

Imunohistokemijska karakterizacija protutijela za membranske proteine Na⁺/K⁺ATPazu, neurolin i prijenosnik organskih kationa 1 u cjelovitim uzorcima zebrice (*Danio rerio*)

Lončarić, Nora

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:327562>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Nora Lončarić

**Imunohistokemijska karakterizacija protutijela za membranske
proteine Na⁺/K⁺-ATPazu, neurolin i prijenosnik organskih kationa 1
u cjelovitim uzorcima zebrice (*Danio rerio*)**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Jedinici za molekularnu toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu pod mentorstvom dr.sc. Deana Karaice te komentorstvom prof. dr. sc. Gorana Klobučara. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar ekologije i zaštite prirode.

Prvenstveno se moram zahvaliti mentoru dr.sc. Deanu Karaici koji me vodio kroz čitav proces jer sam se prvi puta susrela sa ovakvom temom i trebalo mi je vremena da shvatim kako pristupiti temi i interpretirati rezultate. Hvala vam na strpljivosti, posvećenom vremenu, pruženom znanju i velikoj podršci, bez toga ništa ne bi bilo započeto.

Nadalje, neizmjereno se zahvaljujem članovima Jedinice za molekulsku toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada i članovima Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju Instituta Ruđer Bošković zbog pruženog radnog prostora, pomoći i izrazito ugodne radne atmosfere zbog koje mi je bilo žao kada sam završila sa radom.

Veliko hvala i komentoru prof. dr.sc. Goranu Klobučaru zbog upućivanja prema institutu i pomoći oko pisanja i sastavljanja diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svim kolegama koji su mi mnogo puta pomogli tijekom mojeg studiranja bilo kao podrška ili kao pomoć pri objašnjavanju gradiva.

Mojoj obitelji također ogromno hvala, posebno roditeljima koji su bili uz mene financijski, ali i gurali me naprijed kada mi je bilo izrazito teško studirati zbog mojih zdravstvenih problema.

Moju mamu moram posebno izdvojiti jer se odricala svojih planova kako bi mi bila podrška i ohrabivala me na svakom koraku. Bez nje ne bi bila na ovom svijetu, a niti ovakva kakva jesam.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Imunohistokemijska karakterizacija protutijela za membranske proteine Na⁺/K⁺-ATPazu, neurolin i prijenosnik organskih kationa 1 u cjelovitim uzorcima zebrice (*Danio rerio*)

Nora Lončarić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U posljednjih nekoliko desetljeća uporaba zebrice (*Danio rerio*) u biomedicinskim i toksikološkim istraživanjima eksponencijalno raste. Brojne studije istražuju fiziološku/ekotoksikološku funkciju specifičnih proteina lokaliziranih u različitim tkivima zebrice. Za takva istraživanja najčešće se koristi metoda cjelokupnih preparata u kombinaciji s fluorescentnom mikroskopijom. Trenutno ne postoji jedinstveni pristup za provođenje imunohistokemijskih analiza na cjelovitim uzorcima embrija zebrica. U ovom radu upotrijebila sam embrije zebrice (120 sati nakon oplodnje) za određivanje ključnih uvjeta pri pripremi cjelovitih uzoraka embrija zebrice za imunohistokemijsku analizu pomoću antitijela za Na⁺/K⁺-ATPazu, ZN-8 i Oct1 membranske proteine. Dva fiksativa (4% paraformaldehid i Dents fiksativ) i tri različite temperature inkubacije (37 °C/30 min, 70 °C/15 min, 95 °C/5 min) testirani su kako bi se optimizirala imunohistokemijska metoda na cjelovitim uzorcima embrija zebrice. Rezultati su pokazali da upotreba različitih fiksativa i/ili obrade uzoraka pri određenoj temperaturi određuje optimalno vezanje protutijela. Fiksacija uzoraka Dentovim fiksativom je bila važna za detekciju proteina Na⁺/K⁺ATPaze dok su fiksacija i inkubacija uzoraka pri određenoj temperaturi bili važni za detekciju proteina ZN-8. Suprotno od toga, dizajnirana protutijela za protein Oct1 zebrice nisu pokazala specifično vezanje u embrijima zebrica. Zaključno, ovaj rad predstavlja jednostavan i objedinjen pristup za imunohistokemijsku lokalizaciju različitih proteina u cjelovitim uzorcima zebrice.

(54 stranica, 23 slike, 63 literaturnih navoda, 2 priloga, jezik izvornika: hrvatski)

Ključne riječi: kriopreparati, (imuno)fluorescencijska analiza, aktin, natrij-kalij ATP-aza, zebrica
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: dr.sc. Dean Karaica, znanstveni suradnik

Komentor: prof. dr. sc. Goran Klobučar, redoviti profesor u trajnom zvanju

Ocjenitelji: prof. dr. sc. Goran Klobučar

prof. dr. sc. Zoran Marčić

prof. dr. sc. Sven Jelaska

Rad prihvaćen: 08. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

Immunohistochemical characterization of Na⁺/K⁺-ATPase, neurolin and organic cation membrane transporter 1 antibodies in zebrafish (*Danio rerio*) whole-mount samples

Nora Lončarić

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In the last couple of decades, the use of zebrafish (*Danio rerio*) model in biomedical and toxicological research is exponentially increasing. Many studies investigate the physiological/ecotoxicological function of different proteins localized across different zebrafish tissues. Whole-mount preparations coupled with fluorescence microscopy are widely used for this task. To date there is no single approach for conducting whole-mount immunohistochemistry in zebrafish embryos. In this study we used zebrafish embryos (120 hours post fertilization) to determine key parameters in preparation of zebrafish embryos for the use in whole-mount immunohistochemistry by using four antibodies detecting Na⁺/K⁺-ATPase, ZN-8 and Oct1 membrane proteins. Two fixatives (4% paraformaldehyde and Dents fixative) and three different incubation temperatures (37 °C/30 min, 70 °C/15 min, 95 °C/5 min) were tested to optimize the whole-mount immunohistochemistry approach. Results showed that the use of different fixative and/or sample incubation temperature determines optimal antibody binding. Fixation with Dents fixative was essential for Na⁺/K⁺-ATPase detection whereas fixation and incubation temperature were important factors for ZN-8 protein detection. In contrast, designed anti-zebrafish Oct1 antibodies did not show specific binding in zebrafish embryos. Overall, this work presents a simple and unified approach for whole-mount immunohistochemistry localization of different proteins in zebrafish embryos.

Key words: cryosections, (immuno)fluorescence analysis, actin, sodium-potassium ATPase, zebrafish

(54 pages, 23 figures, 63 references, 2 appendices. original in: Croatian)

Thesis is deposited in the Central Biological Library

Menotr: PhD. Dean Karaica, research associate

Co-mentor: Prof. Goran Klobučar, PhD., full professor tenure

Reviewers: Prof. Goran Klobučar, PhD.

Prof. Zoran Marčić PhD.

Prof. Sven Jelaska, PhD.

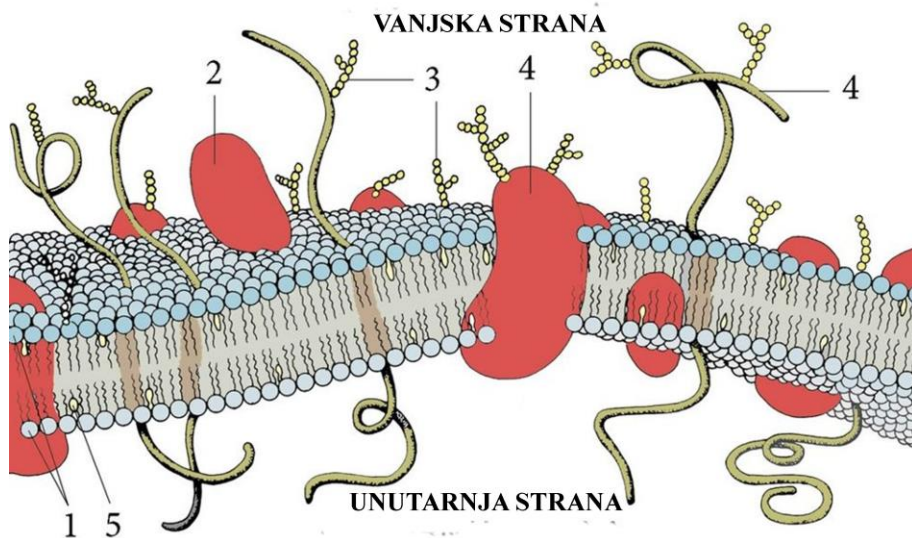
Thesis accepted: 08. September 2022.

1.	UVOD.....	1
1.1.	Uloga i značaj membranskog proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze.....	2
1.2.	Uloga i značaj membranskog proteina neurolin/alcam.....	3
1.3.	Uloga i značaj membranskog proteina Oct1	3
1.4.	Zebrica u znanstvenim istraživanjima i karakteristike zebrice kao modela	4
1.4.1.	Embrionalni razvojni stadiji zebrice	6
1.4.2.	Anatomske i histološke značajke zebrice.....	7
	Mozak	7
	Unutarnje uho	8
	Srce i krvožilni sustav.....	9
	Škrge	
	1
	0	
	Probavni sustav	11
	Bubreg.....	12
1.5.	Histokemija i istraživanja ekspresije membranskih proteina u zebrici.....	13
1.5.1.	Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Na ⁺ /K ⁺ -ATPaze u embrijima i ličinkama zebrice	13
1.5.2.	Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina neurolina/alcama u embrijima i ličinkama zebrice	14
1.5.3.	Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Oct1 u embrijima i ličinkama zebrice	14
1.6.	Protokoli za pripremu histoloških preparata i imunofluorescencijsku analizu proteina zebrice.....	15
1.6.1.	Priprema parafinskih preparata	15
1.6.2.	Priprema kriopreparata zebrice	17
1.6.3.	Priprema cjelokupnih preparata zebrice	18
1.7.	Protutijela.....	19
2.	Cilj istraživanja.....	21
3.	Materijali i metode.....	23

3.1.	Materijali.....	23
3.1.1.	Opis pokusnih životinja i medija za razvoj embrija	23
3.1.2.	Puferi, otopine i kemikalije za obradu uzoraka zebrice	24
3.1.3.	Laboratorijska oprema i potrošni materijal	26
3.1.4.	Računalni programi	26
3.2.	Metode	27
3.2.1.	Uzgoj i uzorkovanje modelnog organizma	27
3.2.2.	Fiksacija embrija	29
3.2.3.	Obrada uzoraka embrija zebrice pri predodređenim temperaturama	29
3.2.4.	Imunofluorescencijska analiza cjelovitog uzorka embrija zebrice	30
3.2.5.	Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika	30
3.2.6.	Prikaz i statistička obrada rezultata	31
4.	Rezultati.....	32
4.1.	Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela DAM-CY3 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice	32
4.2.	Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela GAR-CY3 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice	33
4.3.	Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela za Na ⁺ /K ⁺ -ATPazu u cjelovitim uzorcima embrija zebrice	34
4.4.	Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela za neurolin u cjelovitim uzorcima embrija zebrice.....	37
4.5.	Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela A za Oct1 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice.....	40
4.6.	Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela B za Oct1 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice.....	41
5.	Rasprava	42
6.	Zaključak.....	48
7.	Popis literature	49
8.	Životopis	54
9.	Prilozi	I

1. UVOD

Eukariotske stanice sadrže biološke membrane koje okružuju žive stanice i organele (Hedin i sur. 2011). Biološke membrane sadrže fosfolipide koji su njihova osnovna jedinica, ali sadrže i velik broj proteina raspršenih unutar fosfolipida ili vezanih za njih te upravo ti proteini ugrađeni u lipide mogu činiti i polovicu mase membrane (slika 1). Membranski proteini se nalaze unutar lipidnog odnosno hidrofobnog dvosloja i mogu se podijeliti na periferne i integralne proteine. Periferni proteini nalaze se pričvršćeni na membrani bilo labavim elektrostatskim ili Van der Waalsovima vezama s glavnim grupama proteina membrane ili pomoću kovalentnih veza. Integralni proteini ugrađeni su u cijeli fosfolipidni dvosloj i dijele se na α -zavojnici i β -barrel. Integralni proteini imaju važnu ulogu u prenošenju iona, metabolita i većih molekula kao što su proteini i RNA kroz membranu. Membranski proteini također su odgovorni za slanje i primanje kemijskih signala, širenje električnih impulsa, međusobno pričvršćivanje stanica i pričvršćivanje drugih proteina na određena mjesta u stanici. Ostale funkcije uključuju regulaciju unutarstaničnog vezikularnog transporta, kontrolu sastava membranskih lipida te organiziranje i održavanje oblika organela i same stanice (Hedin i sur. 2011).



Slika 1. Građa stanične membrane, 1. lipidni dvosloj, 2. periferni protein, 3. oligosaharid, 4. integralni (transmembranski) protein, 5. kolesterol (Preuzeto i prilagođeno sa web stranice: https://www.enciklopedija.hr/Ilustracije/HOL_3946.jpg).

1.1. Uloga i značaj membranskog proteina Na^+/K^+ -ATPaze

Tijekom evolucije života, većina stanica zadržala je sličan ionski sastav svoje citoplazme, a to je niska koncentracija kalcija i natrija, a visoka kalija te neutralni pH. Kada su izvanstanične koncentracije iona značajno različite, potrebna je stalna aktivnost ionske pumpe kako bi se održale unutarstanične koncentracije koje su važne za brojne enzimske funkcije stanice (Clausen i sur. 2017). Na^+/K^+ -ATPaza, također poznata kao natrijeva pumpa, ključni je protein za održavanje stanične homeostaze. Natrijeva pumpa se sastoji od dvije funkcionalno potrebne podjedinice, α i β , koje su prisutne u ekvimolarnim količinama. Pretpostavlja se da postoji i treća podjedinica, nazvana γ , iako se čini da nije bitna za aktivnost Na^+/K^+ -ATPaze. Prenoseći natrijeve i kalijeve ione, natrijeva pumpa uspostavlja i održava elektrokemijske gradijente koji su osnova električne podražljivosti živaca i mišića te transporta brojnih otopljenih tvari i vode kroz epitelne površine (Blasiolo i sur. 2006). Mnogo energije pohranjuje se u ionskim gradijentima preko plazmatske membrane, a strmi gradijent natrija i kalija u životinjskim stanicama ima funkciju da olakša sekundarni transport molekula (šećera, neurotransmitera, aminokiselina, metabolita) i drugih iona (H^+ , Ca^{2+} , Cl^-) (Clausen i sur. 2017). Ionski gradijenti također se koriste za brzu signalizaciju otvaranjem natrijevih ili kalijevih selektivnih kanala u plazmatskoj membrani kao odgovor na izvanstanične signale ili membranski potencijal (Clausen i sur. 2017). Gradijent natrija i kalija ima posebnu funkciju u svakom organu. U bubrežima je Na^+/K^+ -ATPaza jako izražena, pa čak postoji i do 50 milijuna pumpi po stanici u distalnim zavijenim kanalićima bubrega (El Mernissi i Doucet, 1984) jer gradijent natrija sudjeluje u glavnim funkcijama bubrega: za filtriranje krvi od otpadnih tvari, za reapsorpciju glukoze i aminokiselina, za regulaciju elektrolita i održavanje pH vrijednosti. U spermijima, regulacija iona i membranskog potencijala ključna je za pokretljivost i kromosomsku reakciju, a spermiji izražavaju jedinstvenu izoformu Na^+/K^+ -ATPaze, koja je neophodna za mušku plodnost (Clausen i sur. 2017). Također, mozak ima veliku potražnju za aktivnošću Na^+/K^+ -ATPaze budući da se neuroni oslanjaju na pumpu da preokrenu postsinaptički tok natrija kako bi ponovno uspostavili gradijente natrija i kalija koji se koristi za pokretanje akcijskih potencijala, a u astrocitima gradijent natrija pokreće ponovno preuzimanje neurotransmitera. U svojoj tvari procjenjuje se da sinteza proteina i drugih molekula koristi samo četvrtinu energije, dok ostatak troše Na^+/K^+ -ATPaze (Clausen i sur. 2017).

1.2. Uloga i značaj membranskog proteina neurolin/alcam

Neurolin je naziv za protein molekulske mase 86 kDa kloniran iz zlatne ribice (*Carassius auratus*) detektiran pomoću monoklonskog protutijela E21 (Mann i sur. 2006). Molekula IgSF Neurolin/ALCAM pripada skupini bjelančevina nazvanih imunoglobulini (protutijela) koji pripadaju imunom sustavu. Sastoji se od pet izvanstaničnih domena, jednostruke transmembranske zavojnice i jedne citoplazmatske domene (Diekmann i Stuermer 2008, Dress 2008). Također gen za neurolin u zebricama je ortolog ljudskom genu neurolinu (Diekmann i Stuermer 2008). Glavne uloge neurolina i sličnih molekula su u aktivaciji T- i B-stanica limfocita, metastazama tumora i aksonskim projekcijama i fascikulaciji za koju se čini da su posrednici ili u homofilnim adhezijama te heterofilnim interakcijama s ligandima CD6 ili NGCAM (Mann i sur. 2006). Jedno od prvih istraživanja neurolina napravili su Paschke i sur. (1992) koji su istraživali ekspresiju neurolina tijekom regeneracije aksona mrežnice i dokazali da se eksprimira u ganglijskim stanicama mrežnice tijekom njihovog razvoja, ali i njihove regeneracije. Koristili su metodu krioseciranja i protutijelo za neurolin mAb E21 koji je pokazao obojenje na površini glikoproteina stanice koji je selektivno povezan s aksonima ganglijskih stanica mrežnice zlatne ribice u fazi rasta. Doduše svi retinalni aksoni i ganglijske stanice u embrijima zlatne ribice pokazali su vezanje mAb E21 za neurolin. U odraslih riba, međutim, imunoreaktivnost E 21 pokazala je strukturiranu distribuciju u ganglijskim stanicama u marginalnoj zoni rasta mrežnice ribe koja se kontinuirano povećava i nove aksone koji izlaze iz tih stanica u mrežnici, optičkom živcu i optičkom traktu. Antigen E21 nije detektiran u starijim aksonima, osim u terminalnom sloju u tektumu, *stratum fibrosum et griseum superficiale* gdje je bio ravnomjerno raspoređen (Paschke i sur. 1992).

1.3. Uloga i značaj membranskog proteina Oct1

Prijenosnici organskih kationa (engl. *organic cation transporters*; OCT) članovi su obitelji SLC22 (engl. *Solute Carrier 22*) koji su odgovorni za unos brojnih organskih kationa kroz plazmatsku

membranu. Važnost navedenih prijenosnika se očituje činjenicom da su geni istih proteina visoko očuvani unutar različitih vrsta kralježnjaka, čije se podrijetlo proteže sve do morskih pasa i kružnousnih (Zhu i sur. 2015). Zastupljeni su s tri koortologa kod gmazova, ptica i čovjeka, dok kod riba koštunjača i vodozemaca imaju dva odnosno jedan ortolog (Mihaljević i sur. 2016). OCT1-3 kod sisavaca eksprimirani su u brojnim toksikološki važnim tkivima koji sudjeluju u metabolizmu i/ili izlučivanju endo- i ksenobiotika, posebno u jetri i bubrezima. Kada se uspoređuje tkivna ekspresija ljudskih OCT-a, OCT1 je visoko eksprimiran u jetri, u sinusoidnim membranama hepatocita (Gorboulev i sur. 1997), a također se nalazi u epitelnim stanicama i neuronima. Ljudski OCT-i su visoko polispecifični i prenose organske katione s jednim ili dva pozitivna naboja ili slabe baze s pozitivnim nabojem pri fiziološkom pH (Mihaljević i sur. 2017).

1.4. Zebrica u znanstvenim istraživanjima i karakteristike zebrice kao modela

Zebrica se u znanstvenim istraživanjima počela koristiti 60 tih godina 20-og stoljeća. Nakon što su je Streisinger i njegovi kolege početkom 1980-ih počeli koristiti za istraživanje mutageneze N-etil-N-nitrozouree koristi se sve češće kao modelni organizam. Danas se široko koristi u raznim molekularno-biološkim istraživanjima. Odličan je organizam zbog visoke homologije genoma sa ljudskim. Primjerice ~70% ljudskih gena ima barem jedan očiti ortolog zebrice, u usporedbi s 80% ljudskih gena s ortolozima miša (Choi i sur. 2021). U toksikološkim istraživanjima najčešće se proučavaju embriji zebrice u stadiju blastule (ne stariji od 3 dana nakon oplodnje) koji su izloženi rastućim koncentracijama istraživane kemikalije i kontrolnoj otopini tijekom 96 h. Svakih 24h bilježe se toksični učinci kao što su: koagulacija tkiva, poremećaj u nastanku somita, poremećaj u odvajanju repa od žumanjčane vrećice i prestanak otkucaja srca. Na kraju izlaganja (96 h), procjenjuje se LC₅₀ (engl. *Lethal Concentration*₅₀ (mg/L)) što označava koncentraciju pri kojoj smrtno strada 50 % izloženih embrija u određenom vremenu (npr. 96 h). Također se bilježi učestalost (%) određenih negativnih učinaka, zajedno s fizikalno-kemijskim svojstvima medija za izlaganje (Pereira i sur. 2019). Test embriološke toksičnosti zebrice (engl. Zebrafish embryotoxicity test –ZET) može poslužiti kao odlična alternativa drugim testovima toksičnosti. U

ovom testu se koriste embriji koji još nisu razvili receptore boli, te im se razvoj može pratiti pod mikroskopom i ne podliježe EU legislative 3 R (zamjena, smanjenje i poboljšanje upotrebe životinja, eng. *replacement, reduction and refinement of animal use*). Dakle, ovaj *in vivo* model ima jedinstvenu prednost otkrivanja učinaka spojeva tijekom cijelog razdoblja organogeneze, a kako su embriji male veličine nije potrebno koristiti velike količine testnih spojeva (Woudenberg i sur. 2013, Pereira i sur. 2019, Lammer i sur. 2009).

