

Kvantifikacija ekspresijskih markera središnjeg živčanog sustava u postnatalnom oposumu (*Monodelphis domestica*)

Marion, Carla

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:193:617842>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-01**

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
"Istraživanje i razvoj lijekova"

Carla Marion

Kvantifikacija ekspresijskih markera središnjeg živčanog sustava u postnatalnom oposumu (*Monodelphis domestica*)

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

SVEUČILIŠTE U RIJECI
ODJEL ZA BIOTEHNOLOGIJU
Diplomski sveučilišni studij
"Istraživanje i razvoj lijekova"

Carla Marion

Kvantifikacija ekspresijskih markera središnjeg živčanog sustava u postnatalnom oposumu (*Monodelphis domestica*)

Diplomski rad

Rijeka, 2021. godina

Mentorica rada: doc. dr. sc. Jelena Ban

UNIVERSITY OF RIJEKA
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
Graduate programme
"Drug research and development"

Carla Marion

Quantification of expression of markers of the central nervous system of postnatal opossums (*Monodelphis domestica*)

Graduate thesis

Rijeka, 2021

Diplomski rad obranjen dana 27. 7. 2021.

pred povjerenstvom:

1. Izv. prof. dr. sc. Ivana Ratkaj
2. Prof. dr. sc. Miranda Mladinić Pejatović
3. Doc. dr.sc. Jelena Ban

Rad ima 56 stranica, 10 slika i 46 literaturnih navoda.

Financijska potpora pri izradi diplomskog rada

U ovom istraživačkom radu korištena je oprema projekta Sveučilišta u Rijeci "Razvoj istraživačke infrastructure 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

Funkcije moždanog korteksa u središnjem živčanom sustavu (SŽS) direktno su povezane sa njegovom staničnom kompozicijom, čije osnove su utvrđene tijekom ranog razvoja. Razumijevanje brojčane distribucije neurona i ostalih stanica korteksa od kritične je važnosti jer patofiziološkim procesom neurodegeneracije taj se broj progresivno reducira. Osim toga, tijekom regeneracije tkiva aktiviraju se stanični procesi koji su identični ili vrlo slični razvojnim procesima. Jedinostveni model za istraživanje neuroregeneracije u sisavcima je oposum, koji pokazuje sposobnost regeneracije SŽS-a kroz embrionalni razvoj sve do drugog postnatalnog tjedna. Postnatalni razvoj korteksa oposuma nije u potpunosti istražen. Ukupan podatak o broju neurona i „ne-neuronalnih“ stanica za prva dva postnatalna tjedna (<P18) nije još objavljen u literaturi, a za dob stariju od P18 su dostupni samo podaci za ukupan broj svih stanica i neurona. Pomoću metode izotropnog frakcionatora (IFR) i fluorescentne mikroskopije proveli smo kvantifikaciju stanica korteksa u oposumima postnatalnih dana (P) 6, 18, 34 i 35. Pokazali smo kako apsolutni broj svih stanica korteksa, uključujući i broj neurona raste kroz postnatalni period, te broj „ne-neuronalnih“ stanica naglo raste od P18 do P34, što nam je ukazalo na kraj neurogeneze i početak gliogeneze. Koristili smo markere NeuN, SOX2 i Ki-67 kako bi identificirali i kvantificirali diferencirane neurone te također progenitorske i proliferativne stanice korteksa oposuma u prvom postnatalnom tjednu (P6). Kvantifikacija ekspresijskih markera ukazala je na mogućnost da u korteksu P6 oposuma postoji populacija stanica nezrelih neurona kod kojih dolazi do kasnijeg utišavanja progenitorskih staničnih karakteristika.

Ključne riječi: korteks, *Monodelphis domestica*, izotropni frakcionator, fluorescentna mikroskopija

ABSTRACT

Functions of the cerebral cortex in the central nervous system (CNS) are directly related to its cellular composition, the basics of which are established during early development. Understanding the numerical distribution of neurons and other cortical cells is crucial because during pathophysiological processes of neurodegeneration the number of these cells decreases progressively. In addition, cellular processes that are identical or very similar to developmental processes are activated during tissue regeneration. A unique model for the study of neuroregeneration in mammals is the opossum, which shows the ability to regenerate the CNS through embryonic development until the second postnatal week. The postnatal development of the opossum cortex has not been fully investigated. Data on the total number of neurons and "non-neuronal" cells for the first two postnatal weeks (<P18) have not yet been published, and for the ages older than P18, the only available data include the total number of all cells and neurons. Using the isotropic fractionator (IFR) method and fluorescence microscopy, we quantified cortical cells in opossums of postnatal days (P) 6, 18, 34, and 35. We showed that the absolute number of all cortical cells, including the number of neurons, increased through the postnatal period and that "non-neuronal" cells increase dramatically from P18 to P34, which indicated the end of neurogenesis and the beginning of gliogenesis. We used markers NeuN, SOX2 and Ki-67 to identify and quantify differentiated neurons as well as progenitor and proliferative cells of the opossum cortex in the first postnatal week (P6). Quantification of expression markers indicated the possibility of an immature neuron cells population in the P6 opossum cortex whose progenitor cell characteristics are subsequently silenced.

Keywords: cortex, *Monodelphis domestica*, isotropic fractionator, fluorescence microscopy

Popis skraćénica

SŽS – središnji živčani sustav

NEC – neuroepitelne stanice

VZ – ventrikularna zona

PP – preploča

SVZ – subventrikularna zona

KP – kortikalna ploča

CSF – cerebrospinalni fluid

PRZ – površna rubna zona

DPP – dublja podploča

IZ – intermedijarna zona

BT – bijela tvar

RGC – radijalne glija stanice

NSC – neuralne matične stanice

NPC - neuralne progenitorske stanice

IPC – intermedijarne progenitorske stanice

E – embrionalni dan

P – postnatalni dan

IFR – izotropni frakcionator

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Relevantnost projekta u području istraživanja regeneracije središnjeg živčanog sustava.....	1
1.2. Kortikogeneza sisavaca	2
1.2.1. Stanična karakterizacija tijekom kortikogeneze	5
1.3. Oposum (<i>Monodelphis domestica</i>) kao životinjski model istraživanja regeneracije središnjeg živčanog sustava	7
1.3.1. Kortikogeneza oposuma	10
1.4. Ekspresijski markeri središnjeg živčanog sustava	12
1.4.1. NeuN	12
1.4.2. SOX2	13
1.4.3. Ki-67	14
1.5. Izotropna frakcionacija	14
2. CILJ RADA.....	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Životinjski modeli	17
3.2. Izotropni frakcionator (IFR).....	17
3.2.1. Fiksacija tkiva korteksa	17
3.2.2. Frakcioniranje	18
3.2.3. Primarna protutijela	19
3.2.4. Sekundarna protutijela.....	21
3.2.5. Priprema uzorka za brojanje apsolutnog broja stanica pomoću hemocitometra	23

3.2.6. Priprema uzorka za brojanje relativnog broja stanica	23
3.3. Fluorescentna mikroskopija.....	25
3.3.1. Identifikacija apsolutnog (ukupnog) broja stanica – Hoechst obilježene jezgre	25
3.3.2. Identifikacija broja neuronalnih stanica – NeuN obilježene jezgre	25
3.3.3. Identifikacija broja ne-neuronalnih stanica (jezgra)	26
3.3.4. Identifikacija relativnog broja neurona	26
3.4. Ručno brojanje stanica pomoću ImageJ programa	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Analiza veličine korteksa različite postnatalne dobi <i>M. domestica</i>	28
4.2. Analiza apsolutnog broja stanica korteksa različite postnatalne dobi <i>M. domestica</i> pomoću IFR.....	32
4.2.1. P6, P18, P34 i P35	34
4.3. Analiza relativnog broja stanica korteksa različite postnatalne dobi <i>M. domestica</i> pomoću IFR.....	37
4.3.1. Validacija nuklearnih markera SOX2 i NeuN	38
4.4. Analiza preklapanja proliferacije i progenitorskih stanica.....	40
4.4.1. Validacija nuklearnih markera SOX2 i Ki-67	40
5. RASPRAVA	43
6. ZAKLJUČAK	49
7. LITERATURA.....	51
8. ŽIVOTOPIS.....	55
.....	56

1. UVOD

1.1. Relevantnost projekta u području istraživanja regeneracije središnjeg živčanog sustava

Ljudski mozak predstavlja najvišu kognitivnu sposobnost među sisavcima, a karakterizira ga izuzetno razvijeni korteks koji predstavlja 80% mase cijelog mozga, u kojem se nalazi 86 milijardi neurona i 85 milijardi ostalih („ne-neuronalnih“) stanica (1). Iako najrazvijeniji u carstvu životinja, središnji živčani sustav (SŽS) sisavaca ima jedan nedostatak – nemogućnost regeneracije, odnosno ponovnog rasta aksona nakon ozlijede. Jedan od izuzetaka su tobolčari, poput kratkorepog sivog oposuma (*Monodelphis domestica*) koji u embrionalnom razvoju pokazuje sposobnost regeneracije SŽS-a nakon ozlijede. Sposobnost regeneracije se produžuje tijekom prva dva tjedna postnatalnog razvoja pa su time jedinstveni životinjski model za istraživanje regeneracije SŽS-a sisavaca (2–6).

Pad u broju stanica moždanog korteksa uobičajena je posljedica starenja, no i mnogih neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove i Parkinsonove bolesti. Međutim, vodeći uzrok invalidnosti u skupini neurodegenerativnih poremećaja jesu ozljede SŽS-a, poput tetraplegije i paraplegije, gdje jedina terapija za sad ostaje rehabilitacija (2,7). Iz toga razloga, pomnije istraživanje broja i vrste stanica te stanične distribucije mozga u postnatalnom periodu *M. domestica* omogućilo bi nova saznanja o ključnim razvojnim procesima koji su odgovorni za tjelesno povezane procese poput neurodegeneracije i neuroregeneracije.

1.2. Kortikogeneza sisavaca

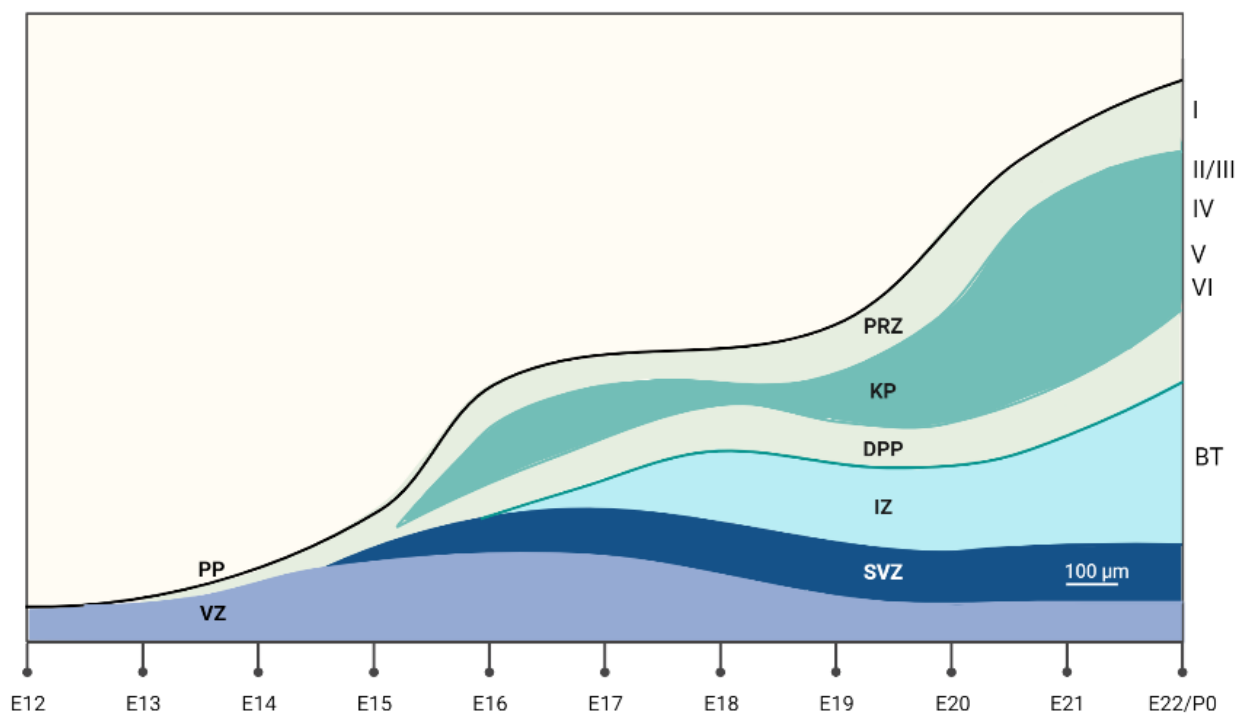
Mozak sisavaca daleko je najsloženiji organ u životinjskom carstvu, a izvanredna veličina i organizacijsko-funkcionalna složenost posljedica je evolucijskog procesa u kojem je najznačajniji razvoj zabilježio korteks. Njegova je funkcija obrada i integriranje senzoričkih podražaja u prethodno pohranjene informacije kako bi nastala motorička i socijalna ponašanja, uključujući ona najreprezentativnija za ljude poput apstraktnog razmišljanja ili kreativnosti (8). Funkcija korteksa u središnjem živčanom sustavu direktno je povezana njezinom staničnom kompozicijom i umreženom arhitekturom, čije su osnove utvrđene tijekom ranog razvoja (9). Uvidi u razvojne događaje tijekom ranih proliferativnih faza kortikalnog razvoja ukazuju na to koliko neuralne matične i progenitorske stanice mogu interaktivno dovesti do kortikalne ekspanzije (10).

Korteks se formira tijekom embrionalnog razvoja te je u početku (embrionalni dan (E) 12 u glodavaca) sastavljen od sloja proliferativnih neuroepitelnih stanica (eng. *neuroepithelial cells*, NEC) koje oblažu lateralne ventrikule i čine ventrikularnu zonu (VZ, Slika 1). VZ je gusto nabijeni stanični sloj nastao od morfološki homogenih mitotičkih stanica koje su radijalno orijentirane i održavaju kontakt sa ventrikularnim središtem i s površinom mozga. Prvi sloj neurona pojavljuje se u periodu kortikalne histogeneze (E13 i E14), i naziva se preploča (eng. *preplate*, PP), te se formira iznad VZ. Drugi proliferacijski sloj koji nosi naziv subventrikularne zone (SVZ) se zatim formira između VZ i PP (nakon E14). SVZ je formirana labavo poredanim stanicama koje nisu radijalno orijentirane, ali sadrži mitotičke stanice poput VZ (11).

Sljedeći korak je kortikalna neurogeneza (E16) koja nastavlja proces generacije novih neurona koji migriraju radijalno od proliferativne zone i talože se u preploči. Uz to, kako se novi kortikalni neuroni stvaraju, tako se

miču od svog mjesta rođenja do svog konačnog mjesta blizu moždane površine, u kritičkom procesu poznatom i kao radijalna migracija (12), cijepajući ovaj sloj na površnu rubnu zonu i dublju preploču. Na taj način oblikuje se nova međustruktura: kortikalna ploča (KP).

