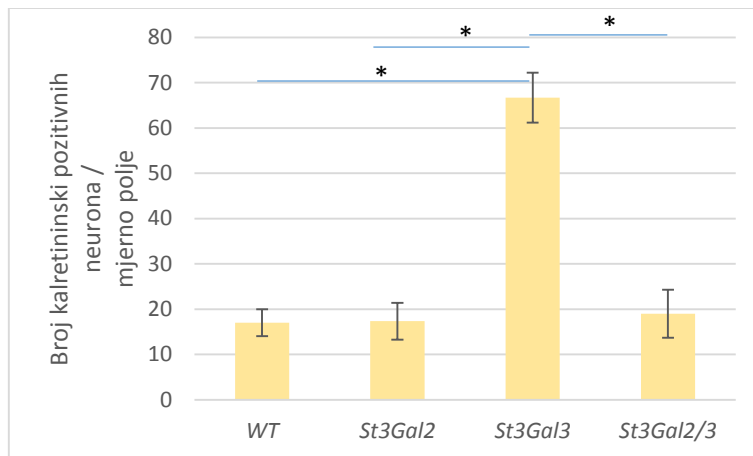
Kalretininski pozitivni interneuroni detektirani su imunohistokemijski na koronarnim rezovima u 4 primarne regije neokorteksa (M1, S1, V1 i Au1). Sve regije kod svih miševa pokazale su pozitivnu reakciju na prisutnost CR u interneuronima (Slika 46, 48, 50 i 52). Kvantitativna analiza rađena je brojanjem cijele kolumne širine 500 μm , tj. u izračun su uključeni svi slojevi neokorteksa.

4.2.4.1. Analiza primarne motoričke regije

Kod WT miševa broj CR pozitivnih interneurona u M1 regiji iznosi 17 ± 3 interneurona po mjernom polju. *St3Gal3* miševi imaju statistički značajnog povećanje u broju CR pozitivnih interneurona usporedno s WT ($p = 0,015$), *St3Gal2* ($p = 0,018$) i *St3Gal2/3* miševima ($p = 0,010$). Ostali miševi se ne razlikuju od WT miševa (Slika 47).



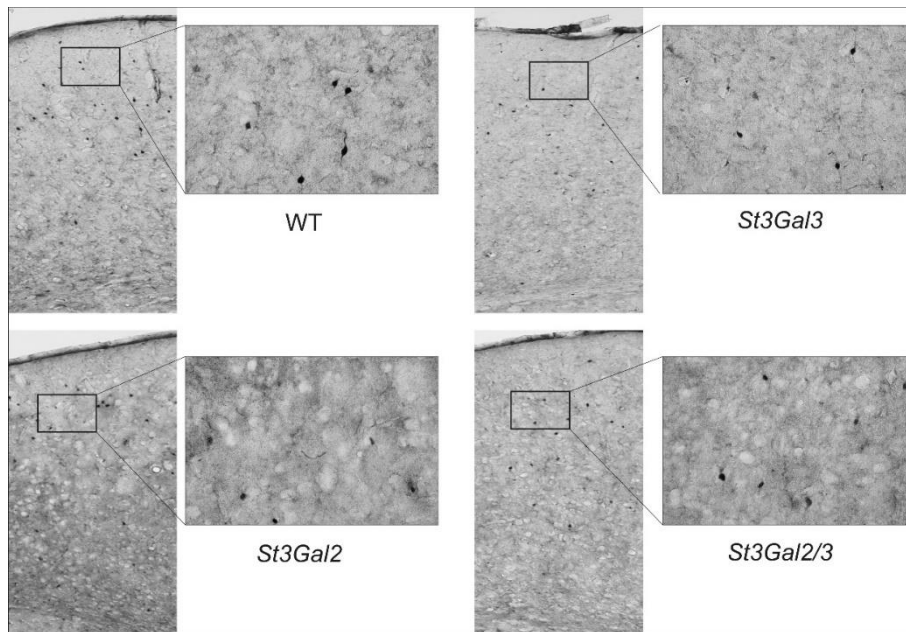
Slika 46. Imunohistokemijska analiza kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



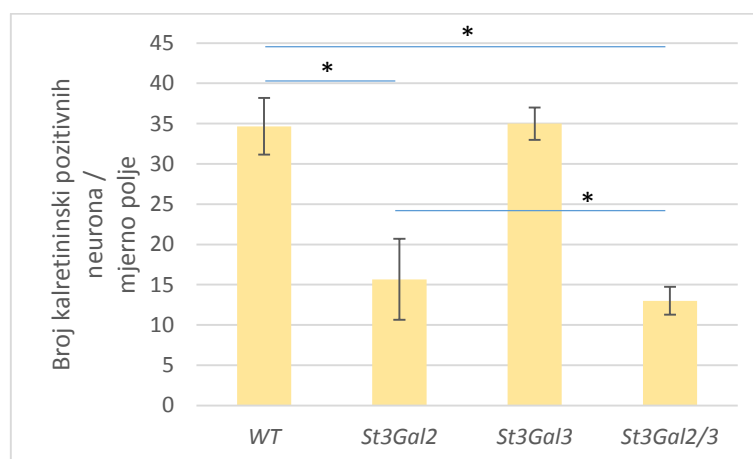
Slika 47. Grafički prikaz broja kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj motoričkoj regiji (M1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.4.2. Analiza primarne osjetne regije

Imunohistokemijskom analizom CR pozitivnih interneurona u S1 regiji utvrđeno je da WT miševi imaju $34,66 \pm 3,5$ interneurona po mjernom polju. Do statistički značajnog smanjenja u broju CR pozitivnih interneurona dolazi kod *St3Gal2* ($p = 0,035$) i *St3Gal2/3* ($p = 0,049$). Također, *St3Gal3* miševi se značajno razlikuju od *St3Gal2/3* miševa ($p = 0,046$). Kod *St3Gal3* miševa ne dolazi do promjene u broju CR interneurona (Slika 49).



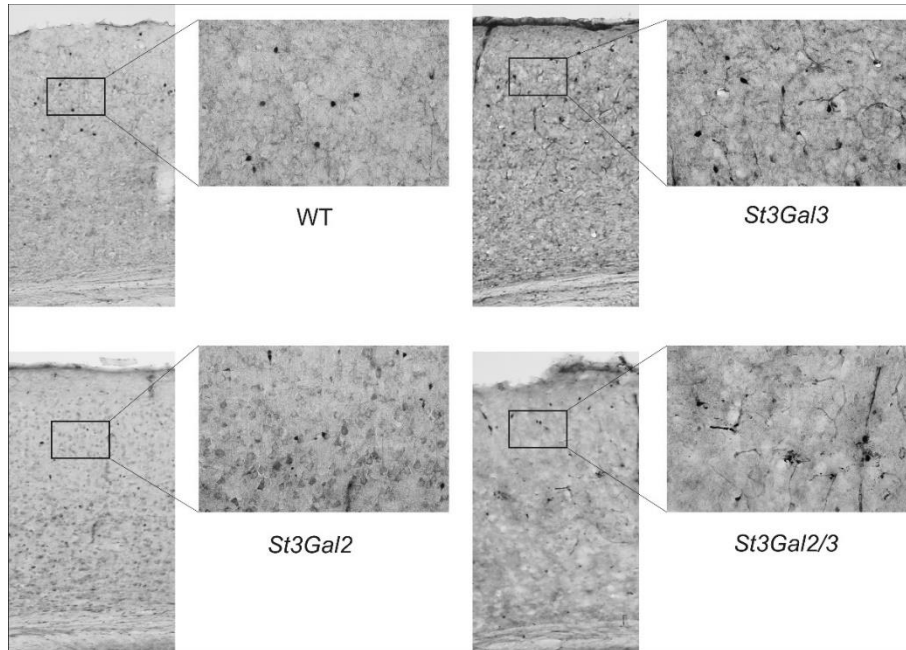
Slika 48. Imunohistokemijska analiza kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



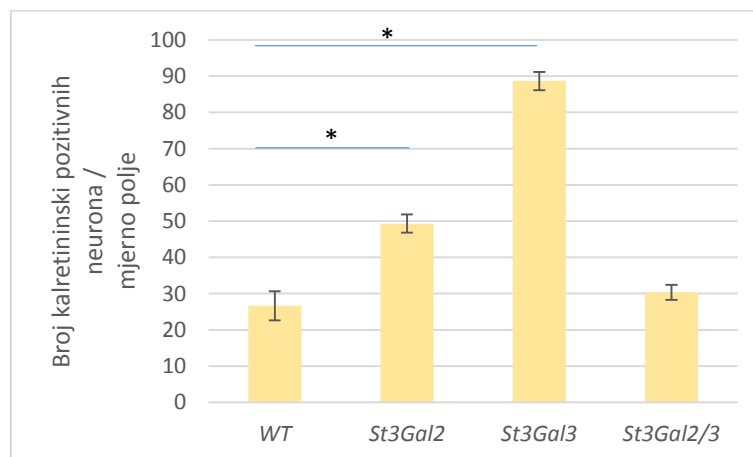
Slika 49. Grafički prikaz broja kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj osjetnoj regiji (S1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.4.3. Analiza primarne vidne regije

Kod WT miševa broj CR pozitivnih interneurona u V1 regiji iznosi $26,66 \pm 4,04$ interneurona po mjernom polju. Do statistički značajnog povećanja CR interneurona dolazi kod *St3Gal2* ($p = 0,046$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0,021$). *St3Gal2/3* miševi ne pokazuju promjenu u broju CR pozitivnih interneurona (Slika 51).



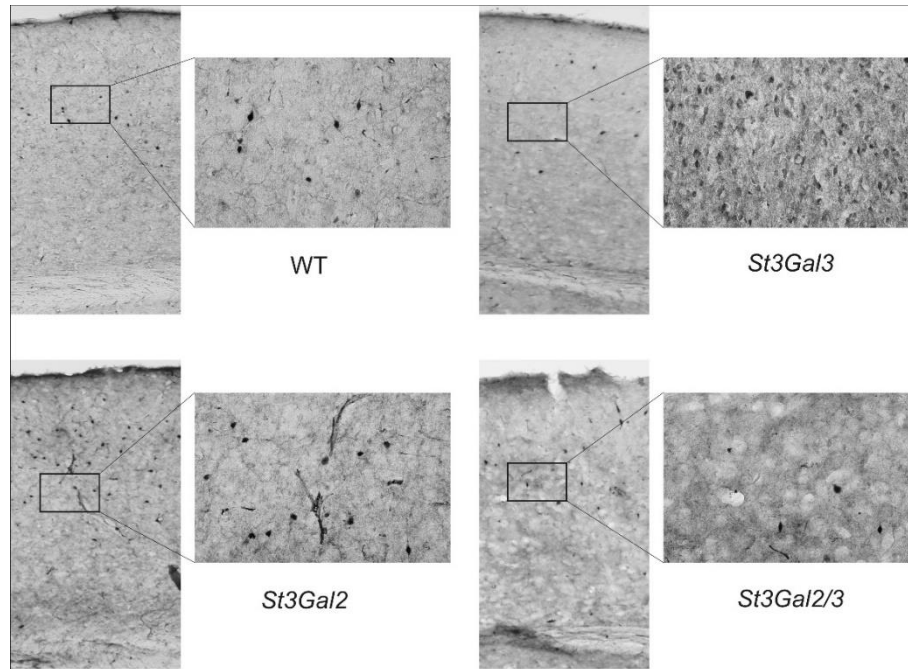
Slika 50. Imunohistokemijska analiza kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



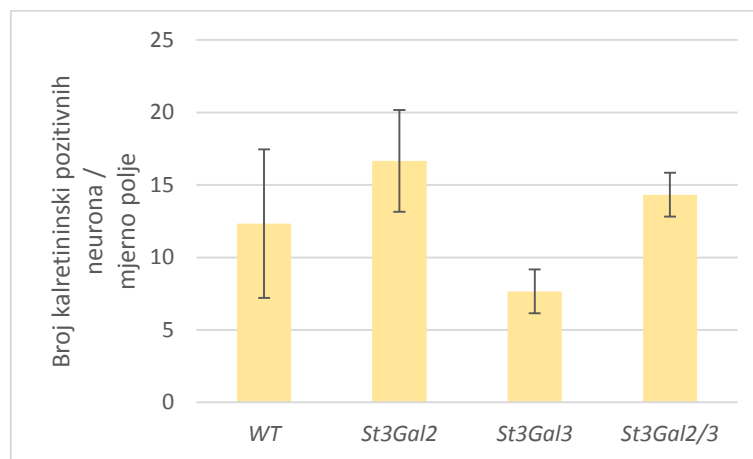
Slika 51. Grafički prikaz broja kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj vidnoj regiji (V1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.2.4.4. Analiza primarne slušne regije

Imunohistokemijskom analizom CR pozitivnih interneurona u Au1 regiji utvrđeno je da WT miševi imaju $12,33 \pm 5,13$ interneurona po mjernom polju. Nije utvrđena značajna razlika u broju CR interneurona kod genetski preinačenih mišjih modela (Slika 53).



Slika 52. Imunohistokemijska analiza kalretininski pozitivnih interneurona u primarnoj slušnoj regiji (Au1) kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



Slika 53. Grafički prikaz broja kalretininski pozitivnih interneurona u Au1 regiji kod genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

U M1 regiji WT miševa od interneurona koji ekspimiraju proteine koji vežu najzastupljeniji su CB pozitivni interneuroni (49%). Podjednako su zastupljeni PV (16%) i CR interneuroni (14%). 21% čine GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij. Udio PV pozitivnih interneurona u odnosu na CB i CR pozitivne interneurone povećava se kod *St3Gal2/3* miševa (32%). Kod ostalih miševa udio PV pozitivnih interneurona kreće se između 16% i 19%. Udio CB pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CR pozitivne interneurone smanjuje se kod *St3Gal2* (27%) i *St3Gal3* (7%) miševa, dok kod *St3Gal2/3* dolazi do povećanja (55%). Udio CR pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CB pozitivne interneurone značajno se povećava kod *St3Gal3* miševa (44%) i *St3Gal3* (7%) miševa, dok kod *St3Gal2/3* dolazi do povećanja (55%). Kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa povećava se udio GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij, dok kod *St3Gal2/3* miševa takvih interneurona u potpunosti nema.

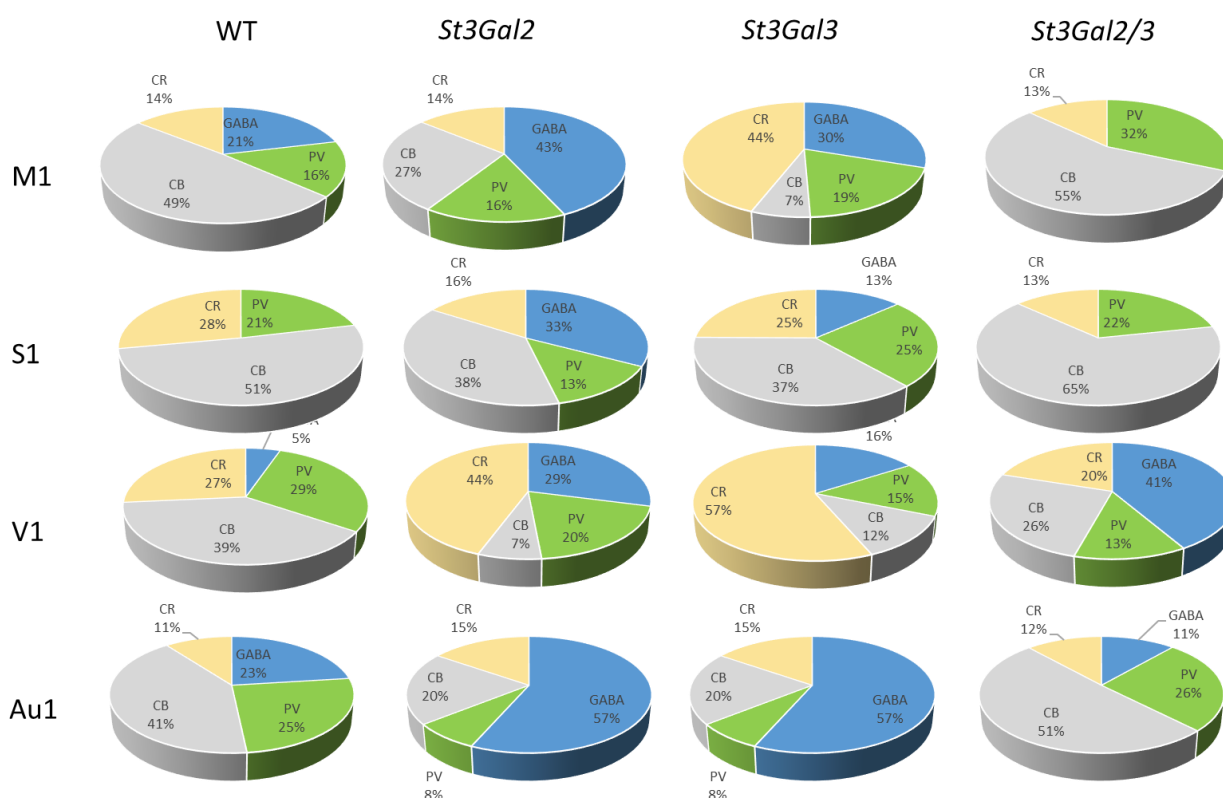
U S1 regiji WT miševa od interneurona koji ekspimiraju proteine koji vežu najzastupljeniji su CB pozitivni interneuroni (51%). Podjednako su zastupljeni PV (21%) i CR interneuroni (28%). Svi GABA-ergični interneuroni u S1 regiji WT miševa ekspimiraju protein koji vežu kalcij. Udio PV pozitivnih interneurona u odnosu na CB i CR pozitivne interneurone u S1 regiji povećava se kod *St3Gal3* miševa (25%), dok se kod *St3Gal2* miševa udio smanjuje na 13%. Kod ostalih miševa udio istih kreće se između 16% i 19%. Udio CB pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CR pozitivne interneurone smanjuje se kod *St3Gal2* (38%) i *St3Gal3* (37%) miševa, dok kod *St3Gal2/3* dolazi do povećanja (65%) (Slika 38). Udio CR pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CB pozitivne interneurone značajno se smanjuje kod *St3Gal2* miševa (16%) i *St3Gal2/3* (13%) miševa, dok kod *St3Gal3* nema promjene (25%). Kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa povećava se udio GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij, dok kod *St3Gal2/3* miševa takvih interneurona u potpunosti nema.

U V1 regiji WT miševa od interneurona koji ekspimiraju proteine koji vežu najzastupljeniji su CB pozitivni interneuroni (39%). Podjednako su zastupljeni PV (29%) i CR interneuroni (27%). 5% čine GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij. Udio PV pozitivnih interneurona u odnosu na CB i CR pozitivne interneurone smanjuje se kod svih genetički modificiranih miševa: *St3Gal2* 20%, *St3Gal3* (15%) i *St3Gal2/3* (13%). Udio CB pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CR pozitivne interneurone smanjuje se kod svih genetički modificiranih miševa: *St3Gal2* (7%), *St3Gal3* (12%) i *St3Gal2/3* (26%) Udio CR pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CB pozitivne interneurone značajno se povećava kod *St3Gal2* (44%) i *St3Gal3* (57%) miševa, dok kod *St3Gal2/3* dolazi do smanjenja (20%). Kod

4. Rezultati

svih genetički preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij, najviše kod *St3Gal2/3* miševa (41%)

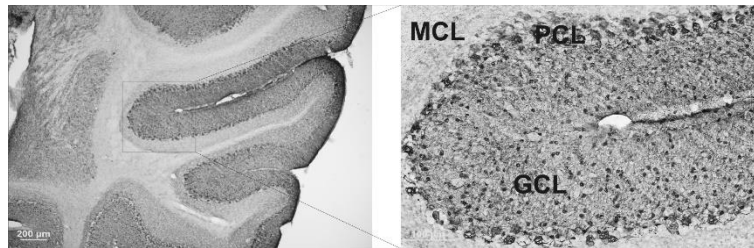
U V1 regiji WT miševa od interneurona koji eksprimiraju proteine koji vežu najzastupljeniji su CB pozitivni interneuroni (41%), dok najmanje ima CR pozitivnih interneurona (11%). PV pozitivni interneuroni zastupljeni su s 23%. 23% čine GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij. Kod *St3Gal2* (8%) i *St3Gal3* (8%) miševa dolazi do značajnog smanjenja udjela PV pozitivnih interneurona u odnosu na CB i CR pozitivne interneurone. Udio CB pozitivnih interneurona u odnosu na PV i CR pozitivne interneurone smanjuje se kod *St3Gal2* (8%) i *St3Gal3* (8%) miševa, dok kod *St3Gal2/3* nepromjenjen (26%). Značajno povećanje udjela GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij vidljivo je kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa (Slika 54).



