

Validacija imunohistokemijskih markera na stanicama tkiva korteksa *Monodelphis domestica*

Kusturin, Helena

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Rijeka / Sveučilište u Rijeci**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:193:440084>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**

Repository / Repozitorij:



[Repository of the University of Rijeka, Faculty of Biotechnology and Drug Development - BIOTECHRI Repository](#)



SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Helena Kusturin

**Validacija imunohistokemijskih markera na stanicama tkiva
korteksa *Monodelphis domestica***

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
Biotehnologija u medicini

Helena Kusturin

**Validacija imunohistokemijskih markera na stanicama tkiva
korteksa *Monodelphis domestica***

Diplomski rad

Rijeka, 2020. godina

Mentor rada: doc. dr. sc. Jelena Ban

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
Biotechnology in medicine

Helena Kusturin

Validation of immunohistochemical markers on *Monodelphis domestica* cortical tissue cells

Graduate thesis

Rijeka, 2020.

Zahvala

Zahvaljujem se svojoj mentorici doc. dr. sc. Jelena Ban na pokazanom velikom entuzijazmu u radu. Njeno vodstvo, motivacija i dostupnost, tijekom svake faze izrade ovog diplomskog rada, značajno su olakšali ovaj cjelokupan proces. Hvala Vam na pruženoj prilici i što ste mi pokazali što znači biti mentor u punom smislu riječi.

Hvala asistentima Zrinku Baričeviću i Antoneli Petrović što su uvijek bili spremni pomoći, na svim danim savjetima i odgovorima na brojna postavljena pitanja.

Velika hvala mojoj obitelji na pruženoj potpori i strpljenju. Njihova ljubav i vjera u mene omogućili su svaki moj uspjeh.

Ovaj rad posvećujem svojoj sestri.

Diplomski rad obranjen je dana 02.07.2020.

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Antonija Jurak Begonja

2. Prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović

3. Doc. dr. sc. Jelena Ban

Rad ima 65 stranica, 18 slika i 48 literaturnih navoda

Financijska potpora pri izradi diplomskog rada

U radu je korištena oprema projekta Sveučilišta u Rijeci „Razvoj istraživačke infrastrukture na Kampusu Sveučilišta u Rijeci“ br. RC.2.2.06-0001, financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj (EFRR), projekta Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ) IP-2016-06-7060 (voditeljica projekta: prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović) te potpore Sveučilišta u Rijeci (18.12.2.1.01, 18-258-6427 i 18-290-1463).

SAŽETAK

Korteks čini najveći dio volumena mozga te se ovdje procesira većina pristiglih informacija. Istražujući tijek razvoja mozga, nailazi se na veliki broj neodgovorenih pitanja. Bolje razumijevanje tog perioda dalo bi potpuniju sliku o funkcijama i mehanizmima koji se događaju u mozgu, a nova saznanja o neuralnim matičnim stanicama mogu se pokazati iznimno korisna u terapiji neuroloških bolesti i ozljeda. Jedan od načina identifikacije neuralnih matičnih stanica, kao i zrelih stanica, je pomoću imunohistokemijskih markera. U ovom istraživanju testiramo markere SOX2, SOX9, GFAP, NeuN, MBP, Iba1, Ki67 na korteksima novorođenih oposuma (*Monodelphis domestica*).

Testiranje je provedeno koristeći dvije metode, imunohistokemiju (IHC) te izotropni frakcionator (IFR). U sklopu IHC metode, korišteni su tanko narezani poprečni presjeci korteksa, dok je za IFR korištena homogena smjesa jezgri stanica korteksa. U obje metode izvršena su imunooznačavanja sa spomenutim markerima te vizualizacija pomoću fluorescentnog mikroskopa.

SOX2⁺ i SOX9⁺ stanice kolokalizirane su u području ventrikula. Postoji velika razlika u broju SOX2⁺ i SOX9⁺ stanica u ostatku korteksa, u korist SOX2⁺ stanica. Ta se razlika s vremenom smanjuje, što upućuje na početak astrogeneze. GFAP⁺ stanice su jasno vidljive tek kod nešto starijih oposuma te su uglavnom koekspimirane sa SOX9, dok kod mlađih oposuma to nije bio slučaj. Mlađi oposumi imali su veliki broj NeuN⁺/SOX2⁺ stanica što bi upućivalo da se radi o mladim neuronima kod kojih dolazi po sporijeg utišavanja ekspresije SOX2 kao moguća posljedica produljene neurogeneze oposuma. MBP nije dao informacije o prisutnosti oligodendrocita, također, marker proliferacije, Ki67, nije se pokazao dovoljno specifičan. Suprotno tome, Iba1 marker jasno je označio mikroglije već kod najranije testirane dobi oposuma. IHC metodom je ispitana valjanost markera koji su pomogli u identifikaciji i lokalizaciji stanica korteksa mladih oposuma. IFR metoda je

dodatno trebala pomoći u kvantifikaciji stanica, no dobiveni podaci nisu pouzdani. Nema studija koje bi potvrdile točnost tih podataka.

Ključne riječi: razvoj korteksa, *Monodelphis domestica*, imunohistokemijski markeri, imunohistokemija, izotropni frakcionator

SUMMARY

The cerebral cortex makes up the largest part of the brain's volume, and most of the information received is processed here. Exploring the course of brain development, one encounters a number of unanswered questions. A better understanding of this period would give a more complete picture of the functions and mechanisms occurring in the brain, and new insights into neural stem cells may prove extremely useful in the treatment of neurological diseases and injuries. One way to identify neural stem cells, as well as mature cells, is by using immunohistochemical markers. In this study, we test the markers SOX2, SOX9, GFAP, NeuN, MBP, Iba1, Ki67 on cortices of newborn opossums (*Monodelphis domestica*).

Testing was performed using two methods, immunohistochemistry (IHC) and isotropic fractionator (IFR). As part of the IHC method, thinly sliced cross sections of the cortex were used, while for IFR a homogeneous mixture of cortex cell nuclei was used. In both methods, immunolabeling with the mentioned markers and visualization using a fluorescent microscope were performed.

SOX2+ and SOX9+ cells are colocalized in the ventricular area. There is a large difference in the number of SOX2+ and SOX9+ cells in the rest of the cortex, in favor of SOX2+ cells. This difference decreases over time, suggesting the onset of astrogenesis. GFAP+ cells are clearly visible only in slightly older opossums and are mostly coexpressed with SOX9, while in younger opossums this was not the case. Younger opossums had a large number of NeuN+/SOX2+ cells, which could indicate that these are young neurons that have a slower silencing of SOX2 expression as a possible consequence of prolonged neurogenesis of the opossum. MBP did not provide information on the presence of oligodendrocytes, also, the proliferation marker, Ki67, did not prove to be specific enough. In contrast, the Iba1 marker clearly marked microglia already at the earliest tested age of the opossum. The validity of markers that helped in the identification and localization of cortex cells of young opossums was examined by the IHC

method. The IFR method was supposed to further aid in cell quantification, but the data obtained is not reliable. There are no studies to confirm the accuracy of this data.

Key words: cortex development, *Monodelphis domestica*, immunohistochemical markers, immunohistochemistry, isotropic fractionator

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	Potreba za boljim poznavanjem središnjeg živčanog sustava	1
1.2.	Razvoj korteksa sisavaca	1
1.2.1.	Neuralne matične i progenitorske stanice korteksa	2
1.3.	Oposum (<i>Monodelphis domestica</i>)	4
1.3.1.	Razvoj korteksa oposuma	4
1.4.	Imunohistokemijski markeri	5
1.5.	Izotropni frakcionator	8
2.	CILJ RADA	10
3.	MATERIJALI I METODE	11
3.1.	Životinjski modeli	11
3.2.	Izotropni frakcionator (IFR)	11
3.2.1.	Frakcioniranje	11
3.2.2.	Primarna protutijela	12
3.2.3.	Sekundarna protutijela i Hoechst	12
3.3.	Imunohistokemija (IHC)	13
3.3.1.	Rezanje uzoraka u kriostatu	13
3.3.2.	Imunofluorescencija (IF)	13
3.4.	Fluorescentna mikroskopija	15
4.	REZULTATI	16
4.1.	Validacija markera prereza korteksa oposuma pomoću IHC	16
4.1.1.	SOX2 i SOX9	16
4.1.2.	GFAP	23
4.1.3.	NeuN	27
4.1.4.	MBP	30
4.1.5.	Iba1	31
4.1.6.	Ki67	33
4.2.	Validacija markera i analiza broja stanica korteksa oposuma	36
4.2.1.	P30	36
4.2.2.	P17	38
4.2.3.	P5	43
5.	RASPRAVA	44
6.	ZAKLJUČAK	48
7.	LITERATURA	49

1. UVOD

1.1. Potreba za boljim poznavanjem središnjeg živčanog sustava

Broj oboljelih od neurodegenerativnih bolesti i mentalnih poremećaja je u porastu. Nedovoljno dobro poznavanje biologije živčanog sustava i povezanih bolesti onemogućuje pronalazak novih lijekova i uspješnih terapija (1). Također, veliki problem predstavljaju ozljede središnjeg živčanog sustava (SŽS). Iako je SŽS čovjeka vrlo kompleksan i sofisticiran, nema mogućnost regeneracije aksona nakon ozljede, kao što imaju beskralježnjaci i neki niži kralježnjaci, te se traži razlog i mogućnost savladavanja te zapreke (2).

1.2. Razvoj korteksa sisavaca

Mozak je najsloženiji organ u organizmu. Razlikuje se po veličini, obliku i složenosti između pojedinih vrsta. Korteks je dio mozga koji je kroz evoluciju, posebice u čovjeka, doživio najveći porast, kako u masi (volumenu), tako i u broju stanica (3). Na veličinu i stanični sastav korteksa ključni utjecaj tijekom razvoja imaju amplificirajuće progenitorske stanice, koje imaju sposobnost samoobnavljanja i neurogeneze, a te sposobnosti značajno se razlikuju od vrste do vrste (4). Jedna od osnovnih funkcija korteksa je procesuiranje i integriranje signala pristiglih iz osjetilnih receptora (5). Korteksi sisavaca se razlikuju u debljini slojeva, broju i gustoći neurona te njihovoj međusobnoj povezanosti (3).

Korteks nastaje iz progenitorskih stanica u ventrikularnoj zoni (VZ). Redoslijed nastanka određenih vrsta stanica SŽS-a je određen tijekom razvoja: prvo dolazi do neurogeneze (diferencijacija progenitorskih stanica u post-mitotičke neurone), nakon čega slijedi gliogeneza, tj. formiranje glijalnih stanica (astrocita i oligodendrocita). Promjene tijekom razvoja kortikalnih matičnih stanica utječu na to koje se stanice proizvode, smanjuje se njihov neurogeni potencijal, a povećava gliogeni. Većina neurona sisavaca nastaje tijekom embrionalnog razvoja, dok se glija stanice uglavnom formiraju nakon rođenja. Time je omogućeno da se aksoni razviju

prije nastanka oligodendrocita koji ih omataju te da se broj glija stanica uravnoteži s već postojećom populacijom neurona (6).

Neurogeneza se odvija u VZ korteksa embrija uzduž lateralnih ventrikula (3). VZ postaje sve manja kako se neurogeneza nastavlja, a na kraju neurogeneze ostaje samo jedan sloj stanica VZ (7). Za razliku od ptica i gmazova, u sisavaca dolazi do stvaranja subventrikularne zone (SVZ), drugog sloja proliferirajućih stanica. SVZ je od velikog značaja za neurogenezu sisavaca, gdje dolazi do povećanja broja neurona povećavanjem stope i produljenjem trajanja neurogeneze (3). Novonastali neuroni migriraju i formiraju 6-slojni korteks po principu da ranije stvoreni neuroni nastanjuju dublje slojeve, a kasnije stvoreni neuroni pliće slojeve (7). Također, SVZ je jedna od regija gdje je potvrđena neurogeneza u odraslom organizmu (8).

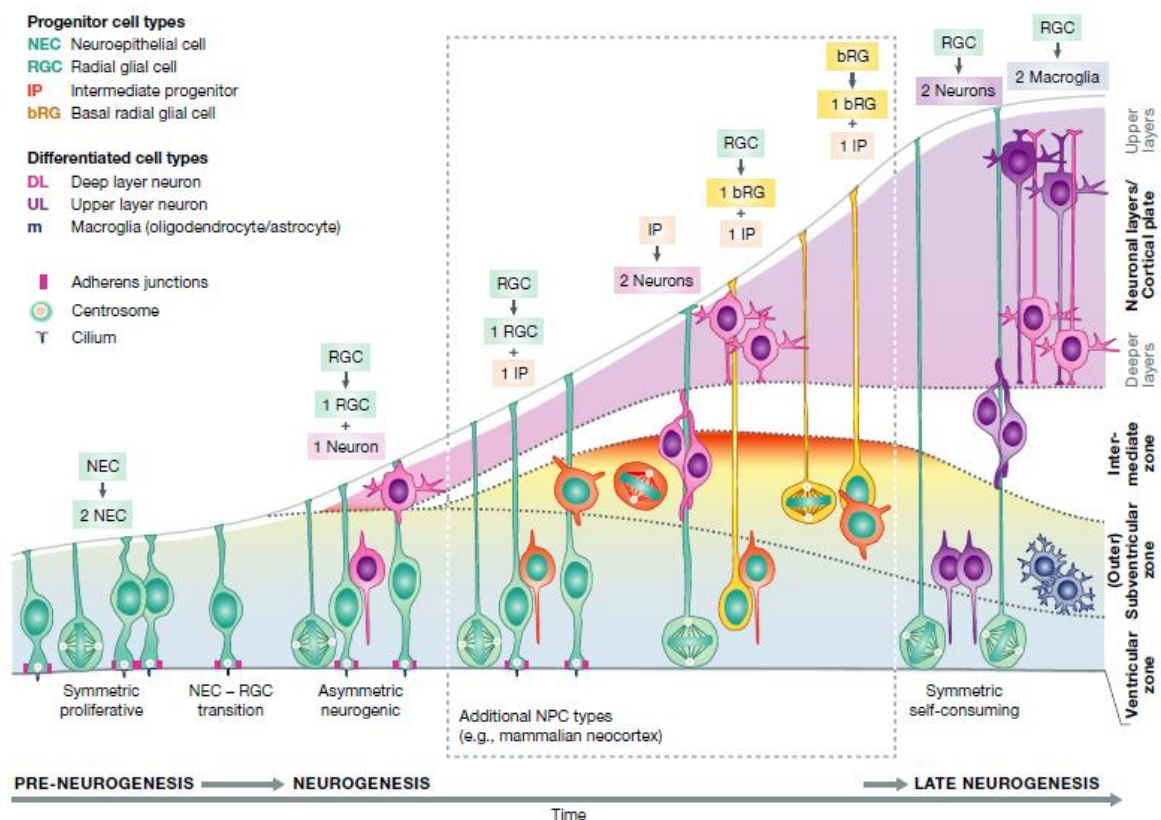
1.2.1. Neuralne matične i progenitorske stanice korteksa

Tijekom embrionalnog razvoja, korteks se sastoji od sloja proliferirajućih neuroepitelnih stanica koje oblažu lateralne ventrikule (VZ). VZ je vidljiva npr. kod štakora nakon embrionalnog dana (E) 12. Stanice su homogene, gusto zbijene i radijalno orijentirane. SVZ se također sastoji od sloja stanica koje se dijele, no nisu toliko gusto i radijalno raspoređene. U slučaju štakora, ovaj sloj nastaje nakon E14 (7).

Na početku embrionalnog razvoja neuroepitelne stanice u VZ dijele se simetrično, dajući 2 identične neuroepitelne stanice, čime se omogućuje znatno povećanje u broju stanica (Slika 1). Iniciranjem neurogeneze, neuroepitelne stanice dobivaju određene karakteristike glija stanica poput ekspresije specifičnih intermedijarnih filamenata i citoplazmatskih glikogenskih granula te se zbog toga nazivaju radijalne glije (RG) (7). RG je bipolarna stanica izduženog oblika te predstavlja glavni izvor progenitorskih stanica tijekom razvoja SŽS. Osim što proliferiraju, RG kontroliraju migraciju novonastalih neurona, služeći kao tračnice koje usmjeravaju neuron na njegovo ciljno mjesto (9). U VZ dolazi do asimetrične diobe RG-a kojom nastaje samoobnavljajuća RG te

diferencirana stanica (neuron) ili intermedijarna progenitorska stanica (eng. intermediate progenitor cell; IPC) (10). IPC migriraju u SVZ i simetričnom diobom stvaraju stanice koje diferenciraju u neurone (7). Nastupanjem gliogeneze od IPC nastaju glija stanice, kao što su astrociti i oligodendrociti, a RG se odvajaju od ventrikula i migriraju prema kortikalnoj ploči te se kod sisavaca uglavnom pretvaraju u astrocite (11).

Da li će matična stanica biti neuralni ili glijalni progenitor ovisi o okolišnim promjenama te o promjenama u samoj stanici (6). Progenitori su heterogena populacija stanica te je teško odrediti vezu između podtipa progenitora i njegove loze (10). Novim saznanjima o transkripcijskim faktorima i njihovoj ekspresiji dobit ćemo bolji uvid o funkciji i raznolikosti matičnih i progenitorskih stanica (7).



Slika 1. Shematski prikaz kortikalne neurogeneze. Neuralne matične i progenitorske stanice svojim diobama u različitim slojevima korteksa dovode do stvaranja neurona. Preuzeto iz: (10).