KP dodatno raste kako migriraju novonastali neuroni pored ranije generiranih stanica, koji progresivno naseljavaju više površinske slojeve, u konačnici tvoreći šestoslojni korteks (E22, Slika 1.) u kojoj laminirani položaj neurona određuje njegov datum rođenja. Kako se neurogeneza nastavlja u VZ, ona postaje manja. Nakon što je neurogeneza završila, VZ je kompletno zamijenjena jednim slojem ependimalnih stanica (eng. *ependymal cells*) koji oblažu lateralne ventrikule i proizvode cerebrospinalni likvor (eng. *cerebrospinal fluid*, CSF) koji teče mozgom, moždanim deblom i leđnom moždinom. CSF omogućuje ekskreciju metaboličkog otpada, donosi nutrijente ili funkcionira kao potpora tkivu. SVZ također nastaje postnatalno u većini kortikalnih regija osim u bočnom zidu lateralnih ventrikula, gdje nastavlja pružiti olfaktorne neurone kroz odraslu dob (10–12). Osim toga, dokazano je da je SVZ jedna od regija u kojoj je moguća neurogeneza u odraslom mozgu, otkriće koje je otvorilo novu perspektivu u istraživanju strategija za liječenje neurodegenerativnih bolesti (13,14).



Slika 1. Histogeneza moždanog korteksa. Ovaj shematski crtež daje približan prikaz izgleda i relativne veličine kortikalnih struktura između embrionalnog dana (E) 12 i E22 kod štakora. Na početku kortikalne histogeneze, ventrikularna zona (VZ, plava) ili *neuroepithelium*, jedina je prisutna struktura u korteksu mozga. Elementi preploče (PP, svijetlozelena) pojavljuju se iznad VZ između E13 i E14. Subventrikularna zona (SVZ, tamnoplava) pojavljuje se iznad VZ, a ispod PP nakon E14. Nakon E16, neuroni kortikalne ploče migriraju u PP, dijeleći ovu strukturu u površnu rubnu zonu (PRZ) i dublju podploču (DPP) i pri tome oblikuju kortikalnu ploču (KP, tamnozeleno). Elementi intermedijarne zone (IZ, svijetloplava) dospjevaju u strukturu korteksa u E16. Kortikalni slojevi I-IV i bijela tvar (BT) prikazani su na desnoj margini sheme. P0 označava postnatalni dan 0. Kortikalne strukture nacrtane su po uzoru na *Kriegstein i sur., 2006.* (10) uz pomoć BioRender ilustratora.

1.2.1. Stanična karakterizacija tijekom kortikogeneze

Intrinzična karakteristika korteksa je njegova ogromna stanična raznolikost, koja sadrži različite vrste neurona i glija stanica raspoređenih unutar šest slojeva koji su regionalno organizirani u visoko specijalizirana područja (11,14). Kortikalni slojevi nastaju tijekom embrionalnog razvoja po principu „iznutra prema van“ (eng. „*inside-out*“) proliferacijom i generacijom novih staničnih linija u valovima. Neuroepitelne stanice (NEC) su najranije stanice korteksa, te iniciranjem neurogeneze NEC usvajaju karakteristike slične glijalnim stanicama poput intermedijarnih filamenata i citoplazmatskih glikogenskih granula, te se stoga nazivaju radijalne glija stanice (eng. *radial glial cells*, RGC). RGC u kortikogenezi djeluju kao primarne matične¹ i kao progenitorske stanice², te se u literaturi navedeni podtipovi stanica označavaju nazivima neuralne matične stanice (eng. *neural stem cells* NSC) i neuralne progenitorske stanice (*neural progenitor cells*, NPC).

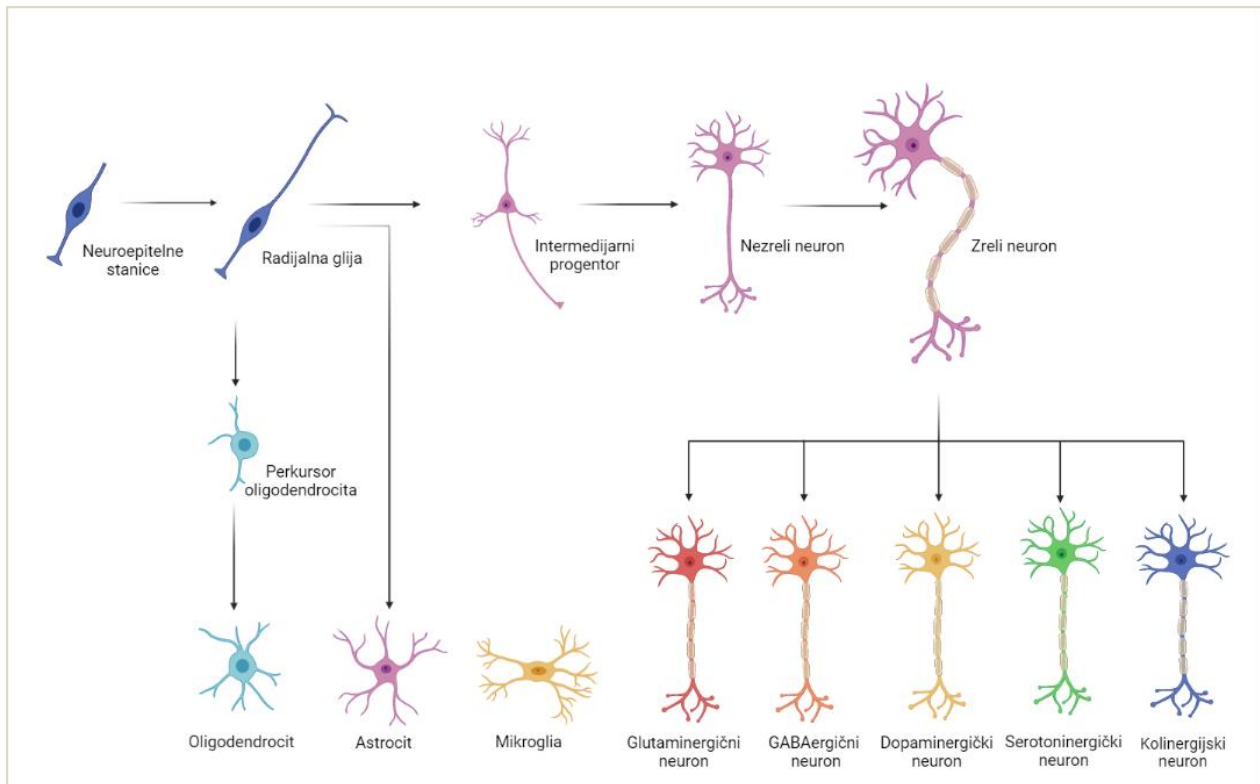
RGC su progenitori svih kortikalnih staničnih linija (Slika 2.), te se u početku dijele simetričnom diobom. Kako se kortikogeneza dalje odvija, oni postupno prolaze diferencijalne podjele kako bi se generirali neuroni izravno (izravna neurogeneza) ili neizravno putem proizvodnje intermedijarnih progenitorskih stanica (eng. *intermediate progenitor cells*, IPC). IPC se dalje simetrično dijele kako bi generirali parove identičnih neurona (neizravna neurogeneza) i nastanjuju SVZ. Proces indirektna neurogeneze važnija je u vrstama koji pokazuju girencefaliju, odnosno nabranu, izvijenu kortikalnu površinu, i presudna je za stvaranje većeg dijela neurona korteksa (8,11).

¹ Matične stanice (eng. *stem cells*) je naziv koji se daje stanicama sa širokim diferencijacijskim potencijalom, koje zadržavaju sposobnost samoobnavljanja u nedogled.

² Progenitorske stanice – nazivaju se i amplificirajuće progenitorske stanice (eng. *transit-amplifying progenitors*) - imaju sposobnost samoobnavljanja i rapidne proliferacije ograničenog broja puta.

Projekcijski neuroni proizvedeni izravnom ili neizravnom neurogenezom iz RGC prolaze kroz složen i vremenski reguliran proces migracije kako bi došli do KP. Rani neuroni oslanjaju se na somalnu translokaciju kako bi se integrirali u duboke slojeve korteksa. Suprotno tome, kasnije rođeni neuroni u početku prelaze u multipolarnu morfologiju, dalje usvajaju bipolarni oblik kako bi se podvrgli kretanju prema gornjim slojevima. Tijekom uspostavljanja moždane kore, projekcijski neuroni proizvode se u uzastopnim valovima i generiraju šest slojeva koji se organiziraju jedan iznad drugoga, što rezultira u „iznutra prema van“ šablonom (11,14,15).

Kada je većina struktura živčanog sustava ustanovljena, slijede kompleksni procesi poput migracije i diferencijacije, te zatim rast aksona koji konačno omogućuje specifičnost ciljne stanice (8). Na taj način je omogućena diferencijacija podvrsta neurona koji proizvode specifične neurotransmitere i receptore: glutaminergični neuroni, GABAergični neuroni, dopaminergički neuroni, serotoninergički neuroni i kolinergijski neuroni. Navedeni diferencirani neuroni potom mogu uspostaviti specifične kontakte sa drugim stanicama (16,17). Nakon neurogeneze slijedi proces poznat i kao gliogeneza u kojem IPC generiraju glija stanice (oligodendrociti, astrociti, mikroglia), dok preostale RGC migracijom počinju nastanjivati KP gdje se u slučaju sisavaca, najčešće pretvaraju u astrocite (10).



Slika 2. Shema neuralnih i glijalnih staničnih linija korteksa.

Prikazano pomoću ilustratora BioRender.

1.3. Oposum (*Monodelphis domestica*) kao životinjski model istraživanja regeneracije središnjeg živčanog sustava

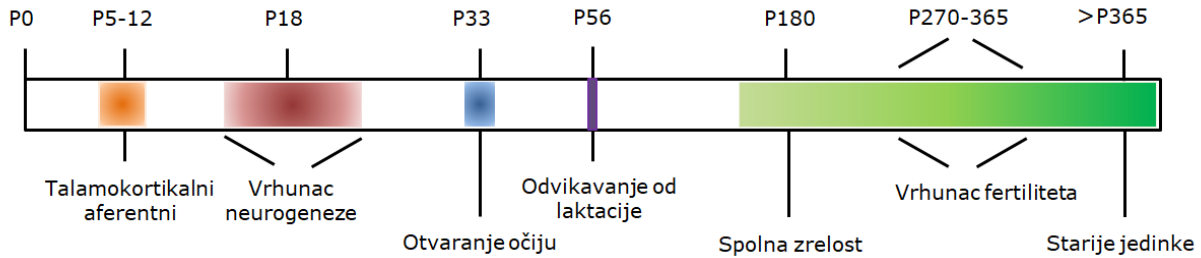
Visoko raznoliki takson tobolčara (*Marsupialia*) podijelio se iz taksona viših sisavaca (*Eutheria*) prije najmanje 125 milijuna godina (Tablica 1.) (18,19). Od tada, evolucija tobolčara odvijala se paralelno uz ostale sisavce, nezavisno razvijajući slične ili različite okolišne prilagodbe. Porodica tobolčara *Didelphidae* koja uključuje kratkorepog sivog oposuma, *Monodelphis domestica*, pokazuje slična anatomska obilježja i sličan razvoj mozga kao i u viših sisavaca (18). Sukladno tome, oposumi mogu pružiti vrijedni uvid u istraživanju evolucijskog podrijetla specifičnih osobina SŽS-a sisavaca (20).

Tablica 1. Taksonomija *M. domestica* (19).

Carstvo	Životinjsko (<i>Animalia</i>)
Koljeno	Svitkovci (<i>Chordata</i>)
Razred	Sisavci (<i>Mammalia</i>)
Podrazred (takson)	Tobolčari (<i>Marsupialia</i>)
Red	<i>Didelphimorphia</i>
Porodica	<i>Didelphiae</i>
Rod	<i>Monodelphis</i>
Vrsta	<i>Monodelphis domestica</i>

Mladunci tobolčara rađaju se u vrlo nerazvijenom stanju nakon 14 dana gestacije. Iz tog razloga, faze razvoja koje se u drugim vrstama javljaju tijekom embrionalnog perioda, u tobolčarima se javljaju postnatalno u tobolcu. *M.domestica*, za razliku od drugih tobolčara, nema tobolac te se novorođeni oposumi rađaju privrženi na majčin abdomen.

Zbog toga je *M.domestica* prikladni životinjski model za eksperimentalnu manipulaciju *ex utero*. Genska ekspresija u novorođenom oposumu (postnatalni dan 0, P0) se pomoću transkriptomike pokazala najbližnja embrionalnom danu (E) 11.5 u mišu ili 12 u štakoru (20,21). U *M. domestica*, vrhunac kortikalne neurogeneze događa se između dana P14 i P24, oči se počinju otvarati u P33, razvijanje samostalnosti u P56 (odvikavanje od laktacije), a spolna zrelost 5 mjeseci nakon rođenja (22) (Slika 3).



Slika 3. Vremenski raspored važnih razvojnih stadija u *M. domestica* (Adaptirano iz Seelke i sur., 2013.)

Novorođeni oposum posjeduje sposobnost obnavljanja veza između oštećenih neurona leđne moždine dokazanu eksperimentalnom traumom u prva dva tjedna nakon rođenja. Nakon navedenog perioda, sposobnost regeneracije se gubi. Gubitak sposobnosti regeneracije se odvija postepeno (eng. *in space and in time*), tj. u periodu od nekoliko dana zahvaća različite regije leđne moždine. Sposobnost regeneracije ustraje do P12 u gornjem cervikalnom dijelu, i do P17 u donjem, manje razvijenom lumbarnom i torakalnom dijelu (3). Stoga, sve navedene tvrdnje impliciraju da je *M. domestica* idealni model za neuroregenerativne studije.

1.3.1. Kortikogeneza oposuma

Pojava šestoslojnog neokorteksa i njegova ekspanzija obilježje je evolucije sisavaca. Unatoč tome što se takson tobolčara evolucijski odvojio od viših sisavaca prije 125 milijuna godina, tobolčari pokazuju karakteristiku 6-slojne kortikalne organizacije. Morfološke studije ukazale su da je sekundarnu proliferativnu zonu, SVZ, vrlo teško odvojiti na jasan način od VZ u oposumu (15,20). Ako jasno organizirana struktura SVZ nije prisutna u oposumu, to sugerira da SVZ nije univerzalno potrebna za stvaranje 6-slojnog neokorteksa kod svih sisavaca. Ova tvrdnja implicira da je ova vrsta potencijalno usvojila drugačiju strategiju kortikalne neurogeneze (15).

1.3.1.1. Usporedba kortikogeneze oposuma sa glodavcima

U odnosu na glodavce i pripadajuću masu tijela, korteks oposuma je manjih dimenzija, period razvoja i same neurogeneze je dulji i odvija se postnatalno (6,15). Podaci histogeneze korteksa ovisno o vremenu su nedovoljno istraženi, kao i molekularni put nastajanja raznih podvrsta neurona. Međutim, poznato je da je ukupan broj neurona u odraslom mozgu manji u odnosu na miševе, implicirajući na različitu strukturu i organizaciju germinalnih centra u korteksu oposuma (15,20). U SVZ dioba stanica kreće kasnije (P14) (15), nego kod štakora (E14) (10). Suprotno od toga, sličnost između ove dvije vrste pokazala se na strukturi VZ: omjer IPC i NEC koje oblažu VZ slične su u oposumu i štakoru (15).

1.3.1.2. Neurogeneza u oposumu

Podaci o vremenskom periodu neurogeneze u oposumu ostaju podvojeni u različitim znanstvenim radovima. Puzzolo i suradnici smatraju da neokortikalna neurogeneza započinje na dan rođenja (P0), dostiže vrhunac u P8, a dolazi kraju dva tjedna nakon rođenja, između P14 i P16. Ova tvrdnja je obrazložena činjenicom da nakon P8 broj bazalnih prekursora opada i IPC u VZ, a u periodu od P18 do P20 pojavljuju se stanice pozitivne na marker

astrocita (eng. *Glial fibrillary acid protein*, GFAP), što upućuje na početak astrocitogeneze. Nadalje, smatraju kako je proces radijalne migracije gotov do P25 (20). Seelke i suradnici ističu da se vrhunac neurogeneze odvija u razdoblju P14-P24, a završava u P35 (5). Sauders i suradnici procjenjuju da neurogeneza traje sve do P45 obzirom da su još uvijek primjetne SVZ i VZ (23). Razlike u literaturnim podacima upućuju na potrebu dodatnih istraživanja kako bi se utvrdile točne razvojne faze kortikogeneze oposuma.

