

Utjecaj različitih trajnih pokrivala na rezultate imunohistokemijske analize

Vuković, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:163334>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Kristina Vuković

**UTJECAJ RAZLIČITIH TRAJNIH
POKRIVALA NA REZULTATE
IMUNOHISTOKEMIJSKE ANALIZE**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

**DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO
LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA**

Kristina Vuković

**UTJECAJ RAZLIČITIH TRAJNIH
POKRIVALA NA REZULTATE
IMUNOHISTOKEMIJSKE ANALIZE**

Diplomski rad

Osijek, 2020.

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

Mentor rada: doc. dr. sc. Barbara Vilječić

Rad ima 42 lista, 3 tablice i 15 slika.

Posebna zahvala mojoj mentorici, doc. dr. sc. Barbari Viljetić na savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Hvala profesoricama Ljubici Nedić i Sandi Kamberović na lektoriranju ovoga rada.

Mojoj obitelji, Marijanu i prijateljima veliko hvala na ohrabrivanju i potpori tijekom cijelog mog obrazovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stanična membrana i lipidne splavi	1
1.2. Gangliozidi	2
1.3. Proteini stanične membrane.....	5
1.4. Trajna pokrivala	7
2. HIPOTEZA	10
3. CILJEVI	11
4. MATERIJALI I METODE	12
4.1. Ustroj studije.....	12
4.2. Materijal (Ispitanici)	12
4.2.1. Pokusne životinje	12
4.2.2. Kemikalije	12
4.3. Metode	13
4.3.1. Žrtvovanje pokusnih životinja	13
4.3.2. Rezanje mozga na kriostatu	14
4.3.3. Imunohistokemija	14
4.4. Statistička analiza	15
5. REZULTATI.....	16
6. RASPRAVA.....	31
7. ZAKLJUČAK.....	34
8. SAŽETAK.....	35
9. SUMMARY.....	36
10. LITERATURA.....	37
11. ŽIVOTOPIS.....	42

POPIS KRATICA

0h – 0 sati

24h – 24 sata

28D – 28 dana

2h – 2 sata

7D – 7 dana

DPX – dibutilftalat ksilen (engl. *dibutylphthalate polystyrene xylene*)

GABA – gama aminomaslačna kiselina (engl. *Gamma Aminobutyric Acid*)

GL – granularni sloj (engl. *granular layer*)

GPI – glikozilfosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)

ML – molekularni sloj (engl. *molecular layer*)

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

PFA – paraformaldehid

RI – indeks loma (engl. *refractive index*)

TBS – tris pufer (engl. *tris-buffered saline*)

UDP – uridin difosfat (engl. *uridine diphosphate*)

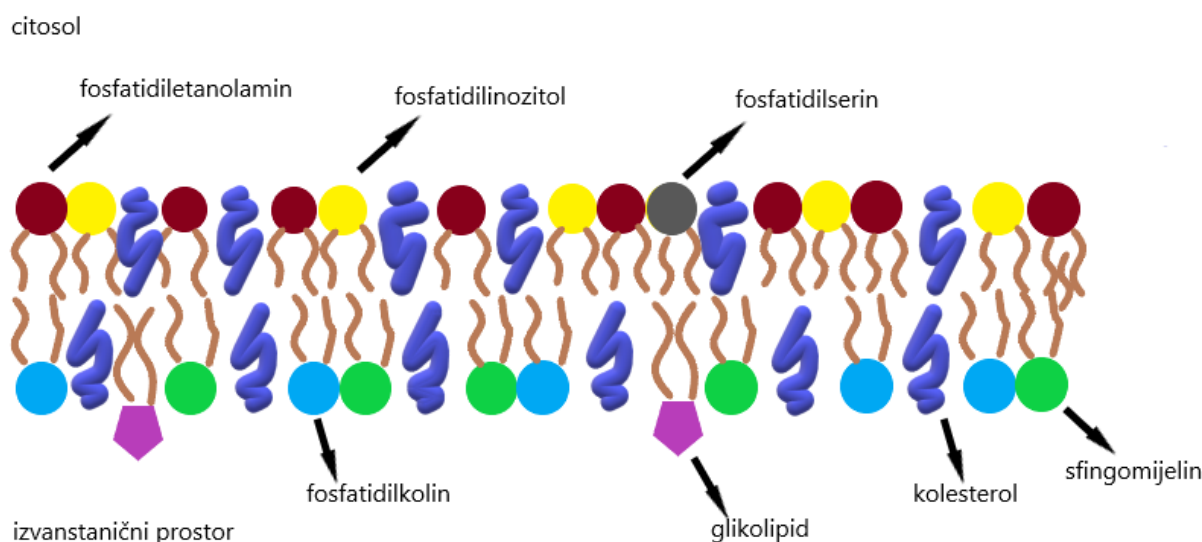
WM – bijela tvar (engl. *white matter*)

WT – divlji tip (engl. *wild type*)

1. UVOD

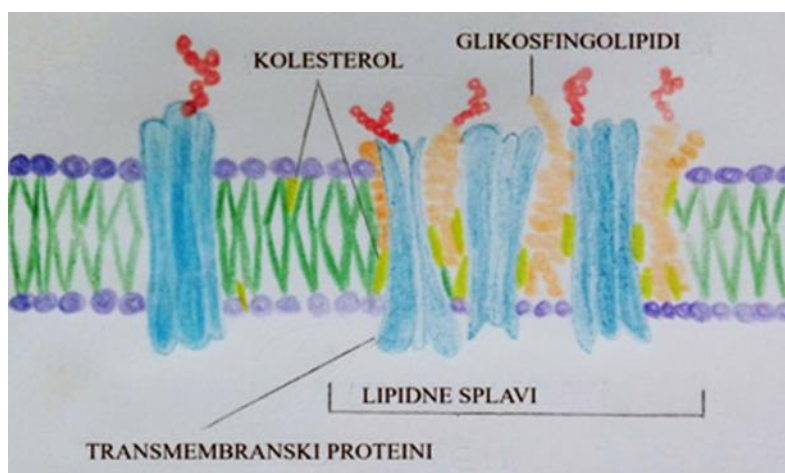
1.1. Stanična membrana i lipidne splavi

Stanična membrana je struktura koja okružuje stanicu i odjeljuje izvanstanični od unutarstaničnog prostora. Služi kao selektivna barijera za prolazak molekula te na taj način određuje sastav citoplazmatske tekućine pa je zbog toga jedna od najbitnijih struktura u staničnoj evoluciji (1). Sastoji se od fosfolipidnog dvosloja koji je nepropustan za molekule topljive u vodi te proteina umetnutih u dvosloj čija je uloga komunikacija s okolnim stanicama i transport molekula u stanicu i izvan stanice (1, 2). Fosfolipidni dvosloj nije jednako građen u svim svojim dijelovima. Vanjski sloj je sastavljen od fosfatidilkolina, sfingomijelina i glikolipida čiji je ugljikohidratni dio okrenut prema staničnoj površini, dok unutarnji čine fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin i fosfatidilinozitol (1, 3) (Slika 1.1.). Fosfolipidi su amfipatske molekule i sastavljene su od dviju hidrofobnih masnih kiselina vezanih na hidrofilni dio koji sadrži fosfat (1). Važna komponenta stanične membrane je i kolesterol, koji se nalazi u oba sloja i molarnim dijelom zauzima gotovo jednako kao i fosfolipidi te ima bitan utjecaj na membransku fluidnost pri različitim temperaturama (1). Osim navedene, stanična membrana obavlja još mnogo funkcija zahvaljujući proteinima koji se nalaze u njoj, a to su endocitoza, stanična adhezija i stanična signalizacija (1, 4). Također, membrana je odgovorna i za transmembranski prijenos tvari kao što su glukoza ili aminokiseline (5).



Slika 1.1. Građa stanične membrane. (Sliku izradila autorica)

Posebni dijelovi koji se mogu pronaći unutar fosfolipidnog dvosloja su lipidne splavi i u odnosu na dvosloj, one su znatno uređenije. Lipidne splavi su male polukrute domene čija je točka taljenja drukčija od točke taljenja fosfolipida zbog čega se one mogu lako detektirati prikladnim metodama, primjerice pomoću dvofotonskog mikroskopa (1). Sastoje se od sfingolipida i kolesterola u vanjskom te fosfolipida i kolesterola u unutarnjem dijelu (6). Uloga lipidnih splavi je višestruka; sudjeluju u staničnoj polarizaciji, staničnoj signalizaciji te razvrstavanju i prijenosu proteina (6). Nadalje, obogaćene su proteinima s GPI-sidrom, dvostruko aciliranim proteinima kao i transmembranskim proteinima koji su ključni u procesima stanične signalizacije i endocitoze (1, 6) (Slika 1.2.).



Slika 1.2. Građa lipidnih splavi. (Sliku izradila autorica)

1.2. Gangliozidi

U vanjskom dijelu lipidnih splavi smješteni su glikosfingolipidi, amfipatske molekule koje su građene od ceramida povezanih oligosaharidnim lancima (7). Ceramid je po svojoj strukturi hidrofobna molekula i sastavljen je od masne kiseline acetilirane na sfingozin (8). Duljina lanca masne kiseline varira ovisno o stanici u kojoj se ceramid nalazi, a u stanicama sisavaca najzastupljeniji su oblici s 16-20 ugljikovih atoma te 22-24 ugljikova atoma (8). Među glikosfingolipidima koji se nalaze u lipidnim splavima, ističu se gangliozidi koji u svojoj strukturi sadrže još i jednu ili više sijalinskih kiselina (7). Zahvaljujući različitim oblicima oligosaharidnih lanaca koji se mogu vezati na glikosfingolipid, postoji preko stotinu različitih vrsta gangliozida (9).

U primjeni je nomenklatura gangliozida po Larsu Svennerholmu (10) prema kojoj se riječ „gangliozid“ označava slovom G, potom slijedi broj sijalinskih kiselina koji se označava slovom M (mono, jedan), D (di, dva), T (tri), Q (tetra, četiri) i P (penta, pet). Zatim je nadodan broj koji označava duljinu ugljikohidratnog lanca na način da se od broja pet oduzima stvarni broj šećera u lancu, primjerice GM2 ima tri šećerna ostatka. Iza broja se nalazi malo slovo koje označava broj sijalinskih kiselina vezanih na galaktozu pri čemu slovo „a“ predstavlja jednu sijalinsku kiselinu, zatim slovo „b“ predstavlja dvije sijalinske kiseline, slovo „c“ ukoliko su vezane tri ili više sijalinskih kiselina, dok slovo „o“ označava odsutnost sijalinskih kiselina (10, 11).

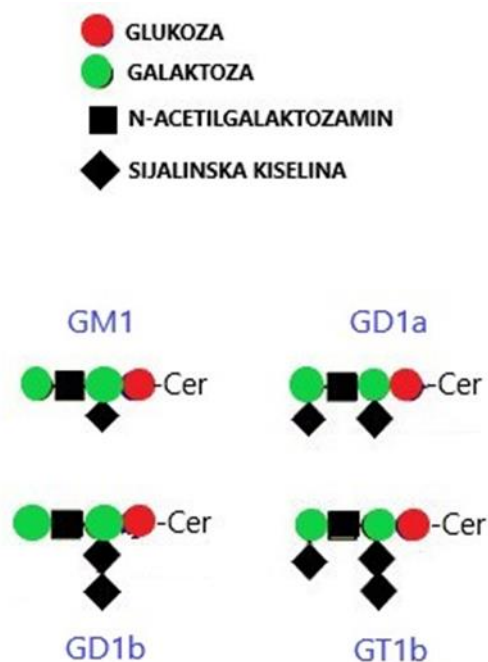
Sinteza gangliozida je proces koji se odvija u više koraka. Prije svega, ceramid se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu nizom enzimatskih reakcija iz L-serina i palmitil-CoA pa se potom prenosi u transportnim vezikulima u drugu staničnu organelu gdje će se dodatno obraditi (12). Naime, slijedi prijenos glukoze iz UDP-glukoze na ceramid posredovanjem enzima glukozilceramid sintaze te se taj korak odvija na citosolnoj strani membrane Golgijeva aparata (13). Nastali glukozilceramid se potom ubacuje u lumen Golgijeva aparata te se tu nastavlja sinteza postupnim dodavanjem monosaharida na rastući glikanski lanac pomoću enzima glikoziltransferaza (14). Glikosfingolipidi, među kojima i gangliozidi, se u konačnici transportiraju na staničnu membranu egzocitozom (12).

Kao što je već navedeno, membrane su sastavljene od proteinskog i lipidnog dijela. Njihova razgradnja, u odnosu na primjerice proteine ili glikoproteine, zahtjeva znatno složeniji sustav pa se oni razgrađuju u lizosomima i endosomima zahvaljujući čitavom nizu kompleksnih procesa (15). Osim potrebnih enzima koji su pohranjeni u navedenim staničnim organelama, za razgradnju su nužni odgovarajući pH (kiseli pH: u endosomima iznosi 5-6, u lizosomima iznosi 4,6-5) i transportni proteini (15). Lizosomska razgradnja membrane je nužna za održavanje homeostaze stanice te se produkti nastali razgradnjom ponovno iskorištavaju u staničnoj izgradnji. Nadalje, gangliozide može razgraditi i gangliozid-specifična sijalidaza Neu3 koja se nalazi na staničnoj membrani i čija je ekspresija primjerice povećana kod melanoma (16). Razgradnja gangliozida u lizosomu započinje aktivnošću enzima glikozidaze koja uklanja monosaharid s nereducirajućeg kraja glikanskog lanca (12). Svaki od sljedećih koraka zahtijeva prisutnost odgovarajućeg enzima te se odsutnost nekih od njih manifestira različitim bolestima. Primjeri su Tay-Sachsova bolest koja je uzrokovana manjkom β -heksozaminidaze A te Sandhoffova bolest koja nastaje zbog manjka β -heksozaminidaze A i

B, a kako je navedeni enzim odgovoran za razgradnju gangliozida GM2 dolazi do nakupljanja istoga (17, 18). Oboljele osobe zbog navedenih bolesti umiru u ranom djetinjstvu.