Kao modelni organizam ima mnoge prednosti u odnosu na druge vrste kralježnjaka u pogledu veličine, uzgoja i rane morfologije (Hill i sur. 2005). Zebrica ima malu veličinu, ali veliku vrijednost za toksikološka istraživanja. Za razliku od drugih vrsta riba poput pastrve, odrasle jedinke zebrice duge su samo oko 3-4 cm. To uvelike smanjuje uzgojni prostor i troškove uzgoja. Zebrica se također već neko vrijeme koristi kao laboratorijska vrsta pa su dobro utvrđeni optimalni uvjeti za uzgoj i održavanje (Hill i sur. 2005). Za razliku od većih vrsta, mala veličina ličinke i odrasle zebrice minimizira troškove kroz male količine testnih spojeva. Osim veličine, ova vrsta ima velik broj potomstva i prozirne embrije što omogućuje direktno praćenje razvoja (uživo), ali i provedbi velikog broja istraživanja u kratkom roku (Hill i sur. 2005, Ali i sur. 2011). Zbog Zakona o zaštiti životinja, zebrice su puno bolji modelni organizmi od sisavca jer imaju manje restrikcija, posebno ako se koriste u embrionalnoj ili ličinačkoj fazi koje ne potpadaju pod legislativu (EU Parliament i Council 2010, Woudenberg i sur. 2013).

Zebrica kao modelni organizam ima i neke nedostatke. Evolucijska divergencija zebrica i sisavaca je bila prije 445 milijuna godina, pa prema tome ne možemo biti sigurni da će nužno imati istu osjetljivost na otrovne tvari kao i sisavci te stoga postoji potreba za validacijom modela. Fiziologija i anatomija zebrice drugačija je od ljudi (poikilotermne su životinje dok su ljudi homeotermni, drugačija je građa srca, nedostaju sinovijalni zglobovi, spužvaste kosti, udovi i pluća). Problem je i duplicirani genom zbog čega su mnogi geni prisutni kao kopija čime je potrebno dvostruko više vremena kako bi se detektirala funkcija. Također, kod opširnijih istraživanja mali organizam više nije prednost jer ima ograničenu količinu tkiva. U imunohistokemijskim istraživanjima problem je i mali broj dostupnih komercijalnih protutijela u odnosu na češće korištene modelne organizme glodavaca poput miševa i štakora (Ferguson i Shive 2019).

1.4.1. Embrionalni razvojni stadiji zebrice

U literaturi je opisano sedam ranih razvojnih stadija zebrice tijekom embriogeneze odnosno razvoja embrija koji se odvijaju tijekom prva 3 dana nakon oplodnje:

- 1) zigota- pri čemu nastaje novo oplođeno jajašce sve dok ne dođe do prve diobe, oko 40 minuta nakon oplodnje; zigota je u trenutku oplodnje promjera oko 0,7 mm,
- 2) dioba- gdje se stanice ubrzano dijele svakih 15 min,
- 3) blastula- pojam blastula koristimo za razdoblje kada blastodisk počinje izgledati kao lopta, u stadiju od 128 stanica, odnosno osmom zigotnom staničnom ciklusu, i do trenutka početka gastrulacije, oko 14-tog ciklusa; događaju se važni procesi; embrij ulazi u prijelaz srednje blastule, formira se sincicijski sloj žumanjka i počinje epibolija (stanjivanje i širenje sincicijalnog sloja žumanjka i blastodiska preko žumanjčane stanice),
- 4) gastrula- morfogogenetski pokreti involucije, konvergencije i ekstenzija od epiblasta, hipoblasta i embrionalne osi; do kraja epibolije,
- 5) segmentacija- razvijaju se somiti, primordija faringealnog luka i neuromeri; dolazi do primarne organogeneze, pojavljuju se najraniji pokreti i rep,
- 6) faringula- embriji su filotipski; os tijela se uspravlja od svoje rane zakrivljenosti oko žumanjčane vrećice; pojavljuje se cirkulacija, pigmentacija i počinju se razvijati peraje,
- 7) razdoblje izlijeganja- završetak brze morfogeneze primarnih organskih sustava; razvoj hrskavice u glavi i prsnoj peraji te dolazi do asinkronog izlijeganja (Kimmel i sur. 1995).

Period izlijeganja je 48-72h. Organizme u tom vremenskom periodu nazivamo embriji do kraja trećeg dana, a nakon toga ličinke, bez obzira jesu li se izlegle ili ne.

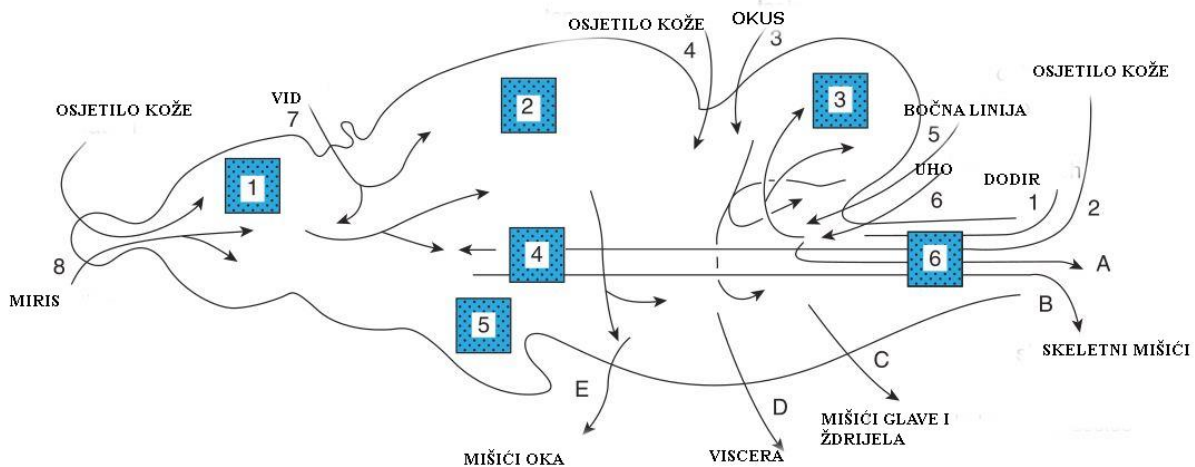
Do 3. dana ciklusa embrio je završio većinu svoje morfogeneze i nastavlja brzo rasti te ulazi u rani period ličinke. Izražene promjene tijekom ovog stadija uključuju napuhavanje plivajućeg mjehura i nastavak prednje dorzalne protruzije usta. U isto vrijeme reflektirajuće trake iridofora posvjetljuju se i produžuju, a ventralna traka žumanjka se proteže u oba smjera. Cijev crijeva pomiče se ventralnije, gdje se može lakše vidjeti, a žumanjčana vrećica se gotovo prazni. Tijekom razdoblja razvoja do 3. dana embrij obično miruje, a nakon toga rana ličinka postupno počinje aktivno plivati i pomiče svoje čeljusti, operkulum, prsne peraje i oči. U tom stadiju stvaraju se brze reakcije bijega i počinje disanje, a kasnije i traženje plijena i hranjenje (Kimmel i sur. 1995).

1.4.2. Anatomske i histološke značajke zebrice

Kako bi u potpunosti shvatili potencijal zebrice kao alternativnog životinjskog modela za razumijevanje ljudskog razvoja, bolesti i toksikologije, prvo je potrebno unaprijediti znanje o normalnoj fiziologiji, anatomiji i histologiji zebrice (Menke i sur. 2011). U nastavku su opisani neki od organa zebrice kao i njihova pripadajuća funkcija.

Mozak

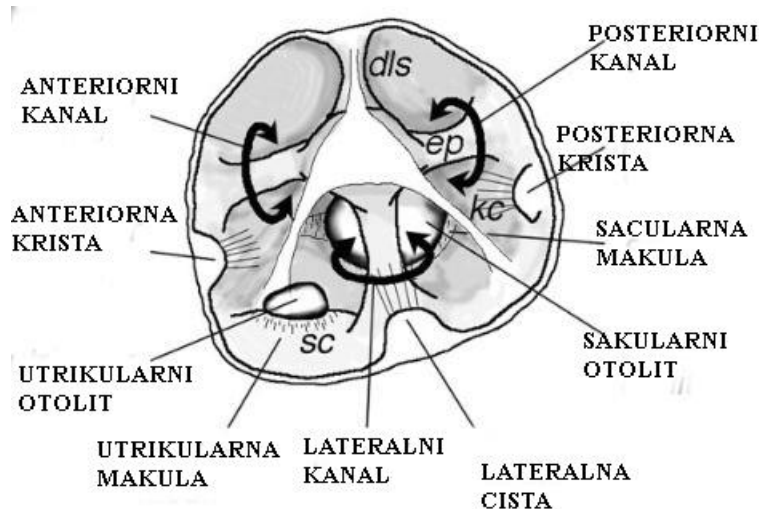
Živčani sustav proteže se cijelim tijelom kao sustav međusobnog povezivanja integracijskih centara i komunikacijskih puteva: neurona i njihovih aksonalnih i dendritičkih procesa. Najveći udio živčanog tkiva nalazi se u mozgu i njegovom stražnjem produžetku, leđnoj moždini, a oni zajedno čine središnji živčani sustav (CŽS). Periferni živčani sustav (PŽS) sastoji se od živaca koji izlaze iz CŽS-a i njihovih živčanih završetaka ili organa posebnog osjetila (Roberts i Ellis 2012). Zebrice imaju sličnu građu mozga kao i evolucijski razvijenije životinje (slika 2.). Građa mozga zebrice se dijeli na pet regija: telencefalon, diencefalon, mesencefalon, metencefalon i mijelencefalon (Speare i Frasca 2006). Za njuh, pamćenje, reproduktivno ponašanje, ponašanje pri hranjenju i razlikovanje boja zaslužan je telencefalon (Roberts i Ellis 2001). Slijedeća regija diencefalon se sastoji od tri komponente: epitalamus, talamus i hipotalamus. Prva komponenta epitalamus sadrži epifizu (lučenje hormona, kontrola dnevnih i sezonskih ritmova uključujući regulaciju reprodukcije, rasta i sezonske migracije) i *saccus dorsalis*. Talamus i hipotalamus su korelacijski centri za senzorne podražaje koji obuhvaćaju trudnoću i miris (Menke i sur. 2011). Mezencefalon je relativno velik i anatomski se dijeli na optički tektum (vizualna percepcija i pokreti) i tegmentum (Roberts i Ellis 2012). Metencefalon ili cerebellum općenito su povezani s primanjem i koordinacijom proprioceptivnih i ravnotežnih podražaja. U većini telosta ima dvije komponente, vestibulolateralis (bazalni) režanj i *corpus cerebelli* (Roberts i Ellis 2012). Mijelencefalon (*Medulla oblongata*—produžena moždina) se spaja s leđnom moždinom bez jasnih granica. Sastoji se uglavnom od četiri stupca živčanih vlakana, visceralnog senzornog i motornog te somatskog senzornog i motoričkog trakta.



Slika 2. Prikaz građe mozga zebrice (Preuzeto i prilagođeno iz Roberts i Ellis 2012).

Unutarnje uho

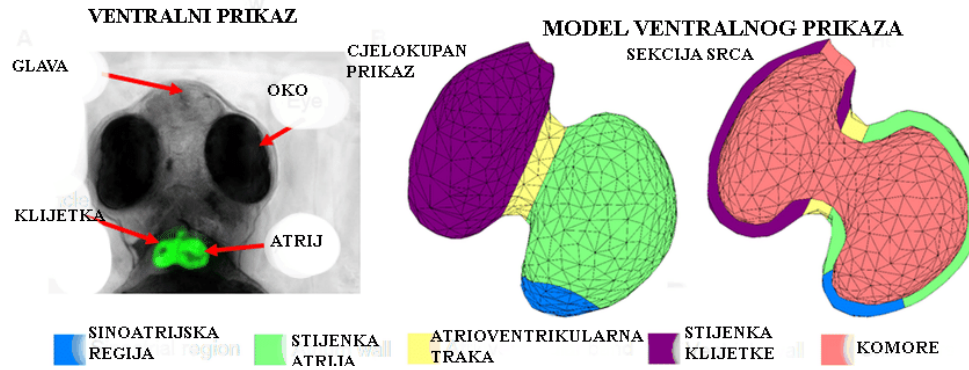
Uho odrasle jedinke zebrice (slika 3.) sastoji se od tri ortogonalno raspoređena polukružna kanala ("prednji", "stražnji" i "horizontalni/lateralni") i tri otolitička organa, utrikule, sakule i lagena, od kojih svaki sadrži senzorni sloj ili makulu (Abbas i Whitfield 2010). Polukružni kanali i utrikul, zajedno s endolimfatičnim kanalom, tvore *pars superior*, evolucijski stariji vestibularni sustav uha, koji je zadužen za ravnotežu, ubrzanje i senzornu gravitaciju. Svaki polukružni kanal završava ampulom, proširenjem kanala koje sadrži senzornu kristu okomitu na os kanala; neampularni krajevi prednjeg i stražnjeg polukružnog kanala spajaju se medijalno i tvore *crus commune*. *Macula neglecta*, par malih osjetnih slojeva bez otolita, nalazi se medijalno u bazi *crus commune* unutar *pars superior* (Abbas i Whitfield 2010). Cijeli labirint je kontinuiran i ispunjen endolimfom, specijaliziranom izvanstaničnom tekućinom obogaćenom K^+ ionima. Sakula je kontinuirana s poprečnim kanalom koji spaja lijevo i desno uho, a čiji je stražnji kraj slijepo zatvoren u *sinus impar*, glavni perilimfatički prostor uha. Ribe sadrže posebne organe otolite ili "ušne kamenčiće" koji se sastoje od kalcijevog karbonata (0,2-10% kod različitih vrsta riba) i malog postotka organske tvari u obliku vlaknastih proteina sličnih kolagenu kao što je otolin. Smicanje otolita koji tako pomiču apikalne snopove dlačica ispod kojih se nalaze osjetne stanice pokreće skup iona koje stimuliraju slušni živac (slika 3.) (Abbas i Whitfield 2010).



Slika 3. Prikaz građe unutarnjeg uha zebrice (preuzeto i prilagođeno iz Whitfield 2002).

Srcce i krvožilni sustav

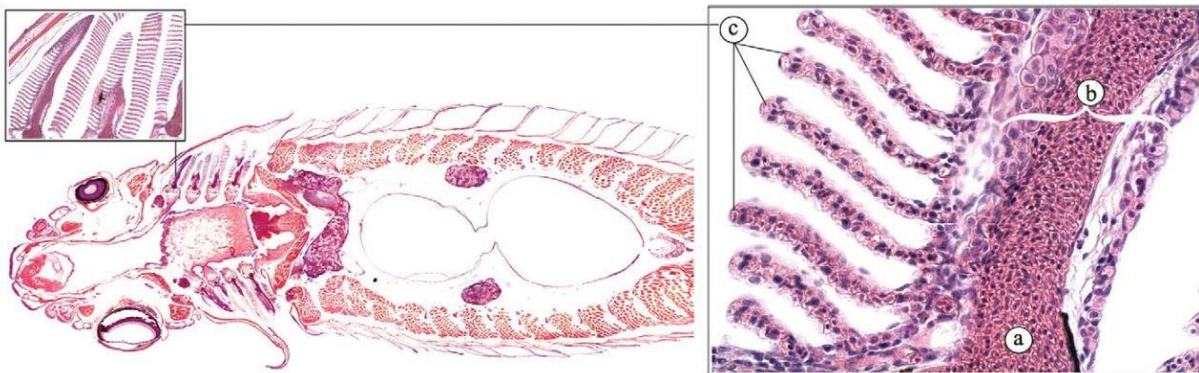
Srcce zebrice (slika 4.) je smješteno ispred glavne tjelesne šupljine i ventralno u odnosu na jednjak (Poppe i Ferguson 2006, Roberts i Ellis 2001). Deoksigenirana venska krv ulazi u *sinus venosus*. Stjenka venoznog sinusa je tanka i uglavnom se sastoji od kolagenog vezivnog tkiva. Krv nakon toga prolazi kroz sino-atrijalni zalistak u atrij. Atrij ima tanak, mišićav zid, a tanke trabekule tvore labavu mrežu u lumenu. Kontrakcija atrija i proširenje ventrikula tjera krv u klijetku preko atrioventrikularnog ventila. Ventrikula ima mnogo deblju stijenku od atrija. Postoji kompaktan vanjski sloj mišića i spužvasti unutarnji sloj s brojnim trabekulama (Menke i sur. 2011). Kontrakcija ventrikula stvara relativno visoki tlak, a krv se pumpa u *bulbus arteriosus* (atrijsku lukovicu) u obliku luka preko ventrikularno-bulbarnog ventila. *Bulbus arteriosus* ima debelu stijenku koja se sastoji od fibroelastičnog tkiva i nekih glatkih mišićnih vlakana. Zbog svoje elastičnosti može se znatno rastegnuti, čime se prigušuje ventrikularni pulsni tlak (Hu i sur. 2001). Iz srca, ventralna aorta distribuira krv do škrga preko aferentnih grančica (Menke i sur. 2011).



Slika 4. Prikaz građe unutarnjeg uha zebrice (preuzeo i prilagođeno iz Crowcombe i sur. 2016)

Škrge

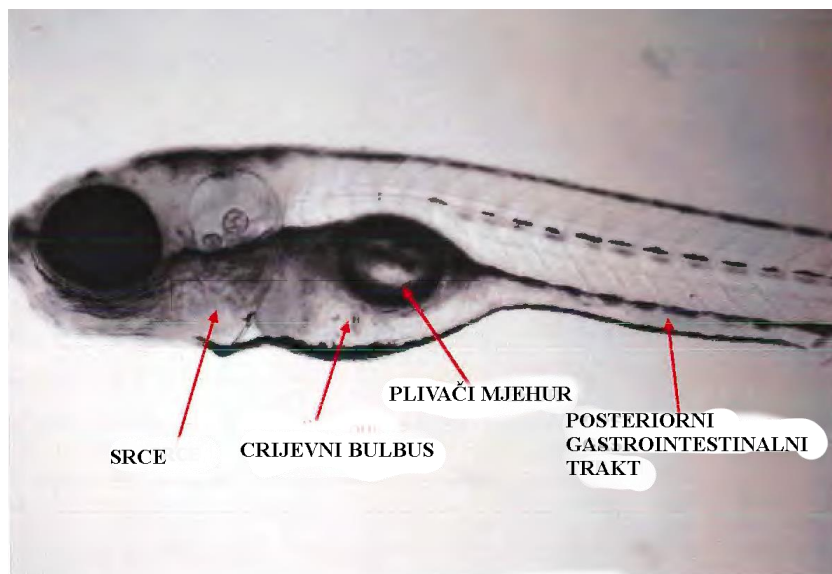
Važnost škrge je u oksigenaciji krvi (Roberts i Ellis 2001, Speare i Ferguson 2006). Voda ulazi kroz usta, preko škrge i izlazi kroz operculum. Protok vode pokreće naizmjenična ekspanzija i kontrakcija bukalne i operkularne komore. Krv teče preko aferentnih filamentnih arterija primarnih lamela u krvne prostore sekundarnih lamela, gdje se ugljikov dioksid (CO_2) oslobađa u vodu, a kisik (O_2) preuzima (Menke i sur. 2011). Sekundarne lamele sastoje se od jednog sloja epitelnih stanica, poduprtih i odvojenih, stanicama stupova. Krv obogaćena kisikom napušta sekundarne lamele putem eferentnih lamelarnih arterija kako bi obogatila kisikom dorzalnu aortu, odakle se distribuira u sva tkiva. Osim uloge u oksigenaciji krvi, škrge također imaju izrazito važnu ulogu u acido-baznoj ravnoteži, osmoregulaciji i izlučivanju otpadnih tvari (slika 5.) (Menke i sur. 2011).



Slika 5. Prikaz građe škrge (a. lamelarna arterija, b. primarna lamela, c. sekundarna lamela) (preuzeto i prilagođeno iz Menke i sur. 2011).

Probavni sustav

Osnovna funkcija crijeva podrazumijeva probavu i apsorpciju hranjivih tvari te eliminaciju otpadnih tvari. Ekspresija gena i regulacija transkripcije u stanicama crijevnog epitela slična je duž segmentnih regija crijeva sisavaca i zebrice (Lickwar i sur. 2017), a slične su i mnoge metaboličke funkcije. Gastrointestinalni trakt zebrice i sisavaca prekriven je zaštitnim slojem sluzi koji se pretežno sastoji od mucina koji tvori gel Muc2 kao njegove strukturne komponente (Flores i sur. 2020). Mucin prvenstveno luče vrčaste stanice, koje su kod odraslih zebrica raspoređene po cijelom crijevu sa većim brojem u srednjem i stražnjem crijevu (Wallace i sur. 2005). Crijevo zebrice podijeljeno je na tri histološki definirana segmenta, uključujući (1) prednju crijevnu lukovicu, (2) srednje crijevo i (3) stražnje crijevo. Ova podjela crijeva zebrice obično se održava od stadija ličinke do odraslih. Različite regije crijeva odrasle zebrice imaju različite funkcije analogne tankom i debelom crijevu sisavaca. Funkcionalno, prednji dio crijeva ima ulogu u obnavljanju žučne soli (Lickwar i sur. 2017), dok prednji i srednji dio mogu pomoći u apsorpciji lipida i proteina (Ng i sur. 2005, Brugman 2016.). Poput debelog crijeva sisavaca, stražnja regija crijeva zebrice odgovorna je za apsorpciju iona i vode (slika 6.) (Wallace i sur. 2005).