Slika 54. Udio PV, CB i CR pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima u regijama neokorteksa. GABA označava interneurone koji nisu pozitivni na PV, CB ili CR genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.3. Analiza interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

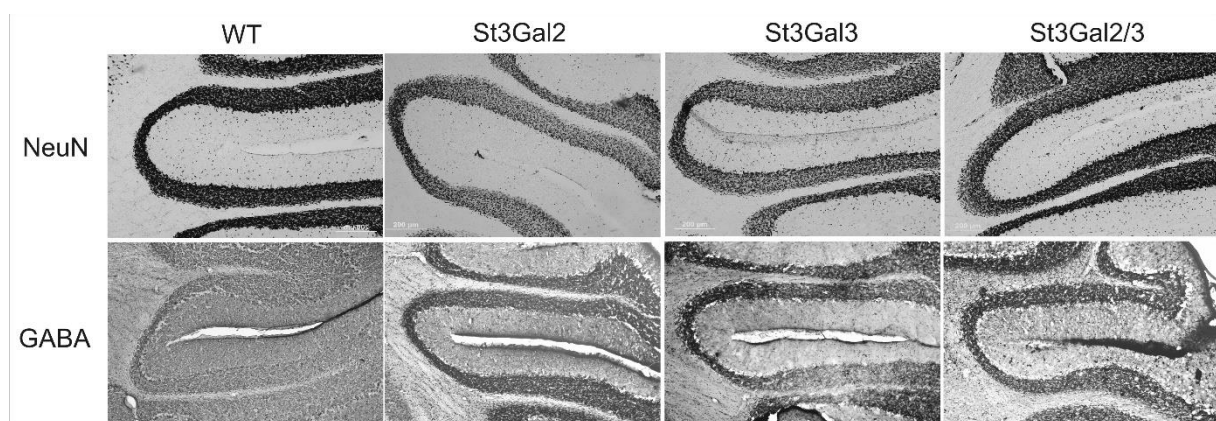
Interneuroni u malom mozgu analizirani su na koronarnim rezovima u tri sloja malog mozga: granularnom i molekularnom, te u sloju Purkinjeovih stanica (Slika 55).



Slika 55. Imunohistokemijski prikaz analiziranih regija malog mozga na koronarnom presjeku (MCL = molekularni sloj, PCL = sloj Purkinjeovih stanica, GCL = granularni sloj).

4.3.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona

Imunohistokemijska analiza pokazala je da sve regije malog mozga eksprimiraju neurone GABA fenotipa (Slika 56). Budući da GABA-ergični interneuroni čine određeni udio ukupnih neurona, rađena je dodatna analiza svih neurona neokorteksa pomoću NeuN protutijela. Karakteristika NeuN protutijela je da ne može detektirati Purinjeove stanice. Nakon kvantitativne analize slojeva malog mozga utvrđeno je postoji li razlika u broju GABA-ergičnih interneurona u odnosu na ukupan broj neurona, te razlika u distribuciji NeuN pozitivnih neurona i GABA-ergičnih.

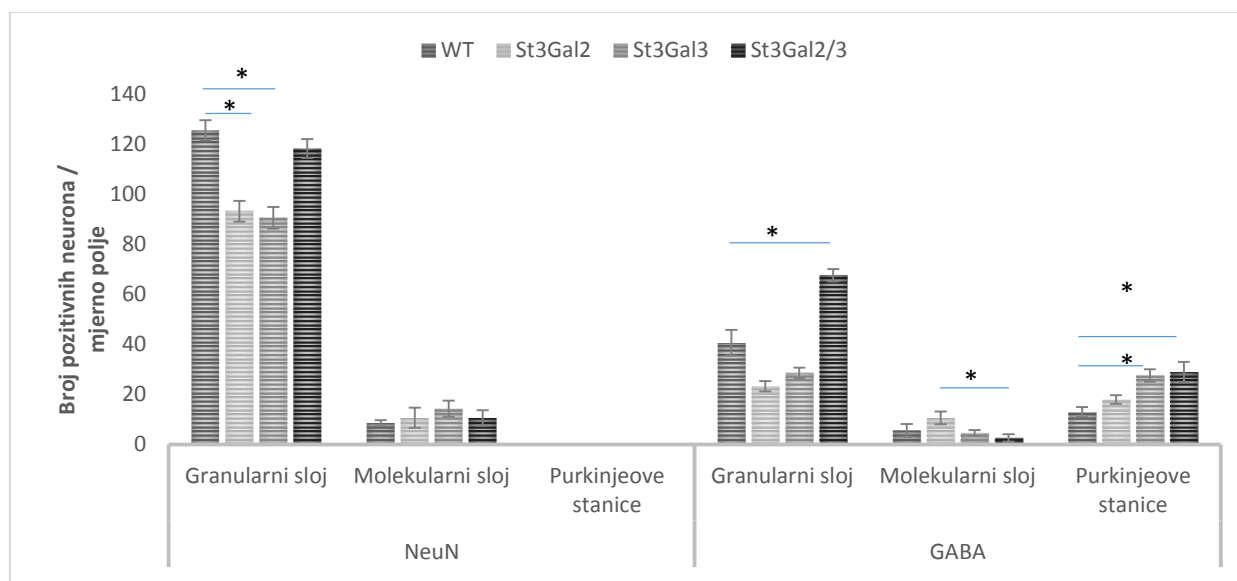


Slika 56. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

U granularnom sloju malog mozga broj ukupnih NeuN pozitivnih neurona iznosi $125,66 \pm 4$. Od toga $40,66 \pm 5$ pripada GABA-ergičnim interneuronima. Statistički značajno smanjenje broja ukupnih NeuN pozitivnih neurona vidljivo je kod *St3Gal2* ($p = 0,040$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0,043$). *St3Gal2/3* miševi imaju statistički značajno povećanje broja GABA-ergičnim interneuronima ($p = 0,022$).

U molekularnom sloju malog mozga broj ukupnih NeuN pozitivnih neurona iznosi $8,66 \pm 1,15$. Od toga $5,66 \pm 2,5$ pripada GABA-ergičnim interneuronima. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do statistički značajnog smanjenja broja GABA-ergičnim interneuronima ($p = 0,047$), dok kod *St3Gal2/3* dolazi do povećanja ($p = 0,027$).

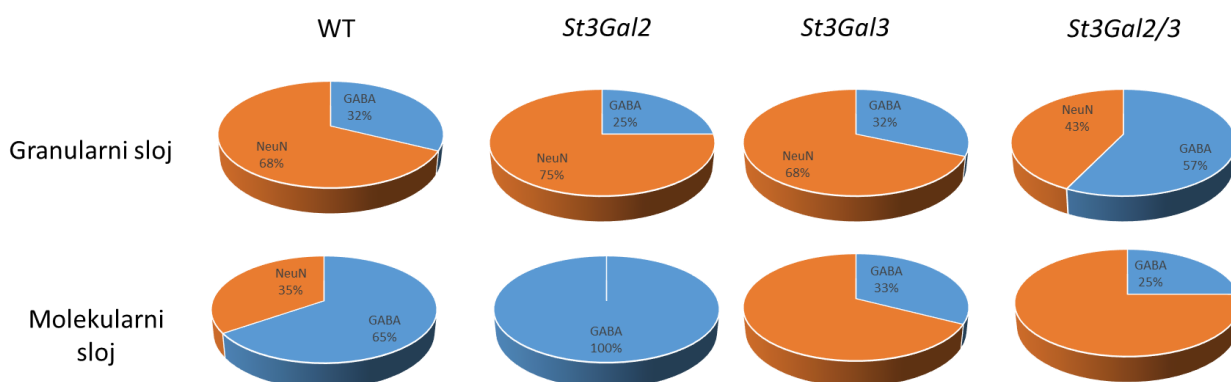
U Purkinjeovim stanicama NeuN pokazuje negativnu reakciju, tako da je određen samo broj Purkinjeovih stanice koje imaju GABA fenotip i njihov broj iznosi 13 ± 2 po mjernom polju. Broj GABA fenotipskih Purkinjeovih stanica povećava se kod svih genetički preinačenih mišjih modela, ali je statistički značajno povećanje broja vidljivo je kod *St3Gal3* ($p = 0,049$) i *St3Gal2/3* ($p = 0,046$) miševa (Slika 57).



Slika 57. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona analiziranih slojeva u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

U granularnom sloju malog mozga WT miševa udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona iznosi 32%. Do povećanja njihovog udjela dolazi kod *St3Gal2* miševa (25%), dok se kod *St3Gal2/3* miševa udio povećava (57%).

U molekularnom sloju malog mozga WT miševa udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona iznosi 65%. Udio GABA-ergičnih neurona u odnosu na ukupan broj neurona značajno se smanjuje kod *St3Gal3* (33%) i *St3Gal2/3* miševa (25%), dok kod *St3Gal2* miševa rezultati upućuju na to da su svi neuroni molekularnog sloja GABA-ergični (Slika 58).



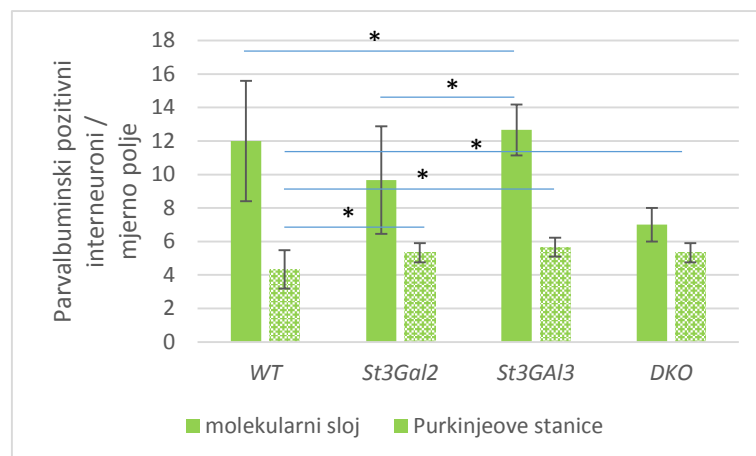
Slika 58. Udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona (NeuN) u molekularnom sloju malog mozga genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.3.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona

Pozitivnu reakciju na parvalbumin pokazali su interneuroni u molekularnom sloju i Purkinjeove stanice. U granularnom sloju nema PV pozitivnih interneurona (Slika 59). U molekularnom sloju malog mozga WT miševa broj PV pozitivnih interneurona iznosi 5 ± 1 . *St3Gal3* miševi se statistički značajno razlikuju od WT ($p = 0.006$) i *St3Gal2* miševima ($p = 0.006$) (Slika 60). Broj PV pozitivnih Purkinjeovih stanica iznosi $3,6 \pm 0,5$ stanica po mjernom polju. WT miševi se statistički značajno razlikuju od *St3Gal2* ($p = 0,005$), *St3Gal3* ($p = 0,008$) i *St3Gal2/3* miševa ($0,019$).



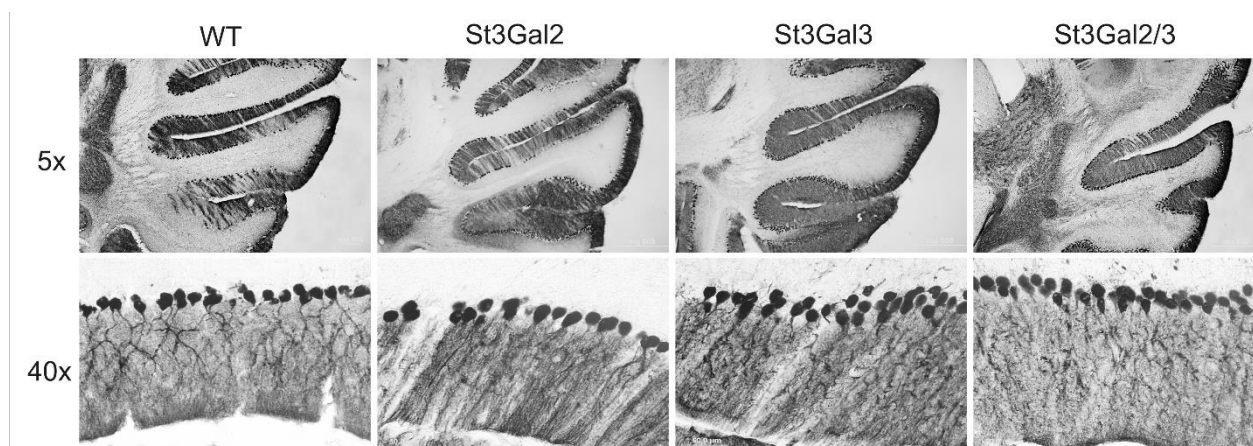
Slika 59. Imunohistokemijska analiza parvalbuminski pozitivnih interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



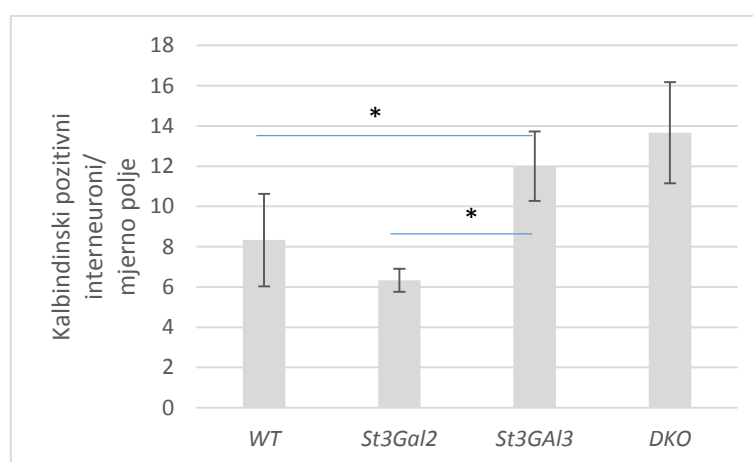
Slika 60. Grafički prikaz broja parvalbuminski pozitivnih interneurona analiziranih slojeva u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.3.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona

U malom mozgu kalbindinski pozitivne su samo Purkinjeove stanice koje su zastupljene sa 11 ± 1 CB pozitivnom stanicom po mjernom polju. Molekularni i granularni sloj nemaju CB pozitivne interneurone (Slika 61). *St3Gal2* miševi se statistički značajno razlikuju od WT ($p = 0,005$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0,001$) (Slika 62).



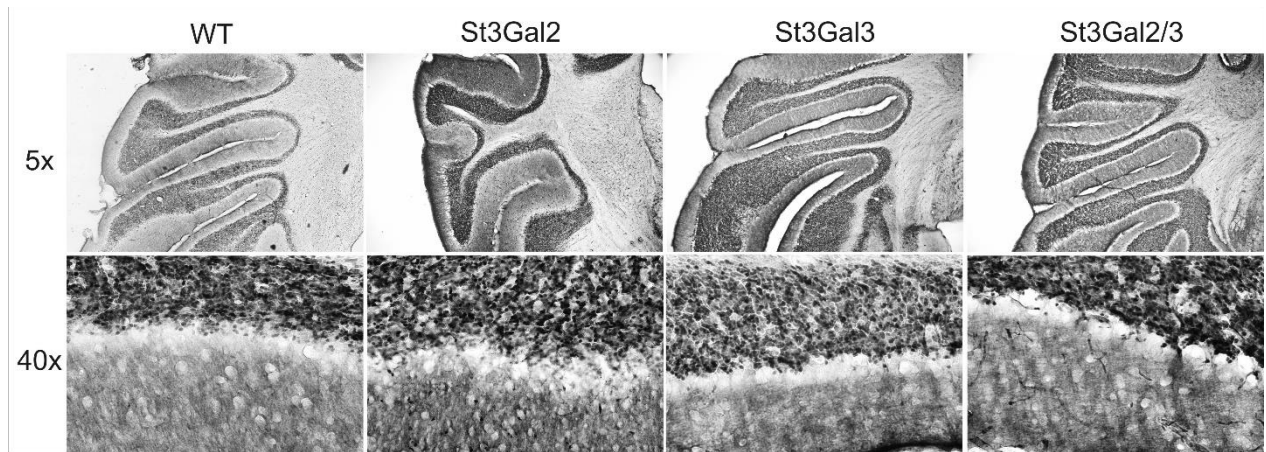
Slika 61. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



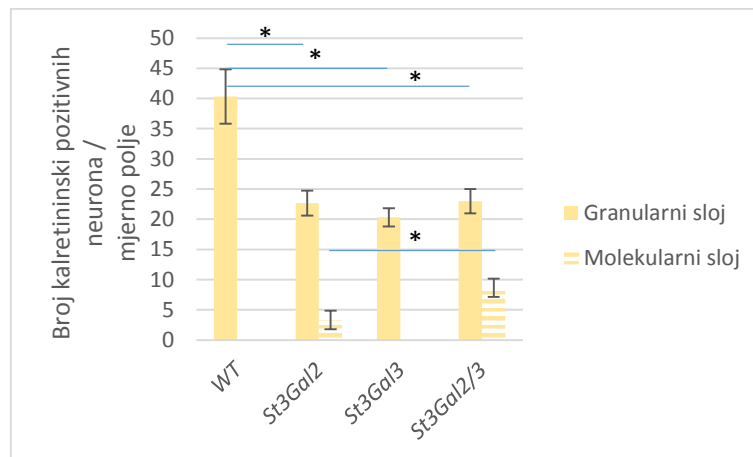
Slika 62. Grafički prikaz broja kalbindinski pozitivnih Purkinjeovih stanica u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.3.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininskih interneurona

U malom mozgu pozitivnu reakciju na kalretininsko protutijelo pokazali su interneuroni granularnom i molekularnom sloju. Purkinjeove stanice su kalretininski negativne (Slika 63). U granularnom sloju malog mozga WT miševa ima najviše CR pozitivnih interneurona, 40 ± 4 po mjernom polju. WT miševi se značajno razlikuju od *St3Gal2* ($p = 0,047$), *St3Gal3* ($p = 0,028$) i *St3Gal2/3* miševa ($p = 0,047$). Kod svih genetski preinačenih mišjih modela dolazi do statistički značajnog smanjenja u brojnosti. U molekularnom sloju WT miševa nema CR pozitivnih interneurona. Statistički značajno povećanje vidljivo je kod *St3Gal2* ($p = 0,003$) i *St3Gal2/3* miševa ($p = 0,017$) (Slika 64).