Gangliozidi su prvi puta izolirani iz moždanog tkiva 1942.godine u istraživanjima Ernsta Klenka. Najzastupljeniji su u mozgu, osobito u sivoj moždanoj tvari gdje su nužni za normalnu funkciju živčanog sustava (12). Njihova uloga je višestruka, važni su i za razvoj i regeneraciju tkiva živčanog sustava, zatim sudjeluju u onkogenezi, ontogenezi, embriogenezi, staničnom rastu, stvaranju interakcija između lipida i proteina te apoptozi (19, 20). Izvan živčanog sustava, ali u znatno manjim koncentracijama, izolirani su još i u koštanoj srži, eritrocitima, probavnom sustavu, jetri, slezeni, testisima, a gangliozid GM4 je izoliran u bubrezima te SSEA-4 (engl. *stage - specific embryonic antigen – 4*) u embrionalnim matičnim stanicama (12).

Najznačajniji porast količine gangliozida u mozgu je prisutan tijekom prvih pet godina života, kada je i najaktivniji proces mijelinizacije (21). U početnim stadijima razvitka mozga nalaze se jednostavni gangliozidi kao što su GM3 i GD3, dok u kasnijem razdoblju prevladavaju složeniji oblici, primjerice GD1a i GT1b (22). U mozgu odrasle osobe najbrojnija su sljedeća četiri gangliozida: GM1, GD1a, GD1b i GT1b (9) (Slika 1.3.).



Slika 1.3. Prikaz strukture četiri najčešća gangliozida u mozgu. (Sliku izradila autorica)

GM1 je monosijalinski gangliozid koji je esencijalna komponenta lipidnih splavi i ima važnu ulogu u staničnoj adheziji, staničnoj polarizaciji, održavanju vijabilnosti živčanih stanica te u kombinaciji s GD1a održava homeostazu Ca^+ (23, 24). Osim toga, gangliozid GM1 kao i GD1b doprinose poboljšanju sinaptičke plastičnosti u CA3 regiji hipokampusa što je povezano s procesima učenja i pamćenja (25). GD1b i GT1b su važni u neuritogenezi, neurogenezi i tipični su za zrele neurone pa se vremenom zbog starenja i propadanja njihova količina smanjuje (26).

O važnosti gangliozida i utjecaju na rad i cjelokupnost živčanog sustava najbolje pokazuju studije provedene na genetički izmijenjenim miševima, kod kojih je postojao nedostatak određene vrste gangliozida, a samim time i neuravnoteženost funkcije živčanog sustava (27). Bilo kakav poremećaj gangliozida utječe na lipidne splavi potom i na staničnu membranu te na stanicu u potpunosti što vodi nastanku mnogobrojnih bolesti.

1.3. Proteini stanične membrane

Dok su lipidi temeljni strukturni element stanične membrane, proteini su odgovorni za obavljanje funkcije membrane. Dvije su skupine membranskih proteina, to su periferni i integralni membranski proteini (1). Periferni membranski proteini su vezani elektrostatskim silama i vodikovim vezama na staničnu površinu i nisu uronjeni u staničnu membranu (28). Disociraju od membrane pod djelovanjem polarnih reagensa, primjerice otopinama s visokom pH vrijednošću ili visokom koncentracijom soli (1). Neki od perifernih membranskih proteina su spektrin i aktin, smješteni u citosolu eritrocita, dok su većina ostalih iz ove skupine proteina smješteni na vanjskoj strani stanične membrane (29). Integralni ili intrinzični membranski proteini su skupina proteina koji se oslobađaju isključivo nakon primjene postupaka kojima razbijamo staničnu membranu te se u tu svrhu rabe detergentski (1). Jedan ili više njihovih dijelova su ugrađeni u fosfolipidni dvosloj te oni sadrže hidrofobne lance koji stupaju u interakciju s masnim kiselinama fosfolipida pa su stoga jače vezani za membranu (29). Ukoliko protein prolazi kroz čitav dvosloj, riječ je o vrsti integralnih membranskih proteina, a zovu se transmembranski proteini (1).

Posebna su skupina proteini s GPI-sidrom. GPI-sidro predstavlja posttranslacijsku modifikaciju proteina glikolipidom koja se odvija u endoplazmatskom retikulumu nizom enzimatskih reakcija, a njegovim se kidanjem protein odvajaju od stanične membrane. Sastoji

se od lipidnog i glikanskog dijela, odnosno od fosfatidilinozitola, zatim glikana koji sadrži jedan glukozamin i tri manoze te terminalnog fosfoetanolamina (30). Na protein je vezan preko amidne veze između C-terminalne skupine karboksilne skupine i aminoskupine fosfoetanolamina (31). Dodavanje GPI-sidra na proteine je od velike važnosti budući da takvi proteini kasnije aktivno sudjeluju u procesima embriogeneze, razvoja, neurogeneze, fertilizacije te u pravilnom funkcioniranju imunološkog sustava (32).

Thy-1 protein jedan je od najmanjih glikoproteina na površini stanične membrane, a sastoji se od samo 110 aminokiselina s jednom V imunoglobulin domenom, vezan na staničnu membranu pomoću GPI-sidra (33). Poznat je i pod nazivom CD90 (engl. *Cluster of Differentiation 90*), a nalazi se na površini mezenhimalnih matičnih stanica, fibroblasta, neurona, hematopoetskih matičnih stanica i timocita (34). Thy-1 protein/CD90 sudjeluje u aktivaciji i regulaciji transdukcijskih puteva, regulira stanični odgovor i potpomaže stvaranje multiproteinskih kompleksa (35).

GABA receptor je transmembranski ionski kanal za koga se veže γ -aminomaslačna kiselina (GABA), neurotransmitter čijim će vezanjem doći do otvaranja kanala i propuštanja iona klorida (36, 37). GABA je najvažniji inhibicijski neurotransmitter u središnjem živčanom sustavu; svoje djelovanje nakon vezanja postiže u milisekundama i suprimira aktivnost neurona u mozgu odraslih (36). Dva su tipa GABA receptora: GABA-A i GABA-B (37). Za razliku od GABA-B receptora koji pripada skupini G-protein vezanih receptora, GABA-A receptor pripada skupini ionotropnih receptora, superobitelji pentamera kojoj pripadaju još i nikotinski acetilkolin receptor, 5-HT₃ receptor i glicin receptori (37, 38).

GABA-A receptor je pentamer koji se sastoji od različitih podjedinica. Najčešća je kombinacija sljedećih podjedinica: 2 α podjedinice, 2 β podjedinice i jedna γ podjedinica (39). Njegova glavna zadaća je regulacija propuštanja kloridnih iona te djelomično propuštanje bikarbonatnih iona (39). GABA-B receptor ima više svojih podtipova, a njegova glavna uloga je kontrola kalijevih kanala, smanjenje aktivnosti adenilat ciklaze i regulacija kalcijevih kanala (40). Disfunkcija ovih receptora očituje se pojavom neuroloških poremećaja, uključujući epilepsiju, anksioznost i poremećaj spavanja (36).

1.4. Trajna pokrivala

Kod imunohistokemijske analize potrebno je biti oprezan i pažljiv u samom načinu izvođenja postupka imunohistokemije, ali i prilikom odabira kemikalija, jer bi u suprotnom moglo doći do pojave ili krivo pozitivnih ili krivo negativnih rezultata, takozvanih artefakta. Od osobite važnosti su koraci fiksacija i permeabilizacija tkiva, koji utječu na propusnost stanične membrane i određuju uspješnost imunofluorescentnog i imunohistokemijskog ispitivanja (41). Primjerice, prilikom fiksacije uzorka treba uzeti u obzir da je preporučeno vrijeme fiksacije 12-24h te da bi u iznimnim situacijama dugotrajna fiksacija mogla uzrokovati gubitak nekih vrsta antigena što će se očitovati pogrešnim rezultatima (42). Nasuprot tomu, pojavi artefakta može doprinijeti i slaba fiksacija zbog čega će doći do jače imunoreaktivnosti na periferiji tkiva obzirom da je taj dio dobro fiksiran, dok će u središnjem dijelu biti slabija imunoreaktivnost (43). U imunohistokemiji koriste se i detergentski, čija je svrha otapanja stanične membrane, a to svojstvo temelji se na sposobnosti da struktura micelle detergentskog oponaša raspored lipida u membranskom dvosloju u kojima su usidreni membranski proteini pa dolazi do interakcije između micelle detergentskog i stanične membrane (44). Istraživanja su pokazala da i korištenje različitih vrsta detergenata, kao i vrijeme izloženosti detergentskom ima značajan utjecaj na rezultate imunohistokemijske analize (45). Naime, duljinu izlaganja detergentskim potrebno je svesti na minimum te sve postupke imunohistokemije treba izvoditi na +4°C jer to značajno umanjuje mogućnost nastanka artefakta izazvanih detergentskom (45).

U histološkim, odnosno imunohistološkim analizama, korištenje trajnih pokrivala posljednji je u nizu koraka kojim završava priprema preparata (46). Trajna pokrivala su otopine, odnosno mediji u koje se ugrađuje uzorak ispod pokrovnog stakalca, a mogu biti u tekućem, gumenom, smolastom obliku te mogu biti topivi u vodi, alkoholu ili nekim drugim otapalima (47). Njihova glavna uloga je fizička zaštita uzorka, međusobno povezivanje uzorka što ga čini otpornijim na vanjske utjecaje, kao i povezivanje s pokrovnicom (47, 48). Komercijalno su dostupni u različitim formulacijama koje imaju različita svojstva pa se njihov odabir mora prilagoditi tipu uzorka, kao i tipu obilježivača koji se koristi u istraživanju (48).

Važno je da prilikom mikroskopiranja trajna pokrivala imaju indeks loma (RI, engl. *refractive index*) što je bliže moguće vrijednosti RI tkiva koji iznosi približno 1.53. (47). Prilikom prolaska svjetlosti kroz medije, dolazi do promjene njene brzine i loma pa se u odnosu na vakuum, svjetlost giba sporije različitim brzinama, ovisno o mediju kroz koji prolazi (47). RI je uvijek jednak omjeru brzine svjetlosti vakuuma i brzine svjetlosti u mediju, odnosno veći je

od 1 (48). Ukoliko je RI trajnog pokrivala blizak RI vrijednosti tkiva, odnosno ukoliko je njegova vrijednost bliska vrijednosti 1.53, trajno pokrivalo neće utjecati na tkivo, bit će prozirno i gledanjem na mikroskopu vidjet će se samo obojeni elementi tkiva (47). Sve vrijednosti RI koje nisu bliske idealnom 1.53, učinit će promatrano tkivo nejasnim s nedovoljno dobrim kontrastom, a primjer za to je zrak čija je RI vrijednost jednaka 1.0 pa su tkiva bez trajnih pokrivala loše vidljiva (48).

Trajna pokrivala se mogu podijeliti u dvije glavne skupine, to su smolasti i vodeni mediji. Smolasti su hidrofobni mediji koji po kemijskoj strukturi pripadaju organskim molekulama, dok su vodeni mediji hidrofilni i neljepljivi (47).

Smolasti mediji su prirodne ili sintetičke smole otopljene u benzenu, toluenu ili ksilenu, a primjenjuju se kada je potrebno trajno učvršćivanje te se najčešće koriste prilikom hematoksilin-eozin (HE) bojanja (49). Do njihova stvrdnjavanja dolazi nakon isparavanja otapala i na taj način fiksiraju pokrovnicu na preparat (47). Najčešće korišteni prirodni smolasti mediji su: Canada balsam, Phenol balsam, Dammar balsam i Euparal, dok je sintetičkih znatno više, oni su komercijalno dostupni, a samo neki od njih su: DPX, Histomount, Permound, Cover bond, Histoclad i drugi (47).

Vodeni mediji se koriste u slučaju mogućeg gubitka boje alkoholom ili ksilenom kao što je primjerice slučaj s većinom masnih mrlja, a nastaje iz destilirane vode uz određene dodatke, ovisno o vrsti vodenog medija (47). Prednost za korištenje ovih medija je, obzirom da se imunohistokemijsko bojenje izvodi i u vodenoj fazi, oni mogu odmah koristiti nakon bojenja što ih čini praktičnima i brzima, dok je nedostatak njihova manja RI vrijednost u odnosu na smolasta/organska pokrivala pa daju slike manje oštine pod mikroskopom (48). Zahtijevaju dodavanje bakteriostatskih sredstava kao što su fenoli, kristal timol ili natrijev mertiolat u svrhu sprječavanja rasta gljiva (49). Predstavnici ove skupine medija su voda, glicerol, glicerol, Farrantov medij, Highmanov medij, fruktozni sirup, polivinil alkohol i drugi (47).

Sljedeća podjela trajnih pokrivala je na ljepljive i neljepljive medije (47). Kao što je već navedeno, vodeni mediji su neljepljivi i njih je često potrebno dodatno zatvoriti oko ruba pokrovnice pomoću vakumske masti u svrhu sprječavanja sušenja tkiva ukoliko ono neće biti odmah analizirano (48). Smolasti mediji su ljepljivi, čvrsto prijanjaju na preparat vežući se i s pokrovnicom što omogućava visok stupanj zaštite imunohistokemijskih bojenja i pomaže dugotrajnom arhiviranju tkiva (48).

Za imunohistokemijske analize mogu se koristiti i vodeni i smolasti mediji. Izbor trajnog pokrivala kod ovih analiza ovisi o vrsti obilježivača koji se koristi u istraživanju (47). Vodeni mediji su obično pogodni za sve vrste obilježivača. Na fluorescentnu emisiju fluorescentnog izotiocijanata iz obilježenog protutijela mogu znatno utjecati karakteristike trajnog pokrivala, osobito njegova ionska jakost, pH vrijednost, viskoznost pa je potrebno i to uzeti u obzir prilikom odabira pokrivala (50). Smolasti medij se može koristiti za enzimске obilježivače kod kojih se talog stvorio između enzima, a kromogen nije topljiv u alkoholima koji se koriste tijekom dehidracije tkiva (postupak dehidracije se ne radi kod vodenih medija) (48).

Kako nepravilno izvođenje, kao i odabir različitih vrsta pojedinih kemikalija, mogu utjecati na preparate u smislu pojave artefakta koji vode destruktiji tkiva u preparatu ili promjene dobivenih rezultata, u ovome istraživanju bit će prikazano na koji način djeluju različita komercijalno dostupna trajna pokrivala na rezultate imunohistokemijske analize.

Osim odabira i postavljanja trajnog pokrivala, kao i svih koraka koji mu prethode, važno je i po završetku cjelokupnog postupka pravilno uskladištiti preparate, kako bi se spriječilo njihovo propadanje (47).

Tijekom ovoga istraživanja korišteno je ukupno pet različitih trajnih pokrivala: Dakocytomation, Permound, Vectamound, Crystalmound i Fluromound.