1.3.1.3. Stanična kompozicija korteksa oposuma

U tijeku kortikalnog razvoja oposuma dolazi do povećanja ukupnog broja stanica, posebice „ne-neuronalnih“ (eng. *non-neuronal cells*), premda neuronalni broj ostaje isti. Ova tvrdnja implicira da je uloga glija stanica u kortikalnom razvoju potencijalno povezana uz neke još nepotpuno definirane funkcije, što je u suprotnosti sa tradicionalnom pristupu u kojem se uloga glija opisivala kao „pasivna potpora neuronima“ (5). Tijekom zadnjih stadija neurogeneze, neuroni sačinjavaju najveći udio stanica u korteksu, a nakon toga taj broj opada ili se stabilizira. Korteks odraslog oposuma (>P365) čini 6 milijuna stanica (6) od kojih samo 22% čine neuroni, dok ostatak tvore ne-neuronalne stanice (5). Relativno nizak broj neurona i odgovarajuće visok broj ne-neuronalnih stanica sugerira da te stanice potencijalno igraju ključnu ulogu u SŽS-u oposuma (5). Do sada je provedeno samo jedno istraživanje kvantificiranja kortikalnih neurona oposuma koje pokazuje odstupanja u odnosu na druge tobočare, te ga je stoga moguće tumačiti kao indikator i potrebno je provesti podobnije studije na tom području (24).

1.4. Ekspresijski markeri središnjeg živčanog sustava

Ekspresijski markeri su izuzetno efikasan i praktičan alat pomoću kojeg je omogućena karakterizacija staničnih procesa poput proliferacije i diferencijacije matičnih i progenitorskih stanica središnjeg živčanog sustava označavanjem specifičnih funkcionalnih proteina. Kvantifikacija i identifikacija različitih ekspresijskih markera matičnih i progenitorskih stanica prilikom različitih faza kortikogeneze mogla bi dati jasne odgovore o raznim regulatornim mehanizmima kojima te stanice podliježu, te u konačnici temelje više kortikalne funkcije. Laboratorijski dostupni ekspresijski markeri postaju sve brojniji, a u ovom istraživanju smo koristili one koji su pokazali određenu specifičnost za ispitivanje stanica čija bi kvantifikacija mogla dati odgovore na postavljene hipoteze. Važno je napomenuti da su matične/progenitorske stanice izuzetno heterogena populacija stanica te da ne postoji jedinstveni marker za svaku podvrstu. Za označavanje diferenciranih neurona, koristili smo marker NeuN, a za označavanje progenitorskih stanica, koristili smo marker SOX2. Proliferacijske stanice smo obilježili markerom Ki-67.

1.4.1. NeuN

NeuN (eng. *neuronal nuclei*) je citoplazmatski i jezgrin protein, te je jedan od najčešće korištenih markera jezgri diferenciranih neurona (25). NeuN nije eksprimiran u neuralnim perikusorima, stoga će se pomoću ovog markera obilježiti postmitotički neuroni. NeuN kao se funkcionalni protein u stanici prvi put pojavljuje u razvojnog razdoblju koji korelira sa povlačenjem stanice iz staničnog ciklusa i njezinog ulaska u terminalnu diferencijaciju (25). NeuN može predstavljati nekoliko prepreka u kvantifikaciji i identifikaciji ciljane populacije stanica pošto ne označava sve tipove neurona u odraslom mozgu kao što su Purkinjeove stanice, fotoreceptore mrežnice i mitralne stanice olfaktornog bulbusa. Još jednu barijeru predstavlja različiti

obrazac obilježavanja ovisno o vrsti, gdje se na primjer može dogoditi pozitivno obilježavanje postmitotičkih neurona s NeuN u jednoj vrsti, dok u drugoj ne (5,25). Unatoč navedenim izuzecima, NeuN je jedan od najčešće korištenih markera neurona u imunohistokemiji, posebice na uzorcima tkiva odraslog mozga.

1.4.2. SOX2

Ekspresijski marker SOX2 (eng. *sex determinig region Y-box2*) pripadnik je obitelji transkripcijskih faktora SOX, jednih od najranijih skupina gena koji se eksprimiraju tijekom embrionalnog razvoja SŽS. SOX proteini ispunjavaju različite funkcije u razvojnoj regulaciji kroz različite molekularne mehanizme vezanjem i savijanjem molekule DNA, te ostvaruju interakciju sa različitim proteinskim partnerima djelujući poput koaktivatora ili korepresora. Na taj način posreduju indukcijom ili represijom stanične proliferacije (26).

SOX2 je važan regulator transkripcije u NSC i NPC (27). Kontroliranjem transkripcije, SOX2 održava pluripotentni status nediferenciranih embrionalnih matičnih stanica. Uz to, SOX2 djeluje i na reprogramiranje već diferenciranih stanica nazad u pluripotentno stanje, induciranjem povratka u drugu fazu staničnog ciklusa. Taj efekt SOX2 proteina čini ga ujedno i poznatim kao jedan od 4 tzv. Yamanaka faktora kojima je moguće reprogramirati somatske stanice u inducirane pluripotentne matične stanice (27,28). Istraživanjem lokalizacije SOX2 u ljudskom embrionalnom mozgu dokazano je da se SOX2+ stanice najčešće nalaze u područjima VZ i SVZ. Druga moguća lokacija pronalaska stanica koje eksprimiraju SOX2 jesu netom zreli neuroni koji migriraju prema KP (29). Prekursori glia stanica i već diferencirani astrociti koji su proliferirajućeg karaktera eksprimiraju SOX2 sve dok ne pređu u postmitotičko stanje. Iz toga razloga moguće je da SOX2 posjeduje različite uloge u procesu kortikogeneze obzirom na neurogenezu i gliogenezu (30).

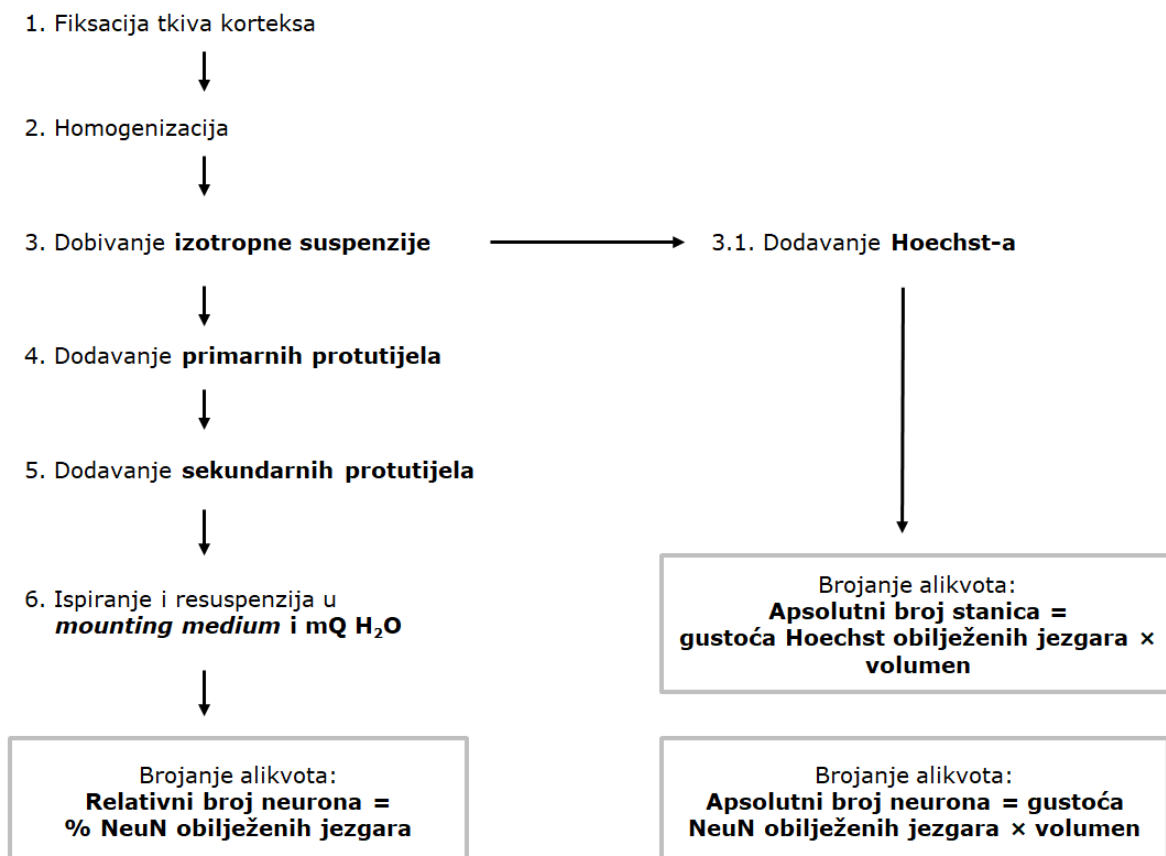
1.4.3. Ki-67

Ki-67 je nuklearni protein eksprimiran u mitotičkim stanicama te se stoga upotrebljava kao marker za gotovo sve proliferirajuće stanice (31). Ki-67 protein prisutan je tijekom svih aktivnih faza staničnog ciklusa (G1, S, G2 i mitozu), ali odsutan u mirujućim stanicama (G0), što ga čini izvrsnim markerom za određivanje udjela rasta s obzirom na populaciju stanica (32). Iz toga razloga Ki-67 se koristi i u medicinskoj dijagnostici za identifikaciju tumorskih stanica (32). Ispitujući ovaj marker na razini staničnog razvoja korteksa, uviđa se obrazac obilježavanja gusto poredanih stanica u VZ, ali se Ki-67+ stanice mogu prepoznati i na područjima IZ i SVZ. Embrionalne NSC vremenom gube proliferacijski potencijal te je u postnatalnim studijama neophodna bolja karakterizacija lokalizacije Ki-67+ stanica (33,34).

1.5. Izotropna frakcionacija

Identifikacija i kvantifikacija broja stanica korteksa moguća je metodom izotropne frakcionacije (IFR). Ova metoda obuhvaća prijelaz iz nehomogene, kompaktne i složene strukture poput fiksiranog tkiva korteksa u izotropnu, homogenu staničnu suspenziju slobodnih jezgara (Slika 2) (35). Homogena stanična suspenzija je obojana fluorescentnim biljezima te se može izbrojati pod mikroskopom koristeći Neubauerovu komoru i identificirati ovisno o označenim pripadajućim ekspresijskim markerima (2). Prednosti IFR metode uključuju brzinu, jednostavnost i ekonomičnost, te se procjene ukupnog broja stanica, neurona i „ne-neuronalnih“ stanica mogu dobiti unutar 24 sata (36). Budući da su rezultati dobiveni IFR metodom neovisni o volumenu strukture koja se homogenizira, rezultati mogu biti utjecajni na velik raspon komparativnih studija i u studijama razvoja, odrasle neurogeneze ili neuropatologije (36). Glavni nedostatak IFR metode je što se u procesu

homogenizacije analizirano tkivo razara, uključujući sve stanične organele osim jezgara, te nije moguće dobiti prostorne informacije o staničnom sastavu bioloških regija od interesa (35). Uz to, nema mogućnosti uporabe markera koji nisu jezgreni.



Slika 4. Shematski prikaz metode izotropne frakcionacije. Nakon fiksacije i homogenizacije tkiva, jezgre su obojane nuklearnim ekspresijskim markerima, poput primarnih i sekundarnih protutijela i/ili interkalirajućim fluorescentnim spojevima (npr. Hoechst 33342). IFR metoda omogućuje brzu determinaciju apsolutnog broja neurona i ne-neuronalnih stanica, kao i relativnog broja neurona u odnosu na cijeli uzorak. Adaptirano iz *Herculano Houzel&Lent, 2005* (36).

2. CILJ RADA

Kvantifikacija broja stanica korteksa ključna je informacija u razumijevanju njihovih funkcija kako zasebno, tako i na sistemskoj razini. Relevantnost sakupljanja podataka leži i u shvaćanju osnova anatomije bioloških struktura i procesa poput razvoja i starenja SŽS-a. Postnatalni razvoj korteksa oposuma nije u potpunosti istražen. Ukupan podatak o broju neurona i „ne-neuronalnih“ stanica za prva dva postnatalna tjedna (<P18) nije još objavljen u literaturi, a za dob stariju od P18 su dostupni samo podaci za ukupan broj stanica i neurona (5). Glavni cilj ovog istraživačkog rada je kvantifikacija ekspresijskih markera SŽS-a u postnatalnom oposumu, životinjskog modela prikladnog za istraživanje neuroregeneracije u sisavcima. Navedeni koncept može se razgranati u tri podcilja:

- 1.** Kvantifikacija apsolutnog broja stanica korteksa oposuma postnatalne dobi P6, P18, P34 i P35 obzirom na pripadajuće ekspresijske markere.
- 2.** Kvantifikacija relativnog broja neurona u korteksu oposuma postnatalne dobi P6 obzirom na pripadajuće ekspresijske markere.
- 3.** Ispitati ekspresiju specifičnih markera SOX2 i Ki-67 koji do sada nisu testirani na oposumu koristeći metodu izotropnog frakcionatora.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Životinjski modeli

U ovom istraživanju koristili smo sive kratkorepe oposume (*Monodelphis domestica*) uzgajanih u vivariju Sveučilišta u Trstu u Italiji. Kolonija je održavana u skladu sa smjernicama Europske unije za brigu o životinjama (d.1.116/92; 86/609/C.E). Svi opisani eksperimenti koji uključuju životinjski model oposuma provedeni su u skladu s Europskom direktivom 2010/63/ EU za pokuse na životinjama. Uložili smo sve napore da se izbjegne patnja životinja tijekom postupka disekcije. Eksperimenti ovog istraživanja uključuju oposume različitih postnatalnih dobi: P6, P18, P34 i P35; gdje se P0 odnosi na dan rođenja.

3.2. Izotropni frakcionator (IFR)

3.2.1. Fiksacija tkiva korteksa

Životinje smo žrtvovali dekapitacijom. Odstranili smo cijeli mozak iz lubanje u disekcijskoj otopini pod osvjetljenim disekcijskim mikroskopom. Disekcijska otopina sastojala se od HBSS-a (eng. *Hanks' Balanced Salt Solution*) bez $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$, 3.5g/L glukoze (Merck), 10 mM HEPES-a (eng. *hydroxyethyl-piperazine-ethane-sulfonic acid*, HEPES), 113 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 1 mM NaH_2PO_4 , 2 mM $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 11 mM glukoze i 0.5% w/v Penicilin/Streptomycin/Amfotericin B, pH 7.4 (Sigma–Aldrich), 3% goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumin*, BSA, PAN Biotech). Izolirali smo korteks i odstranili moždane ovojnice. Tkivo korteksa smo spremili u vijalice od 2 mL i fiksirali otopinom 4% paraformaldehida (PFA, Sigma–Aldrich) u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *Phosphate-Buffered Saline*, PBS) (Millipore, kat. br. 100496) pH 6.9 na 4°C. Fiksacija je trajala minimalno 24h.