Slika 63. Imunohistokemijska analiza kalretininski pozitivnih interneurona u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



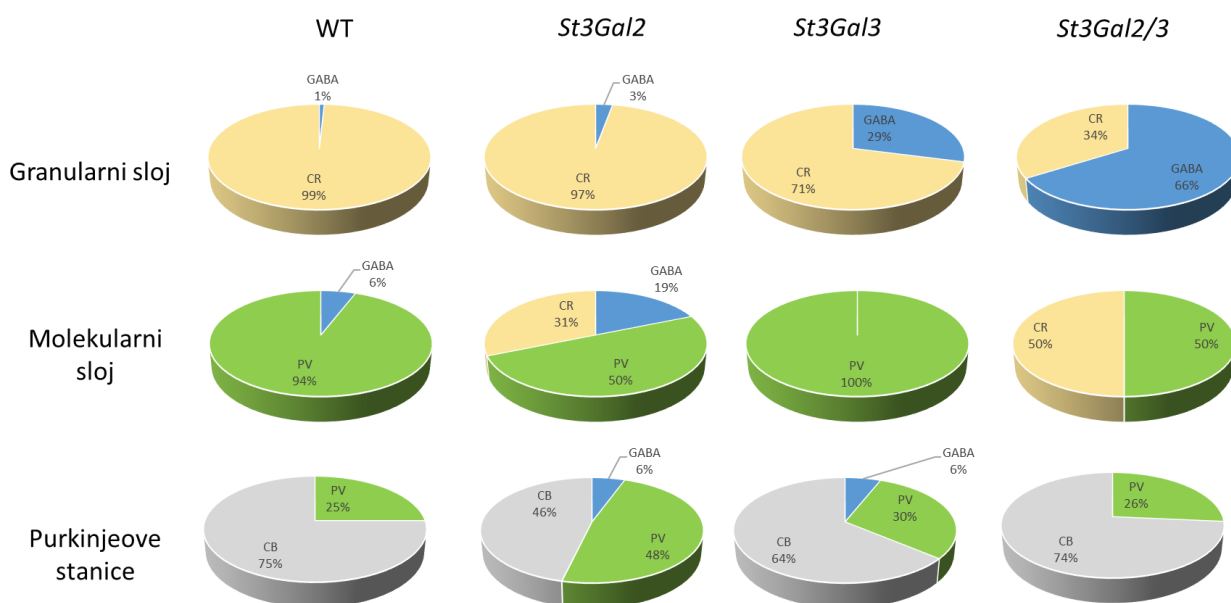
Slika 64. Grafički prikaz broja kalretininski pozitivnih interneurona analiziranih slojeva u malom mozgu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

U granularnom sloju malog mozga WT miševa 99% interneurona je CR pozitivan. 1% čine GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij. Udio CR pozitivnih interneurona u granularnom sloju smanjuje se kod *St3Gal3* (71%) i *St3Gal2/3* (34%) miševa, dok se u molekularnom sloju kod *St3Gal2* (31%) i *St3Gal2/3* (50%) povećava broj CR pozitivnih interneurona

U molekularnom sloju malog mozga WT miševa 94% interneurona je PV pozitivan. 6% čine GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij. Udio CR pozitivnih interneurona povećava se kod *St3Gal2* (31%) i *St3Gal2/3* (50%). Kod *St3Gal2* miševa

povećava se i udio GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij (19%), dok ih kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa u potpunosti nema.

U Purkinjeovim stanicama WT miševa 75% interneurona je CB pozitivno, a 25% PV pozitivno. Udio PV pozitivnih Purkinjeovih stanica povećava se kod *St3Gal2* (48%) i *St3Gal3* (30%) miševa. Udio CB pozitivnih Purkinjeovih stanica smanjuje se kod *St3Gal2* (46%) i *St3Gal3* (64%) miševa, gdje se također povećava i udio GABA-ergični interneuroni koji neeksprimiraju protein koji vežu kalcij (Slika 68).

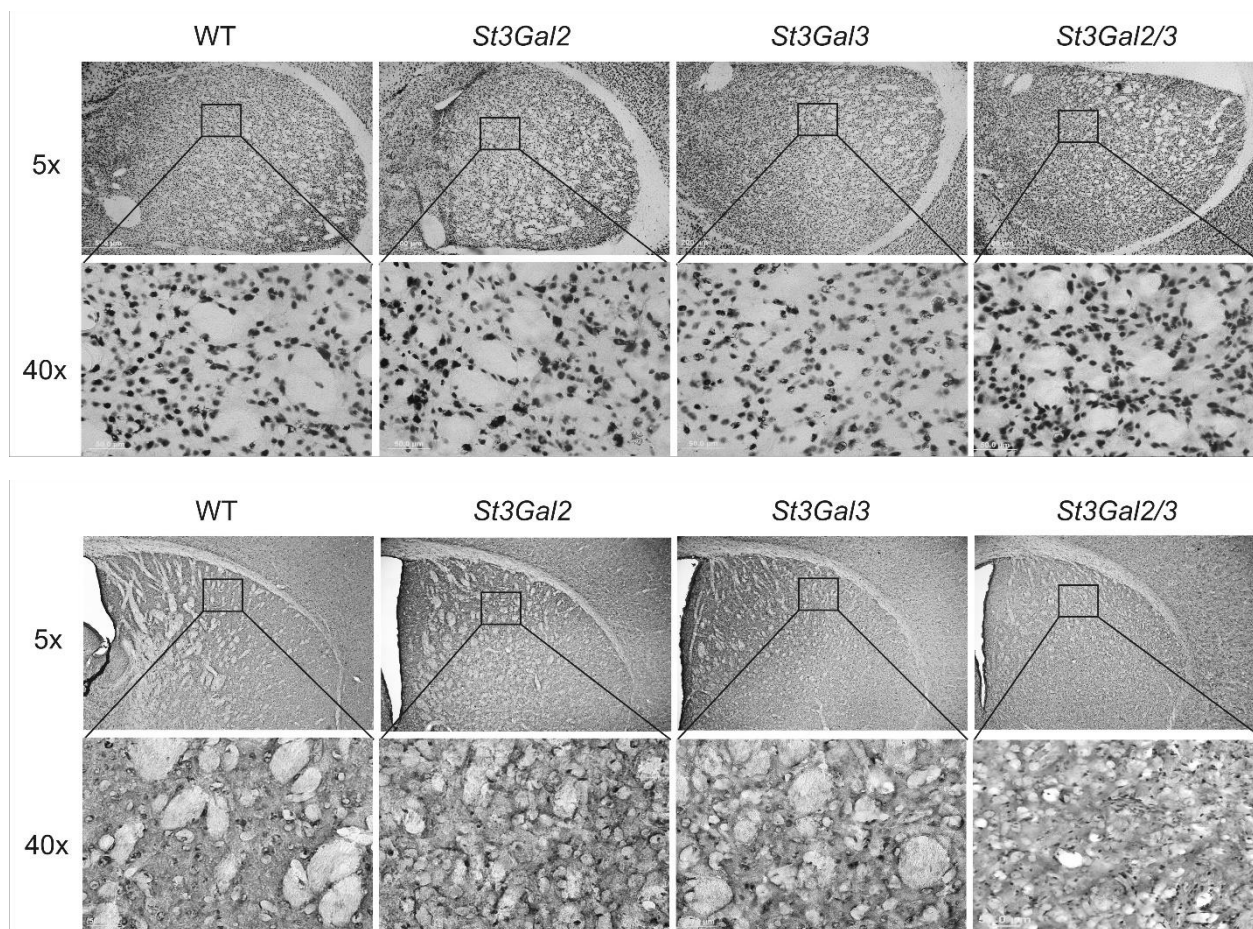


Slika 65. Udio PV, CB i CR pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima u slojevima malog mozga genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT). GABA označava interneurone koji nisu pozitivni na PV, CB ili CR.

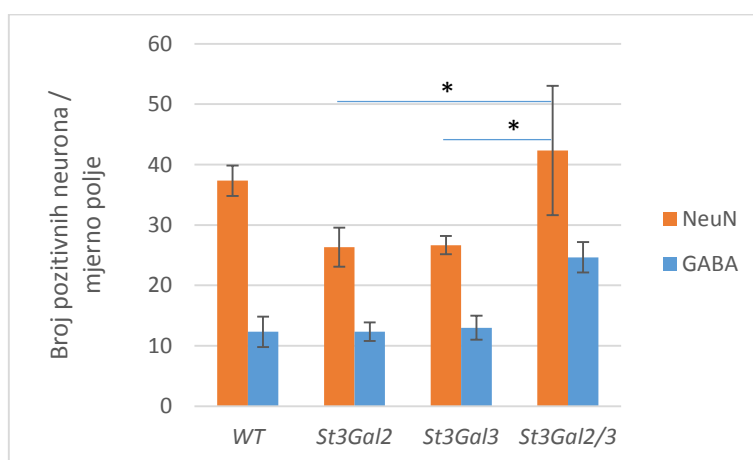
4.4. Analiza interneurona u striatumu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

4.4.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona

Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost GABA-ergičnih interneurona u striatumu svih mišjih modela (Slika 66). Budući da GABA-ergični interneuroni čine određeni udio ukupnih neurona, rađena je dodatna analiza svih neurona striatuma pomoću NeuN protutijela. Nakon kvantitativne analize slojeva striatuma utvrđeno je postoji li razlika u distribuciji NeuN pozitivnih neurona i GABA-ergičnih, te udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona.



Slika 66. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-erģičnih interneurona u striatumu genetski preinaĉenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

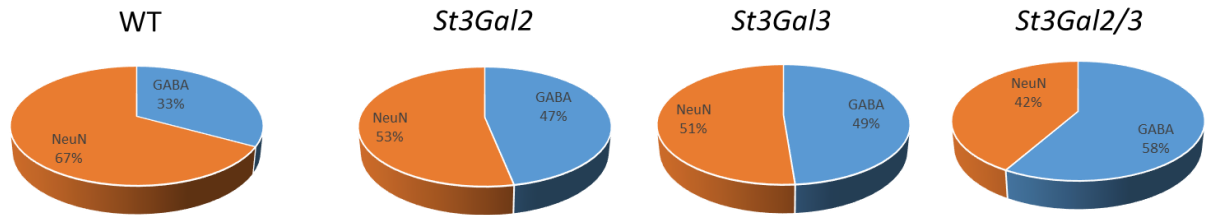


Slika 67. Grafiĉki prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-erģičnih interneurona analiziranih slojeva u striatumu genetski preinaĉenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4. Rezultati

U striatumu WT miševa ukupan broj NeuN pozitivnih neurona je $37,33 \pm 2$, dok $12,33 \pm 2$ od toga primada GABA-ergičnim interneuronima. Ukupan broj neurona *St3Gal2/3* miševa značajno se razlikuje od *St3Gal2* ($p = 0,022$) i *St3Gal3* miševa ($p = 0.042$) (Slika 67). Broj GABA-ergičnih interneurona statistički se značajno ne razlikuje između miševa.

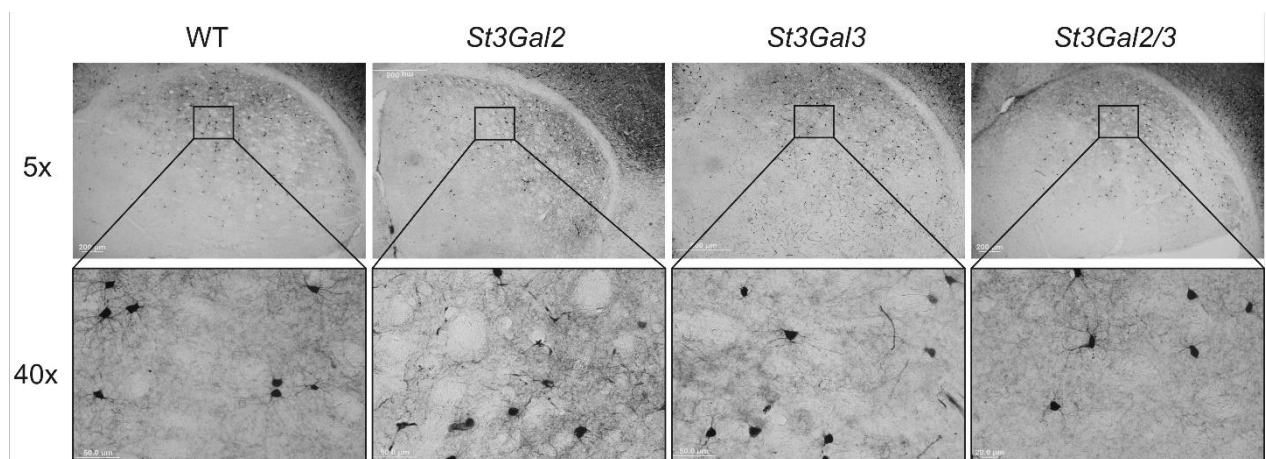
Udio GABA-ergičnih interneurona u striatumu WT miševa iznosi 33%. Kod svih genetički preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona (Slika 68).



Slika 68. Udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona (NeuN) u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.4.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona

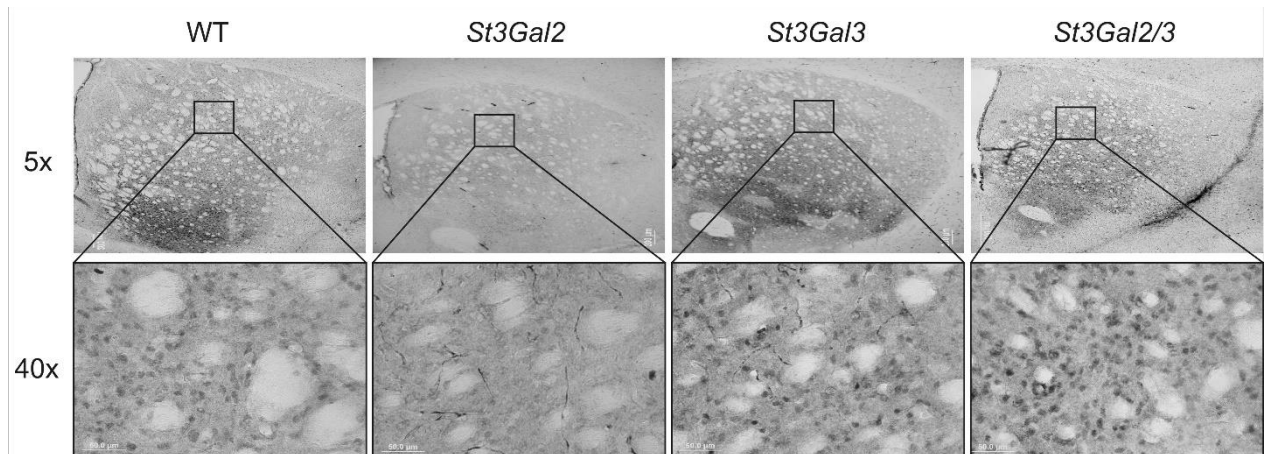
Parvalbuminski pozitivni interneuroni prisutni su u striatumu svih analiziranih životinja. Kod WT miševa broj PV pozitivnih interneurona po mjernom polju iznosi $1,33 \pm 1$, ali u njihovom broju nema statistički značajne razlike između miševa (Slika 69).



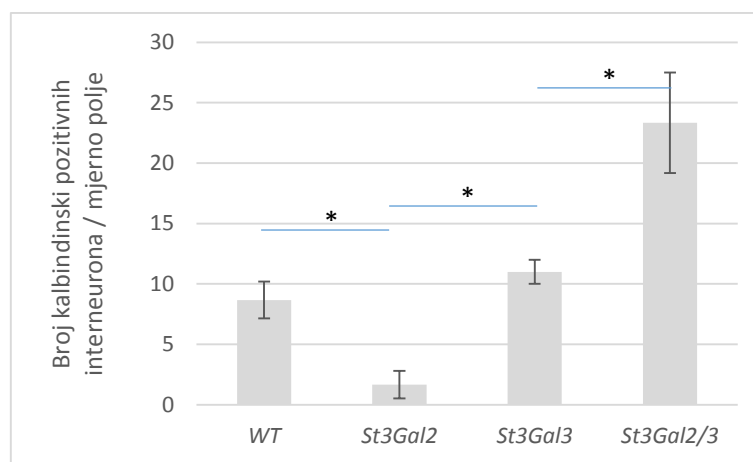
Slika 69. Imunohistokemijska analiza parvalbuminski pozitivnih interneurona u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.4.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona

Kalbindinski pozitivni interneuroni nalaze se u striatumu svih analiziranih miševa (Slika 70). Kod WT miševa broj CB pozitivnih interneurona po mjernom polju iznosi $8,66 \pm 1$. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do značajnog smanjenja ($p = 0,027$), a kod *St3Gal2/3* do povećanja broja CB interneurona ($p = 0,018$). Statistički značajna razlika vidljiva je između *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa ($p = 0,005$) (Slika 71).



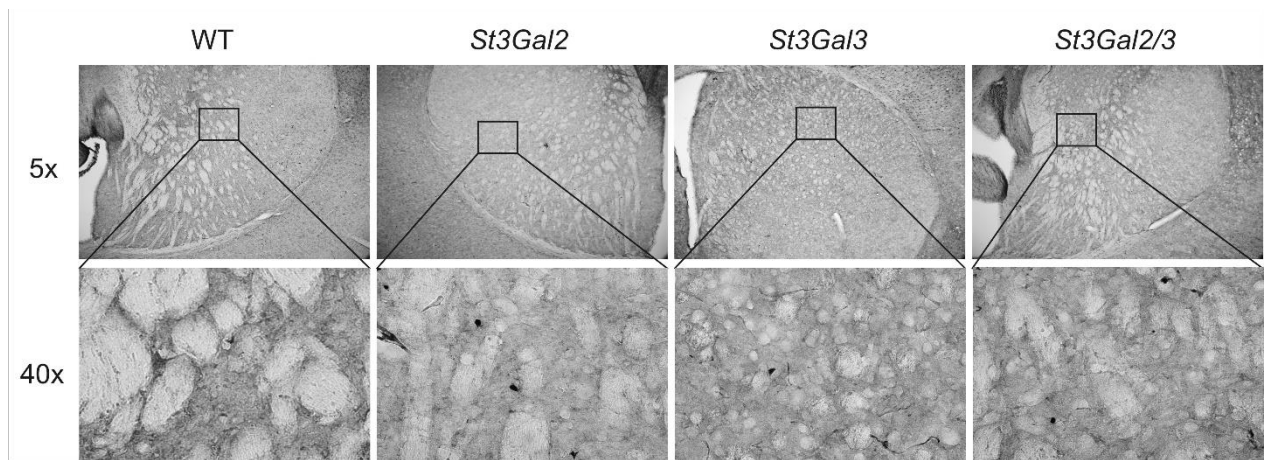
Slika 70. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).



Slika 71. Grafički prikaz broja kalbindinskih interneurona analiziranih u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

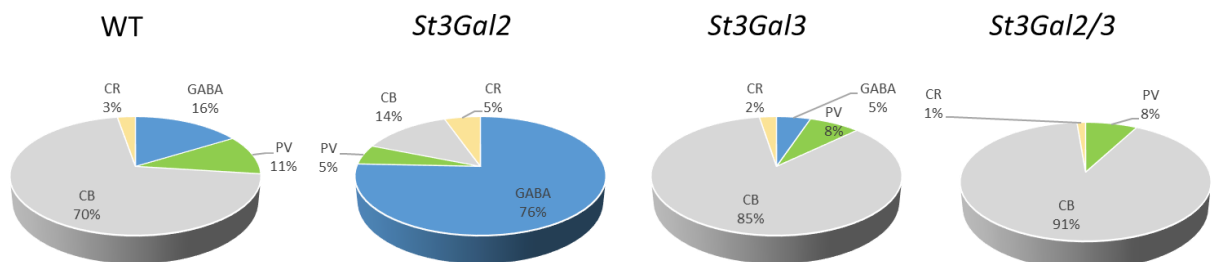
4.4.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininjskih interneurona

U striatumu analiziranih miševa kalretininjski interneuroni su prisutni u jako malom broju, pojavljuju se pojedinačno, a razlika između miševa nije statistički značajna (Slika 72).



Slika 72. Imunohistokemijska analiza kalretininjski pozitivnih interneurona u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

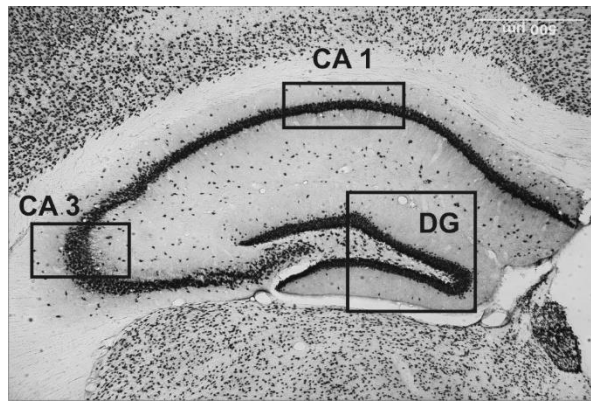
Kod WT miševa dominiraju CB pozitivni interneuroni (70%). PV pozitivni interneuroni zastupljeni su sa 11%, a CR pozitivni interneuroni sa 3%. 16% odnosi se na odnosu na GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij. Kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa dolazi do povećanja udjela CB pozitivnih interneurona, dok se udio PV pozitivnih interneurona smanjuje. *St3Gal2* imaju znatno povećan udio GABA-ergični interneuroni koji neekspimiraju protein koji vežu kalcij (76%), dok kod *St3Gal2/3* miševa takvih interneurona uopće nema (Slika 73).