Permound je trajno pokrivalo koje pripada kategoriji smolastih medija na bazi toluena (51). Ima relativno nisku viskoznost i postavlja se dosta brzo. Crystalmound, Dakocytomation, kao i Fluromound pripadaju skupini vodenih medija, dok je Vectamound smolasti medij.

2. HIPOTEZA

Korištenje različitih trajnih pokrivala znatno utječe na rezultate imunohistokemijskog bojenja gangliozida na rezovima mozga.

3. CILJEVI

1. Usporediti utjecaj komercijalno dostupnih pokrivala na prikaz distribucije kompleksnih gangliozida, GPI-usidrenih proteina te transmembranskih proteina nakon imunohistokemijske analize mozga divljeg tipa miša C57BI/6.
2. Odrediti kolika je trajnost dobivenih rezultata.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. USTROJ STUDIJE

Studija je bila ustrojena kao pokusno (eksperimentalno) istraživanje. Rad je napravljen u sklopu projekta *Patofiziološke posljedice promjena sastava lipidnih splavi* (IP-09-2014-2324) voditeljice prof. dr. sc. Marije Heffer. Za istraživanje je dobiveno odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku (Klasa: 602-04/20-08/07, Ur. br. 2158-61-07-20-90). Praktični dio rada napravljen je u Laboratoriju za neurobiologiju Medicinskog fakulteta Osijek Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku.

4.2. MATERIJAL (ISPITANICI)

4.2.1. Pokusne životinje

U svrhu istraživanja korišteno je tkivo regije malog mozga divljeg tipa miša C57BI/6 (engl. *wild type*, WT). Miševi su stari tri mjeseca te su za izradu rada korištena ukupno tri miša.

4.2.2. Kemikalije

- PBS:
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
 - KCl (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - Na₂HPO₄x7H₂O (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - KH₂PO₄ (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- izofluran (Forane, Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, IL, USA)
- paraformaldehid (Sigma- Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- saharoza (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- izopentan (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- medij za kriostatsko rezanje (Tissue Freezing Medium; Leica, Nussloch, Germany)
- vodikov peroksid H₂O₂ (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- goveđi serum (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)
- kozji serum (Gibco, Invitrogen Auckland, NZ)

- TBS pufer (pH=7,4):
 - Tris (Fisher Bioreagent, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - HCl (Fisher Bioreagent, Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
 - NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- primarna protutijela:
 - anti-GD1a (Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan)
 - protutijelo za Thy-1 protein(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
 - protutijelo za GABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- sekundarno protutijelo: kozje anti-mišje IgG konjugirano s biotinom (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. West Grove, PA, SAD)
- tercijarni kompleks - alkalna fosfataza konjugirana s avidin/biotinom (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- BCIP/NBT (supstrat za alkalnu fosfatazu) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- komercijalno dostupna pokrivala:
 - DakoCytomation (Dako, Via Real Carpinteria, CA, USA)
 - Permout (Fischer Scientific, Schwerte, Germany)
 - Vectamount (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
 - Crystalmount (Biomed, Foster City, CA, USA)
 - Fluoromount (Dako, Via Real Carpinteria, CA, USA)

4.3. METODE

4.3.1. Žrtvovanje pokusnih životinja

Miševi su žrtvovani u skladu s propisanim etičkim načelima – najprije su anestetizirani izofluranom, a potom žrtvovani nakon što im se disanje u potpunosti usporilo. Nakon toga je napravljen postupak transkardijalne perfuzije.

Postupak transkardijalne perfuzije:

Igla je uvedena u lijevu srčanu klijetku, dok je desna pretklijetka prerezana škarama. Iglom za perfuziju ubrizgan je 1xPBS kako bi se isprala krv iz organizma miša, a promjena se može najbolje uočiti po jetri koja je postupno blijedila. Nakon potpunog ispiranja krvi iz organizma

miša, uvedena je igla u isto mjesto lijeve srčane klijetke gdje je ubrizgan fiksativ (4% paraformaldehid). Pokazatelj uspješne fiksacije je ukočenost tijela miša.

Potom je izdvojen mozak koji je najprije fiksiran u 4% PFA tijekom 24h na +4°C. Nakon završene fiksacije, slijedila je krioprotekcija u gradijentu 10% i 20% saharoze kako bi se uklonila voda i spriječio nastanak kristala leda koji bi mogli oštetiti tkivo. Po završetku krioprotekcije, uzorak je zamrznut u pothlađenom izopentanu i pohranjen na -80°C do analize.

4.3.2. Rezanje mozga na kriostat

Mozak je najprije uklopljen u medij za kriostatko rezanje, a potom rezan na kriostatu (Cryostat CM3050S, Leica, Nussloch, Germany) u koronarnom smjeru debljine 35 μm pri temperaturama CT -18°C i OT -16°C. Rezovi su prikupljeni u otopinu 1xPBS te čuvani na 4°C do daljnje analize.

4.3.3. Imunohistokemija

Imunohistokemija je napravljena metodom slobodno-plutajućih rezovima u mikrotitarskim pločicama. Kako bi se zaustavilo djelovanje endogenih peroksidaza, rezovi su najprije premješteni u 1%-tni H_2O_2 u 1xPBS-u. Nakon toga, bilo je potrebno inhibirati nespecifične reakcije vezanja protutijela pa je stoga dodana otopina za blokiranje (bloking) koja je napravljena dodavanjem 1% albumin goveđeg seruma i 5% kozjeg seruma u 1xPBS-u, 2 sata na +4°C. Potom su pripravljena primarna protutijela u otopini za blokiranje. Korišteno je primarno protutijelo za gangliozid GD1a pripravljeno u omjeru 1:20 000, protutijelo za Thy-1 protein u omjeru 1:2000 te protutijelo za GABA u omjeru 1:5000. Inkubiranje u primarnim protutijelima se odvijalo na tresilici, na temperaturi od +4°C tijekom noći. Po završetku inkubiranja, slijedio je niz ispiranja od 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u, a potom inkubacija u sekundarnom protutijelu na tresilici, u trajanju od 4 sata na temperaturi od +4°C. Kao sekundarno protutijelo korišteno je kozje anti-mišje IgG protutijelo konjugirano s biotinom pripremljenim u razrjeđenju 1:500. Zatim je ponovno napravljeno ispiranje 3 puta po 10 minuta u 1xPBS-u.

Poslije toga, rezovi su inkubirani 2 sata na tresilici, na temperaturi od +4°C u tercijarnom kompleksu, odnosno u alkalnoj fosfatazi konjugiranoj s avidin/biotinom, koje je pripravljeno prema uputi proizvođača. Posljednje ispiranje provedeno je 3 puta po 10 minuta u 1xTBS-u koji ima $\text{pH}=7,4$. Nakon ispiranja, primjenjen je supstrat za alkalnu fosfatazu BCIP/NBT koji

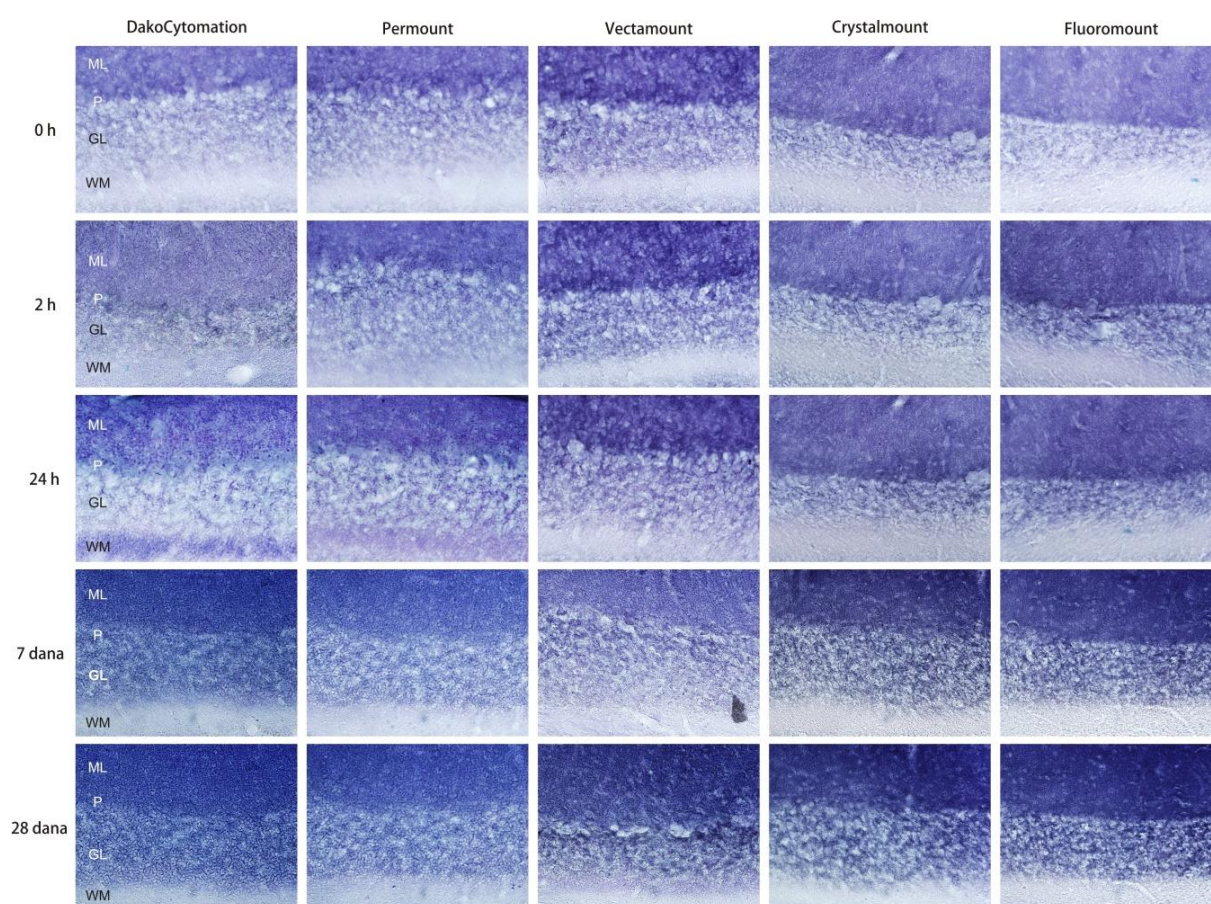
je pripremljen prema uputi proizvođača do pojave obojenja kada su rezovi ponovno vraćeni u 1xTBS u svrhu zaustavljanja reakcije. Potom su rezovi navučeni na silanizirana predmetna stakalca te pokriveni s pet različitih komercijalno dostupnih pokrivala: Dakocytomation, Permout, Vectamount, Crystalmount i Fluromount. Sljedeći korak bio je postavljanje pokrovnih stakalaca na preparate, čime je završen postupak imunohistokemije. Nakon odrađenog imunohistokemijskog bojenja, preparati su fotografirani kamerom Olympus DP70 (Olympus DP70, Optical Olympus, Japan) koja je montirana na svjetlosni mikroskop (Carl Zeiss, Axioskop 2 MOT, Jena, Germany). Povećanje pod kojim su slikani preparati je 400x.

4.4. STATISTIČKA ANALIZA

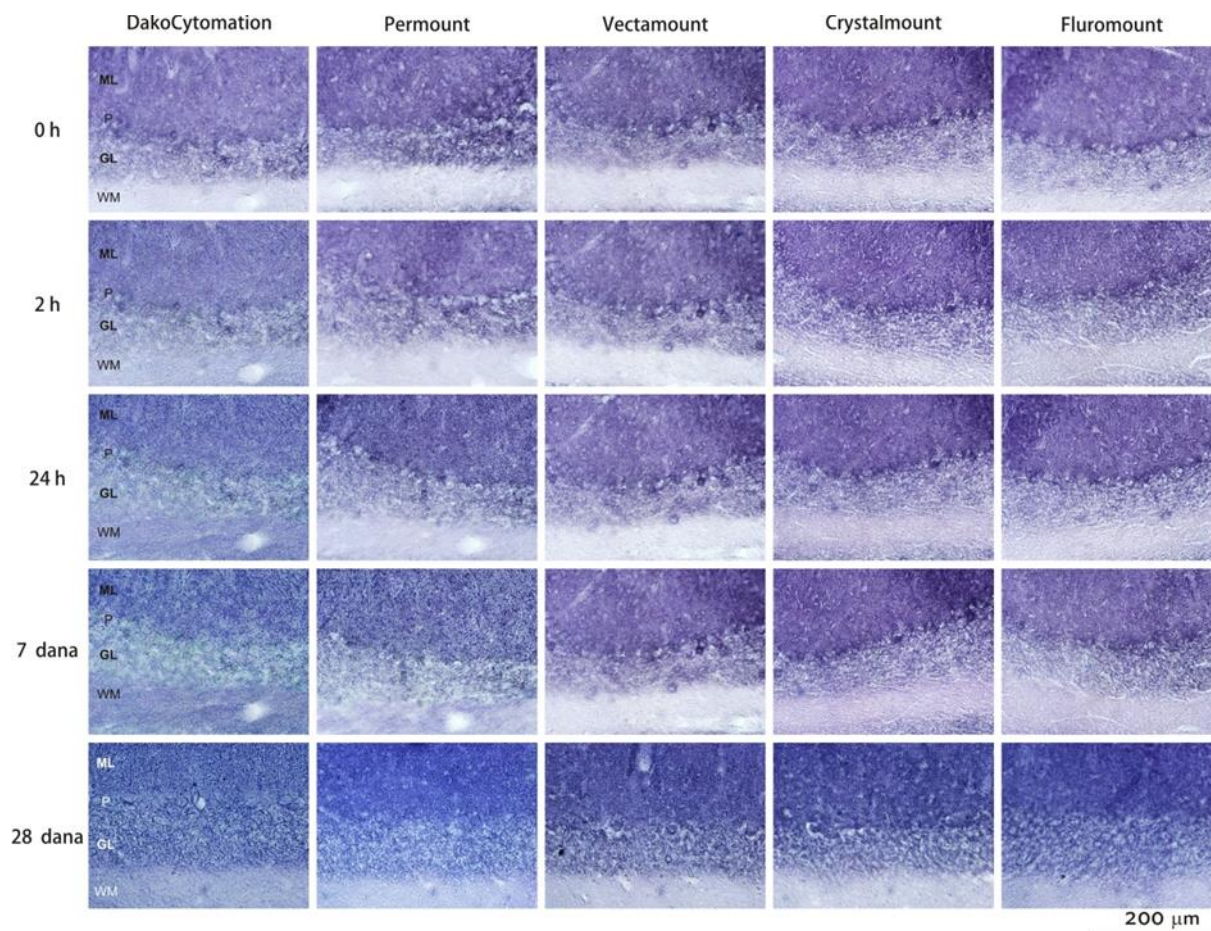
Kvantifikacija slika je izrađena po modificiranom protokolu (52) u računalnom programu *ImageJ (Fiji 101)* (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, SAD), a statistika je napravljena u statističkom programu *XLSTAT* (inačica 2020.3, Addisonsoft Inc, New York, NY, SAD). Statističke razlike između svih skupina podataka u eksperimentu određene su koristeći jednosmjernu analizu varijance (*ANOVA test*) parnom usporedbom s Bonferonni (dvosmjernom) analizom. Sve analize su provedene koristeći 95%-tni interval pouzdanosti ($\alpha=0,05$). Statistička značajnost određena je na $p < 0,05$.

