

Obilježja perineuronskih mreža u prefrontalnoj kori mozga čovjeka

Kirchbaum, Ivona

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:636036>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-21**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Ivona Kirchbaum

**Obilježja perineuronskih mreža u
prefrontalnoj kori mozga čovjeka**

Diplomski rad

Zagreb, 2023

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Ivona Kirchbaum

**Characteristics of perineuronal nets in the
prefrontal cortex of the human brain**

Master thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je izrađen kao jedan od ciljeva znanstvenog projekta BrainECM financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost („Moždani izvanstanični matriks u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“, IP-2019-04-3182, voditeljica projekta: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević) i sredstvima Sveučilišnih potpora (10106-22-3116; 101106-23-2487, voditeljica projekata: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević) te sredstvima projekta "Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi", ZCI-Neuro (GA KK.01.1.1.01.0007, voditelj projekta: prof. dr. sc. Miloš Judaš).



Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za imunohistokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivana Banovca, te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistar eksperimentalne biologije.

Zahvale

Prije svega htjela bih se zahvaliti svom mentoru doc. dr. sc. Ivanu Banovcu na strpljenju, pomoći i potpori pri izradi ovog diplomskog rada.

Hvala mojoj obitelji, posebice mojim roditeljima, koji su bili uvijek uz mene i pružili mi veliku podršku, te hvala mojim prijateljima koji su mi uljepšali i olakšali put kroz studentski život.

Za moju baku Vesnu

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Obilježja perineuronskih mreža u prefrontalnoj kori mozga čovjeka

Ivona Kirchbaum

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Prefrontalna moždana kora (PFC) nalazi se na prednjem dijelu čeonog režnja mozga i proteže se na njegovoj medijalnoj, lateralnoj i orbitalnoj površini. PFC može se podijeliti na dvije regije s različitim funkcijama: lateralni PFC (LPFC) (dorzolateralni i ventrolateralni PFC) i ventromedijalni PFC (vmPFC). Osim na regije, PFC možemo podijeliti na temelju razlika u citoarhitektonici u Brodmannova polja. Izvanstanični matriks PFC-a sadrži složenu mješavinu proteoglikana, tenascina, fibronektina i hijaluronske kiseline koja može okruživati stanična tijela i nastavke neurona, tvoreći dobro organiziranu rešetkastu strukturu koja se naziva perineuronskom mrežom (PNN). PNN-ovi su uključeni u neuroprotekciju, sinaptičku stabilizaciju, ionsko puferiranje te razvoj i plastičnost neurona. Hipoteza ovog diplomskog rada jest da postoje razlike u udjelu, raspodjeli po slojevima i obilježjima perineuronskih mreža između ventralnih i dorzalnih dijelova PFC-a čovjeka. Hipotezu sam ispitala određivanjem udjela PNN-ova u ukupnom broju neurona, raspodjele PNN-ova po slojevima moždane kore te stupnja kolokalizacije PNN-ova i biljega interneurona u ventralnim i dorzalnim dijelovima moždane kore čovjeka. Rezultati imunohistokemijske analize pokazuju da ne postoji značajna razlika u raspodjeli po slojevima i udjelu PNN-ova u ukupnom broju neurona između BA9 i BA14. S druge strane, uočene su određene razlike u raspodjeli PNN-ova uokolo pojedinih subpopulacija živčanih stanica između BA9 i BA14r.

Ključne riječi: izvanstanični matriks, živčane stanice, interneuroni, parvalbumin
(46 stranica, 20 slika, 6 tablica, 63 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: doc. dr. sc. Ivan Banovac

Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Prof. dr. sc. Nada Oršolić

Rad prihvaćen: 7.9.2023.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

Characteristics of perineuronal nets in the prefrontal cortex of the human brain

Ivona Kirchbaum

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The prefrontal cortex (PFC) is located in the frontal lobe of the brain and extends over its medial, lateral, and orbital surfaces. The PFC can be divided into two regions with different functions: the lateral PFC (LPFC) (dorsolateral and ventrolateral PFC) and ventromedial PFC (vmPFC). Furthermore, the PFC can be divided based on differences in cytoarchitectonics into Brodmann areas. The extracellular matrix of the PFC contains a complex mixture of proteoglycans, tenascins, fibronectin, and hyaluronic acid that can surround the cell bodies and processes of neurons, forming a well-organized structure called perineuronal nets (PNNs). PNNs are involved in neuroprotection, synaptic stabilization, ion buffering, and neuronal development and plasticity. The hypothesis of this thesis is that there are differences in the proportion, laminar distribution, and characteristics of perineuronal nets between the ventral and dorsal parts of the human PFC. I tested the hypothesis by determining the proportion of PNNs in the total number of neurons, the distribution of PNNs by layers of the cerebral cortex, and the degree of colocalization of PNNs and interneuron markers in the ventral and dorsal parts of the human cerebral cortex. The results of the immunohistochemical analysis revealed that there is no significant difference in the distribution by layers and the proportion of PNNs in the total number of neurons between BA9 and BA14. On the other hand, certain differences were observed in the distribution of PNNs around specific subpopulations of neurons between BA9 and BA14r.

Keywords: extracellular matrix, nerve cells, interneurons, parvalbumin

(46 pages, 20 figures, 6 tables, 63 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: doc. dr. sc. Ivan Banovac

Co-mentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić, PhD

Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Prof. Nada Oršolić, PhD

Thesis accepted: 7.9.2023

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Prefrontalna kora mozga čovjeka	1
1.2. Izvanstanični matriks moždane kore čovjeka.....	6
1.3. Perineuronske mreže u prefrontalnoj kori mozga čovjeka	7
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	10
3. MATERIJALI I METODE	11
3.1. Uzorci i priprema tkiva.....	11
3.2. Imunohistokemijska analiza histoloških rezova	12
3.3. Obrada i kvantitativna analiza histoloških rezova.....	13
3.4. Statistička analiza	16
4. REZULTATI	17
4.1. Morfologija perineuronskih mreža u Brodmannovim poljima 9 i 14r	17
4.2. Raspodjela po slojevima perineuronskih mreža u Brodmannovim poljima 9 i 14r	19
4.3. Koekspresija perineuronskih mreža i biljega interneurona parvalbumina	25
5. RASPRAVA	35
6. ZAKLJUČCI	39
7. LITERATURA	40
8. ŽIVOTOPIS	46

POPIS KRATICA

BA	Brodmannovo polje, od engl. <i>Brodmann area</i>
CB	kalbindin
CPSG	ondroitin-sulfatni proteoglikani, od engl. <i>chondroitin sulfate proteoglycans</i>
CR	kalretinin
DLPFC	dorzolateralna moždana kora
ECM	izvanstanični matriks, od engl. <i>extracellular matrix</i>
HA	hijaluronska kiselina, od engl. <i>hyaluronic acid</i>
LPCF	lateralna moždana kora
mPFC	medijalna moždana kora
NDS	normalni magareći serum, od engl. <i>normal donkey serum</i>
NeuN	neuronski nuklearni antigen, od engl. <i>neuronal nuclear antigen</i>
oPFC	orbitalna prefrontalna moždana kora
PBS	fostatni pufer, od engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PFC	prefrontalna moždana kora, od engl. <i>prefrontal cortex</i>
PNN	perineuronske mreže, od engl. <i>perineuronal nets</i>
PV	parvalbumin
SBA	aglutinin zrna soje, od engl. <i>soybean agglutinin</i>
SŽS	središnji živčani sustav
VVA	aglutinin vlasastodlakave grahorice, od <i>Vicia villosa agglutinin</i>
WFA	aglutinin japonske glicinije, od <i>Wisteria floribunda agglutinin</i>

1. UVOD

1.1. Prefrontalna kora mozga čovjeka

Moždana kora čeonog režnja može se histološki i fiziološki podijeliti u tri glavna dijela: primarna motorička kora, premotorička kora i prefrontalna kora (Fuster, 2015). Prefrontalna moždana kora (PFC, od engl. *prefrontal cortex*) uobičajeno se definira kao dio moždane kore koji prima recipročne projekcije iz mediodorzalne jezgre talamusa (Uylings i van Eden, 1990; Teffer i Semendeferi, 2012; Barbas, 2015). PFC se nalazi na medijalnoj, lateralnoj i orbitalnoj površini najprednjeg dijela čeonog režanja i zauzima otprilike trećinu cijele kore mozga čovjeka. PFC se često klasificira kao multimodalna asocijacijska kora mozga jer obrađuje integrirane informacije iz više različitih izvora. PFC ima važnu ulogu u tzv. višim kognitivnim funkcijama, tj. složenim kognitivnim procesima koji sudjeluju u kontroli ponašanja. Prema anatomskom smještaju, PFC se može podijeliti u dva funkcionalno različita dijela: lateralni PFC (LPFC) i ventromedijalni PFC (vmPFC) (Morecraft i Yeterian, 2002; Fuster, 2015).