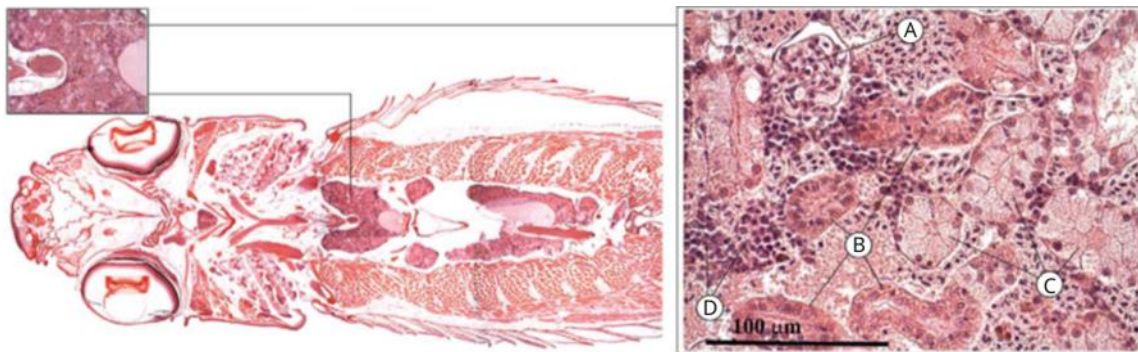


Slika 6. Građa i smještaj crijeva zebrice (preuzeto i prilagođeno iz Hess 2007).

Bubreg

Bubreg zebrice (slika 7.) nalazi se na retroperitonealnom području abdomena, ventralno od kralježnice. Ima različite regije glave i trupa. Slično bubrezima sisavaca, ima nefrone s glomerulom, proksimalne tubule, distalne tubule i sabirne kanale. Bubrežni intersticij sadrži hematopoetske stanice. Endokrine stanice (međububrežne i kromafinske stanice) mogu se naći duž glavnih krvnih žila u prednjem dijelu bubrega (Menke i sur. 2011). Bubrezi imaju dvije glavne funkcije: uklanjanje nepotrebnih tvari iz krvi i održavanje koncentracije iona i metabolita u krvi unutar fizioloških raspona koji podržavaju pravilno funkcioniranje svih ostalih stanica (Drummond i Davidson 2016).

Funkcionalne jedinice bubrega, nefroni se sastoje od filtracijskog dijela za krv - glomerul koji je pričvršćen na tubularni epitel (Drummond i Davidson 2016). Tijekom evolucije kralježnjaka nastale su tri vrste bubrega (poredana po složenosti): pronefros, mezonefros i metanefros (Saxen, 1987). Pronefros je prvi bubreg koji se formira tijekom embriogeneze. Kod kralježnjaka čiji razvojni stadij uključuje ličinke koje slobodno plivaju, a to su vodozemci i teleostne ribe, pronefros je funkcionalni bubreg tijekom ličinačkog života i potreban je za pravilnu osmoregulaciju (Howland 1921). Kasnije, u juvenilnim fazama razvoja riba i žaba, oko i uzduž cijele duljine pronefrosa formira se mezonefros koji kasnije služi kao bubreg odraslih jedinki. Metanefrički bubreg nastaje isključivo u odraslim amniotima (sisavci, ptice i gmazovi), a kod sisavaca je prilagođen za zadržavanje vode i proizvodnju koncentriranog urina (Drummond i Davidson 2016).



Slika 7. Prikaz građe i smještaja bubrega u zebrici (A. glomerulus, B. proksimalni kanalić C. sabirni kanalić, D. hematopoetsko tkivo) (preuzeto iz Menke i sur. 2011).

1.5. Histokemija i istraživanja ekspresije membranskih proteina u zebrici

Ekspresija proteina može pružiti informacije o staničnoj funkciji, posebno prilikom istraživanja ekspresija više proteina istovremeno unutar stanice (kolokalizacija). Promatranje međustaničnih interakcija bitan je element u mnogim studijama i može pružiti ključne uvide u molekularne mehanizme koji se odvijaju na staničnoj razini, a koji posljedično definiraju fenotip organizma (Ferguson i Shive 2019). Imunocitokemija i imunohistopatologija su se pojavile kao nova područja imunologije 1941. godine kada su Albert Coons i njegovi suradnici prvi opisali moguću upotrebu fluorescentno obilježenih protutijela za detekciju protutijela *in situ* (Choe i Cho 1994). Još jedna prekretnica u imunocitokemiji bilo je uvođenje imunologije u istraživanja s elektronskim mikroskopom (Choe i Cho 1994). Ekspresija i površinska lokalizacija proteina mogu se proučavati metodom protočne citometrije, površinskim označavanjem biotinom i Western blot metodom (Hanna i sur. 2006), a široko se koriste i metode poput imunofluorescencije (IF) i fuzije ekspresije fluorescentnih proteina koje mogu dati uvid u distribuciju proteina (Stadler i sur 2013).

1.5.1. Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Na⁺/K⁺-ATPaze u embrijima i ličinkama zebrice

Kod zebrice je složen sustav Na⁺/K⁺-ATPaze s identificiranim genima za 9 α podjedinica i 6 β podjedinica. Dakle, zebrica ima potencijal za 54 moguće kombinacije α/β podjedinica (Blasiolo i sur. 2006). Najupečatljivije otkriće je da svaki od 14 gena Na⁺/K⁺-ATPaze prisutnih tijekom embrionalnog razvoja zebrice pokazuje poseban profil ekspresije. Svi geni α i β podjedinice izraženi su u živčanom sustavu, iako obrazac ekspresije u različitim regijama dramatično varira (Canfield i sur. 2002). U perifernim tkivima, tri od pet $\alpha 1$ -sličnih gena izraženo je u pronefrosu i mukoznim stanicama, jedan je izražen u srcu, a jedan prevladava u skeletnim mišićima. Gen za $\alpha 2$ izražen je u mozgu i srcu, te je najizraženiji u skeletnim mišićima, dok su dva gena $\alpha 3$ ograničena na živčani sustav. Od šest gena β podjedinice, $\beta 1a$ je izražen u najvećoj količini u leći, pronefrosu i srcu, dok su $\beta 1b$ transkripti prisutni u stanicama sluznice. Dva $\beta 2$ slična gena različito su izražena u živčanom sustavu. Jedan $\beta 3$ gen izražen je isključivo u mozgu, dok je drugi izražen u skeletnim mišićima. Prema ovim rezultatima ekspresije različitih podjedinica Na⁺/K⁺-ATPaze, može se

zaključiti da će se najmanje 14 parova podjedinica α/β vjerojatno formirati u različitim tkivima (Canfield i sur. 2002).

1.5.2. Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina neurolina/alcama u embrijima i ličinkama zebrice

Detaljna ekspresija mRNA neurolina u embrionalnom razvoju zebrice nedostaje unatoč izvrsnom opisu lokalizacije u nekim fazama. Istraživanje neurolina u zebrici se uglavnom temelji na istraživanju pomoću protutijela Zn5/Zn8 koji su duplikati izolata istog hibridoma (Mann i sur. 2006). Tijekom razvoja zebrice, neurolin je izražen u podskupinama somitskih i mišićnih stanica, srca i brojnim mjestima sazrijevanja neurona. Također i prva mišićna vlakna imaju ekspresiju neurolina (Mann i sur. 2006). Unutar mrežnice tijekom razvoja zebrice, početak i progresija ekspresije neurolina paralelna je s obrascem diferencijacije ganglijskih stanica mrežnice. Dokazano je da je neurolin neophodan za ključni korak u diferencijaciji ganglijskih stanica mrežnice te bez njega veliki dio ganglijskih stanica mrežnice se ne razvija, a njihovi aksoni su odsutni ili su u smanjenom broju. Također, neurolin je potreban za održavanje ganglijskih stanica mrežnice i za diferencijaciju svih ostalih neurona mrežnice (Diekmann i Stuermer 2008).

1.5.3. Lokalizacija i ekspresija membranskog proteina Oct1 u embrijima i ličinkama zebrice

Strukturna i funkcionalna svojstva Oct proteina u ribama i njihova toksikološka važnost, još uvijek su nedovoljno istraženi. Filogenetska i konzervirana analiza genetike otkrila je ortologne odnose između gena zebrice – oct1 na kromosomu 20 i oct2 na kromosomu 17 – i klastera ljudskog OCT gena na kromosomu 6. Oct1 gen zebrice izražen je u velikom broju u bubrezima oba spola, kao i u jetri mužjaka (Mihaljević i sur. 2016). Profil ekspresije Oct1 sličan je njegovim ljudskim ortolozima koji su izraženi u bazolateralnoj membrani jetre i bubrega. Stoga Oct1 proteini kod zebrice također imaju ulogu u apsorpciji u stanici, distribucijskim procesima metabolizma i izlučivanju ksenobiotika koja je slična ljudskim ortolozima (Mihaljević i sur. 2017).

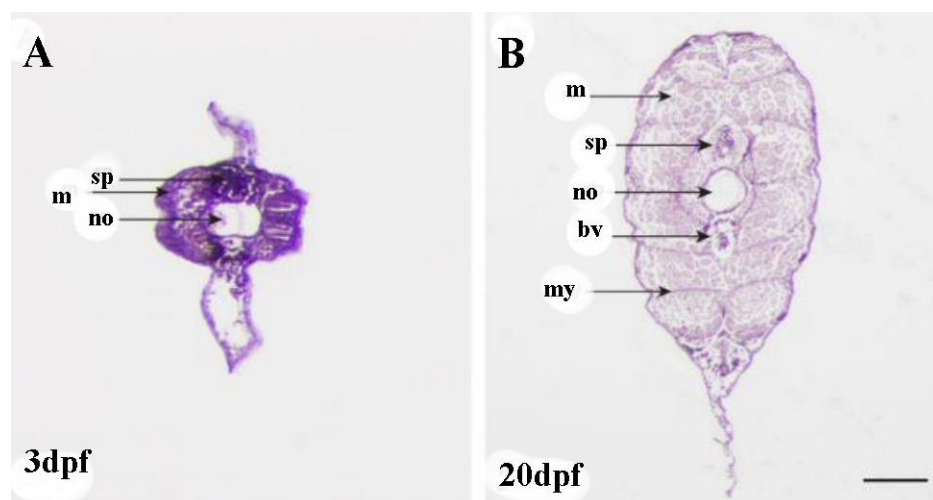
1.6. Protokoli za pripremu histoloških preparata i imunofluorescencijsku analizu proteina zebrice

Imunohistokemija je tijekom posljednjih desetljeća napredovala te je danas vrlo specifična i osjetljiva dijagnostička metoda koja je posebno korisna za proučavanje ranog razvoja, koji se sastoji od mnogo različitih staničnih procesa odvojenih u vremenu i prostoru (Santos i Lurdes Pinto 2018). Zebrica je izvrstan model kralježnjaka koji se intenzivno koristi u području razvojne biologije i medicinskih znanosti, uključujući teratologiju. Kroz tehniku imunohistokemije, označavanje specifičnih molekula povezanih sa specifičnim morfogogenetskim događajima može se vizualizirati i u cjelovitim uzorcima embrija i ličinkama zebrice ili u njihovim tankim histološkim presjecima (Santos i Lurdes Pinto 2018). Svjetlosna i fluorescencijska mikroskopija koriste tri vrste preparata: parafinski, smrznuti i polutanki. Iako je izrada kriopreparata uobičajen način za zaštitu antigenosti tkiva, a priprema uzorka je jednostavna, morfologija zadržanog tkiva je nerijetko lošija i ponekad neprikladna za tanke rezove (Qin i sur. 2018). Kod korištenja cjelovitog organizma, najčešće embrija, postoji ograničenje veličine uzorka (<https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>). Različiti načini proučavanja histoloških preparata omogućuju promatraču bolje razumijevanje funkcije pojedinih stanica u odnosu na njihovo anatomsko i histološko okruženje, a to je ključni čimbenik u razumijevanju procesa ranog razvoja organizma (Santos i Lurdes Pinto 2018).

1.6.1. Priprema parafinskih preparata

Parafinski preparati su najčešće korišteni za promatranje morfologije tkiva. Budući da su uzorci potpuno dehidrirani i ugrađeni u vosak, parafinski blokovi se mogu čuvati neograničeno. Osim toga, seciranjem parafinskih preparata se dobiju tanki presjeci tkiva koji poboljšavaju pristup različitim protutijelima i probama u daljnjim eksperimentima te smanjuju debljinu staničnog sloja (Qin i sur. 2018).

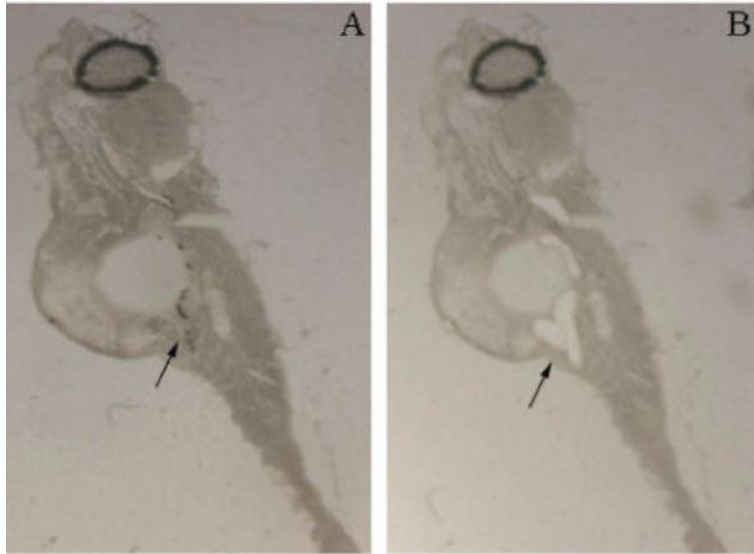
Međutim, uobičajeno parafinsko seciranje je dugotrajno i zahtijeva iskustvo i vještinu (Qin i sur. 2018). Protokol započinje najprije fiksacijom (Adams 2013). Nakon što je tkivo fiksirano, mora se obraditi tako da se u konačnici može izrezati na tanke dijelove prikladne za mikroskopiju. U početku se uzorci dehidriraju kako bi se uklonila voda (najčešće s etanolom), a zatim se čiste pri čemu se otopina korištena za dehidraciju tkiva zamjenjuje novom otopinom koja se može miješati s parafinom (najčešće ksilen), budući da u tkiva bogata vodom parafin ne može izravno prodrijeti (Adams 2013). Nakon toga se ugrađuju u parafinski vosak. Preparati se režu na debljinu između 4-5 μm i stavljaju u vodenu kupelj te se zatim suše na oko 65°C dok se parafin ne počne rastapati. Obojani uzorci se mogu čuvati na sobnoj temperaturi (Adams 2013). Kako bi se poboljšala kvaliteta presjeka, preporučuje se vlaženje izložene površine tkiva prolazeći između oštrica mikrotoma, hlađenjem blokova voska uranjanjem u ledenu vodu ili podizanjem vlažnosti ovlaživačem zraka u blizini mikrotoma. Novije metode za poboljšanje pripreme parafinskih preparata uključuju hibridno ugrađivanje parafina, krioseciranje. Iako ove metode djelomično poboljšavaju brzinu i kvalitetu sekcije parafina, one čine sekciju mnogo većom, a komercijalni sustavi prijenosa sekcija su skupi (slika 8.) (Qin i sur. 2018).



Slika 8. Poprečni presjek repa zebriće korištenjem parafinskog voska s bojanjem hematoksilinom i eozinom A. 3 dana nakon oplodnje i B. 20 dana nakon oplodnje (bv= krvna žila; my= miosepta; m= miomer; no = notokord; sp= leđna moždina, dpf=„days post fertilization“- dana nakon oplodnje). Dorzalna strana je na vrhu (preuzeto i prilagođeno iz Saud i sur. 2009).

1.6.2. Priprema kriopreparata zebrice

Prilikom izrade kriopreparata tkivo se prvo fiksira određenim fiksativom, uklopi u medij za uklapanje uzoraka, zamrzne i nakon toga izreže na debljinu između 3-20 μm pomoću kriomikrotoma pri temperaturi od $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Ferguson i Shive 2019, Brock 2014, Wong 1993). Tokuyasu je uveo metodu korištenja infiltracije saharoze kako bi se smanjila količina vode u tkivu koje je potrebno prerezati. Dodatak saharoze omogućio je glatki blok za rezanje, a također je smanjio štetu tijekom smrzavanja koju uzrokuju kristali leda te je dobiven prerez debljine od samo $3\mu\text{m}$ (Barthel i Raymond 1990, Tokuyasu 1973). Iako se za imunohistokemiju i imunofluorescenciju uglavnom koriste cijeloviti uzorci za analizu ekspresije proteina u embrijima zebrice, takvi uzorci mogu biti problematični za dobivanje preciznih podataka o kolokalizaciji proteina zbog toga jer je korištenjem svjetlosne/fluorescencijske mikroskopije teško razlikovati slojeve tkiva i vizualizirati ekspresiju proteina na razini jedne stanice u uzorcima (Ferguson i Shive 2019). Softverski programi za obradu slika općenito možda neće moći razlikovati površinsko obojenje u dubljim dijelovima uzorka. Ekspresija proteina koji se ne nalaze na ili pri površini uzorka može biti prikrivena jače izraženom ekspresijom istih proteina ili nespecifičnih obojenja drugih proteina i artefakata na površini, a što dovodi do netočnosti u analizi uzoraka. Također, tkiva zebrice su vrlo osjetljiva i podložna lomljenju zbog čega su kriopreparati bolji od parafinskih uzoraka za testove temeljene na fluorescenciji (Ferguson i Shive 2019). Iako su kriopreparati fizički manje stabilni od presjeka uzoraka uklopljenih u parafin ili smolu, općenito su bolji u očuvanju antigenosti, a time i u detekciji antigena pomoću imunofluorescencijske analize (Fischer i sur. 2006). Priprema kriopreparata ne uključuje korake dehidracije tipične za druge metode pripreme uzoraka, te se seciranje, obrada i promatranje uzoraka obično mogu izvesti u jednom danu (slika 9.) (Fischer i sur. 2006).

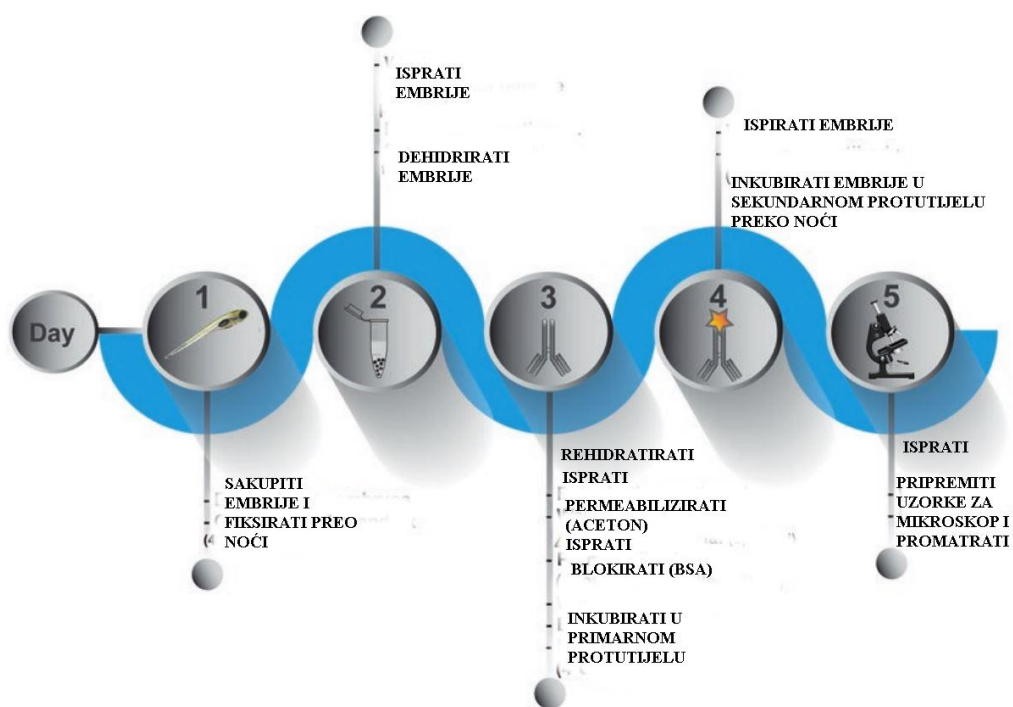


Slika 9. Mikrodisekcija gonada zebrice 5 dana nakon oplodnje A) Kriopreparat u kojemu su vidljive gonade (strelica) obojene NBT BCIP prije mikrodisekcije. B) Kriopreparati nakon mikrodisekcije gonada (preuzeto iz Jørgensen i sur. 2009).

1.6.3. Priprema cjelokupnih preparata zebrice

Cjelokupni preparati podrazumijevaju bojenje malih komadića tkiva, kao što su cijeli embriji zebrice, žabe roda *Xenopus*, miša ili kokoši, bez da se uzorci presijeku. Ova se tehnika pojavila kao moćan istraživački alat koji može pružiti dodatne informacije rutinskoj morfološkoj procjeni tkiva kada je teško presjeći embrije ili ličinke (Santos i sur. 2018). U usporedbi s konvencionalnim metodama pripreme tkiva koje zahtijevaju ugradnju parafina, odsijecanje i vađenje antigena, ova metodologija je korisna za ispitivanje prostorno-vremenske ekspresije molekula budući da je morfologija tkiva i dinamika ekspresije znatno očuvana uz minimalnu dehidraciju tkiva i fizičko oštećenje (Kogata i Howard 2013). Prednosti ove tehnike su što: održava integritet tkiva, kao i strukturu i lokalizaciju stanica, pruža dobre trodimenzionalne informacije visoke razlučivosti o mjestu lokalizacije proteina ili stanica, osobito je korisna za rijetke stanice čiju je lokalizaciju teško otkriti unutar najdubljih, centralno smještenih tkiva i organa, kao što su stanice u koštanoj srži, nije potreban presjek zbog čega ima manje oštećenja strukture tkiva i bolje je očuvanje morfologije tkiva te ušteda vremena pripreme u usporedbi sa serijskim presjecima tkiva/organizama (Zhong 2020). No ovakvi preparati imaju i neke nedostatke, a to su: skupa konfokalna mikroskopija koja je potrebna za dobivanje slike uzorka i prisutnost ograničenja dubine za penetraciju protutijela

(<150 μm) koje iznosi 300 μm za imunobojenje (Zhong 2020). Priprema uzoraka za imunofluorescenciju uključuje tri glavna koraka: fiksaciju, koja se koristi za stabilizaciju strukture stanica; permeabilizaciju staničnih membrana koja omogućava protutijelima da dođu do antigenskih mjesta i bojenje koje uključuje inkubaciju s primarnim protutijelom, a zatim njegovo vezanje sa sekundarnim protutijelom koje ima vezanu molekulu za fluorescencijsku detekciju fluorofor/fluorokrom (slika 10.). U procesu bojenja moguće je istovremeno otkriti dva antigena u jednom preparatu, tehnikom koja se naziva dvostruka imunohistokemija, a koja je korisna, za primjerice identifikaciju i lokalizaciju različitih vrsta stanica i/ili lokaliziranje u istom uzorku tkiva (Santos i sur. 2018).