5. REZULTATI

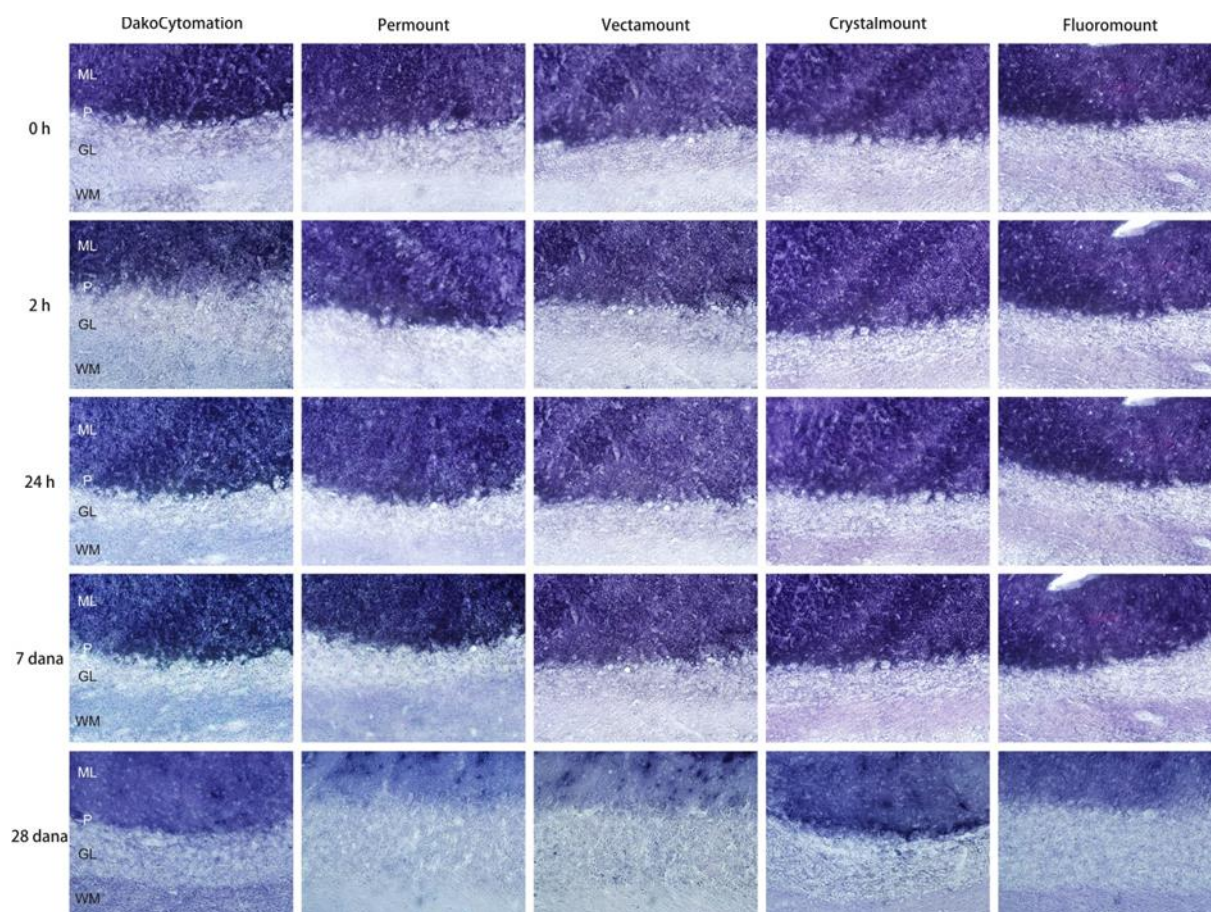
Ekspresija gangliozida GD1a, proteina Thy-1 i GABA receptora promatrana je na trima regijama maloga mozga divljeg tipa miša: molekularni sloj (ML, engl. *molecular layer*), granularni sloj (GL, engl. *granular layer*) i bijela tvar (WM, engl. *white matter*). Nakon provedenog imunohistokemijskog bojenja rezovi su mikroskopirani i slikani odmah (0h), nakon 2h, 24h te nakon 7 dana i 28 dana (Slika 5.1., Slika 5.2., Slika 5.3.). Dobivene slike su se dalje analizirale u programu *Fiji*.



Slika 5.1. Prikaz imunohistokemijskog bojenja GD1a gangliozida na rezovima mozga pokrivenih različitim komercijalno dostupnim pokrivalima slikani odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana. Povećanje je 400x.



Slika 5.2. Prikaz imunohistokemijskog bojenja GABA receptora na rezovima mozga pokrivenih različitim komercijalno dostupnim pokrivalima slikani odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana. Povećanje je 400x.



Slika 5.3. Prikaz imunohistokemijskog bojenja Thy-1 proteina na rezovima mozga pokrivenih različitim komercijalno dostupnim pokrivalima slikani odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana. Povećanje je 400x.

Analizom slika u programu *Fiji* određena je količina piksela za svaku regiju koja odgovara količini pozitivnog obojenja protutijelima na gangliozid GD1a, GABA receptor i Thy-1 protein (Tablica 5.1., Tablica 5.2., Tablica 5.3.).

Tablica 5.1. Srednje vrijednosti količine piksela (standardna devijacija) koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima na gangliozid GD1a u analiziranim područjima: molekularni sloj (ML), granularni sloj (GL) i bijela tvar (WM) odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana.

		Srednja vrijednost količine piksela (SD)					
		Trajno pokrivalo	Analizirano područje	0h	2h	24h	7D
GD1a	DakoCytomation	ML	105,36 (1,30)	109,7 (0,24)	124,63 (4,32)	167,53 (3,40)	171,10 (4,74)
		GL	58,77 (2,67)	87,77 (2,38)	55,38 (5,55)	126,08 (6,12)	131,98 (6,60)
		WM	34,58 (1,44)	62,96 (4,18)	70,66 (5,35)	70,27 (3,47)	77,52 (8,84)
	Permount	ML	117,27 (2,92)	126,41 (1,22)	132,61 (5,07)	137,37 (4,93)	157,21 (6,43)
		GL	68,81 (7,77)	79,8 (2,21)	74,37 (4,96)	82,32 (2,08)	101,41 (2,11)
		WM	32,61 (4,02)	60,22 (4,38)	71,69 (2,16)	42,61 (5,22)	60,27 (2,78)
	Vectamount	ML	130,86 (5,54)	136,69 (3,96)	148,79 (4,18)	120,66 (5,14)	172,05 (5,35)
		GL	80,35 (7,21)	85,63 (6,14)	80,41 (3,06)	73,89 (2,61)	114,24 (3,63)
		WM	40,96 (4,03)	44,43 (3,96)	50,04 (4,93)	37,63 (2,53)	51,88 (2,36)
	Crystalmount	ML	111,91 (7,90)	115,21 (0,40)	128,87 (1,22)	166,09 (3,63)	179,70 (8,65)
		GL	78,66 (1,78)	82,03 (4,84)	96,13 (5,04)	105,84 (7,17)	112,06 (8,65)
		WM	48,14 (0,51)	61,95 (3,37)	66,95 (3,39)	47,38 (3,77)	41,44 (2,52)
	Fluromount	ML	93,78 (5,05)	137,18 (6,61)	135,72 (4,20)	169,66 (10,94)	183,44 (6,18)
		GL	50,59 (2,96)	103,77 (4,40)	97,42 (6,26)	109,26 (8,96)	117,69 (5,19)
		WM	24,84 (1,95)	66,27 (2,17)	58,82 (2,50)	35,73 (1,98)	39,42 (1,00)

Tablica 5.2. Srednje vrijednosti količine piksela (standardna devijacija) koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima na GABA receptor u analiziranim područjima: molekularni sloj (ML), granularni sloj (GL) i bijela tvar (WM) odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana.

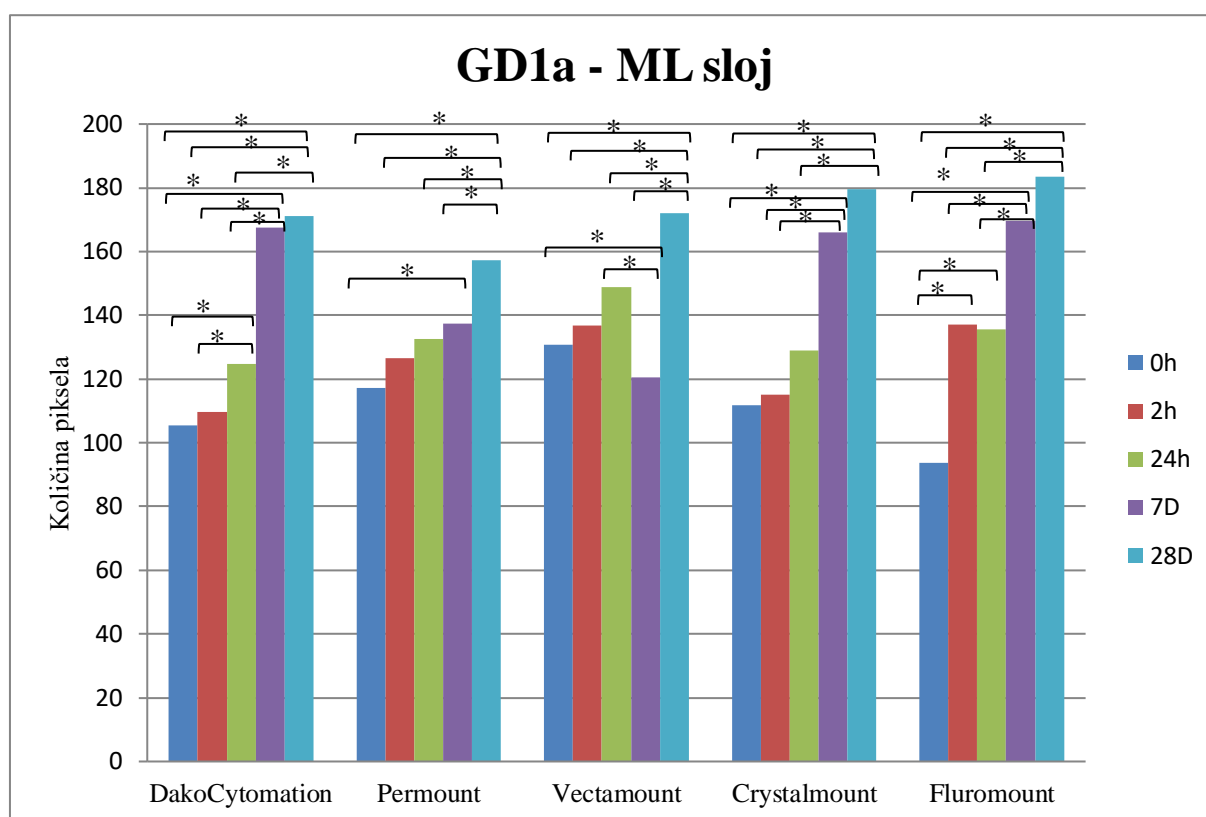
	Srednja vrijednost količine piksela (SD)						
	Trajno pokrivalo	Analizirano područje	0h	2h	24h	7D	28D
GABA	DakoCytomation	ML	102,22	105,60	114,69	119,76	131,08
			(1,19)	(1,21)	(0,54)	(1,89)	(1,64)
		GL	88,30	87,90	93,08	92,82	116,73
			(0,54)	(1,47)	(3,62)	(2,82)	(1,74)
		WM	54,64	71,47	85,79	94,51	93,89
			(2,15)	(1,92)	(2,07)	(1,71)	(1,95)
	Permount	ML	118,66	108,83	128,15	117,72	133,50
			(2,63)	(7,05)	(1,33)	(4,06)	(1,88)
		GL	98,29	87,18	90,30	91,42	97,66
			(9,18)	(7,71)	(4,20)	(5,67)	(4,59)
		WM	54,67	49,43	56,43	63,05	72,42
			(8,08)	(1,07)	(5,52)	(4,22)	(2,09)
	Vectamount	ML	123,81	116,63	113,84	120,22	148,10
			(9,05)	(10,54)	(9,31)	(12,39)	(1,48)
		GL	92,36	89,85	86,15	86,23	118,58
			(6,96)	(3,70)	(2,87)	(3,64)	(2,37)
		WM	48,08	47,07	49,70	47,31	83,49
			(1,48)	(5,11)	(1,45)	(0,76)	(2,20)
	Crystalmount	ML	127,53	118,94	127,77	136,24	151,09
			(8,65)	(5,34)	(4,42)	(8,83)	(1,47)
		GL	92,57	90,11	95,07	94,90	109,35
			(3,60)	(2,73)	(4,52)	(7,10)	(3,47)
		WM	53,76	55,26	64,52	63,48	73,15
			(0,47)	(1,42)	(1,68)	(1,62)	(2,14)
Fluromount	ML	117,50	120,43	126,43	119,97	152,50	
		(5,85)	(3,71)	(3,25)	(5,86)	(3,21)	
	GL	78,52	94,18	87,63	83,54	116,69	
		(3,09)	(12,95)	(1,33)	(8,63)	(4,07)	
	WM	57,74	54,03	56,95	59,41	89,49	
		(4,53)	(3,98)	(2,83)	(6,63)	(2,96)	

Tablica 5.3. Srednje vrijednosti količine piksela (standardna devijacija) koje odgovaraju količini pozitivnog obojenja protutijelima na Thy-1 protein u analiziranim područjima: molekularni sloj (ML), granularni sloj (GL) i bijela tvar (WM) odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7 dana i 28 dana.