1.3. Oposum (*Monodelphis domestica*)

U ovom radu korišteni su uzorci tkiva sivog kratkorepog oposuma (lat. *Monodelphis domestica*; nadalje oposum), tobolčara porijeklom iz Južne Amerike (12). Pogodna je životinja za laboratorijska istraživanja zbog svoje veličine (masa odraslog oposuma 70-120 g) (13), mogućnosti uzdržavanja i razmnožavanja tijekom cijele godine te kratkog gestacijskog razdoblja (14 dana) (14). Rađaju se u vrlo nerazvijenom stanju koje se može usporediti s E14 ili E15 miša ili štakora (2), a budući da su tobolčari bez pravog tobolca, novorođeni oposumi su lako dostupni (15). Posebno su zanimljivi za proučavanje SŽS jer novorođeni oposumi imaju sposobnost potpune regeneracije leđne moždine nakon traume (14). Kada oposum dosegne postnatalni dan (P) 9-12, gubi mogućnost regeneracije aksona, iako je regeneracija moguća u lumbarnom dijelu do 17. dana (2). Iz tog razloga mogu biti korisni za istraživanja na polju neuroregeneracije te razvojne i komparativne biologije SŽS sisavaca. Još jedna prednost ove životinje je ta što joj je sekvenciran genom, što daje dodatne informacije o njenim genima i proteinima (14).

1.3.1. Razvoj korteksa oposuma

Prije više od 100 milijuna godina započela je evolucija tobolčara nakon što su se odvojili od viših sisavaca. Unatoč tome, korteks tobolčara ima 6 slojeva i sličnu temeljnu organizaciju kao ostali sisavci. Za tobolčare je karakteristično to što imaju produljeni period razvoja korteksa i neurogeneze, ali i manji broj dioba stanica te manjak neurona u odnosu na glodavce (3). Malo se zna o točnom vremenu nastanka određenih slojeva korteksa i o njihovom staničnom i molekularnom sastavu te gdje i kako nastaju razne podvrste neurona. Veći dio razvoja korteksa oposuma se odvija postnatalno (14).

Oposumi imaju različit omjer glijastanica naspram neurona u odnosu na miševе, odnosno manji broj neurona što upućuje na različitu strukturu i organizaciju njihovih germinalnih zona (3). Kod oposuma se ne može jasno

odrediti granica između VZ i SVZ (14). U SVZ dolazi do kasnije pojave stanica koje se dijele (P14)(3), nego što je slučaj kod glodavaca (E14) (7), dok u VZ nema velike razlike. Proporcije IPC u SVZ i neuroepitelnih stanica u VZ su vrlo slične između štakora i oposuma (3).

Još uvijek nije točno definirano kada kod oposuma počinje i završava neurogeneza te postoje podvojena mišljenja u literaturi. Puzzolo i suradnici tvrde kako neurogeneza doseže svoj vrhunac pri P8, nakon čega pada broj bazalnih progenitora. Smatraju kako neurogeneza najvjerojatnije završava između P14 i P16 jer se nakon P18-P20 javlja GFAP, koji je indikator astrocitogeneze, te da bi u razdoblju P25-P30 uglavnom trebala biti gotova migracija neurona (14). Seelke i suradnici smatraju da je vrhunac kortikalne neurogeneze između P14 i P24 (15). Saunder i suradnici tvrde da neurogeneza traje i dulje od toga budući da su pri P45 još uvijek vidljive VZ i SVZ (13). Osim neurogeneze, gliogeneza oposuma je također produljena te može trajati sve do P180 (15).

U odnosu na ostale životinje sličnih veličina kao oposum, korteks oposuma je manjih dimenzija (5). Tijekom razvoja korteksa ukupni broj stanica se povećava, posebno onih „ne-neuronskih“ (od engl. „non-neuronal cells“, uglavnom glija stanice), dok se broj neurona ne mijenja značajno. Ta činjenica sugerira da bi glija stanice kod tobočara mogle imati puno važniju ulogu od „pasivne“ potpore neurona, uloge koja im se u prošlosti pripisivala. Broj neurona se stabilizira ili opada nakon završene neurogeneze (15). Od ukupnog broja stanica korteksa odraslog oposuma (6 milijuna stanica) (5), 22% opada na neurone, a ostatak na ne-neuronske stanice (15). Za sada postoji samo jedno istraživanje koje je kvantificiralo broj neurona u korteksu oposuma te postoje nepravilnosti u odnosu na druge tobočare, stoga taj podatak ne treba prihvatiti kao neosporan (16).

1.4. Imunohistokemijski markeri

Imunohistokemijski markeri su vrlo koristan alat u identifikaciji različitih neuralnih i glijalnih prekursora te boljem razumijevanju dijeljenja i diferencijacije matičnih i progenitorskih stanica. Detektiranjem razlike u

ekspresiji markera matičnih/progenitorskih stanica tijekom različitih stadija razvoja korteksa mogli bismo dobiti jasniju sliku o njihovoj ulozi u kortikogenezi (17). Na tržištu postoje mnogobrojni različiti markeri te ih nije moguće sve ispitati. U ovom istraživanju koristili smo niz markera koji su nama bili dostupni te koji su do sada pokazali svoju specifičnost za određene tipove stanica ili njihove funkcije. Kao marker progenitorskih stanica koristili smo SOX2, a za diferencirane neurone NeuN. Za označavanje glija stanica koristili smo SOX9 i GFAP, markere astrocita te MBP za oligodendrocite. Uporaba markera Iba1 obilježila je mikroglije, dok je kao marker proliferacije korišten Ki67.

Unatoč tome što su identificirani mnogi proteini koje eksprimiraju RG, još uvijek ne postoji jedinstveni marker. One istovremeno eksprimiraju markere zrelih astrocita, ali i neuralnih matičnih stanica te imaju bipolarnu morfologiju. *In vitro* istraživanja su pokazala kako RG neonatalnog (P1) štakora uglavnom diferenciraju u astrocite, a mali broj u neurone (18).

SOX2 (eng. SRY (sex determining region Y)-box2) je jedan od najranije prisutnih transkripcijskih faktora tijekom razvoja SŽS, ima ulogu u održavanju pluripotencije nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica, a također ga eksprimiraju proliferirajući neuralni progenitori. Neuralne matične stanice koje su SOX2 pozitivne mogu dati identične stanice kćeri ili neuralne prekursore. U posljednjem staničnom ciklusu progenitora smanjuje se ekspresija ovog proteina prije nego postanu postmitotički (19).

SOX2 je tijekom istraživanja na ljudskim embrionalnim korteksima najjače izražen u jezgrama stanica koje se nalaze u VZ i SVZ. Izvan tih zona detektiran je u migrirajućim novorođenim neuronima na putu prema kortikalnoj ploči (17). Glijalni prekursori i diferencirani astrociti (proliferirajući) eksprimiraju SOX2 dok ne dođu u stanje mirovanja. Moguće je da SOX2 ima različite uloge tijekom neurogeneze naspram gliogeneze (20).

GFAP (eng. glial fibrillary acidic protein) jedan je od glavnih proteina u skupini intermedijarnih filamenata prisutnih kod astrocita (21). Koristi se i kao marker radijalnih glija (9, 11) te za specifično obilježavanje astrocita kako bi se izdvojili od ostalih vrsta glija stanica (21). Iako je GFAP jedan od najčešće korištenih markera za astrocite, nije eksprimiran u većini astrocita mišjeg korteksa (22). Ekspresija GFAP-a u ljudskom embrionalnom korteksu javlja se nakon 11. tjedna gestacije, prateći razvoj neuralnih i glijalnih prekursora (17).

SOX9 (eng. SRY (sex determining region Y)-box9) je transkpcijski faktor koji se pretežno koristi kao neuralni marker specifičan za astrocite. Tijekom razvoja SŽS ima ulogu promicanja glijalne diferencijacije stanica. Neuralne matične stanice tijekom embrionalnog razvoja eksprimiraju ovaj protein. U odraslom mozgu, osim u astrocitima, SOX9 se također može pronaći i u endodermalnim stanicama te neuralnim progenitorima. Ekspresija SOX9 se povećava sa starosti dok god broj astrocita ne postane stabilan. Nije primijećena kolokalizacija SOX9 i markera neurona, NeuN-a, što znači da neuroni ne eksprimiraju SOX9 te se time potvrđuje specifičnost ovih markera u obilježavanju astrocita u odnosu na neurone (22).

MBP (eng. myelin basic protein) je jedan od glavnih proteina koji čini sastavni dio mijelina u SŽS. Mijelin stvaraju oligodendrociti te se MBP koristi kao marker istih. Lokaliziran je u citoplazmi oligodendrocita te izdancima. Primijećeno je kako MBP mogu eksprimirati i makrofazi te mikroglije. U razdoblju od 10. do 15. gestacijskog tjedna, MBP pozitivne stanice ljudskog fetusa su vidljive u VZ i SVZ te u kortikalnoj ploči korteksa. Stanice izgledaju kao mikroglija, okruglog su ili bipolarnog oblika (23).

NeuN (eng. neuronal nuclei) je protein specifičan za neurone, no ne označava sve tipove neurona. Također postoje razlike između vrsta, npr. kod jedne životinjske vrste može doći do obilježavanja određenog tipa neurona korištenjem NeuN-a, dok kod druge životinjske vrste isti tip neurona neće biti obilježen. NeuN nije marker neuralnih prekursora, već postmitotičkih neurona, iako se može eksprimirati kod neurona na izlazu iz staničnog

ciklusa. NeuN nije ispitan na mozgovima velikog broja različitih životinja (15).

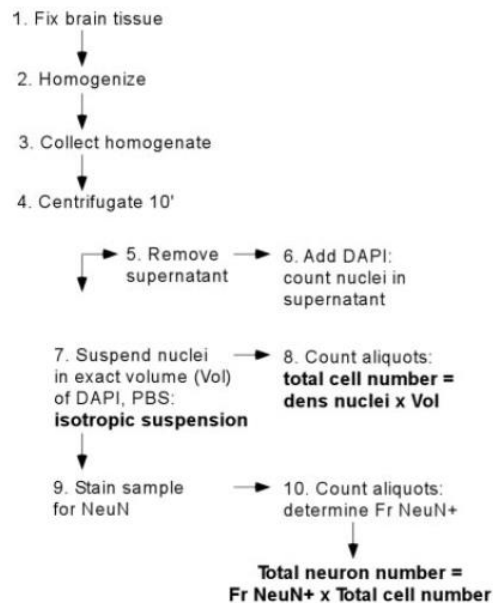
Iba1 (eng. ionized calcium-binding adapter molecule 1), također je poznata kao AIF-1 (eng. Allograft inflammatory factor 1), a koristi se kao marker specifičan za mikrogliju (24). Aktivacija mikroglije dovodi do različite lokalizacije Iba1 (25). U ranim fazama razvoja korteksa, Iba1+ mikroglije migriraju u korteks te nastanjuju pijalnu površinu te unutar lateralnih ventrikula, a kasnije se rasprostrane uzduž cijelog korteksa (26).

Ki67 je nuklearni protein koji se eksprimira u stanicama koje se dijele pa se stoga koristi kao marker stanične proliferacije za gotovo sve vrste stanica (27). Uglavnom ga ekspimiraju gusto poredane progenitorske stanice u VZ (28). Daljnjim razvojem korteksa, Ki67+ stanice se mogu pronaći i u SVZ te intermedijarnoj zoni. Neuralni progenitori embrija s vremenom gube sposobnost proliferacije te je primjerice kod tek rođenog miša opstao vrlo mali broj proliferirajućih stanica u VZ i SVZ (29).

1.5. Izotropni frakcionator

Izotropni frakcionator (IFR) je relativno jednostavna, brza, ekonomična i pouzdana metoda brojanja stanica (30). Postupak je takav da se fiksirano tkivo mora pretvoriti u homogenu ili tzv. „izotropnu suspenziju“ izoliranih staničnih jezgri te se pomoću imunofluorescencije prebroje i svrstaju u određeni tip stanica za svega 24 sata (Slika 2.). Prednosti korištenja ove metode su: brzina, jednostavnost, metodu je lako uspostaviti u svakom laboratoriju jer ne zahtjeva skupu opremu, a moguće je identificirati tip stanice koristeći nuklearne markere (31). Nedostatci ove metode su razaranje membrane i citoskeleta stanice dok je gubitak jezgri tijekom homogenizacije minimalan zbog prethodne fiksacije. Iako su izgubljene informacije o morfologiji i povezanosti između stanica, zahvaljujući nuklearnom markeru specifičnom za neurone (NeuN), ovom metodom izbrojen je ukupan broj neurona mozga odraslog čovjeka (86 milijardi) i desetine ostalih vrsta sisavaca (15).

Ova metoda se smatra pouzdanom jer su uspoređujući broj stanica dobiven drugim metodama poput imunohistokemije prereza tkiva ili ekstrakcije DNA, rezultati bili podudarajući (30). Određivanje ukupnog broja različitih vrsta stanica mozga i/ili regija mozga poput korteksa su vrlo bitne informacije za bolje razumijevanje razvoja SŽS te omogućuju ispitivanja razlike između zdravog mozga te za vrijeme bolesti (31).



Slika 2. Shematski prikaz metode izotropnog frakcionatora u 10 jednostavnih koraka. Nakon fiksacije i homogenizacije tkiva slijedi bojanje izoliranih jezgi imunohistokemijskim markerima. Jezgre je tada moguće prebrojati i svrstati u određene skupine. Preuzeto iz: (31).

2. CILJ RADA

Svrha ovog istraživačkog rada je validiranje imunohistokemijskih markera na stanicama tkiva korteksa tijekom razvoja u novorođenih oposuma.

Ciljevi istraživačkog rada:

1. Ispitati ekspresiju imunohistokemijskih markera za progenitorske stanice, neurone, glija stanice te proliferirajuće stanice koji do sada nisu bili testirani na oposumu, no učestalo se koriste kod drugih životinjskih modela.
2. Pomoću imunohistokemijskih markera odrediti lokalizaciju i udio imunooznačenih stanica u tkivu korteksa.
3. Ispitati u kojem vremenskom periodu dolazi do pojave i nestanka određenih vrsta stanica te uočiti varijacije u njihovoj lokalizaciji i količini kod novorođenih oposuma tijekom prvih 30 dana života. Budući da oposumi imaju produljeni postnatalni period razvoja korteksa i same neurogeneze (koji nisu dovoljno precizno definirani), u odnosu na glodavce, radimo usporedbu s novorođenim mišem.
4. Pokušati kvantificirati imunooznačene stanice korteksa oposuma te njihovu fluktuaciju u odnosu na postnatalnu dob oposuma koristeći metodu izotropnog frakcionatora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinjski modeli

U ovom istraživanju korišteni su oposumi (*Monodelphis domestica*) različitih postnatalnih dobi: P6, P17 i P30; gdje se P0 odnosi na dan rođenja. Kolonija sivog kratkorepog oposuma održavana je u vivariju na Sveučilištu u Trstu, Trst, Italija, u skladu sa smjernicama Europske unije za njegu životinja (d.1.116/92; 86/609/C.E.). Uloženi su svi naponi da se izbjegne patnja životinja tijekom postupka disocijacije.

3.2. Izotropni frakcionator (IFR)

Životinje su žrtvovane dekapitacijom, nakon čega su im izolirani korteksi te odstranjene moždane ovojnice. Izvršena je fiksacija uranjanjem korteksa u otopinu 4% paraformaldehida (PFA) u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) (Millipore, kat. br. 100496) na 4°C, koja je trajala minimalno 12-24 sata.

3.2.1. Frakcioniranje

Korteks je izvađen iz otopine PFA te ispran 3x s 1 ml PBS (Merck, kat. br. D8537. Dodano je 1,5 ml citratnog pufera (40 mM natrijevog citrata i 1% Triton X-100, pH 6,0) te zajedno s korteksom prebačeno u 5 ml stakleni homogenizator za tkivo (Tenbroeck tissue grinder, Wheaton). Homogenizira se sve dok više nisu uočljivi ni najmanji fragmenti tkiva. Iako je tkivo razoreno, jezgre su ostale netaknute zahvaljujući prethodnoj fiksaciji te je time dobivena suspenzija koja će se koristiti za označavanje i brojanje stanica korteksa. Homogenizator je ispran s dodatnih 500 µl citratnog pufera te je homogenat prebačen u vijalicu i dva puta centrifugiran (10 min na 4000 rpm, 4°C). Nakon prve centrifuge, uklonjen je supernatant te je dodano 1,5 ml citratnog pufera, dok je nakon druge centrifuge dodano 1,5 ml 1% otopine BSA (eng. *Bovine Serum Albumin*) u PBS-u (odsad pa nadalje koristi se termin BSA otopina). Vijalica je inkubirana u mraku, na sobnoj temperaturi, 30 min. Ponovno slijedi dvostruka centrifuga (10 min na 4000 rpm, 4°C), gdje je nakon prve dodano 1,5 ml BSA otopine. Ovisno o veličini korteksa, nakon druge centrifuge dodane su različite količine BSA otopine

(300 µl za P6, 1 ml za P17, 1,5 ml za P30), s obzirom da dimenzije korteksa (pa time i broj stanica) različite postnatalne dobi znatno variraju.

3.2.2. Primarna protutijela

Kako bi se osigurala homogena frakcija, dobiveni homogenat je dobro promiješan, te je uzeto 100 µl alikvota i prebačeno u novu vijalicu. Nakon centrifuge (10 min, 4000 rpm), uklanjanja supernatanta i resuspenzije u 500µl citratnog pufera, potrebno je poboljšati izloženost antigena čiji epitopi mogu ostati skriveni kao posljedica dugoročne fiksacije tkiva. To je postignuto 15-minutnom inkubacijom na 60°C u termo bloku. Primarna protutijela su dodana nakon centrifuge (10 min na 4000 rpm), uklanjanja supernatanta i dodatka 250 µl BSA otopine. Korištena su različita protutijela u različitim koncentracijama i kombinacijama (Tablica 1.).

