

# Utjecaj fiksacije tkiva jetra i mozga na standardna histološka i imunohistokemijska bojenja

---

Viland, Sven

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:588347>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-01**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske**  
**dijagnostike**

**Sven Viland**

**UTJECAJ FIKSACIJE TKIVA JETRE I**  
**MOZGA NA STANDARDNA**  
**HISTOLOŠKA I**  
**IMUNOHISTOKEMIJSKA BOJENJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**  
**MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK**  
**Preddiplomski sveučilišni studij medicinsko laboratorijske**  
**dijagnostike**

**Sven Viland**

**UTJECAJ FIKSACIJE TKIVA JETRE I**  
**MOZGA NA STANDARDNA**  
**HISTOLOŠKA I**  
**IMUNOHISTOKEMIJSKA BOJENJA**

**Završni rad**

**Osijek, 2018.**

Rad je izrađen na Medicinskom fakultetu Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
u Laboratoriju za neurobiologiju.

Mentor rada: prof.dr.sc. Marija Heffer

Rad ima 117 stranica i 85 slika.

Hvala mentorici, prof. dr.sc. Mariji Heffer, na vjeri u mene i pomoći pri izradi ovog rada.

Hvala Miloradu Zjaliću na neizmjernom strpljenju, stalnim objašnjavanjima i neprospavanim noćima zbog mene.

Hvala mojoj obitelji i prijateljima na podršci i razumijevanju.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	1
1.1. Nedenaturirajući fiksativi .....	1
1.1.1. Formaldehid .....	2
1.1.2. Akrolein .....	3
1.1.3. Glioksal .....	3
1.1.4. Osmijev tetroksid .....	3
1.1.5. Karbodiimidi .....	3
1.1.6. Glutaraldehid .....	3
1.2. Denaturirajući fiksativi .....	4
1.2.1. Metanol i etanol .....	4
1.2.2. Aceton .....	4
1.2.3. Acetatna kiselina .....	4
1.2.4. Pikrinska kiselina.....	5
1.3. Utjecaj cinka na rutinsku fiksaciju tkiva .....	5
1.4. Histologija jetre .....	6
1.5. Histologija regija mozga .....	7
1.5.1. Kora velikog mozga .....	7
1.5.2. Mali mozak .....	7
1.5.3. <i>Cingulum</i> .....	7
1.5.4. Hipokampus .....	8
<b>2. HIPOTEZA</b> .....	9
<b>3. CILJEVI RADA</b> .....	10
<b>4. ISPITANICI I METODE</b> .....	11
4.1. Ustroj studije .....	11
4.2. Materijali .....	11
4.3. Metode .....	12
4.3.1. Imunohistologija .....	13
4.3.2. Hemalaun/eozin bojenje .....	14
4.3.3. Toluidinsko bojenje .....	15
4.3.4. Toluidin s dijastazom i odmašćivanjem .....	15
4.3.5. Toluidin s dijastazom .....	16
4.3.6. Bojenje po Nisslu .....	15
4.3.7. Uljno crvena na slobodno plutajućim uzorcima .....	16
4.3.8. Perls-DAB .....	16
4.4. Kvantifikacija uzoraka mozgova .....	16
4.5. Kvantifikacija uzoraka jetara .....	17
4.6. Statističke metode .....	19
<b>5. REZULTATI</b> .....	19
5.1. Hemalaun/eozin mozak .....	19
5.2. Nissl mozak .....	28
5.3. Uljno crvena mozak .....	33
5.4. Metakromatski toluidin mozak .....	38
5.5. Metakromatski toluidin s dijastazom mozak .....	43
5.6. Metakromatski toluidin s dijastazom i odmašćivanjem mozak .....	48
5.7. Perls-DAB mozak .....	53
5.8. NeuN .....	58
5.9. MAP2 .....	63
5.10. Kolera toksin .....	68

5.11.	GT1b .....	73
5.12.	GFAP .....	75
5.13.	IBA 1 .....	80
5.14.	Hemalaun/eozin jetra .....	85
5.15.	Nissl jetra .....	90
5.16.	Uljno crvena jetra .....	93
5.17.	Metakromatski toluidin jetra .....	96
5.18.	Metakromatski toluidin s dijastazom jetra .....	99
5.19.	Perls-DAB jetra .....	102
<b>6.</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>105</b>
<b>7.</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>111</b>
<b>8.</b>	<b>SAŽETAK</b> .....	<b>112</b>
<b>9.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>113</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>114</b>
<b>11.</b>	<b>ŽIVOTOPIS</b> .....	<b>117</b>

## POPIS KRATICA

CTXB	kolera toksin podjedinica B (engl. <i>cholera toxin B subunit</i> )
CA	struktura hipokampusa - amonov rog (lat. <i>Cornu ammonis</i> )
DAB	diaminobenzidin
ESS	pojačana fiziološka otopina (engl. <i>enhanced saline solution</i> )
ESS/Zn	pojačana fiziološka otopina s dodatkom 0.2% cinkova sulfata
GFAP	kiseli protein glije (engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GT1b	trisijalogangliozid serije b (engl. <i>trisialoganglioside series b</i> )
HRP	peroksidaza iz hrena (engl. <i>horse radish peroxidase</i> )
IBA1	adaptorska molekule koja veže kalcij (engl. <i>Ionized calcium-binding molecule</i> )
MAP2	mikrotubulima pridruženi protein2 (engl. <i>microtubule associated protein 2</i> )
NeuN	neuronske jezgre (engl. <i>neuronal nuclei</i> , neuronske jezgre)
PFA	paraformaldehid
PFA/Zn	PFA i 1% sol cinkova sulfata

TBS	Tris pufer (engl. <i>Tris buffer saline</i> )
Zn	Grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije
Zn/Zn	Grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn
0/Zn	Grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn
0/0	Grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA
0	Grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije



# 1. UVOD

## 1. UVOD

Kvalitetna fiksacija neophodna je za svakodnevni rad u histološkim laboratorijima. Fiksativi su kemikalije koje svojim djelovanjem sprječavaju aktivnost proteolitičkih enzima, povećavaju strukturnu stabilnost tkiva i imaju baktericidan učinak u tkivima na koje djeluju. Fiksacija omogućava očuvanje izvorne stanične strukture za vrijeme djelovanja reagensa koji se primjenjuju u histološkoj analizi tkiva. Nekoliko je uvjeta za idealnu fiksaciju: što manje vremena mora proći između disekcije tkiva iz živog organizma i fiksacije istog, pH fiksativa bi trebao biti blizu 7 tijekom cijele fiksacije (zato bi omjer volumena fiksativa i tkiva trebao biti barem 20:1), brzina prodiranja fiksativa u tkivo treba biti optimizirana s vremenom fiksacije i treba poznavati utjecaj temperatura na brzinu fiksacije. Pretjerana fiksacija oštećuje tkivo i dovodi 'skrivanja' epitopa. Kako su fiksativi skupi i uglavnom štetni po okoliš, manje koncentracije ne samo da omogućavaju uštedu već su i učinkovitije (1). Brojne su prednosti pri izboru samo jednog fiksativa, ali isto tako i ograničenja koja su specifična za tkiva ili metode koje slijede nakon primjene tog fiksativa. Često se u istraživačke svrhe, posebno za tkiva koja brzo propadaju - poput bubrega i mozga, koristi Zenkerova otopina. Zbog toga što se u Zenkerovoj otopini uz PFA nalaze otrovne živine soli i pikrinska kiselina, neprikladna je za rutinsku upotrebu. Zadatak živinih soli jest povećati ionsku jakost fiksativa i time dovesti do razvezivanja ionskih veza i bolje fiksacije pojedinačnih molekula. Pikrinska kiselina zakiseljava pufer i doprinosi denaturaciji proteina. Soli metala su manje agresivan način postizanja disocijacije molekula, pa bi i samo obogaćivanje standardnog formaldehidnog fiksativa ovim solima doprinijelo boljoj fiksaciji uzoraka (2). Općenito, fiksativi se mogu podijeliti na denaturirajuće i nedenaturirajuće.

### 1.1 Nedenaturirajući fiksativi

Nedenaturirajući fiksativi se češće primjenjuju zahvaljujući formaldehidu (formalinu), koji se najčešće koristi prilikom izrade preparata za dijagnostičke svrhe. Načelo rada nedenaturirajućih fiksativa je stvaranje veza između aktivnog sastojka izabranog fiksativa i proteina te raznih drugih staničnih molekula kojima mijenja naboj i prostorni raspored (3,4). Neki od ostalih češćih nedenaturirajućih fiksativa su akrolein, gliksal, osmijev tetroksid, karbodiimid i glutaraldehid. Osim navedenih, postoje još razni spojevi koji se ne koriste veoma često. Neki od takvih su: diizocijanati, dietilpirokarbonati, diimidoesteri, kloro-s-triazidi, maleimidi i benzokinoni (5).

# 1. UVOD

## 1.1.1. Formaldehid

Formaldehid je najčešći fiksativ koji se koristi u rutinskom radu histološkog laboratorija. U praksi se obično koristi u obliku formalina – odnosno paraformaldehid, koji se dobije otapanjem 10%-tnog formalina u puferu (6). Formaldehid se u vodenoj otopini hidrira u metilen glikol. Molekule metilen glikola reagiraju međusobno, stvarajući polimer. Metilen glikol se nakon dužeg vremena polimerizira u polioksometilen glikol. U tkivu, koje je blago lužnati puferi sustav, polioksometilen glikol se depolimerizira u metilen glikol koji se potom dehidrira u karbonil formaldehid (7). Oba oblika formaldehida imaju sposobnost fiksacije tkiva. Formaldehid je najdjelotvorniji kada u otopini ima malo više metilen glikola nego karbonil formaldehida. Etilen glikol i karbonil formaldehid prodiru u tkivo kada je ono uronjeno u fiksativ. Bitno je naglasiti da karbonil formaldehid ulazi puno sporije i u manjoj količini od etilen glikola. Ta je pojava poznata pod nazivom „penetracijsko-fiksacijski paradoks“ (1,6,8). Formaldehid reagira sa raznim makromolekulama uključujući proteine, glikoproteine, nukleinske kiseline i polisaharide (1,7,9). Smatra se da je najčešća vrsta križnih veza nastala djelovanjem formaldehida veza između atoma dušika na kraju postraničnog lanca tirozina i atoma dušika u peptidnoj vezi. Tijekom vremena, broj tih veza se povećava (1,7,8). Prvo s čime formaldehid reagira su primarni amini. Zatim reagira i s purinima i tiolima pri čemu nastaju mono, dimetilni ili hidroksilni metilni derivati koji su kovalentno vezani s tkivom. Križno vezivanje u reakcijama s formaldehidom se zapravo događa stvaranjem metilenskih mostova. Križne veze nastavljaju reagirati s drugim funkcionalnim skupinama u blizini, poput gvanidina, tirozinskih prstena, asparagina i amida (1,7,9,10). Formaldehid reagira s aminima stvarajući iminske ione. Iminski ioni potom reagiraju s fenolnom skupinom tirozina, pri čemu nastaje kovalentna veza (7,11). Prvotno se križno vezivanje zaustavlja 48 sati nakon što fiksativ prodre u tkivo. Dok se stvore stabilne veze, može proći i 30 dana. Prvi stupanj ove reakcije je povratan jer se ispiranjem formalina reaktivne skupine vraćaju u početno stanje. U slučaju da se formalin ne ispere, ova reakcija postaje nepovratna zbog velikog broja stvorenih metilenskih mostova (7). Ispiranjem kroz 24 sata se uklanja 50%, a kroz 4 tjedna 90% reaktivnih grupa. Treba napomenuti da se tkiva koja dugo vremena provedu u PFA skupe za približno jednu trećinu izvornog volumena i otvrdnu (12). Još jedna značajka formaldehida je stvaranje vezikula u staničnim membranama koja se vjerojatno događa zbog prisutnosti metilen glikola (1). Česta formula za brzinu prodora ovog fiksativa je 1 mm po satu, a fiksacija traje 24 sata pri sobnoj temperaturi (6). Nedostatak

## 1. UVOD

formaldehida je njegovo kancerogeno djelovanje i hlapljivost, što nalaže rukovanje u digestoru. Loše čuva strukturu nukleinskih kiselina i mijenja terciarnu i kvartarnu strukturu proteina, što ga čini neprikladnim za tkiva koja se obrađuju imunohistokemijski (13).

### 1.1.2. Akrolein

Akrolein (akrilni aldehid) reagira s molekulama na način sličan formaldehidu pri čemu između proteina stvara reverzibilne veze. Neka su istraživanja čak pokazala da stvara više veza od formaldehida. Akroleinova glavna značajka je to što reagira s masnim kiselinama. Prednosti su mu brza penetracija u tkiva i velika reaktivnost, ali nije primjenjiv u rutinskoj primjeni jer dovodi do skupljanja tkiva i nestabilan je u lužnatom pH. Najčešće se koristi u enzimskoj histokemiji i fiksaciji raznovrsnog biljnog materijala (5).

### 1.1.3. Glioksal

Glioksal je aldehid koji također reagira slično formaldehidu. Reaktivne su aldehidne skupine u glioksalu koje omogućavaju stvaranje poprečnih veza. Često se koristi kao zamjena za formalin jer pri sobnoj temperature, za razliku od formalina, ne isparava. Mana mu je što nadražuje kožu (5).

### 1.1.4. Osmijev tetroksid

Osmijev tetroksid je vrlo zapaljiva i otrovna kristalna krutina. Mora se držati u digestoru. Topljiv je u polarnim i nepolarnim otapalima i križno povezuje proteine. Glavna mu je uloga u fiksaciji nezasićenih lipida i fosfolipida pa je jedan od rijetkih fiksativa koji stabiliziraju lipide. U procesu fiksacije osmijev tetroksid reducira u crne spojeve koji su netopljivi, te se nakupljaju u tkivima. Budući da je osmij teški metal, daje gustoću uzorku i to ga čini izvrsnim za rad s elektronskim mikroskopom (6,14).

### 1.1.5. Karbodiimidi

Karbodiimidi su vrlo reaktivni spojevi koji reagiraju s velikim brojem funkcionalnih grupa. Reakcije se mogu pojačati ili pak blokirati odabiranjem kombinacije određene vrste karbodiimida, pH, temperature i katalizatora. Koriste se u pripremi imunogena. Budući da peptidne veze mogu nastati kao posljedica fiksacije, a mogu se i pokidati proteazama, karbodiimidi imaju svoje mjesto u rutinskoj histologiji i imunohistologiji (5).

### 1.1.6. Glutaraldehid

## 1. UVOD

Glutaraldehyd je aldehid koji vjerojatno djeluje na isti način kao i formaldehyd, reagiranjem s lizinom. Aldehidne skupine na oba kraja ove molekule pospješuju jače stvaranje križnih veza nego u slučaju formaldehida, a time i bolje očuvanje ultrastrukture tkiva. Glutaraldehyd daje najbolje očuvanje citoplazme i jezgre. Negativna strana je sporiji prodor fiksativa i, posljedično, loš učinak na imunohistokemijske metode. Zbog toga blokovi tkiva koji se fiksiraju ovim fiksativom moraju biti tanki; najviše pola milimetra. Križno vezanje nastalo djelovanjem glutaraldehida je nepovratno. (1,5).

### 1.2. Denaturirajući fiksativi

Denaturirajući fiksativi su fiksativi na bazi alkohola. Oni imaju sposobnost denaturacije proteina, odnosno, mijenjaju njihovu strukturu. Utjecaj alkohola u ovim fiksativima je uklanjanje vode iz slobodnih karboksilnih, hidroksilnih, amino, amido i imino skupina na proteinima, što za posljedicu ima koagulaciju proteina i skupljanje tkiva. Najčešći takvi fiksativi su etanol, metanol, aceton, pikrinska kiselina i acetatna kiselina (4,15).

#### 1.2.1. Metanol i etanol

Metanol i etanol narušavaju hidrofobne interakcije jer se izmjenjuju s vodom, čime se mijenja topljivost i tercijska struktura uzorka. Alkoholi vrlo rijetko koriste samostalno kao fiksativi. Najčešće se nalaze u mješavini s raznim drugim fiksativima poput formaldehida, pikrinske kiseline, acetona i dr. Metanol i etanol se također miješaju. Etanola treba biti oko 60% a metanola oko 80% za uspješnu fiksaciju. Etanol je izvrstan u fiksaciji histoloških razmaza, ali narušava strukturu jezgre i citoplazme. Metanol se najčešće koristi u fiksaciji krvnih razmaza (4,16).

#### 1.2.2. Aceton

Aceton se često koristi u brznoj obradi malih uzoraka. Ima sličan način djelovanja kao etanol i metanol. Najbolje ga je iskoristiti za fiksaciju u sklopu histokemijskog prikazivanja enzima. Dobro otapa lipide, što može tkiva ostaviti krhkim. Aceton je također vrlo zapaljiv i hlapljiv, ta ga nije mudro koristiti u automatskim uređajima jer će ih oštetiti (4,17).

#### 1.2.3. Acetatna kiselina

Za razliku od većine drugih fiksativa, acetatna kiselina ima ulogu u fiksaciji nukleinskih kiselina, a ne proteina. Nalazi se kao sastojak u fiksativima koji sprječavaju skupljanje tkiva, a ovaj učinak se ostvaruje djelovanjem acetata na bubrenje kolagena. Ovo je

## 1. UVOD

djelovanje koje se suprotavlja učincima etanola koji dovodi do značajnog skupljanja tkiva. Acetatna kiselina brzo prodire i fiksacija može biti kratka. Loša strana ovog fiksativa je liza eritrocita (4, 16).

### 1.2.4. Pikrinska kiselina

Pikrinska kiselina je čvrsta tvar žute boje, koja mora biti stalno vlažna da bi se neutralizirala opasnost od eksplozije. Uglavnom se nalazi kao sastojak u drugim fiksativima. Zbog intenzivne boje, pikrinska kiselina se također može koristiti kao histološka boja, ali uz napomenu da bi se trebala isprati s 70% etanolom. Također se koristi za očuvanje glikogena. Njeno djelovanje se temelji na ometanju vodikovih veza u proteinima. Pikrinska se kiselina koristi postraničnim skupinama proteina da bi stvorila soli, a to uzrokuje koagulaciju. Razgrađuje nukleinske kiseline i kalcij. Nedostatak je znatno skupljanje tkiva (4,5).

### 1.3. Utjecaj cinka na rutinsku fiksaciju tkiva

Cink je dvovalentni metalni ion koji ulazi u interakciju s proteinima i gangliozidima te dovodi do disocijacije ovih molekula od njihovih prirodnih liganda. Cink je manje je toksičan i, ponekad se, ali vrlo rijetko, koristi kao zamjena za živu. Ako se dokaže da cink povećava kvalitetu histoloških i imunohistokemijskih postupaka bojenja tkiva, mogao bi se preporučiti za standardnu primjenu u protokolu fiksacije u kojemu se klasičan PFA nadopunjuje 1% solima cinkova sulfata (2). Istraživanja su pokazala da tkiva, koja su fiksirana fiksativima koja sadrže teške metale, poput cinka, imaju bolje fiksirane proteine jezgre. Također, ovakva fiksacija uzoraka utječe na općenito bolju obojenost tkiva rutinskim bojenjima, poput hemalaun/eozin bojenja (17,18,19). Fiksativi s cinkom općenito pokazuju jasniju staničnu morfologiju i cjelovitost tkiva na koja djeluju (13). Cink, na prvi pogled, nema značajnih nedostataka kada se koristi kao dodatak fiksativima, a prednosti su brojne. Jedna od najvažnijih je očuvanje antigenske strukture proteina u imunohistokemijskoj obradi tkiva. Kvaliteta takvih tkiva je čak usporediva sa smrznutim tkivima, koja se smatraju zlatnim standardom za imunohistokemiju (20). Fiksativi s cinkom također čuvaju strukturu i količinu RNK i DNK u uzorcima. Dok ostali fiksativi nabolje čuvaju proteine niske molekularne mase, fiksativi s cinkom taj učinak imaju na proteine velike molekularne mase (13). Zbog svojstva boljeg očuvanja proteina fiksativima s cinkom htjeli smo provjeriti kako će se to odraziti na proteine mozga jer do sada nije rađeno fiksiranje s cinkom na moždanom tkivu štakora. Posebice je važno napomenuti da ovaj način pripreme tkiva nije testiran na krioprotektiranim uzorcima nego isključivo na parafinskim uzorcima. Jetra, kao parenhimski

## 1. UVOD

organ, poslužila je kao kontrola, ali ni na ovom tkivu do sada nije rađena fiksacija cinkom za krioprotektirane rezove.

### 1.4. Histologija jetre

Jetra je najveća žlijezda u ljudskom tijelu. Nalazi se u abdominalnoj šupljini. Obavijena je tankom kapsulom od vezivnog tkiva nazvanom Glissonova kapsula. Posrednik je između probavnog sustava i krvi. Jetra obavlja nekoliko funkcija koje imaju esencijalnu ulogu u metabolizmu: odlaže glikogen, uklanja otpadne metabolite i ksenobiotike, proizvodi žučne soli koje su ključne u probavi lipida i proizvodi krvne bjelančevine. Jetra je podijeljena u 4 veća režnja i u velik broj mikroskopskih režnjića oblika pravilnog šesterokuta u čijim se središtima nalazi središnja vena, a na rubu režnjića je portalni prostor. Portalni prostor je građen od vezivnog tkiva u kojem se nalazi venula, arteriola i žučni kanal. Ta tri dijela se još nazivaju i portalna trijada. Venule sadrže krv iz gornje i donje mezenteričke i vene slezene. Arteriola sadrži krv aorte. Kanal prenosi žuč stvorenu u hepatocitima. u žučni vod. Jetreni režnjići predstavljaju funkcionalnu jedinicu jetre. Oko centralne vene su zrakasto postavljene jetrene stanice, odnosno hepatociti. Hepatocita ima najviše, i to su stanice koje obavljaju jetrene funkcije. Karakteristično za hepatocite je njihov obilan endoplazmatski retikulum, i glatki i hrapavi. Također sadrže nakupine glikogena koje se mogu uočiti histološkim bojenjima. Međusobno su spojeni čvrstim vezama. Acinusni prostor se odnosi na hepatocite u području između dva portalna prostora i dvije najbliže centralne vene. Hepatociti najbliži jetrenoj arterioli će se najbolje opskrbiti kisikom te će moći vršiti najzahtjevnije procese poput sinteze proteina. Što su hepatociti bliže centralnoj veni, to manje kisika dobivaju i obavljaju energetski manje zahtjevan zadatak. Između hepatocita se nalaze jetreni sinusoidi. Sinusoidi sadržavaju Kupfferove stanice duguljastih jezgara koje imaju sposobnost fagocitoze i čija je uloga razgradnja starih eritrocita i hemoglobina. Između hepatocita se također nalaze i žučne kapilare. Kroz njih žuč putuje iz središta režnjića prema žučnim kanalima u portalnom prostoru. Venska krv iz portalnih venula u vezivnim pregradama teče jetrenim sinusoidama prema središtu jetrenog režnjića u centralnu venu. Jetreni sinusoidi su građeni od sloja fenestriranih endotelnih stanica. Odvojeni su od hepatocita tankom bazalnom laminom i vrlo uskim perisinusoidalnim prostorom zvanim Disseov prostor. U ovom se prostoru događa ključna izmjena tvari stanica i plazme pomoću mikrovila hepatocita. Ovdje se također nalaze i stanice koje čuvaju masti. Te su stanice poznate pod nazivom Itove stanice. Sadrže male kapljice lipida s vitaminom A (21).

# 1. UVOD

## 1.5. Histologija regija mozga

### 1.5.1. Kora velikog mozga

Kora velikog mozga se sastoji od 6 slojeva stanica neurona. Većina neurona u kori su položeni okomito, a najveći broj neurona su eferentne piramidalne stanice. Prvi je sloj molekularni sloj koji sadrži mali broj živčanih stanica. Drugi je sloj vanjski zrnati sloj. U njemu je tanak sloj velikog broja malih i gusto složenih živčanih stanica. Treći je sloj piramidalni sloj ili vanjski piramidalni sloj građen od piramidalnih živčanih stanica srednje veličine. Četvrti je sloj vanjski zrnati sloj koji sadrži male živčane stanice nepravilnog izgleda. Peti je sloj ganglijski ili unutarnji piramidalni sloj. U njemu se nalaze velike piramidalne stanice koje spajaju koru velikog mozga i subkortikalne regije, odnosno komuniciraju s motornim neuronima. Zadnji sloj je šesti sloj: multiformni sloj. U njemu se nalaze male polimorfne u fuziformne živčane stanice (22).

### 1.5.2. Mali mozak

Mali je mozak građen od 3 slojaneurona. Prvi je molekularni sloj koji sadrži zvjezdaste i košaraste neurone. Drugi sloj je ganglijski sloj ili sloj Purkinjeovih stanica koji je građen od jednog sloja velikih Purkinjeovih stanica. Treći je sloj zrnati sloj, građen od gusto postavljenih zrnatih stanica. Tijela zrnatih stanica su okrenuta okomito u molekularni sloj gdje se računaju. Ti ogranci potom putuju paralelno duž drugog sloja i spajaju se sa sinapsama Purkinjeovih stanica. U ovom sloju se također nalaze raspršene Golgijeve stanice (22).

### 1.5.3. *Cingulum*

*Cingulum* se sastoji od vlakana koje izlaze iz cingulatnog girusa u entorinalni korteks, omogućavajući komunikaciju između dijelova limbičkog sustava. Tvori bijelu tvar u srži cingulatnog girusa, prateći ga od girus subcallosus čeonog režnja ispod rostruma strukture *corpus callosum* (23). *Cingulum* sadrži vlakna koja spajaju srednje dijelove čeonog, parijetalnog i sljepoočnog režnja. Ta vlakna su poznata pod nazivom U-vlakna (24).

### 1.5.4. Hipokampus

Hipokampus je nakupina sive tvari u obliku morskog konjica. To je područje gdje se kora velikog mozga suzi u jedan sloj gusto položenih piramidalnih neurona, te se tijekom razvoja uvijek u karakterističan oblik (25). Hipokampus je građen od nekoliko slojeva. Dentatni girus je dio hipokampusa građen od 3 sloja stanica: molekularni, zrnati i polimorfni. Živčane

## 1. UVOD

stanice u zrnatom sloju zovu se zrnate stanice. Njihovi aksoni se protežu do dendrita piramidalnih živčanih stanica u regiji 3 amonovog roga (lat. *Cornu amonis*) (26). CA3 područje hipokampusa sadrži slojeve poznato kao *strata*: lacunosum-molekularni, radiatum, lucidum, piramidalni i oriens. CA2 i 1 imaju sve ove slojeve bez lucidum stratum. Jezgre talamusa, srednje septalne jezgre, supramamilarne jezgre hipotalamusa, jezgra središnje crte i *locus coeruleus* moždanog debla šalju svoje aksoni prema entorinalnom korteksu. Hipokampus komunicira svojim ograncima aksona s ostalim regijama poput neokorteksa i moždanog debla (27).



### **2. HIPOTEZA**

U usporedbi s običnom PFA fiksacijom, fiksacija kombinacijom PFA i 1% solima cinkova sulfata poboljšava kvalitetu osnovnih histoloških i imunohistokemijskih bojenja tkiva.

### **3. CILJEVI RADA**

### **3. CILJEVI RADA**

1. Kvantitativno i kvalitativno usporediti kvalitetu histološkog bojenja ( jezgre, glikogena, lipida i željeza) uzoraka tkiva jetre i mozga nakon perfuzijske ili imerzijske fiksacije s PFA ili PFA/Zn otopinom.
2. Kvantificirati pozitivno i pozadinsko imunohistokemijsko bojenje (na epitope NeuN, MAP-2, Iba1, CTX, GT1b i GFAP) na uzorcima tkiva mozga i jetre nakon perfuzijske ili imerzijske fiksacije s PFA ili PFA/Zn otopinom.

### 4. MATERIJALI I METODE

#### 4.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao istraživanje parova (tkivo životinja perfundiranih PFA fiksativom prema tkivu životinja perfundiranih s PFA/Zn fiksativom), zatim tkiva koja su bila fiksirana samo uranjanjem u fiksativ (imerzijski) nakon disekcije prema tkivima koja su prvo perfundirana fiksativom, a zatim postfiksirana uranjanjem.

#### 4.2. Materijali

U studiju je uključeno 15 mužjaka štakora starosti 3,5 mjeseci koji su nakon pokusa bili namijenjeni eutanaziji u sklopu projekta „Poremećaj vazorelaksacije i endotelno leukocitna interakcija u razvoju aterosklerotskih lezija“ pod voditeljstvom dr. sc. Zrinke Mihaljević. Cjelokupna studija je napravljena na arhivi tkiva pripremljenog na 5 različitih načina.

Studija obuhvaća 5 grupa štakora, s 3 štakora u svakoj grupi - ukupno 15 štakora. U tri grupe, fiksaciji je prethodilo transkardijalno ispiranje krvi iz tkiva uz pomoć transkardijalne perfuzije pojačanom fiziološkom otopinom (engl. *enhanced saline solution*, ESS) sastava 0.9 % NaCl i 0.2% KCl, a pH je prilagođen na 7.40. Zatim je uslijedila disekcija tkiva i imerzijska fiksacija u 4% PFA sa ili bez cinka. U dvijema su grupama uzorci tkiva disecirani odmah nakon eutanazije životinje, bez prethodne perfuzije, te su uzorci naknadno uronjeni u 4% PFA (imerzijska fiksacija tkiva izoliranog iz 6 štakora). Protokol perfuzije (ispiranje pomoću ESS pa fiksacija) za prve tri grupe životinja bio je sljedeći:

1. transkardijalna perfuzija ESS/Zn i imerzijska fiksacija PFA/Zn
2. transkardijalna perfuzija ESS, perfuzija PFA/Zn, imerzijska fiksacija PFA/Zn
3. transkardijalna perfuzija ESS, perfuzija PFA, imerzijska fiksacija PFA.

U preostale dvije grupe, tkivo je nakon eutanazije životinje i disekcije uronjeno u fiksativ, tj. napravljena je samo imerzijska fiksacija kako slijedi:

4. imerzijska fiksacija PFA/Zn
5. imerzijska fiksacija PFA.

Nakon prikupljanja uzoraka, tkiva su ostavljena u otopini pripadajućeg fiksativa u trajanju od 4 dana s dvije izmjene. Nakon fiksacije, tkiva su krioprotektirana u rastućem nizu otopina saharoze. Otopine saharoze su bile napravljene tako da je maseni udio (engl. *weight per*

## 4. MATERIJALI I METODE

*volume*, w/V) saharoze otopljene u PBS puferu bio 10, 20 odnosno 30%. Nakon krioprotekcije tkiva su smrznuta u pothlađenom izopentanu i čuvana na -80°C do daljnje upotrebe.

### 4.3. Metode

Krioprotektirano tkivo izrezano je na kriostatu (LEICA, CM3050 S, Wetzlar, Njemačka). Mozak je rezan u sagitalnom smjeru na debljinu od 35 µm, a jetra na debljinu od 20 µm. Za histološka bojenja uzorci su navučeni na predmetna stakla presvučena želatinom.

Postupak kojim se dobivaju želatinizirana stakla je slijedeći:

- 300 mL destilirane vode se zagrije na 50 °C,
- priredi se 2% otopina želatine (Sigma Aldrich) u vodi dodavanjem 6g želatine u zagrijanu vodu,
- nakon potpunog otapanja otapanja želatine u vodi se doda 0.075 g kromova stipsa (0.00025g/L)
- dobro oprana predmetna stakalca se uranjaju u pripremljenu ohlađenu otopinu u trajanju od 10 sekunda
- stakla se ocijede od viška otopine i ostave sušiti preko noći.

Uzorci su bili obojeni sljedećim histološkim bojenjima: hemalaun/eozin (za prikaz strukture tkiva), Nissl (bojenje jezgara), metakromatski toluidin (prikaz glikogena), uljno crvena (bojenje lipida) i Perls-DAB (prikaz željeza). Tkivo mozga se dodatno bojilo toluidinom za prikazivanje mijelina. Toluidinsko bojenje na uzorcima mozga je napravljeno na dva načina; tako da su uzorci prvo odmašćeni organskim otapalima, pa obojeni, ili tako da su uzorci odmašćeni i tretirani enzimom dijastazom pa obojeni. Metakromazija u mozgu se očekuje u makrofazima i mikroglijji. U rijetkim slučajevima patoloških poremećaja se može naći značajna količina metakromatski obojenih struktura (28).

Imunohistologija je napravljena na slobodno plutajućim uzorcima (engl. *free floating*) nakon čega su uzorci navučeni na stakla. U svim otopinama za imunohistokemiju koristio se kao otapalo Tris pufer (engl. *Tris buffer saline*, TBS). Imunokemijski su prikazani slijedeći epitopi uz korištenje primarnih protutijela kako slijedi:

## 4. MATERIJALI I METODE

- NeuN (engl. *neuronal nuclei*, neuronske jezgre) mišje monoklonsko protutijelo, oznaka protutijela: MAB377, broj klona: A60, proizvođač: Chemicon, Temecula, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države - biljeg zrelih neurona;
- GFAP (engl. *glial fibrillary acidic protein*, kiseli protein glije) zečje poliklonsko protutijelo oznaka protutijela: Z0334, proizvođač: Dako, Agilent Technologies, SantaClara, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države - biljeg astrocita;
- IBA1 (engl. *Ionized calcium- binding molecule 1*, adaptorska molekula koja veže kalcij) zečje poliklonsko protutijelo, oznaka protutijela: C-9972, lot: 127H4050, proizvođač: Wako Pure Chemical Industries, Chuo-ku, Osaka, Japan - biljeg mikroglije;
- GT1b 2b (engl. *trisialoganglioside series b*, trisijaloganglioizid serije b) mišje monoklonsko protutijelo, dobiveno dobrotom profesora Ronalda Lee Schnaara, Jons Hopkins Medicinski fakultet, Baltimore, Sjedinjene Američke Države – biljeg neuronskih membrana;
- MAP2 (engl. *microtubule associated protein 2*, mikrotubulima pridruženi protein 2) mišje monoklonsko protutijelo, oznaka protutijela: M4403, lot: 110M4848, proizvođač: Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države)
- CTXB (engl. *cholera toxin B subunit*, kolera toksin podjedinica B) s biotinom konjugirana podjedinica B kolera toksina, kataloški broj: C-9972, lot: 127H5050, proizvođač: Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Sjedinjene Američke Države) – prepoznavanje epitopa na GM1 ganglioizidima.

Sva bojenja su provedena s ciljem ispitivanja očuvanja strukture proteinskih i lipidnih epitopa nakon različitih protokola fiksacije. Svi uzorci su fotografirani, a slike podvrgnute kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi. Analiza uzoraka je uključivala mjerenje intenziteta obojenja, jasnoće i oštine obojenja preparata, međustaničnu povezanost i cjelovitosti tkiva. Kvantitativna analiza mjerenja intenziteta obojenja, čime se direktno mjerio stupanj vezivanja boje i protutijela za pojedine strukture, obavljena je uz pomoć javno dostupnog programa ImageJ.

### 4.3.1. Imunohistologija

Uzorci su iz deOlmos otopine za čuvanje krioprotektiranih slobodno-plutajućih uzoraka prebačeni u ESS, a zatim u TBS. Blokiranje endogene tkivne peroksidaze napravljeno je kroz dvije inkubacije od po 15 minuta u 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kemika, Zagreb) u TBS-ua. Potom su prebačeni

## 4. MATERIJALI I METODE

u blokirajuću otopinu koju čine kozji serum u volumnom udjelu od 5% i BSA u volumnom udjelu od 1% (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, SAD) otopljeni u TBS-u. Jedan je rez iz svake skupine preko noći inkubiran samo u blokirajućoj otopini i predstavlja negativnu kontrolu kojom smo ustvrdili izostanak reakcije sekundarnog protutijela s epitopima u tkivu. Uzorci negativne kontrole dalje se inkubiraju samo u sekundarnom protutijelu i terciarnom kompleksu te razvijaju. Ostali uzorci su preko noći inkubirani u otopini blokiranja i primarnog protutijela u razrjeđenjima kako slijedi: NeuN 1:1000, GFAP 1: 4000, GT1b 1:2500, Iba1 1:1000, MAP-2 1:500 i CTX 1:1000 . Sljedeći su dan mozgovi prebačeni iz primarnih protutijela u TBS i stavljeni na ispiranje 3 puta po 10 minuta na tresilici. . Sekundarna protutijela, kozja protu-mišja IgG (Jackson-Immunolaboratories, 115065071) ili kozja protu-zečja IgG (Jackson-Immunolaboratories) razrijeđena su u omjeru 1:500 u blokirajućoj otopini. Preparati su inkubirani u ovoj otopini 4 sata na +4°C. Uzorci su ispreani 3 puta po 10 minuta u TBS-u i prebačeni u otopinu terciarnog kompleksa. Tercijarni kompleks (VectaStain ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) čine avidin ibiotin konjugiran s peroksidazom iz hrena (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) priređeni u razrijeđenju 1:250 i inkubirani pola sata prije uranjanja uzoraka kako bi se napravio kompleks. Nakon 2 sata inkubacije u terciarnom kompleksu i 3 ispiranja u TBS, uslijedilo je razvijanje pomoću DAB-a, substrata za HRP. Otopina za razvijanje priređena je prema uputama proizvođača Vector DAB Substrate Kit, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države). Uzorci su stajali u otopini 1 minutu i 45 sekundi, zatim su isprani u TBS-u i stavljeni u hladnjak na 48 sati. Na poslijetku su uzorci navučeni na čista stakla, pokriveni medijem Vectamount (Vector lab., Burlingame, Kalifornija, Sjedinjene Američke Države) te pokrovnim stakalcem.

### 4.3.2. Hemalaun/eozin bojenje

Bojenje hemalaun/eozin napravljeno je na slijedeći način: uranjanje uzoraka u destiliranu vodu 5 minuta, zatim u rastući niz etanola po 5 minuta (50%, 70%, 96%, 100%, 100%), potom u prvi i drugi ksilen 5 minuta, iza ovoga slijedi padajući niz etanola po 5 minuta u svakom, u destiliranu vodu 5 minuta, u hemalaun 10 minuta, ispiranje u destiliranoj vodi, ispiranje u vodu iz slavine 10 minuta, opet ispiranje u destiliranoj vodi, uranjanje u alkoholni eozin 5 do 10 sekundi, ispiranje u destiliranoj vodi, dehidracija u rastućem nizu etanola po 5 sekundi (50%, 70%, 96%, 100%, 100%), u ksilen 1 na 5 minuta, u ksilen 2 na 30 minuta (29), a na kraju su stakla pokrivena histomountom (National Diagnostics, Atlanta, Georgia).