		Srednja vrijednost količine piksela (SD)					
		Trajno pokrivalo	Analizirano područje	0h	2h	24h	7D
Thy-1 protein	DakoCytomation	ML	180,03 (7,89)	183,07 (1,65)	167,15 (12,53)	176,50 (9,70)	156,95 (3,15)
		GL	55,01 (5,30)	65,43 (2,55)	46,62 (2,82)	54,14 (2,45)	85,25 (1,70)
		WM	53,47 (7,52)	75,54 (1,15)	55,72 (1,01)	67,81 (2,98)	108,12 (1,18)
	Permount	ML	178,23 (5,54)	160,40 (3,44)	163,33 (3,61)	189,30 (5,54)	129,64 (4,79)
		GL	54,29 (0,12)	37,26 (7,18)	36,88 (7,15)	50,31 (5,15)	68,16 (1,90)
		WM	26,46 (3,20)	23,34 (4,69)	36,18 (0,44)	73,06 (3,41)	64,45 (3,93)
	Vectamount	ML	155,84 (7,18)	161,88 (1,19)	146,86 (7,00)	164,20 (6,80)	137,16 (2,62)
		GL	59,57 (7,98)	67,58 (4,47)	49,10 (2,01)	61,50 (3,42)	75,10 (0,65)
		WM	30,71 (1,24)	37,62 (0,75)	29,08 (1,09)	37,67 (1,30)	64,72 (3,54)
	Crystalmount	ML	163,51 (2,46)	159,89 (7,28)	153,62 (10,81)	178,24 (8,08)	154,93 (4,33)
		GL	53,43 (4,02)	44,23 (4,44)	46,62 (2,01)	51,83 (2,73)	71,03 (3,78)
		WM	44,02 (1,28)	42,13 (1,52)	55,26 (0,76)	48,09 (4,66)	79,29 (0,99)
	Fluromount	ML	170,67 (9,69)	159,30 (6,21)	168,17 (7,69)	162,21 (0,61)	146,24 (3,51)
		GL	53,35 (3,48)	49,30 (2,78)	51,64 (2,19)	51,92 (5,16)	74,65 (1,94)
		WM	63,97 (8,05)	57,53 (3,47)	55,45 (5,29)	62,47 (4,06)	91,39 (2,32)

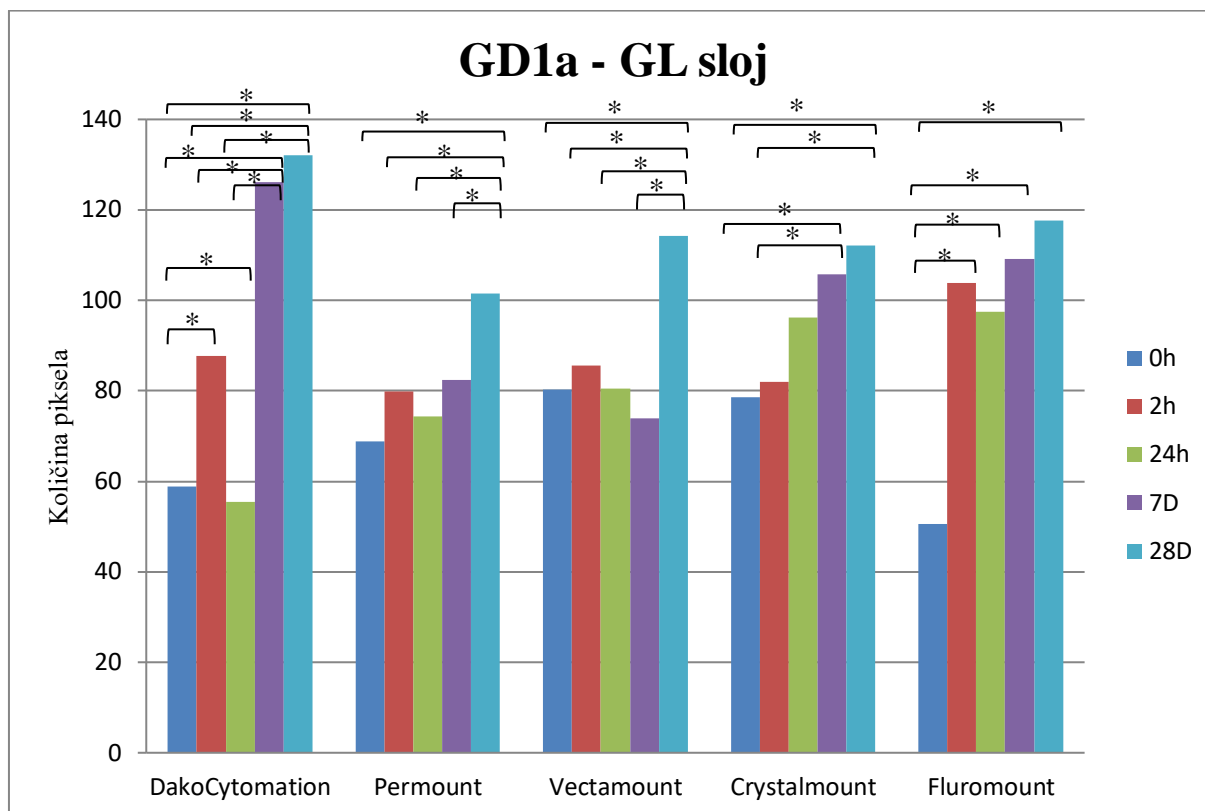
Nakon toga, na temelju dobivenih vrijednosti, ANOVA parnom usporedbom s Bonferonni analizom testirane su razlike između različitih vremenskih perioda za svako protutijelo, svako pokrivalo i svaki sloj, pri čemu je iznosio $p < 0,05$.

U području ML sloja kod GD1a najmanje vrijednosti količine piksela su izmjerene kod slika koje su poslikane odmah (0h), dok je najveća količina piksela izmjerena kod slika poslikanih nakon 28 dana (Slika 5.4.). Najmanji izražaj GD1a u kategoriji 0h izmjeren je kod pokrivala Fluromount i iznosi 93,78 piksela (SD=5,05), dok je najveći izražaj GD1a nakon 28 dana također izmjeren kod pokrivala Fluromount i iznosi 183,44 piksela (SD=6,18).



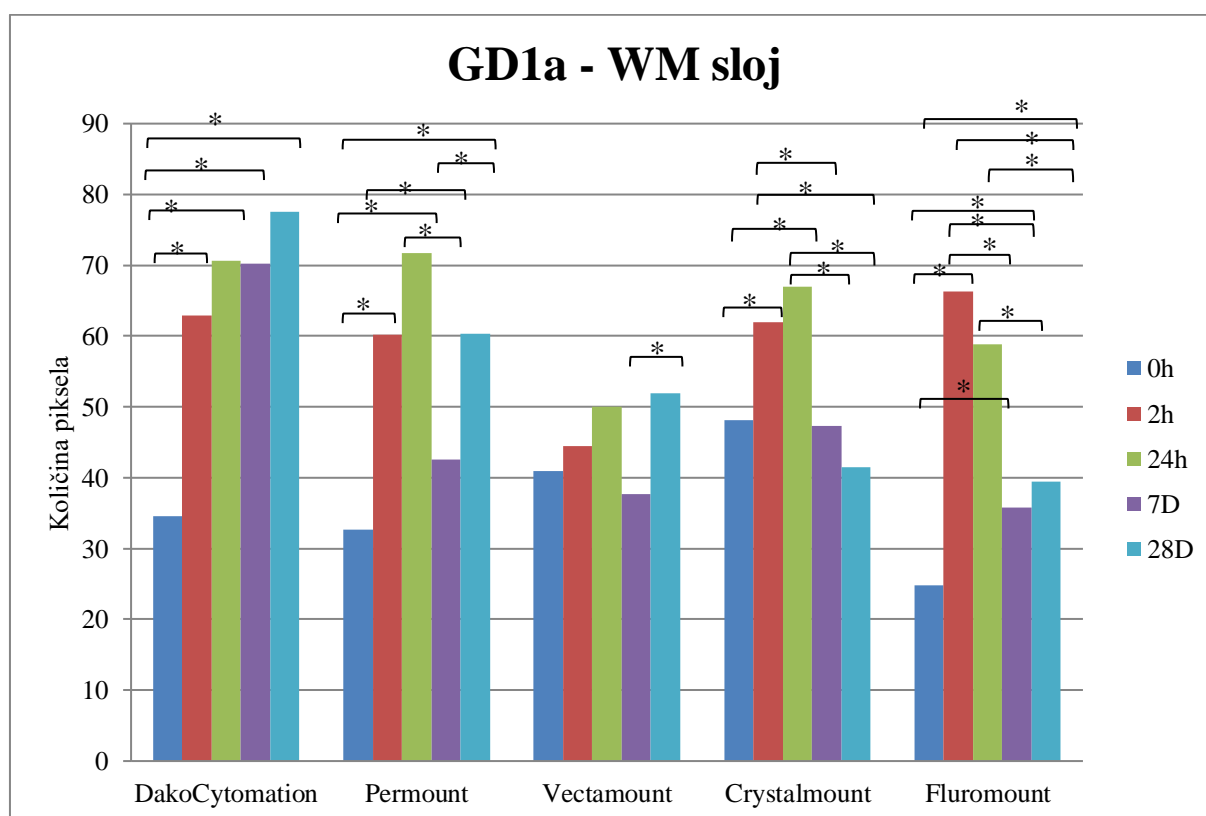
Slika 5.4. Usporedba ekspresije GD1a u molekularnom sloju (ML) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

U području ove regije, ekspresija GD1a kod slika napravljenih odmah po završetku imunohistokemije ima najjači izražaj kod trajnog pokrivala Vectamount (Slika 5.5.). Količina piksela iznosi 80,35 (SD=7,21). Najslabiji izražaj je kod pokrivala Fluromounta te iznosi 50,59 (SD=2,97) piksela. Nakon 28 dana, najjači izražaj GD1a izmjeren je kod pokrivala DakoCytomation i iznosi 131,98 (SD=6,60).



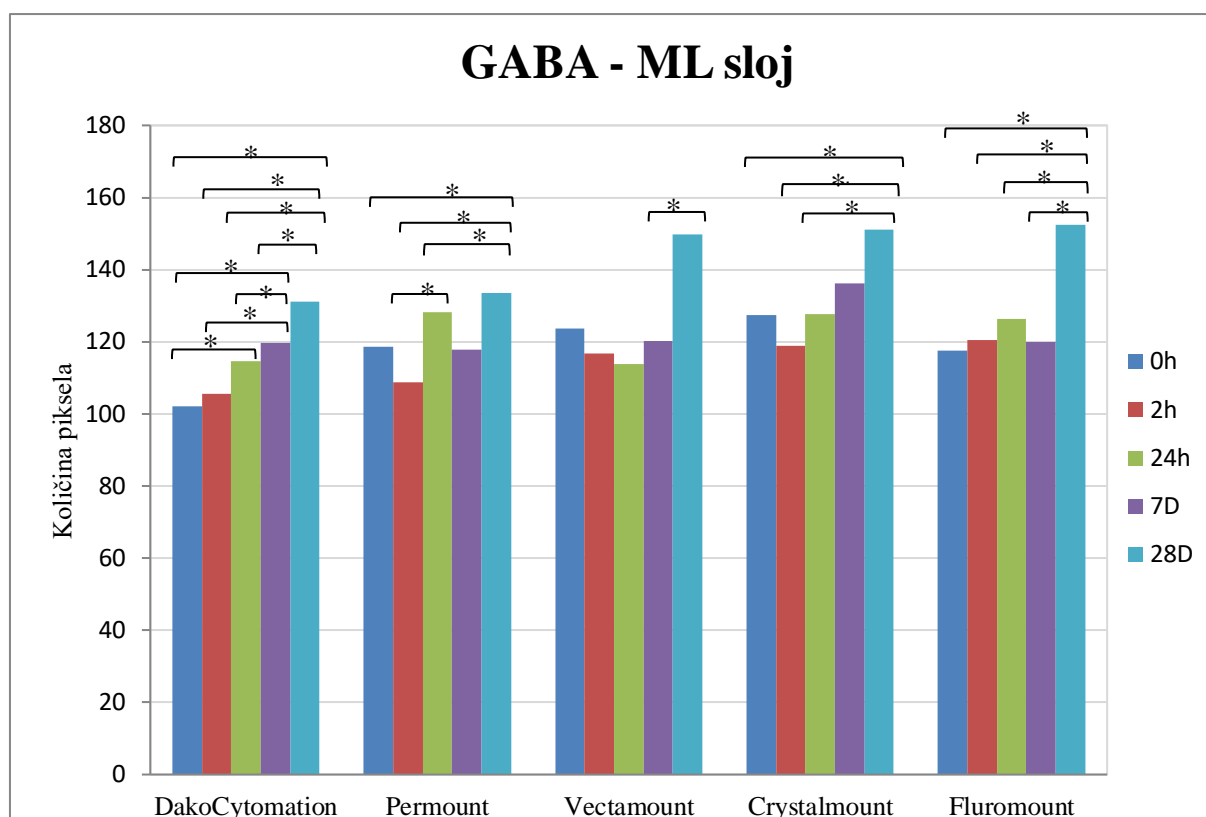
Slika 5.5. Usporedba ekspresije GD1a u granularnom sloju (GL) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

Izražaj GD1a u WM sloju je najmanji kod slika nastalih odmah nakon imunohistokemijskog bojenja. Najmanja vrijednost je izmjerena kod trajnog pokrivala Fluromount i iznosi 24,84 piksela (SD=1,95). Najveću vrijednost imao je Crystalmount te ona iznosi 48,14 piksela (SD=0,51). Nakon 28 dana znatna je razlika između DakoCytomationa koji je imao najveći izražaj i iznosi 77,52 piksela (SD=8,84) i Fluromounta koji iznosi 39,42 piksela (SD=1,00) (Slika 5.6.).