3.2.3. Sekundarna protutijela i Hoechst

Nakon dvostruke centrifuge (10 min na 4000 rpm), uklanjanja supernatanta i resuspenzije u 250 µl BSA, dodana su sekundarna protutijela: Goat anti-Mouse IgG H+L (Alexa Fluor Plus 488; kat. br. A32723, Thermo Fisher Scientific) u omjeru 1:500 te Goat anti-Rabbit IgG H+L (Alexa Fluor Plus 555; kat. br. A32732, Thermo Fisher Scientific) u omjeru 1:250. Inkubacija se odvijala u mraku, na sobnoj temperaturi, 1 h. Za bojanje jezgri korišteno je 500 µl 2 µg/ml Hoechst 33342 (Merck) u PBS-u, uz inkubaciju od 20 min, u mraku, na sobnoj temperaturi. Za ispiranje je nakon 3x centrifuge (10 min na 4000 rpm) korišteno 500 µl PBS nakon prve, 500 µl Milli-Q H₂O nakon druge centrifuge. Nakon treće centrifuge, za očuvanje fluorescencije korišteno je 10 µl Vectashield medija za uklapanje (Vector Laboratories, kat. br. H-1000) te je zajedno s jezgrama nakapano na očišćeno mikroskopsko stakalce (Thermo Fischer Scientific), pokriveno pokrovnim stakalcem te pričvišćeno s tankim slojem laka za nokte. Stakalca su nakon sušenja pohranjena na 4°C za vrijeme analize, a dugoročno na -20°C, zaštićena od svjetla.

3.3. Imunohistokemija (IHC)

Istraživanje je provedeno na modelima oposuma *Monodelphis domestica* postnatalnih starosti P6, P17 i P30 te na mišu (*Mus musculus*), starosti između P1-P2. Odstranjeni mozgovi životinja su fiksirani u otopini 4% PFA na 4°C u razdoblju 12-24 sata. Barem 3 sata prije rezanja mozgov, potrebno je ukloniti PFA te isprati 2x u PBS-u. Mозгови se zatim uranjaju u otopinu 30% saharoze/PBS, koja sprječava stvaranje kristala i razaranje tkiva nakon njegovog zamrzavanja.

3.3.1. Rezanje uzoraka u kriostatu

Mozak se uklapa u medij za zamrzavanje Killik (Bio Optica Milano s.p.a.) i zamrzava na -80°C. Uklopljeni mozak se prenosi u kriostat na specijalizirane metalne nosače na -30°C. Tkivo je rezano frontalno (koronalno) na kriške debljine 16 µm te prikupljeno na SuperFrost™ mikroskopska predmetna stakalca, specifično dizajnirana za što bolje prijanjanje uzoraka tkiva (Thermo Fischer Scientific). Stakalca s uzorcima su ostavljena na sušenje 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su pohranjena na -20°C.

3.3.2. Imunofluorescencija (IF)

Stakalca su uzeta sa -20°C te ostavljena nekoliko minuta na sobnoj temperaturi kako bi se mogla okružiti s hidrofobnom olovkom (Vector Laboratories, Inc). Zatim slijedi ispiranje stakalaca 2x po 5 min s 0,1% Tween 20 (Applicationhem) u 1xPBS (PBS-T), nakon čega su stavljena na termo blok (15 min na 60°C) te nakapavana s 10 mM natrijevim citratom, 0,05% Tween 20 (pH 6,0) radi bolje demonstracije antigena. Blokiranje je provedeno na sobnoj temperaturi, trajanja 1 h te je korištena otopina napravljena od 3% normalnog kozjeg seruma (eng. *Normal Goat Serum*, NGS; PAN Biotech), 3% BSA, 0,3% TritonX-100 i 10xPBS. Korištena su razna primarna protutijela (Tablica 1.) koja su najprije razrijeđena u otopini za protutijela napravljenoj od 1% NGS, 1% BSA, 0,1% Tween 20 i 10xPBS.

Pripremljena primarna protutijela u količini od 100 µl su nakapana na stakalca te ostavljena na inkubaciju u vlažnoj komori na 4°C preko noći.

Sljedeći dan, stakalca su isprana 3x po 5 min s 1xPBS-T. Sekundarna protutijela (korištena ista kao za IFR) su razrijeđena na isti način kao primarna protutijela, no u omjeru 1:500, uz dodan uz dodan 4' ,6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) za bojanje jezgara. Inkubacija je izvedena u vlažnoj komori, 2 h na sobnoj temperaturi. Stakalca su isprana 2x po 5 min s 1xPBS-T te 1x u H₂O. Nakon sušenja stakalca, dodano je 2 kapi medija a pričvršćivanje (Vectashield, Vector Laboratories), stavljeno je pokrovno stakalce te premazano s tankim slojem laka za nokte. Stakalca se pohranjuju na 4°C za vrijeme analize, a dugoročno na -20°C, zaštićena od svjetla.

Tablica 1. Primarna protutijela korištena u istraživanju

Protutijelo	Domaćin i (izo)tip	Razrijeđenje	Imunogen	Kataloški broj	IFC/IHC
Anti - SOX2 [9-9-3]	Miš monoklonalno IgG1	IF 1:625 IHC 1:500	Sintetički peptid konjugiran na KLH izveden iz ostataka 300 do C-kraja humanog SOX2	Abcam ab79351	IFC, IHC
Anti - SOX9 [EPR14335-78]	Zec monoklonalno IgG	IF 1:500 IHC 1:500	Rekombinantni fragment unutar humane SOX9 aa 150-300 (unutarnja sekvenca)	Abcam ab185966	IFC, IHC
Anti - Ki67	Zec poliklonalno IgG	IF 1:50 IF 1:100 IF 1:250 IF 1:500 IHC 1:100	Sintetički peptid konjugiran na KLH izveden iz ostataka 1200-1300 od humanog Ki67	Abcam ab15580	IFC, IHC
Anti - Ki67	Miš monoklonalno IgM	IF 1:500	Nuklearna priprema HeLa stanica. Clone PP-67, ascites tekućina	Sigma-Aldrich P6834	IFC
Anti - NeuN [EPR12763]	Zec monoklonalno	IF 1:500 IHC 1:500	Sintetski peptid unutar humane NeuN aa 1-100 (cisteinski ostatak)	Abcam ab177487	IFC, IHC
Anti - NeuN	Miš monoklonalno IgG1	IHC 1:50	Pročišćene stanične jezgre iz mišjeg mozga. Clone A60	Milipore MAB377	IHC
Anti - GFAP	Miš monoklonalno IgG1	IHC 1:400	GFAP od leđne moždine svinje. Clone G-A-5, ascites tekućina	Sigma-Aldrich G3893	IHC
Anti - MBP (F-6)	Miš monoklonalno	IHC 1:50	Specifičan za mapiranje epitopa između	Santa Cruz sc-271524	IHC

			aminokiselina 196-237 unutar internog područja MBP ljudskog porijekla.		
Anti - Iba1	Zec poliklonalno IgG	IHC 1:200	Sintetski peptid iz C terminalnih aminokiselina humanog Iba1	Abcam ab108539	IHC

3.4. Fluorescentna mikroskopija

Mikroskopska stakalca s uzorcima koji su bili potvrđeni tehnikama IFR i IHC analizirana su pomoću fluorescentne mikroskopije. Evaluacija imunooznačenih uzoraka izvršena je koristeći invertirni fluorescentni mikroskop Olympus IX83 (Olympus, Japan) opremljen Xenon lampom, Hamamatsu Orca R2 CCD kamerom (Hamamatsu, Japan), DIC i fluorescentnom optikom te softverom Cell Sense (Olympus, Japan). Korišteni su objektivi 20x 0.5 numeričke aperture (NA), također i 40x 1.3 NA te 100x 1.3 NA objektivi uronjeni u imerzijsko ulje (IMMOIL-8CC, $n_e=1.518$, Olympus). Korišteni set filtera prikazan je u tablici 2. Za svaku sliku prikupljena je kolekcija od 10-ak slika (eng. Z stacks) s razmakom od 1 μm između optičkih sekcija. Za obradu slika korišten je Cell Sense i ImageJ softver (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.).

Tablica 2. Set filter kocki korištenih u fluorescentnoj mikroskopiji.

	Unit Name	Excitation filter	Emission filter	Dichromatic mirror
Ultraviolet Excitations	U-FUNA	360-370	420-460	410
Blue Excitations	U-FBW	460-495	510IF	505
Green Excitations	U-FGW	530-550	575IF	570
Far-Red Excitations	Cy5	620/60	700/75	660

4. REZULTATI

4.1. Validacija markera prereza korteksa oposuma pomoću IHC

Imuno-obojeni prerezi korteksa oposuma *Monodelphis domestica* pomažu u izučavanju diferencijacije i lokalizacije stanica u mozgu kroz različite razvojne faze. Prednost IHC metode je što se obilježavaju i analiziraju stanice netretiranog, „wild-type“ tkiva te se time može ispitati morfologija i lokalizacija stanica vrlo slična ili gotovo identična realnoj („*in vivo*“). Međutim, postoje mnoga protutijela čija validacija nije provedena u slučaju ove vrste. Odlučili smo se usredotočiti na validaciju protutijela usmjerena na marker multipotentnih neuralnih matičnih stanica (SOX2), astrocita (SOX9 i GFAP), neurona (NeuN), oligodendrocita (MBP), mikroglija (Iba1) te markera stanične proliferacije (Ki67). Validacija je provedena na oposumima različite postnatalne dobi (P6, P17 i P30) te naposljetku na neonatalnom mišu (P1-P2), kako bi se uočila razlika u ekspresiji markera s obzirom na starost, ali i vrstu.

4.1.1. SOX2 i SOX9

SOX2 i SOX9 su transkripcijski faktori koji pripadaju skupini proteina SOX te imaju vrlo važnu ulogu u razvoju mozga (32). SOX2 je eksprimiran u samoobnavljajućim progenitorskim stanicama, dok je SOX9 povezan s inicijacijom gliogeneze, te se u kasnijim razvojnim fazama koristi kao specifičan marker diferenciranih astrocita. Budući da su SOX2 i SOX9 markeri koji mogu upućivati na različiti stupanj diferencijacije stanica, odlučili smo valjanost njihovih protutijela testirati zajedno, s obzirom da smo imali na raspolaganju protutijela koja su se mogla kombinirati u istom eksperimentu (SOX2 je mišje, a SOX9 zečje protutijelo).

Imunooznačavanje s anti-SOX2 i anti-SOX9 protutijelima najprije je provedeno na frontalno narezanom tkivu mozga oposuma P6. Prije odabira protutijela, provedena je analiza podudarnosti s oposumima, s obzirom da je vrlo malo komercijalno dostupnih protutijela testirano na oposumima. Budući da je za proizvodnju i imunizaciju odabranih anti-SOX2 i anti-SOX9 protutijela korištena humana sekvenca, u programu Clustal Omega,

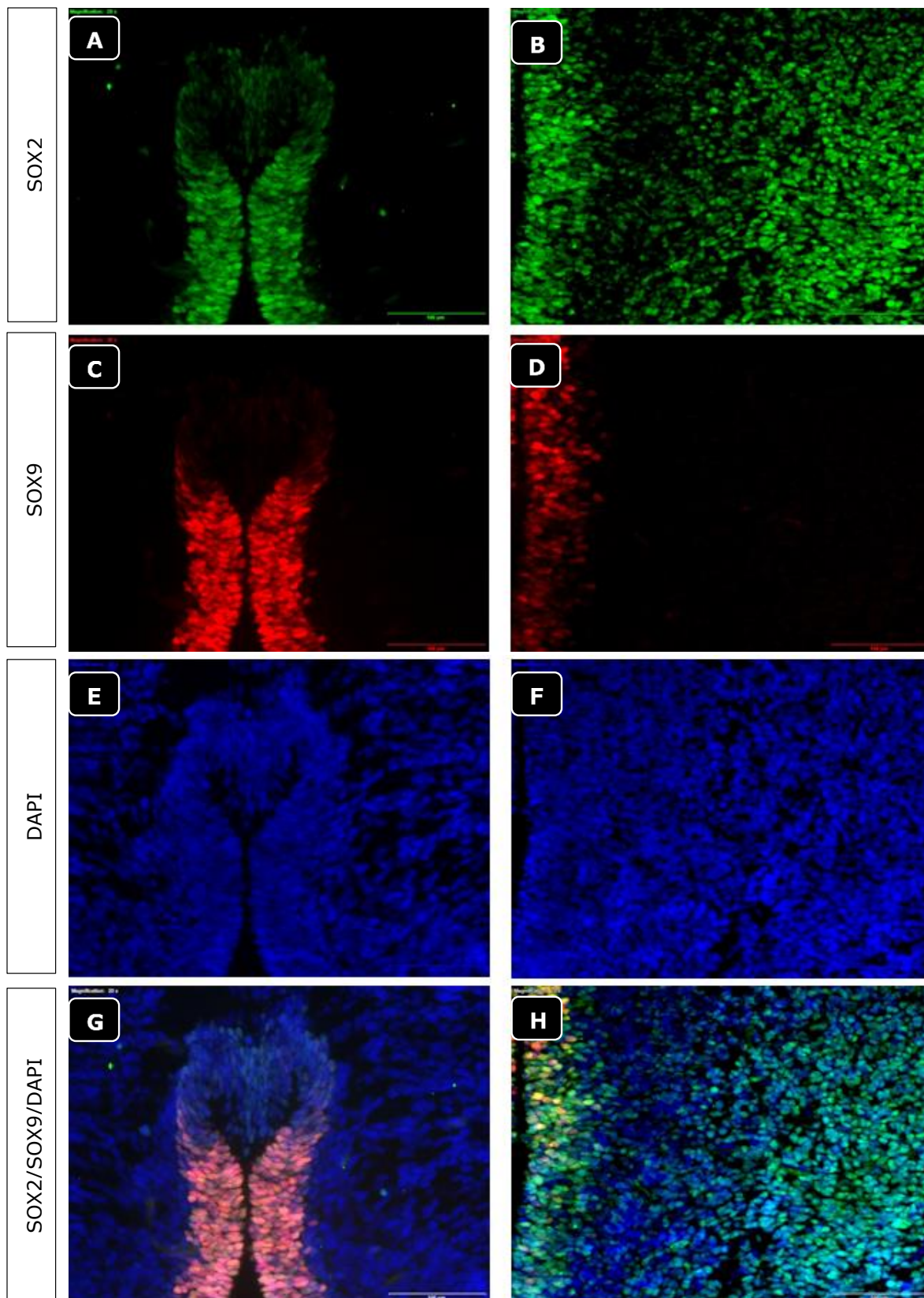
A

B

17

Slika 3. Usporedba SOX2 i SOX9 proteinskih sekvenci čovjeka i oposuma. Analiza je provedena u programu Clustal Omega za proteine SOX2 (**A**) i SOX9 (**B**). Zvezdice (*) označavaju identične aminokiseline, dvotočke (:) označavaju vrlo slične aminokiseline, točke (.) slične aminokiseline, dok prazna mjesta označavaju dvije vrlo različite aminokiseline.

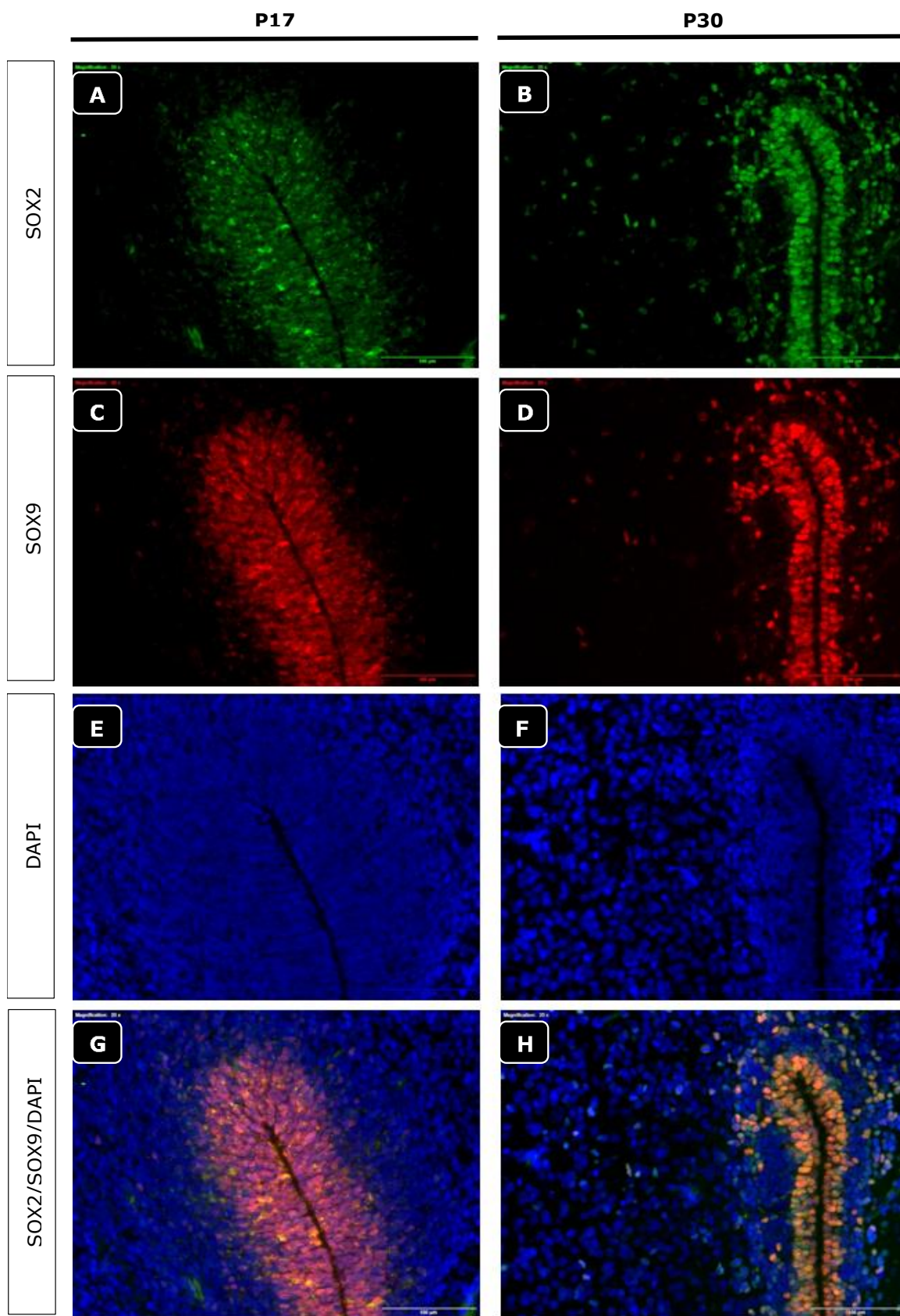
Imunobojanja su pokazala da oba protutijela lokaliziraju u jezgri te se time s velikom vjerojatnošću može potvrditi funkcionalnost testiranih protutijela. Najveća koncentracija SOX2 i SOX9 pozitivnih stanica nalazila se u području ventrikula, gdje su stanice uglavnom bile dvostruko pozitivne (Slika 2. A, C, E, G). Količina SOX9+ stanica izvan područja ventrikula bila je zanemarivo mala. Međutim, to nije bio slučaj sa SOX2+ stanicama. Za razliku od SOX9+ stanica, SOX2+ stanice su u velikom broju bile rasprostranjene po čitavom korteksu (Slika 4. B, D, F, H).