## 4. MATERIJALI I METODE

### 4.3.3, Toluidinsko bojenje

Toluidinsko bojenje napravljeno je na sljedeći način: uranjanje uzoraka u destiliranu vodu 5 minuta, zatim u 0.5% otopinu perjodne kiseline u destiliranoj vodi, ispiranje u destiliranoj vodi jednu minutu, inkubacija u 5% otopini kalijeva metabisulfida u destiliranoj vodi 1 sat, ispiranje u destiliranoj vodi jednu minutu, bojenje u zakiseljenom toluidinu 3 minute, dehidracija u rastućem nizu etanola (100%, 96%, 75%, 100%, 100%) po 5 sekundi u svakom, pročišćavanje u ksilene 1 i 2 po 5 minuta i na kraju su stakla pokrivena pokrovnica uz pomoć medija Histomount (29).

### 4.3.4. Toluidin s dijastazom

Za ovo bojenje je bilo potrebno pripremiti dijastazni pufer sastava 0.14 g dinatrijeva fosfata, 0.985 mononatrijeva fosfata, 4 g natrijeva klorida i 500 mL prokuhane destilirane vode. Uzorci su prebačeni u ovaj pufer i stavljeni na tresilicu 1 sat, 2 puta. Potom je pripremljeno 100 mL 0.1% dijastaze. Uzorci su prebačeni u dijastazu na tresilicu 1 sat pri 37°C, nakon čega je slijedila promjena dijastaze i opet stavljanje na tresilicu 1 sat. Potom je slijedilo bojenje toluidinom iz točke 4.3.3., a na kraju su stakla pokrivena histomountom (29).

### 4.3.5. Toluidin s dijastazom i odmašćivanjem

1. Odmašćivanje uzoraka za toluidin s dijastazom napravljeno uranjanjem uzoraka na 10 min u smjese acetona i kloroforma kako slijedi: 30 mL acetona + 60 mL kloroforma
2. 30 mL acetona + 30 mL kloroforma
3. 60 mL acetona + 30 mL kloroforma.

Potom su uzorci rehidrirani u silaznom nizu etanola (100%, 96%, 75%). Na rehidriranim uzorcima je primijenjen enzim dijastaza otopljen u dijastaznom puferu (29) pri pH 6.5, u trajanju 2 sata u vodenoj kupelji s tresilicom. Dijastaze metabolizira glikogen i slične polisaharide na jednostavne šećere. Nakon vodene kupelji slijedio je protokol bojenja toluidinom kao u točki 4.3.3.

### 4.3.6. Bojenje po Nisslu

Protokol bojenja prema Nisslu bio je sljedeći: uranjanje uzoraka u destiliranu vodu 5 minuta, dehidracija u uzlaznom nizu etanola (50%, 70%, 96%, 100%, 100%) po 5 minuta u svakom, te dodatno u ksilenu 1 i 2 po 5 min, zatim rehidracija u silaznom nizu etanola (100%, 96%, 70%) po 5 minuta, te u destiliranoj vodi 5 minuta, bojenje u krezil violet boji (50 ml krezil violet 1% stock otopine i 200 mL destilirane vode) kroz 5 minuta, odbojavanje u 50% etanolu

## 4. MATERIJALI I METODE

5 minuta, potom 30 sekundi u 70% etanol. Do ove točke postupak za jetru i mozak je bio isti. . Postupak za rezove mozga nastavljen je kako slijedi: 3 minute u 70% etanol, naizmjenično uranjanje uzoraka u 50% i 70% etanol zbog diferencijacije struktura, zatim dehidracija u 96% etanolu 3 minute, u 100% etanolu 3 minute, u ksilenu 3 minute, te pokrivanje medijem Histomount i pokrovnica. Postupak za jetre nastavljen je kako slijedi: dehidracija u 96% etanolu kroz 1 minutu, u 100% etanolu 3 minute, u ksilenu 3 minute, a na kraju su stakla pokrivena histomountom (29).

### 4.3.7. Uljno crvena na slobodno plutajućim uzorcima

Histološko bojenje uljno crvena (eng. *Oil red*) napravljeno je na sljedeći način: uranjanje uzoraka na 15 minuta u otopinu uljno crvene koja je stajala na sobnoj temperaturi 15 minuta (15 mL koncentrirane uljno crvene + 10 mL destilirane vode), zatim dodatna inkubacija na tresilicu 10 minuta, ispiranje 2 puta u destiliranoj vodi po 2 minute, ispiranje u otopini *Heshta* (2  $\mu$ L *Heshta* + 20 mL TBS) 1 minutu, i još jedno ispiranje u TBS-u. Uzorci su potom navučeni na silanizirana stakla i pokriveni glicerolom (29).

### 4.3.8. Perls-DAB bojenje

Bojenje Perls-DAB je napravljeno na sljedeći način: rehidracija uzoraka na staklu u destiliranoj vodi 5 minuta, bojenje sat vremena u pruskom modrilu (50 mL kalijeva ferocijanata, 50 mL 0.2 N klorovodične kiseline i 100 mL destilirane vode), ispiranje u destiliranoj vodi kroz 5 i 2 minute, zatim u 30% etanolu s 1% vodikovim peroksidom čime se inaktiviraju endogene peroksidaze, u hladnjaku na tresilici kroz 75 minuta, ispiranje u destiliranoj vodi 2 minute, razvijanje u DAB-u 12 minuta, ispiranje u destiliranoj vodi 2 minute, a na kraju su stakla pokrivena histomountom (30). Također je obrađen dodatni set uzoraka koji nije inkubiran u pruskom modrilu i oni su poslužili kao negativna kontrola reakciji

### 4.4. Kvantifikacija uzoraka mozgova

Svi uzorci mozgova i jetara su fotografirani kamerom Olympus D70 na mikroskopu Carl Zeiss Axioskop 2 MOT pri povećanju 200x te su kvantificirani u računalnom programu ImageJ. Fotografije su prvo pretvorene u 8-bitne pomoću funkcije *Image/Type/8-bit*. Fotografije koje su dekonvoluirane naredbom *Image/Color/Color Deconvolution* nisu prethodno pretvorene u 8-bitne. Skupine fotografije mozgova nastale dekonvolucijom su obrađene na isti način kao i one 8-bitne. Odabran je kvadrat veličine 500×500 piksela te je



## 4. MATERIJALI I METODE

kvantificirana srednja vrijednost intenziteta obojenja koja se kreće između 0 i 255, gdje 0 predstavlja najtamnije, a 255 najsvjetlije obojenje. Kvantificiranje svakog kvadrata nakon pretvorbe je obavljeno pomoću naredbe *Analyze/measure* s postavkama mjerenja za: *area, min and max gray value, skewness, area fraction i mean gray value*. Ovi uvjeti analize vrijede i za jetre i za mogove. U svim bojenjima su kvantificirane 4 regije: kora mozga, mali mozak, *cingulum* i dentatni girus. U kori mozga, ovisno o izgledu i očuvanosti uzorka, kvantificirano je područje ispod molekularnog sloja , u 3 kvadrata, s lijeva na desno s nepravilnim razmacima. U malom mozgu: kvantificirana su 2 područja; bijela tvar i siva tvar malog mozga. Siva tvar je kvantificirana uz duž ogranaka živčanih vlakana, u 3 kvadrata, s lijeva na desno, s nepravilnim razmacima. Na isti način su kvantificirana i vlakna. U kvadratu gdje se nalazio *cingulum*, *cingulum* je bio na dnu, oko 1000 piksela iznad nazubljene vijuge. Ovdje su kvantificirana 2 područja; donji slojevi kore velikog mozga i sami *cingulum*. Oba područja su kvantificirana 3 puta, s lijeva na desno, s nepravilnim razmacima. U dentalnom girusu su kvantificirana 2 područja; sloj zrnastih stanica i hilus. Oba područja su kvantificirana 3 puta, s lijeva na desno, s nepravilnim razmacima.

Fotografije mozгова bojenih hemalaun/eozinom su dekonvoluirani prema vektoru H+E čime su dobivene dobivene dvije skupine fotografija. Prva je bila skupina fotografija eozina, a druga hemalauna. Fotografije mozгова bojenih toluidinom su dekonvoluirani prema vektoru FeulgenLightGreen čime su dobivene dobivene dvije skupine fotografija. Prva je bila skupina fotografija metakromatskog obojenja, a druga ostatne vezane boje. Fotografije ostalih mozгова su pretvorene u 8-bitne umjesto dekonvolucije.

### 4.5. Kvantifikacija uzoraka jetara

U jetara su analizirana 2 područja; subkapsularno područje (periferni dio) i područje oko centralne vene (središnji dio) na isti način kao i mozak. Sve fotografije uzoraka jetre su pretvorene u 8-bitne ili dekonvoluirane poput mozгова bojenih pripadajućim bojenjem. Dodatno su dekonvoluirane fotografije uzoraka jetre bojene Pruskim modrilom, za razliku od fotografija uzoraka mozгова bojenih Pruskim modrilom, koje nisu dekonvoluirane. Dekonvolucijom prema vektoru H Dab su dobivene dvije skupine fotografija. Prva je značajna i predstavlja količinu željeza u ktivu. Samo područje kvantifikacije nije obuhvaćalo određene regije nego je zahvaćena cijela površina fotografije jetre.

### 4.6. Statističke metode

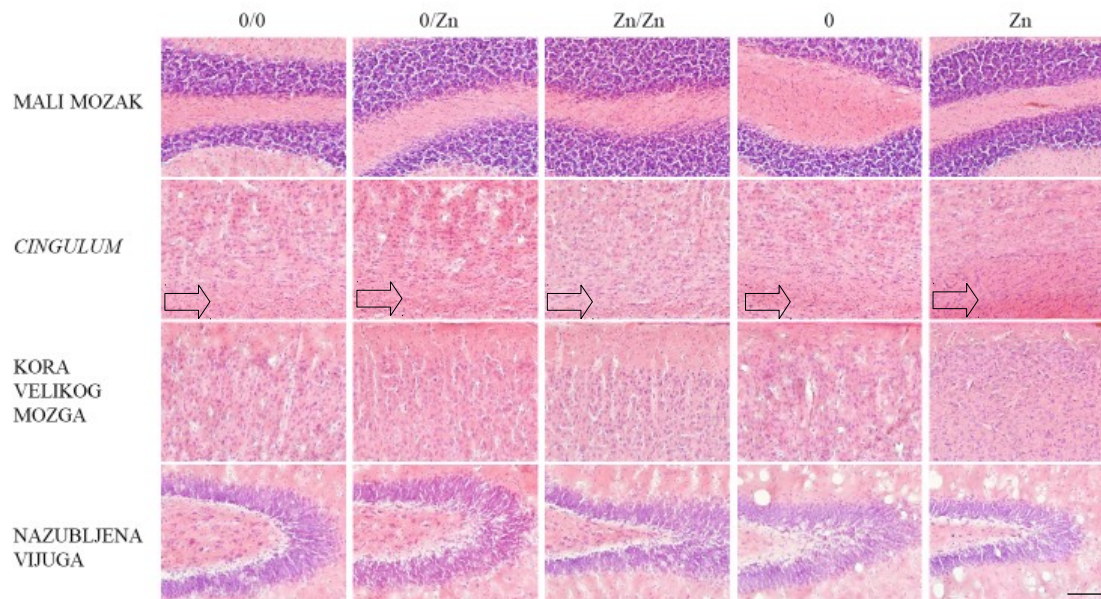
## 4. MATERIJALI I METODE

Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Lilieforsovom inačicom Kolmogorov-Smirnovljenovog testa. Numerički podatci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju raspodjela koja slijede normalnu, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. Sve P vrijednosti bile dvostrane. Razina značajnosti postavljena je na  $\alpha=0,05$ . Za statističku obradu podataka rabljen je program SPSS for Windows (inačica 13.0, SPSS Inc., Chicago, IL, SAD).

### 5. REZULTATI

#### 5.1. Hemalaun/eozin, mozak

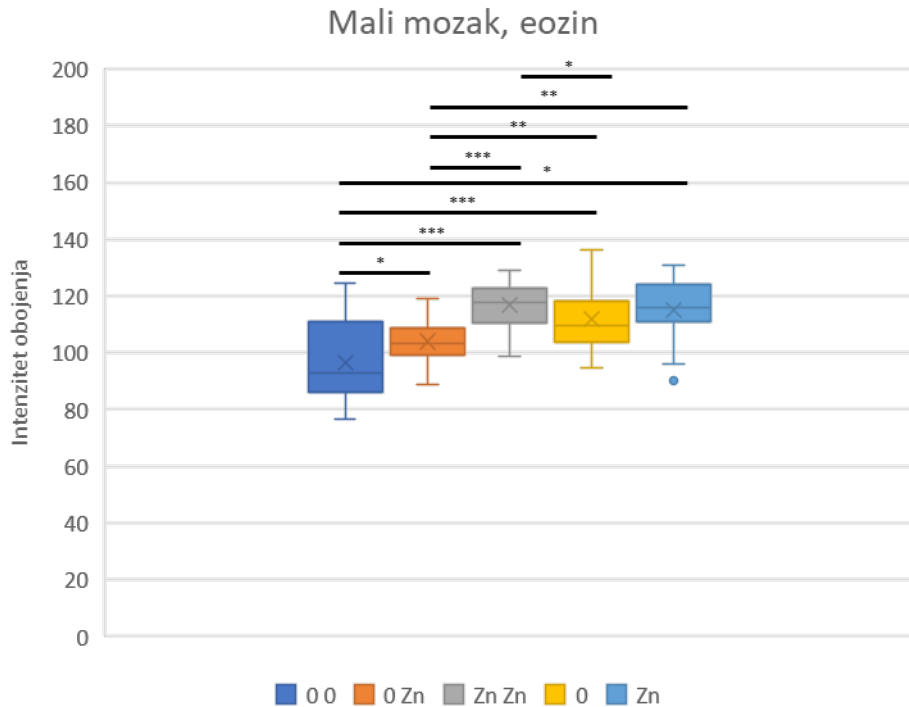
Vezivanje eozina u različitim dijelovima mozga je različita. Eozin se obično veže na pozitivno nabijene skupine u tkivu poput pozitivno nabijenih aminokiselina. Najbolje vezivanje boje eozina je izmjereno u većini regija u 0/Zn grupi i znatno lošije u Zn/Zn grupama i u fiksiranju uranjanjem.



Slika 1. Fotografije uzoraka bojenih hemalaun/eozinom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

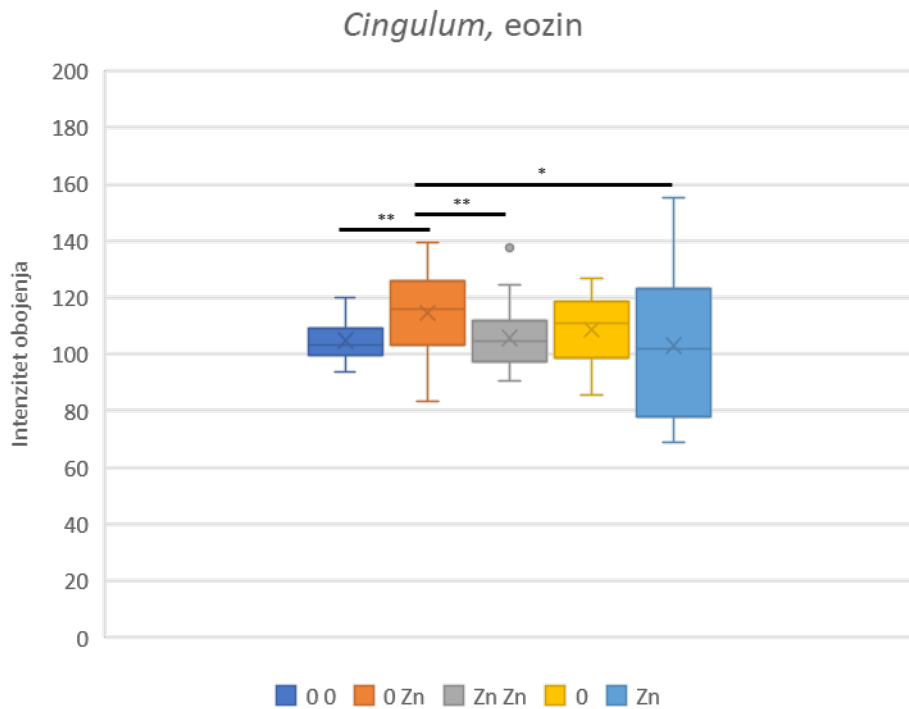
U malom mozgu cink pozitivno utječe na vezivanje i negativno na ispiranje eozina iz preparata i može se vidjeti najintenzivnije vezivanje u slučaju Zn/Zn i Zn grupa koje je su sadržavale cinkove ione. Statistička značajnost razlike  $p < 0,05$ ,  $p < 0,005$ ,  $p < 0,001$ .



Slika 2. Razlika u obojenosti malog mozga eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

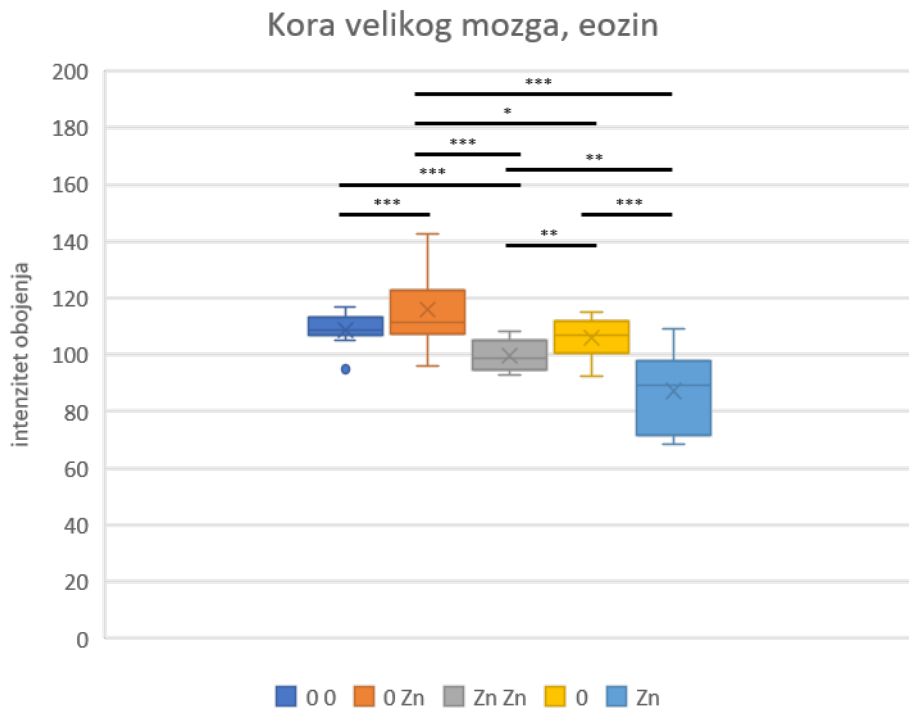
*Cingulum* zbog uglavnom aksonske građe ima drugačije rezultate i vidljivo je kako cink samo u fiksativu kod perfundirane grupe (0/Zn grupa) pojačava vezivanje eozina u odnosu na 0/0 grupu,  $p < 0,005$ . Prisustvo cinka u ESS i fiksativu ( $p < 0,005$ ) i samo u fiksativu kod fiksacije samo uranjanjem značajno smanjuju vezivanje i otpuštanje eozina u odnosu na 0/Zn grupu ( $p < 0,05$ ).



Slika 3. Razlika u obojenosti cinguluma eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

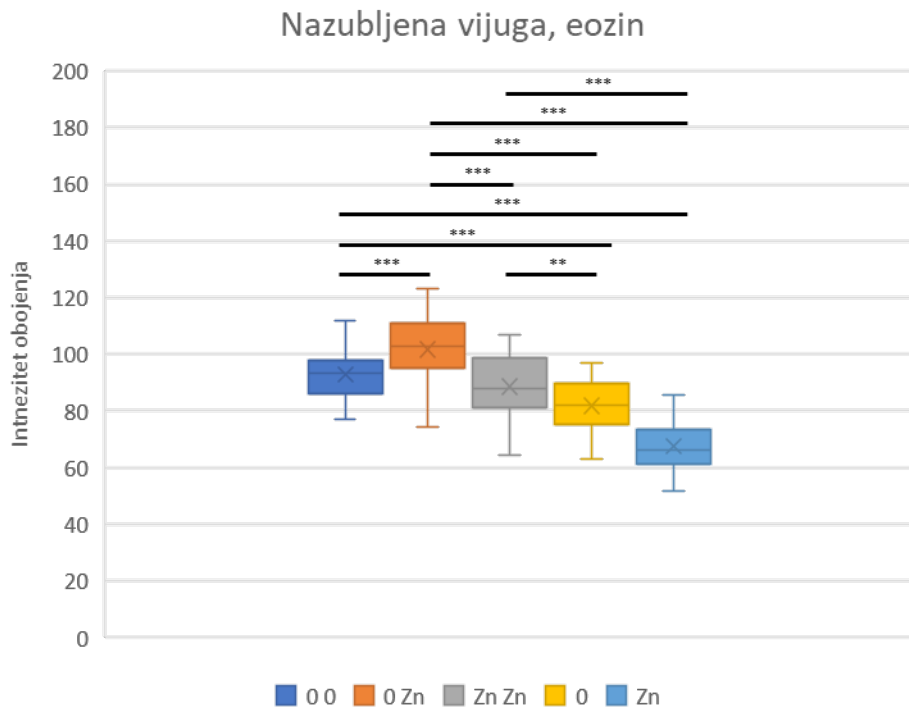
Intenzitet vezivanja i otpuštanja eozina je sličan u kori velikog mozga i u *cingulumu*, a 0/Zn grupa ima značajno više eozina od Zn/Zn grupe ( $p < 0,001$ ), odnosno 0 grupe ( $p < 0,05$ ).



Slika 4. Razlika u obojenosti kore velikog mozga eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

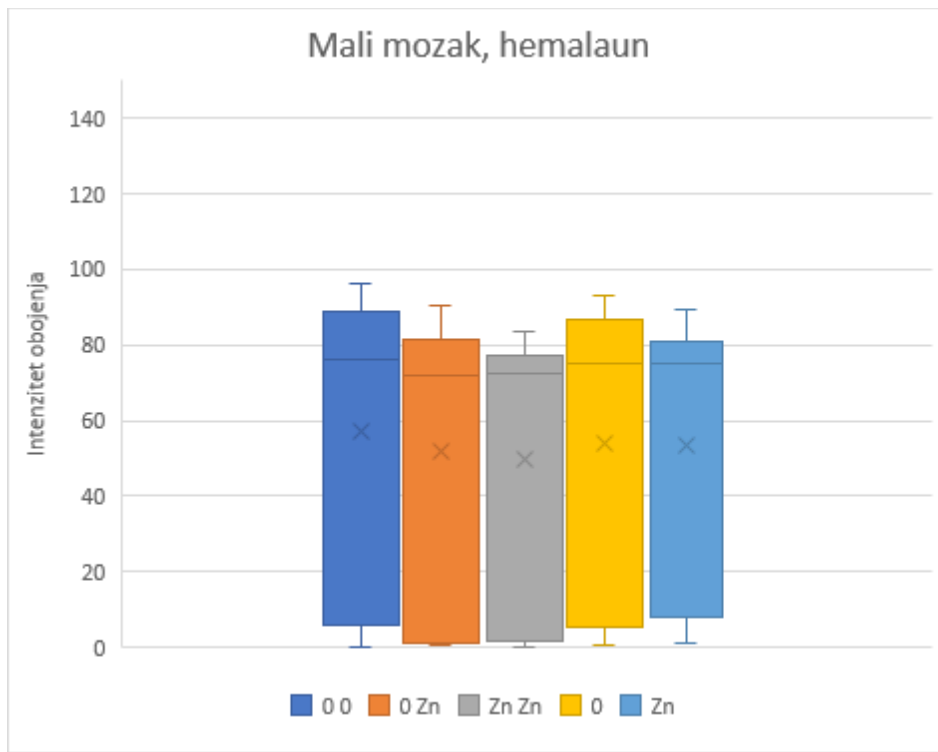
Nazubljena vijuga prati trend prethodne dvije regije s obzirom na obojenost eozinom sa statističkim značajnostima  $p < 0,001$ . Najintenzivnije obojenje od svih je izmjereno u 0/Zn grupi, a najniže u Zn grupi. Fiksiranje samo uranjanjem uz prisustvo cinkovih soli dodatno olakšava ispiranje boje iz tkiva no nema statistički značajnijih razlika u odnosu na samo fiksiranje uranjanjem u PFA bez cinkovih soli.



Slika 5. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Značajnijih razlika u vezivanju hemalaina u jezgrama stanica malog mozga nema. Uočen je veliki raspon intenziteta obojenja gdje se većina intenziteta nalazi u grupama s fiksativom bez dodanog cinka (0 i 0/0).

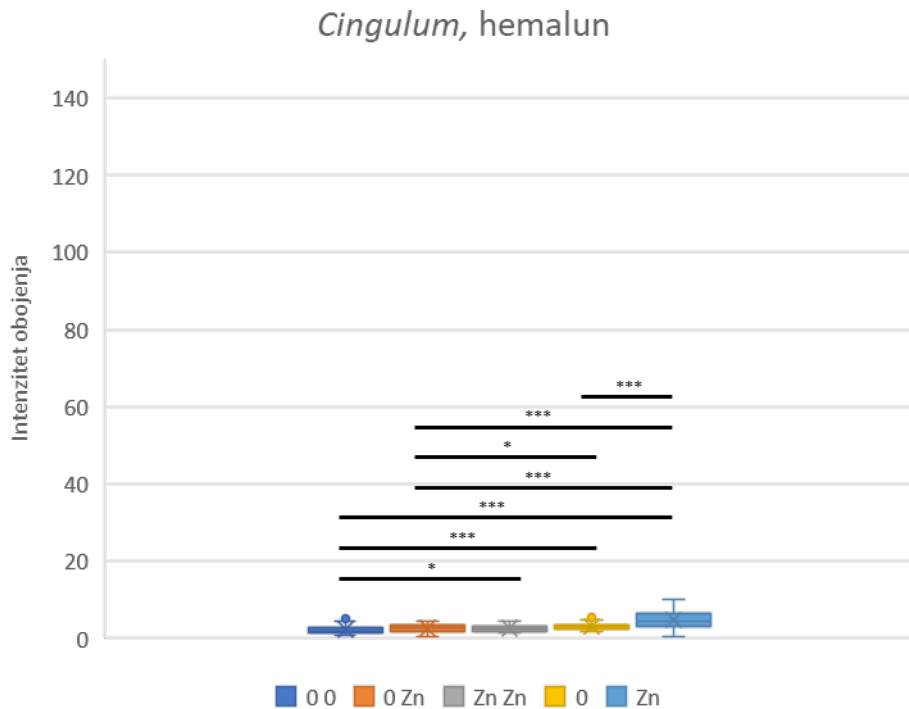


Slika 6. Razlika u obojenost malog mozga hemalainom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test.



## 5. REZULTATI

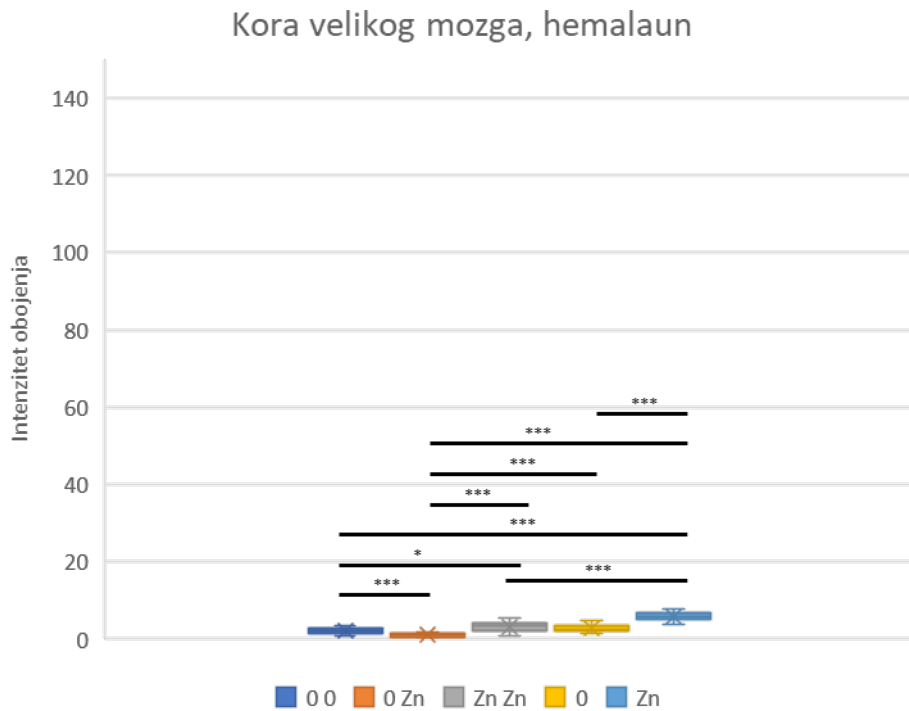
Unutar *cinguluma*, jezgre stanica koje su fiksirane dodatno s cinkom vezale su više boje na sebe u odnosu na 0/0 i 0 grupe ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ). *Cingulum* slabijim intenzitetom veže hemalaun unutar svojih jezgara. Samo uranjanje tkiva u fiksativ rezultirati će jačim vezivanjem boje u jezgrama u odnosu na Zn/Zn perfuzijsku grupu ( $p < 0,001$ ).



Slika 7. Razlika u obojenosti cinguluma hemalaunom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

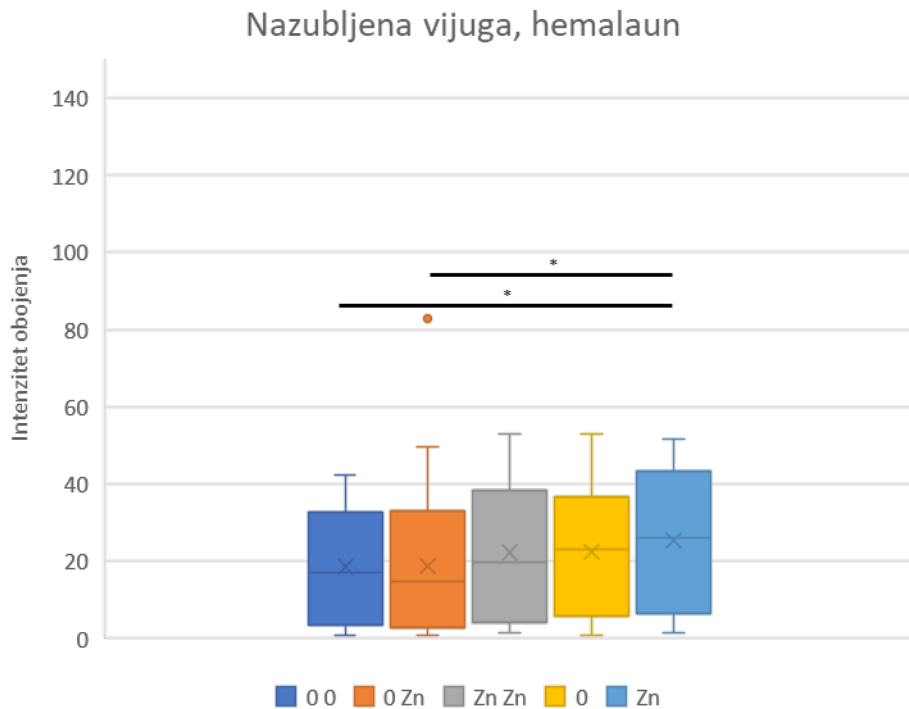
Unutar kore velikog mozga, jezgre stanica koje su fiksirane dodatno s cinkom vezale su više boje na sebe u odnosu na 0/0 i 0 grupe ( $p < 0,05$  i  $p < 0,001$ ). Samo uranjanje tkiva u fiksativ rezultiralo je jačim vezivanjem boje u jezgrama u odnosu na Zn/ Zn perfuzijsku grupu. ( $p < 0,001$ ).



Slika 8. Razlika u kore velikog mozga hemalaunom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Nazubljena vijuga, poput malog mozga, veže hemalaun većim intenzitetom, a značajna razlika postoji između 0/0, 0/Zn grupa i Zn grupe gdje je Zn grupa jače vezala boju u odnosu na prethodne dvije ( $p < 0,05$ ). Narančasta točka iznad 0/Zn grupe predstavlja prisutnost artefakta.

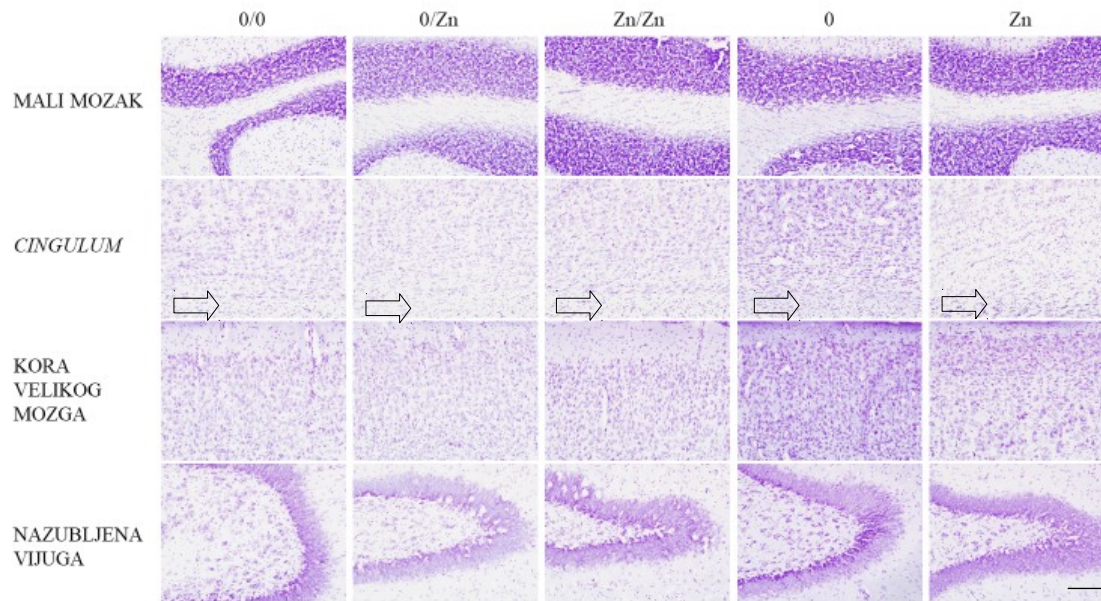


Slika 9. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge hemalaunom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.2. Nissl, mozak

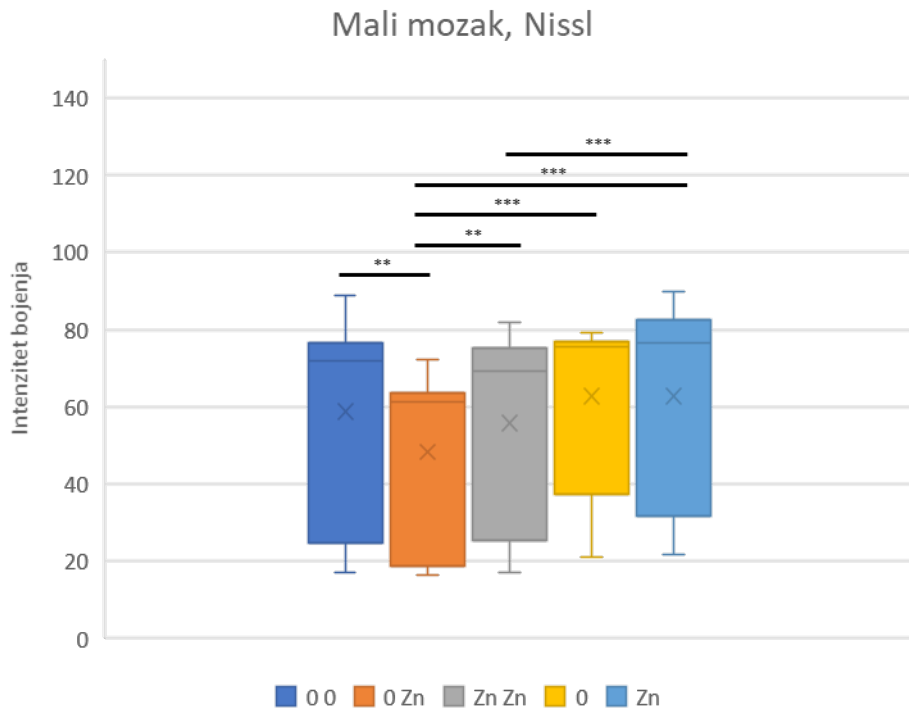
Fiksiranje uranjanjem u fiksativ s cinkom se pokazalo najbolje za očuvanje endoplazmatskog retikuluma (ER) na kojeg se kretil violet boja veže. Nissl je sve grupe pouzdano obojio, ali Zn/Zn daje možda najbolji omjer bojenja i obojenost pozadine.