Slika 10. Shematski prikaz protokola za cjeloviti uzorak (engl. *whole-mount*) (preuzeto i prilagođeno iz Santos i sur. 2018).

1.7. Protutijela

Postoje dvije glavne podjele primarnih protutijela. Poliklonska protutijela općenito se sintetiziraju uz pomoć specifičnih peptida ili velikih regija proteina i mogu prepoznati brojne epitope. To znači da je vjerojatnije da će protutijelo unakrsno reagirati između vrsta i da će uspješno označavanje biti relativno neosjetljivo na fiksaciju (Macdonals 1999). Međutim, nespecifičnost vezanja se također

može povećati. Monoklonska protutijela, sintetizirana korištenjem mišjih hibridoma, prepoznaju pojedinačne epitope i stoga općenito imaju nižu razinu nespecifičnih vezanja. To također znači da je manje vjerojatno da će protutijelo prepoznati epitop kod drugih vrsta, osim ako je protein visoko konzerviran. Također, protutijelo može biti osjetljivo na fiksaciju (Macdonals 1999). Protutijela se sastoje od dvije vrste lanaca (teških i lakih), od kojih svaki sadrži vrlo raznoliku domenu koja veže antigen (varijablu). Segmenti gena V, D i J varijabilnih gena teškog lanca protutijela prolaze kroz niz rekombinacija kako bi se stvorio novi gen teškog lanca. Protutijela nastaju mješavinom rekombinacije genskih segmenata, diverzifikacijom sekvenci na spojevima tih segmenata i točkastim mutacijama unutar gena. Procjene imunološke raznolikosti za protutijela ili srodne T-stanične receptore mogu ekstrapolirati iz malih uzoraka na cijele sustave ili biti ograničene grubom rezolucijom gena imunoloških receptora (Weinstein i sur. 2009).

„Labome“ baza protutijela navodi oko 954119 protutijela nasuprot 88487 gena, uključujući 19044 ljudskih, 15677 mišjih i 14548 štakorskih gena. Za zebrice u Labome bazi podataka postoji 387 monoklonskih protutijela, 5433 poliklonskih antitijela i 37 rekombinantnih protutijela ribe zebrice (<https://www.labome.com/summary/zebrafish-genes.html>). Metode koje se koriste za analizu gena i protutijela su injektiranje, imunološko bojenje, označavanje *in situ*, *knock-down* ekspresija gena, ciljana mutageneza, transgenetski alati, mozaični eksperimenti, imunohistokemija i *in situ* hibridizacija (<https://www.labome.com/summary/zebrafish-genes.html>, Macdonald 1999). Kod zebrica, imunohistokemija se koristi za određivanje lokalizacije i ekspresije proteina. Dvostruko označavanje s protutijelom specifičnim za vrstu stanice i novim protutijelom za drugi protein od interesa identificiraju vrste stanica ili njihove unutarstanične strukture koje ga sadrže. Neka protutijela koriste se u kombinaciji s metodom *in situ* hibridizacije RNA za identifikaciju struktura i stanica koje izražavaju određenu glasničku RNA. Imunohistokemija je također korisna tehnika za pregled linija zebrica koje sadrže nasumične mutacije zbog mogućnosti vizualizacije suptilnih promjena u razvoju specifičnih struktura ili vrsta stanica (npr. neurona i aksona) (Macdonald 1999). Iako postoje brojna dostupna protutijela koja su odgovarajuće kvalitete, pronalaženje onih koja specifično djeluju kod zebrica je izazovnije i često zahtijeva testiranje i rješavanje problema s protutijelima za antigena sisavaca. Međutim, na tržištu postoji sve veći broj validiranih protutijela za ribe zebrice, a pojava tehnologije CRISPR/Cas9 omogućila je označavanje epitopa endogenih proteina putem genomskog inženjeringa. Međutim, ti su procesi dugotrajni i izazovni te zahtijevaju temeljitu provjeru funkcije proteina (Hammond-Weinberger i ZeRuth 2020). Neka od često

korištenih protutijela u modelu zebrice su specifična za proteine poput neurolina/alcama (Zn8) i Na^+/K^+ -ATPaze (<https://zfin.org/action/antibody/search>).

2. Cilj istraživanja

Imunohistokemijske metode predstavljaju svestran alat koji se može koristiti za karakterizaciju prostorno-vremenske ekspresije gotovo bilo kojeg proteina od interesa u organizmu. Pretežno su se koristile na različitim modelnim organizmima, ali uglavnom na glodavcima i ostalim sisavcima zbog čega nedostaje informacija o njihovom korištenju na drugim organizmima. Primjena imunohistokemijskih metoda na različitim modelnim organizmima može zahtijevati različite tehnike fiksacije, otopine za blokiranje, različito vrijeme inkubacije zbog debljine i sastava tkiva. Zebrica kao modelni organizam ima mnogo prednosti i zbog toga se sve više koristi u istraživanjima, ali još uvijek nedostaju informacije o različitim uvjetima i većem broju protutijela koji se mogu vezati za epitop od interesa u tkivu zebrice. Prednost metode cjelovitih uzoraka (*whole mount*) je što se tijekom mikroskopiranja uzorka ima pregled cijelog organizma bez da se tkivo mora rezati, te je bolja preglednost i lakše se može odrediti mjesto gdje je protein izražen. Koristeći metodu cjelovitih uzoraka zebrice, testirati ću učinke dvije vrste fiksacijskih otopina (4% PFA i Dentov fiksativ) na očuvanje tkiva i vezanje protutijela za tri različita membranska proteina (Na^+/K^+ -ATPaza, neurolin i Oct1). Uzorke ću dodatno podvrgnuti različitim temperaturama (37 °C, 70 °C i 95 °C) kako bi utvrdila učinak temperature na vezanje protutijela za navedena tri membranska proteina. Pretpostavka je da ću na taj način uspjeti odrediti optimalni protokol za daljnje korištenje navedenih protutijela koji omogućuje djelotvorno otkrivanje epitopa i učinkovitu lokalizaciju i analizu signala istraživanih proteina na cjelovitim uzorcima embrija zebrice.

Dakle, specifični ciljevi ovog diplomskog rada su:

- 1) odrediti optimalan postupak fiksacije embrija/ličinki zebrice za upotrebu u imunofluorescencijskoj analizi cjelovitog uzorka zebrice,
- 2) odrediti optimalne uvjete otkrivanja epitopa za provođenje imunofluorescencijske analize na cjelovitom uzorku embrija/ličinke zebrice sa monoklonskim protutijelima a6F za membranski protein α 1-podjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze i ZN-8 za membranski protein neurolin, te sa dizajniranim poliklonskim protutijelima za prijenosnik organskih kationa 1 (Oct1),

- 3) otkriti lokalizaciju proteina Oct1 u cjelovitom uzorku embrija/ličinke zebrice,
- 4) utvrditi prednosti/nedostatke korištenog pristupa za otkrivanje epitopa ciljanih proteina (Na^+/K^+ ATPazu, neurolin i Oct1).

3. Materijali i metode

3.1. Materijali

3.1.1. Opis pokusnih životinja i medija za razvoj embrija

- Ribe vrste *Danio rerio* (Hamilton, 1822) (Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska).

U ovom istraživanju koristila sam animalni model zebrice (*Danio rerio*), slatkovodne ribe porijeklom iz južne Azije koja pripada porodici Cyprinidae i redu Cypriniformes (Ge 2018). Prema IUCN (engl. *The International Union for Conservation of Nature*) crvenoj listi zebrice pripadaju najmanjem stupnju zabrinutosti i trenutno ne pripadaju ugroženim vrstama (<https://www.iucnredlist.org/>). Razmnožavaju se ovisno o sezoni i klimatskim uvjetima od travnja do kolovoza (Perry i sur 2010). Kao svejed se hrani zooplanktonom, malim kukcima, algama i drugim biljnim materijalom (slika 11.) (Ge 2018).



Slika 11. Razlika između mužjaka i ženke vrste zebrica (*Danio rerio*) (Preuzeto i prilagođeno sa web stranice: <https://www.aquariumnexus.com/wp-content/uploads/2020/01/zebra-danio-fish-male-vs-female.jpg>).

- 50 x otopina E3 medija za razvoj embrija čuvana pri temperaturi + 4 °C (pH 7,8) sastoji se od:
 - 7,305 g NaCl, 250 mM (Kemika, Hrvatska)

- 0,317 g KCl, 8,5 mM (Kemika, Hrvatska)
- 0,916 g CaCl₂, g 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
- 0,993 g MgSO₄, 16,5 mM (Kemika, Hrvatska)
- 500 mL deH₂O

3.1.2. Puferi, otopine i kemikalije za obradu uzoraka zebrice

3.1.2.1. Otopine za fiksaciju uzoraka embrija

- Otopina 4% paraformaldehida pripremljena u 1x fiziološkoj otopini puferiranoj fosfatnim puferom (1x PBS ili engl. *Phosphate Buffered Saline*; pH 7,4) sastoji se od:
 - 20 g PFA (Sigma, SAD)
 - 500 mL 1x PBS
- Otopina Dentovog fiksativa sastoji se od: 80% Metanol : 20% Dimetil sulfoksid = 4 : 1

3.1.2.2. Otopine za histokemijsku i imunofluorescencijsku analiza uzoraka

- Otopina 1x PBS (engl. *Phosphate Buffered Saline*; pH 7,4) sastoji se od:
 - 7,95 g NaCl, 140 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 200 mg KCl, 2,7 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1,14 g Na₂HPO₄, 8 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 272 mg KH₂PO₄, 2 mM (Kemika, Hrvatska)
 - 1 L deH₂O
- Otopina PBSt (pH 7,4) sastoji se od:
 - 1 L 1x PBS
 - 1 mL neionskog surfaktanta Tween 20 (Calbiochem, SAD)
- 20 % otopina natrijeva azida (NaN₃) sastoji se od:
 - 20 g NaN₃ (Fisher Scientific, SAD)
 - 100 mL deH₂O
- 25 % otopina za očuvanje fluorescencije sastoji se od:
 - 300 µL otopine za očuvanje fluorescencije Vectashield (Vector Laboratories, SAD)

- 900 μ L pufera za pripremu 10 % gela za razdvajanje proteina sastoji se od:
 - 18,17 g Tris (Sigma, SAD)
 - 100 mL deH₂O
 - 10 % HCl za prilagođavanje pH vrijednosti (Kemika, Hrvatska)
- Otopina Tris-HCl, (pH 9)
- Otopina 1% BSA (engl. *Bovine Serum Albumin*) sastoji se od:
 - 1 g BSA (Sigma, SAD)
 - 100 mL 1x PBS
- Aceton
- Destilirana voda

3.1.2.3. Protutijela korištena za imunofluorescencijske analize

- Primarna protutijela:
 - Protutijelo za protein α 1 podjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze (Na⁺/K⁺-Ab) – monoklonsko protutijelo proizvedeno u stanicama miša upotrebom imunizirajućeg peptida N-terminalnog kraja proteina Na⁺/K⁺-ATPaza (slijed aminokiselina između 27-55); 43 μ g/mL (a6F, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, Sveučilište Iowa, SAD).
 - Protutijelo za neurolin/alcam (CD166 antigen homolog A) – monoklonsko protutijelo proizvedeno u stanicama hibridoma miša (mijeloma linije SP 2/0) upotrebom cjelovitog proteina; 43 μ g/mL (ZN-8, *Developmental Studies Hybridoma Bank*, Sveučilište Iowa, SAD)
 - Protutijelo za Oct1 protein zebrice (zbOct1) – dizajnirano poliklonsko protutijelo proizvedeno u zecu upotrebom imunizirajućeg peptida/haptena sa slijedom aminokiselina TPEHWCRDPGVSEIRERC koji se topološki nalazi na izvanstaničnoj petlji (45-60 aminokiselinski slijed) Oct1 proteina zebrice; 47 μ g/mL (Genosphere Biotechnologies, Francuska).
 - Protutijelo za Oct1 protein zebrice (zbOct1) – dizajnirano poliklonsko protutijelo proizvedeno u zecu upotrebom imunizirajućeg peptida/haptena sa slijedom aminokiselina CEHPNRNKENPQQSQQ koji se topološki nalazi na karboksilnom terminalnom kraju (530-544 aminokiselinski slijed) Oct1 proteina zebrice; 65 μ g/mL (Genosphere Biotechnologies, Francuska).

- Sekundarna protutijela:
- DAM–CY3 (engl. *Donkey Anti-Mouse-CY3*) – magareće protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno fluorescencijskom bojom CY3; 1,2 µg/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD).
- GAR- CY3 (engl. *Goat Anti-Rabbit-CY3*) – kozje protutijelo protiv imunoglobulina klase G (IgG) obilježeno fluorescencijskom bojom CY3; 1,7 µg/mL (Jackson ImmunoResearch Laboratories, SAD).

3.1.3. Laboratorijska oprema i potrošni materijal

- Fluorescencijski mikroskop: OPTON III RS (Opton Feintechnik, Njemačka)
- Digitalna kamera za fluorescencijski mikroskop: Spot RT (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- Hladnjaci (4°C) i zamrzivači (-20°C i -80°C)
- Računalo: Asus MSGW
- Tehnička vaga
- Analitička vaga
- Vibracijska miješalica: Genie 2 Vortex (Fisher Scientific, SAD)
- Orbitalna mješalica: Thermolyne BIG BiII Orbital Shaker (Thermolyne, SAD)
- Automatske pipete s promjenjivim volumenom (0,1-2,5 µL; 0,5-10 µL; 2-20 µL; 20-200 µL i 100-1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Nastavci za pipete (10, 20, 100, 200, 1000 µL) (Eppendorf, Njemačka)
- Pokrovna stakalca Menzel-Glaser (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Predmetna stakalca Superfrost/Plus (Thermo Scientific: Menzel-Glaser, SAD)
- Kutije za mikroskopska stakalca (Heathrow Scientific, SAD)

3.1.4. Računalni programi

- SPOT RT v3.4 (Diagnostic Instruments Inc., SAD)
- Adobe Photoshop 6.0 (<http://www.adobe.com>)
- ImageJ/FIJI 1.53c (<http://imagej.nih.gov/ij/>)
- Statistica 14.0.0.15 (<http://tibco.com>)

3.2. Metode

3.2.1. Uzgoj i uzorkovanje modelnog organizma

Za ovo istraživanje koristila sam spolno nezrele embrije (5. dana nakon oplodnje) ribe vrste *Danio rerio* koje su uzgojene u Laboratoriju za ekotoksikologiju mora Instituta Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu. Uzorkovala sam 30 jedinki starosti 5 dana nakon oplodnje. Akvarijski sustav u kojem su sve jedinke uzgojene bio je PP-Module (AquaSchwarz, Njemačka) (slika 12.). Temperatura vode u kontroliranom akvarijskom sustavu održavana je konstantnom između 27 °C do 29 °C, pH vrijednost vode od 7 do 8,2, provodljivost 1000-12000 µS, a uvjeti svjetla i tame su održavani u odnosu 14h:10h. Akvarijski sustav je sadržavao vodu dobivenu reverznom osmozom vodovodne vode sa dodatkom smjese soli za akvarije. Korištena voda prije ponovnog uvođenja u sustav prolazi kroz filтере sa porama veličina 120 i 50 µm, biološki filter (Siporax) koji razgrađuje organske dušikove spojeve (npr. amonijak), apsorpcijski filter s aktivnim ugljenom koji uklanja neuklonjene organske spojeve i čestice te se još dodatno dezinficira ultraljubičastim filterom odnosno UV vodenom svjetiljkom koja uklanja moguću mikrobiološku kontaminaciju poput bakterija.



Slika 12. Sustav za uzgoj zebrice (Preuzeto sa: <https://www.plexx.eu/wp-content/uploads/2020/06/labreedzebsystem.png>).

Ribe je bilo potrebno hraniti jednom dnevno sa standardnom ribljom hranom odgovarajuće veličine (Gemma Micro, Skretting France). Za dobivanje embrija u ovom istraživanju mriještene su odrasle muške i ženske jedinke starosti 1-1,5 godine u mrijesticama u omjeru muški vs. ženski spol 3:1 (Slika 13.). Kako bi se ribe potaknulo na mrijest svijetla su upaljena u jutarnjim satima između 8-9h. Isti dan popodne između 16-17h oplodeni mrijest je prenijet u petrijevu zdjelicu sa E3 medijem te su odloženi u inkubator na 28 °C do uzorkovanja koje se provodilo 5 dana nakon oplodnje (slika 14.). Uzgoj i mrijest riba proveli su djelatnici Laboratorija za molekularnu ekotoksikologiju na Institutu Ruđer Bošković. Sva istraživanja na životinjama su odobrena od Etičkog povjerenstva IRB, Nacionalnog povjerenstva za dobrobit životinja i Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (525-10/124120-9) prilikom odobravanja znanstveno-istraživačkog projekta DANIOTRANS (HRZZ-IP-2019-04-1147, voditelj: dr. sc. Tvrtko Smital) financiranog sredstvima Hrvatske zaklade za znanost.



Slika 13. Mrijestilica za zebrice (preuzeto sa: <https://www.scanbur.com/Admin/Public/GetImage.ashx?Image=/Files/Images/A1226575.jpg&Format=jpg&Height=450&Crop=0&DoNotUpscale=true>).



Slika 14. Inkubator (preuzeto sa: <https://www.nv-lab.ru/images/upload/editor3612.jpg>).

3.2.2. Fiksacija embrija

Za potrebe imunofluorescencijske analize uzoraka cjelovitih embrija zebrice koristila sam modificirani protokol za imunofluorescenciju cjelovitih uzoraka embrija ribe zebrice (Inoue i Wittbrodt 2011). Prije svega embrije starosti 5 dana sam podijelila u dvije skupine. Jednu skupinu sam fiksirala sa fiksativom 4% PFA, a drugu sa Dentovim fiksativom koje sam direktno dodavala u epruvete sa embrijima. U svakoj od dvije skupine (N=90 embrija po skupini) je bilo 30 jedinki za svaki od 3 uvjeta zagrijavanja. Embriji su se inkubirali preko noći u navedenim otopinama za fiksaciju. Slijedeći dan embrije sam isprala 3 puta po 10 min sa 1xPBS na orbitalnu miješalicu.

3.2.3. Obrada uzoraka embrija zebrice pri predodređenim temperaturama

Nakon ispiranja 180 embrija inkubirala sam ih u 150 mM Tris-HCl (pH 9,0) 5 min nakon čega je slijedilo zagrijavanje uzoraka (N=10 embrija/epruveti) pri 3 različite temperature. Temperature na kojima sam zagrijavala uzorke su 37°C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min. Nakon zagrijavanja, uzorke sam odložila 5 min na led nakon čega sam isprala uzorke 2 puta po 10 min sa 1x PBS te potom 2 puta po 5 min sa dH₂O. Nakon toga, kako bih poboljšala permeabilizaciju tkiva, a za optimalnu penetraciju i vezanje protutijela za protein od interesa u cjelovitom uzorku sve embrije sam tretirala sa acetonom i stavila na 20 minuta pri – 20 °C.

3.2.4. Imunofluorescencijska analiza cjelovitog uzorka embrija zebrice

Nakon što su embriji inkubirani u acetonu, isprala sam ih 2 puta po 5 min sa dH₂O i 2 puta po 10 min sa 1x PBSt. Potom sam uzorke inkubirala u 1% BSA tijekom 1 h u frižideru na 4 °C, a potom u primarnom protutijelu za jedan od ciljanih proteina (Na⁺/K⁺ ATPaza, Oct1, neurolin u razrjeđenju od 1 : 10) tijekom noći pri 4 °C. Uzorke obrađene na taj način isprala sam po 2 puta 5 min sa 1x PBSt i inkubirala u sekundarnom protutijelu. Ovisno o tome koje sam primarno protutijelo koristila inkubirala sam uzorke u GAR-CY3 protutijelu (razrjeđenje 1 : 800) nakon što su uzorci prethodno inkubirani u primarnim protutijelima za protein Na⁺/K⁺ ATPazu i Oct1, a u DAM-CY3 protutijelu (razrjeđenje 1 : 400) nakon što su uzorci inkubirani sa protutijelom za neurolin tijekom noći pri 4 °C. Razrjeđenja primarnih i sekundarnih protutijela su pripremana u 1x PBS + 0,02 % NaN₃. Tako pripremljene i obrađene uzorke sam prenijela na predmetno stakalce (dva / stakalce) pomoću pipete i okružila vazelinom u obliku kvadrata te potom dodala ~10 µL medija za očuvanje fluorescencije *Vectashield* i poklopila lagano sa pokrovnim stakalcem.

3.2.5. Prikupljanje i obrada mikroskopskih slika

Kako bih odredila kvalitetu dobivenih cjelovitih uzoraka pri različitim uvjetima te lokalizaciju i ekspresiju proteina Na⁺/K⁺-ATPaze, neurolin i Oct1 koristila sam fluorescencijski mikroskop OPTON III RS pri povećanjima od 100 puta. Digitalnu kameru SPOT RT sa pridruženim SPOT RT v3.4 programom upotrijebila sam za prikupljanje mikroskopskih slika na fluorescencijskom mikroskopu (Slika 15.).