Slika 4. Validacija anti-SOX2 i anti-SOX9 primarnih protutijela na stanicama korteksa oposuma P6. Poprečni prerezi korteksa oposuma P6 su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je za bojanje jezgri

korišten DAPI (plavo). **A, C, E, G** Stanice u području ventrikula. **B, D, F, H** Stanice u unutrašnjosti korteksa. Povećanje 20x, mjerilo 100 µm.

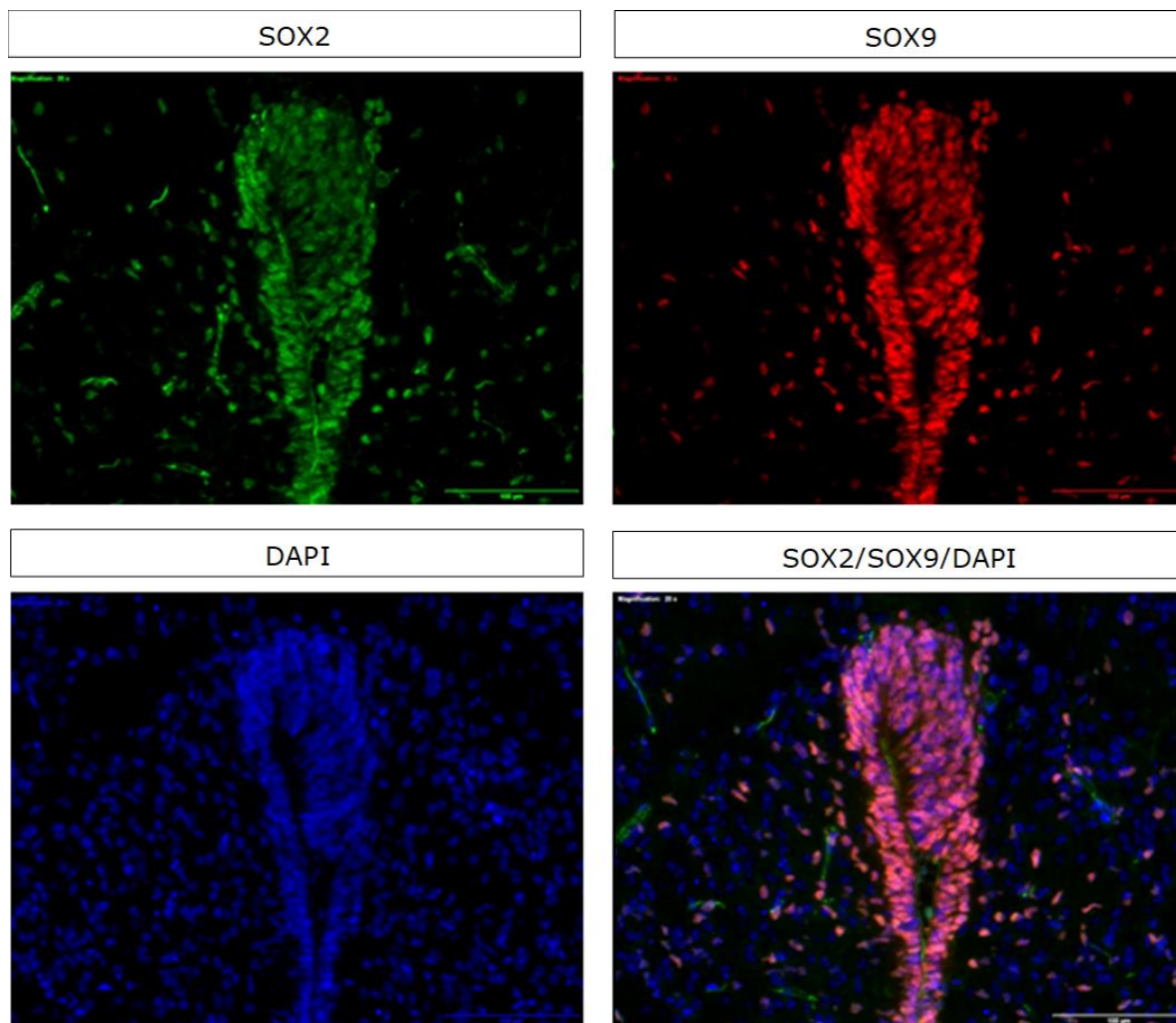
Isti postupak je ponovljen i u slučaju oposuma P17 i P30. Ponovno je najveća koncentracija SOX2+ i SOX9+ stanica lokalizirana u području ventrikula. Uspoređujući kortekse P17 i P30, vidljivo je kako se kod korteksa P30 smanjuje broj slojeva SOX2+ i SOX9+ stanica oko ventrikula u odnosu na P17 (Slika 5). Također, s povećanjem starosti smanjuje se broj SOX2+ stanica u ostatku korteksa, dok se broj SOX9+ stanica blago povećava.



Slika 5. Validacija anti-SOX2 i anti-SOX9 primarnih protutijela na stanicama korteksa oposuma P17 i P30. Poprečni prerezi korteksa oposuma P17 i P30 su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je

za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A, C, E, G** Stanice oposuma P17 u području ventrikula. **B, D, F, H** Stanice oposuma P30 u području ventrikula. Povećanje 20x, mjerilo 100 µm.

Za usporedbu ekspresije SOX2 i SOX9 između vrsta, korišten je mozak miša starosti P1-P2. Mišji mozak P1-P2 je približno jednake veličine kao mozak oposuma P17. Međutim, još nije dovoljno istraženo koja postnatalna dob oposuma odgovara mišjoj, koja je vrlo dobro proučena. Postupak imunooznačavanja je jednak kao i u slučaju oposuma, jer su ista protutijela kompatibilna s miševima. Analizom korteksa vidljivo je kako je isto tako najveća koncentracija SOX2+ i SOX9+ stanica u području ventrikula (Slika 6). U usporedbi s oposumom P17, mišji ventrikuli imaju manje slojeva SOX2+ i SOX9+ stanica. U ostatku korteksa još uvijek ima znatan broj SOX2+ stanica te nešto manji broj SOX9+ stanica što je u korelaciji s oposumom P17.

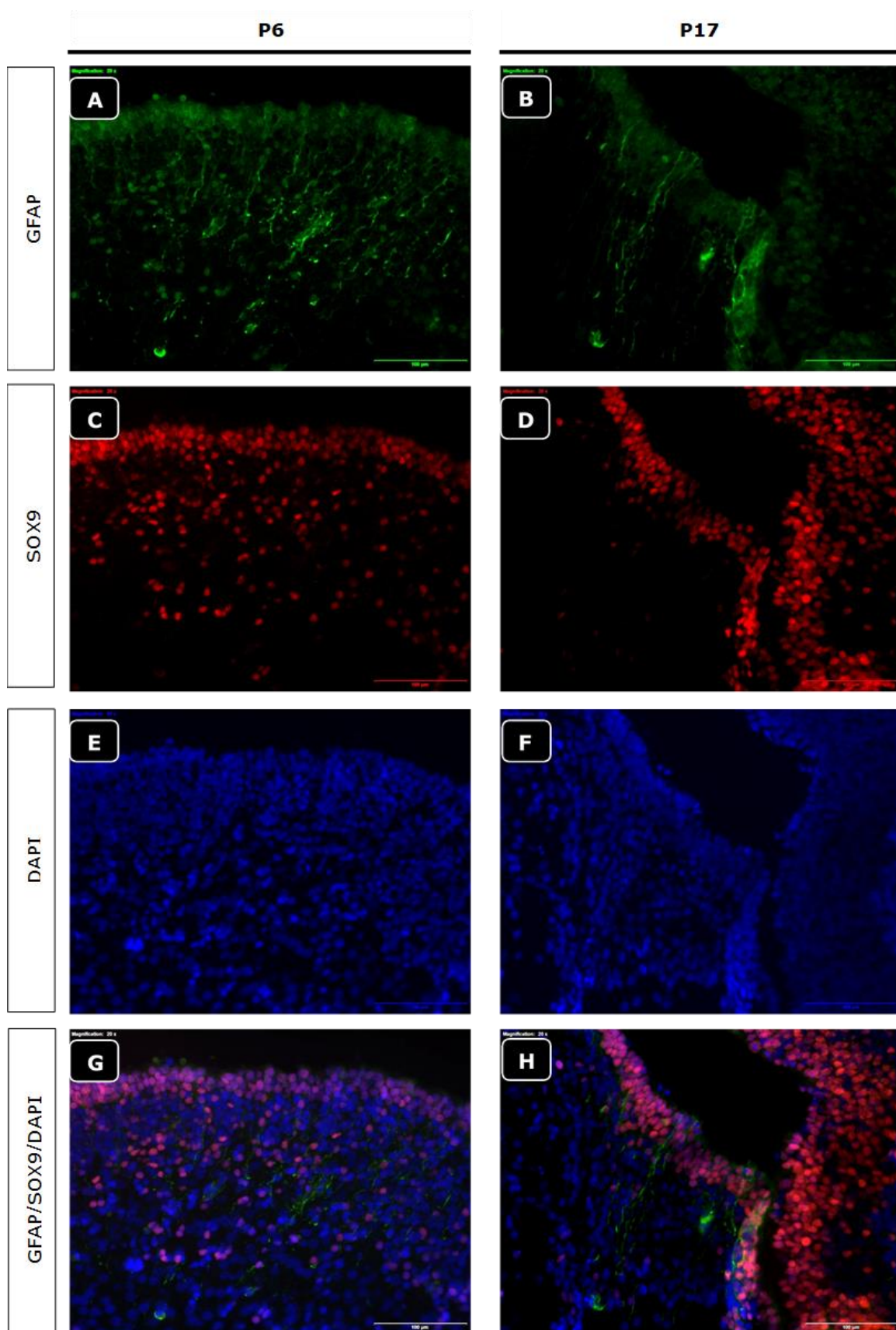


Slika 6. Imunooznačavanje mišjeg korteksa P1-P2 s anti-SOX2 i anti-SOX9 primarnim protutijelima. Poprečni prerezi korteksa miša P1-P2 su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). Na slikama se vide imunooznačene stanice u području ventrikula. Povećanje 20x, mjerilo 100 μ m.

4.1.2. GFAP

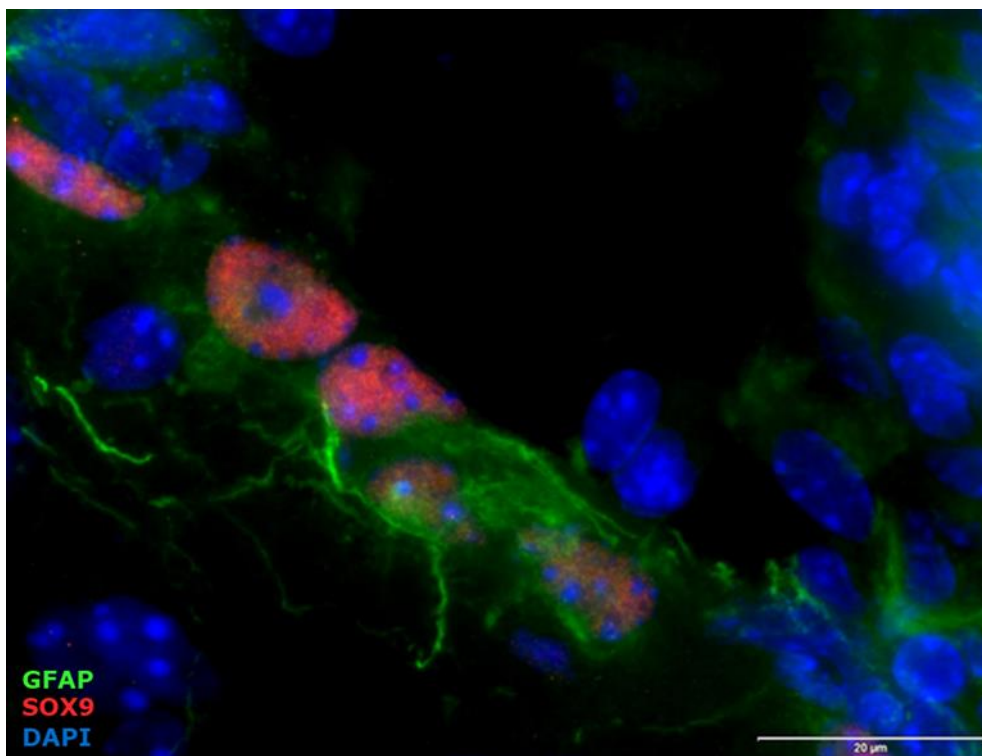
Za raspoznavanje astrocita od ostalih glija stanica, odlučili smo testirati i validirati primarna protutijela usmjerena na GFAP. Ovaj specifični marker lokaliziran je u citoplazmi jer se veže na intermedijarne filamente astrocita. Budući da smo već ustanovili valjanost anti-SOX9 protutijela, uključili smo ih u testiranje anti-GFAP protutijela kao dodatnu potvrdu identifikacije astrocita.

GFAP je bio jedva uočljiv na imunooznačenim prerezima korteksa oposuma P6 i P17 (Slika 7). Gotovo da i nema razlike u količini GFAP-a između te dvije dobi. GFAP je vidljiv jedino u području ventrikula. No, zanimljivo je kako se javlja samo s jedne strane ventrikula te se pruža prema spoju lijeve i desne strane korteksa. Jednaki rezultati su se pojavili i u slučaju miša P1-P2 (Slika 8).



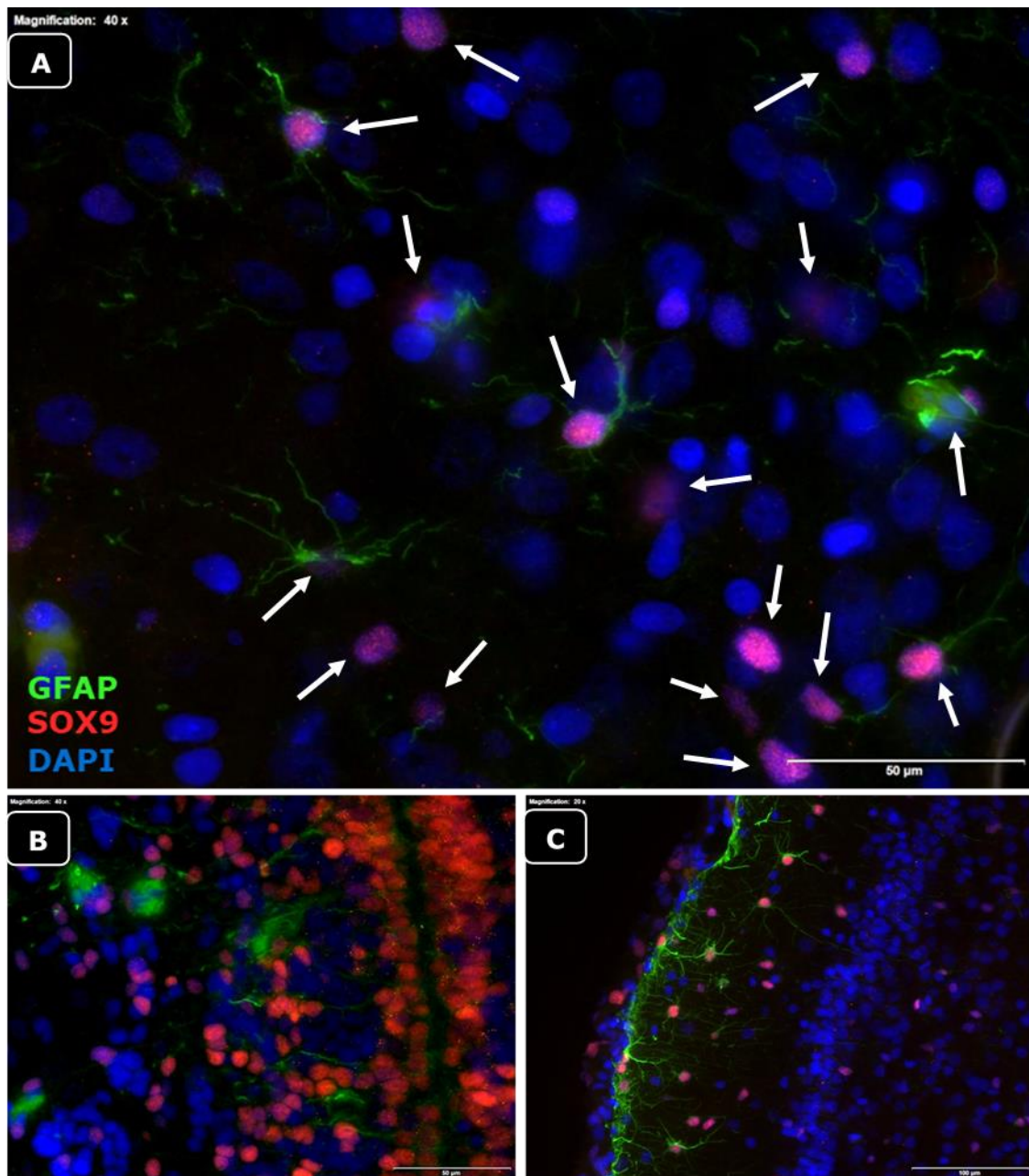
Slika 7. Validacija anti-GFAP primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P6 i P17. Poprečni prerezi korteksa oposuma P6 i P17 su imunooznačeni

kombinacijom protutijela anti-GFAP (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A, C, E, G** Stanice oposuma P6 u području ventrikula. **B, D, F, H** Stanice oposuma P17 u području ventrikula. Povećanje 20x, mjerilo 100 μm .