Slika 73. Udio PV, CB i CR pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima u striatumu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT). GABA označava interneurone koji nisu pozitivni na PV, CB ili CR.

4.5. Analiza interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

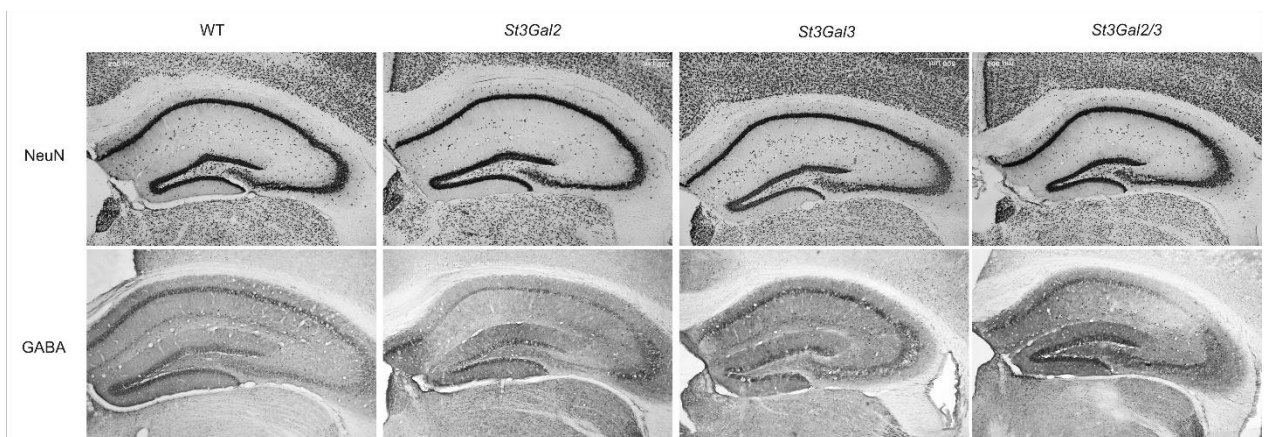
Interneurone hipokampusu analizirali smo u 3 regije: CA1, CA3 i *dentate gyrus* (DG) (Slika 74).



Slika 74. Prikaz analiziranih regija hipokampusu (CA1, CA3 i DG).

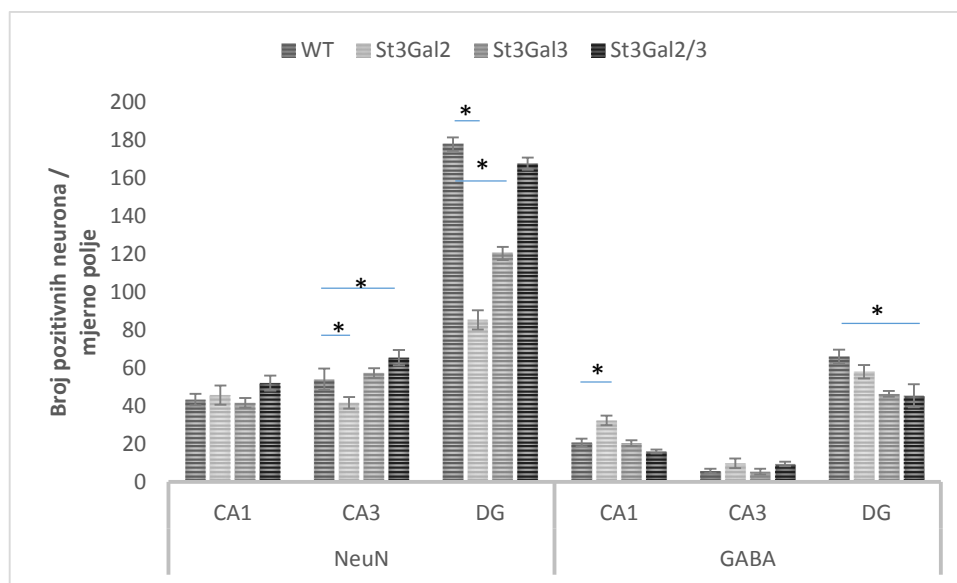
4.5.1. Imunohistokemijska lokalizacija GABA-ergičnih neurona

Imunohistokemijska analiza pokazala je prisutnost GABA-ergičnih interneurona u hipokampusu svih mišjih modela (Slika 75). Budući da GABA-ergični interneuroni čine određeni udio ukupnih neurona, rađena je dodatna analiza svih neurona hipokampusu pomoću NeuN protutijela. Nakon kvantitativne analize analiziranih regija hipokampusu utvrđeno je postoji li razlika u distribuciji NeuN pozitivnih neurona i GABA-ergičnih, te udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona.



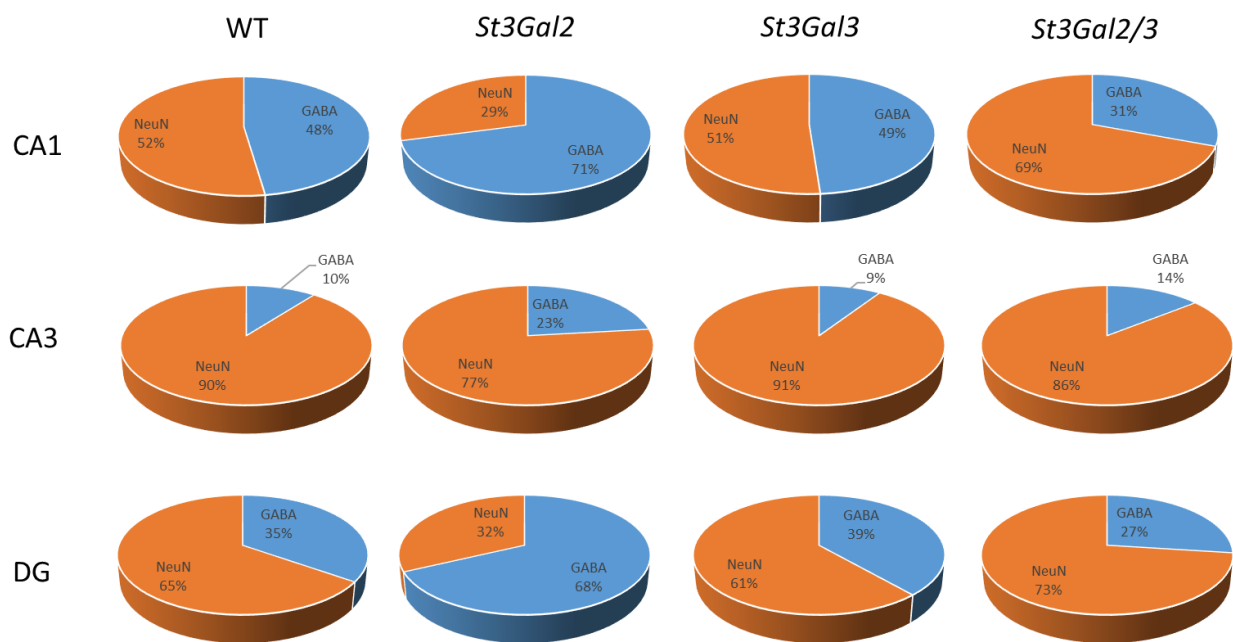
Slika 75. Imunohistokemijska analiza svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

Kod WT miševa u CA1 regiji hipokampusa ukupan broj NeuN pozitivnih neurona iznosu 43 ± 3 , a od toga GABA-ergičnih interneurona ima 20 ± 2 . Svi genetički preinačeni mišji modeli u ukupnom broju neurona statistički se ne razlikuju od WT miševa. Između WT i *St3Gal2* miševa postoji statistički značajna razlika u količini GABA-ergičnih interneurona ($p = 0.040$). WT miševi u CA3 regiji hipokampusa imaju 54 ± 4 NeuN pozitivnih neurona, od čega je 5 ± 2 GABA-ergičnih. Analizom CA3 regije hipokampusa utvrđena je satistički značajna razlika u ukupnom broju neurona između WT i *St3Gal2* miševa ($p = 0.010$), gdje kod *St3Gal2* miševa dolazi do smanjenja broja neurona, kao i između WT i *St3Gal2/3* ($p = 0.016$) gdje dolazi do povećanja broja neurona. Statistički značajne razlike u broju GABA-ergičnih interneurona nema. WT miševi u DG regiji hipokampusa imaju 178 ± 3 NeuN pozitivnih neurona, od čega je 62 ± 3 GABA-ergičnih. WT miševi se statistički značajno razlikuju u ukupnom broju neurona sa *St3Gal2* ($p = 0,026$) i *St3Gal3* miševima ($p = 0,040$). Ukupan broj neurona i GABA-ergični interneuroni u DG regiji smanjen je kod svih genetički preinačenih mišjih modela, a statistički značajna razlika postoji između WT i *St3Gal3* miševa ($p = 0,030$) (Slika 76).



Slika 76. Grafički prikaz broja svih neurona (NeuN) i GABA-ergičnih interneurona analiziranih u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

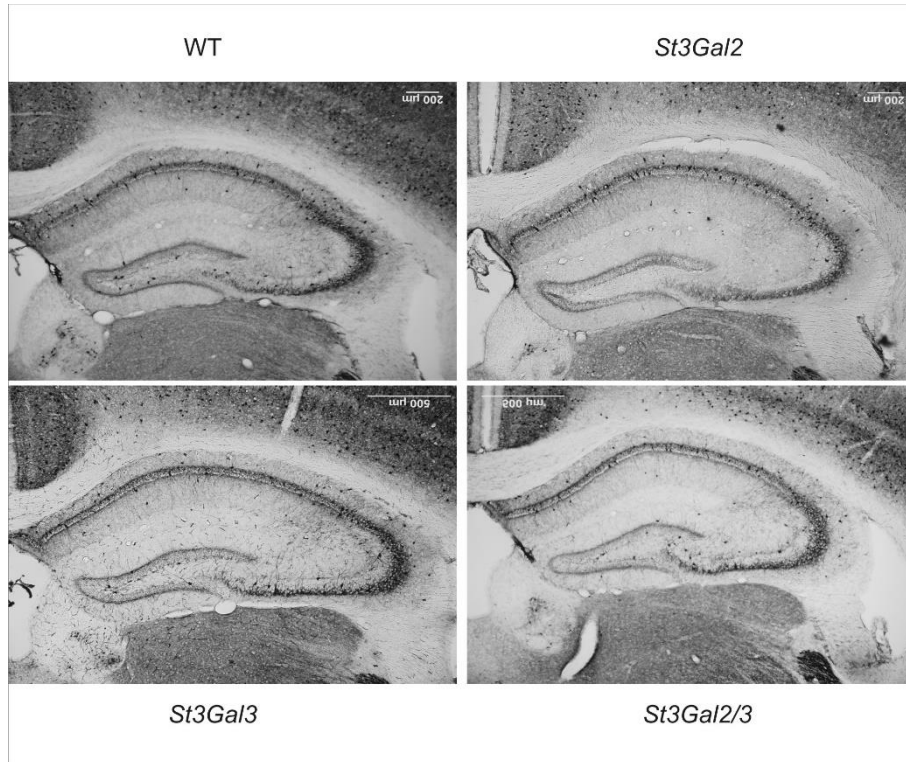
Udio GABA-ergičnih interneurona u CA1 regiji WT miševa iznosi 48%. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do povećanja tog udjela (71%), a kod *St3Gal2/3* miševa do smanjenja (31%). U CA3 regiji WT miševi imaju 10% GABA-ergičnih interneurona. Kod *St3Gal2* i *St3Gal2/3* miševa dolazi do povećanja tog udjela. Udio GABA-ergični interneuroni u DG regiji WT miševa iznosi 35%. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do značajnog povećanja njihovog udjela (77%), dok kod *St3Gal2/3* dolazi do smanjenja (27%) (Slika 77).



Slika 77. Udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona (NeuN) u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.5.2. Imunohistokemijska lokalizacija parvalbuminskih interneurona

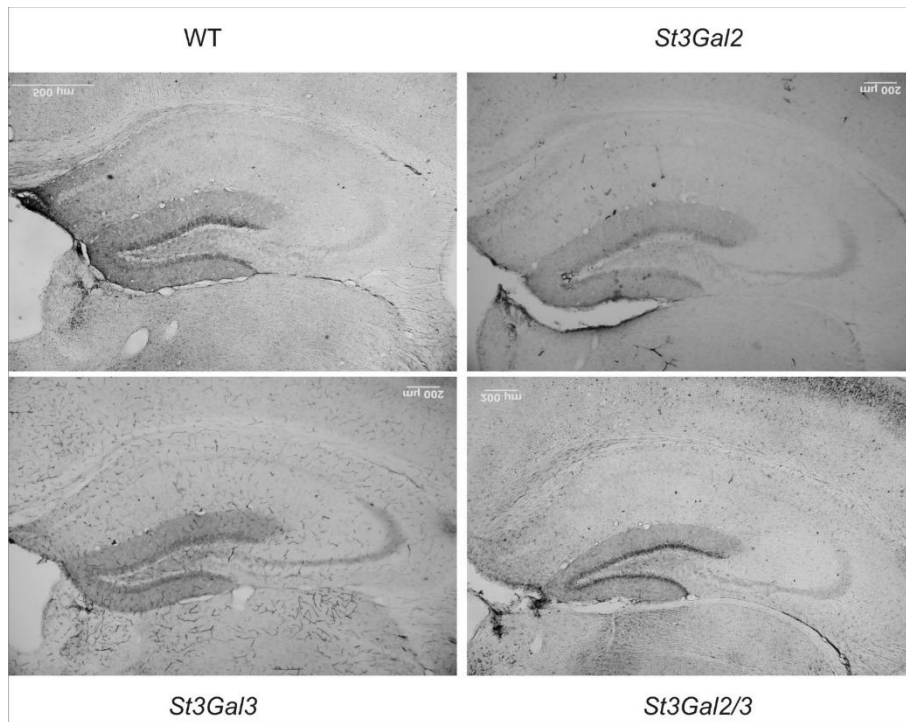
Pozitivnu reakciju na parvalbumin pokazali su interneuroni u sve tri analizirane regije hipokampusa WT, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa ali među njima nema statistički značajne razlike. PV interneuroni nisu prisutni jedino u DG regiji *St3Gal2* miševa (Slika 78).



Slika 78. Imunohistokemijska analiza parvalbuminski pozitivnih interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.5.3. Imunohistokemijska lokalizacija kalbindinskih interneurona

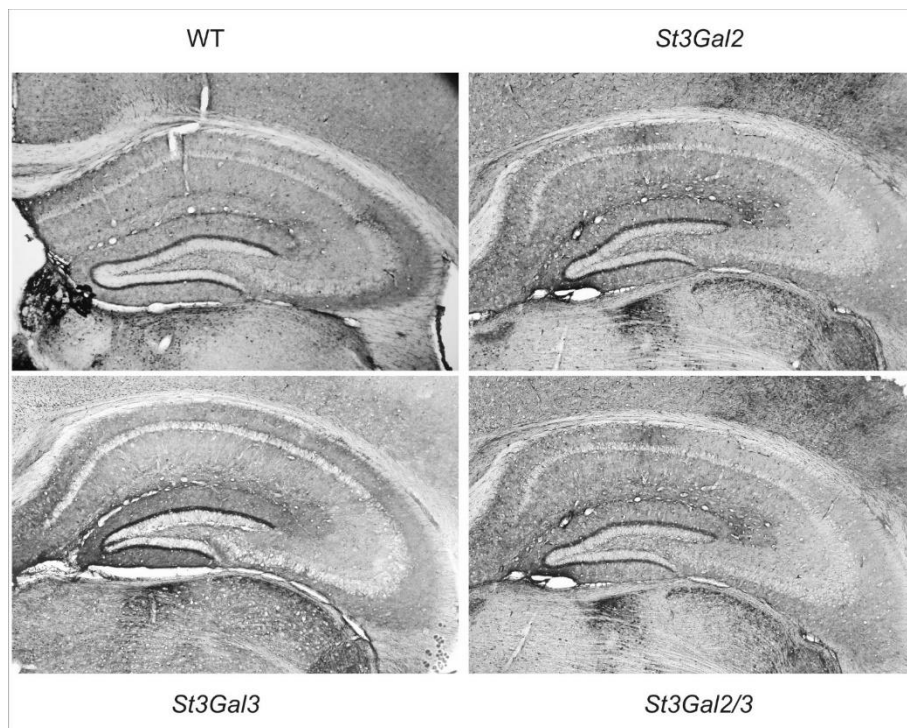
Kalbindinski pozitivni interneuroni detektirani su jedino u DG regiji hipokampusa, dok ih u CA1 i CA3 regijama nema (Slika 79). Statistički značajne razlike u njihovom broju nema.



Slika 79. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

4.5.4. Imunohistokemijska lokalizacija kalretininskih interneurona

Kao i kalbindinski, kalretininski pozitivni interneuroni dominiraju u DG regiji hipokampusa. U CA1 regiji pojavljuju se pojedinačni CR interneuroni, dok ih u CA3 regija nema. U DG regiji WT miševa ukupan broj NeuN pozitivnih neurona je 178 ± 3 , od čega je 62 ± 3 GABA-ergičkih interneurona. U broju ukupnih neurona statistički značajna razlika vidljiva je između WT i *St3Gal2* miševa ($p = 0,042$), WT i *St3Gal3* miševa ($p = 0,035$) i WT i *St3Gal2/3* miševa ($p = 0,027$ (Slika 80).

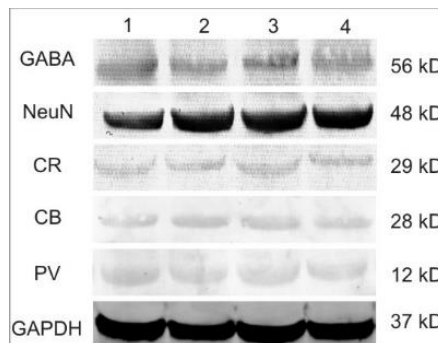


Slika 80. Imunohistokemijska analiza kalbindinski pozitivnih interneurona u hipokampusu genetski preinačenih mišjih modela (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) i divljeg tipa (WT).

Udjeli pojedinih interneurona koji eksprimiraju protein koji vežu kalcij nisu računati jer se interneuroni pojavljuju u jako malom broju.

4.6. Western blot analiza proteina koji vežu kalcij u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

Western blot analiza pokazala je da u homogenate cijelog mozga ne postoji statistički značajna razlika između pojedinih miševa u broju ukupnih neurona, kao ni u broju GABA-ergičnih interneurona. Kao unutarnja kontrola korišten je gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) (Slika 81).



Slika 81. Western blot analiza na mozgu genetski preinačenih mišjih modela (1 = WT, 2= *St3Gal2*, 3 = *St3Gal3*, 4 = *St3Gal2/3*).