Slika 15. Prikaz fluorescencijskog mikroskopa (Preuzeto sa: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/d/dd/Olympus-BX61-fluorescence_microscope.jpg/660px-Olympus-BX61-fluorescence_microscope.jpg).

Mikroskopske slike koje sam prikupila obradila sam i analizirala računalnim programom ImageJ/FIJI 1.53c. Za analizu obojenja većeg broja mikroskopskih slika dijelova tijela zebriće koristila sam Macro algoritam. Kod Macro algoritma prvo sam prebacila slike u 8 bit-ne slike i onda pomoću alata *Threshold* segmentirala bojanja od interesa. Takvim postupkom sam mogla dobiti točna mjerenja intenziteta fluorescencijskog obojenja koje sam koristila za daljnju statističku analizu ekspresije.

3.2.6. Prikaz i statistička obrada rezultata

Za bolji prikaz rezultata napravila sam slikovne panele pomoću računalnog programa ImageJ/FIJI 1.53c koristeći njegov umetak (engl. *Plugin*) ScientiFig. Također, neki slikovni paneli su minimalno obrađeni računalnim programom Adobe Photoshop 6.0. Za statističku analizu mjerenja intenziteta obojenja (N=30 uzoraka / tretmanu ili skupini) koristila sam Faktorijalnu ANOVA analizu (uz faktore: vrsta otopine fiksativa i vrsta tretmana uzoraka) i Duncan posthoc test koji su dio računalnog programa Statistica 14 (TIBCO, SAD) uz razinu statističke značajnosti $p < 0,05$. Vrijednosti prikazane na grafičkim prikazima predstavljaju srednju vrijednost mjerenja intenziteta obojenja fluorescencijske boje cijanin 3 (CY3) \pm standardnu grešku.

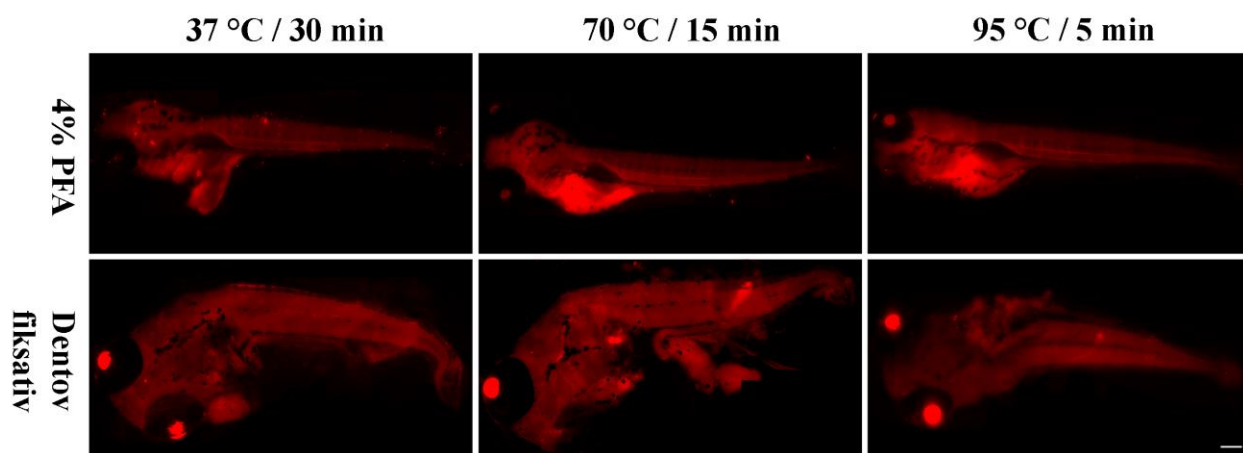
4. Rezultati

Kako bi utvrdili optimalne uvjete za upotrebu četiri različita protutijela namijenjenih za vezanje i detekciju 3 različita membranska proteina (komercijalna protutijela za Na⁺/K⁺-ATPazu i neurolin te dva dizajnirana protutijela za Oct1), provedene su imunohistokemijske/imunofluorescencijske analize korištenjem 6 različitih uvjeta koji su uključivali upotrebu različitih fiksativa (4% PFA i Dentov fiksativ) i pristupa obrade uzoraka pri tri različite temperature / vremena inkubacije (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). Za utvrđivanje potencijalno nespecifičnog vezanja / obojenja sekundarnih protutijela (DAM-CY3 i GAR-CY3) u cjelovitim uzorcima zebrice prvo je provedena imunohistokemijska/imunofluorescencijska analiza pri svih šest uvjeta koristeći navedena sekundarna protutijela (Slika 16. i slika 17.). Nakon utvrđivanja mogućih nespecifičnih vezanja / obojenja sekundarnih protutijela u cjelovitim uzorcima zebrice pristupilo se provedbi eksperimenata indirektno imunofluorescencije koji su uključivali upotrebu navedenih primarnih i odgovarajućih sekundarnih protutijela (Slike 18-21). Nadalje, nakon utvrđenih optimalnih uvjeta za upotrebu pojedinog primarnog protutijela provedena je analiza intenziteta obojenja kod onih protutijela čiji su rezultati lokalizacije upućivali na specifično vezanje protutijela za protein od interesa (Slika 18-23).

4.1. Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela DAM-CY3 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

Za potrebe korištenja sekundarnog protutijela DAM-CY3 na cjelovitim uzorcima embrija zebrice razvojnog stadija 120 dana nakon oplodnje, tj. 120 hpf (engl. *hours post fertilization*) u svrhu imunohistokemijske / imunofluorescencijske analize u kombinaciji sa monoklonskim protutijelima za Na⁺/K⁺-ATPazu i neurolin, provedena je imunofluorescencijska analiza obojenja samog sekundarnog protutijela pri šest različitih uvjeta. Rezultati mikroskopske analize pokazali su postojanje nespecifičnog obojenja u predjelu žumanjčane vreće kod uzoraka fiksiranih 4% PFA i obrađenih / inkubiranih pri temperaturi 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min (slika 16). Također, kod istih uzoraka bilo je vidljivo nespecifično obojenje leće oka embrija zebrice blažeg intenziteta koje je ovisilo o uvjetu inkubacije (37 °C / 30 min < 70 °C / 15 min < 95 °C / 5 min). U odnosu na njih, uzorci fiksirani Dentovim fiksativom imali su nespecifično obojenje leće oka jakog intenziteta

neovisno o uvjetima inkubacije (slika 16.). Osim navedenih nespecifičnih obojenja, nisu opažena druga obojenja koja bi se mogla okarakterizirati kao nespecifična obojenja sekundarnog protutijela.

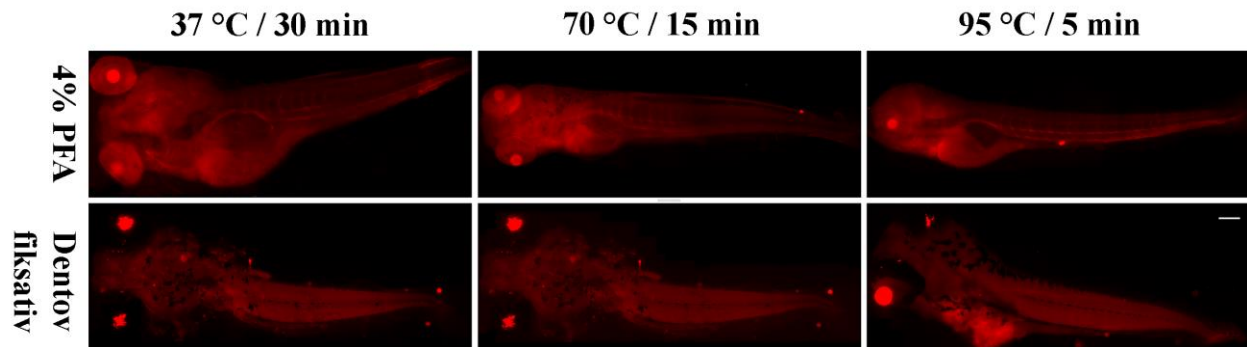


Slika 16. Imunofluorescencijska mikroskopska analiza specifičnog vezanja sekundarnog protutijela DAM-CY3 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). Emisija fluorescencijske boje CY3 promatrana je pod filterom svjetlosti koji propušta svjetlost valne duljine 566-646 nm. Veličina mjerila je 150 μ m.

4.2. Nespecifično vezanje sekundarnog protutijela GAR-CY3 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

Za potrebe korištenja sekundarnog protutijela GAR-CY3 na cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) u svrhu imunohistokemijske / imunofluorescencijske analize u kombinaciji sa dizajniranim poliklonskim protutijelima za Oct1 (epitop 45-60 aa i epitop 530-544 aa), provedena je imunofluorescencijska analiza obojenja samog sekundarnog protutijela pri šest različitih uvjeta. Rezultati mikroskopske analize pokazali su postojanje blagog nespecifičnog obojenja žumanjčane vreće embrija zebrice fiksiranim 4% PFA u uvjetima inkubacije pri 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min te uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom u uvjetima inkubacije pri 95 °C / 5 min (slika 17). Osim toga opaženo je nespecifično bojanje leće oka embrija zebrice jakog intenziteta neovisno o vrsti upotrijebljenog fiksativa i uvjetu inkubacije (37 °C / 30 min = 70 °C / 15 min = 95 °C / 5

min) (slika 17). Osim navedenih opažena su pojedinačna nespecifična obojenja mikroskopskih artefakata koji nisu pripadali uzorku već onečišćenju samih uzoraka stranim materijalom (npr. komadići staničevine) (slika 17.).



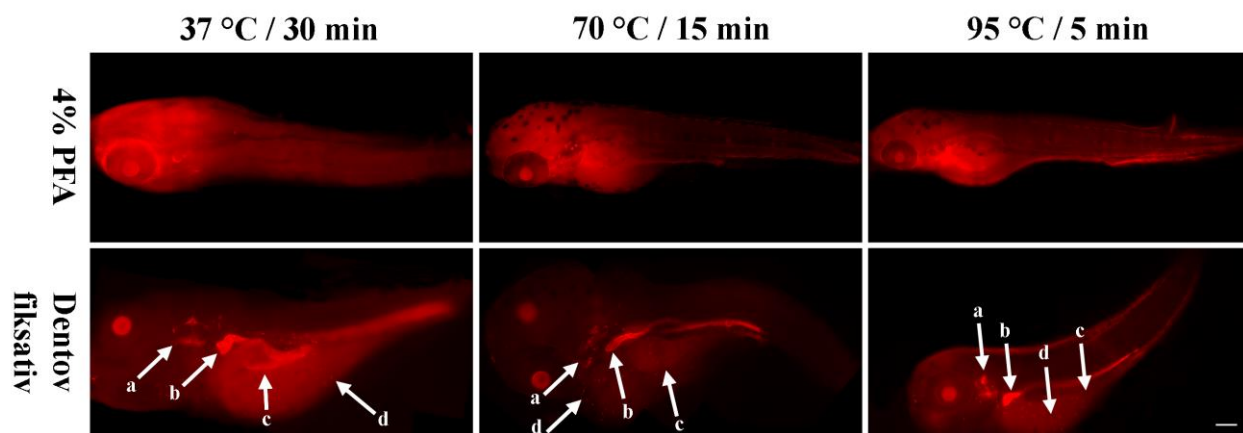
Slika 17. Imunofluorescencijska mikroskopska analiza nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela GAR-CY3u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). Emisija fluorescencijske boje CY3 promatrana je pod filterom svjetlosti koji propušta svjetlost valne duljine 566-646 nm. Veličina mjerila je 150 μ m.

4.3. Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela za Na⁺/K⁺-ATPazu u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

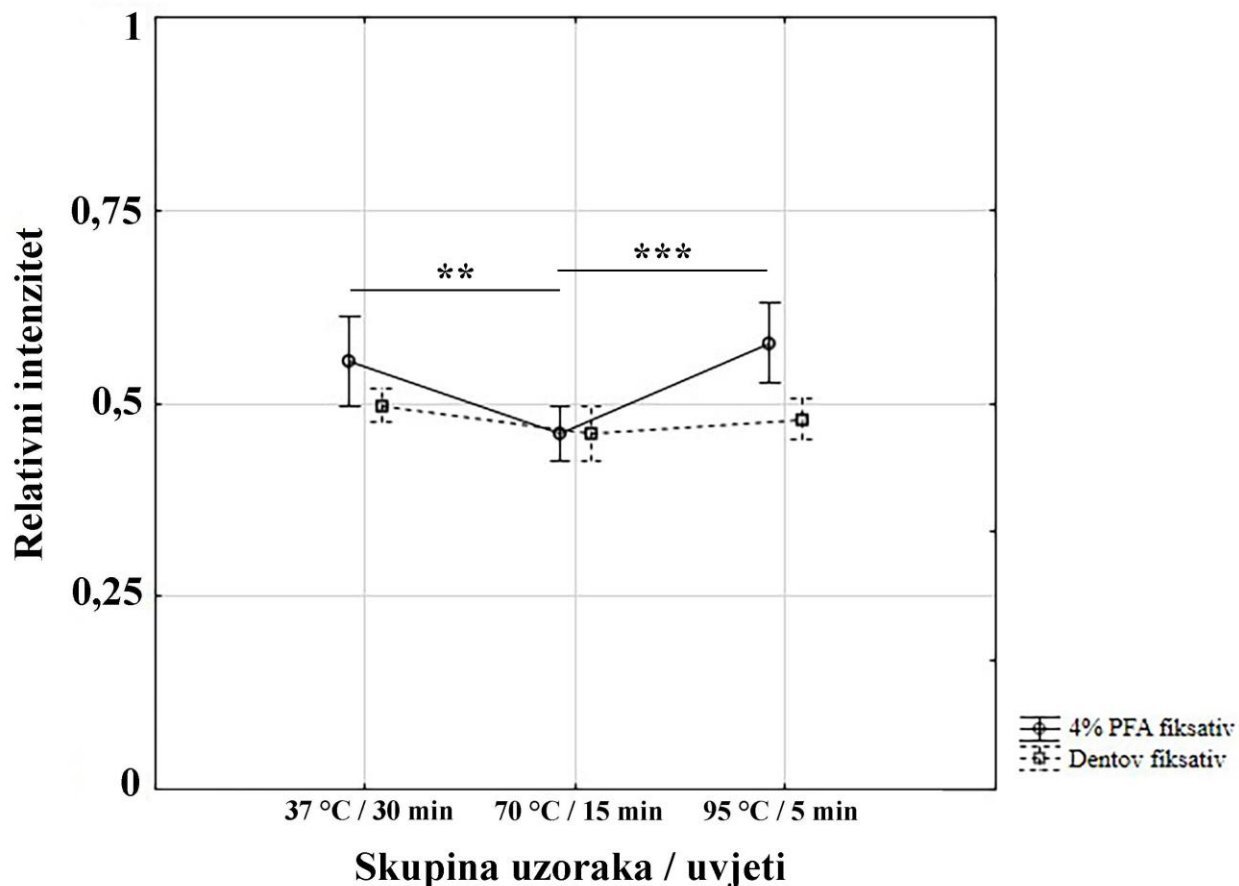
Kako bi utvrdili optimalnu metodu otkrivanja antigena za uspješno vezanje protutijela za α 1 podjedinicu Na⁺/K⁺-ATPaze i detekciju istoimenog proteina u cjelovitim uzorcima embrija zebrice, istraženo je 6 različitih uvjeta koji su uključivali dva različita fiksativa (4% PFA i Dentov fiksativ) i inkubaciju pri 3 različite temperature. Rezultati mikroskopske analize pokazali su da je lokalizacija Na⁺/K⁺-ATPaze u cjelovitim embrijima zebrice bila uspješna i vidljiva kod uzoraka koji su bili fiksirani Dentovim fiksativom neovisno o temperaturi inkubacije (slika 18.). Tako je Na⁺/K⁺-ATPaza lokalizirana u bazolateralnim membranama unutarnjeg uha (slika 18. a), pronefrosa (slika 18. b), srednjeg i stražnjeg crijeva (slika 18. c) i plazmatske membrane ionocita bogatih proteinom Na⁺/K⁺-ATPazom (slika 18. d). Kod cjelovitih uzoraka embrija zebrice koji su bili inkubirani u 4% PFA nije bila vidljiva karakteristična lokalizacija navedenog proteina već su

nespecifična obojenja bila u području glave, oka (slika 18; 37 °C / 30 min), žumanjčane vreće (slika 18; 70 °C / 15 min) i ruba repa samog embrija (slika 18; 95 °C / 5 min).

Analiza intenziteta obojenja na mikroskopskim slikama uzoraka cjelovitih embrija iz svih ispitanih uvjeta potvrdila je značajno različite učinke vrste fiksativa na intenzitet obojenja za Na⁺/K⁺-ATPazu (prilog 1) (Faktorijalna ANOVA/Duncan analiza, p < 0.05). Također, utvrdila je postojanje značajnih razlika u intenzitetu obojenja između uzoraka fiksiranih 4% PFA i obrađenih pri 37 °C / 30 min i 70 °C / 15 min te 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min (** p < 0.01, *** p < 0.001) (slika 19.). Kod uzoraka fiksiranih Dentovim fiksativom nije bilo značajnih razlika u intenzitetu obojenja između ispitivanih skupina (slika 19.).



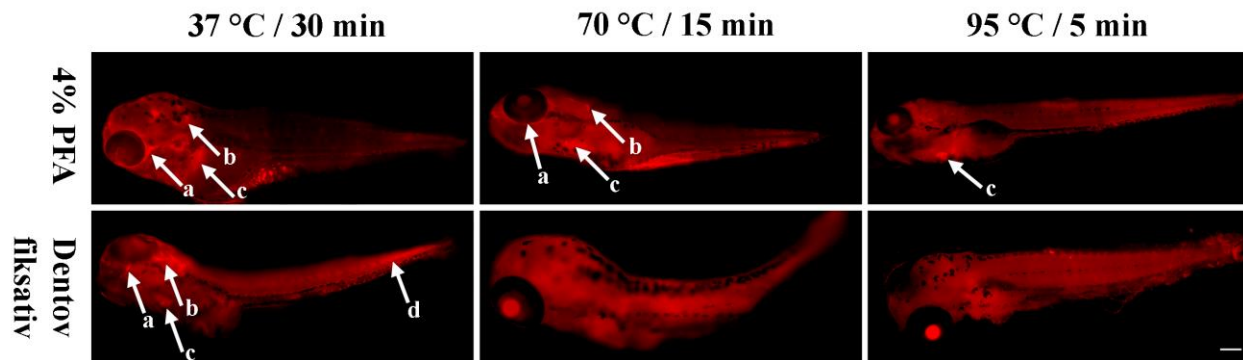
Slika 18. Imunofluorescencijska analiza vezanja primarnog protutijela $\alpha 1$ podjedinice proteina Na⁺/K⁺-ATPaze (sekundarno protutijelo DAM-CY3) u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). U uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom i inkubiranim pri 37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min vidljivo je specifično vezanje primarnog protutijela u (strelice): a. bazolateralnim membranama epitela unutarnjeg uha, b. bazolateralnim membranama epitela pronefrosa, c. bazolateralnim membranama srednjeg i stražnjeg crijeva i d. membranama ionocita bogatih proteinom Na⁺/K⁺-ATPaza. Slova a-d predstavljaju obilježena mjesta lokalizacije proteina Na⁺/K⁺-ATPaza u cjelovitim uzorcima zebrice. Veličina mjerila je 150 μ m.



Slika 19. Analiza relativnog intenziteta fluorescentnog obojenja CY3 sekundarnog protutijela (DAM-CY3) vezanog za primarno protutijelo koje se specifično vezalo za $\alpha 1$ podjedinicu proteina Na^+/K^+ -ATPaze u cjelovitim uzorcima embrija zebriice fiksiranih 4% PFA i Dentovim fiksativom 24 h (N = 30). Faktorijsalna ANOVA/Duncan posthoc analiza pokazala je značajno različit učinak fiksativa na intenzitet obojenja uzorka embrija zebriice ($p < 0.05$). Također pokazala je statistički značajnu razliku između uzoraka fiksiranih 4% PFA fiksativom i obrađenih pri 37 °C / 30 min i 70 °C / 15 min te 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Između ostalih skupina nije zabilježena statistički značajna razlika. Vrijednosti na grafičkom prikazu predstavljaju srednju vrijednost mjerenja intenziteta fluorescentnog obojenja CY3 \pm standardnu grešku.