Slika 10. Fotografije uzoraka bojenih po Nissl-u pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

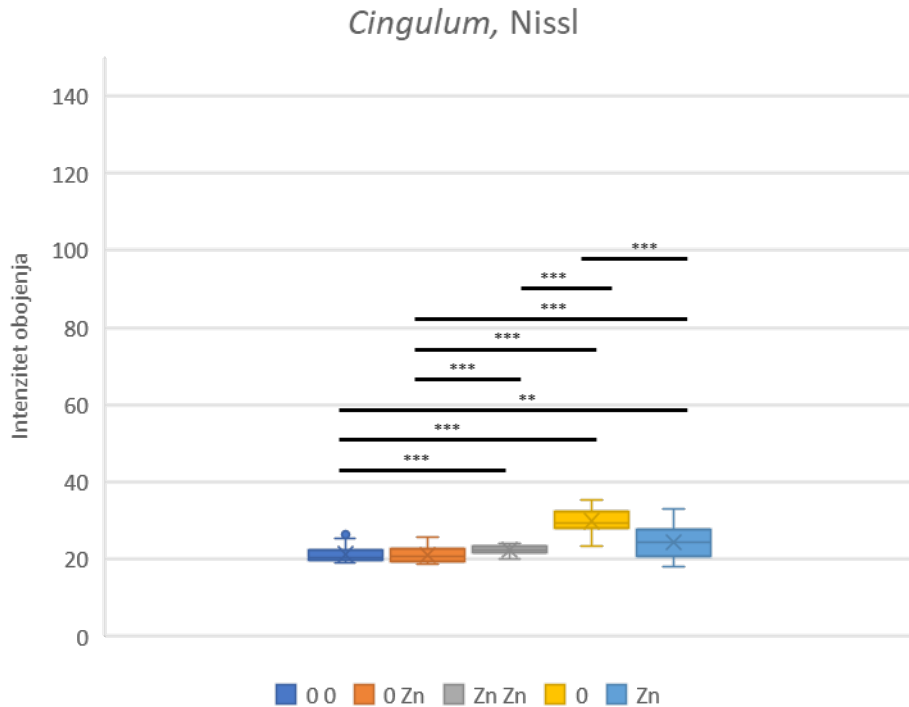
Vezivanje u malom mozgu je najslabije u 0/Zn grupi u odnosu na sve ostale grupe ( $p < 0,005$  i  $p < 0,001$ ). Najjače je u Zn grupi.



Slika 11. Razlika u obojenosti malog mozga bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

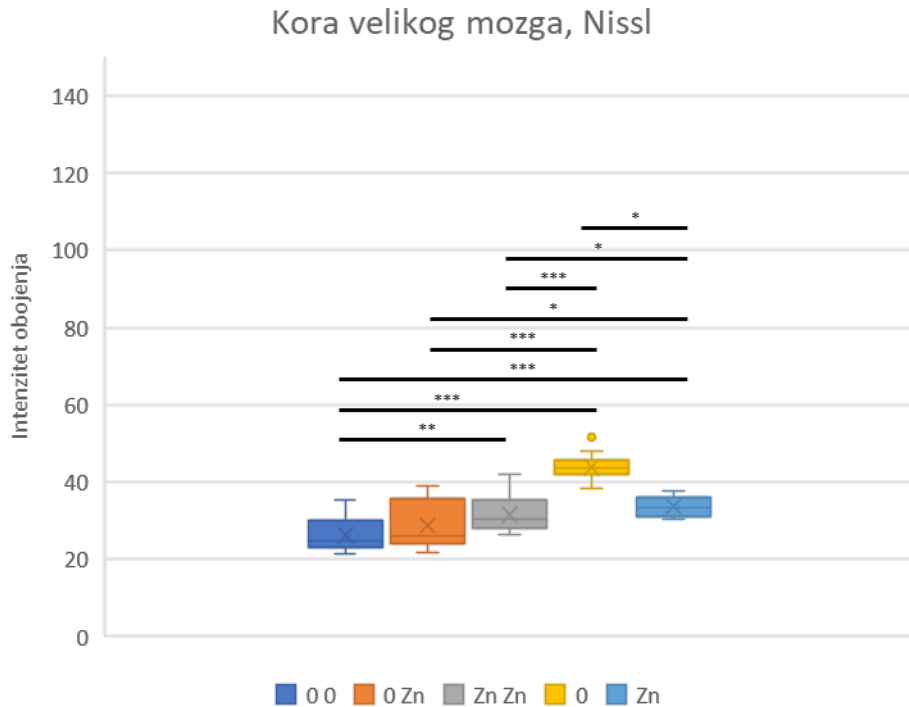
*Cingulum* ima slične uzorke značajnosti kao kora velikog mozga, odnosno boja se najjače vezala za endoplazmatski retikulum u grupi 0, a najlošije u grupi 0/0, u odnosu na ostale fiksacijske grupe ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ).



Slika 12. Razlika u obojenosti cinguluma bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

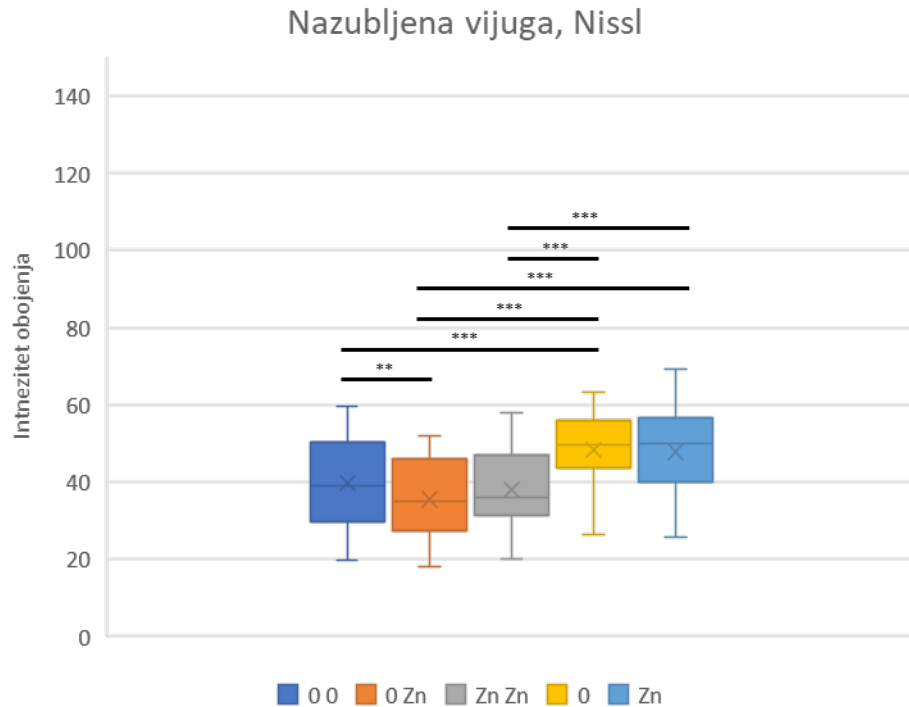
Kora velikog mozga ima slične uzorke značajnosti kao *cingulum*, odnosno boja se najjače vezala za endoplazmatski retikulum u grupi 0, a najlošije u grupi 0/0, u odnosu na ostale fiksacijske grupe ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.005$ ).



Slika 13. Razlika u obojenosti kore velikog mozga bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi dodavanje cinka samo u fiksativ (0/Zn grupa) se pokazalo lošijim u odnosu na ostale grupe jer je vezivanje boje najslabije. Značajnije razlike nisu dobivene kod grupa koje su fiksirane samo uranjanjem tkiva u fiksativ s cinkom i bez cinka.



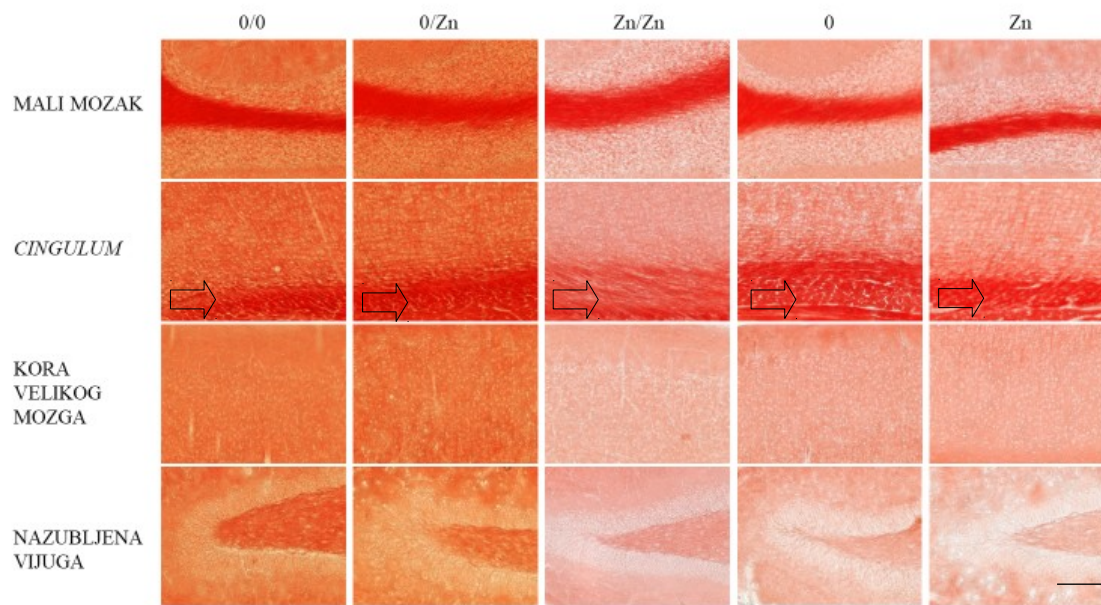
Slika 14. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

### 5.3. Uljno crvena, mozak

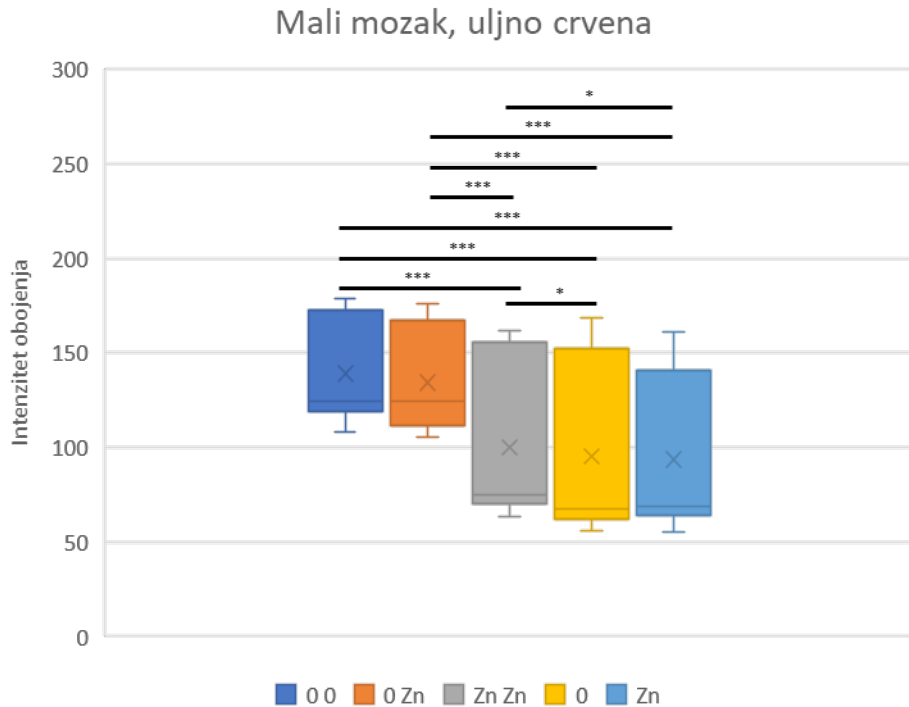
Uljno crvena je lipofilna boja i njezino najintenzivnije vezivanje se očekuje u bijeloj tvari mozga zbog visokog sadržaja mijelina. Grupe 0/0 i 0/Zn su značajno tamnije obojene uljnom crvenom u odnosu na tri preostale grupe ( $p < 0,001$ ). Između grupe Zn/Zn i 0 postoji značajnost  $p < 0,05$ .



Slika 15. Fotografije uzoraka bojenih uljnom crvenom bojom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

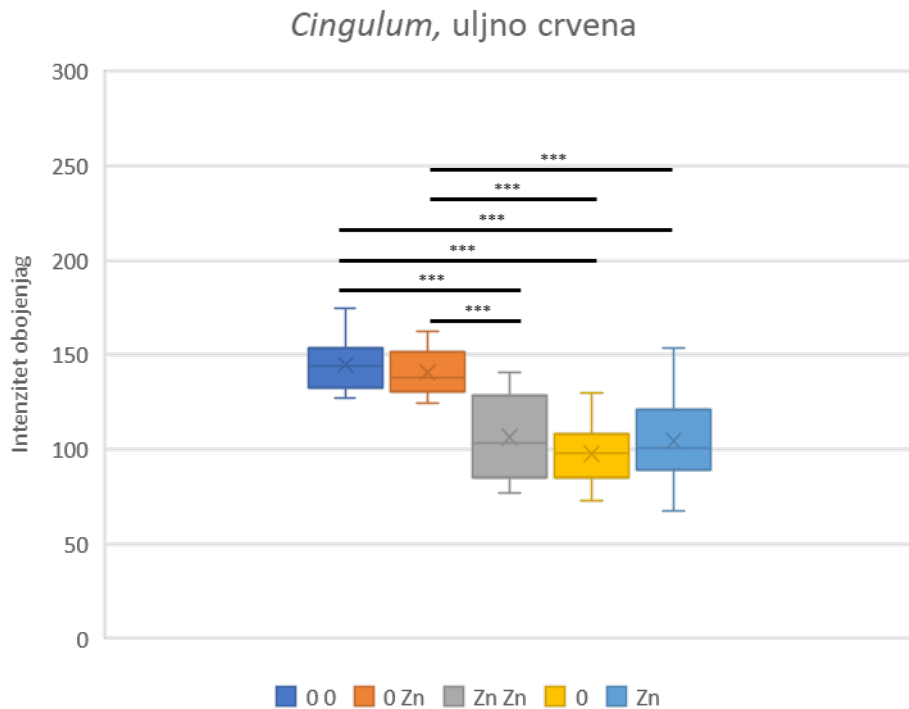
U malom mozgu, vezivanje boje je slabije u 0 grupi u odnosu na Zn/Zn grupu ( $p < 0,05$ ). Nema značajnijih razlika u obojenju uljno crvenom između tkiva malog mozga fiksiranog uranjanjem u fiksativ s cinkom i bez cinka.



Slika 16. Razlika u obojenosti malog mozga uljno crvenom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

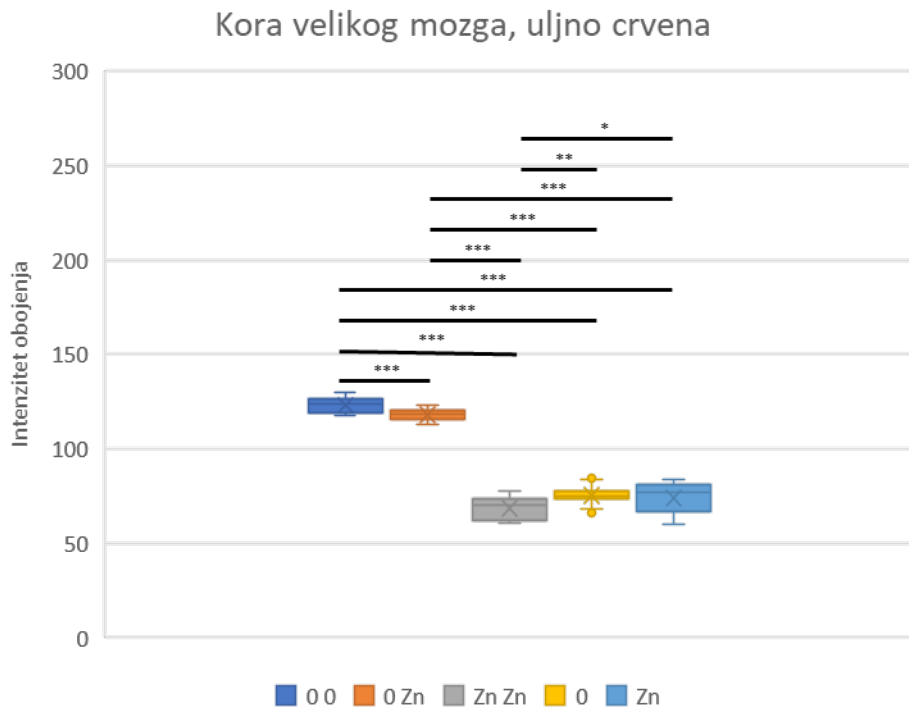
Najintenzivnije vezivanje uljno crvene se očekuje u bijeloj tvari mozga zbog visokog sadržaja mijelina, dakle u sloju vlakana kore malog mozga. Grupe 0/0 i 0/Zn su značajno tamnije obojene uljnom crvenom u odnosu na preostale ( $p < 0,001$ ). Nema značajnijih razlika između fiksiranja uranjanjem u fiksativ s cinkom i bez cinka.



Slika 17. Razlika u obojenosti cinguluma uljnom crvenom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

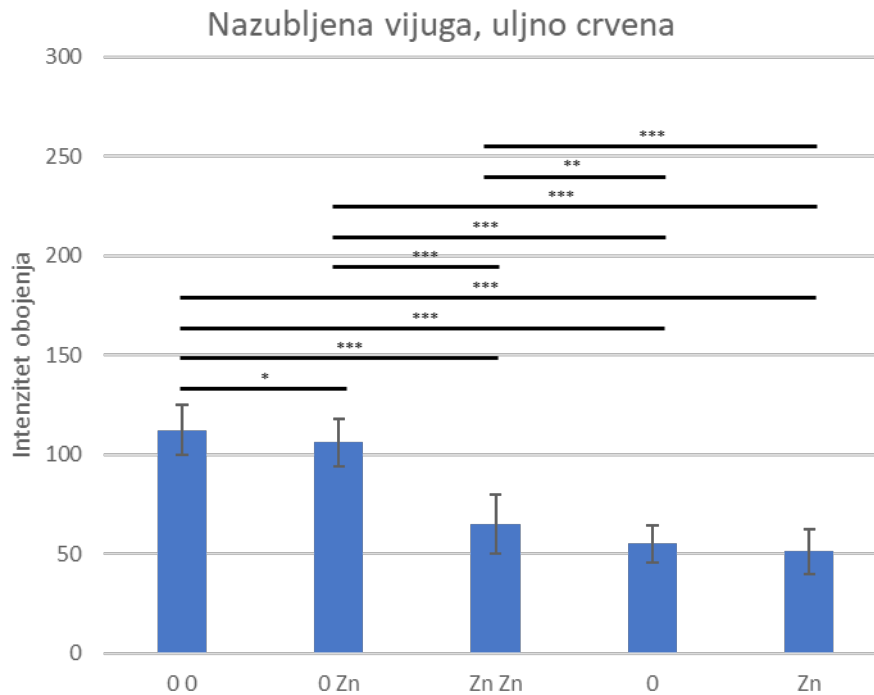
Najintenzivnije vezivanje uljno crvene se očekuje u donjim slojevima kore velikog mozga koji obiluju mijeliniziranim vlaknima. Grupe 0/0 i 0/Zn su značajno tamnije obojene uljnom crvenom u odnosu na preostale 3 grupe ( $p < 0,001$  za svih 6 usporedbi). U kori velikog mozga, vezivanje uljno crvene je slabije u 0/Zn grupi u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,05$ ). Nema značajnijih razlika između fiksiranja uranjanjem u fiksativ s cinkom i bez cinka.



Slika 18. Razlika u obojenosti kore velikog mozga uljno crvenom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi najintenzivnije bojenje očekuje se u sloju vlakana. Grupe 0/0 i 0/Zn su značajno tamnije obojene uljnom crvenom u odnosu na preostale ( $p < 0,001$  za svih 6 usporedbi). U nazubljenoj vijuzi vezivanje uljno crvene je slabije u 0/Zn grupi u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,001$ ). U nazubljenoj vijuzi vezivanje boje je slabije u 0 grupi u odnosu na Zn/Zn grupu ( $p < 0,001$ ). Nema značajnijih razlika između fiksiranja uranjanjem u fiksativ s cinkom i bez cinka.

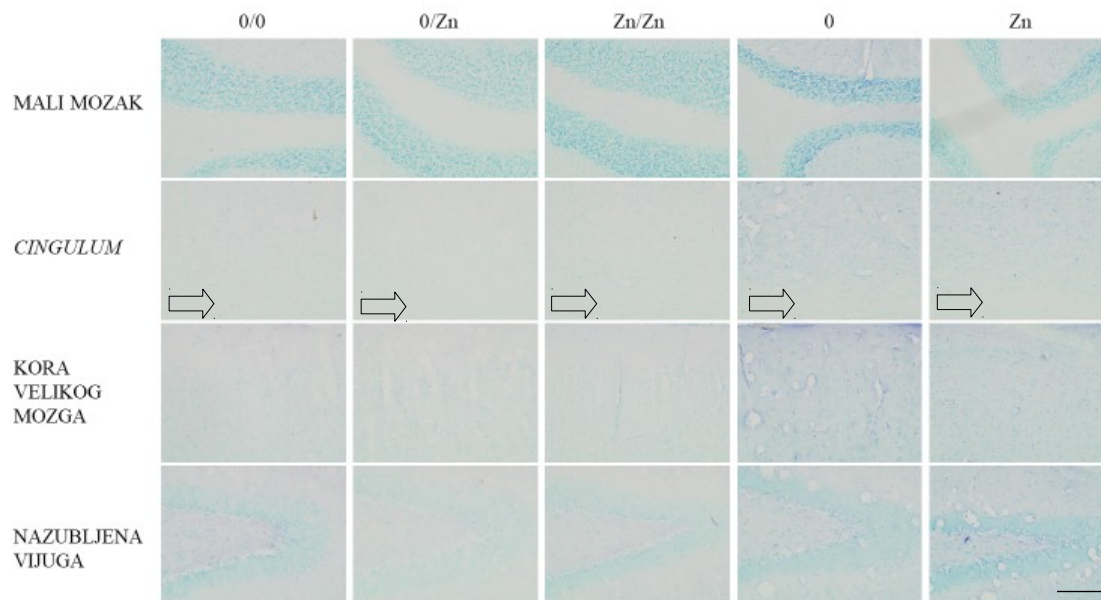


Slika 19. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge uljnom crvenom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.4. Metakromatski toluidin, mozak

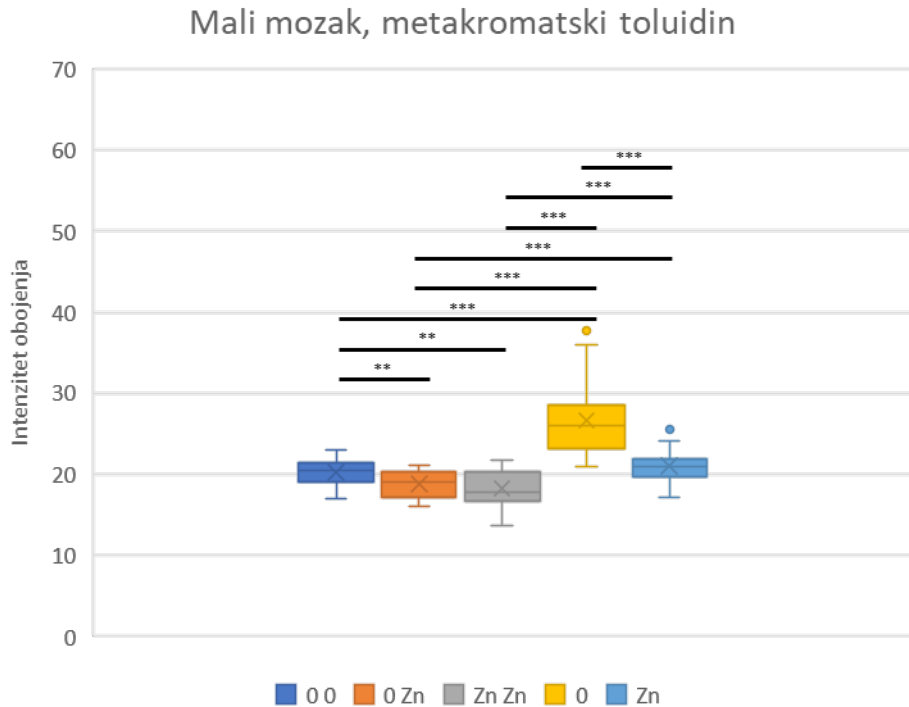
Toluidin se koristi kada želimo bojati šećere, prvenstveno glikogen. Znatna je razlika u količini glikogena u jetri i u mozgu, što se može vidjeti iz rezultata. Najintenzivnije obojenje u mozgu se vidi u grupama 0/0 i 0 koje nemaju cinka.



Slika 20. Fotografije uzoraka bojanih toluidinom. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

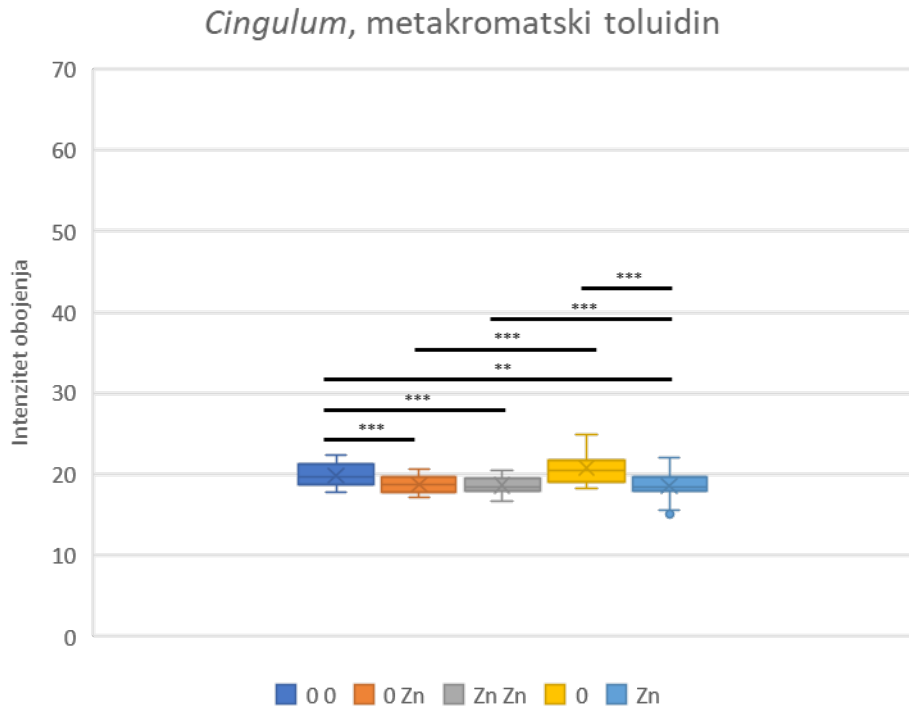
U malom mozgu ističe se 0/0 perfuzijska grupa koja je intenzivnije obojena odnosu na perfuzijske 0/Zn i Zn/Zn ( $p < 0,05$ , za obje usporedbe), a najintenzivnije je obojena grupa 0 u odnosu na sve ostale grupe ( $p < 0,001$  za sve četiri usporedbe).



Slika 21. Razlika u obojenosti malog mozga toluidinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U *cingulumu* rezultati variraju i ne prate jasan obrazac kao u malom mozgu. Grupe 0/0 i 0 su najintenzivnije obojene u odnosu na ostale grupe ( $p < 0,001$  za sve usporedbe osim 0/0 i 0/Zn). Značajnost između grupe 0/0 i 0/Zn je  $p < 0,01$ .

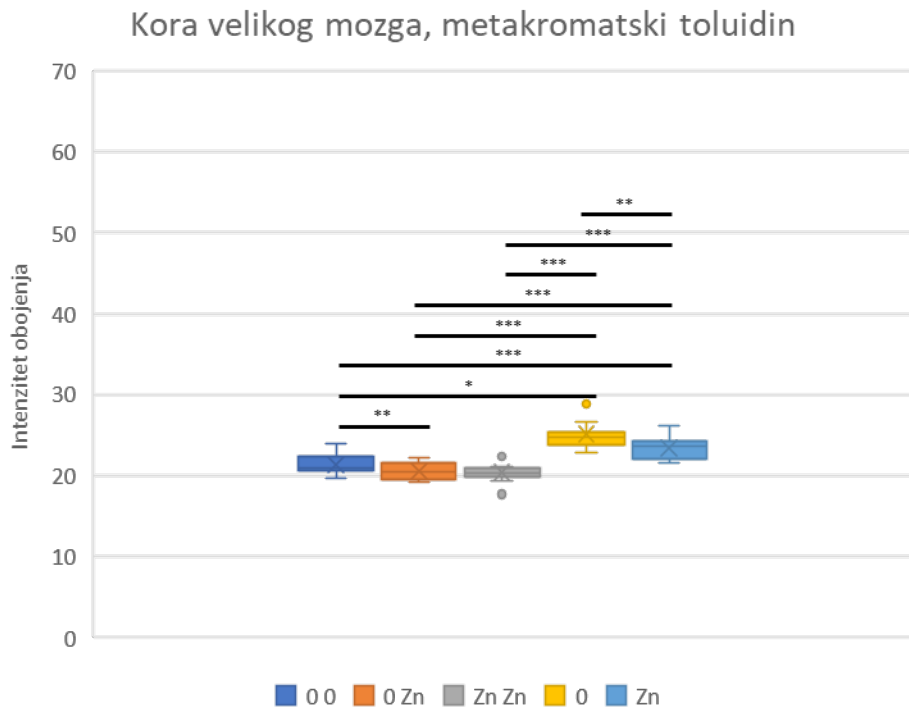


Slika 22. Razlika u obojenosti cinguluma toluidinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

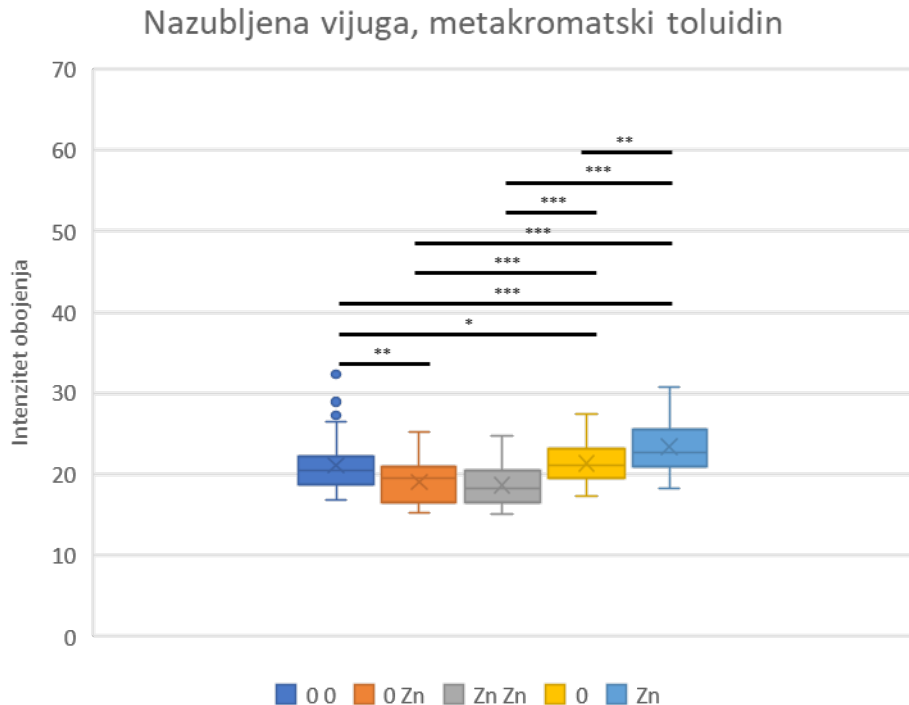
Kora velikog mozga je značajno tamnije obojena u 0/0 grupi u odnosu na 0/Zn grupu  $p < 0,005$  i Zn, a svjetlije u odnosu na Zn grupu  $p < 0,001$ . Primjetno je da fiksacija uranjanjem tkiva pogoduje bojanju jer su Zn i 0 grupe značajno tamnije od ostalih ( $p < 0,001$ ). Cink ima utjecaja na obojenje u kori velikog mozga i smanjuje intenzitet obojenja. Značajna razlika je samo između 0 i Zn grupe gdje je Zn/Značajno svjetlija  $p < 0,005$ .



Slika 23. Razlika u obojenosti kore velikog mozga toludinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Nazubljena vijuga je najintenzivnije obojena u Zn grupi ( $p < 0,001$ ). Ovo obojenje je ponešto suprotno rezultatima iz prethodnih regija, no i dalje je 0/0 grupa najintenzivnije obojena ako se uspoređi s 0/Zn grupom koja sadržava cink ( $p < 0,005$ )

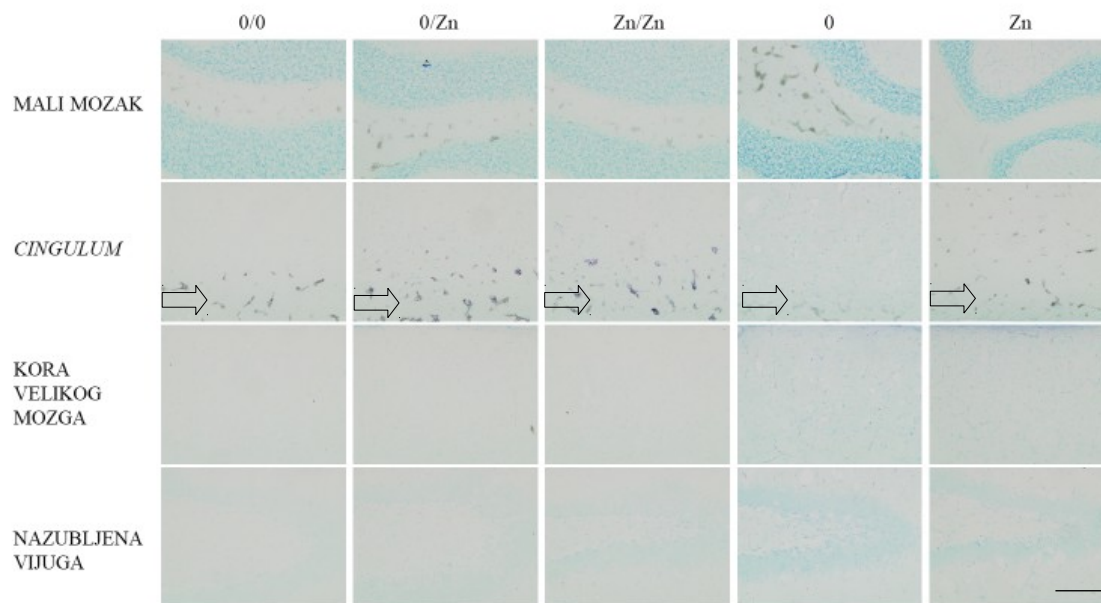


Slika 24. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge toluidinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.5. Metakromatski toluidin s dijastazom, mozak

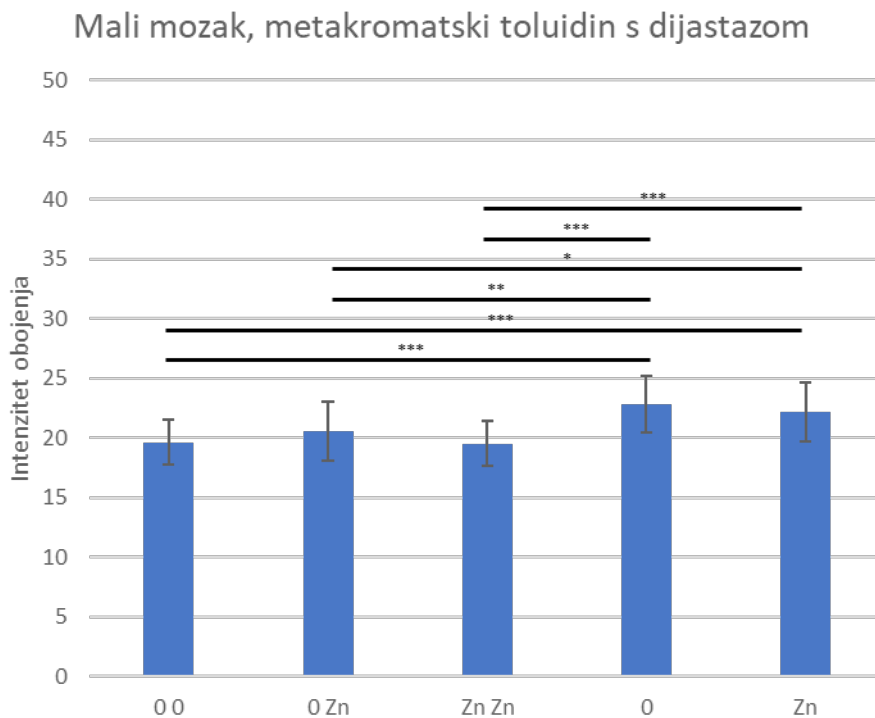
Uz već objašnjem toluidin, dijastazu koristimo kada želimo razgraditi glikogen. Posljedično bismo trebali dobiti samo tirkizno plavu pozadinu, iako je su u nekim regijama uočene neuobičajene tvorevine nalik krvnim žilama. Nakon probavljanja dijastazom razlika između perfuzijskih grupa je nestala, kao i razlika između grupa gdje su tkiva samo uronjena u fiksativ. Nestankom tih razlika pojavilo se značajno intenzivnije obojenje u grupama koje su samo uronjene u fiksativ u odnosu na perfundirane grupe ( $p < 0.05$ ).



Slika 25. Fotografije uzoraka bojenih toluidinom s dijastazom pri povećanju 200x. Probavljanje dijastazom u kori velikog mozga i nazubljenoj vijuzi nije otkrilo dijastaza otporni epitop. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

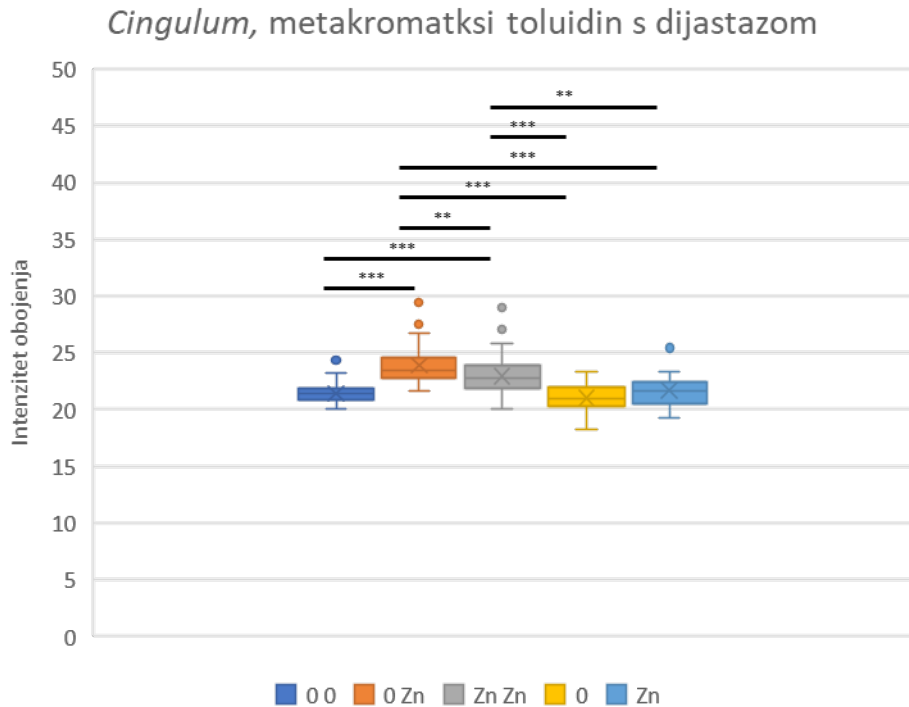
Postoji značajna razlika u obojenosti 0 i Zn grupe malog mozga s ostalim grupama ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ).