3.2.2. Frakcioniranje

Izvadili smo korteks iz otopine PFA i isprali 3x s 1 mL PBS (Merck, kat. br. D8537). Dodali smo 1,5 mL citratnog pufera (40mM natrijevog citrata i 1% Triton X-100, pH 6,0) i zajedno s korteksom prebacili u stakleni homogenizator za tkivo volumena 5 mL (Tenbroeck tissue grinder, Wheaton). Homogenizirali smo tkivo 10 minuta. Homogenizirana suspenzija koju smo dobili sastojala se od razorenog tkiva, ali netaknutih jezgara, koje smo u kasnijim postupcima označili i koristili za brojanje stanica korteksa. Otopinu smo premjestili iz homogenizatora u vijalicu od 2 mL. Isprali smo homogenizator i tučak sa 4x 1mL citrata te prebacili otopinu u dvije vijalice od 2 mL. Tri navedene vijalice centrifugirali smo 10 minuta na 4000 g na 4° C. Uklonili smo supernatant iz vijalica 1, 2 i 3.

3.2.2.1. Dobivanje Stock otopine za uzorke P6

Resuspendirali smo vijalice 2 i 3 u 250 µL 1% otopine BSA u PBS-u i prebacili u vijalicu 1 gdje se nalazio najveći pelet te resuspendirali. Na taj način dobili smo stock otopinu volumena 500 µL mL koji smo koristili za daljnje eksperimente.

3.2.2.2. Dobivanje Stock otopine za uzorak P18

Resuspendirali smo vijalice 2 i 3 u 600 µL 1% otopine BSA u PBS-u i prebacili u vijalicu 1 gdje se nalazio najveći pelet te resuspendirali. Na taj način dobili smo stock otopinu volumena 1.2 mL koji smo koristili za daljnje eksperimente.

3.2.2.3. Dobivanje Stock otopine za uzorak P34 i P35

Resuspendirali smo vijalice 2 i 3 u 1 mL 1% otopine BSA u PBS-u i prebacili u vijalicu 1 gdje se nalazio najveći pelet te resuspendirali. Na taj način dobili smo stock otopinu volumena 2 mL koji smo koristili za daljnje eksperimente. Različiti volumeni 1% BSA otopine su neophodni pošto ovisno o postnatalnoj

dobi, proporcije korteksa, pa time i stanični broj, variraju. Na taj način se dobila podjednaka gustoća staničnih jezgri u izotropnoj suspenziji.

3.2.3. Primarna protutijela

Za inkubaciju sa primarnim protutijelima, uzeli smo frakciju od 200 μL stock otopine, prebacili u novu vijalicu i centrifugirali (10 minuta, 4000 g, 4°C). Supernatant je uklonjen a pelet resuspendiran u 200 μL 1% BSA otopine. Uzorak smo inkubirali 15 minuta u mraku na sobnoj temperaturi (eng. *room temperature*, RT; 20-22°C). Zatim smo centrifugirali uzorak (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli dobiveni supernatant i resuspendirali u 200 μL citrata.

3.2.3.1. Vraćanje antigenskih epitopa i dodavanje Hoechst-a

Sljedeći korak je vraćanje antigenskih epitopa (eng. *antigen retrieval*) koji je potreban u slučaju kada je uzorak fiksiran duže od 2 dana. Radi se o 15-minutnoj inkubaciji u termo bloku na 60°C. Nakon inkubacije centrifugirali smo uzorak (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli dobiveni supernatant i resuspendirali u 200 μL 1% BSA otopine koja je sadržavala Hoechst (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.2.3.2. Spin-down primarnih protutijela

Prije dodavanja primarnih protutijela, njihove smo alikvote kratko centrifugirali (eng. *spin-down*) u minicentrifugi na 30 sekundi. Koristili smo različita primarna protutijela u različitim omjerima, ovisno o ciljevima eksperimenta (Tablica 2). Koristili smo primarna protutijela u sljedećim kombinacijama:

- anti – NeuN u omjeru 1:500 (0.4 μL); ili
- anti – NeuN u omjeru 1:500 (0.4 μL) i anti – SOX2 u omjeru 1:500 (0.4 μL); ili

- anti – SOX2 u omjeru 1: 500 (0.4 µL) i anti – Ki-67 u omjeru 1:250 (0.8 µL).

Nakon što smo dodali željena primarna protutijela, uzorak smo inkubirali na +4°C, minimalno 12h u mraku.

Tablica 2. Primarna protutijela korištena u istraživanju.

Primarno protutijelo	Domaćin i (izo) tip	Razrijeđenje	Imunogen	Katološki broj
Anti – SOX2	Miš monoklonalno IgG1	1:500	Sintetički peptid konjugiran na KLH izveden iz ostataka 300 do C-kraja humanog SOX2	Abcam ab79351
Anti – Ki-67	Zec poliklonalno IgG	1:250	Sintetički peptid konjugiran na KLH izveden iz ostatka 1200- 1300 od humanog Ki-67	Abcam ab15580
Anti – NeuN	Zec monoklonalno	1:500	Sintetički peptid unutar humane NeuN aa 1-100 (cisteinski ostatak)	Abcam ab177487

3.2.4. Sekundarna protutijela

Nakon inkubacije primarnih protutijela centrifugirali smo uzorak (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli dobiveni supernatant i resuspendirali u 200 µL 1% BSA otopine. Kao i za primarna, vijalice sa sekundarnim protutijelima smo kratko centrifugirali (*spin-down*) u minicentrifugi na 30 sekundi. Koristili smo različita sekundarna protutijela u različitim omjerima, ovisno o ciljevima eksperimenta (Tablica 3). Koristili smo sekundarna protutijela u tri moguće kombinacije:

- *Goat anti - rabbit IgG (H+L) Alexa Flour® Plus 555* u razrjeđenju od 1:250 (0.8 µL) u slučaju da smo imali samo primarno protutijelo anti - NeuN; ili
- *Goat anti Rabbit IgG (H&L) Alexa Flour® Plus 555* u razrjeđenju od 1:250 (0.8 µL) i *goat anti - mouse IgG1 Alexa Flour® 488* u omjeru 1:500 (0.4 µL) za kombinaciju SOX2/NeuN primarnih protutijela; ili
- *Goat anti Rabbit IgG (H&L) Alexa Flour® Plus 647* u razrjeđenju od 1:250 (0.8 µL) i *goat anti - mouse IgG1 Alexa Flour® 488* u omjeru 1:500 (0.4 µL) za kombinaciju SOX2/Ki-67 primarnih protutijela.

Nakon 30 sekundi vorteksiranja i resuspendiranja pipetom (minimalno 20 puta), uzorak smo inkubirali na RT 60 minuta u mraku. Nakon inkubacije centrifugirali smo uzorak (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli dobiveni supernatant kako bi se maknuo višak protutijela i resuspendirali u 200 µL PBS. Dobivenu otopinu smo pohranili na 4°C i nju smo koristili za mikroskopsku analizu.

Tablica 3. Sekundarna protutijela korištena u istraživanju.

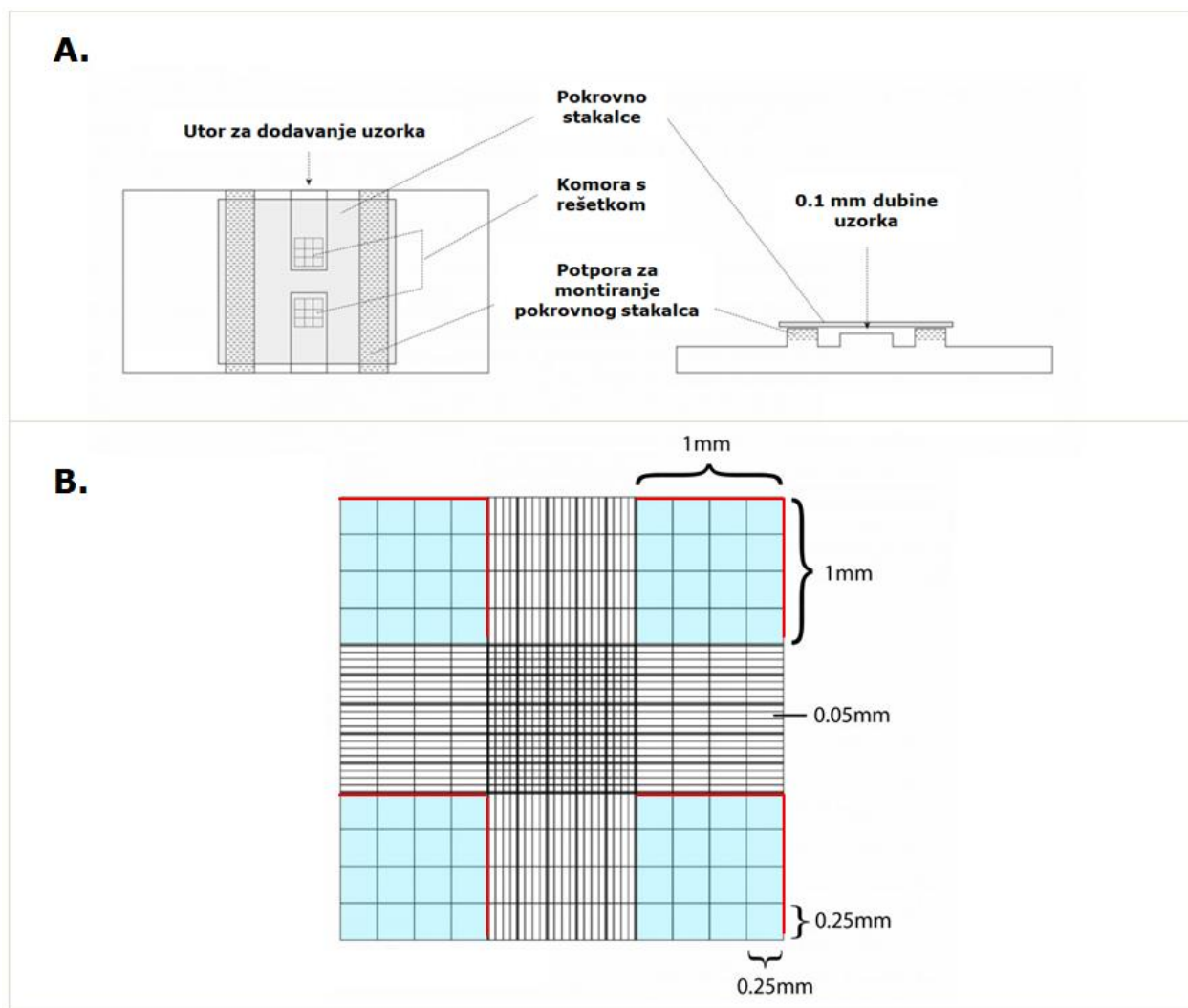
Sekundarno protutijelo	Domaćin i (izo) tip	Ciljana vrsta	Razrijeđenje	Imunogen	Katološki broj	Konjugacija
Goat anti Mouse IgG1	Kozje poliklonalno IgG1	Miš	1:500	IgG Gama 1	Thermo Fisher A21137	Alexa Flour® 488
Goat anti rabbit IgG (H+L)	Kozje poliklonalno IgG	Zec	1:250 ili 1:500	Gama imunoglobulini Teški i laki lanac	Thermo Fisher A32732 Lot: TC267122	Alexa Flour® Plus 555
Goat anti Rabbit IgG (H&L)	Kozje poliklonalno IgG	Zec	1:250	Nedostupno	Abcam ab150083 Lot: GR3234654-1	Alexa Flour® 647

3.2.5. Priprema uzorka za brojanje apsolutnog broja stanica pomoću hemocitometra

Otopinu PBS-a koju smo dobili u koraku 3.2.4. smo vorteksirali i resuspendirali. Prije korištenja hemocitometra (Hausser Scientific Horsham, SAD), očistili smo sami hemocitometar i pokrovno stakalce 70%-tnim etanolom. Na staklenoj ploči hemocitometra pričvršćena je posebna komora s rešetkom. Mjera kvadrata komore iznosi 1 mm x 1 mm i ona se dijeli na 16 manjih kvadrata mjere 0.00025 mm x 0.00025 mm. Nakon što smo poklopili staklenu ploču hemocitometra pokrovnim stakalcem koje se nalazi 0.1 mm iznad rešetke, dodali smo volumen od 10 µL u utor (Slika 3). Na taj smo način omogućili ravnomjerni raspored jezgara.

3.2.6. Priprema uzorka za brojanje relativnog broja stanica

Otopinu jezgri koju smo dobili u koraku 3.2.4. smo centrifugirali (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli dobiveni supernatant i resuspendirali u 200 µL Milli-Q H₂O. Zatim smo ponovno centrifugirali uzorak (10 minuta, 4000 g, 4°C), maknuli supernatant i resuspendirali u 8 µL Vectashield medija za uklapanje (Vector Laboratories, kat. br. H-1000) i nakapali na čisto mikroskopsko predmetno stakalce (Thermo Fischer Scientific). Mikroskopsko stakalce pokrili smo čistim pokrovnim stakalcem i obrubili tankim slojem laka za nokte. Stakalce s uzorkom smo sušili 60 minuta na 4°C u mraku. Nakon analize, stakalca su pohranjena dugoročno na -20 °C u mraku.



Slika 5. Shematski prikaz hemocitometra (A) i pripadajuće komore s rešetkom (B) korištenog za brojanje stanica. Crvenom bojom označene su granične linije (gore i desno) koje su uzete u obzir prilikom manualne kvantifikacije stanica. Slike preuzete sa web-stranice: <https://rsscience.com/>, adaptirala autorica.

3.3. Fluorescentna mikroskopija

3.3.1. Identifikacija apsolutnog (ukupnog) broja stanica – Hoechst obilježene jezgre

Hemocitometar s uzorkom za analizu apsolutnog broja stanica evaluirali smo pomoću mikroskopije. Koristili smo invertni mikroskop Olympus IX73 (Olympus, Japan), opremljen Olympus XM10 CCD kamerom te Olympus U-RX-T i Olympus THR4-200 lampama. Hoechstom obilježene jezgre promatrali smo i slikali na povećanju od 400X pomoću objektiva 20x numeričke aparature (NA) 0.45. Pritom smo koristili filter kockicu za UV područje (U-FUNA, Tablica 3). Brojali smo samo jezgre koje su netaknute ili one koje zadržavaju okrugli i kompaktni oblik. Vidljivo fragmentirane jezgre (tzv. *debris*) smo odbacili, a oni su prepisani nedovoljnoj fiksaciji i/ili homogenizaciji. Nuklearnu gustoću stanica u otopini odredili smo slikanjem kvadranta hemocitometra najmanje 2 puta pomoću Olympus CellSens programa.

Originalni broj stanica (apsolutni broj) u izvornom tkivu prebrojali smo na način da smo najprije odredili srednju vrijednost odnosno broj stranica po kvadrantu hemocitometra. Zatim smo izračunali srednju vrijednost minimalno 2 mjerenja i pomnožili sa 10 000 po uputama proizvođača hemocitometara. Dobiveni broj smo pomnožili sa razjedenjem (ukupni volumen alikvota = 0.5 mL za P6, 1.2 mL za P18, 2 mL za P34 i P35).

3.3.2. Identifikacija broja neuronalnih stanica – NeuN obilježene jezgre

Obilježene jezgre neurona promatrali smo i slikali na povećanju od 400X koristeći U-FGW filter kockicu za Alexa Flour® Plus 555 (crveno) obilježene jezgre. Nuklearnu gustoću neurona u otopini determinirali smo slikanjem kvadranta hemocitometra najmanje 2 puta pomoću Olympus CellSens programa.

Originalni broj neurona (apsolutni broj neurona) u izvornom tkivu prebrojali smo na način da smo najprije odredili srednju vrijednost odnosno broj stranica po kvadrantu hemocitometra. Zatim smo izračunali srednju vrijednost minimalno 2 mjerenja i pomnožili sa 10 000. Dobiveni broj smo pomnožili sa razrjeđenjem (ukupni volumen alikvota = 0.5 mL za P6, 1.2 mL za P18, 2 mL za P34 i P35).

3.3.3. Identifikacija broja ne-neuronalnih stanica (jezgra)

Apsolutni broj „ne-neuronalnih“ stanica (astrociti, mikroglia, oligodendrociti) izračunali smo oduzimanjem broja NeuN-obilježenih jezgara od apsolutnog broja jezgara (stanica).