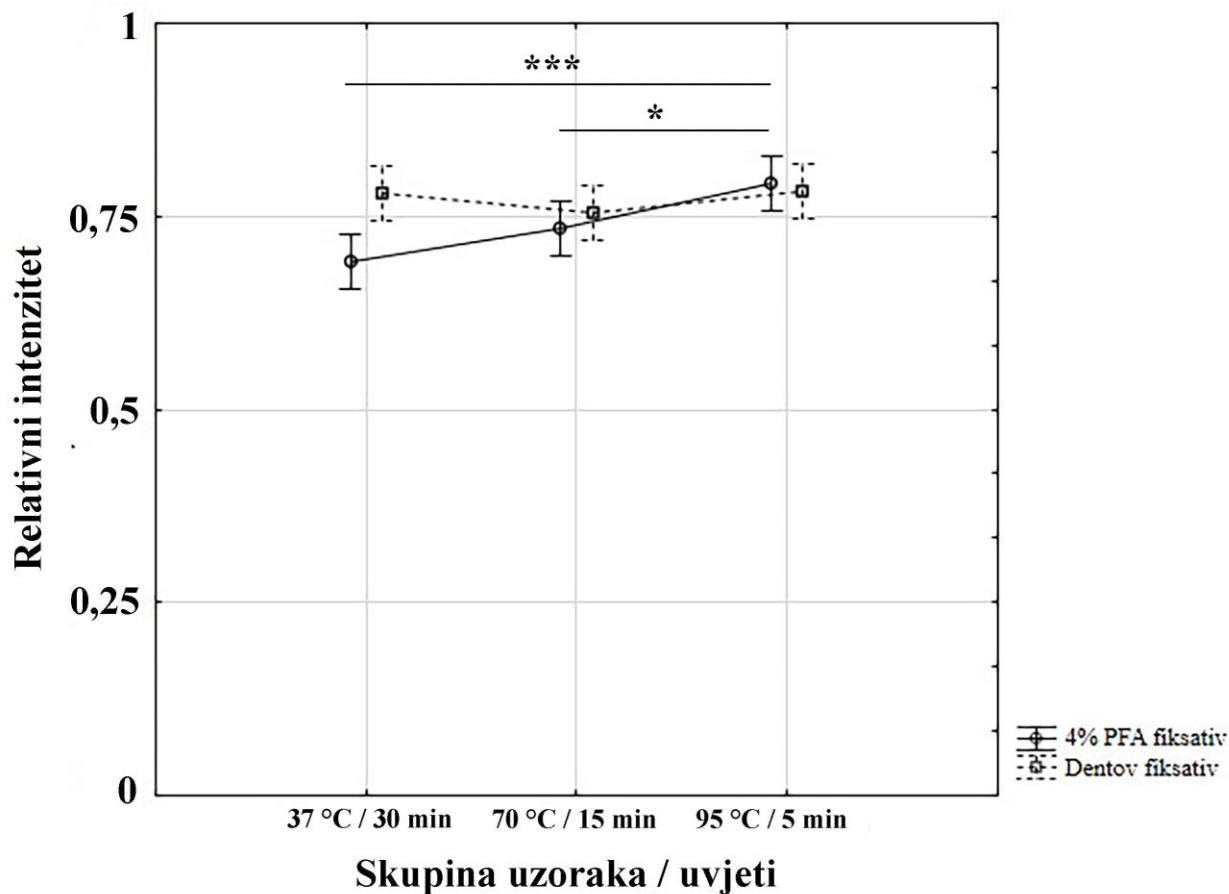
4.4. Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela za neurolin u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

Kako bi utvrdili optimalnu metodu otkrivanja antigena za uspješno vezanje protutijela za neurolin i detekciju istoimenog proteina u cjelovitim uzorcima embrija zebrice, istraženo je 6 različitih uvjeta koji su uključivali dva različita fiksativa (4% PFA i Dentov fiksativ) i inkubaciju pri 3 različite temperature. Rezultati mikroskopske analize pokazali su da je lokalizacija neurolina u cjelovitim embrijima zebrice bila uspješna i vidljiva kod uzoraka koji su bili fiksirani 4% PFA i inkubirani pri temperaturi od 37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i djelomično uspješna pri 95 °C / 5 min. Najuspješnija lokalizacija neurolina je bila u uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom i inkubiranim pri temperaturi od 37 °C / 30 min (slika 20.). Naime, iz rezultata mikroskopske analize je vidljivo da je Dentov fiksativ i 37 °C / 30 min pridonio vezanju na neurolin u membrani aksona ganglijskih stanica mrežnice, membrani aksona neurona u središnjem dijelu mozga, membrani stanica srčanog mišića i membrani somitskih mišića trupa i repa embrija zebrice (slika 20.). Kod uzoraka obrađenim drugim uvjetima nisu pronađena karakteristična mjesta vezanja protutijela za protein neurolin.



Slika 20. Imunofluorescencijska analiza vezanja primarnog protutijela za protein neuroilin (alcam / ZN-8; sekundarno protutijelo DAM-CY3) u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). U uzorcima fiksiranim 4% PFA ovisno o uvjetima inkubacije vidljivo je specifično vezanje primarnog protutijela u (strelice): a. membrani aksona ganglijskih stanica mrežnice, b. u membrani aksona neurona u središnjem dijelu mozga, c. membrani stanica srčanog mišića i d. membrani somitskih mišića trupa i repa embrija zebrice. Slova a-d predstavljaju obilježena mjesta lokalizacije proteina neuroilin u cjelovitim uzorcima zebrice. Veličina mjerila je 150 μ m.

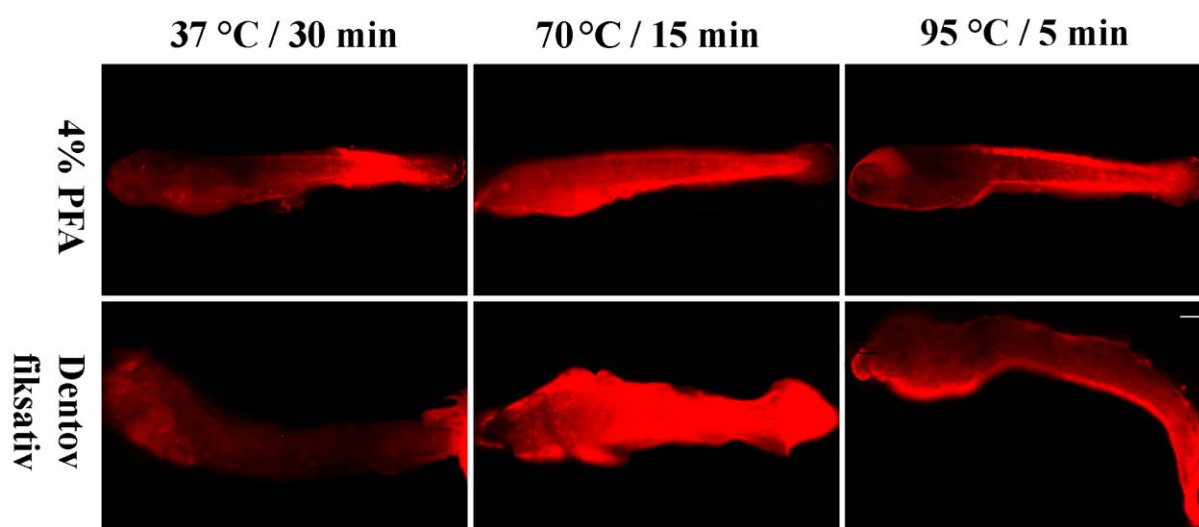
Analiza intenziteta obojenja na mikroskopskim slikama uzoraka cjelovitih embrija iz svih istraženih skupina / uvjeta potvrdila je značajno različit učinak vrste fiksativa na intenzitet obojenja za neuroilin (prilog 2) (Faktorijalna ANOVA/Duncan analiza, $p < 0.05$). Nadalje, ista analiza je utvrdila postojanje značajnih razlika u intenzitetu obojenja između uzoraka fiksiranih 4% PFA i obrađenih pri 37 °C / 30 min i 95 °C / 15 min te 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$) no ne i između 37 °C / 30 min i 70 °C / 15 min (20). Također, ista analiza nije utvrdila razlike u intenzitetu obojenja između uzoraka fiksiranih Dentovim fiksativom (slika 21.).



Slika 21. Analiza relativnog intenziteta fluorescentnog obojenja CY3 sekundarnog protutijela (DAM-CY3) vezanog za primarno protutijelo koje se specifično vezalo za protein neurolin u cjelovitim uzorcima embrija zebrice fiksiranih 4% PFA i Dentovim fiksativom 24 h (N = 30). Faktorijsalna ANOVA/Duncan posthoc analiza pokazala je značajno različite učinke fiksativa na intenzitet obojenja uzorka embrija zebrice ($p < 0.05$). Također pokazala je značajnu razliku u intenzitetu obojenja između uzoraka fiksiranih 4% PFA i obrađenih pri 37 °C / 30 min i 95 °C / 5 min te i 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min (***) $p < 0.001$, * $p < 0.05$). dok između ostalih skupina nije zabilježena statistički značajna razlika. Vrijednosti na grafičkom prikazu predstavljaju srednju vrijednost mjerenja intenziteta fluorescentnog obojenja CY3 ± standardnu grešku.

4.5. Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela A za Oct1 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

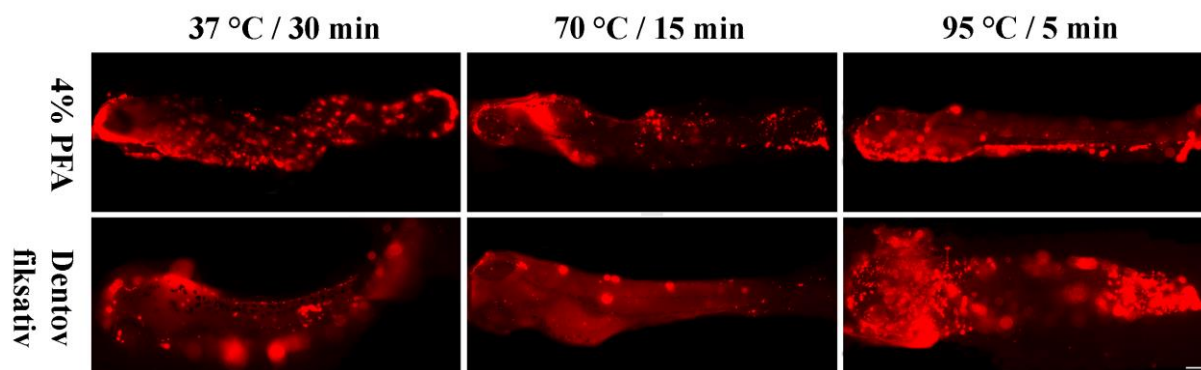
Za potrebe otkrivanja optimalnog uvjeta za vezanje dizajniranog protutijela za protein zebrice Oct1 (epitop 45-60 aa), istražen je učinak obrade uzoraka 6 različitih uvjeta kao i za prethodna dva komercijalno dostupna protutijela. Rezultati mikroskopskih ispitivanja nisu otkrili specifično vezanje protutijela Oct1. Naime, vezanje protutijela je bilo nespecifično i lokalizirano je na površinskom/rubnom dijelu uzorka u predjelu rubova glave, tijela i repa embrija zebrice (slika 22). Uzorak obojenja embrija zebrice bio je sličan neovisno o upotrebljenom fiksativu i ovisio je o uvjetima inkubacije uzoraka pri određenoj temperaturi. Stoga, iz mikroskopskih slika uzoraka embrija zebrice bilo je vidljivo da je najmanje nespecifičnog obojenja prisutno kod uzoraka inkubiranih pri 37 °C / 30 min, nešto više kod uzoraka inkubiranih pri 95 °C / 5 min, a najviše kod uzoraka inkubiranih pri 70 °C / 15 min (slika 22.). Zbog postojanja isključivo nespecifičnog obojenja u ovim uzorcima embrija zebrice analiza intenziteta obojenja nije provedena.



Slika 22. Imunofluorescencijska analiza vezanja primarnog protutijela za protein Oct1 (epitop 45-60 aa; sekundarno protutijelo GAR-CY3) u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). Veličina mjerila je 150 μm.

4.6. Učinak različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela B za Oct1 u cjelovitim uzorcima embrija zebrice

Za potrebe otkrivanja optimalnog uvjeta za vezanje drugog dizajniranog protutijela za protein zebrice Oct1 (epitop 530-544 aa), također je ispitan učinak obrade uzoraka embrija zebrice pri 6 različitih uvjeta kao što je provedeno i za prethodno ispitana protutijela. Rezultati mikroskopskih ispitivanja nisu otkrili specifično vezanje drugog protutijela za protein Oct1. Naime, vezanje protutijela, tj. vidljivo obojenje je bilo nespecifično te je karakterizirano točkastim uzorkom obojenja površine tijela embrija zebrice (slika 23.). Uzorak obojenja embrija zebrice bio je općenito sličan neovisno o upotrebljenom fiksativu i uvjetima inkubacije pri različitim temperaturama. Kod uzoraka embrija zebrice fiksiranih 4% PFA inkubiranih pri 37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min te fiksiranim Dentovim fiksativom pri 95 °C / 5 min, nespecifično obojenje je bilo vidljivo najrasprostranjenije i najintenzivnije. Najmanje nespecifičnog obojenja je bilo prisutno u uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom pri 37 °C / 30 min i 70 °C / 15 min (slika 23.). Zbog postojanja isključivo nespecifičnog obojenja u ovim uzorcima embrija zebrice analiza intenziteta obojenja nije provedena.



Slika 23. Imunofluorescencijska analiza vezanja primarnog protutijela za protein Oct1 (epitop 530 - 544 aa; sekundarno protutijelo GAR-CY3) u cjelovitim uzorcima embrija zebrice (120 hpf) fiksiranim 4% PFA i Dentovim fiksativom te inkubiranim na različitim temperaturama kroz različito vrijeme (37 °C / 30 min, 70 °C / 15 min i 95 °C / 5 min). Veličina mjerila je 150 µm.

5. Rasprava

Imunohistokemijsko otkrivanje lokalizacije proteina u tkivima organizama *in situ* sve se češće upotrebljava zbog svoje jednostavnosti i brze provedbe (Hammond-Weinberger i ZeRuth 2020). No, uspješnost otkrivanja antigena/epitopa pojedinog proteina među ostalim određuju čimbenici poput pH, molariteta, prirode i koncentracije korištenog pufera za otkrivanje antigena, klonalica korištenih za proizvodnju protutijela i razrjeđenje primarnog protutijela (D'Amico i sur. 2009). Štoviše, za metode otkrivanja antigena koje uključuju inkubaciju uzoraka pri određenoj temperaturi osim same temperature bitno je i trajanje inkubacije uzoraka (D'Amico i sur. 2009). U kontekstu imunolokalizacije i posljedičnog definiranja fiziološke uloge pojedinih proteina, zebrića se pokazala kao vrijedan modelni organizam sa mnogim prednostima (Hill i sur. 2005). No za upotrebu uzoraka tkiva/organa kao i cjelovitih uzoraka zebriće u imunofluorescencijskim analizama do danas ne postoji sveobuhvatni i jedinstven protokol koji obuhvaća veći broj uvjeta. Trenutno postoji prostor, ali i potreba da se postojeći imunohistokemijski protokoli prilagode, objedine i testiraju u svrhu bolje detekcije različitih proteina zebriće u cjelovitim uzorcima ovog organizma. Dosadašnja istraživanja su pokazala da su jedni od najboljih i najčešće korištenih fiksativa za imunohistokemiju zebriće Dentov fiksativ i 4% PFA (Donoho i Hasty 2002, Ichimura i sur. 2013). Stoga je u ovom radu ponajprije napravljena usporedba učinaka ova dva fiksativa na uspješnost vezanja četiri primarna protutijela za proteine Na⁺/K⁺-ATPaza, neurolin i Oct1.

Do danas razvijene i često korištene vrste protokola za otkrivanje antigena uključuju obradu uzoraka različitim organskim otapalima i kuhanje mikrovalovima u puferima određene pH vrijednosti (Brzica i sur. 2013, Hammond-Weinberger i ZeRuth 2020, Inoue i Wittbrodt 2011). Za iste je pokazano da mogu pospješiti vezanje protutijela za antigen od interesa u cjelovitim i/ili drugim histološkim preparatima i time olakšati njegovu detekciju *in situ* (Brzica i sur. 2013, Hammond-Weinberger i ZeRuth 2020, Inoue i Wittbrodt 2011). Stoga je osim učinka prethodno navedenih fiksativa testiran i učinak obrade cjelovitih uzoraka zebriće pri različitim temperaturama na uspješnost vezanja primarnih protutijela za proteine Na⁺/K⁺-ATPaza, neurolin i Oct1.

U ovom istraživanju rezultati imunohistokemijske analize vezanja protutijela za protein Na⁺/K⁺-ATPazu pokazali su da je obrada uzoraka Dentovim fiksativom dala najbolje rezultate neovisno o temperaturi pri kojoj su uzorci obrađeni. Naime, u uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom protein Na⁺/K⁺-ATPaza je lokalizirana u bazolateralnoj membrani unutarnjeg uha, pronefrosu, srednjem i stražnjem crijevu i plazmatskoj membrani ionocita bogatih istoimenim proteinom.

Navedeni rezultati slijede nalaze prethodnih istraživanja u cjelovitim preparatima i kriopreparatima zebrice koji pokazuju lokalizaciju ovog proteina u istim organima i stanicama (Blasiolo i sur. 2006, Canfield i sur. 2002, Drummond 2000, Wallace i sur. 2005, Hwang i Chou 2013, Drummond i sur. 1998, Xu i sur. 2017, Zhu i sur. 2017, Zimmer i sur. 2018, Levic i sur., 2020, Grisham i sur. 2013, Abbas i Whitfield 2009). Istraživanjem ekspresije gena α -podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze koristeći metodu *in situ* hibridizacije cjelovitih uzorka zebrice dodatno je otkrivena njegova ekspresija u srcu, leći oka, leđnoj moždini, mozgu, mukoznim stanicama, olfaktornoj plakodi i skeletnim mišićima (Canfield i sur. 2002). To upućuje da lokalizacija proteina α -podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u zebrici još nije u potpunosti istražena te da se možda mogu upotrijebiti i druga protutijela za lokalizaciju ovog proteina u prethodno navedenim organima/tkivima zebrice.

Prethodna istraživanja koja su koristila Dentov fiksativ, fiksirali su uzorke pri različitim temperaturama u rasponu od 4 °C do -20 °C i pri različitom vremenu trajanja od 2h do 8h, odnosno preko noći (Drummond i sur. 1998, Abbas i Whitfield 2009, Xu i sur. 2017). Neka od prethodnih istraživanja nisu koristila postupke dehidracije i hidratacije uzoraka prije inkubacije u protutijelu za α -podjedinicu Na^+/K^+ -ATPaze nego su ih odmah inkubirali s protutijelom i uklopili uzorke u gel (Drummond i sur. 1998). Međutim, u jednom istraživanju se provelo ispiranje i ponavljanje dehidracije i hidratacije uzoraka sa otopinama metanola različitog postotka dok se u drugom koristio tripsin u otopini PBST-a za postizanje bolje permeabilizacije organizma zebrice (Abbas i Whitfield 2009, Xu i sur. 2017). Za razliku od svih navedenih istraživanja, u ovom radu uzorci su nakon fiksacije Dentovim fiksativom i obrade različitim temperaturama bili dodatno inkubirani/permeabilizirani u acetonu pri -20 °C tijekom 20 min.

Osim toga, prethodno provedena istraživanja detektirala su lokalizaciju/ekspresiju i funkciju Na^+/K^+ -ATPaze u samo pojedinačnim organima ne spominjući druga mjesta lokalizacije ovog proteina u zebrici. Stoga, optimalan protokol korišten u ovom radu koji je otkrio sva mjesta lokalizacije ovog proteina opisana u literaturi, predstavlja optimalan pristup za korištenje protutijela za Na^+/K^+ -ATPazu u zebrici.

Većina istraživanja koja su koristila 4% PFA fiksativ fiksirali su uzorke u trajanju od 2h do 8h ili preko noći te nisu uopće obrađivali cjelovite uzorke embrija zebrice ili su ih tretirali deterdžentom (tritonom) prije same inkubacije u primarnom protutijelu (Blasiolo i sur. 2016, Zhu i sur. 2016, Levic i sur. 2020, Zimmer i sur. 2018, Clemens Grisham 2013, Wallace i sur. 2005). Neka istraživanja su u otopini sa primarnim protutijelom dodatno koristila BSA, riblju želatinu i kozji

serum za dodatnu blokadu nespecifičnog vezanja primarnog protutijela (Clemens Grisham 2013). No, iako je u ovom radu primarno protutijelo za Na^+/K^+ -ATPazu razrijeđeno u 1xPBS + NaN_3 uzorci su prije inkubacije s primarnim protutijelom inkubirani u otopini 1% BSA čime je postignut sličan učinak. U nekim istraživanjima korištena je kolagenaza za pospješivanje prodiranja protutijela u postupku obrade kriopreparata zebrice no sličan postupak dosada nije korišten na cjelovitim uzorcima (Walace i sur. 2005). Stoga, postavlja se pitanje bi li ovaj brži postupak obrade uzoraka zebrice bio efikasan kao i postupak fiksacije (Dentovim fiksativom) i obrade uzoraka (acetom pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$) koji je korišten u ovom radu. Neka od prethodnih istraživanja koristila su obradu uzoraka u otopini metanola i PBST-a te ispiranje u 100% metanolu nakon čega bi uzorci bili pohranjeni pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do daljnje obrade za potrebe imunofluorescencijske analize (Zimmer i sur. 2018). Za usporedbu u ovom radu korišteni Dentov fiksativ koji sadrži 80% metanola i 20% DMSO, a nakon toga i acetom pri $-20\text{ }^\circ\text{C}$ vjerojatno imaju slično, ali ne isto djelovanje na cjelovite uzorke zebrice. U prethodno navedenom istraživanju nisu opisana sva prethodno poznata mjesta lokalizacije α -podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze u zebrici. To upućuje na činjenicu da je obrada uzoraka zebrice u tom istraživanju bila suboptimalna za uspješno vezanje primarnog protutijela. Također, kao i u ovom radu, prethodno navedeno istraživanje je koristilo toplinsku obradu uzoraka pri $65\text{ }^\circ\text{C}$ (Zimmer i sur. 2018). No, prema rezultatima prikazanim u ovom radu možemo vidjeti da toplinska obrada uzoraka nije imala ključnu ulogu u vezanju primarnog protutijela jer je rezultat bio neovisan o toplinskoj obradi uzoraka.

Dakle, na temelju svih dosadašnjih istraživanja o lokalizaciji i ekspresiji proteina α -podjedinice Na^+/K^+ -ATPaze, a koja uključuju i rezultate našeg istraživanja možemo zaključiti da su ključni čimbenici za optimalno vezanje protutijela za istoimeni protein upotreba fiksativa i/ili obrada uzoraka organskim otapalima poput metanola, acetona i deterdženata, dok obrada uzoraka temperaturom nema značajan učinak. No, iako je moguće da su ovi rezultati primjenjivi samo za dotično protutijelo korišteno u ovom istraživanju, pristup fiksacije/obrade cjelovitih uzoraka zebrice prikazan u ovom radu nudi mogućnost bržeg i jednostavnijeg otkrivanja optimalnog/ih uvjeta za druga protutijela koja se koriste za lokalizaciju proteina u cjelovitim uzorcima zebrice.