Slika 8. Imunooznačavanje mišjeg korteksa P1-P2 s anti-GFAP i anti-SOX9 primarnim protutijelima. Poprečni prerezi korteksa miša P1-P2 su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-GFAP (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). Na slikama se vide imunooznačene stanice u području ventrikula. Povećanje 100x, mjerilo 20 μm .

Korteks oposuma P30 se bitno razlikovao u količini GFAP-a u odnosu na P6, P17 i mišji korteks. Ovdje je GFAP bio naširoko rasprostranjen te vrlo izražajan (Slika 9). Osim u području ventrikula, bio je prisutan posvuda po unutrašnjosti te prema površini korteksa. Primjećene su razgranate stanice karakteristične za astrocite, što sugerira početak glio-/astrogeneze u oposumima P30.



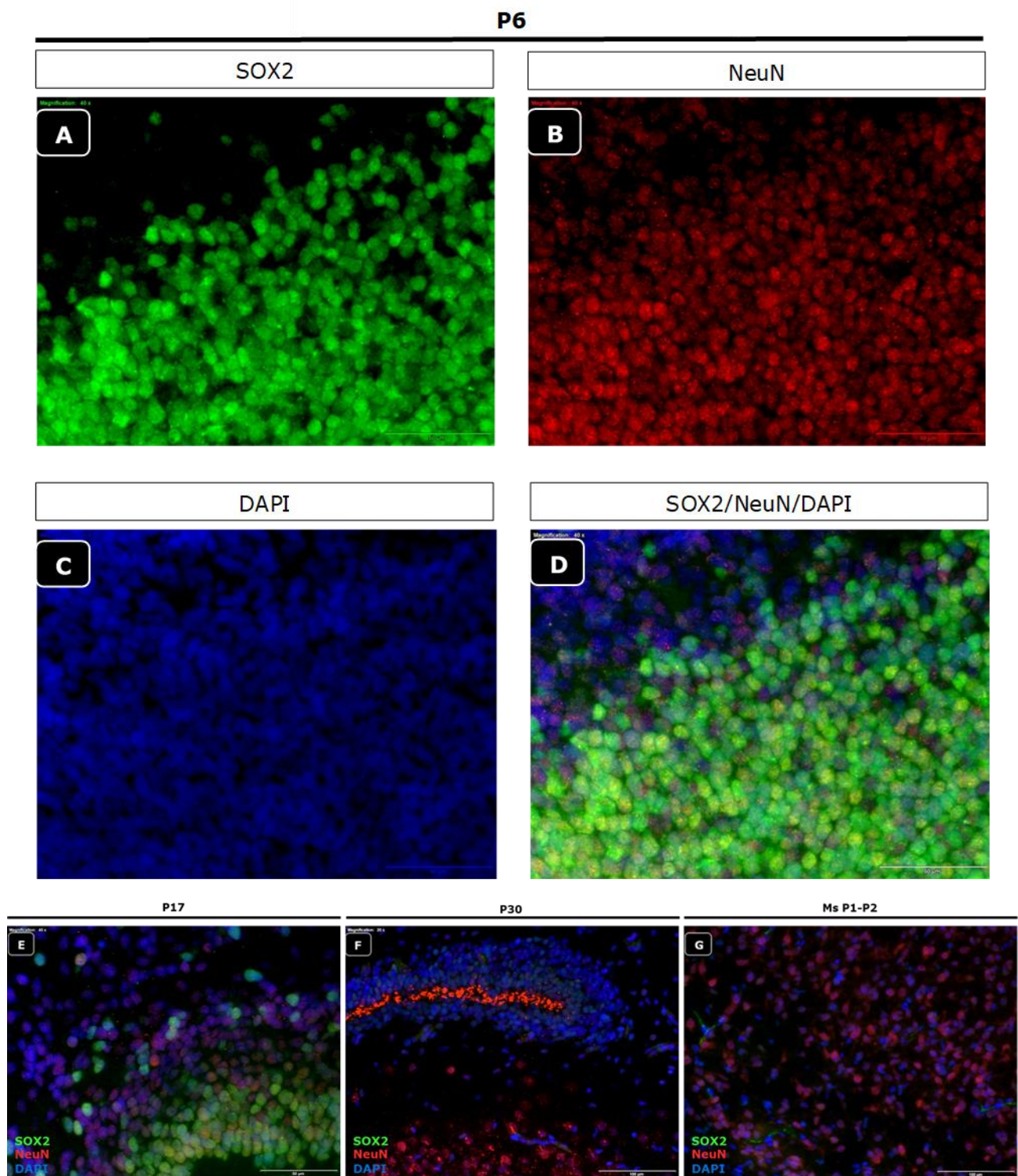
Slika 9. Validacija anti-GFAP primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P30. Poprečni prerezi korteksa oposuma P30 su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-GFAP (zeleno) i anti-SOX9 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A** Stanice u unutrašnjosti korteksa. Bijele strijelice označavaju astrocite (GFAP+/SOX9+). **B** Stanice u području ventrikula. **C** Stanice na (vanjskoj) površini korteksa. Povećanje: 40x (**A**, **B**), 20x (**C**); mjerilo: 50 µm (**A**, **B**), 100 µm (**C**).

4.1.3. *NeuN*

NeuN je protein specifičan za neurone. Nalazi se u jezgri i perinuklearnoj citoplazmi većine neurona središnjeg živčanog sustava. Već duži niz godina se koristi kao marker zrelih neurona (33). Testirali smo ga u kombinaciji s već validiranim anti-SOX2 primarnim protutijelom, te se očekuje da će SOX2+ stanice biti matične/progenitorske stanice, a NeuN+ postmitotički diferencirani neuroni.

Rezultati validacije anti-NeuN primarnih protutijela pokazali su se pozitivni te je velika većina stanica bila NeuN+, što je u skladu s činjenicom da neurogeneza prethodi gliogenezu. Međutim, obojenje se nije pokazalo toliko intenzivno kao kod SOX9. Kod oposuma P6, najveća koncentracija NeuN+ stanica nalazi se u području ventrikula. Većina stanica tog područja pozitivna je i na SOX2 (Slika 10. A, B, C, D). Ovo je prilično iznenađujući rezultat jer se u većini literature navodi da prestanak ekspresije (eng. downregulation) SOX2 u diferenciranim neuronima. U unutrašnjosti korteksa također se mogu pronaći NeuN+ stanice.

Kod starijih oposuma (P17 i P30) povećava se broj NeuN+ stanica u unutrašnjosti, dok se njihov broj u području ventrikula smanjuje (Slika 10. E, F), što sugerira da je neurogeneza u poodmakloj fazi. Primijećene je i nespecifičan točkasti signal u slučaju oposuma P30, a posebno unutar ventrikula, koji je otežao analizu uzorka. Mišji korteks P1-P2 imao je veći omjer NeuN+ stanica u unutrašnjosti u odnosu na ventrikule te se pokazao sličniji korteksu oposuma P30 nego P17 (Slika 10. G).



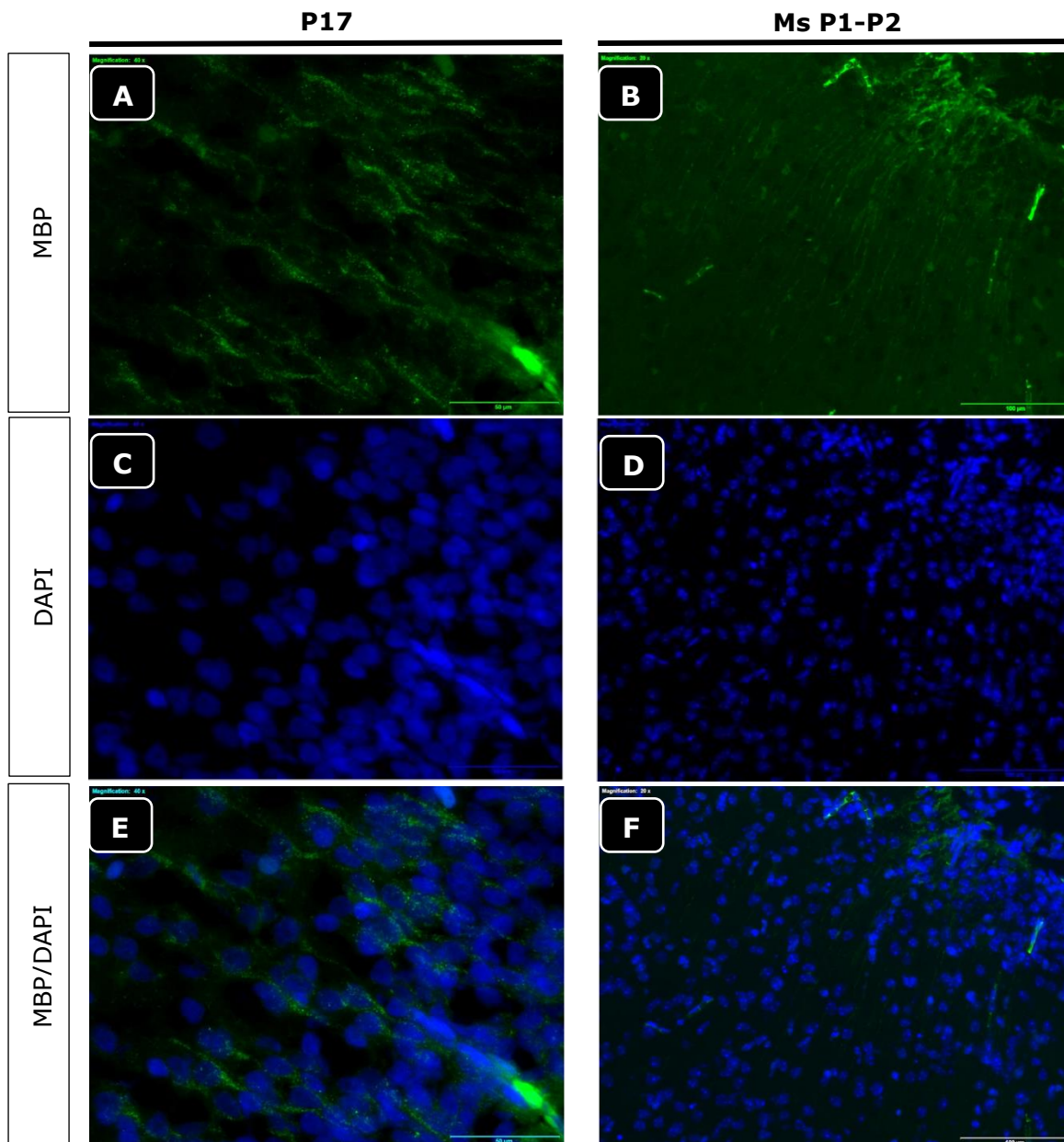
Slika 10. Validacija anti-NeuN primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P6, P17 i P30 te mišjeg korteksa P1-P2. Poprečni prerezi korteksa su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-NeuN (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A-D** Stanice korteksa oposuma P6 u području ventrikula. **E** Stanice korteksa oposuma P17 u području ventrikula. **F** Stanice korteksa oposuma P30 u području ventrikula. **G** Stanice mišjeg korteksa P1-P2 u unutrašnjosti

korteksa. Povećanje: 40x (**A-E**), 20x (**F, G**); mjerilo: 50 μm (**A-E**), 100 μm (**F, G**).
*Ms=mouse.

4.1.4. *MBP*

MBP je protein koji čini glavnu stukturnu komponentu mijelina. Specifičan je marker s obzirom da ga u središnjem živčanom sustavu eksprimiraju isključivo oligodendrociti. Osim što je sastavni dio mijelinskog omotača, može se pronaći na citoplazmatskoj površini plazmatske membrane oligodendrocita (34).

Validacija anti-MBP protutijela nije dala zadovoljavajuće rezultate. Signal je bio jako slab te je u slučaju oposuma P6 i P30 gotovo neprimjetan. Oposum P17 dao je najbolje rezultate te je prikazan s mišem P1-P2 (Slika 11). Rezultati oposuma P17 i miša P1-P2 izgledaju vrlo slično. Kod njih je signal manifestiran zrnato i razgranato, uglavnom na rubnim dijelovima korteksa.

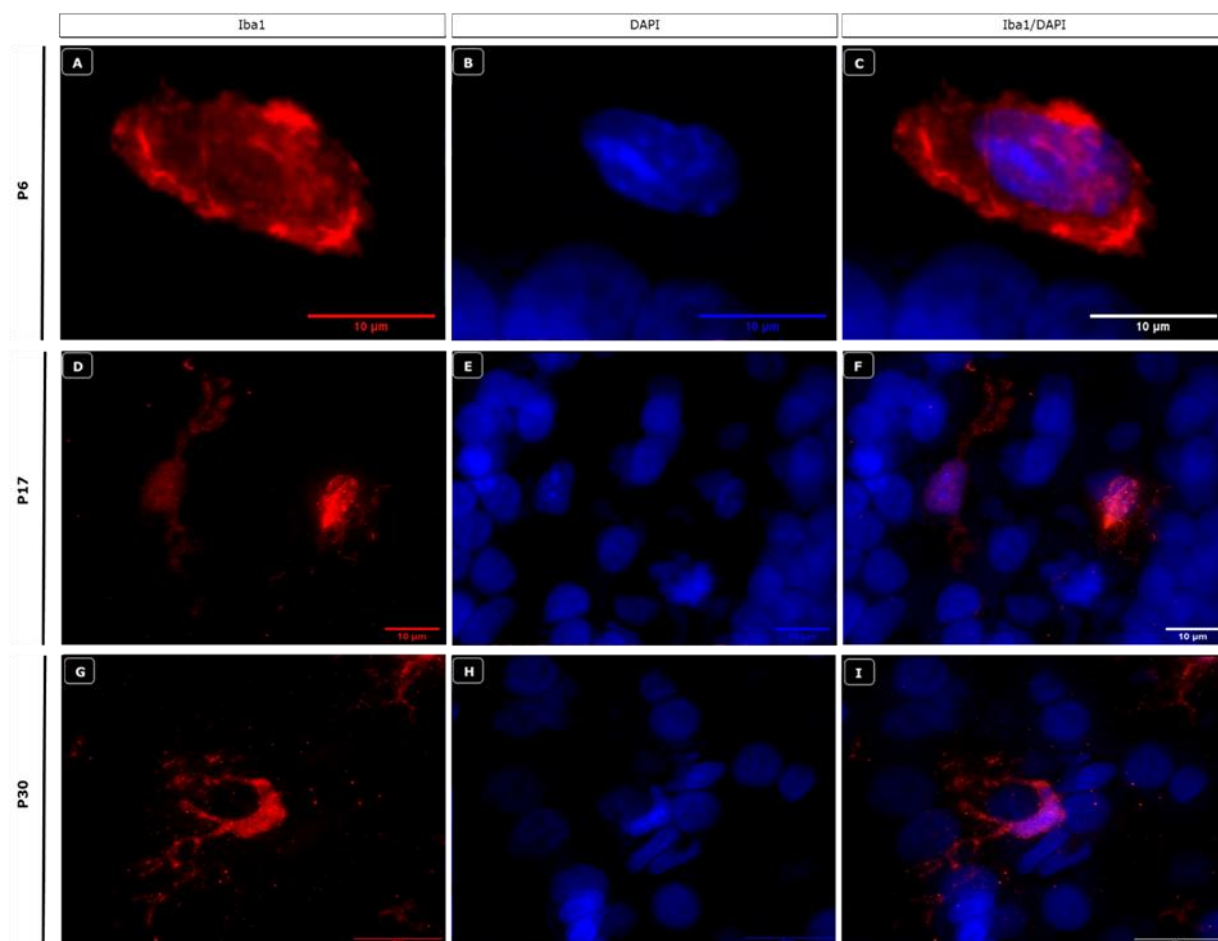


Slika 11. Validacija anti-MBP primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P17 te mišjeg korteksa P1-P2. Poprečni prerezi korteksa su imunooznačeni primarnim protutijelom anti-MBP (zeleno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A, C, E** Stanice korteksa oposuma P17 na rubnim dijelovima korteksa. **B, D, F** Stanice korteksa miša P1-P2 na rubnim dijelovima korteksa. Povećanje: 40x (**A, C, E**), 20x (**B, D, F**); mjerilo: 50 µm (**A, C, E**), 100 µm (**B, D, F**). *Ms=mouse

4.1.5. *Iba1*

Kao marker za mikrogliju, odlučili smo ispitati *Iba1*. *Iba1* je protein koje se specifično eksprimira u svim mikroglijama, bile one u stanju mirovanja ili aktivirane. Lokalizacija mu je u citoplazmi (35).