3.3.4. Identifikacija relativnog broja neurona

Mikroskopska stakalca s uzorcima za analizu relativnog broja stanica evaluirali smo pomoću fluorescentne mikroskopije na Olympus IX83 automatiziranom invertnom mikroskopu (Olympus, Japan) opremljen Xenon lampom, Hamamtsu Orca R2 CCD kamerom (Hamamtsu, Japan), DIC i fluorescentnom optikom te softverom CellSense (Olympus, Japan). Koristili smo objektivne 20X 0.5 numeričke aparature (NA). Filteri koje smo koristili prikazani su u Tablici 4. Za svaku finalnu sliku pribavljena je kolekcija 10-ak slika (eng. *Z stacks*) s razmakom od 1 μm između optičkih sekcija.

Tablica 4. Tablični prikaz seta filter kocki korištenih u fluorescentnoj mikroskopiji.

	<i>Unit Name</i>	<i>Excitation filter</i>	<i>Emission filter</i>	<i>Dichromatic mirror</i>
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

3.4. Ručno brojanje stanica pomoću ImageJ programa

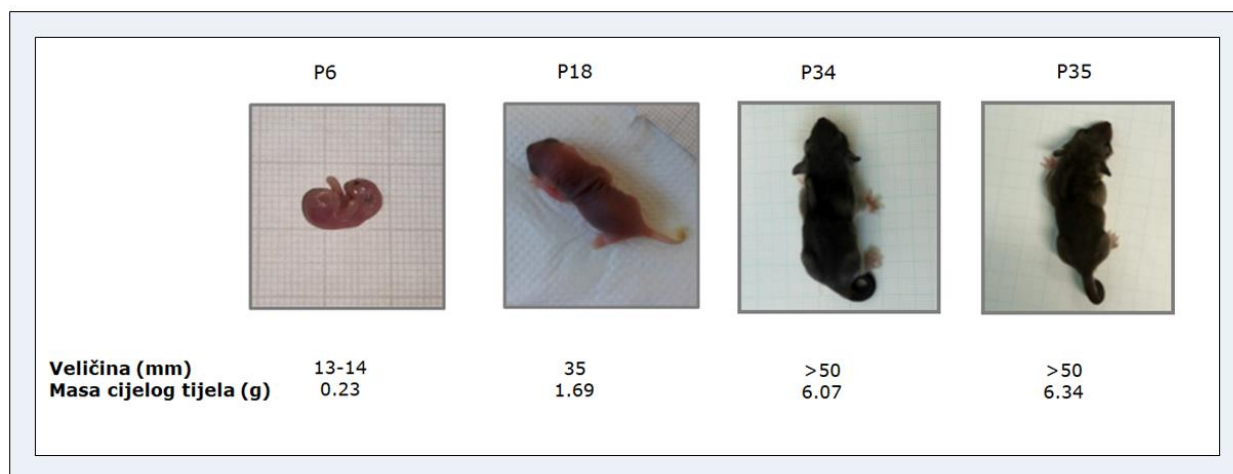
Za obradu slika i brojanje stanica koristili smo softver ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.). Dobivene podatke obradili smo pomoću programa Microsoft Excel. Rezultate smo prezentirali pomoću funkcija srednje vrijednosti uz asocirane standardne devijacije.

4. REZULTATI

U sljedećim rezultatima evaluirali smo staničnu kompoziciju korteksa različite postnatalne dobi oposuma. Usporedili smo brojeve, gustoću i postotak svih stanica, neuronalnih i ne-neuronalnih. Koristili smo kvantitativnu metodu IFR i ekspresijske markere NeuN, SOX2 i Ki-67, koji spadaju u kategoriju još neobjavljenih podataka. Koristili smo oposome različite postnatalne dobi: P18, P34 i P35 (tri različita oposuma iz tri različita legla) i P6 (tri oposuma iz dva različita legla). Da bismo osigurali pouzdanost ovih rezultata, uspoređivali smo dobivene vrijednosti s jedinim do sad objavljenim radom dostupnim u literaturi u kojima se koristila IFR metoda na uzorcima mozga P18 i P35 *M.domestica* (5). Za P6 oposuma, koliko je nama poznato, nema dostupnih podataka.

4.1. Analiza veličine korteksa različite postnatalne dobi *M. domestica*

Veličina i masa tijela oposuma značajno se povećavaju kroz postnatalni razvoj (Slika 6., Tablica 5.). Po istom principu, vidimo kako se i mase mozga i mase korteksa oposuma povećavaju za rastuće postnatalne dobi (Tablica 6.). U ovom istraživanju korišteni su oposumi muškog spola, što je bilo moguće odrediti samo za dobi starije od P18. Karakterizacije omjera mase mozga i korteksa rađene su samo na starijim oposumima (>P18) pošto je moždana struktura P6 vrlo mala i mekana, vrlo ju je teško odvojiti od meningnih ovojnica, te lako dolazi do oštećenja tkiva prilikom vaganja. Osim toga, ukupna masa mozga P6 oposuma iznosi svega 0,010 g, a korteksa 0,007 g, što ne omogućuje precizno mjerenje.



Slika 6. Veličina i masa cijelog tijela *Monodelphis domestica* dobi P6, P18, P34 i P35.

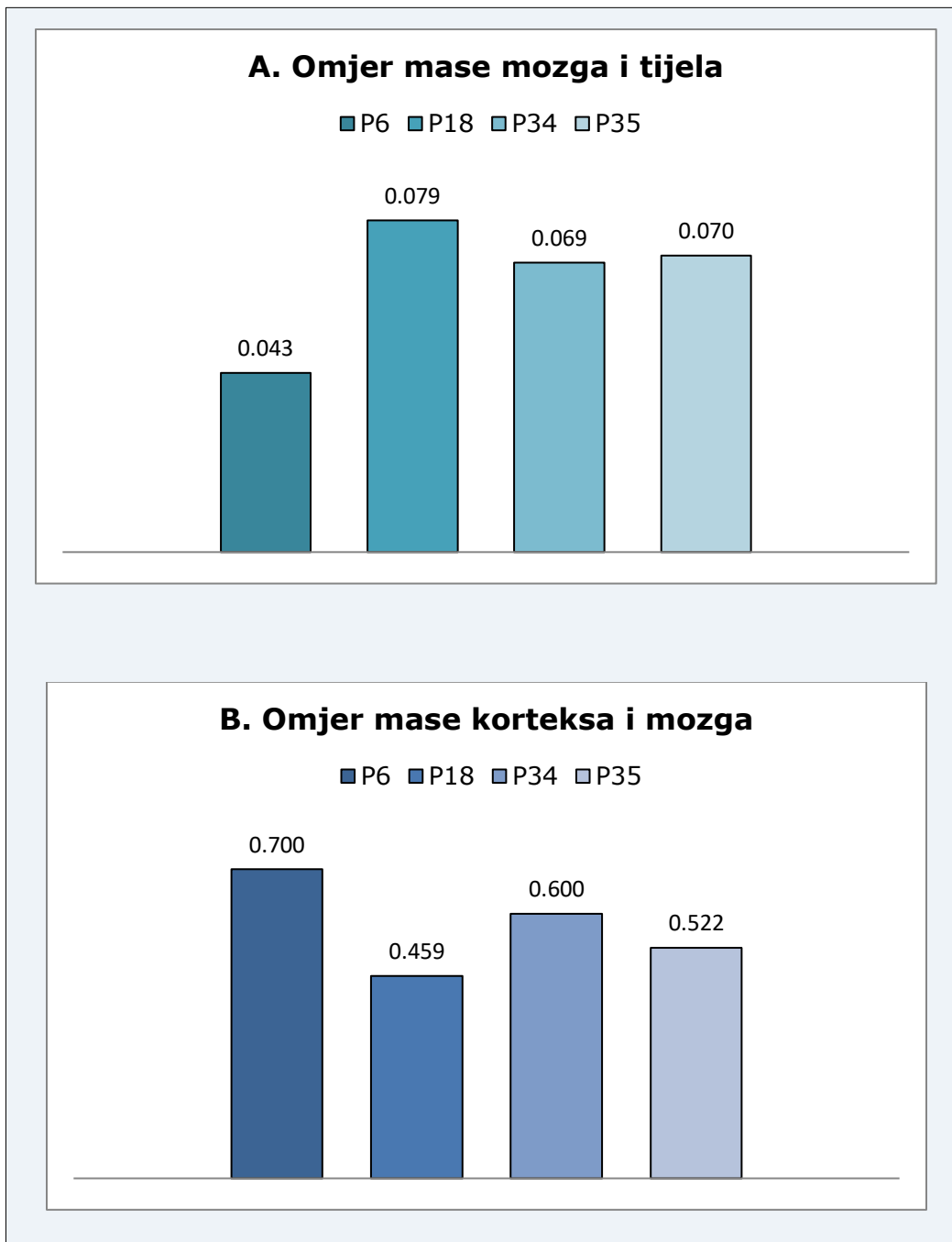
Tablica 5. Postnatalna dob, broj oposuma, spol, masa životinje [g]; proteklo vrijeme između datuma disekcije i datuma homogenizacije (vrijeme u fiksacijskoj otopini).

<i>Postnatalni dan</i>	<i>Spol</i>	<i>Masa životinja [g]</i>	<i>Proteklo vrijeme između disekcije i homogenizacije [d]</i>
P6	/	0,235	30
P18	M	1,691	20
P34	M	6,075	14
P35	M	6,341	1

S obzirom da je vrlo važno izvesti što brže izolaciju, disekciju i fiksaciju tkiva kako bi se izbjeglo odumiranje stanica, odlučili smo provjeriti koliko varira masa prije i nakon fiksacije (Tablica 6.) te utvrdili da povećanje mase mozga nakon fiksacije iznosi otprilike 10% za P34 i P35, dok za P18 iznosi oko 15%. Kako bi se uzorci što prije fiksirali, za neke uzorke odlučili smo izolirati korteks i ukloniti meningne ovojnice nakon fiksacije.

Tablica 6. Tablični prikaz mase cijelog mozga neposredno nakon disekcije, cijelog mozga nakon fiksacije sa PFA, i korteksa.

<i>Postnatalni dan</i>	<i>Masa cijelog mozga nakon disekcije [g]</i>	<i>Masa cijelog mozga nakon fiksacije sa PFA [g]</i>	<i>Masa korteksa bez ovojnice [g]</i>
P6	/	0,010	0,007
P18	0,115	0,133	0,061
P34	0,371	0,417	0,250
P35	0,402	0,446	0,233



Slika 7. Omjer mase mozga i tijela (A) i omjer mase korteksa i mozga (B). U izračunima omjera koristile su se dobivene mase uzoraka cijelog mozga i korteksa nakon fiksacije. Omjer tijela i mozga se povećava kroz razvoj, odnosno raste nakon P6, dostiže vrhunac pri P18, i nakon toga se stabilizira (A). Omjer mase korteksa i mozga najviša je u počecima razvoja za P6. Za P18 se spušta, zatim opet raste i ide k stabilizaciji (B).

Omjer mase mozga u odnosu na tjelesnu masu se povećava kroz razvoj (Slika 7). Najniži je tijekom prvog postnatalnog tjedna, a dostiže vrhunac pri P18, kada se omjer gotovo udvostručuje (sa 0.043 za P6 na 0.079 za P18). Nakon prvog postnatalnog mjeseca (P34 i P35) dolazi do slabijeg pada (manjeg od 10%) u omjeru u odnosu na P18. Ispitali smo i varijacije u omjeru između dva postnatalna dana, P34 i 35, te utvrdili da nema značajnijih promjera u omjeru koji se stabilizira tijekom drugog postnatalnog mjeseca.

Omjer mase korteksa u odnosu na cijeli mozak pokazuje različiti trend: najviši je za P6 u kojem korteks čini 70% moždane mase, dok za P18 taj omjer opada na 45%. Za P34 i P35 omjer varira između 52-60% što upućuje da rast korteksa u ove tri dobne skupine prolazi kroz različite stope rasta. Zbog iznimno malih dimenzija korteksa oposuma, ovi preliminarni podaci se trebaju uzeti s oprezom s obzirom mogućnost eksperimentalne pogreške. Također su potrebna dodatna mjerenja kako bi se dobili statistički značajni podaci.

4.2. Analiza apsolutnog broja stanica korteksa različite postnatalne dobi *M. domestica* pomoću IFR

Metoda IFR koristi fluorescentne ekspresijske markere i slijedi princip identifikacije neurona unutar populacije stanica, homogenizirajući tkivo od interesa (u našem istraživanju to je korteks). Na taj se način omogućuje stanična kvantifikacija živčanog tkiva. Nakon homogenizacije tkiva u izotropnu staničnu (jezgrenu) suspenziju, jezgre su označene Hoechst-om, a zatim obojane NeuN-om kako bi se otkrile neuronalne jezgre. Vizualizacija pomoću hemocitometra na invertnom mikroskopu omogućuje kvantifikaciju neuronalnih jezgra crvenim *stainingom*, dok jezgre koje su dvostruko pozitivne (i na Hoechst i na NeuN) ružičastim *stainingom*. Stanice su

prebrojane ImageJ programom. Provedena istraživanja metodom IFR različitim kombinacijama ekspresijskih markera su prikazana u Tablici 7.

Tablica 7. Provedene evaluacije u istraživanju.

<i>Postnatalni dan</i>	<i>Cilj pokusa</i>	<i>Ekspresijski marker</i>
P35	Odrediti apsolutni broj svih stanica i neurona korteksa	NeuN/Hoechst
P34	Odrediti apsolutni broj svih stanica i neurona stanica korteksa	NeuN/Hoechst
P18	Odrediti apsolutni broj svih stanica i neurona stanica korteksa	NeuN/Hoechst
P6	Analiza preklapanja proliferirajućih i matičnih stanica	SOX2/Ki-67/Hoechst
	Odrediti apsolutni broj stanica korteksa	NeuN/Hoechst
	Odrediti relativni broj neuralnih matičnih stanica i neurona korteksa	SOX2/NeuN/Hoechst

4.2.1. P6, P18, P34 i P35

Stanična kompozicija varira kroz postnatalni razvoj u oposumu (Tablica 8, Tablica 9 i Slika 8). Ispitali smo stanični sastav korteksa na 4 različite postnatalne dobi: P6, P18, P34 i P35. Ispitali smo apsolutni broj svih stanica (pozitivne na Hoechst nuklearni marker, Slika 8A), broj neurona i njihov postotak odnosno na apsolutni broj (Slika 8C), te zatim izračunali broj ne-neuronalnih stanica obzirom na dvije prethodno navedene kategorije. Drugim riječima, ne-neuronalne stanice se identificiraju kao NeuN-negativne, Hoechst-pozitivne stanice. Uz to, izračunali smo i gustoću stanica na način da smo apsolutni broj stanica, broj neurona i broj ne-neurona podijelili sa masom korteksa pripadajućih oposuma (Slika 8B).

Apsolutni broj svih stanica (broj neurona + broj ne-neuronalnih stanica) te broj neurona konstantno raste od P6 (sa ukupno 230.000 izbrojanih stanica korteksa) do P18 (4,49 milijuna) i P34 (14.72 milijuna), gdje se u odnosu na P18 broj stanica gotovo utrostručio. Za P35 došlo je do značajnih odstupanja u dobivenim rezultatima u apsolutnom broju stanica, što pripisujemo eksperimentalnoj pogrešci te se ti dobiveni rezultati neće uzeti u obzir. Postotak NeuN+ neurona je najveći pri P6 (46.77%), zatim opada na 25.61% za P18 i na 14.67% za P34, i onda minimalno raste ponovno do P35. Za razliku od apsolutnog broja svih stanica, relativni udio neurona za P35 ne pokazuje znatno odstupanje što upućuje na to da je u izotropnoj otopini jezgra donekle zadržan omjer neurona u odnosu na ostale stanice mozga. Broj ne-neuronalnih stanica raste značajno od P6 do P34, ali je za P35 primijećeno znatno odstupanje, kao i za apsolutni (ukupni) broj svih stanica.