Iz prethodnih istraživanja poznata je lokalizacija proteina neurolina u membrani aksona ganglijskih stanica mrežnice, u membrani aksona neurona u središnjem dijelu mozga, membrani stanica srčanog mišića i membrani somitskih mišića zebrice (Seritrakul i Gross 2017, Lee i sur. 2020,

Trevarrow 2008, Weaver i sur. 2018, Inoue i Wittbrodt 2011). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da su upotrebom komercijalno dostupnog protutijela za neurolin uspješno potvrđena sva mjesta lokalizacije istoimenog proteina u navedenim organima/tkivima zebrice. Ipak, samo je jedan uvjet (Dentov fiksativ + 37 °C) uspio otkriti sva lokalizacijska mjesta u cjelovitom uzorku zebrice dok su ostali otkrili većinu (4% PFA + 37 °C, 70 °C i 95 °C) ili niti jedno mjesto lokalizacije (Dentov fiksativ, + 70 °C i 95 °C). Istraživanja sa protutijelom Zn-8 koja su koristila 4% PFA fiksirala su uzorke u trajanju od 10 min do preko noći pri temperaturama u rasponu od +4 °C do 70 °C (Inoue i Wittbrodt 2011, Seritrakul i Gross 2017, Lee i sur. 2020, Weaver i sur. 2018, Ott i sur 2001). U jednom od navedenih istraživanja protutijelo Zn-8 za protein neurolin je testirano na kriopreparatima i cjelovitim uzorcima zebrice obrađenim u 150 mM Tris-HCl (pH= 9) pri temperaturi 70 °C / 15 min. No, obrada uzoraka zebrice nije značajno utjecala na vezanje protutijela Zn-8 i posljedični intenzitet obojenja (Inoue i Wittbrodt 2011). Uzorci obrađeni na navedeni način u ovom radu nisu pokazali optimalno vezanje protutijela Zn-8. Navedeno ukazuje na potrebu za upotrebom šireg spektra uvjeta za određivanje onog optimalnog, a za upotrebu pojedinog primarnog protutijela. Kako bi dodatno pospješili permeabilizaciju protutijela u tkivo, u većini istraživanja uzorci su prije inkubiranja s primarnim protutijelom tretirani acetonom pri – 20 °C u trajanju od 2 min do 50 min (Inoue i Wittbrodt 2011, Lee i sur. 2020, Weaver i sur. 2018, Ott i sur 2001). U drugim radovima nakon inkubiranja acetonom korištena je dodatno i proteinaza K tijekom 10-30 min (Weaver i sur. 2018). Rezultati ovog istraživanja su pokazali da je Dentov fiksativ i toplinska obrada na nižoj temperaturi od 37 °C / 30 min bila optimalan uvjet za vezanje protutijela Zn-8 i otkrivanje svih lokalizacijskih mjesta. Iako su i kod uzoraka fiksiranih 4% PFA i obrađenih pri različitim temperaturama bile vidljive lokalizacije u određenim organima/tkivima, niti jedan uvjet nije omogućio vezanje protutijela Zn-8 i detekciju lokalizacije neurolina u svim ranije opisanim organima/tkivima. Stoga, iako je obrada uzoraka acetonom poželjan permeabilizacijski korak, obrada uzoraka prikladnim fiksativom (Dentov) i temperaturom (37 °C) pokazao se kao ključan korak za dobivanje optimalnog vezanja i detektiranja lokalizacije proteina neurolin. U ovom radu nije korištena proteinaza K, međutim bilo bi poželjno ispitati njezin učinak u okviru protokola korištenog u ovom radu, a u svrhu njegove daljnje optimizacije (npr. skraćivanja). Dodatno, vrijedno je spomenuti kako nema istraživanja u kojem su navedena sva mjesta lokalizacije neurolina u zebrici kao što je to slučaj u ovom istraživanju. Također bitno je istaknuti da postoji nedostatak istraživanja proteina neurolina u uzorcima obrađenim Dentovim fiksativom

koji se u ovom istraživanju pokazao kao bolja fiksacijska otopina od 4% PFA. Upotreba ovdje opisanog optimalnog uvjeta nudi mogućnost za istraživanje ekspresije neurolina u ostalim organima/tkivima zebriće upotrebom snažnijih mikroskopskih tehnika poput konfokalnog mikroskopa koji zbog svojih tehničkih mogućnosti mogu detektirati niže razine ekspresije proteina.

U ovom je radu po prvi puta napravljena imunohistokemijska analiza lokalizacije proteina Oct1 upotrebom protutijela dizajniranih za različite epitope (izvanstaničnu petlju i unutarstanični dio karboksiterminalnog kraja) istoimenog proteina. Istraživanja funkcije i lokalizacije Oct proteina u zebrići su malobrojna. Jedino istraživanje OCT proteina u zebrići definiralo je karakteristike transporta Oct1 proteina *in vitro* (Mihaljević i sur. 2017). Također otkrili su da je ekspresija gena Oct1 prisutna u jetri i bubrezima zebriće koji imaju važnu ekotoksikološku ulogu (Mihaljević i sur. 2017). U ovom istraživanju nije otkrivena lokalizacija Oct1 proteina u navedenim organima već su dobivena nespecifična obojenja na površini organizma zebriće. Inače, nespecifično obojenje može se klasificirati u dvije kategorije: jedno je imunološkog podrijetla, odnosno nastaje zbog unakrsne reaktivnosti protutijela sa drugim proteinima, a drugo je metodološkog podrijetla, odnosno povezano je sa samim reagensom i uvjetima koji su korišteni za otkrivanje antigena (Choe i Cho 1994). Protutijela koja reagiraju s antigenskim determinantama nepovezanim s onima imunizirajućeg antigena dat će nespecifično bojenje. Dva izvora unakrsne reaktivnosti za poliklonska protutijela mogu biti sljedeća:

1. prisutnost zajedničkih antigenskih determinanata u pročišćenom imunizirajućem antigenu. Određeni proteini imaju jedinstvene (specifične) kao i zajedničke (nespecifične) determinante svoje domene ili strukture podjedinice. Na primjer, IgM i IgG dijele identične L lance. Apsorpcija takvih poliklonskih antiseruma s proteinom L lanca dat će monospecifične antiserume;
2. Unakrsna reakcija poliklonskog antiseruma sa sastavom tkiva. Ako se sumnja na nečistoću izvornog imunogena, antigen treba ispitati elektroforezom u SDS-poliakrilamidnom gelu i postupkom imunoblotiranja (Western blot). Ukoliko je antiserum visokog titra i visoke avidnosti, problem unakrsne reaktivnosti se može riješiti visokim razrjeđenjem. Pri visokom razrjeđenju (1:1000 ili više) protutijela visokog afiniteta, obično samo specifična protutijela inducirana imunogenom mogu reagirati sa ciljanim antigenom u tkivu. Inače bi se antiserum trebao eliminirati vezanjem za tkivo/komponente tkiva koje ne sadrži ciljani antigen (Choe i Cho 1994). Primjerice, BSA se može koristiti za sprječavanje elektrostatskih i hidrofobnih interakcija imunokemijskih

reagensa s fiksiranim tkivima. Na taj način se postiže zasićenje nespecifičnih mjesta vezanja i smanjenje nespecifičnih obojenja (Choe i Cho 1994). Nespecifična obojenja mogu nastati i zbog nespecifičnog vezanja sekundarnog protutijela. No, prethodno provedeno testiranje vezanja sekundarnog protutijela GAR-CY3, korišteno u kombinaciji s poliklonskim Oct1 protutijelima, pokazalo je bitno drugačiji uzorak obojenja. Dakle, rezultati ukazuju da nespecifično vezanje primarnih protutijela na površini tijela zebrice ne može biti posljedica vezanja sekundarnog protutijela GAR-CY3. Ista su vjerojatno posljedica vezanja primarnih protutijela za neutvrđene antigene prisutne na površini organizma zebrice.

6. Zaključak

1. Iz rezultata utvrđivanja mogućih nespecifičnih vezanja / obojenja sekundarnih protutijela korištenih u ovom istraživanju u cjelovitim uzorcima zebrice može se zaključiti da intenzitet nespecifičnog obojenja (DAM-CY3 i GAR-CY3) djelomično ovisi o uvjetima inkubacije, posebno pri korištenju fiksativa 4% PFA.
2. Vezanje protutijela za Na^+/K^+ -ATPazu u cjelovitim uzorcima embrija zebrice u potpunosti je uspješno samo uz korištenje Dentovog fiksativa što znači da vezanje ovog protutijela ovisi o vrsti korištenog fiksativa. Lokalizacija Na^+/K^+ -ATPaze je potvrđena pri tom uvjetu i detektirana u bazolateralnim membranama unutarnjeg uha, pronefrosu, srednjem i stražnjem crijevu i plazmatskoj membrani ionocita bogatih proteinom Na^+/K^+ -ATPaza.
3. Vezanje protutijela za neurolin u cjelovitim uzorcima embrija zebrice ovisno je o vrsti fiksativa i temperaturi inkubacije. Najuspješnija lokalizacija neurolina je bila u uzorcima fiksiranim Dentovim fiksativom i inkubiranim pri temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ / 30 min. Lokalizacija neurolina je ovim protokolom potvrđena, tj. detektirana u membrani aksona ganglijskih stanica mrežnice, membrani aksona neurona u središnjem dijelu mozga, membrani stanica srčanog mišića i membrani somitskih mišića trupa i repa embrija zebrice.
4. Proučavanje učinaka različitih fiksativa i inkubacijskih temperatura na vezanje protutijela za Oct1 (epitop 45-60 aa i 530-544 aa) u cjelovitim uzorcima embrija zebrice nije bilo uspješno jer su sva obojenja bila nespecifična. Zbog navedenog potrebno je mijenjati/prilagoditi epitope za izradu novih specifičnih protutijela za imunolokalizaciju proteina Oct1 u zebrici.

7. Popis literature

- Abbas L., Whitfield T. T. (2010): The zebrafish inner ear. *Fish Physiology* 29: 123-171.
- Ali S., Champagne D. L., Spaink H. P., Richardson M. K. (2011): Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today Review* 93: 115–133.
- Barthel L. K., Raymond P. A. (1990): Improved method for obtaining 3-micrometer cryosections for immunocytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 38: 1383-2388.
- Blasiolo B, Canfield A. V. Vollrath M. A. Huss D. Mohidee M. A. P. K. Dickman D. J. Cheng C. K., Fekete D. M., Levenson R. (2006): Separate Na,K-ATPase genes are required for otolith formation and semicircular canal development in zebrafish. *Developmental Biology* 294: 148–160.
- Brugman S. (2016) The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Developmental & Comparative Immunology* 64: 82–92.
- Choi T. Y., Choi T. I., Lee Y. R., Choe S. K., Kim C. H. (2021): Zebrafish as an animal model for biomedical research. *Experimental & Molecular Medicine* 53: 310–317.
- Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H., (2017): The structure and function of the Na,K-ATPase isoforms in health and disease. *Frontiers in Physiology* (8) 371: 1-16.
- Clemens Grisham, R. Kindt, K. Finger-Baier, K. Schmid, B. Nicolson, T. (2013): Mutations in *ap1b1* cause mistargeting of the Na⁺/K⁺-ATPase pump in sensory hair cells. *PLoS One* 8 (4): 1-12.
- Crowcombe J. Dhillon S. Hurst R. M. Egginton S. (2016): 3D finite element electrical model of larval zebrafish ECG. *Signals.Plos One* 11 (11): 1-23
- D'Amico F, Skarmoutsou E, Stivala F. (2009): State of the art in antigen retrieval for immunohistochemistry. *Journal of Immunological Methods* 341: 1–18.
- Diekmann H., Stuermer C. O. A. (2008): Zebrafish Neurolin-a and -b, Orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *The Journal of Comparative Neurology* 513:38–50.
- Drummond, I. A., Majumdar, A., Hentschel, H., Elger, M., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss S. C. F., Stemple, D. L., Zwartkruis F., Rangini Z., Driever W., Fishman M. C. (1998): Early development of the zebrafish pronephros and analysis of mutations affecting pronephric function. *Development* 125: 4655–4667.

- El Mernissi, G., Doucet, A. (1984). Quantitation of ouabain binding and turnover of Na-K-ATPase along the rabbit nephron. *American Journal of Physiology* 247: 158–167.
- EU Parliament, Council (2010): Directive 2010/63/eu of the european parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Off. J. Eur. Union* 276: 33–79.
- Ferguson J. L., Shive H. R. (2019): Sequential immunofluorescence and immunohistochemistry on cryosectioned zebrafish embryos. *Journal of Visual Experiments* 14: 3–4.
- Fischer A. H. Jacobson K. A. Rose J. Zeller R. (2008): *CSH Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 3(8): 1-2
- Ge W. (2018): *Encyclopedia of Reproduction*. Elsevier Academic Press, Cambridge.
- Gorboulev V., Shatskaya N., Volk C., Koepsell H., 2005. Subtype-specific affinity for corticosterone of rat organic cation transporters rOCT1 and rOCT2 depends on three amino acids within the substrate binding region. *Molecular Pharmacology* 67: 1612-1619.
- Hammond W. R. D., ZeRuth T. G. (2020): Whole Mount Immunohistochemistry in Zebrafish Embryos and Larvae. *Journal of Visual Experiments* 155: 2-9.
- Hann C. R., Springett M. J., Johnson D. H., (2001): Antigen retrieval of basement membrane proteins from archival eye tissues. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 49 (4): 475-482
- Hedin L. E., Illergard K., Elofsson A. (2011): An Introduction to Membrane Proteins *Journal of Proteome Research* 10: 3324–3331.
- Hess S. L. (2007): A new functional zebrafish gastrointestinal motility assay. *Biology*. State University of New York College at Brockport
- Hill A.J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R.E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicology Science* 86: 6–19.
- Hill A. J., Teraoka H., Heideman W., Peterson R. E. (2005): Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicology Science* 86: 6–19.
- Hoff F. How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy (online) 2022 (pristupljeno 1.rujna 2022) dostupno na:URL <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>
- Howland R. B. (1921). Experiments on the effect of the removal of the pronephros of *Ambystoma punctatum*. *Journal of Experimental Zoology*, 32 (3): 355-396.

- Hu N., Yost H. J., Clark E. B. (2001): Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish. *The Anatomical Record* 264: 1–12.
- Inoue D., Wittbrodt J. (2011): One for All—A Highly Efficient and Versatile Method for Fluorescent Immunostaining in Fish Embryos. *PLoS ONE* 6(5): 1-7.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F. (1995): Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253–310.
- Labome. anti-zebrafish antibodies (Pristupljeno 2. rujna 2022.) Dostupno na: URL <https://www.labome.com/summary/zebrafish-genes.html>
- Lammer E., Kamp H. G., Hisgen V., Koch M., Reinhard D., Salinas E. R., Wendler K., Zok S., Braunbeck T. (2009): Development of a flow-through system for the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology in Vitro* 23 (7): 1436–1442.
- Lee S. H., Hadipour-Lakmehsari S., Murthy H. R., Gibb N., Miyake T., Teng A. C. T., Cosme J., Yu J.C., Moon M., Lim S., Wong V., Liu P., Billia F., Fernandez-Gonzalez R., Stagljar I., Sharma P., Kislinger T., Scott I. C., Gramolini A. O. (2020): REEP5 depletion causes sarcoplasmic reticulum vacuolization and cardiac functional defects. *Nature Communications*. 11(1): 1-20.
- Levic D. S., Ryan S., Marjoram L., Honeycutt J., Bagwell J., Bagnat M., (2020): Distinct roles for luminal acidification in apical protein sorting and trafficking in zebrafish. *Journal of Cell Biology* 219 (4): 1-22.
- Lickwar C. R, Camp J. G, Weiser M., Cocchiaro J. L., Kingsley D. M., Furey T. S., Sheikh A. Z., Rawls J. F. (2017): Genomic dissection of conserved transcriptional regulation in intestinal epithelial cells. *PIOs Biology*: 1-40.
- Macdonald R. (1999): Zebrafish Immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 127:77-88.
- Mann C.J., Hinitz Y., Hughes S. M.(2006): Comparison of neurolin (ALCAM) and neurolin-like cell adhesion molecule (NLCAM) expression in zebrafish. *Gene Expression Patterns* 6: 952–963.
- Menke A. L., Spitsbergen J. M., Wolterbeek A. P. M., Woutersen R. A. (2011): Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. *Toxicologic Pathology* 39: 759–775.
- Mihaljevic, I., Popovic, M., Zaja, R., Smital, T. (2016.): Phylogenetic, syntenic, and tissue expression analysis of *slc22* genes in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Genomics*. 17, 626-639.

- Mihaljević I., Popović M., Zaja R., Maraković N., Sinko G., Smital T. (2017): Interaction between the zebrafish (*Danio rerio*) organic cation transporter1 (Oct1) and endo-and xenobiotics. *Aquatic Toxicology*. 187: 18-28.
- Ng A. N. Y., de Jong-Curtain T. A., Mawdsley D. J., White S. J., Shin J., Appel B., Duc Si Dong P., (2005): Formation of the digestive system in zebrafish: III. Intestinal epithelium morphogenesis. *Developmental Biology* 286: 114–135.
- Paschke K. A., Lottspeich F., Stuermer C. A. O. (1992): Neurolin, a Cell Surface Glycoprotein on Growing Retinal Axons in the Goldfish Visual System Is Reexpressed during Retinal Axonal Regeneration. *The Journal of Cell Biology*, 117: 863- 875.
- Pereira A. C., Gomes T., Ferreira Machado M.R., Rocha T. L. (2019): The zebrafish embryotoxicity test (ZET) for nanotoxicity assessment: from morphological to molecular approach. *Environmental Pollution* 252: 1841–1853.
- Perry S. F., Ekker M., Farrell A. P., Brauner C. J. (2010) *Fish Physiology: Zebrafish*. Elsevier Academic Press. London.
- Poppe, T. T., Ferguson, H. W. (2006): *Systemic Pathology of Fish*. Scotian Press: 67-141
- Roberts, R. J., Ellis, A. E. (2001): *Fish Pathology*. W. B. Saunders: 12–54.
- Roberts R. J., Ellis A.E. (2012): *The Anatomy and Physiology of Teleost*. Wiley Online Library, New Jersey.
- Saud H., Alshami I., Cooper R. (2021): Localization, Distribution and Structure of Muscle Fibres Using Specific Antibody Markers in the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Basrah Journal of Agriculture Science* 34 (1): 147-155.
- Saxe 'n, L. (1987). Early organogenesis of the kidney. *Pediatric Nephrology* 1(3): 385-392.
- Serittrakul, P., Gross, J.M. (2017): Tet-mediated DNA hydroxymethylation regulates retinal neurogenesis by modulating cell-extrinsic signaling pathways. *PLoS Genetics*. 13(9): 1-32.
- Speare, D. J., and Ferguson, H. W. (2006): *Systemic Pathology of Fish*. Scotian Press. London
- Tokuyasu K.T. (1973): A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissue. *Journal of Cell biology* 57(2): 551-565.
- Sinobiological. What is the specimen commonly used in immunofluorescence staining experiments? (online) (pristupljeno 1.rujna 2022) dostupno na: URL <https://www.sinobiological.com/category/if-icc-faq-specimen>

- Stadler C., Rexhepaj E., Singan V.R., Murphy R.F., Pepperkok R., Uhlén M., Simpson J. C., Lundberg E. (2013): Immunofluorescence and fluorescent-protein tagging show high correlation for protein localization in mammalian cells. *Nat Methods*. 10: 315-23.
- Trevarrow, Bill (2008): Antibody Descriptions. ZFIN Direct Data Submission.
- Vishwanath W. *Danio rerio*. *The IUCN Red List of Threatened Species* (online) 2010 (Pristupljeno 02. rujna 2022) Dostupno na: URL <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T166487A6219667.en>.
- Weinstein J. A., Jiang N., White R. A., Fisher D. S., Quake S. R., (2009): High-Throughput Sequencing of the Zebrafish Antibody Repertoire. *Sciencemag* 324: 807-810.
- Whitfield T.T., Riley B. B., Chiang M. Y., Phillips B. (2002): Development of the zebrafish inner ear. *Developmental Dynamic* 223 (4): 427-458
- Woudenberg B .A., Wolterbeek A., Brake L., Snel C., Menke A., Rubingh C., Groot D., Kroese D. (2013): A category approach to predicting the developmental (neuro) toxicity of organotin compounds: the value of the zebrafish (*Danio rerio*) embryotoxicity test (ZET). *Reproductive Toxicology* 41: 35-44.
- Xu, W., Jin, M., Hu, R., Wang, H., Zhang, F., Yuan, S., Cao, Y., (2017): The joubert syndrome protein Inpp5e controls ciliogenesis by regulating phosphoinositides at the apical membrane. *Journal of American Society of Nephrology* 28: 118–129.
- Zhong L. Whole mount staining and confocal imaging (online) 2020 (pristupljeno 1.rujna 2022) dostupno na: URL <https://www.med.upenn.edu/pcmd/assets/user-content/documents/Histology/Learning%20Lunches/PCMD%20HC%20Learning%20Lunch%20-%20Whole%20Mount%20Staining%20and%20Confocal%20Imaging.pdf>
- Zhu, C., Nigam K. B., Date R. C., Bush K. T., Springer S. A., Saier J., M. H., Wu W., Nigam S. K., (2015): Evolutionary analysis and classification of OATs, OCTs, OCTNs, and other SLC22 transporters: Structure-function implications and analysis of sequence motifs. *PLoS ONE* 10(11): e0140569.
- Zhu, P., Sieben, C.J., Xu, X., Harris, P.C., Lin, X., (2017): Autophagy activators suppress cystogenesis in an autosomal dominant polycystic kidney disease model. *Human Molecular Genetics* 26: 158–172.
- Zimmer A. M., Dymowska A. K., Kumai Y., Goss G. G., Perry S. F., Kwong R. W. M., (2018): Assessing the role of the acid-sensing ion channel ASIC4b in sodium uptake by larval

zebrafish. Comparative Biochemistry Physiology -Part A Molecular Integrative Physiology
226: 1–10.