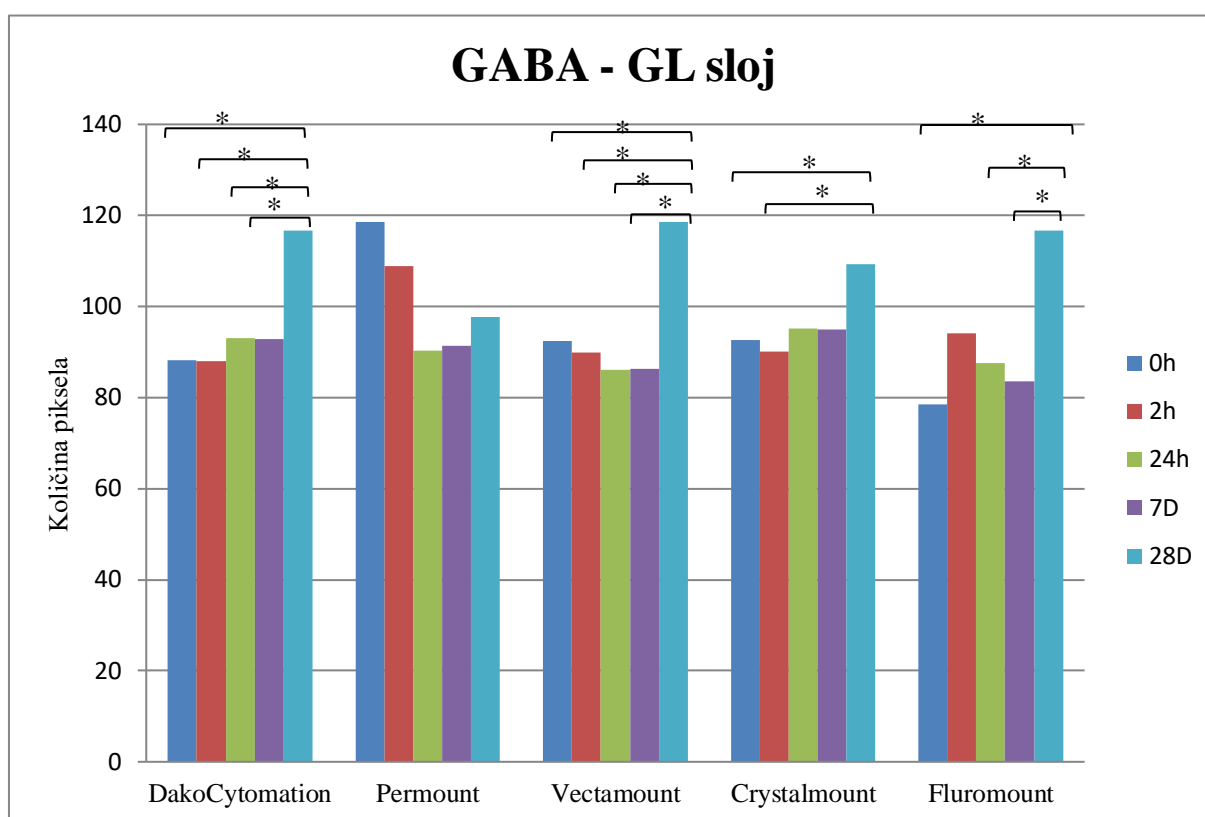
Slika 5.6. Usporedba ekspresije GD1a u bijeloj tvari (WM) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

Najveću ekspresiju receptora GABA u molekularnom sloju izmjerena je kod pokrivala Fluromount slikano nakon 28 dana i iznosi 152,5 piksela (SD=3,21). Približne vrijednosti dobivene su i za pokrivala Crystalmount i Vectamount koje iznose 151,09 (SD=1,47) i 148,1 piksela (SD=1,48). Najmanji izražaj GABA receptora bio je kod pokrivala DakoCytomation i iznosi 102,22 piksela (SD=1,19), dok je najveću vrijednost imao Crystalmount i iznosi 127,53 piksela (SD=8,65) kod slika koje su slikane nakon 0h. Najveći izražaj nakon 2h imao je Fluromount (120,43 piksela, SD=3,71), dok je najveći izražaj GABA kod slika snimljenih 24h nakon imunohistokemije imao Permout (128,15 piksela, SD=1,33) (Slika 5.7.).



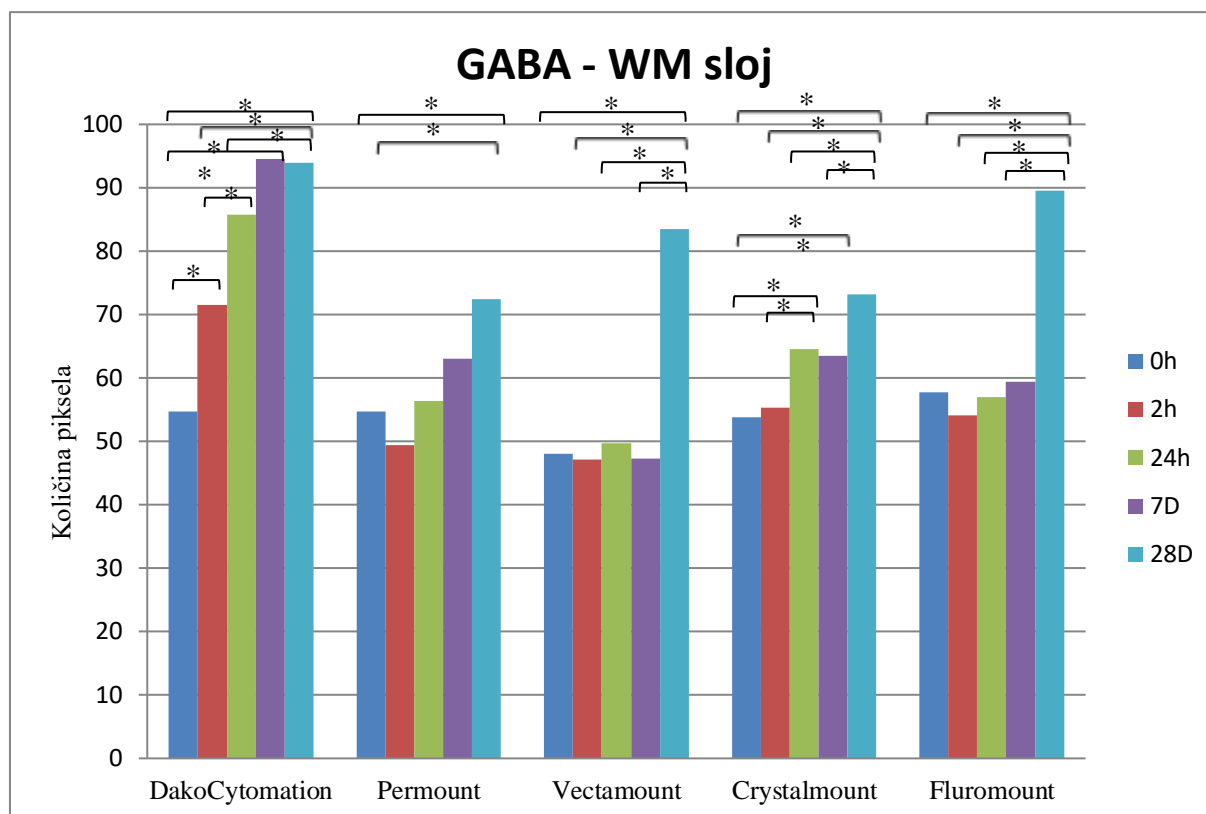
Slika 5.7. Usporedba ekspresije GABA receptora u molekularnom sloju (ML) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

Gledajući granularni sloj na slikama koje su slikane odmah nakon analize najveći izražaj navedenog receptora je kod pokrivala Permout te on iznosi 98,29 piksela (SD=9,18). Nakon 2h najveći izražaj GABA receptora detektiran je kod pokrivala Fluromount i iznosi 94,18 piksela (SD=12,95) iako su vrijednosti i ostalih trajnih pokrivala vrlo slične. Trajno pokrivalo Crystalmount je imalo najveću vrijednost piksela 24h nakon analize i iznosi 95,07 piksela (SD=4,52). Kod slika poslikanih nakon sedam dana, najveći izražaj receptora GABA izmjeren je kod pokrivala Crystalmount i iznosi 94,9 piksela (SD=7,10), dok je nakon 28 dana najveći izražaj bio kod pokrivala Vectamount (118,58 piksela, SD=2,37) (Slika 5.8.).



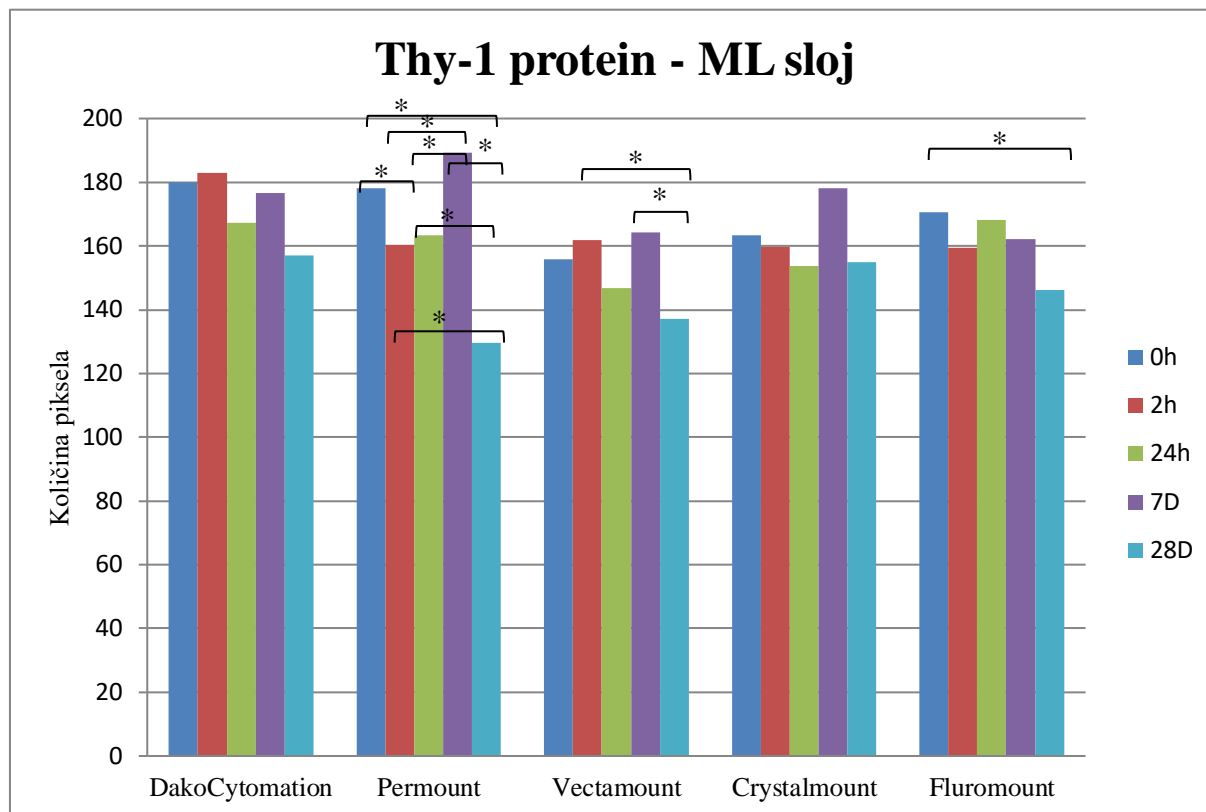
Slika 5.8. Usporedba ekspresije GABA receptora u granularnom sloju (GL) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

U WM području su značajne razlike u ekspresiji epitopa između pojedinih vrsta trajnih pokrivala. Najmanji izražaj GABA u kategoriji 0h imao je Vectamount i iznosi 48,08 piksela (SD=1,48), dok je najveći izražaj imao Fluromount i iznosi 57,74 (SD=4,53). U svim ostalim kategorijama najveći izražaj imao je DakoCytomation (2h=71,47 piksela (SD=1,92), zatim 24 sata=85,79 piksela (SD=2,07), vrijednost za 7 dana iznosi 94,51 piksela (SD=1,71), dok za 28 dana količina piksela iznosi 93,89 (SD=1,95)) (Slika 5.9.).



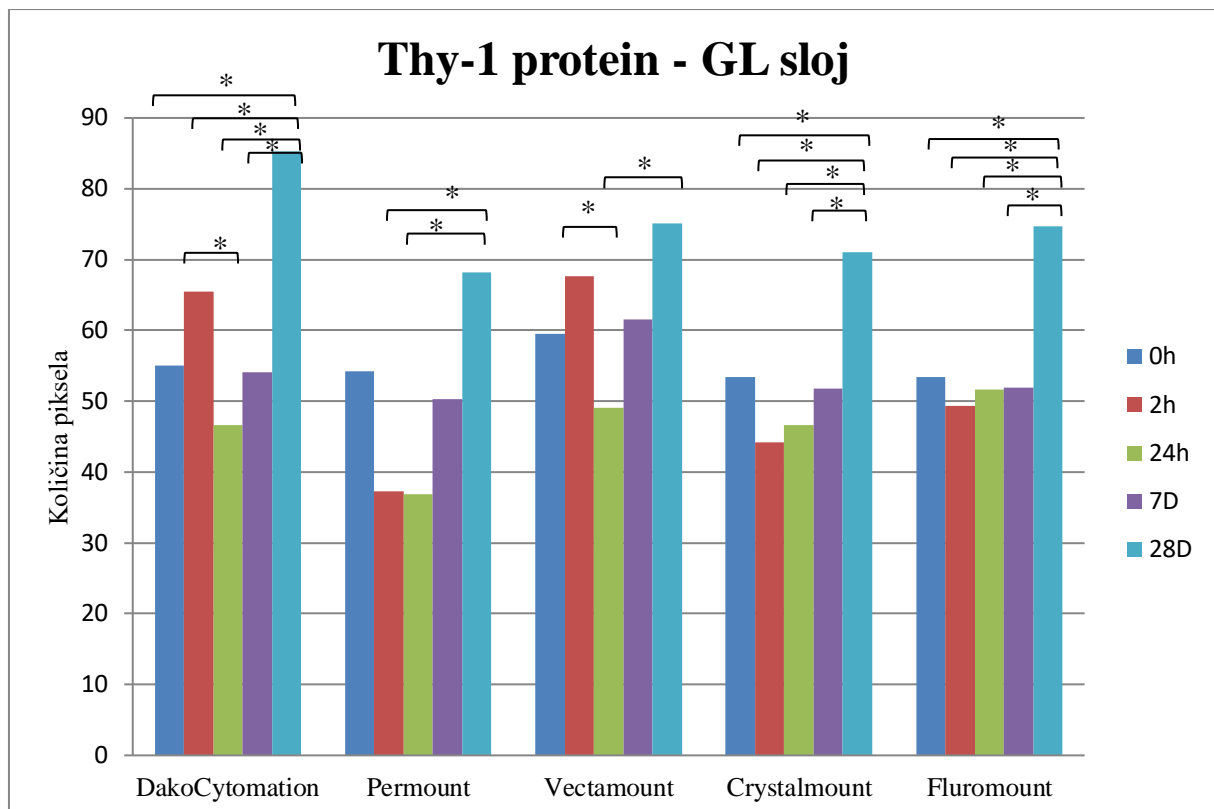
Slika 5.9. Usporedba ekspresije GABA receptora u bijeloj tvari (WM) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

Najmanji izražaj Thy-1 proteina u ML regiji imao je preparat pokriven trajnim pokrivalom Permout nakon 28 dana i iznosi 129,64 piksela (SD=4,79). Istovremeno je najveći izražaj Thy-1 proteina dobiven kod pokrivala Permout nakon 7 dana i iznosi 189,3 piksela (SD=5,54) (Slika 5.10.).