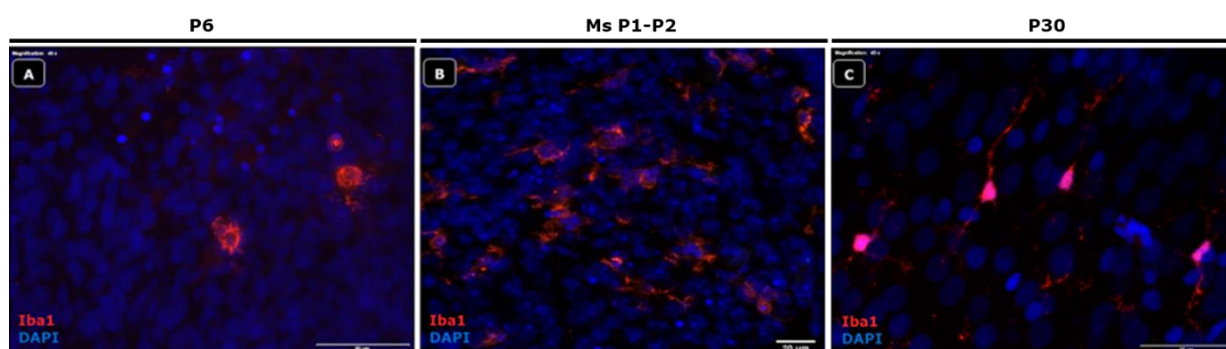
Imunooznačavanje s anti-Iba1 primarnim protutijelima se pokazalo veoma uspješno. U svim dobima oposuma, kao i mišu, ovo protutijelo je specifično označilo mikroglije te je jasno vidljiv njihov oblik. Kod oposuma P6 mogla se uočiti nekolicina mikroglija stanica koje su se vrlo lako mogle pobrojati. Stanice su bile okruglog ili ameboidnog oblika, bez izdanaka ili s malobrojnim kratkim izdancima (Slika 12. A-C). Mikroglije su bile brojnije u slučaju oposuma P17. Stanice su uglavnom izgledale grmoliko, s kratkim, razgranatim izdancima (Slika 12. D-F). Korteks oposuma P30 imao je mikroglija stanica u izobilju te su bile ravnomjerno raspoređene po čitavom korteksu. Pomoću Iba1 možemo vidjeti kako mikroglije mogu mijenjati oblik pri obavljanju svoje funkcije (Slika 12. G-I). Osim grmolikih stanica, kod oposuma P30, javljaju se i stanice s izduženim izdancima.



Slika 12. Validacija anti-Iba1 primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P6, P17 i P30. Poprečni prerezi korteksa su imunooznačeni primarnim protutijelom anti-Iba1 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A, B, C** Stanice korteksa oposuma P6. **D, E, F** Stanice korteksa oposuma P17. **G, H, I** Stanice

korteksa oposuma P30. Povećanje: 100x (slike **A-F** izrezane) mjerilo: 10 μm (**A-F**), 20 μm (**G-I**).

Uspoređujući mikroglia stanice miša P1-P2 s onima u oposuma, možemo reći kako je najviše sličnosti s oposumom P17. Mikroglia stanice miša nisu toliko brojne kao kod oposuma P30 te je njihov broj sličniji oposumu P17. Što se tiče morfologije samih stanica, također je najviše sličnosti s oposumom P17. Stanice imaju kratke, deblje izdanke te se nisu mogle vidjeti stanice s izduženim, tankim izdancima i jasno vidljivom somom stanice, kao što je slučaj kod oposuma P30 (Slika 13).



Slika 13. Usporedba mikroglia stanica korteksa miša P1-P2 s onima oposuma P6 i P30. Poprečni prerezi korteksa su imunooznačeni primarnim protutijelom anti-Iba1 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI (plavo). **A** Stanice korteksa oposuma P6. **B** Stanice korteksa miša P1-P2. **C** Stanice korteksa oposuma P30. Povećanje: 40x (**A-C**); 20x (**B**, slika je izrezana) mjerilo: 50 μm (**A**, **C**), 20 μm (**B**). *Ms=mouse.

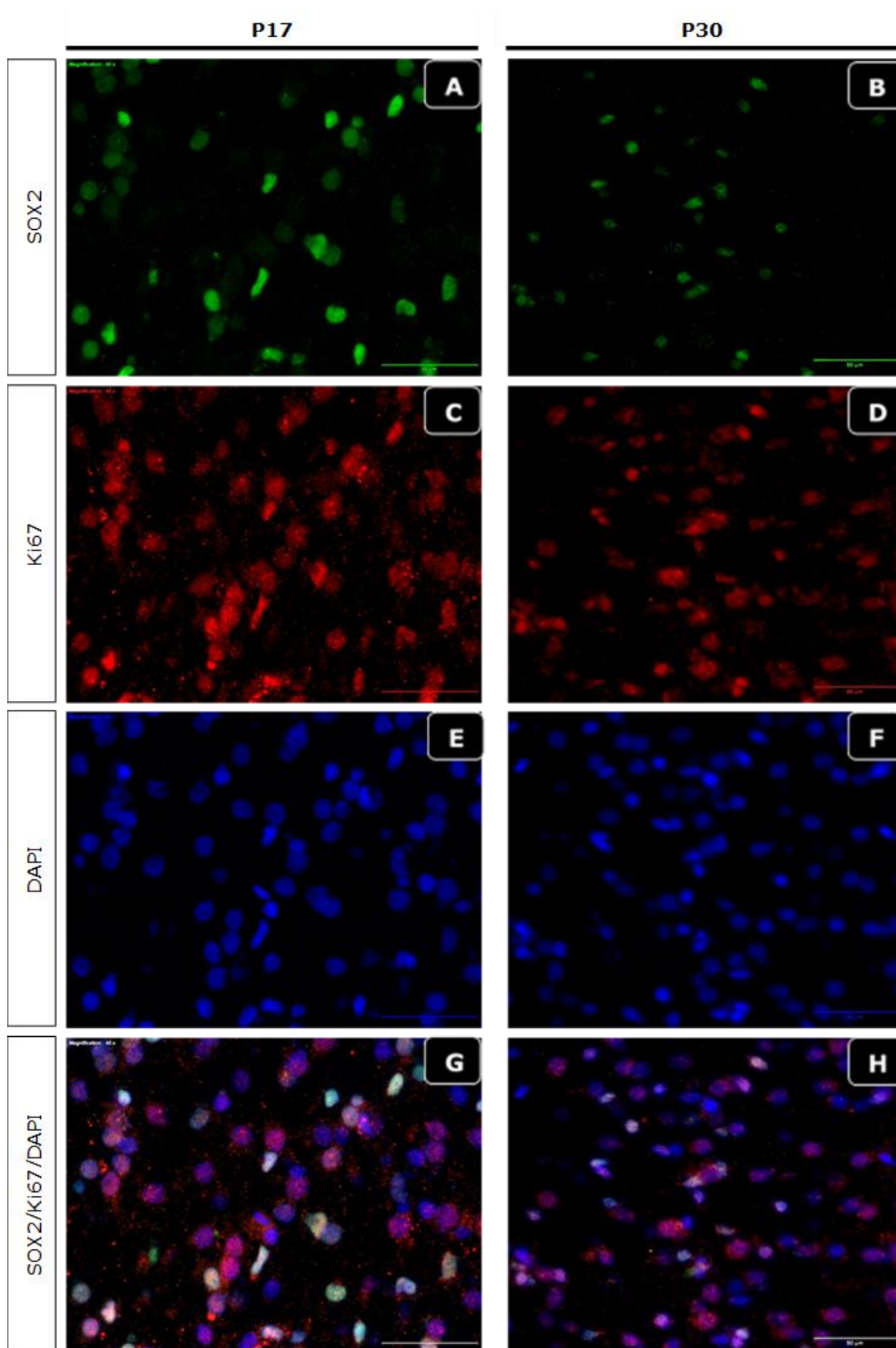
4.1.6. *Ki67*

Ki67 je protein koji eksprimiraju proliferirajuće stanice. Prisutan je tijekom svih faza staničnog ciklusa, osim faze mirovanja (G0). Zbog toga se upotrebljava kao marker proliferirajućih stanica, kako onih zdravih, tako i tumorskih. Iako se generalno naziva nuklearnim markerom, zbog svoje funkcije vezanja za DNA (eng. *deoxyribonucleic acid*), njegova lokalizacija uvelike ovisi o fazi staničnog ciklusa (36).

Validacija primarnog protutijela anti-Ki67 nije dala dovoljno jasne rezultate. IHC korteksa oposuma P6 rezultirala je izuzetno gusto distribuiranom signalu u cijelom prerezu korteksa. Granularni uzorak bojenja ovog

protutijela, kao i jaka autofluorescencija nekih nečistoća rezultirali su tome da se nisu mogle dobiti dovoljno dobre slike te je naizgled svaka stanica djelovala Ki67+.

Iz tog razloga su prikazani samo rezultati oposuma P17 i P30 s kojima je bilo više uspjeha (Slika 14). Protutijelo anti-Ki67 je ispitano u kombinaciji s anti-SOX2. Za razliku od anti-SOX2 protutijela, gdje se vrlo lako mogu izdvojiti SOX2+ stanice, kod Ki67+ stanica to nije slučaj. Anti-Ki67 protutijelo se čini manje specifično, na način da je gotovo svaka stanica obojana kao pozitivna, u većoj ili manjoj mjeri. Ispitano je nekoliko koraka u IHC čime se pokušao dobiti čistiji signal (npr. korišteno je svježije narezano tkivo kako bi se izbjegla dugotrajna fiksacija za koju se zna da doprinosi višem aspecifičnom signalu; nadalje, pripremljene su sve nove otopine za IHC, a isto tako testirane su različite koncentracije protutijela). Zbog nezadovoljavajućih rezultata, ovo protutijelo nismo ispitali na mišu.



Slika 14. Validacija anti-Ki67 primarnog protutijela na stanicama korteksa oposuma P17 i P30. Poprečni prerezi korteksa su imunooznačeni kombinacijom protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-Ki67 (crveno), dok je za bojanje jezgri korišten DAPI

(plavo). **A, C, E, G** Stanice korteksa oposuma P17. **B, D, F, H** Stanice korteksa oposuma P30. Povećanje: 40x (**A, C, E, G**), 20x (**B, D, F, H** slike su izrezane); mjerilo: 50 µm.

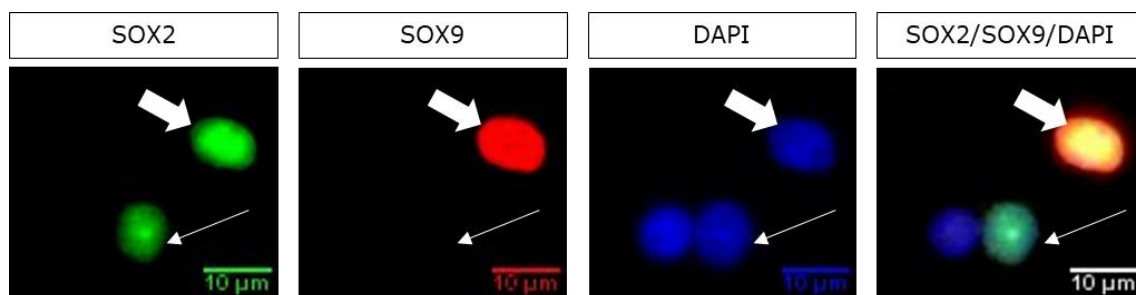
4.2. Validacija markera i analiza broja stanica korteksa oposuma IFR je kvantitativna metoda pomoću koje se, u odnosu na IHC, na jednostavniji i brži način mogu izbrojati fluorescentno obilježene stanice živčanog tkiva. Ključna razlika je da se u IHC radi prerez tkiva, dok se u IFR metodi homogenizira cijeli korteks te dobije homogena otopina staničnih jezgara. Pomoću IFR metode, koristeći protutijela za nuklearne antigene, pokušali smo odrediti broj i vrstu stanica koje se nalaze u ranom postnatalnom razdoblju oposuma.

4.2.1. P30

Za provedbu ovog istraživanja korišteni su korteksi triju jedinki oposuma iz različitih legla (jedinka 1 iz legla 1, jedinka 2 i 3 iz legla 2). U slučaju jedinke 1 uzeta su 4 alikvota homogenata korteksa te su testirana na prisutnost nuklearnih markera SOX2 i SOX9, što je vidljivo iz Tablice 2. Stanice su analizirane i poslikane s invertiranim fluorescentnim mikroskopom (Olympus IX83 opremljen Hamamatsu Orca R2 CCD kamerom i fluorescencijom) te prebrojane pomoću ImageJ programa (Slika 15).

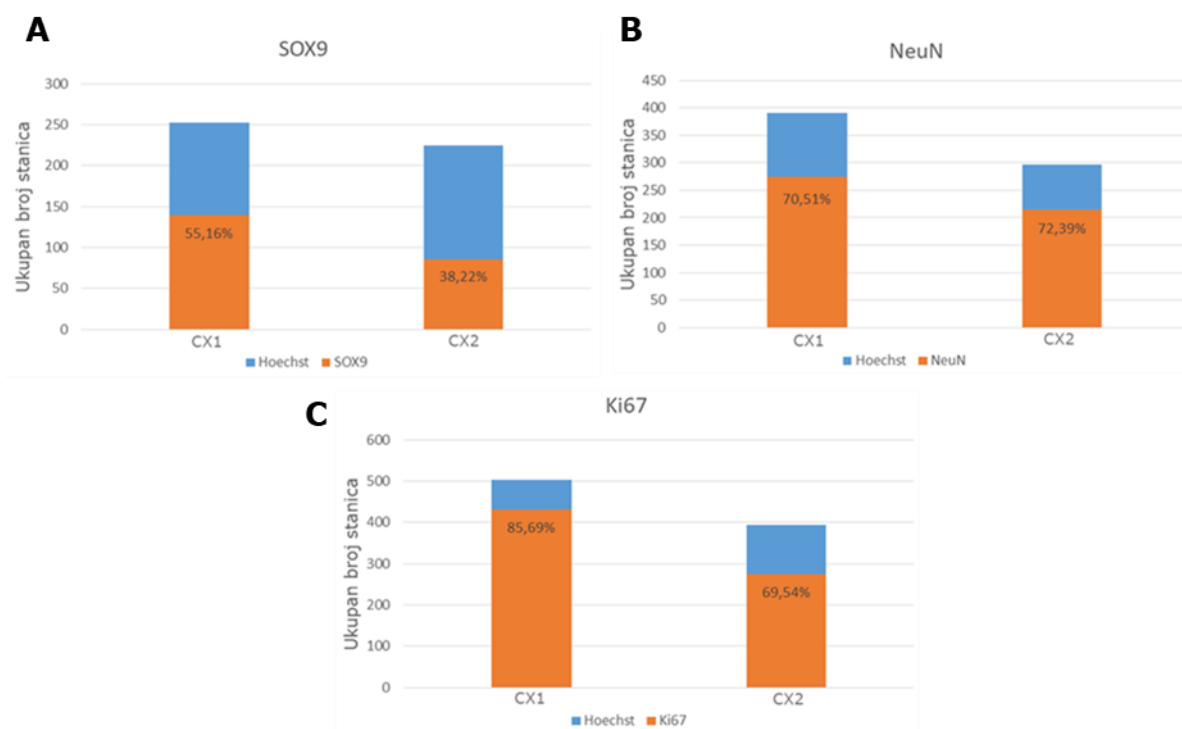
Tablica 2. Broj stanica korteksa oposuma P30 pozitivnih na neuralne markere SOX2 i SOX9. Hoechst predstavlja broj stanica, SOX2+ su stanice pozitivne na SOX2, SOX9+ su stanice pozitivne na SOX9, dok SOX2/SOX9+ predstavlja dvostruko pozitivne stanice.

Jedinka 1	Hoechst	SOX2+	SOX9+	SOX2/SOX9+
Alikvot 1	408	164	136	115
Alikvot 2	263	99	66	60
Alikvot 3	689	316	311	224
Alikvot 4	497	224	193	150
Ukupno (% u odnosu na Hoechst)	1857	803 (43,24%)	706 (38,02%)	549 (29,56%)



Slika 15. Imunooznačene jezgre stanica korteksa oposuma P30. Jezgre su izolirane metodom izotropnog frakcionatora. Za imunooznačavanje su korištena kombinacija primarnih protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-SOX9 (crveno) te Hoechst za bojanje jezgri (plavo). Tanka strijelica, primjer SOX2 pozitivne jezgre; puna stijelica, primjer dvostruko pozitivne jezgre (SOX2/SOX9+). Mjerilo 10 µm.

Budući da je imunooznačavanje jezgri korteksa P30 završeno mjesec dana nakon disekcije mozga, odlučili smo validirati protutijela na svježem tkivu. Iz novog legla su uzete dvije jedinke oposuma P30 te je imunooznačavanje provedeno dan nakon disekcije mozgova (tj. fiksacija je trajala manje od 24 sata). Osim anti-SOX2 i anti-SOX9, validirali smo i dodatna protutijela: anti-NeuN i anti-Ki67. Iako smo anti-SOX2 protutijela testirali u kombinaciji sa svim gore navedenim protutijelima, pri analizi je SOX2 imao jaku pozadinu stoga SOX2 pozitivne jezgre nije bilo moguće prebrojiti. Rezultati brojanja jezgri pozitivnih na ostala testirana protutijela vidljiva su na Slici 16. Uspoređujući kortekse dviju jedinki, primijete se razlike među njima. Iako je postotak NeuN+ stanica praktički identičan, to ne vrijedi za SOX9+ i Ki67+ stanice, gdje je razlika dvaju korteksa između 15% i 20%.



Slika 16. Rezultati brojanja jezgri pozitivnih na markere SOX9, NeuN te Ki67 dvaju različitih korteksa oposuma P30. Grafovi prikazuju postotke stanica pozitivnih na testirana protutijela: anti-SOX9 (A), anti-NeuN (B) te anti-Ki67 (C) u odnosu na ukupan broj stanica. CX1= korteks jedinke 1, CX2= korteks jedinke 2.