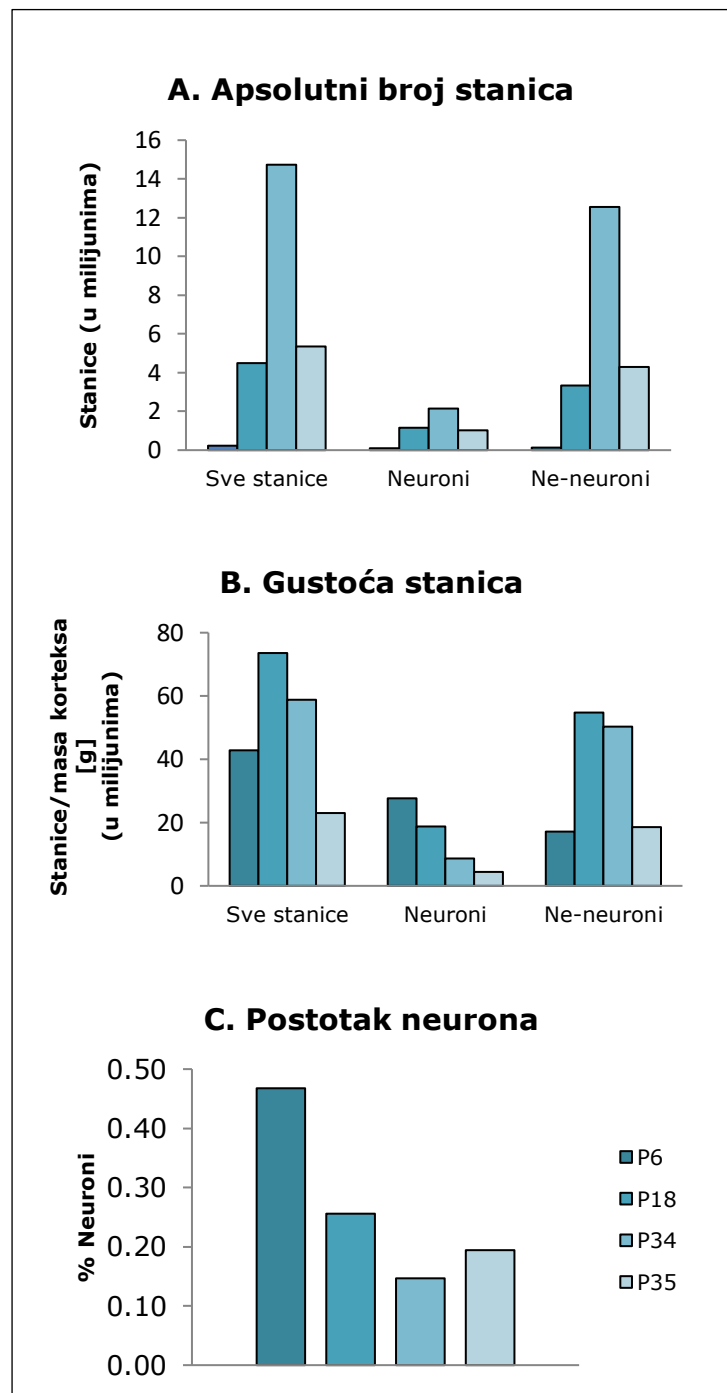
Tablica 8. Stanična kompozicija korteksa *Monodelphis domestica* postnatalnih dobi P6, P18, P34 i P35.

<i>Postnatalni dan</i>	<i>Apsolutni broj (u milijunima)</i>	<i>Broj neurona (u milijunima)</i>	<i>Broj „ne-neuronalnih“ stanica (u milijunima)</i>	<i>% Neurona</i>
P6	0.23	0.11	0.12	46.77%
P18	4.49	1.15	3.34	25.61%
P34	14.72	2.16	12.56	14.67%
P35	5.35	1.04	4.31	19.44%

Tablica 9. Gustoća svih stanica, neurona i ne-neuronalnih stanica u korteksu *Monodelphis domestica* postnatalnih dobi P6, P18, P34 i P35.

<i>Postnatalni dan</i>	<i>Apsolutni broj stanica po gramu (u milijunima)</i>	<i>Broj neurona po gramu (u milijunima)</i>	<i>Broj „ne-neuronalnih“ stanica po gramu (u milijunima)</i>
P6	42.85	27.71	17.14
P18	73.60	18.85	54.75
P34	58.88	8.64	50.24
P35	22.96	4.46	18.49

Promjene u staničnoj kompoziciji korteksa ukazuju da iako apsolutni broj neurona raste (Slika 8A), njihova se gustoća (broj stanica po gramu korteksa, Slika 8B) te također postotak u ukupnom broju stanica progresivno smanjuje od P6 do P34 (Slika 8C).



Slika 8. Promjene u staničnoj kompoziciji korteksa. A. Promjene u apsolutnom broju svih stanica (lijevo), broju neurona (centar) i ne-neurona (desno) u korteksu tijekom razvoja. Apsolutni broj svih stanica značajno raste kroz razvoj, pogotovo od P6 do P18. Apsolutni broj neurona također progresivno raste od P6 do P34. Broj ne-neuronalnih stanica značajno raste kroz razvoj, pogotovo od P18 do P34. **B.** Promjene u gustoći apsolutnog broja svih stanica (lijevo), neurona (centar) i ne-neurona (desno) u korteksu tijekom razvoja. Gustoća svih stanica je najveća pri P18, zatim opada do P34. Gustoća neurona je najviša pri P6, a ne-neuronalnih stanica pri P18. **C.** Postotak neurona u korteksu. Najveći postotak neurona je pri P6, zatim opada do P34 i opet se uzdiže pri P35.

4.3. Analiza relativnog broja stanica korteksa različite postnatalne dobi *M. domestica* pomoću IFR

S obzirom da su dimenzije korteksa oposuma P6 izrazito malih proporcija, brojanje apsolutnog broja pomoću hemocitometra i mikroskopa može predstavljati prepreku. Osim toga, u našem laboratoriju se za brojanje na hemocitometru koristi invertni mikroskop na kojem je fluorescentni signal slabijeg intenziteta jer svjetlost prolazi kroz hemocitometar („odozdo“), za razliku od „*upright*“ konfiguracije fluorescentnih mikroskopa. Iz tog razloga proveli smo analizu relativnog broja stanica korteksa. Relativni broj označava omjer, odnosno postotak neurona u uzorku u odnosu na sveukupne prebrojane stanice uzorka. Nakon izotropne frakcionacije, stanice smo uklopili na predmetno i pokrovno stakalce kako bi mogli slikati i analizirati stanice invertnim fluorescentnim mikroskopom (Olympus IX83 opremljen Hamamatsu Orca R2 CCD kamerom i CellSens softverom). Nakon slikanja, prebrojali smo stanice ImageJ programom (Slika 9). Obzirom da analiza relativnog broja stanica ne uključuje hemocitometar, slikali smo 5 finalnih slika po minimum 20 stanica po slici za svaki alikvot. Za svaku finalnu sliku pribavljena je kolekcija 10-ak slika (eng. *Z stacks*) s razmakom od 1 μm između optičkih sekcija. Za svaku sljedeću tablicu prikazane su srednje vrijednosti prebrojanih stanica pojedine finalne slike.

4.3.1. Validacija nuklearnih markera SOX2 i NeuN

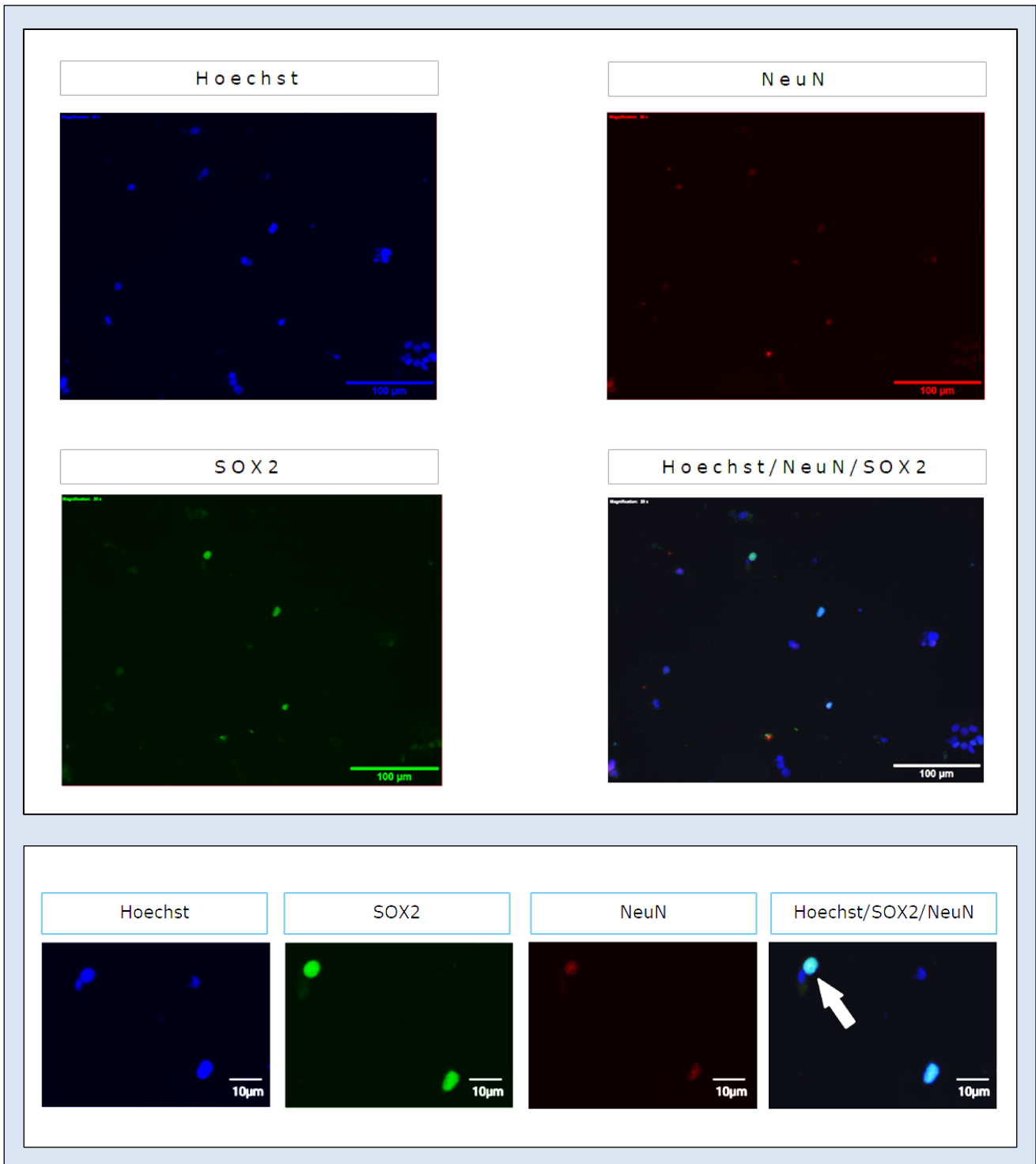
Koristili smo 2 alikvota homogenata korteksa oposuma P6 kojeg smo testirali na prisutnost nuklearnih markera SOX2 i NeuN i proveli 2 brojanja. Na kraju svakog brojanja izračunali smo srednju vrijednost prebrojanih stanica pojedine finalne slike (Tablica 10.)

Tablica 10. Kvantificirane stanice korteksa oposuma P6 pozitivne na neuralne markere SOX2 i NeuN. Hoechst predstavlja broj stanica, SOX2+ su stanice pozitivne na SOX2, NeuN+ su stanice pozitivne na NeuN. Oznaka *double+* označava dvostruko pozitivne stanice (eng. *double positive*). Vrijednosti u postocima se odnose na srednju vrijednost postotaka svih pojedinačnih brojanja \pm standardna pogreška.

Hoechst	SOX2+	NeuN+	double +	%SOX2	%NeuN	%double
285	157	176	115	58.92 \pm 7.23	65.41 \pm 5.44	43.98 \pm 5.69

Ova analiza daje na uvid u staničnu kompoziciju progenitorskih stanica (SOX2+) i neuronalnih stanica (NeuN+) u korteksu oposuma P6 u odnosu na sve stanice (Hoechst). SOX2+ stanice sačinjavaju gotovo 60% stanica korteksa (58.92 \pm 7.23%, n=285). NeuN+ stanice čine 65.41 \pm 5.44% svih stanica. Zanimljiv podatak je da većina SOX2+ i NeuN+ populacije stanica (ukupno 43.98 \pm 5.69% svih stanica) eksprimiraju oba markera, čineći specifičnu staničnu liniju koja ima oboje progenitorske i neuronalne karakteristike. Možemo pretpostaviti da ostatak SOX2+ stanica (negativnih na NeuN) predstavlja proliferativne progenitorske stanice, dok bi preostale NeuN+ i SOX2- stanice trebale biti post-mitotički neuroni koji su utišali progenitorski marker SOX2.

Primjer imunooznačenih stanica P6 korteksa korištenih u ovoj analizi je prikazan na Slici 9.



Slika 9. Imunooznačene jezgre stanica korteksa oposuma P6. Jezgre su izolirane metodom izotropne frakcionacije. Jezgre su obilježene primarnim protutijelima anti-SOX2 (zeleno) i anti-NeuN (crveno), a jezgre su obilježene nuklearnim interkalatorom Hoechst (plavo). Puna strelica označava primjer dvostruko pozitivne jezgre NeuN/SOX2+.