5. RASPRAVA

Ovim istraživanjem po prvi put se dokazuje direktna povezanost između sinteze kompleksinih gangliozida i distribucije GABA-eričkih interneurona u mozgu genetskih preinačenih miševa. Prikazani rezultati odnose se na posebnu skupinu interneurona koji eksprimiraju proteine koji vežu kalcij, te iskazuju parvalbuminski, kalbindinski i kalretikulinski fenotip. U svrhu razjašnjavanja funkcija gangliozida razvijeni su različiti genetski preinačeni mišji modeli s deficitarnom ili prekomjernom sintezom gangliozida, odnosno izmijenjenim genima enzima za biosintezu ili razgradnju gangliozida⁶⁷. S patofiziološkog gledišta, poremećaji homeostaze iona kalcija u neuronu uključeni su u degenerativne bolesti, starenje i ekscitotoksičnost, te ishemiju i hipoglikemiju. Promjene u količini i sastavu gangliozida detektirani su u neurodegenerativnim bolestima poput Alzheimerove, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti⁴⁴. Nedostatak interneurona moguća je poveznica između kognitivne disfunkcije i promjenjive neuronske aktivnosti kod različitih neurodegenerativnih bolesti⁹⁵. Poznato je da je nedostatak interneurona moguća poveznica između kognitivne disfunkcije i promjena neuronske aktivnosti kod Alzheimerove bolesti⁹⁶. Shizofrenija, autizam i intelektualne poteškoće predstavljaju spektar bolesti koje imaju široku skupinu mogućih uzroka pa tako i poremećaj u strukturi i funkciji inhibicijskih krugova može biti jedan od njih. Nedavne studije na životinjama pokazuju da je molekularna osnova takvih poremećaja povezana s određenim nedostacima u razvoju i funkcioniranju interneurona⁹⁷. Gangliozidi su prisutni u različitim tipovima neurona: projekcijskim (eferentnim i aferentnim), asocijacijskim, komisuralnim i interneuronima⁹⁸. Nedavno je dokazano da različite podvrste inhibicijskih interneurona možemo razlikovati na temelju prisutnosti tri važna proteina koji služe kao unutarstanični puferi Ca^{2+} - parvalbumin, kalbindin i kalretinin³. S obzirom na sve prethodno navedeno i veliku važnost gangliozida, analizirali smo potencijalnu ulogu gangliozida u procesu proliferacije, migracije i diferencijacije interneurona koji vežu kalcij (PV, CB i CR) u osnovnim regijama mozga genetski preinačenih mišjih modela: neokorteksu i to u 4 primarne regije: motoričkoj, osjetnoj, slušnoj i vidnoj, te u malom mozgu, striatumu i hipokampusu.

5.1. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne motoričke regije neokorteksa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Neokorteks ili kora velikog mozga sastavljena je od šest slojeva u kojim su raspoređeni neuroni. Većina neurona neokorteksa su ekscitorni piramidalni (80%), dok ostatak čine interneuroni (20%)⁹⁹. Dobiveni rezultati pokazuju da u M1 regiji neokorteksa kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 31% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod svih genetički preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona (*St3Gal2* = 37%, *St3Gal3* = 49%, *St3Gal2/3* = 42%). Interneuroni pozitivni na proteine koji vežu kalcij čine 79% od ukupnog broja GABA-ergičnih interneurona, a najveći udio odnosi se na CB pozitivne interneurone (49%). Kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona koji su negativni na PV, CB i CR, dok kod *St3Gal2/3* miševa takvih interneurona nema. *St3Gal3* miševi su karakteristični i po tome što kod njih dolazi do smanjenja udjela CB pozitivnih interneurona (7%), a istovremeno se povećava udio CR pozitivnih interneurona (Tablica 2). Inhibicijski interneuroni su od presudne važnosti za funkciju moždane kore i ponašanje. Mehanizmi koji kontroliraju raznolikost i raspodjelu inhibitornih neurona u različitim regijama korteksa su još uvijek slabo istraženi. Ovo istraživanje, kao i sva buduća vezana istraživanja doprinose razjašnjavanju tih mehanizama. Navedena pojava u korelaciji je s povezanim aktivnostima različitih regija neokorteksa i vjerojatno sa pojavom inhibitorne aktivnosti neokorteksa¹⁰⁰. Poznato je da kod štakora oboljelih od Parkinsonove bolesti također dolazi do povećanja PV pozitivnih interneurona u M1 regiji¹⁰¹, što može biti povezano sa otežanom motoričkom aktivnošću *St3Gal2/3* miševa. Smanjene motoričke aktivnosti moguća su posljedica povećanja palidalne inhibitorne aktivnosti koja za posljedicu ima akineziju i mišićnu rigidnost¹⁰². *St3Gal2* miševi imaju najmanji udio interneurona pozitivnih na proteine koji vežu kalcij. Poznato je da redukcija GABA inhibicije olakšava dugoročnu potencijaciju u motoričkom korteksu^{103,104}. Nepravilnosti kod inhibitornih neurona dokazane su kod nekoliko neuroloških poremećaja kao što su epilepsija i shizofrenija⁴². Također, poznata je njihova uloga kod bipolarnog poremećaja i autizma. Kod nižih sisavaca gotovo svi GABA-erični interneuroni korteksa generiraju se dalje od krajnjeg odredišta i to u specifičnoj regiji telencefalona, medijalnoj ganglijskoj eminenciji. Većina dosadašnjih istraživanja još uvijek se bazira na distribuciju interneurona koji su pozitivni na proteine koji vežu kalcij, ali nedostaje istraživanja koja povezuju izmjenjenu distribuciju sa funkcijom. Funkcija tih proteina treba biti još detaljno istražena u smislu elektrofizioloških i morfoloških karakteristika interneurona. Jedna od smjernica koje bi se mogle koristiti u daljnim istraživanjima odnosi se na ubrizgavanje PV, CB i CR u neurone kojima nedostaju ili

blokiranjem funkcije interneurona koji ih eksprimiraju ubrizgavanjem specifičnih protutijela. Dokazano je da je rijedak oblik urođene epilepsije posljedica mutacije gena koji sudjeluje u stvaranju gangliozida u mozgu. Temeljem navedenog možemo zaključiti kako je razvoj proteina koji vežu kalcij u interneuronima M1 regije ovisan o aktivnost gena *St3Gal2* i *St3Gal3*, kao i njihovih produkata, koji osim gangliozida uključuju i glioproteine. Kod *St3Gal2/3* miševa pojačana je ekspresija GM1 gangliozida, što također može biti faktor koji utječe na promjene u neurološkoj funkciji, te je dodatno potrebno odrediti na kojim se točno stanicama eksprimira GM1. U prilog tome ide i istraživanje u kojem je potvrđeno da ubrizgavanje GM1 gangliozida u motoričku i senzoričku regiju korteksa štakora uzrokuje nastanak reverzibilnih epileptičkih napada¹³. Primarni motorički korteks upravlja voljnim pokretima tijela, dok motorička asocijativna područja pomažu u planiranju i izvršavanju motoričke aktivnosti¹⁰⁵. Interneuroni omogućuju selektivno i vremenski usklađeno djelovanje osjetnih i silaznih motoričkih signala na spinalne refleksne krugove. Inhibicijski interneuroni omogućuju usklađeno djelovanje mišića oko jednog zgloba¹⁰⁶, te usklađuju djelovanje suprotstavljenih mišića¹⁰⁷. Takav rezultat upućuje na moguću bitnu ulogu gangliozida GD1a i GT1b u procesu migracije interneurona, te procesu njihovog sazrijevanja, te na eventualnu ulogu gangliozida koji nastaju nizvodno od bloka u sintezi – acetiliranih forma i c-serije polisijalogangliozida ili sijaloglikoproteina. Ovi rezultati podupiru teoriju koja se odnosi na to da gangliozidi služe kao modulatori dostupnosti dvovalentnih kationa, kalcij i magnezij ovisnih adhezijskih sustava i time utječu na vezanje liganda¹². Alternativna teorija zasniva se na činjenici da gangliozidi mogu regulirati bočno širenje i sudjelovati u stvaranju signalnih kompleksa u membranskim mikrodomenama i na taj način ometati funkciju drugih proteina, kao što je integrin i TAG-1.

5.2. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne osjetne regije neokorteksa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

Dobiveni rezultati pokazuju da u S1 regiji neokorteksa kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 27% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. *St3Gal3* miševi jedini od istraživanih genetički preinačenih modela imaju povećanje udjela GABA-ergičnih interneurona (38%). Kod WT miševa svi GABA-ergični interneuroni se dijele na interneurone pozitivne na proteine koji vežu kalcij (PV, CB i CR). Razlika se pojavljuje kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa koji imaju određeni udio GABA-ergičnih interneurona koji ne sadrže protein koji vežu kalcij. Primarna osjetna područja primaju somatske, vidne, slušne, mirisne i okusne podražaje iz perifernih receptora. Glavna uloga neurona S1 regije je provođenje akcijskog potencijala od receptivnih osjetnih područja u središnja asocijativna područja SŽS u kojima se generiraju

osjeti¹⁰⁸. Nekoliko studija pokazalo je da gubitak GABA-ergičnih interneurona pojačava osjećaj boli^{109–111}. Ta činjenica upućuje na moguću smanjenu osjetljivost na bol kod *St3Gal3* miševa. U svim osjetnim modalitetima, informacije se provode vertikalno kroz slojeve korteksa¹¹². Interneuroni korteksa djeluju inhibicijski na ekscitacijske stanice i na taj način formiraju određeni modalitet osjeta¹¹³. Istraživanja S1 regije neokorteksa u zadnjih nekoliko godina bazirana su na analizu tipova GABA-ergičnih interneurona u bačvastom polju^{107,114}, ali poznavanje njihove funkcionalne uloga, kao i strukturne karakteristike još uvijek su oskudne. Poznato je da su svi CB pozitivni interneuroni korteksa pod direktnim utjecajem GABA-ergičnih interneurona koji eksprimiraju peptid VIP. Indirektna funkcionalna posljedica toga moguća je disinhibicija piramidálnih stanica, za koje se smatra da su jedan od osnovnih ciljeva CB pozitivnih interneurona¹¹⁵. Budući da *St3Gal2* i *St3Gal3* miševi imaju smanjeni udio CB pozitivnih interneurona, postoji mogućnost da je kod njih povećana inhibicija piramidálnih stanica. Kako bi se objasnila uloga različitih tipova inhibitornih neurona, potrebno je napraviti detaljnu analizu inhibitornih neurona po slojevima korteksa. Također, uz analizu po slojevima, osim proteina koji vežu kalcij, potrebno je analizirati i ostale neuropeptide kao što su VIP i SOM.

5.3. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne vidne regije neokorteksa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

Dobiveni rezultati pokazuju da u V1 regiji neokorteksa kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 33% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod svih genetički preinačenih miševa dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona, tako *St3Gal2/3* miševi imaju duplo veći udio GABA-ergičnih interneurona (69%). Kod WT miševa udio PV, CB i CR pozitivnih interneurona u odnosu na ostale GABA-ergične interneurone iznosi 95%. Kod svih genetički preinačenih mišjih modela taj udio se smanjuje, posebno kod *St3Gal2/3* miševa kod kojih iznosi 59%. Udio PV i CB pozitivnih interneurona smanjuje kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa. Istovremeno kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa dolazi do smanjenja broja CR pozitivnih interneurona. Kod primata i glodavaca reducirani osjetni podražaji dovode do smanjene ekspresije GAD i GABA-e¹¹⁶. Temeljem toga možemo zaključiti da su kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa povećani osjetni podražaji. Frekvencija spontanog GABA-ergičnog odgovora progresivno se povećava u početnoj fazi života glodavaca, što se reflektira povećanjem gustoće GABA-ergičnih sinapsi¹¹⁷. Također, poznato je i da GABA negativno utječe na proliferaciju matičnih stanica¹¹⁸. Utjecaj GABA-e na migraciju interneurona ovisi o depolarizacijskoj aktivnosti u nezrelim neuronima¹¹⁹. Količina PV

pozitivnih interneurona u V1 regiji ima bitnu ulogu u procesu orijentacije, veću nego piramidalni neuroni¹²⁰. Funkcionalno sazrijevanje inhibitornih interneurona ima glavnu ulogu u plastičnosti vizualnog korteksa vezanu za očnu dominaciju¹²¹. Inhibicija posredovana GABA-ergičnim interneuronima koji su PV pozitivni kontrolira vremensko i prostorno širenje neuronskih krugova korteksa¹²⁰. Nedostatak osjetnih i vizualnih podražaja uzrokuje smanjenje broja PV pozitivnih interneurona¹²². Također, ekspresija PV pozitivnih interneurona uvelike je ovisna o vanjskim faktorima, odnosno vizualnim stimulacijama¹²³. Test dubinske percepcije pokazao je da između *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* nema razlike usporedno sa WT miševima¹²⁴. CR pozitivni interneuroni formiraju mrežu koja zaustavlja inhibiciju piramidalnih neurona¹²⁵. Budući da GABA kontrolira proliferaciju i migraciju neurona možemo zaključiti da je kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa moguć poremećaj u razvoju GABA-ergičnih neuronskih krugova, odnosno da je povećano stvaranja GABA-ergičnih sinapsi u određenom životnom razdoblju.

5.4. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima primarne slušna regije neokorteksa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*

Dobiveni rezultati pokazuju da u Au1 regiji neokorteksa kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 45% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod *St3Gal2* miševa ta se razlika smanjuje (39%), dok se kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa povećava. Udio PV i CB pozitivnih interneurona se također smanjuje kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa. Smanjena ekspresija GABA-ergičnih interneurona prisutna je kod pacijenata oboljelih od shizofrenije¹²⁶. Starosni gubitak sluha povezan je sa opadanjem ekspresije PV pozitivnih interneurona¹²⁷. Također, dokazana je i selektivna regulacija prema nižim protein GAD67 i PV u PV pozitivnim interneuronima smještenih u III-V sloju prefrontalnog korteksa^{128,129}. PV pozitivni interneuroni imaju ulogu u inicijaciji kritičnog perioda kortikalne plastičnosti u vizualnom, osjetnom i slušnom korteksu¹³⁰⁻¹³². Bilateralna ablacija pužnice uha uzrokuje redukciju GABA-ergičnih interneurona PV i CB¹³³. Upravo to je slučaj kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa, prema čemu možemo zaključiti moguće postojanje poremećaja u percepciji zvuka. Kako bi se to potvrdilo potrebno je provesti slušne biheviorističke testove. Osim toga ovu teoriju podržava i činjenica da kod *St3Gal* i *St3Gal3* miševa dolazi do povećane ekspresije CR pozitivnih interneurona. Povećana ekspresija CR pozitivnih interneurona javlja se nakon unilateralnog uklanjanja Au1 regije kod miševa¹³⁴. Dokazano je da miševi koji ekspimiraju samo GM3 pate od fatalnih audiogenih napada, koji mogu biti posljedica dugoročnom izlaganju zvukovima visoke

frekvencije¹³⁵. Dobiveni rezultati sugeriraju da osim povećane ekspresije GM1 i kompleksni gangliozi imaju bitnu ulogu u razvoju sluha.

Tablica 2. Prikaz udjela (%) interneurona u neokorteksu kod WT, *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Regija neokorteksa		WT	<i>St3Gal2</i>	<i>St3Gal3</i>	<i>St3Gal2/3</i>
M1	GABA	◦	↑	↑	↑
	PV	◦	◦	↑	↑
	CB	◦	↓	↓	↑
	CR	◦	◦	↓	◦
	GABA*	◦	↑	↑	-
S1	GABA	◦	◦	↑	◦
	PV	◦	↓	◦	◦
	CB	◦	↓	↓	↑
	CR	◦	↓	◦	↓
	GABA *	-	↑	↑	-
V1	GABA	◦	↑	↑	↑
	PV	◦	↓	↓	↓
	CB	◦	↓	↓	↓
	CR	◦	↑	↑	↓
	GABA*	◦	↑	↑	↑
Au1	GABA	◦	↓	↑	↑
	PV	◦	↓	↓	◦
	CB	◦	↓	↓	↑
	CR	◦	↑	↑	◦
	GABA*	◦	↑	↑	↓

Vrijednosti prikazane u tablici: GABA = udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona; PV = udio parvalbumin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; CB = udio kalbindin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; CR = udio kalretinin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; GABA* = udio interneurona negativnih na PV, CB i CR u ukupnim GABA-ergičnim neuronima; ◦ = kontrola – nema promjene; ↓ = smanjenje udjela; ↑ = povećanje udjela; - = nisu prisutni

Generalno gledajući sve četiri analizirane regije neokorteksa možemo zaključiti da kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa dolazi do smanjnja udjela GABA-ergičnih interneurona pozitivnih na proteine koji vežu kalcij (PV, CB i CR). Također, kod navedenih miševa dolazi do smanjenog udjela CB pozitivnih interneurona u odnosu na WT miševe. *St3Gal2* miševi karakteristični su po smanjenom udjelu PV pozitivnih interneurona u svim osjetnim analiziranim regijama neokorteksa (S1, V1 i Au1). Kod *St3Gal3* miševa dolazi do ukupnog povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona. Kako bi se u potpunosti mogao odrediti fenotip interneurona analiziranih genetički preinačenih miševa potrebno je napraviti još niz dodatnih istraživanja koja uključuu analize po slojevima, te analize na ostale neuropeptide karakteristične za interneurone. Dodatno je potrebno proširiti biheviorističke studije koje bi pridonijele objašnjenju funkcionalne uloge određenog fenotipa interneurona.

5.5. Analiza proteina koji vežu kalcij u malom mozgu WT, *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

U granularnom sloju WT miševa GABA-ergični neuroni čine 32% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod *St3Gal2* miševa udio neurona koji eksprimiraju GABA-u smanjen je na 25%, dok je kod *St3Gal2/3* miševa povećan na 57%. Od interneurona pozitivnih na proteina koji vežu kalcij prisutni su samo CR pozitivni neuroni čiji udio kod *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa opada. U granularnom sloju kod svih genetički preinačenih mišjih modela povećava se udio GABA-ergičnih neurona koji su negativni na proteine koji vežu kalcij (PV, CB i CR).

U molekularnom sloju WT miševa GABA-ergični neuroni čine 35% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod *St3Gal2* miševa, dolazi do povećanje, te svi neuroni eksprimiraju GABA-u, dok je kod *St3Gal2/3* miševa njihov udio smanjen na 25%. Za razliku od granularnog sloja neuroni molekularnog sloja osim na CR pozitivni su i na PV. Udio PV pozitivnih neurona smanjuje se kod *St3Gal2* i *St3Gal2/3* miševa. WT miševi imaju 6% neurona koji su GABA-ergični, ali ne eksprimiraju proteine koji vežu kalcij. Značajno je povećanje tih neurona kod *St3Gal2* miševa na 19%, dok kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa takvi neuroni u potpunosti nedostaju.

Broj Purkinjeovih stanica povećava se kod svih analiziranih genetički preinačenih mišjih modela. Kod WT miševa udio PV pozitivnih Purkinjeovih stanica je 25%, a ostatak je pozitivan na CB. Kod *St3Gal2* miševa udio PV pozitivnih Purkinjeovih stanica povećava se na 48%, dok udio CB pozitivnih Purkinjeovih stanica opada. Značajno je da su kod WT miševa sve Purinjeove stanice pozitivne na proteine koji vežu kalcij, dok se kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa povećava udio GABA-ergičnih neurona koji ne eksprimiraju proteine koji vežu kalcij.

Purkinjeove stanice projiciraju u duboke jezgre kore malog mozga. Kako su one jedine eferentne stanice kore malog mozga, budući da su GABA-ergične, izlazni signal je potpuno inhibicijski. Svrha inhibicijskog signala Purkinjeovih stanica je oblikovanje obrasca okidanja koji duboke cerebelarne jezgre malog mozga stvaraju na poticaj izravnih ekscitacijskih signala od mahovinastih i vitičastih vlakana. Tisuću i više sinapsi između jednog vitičastog vlakna i proksimalnih dendrita jedne Purkinjeove stanice predstavljaju jednu od najmoćnijih ekscitacijskih veza u čitavom središnjem živčanom sustavu.