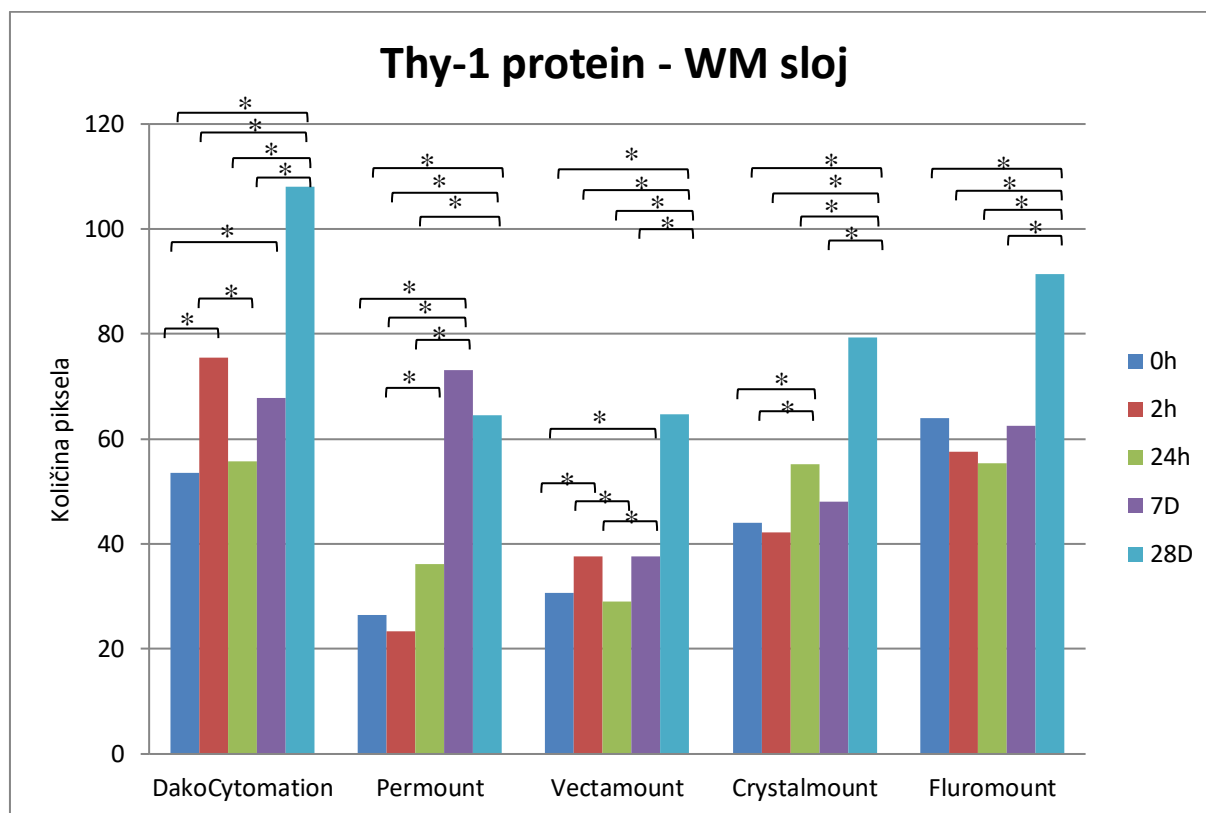
Slika 5.10. Usporedba ekspresije Thy-1 proteina u molekularnom sloju (ML) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D nakon analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

U ovoj regiji najveći izražaj Thy-1 proteina kod slika slikanih nakon 0h, 2h i 7 dana bio je kod pokrivala Vectamount te on iznosi 59,57 piksela (SD=7,98), 67,58 piksela (SD=4,47) i 61,5 piksela (SD=3,42). Dvadeset i četiri sata nakon imunohistokemijske analize najveći izražaj dobiven je kod pokrivala Fluromount i iznosi 51,64 piksela (SD=2,19), dok je kod pokrivala DakoCytomation najveći izražaj nakon 28 dana i iznosi 85,25 piksela (SD=1,70) (Slika 5.11.).



Slika 5.11. Usporedba ekspresije Thy-1 proteina u granularnom sloju (GL) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

U bijeloj tvari najveću ekspresiju Thy-1 proteina imalo je pokrivalo Fluromount slikano nakon 0h i iznosi 63,97 piksela (SD=8,05). Kod preparata slikanih nakon 2h, 24h i 28 dana najveći izražaj istog proteina dobiven je kod pokrivala DakoCytomation (75,54 piksela (SD=1,15), 55,72 piksela (SD=1,01), 108,12 piksela (SD=1,18)), dok je kod pokrivala Permount najveći izražaj navedenog epitopa 7 dana nakon imunohistokemijskog bojenja i iznosi 73,06 piksela (SD=3,41) (Slika 5.12.).



Slika 5.12. Usporedba ekspresije Thy-1 proteina u bijeloj tvari (WM) različitih trajnih pokrivala slikanih odmah (0h), nakon 2h, 24h, 7D i 28D od analize. * označava statistički značajnu razliku čija je vrijednost manja od 0,05.

6. RASPRAVA

Imunohistokemija je vrlo važna metoda čija je uloga detekcija antigena u organu ili tkivu, a temelji se na specifičnom vezanju protutijela i vizualizaciji nastalih antigen-antitijelo kompleksa pomoću mikroskopa nakon odrađenog imunohistokemijskog bojenja (42, 53). Iako je tijekom vremena metoda poboljšana pa se danas koriste specifična protutijela i visokorezolucijski mikroskopi, ipak je sklona stvaranju lažno pozitivnih ili lažno negativnih rezultata, odnosno dolazi do pojave artefakta. Kako bismo dobili točne rezultate nakon imunohistokemijske analize, potrebno je svaki korak imunohistokemije napraviti pravilno koristeći odgovarajuće kemikalije. Dosadašnjim istraživanjima utvrđeno je da odabir pojedinih vrsta kemikalija, kao i neke druge značajke, na primjer vrijeme izloženosti nekoj tvari tijekom izvođenja postupka, može utjecati na konačan rezultat analize. To se prvenstveno odnosi na duljinu izlaganja detergentima te temperaturu na kojoj se izvodi postupak (45). Naime, neke skupine molekula, na primjer gangliozidi, su komplicirani za analiziranje budući da korištenje detergenata uzrokuje njihovu redistribuciju pa tako dobiveni rezultati nisu odraz pravog stanja analiziranog tkiva (54). Gangliozidi, među kojima i gangliozid GD1a koji je korišten i u ovom eksperimentu, se normalno pojačano ekspimiraju u sivoj tvari živčanog sustava, ali prethodna istraživanja pokazala su kako tretiranje određenim vrstama detergenata može uzrokovati prijelaz GD1a iz sive tvari u područje bijele tvari, čime on postaje dostupan protutijelima te samim time u konačnici kao rezultat dobivene su povećane vrijednosti GD1a u području bijele tvari (12, 54). Osim toga, u imunohistokemiji važno je između ostaloga, voditi računa i o fiksaciji kako bismo mogli pravilno obojati tkivo. Fiksacija je jedan od koraka u imunohistokemiji koji je bitan za očuvanje strukture stanice, prevenciju autolize i premještanja staničnih komponenata, stabilizaciju staničnog materijala u naknadnim postupcima te olakšanje obojenja tkiva, a smatra se glavnim uzrokom varijacije u obnovljivosti imunohistokemijskog bojenja (53). Zbog toga se cjelokupan postupak nastoji što više standardizirati pa se preporuča započeti fiksaciju odmah nakon kirurškog uzorkovanja tkiva i izbjegavati dugotrajnu fiksaciju (>24-48 sati) (53). Prije toga, važno je na odgovarajući način dehidrirati tkivo pa je bitno ne koristiti predugo iste alkoholne otopine jer u protivnom može doći do slabe dehidracije tkiva što rezultira slabim ili odsutnim obojenjem ciljnih stanica, odnosno dolazi do pojave artefakta (55).

Posljednji korak imunohistokemije je postavljanje trajnog pokrivala čime se dobiva gotovi preparat. Trajna pokrivala su otopine odnosno mediji u koje se ugrađuje uzorak ispod pokrovnog stakalca, a mogu biti u gumenom, smolastom i tekućem obliku. Nadalje, mogu

biti topivi u vodi, alkoholu ili nekim drugim otapalima (47). Uloga im je višestruka; povezivanje s pokrovnicom, fizička zaštita uzorka kao i međusobno povezivanje uzorka čime je preparat otporniji na vanjske utjecaje (47, 48).

U ovome istraživanju korišteni su WT miševi soja C57BI/6 starosti tri mjeseca, kao i ukupno pet različitih komercijalno dostupnih trajnih pokrivala: DakoCytomation, Permount, Vectamount, Crystalmount i Fluromount te je ispitivano kakav je prikaz distribucije gangliozida GD1a, GABA receptora te Thy-1 proteina kada se koriste navedena trajna pokrivala i koliko se njihova distribucija mijenja kroz vrijeme. Pritom su analizirana tri sloja korteksa maloga mozga; molekularni sloj, granularni sloj i bijela tvar. Kao što je prethodno navedeno, gangliozidi su pojačano eksprimirani u sivoj tvari u odnosu na bijelu tvar (12), što je pokazano i dobivenim rezultatima ovoga istraživanja, gdje je količina piksela osobito za molekularni, ali i granularni sloj (koji skupa čine sivu tvar) značajno veća usporedno s količinom piksela bijele tvari (WM).

Nadalje, određivanjem vrijednosti piksela za svako pojedinačno trajno pokrivalo, jasno su vidljive razlike među njima kada su dobivene različite vrijednosti istog područja u istom vremenu. Analizom je utvrđena najviša ekspresija gangliozida GD1a u molekularnom sloju odmah nakon završetka imunohistokemijskog bojenja. U vremenu 0h, odnosno odmah nakon završene analize, najveća količina obojenja utvrđena je kod trajnog pokrivala Vectamount, dok je nakon 28 dana najveću količinu obojenja imalo trajno pokrivalo Fluromount. Cjelokupno gledano, protokom vremena dolazi do promjene obojenja bijele tvari što se vidi i nakon kvantifikacije jer su i vrijednosti količine piksela rasle, uz nekoliko izuzetaka. Za analizu gangliozida GD1a najbolje se pokazalo trajno pokrivalo Vectamount kod kojega je najmanje došlo do promjene u prikazu imunohistokemije u analiziranim slojevima. Minimalna promjena je najuočljivija u molekularnom sloju u razlici između 0 sati i 28 dana. Nasuprot tomu, najveća promjena zabilježena je kod trajnog pokrivala Fluromounta kod kojega je nastupila najveća razlika između mjerenja, osobito u molekularnom sloju gdje se i nalazi najviše gangliozida GD1a.

Zatim, analizom su utvrđene vrijednosti piksela koje odgovaraju ekspresiji GABA receptora za svako pojedinačno trajno pokrivalo. Rezultati se između pojedinih vrsta trajnih pokrivala također razlikuju, no razlike između srednjih vrijednosti dobivenih piksela među slojevima nisu toliko velike kao u slučaju gangliozida GD1a. Dosadašnja istraživanja dokazala su prisutnost ovoga transmembranskog proteina i u sivoj i u bijeloj tvari gdje on ima važnu ulogu

u izgradnji pre- i postsinaptičkih i postsinaptičkih struktura (56). Najveću vrijednost ekspresije GABA receptora imalo je trajno pokrivalo Crystalmount po završetku imunohistokemijskog bojenja u molekularnom sloju, dok je nakon 28 dana najveća vrijednost bila za trajno pokrivalo Fluomount. Ovisno o analiziranom sloju, dolazi do različitih promjena u ekspresiji navedenog receptora kroz vrijeme. Do najmanje promjene u prikazu imunohistokemijskog bojanja došlo je kod trajnog pokrivala Vectamount, ukoliko su uzeti u obzir svi slojevi i sva vremena. Razlika između prva dva mjerenja je najuočljivija kod trajnog pokrivala DakoCytomation kod kojega je došlo do pojave obojenja bijele tvari koje se vremenom sve više pojačavalo. Osim iz vrijednosti piksela za svaku analiziranu regiju i trajno pokrivalo, statističkim analizama je također utvrđeno postojanje razlike u ekspresiji GABA receptora između različitih vremena.

Potom su analizom utvrđene vrijednosti koje odgovaraju ekspresiji Thy-1 proteina, predstavnika proteina vezanih na membranu pomoću GPI-sidra (33). Istraživanjem je dobivena najveća vrijednost piksela kod trajnog pokrivala DakoCytomationa kod preparata po završetku imunohistokemijske analize u molekularnom sloju, dok je nakon 28 dana najveću vrijednost imalo također trajno pokrivalo DakoCytomation. Razlike u ekspresiji Thy-1 proteina među slojevima su primjetne i u skladu s dosadašnjim istraživanjima. Naime, prethodnim studijama potvrđeno je da se Thy-1 protein eksplicira u živčanom tkivu svih sisavaca, i to osobito u sivoj tvari središnjeg živčanog sustava te u nekim živcima na periferiji stoga je vrijednost piksela u molekularnom sloju kod svih pokrivala u svim mjerenjima očekivano najviša (57). U analizi ekspresije ovog proteina, najmanja promjena u imunohistokemiji zapažena je kod trajnog pokrivala Crystalmount.