4.4. Analiza preklapanja proliferacije i progenitorskih stanica

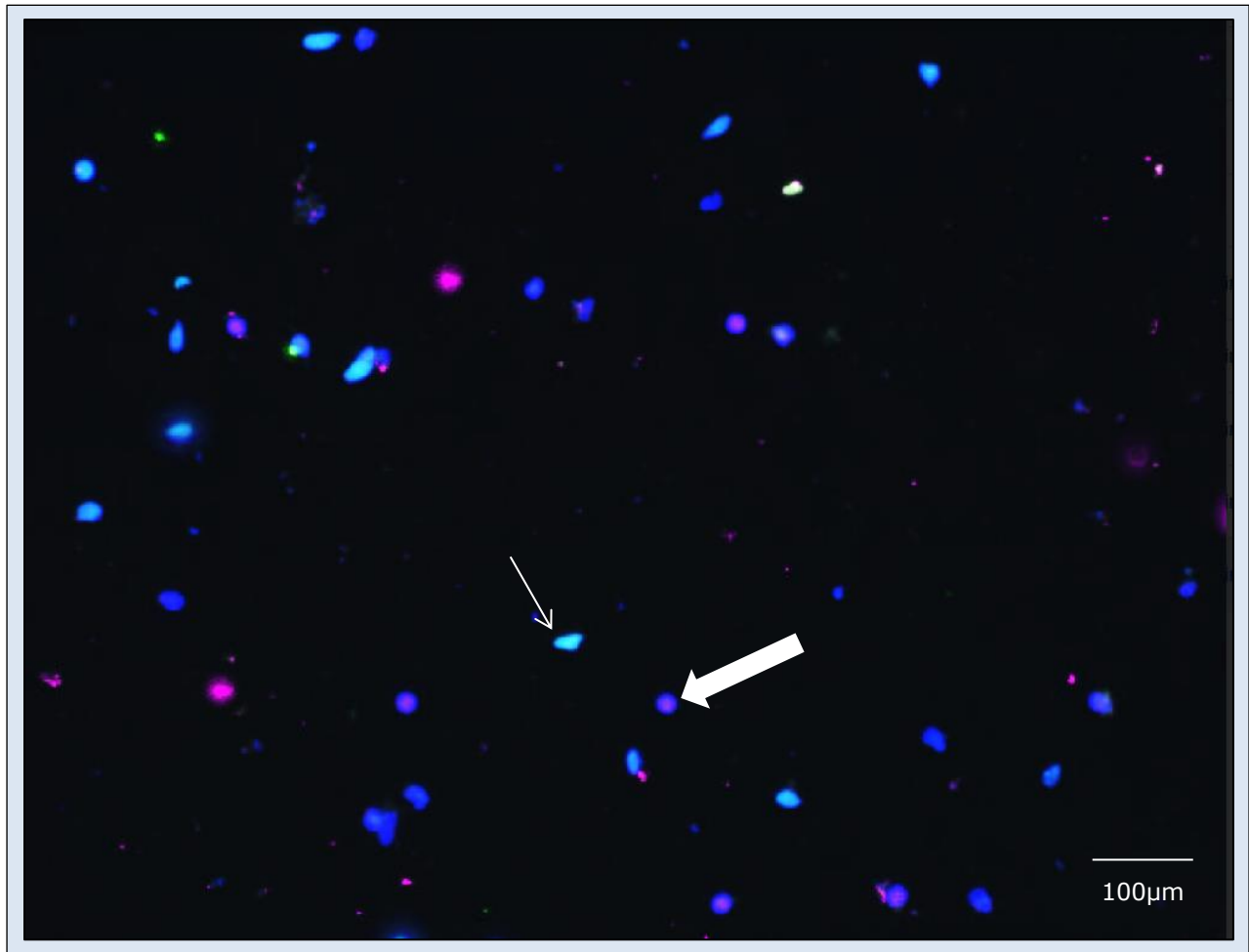
Analiza preklapanja proliferacije i progenitorskih stanica odrađena je u cilju potvrde da se radi o istim stanicama. Kao marker progenitorskih stanica smo koristili marker SOX2, a kao marker proliferacije Ki-67. Obzirom da je životinjski model korišten u ovom istraživanju bio oposum, čija stanična kompozicija je u velikoj većini dostupne literature još neistražena, postavili smo hipotezu da je ovim eksperimentom potencijalno moguće dokazati populaciju stanica koje su progenitorske, ali ne pokazuju proliferacijske karakteristike, ili populaciju stanica koje su proliferacijskog karaktera, ali nisu progenitori.

4.4.1. Validacija nuklearnih markera SOX2 i Ki-67

Nakon izotropne frakcionacije, slikali smo i analizirali stanice invertnim fluorescentnim mikroskopom (Olympus IX83 opremljen Hamamatsu Orca R2 CCD kamerom i CellSens softverom). Nakon slikanja, prebrojali smo stanice ImageJ programom (Slika 10). Slikali smo 5 finalnih slika po minimum 20 stanica. Za svaku finalnu sliku pribavljena je kolekcija 10-ak slika (eng. *Z stacks*) s razmakom od 1 μm između optičkih sekcija. Za svaku sljedeću tablicu prikazane su srednje vrijednosti prebrojanih stanica pojedine finalne slike.

Tablica 11. Kvantificirane stanice korteksa oposuma P6 pozitivne na neuralne markere SOX2 i Ki-67. Hoechst predstavlja broj stanica, SOX2+ su stanice pozitivne na SOX2, Ki-67+ su stanice pozitivne na Ki-67. Oznaka *double+* označava dvostruko pozitivne stanice (eng. *double positive*). Vrijednosti u postocima se odnose na srednju vrijednost postotaka svih pojedinačnih brojanja \pm standardna pogreška.

Hoechst	SOX2+	Ki-67+	double +	%SOX2	%Ki-67	%double+
199	132	107	80	67.80 \pm 3.45	54.79 \pm 4.27	40.54 \pm 1.89



Slika 10. Imunooznačene jezgre stanica korteksa oposuma P6. Jezgre su izolirane metodom izotropne frakcionacije. Jezgre su obilježene primarnim protutijelima anti-SOX2 (zeleno), anti-Ki-67 (*far red*) i Hoechst (plavo). Tanka strelica označava primjer SOX2 pozitivne, ali Ki-67 negativne jezgre. Puna strelica označava primjer dvostruko pozitivne jezgre SOX2+/Ki-67+. Mjerilo 100 μm .

Dobiveni rezultati pokazuju da broj SOX2+ stanica i Ki-67+ stanica nije isti. SOX2+ stanice, koje predstavljaju progenitorske stanice korteksa, pridonose $67,80 \pm 3.45\%$ ukupnom broju stanica. Ki-67+ stanice, koje predstavljaju proliferativne stanice, pridonose $54,79 \pm 4.27\%$ ukupnom broju stanica. SOX2+ i Ki-67+ dvostruko pozitivne stanice bi stoga mogle biti nezreli/rano diferencirani neuroni, poput SOX2+ NeuN+ dvostruko pozitivnih stanica iz prethodnog eksperimenta. Nažalost, nije bilo moguće provjeriti kombinaciju

Ki-67 i NeuN markera jer su oba protutijela proizvedena u istom domaćinu. Na osnovu dobivenih rezultata možemo zaključiti da u oposumima postoji specifična populacija tranzijentnih stanica koje koeksprimiraju proliferativne, progenitorske i neuronske markere.

5. RASPRAVA

Rezultati analize tjelesne mase, mase mozga i korteksa oposuma *M. domestica* pokazali su da one rastu tijekom razvoja, te da se u tri ispitane dobne skupine (P6, P18 i P34-35) omjeri bitno razlikuju. Omjer mase tijela i mozga gotovo se udvostručuje u ranom razvoju tijekom prva dva postnatalna tjedna (od P6 do P18), a nakon toga se smanjuje težeći prema konstantnoj vrijednosti (P34-35). Analizom tjelesne mase oposuma uviđamo odstupanja u odnosu na literaturu. U ovom radu korišteni su oposumi postnatalne dobi P6, P18, P34 i P35, dok u dostupnoj usporednoj literaturi *Seelke i sur., 2013.* (5) istraživanja su provedena na oposumima postnatalne dobi P18, P35, P180, P270-365 i P>365, i to po 5 oposuma iste dobne kategorije i oba spola, dok smo mi koristili jedan oposum muškog spola po svakoj dobnoj kategoriji. Mase tijela oposuma P18 iz rada *Seelke i sur., 2013.* imaju raspon od 2 do 3 g, dok oposumi korišteni u našem laboratoriju pri dobi P18 pokazuju tjelesnu masu manju od 2 g (1.75 ± 0.10 g, mjereno na najmanje 10 oposuma oba spola iz najmanje 3 različita legla) (37). Također oposumi P35 u našem laboratoriju nikad ne prelaze tjelesnu masu od 7 g, dok su *Seelke i sur., 2013.* zabilježili vrijednosti i do 9 g. Ova odstupanja u tjelesnoj masi mogu dovesti i do razlika u bojanjima kako apsolutnog broja stanica, tako i neurona korteksa. Interesatan podatak je da za razliku od tjelesne mase, mase mozga za P18 (0.115 g) i P35 (0.371 g) ne pokazuju značajna odstupanja u odnosu na *Seelke i sur., 2013.* (0.119 g za P18 i 0.345 g za P35). Stoga se niži dobiveni omjeri moždane i tjelesne mase (0.0522 za P18 i 0.0503 za P35) u radu *Seelke i sur., 2013.* odnosu na naše dobivene vrijednosti (0.0786 za P18 i 0.0703 za P35) mogu pripisati razlici u tjelesnoj težini, a ne masi mozga.

Omjer mase korteksa i mozga najviši je u ranim počecima razvoja (P6) te varira u ostalim dobima, no međutim zbog iznimno malih dimenzija korteksa (za P6 masa korteksa iznosi svega 0,007 g) dobivene preliminarne rezultate treba uzeti s oprezom. U svakom slučaju, rast korteksa u ove tri dobne skupine prolazi kroz različite stope rasta.

Rezultati analize stanične kompozicije korteksa pokazuju da apsolutni broj stanica značajno raste kroz razvoj od P6 do P34. Rezultati dobiveni za postnatalnu dob P35 treba prihvatiti kao moguću grešku u provedbi tog eksperimenta. Broj neurona također pokazuje linearni rast kroz razvoj do P34. S obzirom da je došlo do anomalije u rezultatima apsolutnog broja za P35, također se posljedično trebaju uzeti s oprezom dobiveni rezultati za apsolutan broj neurona i ne-neuronalnih stanica za tu dob.

Moguće objašnjenje za odstupanja u rezultatima brojanja između P34 i P35 jesu greške prilikom uspostave IFR metode i ručnog brojanja stanica pomoću ImageJ programa. Iako IFR metoda ima prednosti, trebaju se uzeti u obzir nedostaci i ograničenja. Pošto kvantifikacija uključuje samo neokrznute stanične jezgre, svako oštećenje ili gubitak jezgara tijekom postupka može rezultirati u varijabilnosti prilikom određivanja kako apsolutnog broja stanica, tako i neurona. Nadalje, pošto smo u ovom istraživanju koristili samo jedan oposum po svakoj dobnoj kategoriji, trebamo uzeti u obzir individualnu varijabilnost unutar istog legla i različitih legla primarnih kultura. P34 i P35 su nominalni dani – podatak o točnom vremenu rođenja nije dostupan i stoga je moguće da nedostatak ovih podataka igra ulogu u točnoj karakterizaciji i podobnijoj interpretaciji rezultata. Najveći izvor eksperimentalne pogreške u ovoj metodi predstavlja reprezentativnost frakcije koja se uzima za brojanje. Moguće je da se prilikom pipetiranja ne uzme homogena frakcija i/ili da se prilikom pipetiranja jezgri na hemocitometar otopina ne raspodijeli ravnomjerno. Dobivena eksperimentalna greška (u ovom slučaju značajno niži apsolutni brojevi

stanica u frakciji korištenoj za brojanje) se dodatno množi prilikom izračuna konačnog (apsolutnog) broja stanica za cijeli mozak.

U usporedbi sa *Seelke i sur., 2013.*, došlo je do značajnih odstupanja za sve dobivene vrijednosti, ali je potvrđen trend rasta ukupnog broja ne-neuronalnih stanica od P18 do P34, što se može pripisati gliogenezi koja počinje nakon P18 i nastavlja se u sljedećim tjednima (20).

Gustoća svih stanica u korteksu bila je najveća pri P18, a zatim pada do P34. Međutim, pri P35 ovaj broj opet opada što nije u skladu sa literaturom te je još jedan razlog zašto se brojanje u P35 ne treba uzimati kao značajan. Broj neurona raste kroz razvoj, dok postotak i gustoća neurona opada kroz dob (Slika 8.) što sugerira da je rast korteksa posljedica dodavanja „ne-neuronalnih“ stanica i da se prirodno odumiranje neuronalnih stanica događa prije P18. Povećanje populacije „ne-neuronalnih“ stanica je u skladu sa literaturom i nije iznenađujuće pošto je uzorkovana dob od P18 hipotetska dob u kojoj se događa vrhunac kortikalne neurogeneze, nakon koje slijedi proces gliogeneze unutar korteksa (15,20). Ovu tvrdnju osporavaju i rezultati gustoće stanične populacije „ne-neuronalnih“ stanica, koja je najviša pri P18, te se zatim smanjuje do P34. Relativno velik udio glija stanica u korteksu oposuma sugerira da se njihov SŽS može u velikoj mjeri oslanjati na glijalne stanice (kao što su to npr. astrociti) za pomoć u sinaptičkom prijenosu. Ova bi hipoteza mogla biti istražena primjenom IFR metode nakon uspostave nuklearnih markera za različite vrste glija stanica, oput mikroglije, oligodendrocita i astrocita. Navedene studije mogle bi nas dovesti do većeg razumijevanja kako populacije neurona i glija međusobno djeluju i kako te interakcije mogu utjecati na neuronalnu obradu (5,6).

Bitno je napomenuti da je marker korišten za obilježavanje i određivanje neurona u ovom radu bio NeuN. NeuN je marker postmitotičkih neurona (25), što znači da nije eksprimiran u prekursorskim stanicama, već samo u neuronima koji izlaze iz staničnog ciklusa (38,39). Iz toga razloga, veliki udio NeuN pozitivnih stanica tijekom ranog razvoja nije rezultat obilježavanja nezrelih tipova stanica. Nadalje, postoje tipovi neurona koje NeuN ne obilježava (25), iako se to ne odnosi na kortikalne neurone, a djelotvornost NeuN-a nije dobro karakterizirana u mozgu mnogih različitih životinja u kojih je korištena je tehnika izotropne frakcionacije. Ta se ograničenja moraju uzeti u obzir prilikom tumačenja naših podataka. Konačno, kao što je već prethodno spomenuto, metoda izotropne frakcionacije koristi disocirane stanične jezgre za generiranje podataka o broju i gustoći stanica unutar strukture korteksa. Budući da su tijekom procesa homogenizacije uklonjene sve stanične membrane, aksoni i dendriti, ova tehnika ne može pružiti nikakve konkretne informacije o veličini, obliku, te izvanstaničnim prostorima ili vezama između cijelih stanica i neurona.

Postoji još nekoliko važnih upozorenja koja se moraju uzeti u obzir prilikom tumačenja podataka koji se koriste NeuN-om kao neuronalnim markerom u različitim tkivima i u različitim vrstama. Prvo, NeuN ne uspijeva označiti nekoliko vrsta neurona u mozgu odrasle osobe, poput mitralnih stanica u olfaktornom bulbusu, retinalni fotoreceptori i Purkinjeove stanice u malom mozgu (25). Drugo, NeuN ne uspijeva obilježiti neke skupine postmitotičkih neurona, poput stanica VIa sloja u neokorteksu (40) i interneurona ne-granularnih stanica u malom mozgu miša (41) do kasnije razvojne dobi. Posljednja istraga također ukazuje na to da izražaj NeuN-a tijekom razvoja može ovisiti o fiziološkom statusu neurona u razvoju (41). Dakle, studije koji koriste NeuN za ispitivanje uzoraka staničnog sastava u višestrukim razvojnim vremenskim točkama moraju se tumačiti oprezno. Konačno, iako postoje dobri dokazi da NeuN označava neurone u živčanom tkivu odraslih

sisavaca i u uporabi metodologije izotropnog frakcionatora u preko 30 vrsta (42–45), vjerojatno postoji specifična razlika u uzorku označavanja. Usporedne studije o određenim detaljima obrazaca označavanja pomoću NeuN-a za vrste koje nisu miševi i štakori važni su za preciznu interpretaciju podataka pomoću ove metodologije.

Rezultati ispitivanja ekspresijskih markera SOX2 i NeuN na oposumu P6 pokazali su koekspresiju markera, gdje u prvom brojanju SOX2/NeuN duplo pozitivne stanice čine trećinu svih stanica, a u drugom brojanju polovicu. Obzirom da je funkcija SOX2 proteina održavanje pluripotencije u matičnim stanicama (27,28), ispitivanje je bilo u cilju dokazivanja da ekspresija SOX2+ stanica neće biti zajednička sa NeuN-om, obzirom da je NeuN marker post-mitotičkih, već diferenciranih neurona. Ovi podaci se mogu interpretirati pretpostavkom da SOX2/NeuN dvostruko pozitivna stanična populacija reprezentira nezrele neurone čije je gensko utišavanje SOX2 proteina sporije nego u slučaju glodavaca, implicirajući dulji period neurogeneze i općenito sporijeg postnatalnog razvoja. Funkcija SOX2 mogla bi biti puno kompleksnija nego što je do sad razmotreno, te uloga kao transkripcijski faktor mogla bi biti različita ovisno o vremenskom razdoblju ispitivanja, kao i o različitoj fazi u kojoj se stanica nalazi prilikom ispitivanja (proliferativna matična ili diferencirana stanica). Ova bi pretpostavka mogla biti istražena primjenom različitih kombinacija protutijela koja nisu anti-Neun i anti-SOX2, kako bi se dokazale jasne razlike između populacija diferenciranih neurona od njihovih prekursorskih matičnih stanica. Postojanje SOX2 pozitivnih neurona je nedavno dokazano u radu objavljenog od strane *Mercurio i sur., 2019.* (46).