Analiza fiziološke uloge PV, CB i CR pozitivnih interneurona u malom mozgu olakšana je zbog njihove specifične distribucije u različitim slojevima³¹. CR pozitivni interneuroni dominiraju u granularnom sloju, dok su pojedinačni CR pozitivni interneuroni uočeni i u molekularnom sloju. CR interneuroni nalaze se na aksonima granularnih neurona smještenih odmah ispod Purkinjeovih stanica, što upućuje na njihovu ulogu u disinhibiciji Purkinjeovih stanica¹³⁶. Naši rezultati pokazuju da *St3Gal2* miševi imaju povećanu, a *St3Gal2/3* smanjenu inhibiciju Purkinjeovih stanica. Takav rezultat objašnjava izraženi poremećaj u motoričkoj koordinaciji kod *St3Gal2/3* miševa. Za PV i CB interneurone smatra se da imaju snažni inhibitorni učinak na Purkinjeove stanice, kao i na piramidalne stanice neokorteksa. Kod *CB^{-/-}* miševa, vidljiv je poremećaj u motoričkoj koordinaciji³¹. No, treba naglasiti da neuroni maloga mozga u svojoj međusobnoj interakciji ostvaruju i osobito važnu funkciju kratkoročnog pamćenja¹³⁷, što je glavna pretpostavka koordinacije, budući da u reguliranju izvođena pokreta pojedine strukture maloga mozga moraju pratiti signalizaciju iz proprioceptora, vidnih i slušnih osjetnih organa te kratkoročno pohranjivati i analizirati informacije koje povratno signaliziraju o stanju svim struktura uključenih u izvođenje pokreta kao i o njihovim međusobnim odnosima tijekom odvijanja pokreta⁷.

Generalno možemo zaključiti da kod analiziranih genetički preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih neurona koji ne ekspimiraju proteine koji vežu kalcij. U granularnom sloju se pojavljuju jedino CR pozitivni neuroni. Neuroni molekularnog sloja ne ekspimiraju CB, dok Purkinjeove stanice ne ekspimiraju CR.

Tablica 3. Prikaz udjela (%) interneurona u malom mozgu kod WT, *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Regija malog mozga		WT	<i>St3Gal2</i>	<i>St3Gal3</i>	<i>St3Gal2/3</i>
Granularni sloj	GABA	◦	↓	◦	↑
	PV	-	-	-	-
	CB	-	-	-	-
	CR	◦	◦	↓	↓
	GABA*	◦	↑	↑	↑
Molekularni sloj	GABA	◦	↑	◦	↓
	PV	◦	↓	◦	↓
	CB	-	-	-	-
	CR	◦	↑	◦	↑
	GABA*	◦	↑	-	-
Purkinjeove stanice	GABA	/	/	/	/
	PV	◦	↑	◦	◦
	CB	◦	↓	↓	◦
	CR	-	-	-	-
	GABA*	-	↑	↑	-

Vrijednosti prikazane u tablici: GABA = udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona; PV = udio parvalbumin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; CB = udio kalbindin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; CR = udio kalretinin pozitivnih interneurona u GABA-ergičnim interneuronima; GABA* = udio interneurona negativnih na PV, CB i CR u ukupnom broju GABA-ergičnih neurona ◦ = kontrola – nema promjene; ↓ = smanjenje udjela; ↑ = povećanje udjela; - = nisu prisutni; / = nema podataka jer su Purkinjeove stanice negativne na NeuN

5.6. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima hipokampusa *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Interneurone hipokampusa analizirali smo u 3 regije: CA1, CA3 i *gyrus dentatus* (DG). Dobiveni rezultati pokazuju da u CA1 regiji hipokampusa kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 48% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod *St3Gal2* miševa dolazi do povećanja, a kod *St3Gal2/3* miševa do smanjenja njihovog udjela. Ista situacija prisutna je i u DG regiji. U CA3 regiji kod *St3Gal3* miševa također dolazi do povećanja udjela GABA-ergičkih interneurona (Tablica 4).

Hipokampus je područje mozga u obliku potkove koje ima važnu ulogu u pretvaranju informacija iz kratkoročnog pamćenja u dugoročno pamćenje. Dio je limbičkog sustava, sustava povezanog s emocijama i dugoročnim pamćenjem. Odgovoran je za kompleksne procese kao što su formiranje, organiziranje i pohranjivanje sjećanja. Također bitnu ulogu ima i u prostornoj orijentaciji.

U CA1 i CA3 regijama hipokampusa 94% PV pozitivnih interneurona je ekscitacijsko, dok je samo 6% inhibicijsko^{138,139}. U dosadašnjim istraživanjima postavljene su indikacije da su PV pozitivni interneuroni hipokampusa uključeni u tzv. *feedback* i *feedforward* inhibicije. Najznačajniji rezultati analize hipokampusa odnose se na povećanje ekspresije CR pozitivnih interneurona u DG regiji kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa i smanjena ekspresija CB pozitivnih interneurona kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa. Takvo stanje u korelaciji je sa pojavom ranih febrilnih konvulzija u pacijenata sa epilepsijom temporalnog režnja¹⁴⁰.

Tablica 4. Prikaz udjela (%) interneurona u hipokampusu kod WT, *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Regija hipokampusa		WT	<i>St3Gal2</i>	<i>St3Gal3</i>	<i>St3Gal2/3</i>
CA1	GABA	◦	↑	◦	↓
CA3	GABA	◦	↑	◦	↑
DG	GABA	◦	↑	◦	↓

Vrijednosti prikazane u tablici: GABA = udio GABA-ergičnih interneurona u ukupnom broju neurona; ◦ = kontrola – nema promjene; ↓ = smanjenje udjela; ↑ = povećanje udjela

5.7. Analiza proteina koji vežu kalcij u interneuronima striatuma *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa

Dobiveni rezultati pokazuju da u striatumu kod WT miševa GABA-ergični interneuroni čine 33% od ukupnog broja NeuN pozitivnih neurona. Kod svih genetički preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona. Kod WT miševa CB pozitivni interneuroni čine 70% GABA-ergičnih interneurona, dok 12% odlazi na GABA-ergične interneurone koji ne eksprimiraju proteine koji vežu kalcij. Najznačajnija razlika javlja se kod *St3Gal2* miševa kod kojih se udio GABA-ergičnih interneurona koji neeksprimiraju proteine koji vežu kalcij povećava na 76%, a udio CB pozitivnih interneurona se smanjuje na 14%. U striatumu dominiraju CB pozitivni interneuroni, dok se PV i CR pozitivni interneuroni pojavljuju pojedinačno. Striatum je siva tvar (tijela neurona) koja se nalazi u bijeloj tvari (mijelinizirani aksoni) krajnjeg mozga, telencephalona, točnije u subkortikalnom području (području ispod moždane kore koja je također sive boje). Striatum je zajednički naziv za nukleus kaudatus (*nucleus caudatus*) i putamen, dva od ukupno četiri bazalna ganglija u krajnjem mozgu (*telencephalon*). Bazalni gangliji, uključujući striatum, sudjeluju u modulaciji brojnih procese u motoričkom sustavu čineći na taj način dio važnih neuronskih krugova. Temeljna funkcionalna uloga za frontalni (izvršni) dio mozga su interakcija motivacije, emocija i spoznaja. Masivni gubitak neurona striatuma karakterističan je za Huntingtonovu bolest koja dovodi do poremećaja u motorici, smanjenja kognitivne funkcije i različitih psihijatrijskih poremećaja¹⁴¹.

Western blot analiza suprotno očekivanjima nije pokazala razliku u količini pojedinih interneurona između miševa. Takav rezultat, upućuje na zaključak da je promjena u sastavu PV, CB i CR pozitivnih interneurona regionalno specifična, te da je potrebno napraviti detaljnu analizu cijelog mozga kako bi se odredilo gdje se sve pojavljuju određeni interneuroni. Nedostatak ove analize je činjenica da je homogenate za analizu napravljen iz cijelog mozga, a ne pojedinačnih analiziranih regija. Osim toga potrebno je u daljnjem istraživanju analizirati navedene interneurone u najranijim fazama života kako bi se utvrdilo u kojem trenutku dolazi do blokade u sazrijevanju i migraciji pojedine skupine interneurona.

Sveobuhvatnim pregledom dobivenih rezultata otvoreno je niz dodatnih pitanja na koje je potrebno odgovoriti kako bi se sa sigurnošću objasnila uloga gangliozida ili još neidentificiranih glikoproteina čija glikozilacija ovisi o gore istraživanim sijalotransferazama u formiranju konačnog odnosa u brojevima različitih vrsta neurona.

6. ZAKLJUČCI

6. Zaključci

1. U ovom je radu po prvi puta napravljena analiza interneurona koji eksprimiraju proteine (parvalbumina, kalbindina i kalretinina) koji vežu kalcij u mozgu genetski preinačenih mišjih modela *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*.
2. Sposobnost biosinteze gangliozida u razvojno specifičnim odnosima sudjeluje u usmjeravanju diferencijacije neurona određenog kemijskog fenotipa.
3. Posljedica nedostatka sinteze vidljiva je kao kvantitativna promjena različitih vrsta zrelih tipova interneurona (piramidni/interneuroni).
4. Na temelju dobivenih podataka vidljiva je povezanost između sijalotransferaza i distribucije neurona, kao i parvalbuminskih interneurona u korteksu genetski preinačenih miševa (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3*) u usporedbi sa divljim tipom miša (WT).
5. Razlika u broju zrelih tipova interneurona povezana je sa fenotipom pojedinih miševa
6. Sijalotransferaze utječu na ukupan broj neurona i GABA-ergički pozitivnih interneurona u neokorteksu *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa.
7. *St3Gal2* miševi u svim regijama neokorteksa imaju manjen udio GABA-ergičnih interneurona koji eksprimiraju proteine koji vežu kalcij, dok se kod *St3Gal3* miševa smanjuje ukupna količina GABA-ergičnih neurona.
8. Najveći udio GABA-ergičkih interneurona u mozgu istraživanih miševa čine parvalbuminski interneuroni, dok su kalretininski zastupljeni u najmanjem postotku
9. U striatumu svih genetski preinačenih mišjih modela dolazi do povećanja udjela GABA-ergičnih interneurona.
10. U hipokampusu dolazi do povećanje ekspresije CR pozitivnih interneurona u DG regiji kod *St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/3* miševa i smanjena ekspresija CB pozitivnih interneurona kod *St3Gal2* i *St3Gal3* miševa.
11. U malom mozgu kod *St3Gal2* miševa dolazi do smanjenja udjela GABA-ergičnih interneurona koji eksprimiraju protein koji vežu kalcij.
12. Promjene u sastavu PV, CB i CR pozitivnih interneurona imaju potencijalnu ulogu u razvoju neurodegenerativnih poremećaja.

7. LITERATURA

7.Literatura

1. Kay, J. N., Voinescu, P. E., Chu, M. W. & Sanes, J. R. Neurod6 expression defines new retinal amacrine cell subtypes and regulates their fate. *Nat. Neurosci.* **14**, 965–972 (2011).
2. Nakazawa, K. *et al.* GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology* **62**, 1574–1583 (2012).
3. DeFelipe, J. *et al.* New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 202–216 (2013).
4. Berridge, M. J., Bootman, M. D. & Roderick, H. L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
5. Schwaller, B. in *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* (eds. Lajtha, A. & Banik, N.) 197–221 (Springer US, 2007).
6. Kawasaki, H., Nakayama, S. & Kretsinger, R. H. Classification and evolution of EF-hand proteins. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **11**, 277–295 (1998).
7. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
8. Nelson, M. R. & Chazin, W. J. Structures of EF-hand Ca(2+)-binding proteins: diversity in the organization, packing and response to Ca²⁺ binding. *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* **11**, 297–318 (1998).
9. Skelton, N. J., Kördel, J. & Chazin, W. J. Determination of the solution structure of apo calbindin D9k by NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **249**, 441–462 (1995).
10. Eggermann, E., Bucurenciu, I., Goswami, S. P. & Jonas, P. Nanodomain coupling between Ca²⁺ channels and sensors of exocytosis at fast mammalian synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 7–21 (2011).
11. Schmidt, H. Three functional facets of calbindin D-28k. *Front. Mol. Neurosci.* **5**, (2012).
12. Beglopoulos, V. *et al.* Neurexophilin 3 Is Highly Localized in Cortical and Cerebellar Regions and Is Functionally Important for Sensorimotor Gating and Motor Coordination. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 7278–7288 (2005).
13. Río, J. A. D., Martínez, A., Auladell, C. & Soriano, E. Developmental History of the Subplate and Developing White Matter in the Murine Neocortex. Neuronal Organization and Relationship with the Main Afferent Systems at Embryonic and Perinatal Stages. *Cereb. Cortex* **10**, 784–801 (2000).
14. Cates, M. S., Teodoro, M. L. & Phillips, G. N. Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophys. J.* **82**, 1133–1146 (2002).
15. Celio, M. R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**, 375–475 (1990).

7.Literatura

16. Heizmann, C. W. & Hunziker, W. Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 98–103 (1991).
17. Celio, M. R. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* **35**, 375–475 (1990).
18. Schwaller, B., Durussel, I., Jermann, D., Herrmann, B. & Cox, J. A. Comparison of the Ca²⁺-binding Properties of Human Recombinant Calretinin-22k and Calretinin. *J. Biol. Chem.* **272**, 29663–29671 (1997).
19. Stevens, J. & Rogers, J. H. Chick Calretinin: Purification, Composition, and Metal Binding Activity of Native and Recombinant Forms. *Protein Expr. Purif.* **9**, 171–181 (1997).
20. Groves, P., Palczewska, M. & KuÅ°nicki, J. Calretinin, an EF-Hand Calcium-Binding Protein, Binds Zinc and Copper. *Calcium Bind. Proteins* **1**, 156–159 (2006).
21. D’Orlando, C. *et al.* Calretinin and calbindin D-28k delay the onset of cell death after excitotoxic stimulation in transfected P19 cells. *Brain Res.* **909**, 145–158 (2001).
22. D’Orlando, C., Celio, M. R. & Schwaller, B. Calretinin and calbindin D-28k, but not parvalbumin protect against glutamate-induced delayed excitotoxicity in transfected N18-RE 105 neuroblastoma-retina hybrid cells. *Brain Res.* **945**, 181–190 (2002).
23. Camp, A. J. & Wijesinghe, R. Calretinin: Modulator of neuronal excitability. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2118–2121 (2009).
24. Gall, D. *et al.* Altered Neuronal Excitability in Cerebellar Granule Cells of Mice Lacking Calretinin. *J. Neurosci.* **23**, 9320–9327 (2003).
25. Schwaller, B. The continuing disappearance of ‘pure’ Ca²⁺ buffers. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 275–300 (2009).
26. DeFelipe, J. & Fariñas, I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog. Neurobiol.* **39**, 563–607 (1992).
27. Gelman, D. M. & Marín, O. Generation of interneuron diversity in the mouse cerebral cortex. *Eur. J. Neurosci.* **31**, 2136–2141 (2010).
28. Raghanti, M. A. *et al.* A comparative perspective on minicolumns and inhibitory GABAergic interneurons in the neocortex. *Front. Neuroanat.* **4**, 3 (2010).

7.Literatura

29. Markram, H. *et al.* Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 793–807 (2004).
30. Bastianelli, E. Distribution of calcium-binding proteins in. *The Cerebellum* **2**, 242–262 (2003).
31. Schwaller, B., Meyer, M. & Schiffmann, S. ‘New’ functions for ‘old’ proteins: The role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice. *The Cerebellum* **1**, 241–258 (2002).
32. Tepper, J. M., Tecuapetla, F., Koós, T. & Ibáñez-Sandoval, O. Heterogeneity and Diversity of Striatal GABAergic Interneurons. *Front. Neuroanat.* **4**, (2010).
33. Paxinos, G. *The Rat Nervous System*. (Academic Press, 2014).
34. Danglot, L., Triller, A. & Marty, S. The development of hippocampal interneurons in rodents. *Hippocampus* **16**, 1032–1060 (2006).
35. Katsumaru, H., Kosaka, T., Heizmann, C. W. & Hama, K. Immunocytochemical study of GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus. *Exp. Brain Res.* **72**, 347–362 (1988).
36. Gulyás, A. I. & Freund, T. F. Pyramidal cell dendrites are the primary targets of calbindin D28k-immunoreactive interneurons in the hippocampus. *Hippocampus* **6**, 525–534 (1996).
37. Sonnino, S., Mauri, L., Chigorno, V. & Prinetti, A. Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* **17**, 1R–13R (2007).
38. Sonnino, S. & Prinetti, A. Membrane domains and the ‘lipid raft’ concept. *Curr. Med. Chem.* **20**, 4–21 (2013).
39. Schnaar, R. L., Gerardy-Schahn, R. & Hildebrandt, H. Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol. Rev.* **94**, 461–518 (2014).
40. Tettamanti, G., Bonali, F., Marchesini, S. & Zambotti, V. A new procedure for the extraction, purification and fractionation of brain gangliosides. *Biochim. Biophys. Acta* **296**, 160–170 (1973).
41. Merrill, A. H. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 25843–25846 (2002).

7.Literatura

42. Kolter, T., Proia, R. L. & Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 25859–25862 (2002).
43. Yu, R. K., Ariga, T., Yanagisawa, M. & Zeng, G. in *Glycoscience* (eds. Dr. B. O. F.-R. P., Dr. K. T. P. & Dr. J. T. P.) 1671–1695 (Springer Berlin Heidelberg, 2008).
44. Mlinac, K. & Bogнар, S. K. Role of gangliosides in brain aging and neurodegeneration. *Transl. Neurosci.* **1**, 300–307 (2010).
45. D' Azzo, A., Tessitore, A. & Sano, R. Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response. *Cell Death Differ.* **13**, 404–414 (2006).
46. Zhang, X. & Kiechle, F. L. Review: Glycosphingolipids in health and disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **34**, 3–13 (2004).
47. Schnaar, R. L. & Lopez, P. H. H. Myelin-associated glycoprotein and its axonal receptors. *J. Neurosci. Res.* **87**, 3267–3276 (2009).
48. Ohmi, Y. *et al.* Gangliosides play pivotal roles in the regulation of complement systems and in the maintenance of integrity in nerve tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22405–22410 (2009).
49. Audry, M. *et al.* Current trends in the structure–activity relationships of sialyltransferases. *Glycobiology* **21**, 716–726 (2011).
50. Takashima, S. *et al.* Molecular Cloning and Expression of a Sixth Type of α 2,8-Sialyltransferase (ST8Sia VI) That Sialylates O-Glycans. *J. Biol. Chem.* **277**, 24030–24038 (2002).
51. Harduin-Lepers, A., Mollicone, R., Delannoy, P. & Oriol, R. The animal sialyltransferases and sialyltransferase-related genes: a phylogenetic approach. *Glycobiology* **15**, 805–817 (2005).
52. Datta, A. K. & Paulson, J. C. The sialyltransferase ‘sialylmotif’ participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc. *J. Biol. Chem.* **270**, 1497–1500 (1995).
53. Harduin-Lepers, A., Recchi, M. A. & Delannoy, P. 1994, the year of sialyltransferases. *Glycobiology* **5**, 741–758 (1995).
54. Takashima, S., Tsuji, S. & Tsujimoto, M. Comparison of the enzymatic properties of mouse beta-galactoside α 2,6-sialyltransferases, ST6Gal I and II. *J. Biochem. (Tokyo)* **134**, 287–296 (2003).

7.Literatura

55. Paulson, J. C. & Rademacher, C. Glycan terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1121–1122 (2009).
56. Sandhoff, K. & Harzer, K. Gangliosides and Gangliosidoses: Principles of Molecular and Metabolic Pathogenesis. *J. Neurosci.* **33**, 10195–10208 (2013).
57. Kolter, T. Ganglioside Biochemistry. *Int. Sch. Res. Not.* **2012**, e506160 (2012).
58. Yu, R. K., Tsai, Y.-T., Ariga, T. & Yanagisawa, M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides--An overview. *J. Oleo Sci.* **60**, 537–544 (2011).
59. Monti, E. & Miyagi, T. Structure and Function of Mammalian Sialidases. *Top. Curr. Chem.* (2012).
60. Simons, K. & Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572 (1997).
61. Lopez, P. H. H. & Schnaar, R. L. Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 549–557 (2009).
62. Posse de Chaves, E. & Sipione, S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Lett.* **584**, 1748–1759 (2010).
63. Fujii, S. *et al.* Effects of the mono- and tetrasialogangliosides GM1 and GQ1b on ATP-induced long-term potentiation in hippocampal CA1 neurons. *Glycobiology* **12**, 339–344 (2002).
64. Wang, X.-Q., Sun, P. & Paller, A. S. Ganglioside GM3 Inhibits Matrix Metalloproteinase-9 Activation and Disrupts Its Association with Integrin. *J. Biol. Chem.* **278**, 25591–25599 (2003).
65. Yowler, B. C. & Schengrund, C.-L. Glycosphingolipids-sweets for botulinum neurotoxin. *Glycoconj. J.* **21**, 287–293 (2004).
66. Vyas, A. A. *et al.* Gangliosides are functional nerve cell ligands for myelin-associated glycoprotein (MAG), an inhibitor of nerve regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8412–8417 (2002).
67. Fukuda, M., Rutishauser, U. & Schnaar, R. L. *Neuroglycobiology*. (Oxford University Press, 2005).
68. Hu, H. *et al.* ST3GAL3 mutations impair the development of higher cognitive functions. *Am. J. Hum. Genet.* **89**, 407–414 (2011).