Slika 26. Razlika u obojenosti malog mozga toluidinom s dijastazom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

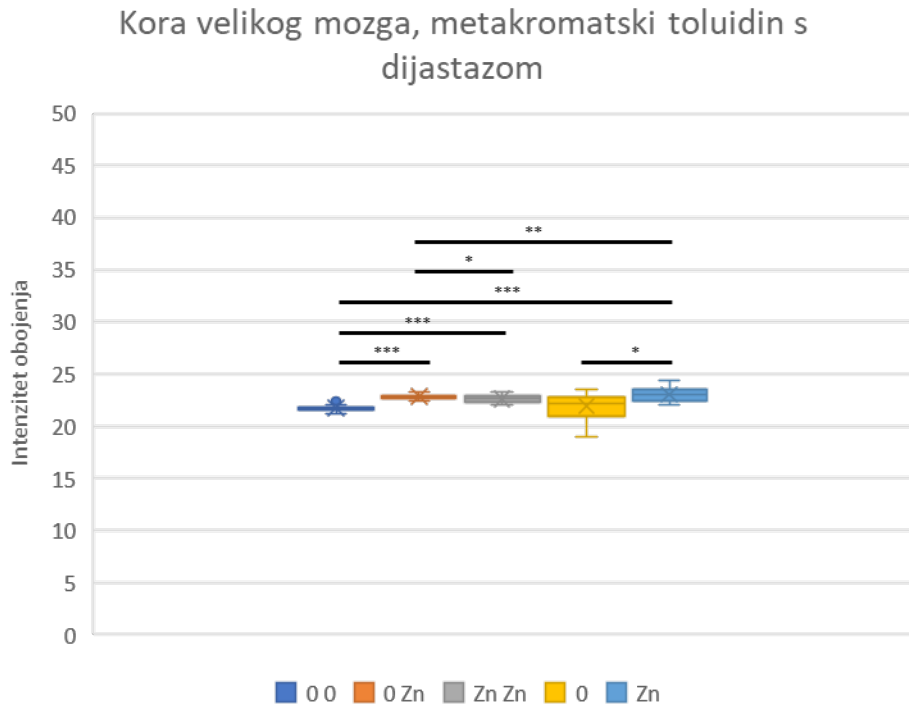
Probavljanje dijastaza osjetljivih šećera u *cingulumu* otkriva strukture nalik krvnim žilama koje su metakromatski obojene, najintenzivnije u 0/Zn grupi u odnosu na 0/0 ( $p < 0,001$ ) i Zn/Zn grupu ( $p < 0,005$ ). Značajnih razlika nema između grupa 0 i Zn.



Slika 27. Razlika u obojenosti cinguluma toluidinom s dijastazom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

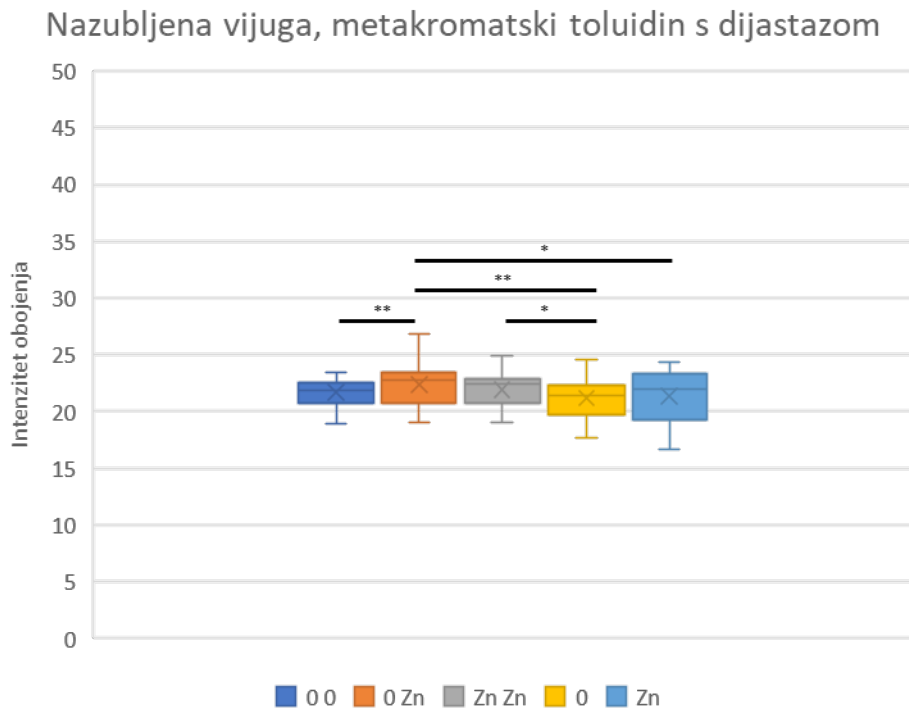
Probavljanje dijastazom smanjuje raspon intenziteta bojenja toluidinom između grupa, a intenzitet obojenja je značajno manji u 0/0 grupi u odnosu na 0/Zn i Zn/Zn grupu. Zanimljivo je to što je došlo do obrata između Zn i 0 grupe te je Zn grupa značajno jače obojena od 0 ( $p < 0,05$ ) što bi značilo da je u toj grupi bolje očuvan Toluidin-osjetljivi epitop nakon tretiranja dijastazom.



Slika 28. Razlika u obojenosti kore velikog mozga toluidinom s dijastazom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Djelovanje dijastaze u nazubljenoj vijuzi je pokazalo u grupi 0/Zn/Značajno više struktura nalik krvnim žilama nego u ostalim grupama ( $p < 0,05$ ).

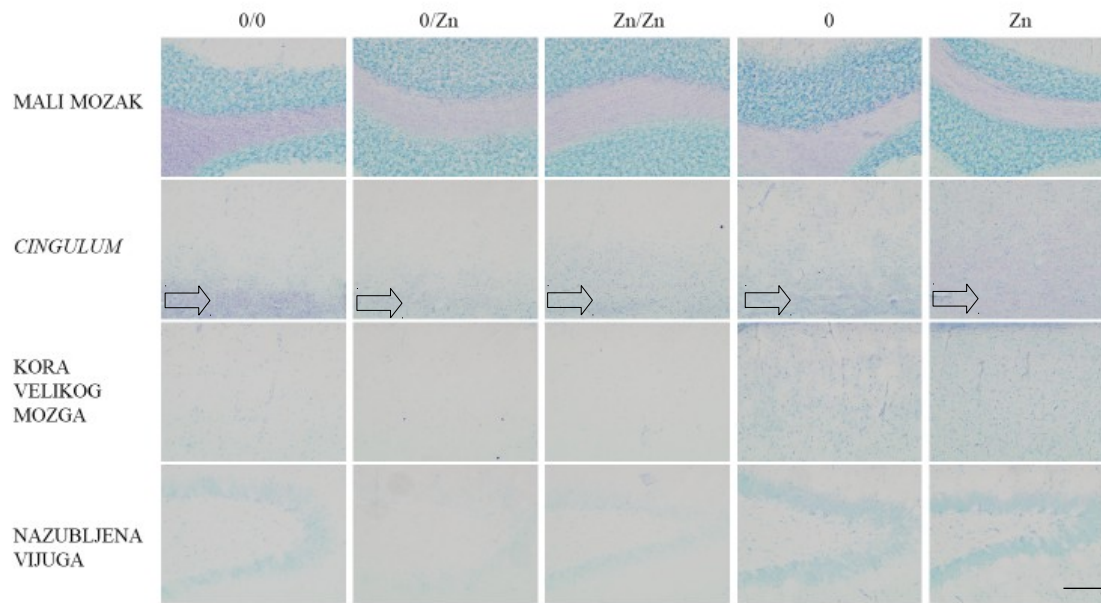


Slika 29. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge toluidinom s dijastazom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.6. Toluidin s dijastazom i odmašćivanjem, mozak

Uz već spomenute značajke toluidina i dijastaze, postupkom odmašćivanja mozgova, prijašnje spomenute strukture su nestale što može značiti da su to glikolipidi osjetljivi na organska otapala. Također su se pojavila metakromatska obojenja u vlaknima malog mozga i *cinguluma*.

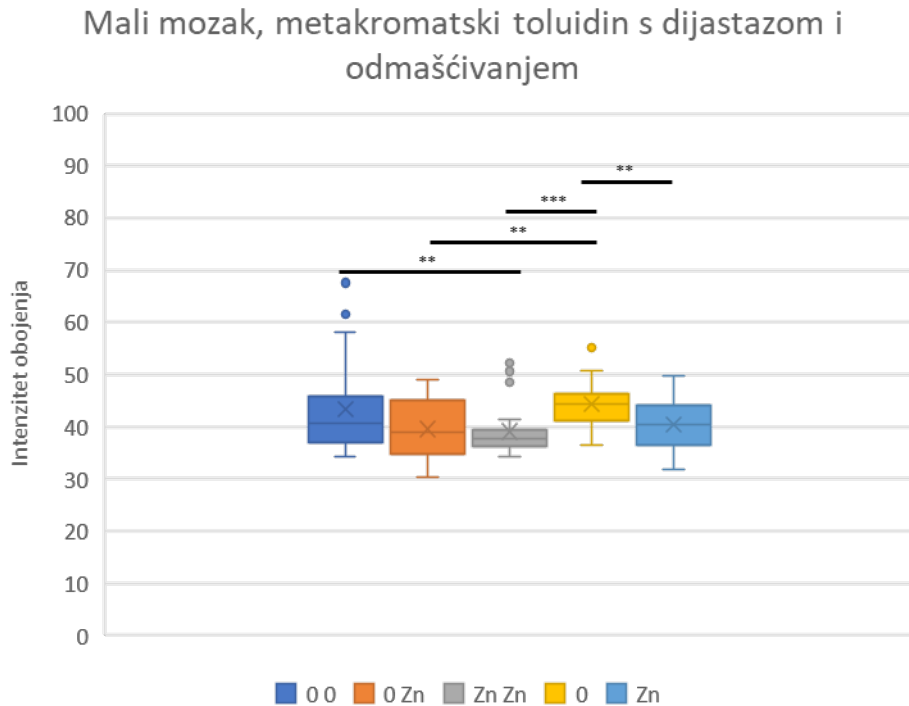


Slika 30. Fotografije uzoraka bojenih toluidinom s dijastazom i dodatnim odmašćivanjem pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.



## 5. REZULTATI

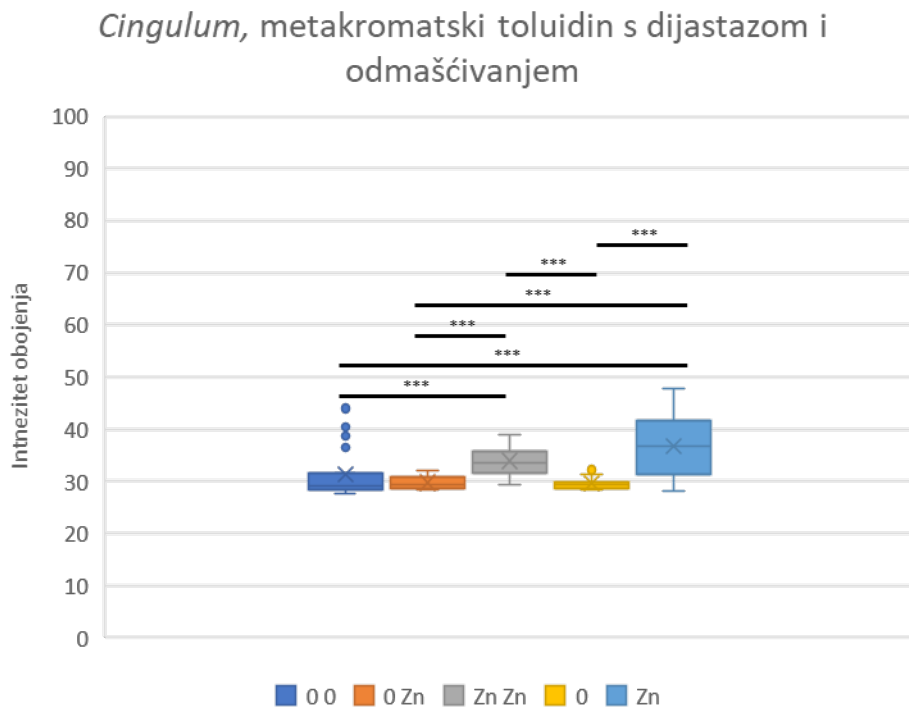
U malom mozgu najintenzivnije je obojena 0/0 grupa u odnosu na 0/Zn i Zn/Zn ( $p < 0,05$ ). Slabije obojenje pojavljuje u svim skupinama s cinkom. Najintenzivnije obojenje je u 0/0 grupi i značajno je intenzivnije ako ga usporedimo s Zn/Zn grupom. Dodatak cinka u fiksativ u Zn grupi je statistički značajno smanjio intenzitet obojenja u odnosu na 0 grupu.



Slika 31. Razlika u obojenosti malog mozga toluidinom s dijastazom i odmaščivanjem u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

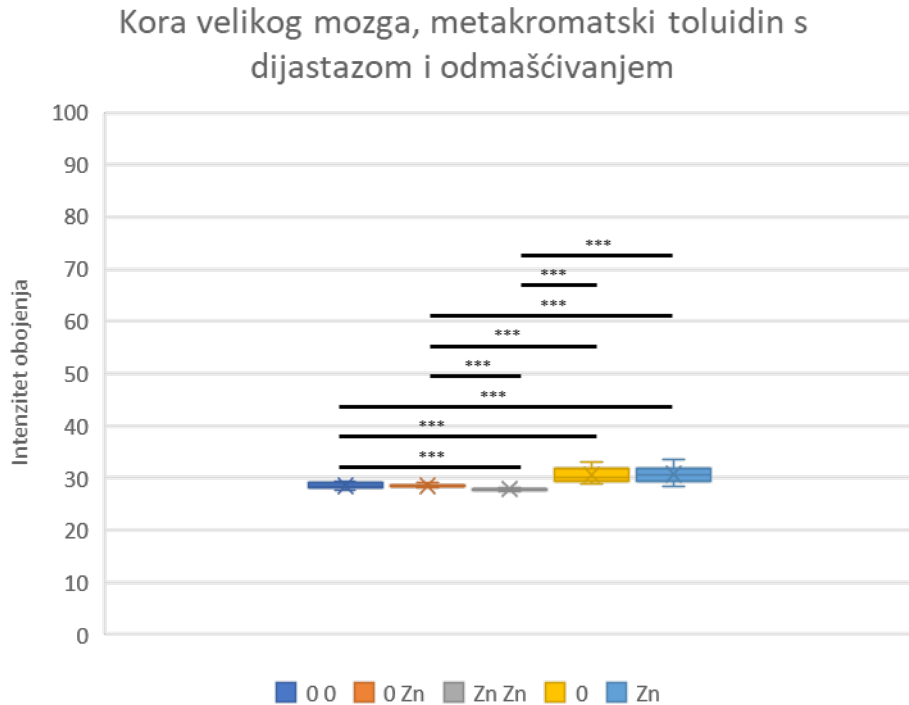
Probavljanje dijastaza osjetljivih šećera s odmaščivanjem u *cingulumu* otkriva strukture koje su metakromatski obojene, najintenzivnije u Zn grupi u odnosu na 0/0 ( $p < 0,001$ ) i 0/Zn grupu ( $p < 0,001$ ). Uočene su značajne razlike između grupa 0 i Zn ( $p < 0,001$ ). Grupe Zn/Zn i Zn nemaju međusobno značajno veći intenzitet obojenja. Grupa Zn/Zn je najintenzivnije obojena u perfundiranim grupama u odnosu na 0/0 i 0/Zn ( $p < 0,001$  za obje grupe).



Slika 32. Razlika u obojenosti cinguluma toluidinom s dijastazom i odmaščivanjem u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

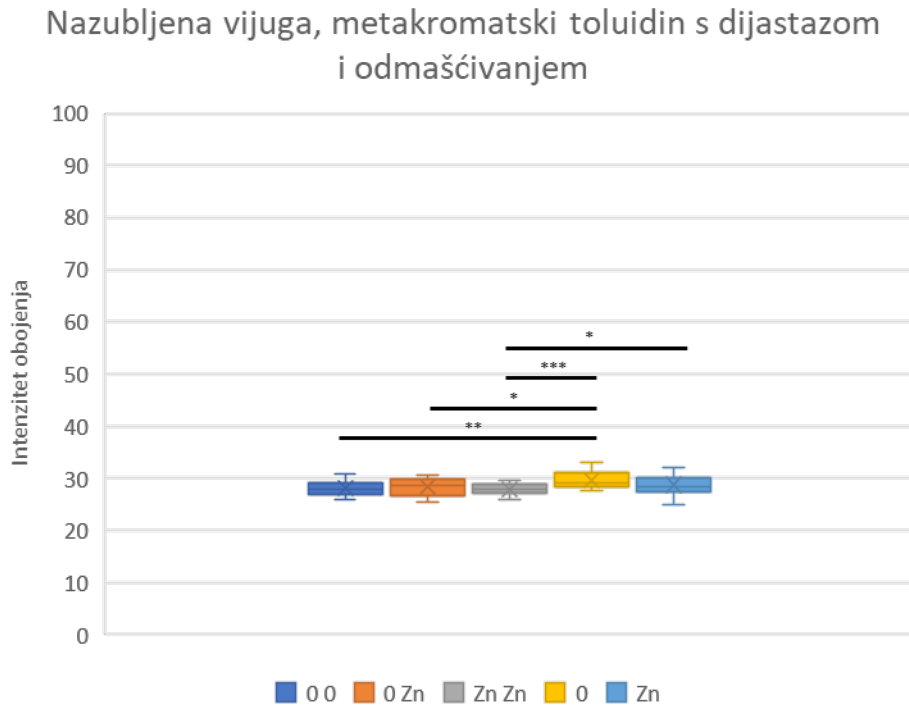
Odmašćivanje je pokazalo značajnu razliku između svih grupa u kori velikog mozga ( $p < 0,001$ ). Također postoji razlika između grupa fiksiranih perfuzijskih i fiksiranih uranjanjem pri čemu su ove druge statistički značajno tamnije obojene ( $p < 0,001$ ).



Slika 33. Razlika u obojenosti kore velikog mozga toluidinom s dijastazom i odmašćivanjem u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Statistički značajne razlike u intenzitetu obojenja nazubljene vijuge se mogu uočiti između 0/Zn grupe i ostalih grupa i najintenzivnije je obojena u odnosu na 0/0 ( $p < 0,005$ ) i Zn grupu ( $p < 0,05$ ). Odmašćivanje donekle je ujednačilo vrijednosti intenziteta obojenja. Značajne razlike su između grupe 0 i Zn/Zn  $p < 0,001$ , 0/Zn  $p < 0,05$ , 00  $p < 0,005$ . Također intenzivnije je obojena grupa Zn u odnosu na perfundiranu Zn/Zn grupu  $p < 0,05$ .

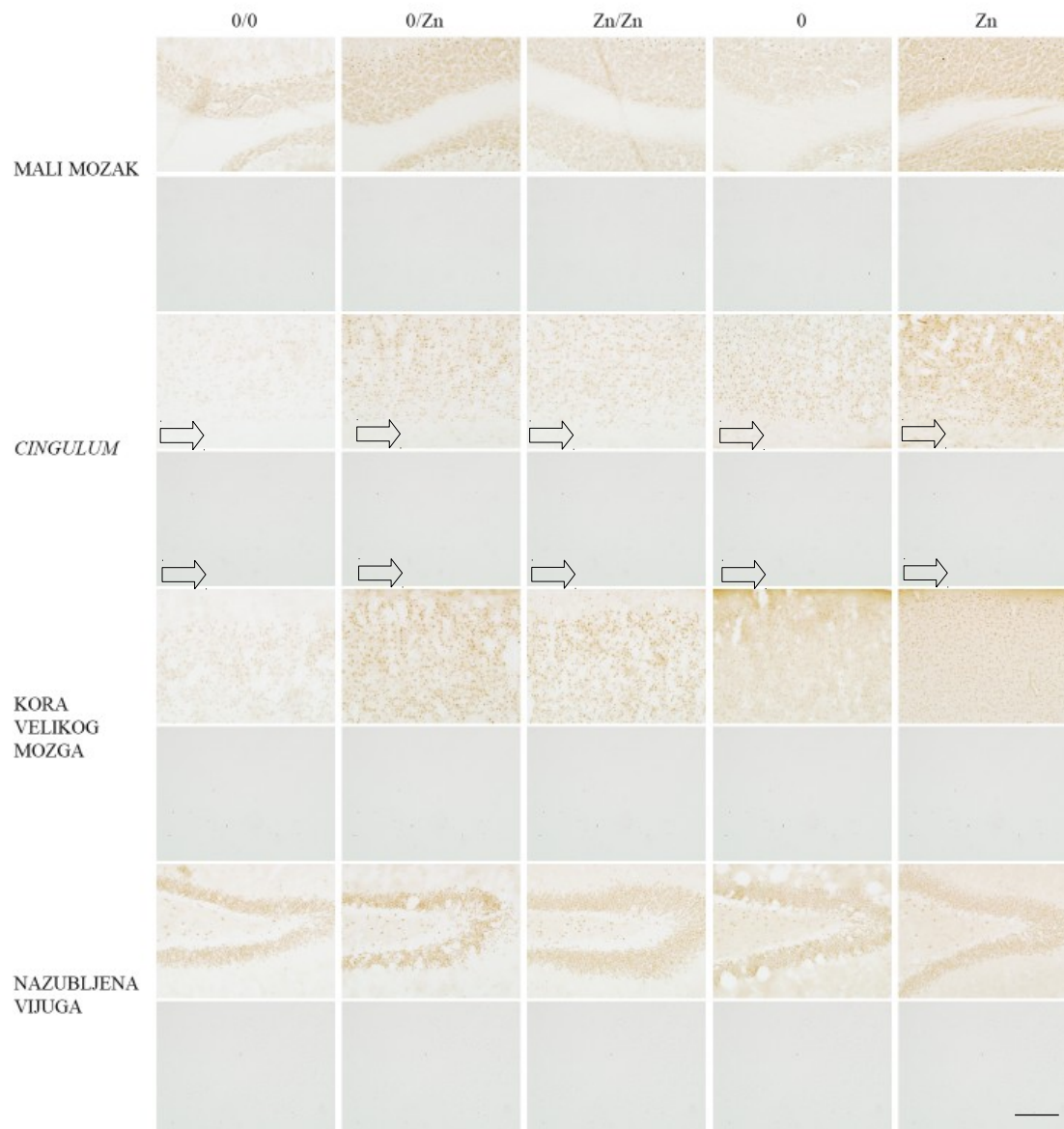


Slika 34. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge toluidinom s dijastazom i odmašćivanjem u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.7. Perls-DAB, mozak

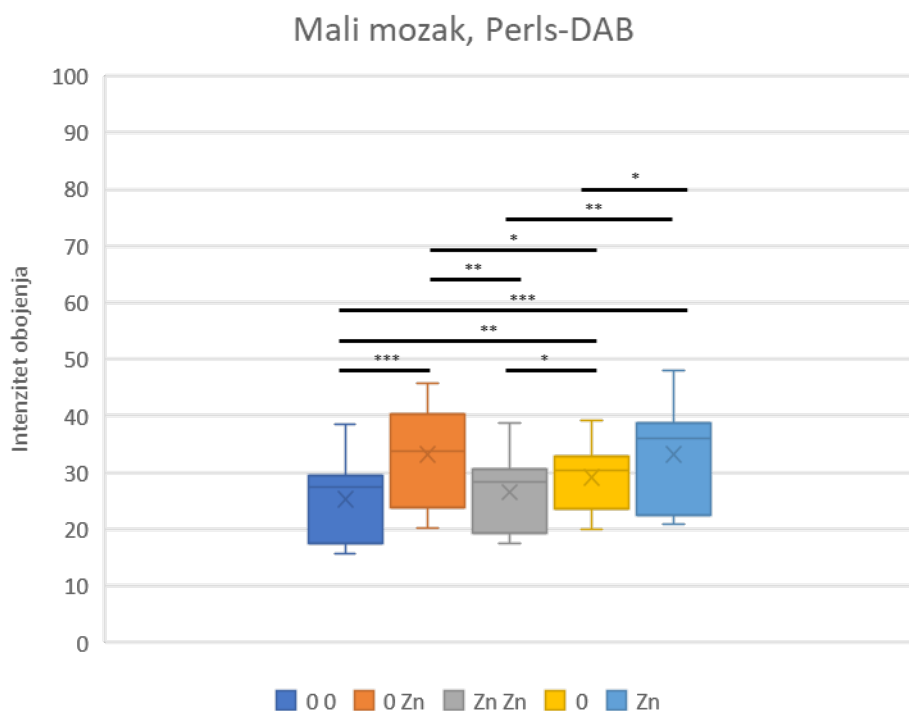
Perls-DAB bojenje boji željezo, koje je u mozgu vrlo važno za finu regulaciju metabolizma mijelina. Perfuzija bez cinkovih soli vodi do najslabijeg obojenja tkiva mozga. Sve ostale metode fiksacije su značajno tamnije od 0/0 grupe. Zanimljiva je značajno veća razlika u intenzitetu obojenja u malom mozgu između grupe 0/Zn i Zn/Zn ( $p < 0,005$ ). Ova statistički značajna razlika između 0/Zn i Zn/Zn grupa provlači se kroz sve regije mozga.



## 5. REZULTATI

Slika 35. Fotografije uzoraka bojenih Perls-DAB bojenjem pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

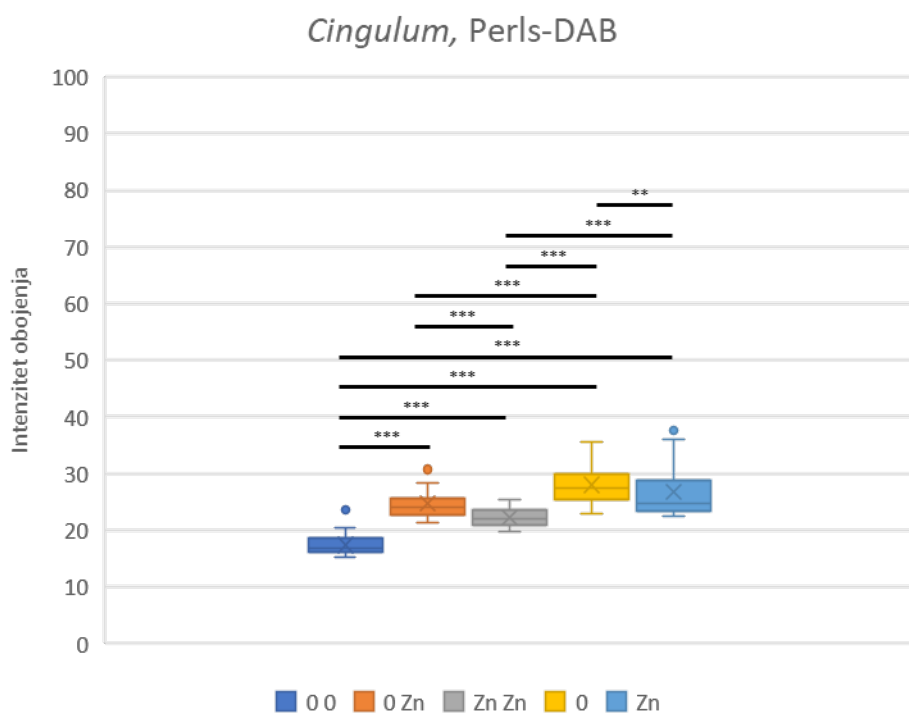
Grupa 0/0 u malom mozgu ima slabiji intenzitet obojenja u odnosu na grupu 0 ( $p < 0.005$ ) i grupu Zn ( $p < 0,001$ ). Obojenje je intenzivnije u Zn grupi u odnosu na 0 grupu u malom mozgu ( $p < 0,05$ ). Perfuzija s cinkom u ESS te perfuzija s Zn u ESS i fiksativu (Zn/Zn) daje značajno slabiji intenzitet obojenja u odnosu na fiksaciju samim uranjanjem u fiksativ s cinkom (Zn) u malom mozgu ( $p < 0,005$ ).



Slika 36. Razlika u obojenosti malog mozga Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

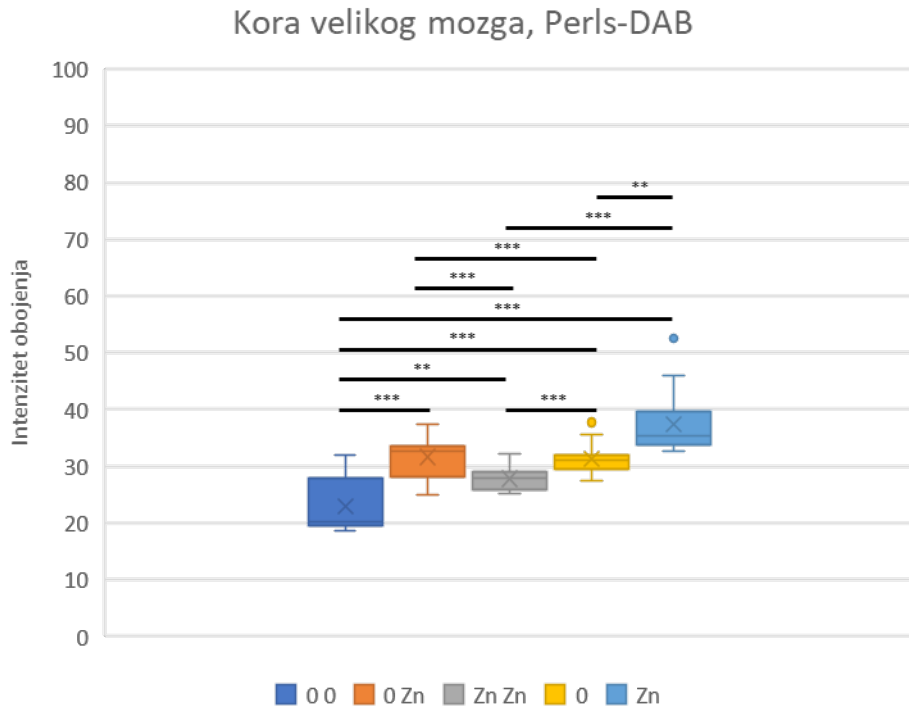
Perfuzija s cinkom u ESS i fiksativu (Zn/Zn) daje značajno slabiji intenzitet obojenja u odnosu na samo uranjanje u fiksativ s cinkom (Zn) u regijama *cinguluma*, kori velikog mozga i nazubljenoj vijuzi ( $p < 0,001$ ) te malom mozgu ( $p < 0,005$ ). Ovo je dijelom zbog načina fiksacije, a onda i zbog malog broja stanica između aksona, naime *cingulum* po bojenju prati ostale regije mozga i najslabije ima obojano željezo u odnosu na sve ostale skupine ( $p < 0,001$ ). Grupa 0/Zn ima jači intenzitet obojenja u odnosu na Zn/Zn ( $p < 0,001$ ). Značajno intenzivnije je obojana 0 grupa u odnosu na Zn grupu ( $p < 0,001$ ). Perfuzija s cinkom u ESS i fiksativu (Zn/Zn) daje značajno slabiji intenzitet obojenja u odnosu na samo uranjanje u fiksativ s cinkom (Zn) u *cingulumu*.



Slika 37. Razlika u obojenosti *cinguluma* Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Perfuzija s cinkom u ESS i fiksativu (Zn/Zn) daje značajno slabiji intenzitet obojenja u odnosu na samo uranjanje u fiksativ s cinkom (Zn) u kori velikog mozga ( $p < 0,001$ ). Obojenje uzorka je intenzivnije u Zn grupi u odnosu na 0 grupu u kori velikog mozga ( $p < 0,05$ ).

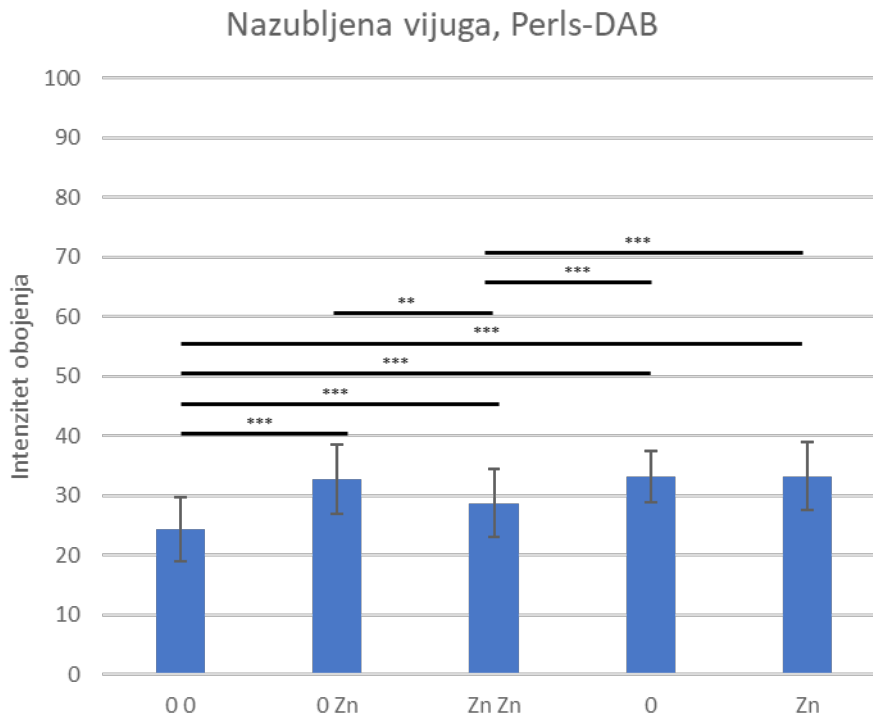


Slika 38. Razlika u obojenosti kore velikog mozga Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

Perfuzija s cinkom u ESS i fiksativu (Zn/Zn) daje značajno slabiji intenzitet obojenja u odnosu na samo uranjanje u fiksativ s cinkom (Zn) u regijama *cinguluma*, kori velikog mozga i nazubljenoj vijuzi ( $p < 0,001$ ) te malom mozgu ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/Zn ima jači intenzitet obojenja u odnosu na Zn/Zn ( $p < 0,001$ ). Značajno intenzivnije je obojana 0 grupa u odnosu na Zn grupu ( $p < 0,001$ ) iako su očekivani obrnuti rezultati. U nazubljenoj vijuzi najslabije obojenje je u 0/0 grupi u odnosu na sve ostale skupine ( $p < 0,001$ ).

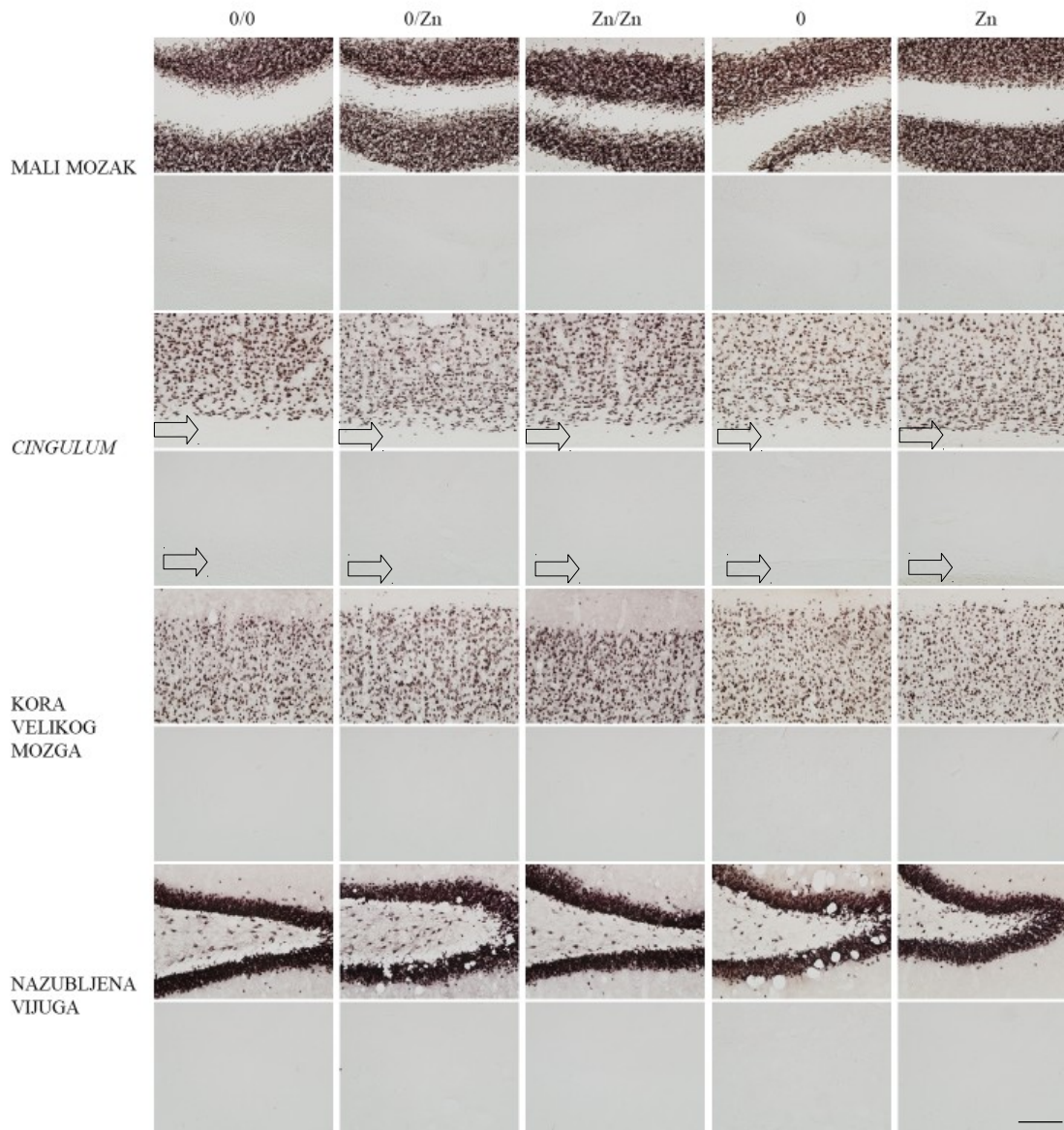


Slika 39. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.8. NeuN

Kod NeuN-a se radi se o vrlo specifičnom protutijelu namijenjenom svježim i parafinskim rezovima koje boja pod svim uvjetima. Izvrsno boja neurone. Obojenost pojedine regije značajno varira među grupama.