Testiranje anti-Ki-67 i anti-SOX2 protutijela na oposumu P6 pokazali su koekspresiju markera, gdje se u brojanju pokazalo da Ki-67/SOX2 dvostruko pozitivne stanice čine oko 40% ukupnih prebrojanih stanica. Obzirom da je funkcija SOX2 proteina održavanje pluripotencije u matičnim i

progenitorskim stanicama (21,28), ispitivanje je bilo u cilju dokazivanja da ekspresija SOX2+ stanica neće biti zajednička sa Ki-67, pošto je Ki-67 marker mitotičkih stanica koje proliferiraju.

Obzirom da je stanična kompozicija korteksa oposuma u velikoj većini dostupne literature još neistražena, postavili smo hipotezu da je ovim eksperimentom potencijalno moguće dokazati populaciju stanica koje su progenitorske, ali ne pokazuju proliferacijske karakteristike, ili populaciju stanica koje su proliferacijskog karaktera, ali nisu progenitori. Iako je dokazana takva populacija, rezultati nisu zadovoljavajući pošto je provedeno samo jedno brojanje te su stoga potrebna dodatna ispitivanja validacije IFR metode koristeći ovu kombinaciju ekspresijskih markera. Osim toga, nema objavljenih istraživanja s kojim bi se mogli potvrditi i usporediti naši rezultate u području Ki-67/SOX2 koekspresije.

6. ZAKLJUČAK

Kvantifikacija broja stanica moždanog korteksa u životinjskom modelu oposuma mogla bi pridonijeti novim otkrićima u području istraživanja neuroregeneracije u sisavaca. Pomoću IFR i fluorescentne mikroskopije ispitali smo ekspresijske markere na različitim dobima postnatalnog oposuma u cilju kvantifikacije apsolutnog broja stanica, broja neurona i „ne-neuronalnih“ stanica. Uporabom interkalirajućeg fluorescentnog spoja Hoechst i nuklearnog markera NeuN, otkrili smo da je apsolutni broj stanica i broj neurona rastu kroz razvoj, ali najznačajniji porast pokazuju one „ne-neuronalne“. Ovo zapažanje nas upućuje da bi nova istraživanja ove populacije stanica mogla biti vrlo bitna u shvaćanju sposobnosti SŽS-a oposuma i njegove neuroregeneracije. Iako se se NeuN kao marker postmitotičkih neurona pokazao diskutabilni, obzirom da je pokazao koeskpresiju sa SOX2 markerom, mogući je razlog još neistražena populacija stanica u korteksu oposuma, a potporu ovoj hipotezi daju i novija istraživanja na miševima u kojima se potvrdila ekspresija SOX2 u postmitotičkim talamičkim neuronima. Ispitivanjem preklapanja proliferacije i progenitorskih stanica pomoću markera SOX2 i Ki-67, dokazana je prisutnost stanica koje su moguće progenitorske, ali ne pokazuju proliferacijske karakteristike, ili moguću populaciju stanica koje su proliferacijskog karaktera, ali ne progenitorskog. Ova saznanja upućuju na visoku relevantnost sakupljanja podataka o staničnim linijama i njihovim funkcijama u korteksu postnatalnog oposuma. Uspostava metode optimizirane homogenizacije mogla bi imati izravnu primjenu u dijagnostici, npr. kvantitativna analiza stanica (neurona, matičnih ili glijanih stanica) te proliferativnog statusa na post-operativnim uzorcima tumora mozga korištenjem postojećih (npr. Ki-67) ili dodatnih markera (SOX2, SOX9, NeuN). Time bi se omogućila usporedba zdravog tkiva sa tumorskim ili

neurodegenerativnim poremećajima. Bolja karakterizacija NSC nužna je za razvoj efikasnijih metoda i protokola u staničnoj terapiji.

7. LITERATURA

1. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, et al. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol.* 2009;513(5):532–41.
2. Collins CE, Young NA, Flaherty DK, Airey DC, Kaas JH. A rapid and reliable method of counting neurons and other cells in brain tissue: A comparison of flow cytometry and manual counting methods. *Front Neuroanat.* 2010;4(FEB):10–5.
3. Mladinic M, Muller KJ, Nicholls JG. Central nervous system regeneration: From leech to opossum. *J Physiol.* 2009;587(12):2775–82.
4. Nicholls JG, Stewart RR, Erulkar SD, Saunders NR. Reflexes, fictive respiration and cell division in the brain and spinal cord of the newborn opossum, *Monodelphis domestica*, isolated and maintained in vitro. *J Exp Biol.* 1990;152:1–15.
5. Seelke AMH, Dooley JC, Krubitzer LA. Differential changes in the cellular composition of the developing marsupial brain. *J Comp Neurol.* 2013;521(11).
6. Seelke AMH, Dooley JC, Krubitzer LA. The cellular composition of the marsupial neocortex. *J Comp Neurol.* 2014;522(10).
7. Dietz V, Schwab ME. From the Rodent Spinal Cord Injury Model to Human Application: Promises and Challenges. *J Neurotrauma.* 2017;34(9):1826–30.
8. De Juan Romero C, Borrell V. Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia.* 2015;63(8):1303–19.
9. Bandeira F, Lent R, Herculano-Houzel S. Changing numbers of neuronal and non-neuronal cells underlie postnatal brain growth in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14108–13.
10. Kriegstein A, Noctor S, Martínez-Cerdeño V. Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(11):883–90.
11. Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. Vol. 591, *FEBS Letters.* 2017.
12. Rakic P. Evolution of the neocortex: A perspective from developmental biology. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2009;10(10):724–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrn2719>

13. Lois C, Alvarez-Buylla A. Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(5):2074–7.
14. Baizabal JM, Furlan-Magaril M, Santa-Olalla J, Covarrubias L. Neural stem cells in development and regenerative medicine. *Arch Med Res*. 2003;34(6):572–88.
15. Cheung AFP, Kondo S, Abdel-Mannan O, Chodroff RA, Sirey TM, Bluy LE, et al. The subventricular zone is the developmental milestone of a 6-layered neocortex: Comparisons in metatherian and eutherian mammals. *Cereb Cortex*. 2010;20(5):1071–81.
16. Llorca A, Marín O. Orchestrated freedom: new insights into cortical neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol*. 2021;66:48–56.
17. Qian X, Shen Q, Goderie SK, He W, Capela A, Davis AA, et al. Timing of CNS Cell Generation. *Neuron*. 2000;28(1):69–80.
18. Bartkowska K, Gajerska M, Turlejski K, Djavadian RL. Expression of TrkC Receptors in the Developing Brain of the Monodelphis opossum and Its Effect on the Development of Cortical Cells. *PLoS One*. 2013;8(9):1–14.
19. Voss RS, Jansa SA. Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *Bull Am Museum Nat Hist*. 2009;(322):1–177.
20. Puzzolo E, Mallamaci A. Cortico-cerebral histogenesis in the opossum *Monodelphis domestica*: Generation of a hexalaminar neocortex in the absence of a basal proliferative compartment. *Neural Dev*. 2010;5(1):1–18.
21. Cardoso-Moreira M, Halbert J, Valloton D, Velten B, Chen C, Shao Y, et al. Gene expression across mammalian organ development. *Nature* [Internet]. 2019;571(7766):505–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-019-1338-5>
22. Dooley JC, Franca JG, Seelke AMH, Cooke DF, Krubitzer LA. A connection to the past: *Monodelphis domestica* provides insight into the organization and connectivity of the brains of early mammals. *J Comp Neurol*. 2013;521(17):3877–97.
23. Saunders NR, Adam E, Reader M, Møllgård K. *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum): an accessible model for studies of early neocortical development. *Anat Embryol (Berl)*. 1989;180(3):227–36.
24. Dos Santos SE, Porfirio J, Da Cunha FB, Manger PR, Tavares W, Pessoa

- L, et al. Cellular Scaling Rules for the Brains of Marsupials: Not as "primitive" as Expected. *Brain Behav Evol.* 2017;89(1):48–63.
25. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN , a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. 1992;211:201–11.
 26. Chew LJ, Gallo V. The Yin and Yang of Sox proteins: Activation and repression in development and disease. *J Neurosci Res.* 2009;87(15):3277–87.
 27. Zhang S. Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells.* 2014;6(3):305.
 28. Sarkar A, Hochedlinger K. The Sox family of transcription factors: Versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2013;12(1):15–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.007>
 29. Vinci L, Ravarino A, Fanos V, Naccarato AG, Senes G, Gerosa C, et al. Immunohistochemical markers of neural progenitor cells in the early embryonic human cerebral cortex. *Eur J Histochem.* 2016;60(1):13–9.
 30. Bani-yaghoub M, Tremblay RG, Lei JX, Zhang D, Zurakowski B, Sandhu JK, et al. Role of Sox2 in the development of the mouse neocortex. 2006;295:52–66.
 31. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175–86.
 32. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000;182(3):311–22.
 33. Tian Y, Lei L, Minden A. A key role for Pak4 in proliferation and differentiation of neural progenitor cells. *Dev Biol* [Internet]. 2011;353(2):206–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.02.026>
 34. Engel AK, Singer W, Yuan B, Chess A, Wong AM, Axel R, et al. Regulation of Cerebral Cortical Size by Control of Cell Cycle Exit in Neural Precursors. 2002;297(July):365–70.
 35. Herculano-Houzel S, von Bartheld CS, Miller DJ, Kaas JH. How to count cells: the advantages and disadvantages of the isotropic fractionator compared with stereology. Vol. 360, *Cell and Tissue Research.* 2015.
 36. Herculano-Houzel S, Lent R. Isotropic fractionator: A simple, rapid method for the quantification of total cell and neuron numbers in the brain. *J Neurosci.* 2005;25(10):2518–21.

37. Petrović A, Ban J, Tomljanović I, Pongrac M, Ivaničić M, Mikašinović S, et al. Establishment of Long-Term Primary Cortical Neuronal Cultures From Neonatal Opossum *Monodelphis domestica*. *Front Cell Neurosci.* 2021;15:661492.
38. Martínez-Cerdeño V, Cunningham CL, Camacho J, Antczak JL, Prakash AN, Cziep ME, et al. Comparative analysis of the subventricular zone in rat, ferret and macaque: Evidence for an outer subventricular zone in rodents. *PLoS One.* 2012;7(1).
39. Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR. Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol.* 2008;508(1):28–44.
40. Lyck L, Krøigård T, Finsen B. Unbiased cell quantification reveals a continued increase in the number of neocortical neurones during early post-natal development in mice. *Eur J Neurosci.* 2007;26(7):1749–64.
41. Weyer A, Schilling K. Developmental and cell type-specific expression of the neuronal marker NeuN in the murine cerebellum. *J Neurosci Res.* 2003;73(3):400–9.
42. Collins CE, Airey DC, Young NA, Leitch DB, Kaas JH. Neuron densities vary across and within cortical areas in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(36):15927–32.
43. Burish MJ, Peebles JK, Baldwin MK, Tavares L, Kaas JH, Herculano-Houzel S. Cellular scaling rules for primate spinal cords. *Brain Behav Evol.* 2010;76(1):45–59.
44. Sarko DK, Catania KC, Leitch DB, Kaas JH, Herculano-Houzel S. Cellular scaling rules of insectivore brains. *Front Neuroanat.* 2009;3(JUN).
45. Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. How to build a bigger brain: Cellular scaling rules for rodent brains. *Evol Nerv Syst.* 2007;3(32):155–66.
46. Mercurio S, Serra L, Nicolis SK. More than just stem cells: Functional roles of the transcription factor Sox2 in differentiated glia and neurons. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).

8. ŽIVOTOPIS



Carla Marion

Datum rođenja: 06. kolovoza 1997. | **Spol** Žensko | carla.marion97@gmail.com | carla.marion@student.uniri.hr | Matteo Benussi Cio 6, 52440, Poreč, Hrvatska

● OBRAZOVANJE I OSPOBLJAVANJE

2019 – 2021 – Rijeka, Hrvatska
DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ "ISTRAŽIVANJE I RAZVOJ LIJEKOVA" – Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

OŽUJKA 2020. – SRPNJA 2020. – Foggia, Italija
ERAMSUS STUDENTICA - PROGRAM "SCIENZE BIOMOLECOLARI" – Sveučilište u Foggii, Odjel za eksperimentalnu medicinu

2016 – 2019 – Rijeka, Hrvatska
SVEUČILIŠNA PRVOSTUPNICA BIOTEHNOLOGIJE I ISTRAŽIVANJA LIJEKOVA – Sveučilište u Rijeci, Odjel za biotehnologiju

2012 – 2016 – Pazin, Hrvatska
SREDNJOŠKOLSKA DIPLOMA - OPĆA GIMNAZIJA – Gimnazija i strukovna škola Jurja Dobrile

2004 – 2012 – Poreč, Hrvatska
OSNOVNOŠKOLSKA DIPLOMA – Talijanska škola Bernardo Parentin

● RADNO ISKUSTVO

30. LIPNJA 2020. – 12. SRPNJA 2021. – Rijeka
DOPREDSJEDNICA – UDRUGA STUDENATA BIOTEHNOLOGIJE SVEUČILIŠTA U RIJECI, USBRI

● JEZIČNE VJEŠTINE

Materinski jezik/jezici: TALIJANSKI | HRVATSKI

Drugi jezici:

	RAZUMIJEVANJE		GOVOR		PISANJE
	Slušanje	Čitanje	Govorna produkcija	Govorna interakcija	
ENGLESKI	C2	C2	C1	C1	C1

Razine: A1 i A2: temeljni korisnik; B1 i B2: samostalni korisnik; C1 i C2: iskusni korisnik

● DIGITALNE VJEŠTINE

Microsoft/Microsoft Office | R and Rstudio | Avogadro, UCSF Chimera, PyMol, Marvin, Vina, VMD, NAMD, Cresset Spark | Orange | ImageJ Fiji | GraphPad Prism

● PUBLIKACIJE

DISC1 as an important protein involved in the process of neurodevelopment

<https://repository.biotech.uniri.hr/Islandora/object/biotechri:409> – 2019

Završni rad, mentor: doc. dr. sc. Nicholas J. Bradshaw

● KONFERENCIJE I SEMINARI

21. LIPNJA 2021. – 30. LIPNJA 2021. – Odjel za biotehnologiju, Rijeka

Prvi simpozij studenata biotehnologije "PosterI"

Nagrada za drugi najbolje izrađen i prezentiran znanstveni poster u kategoriji "Diplomski sveučilišni studij"

Tema postera: "Cijepljenje kao strategija za liječenje antimikrobne rezistencije"

18. SVIBNJA 2021. – Online

Konferencija "3D Cell Culture & Organoids"

16. STUDENOGA 2020. – 20. STUDENOGA 2020. – Odjel za biotehnologiju, Rijeka

Konferencija "Budućnost i perspektiva"

● VOLONTIRANJE

2016 – 2021

Student mentor

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci, USBRI

2020 – 2021

Studentske poduke za maturante

Udruga studenata biotehnologije Sveučilišta u Rijeci, USBRI

2020

Evaluator studentskih projekta

Studentski zbor Sveučilišta u Rijeci, SZSUR

● VOZAČKA DOZVOLA

Vozačka dozvola: AM

Vozačka dozvola: B