7.Literatura

69. Edvardson, S. *et al.* West syndrome caused by ST3Gal-III deficiency. *Epilepsia* **54**, e24–27 (2013).
70. Sturgill, E. R. *et al.* Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. *Glycobiology* **22**, 1289–1301 (2012).
71. Okada, M. *et al.* b-series Ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve. *J. Biol. Chem.* **277**, 1633–1636 (2002).
72. Chu, J. & Anderson, S. A. Development of Cortical Interneurons. *Neuropsychopharmacology* (2014).
73. Henderson, K. W. *et al.* Long-term seizure suppression and optogenetic analyses of synaptic connectivity in epileptic mice with hippocampal grafts of GABAergic interneurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34**, 13492–13504 (2014).
74. Hunt, R. F., Girskis, K. M., Rubenstein, J. L., Alvarez-Buylla, A. & Baraban, S. C. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. *Nat. Neurosci.* **16**, 692–697 (2013).
75. Permyakov, E. A. *Parvalbumin*. (Nova Publishers, 2006).
76. Andrioli, A., Alonso-Nanclares, L., Arellano, J. I. & DeFelipe, J. Quantitative analysis of parvalbumin-immunoreactive cells in the human epileptic hippocampus. *Neuroscience* **149**, 131–143 (2007).
77. Arellano, J. I., Muñoz, A., Ballesteros-Yáñez, I., Sola, R. G. & DeFelipe, J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. *Brain* **127**, 45–64 (2004).
78. Sullivan, P. F., Kendler, K. S. & Neale, M. C. Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies. *Arch. Gen. Psychiatry* **60**, 1187–1192 (2003).
79. Perry, T. L., Kish, S. J., Buchanan, J. & Hansen, S. Gamma-aminobutyric-acid deficiency in brain of schizophrenic patients. *Lancet* **1**, 237–239 (1979).
80. Bird, J. M. Computed tomographic brain studies and treatment response in schizophrenia. *Can. J. Psychiatry Rev. Can. Psychiatr.* **30**, 251–254 (1985).
81. Benes, F. M., McSparren, J., Bird, E. D., SanGiovanni, J. P. & Vincent, S. L. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch. Gen. Psychiatry* **48**, 996–1001 (1991).

7.Literatura

82. Mann, E. O. & Paulsen, O. Role of GABAergic inhibition in hippocampal network oscillations. *Trends Neurosci.* **30**, 343–349 (2007).
83. WHO | World Health Organization. *WHO*
84. Rubenstein, J. L. R. & Merzenich, M. M. Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav.* **2**, 255–267 (2003).
85. Lawrence, Y. A., Kemper, T. L., Bauman, M. L. & Blatt, G. J. Parvalbumin-, calbindin-, and calretinin-immunoreactive hippocampal interneuron density in autism. *Acta Neurol. Scand.* **121**, 99–108 (2010).
86. Palmen, S. J. M. C., Engeland, H. van, Hof, P. R. & Schmitz, C. Neuropathological findings in autism. *Brain* **127**, 2572–2583 (2004).
87. Shao, Y. *et al.* Fine Mapping of Autistic Disorder to Chromosome 15q11-q13 by Use of Phenotypic Subtypes. *Am. J. Hum. Genet.* **72**, 539–548 (2003).
88. Priatel, J. J. *et al.* The ST3Gal-I Sialyltransferase Controls CD8+ T Lymphocyte Homeostasis by Modulating O-Glycan Biosynthesis. *Immunity* **12**, 273–283 (2000).
89. Ellies, L. G. *et al.* Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood* **100**, 3618–3625 (2002).
90. Ellies, L. G. *et al.* Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of hemostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 10042–10047 (2002).
91. Schnaar, R. L. Isolation of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **230**, 348–370 (1994).
92. Schnaar, R. L. & Needham, L. K. Thin-layer chromatography of glycosphingolipids. *Methods Enzymol.* **230**, 371–389 (1994).
93. Heffer-Laue, M., Viljetia, B., Vajn, K., Schnaar, R. L. & Laue, G. Effects of Detergents on the Redistribution of Gangliosides and GPI-anchored Proteins in Brain Tissue Sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* **55**, 805–812 (2007).
94. Schnaar, R. L. *et al.* Immunoglobulin G-class mouse monoclonal antibodies to major brain gangliosides. *Anal. Biochem.* **302**, 276–284 (2002).
95. Li, Y. & Chen, X. Sialic acid metabolism and sialyltransferases: natural functions and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **94**, 887–905 (2012).

7.Literatura

96. Verret, L. *et al.* Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* **149**, 708–721 (2012).
97. Marín, O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 107–120 (2012).
98. Vajn, K., Viljetić, B., Degmečić, I. V., Schnaar, R. L. & Heffer, M. Differential Distribution of Major Brain Gangliosides in the Adult Mouse Central Nervous System. *PLoS ONE* **8**, e75720 (2013).
99. Lui, J. H., Hansen, D. V. & Kriegstein, A. R. Development and Evolution of the Human Neocortex. *Cell* **146**, 18–36 (2011).
100. Alcántara, S., Ferrer, I. & Soriano, E. Postnatal development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivities in the cerebral cortex of the rat. *Anat. Embryol. (Berl.)* **188**, 63–73 (1993).
101. Capper-Loup, C., Burgunder, J.-M. & Kaelin-Lang, A. Modulation of parvalbumin expression in the motor cortex of parkinsonian rats. *Exp. Neurol.* **193**, 234–237 (2005).
102. Goldberg, J. A. *et al.* Enhanced Synchrony among Primary Motor Cortex Neurons in the 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Primate Model of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.* **22**, 4639–4653 (2002).
103. Castro-Alamancos, M. A. & Connors, B. W. Short-term synaptic enhancement and long-term potentiation in neocortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1335–1339 (1996).
104. Castro-Alamancos, M. A., Donoghue, J. P. & Connors, B. W. Different forms of synaptic plasticity in somatosensory and motor areas of the neocortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **15**, 5324–5333 (1995).
105. Rudy, B., Fishell, G., Lee, S. & Hjerling-Leffler, J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev. Neurobiol.* **71**, 45–61 (2011).
106. Rossignol, E. Genetics and Function of Neocortical GABAergic Interneurons in Neurodevelopmental Disorders. *Neural Plast.* **2011**, e649325 (2011).
107. Xu, H., Jeong, H.-Y., Tremblay, R. & Rudy, B. Neocortical Somatostatin-Expressing GABAergic Interneurons Disinhibit the Thalamorecipient Layer 4. *Neuron* **77**, 155–167 (2013).
108. Hogan, Q. Labat Lecture: The Primary Sensory Neuron: Where it is, What it Does, and Why it Matters. *Reg. Anesth. Pain Med.* **35**, 306–311 (2010).

7.Literatura

109. Ross, S. E. *et al.* Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron* **65**, 886–898 (2010).
110. Torsney, C. & MacDermott, A. B. Disinhibition opens the gate to pathological pain signaling in superficial neurokinin 1 receptor-expressing neurons in rat spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **26**, 1833–1843 (2006).
111. Moore, K. A. *et al.* Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **22**, 6724–6731 (2002).
112. Li, L. *et al.* A Feedforward Inhibitory Circuit Mediates Lateral Refinement of Sensory Representation in Upper Layer 2/3 of Mouse Primary Auditory Cortex. *J. Neurosci.* **34**, 13670–13683 (2014).
113. Wilson, N. R., Runyan, C. A., Wang, F. L. & Sur, M. Division and subtraction by distinct cortical inhibitory networks in vivo. *Nature* **488**, 343–348 (2012).
114. Perrenoud, Q. *et al.* Characterization of Type I and Type II nNOS-Expressing Interneurons in the Barrel Cortex of Mouse. *Front. Neural Circuits* **6**, 36 (2012).
115. Staiger, J. F., Masannek, C., Schleicher, A. & Zuschratter, W. Calbindin-containing interneurons are a target for VIP-immunoreactive synapses in rat primary somatosensory cortex. *J. Comp. Neurol.* **468**, 179–189 (2004).
116. Benevento, L. A., Bakkum, B. W. & Cohen, R. S. gamma-Aminobutyric acid and somatostatin immunoreactivity in the visual cortex of normal and dark-reared rats. *Brain Res.* **689**, 172–182 (1995).
117. Luhmann, H. J. & Prince, D. A. Postnatal maturation of the GABAergic system in rat neocortex. *J. Neurophysiol.* **65**, 247–263 (1991).
118. Andäng, M. *et al.* Histone H2AX-dependent GABAA receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* **451**, 460–464 (2008).
119. Le Magueresse, C. & Monyer, H. GABAergic Interneurons Shape the Functional Maturation of the Cortex. *Neuron* **77**, 388–405 (2013).
120. Kuhlman, S. J., Tring, E. & Trachtenberg, J. T. Fast-spiking interneurons have an initial orientation bias that is lost with vision. *Nat. Neurosci.* **14**, 1121–1123 (2011).
121. Iwai, Y., Fagiolini, M., Obata, K. & Hensch, T. K. Rapid critical period induction by tonic inhibition in visual cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 6695–6702 (2003).

7.Literatura

122. Ueno, H. *et al.* Somatosensory and visual deprivation each decrease the density of parvalbumin neurons and their synapse terminals in the prefrontal cortex and hippocampus of mice. *Acta Med. Okayama* **67**, 135–143 (2013).
123. Patz, S., Grabert, J., Gorba, T., Wirth, M. J. & Wahle, P. Parvalbumin Expression in Visual Cortical Interneurons Depends on Neuronal Activity and TrkB Ligands during an Early Period of Postnatal Development. *Cereb. Cortex* **14**, 342–351 (2004).
124. Yoo, S.-W. *et al.* Sialylation regulates brain structure and function. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* (2015).
125. Gonchar, Y. & Burkhalter, A. Connectivity of GABAergic Calretinin-immunoreactive Neurons in Rat Primary Visual Cortex. *Cereb. Cortex* **9**, 683–696 (1999).
126. Lewis, D. A., Curley, A. A., Glausier, J. R. & Volk, D. W. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **35**, 57–67 (2012).
127. Martin del Campo, H. N., Measor, K. R. & Razak, K. A. Parvalbumin immunoreactivity in the auditory cortex of a mouse model of presbycusis. *Hear. Res.* **294**, 31–39 (2012).
128. Hashimoto, T. *et al.* Gene expression deficits in a subclass of GABA neurons in the prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **23**, 6315–6326 (2003).
129. Mirnics, K., Middleton, F. A., Marquez, A., Lewis, D. A. & Levitt, P. Molecular Characterization of Schizophrenia Viewed by Microarray Analysis of Gene Expression in Prefrontal Cortex. *Neuron* **28**, 53–67 (2000).
130. Fox, K. & Wong, R. O. L. A comparison of experience-dependent plasticity in the visual and somatosensory systems. *Neuron* **48**, 465–477 (2005).
131. Wonders, C. P. & Anderson, S. A. The origin and specification of cortical interneurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 687–696 (2006).
132. Lehmann, K., Steinecke, A. & Bolz, J. GABA through the Ages: Regulation of Cortical Function and Plasticity by Inhibitory Interneurons. *Neural Plast.* **2012**, e892784 (2012).
133. SarahL Pallas. in *Cortical Areas* 245–272 (CRC Press, 2002).

7.Literatura

134. Clarkson, C., Juárez, J. M. & Merchán, M. A. Long-term regulation in calretinin staining in the rat inferior colliculus after unilateral auditory cortical ablation. *J. Comp. Neurol.* **518**, 4261–4276 (2010).
135. Kawai, H. *et al.* Mice Expressing Only Monosialoganglioside GM3 Exhibit Lethal Audiogenic Seizures. *J. Biol. Chem.* **276**, 6885–6888 (2001).
136. Dieudonné, S. & Dumoulin, A. A: Serotonin-driven long-range inhibitory connections in the cerebellar cortex. in *de Souza and De Schutter Neural Systems & Circuits 2011*,
137. Kullmann, D. M. Interneuron networks in the hippocampus. *Curr. Opin. Neurobiol.* **21**, 709–716 (2011).
138. Gulyás, A. I., Megias, M., Emri, Z. & Freund, T. F. Total Number and Ratio of Excitatory and Inhibitory Synapses Converging onto Single Interneurons of Different Types in the CA1 Area of the Rat Hippocampus. *J. Neurosci.* **19**, 10082–10097 (1999).
139. Nörenberg, A., Hu, H., Vida, I., Bartos, M. & Jonas, P. Distinct nonuniform cable properties optimize rapid and efficient activation of fast-spiking GABAergic interneurons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 894–899 (2010).
140. Blümcke, I. *et al.* An increase of hippocampal calretinin-immunoreactive neurons correlates with early febrile seizures in temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **97**, 31–39 (1999).
141. Menalled, L. *et al.* Decrease in Striatal Enkephalin mRNA in Mouse Models of Huntington's Disease. *Exp. Neurol.* **162**, 328–342 (2000).

8. SAŽETAK

Nedostatak većine ili svih kompleksnih gangliozida u miševa uzrokuju ozbiljne poremećaje i različita neurodegenerativna stanja. Nedostatak interneurona moguća je poveznica između kognitivne disfunkcije i promjenjive neuronske aktivnosti kod različitih neurodegenerativnih bolesti. Ciljevi ovog istraživanja bili su utvrditi postoji li povezanost osnovnih kemijskih fenotipova interneurona i ekspresije pojedinih gangliozida na genetički preinačenim mišjim modelima (*St3Gal2*, *St3Gal3* i *St3Gal2/St3Gal3*). U istraživanju su korišteni uzorci moždanog tkiva tri genetski preinačena mišja modela s nedostatnom sintezom gangliozida, te miš bez ikakvih genetskih preinaka kao kontrola (WT). Tijekom istraživanja korištene su metode ekstrakcije, kvantifikacije i analize gangliozida, te varijabilnosti u broju i morfologiji interneurona koji ekspimiraju kalcij-vezujuće proteine. Po prvi puta istražen je utjecaj deficita sinteze gangliozida na diferencijaciju i distribuciju interneurona. Utvrđeno je da su *St3Gal2/3* miševi najosjetljiviji, a ujedno je kod njih vidljiva i najveći porast u broju kalcij vezujućih interneurona u svim regijama, dok kod *St3Gal2* miševa dolazi do najvećeg smanjenja količine GABA-ergičnih interneurona koji ekspimiraju protein koji vežu kalcij. Takav rezultat upućuje na bitnu ulogu gangliozida GD1a i GT1b u procesu migracije neurona i interneurona, te procesu njihovog sazrijevanja, te eventualnu ulogu gangliozida koji nastaju nizvodno od njih – acetiliranih forma i c-serije polisijalogangliozida. Ovi rezultati podupiru teoriju koja se odnosi na to da gangliozidi služe kao modulatori dostupnosti dvovalentnih kation nizu različitih kalcij i magnezij ovisnih adhezijskih sustava i time utječu na vezanje liganda. Alternativna teorija zasniva se na činjenici da gangliozidi mogu regulirati bočno širenje i sudjelovati u stvaranju signalnih kompleksa u membranskim mikrodomenama i na taj način ometati funkciju drugih proteina, kao što je integrin i TAG-1.

13. SUMMARY

9. Summary

Lack of the most or all complex gangliosides in mice cause serious disorders and various neurodegenerative conditions. Lack of interneurons is possible link between cognitive dysfunction and variable neural activity in various neurodegenerative diseases. The aim of this study would be to determine whether there is a connection between the basic chemical interneuron phenotypes and expression of individual ganglioside in genetically modified mouse models (*St3Gal2*, *St3Gal3* and *St3Gal2/St3Gal3*). This study used sample of brains from three genetically modified mouse models with insufficient synthesis of ganglioside and mouse without any genetic modification as a control (WT).

During the research different methods of extraction are used for quantification and analysis of ganglioside and variability in number and morphology of interneurons expressing calcium binding proteins. In this study, for the first time effect of deficient ganglioside synthesis on the distribution of interneurons will be studied.

It was found that *St3Gal2/3* mice are the most sensitive and they have greatest increase in the number of calcium binding interneurons in all regions, while *St3Gal2* mice have the biggest reduction in the amount of interneurons positive to calcium binding proteins. This result indicates the important role of complex gangliosides (GD1a/ GT1b) in the process of migration of neurons and interneurons, process of their maturation and possible role of ganglioside which occurs downstream of them - acetylated form and c - series polisijalogangliozida. Those findings support our theory that gangliosides serve as modulators for availability of divalent calcium -dependent cation adhesion and magnesium systems and weather affect the binding of the ligand. Alternative theory is based on the fact that gangliosides may regulate lateral expansion and participate in the creation of signaling complexes in the membrane microdomains in this way that they interfere with the function of other proteins, such as integrin and TAG – first.