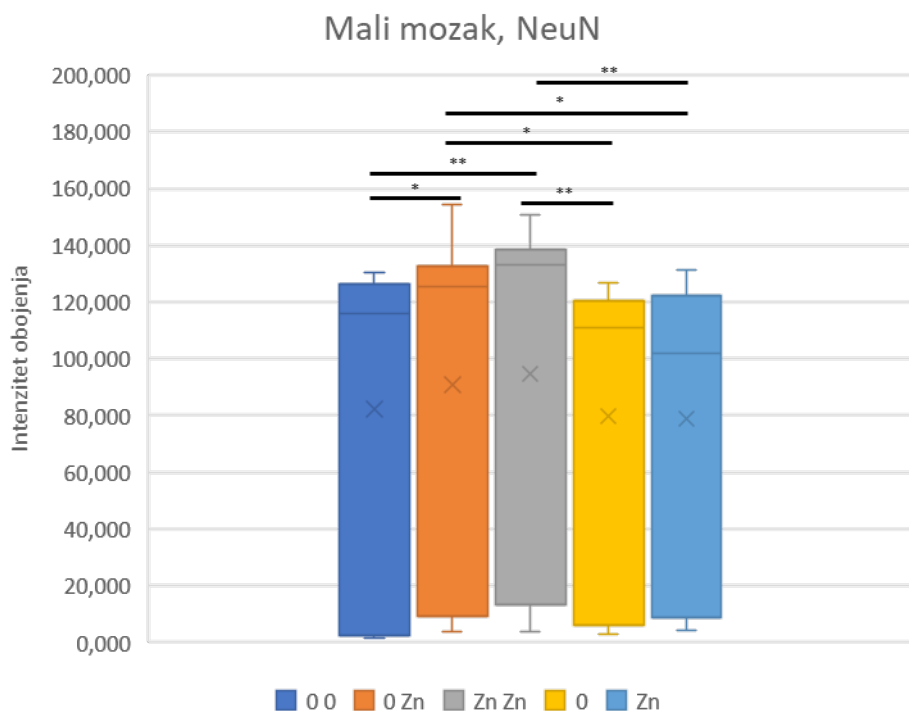


Slika 40. Fotografije uzoraka bojenih NeuN protutijelima pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu$ m. Strelice označavaju područje gdje se nalazi

## 5. REZULTATI

cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

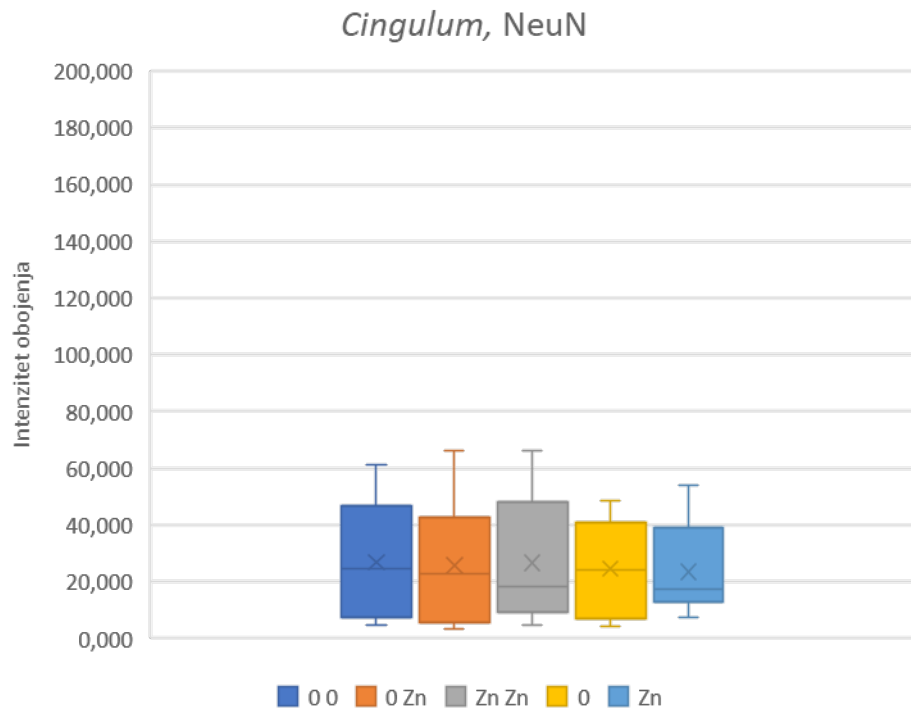
Perfuzija sa solima cinka bolje čuva NeuN epitop unutar jezgre i tijela stanice unutar malog mozga, značajno bolje nego imerzijska fiksacija. Intenzitet obojenja stanica je najveći u Zn/Zn grupi u odnosu na 0/0 ( $p<0,005$ ), 0/Zn grupu ( $p<0,05$ ) i Zn grupu ( $p<0,05$ ). Fiksacija uranjanjem je bolja bez cinkovih soli jer je dostupnost epitopa veća i reakcija je intenzivnija u odnosu na fiksaciju uranjanjem s cinkom.



Slika 41. Razlika u obojenosti malog mozga NeuN protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p<0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p<0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p<0,001$ ).

## 5. REZULTATI

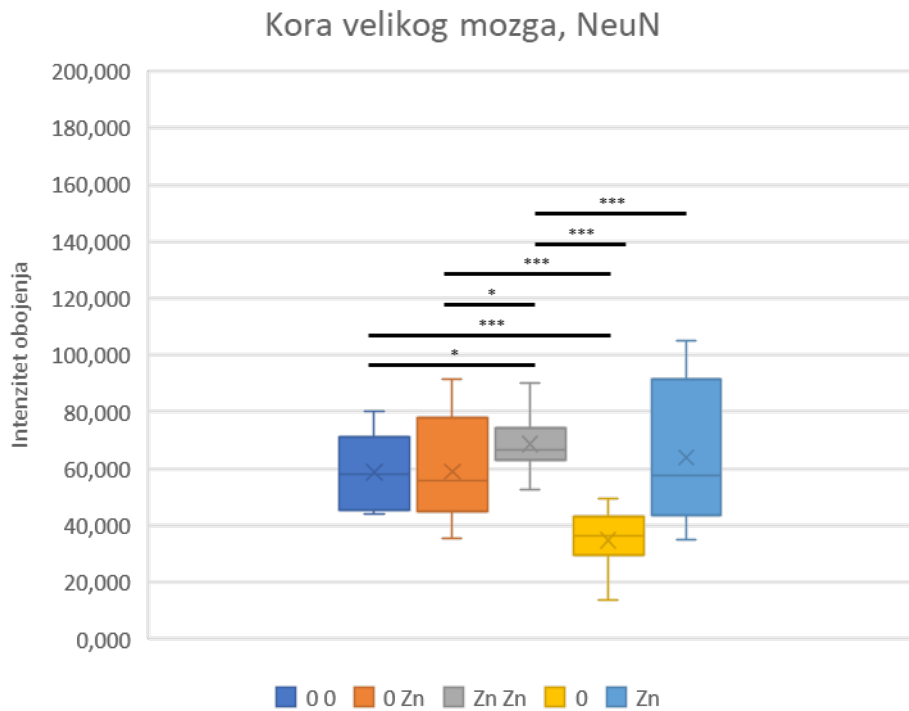
U *Cingulumu* nema značajnijih razlika u intenzitetu obojenja – sve primijenjene varijante fiksacije jednako dobro čuvaju NeuN epitop.



Slika 42. Razlika u obojenosti *cingulumu* u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test.

## 5. REZULTATI

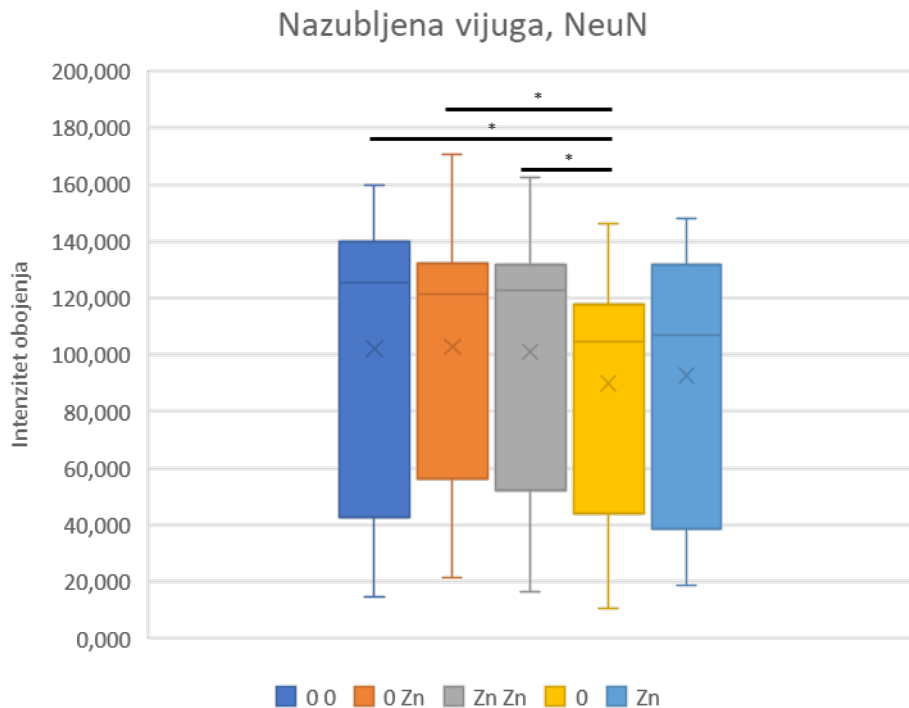
Kora velikog mozga ima slične obrasce intenziteta obojenja i očuvanja epitopa kao mali mozak. Najintenzivnije obojana je grupa Zn/Zn u odnosu na 00  $p < 0,05$ , 0/Zn  $p < 0,05$ , 0 i Zn  $p < 0,001$ . Unatoč zavaravajućem izgledu, statistički značajne razlike nema između grupa 0 i Zn.



Slika 43. Razlika u obojenosti kore velikog mozga NeuN protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi najslabiji intenzitet obojenja ima grupa 0 u odnosu na sve tri perfundirane grupe ( $p < 0,05$ ), pri čemu nema značajne razlike između perfuzijskih grupa.

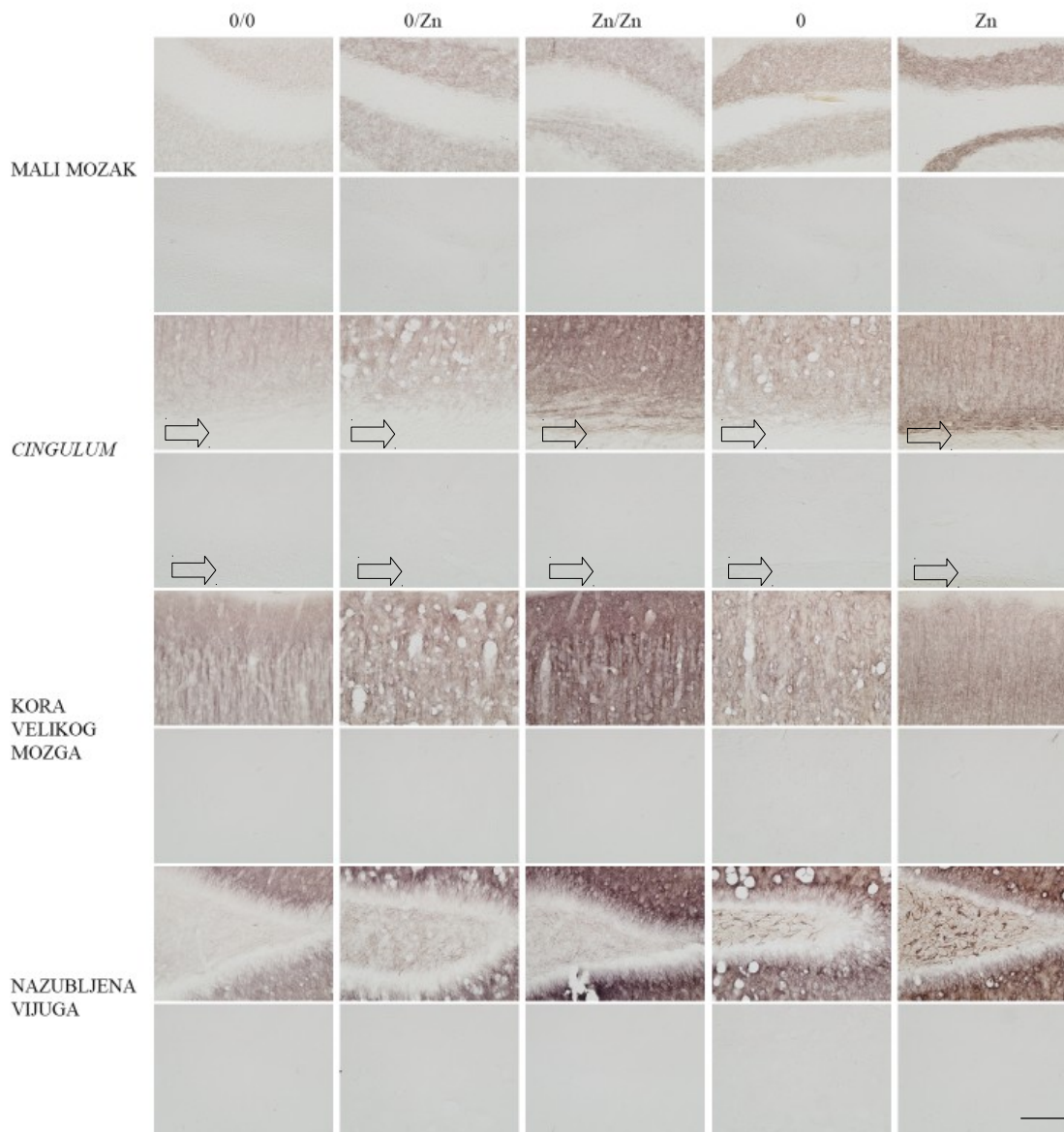


Slika 44. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge NeuN protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.9. MAP2

MAP2 je protein koji je posrednik između mikrotubula i intermedijarnih filameta. Intenziteti obojenja MAP2 su različiti u različitim regijama mozga. Grupa Zn se pokazala najboljom za vizualizaciju većina MAP2 proteina unutar aksona.

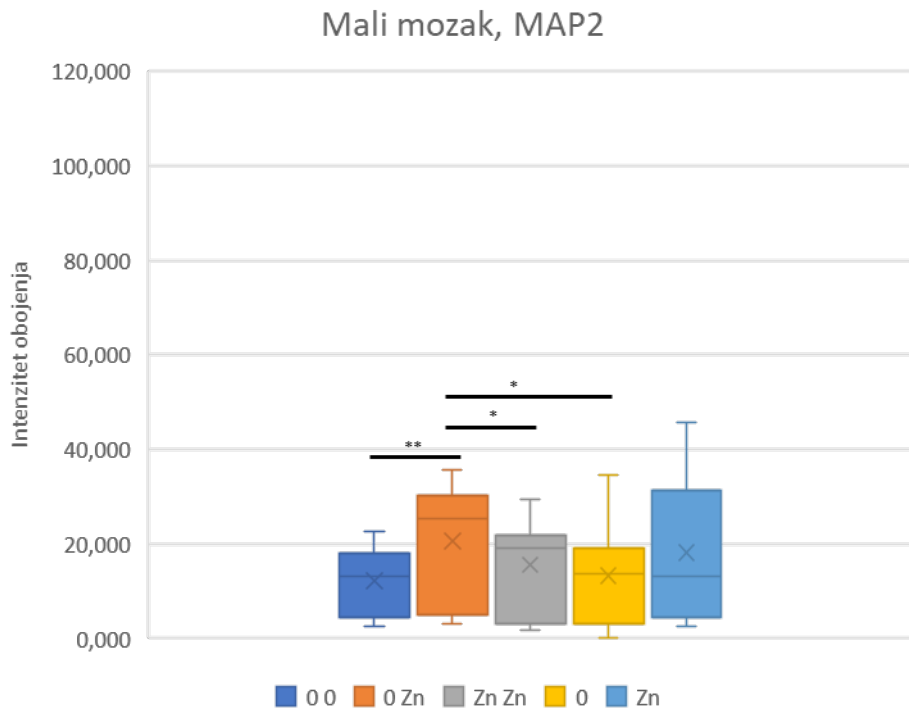


Slika 45. Fotografije uzoraka bojenih MAP2 pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu$ m. Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum.

## 5. REZULTATI

0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

MAP2 u malom mozgu je najintenzivnije obojen u 0/Zn grupi, a statistički značajno intenzivnije u odnosu na 00 grupu ( $p < 0,005$ ) i 0 grupu ( $p < 0,05$ ).

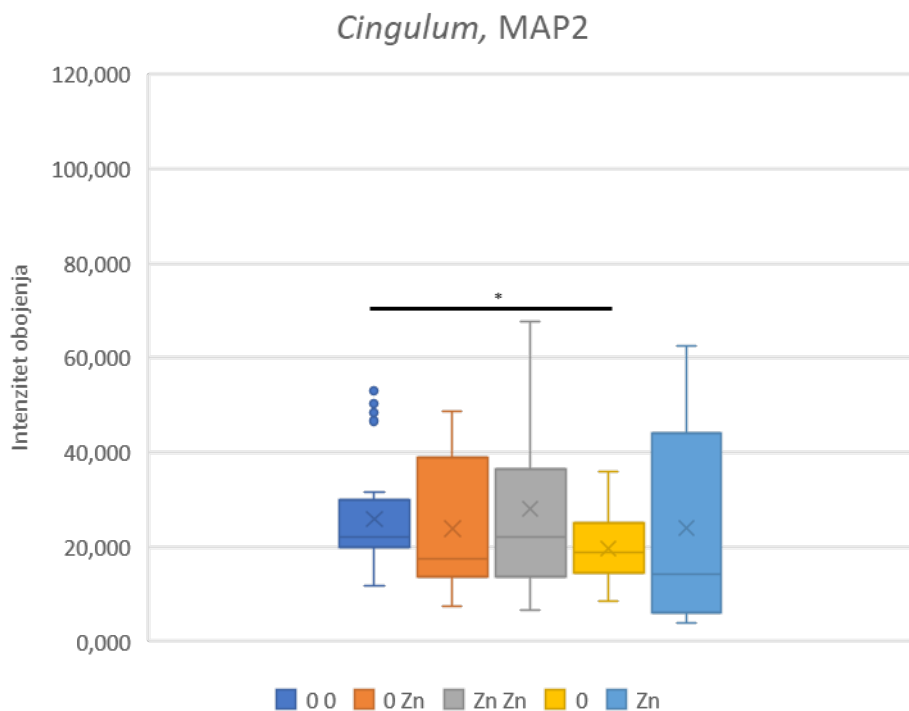


Slika 46. Razlika u obojenosti malog mozga MAP2 protutijelom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

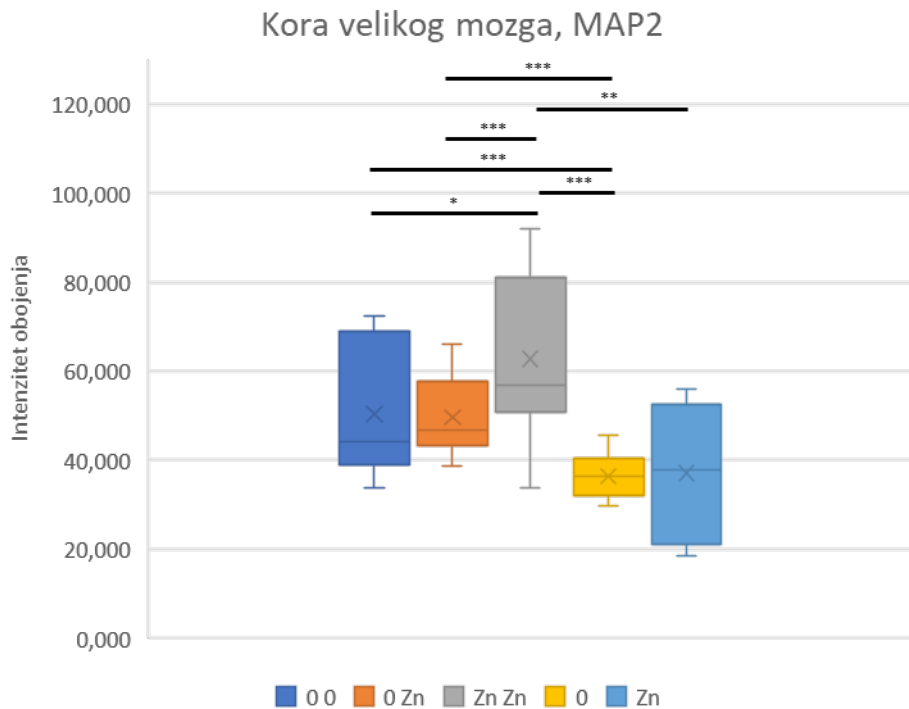
U *cingulumu* je jedina značajna razlika između grupe 0/0 i grupe 0 ( $p < 0,05$ ) u kojoj 0/0 grupa ima jače bojanje od svih ostalih grupa.



Slika 47. Razlika u obojenosti *cingulumu* MAP2 protutijelom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

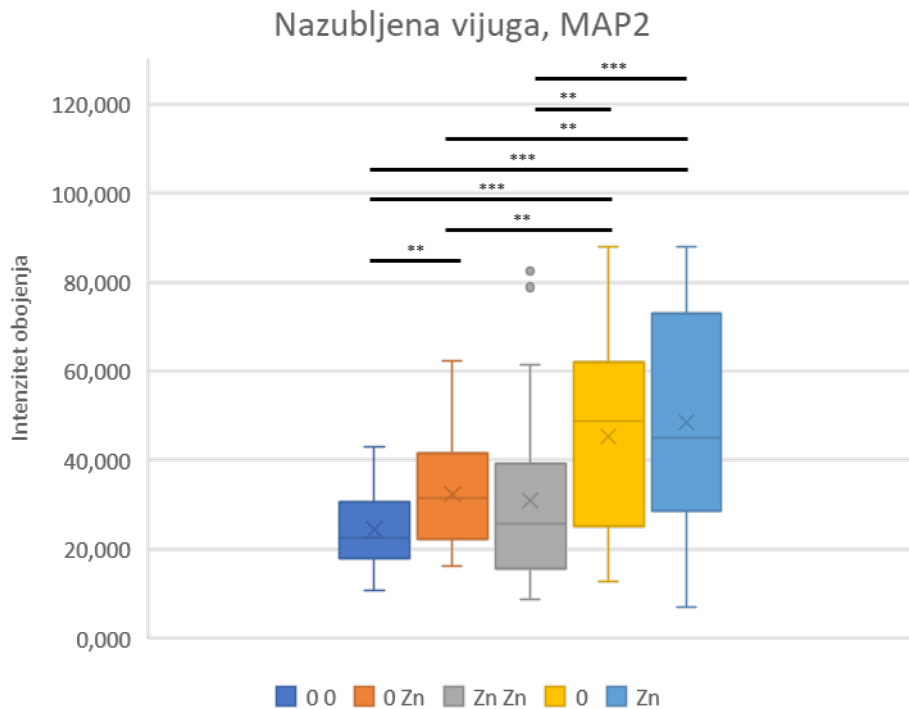
U kori velikog mozga najintenzivnije je obojena Zn/Zn grupa u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,05$ ) i 0/Zn grupu ( $p < 0,001$ ). Perfuzija (grupa 0/0) u odnosu na grupe fiksirane samo uranjanjem (grupa 0) značajno bolje očuva epitop u kori velikog mozga ( $p < 0,001$ ), a isto je s Zn/Zn grupom u odnosu na Zn grupu ( $p < 0,005$ ).



Slika 48. Razlika u obojenosti kore velikog mozga MAP2 protutijelom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi najintenzivnije je obojena grupa 0 u odnosu na Zn/Zn grupu ( $p < 0,05$ ), 0/Zn grupu ( $p < 0,05$ ), 0/0 grupu ( $p < 0,001$ ). Dodatak cinka u fiksativ prilikom perfuzije značajno bolje očuva epitop nego perfuzija bez cinka ( $p < 0,005$ ). Zn grupa je značajno intenzivnije obojena u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,001$ ) i Zn/Zn grupu ( $p < 0,001$ ).

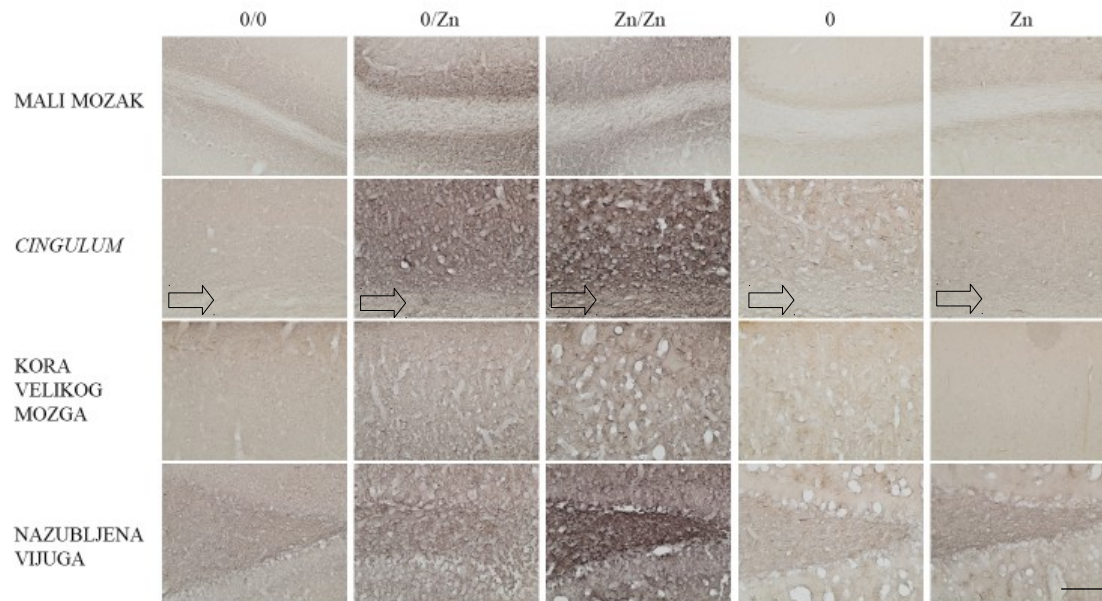


Slika 49. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge MAP2 protutijelom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.10. Kolera toksin

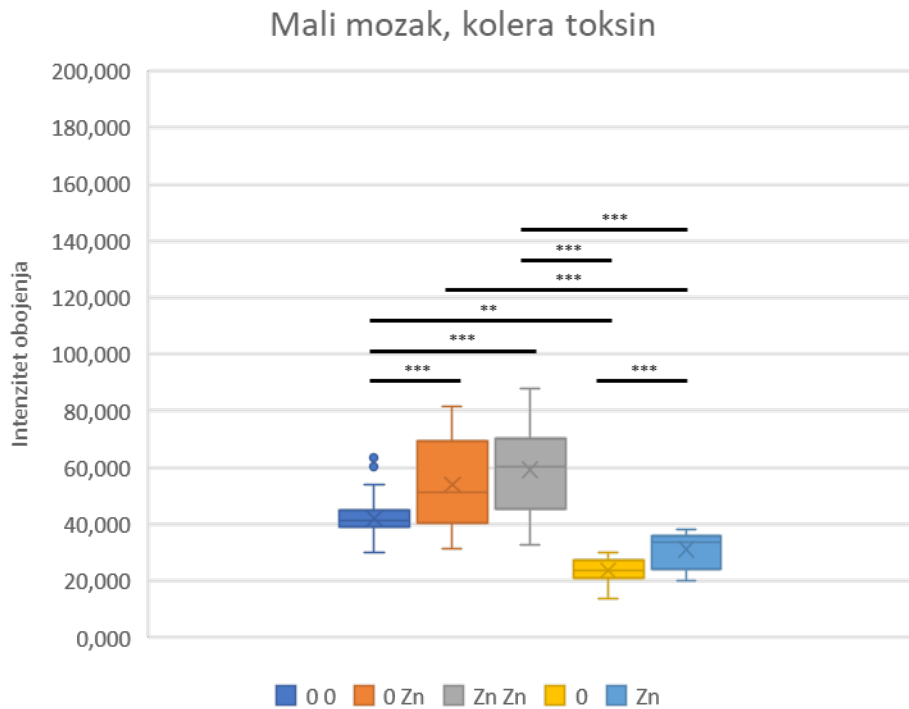
Kolera toksin nije reagirao kako je predviđeno lokacijom njegova epitopa, no obojenje je svejedno prisutno i razlikuje se između grupa. Grupa Zn/Zn je najintenzivnije obojena u odnosu na sve ostale grupe u svim ispitivanim regijama mozga.



Slika 50. Fotografije uzoraka bojenih kolera toksinom pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

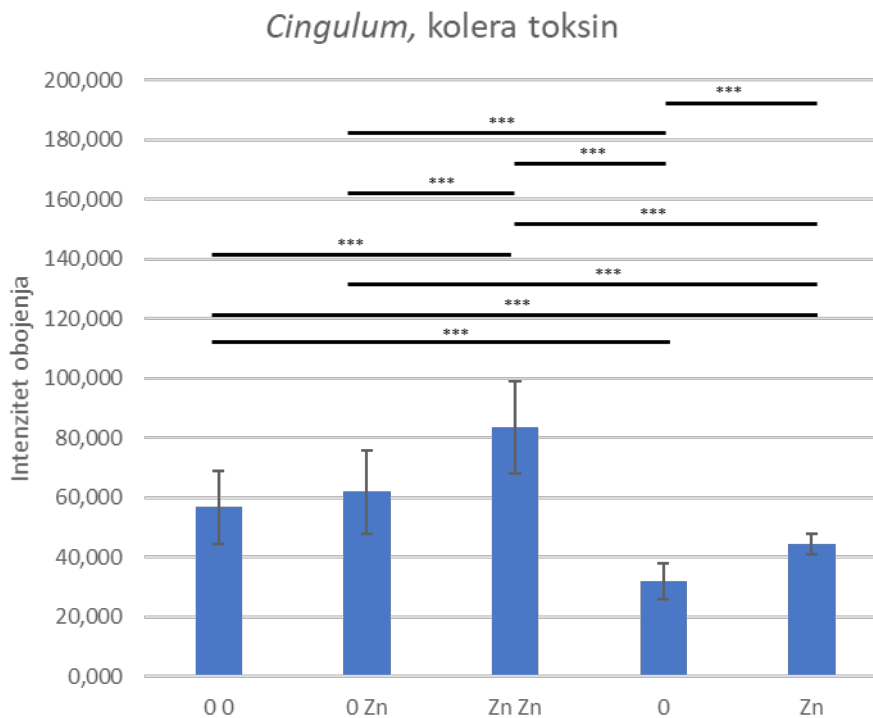
Epitop je značajno slabije dostupan u malom mozgu u 0/0 grupi u odnosu na 0/Zn i Zn/Zn grupu ( $p < 0,001$ ), i značajno više dostupan u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,005$ ). Cink u perfuziji u ESS i u fiksativu značajno povećava dostupnost epitopa u odnosu na samo fiksiranje uranjanjem s ili bez cinka ( $p < 0,001$ ). Cink značajno povećava dostupnost epitopa u fiksaciji uranjanjem ( $p < 0,001$ ).



Slika 51. Razlika u obojenosti malog mozga kolera toksinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

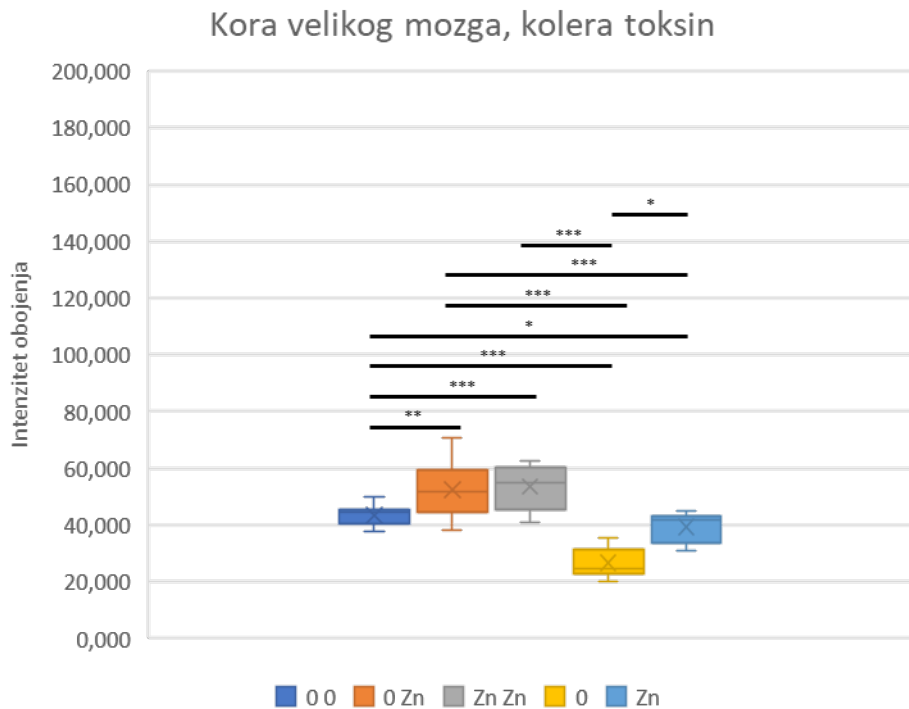
U *cingulumu* trend je isti kao i u malom mozgu, odnosno cink povećava dostupnost epitopu ( $p < 0,001$ ).



Slika 52. Razlika u obojenosti *cingulum*a kolera toksinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

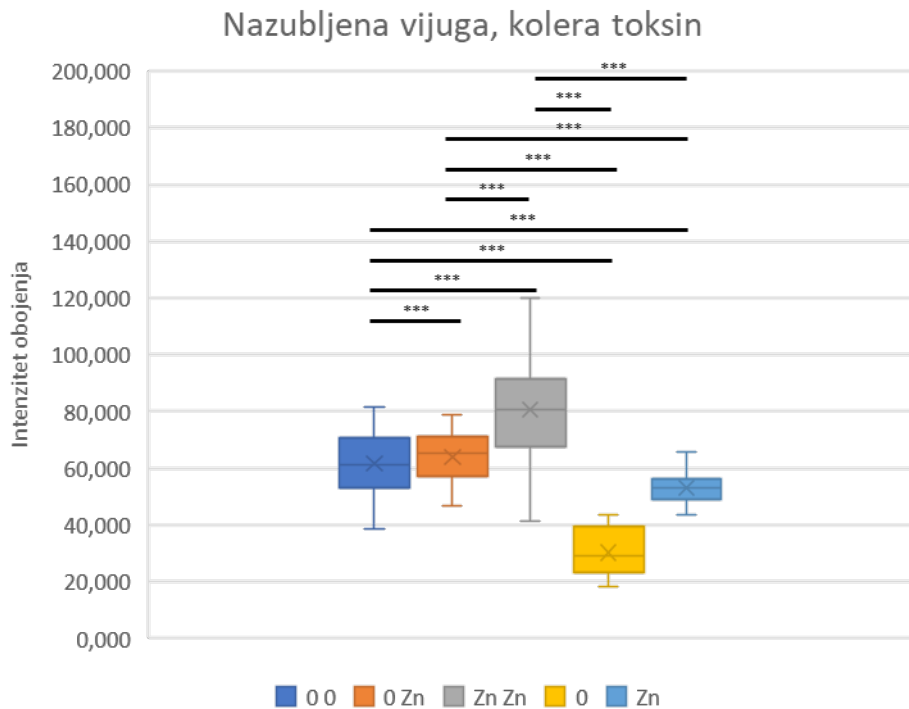
Kora velikog mozga ima najslabije dostupan epitop kolera toksina, ako se samo fiksira uranjanjem u fiksativ bez cinka u odnosu na uranjanje u fiksativ s cinkom ( $p < 0,05$ ). Također, u ovoj je grupi značajno slabije dostupan epitop u odnosu na sve perfuzijske fiksacije ( $p < 0,001$ ). Najintenzivnije obojena je grupa Zn/Zn.



Slika 53. Razlika u obojenosti kore velikog mozga kolera toksinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi najintenzivnije obojena grupa je Zn/Zn u odnosu na sve grupa ( $p < 0,001$ ). Nema statistički značajne razlike između 0 i Zn grupa. Grupa životinja 0/Zn ima značajno intenzivnije obojenja i dostupniji epitop u odnosu grupu 0/0 ( $p < 0,001$ ), grupu 0 ( $p < 0,001$ ), grupu Zn ( $p < 0,001$ ).