8. Životopis

Nora Lončarić osnovnu školu završila je na Rabu u Osnovnoj školi Ivana Rabljanina, a srednju školu je završila u Prirodoslovno grafičkoj školi u Rijeci. Sveučilišni preddiplomski studij završila je u Puli i stekla zvanje Sveučilišne prvostupnice Znanosti o moru. Diplomski studij upisala je 2020. godine na Biološkom Odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, smjer Ekologija i zaštita prirode, modul more.

9. Prilozi

Prilog 1. Mjerenja intenziteta obojenja dobivenog vezanjem primarnog protutijela specifičnog za α 1-podjedinicu proteina Na^+/K^+ -ATPaze

	Tretman	Fiksativ	Srednja vrijednost	Minimalna granica mjerenja	Maksimalna granica mjerenja
1	37 °C / 30 min	PFA	30,24	22	255
2	37 °C / 30 min	PFA	38,49	22	255
3	37 °C / 30 min	PFA	33,39	22	255
4	37 °C / 30 min	PFA	30,29	22	255
5	37 °C / 30 min	PFA	47,65	22	255
6	37 °C / 30 min	PFA	59,11	22	255
7	37 °C / 30 min	PFA	32,83	22	255
8	37 °C / 30 min	PFA	24,29	22	255
9	37 °C / 30 min	PFA	25,26	22	255
10	37 °C / 30 min	PFA	23,45	22	255
11	37 °C / 30 min	PFA	30,98	22	255
12	37 °C / 30 min	PFA	32,45	22	255
13	37 °C / 30 min	PFA	30,98	22	255
14	37 °C / 30 min	PFA	30,08	22	255
15	37 °C / 30 min	PFA	30,49	22	255
16	37 °C / 30 min	PFA	30,47	22	255
17	37 °C / 30 min	PFA	26,76	22	255
18	37 °C / 30 min	PFA	24,79	22	255
19	37 °C / 30 min	PFA	29,83	22	255
20	37 °C / 30 min	PFA	31,06	22	255
21	37 °C / 30 min	PFA	31,62	22	255
22	37 °C / 30 min	PFA	31,72	22	255
23	37 °C / 30 min	PFA	47,65	22	255
24	37 °C / 30 min	PFA	59,11	22	255
25	37 °C / 30 min	PFA	32,83	22	255
26	37 °C / 30 min	PFA	24,29	22	255
27	37 °C / 30 min	PFA	25,26	22	255
28	37 °C / 30 min	PFA	23,45	22	255
29	37 °C / 30 min	PFA	30,98	22	255
30	37 °C / 30 min	PFA	32,45	22	255
31	70 °C / 15 min	PFA	31,28	22	255

32	70 °C / 15 min	PFA	29,42	22	255
33	70 °C / 15 min	PFA	24,66	22	255
34	70 °C / 15 min	PFA	23,08	22	255
35	70 °C / 15 min	PFA	24,19	22	255
36	70 °C / 15 min	PFA	25,98	22	255
37	70 °C / 15 min	PFA	22,99	22	255
38	70 °C / 15 min	PFA	23,18	22	255
39	70 °C / 15 min	PFA	30,19	22	255
40	70 °C / 15 min	PFA	28,98	22	255
41	70 °C / 15 min	PFA	26	22	255
42	70 °C / 15 min	PFA	22,93	22	255
43	70 °C / 15 min	PFA	24,42	22	255
44	70 °C / 15 min	PFA	23,77	22	255
45	70 °C / 15 min	PFA	26,77	22	255
46	70 °C / 15 min	PFA	25,03	22	255
47	70 °C / 15 min	PFA	25,16	22	255
48	70 °C / 15 min	PFA	24,82	22	255
49	70 °C / 15 min	PFA	25,53	22	255
50	70 °C / 15 min	PFA	23,7	22	255
51	70 °C / 15 min	PFA	26,88	22	255
52	70 °C / 15 min	PFA	23,77	22	255
53	70 °C / 15 min	PFA	26	22	255
54	70 °C / 15 min	PFA	24,42	22	255
55	70 °C / 15 min	PFA	28,98	22	255
56	70 °C / 15 min	PFA	22,93	22	255
57	70 °C / 15 min	PFA	30	22	255
58	70 °C / 15 min	PFA	46	22	255
59	70 °C / 15 min	PFA	45	22	255
60	70 °C / 15 min	PFA	30,19	22	255
61	95 °C / 5 min	PFA	45,79	22	255
62	95 °C / 5 min	PFA	38,26	22	255
63	95 °C / 5 min	PFA	31,54	22	255
64	95 °C / 5 min	PFA	28,63	22	255
65	95 °C / 5 min	PFA	27,53	22	255
66	95 °C / 5 min	PFA	27,29	22	255
67	95 °C / 5 min	PFA	27,08	22	255
68	95 °C / 5 min	PFA	43,6	22	255
69	95 °C / 5 min	PFA	46,41	22	255
70	95 °C / 5 min	PFA	37,31	22	255
71	95 °C / 5 min	PFA	30,2	22	255
72	95 °C / 5 min	PFA	32,53	22	255
73	95 °C / 5 min	PFA	30,58	22	255
74	95 °C / 5 min	PFA	26,97	22	255

75	95 °C / 5 min	PFA	26,44	22	255
76	95 °C / 5 min	PFA	26,49	22	255
77	95 °C / 5 min	PFA	24,23	22	255
78	95 °C / 5 min	PFA	24,58	22	255
79	95 °C / 5 min	PFA	48	22	255
80	95 °C / 5 min	PFA	32,6	22	255
81	95 °C / 5 min	PFA	30,5	22	255
82	95 °C / 5 min	PFA	33,83	22	255
83	95 °C / 5 min	PFA	44	22	255
84	95 °C / 5 min	PFA	44	22	255
85	95 °C / 5 min	PFA	27,13	22	255
86	95 °C / 5 min	PFA	49,5	22	255
87	95 °C / 5 min	PFA	25,86	22	255
88	95 °C / 5 min	PFA	26,61	22	255
89	95 °C / 5 min	PFA	43	22	255
90	95 °C / 5 min	PFA	44	22	255
91	37 °C / 30 min	Dent	24,53	22	255
92	37 °C / 30 min	Dent	22,76	22	255
93	37 °C / 30 min	Dent	26,99	22	255
94	37 °C / 30 min	Dent	25,1	22	255
95	37 °C / 30 min	Dent	26,94	22	255
96	37 °C / 30 min	Dent	27,51	22	255
97	37 °C / 30 min	Dent	30,05	22	255
98	37 °C / 30 min	Dent	30,5	22	255
99	37 °C / 30 min	Dent	23,34	22	255
100	37 °C / 30 min	Dent	25,84	22	255
101	37 °C / 30 min	Dent	31,94	22	255
102	37 °C / 30 min	Dent	29,95	22	255
103	37 °C / 30 min	Dent	28,12	22	255
104	37 °C / 30 min	Dent	26,93	22	255
105	37 °C / 30 min	Dent	27,87	22	255
106	37 °C / 30 min	Dent	30,23	22	255
107	37 °C / 30 min	Dent	31,37	22	255
108	37 °C / 30 min	Dent	31,42	22	255
109	37 °C / 30 min	Dent	27,63	22	255
110	37 °C / 30 min	Dent	29,35	22	255
111	37 °C / 30 min	Dent	31,27	22	255
112	37 °C / 30 min	Dent	35,1	22	255
113	37 °C / 30 min	Dent	35,17	22	255
114	37 °C / 30 min	Dent	36,63	22	255
115	37 °C / 30 min	Dent	33,17	22	255
116	37 °C / 30 min	Dent	27,38	22	255
117	37 °C / 30 min	Dent	28,6	22	255

118	37 °C / 30 min	Dent	33,91	22	255
119	37 °C / 30 min	Dent	31,79	22	255
120	37 °C / 30 min	Dent	29,49	22	255
121	70 °C / 15 min	Dent	31,28	22	255
122	70 °C / 15 min	Dent	29,42	22	255
123	70 °C / 15 min	Dent	24,66	22	255
124	70 °C / 15 min	Dent	23,08	22	255
125	70 °C / 15 min	Dent	24,19	22	255
126	70 °C / 15 min	Dent	25,98	22	255
127	70 °C / 15 min	Dent	22,99	22	255
128	70 °C / 15 min	Dent	23,18	22	255
129	70 °C / 15 min	Dent	30,19	22	255
130	70 °C / 15 min	Dent	28,98	22	255
131	70 °C / 15 min	Dent	26	22	255
132	70 °C / 15 min	Dent	22,93	22	255
133	70 °C / 15 min	Dent	24,42	22	255
134	70 °C / 15 min	Dent	23,77	22	255
135	70 °C / 15 min	Dent	26,77	22	255
136	70 °C / 15 min	Dent	25,03	22	255
137	70 °C / 15 min	Dent	25,16	22	255
138	70 °C / 15 min	Dent	24,82	22	255
139	70 °C / 15 min	Dent	25,53	22	255
140	70 °C / 15 min	Dent	23,7	22	255
141	70 °C / 15 min	Dent	26,88	22	255
142	70 °C / 15 min	Dent	26	22	255
143	70 °C / 15 min	Dent	30	22	255
144	70 °C / 15 min	Dent	46	22	255
145	70 °C / 15 min	Dent	45	22	255
146	70 °C / 15 min	Dent	30,19	22	255
147	70 °C / 15 min	Dent	28,98	22	255
148	70 °C / 15 min	Dent	23,77	22	255
149	70 °C / 15 min	Dent	22,93	22	255
150	70 °C / 15 min	Dent	24,42	22	255
151	95 °C / 5 min	Dent	27,92	22	255
152	95 °C / 5 min	Dent	24,18	22	255
153	95 °C / 5 min	Dent	24,73	22	255
154	95 °C / 5 min	Dent	26,04	22	255
155	95 °C / 5 min	Dent	29,62	22	255
156	95 °C / 5 min	Dent	32,81	22	255
157	95 °C / 5 min	Dent	24,88	22	255
158	95 °C / 5 min	Dent	25,51	22	255
159	95 °C / 5 min	Dent	26,11	22	255
160	95 °C / 5 min	Dent	39	22	255

161	95 °C / 5 min	Dent	35,69	22	255
162	95 °C / 5 min	Dent	29,92	22	255
163	95 °C / 5 min	Dent	29,45	22	255
164	95 °C / 5 min	Dent	25,1	22	255
165	95 °C / 5 min	Dent	24,43	22	255
166	95 °C / 5 min	Dent	27,92	22	255
167	95 °C / 5 min	Dent	24,18	22	255
168	95 °C / 5 min	Dent	24,73	22	255
169	95 °C / 5 min	Dent	26,04	22	255
170	95 °C / 5 min	Dent	29,62	22	255
171	95 °C / 5 min	Dent	39,2	22	255
172	95 °C / 5 min	Dent	32,81	22	255
173	95 °C / 5 min	Dent	35,7	22	255
174	95 °C / 5 min	Dent	24,88	22	255
175	95 °C / 5 min	Dent	29,85	22	255
176	95 °C / 5 min	Dent	25,51	22	255
177	95 °C / 5 min	Dent	29,48	22	255
178	95 °C / 5 min	Dent	26,11	22	255
179	95 °C / 5 min	Dent	24,4	22	255
180	95 °C / 5 min	Dent	25,12	22	255

Prilog 2. Mjerenja intenziteta obojenja dobivenog vezanjem primarnog protutijela specifičnog za protein neurolin

	Tretman	Fiksativ	Srednja vrijednost	Minimalna granica mjerenja	Maksimalna granica mjerenja
1	37 °C / 30 min	PFA	49,94	44	255
2	37 °C / 30 min	PFA	49,15	44	255
3	37 °C / 30 min	PFA	47,58	44	255
4	37 °C / 30 min	PFA	45,47	44	255
5	37 °C / 30 min	PFA	61,28	44	255
6	37 °C / 30 min	PFA	58,98	44	255
7	37 °C / 30 min	PFA	68,57	44	255
8	37 °C / 30 min	PFA	64	44	255
9	37 °C / 30 min	PFA	64,17	44	255
10	37 °C / 30 min	PFA	61,75	44	255
11	37 °C / 30 min	PFA	46,1	44	255
12	37 °C / 30 min	PFA	48,06	44	255
13	37 °C / 30 min	PFA	48,9	44	255
14	37 °C / 30 min	PFA	46,4	44	255
15	37 °C / 30 min	PFA	45,72	44	255
16	37 °C / 30 min	PFA	47,55	44	255

17	37 °C / 30 min	PFA	45,8	44	255
18	37 °C / 30 min	PFA	45,96	44	255
19	37 °C / 30 min	PFA	57,24	44	255
20	37 °C / 30 min	PFA	58,14	44	255
21	37 °C / 30 min	PFA	52,2	44	255
22	37 °C / 30 min	PFA	47,61	44	255
23	37 °C / 30 min	PFA	47,24	44	255
24	37 °C / 30 min	PFA	46,17	44	255
25	37 °C / 30 min	PFA	46,19	44	255
26	37 °C / 30 min	PFA	45,58	44	255
27	37 °C / 30 min	PFA	46,71	44	255
28	37 °C / 30 min	PFA	47,53	44	255
29	37 °C / 30 min	PFA	46,73	44	255
30	37 °C / 30 min	PFA	47,57	44	255
31	70 °C / 15 min	PFA	49,51	44	255
32	70 °C / 15 min	PFA	52,74	44	255
33	70 °C / 15 min	PFA	59,79	44	255
34	70 °C / 15 min	PFA	53,52	44	255
35	70 °C / 15 min	PFA	51,93	44	255
36	70 °C / 15 min	PFA	50,67	44	255
37	70 °C / 15 min	PFA	49,56	44	255
38	70 °C / 15 min	PFA	48,42	44	255
39	70 °C / 15 min	PFA	52,06	44	255
40	70 °C / 15 min	PFA	53,55	44	255
41	70 °C / 15 min	PFA	54,03	44	255
42	70 °C / 15 min	PFA	48,04	44	255
43	70 °C / 15 min	PFA	57,89	44	255
44	70 °C / 15 min	PFA	56,58	44	255
45	70 °C / 15 min	PFA	63,3	44	255
46	70 °C / 15 min	PFA	66	44	255
47	70 °C / 15 min	PFA	62,78	44	255
48	70 °C / 15 min	PFA	66,67	44	255
49	70 °C / 15 min	PFA	63,11	44	255
50	70 °C / 15 min	PFA	50,67	44	255
51	70 °C / 15 min	PFA	49,56	44	255
52	70 °C / 15 min	PFA	48,42	44	255
53	70 °C / 15 min	PFA	52,06	44	255
54	70 °C / 15 min	PFA	53,55	44	255
55	70 °C / 15 min	PFA	54,03	44	255
56	70 °C / 15 min	PFA	48,04	44	255
57	70 °C / 15 min	PFA	63,11	44	255
58	70 °C / 15 min	PFA	50,67	44	255
59	70 °C / 15 min	PFA	49,56	44	255

60	70 °C / 15 min	PFA	48,42	44	255
61	95 °C / 5 min	PFA	70,02	44	255
62	95 °C / 5 min	PFA	67,09	44	255
63	95 °C / 5 min	PFA	60,38	44	255
64	95 °C / 5 min	PFA	71,14	44	255
65	95 °C / 5 min	PFA	72	44	255
66	95 °C / 5 min	PFA	71,33	44	255
67	95 °C / 5 min	PFA	71,33	44	255
68	95 °C / 5 min	PFA	72	44	255
69	95 °C / 5 min	PFA	62,27	44	255
70	95 °C / 5 min	PFA	60,39	44	255
71	95 °C / 5 min	PFA	60,13	44	255
72	95 °C / 5 min	PFA	54,76	44	255
73	95 °C / 5 min	PFA	51,48	44	255
74	95 °C / 5 min	PFA	50,51	44	255
75	95 °C / 5 min	PFA	48,49	44	255
76	95 °C / 5 min	PFA	47,7	44	255
77	95 °C / 5 min	PFA	47,51	44	255
78	95 °C / 5 min	PFA	55,31	44	255
79	95 °C / 5 min	PFA	58,13	44	255
80	95 °C / 5 min	PFA	58,87	44	255
81	95 °C / 5 min	PFA	56,25	44	255
82	95 °C / 5 min	PFA	54,56	44	255
83	95 °C / 5 min	PFA	65,14	44	255
84	95 °C / 5 min	PFA	63,49	44	255
85	95 °C / 5 min	PFA	54,88	44	255
86	95 °C / 5 min	PFA	55,92	44	255
87	95 °C / 5 min	PFA	56,22	44	255
88	95 °C / 5 min	PFA	47,64	44	255
89	95 °C / 5 min	PFA	46,31	44	255
90	95 °C / 5 min	PFA	47,47	44	255
91	37 °C / 30 min	Dent	48,17	44	255
92	37 °C / 30 min	Dent	58,28	44	255
93	37 °C / 30 min	Dent	56,88	44	255
94	37 °C / 30 min	Dent	49,71	44	255
95	37 °C / 30 min	Dent	71,33	44	255
96	37 °C / 30 min	Dent	47,41	44	255
97	37 °C / 30 min	Dent	74	44	255
98	37 °C / 30 min	Dent	47,42	44	255
99	37 °C / 30 min	Dent	72,67	44	255
100	37 °C / 30 min	Dent	45,74	44	255
101	37 °C / 30 min	Dent	71,33	44	255
102	37 °C / 30 min	Dent	50,19	44	255

103	37 °C / 30 min	Dent	71,33	44	255
104	37 °C / 30 min	Dent	52,38	44	255
105	37 °C / 30 min	Dent	71	44	255
106	37 °C / 30 min	Dent	71,33	44	255
107	37 °C / 30 min	Dent	50,95	44	255
108	37 °C / 30 min	Dent	48,84	44	255
109	37 °C / 30 min	Dent	47,21	44	255
110	37 °C / 30 min	Dent	47,4	44	255
111	37 °C / 30 min	Dent	49,72	44	255
112	37 °C / 30 min	Dent	50,3	44	255
113	37 °C / 30 min	Dent	48,4	44	255
114	37 °C / 30 min	Dent	56,24	44	255
115	37 °C / 30 min	Dent	57,07	44	255
116	37 °C / 30 min	Dent	59,73	44	255
117	37 °C / 30 min	Dent	63,3	44	255
118	37 °C / 30 min	Dent	68,12	44	255
119	37 °C / 30 min	Dent	64,44	44	255
120	37 °C / 30 min	Dent	58,36	44	255
121	70 °C / 15 min	Dent	57,81	44	255
122	70 °C / 15 min	Dent	56,84	44	255
123	70 °C / 15 min	Dent	57,89	44	255
124	70 °C / 15 min	Dent	59,42	44	255
125	70 °C / 15 min	Dent	51,84	44	255
126	70 °C / 15 min	Dent	61,47	44	255
127	70 °C / 15 min	Dent	51,25	44	255
128	70 °C / 15 min	Dent	60,01	44	255
129	70 °C / 15 min	Dent	59,88	44	255
130	70 °C / 15 min	Dent	48,11	44	255
131	70 °C / 15 min	Dent	50,05	44	255
132	70 °C / 15 min	Dent	53,3	44	255
133	70 °C / 15 min	Dent	53,49	44	255
134	70 °C / 15 min	Dent	50,83	44	255
135	70 °C / 15 min	Dent	50,72	44	255
136	70 °C / 15 min	Dent	51,16	44	255
137	70 °C / 15 min	Dent	58,42	44	255
138	70 °C / 15 min	Dent	56,69	44	255
139	70 °C / 15 min	Dent	47,44	44	255
140	70 °C / 15 min	Dent	57,3	44	255
141	70 °C / 15 min	Dent	55,2	44	255
142	70 °C / 15 min	Dent	56,05	44	255
143	70 °C / 15 min	Dent	57,14	44	255
144	70 °C / 15 min	Dent	44,59	44	255
145	70 °C / 15 min	Dent	45,55	44	255

146	70 °C / 15 min	Dent	58,7	44	255
147	70 °C / 15 min	Dent	62,43	44	255
148	70 °C / 15 min	Dent	65,33	44	255
149	70 °C / 15 min	Dent	68	44	255
150	70 °C / 15 min	Dent	68,6	44	255
151	95 °C / 5 min	Dent	59	44	255
152	95 °C / 5 min	Dent	59,75	44	255
153	95 °C / 5 min	Dent	58,89	44	255
154	95 °C / 5 min	Dent	58,89	44	255
155	95 °C / 5 min	Dent	56,47	44	255
156	95 °C / 5 min	Dent	64,33	44	255
157	95 °C / 5 min	Dent	65,33	44	255
158	95 °C / 5 min	Dent	67,58	44	255
159	95 °C / 5 min	Dent	61,18	44	255
160	95 °C / 5 min	Dent	49,44	44	255
161	95 °C / 5 min	Dent	49,81	44	255
162	95 °C / 5 min	Dent	54,14	44	255
163	95 °C / 5 min	Dent	48,65	44	255
164	95 °C / 5 min	Dent	47,85	44	255
165	95 °C / 5 min	Dent	59,6	44	255
166	95 °C / 5 min	Dent	58,99	44	255
167	95 °C / 5 min	Dent	57,73	44	255
168	95 °C / 5 min	Dent	57,68	44	255
169	95 °C / 5 min	Dent	47,65	44	255
170	95 °C / 5 min	Dent	45,86	44	255
171	95 °C / 5 min	Dent	57,9	44	255
172	95 °C / 5 min	Dent	53,88	44	255
173	95 °C / 5 min	Dent	59,83	44	255
174	95 °C / 5 min	Dent	60,21	44	255
175	95 °C / 5 min	Dent	60,76	44	255
176	95 °C / 5 min	Dent	62	44	255
177	95 °C / 5 min	Dent	63,75	44	255
178	95 °C / 5 min	Dent	58,99	44	255
179	95 °C / 5 min	Dent	69,43	44	255
180	95 °C / 5 min	Dent	59,6	44	255