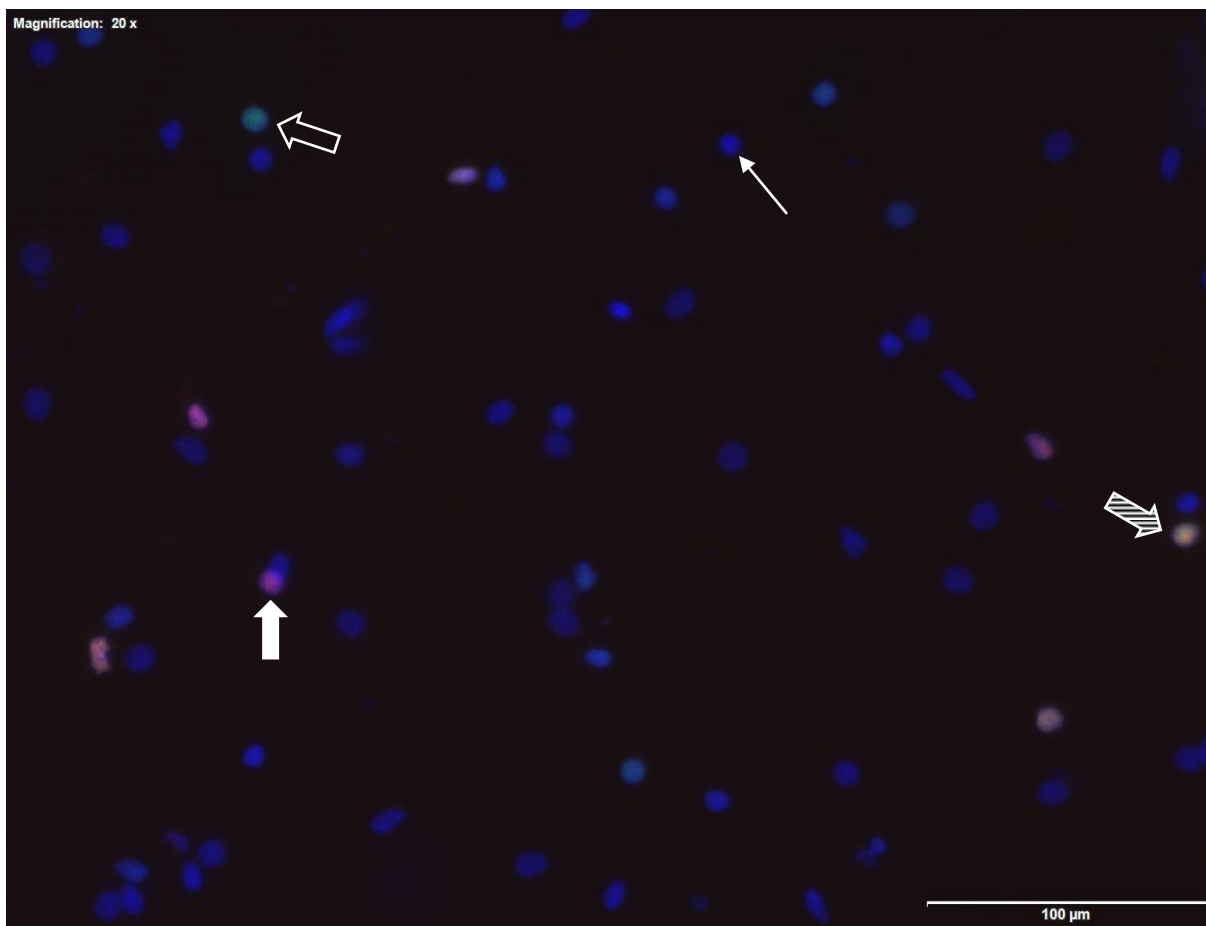
4.2.2. P17

Korteks jedinke P17 bio je 12 dana u fiksacijskoj otopini prije nego što je izvršena frakcionacija. Uzeta su 2 alikvota iste homogene frakcije korteksa. Korištena je kombinacija protutijela anti-SOX2 i anti-SOX9 kako bismo utvrdili broj SOX2 i SOX9 pozitivnih stanica korteksa u toj dobi te Hoechst za bojanje jezgre (Tablica 3, Slika 17).

Tablica 3. Broj stanica korteksa oposuma P17 pozitivnih na neuralne markere SOX2 i SOX9. Hoechst predstavlja broj stanica, SOX2+ su stanice pozitivne na SOX2, SOX9+ su stanice pozitivne na SOX9, dok SOX2/SOX9+ predstavlja dvostruko pozitivne stanice.

P17	Hoechst	SOX2+	SOX9+	SOX2/SOX9+
Alikvot 1	423	76	55	49
Alikvot 2	54	9	4	4

Ukupno (% u odnosu na Hoechst)	477	85 (17,82%)	59 (12,37%)	53 (11,11%)
--------------------------------------	-----	----------------	----------------	----------------



Slika 17. Imunooznačene jezgre stanica korteksa oposuma P17. Jezgre su izolirane metodom izotropnog frakcionatora. Za imunooznačavanje su korištena kombinacija primarnih protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-SOX9 (crveno) te Hoechst za bojanje jezgri (plavo). Tanka strijelica, primjer Hoechst obojane jezgre; prazna strijelica, primjer SOX2 pozitivne jezgre; puna stijelica, primjer SOX9 pozitivne jezgre; iscrtkana strijelica, primjer dvostruko pozitivne jezgre (SOX2/SOX9+). Povećanje 20x, mjerilo 100 µm.

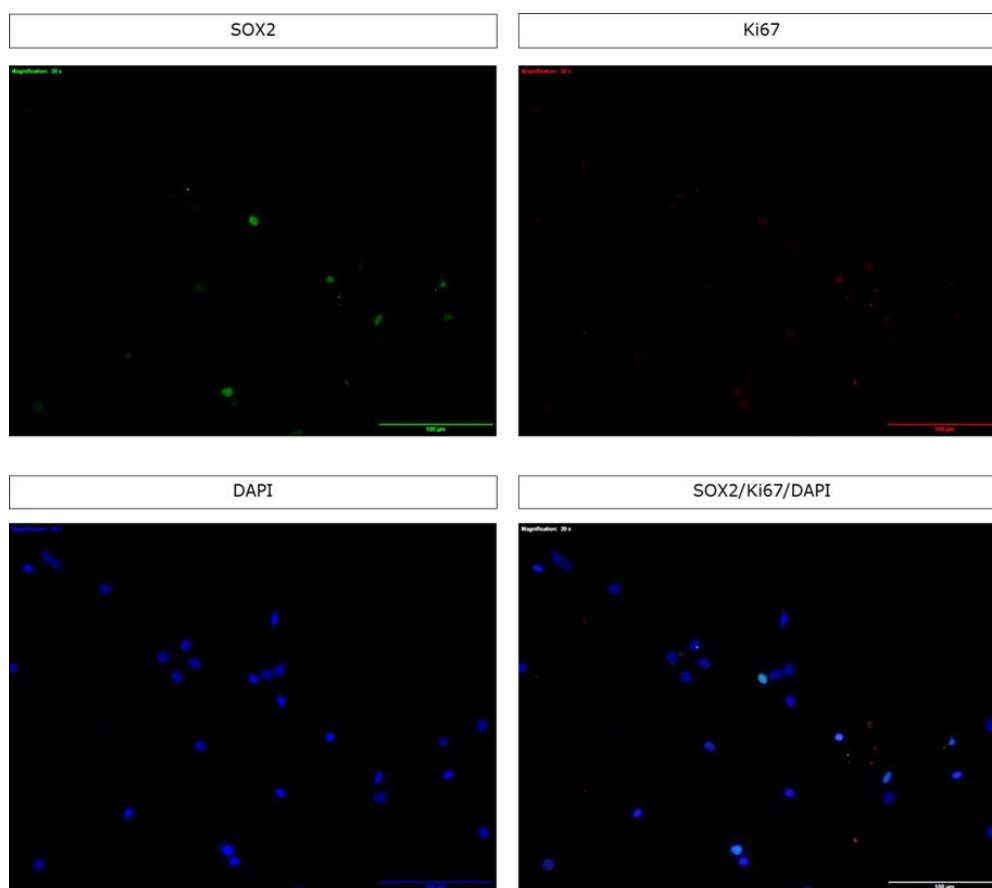
Zbog dobivenog malog postotka SOX2 i SOX9 pozitivnih stanica, odlučili smo provjeriti je li mogući razlog takvog rezultata kompeticija anti-SOX2 i anti-SOX9 protutijela za isti epitop. Od iste homogene frakcije kao iz prethodnog eksperimenta, uzeta su 2 alikvota. Alikvot 1 testiran je s anti-SOX2 protutijelima, dok je alikvot 2 testiran s anti-SOX9 protutijelima (Tablica 4).

Tablica 4. Broj stanica korteksa oposuma P17 pozitivnih na neuralne markere SOX2 i SOX9 bez kompetencije protutijela. Hoechst predstavlja broj stanica, SOX2+ su stanice pozitivne na SOX2, SOX9+ su stanice pozitivne na SOX9.

P17	Hoechst	SOX2+	SOX9+	Ukupno (% u odnosu na Hoechst)
Alikvot 1	331	60	/	18,13%
Alikvot 2	393	/	50	12,72%

Iz gore navedenih rezultata možemo zaključiti da se SOX2 i SOX9 protutijela mogu koristiti u kombinaciji, kako u IFR metodi, tako i u IHC.

Osim anti-SOX2 i anti-SOX9 kombinacije protutijela, testirali smo i anti-SOX2 sa zečjim anti-Ki67 (1:500). Analizom na mikroskopu, Ki67 je imao jaku pozadinu te su jezgre bile blijedo te naizgled nespecifično obojane. Podešavanjem svjetline i kontrasta u ImageJ-u, dobili smo bolju sliku, no još uvijek su jezgre bile blijedo obojane (Slika 18).



Slika 18. Ispitivanje primarnog protutijela anti-Ki67 na jezgrama stanica korteksa oposuma P17. Jezgre su izolirane metodom izotropnog frakcionatora. Za imunooznačavanje su korištena kombinacija primarnih protutijela anti-SOX2 (zeleno) i anti-Ki67 (crveno) te Hoechst za bojanje jezgri (plavo). Povećanje 20x, mjerilo 100 µm.

Postojala je mogućnost da anti-Ki67 protutijelo ne radi ispravno jer je predugo vremena na +4°C te više nije stabilno. Drugi razlog može biti taj što je vrijeme inkubacije možda prekratko za ovo primarno protutijelo (1 h). Također, razlog može biti neodgovarajuće razrijeđenje primarnog protutijela (1:500). Zato smo od istog homogenata korteksa P17 uzeli 6 novih alikvota te testirali ove mogućnosti (Tablica 5). Rezultati se nisu mnogo razlikovali od prethodnog eksperimenta. Nijedan alikvot nije dao zadovoljavajuće i specifično obojenje anti-Ki67.

Tablica 5. Alikvoti homogenata korteksa oposuma P17 testirani na anti-Ki67 s različitim parametrima. Rb= domaćin je zec; Ms= domaćin je miš; Staro= korišteno isto

protutijelo kao u prethodnom eksperimentu; Novo= korišteno novo, tek odleženo protutijelo.

Alikvot	Protutijelo	Staro/Novo	Razrijeđenje	Inkubacija
1	Rb Ki67	Staro	1:250	2.5 h
2	Rb Ki67	Novo	1:500	2.5 h
3	Ms Ki67	Novo	1:500	2.5 h
4	Rb Ki67	Staro	1:500	Preko noći
5	Rb Ki67	Novo	1:500	Preko noći
6	Ms Ki67	Novo	1:500	Preko noći

Sljedeći korak bio je promjena sekundarnih protutijela. Ponovno smo od istog homogenata korteksa P17 uzeli tri nova alikvota (Tablica 6). Nova serija sekundarnih protutijela nije napravila razliku.

Tablica 6. Alikvoti homogenata korteksa oposuma P17 testirani na anti-Ki67 s različitim sekundarnim protutijelima. Rb= domaći je zec; Ms= domaćin je miš; Staro= korišteno isto protutijelo kao u prethodnom eksperimentu; Novo= korišteno novo, tek odleženo protutijelo; Gt α Rb= domaćin je koza, protu-zečje; Gt α Ms= domaćin je koza, protu-mišje.

Alikvot	Protutijelo	Staro/Novo	Razrijeđenje	Inkubacija
1	Primarno; Rb anti-Ki67	Staro	1:500	Preko noći
	Sekundarno; Gt α Rb 555+	Staro	1:250	1 h
2	Primarno; Rb anti-Ki67	Novo	1:500	Preko noći
	Sekundarno; Gt α Rb 555+	Novo	1:250	1 h
3	Primarno; Ms anti-Ki67	Novo	1:500	Preko noći
	Sekundarno; Gt α Ms 488+	Novo	1:500	1 h

4.2.3. P5

Za ovo istraživanje uzete su dvije jedinke oposuma P5 iz istog legla. Njihovi korteksi su bili u fiksacijskoj otopini manje od 24 sata prije homogenizacije. Oba korteksa su potvrđena imunooznačavanju s kombinacijama primarnih protutijela anti-SOX2/anti-SOX9 te anti-SOX2/anti-NeuN (Tablica 7). Zbog malog broja analiziranih stanica, rezultati variraju te nisu pouzdani. Potrebno je ponoviti eksperiment s većim brojem stanica kako bismo dobili reprezentativan uzorak.

Tablica 7. Broj stanica dvaju korteksa oposuma P5 pozitivnih na neuralne markere SOX2, SOX9 te NeuN. A) korištena kombinacija anti-SOX2/anti-SOX9 primarnih protutijela. **B)** korištena kombinacija anti-SOX2/anti-NeuN primarnih protutijela. Za bojanje jezgri korišten Hoechst. N= broj stanica. CX1= korteks jedinke 1. CX2= korteks jedinke 2.

A)		Hoechst	SOX2+	SOX9+	SOX2/SOX9+
CX1	N (% u odnosu na Hoechst)	112	100 (89,29%)	93 (83,04%)	90 (80,36%)
CX2	N (% u odnosu na Hoechst)	221	178 (80,54%)	144 (65,14%)	142 (64,25%)

B)		Hoechst	SOX2+	NeuN+	SOX2/NeuN+
CX1	N (% u odnosu na Hoechst)	178	76 (42,70%)	139 (78,09%)	74 (41,85%)
CX2	N (% u odnosu na Hoechst)	187	143 (76,47%)	175 (93,58%)	142 (75,94%)

5. RASPRAVA

Testiranje anti-SOX2 i anti-SOX9 protutijela je pokazalo kako je lokalizacija SOX2+ i SOX9+ stanica u području ventrikula što je i u skladu sa literaturom pa je tako i u miševa i u štakora tijekom razvoja najviše neuralnih matičnih stanica primijećeno u toj regiji (20, 37). Distribucija SOX2+ stanica nadilazi područje ventrikula korteksa u razvoju, a isto se događa i kod štakora (38). Koja je uloga van ventrikularnih SOX2+ stanica te što utječe na njihovu migraciju još uvijek nije poznato.

Naši rezultati pokazuju kako se daljnjim razvojem oposuma mijenja omjer SOX2+ i SOX9+ stanica u unutrašnjosti korteksa, na način da dolazi do znatnog pada broja SOX2+ stanica, a broj SOX9+ stanica blago raste. Ovo upućuje na početak geneze astrocita koja se u literaturi za oposume smatra da počinje oko P18-P20 (14). Međutim, s obzirom da se za obilježavanje astrocita koristi GFAP i SOX9 koji su eksprimirani i u matičnim stanicama (GFAP je marker i radijalne glije, prekursora neurona i astrocita), potrebni su dodatni markeri astrocita kako bi se sa sigurnošću mogao utvrditi točan početak astrogeneze.

Rezultati ispitivanja anti-SOX2 i anti-SOX9 protutijela na mišu najviše koreliraju s onima oposuma P17: u oba slučaja ventrikuli imaju manje slojeva te je izvan ventrikula primijećen određen broj SOX2+, kao i SOX9+ stanica. Signal SOX2 je u slučaju miša davao jaku pozadinu te je potrebno ponoviti ispitivanje, po mogućnosti i na onima različitih starosnih dobi kako bi se dobila jasnija usporedba dviju životinja.

Kod oposuma P6 i P17, kao i kod miša P1-P2, GFAP+ stanice imaju bipolarnu morfologiju tipičnu za radijalnu gliju, dok bi astrociti trebali imati više razgranatu morfologiju. Isto tako, potrebno je dodatno ispitati da li je testirano GFAP protutijelo u oposumima doista specifično. Vrlo je zahtjevno odrediti i prebrojati GFAP+ stanice, posebice ako je velika koncentracija stanica, kao što je to slučaj s uzorcima tkiva. Osim toga, za razliku od odraslih astrocita, gdje su GFAP i SOX9 gotovo uvijek koeksprimirani, uočili smo znatno više SOX9+ stanica u odnosu na broj GFAP+ stanica. Isto se

dogaća i u mišjem korteksu, gdje GFAP nije bio eksprimiran u većini astrocita, no sve GFAP+ stanice su također bile i SOX9+ stanice (22). Mogući razlog tome je što, tijekom razvoja mozga, neuralne matične stanice eksprimiraju SOX9 koji ima ulogu u glijalnoj specifikaciji, kako astrocita, tako i oligodendrocita (22). Također, GFAP je marker odraslih astrocita te se ne eksprimira u fazi specifikacije astrocita, stoga nije optimalan kao linijski-specifični marker (39). Isto tako, GFAP je pouzdaniji kao marker reaktivnih astrocita koji se javljaju u slučaju ozljede/bolesti SŽS, dok mnogi zreli astrociti zdravog tkiva pokazuju varijabilne razine ekspresije GFAP-a (40).