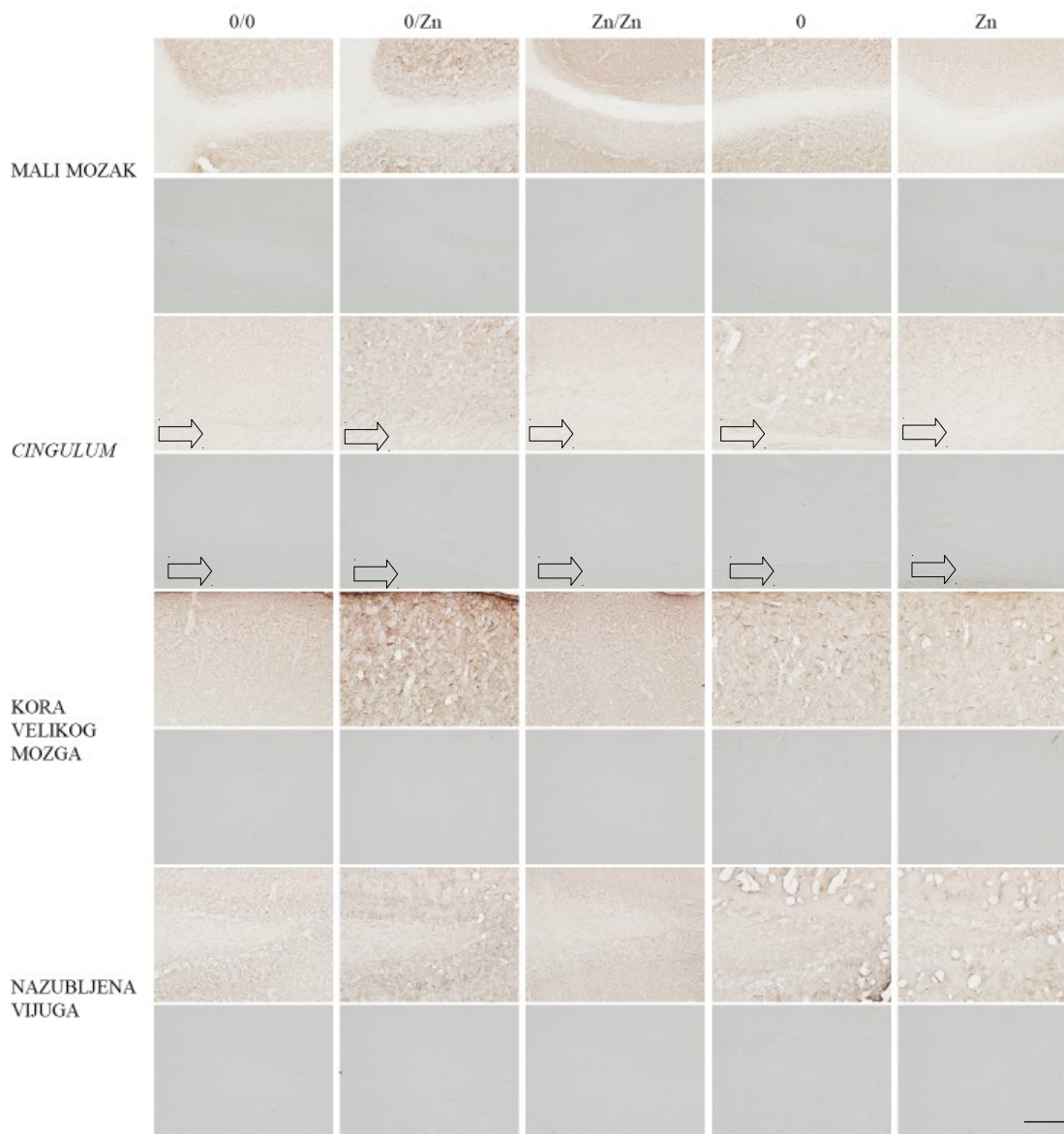
Slika 54. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge kolera toksinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

### 5.11. GT1b

GT1b je gangliozid koji je integralni dio mijelinskog omotača neurona. Ima 3 sijalinske kiseline što ga čini vrlo nabijenom molekulom. Većina regija GT1b je računalno jednako obojena kao i negativna kontrola. Postoji mogućnost da protutijelo nije radilo i nakon oduzimanja intenziteta obojenja negativne dobivene su negativne vrijednosti.

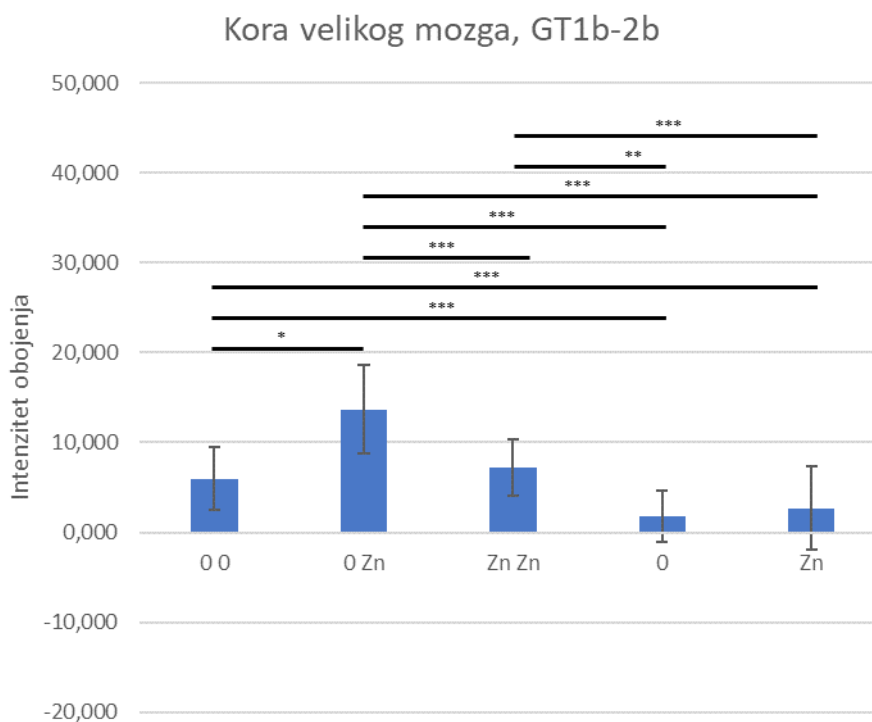


Slika 55. Fotografije uzoraka bojenih GT1b-om pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu

## 5. REZULTATI

slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . Strelice označavaju područje gdje se nalazi cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

Samo u kori velikog mozga je reakcija bila intenzivnija od negativne kontrole. 0/Zn grupa je najintenzivnije obojena u odnosu na grupu 00 ( $p < 0,05$ ) i ostale grupe ( $p < 0,001$ ). Perfuzijom fiksirane grupe su značajno intenzivnije obojene od grupa fiksiranih uranjanjem ( $p < 0,001$ ). Grupa 0 je značajno svjetlija od Zn/Zn perfuzijom fiksirane grupe ( $p < 0,005$ ). Ostale su regije jednako tamne kao i negativna kontrola.

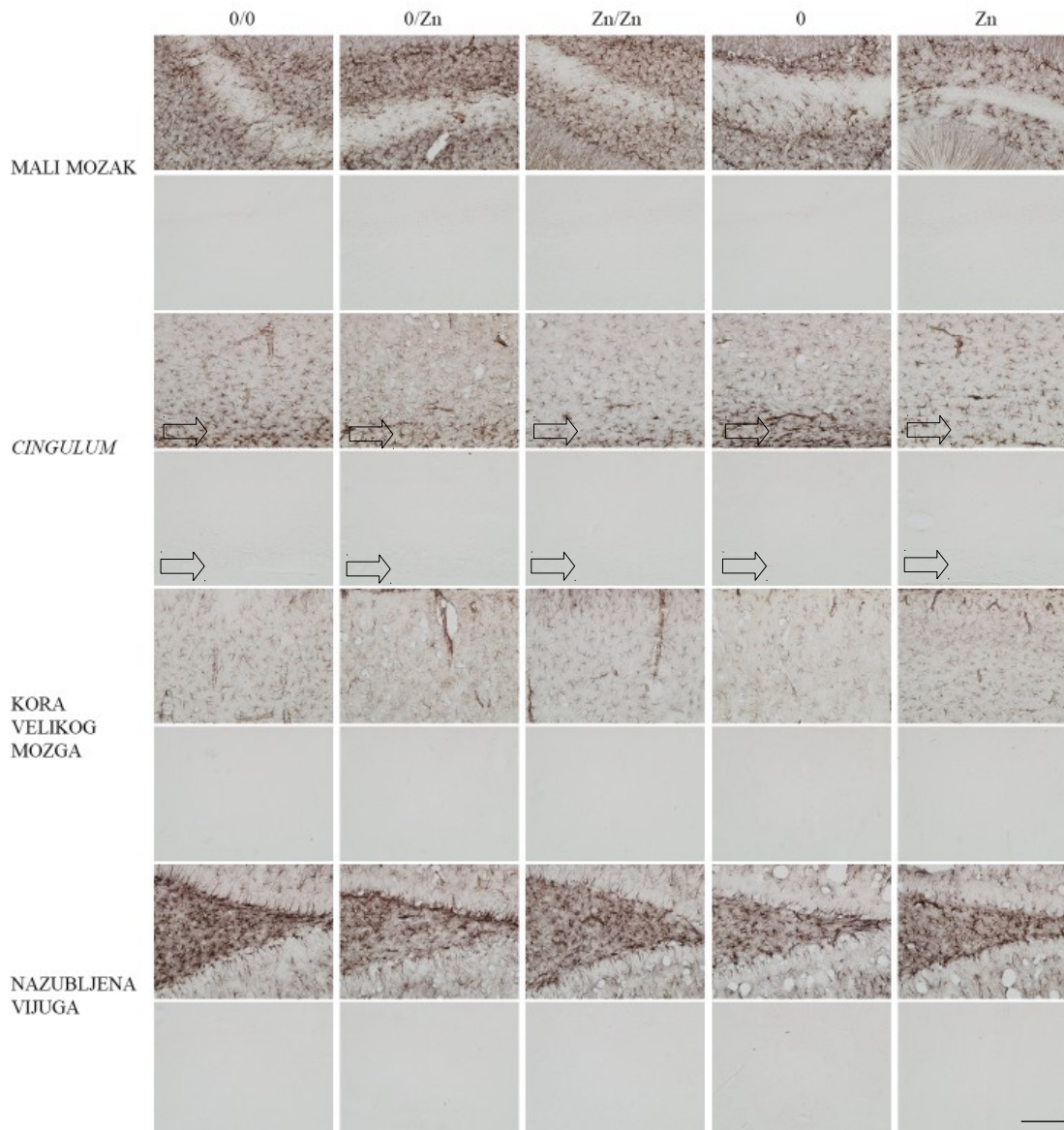


Slika 56. Razlika u obojenosti kore velikog mozga GT1b protutijelom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.12. GFAP

GFAP je intermedijarni protein kojeg eksprimiraju brojne stanice središnjeg živčanog sustava. Razmatanje njegove strukture može omesti vezanje protutijela. Najintenzivnije su obojeni u grupi 0/0 u kojoj nema cinkovih iona.

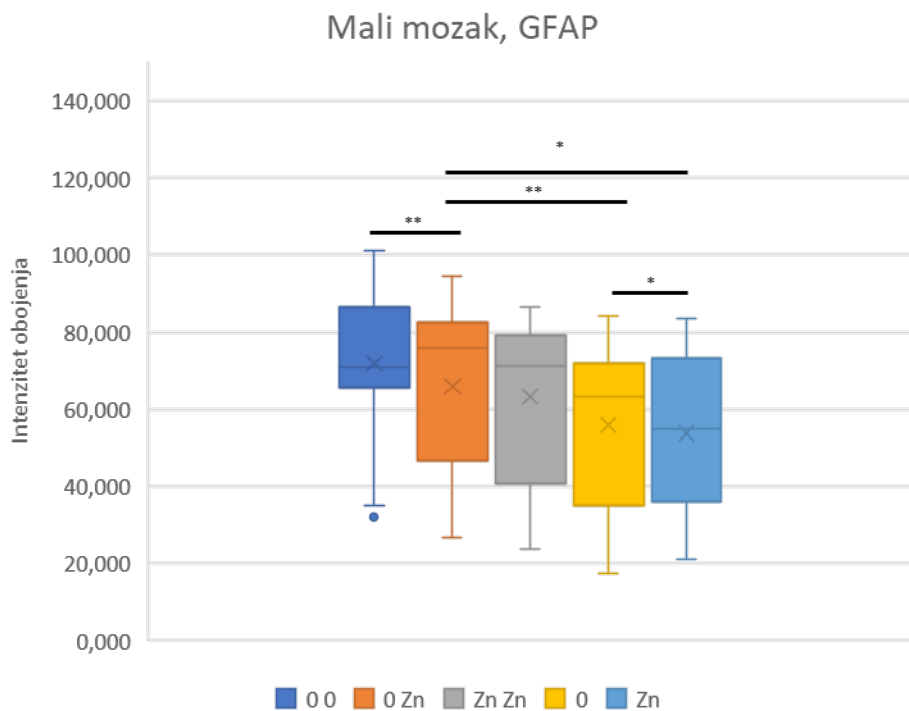


Slika 57. Fotografije uzoraka bojnih GFAP protutijelima pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu$ m. Strelice označavaju područje gdje se nalazi

## 5. REZULTATI

cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

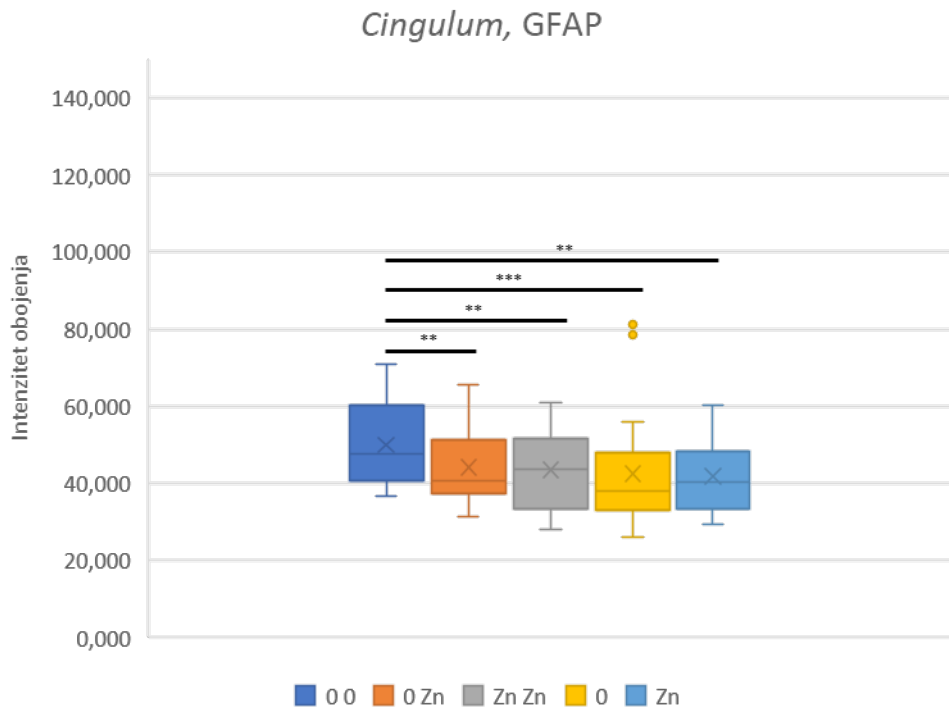
U malom mozgu, perfuzijom fiksirana grupa 0/Zn ima intenzivnije obojene astrocite u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,005$ ), 0 grupu ( $p < 0,005$ ) i Zn grupu ( $p < 0,05$ ). Razlika je također uočljiva između grupa fiksiranih uranjanjem gdje je fiksacija bez cinka bolje očuvala epitop nego fiksacija s cinkom ( $p < 0,05$ ).



Slika 58. Razlika u obojenosti malog mozga GFAP protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

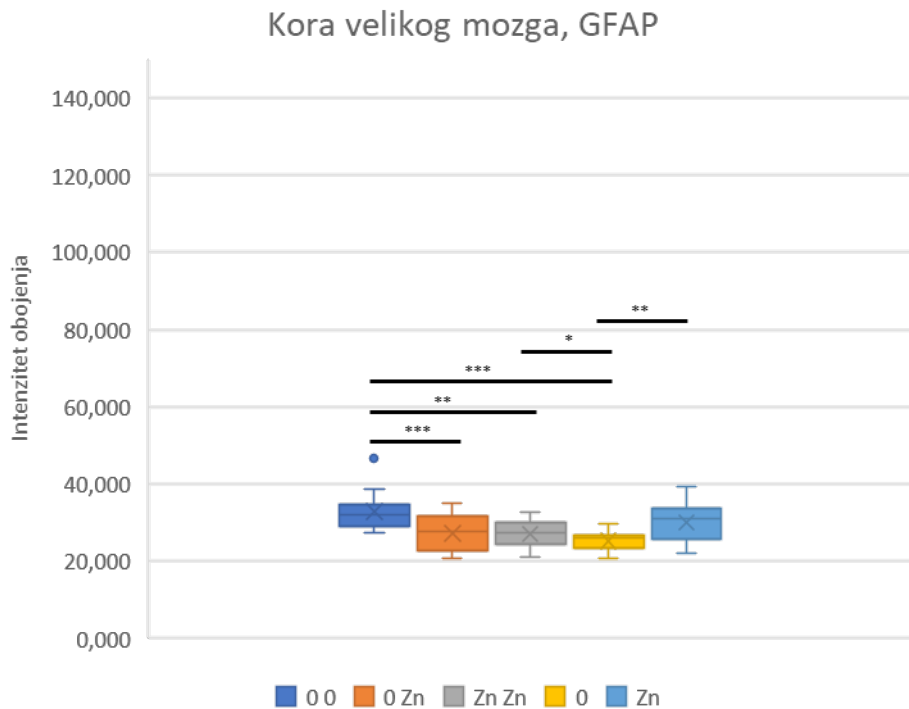
U *cingulumu* postoji velika statistički značajna razlika u obojenju 0/0 grupe, koja je najintenzivnije obojena, i svih ostalih grupa ( $p < 0.01$ ). Indikativno je da cink ne poboljšava očuvanje epitopa citoskeleta unutar astrocita. Grupa 0/0 u *cingulumu* je značajno intenzivnije obojena od 0/Zn grupe  $p < 0,005$ , Zn/Zn grupe  $p < 0,005$ , 0 grupe  $p < 0,001$  i Zn grupe  $p < 0,005$ . Značajnija razlika nije uočena u *cingulumu* između grupa fiksiranih uranjanjem.



Slika 59. Razlika u obojenosti cinguluma GFAP protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

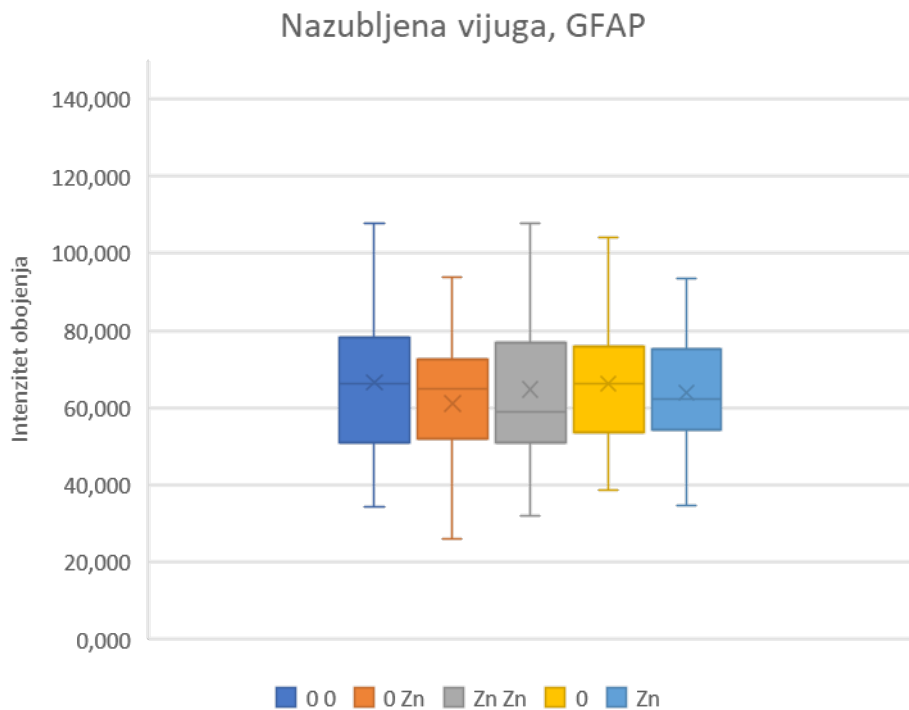
Dodatak cinka u fiksativ u kori velikog mozga bolje čuva GFAP epitop i obojenje u Zn grupi je intenzivnije u odnosu na 0 grupu ( $p < 0,005$ ). Perfuzijska fiksacija bez cinka značajno bolje čuva epitop u kori velikog mozga u odnosu na 0/Zn ( $p < 0,001$ ) i Zn/ Zn grupu ( $p < 0,005$ ), vrlo slično kao i u *cingulumu*. Grupa 0 je značajno slabije obojena od Zn/Zn grupe ( $p < 0,05$ ).



Slika 60. Razlika u obojenosti kore velikog mozga GFAP protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi nije došlo do statistički značajne razlike u fiksaciji između grupa.

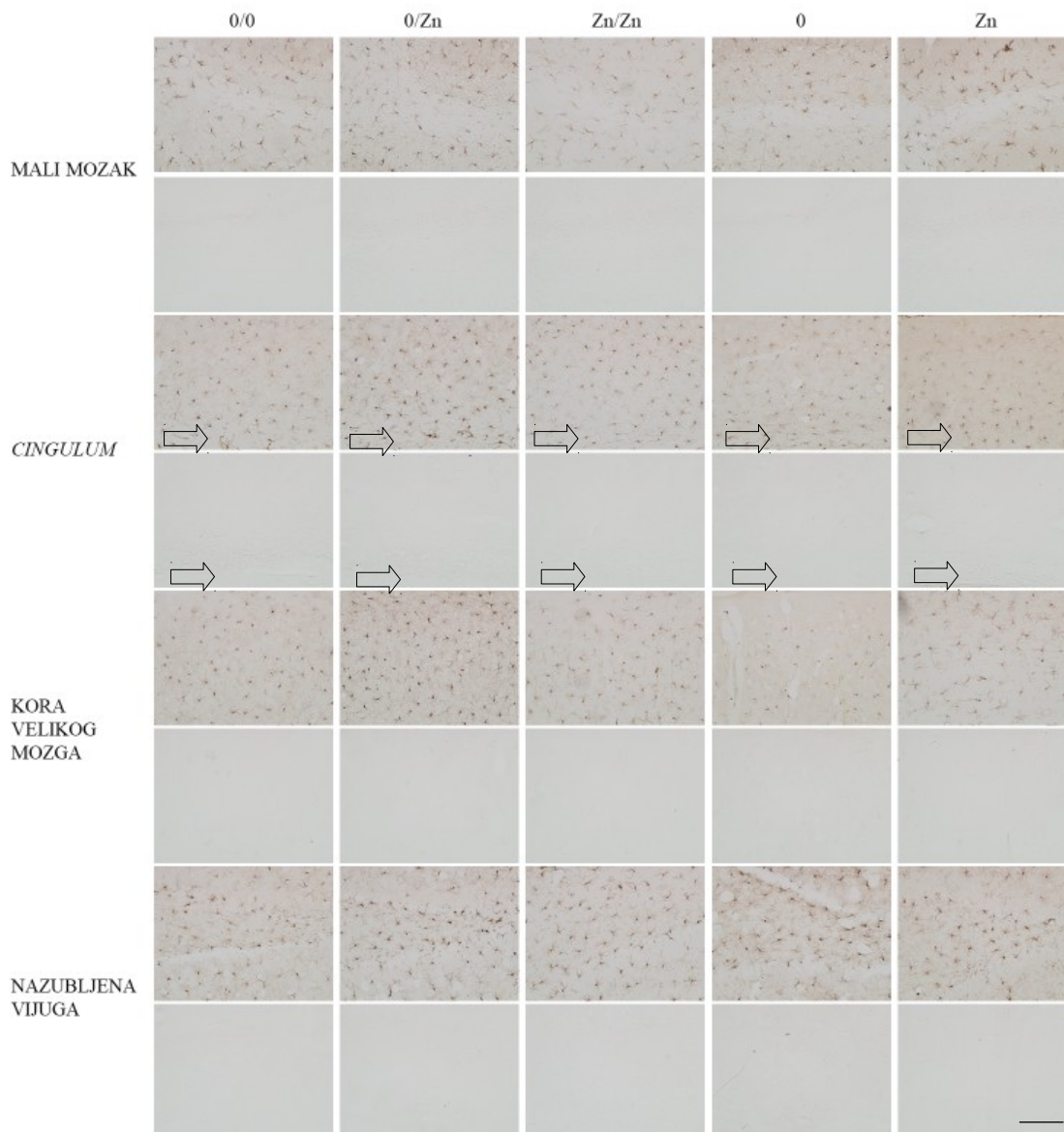


Slika 61. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge GFAP protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test.

## 5. REZULTATI

### 5.13. IBA1

IBA1 je protein koji je izražen u mikrogliji i makrofazima. Nalazi se u citoplazmi i veže kalcij. IBA1 epitop je također znatno bolje očuvan fiksacijom bez cinka, a prisustvo cinka u ESS i fiksativu značajno ometa vezivanje protutijela.



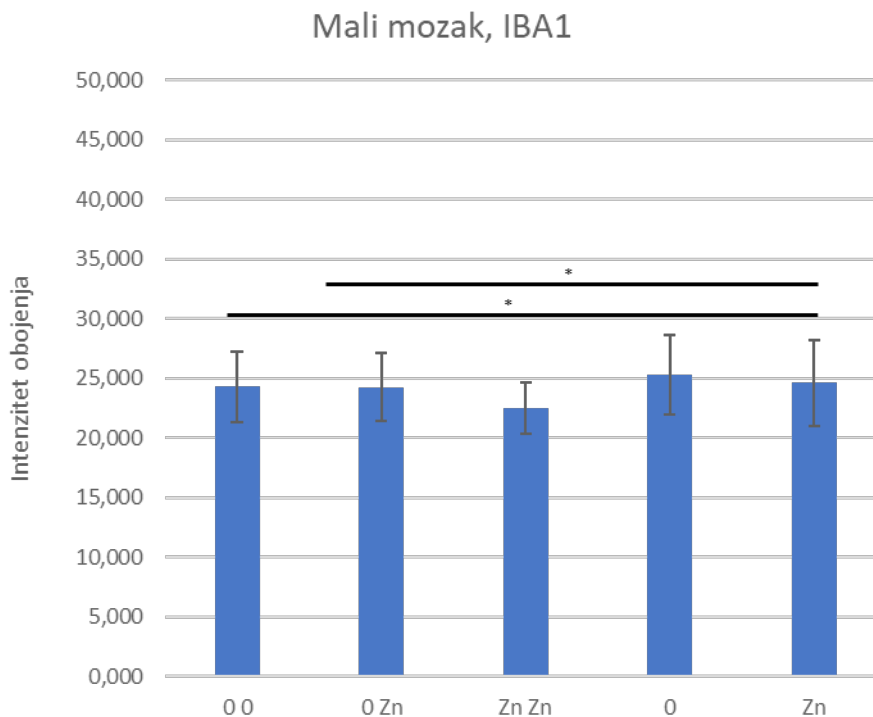
Slika 62. Fotografije uzoraka bojenih IBA1 protutijelom pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu$ m. Strelice označavaju područje gdje se nalazi



## 5. REZULTATI

cingulum. 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

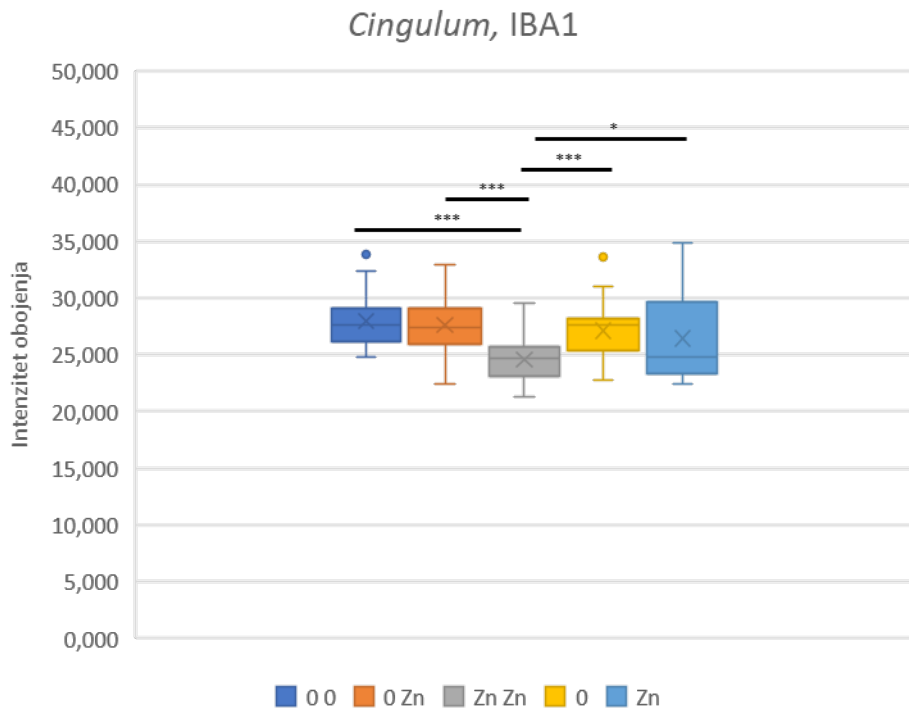
U malom mozgu, epitop IBA1 je podjednako dobro očuvan. Nešto intenzivnije bojenje pokazuje Zn grupa, odnosno, odnosno bolje očuvan epitop u odnosu na 0/0 grupu ( $p<0,05$ ) i 0/Zn grupu ( $p<0,05$ ).



Slika 63. Razlika u obojenosti malog mozga IBA1 protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke (\* statistička značajnost  $p<0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p<0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p<0,001$ ).

## 5. REZULTATI

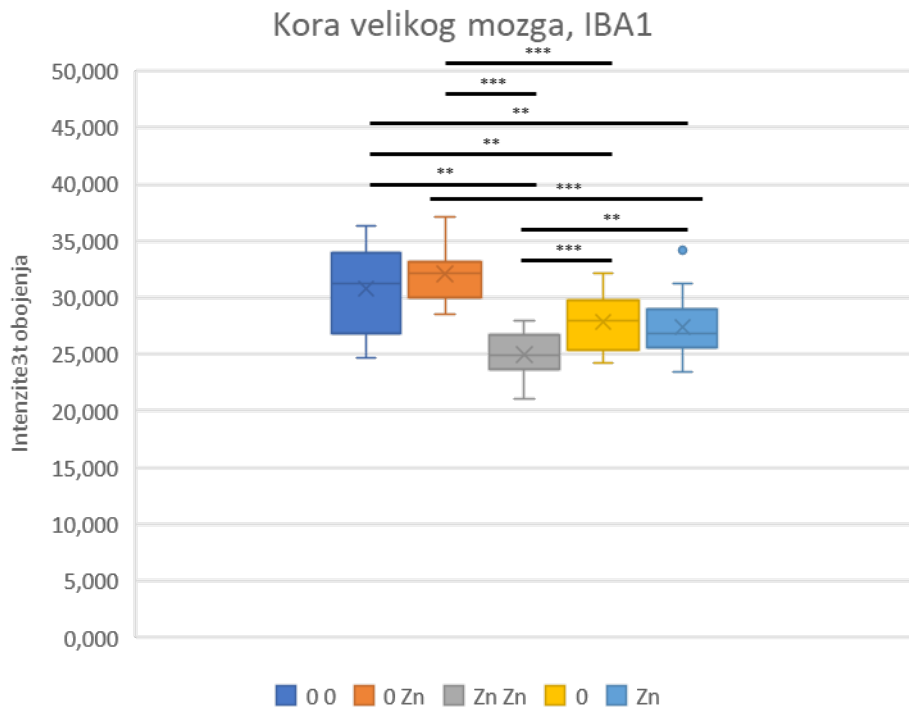
U prikazu IBA1 epitopa u *cingulumu* ima značajnijih razlika kada se fiksira s cinkom. Grupa Zn/Zn je obojena slabijim intenzitetom u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,001$ ), 0/Zn grupu ( $p < 0,001$ ) i grupu 0 ( $p < 0,001$ ). Intenzivnije je obojenje IBA1 samo u grupi 0 u odnosu na Zn grupu ( $p < 0,05$ ).



Slika 64. Razlika u obojenosti *cingulum*a IBA1 protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

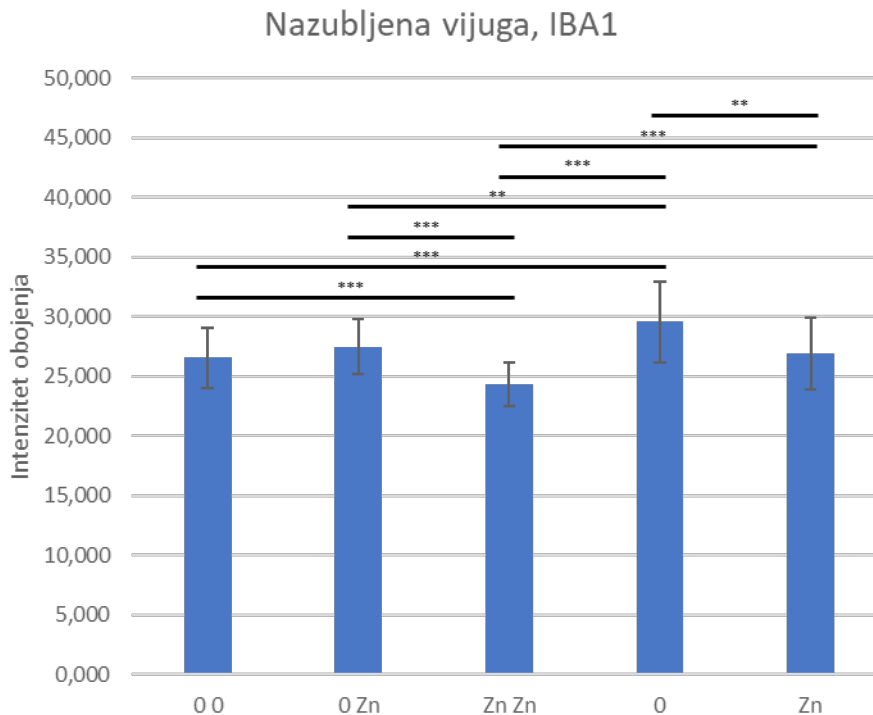
Kora velikog mozga prati trend već uočen na tkivu *cinguluma* pa je grupa 0/0 je značajno intenzivnije obojena u odnosu na grupe Zn/Zn ( $p < 0,005$ ), 0 i Zn ( $p < 0,005$ ). Cink prisutan u ESS i fiksativu je manje povoljan za očuvanje epitopa u odnosu kada je samo prisutan u fiksativu u grupi 0/Zn ( $p < 0,001$ ) i u grupi Zn ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/Zn je značajno intenzivnije obojena u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,001$ ).



Slika 65. Razlika u obojenosti kore velikog mozga IBA1 protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U nazubljenoj vijuzi je najveći intenzitet obojenja u 0 grupi u odnosu na druge grupe. Ove usporedbe drugih grupa s grupom 0 imaju sljedeće značajnosti: za grupu 0/0 ( $p < 0,001$ ), grupu 0/Zn ( $p < 0,001$ ), grupu Zn/Zn ( $p < 0,001$ ), a za grupu Zn ( $p < 0,005$ ). Značajna je razlika između neperfundiranih grupa, naime cink (grupa Zn) lošije čuva epitop u odnosu na 0 grupu i fiksaciju bez cinka ( $p < 0,005$ ). Prisutnost cinka u ESS i fiksativu prati trend kao u ostalim regijama mozga. Grupa Zn/Zn je svjetlija u odnosu na grupu 0/Zn ( $p < 0,001$ ).

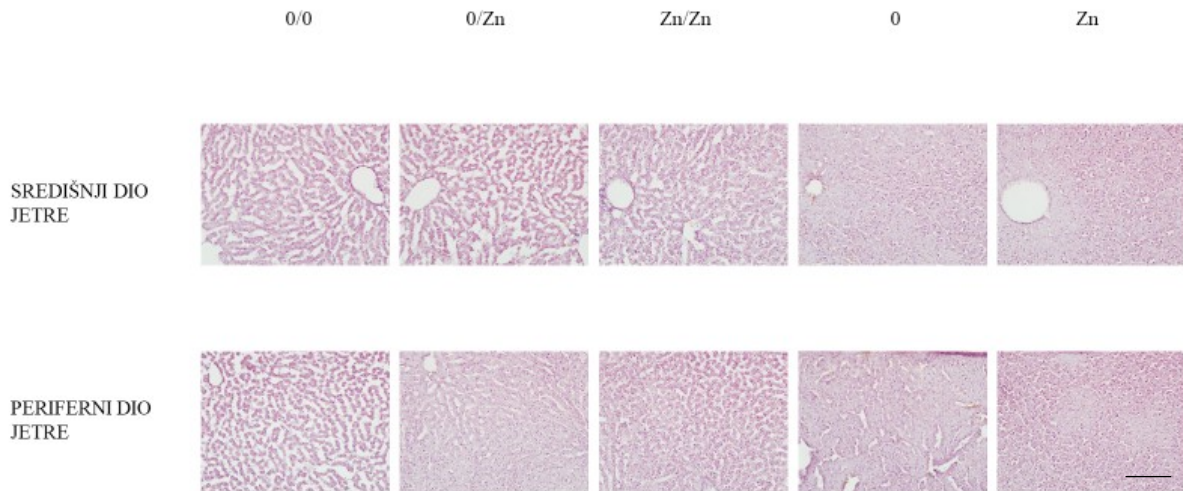


Slika 66. Razlika u obojenosti nazubljene vijuge IBA1 protutijelima u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. T-test za nezavisne uzorke. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.14. Hemalaun/eozin, jetra

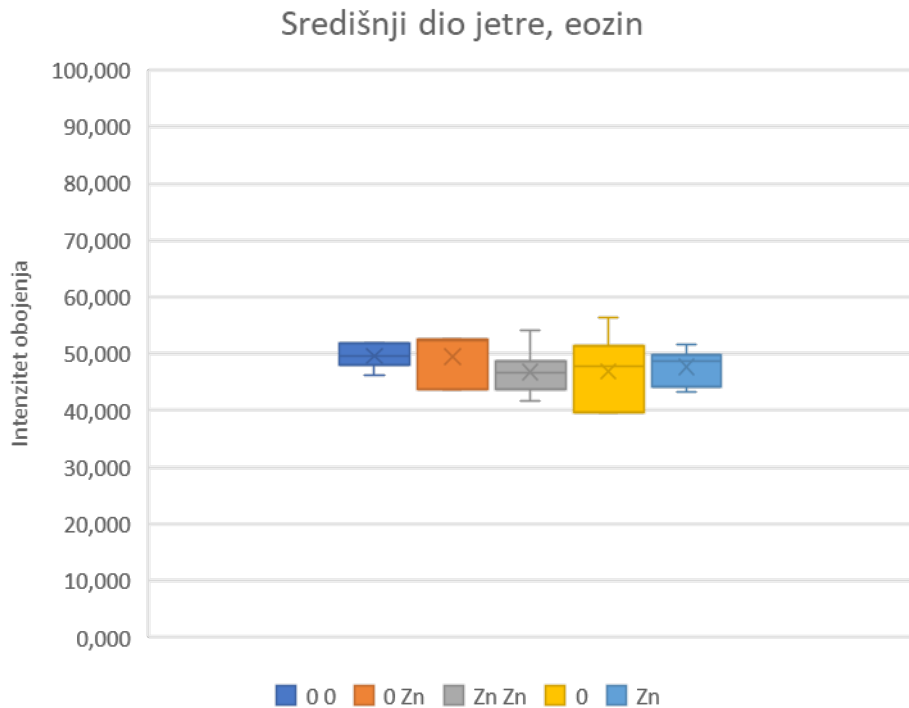
Eozin je negativno nabijena boja, te se obično veže na pozitivno nabijene skupine u tkivu poput pozitivno nabijenih aminokiselina. Zbog brojnih enzima u jetri, eozin se dobro vezao na njih.