U ovome je radu prvi put analiziran utjecaj medija za pokrivanje preparata na rezultate distribucije tri skupine molekula nakon imunohistokemijske analize. Kao glavni zaključak se može izvući da do promjene rezultata dolazi veoma brzo, osobito kada su u pitanju gangliozidi i proteini vezani GPI-sidrom na membranu pa bi njih trebalo odmah poslikati pod mikroskopom nakon imunohistokemije kako bi se dobili vjerodostojni rezultati.

U budućnosti bi bilo korisno, a u svrhu utvrđivanja trajnosti preparata, odnosno koliko su dugo pogodni za analizu, detaljnije proučiti kako trajno pokrivalo utječe na rezultate nakon duljih vremenskih razdoblja, primjerice nakon 6 ili 12 mjeseci. Osim toga, u daljnje bi studije osim korištenih, trebalo uključiti i druge vrste trajnih pokrivala u svrhu ispitivanja njihova utjecaja na rezultate imunohistokemijske analize.

7. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja dolazi se do sljedećih zaključaka:

1. Različita komercijalno dostupna trajna pokrivala utječu na prikaz distribucije transmembranskih proteina, GPI-usidrenih proteina, a osobito kompleksnih gangliozida.
2. Usporedbom ekspresije gangliozida GD1a, GABA receptora te Thy-1 proteina u različitim vremenskim razdobljima nakon imunohistokemijske analize utvrđena je statistički značajna razlika kod većine korištenih trajnih pokrivala.
3. Kod gangliozida GD1a najmanje se promijenilo trajno pokrivalo Vectamount, a najviše trajno pokrivalo Fluromount.
4. Kod GABA receptora do najmanje promjene u prikazu imunohistokemije došlo je kod trajnog pokrivala Vectamount, a najveća promjena dobivena je kod trajnog pokrivala DakoCytomation.
5. U prikazu imunohistokemije kod Thy-1 proteina, najmanja promjena je kod trajnog pokrivala Crystalmount, a najveća kod trajnog pokrivala DakoCytomation.
6. Za svaku od navedenih molekula bi trebalo odmah slikati preparat pod mikroskopom u svrhu dobivanja ispravnih rezultata.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Usporediti utjecaj komercijalno dostupnih pokrivala na prikaz distribucije kompleksnih gangliozida, GPI-usidrenih proteina i transmembranskih proteina te odrediti trajnost dobivenih rezultata nakon imunohistokemijske analize.

Nacrt studije: Eksperimentalna studija na pokusnim laboratorijskim životinjama

Materijal i metode: Za istraživanje je korišteno tkivo mozga miševa starih tri mjeseca. Nakon žrtvovanja životinja, njihovi su mozgovi izolirani, fiksirani i krioprotektirani. Imunohistokemijska analiza je napravljena korištenjem primarnih protutijela za gangliozid GD1a, Thy-1 protein i GABA receptor. Dobiveni rezultati su fotografirani digitalnim fotoaparatom na svjetlosnom mikroskopu, analizirani u programu *Fiji*, a statistika je napravljena u programu *XLSTAT*.

Rezultati: U prikazu imunohistokemijskog obojenja kod gangliozida GD1a do najveće promjene došlo je kod trajnog pokrivala Fluoromount, što je i pokazano kao statistički značajno, osobito u ML sloju kao i u WM sloju. Kod GABA receptora, do najveće promjene u prikazu došlo je kod trajnog pokrivala DakoCytomation, što je analizom pokazano kao statistički značajno posebno u ML sloju i u WM području. Imunohistokemijsko obojenje kod Thy-1 proteina najviše se promijenilo kod trajnog pokrivala DakoCytomation, statistički značajno u GL i WM sloju.

Zaključak: Različita trajna pokrivala utječu na rezultate imunohistokemijske analize te je za ispravne rezultate potrebno preparate odmah poslikati pod mikroskopom.

Ključne riječi: GABA receptor; gangliozidi; Thy-1 protein; trajna pokrivala

9. SUMMARY

Different mounting media influence immunohistochemical analysis

Objectives: To compare the influence of commercially available mounting media on the display of the distribution of complex gangliosides, GPI-anchored proteins and transmembrane proteins and to determine the durability of the results after immunohistochemical analysis.

Study Design: Experimental study on laboratory animals

Material and methods: The brain of three month old mice were used for this study. After sacrificing the animals, their brains were isolated, fixed and cryoprotected. Immunohistochemical analysis was performed using primary antibodies for gangliosid GD1a, Thy-1 protein and GABA receptor. The results were photographed by digital camera on a light microscope, analyzed in *Fiji* and statistics were produced in *XLSTAT*.

Results: In the presentation of immunohistochemical staining in ganglioside GD1a, the greatest change occurred in the case of mounting media Fluromount, which was shown as statistically significant, especially in the ML and WM layers. At the GABA receptor, the greatest change in the display occurred with mounting media DakoCytomation, which was shown by analysis to be statistically significant, especially in the ML layer and WM area. Immunohistochemical staining in Thy-1 protein changed most with mounting media DakoCytomation, which is statistically significant in the GL and WM layers.

Conclusion: Different mounting media affect the results of immunohistochemical analysis so, to obtain accurate results, the photographs of specimens should be taken immediately under a microscope.

Keywords: GABA receptor; gangliosides; mounting media; Thy-1 protein

10. LITERATURA

1. Cooper GM, Hausman RE. Stanica, molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2010.
2. Vega- Cabrera LA, Pardo- Lopez L. Membrane remodeling and organization: Elements common to prokaryotes and eukaryotes. *IUBMB Life*. 2017;69(2):55-62.
3. Shevchenko A, Simons K. Lipidomics: coming to grips with lipid diversity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11(8):593-8.
4. Zalba S, L.M. ten Hagen T. Cell membrane modulation as adjuvant in cancer therapy. *Cancer Treat Rev*. 2017;52:48-57.
5. Shi Y, Cai M, Zhou L, Wang H. The Structure and Function of Cell Membranes Studied by Atomic Force Microscopy. *Semin Cell Dev Biol*. 2018;73:31-44.
6. Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. 2002;110(5):597-603.
7. Daniotti JL, Iglesias–Bartolome R. Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides. *IUBMB Life*. 2011;63(7):513-520.
8. Castro BM, Prieto M, Silva LC. Ceramide: A simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog Lipid Res*. 2014;54:53-67.
9. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa T. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides—An overview. *J Oleo Sci*. 2011;60(10):537-544.
10. Svennerholm L. Ganglioside designation. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1980;125:11.
11. Lauc G, Heffer-Lauc M. Shedding and uptake of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol- anchored proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1760(4):584-602.
12. Kolter T. Ganglioside biochemistry. *ISRN Biochem*. 2012;103(1):81-90.
13. Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. Sialic Acids in the Brain: Gangliosides and Polysialic Acid in Nervous System Development, Stability, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev*. 2014;94(2):461-518.

14. Li TA, Schnaar RL. Congenital Disorders of Ganglioside Biosynthesis. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2018;156:63-82.
15. Kolter T, Sandhoff K. Lysosomal degradation of membrane lipids. *FEBS Letters.* 2010;584:1700-1712.
16. Miyata M, Kambe M, Tajima O, Moriya S, Sawaki H, Hotta H, et al. Membrane Sialidase NEU3 Is Highly Expressed in Human Melanoma Cells Promoting Cell Growth With Minimal Changes in the Composition of Gangliosides. *Cancer Sci.* 2011;102(12):2139-49.
17. Fernandes Filho JA, Shapiro BE. Tay-Sachs Disease. *Arch Neurol.* 2004;61(9):1466-8.
18. Zhang X, Kiechle FL. Glycosphingolipids in Health and Disease. *Ann Clin Lab Sci.* 2004;34(1):3-13.
19. Posse de Chaves E, Sipione S. Sphingolipids and gangliosides of the nervous system in membrane function and dysfunction. *FEBS Letters.* 2010;584(9):1748-1759.
20. Kwak DH, Seo BB, Chang KT, Choo YK. Roles of gangliosides in mouse embryogenesis and embryonic stem cell differentiation. *Exp Mol Med.* 2011;43(7):379-388.
21. Kinney HC. Human myelination and Perinatal White Matter Disorders. *J Neurol Sci.* 2005;228(2):190-2.
22. Yu RK, Nakatani Y, Yanagisawa M. The role of glycosphingolipids metabolism in the developing brain. *J Lipid Res.* 2009;50:440-445.
23. Bisel B, Pavone FS, Calamai M. GM1 and GM2 gangliosides: recent developments. *BioMol Concepts.* 2014;5(1):87-93.
24. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, Mc Jarrow P. The Role of Gangliosides in Neurodevelopment. *Nutrients.* 2015;7(5):3891-3913.
25. Kesner PR. Behavioral Functions of the CA3 Subregion of the Hippocampus. *Learn Mem.* 2007;14(11):771-81.
26. Kracun I, Rosner H, Drnovsek V, Heffer-Lauc M, Cosovic C, Lauc G. Human brain gangliosides in development, aging and disease. *Int J Dev Biol.* 1991;35:289-295.

27. Trinchera M, Parini R, Indellicato R, Domenighini R, dall' Olio F. Diseases of Ganglioside Biosynthesis: An Expanding Group of Congenital Disorders of Glycosylation. *Mol Genet Metab.* 2018;124(4):230-237.
28. Smith SM. Strategies for the Purification of Membrane Proteins. *Methods Mol Biol.* 2017;1485:389-400.
29. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE. *Molecular Cell Biology.* 4. izd. New York: W. H. Freeman; 2000.
30. Kinoshita T. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anchors: Biochemistry and Cell Biology: Introduction to a Thematic Review Series. *J Lipid Res.* 2016;57(1):4-5.
31. Kinoshita T, Fujita M. Biosynthesis of GPI-anchored Proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J Lipid Res.* 2016;57(1):5-24.
32. Nozaki M, Ohishi K, Yamada N, Kinoshita T, Nagy A, Takeda J. Developmental Abnormalities of Glycosylphosphatidylinositol – Anchor – Deficient Embryos Revealed by Cre/loxP System. *Lab Invest.* 1999;79(3):293-9.
33. Morris RJ. Thy-1, a Pathfinder Protein for the Post-genomic Era. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:173.
34. Picke AK, Campbell GM, Blucher M, Krugel U, Schmidt FN, Tsourdi E, i sur. Thy-1 (CD90) promotes bone formation and protect against obesity. *Sci Transl Med.* 2018;10(453):6806.
35. Leyton L, Diaz J, Martinez S, Palacios E, Perez LA, Perez RD. Thy-1/CD90 a Bidirectional and Lateral Signaling Scaffold. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7:132.
36. Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM Jr, Kim JJ, Hibbs RE. Structure of a human synaptic GABA-A receptor. *Nature.* 2018;559(7712):67-72.
37. Olsen RW. GABA_AReceptor: Positive and Negative Allosteric Modulators. *Neuropharm.* 2018;136(Pt A):10-22.
38. Collingridge GL, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharm.* 2009;56(1):2-5.

39. Sigel E, Steinmann ME. Structure, Function, and Modulation of GABA_A Receptors. *J Biol Chem*. 2012;287(48):40224-40231.
40. Pin JP, Bettler B. Organization and Functions of mGlu and GABA_B Receptor Complexes. *Nature*. 2016;540(7631):60-68.
41. Cheng R, Zhang F, Li M, Wo X, Su YW, Wang W. Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Front Chem*. 2019;7:588.
42. Ramos-Vara J.A. Principles and Methods of Immunohistochemistry. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:115-128.
43. Miller RT. Avoiding pitfalls in diagnostic immunohistochemistry - important technical aspects that every pathologist should know. *Semin Diagn Pathol*. 2019;36(5):312-335.
44. Seddon AM, Curnow P, Booth PJ. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1666:105-117.
45. Heffer-Lauc M, Viljetic B, Vajn K, Schnaar RL, Lauc G. Effects of Detergents on the Redistribution of Gangliosides and GPI-anchored Proteins in Brain Tissue Sections. *J Histochem Biochem*. 2007;55:805.
46. Syrbu SI, Cohem MB. An Enhanced Antigen – Retrieval Protocol for Immunohistochemical Staining of Formalin – Fixed, Paraffin – Embedded Tissues. *Methods Mol Biol*. 2011;717:101-10.
47. Ravikumar S, Surekha R, Thavarajah R. Mounting media: An overview. *J NTR Univ Health Sci*. 2014;3:1-8.
48. Renshaw S. *Immunohistochemistry and Immunocytochemistry: Essential Methods*. 2. izd. West Sussex, UK: John Willey & Sons, Ltd; 2017.
49. Luna LG. *Manual of Histologic and Special Staining Techniques*. 2. izd. New York: The Blakiston Division McGraw Hill Book Co; 1960.
50. Chery WB. *Flourescence emission with special reference to standardization in immunofluorescence. Standardization in Immunofluorescence*. 1. izd. Oxford: Blackwell; 1970.

51. Collins TJ. Mounting Media and Antifade Reagents. *Microscopy Today*. 2006;14(1):34-39.
52. Ivić V. Poveznica upale niskog stupnja i razvoja rezistencije na leptin i inzulin u mozgu odraslih pretilih Sprague-Dawley štakora liječenih metforminom i liraglutidom. Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku; 2017.
53. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Vet Pathol*. 2005;42(4):405-26.
54. Heffer-Lauc M, Lauc G, Nimrichter L, Fromholt SE, Schnaar RL. Membrane redistribution of gangliosides and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in brain tissue sections under conditions of lipid raft isolation. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1686(3):200-208.
55. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of Formalin Tissue Fixation and Processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-1019.
56. Chen AI, Zang K, Masliah E, Reichardt LF. Glutamatergic axon-derived BDNF controls GABAergic synaptic differentiation in the cerebellum. *Sci Rep*. 2016;6:20201.
57. McKenzie JL, Fabre JW. Distribution of Thy-1 in human brain: immunofluorescence and absorption analyses with a monoclonal antibody. *Brain Res*. 1981;230(1-6):307-316.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Kristina Vuković

Datum rođenja: 15. travnja 1996.

Adresa: Josipa bana Jelačića 144, Donja Mahala, BiH

e-pošta: kvukovick96@gmail.com

Obrazovanje:

2018. – 2020. Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek

2015. – 2018. Preddiplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika na Medicinskom fakultetu Osijek

2011. – 2015. Opća gimnazija, Školski centar fra Martina Nedića Orašje

2003. – 2011. Osnovna škola Ruđera Boškovića u Donjoj Mahali