10.POPIS KRATICA

2D-TLC – dvodimenzionalna tankoslojna kromatografija
Au1 – primarna slušna regija neokorteksa
CaBP – puferski proteini za kalcij (engl. *calcium-binding proteins*)
CAZy – (eng. *carbohydrate active enzyme*)
CB – kalbindin (engl. *Calbindin*)
Cer - ceramid
CMP – citidin monofosfat
CR – kalretinin (engl. *Calretinin*)
BSA – goveđi serum albumina (eng. *albumin bovine serum*)
DAB – diaminobenzidin
DG – *dentate gyrus*, regija hipokampusa
GABA – gama-aminomaslačna kiselina (engl. *gamma-aminobutyric acid*)
GAD - dekarboksilaza glutaminske kiseline (engl. *glutamic acid decarboxylase*)
Gal – galaktoza
GAPDH – gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)
GCL – granularni sloj malog mozga
GlcCer – glukozilceramid
HPTLC – kromatografija visoke sposobnosti razlučivanja (eng. *high performance thin-layer chromatography*)
LTP – dugoročna potencijacija
M1 – primarna motorička regija neokorteksa
MAG – glikoprotein mijelina (engl. *myelin associated glycoprotein*)
MCL – molekularni sloj malog mozga
NeuN - Marker jezgara svih neurona (eng. *neuronal nuclei*)
Neu5Ac, SA – sijalinska kiselina
PBS - fosfatni pufer (eng. *phosphate buffer saline*)
PBST – fosfatni pufer s Tween-om
PCL – sloj Purkinjeovih stanica
PFA - paraformaldehid
PV - parvalbumin
S1 – primarna osjetna regija neokorteksa
SA – sijalinska kiselina (engl. *sialic acide*)
ST – sijalotransferaze
ST3Gal – ST β -galactozid α 2,3-sijalotransferaze
St3Gal2 – genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galactozid α 2,3-sijalotransferaze 2
St3Gal3 - genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galactozid α 2,3-sijalotransferaze 3
St3Gal2/3 - genetički modificiran miš sa isključenim genom za sintezu ST β -galactozid α 2,3-sijalotransferaze 2 i 3
ST6Gal – ST β -galactozid α 2,6-sijalotransferaze
ST6GalNAc - ST α -N-acetilgalaktozamid α -2,6-sialyltransferase
ST8Gal – ST β -galactozid α 2,8-sijalotransferaze
SŽS – središnji živčani sustav
TLC – tankoslojna kromatografija (eng. *thin-layer chromatography*)
V1 – primarna vidna regija neokorteksa
WT – divlji tip

11. PRILOZI

11.1 Popis kemikalija korištenih u istraživanju

Naziv kemikalije	Proizvođač
Albumin govedeg seruma	Sigma Aldrich
Amonijak	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Bakrov(II) sulfat	Kemika, Zagreb
Bolt® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
CellLytic MT	Sigma Aldrich
Etilenglikol	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Izofluran	Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, SAD
Kalcijev klorid	Kemika, Zagreb
Kalijev hidrogenfosfat	Kemika, Zagreb
Kalijev klorid	Kemika, Zagreb
Kloroform	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
36% klorovodična kiselina	VWR International, France
Metanol	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Natrijev hidroksid	Sigma Aldrich
Natrijev hidrogenfosfat	Sigma Aldrich
Natrijev klorid	Sigma Aldrich
NuPAGE LDS (4x) Sample buffer	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
NuPAGE LDS Red. Ag. (10x)	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Invitrogen, Carlsbad, CA, SAD
Paraformaldehid	Sigma Aldrich
Peroxidase Substrate System Kit	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Polivinilpirolidon	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Rezorcinol	Kemika, Zagreb
Saharoza	Sigma Aldrich
Triton X	Bio Rad
Tween 20	Bio Rad
Vectamount pokrivalo	Vector Lab, Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC Kit <i>Elite</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vodikov peroksid	Sigma Aldrich

11.2. Postupak priprema otopina korištenih u istraživanju

Svennerholm reagens:

- 2,5 mL 2% otopine rezorcinola
- 62,5 μ L 0,1 M CuSO_4
- 20 mL 36% HCl
- dH_2O do ukupnog volumena od 25 ml

10xPBS

- 90g NaCl
- 2g KCl
- 21.7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$
- 2g KH_2PO_4
- Otopiti u 1 L dH_2O

1x PBST pufer

- 0.5 L 1 \times PBS
- 2.5 ml 10% Tween

Otopina za blokiranje – imunohistokemija

- 0.5g BSA
- 2.5 ml kozjeg seruma
- 125 μ L tritona X-100
- 1 \times PBS do ukupnog volumena od 50 ml

DeOlmos otopina:

- 500 ml 100 mM 1 \times PBS (pH 7,2)
- 300g saharoze
- 10g polivinilpirolidona
- 300 ml etilenglikola
- dH_2O do ukupnog volumena od 1000 ml

Otopina za blokiranje –Western blot

- 2.5g mlijeka u prahu (bezmasnog)
- 500 μ L 10% Tween
- 1 \times PBS do ukupnog volumena od 50 ml

12. ŽIVOTOPIS

Nakon završene Opće Gimnazije (2002, Osijek) upisala je studij biologije i kemije na Sveučilištu J.J.Strossmayer u Osijeku, Odjel za biologiju i Odjel za kemiju koji je završila 2008. stekavši zvanje profesora biologije i kemije. Od 2008. godine do sada zaposlena je na Odjelu za biologiju u Osijeku na zavodu za biokemiju i ekofiziologiju biljaka kao asistent. Iste godine upisala je Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni studij Molekularne bioznanosti. 2011 provela je 6 mjeseci na stručnom usavršavanju na Johns Hopkins Sveučilištu u Baltimoru (SAD). Boravak je financiran na temelju stipendije dobivene od Hrvatske Nacionalne zaklade za znanost. Od 2013. certificirana je za rad sa laboratorijskim životinjama (FELASA, kat C ekvivalent). Radila je na projektu „Uloga lipidnih raftova i glikokonjugata u razvoju i regeneraciji živčanog sustava (MZOS #219-0061194-2158) pod vodstvom Prof.dr.sc. Marija Heffer. Trenutno je kao suradnik uključena u 2 projekta Hrvatske nacionalne zaklade za znanost: 1. „Liječenje neuropatske boli stimulacijom ganglija – NeuroMod, pod vodstvom Prof.dr.sc.Damira Sapunara. 2. Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi, pod vodstvom Prof.dr.sc. Marije Heffer Sudjeluje u izvođenu nastave na Odjelu za biologiju u sklopu kolegija: Biokemija I, Biokemija II, Biokemija III, Imunologija, Pokusne životinje i Neurobiologija Također, aktivno je uključena u projekte popularizacije znanosti kao što su: Festivala znanosti (2003-2014), Tjedna mozga (2010-2014) i projekt Odjela za biologiju pod nazivom „Biolog i ja“. Tijekom obrazovanja stekla je iskustvo u laboratorijskom radu (imunohistokemijske tehnike, proteinske ekstrakcije, kulture stanica, proizvodnja protutijela, te u radu sa životinjama). Do sada je objavila 6 znanstvenih radova (CC) i 1 stručni rad. Na različitim skupovima sudjelovala je sa 23 sažetaka. Članica je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju i Hrvatskog društva za neuroznanost.

Ispis svih znanstvenih publikacija iz CROSBİ baze

Senka Blažetić (311165)

- Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima (6)
- Ostali radovi u drugim časopisima (1)
- Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima (1)
- Radovi u postupku objavljivanja (2)
- Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunar. rec. (1)
- Sažeci u zbornicima skupova (23)
- Diplomski radovi (1)
- Druge vrste radova (8)
- Vođenje disertacija, magistarskih i diplomskih radova (1)

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. Balog, Marta; Miljanović, Milan; **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Ivić, Vedrana; Viljetić, Barbara; Borbely, Attila; Papp, Zoltán; Blažeković, Robert; Vari, Sandor G; Fagyas, Miklós; Heffer, Marija. Sex-specific chronic stress response at the level of adrenal gland modified sexual hormone and leptin receptors. // Croatian medical journal. 56 (2015) , 2; 104-113 (članak, znanstveni).

2. **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Viljetić, Barbara; Balog, Marta; Vari G.Sandor; Krivošikova, Zora; Gajdoš, Martin; Kramarova, Patricia; Kebis, Anton; Vuković, Rosemary; Puljak, Livia; Has-Schon, Elizabeta; Heffer, Marija. Effects of high fat diet, ovariectomy, and physical activity on leptin receptor expression in rat brain and white fat tissue. // Croatian medical journal. 55 (2014) ; 228-238 (članak, znanstveni).

3. Kalasz, Judit; Pasztor, Toth; Bodí, Beata; Fagyas, Miklos, Toth, Attila; Pal H. Bgattoa; Vari G. Sandor; Balog, Marta; **Blažetić, Senka**; Heffer, Marija; Papp, Zoltan; Borbely, Attila. Single acute stress-induced progesterone and ovariectomy alter cardiomyocyte contractile function in female rats. // Croatian medical journal. 55 (2014) ; 239-249 (članak, znanstveni).

4. Vuković, Rosemary; **Blažetić, Senka**; Oršolić, Ivana; Heffer, Marija; Vari G. Sandor; Gajdoš, Martin; Krivošikova, Zora; Kramarova, Patricia; Kebis, Anton; Has-Schon, Elizabeta. Impact of ovariectomy, high fat diet, and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in the rat liver. // Croatian medical journal. 55 (2014) ; 218-227 (članak, znanstveni).

5. Sturgill, E.R.; Aoki, K.; Lopez, P.H.; Colacurcio, D.; Vajn, Katarina; Lorenzini, I.; **Majić, Senka**; Yang, W.H.; Heffer, Marija; Tiemeye, M.; Marth, J.D.; Schnaar, R.L. Biosynthesis of the major brain gangliosides GD1a and GT1b. // Glycobiology. 22 (2012) , 10; 1289-1301 (članak, znanstveni).

6. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; **Majić, Senka**; Štambuk, Anamaria; Heffer, Marija. Distribution of mono-, di- and tri-sialo gangliosides in the brain of Actionopterygian fishes. // Biochimica et biophysica acta. G, General subjects. 1820 (2012) , 9; 1437-1443 (članak, znanstveni).

Ostali radovi u drugim časopisima

1. **Senka Majjić**, Rosemary Vuković, Anamarija Šter, Elizabeta Has-Schön. ENZIMATSKO ODREĐIVANJE GLIKOLITIČKOG POTENCIJALA – POUZDANA METODA ZA PREDVIĐANJE KVALITETE MESA. // Krmiva : časopis o hranidbi životinja, proizvodnji i tehnologiji krme. 52 (2010.) , 6; 353-358 (članak, stručni).

Kongresno priopćenje (sažeci) u ostalim časopisima

1. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; **Majjić, Senka**; Perkov, Vedrana; Bogdanović, Tomislav; Jelić, Dušan; Dragun, Dario; Heffer, Marija. Distribucija kompleksnih gangliozida u mozgu *Vipera ammodytes* i *Vipera berus bosniensis* // 11. Hrvatski biološki kongres : zbornik sažetaka / Jelaska, Sven ; Klobučar, Goran ; Šerić Jelaska, Lucija ; Leljak Levanić, Dunja ; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb : Hrvatsko biološko društvo 1885, 2012. 134-135 (poster, sažetak, znanstveni).

Znanstveni radovi u zbornicima skupova s međunar. rec.

1. Ozimec, Siniša; Opačak, Anđelko; Florijančić, Tihomir; Bošković, Ivica; Puškadija, Zlatko; **Majjić, Senka**. Usporedba hidrobioloških obilježja odabranih ribolovnih voda u Podravini // Zbornik radova 45. hrvatskog i 5. međunarodnog simpozija agronoma / Maric, Sonja ; Lončarić, Zdenko ; Florijančić, Tihomir ; Lužaić, Ras (ur.). Osijek : Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2010. 983-987 (predavanje, međunarodna recenzija, objavljeni rad, znanstveni).

Sažeci u zbornicima skupova

1. Heffer, Marija; Balog, Marta; Ivić, Vedrana; Labak, Irena; **Blažetić, Senka**; Zelen, Ada. How adrenal gland takes hit by chronic stress? // GlowBrain Final Conference "Stem cell and biomaterial applications for brain repair". Zagreb : Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2015. 11-11 (pozvano predavanje, sažetak, znanstveni).

2. Ivić, Vedrana; Balog, Marta; Labak, Irena; **Blažetić, Senka**; Viljetić, Barbara; Heffer, Marija. OBR in stem cells in rat adrenal gland // Visualization of molecular markers in the brain. Zagreb : Sveučilište u Zagrebu Medicinski fakultet, 2015. 52-52 (predavanje, sažetak, znanstveni).

3. Ivić, Vedrana; Labak, Irena; Balog, Marta; **Blažetić, Senka**; Vondrak, Luka; Heffer, Marija. Alteration of ObR expression in the Sprague-Dawley rat brain as a consequence of acute and chronic stress // Bridges in Life Sciences 10th Annual Scientific Conference / Sandor G. Vari (ur.). 2015. 33-33 (poster, sažetak, znanstveni).

4. Balog, Marta; **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Viljetić, Barbara; Blažeković, Robert; Vuković, Rosemary; Heffer, Marija. Gender difference in expression of estrogen and leptin receptor in Sprague Dawley rat adrenal gland after acute and chronic stress // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "The interplay of Biomolecules", HDBMB2014 / Katalinić Maja and Kovarik Zrinka (ur.). - Zadar : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology , 2014..2014. (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

5. Balog, Marta; **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Viljetić, Barbara; Gajdoš, Martin; Vari, Sandor; Heffer, Marija. High Fat Diet, ovariectomy and physical activity differently affect leptin receptor distribution in hippocampus // Abstract Book. 9th FENS Forum on Neuroscience / FENS (ur.). 2014. (poster, sažetak, znanstveni).

12. Popis radova

6. Ivić, Vedrana; Balog, Marta; **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Heffer, Marija. Acute and chronic stress model in Sprague-Dawley rats // Pokusne životinje u znanstvenim istraživanjima (Experimental animals in scientific research). Zagreb : Hrvatsko društvo za znanost o laboratorijskim životinjama, 2014. 54-55 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
7. Viljetić, Barbara; Ivić, Vedrana; Labak, Irena; **Blažetić, Senka**; Heffer, Marija. Distribution of PSA-NCAM in brains of two venomous species: Vipera ammodytes and Vipera berus bosniensis // Application of biomaterials and in vivo imaging in stem cell research. Zagreb : University of Zagreb School of Medicine, 2014. 70 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
8. Vuković, Rosemary; **Blažetić, Senka**; Oršolić, Ivana; Heffer, Marija; Vari, G. Sandor; Gajdoš, Martin; Krivošiková, Zora; Kramarová, Patricia; Kebis, Anton; Has-Schön, Elizabeta. Impact of ovariectomy, high fat diet and lifestyle modifications on oxidative/antioxidative status in rat liver // Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific Conference - RECOOP HST ASSOCIATION Split, May 2 - June 1 : Split, 2014. 53 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
9. Vuković, Rosemary; **Blažetić, Senka**; Vuković, Ana; Vuković, Kristina; Varga, Martina; Balog, Marta; Krivošikova, Zora; Heffer, Marija; Has-Schon, Elizabeta. Selenized onion biscuits in attenuating oxidative stress induced by high fat diet, in the liver of ovariectomised rats // Book of Abstracts of the Congress of the Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology "The interplay of Biomolecules", HDBMB2014 / Katalinić Maja and Kovarik Zrinka (ur.). Zadar : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2014. 67-67 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
10. Balog, Marta; Šerić, Vatroslav; Degmečić, Ivan Večeslav; **Blažetić, Senka**; Mlinarević, Dražen; Blazekovic, Robert; Vari, Sandor; Miljanović, Milan; Heffer, Marija. Impact of Obesity and Stress on Cardiovascular Function // Abstract Book. Bridges in Life Sciences 8th Annual Scientific Conference Prague, Czech Republic / Vari, Sandor (ur.). RECOOP HST, 2013. (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
11. **Blažetić, Senka**; Labak, Irena; Viljetić, Barbara; Balog, Marta; Vari, Sandor G.; Krivosikovia, Zora; Gajdos, Martin; Kramarova, Patricia; Kebis, Anton; Vuković, Rosemary; Puljak, Livia; Has-Schon, Elizabeta; Heffer, Marija. Effects of high fat diet, ovariectomy and physical activity on leptin receptor expression in rat brain and white fat tissue // Bridges in Life Sciences 9th Annual Scientific Conference - RECOOP HST ASSOCIATION. Split, May 2 - June 1, 2013. 77 (predavanje, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).
12. **Blažetić, Senka**; Viljetić, Barbara; Labak Irena; Balog Marta; Ivić Vedrana; Schnaar Ronald L.; Heffer Marija. Alternations in number of calcium-binding striatal and hippocampal parvalbumin and calbindin D28k interneurons in the brain of St3Gal2, St3Gal3 and double knockout mice // Book of Abstracts ; 4. Croatian Congress of Neuroscience / Croatian Society for Neuroscience (CSfN) (ur.). Zagreb, 2013. 44-45 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).
13. Jelkić, Dinko; Opačak, Anđelko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka Blažetić**. Utjecaj načina gospodarenja na raznolikost ihtiofaune u vodama stajaćicama ribolovnog područja Drava – Dunav // Zbornik sažetaka 48. hrvatski i 8. međunarodni simpozij agronoma / Marić, Sonja ;

12. Popis radova

Lončarić, Zdenko (ur.). Osijek : Poljoprivredni fakultet u Osijeku, 2013. 226-227 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

14. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; **Blažetić, Senka**; Ivić, Vedrana; Heffer, Marija. Distribution of complex gangliosides in brains of catfish and perch // Book of Abstracts 4th Croatian Congress of Neuroscience /. Zagreb : Croatian Society for Neuroscience, Croatian Institute for Brain Research, 2013. 34-34 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

15. Labak, Irena; Viljetić, Barbara; Perković, Vedrana; **Majić, Senka**; Heffer, Marija. Distribution Of Migratory Zones In Optic Tectum Of Teleostea // . (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

16. **Majić S.**; Krajina V.; Labak I.; Viljetić B.; Perković V.; Schnaar R.L.; Heffer M. Alteration In Number Of Calbindin D28k And Parvalbumin Expressing Neurons In Cortical Regions Of St3gal2, St3gal3 And Double Knockout Mice // . (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

17. Labak, Irena; Viljetić, Barbara; **Majić, Senka**; Heffer, Marija. Interspecies differences in PSA-NCAM zones in adult fish brain // SiNAPSA Neuroscience Conference SNC'11, Book of Abstracts / Damjan Osredkar, Blaž Koritnik, Miha Pelko (ur.) (ur.). Ljubljana : Sinapsa, Slovenian Neuroscience Association, 2011. 148-148 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

18. Viljetić, Barbara; Labak, Irena; **Majić, Senka**; Heffer, Marija. Complex gangliosides in fish brain // SiNAPSA Neuroscience Conference SNC'11 Book of Abstracts / Damjan Osredkar, Blaž Koritnik, Miha Pelko (ur.) (ur.). Ljubljana : Sinapsa, Slovenian Neuroscience Association, 2011. 148-148 (poster, međunarodna recenzija, sažetak, znanstveni).

19. Labak, Irena; Viljetić, Barbara; **Majić, Senka**; Heffer-Lauc, Marija. Interspecies differences in PSA-NCAM zones in adult Teleostean brains // Book of Abstracts. 2010. 125-125 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

20. Labak, Irena; Viljetić, Barbara; **Majić, Senka**; Perković, Vedrana; Galović, Dalida; Has-Schön, Elizabeta; Heffer-Lauc, Marija. Komparativne razlike u sposobnosti regeneracije mozga slatkovodnih riba // Proceeding Summary / Bogut, Ivan (ur.). Vukovar : Hrvatska gospodarska komora, 2010. 12-13 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

21. Vuković, Rosemary; **Majić, Senka**; Pavličević, Jerko; Galović, Dalida; Has-Schön, Elizabeta; Bogut, Ante; Bogut, Ivan. Heavy metal distribution in tissues of three fish species inhabiting hydroaccumulation Mostar, Bosnia and Herzegovina // Book of Abstracts / Zrinka, Kovarik ; Jadranka, Varljen (ur.). Rijeka : Croatian Society of Biochemistry and Molecular Biology, 2010. 152-152 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

22. Špoljarić, Dubravka; **Majić, Senka**; Stević, Filip; Ozimec, Siniša. Praćenje livadnih populacija dviju vrsta orhideja u okolini Zmajevca (Baranja) // Zbornik sažetaka 10. hrvatskog biološkog kongresa s međunarodnim sudjelovanjem / Besendorfer, V. ; Kopjar, N. ; Vidaković-Cifrek, Ž. ; Tkalec, M. ; Bauer, N. ; Lukša, Ž. (ur.). Zagreb : Hrvatsko biološko društvo 1885, 2009. 137-138 (poster, međunarodna recenzija, sažetak).

12. Popis radova

23. Vuković, Rosemary; Suknović, Dragica; Wagner, Jadranka; **Majić, Senka**; Has-Schön, Elizabeta. Utjecaj intenziteta i trajanja pušenja na derivate hemoglobina u krvi pušača iz Osijeka // Zbornik Sažetaka / Besendorfer, Višnja ; Kopjar, Nevenka ; Vidaković-Cifrek, Željka ; Tkalec, Mirta ; Bauer, Nataša ; Lukša, Žaklin (ur.). Zagreb : Hrvatsko biološko društvo, 2009. 267-268 (predavanje, domaća recenzija, sažetak, znanstveni).

Druge vrste radova

1. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove "Športski ribolovni savez Požeško - slavonske županije", 2013. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
2. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Ribolovno gospodarska osnova Vukovarsko - srijemske županije, 2012. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
3. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Ribolovno gospodarska osnova Zajednice športsko ribolovnih udruga Vukovar, 2012. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
4. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove Športsko ribolovnog saveza Brodsko - posavske županije, 2012. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
5. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove Zajednice športsko ribolovnih udruga Slatina, 2012. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
6. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove Zajednice športsko ribolovnih udruga Donji Miholjac, 2012. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
7. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove Zajednice športsko ribolovnih udruga Valpovo, 2011. (studija - ribolovno gospodarska osnova).
8. Opačak, Anđelko; Jelkić, Dinko; Ozimec, Siniša; **Blažetić, Senka**. Revizija ribolovno gospodarske osnove Zajednice športsko ribolovnih klubova Koprivnica, 2010. (studija - ribolovno gospodarska osnova).