Slika 67. Fotografije uzoraka bojenih hemalaun/eozinom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

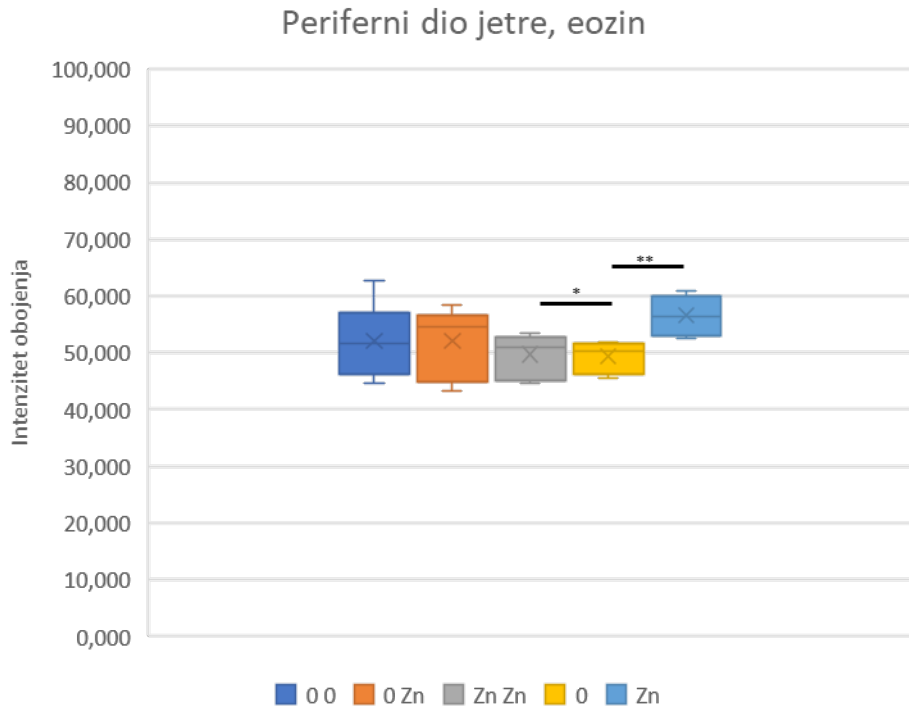
Vezivanje eozina u tkivu jetre se ne razlikuje između grupa u središnjem dijelu jetre.



Slika 68. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test.

## 5. REZULTATI

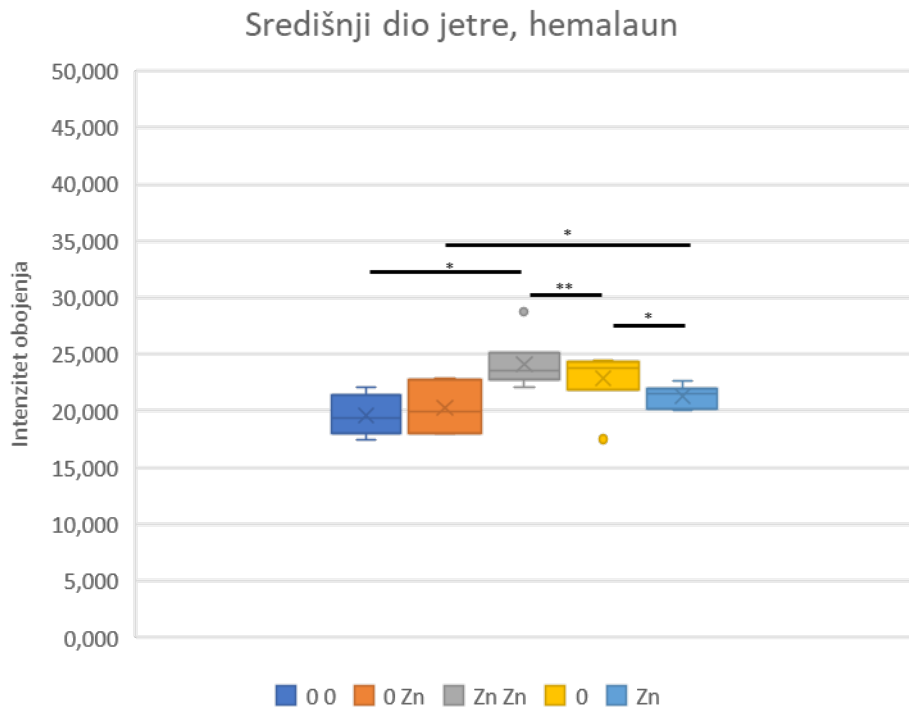
U perifernom je dijelu jetre značajna razlika između grupa fiksiranih cinkom u odnosu na ostale. Grupa Zn/Zn je tamnije obojena od grupe 0 ( $p < 0,05$ ), a grupa 0 je značajno svjetlije obojena od grupe Zn ( $p < 0,005$ ).



Slika 69. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre eozinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Vezivanje hemalauna u središnjem dijelu jetre je najintenzivnije u grupu Zn/Zn, u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,05$ ), a u odnosu na grupu 0 je  $p < 0,005$ . Značajna je razlika u intenzitetu obojenja u grupama fiksiranim uranjanjem gdje je situacija obrnuta pa je Zn grupa značajno svjetlija od 0 ( $p < 0,05$ ). Perfuzija u kojoj fiksativ sadržava cink daje značajno slabije vezivanje boje u odnosu na samo na uranjanju u fiksativ s cinkom ( $p < 0,05$ ).

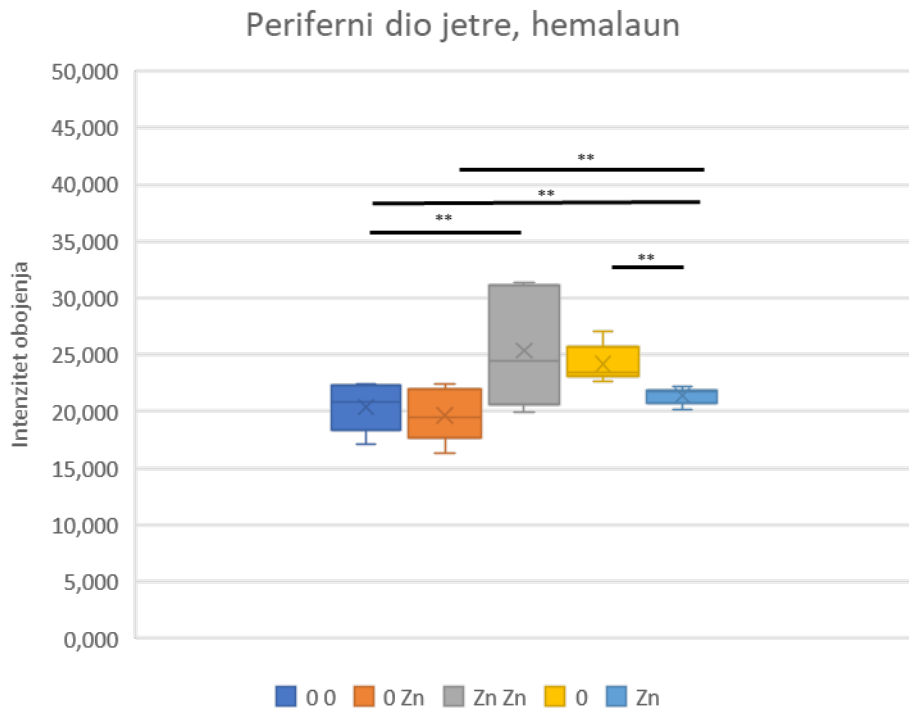


Slika 70. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre hemalaunom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



## 5. REZULTATI

Periferni dio jetre prati sličan obrazac kao središnji dio jetre. Grupa Zn/Zn je značajno tamnija od grupe 0/0 ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/0 je svjetlija od grupe Zn ( $p < 0,005$ ). Fiksacija uranjanjem u fiksativ s cinkom daje značajno svjetlije obojenje u odnosu na fiksativ bez cinka ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/Zn je svjetlije obojena od Zn grupe ( $p < 0,005$ ).

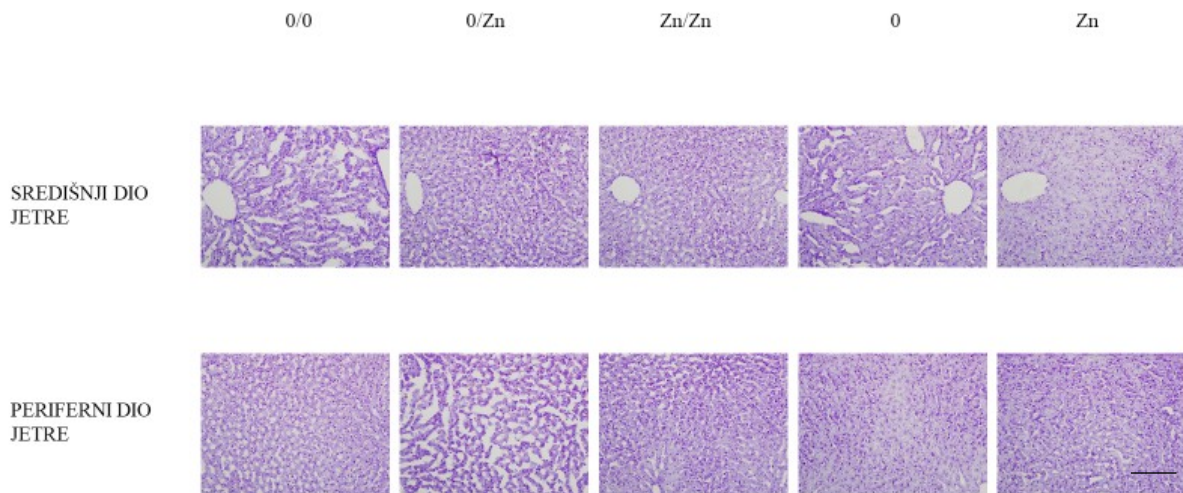


Slika 71. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre hemalaunom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.15. Nissl, jetra

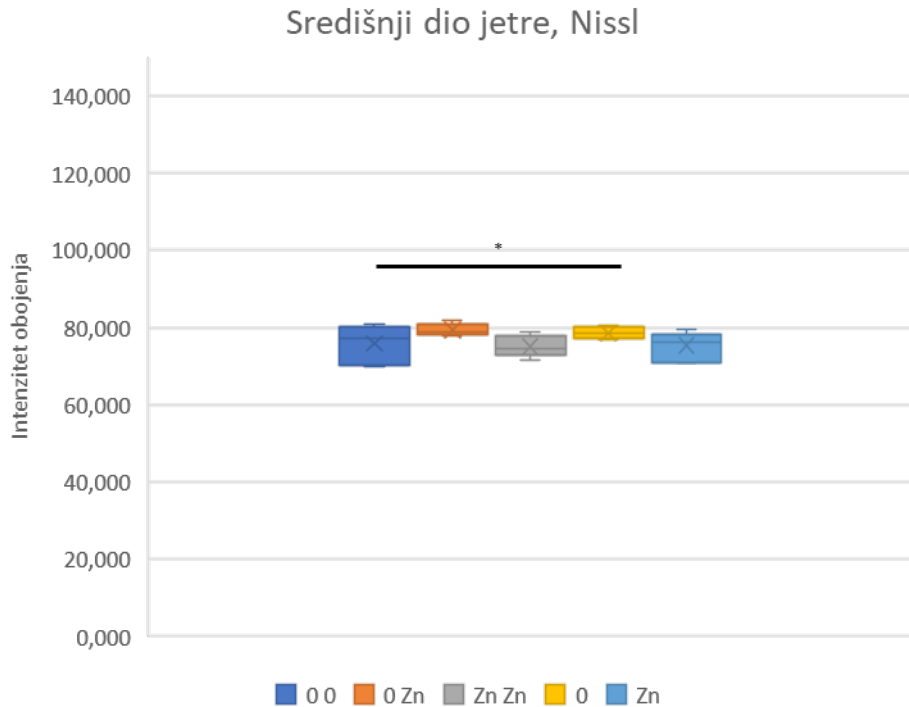
Krezil violet je bazična boja koja ima afinitet na kisele tvari unutar stanice kao npr. nukleinske kiseline. Vezivanje krezil violeta u jetri je značajno jače u grupama koje su uronjene u fiksativ.



Slika 72. Fotografije uzoraka bojenih po Nissl-u pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

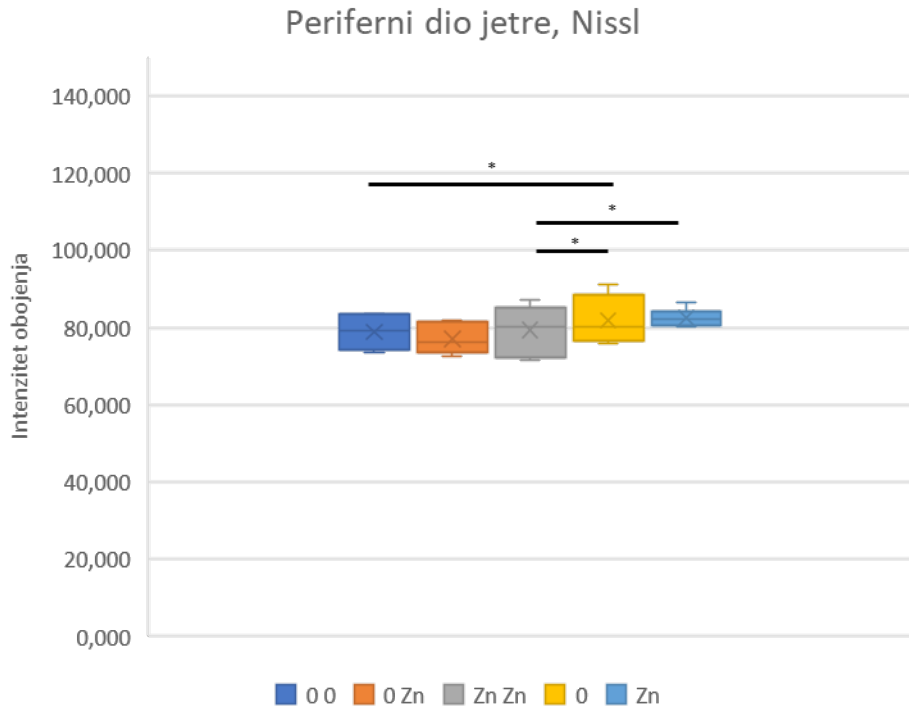
Bojanje krezil violet bojom u jetri otkriva podjednako očuvanje ER između grupa u središnjem dijelu jetre uz statistički značajni jači intenzitet obojenja u grupi 0 u odnosu na perfuzijsku grupu 0/0 ( $p < 0,05$ ).



Slika 73. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Periferni dio jetre također ima jači intenzitet obojenja u grupi 0 u odnosu na grupu 0/0 ( $p < 0,05$ ). Fiksacija perfuzijom s cinkom u ESS i fiksativu daje slabije obojenje u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,05$ ) i grupu Zn ( $p < 0,05$ ).

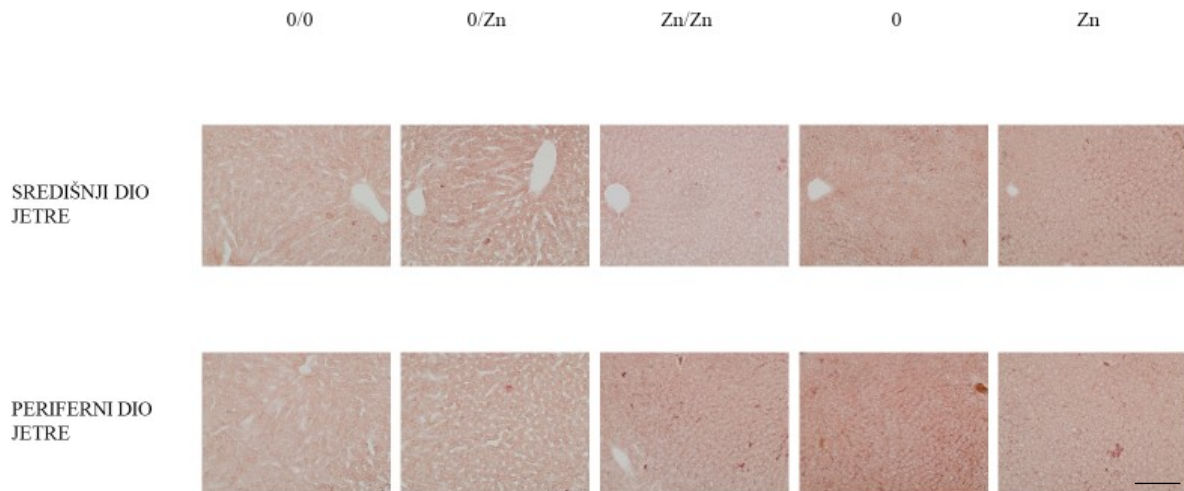


Slika 74. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre bojenjem po Nissl-u u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.16. Uljno crvena, jetra

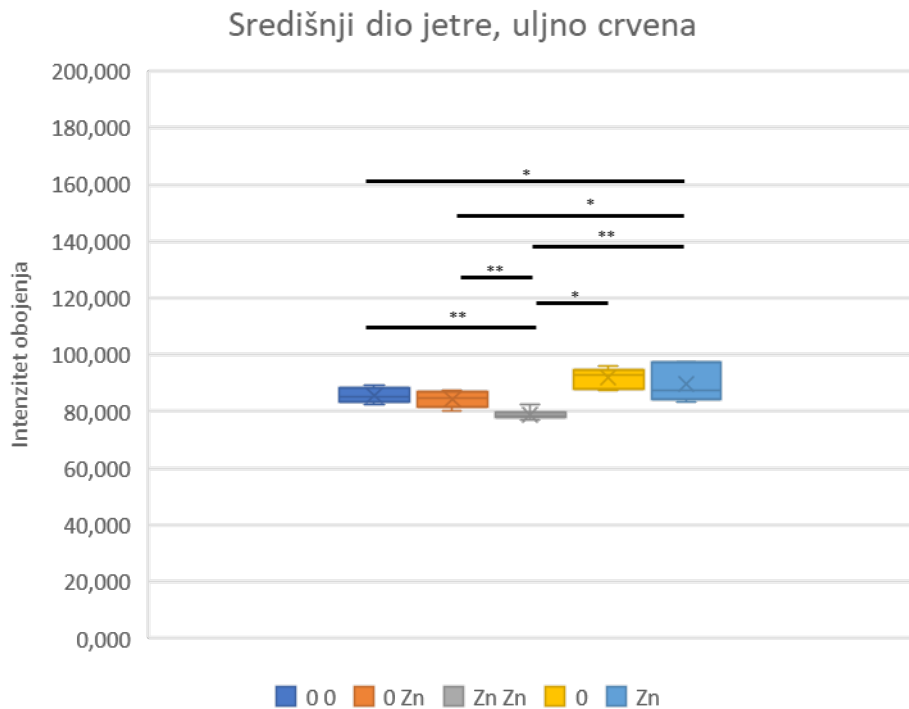
Fiksacija uranjanjem stvara najveće pozadinsko obojenje u tkivu. Perfuzijsko fiksiranje zaustavlja aktivnost većine enzima koji bi mogli pregraditi hepatocite od kojih je najvažnija jetrena lipaza koja cijepa trigliceride i posljedično može nataložiti slobodne masne kiseline u tkivu koje se postupno fiksira uranjanjem.



Slika 75. Fotografije uzoraka bojenih uljno crvenom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

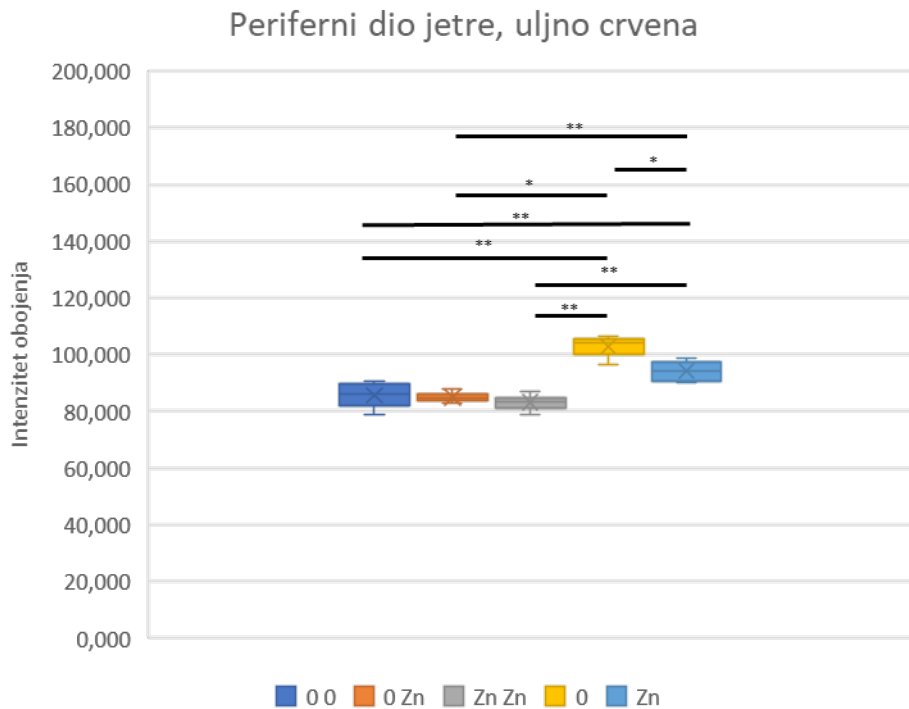
U središnjem je dijelu jetre značajno intenzivnije obojenje u Zn grupi u odnosu na Zn/Zn grupu ( $p<0,05$ ) i grupu 0/0 ( $p<0,05$ ). Zn/Zn grupa je obojena značajno manjim intenzitetom i odnosu na grupu 0/Zn ( $p<0,005$ ) i grupu 0 ( $p<0,05$ ). Perfuzijska fiksacija cinkom stvara najmanje pozadinsko obojenje u središnjem i perifernom dijelu jetre.



Slika 76. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre uljno crvenom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p<0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p<0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p<0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Grupa 0 je najintenzivnije obojena i stvara najviše pozadinskog vezivanja boje u perifernom dijelu jetre u odnosu na grupu Zn/Zn ( $p < 0,005$ ), grupu 0/0 ( $p < 0,005$ ), grupu 0/Zn ( $p < 0,05$ ) i grupu Zn ( $p < 0,05$ ). Grupa Zn je značajno tamnije obojena u odnosu na Zn/Zn grupu  $p < 0,005$ . Perfuzijska fiksacija cinkom stvara najmanje pozadinsko obojenje u središnjem i perifernom dijelu jetre.

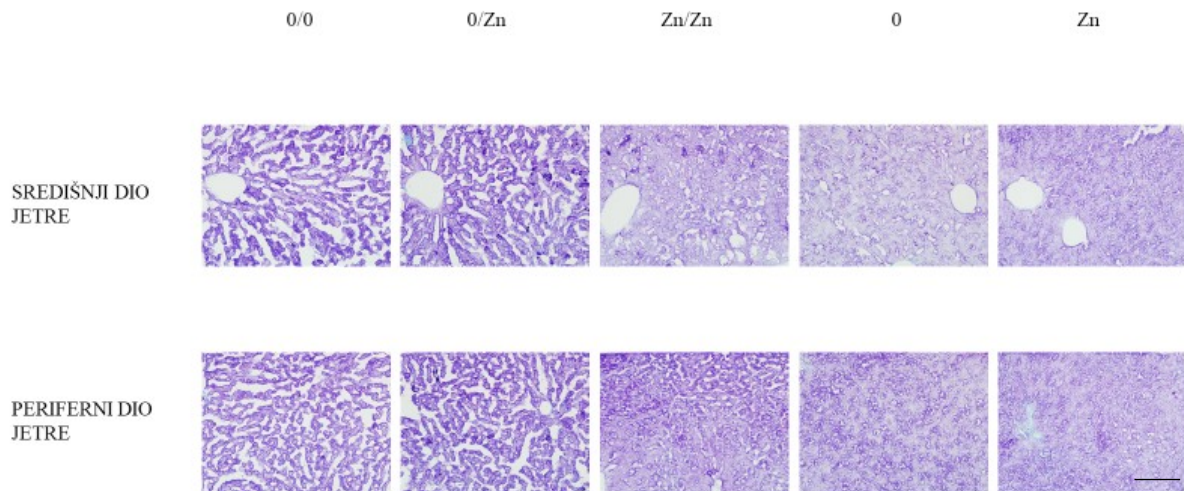


Slika 77. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre uljno crvevnom bojom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.17. Metakromatski toluidin, jetra

Budući da je jetra puna glikogena, a toluidin boja glikogen, očekivano su dobro obojeni uzorci svih grupa. Grupa 0 je najintenzivnije obojena, a grupa Zn najslabije.

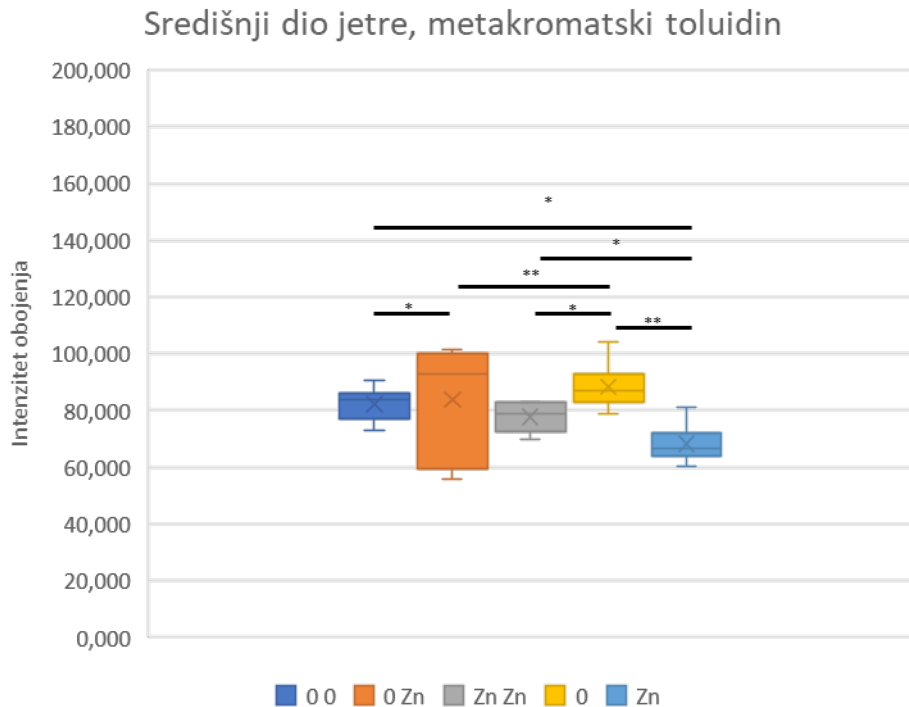


Slika 78. Fotografije uzoraka bojениh toluidinom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.



## 5. REZULTATI

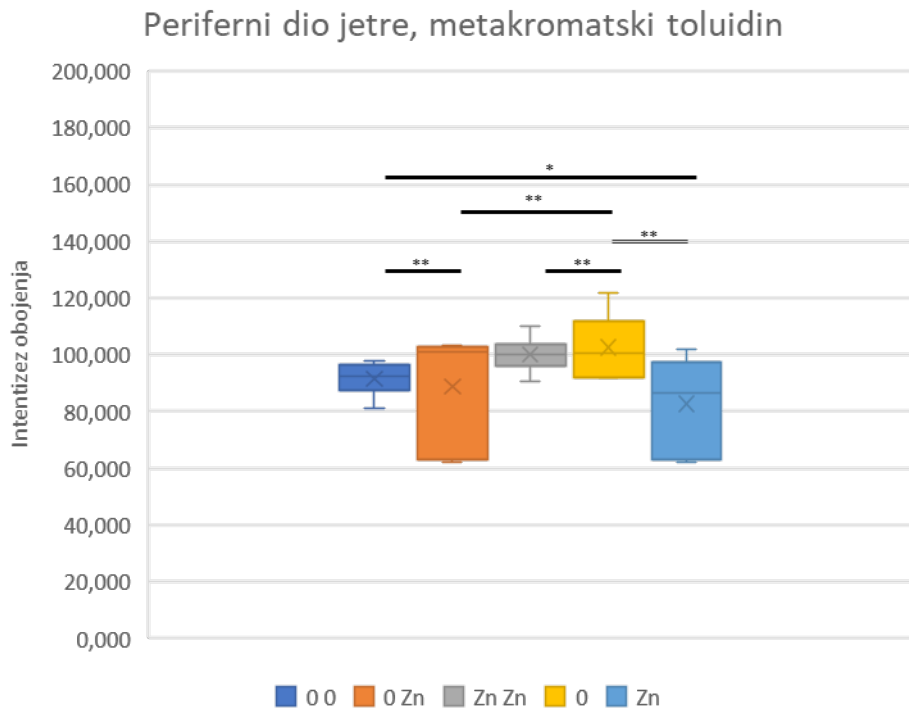
Fiksacija cinkom u središnjem dijelu jetre značajno utječe na intenzitet obojenja i obojenje je slabije u grupi Zn u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,005$ ). Perfuzijska fiksacija cinkom u grupi Zn/Zn daje snažniji intenzitet obojenja u odnosu na grupu Zn ( $p < 0,05$ ), a grupa Zn je značajno svjetlija od grupe 0/0 fiksirane perfuzijom ( $p < 0,05$ ). Fiksacija uranjanjem bez cinka daje slabiji intenzitete obojenja u odnosu na 0/Zn grupu ( $p < 0,005$ ). Dodatak cinka u fiksativ prilikom perfuzijske fiksacije dat će jači intenzitet obojenja u odnosu na 0/0 grupu ( $p < 0,05$ ).



Slika 79. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre toluidinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

U perifernom dijelu jetre grupa 0/Zn je značajno tamnije obojena u odnosu na grupu 0/0 ( $p < 0,005$ ) i grupu 0 ( $p < 0,005$ ). Cink u fiksativu smanjuje ukupni intenzitet obojenja u Zn grupi u odnosu na 0 grupu ( $p < 0,005$ ) i grupu 0/0 ( $p < 0,05$ ). Zn/Zn grupa je svjetlije obojena u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,005$ ).

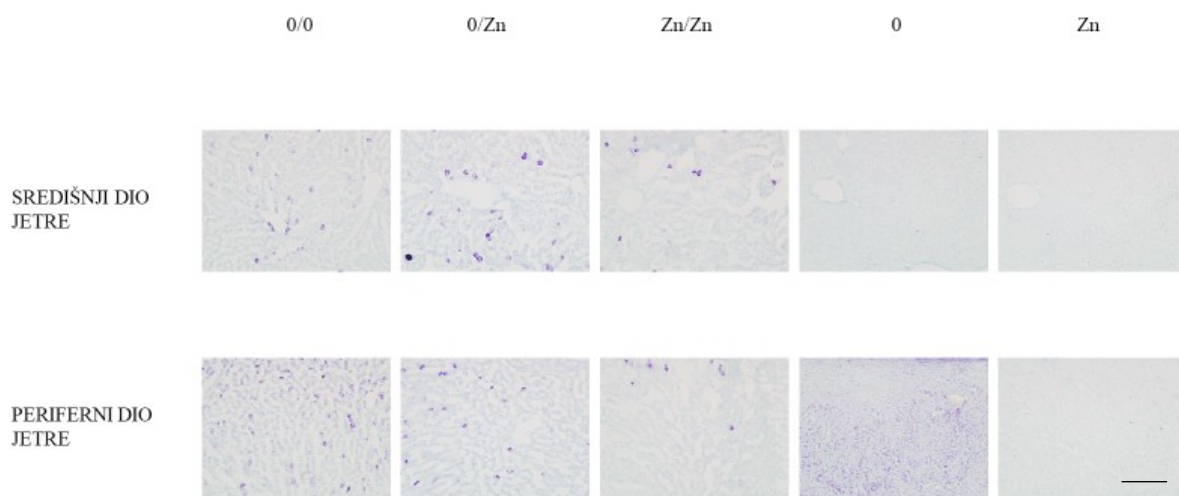


Slika 80. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre toluidinom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.18. Metakromatski toluidin s dijastazom, jetra

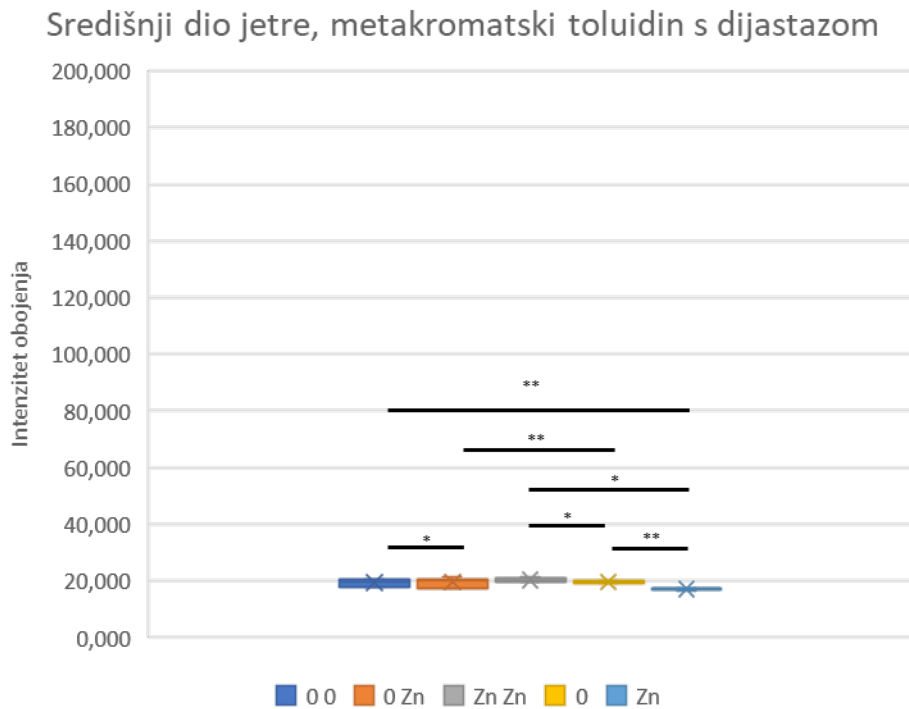
Dobivena je očekivana je značajna razlika u obojenju toluidinom s dijastazom u odnosu na toluidin bez dijastaze jer je dijastaza u jetri je značajno smanjila količine glikogena i dalje uz značajne varijacije u intenzitetu obojenja između grupa, gdje je ona s cinkom najslabije obojena. Probavljanje dijastazom je znatno smanjilo intenzitete obojenja u jetri i spustilo ih s 80-100 (Slika 79. i 80.) na raspon između 15 i 30, što ukazuje na učinkovito probavljanje glikogena dijastazom. Unatoč uspješnom probavljanju glikogena, razlike između grupa su i dalje statistički uočljive.



Slika 81. Fotografije uzoraka bojenih toluidinom s dijastazom pri povećanju 200x. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

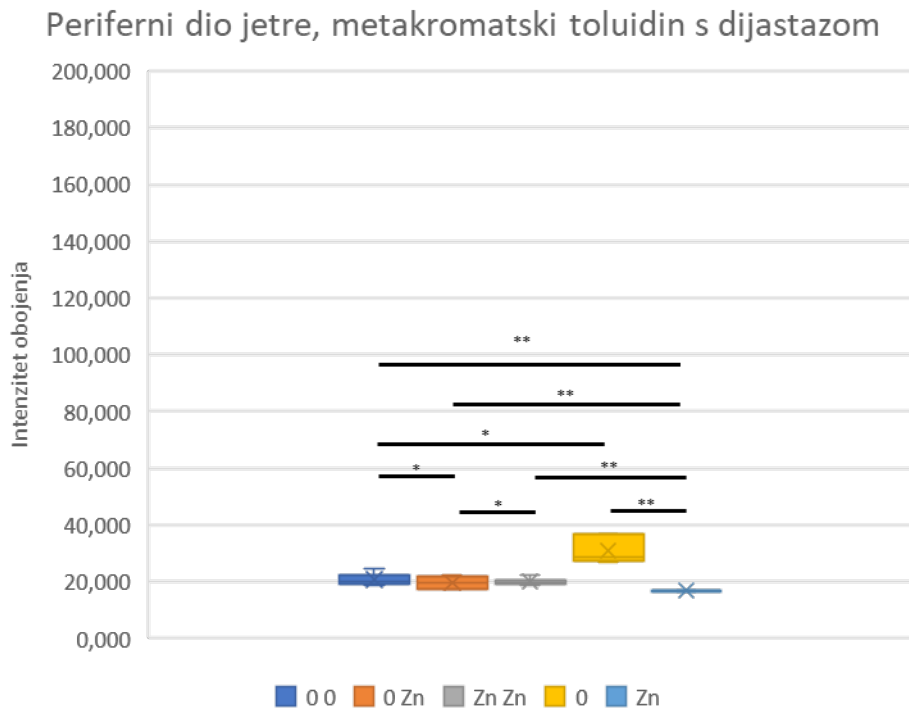
Grupa Zn u središnjem dijelu jetre intenzitetom prati trend u dijastaza neprobavljenim uzorcima iz bojenja toluidinom bez dijastaze uz značajno manji intenzitet obojenja u odnosu na 0 grupu ( $p < 0,005$ ), Zn/Zn grupu ( $p < 0,05$ ) i 0/0 grupu ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/0 je tamnije obojena u odnosu na 0/Zn grupu ( $p < 0,05$ ) i u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,05$ ). Grupa Zn/Zn je tamnije obojena u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,05$ ).