Tek kod oposuma P30 javlja se razgranata morfologija stanica, karakteristična za astrocite. Po dobivenim rezultatima možemo sa sigurnošću reći da je glio-, tj. astrogeneza u oposumima P30 započeta. Za točno utvrđivanje početka astrogneze i pojave prvih razgranatih GFAP+ stanica potrebno bi bilo učiniti IHC na dobi između P17 i P30 te po mogućnosti koristiti dodatne markere. Tijekom jednog istraživanja na mišjem mozgu korišteno je protutijelo specifično za jednu GFAP izoformu, GFAP δ , te je vidljiva imunoreaktivnost nakon E18, dok je koristeći protutijelo koje označava većinu GFAP izoformi, imunoreaktivnost uočena malo ranije (E12) (41). Postoji ukupno 10 izoformi GFAP proteina koje su različito eksprimirane tijekom razvoja pa bi zato bilo korisno imati GFAP protutijela specifična za npr. embrionalne ili odrasle izoforme proteina (42).

Naši rezultati pokazali su koekspresiju NeuN i SOX2 markera, koja je najjasnije izražena kod mladih oposuma P6, gdje je velika većina stanica dvostruko pozitivna. Budući da je SOX2 transkripcijski faktor koji ima ulogu u očuvanju pluripotencije, samoobnavljanja i proliferacije matičnih stanica (43, 44), ne očekujemo njegovu ekspresiju zajedno sa NeuN-om koji je marker diferenciranih neurona. SOX2+/NeuN+ u oposumima najvjerojatnije predstavljaju mlade neurone te je moguće da je utišavanje ekspresije SOX2 sporije u odnosu na glodavce. Također, miš P1-P2 je više korelirao s oposumom P30, nego P17, s obzirom na brojnost i raspodjelu

neurona u korteksu, što je mogući dokaz produljene neurogeneze te općenito postnatalnog perioda razvoja u oposuma.

Treba uzeti u obzir kako su nedavna istraživanja pokazala visoku ekspresiju SOX2 kod već diferenciranih neurona i glija stanica, a također i visoku stopu koekspresije NeuN i SOX2 u slučaju talamičkih neurona (45, 46). Uloga SOX2 bi mogla biti mnogo kompleksnija nego što se do sada smatralo te može varirati ovisno da li se radi o matičnim ili već diferenciranim stanicama (47). Stoga kombinacija anti-NeuN i anti-SOX2 protutijela nije dovoljna kako bismo jasno mogli odijeliti diferencirane neurone od njihovih prekursora.

MBP je bio jedva primijetan samo u slučaju oposuma P17 te ga ne možemo potvrdno identificirati. U literaturi u korteksu oposuma nismo naišli na ovaj marker, a jedini rezultati IHC za oligodendrocite je izrađen u starijoj dobi, P40 i P60. Osim toga korišten je drugi marker, O4 (14). Moguće je da bi MBP protutijelo dalo bolje rezultate na starijim oposumima. Oligodendrociti su kod miševa primijećeni od E17 u vrlo malim količinama, a njihov broj se povećava u prvih mjesec dana nakon rođenja (6). Vjerojatno bi i kod oposuma u prvom postnatalnom mjesecu trebali biti prisutni oligodendrociti, budući da smo potvrdili prisutnost astrocita te možemo sa sigurnošću reći kako je u razdoblju P30 već nastupila gliogeneza. Bilo bi dobro ispitati O4 marker na oposumima P17-P30 kako bi se dobila jasnija slika oligogeneze.

Testiranje anti-Iba1 protutijela potvrdilo je prisutnost mikroglija već kod oposuma P6. Ovaj rezultat dokazuje da mikroglija u vrlo ranoj postnatalnoj dobi migrira u korteks, ali za točan dan bi bilo potrebno ispitati oposome ranije dobi. Migracija mikroglija u korteks miša događa se u njegovom embrionalnom razvoju, između devetog i desetog dana (48). Stoga postoji vjerojatnost da i kod oposuma migracija nastupa prenatalno.

Bilo je mnogo problema pri utvrđivanju prisutnosti Ki67 proteina kod oposuma. Nakon što smo izmijenili mnoge parametre, rezultati još uvijek nisu bili zadovoljavajući. Mogući razlog je što su se u ovom istraživanju

koristila mišja i zečja protutijela čije sekvence nemaju veliku podudarnost s onom oposuma te da su se zato protutijela vezala nespecifično.

Potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se IFR metoda validirala kao uspješna za kvantifikaciju stanica korteksa jer bi se time znatno olakšalo brojanje koje je u prerezima tkiva teško izvedivo zbog visoke gustoće stanica, a za ukupnu kvantifikaciju je potrebno prikupiti velik broj prereza iz različitih dijelova korteksa, što je izuzetno dug postupak. Osim toga, manjak istraživanja provedenih na oposumima ne daju mogućnost provjere i usporedbe dobivenih podataka.

6. ZAKLJUČAK

Markeri koje smo testirali u ovom istraživanju uglavnom su se pokazali imunoreaktivni u slučaju oposuma. SOX2 nam je predočio tijek neurogeneze. Od mnoštva SOX2 pozitivnih pluripotentnih, mitotičkih stanica, u oposumu P6, koje su lokalizirane po cijelom korteksu, njihov se broj postupno smanjuje i oganičava na područje ventrikula približavajući se dobi od P30. Kako bi se odredio točan dan kada je neurogeneza na svom vrhuncu, bilo bi potrebno provesti istraživanje na oposumima u razdobljima oko šestog dana starosti. SOX9+ stanice u području ventrikula i onih u unutrašnjosti korteksa nalaze se u obrnuto proporcionalnom odnosu. Od P6 do P30, kako se smanjuje broj SOX9+ stanica u području ventrikula, tako se njihov broj u unutrašnjosti korteksa povećava. Kombinacija SOX9/GFAP sugerira kako je mogući početak gliogeneze oposuma između P17 i P30, što bi bilo dobro potvrditi s dodatnim markerima. Tvrdnja kako je NeuN marker zrelih, postmitotičkih neurona pokazala se diskutabilna, s obzirom da smo u slučaju mladog oposuma P6 primijetili NeuN i SOX2 dvostruko pozitivne stanice. MBP se nije pokazao kao dobar i specifičan marker mladih oligodendrocita oposuma te bi trebalo pokušati s drugim markerima, poput O4, čija je ispravnost već potvrđena kod nešto starijih oposuma. Mikroglije su bile vrlo jasno označene s Iba1 markerom. Broj i raspršenost mikroglija se povećava od P6 do P30, a mijenja se i njihova morfologija. Novo istraživanje s Iba1 na oposumima mlađim od P6 dalo bi informaciju kada se točno događa migracija mikroglija u korteks. Ki67 se nije pokazao dovoljno specifičan kao marker proliferacije. Što se tiče kvantifikacije stanica korteksa, potrebna su dodatna istraživanja kako bi se potvrdila valjanost IFR metode.

7. LITERATURA

1. D. Merryweather, P. Roach, The need for advanced three-dimensional neural models and developing enabling technologies. *MRS Commun.* **7**, 309–319 (2017).
2. M. Mladinic, K. J. Muller, J. G. Nicholls, Central nervous system regeneration: from leech to opossum: Central nervous system regeneration. *J. Physiol.* **587**, 2775–2782 (2009).
3. A. F. P. Cheung, *et al.*, The Subventricular Zone Is the Developmental Milestone of a 6-Layered Neocortex: Comparisons in Metatherian and Eutherian Mammals. *Cereb. Cortex* **20**, 1071–1081 (2010).
4. C. De Juan Romero, V. Borrell, Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex: Coevolution of Radial Glia and Cerebral Cortex. *Glia* **63**, 1303–1319 (2015).
5. A. M. H. Seelke, J. C. Dooley, L. A. Krubitzer, The cellular composition of the marsupial neocortex: Cellular composition of the marsupial neocortex. *J. Comp. Neurol.* **522**, 2286–2298 (2014).
6. X. Qian, *et al.*, Timing of CNS Cell Generation. *Neuron* **28**, 69–80 (2000).
7. A. Kriegstein, S. Noctor, V. Martínez-Cerdeño, Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat. Rev. Neurosci.* **7**, 883–890 (2006).
8. J.-M. Baizabal, M. Furlan-Magaril, J. Santa-Olalla, L. Covarrubias, Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch. Med. Res.* **34**, 572–588 (2003).
9. D. S. Barry, J. M. P. Pakan, K. W. McDermott, Radial glial cells: Key organisers in CNS development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **46**, 76–79 (2014).

10. J. T. Paridaen, W. B. Huttner, Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.* **15**, 351–364 (2014).
11. A. Kriegstein, A. Alvarez-Buylla, The Glial Nature of Embryonic and Adult Neural Stem Cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 149–184 (2009).
12. J. L. VandeBerg, E. S. Robinson, The Laboratory Opossum (*Monodelphis domestica*) in Laboratory Research. *ILAR J.* **38**, 9 (1997).
13. N. R. Saunders, E. Adam, M. Reader, K. Møllgård, *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anat. Embryol. (Berl.)* **180**, 227–236 (1989).
14. E. Puzzolo, A. Mallamaci, Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Develop.* **5**, 8 (2010).
15. A. M. H. Seelke, J. C. Dooley, L. A. Krubitzer, Differential changes in the cellular composition of the developing marsupial brain: Opossum Brain Composition Across Development. *J. Comp. Neurol.* **521**, 2602–2620 (2013).
16. S. E. Dos Santos, *et al.*, Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as “Primitive” as Expected. *Brain. Behav. Evol.* **89**, 48–63 (2017).
17. L. Vinci, *et al.*, Immunohistochemical markers of neural progenitor cells in the early embryonic human cerebral cortex. *Eur. J. Histochem.* **60** (2016).
18. H. Li, *et al.*, Identification of neonatal rat hippocampal radial glia cells in vitro. *Neurosci. Lett.* **490**, 209–214 (2011).

19. S. Zhang, Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J. Stem Cells* **6**, 305 (2014).
20. M. Bani-Yaghoub, *et al.*, Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. *Dev. Biol.* **295**, 52–66 (2006).
21. , GFAP glial fibrillary acidic protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI (February 21, 2020).
22. W. Sun, *et al.*, SOX9 Is an Astrocyte-Specific Nuclear Marker in the Adult Brain Outside the Neurogenic Regions. *J. Neurosci.* **37**, 4493–4507 (2017).
23. N. Zečević, A. Andjelković, J.-M. Matthieu, M. Tosić, Myelin basic protein immunoreactivity in the human embryonic CNS. *Dev. Brain Res.* **105**, 97–108 (1998).
24. D. Ito, *et al.*, Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.* **57**, 1–9 (1998).
25. T. Sawano, *et al.*, Homology analysis detects topological changes of Iba1 localization accompanied by microglial activation. *Neuroscience* **346**, 43–51 (2017).
26. N. Swinnen, *et al.*, Complex invasion pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia* **61**, 150–163 (2013).
27. H. Ábrahám, T. Tornóczky, G. Kosztolányi, L. Seress, Cell formation in the cortical layers of the developing human cerebellum. *Int. J. Dev. Neurosci.* **19**, 53–62 (2001).
28. A. Chenn, C. A. Walsh, Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors. *Sci. New Ser.* **297**, 365–369 (2002).

29. Y. Tian, L. Lei, A. Minden, A key role for Pak4 in proliferation and differentiation of neural progenitor cells. *Dev. Biol.* **353**, 206–216 (2011).
30. J. Bahney, C. S. von Bartheld, Validation of the isotropic fractionator: Comparison with unbiased stereology and DNA extraction for quantification of glial cells. *J. Neurosci. Methods* **222**, 165–174 (2014).
31. S. Herculano-Houzel, Isotropic Fractionator: A Simple, Rapid Method for the Quantification of Total Cell and Neuron Numbers in the Brain. *J. Neurosci.* **25**, 2518–2521 (2005).
32. Y. Kamachi, H. Kondoh, Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **140**, 4129–4144 (2013).
33. R. J. Mullen, C. R. Buck, A. M. Smith, NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. **11**.
34. E. Barbarese, *et al.*, Expression and Localization of Myelin Basic Protein in Oligodendrocytes and Transfected Fibroblasts. *J. Neurochem.* **51**, 1737–1745 (1988).
35. I. Hovens, C. Nyakas, R. Schoemaker, A novel method for evaluating microglial activation using ionized calcium-binding adaptor protein-1 staining: cell body to cell size ratio. *Neuroimmunol. Neuroinflammation* **1**, 82 (2014).
36. T. Scholzen, J. Gerdes, The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **12**.
37. S. R. Hutton, L. H. Pevny, SOX2 expression levels distinguish between neural progenitor populations of the developing dorsal telencephalon. *Dev. Biol.* **352**, 40–47 (2011).

38. T. Wells, K. Rough, D. A. Carter, Transcription Mapping of Embryonic Rat Brain Reveals EGR-1 Induction in SOX2+ Neural Progenitor Cells. *Front. Mol. Neurosci.* **4** (2011).
39. A. V. Molofsky, *et al.*, Expression profiling of Aldh1l1-precursors in the developing spinal cord reveals glial lineage-specific genes and direct Sox9-Nfe2l1 interactions: Expression Profiling of Astrocyte Precursors. *Glia* **61**, 1518–1532 (2013).
40. M. V. Sofroniew, H. V. Vinters, Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **119**, 7–35 (2010).
41. C. Mamber, *et al.*, GFAP δ Expression in Glia of the Developmental and Adolescent Mouse Brain. *PLoS ONE* **7**, e52659 (2012).
42. E. M. Hol, M. Pekny, Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Curr. Opin. Cell Biol.* **32**, 121–130 (2015).
43. D. W. Hagey, *et al.*, SOX2 regulates common and specific stem cell features in the CNS and endoderm derived organs. *PLOS Genet.* **14**, e1007224 (2018).
44. V. Graham, J. Khudyakov, P. Ellis, L. Pevny, SOX2 Functions to Maintain Neural Progenitor Identity. *Neuron* **39**, 749–765 (2003).
45. S. Mercurio, L. Serra, S. K. Nicolis, More than just Stem Cells: Functional Roles of the Transcription Factor Sox2 in Differentiated Glia and Neurons. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 4540 (2019).
46. S. Mercurio, *et al.*, Sox2 Acts in Thalamic Neurons to Control the Development of Retina-Thalamus-Cortex Connectivity. *iScience* **15**, 257–273 (2019).

47. M. Cavallaro, *et al.*, Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* **135**, 541–557 (2008).
48. T. L. Tay, J. C. Savage, C. W. Hui, K. Bisht, M.-È. Tremblay, Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition: Microglia across the lifespan. *J. Physiol.* **595**, 1929–1945 (2017).

OSOBNJE INFORMACIJE Helena Kusturin

OBRAZOVANJE I
OSPOBLJAVANJE

- 2017–danas **Diplomski sveučilišni studij "Biotehnologija u medicini"**
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
- 2014–2017 **Sveučilišna prvostupnica Biotehnologije i istraživanja lijekova**
Sveučilište u Rijeci - Odjel za biotehnologiju
Radmile Matejčić 2, 51000 Rijeka (Hrvatska)
- 2010–2014 **Prva riječka hrvatska gimnazija**
Rijeka

RADNO ISKUSTVO

- 04/2019–07/2019 **Izrada diplomskog rada**
Laboratorij za molekularnu neurobiologiju, Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
Tema: Identifikacija neuralnih matičnih stanica putem fluorescentne mikroskopije i validacija markera
Mentor: dr. sc. Jelena Ban
- 02/2019–04/2019 **Stručna praksa (Erasmus+ program)**
Sveučilište u Ljubljani, Biotehnički fakultet, Odjel za biologiju, Ljubljana (Slovenija)
- Priprema uzoraka histoloških tkiva i lokalizacija staničnih komponenti pomoću fluorescentnih markera
- 10/2017–11/2017 **Demonstrator na kolegiju Imunologija**
Odjel za biotehnologiju, Sveučilište u Rijeci
- Asistiranje tijekom laboratorijskih vježbi
- 06/2017–07/2017 **Stručna praksa**
Jadran galenski laboratorij JGL d.d.
Pulac 4A, 51000 Rijeka (Hrvatska)
Djelatnost ili sektor: Istraživanje i razvoj

OSOBNJE VJEŠTINE

Materinski jezik Hrvatski

Strani jezici

	RAZUMJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	
Engleski	C2	C2	C1	C1	C1
Kineski	A2	A2	A2	A2	A2
Talijanski	A1	A1	A1	A1	A1

Stupnjevi: A1 i A2: Početnik - B1 i B2: Samostalni korisnik - C1 i C2: Iskusni korisnik
Zajednički europski referentni okvir za jezike - Ljestvica za samoprocjenu

Komunikacijske vještine	- Vještine javnog govora osigurale pobjedu na natjecanju iz kineskog jezika - Razgovor i posluživanje kupaca tijekom rada u trgovini, u promocijama - Sklona timskom radu - Sposobna brzo se prilagoditi u novom okruženju te samostalno i odgovorno pristupiti rješavanju problema
Organizacijske / rukovoditeljske vještine	- Smisao za organizaciju - Iskustvo u vođenju tima ljudi tijekom obrazovanja kroz rad na seminarima - Sudjelovanje u projektu Studentmentor - Takmičenje u sportskim utakmicama - Aktivno sudjelovanje na Festivaluznanosti
Digitalne vještine	- Osnove rada na računalu - Poznavanje rada u MS Office - Rad u programima za računalnu biokemiju: Avogadro, Chimera, PyMOL, Vina, VMD, NAMD, Spark - Upravljanje software-ima uređivanja fotografija: Fiji/ImageJ - Korištenje Interneta te društvenih mreža
Ostale vještine	- Odbojka (2002.-2012. ŽOK „Drenova“; 2012.-2014. ŽOK „Sv.Matej2006“; 2014.-2017. „Biotech“)
Vozačka dozvola	B

DODATNE INFORMACIJE

Priznanja i nagrade	- Prvo mjesto na državnom natjecanju u znanju kineskog jezika za strane studente "Kineski most" 2019. - Završen preddiplomski studij s pohvalom CUM LAUDE - Stipendistica Ministarstva hrvatskih branitelja 2010.-2019. - Erasmus stipendija za stručnu praksu 2018./2019.
Članstva	- Udruga studenata biotehnologije UsbRi 2014.- danas - Udruga IAESTE 2015.-2016.