Slika 82. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre toluidinom s dijastazom u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Periferno u jetri, grupa 0 je značajno tamnije obojena u odnosu na grupu Zn ( $p < 0,005$ ), te grupu 0/0 ( $p < 0,05$ ). Cinkov negativno utječe kod fiksaciji uranjanjem te dolazi do značajno svjetlijeg obojenja u Zn grupa u odnosu na sve ostale grupe ( $p < 0,005$ ). Grupa 0/Zn je značajno tamnija od grupe Zn/Zn ( $p < 0,05$ ).



Slika 83. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre toluidinom s dijastazomu u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

### 5.19. Perls-DAB, jetra

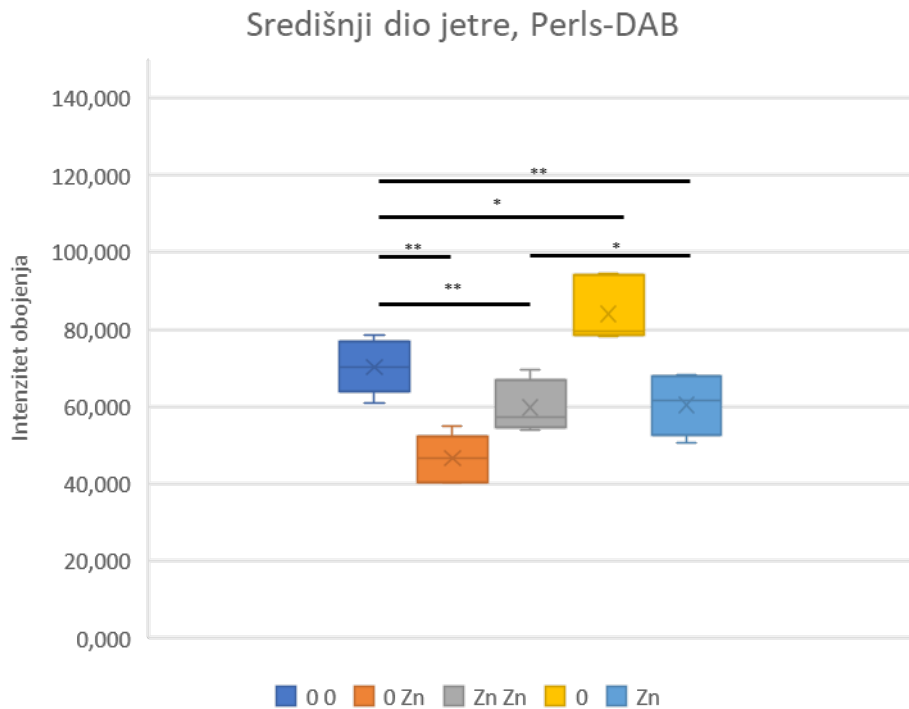
Perls-DAB je boja koja veže željezo. Najobojenija grupa Perls-DAB-om u jetri je grupa 0, a najlošije obojena grupe je grupa 0/Zn.



Slika 84. Fotografije uzoraka bojenih Perls-DAB bojenjem pri povećanju 200x. U svakom drugom redu su fotografije pripadajuće negativne kontrole za pojedinu regiju. Skala u donjem desnom kutu slike predstavlja duljinu od 200  $\mu\text{m}$ . 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Fotografirao autor.

## 5. REZULTATI

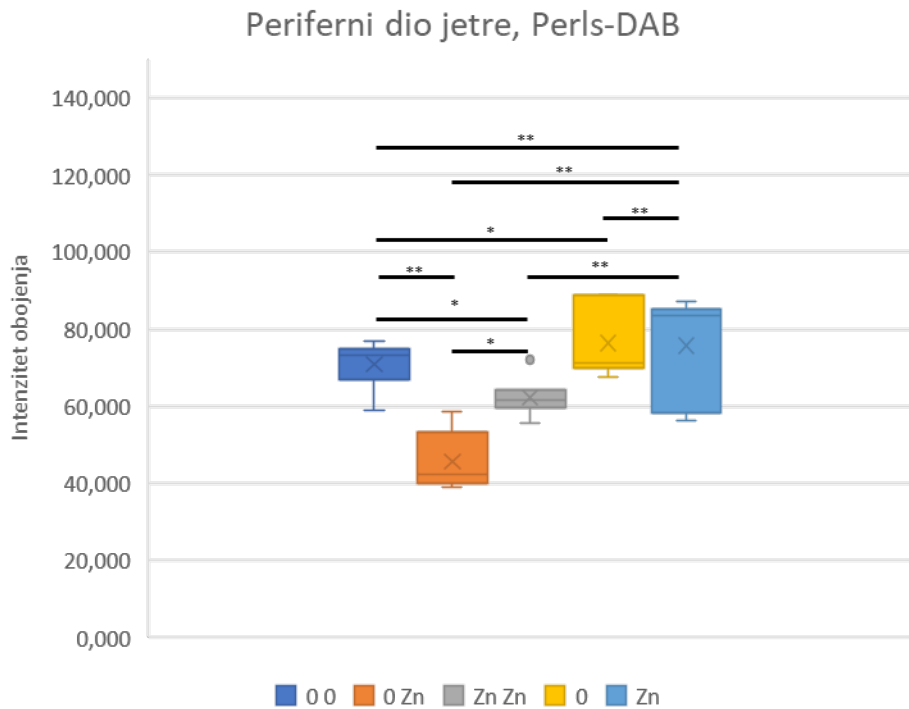
U središnjem dijelu jetre, intenzitet obojenja u grupi 0 je značajno veći u odnosu na grupu 0/0 ( $p < 0,05$ ). Također, Zn grupa je značajno tamnija od Zn/Zn grupe ( $p < 0,05$ ) u središnjem dijelu jetre. Utjecaj cinka na intenzitet obojenja je djelomično suprotan od očekivanog u središnjem dijelu jetre. Grupa 0/0 centralno je tamnija u odnosu na grupu 0/Zn ( $p < 0,005$ ) i grupu Zn/Zn ( $p < 0,005$ ).



Slika 85. Razlika u obojenosti središnjeg dijela jetre Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).

## 5. REZULTATI

Grupa Zn u perifernom dijelu jetre je najintenzivnije obojena u odnosu na sve ostale grupe ( $p < 0,005$ ). Ovaj trend obojenja Zn grupe prati očekivanja utjecaja cinka na obojenje željeza u tkivu jetre. Grupa 0/0 je tamnije obojena u odnosu na grupu 0 ( $p < 0,05$ ) što je u suštini obrnuto od intenziteta u središnjem dijelu jetre. Grupa 0/0 je tamnija u odnosu na grupu 0/Zn ( $p < 0,005$ ) i grupu Zn/Zn ( $p < 0,05$ ).



Slika 86. Razlika u obojenosti perifernog dijela jetre Perls-DAB-om u 5 skupina životinja: 0/0 - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA, 0/Zn - grupa štakora perfundirana ESS i fiksirana PFA/Zn, Zn/Zn - grupa štakora perfundirana ESS/Zn i fiksirana PFA/Zn, 0 - grupa štakora fiksirana PFA bez perfuzije, Zn - grupa štakora fiksirana PFA/Zn bez perfuzije. Mann-Whitney U test. (\* statistička značajnost  $p < 0,05$ ; \*\* statistička značajnost  $p < 0,005$ ; \*\*\* statistička značajnost  $p < 0,001$ ).



### 6. RASPRAVA

Fiksacija cinkom i priprema tkiva za bojenje postupkom krioprotekcije, zahtijevaju posebne prilagodbe inače standardnih histološki protokola zbog obrade i pripreme rezova fiksacijom i krioprotekcijom za rezanje na kriostatu. Naši uzorci se znatno razlikuju od većine uzoraka koji se obrađuju u standardnim histološkim postupcima, prvenstveno time što nisu uklopljeni u parafin. Kao uzorak je korišten mozak, koji se vrlo rijetko fiksira s cinkovima solima jer je relativno rijedak uzorak tkiva u rutinskim postupcima, a prethodna vrlo rijetka istraživanja su ukazala na dobit s dodatkom cinka u fiksativ (18, 31). Također, na kriostatu su izrezani rezovi debljine 35  $\mu\text{m}$ , što je zamjetno deblje od uobičajene debljine od oko 10  $\mu\text{m}$ . Očuvanje rezova je potrebno u svakodnevnom istraživanju kao i bolja dostupnost epitopa koji nas zanima, a također želimo i izbjeći živu u svakodnevnom radu s rezovima. Sama cjelovitost rezova je kvalitetnija kada se koristi fiksativ s cinkom, a uvjerljivo je najlošija u grupi 0/0, u kojoj cinka nema ni u perfuziji ni u fiksativu, do te razine da smo u pripremi rezova morali odbaciti neke rezove. Općenito, grupe koje u perfuziji ne sadrže cink (0, 0/0) primjetno su lošije kvalitete u uspoređi s grupama koje sadrže cink (0/Zn, Zn/Zn, Zn). Najbolje vezivanje boje eozina je izmjereno u većini regija u 0/Zn grupi i znatno lošije u Zn/Zn grupama i u fiksiranju samo uranjanjem. Eozin se obično veže na pozitivno nabijene skupine u tkivu poput pozitivno nabijenih aminokiselina. Dodatak cinka u prvom ispiranju krvi iz tkiva vjerojatno uzrokuje njegovo vezanje na pozitivno nabijene aminokiseline i onemogućuje dovoljno jako vezivanje eozina. Time se postavlja pitanje je li povoljnije za prikaz struktura jače obojenje eozinom ili slabije. Ovisi koje strukture unutar stanica se vide jasnije, što ovim istraživanjem nismo pokrili jer nas je prvenstveno zanimalo vezivanje i otpuštanje boje. U perifernom dijelu tkiva jetre Zn grupe obojenje eozinom je najintenzivnije. Između ostalih grupa nema značajnije razlike. Uzevši u obzir različitu strukturu tkiva jetre i mozga i prisustva velike količine enzima i citokroma u jetri, moguće je da se cink vezao na njih jer brojni enzimi sadrže cink kao kofaktor, a vezivanje kofaktora uzrokuje strukturnu promjenu i dostupnost aminokiselina eozinu. Zašto Zn/Zn grupa nije intenzivnije obojana ostaje nepoznanica i potrebno je provesti dodatna istraživanja unutarstaničnih struktura. Hemalaun je pratio dosadašnja istraživanja i pretpostavke o pojačanju reakcije hemateina s cinkovim solima i posljedično jačim intenzitetom obojenja. Grupa Zn je najjače obojena, no to ne objašnjava zašto grupa Zn/Zn nije još intenzivnije obojena jer su tkiva perfundirana cinkom i dodatno uronjena u fiksativ kojemu je dodan cink. Objašnjenje bi moglo ležati u činjenici da fiksativ prilikom uranjanja prodire oko 1-2 mm po satu (1,8) te stanice koje su udaljenije od

## 6. RASPRAVA

površine s koje prodire fiksativ ulaze u apoptozu, što uzrokuje razmotavanje većine proteina koji okružuju jezgru i čine je dostupnijom. Učiniti obojenje intenzivnijim je moguće predtretmanom rezova s otopinom cinkovih soli neovisno o prethodnom načinu fiksacije, kao što se primjerice fiksacija hematoksilina radi predtretmanom s željezovim solima u postupku bojenja hematoksilinom po Weigertu (33). Stanice jetre su se ponašale sukladno s pretpostavkama i Zn/Zn grupa je najintenzivnije obojena periferno u jetri i središnje u jetri, te se ovaj nalaz poklapa s prethodnim istraživanjima.

Nissl je jedno od najvažnijih histoloških bojenja u neuroznanosti jer otkriva slojevitost mozga, prvenstveno bojeći endoplazmatski retikulum. Endoplazmatski retikulum se do sredine 20-og stoljeća nazivao Nisslova tvar prema istraživaču koji ga je tim postupkom bojenja otkrio. Bojenje je u praksi vrlo često problematično za izvesti jer je teško pogoditi točan omjer inkubiranja u radnoj otopini boje i duljinu ispiranja u alkoholnom nizu. Loš izračun navedenog omjera dovodi do prevelike odbojanosti tijela neurona ili prekomjernog zaostajanja boje u međustaničnoj tvari. Cink je uzrokovao slabije vezivanje boje u tijelima neurona u svim kombinacijama grupa, vrlo vjerojatno iz istih razloga kao i kod eozina, no značajno je jače vezivanje boje na tkiva koja su samo uronjena u fiksativ. Krezil violet je bazična boja koja ima afinitet na kisele tvari unutar stanice. Cink bi svojim pozitivnim nabojem mogao zamaskirati i tako onemogućiti dovoljno intenzivnu reakciju boje s kiselim tvarima unutar stanice. Ova pojava slabijeg vezivanja boje bi se mogla izbjeći predtretmanom u kiseljoj otopini koja bi uklonila višak cinkovih iona i olakšala pristup boje tkivu. Vezivanje krezil violeta u jetri je značajno jače u grupama koje su uronjene u fiksativ. Nije očekivana značajnija razlika u tkivu jetre zbog svoje relativne homogenosti. U jetri se pretežito boje RNA molekule.

Bojenje uljno crvenom je redovito u standardnim postupcima rezerviran za bojenje svježih smrznutih preparata za određivanje steatoze, no vrlo rijetko se koristi jer se isto može dobiti određivanjem površina praznih kružnih prostora unutar hepatocita koji su obojeni hemalun/eozinom. U mozgu je mijelin, mastima vrlo bogat okoliš, primarna meta uljno crvene. U krioprotektiranim rezovima može se uljno crvena koristiti umjesto boje *luxol fast blue* ili osmijevog tetroksida za određivanje debljine aksona i debljine mijelinskog omotača. Fiksiranje perfuzijom gdje ESS i fiksativ sadržavaju cinkove soli, kao i uranjanje u fiksativ, daju znatno slabije obojenje mijelina i pozadinsko obojenje u odnosu na bojanje nakon fiksacije perfuzijom. Također, boja se ne bi trebala ispirati u alkoholima zbog oštećivanja mijelina. U svim regijama Zn/Zn grupe uljno crvena je dovoljno intenzivno obojala mijelin s

## 6. RASPRAVA

gotovo neznatnom pozadinom. Nedostatak korištenja uljno crvene boje na ovim rezovima je debljina reza od 35  $\mu\text{m}$ . Strukture bi se jasnije vidjele u slučaju tanjih rezova, primjerice debljine 10 ili 12  $\mu\text{m}$  (29). Životinje korištene u ovom istraživanju su bile zdrave i netretirane lijekovima ili drugim mehaničkim postupcima koji bi mogli dovesti do steatoze jetre (34). Bojenje uljno crvenom možemo promatrati i u smislu koliko različita fiksacija utječe na pozadinsko obojenje preparata, što je važno u programskom određivanju broja i prosječne veličine kapljice. Što je manje pozadinsko obojenje fiksacija je bolja za istraživanje uljnih kapljica i omogućuje veliki broj istovremenih analiza. Fiksacija uranjanjem stvara najveće pozadinsko obojenje u tkivu, grupa Zn u središnjem dijelu jetre, a grupa 0 u perifernom dijelu jetre. Perfuzijsko fiksiranje zaustavlja aktivnost većine enzima koji bi mogli pregraditi hepatocyte od kojih je najvažnija jetrena lipaza koja cijepa trigliceride i posljedično može nataložiti slobodne masne kiseline u tkivu koje se postupno fiksira uranjanjem (35, 36).

Metakromatski toluidin je zanimljiva zamjena standardnom PAS bojanju zbog svojih oštrih i jasnih kontrasta između tirkizno plave pozadine i ljubičasto obojenih šećera koje je perjodna kiselina oksidirala. Najvažniji šećer koji se boja ovim postupkom je glikogen. Mozak nema značajnije količine glikogena i ovo bojenje je informativno za tkivo jetre. Najintenzivnije obojenje u mozgu se vidi u grupama 0/0 i 0 koje nemaju cinka. Uzevši u obzir da je priprema ovom bojanju kemijska reakcija oksidacije perjodnom kiselinom i potom inkubacija u metabisulfidu koji tvori mostove između aldolnih grupa pripremajući šećer za vezivanje toluidina (29) moguće je da cinkove soli ometaju obojenje u mozgu u jednom od ova dva kemijska koraka. Uklanjanje svog glikogena u mozgu koji se metabolički zatekao u trenutku žrtvovanja, otkrilo je ovim postupkom bojenja isključivo u bijeloj tvari malog mozga i *cinguluma* strukture nalik krvnim žilama. Pretpostavka za ove strukture je da su to glikolipidi osjetljivi na organska otapala jer postupkom odmašćivanja nakon dijastaze te strukture nalik krvnim žilama su nestale. Istovremeno su se pojavile unutar bijele tvari malog mozga i *cinguluma* metakromatska obojenja. Ono što je moglo preostati u mijelinu su netopivi glikoproteini i/ili glikolipidi te proteoglikani koji su i dalje podložni djelovanju perjodne kiseline na njihove šećerne ogranke. Intenziteti obojenja u jetri su dijelom slični onima u mozgu. Grupa 0 je najintenzivnije obojena, a grupa Zn najslabije. Dijastaza u jetri je značajno smanjila količine glikogena i dalje uz značajne varijacije u intenzitetu obojenja između grupa gdje je ona s cinkom najslabije obojena. Kao i u mozgu, cink bi mogao ometati vezivanje boje u jednom od dva kemijska postupka predtretiranja.

## 6. RASPRAVA

Količine su željeza u mozgu vrlo važne za finu regulaciju metabolizma mijelina. Suvišak ili nedostatak vode u krajnosti se može manifestirati kao poremećaj središnjeg živčanog sustava. Reakcija se odvija na slobodnom nevezanom željezu. Učinci dodatnih iona cinka na ovo bojenje nisu do sada opisani. Perfuzija bez cinkovih soli vodi do najslabijeg obojenja tkiva mozga. Sve ostale metode fiksacije daju značajno tamnije obojenje od 0/0 grupe. Moguće objašnjenje ovakvog nalaza leži u međureakciji cinkovih soli s kalij fericijanidom nakon čega se taj kompleks ponaša kao pseudoperoksidaza i taloži DAB. Scott. A. Sands je savjetovao da se prilikom vizualizacije izbjegne korištenje niklovi soli iz DAB kita kako ne bi došlo do pozadinskog obojenja i lažno pozitivnih obojenja (30). U jetri, istom histološkom metodom, najintenzivnije obojenje vidi se u središnjem dijelu režnjića kod grupe 0/0 i 0, dok se periferni dio režnjića bolje boja u Zn grupi. Ovo je suprotno od rezultata dobivenih u pripadajućim grupama mozgu. Moguće je tako zbog brojnih enzima u jetri koji mogu vezivati na sebe metale, no potrebno je provesti dodatna istraživanje kako bi se utvrdilo stvarno stanje. Zaključak je da se za histološka bojenja kojima se prikazuju metale u jetri i mozgu ne treba koristiti cinkove soli u fiksaciji.

Imunohistologija je važan alat u istraživanjima koji je u mnogo slučajeva nezamjenjiv kada histološke metode ne mogu obojiti vrlo specifične proteine ili glikolipide unutar stanice. Pravilno fiksiranje omogućuje ispravnu reaktivnost protutijela i smanjuje njegovu potrošnju čime se povećava opseg reakcija koje se mogu izvesti. Postoji više istraživanja, znatno više nego istraživanja na histološkim bojenjima, raznih načina poboljšanja izražaja raznih epitopa u imunohistologiji, u kojima se eksperimentalno koristi paraformaldehid s cinkovim solima kao jedan od fiksativa. Gotovo sva istraživanja su potvrdila pozitivan učinak fiksacije s cinkom na strukturu tkiva i izražaj epitopa iako su uglavnom korišteni parafinski blokovi (20, 37, 38, 39). NeuN je najintenzivnije obojen u Zn/ Zn grupama u većini ispitivanih regija mozga. Nedostatak značajnosti u *cingulumu* je očekivan jer je taj dio mozga uglavnom građen od vlakana s vrlo malo stanica. Cinkovi ioni su epitop NeuN, koji se većinom nalazi unutar jezgre i djelom u citoplazmi, učinili dostupnijim protutijelu u odnosu na ostale grupe. Ako usporedimo pozadinsko obojenje, ono je manje u odnosu na ostale grupe. Najlošije se pokazalo samo uranjanje u fiksativ, stanice su svjetlije od ostalih i potrebno je postaviti količinu protutijela kako bi se nadoknadio pad u intenzitetu obojenja.

Intenziteti obojenja MAP2 su različiti u različitim regijama mozga. Nazubljena vijuga i kora velikog mozga imaju suprotan intenzitet obojenja. Za veliki mozak fiksacija uranjanjem daje slabiji intenzitet obojenja u odnosu na nazubljenu vijugu u kojoj se dodatno jasno vide

## 6. RASPRAVA

neuroni hilusa i mahovinastog sloja. Grupa Zn se pokazala najboljom za vizualizaciju većina MAP2 proteina unutar aksona. Epitopi za proizvodnju protutijela se uglavnom pročišćavaju, a MAP2 je protein koji je posrednik između mikrotubula i intermedijarnih filamenata te ova interakcija pokriva većinu strukture. Postoji mogućnost da veća dostupnost epitopa u Zn grupi postignuta uslijed raspadanje kvarterne strukture između mikrotubula i intermedijarnih filamenata. Slično se može vidjeti u grupi 0, gdje se također vide neuroni hilusa i mahovinastog sloja nazubljene vijuge. Moguće je da polagana fiksacija uzrokuje raspadanje kvarterne strukture, a cinkovi ioni to dodatno pojačavaju omogućujući jasniju reakciju. Reakcija je intenzivnija i u ostalim regijama mozga u 0 i Zn grupama kako kvantitativno tako i kvalitativno te se mogu pojedini aksonski ogranci jasnije raspoznati. Cink je svakako dobro koristiti za proteine koji su integralni dio kvarternih struktura jer će postati dostupniji protutijelu, no ne preporuča se za istraživanje fine građe citoskeleta jer može razjediniti proteine.

Kolera toksin nije reagirao kako je predviđeno s obzirom na smještaj njegova epitopa, no obojenje je svejedno prisutno i razlikuje se između grupa. Grupa Zn/Zn je najintenzivnije obojena u odnosu na sve ostale grupe u svim ispitivanim regijama mozga. Samo fiksiranje uranjanjem čini epitop manje dostupnim i sukladno tome reakcija je slabija. GM1 gangliozid, koji je epitop na kojeg se kolera toksin veže, ima sposobnost keliranja dvovalentnih metalnih iona između sebe zbog sadržaja sijalinske kiseline. Cink je dvovalentni ion koji je dovoljno mali da reagira s GM1 i tako učini epitop dostupnijim za kolera toksin. Prethodna istraživanja su pokazala da je  $\text{Ni}^{2+}$  ion neophodan za pravilno vezivanje i aktivnost kolera toksina (40). Postavlja se pitanje imaju li cinkovi ioni utjecaja na aktivnost kolere *in vitro*, jer su istraživanja pokazala da dodatak cinkovih iona ometa aktivnost kolera toksina kod djece (41) ili je ta inhibitorna aktivnost ograničena na *in vivo* uvjete.

Za razliku od kolera toksina, protutijelo na drugi gangliozid -GT1b, nije reagiralo dovoljnim intenzitetom i uglavnom je na kvantifikaciji svjetlije od negativne kontrole. Samo je u kori velikog mozga vidljiva reakcija, ali ona nije dovoljno specifična. Najintenzivnije obojenje je vidljivo u 0/Zn grupi, a najslabije je dobiveno fiksacijom samo uranjanjem. Ovu reakciju bi trebalo ponoviti s drugim alikvotom protutijela ili uzeti protutijelo na sličan epitop poput GD1, a koji je također unutar mijelina u aksonu.

Astroцитi i mikroglia su najvažniji pomoćni dio središnjeg živčanog sustava jer održavaju tkivo van neurona fagocitirajući apoptotične neurone i reciklirajući ione koje neuroni

## 6. RASPRAVA

ispuštaju normalnom sinaptičkom aktivnosti. Najintenzivnije su obojeni u grupi 0/0 u kojoj nema cinkovih iona. Ovakvo obojenje je ponešto suprotno od onoga u MAP2 jer GFAP je intermedijarni filament i razmatanje njegove strukture može omesti vezivanje protutijela. Pozadinsko obojenje je najveće u Zn grupi i najviše smeta računalnoj analizi građe astrocita. Strukturna je jasnoća astrocita vrlo važna jer se iz površine ogranaka astrocita može vidjeti postoje li upalni procesi u mozgu (42).

IBA1 epitop je također znatno bolje očuvan fiksacijom bez cinka, a prisustvo cinka u ESS i fiksativu značajno ometa vezivanje protutijela. IBA1 je citoplazmatski protein koji veže kalcij. Cinkovi ioni bi mogli imati dvostruki utjecaj na IBA1 razmatajući ga i vežući se na njega, čime bi značajno poremetili prostorni izgleda i raspored naboja i tako otežali vezivanje protutijela.

Dodatak cinka u fiksativ za imunohistokemije je dobar izbor ako želimo proučavati proteine i strukture koji ulaze u interakcije s drugim proteinima, a dostupna protutijela su uzgojena na dobro odabrani epitop. Ovim postupkom povećavamo dostupnost željenog epitopa.

### 7. ZAKLJUČCI

Temeljem provedenog istraživanja i dobivenih rezultata mogu se izvesti slijedeći zaključci:

- Korištenjem cinkovih soli prilikom perfuzije uzoraka puferom, a neposredno prije perfuzijske fiksacije dobivaju se uzorci primjetno očuvanije cjelovitosti tkivnih struktura.
- Cinkove soli u fiksativu ne pridonose boljoj očuvanosti tkiva, ali utječu na bolje vezivanje histoloških boja
- Imunohistokemijska bojenja su uspješnija u uzorcima koji su fiksirani fiksativom s cinkovima solima, jer cinkove soli omogućavaju veću dostupnost epitopa protutijelu za epitope koji ulaze u interakciju s drugim proteinima.

### 8. SAŽETAK

**Uvod:** Dodavanje cinkovih (Zn) soli u fiksativ je uobičajeno kod fiksacije nekih posebnih tkiva (npr. bubreg), ali nije poznato kako bi utjecalo na druga tkiva, primjerice mozak i jetru.

**Cilj istraživanja:** Kvantitativno i kvalitativno usporediti kvalitetu histološkog bojenja (jezgre, glikogena, lipida i željeza) uzoraka tkiva jetre i mozga, odnosno imunohistokemijskog bojenja mozga nakon perfuzijske ili imerzijske fiksacije s paraformaldehidom (PFA) ili PFA/Zn otopinom

**Nacrt studije:** Studija je ustrojena kao istraživanje parova (tkivo životinja perfundiranih PFA fiksativom prema tkivu životinja perfundiranih s PFA/Zn fiksativom, zatim tkiva koja su bila fiksirana samo uranjanjem u fiksativ (imerzijski) prema tkivima koja su prvo perfundirana fiksativom, a zatim postfiksirana uranjanjem.

**Materijal i metode:** U istraživanje je uključena tkiva jetre i mozga 15 štakora koji su podijeljeni u 5 grupa fiksiranih uranjanjem ili perfuzijom s/bez cinkovih soli. Primijenjena su histološka bojenja: hemalaun/eozin, Nissl, uljno crvena, toluidin, toluidin s dijastazom, toluidin s dijastazom i dodatnim odmašćivanjem, Perls-DAB. Imunohistokemijski su na tkivu mozga prikazani epitopi: NeuN, MAP2, IBA1, GT1b, GFAP i kolera toksin. Rezultati su analizirani računalnim programom Fiji te su statistički obrađeni.

**Rezultati:** Perfuzija s dodatkom cinkovih soli doprinosi statistički značajno kvalitetnijoj cjelovitosti uzoraka. Statistički je značajno povezana fiksacija s dodatkom cinkovih soli i jače obojenje uzoraka standardnim histološkim bojenjima ukoliko cinkove soli ne utječu na kemijsku reakciju koja je podloga za određeno bojenje.

**Zaključak:** U usporedbi sa rutinskom PFA fiksacijom, fiksacija uz dodatak cinkovih soli poboljšava kvalitetu osnovnih histoloških i imunohistokemijskih bojenja.

**Ključne riječi:** cinkove soli, PFA/Zn, histološka bojenja, imunohistokemijska bojenja, mozak, jetra.



### 9. SUMMARY

#### **Fixation effects of liver and brain on standard histological and immunohistochemical staining**

**Introduction:** Adding Zinc-salts in fixatives is common with fixating special tissues, such as kidney. However, its effect on other tissues, for example, liver and brain, is still unknown.

**Objectives:** Qualitative and quantitative comparison of the quality of histological staining (nuclei, glycogen, lipids, iron) on liver and brain samples. Comparison of immunohistochemical staining of the brain, after perfusion fixation or immersion fixation with paraformaldehyde (PFA) and/or PFA/Zn solution, is also included.

**Study design:** This is a case-control study (tissues perfused with PFA fixative versus tissues perfused with PFA/Zn fixative, tissues fixated by immersion fixation versus tissues which are perfusion fixated and afterwards immersion fixated).

**Material and Methods:** This study included the liver and brain tissues from 15 rats sorted into 5 groups which are immersion/perfusion fixated with/without zinc-salts. Histological staining used in this study is the following: Hemalaun/eosin, Nissl, oil red, toluidine, toluidine with diastase, toluidine with diastase and additional de-fattening, Perls-DAB. Brain epitopes demonstrated by immunohistochemical processing are the following: NeuN, MAP2, IBA1, GT1b, GFAP and cholera toxin. The results were analysed in computer program Fiji, and then statistically processed.

**Results:** Perfusion with added zinc-salts contributes to increased quality of tissue integrity. There is a statistically significant link between fixation with added zinc-salts and more intensely histologically stained samples, if zinc-salts don't interfere with the chemical reaction as basis for a certain staining.

**Conclusion:** In comparison with routine PFA fixation, fixation with added zinc-salts improves the quality of standard histological and immunohistochemical staining.

**Key words:** zinc-salts, PFA/Zn, histological staining, immunohistochemical staining, brain, liver.

### 10. LITERATURA

1. Ganjali H, Ganjali M. Fixation in tissue processing. *IJFAS*. 2013;2:686-689.
2. Bancroft J, Layton C, Suvarna SK. *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*, 7. izd. Elsevier Health Sciences, 2012.
3. Williams JH, Mepharm BL, Wright DH. Tissue preparation for immunocytochemistry. *J Clin Pathol*. 1997;50:422-428.
4. Eltoum I, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Introduction to the theory and practice of fixation of tissues. *J Histotechnol* 2001;24:173 -190.
5. Eltoum I, Fredenburgh J, Grizzle WE. Advanced concepts in fixation: 1. Effects of fixation on immunohistochemistry, reversibility of fixation and recovery of proteins, nucleic acids, and other molecules from fixed and processed tissues. 2. Developmental methods of fixation. *J Histotechnol*. 2001;24:201-210.
6. Howat WJ, Wilson BA. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods*. 2014;70(1):12-19.
7. Thavarajah R, Mudimbaimannar VK, Elizabeth J, Rao UK. Chemical nad physical basics of routine formaldehyde fixation. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012;16(3):400-405.
8. Fox CH, Johnson FB, Whiting J., Roller PP. *J Histochem Cytochem*. 1985;33:845–853.
9. Mason JT, O’Leary TJ. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: A calorimetric and Infrared spectroscopic investigation. *J Histochem Cytochem*. 1991;39:225–229.
10. Grizzle WE, Fredenburgh JL, Myers RB. Fixation of tissues. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Elsevier Limited; 2008;6:56–63.
11. Somapuram SR, Vani K, Messana E, Bogen SA. A molecular mechanism of formalin fixation and antigen retrieval. *Am J Clin Pathol*. 2004;121:190–9.
12. Winsor L. Tissue processing. *Laboratory histopathology*. 1994;4(2):1-39.
13. Wester K, Asplund A, Bäckvall H, Micke P, Derveniece A, Hartmane I, Malmström P-U, Pontén F. Zinc-Based Fixative Improves Preservation of Genomic DNA and Protein s in Histoprocessing of Human Tissues. *Laboratory Investigation*. 2003;83:889-899.
14. Carson FL. *Histotechnology*. 4. izd. Chicago: ASCP Press, 2007.
15. Baker JH. J. Fixation in citochemistry and electron microscopy. *Histochem. Cytochem.: Official J. Histochem. Soc*. 1958;5:303–308.
16. Leong AS-Y. Fixation and fixatives. *Laboratory histopathology*. 1994;4(1):1-26.
17. Abbondanzo SL, Allred DC, Lampkin S, Banks PM. Enhancement of immunoreactivity among lymphoid malignant neoplasms in paraffin-embedded tissues by refixation in zinc sulfate-formalin. *Atch Pathol Lab Med*. 1991;115:31-33.

## 10. LITERATURA

18. L'Hoste RJ, Tourres MA. Using Zinc Formalin as a Routine Fixative in the Histology Laboratory. *Lab Med.* 1995;26(3):210-214.
19. Dapson RW. Fixation for the 1990's: a review of needs and accomplishments. *Biotechnic and Histochem.* 1993;68:75-82.
20. Beckstead JH. A Simple Techinque for Preservation of Fixation-sensitive Antigens in Paraffin-embedded Tissues. *JHC.* 1994;42(8):1127-1134.
21. Junqueira LC, Carneiro J: Osnove histologije, udžbenik i atlas prema 10. američkom izdanju. Školska knjiga, Zagreb, 2005.
22. Snell RS. *Clinical and functional histology for medical students*, Little, Brown and Company, 1984.
23. Bruni JE, Montemurro D. *Human Neuroanatomy: A Text, Brain Atlas and Laboratory Dissection Guide*. Oxford University Press, 2009.
24. [Bubb EJ](#), [Metzler-Baddeley C](#), [Aggleton JP](#). The *cingulum* bundle: Anatomy, function, and dysfunction. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018;92:104-127.
25. Moser M-B, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus. 1998;8:608-619.
26. Blumenfield H. *Neuroanatomy through clinical cases*, Oxford University Press, 2.ed., 2010.
27. Amaral D, Lavenex P. *The hippocampus book*. 1. izd, New York: Oxford University Press, 2007.
28. Idol RA, Wozniak DF, Fujivara H, Yuede CM, Ory DS, Kornfeld S, Vogel P. Neurologic Abnormalities in Mouse Models of the Lysosomal Storage Disorders Mucopolidosis II and Mucopolidosis III  $\gamma$ . *PLoS One.* 2014;9(10).
29. Vacca LL. *Laboratory manual of histochemistry*. Raven Press, New York, 6. izd, 1985.
30. Sands SA, Leung-Toung R, Wang Y, Connelly J, LeVine SM. Enhanced Histochemical Detection of Iron in Paraffin Sections of Mouse Central Nervous System Tissue: Application in the APP/PSI Mouse Model of Alzheimer's Disease. *ASN.* 2016;1-14.
31. Herman GE, Chlipala E, Bochenski G, Sabin L, Elfont E. Zinc Formaline Fixative For Automated Tissue Processing. *JHC.* 1988;11:85-89.
32. Abou el-Maqd AM, el-Askalany AM. Stability constants of Zn II), PB(II), CD(II), and Cu(II) complexes with hematoxylin. *CBP.* 1995;43(10):1791-1792.
33. Weigert K, Wisen Z. *Mikr.* 1904;21:1-5.
34. Benedict M, Zhang X. Non-alchocolic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017;9(16):715-732.
35. Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology.* 1998;9(3):211-219.
36. Jansen H, Verhoeven AJ, Sijbrands EJ. Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein?". *Journal of Lipid Research.* 2002;43(9):1352-62.

## 10. LITERATURA

37. Hicks DJ, Johnson L, Mitchell SM, Gough J, Cooley WA, La Ragione RM, Spencer YI, Wangoo A. Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotechnic & Histochemistry*. 2006;81:23-30.
38. Paavilainen L, Edvinsson A, Asplund, i sur. The Impact of Tissue Fixatives on Morphology and Antibody-based Protein Profilin in Tissues and Cells. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2010;58(3):237-246.
39. Mori H, Soonsawad P, Schuetter L, Chen Q, Hubbard NE, Cardiff RD, Borowsky AD. Introduction of zinc-salt fixation for effective detection of immune cell related markers by immunohistochemistry. *Toxicol Pathol*. 2015;43(6):883-889.
40. Dertzbaugh MT, Cox LM. The affinity of cholera toxin for Ni<sup>2+</sup> ion. *Protein Eng*. 1998;11(7):577-81.
41. Canani RB, Cirillo P, Buccigrossi V, Routolo S, De Luca P, Porcaro F, De Marco G, Guarino A. Zinc inhibits cholera toxin-induced, but not Escherichia coli heat-stable enterotoxin-induced, ion secretion in human enterocytes. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005;191(7):1072-7.
42. Becerra-Calixto A, Cardona-Gómez GP. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:88.

### 11. ŽIVOTOPIS

**Ime i prezime:** Sven Viland

**Datum rođenja:** 23. 6. 1996.

**Mjesto rođenja:** Osijek

**Adresa stanovanja:** Krstova 5a, Osijek

**Kontakt:** 098 928 3118

**Završeno obrazovanje:**

2003. - 2011. Osnovna škola August Šenoa, Osijek

2011. - 2015. Prirodoslovno-matematička gimnazija, Osijek

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