LPFC dodatno se može podijeliti na dorzalni dio (DLPFC) i ventralni dio (VLPFC). DLPFC iznimno je dobro razvijen u čovjeka te je prvenstveno zadužen za procesiranje izvršnih funkcija kao što su planiranje, rasuđivanje, radna memorija, kognitivna fleksibilnost te procesuiranje govora i jezika.

Slično kao i LPFC, vmPFC može se dodatno podijeliti na dva dijela: ventralni ili orbitalni dio (vPFC/oPFC) te medijalni dio (mPFC) (Ongür i sur., 2003; Fuster, 2015). Za razliku od LPFC-a koji je prvenstveno uključen u kognitivne funkcije, vmPFC ima važnu ulogu u generiranju i kontroli emocija, motivacije i nagona, a uključen je i u sustav nagrađivanja. Osim navedenih uloga, vmPFC povezan je i limbičkim sustavom koji je uključen u regulaciju autonomnog živčanog sustava (prvenstveno mPFC) (Groenewegen i Uylings, 2000) te s dijelovima moždane kore zaduženima za procesiranje visceralnih osjeta – okusa i njuha (prvenstveno oPFC) (Fuster, 2015). Na temelju toga oPFC sudjeluje u učenju pomoću podražaja koje prima iz osjetila okusa i mirisa. (Morecraft i Yeterian, 2002; Fuster, 2015; Ece Sarı, 2022).

PFC u čovjeka značajno je više razvijen nego u ostalih primata, a u drugih sisavaca (primjerice glodavaca) pravi korelati postoje samo za dijelove vmPFC-a, dok za DLPFC ne postoje pravi korelati u ne-primata (Preuss, 1995; Uylings i sur., 2003; Fuster, 2015).

Kora velikog mozga može se podijeliti u različite citoarhitektonske regije na temelju razlika u veličini i vrsti stanica te rasporedu neurona u različitim slojevima moždane kore, kao što su razlike u gustoći stanica, prisutnost ili odsutnost određenih slojeva i u relativnoj debljini slojeva (Petrides i sur., 2012). Veliki dio PFC-a čini šestoslojni homotipni izokorteks. Slojevi PFC-a većinom su jasno odijeljeni, a većina regija unutar PFC-a sadrži i dobro razvijen unutarnji granularni sloj (IV), zbog čega se PFC nekad nazivao „frontalnom granularnom moždanom korom“. Iako navedeno vrijedi za dorzalne i rostralne dijelove PFC-a, u ventrokaudalnim i medijalnim dijelovima PFC-a granularni sloj je ili slabo razvijen (disgranularna moždana kora) ili gotovo potpuno odsutan (agranularna moždana kora) (Morecraft i Yeterian, 2002; Petrides i sur., 2012; Fuster, 2015).

U šestoslojnom homotipnom izokorteksu, sloj I naziva se još i molekularnim slojem, a sadrži vrlo mali broj stanica. Sloj II sadrži uglavnom zrnate stanice te nešto piramidalnih stanica čiji se dendriti protežu u sloj I, a aksoni se spuštaju kroz dubinske slojeve moždane kore. Sloj III uglavnom sadrži piramidalne stanice čija se veličina povećava s dubinom prema bijeloj tvari pa ga prema tome možemo podijeliti u tri podsloja: IIIa koji sadrži male piramidalne stanice, IIIb koji sadrži piramidalne stanice srednje veličine i IIIc koji sadrži velike piramidalne stanice. Budući da se slojevi I, II i III nalaze površinski (tj. „iznad“) u odnosu na granularni sloj IV, nazivaju se još zajedničkim imenom i supragranularnim slojevima. Aksoni piramidalnih stanica slojeva II i III tvore asocijacijske kortiko-kortikalne projekcije, tj. veze između različitih regija moždane kore. Granularni sloj IV prvenstveno se sastoji od zvjezdastih neurona koji se često nazivaju i zrnatim stanicama, a karakteriziraju ih kratki dendriti koji se granaju u blizini tijela i šire u svim smjerovima, tvoreći sferično dendritičko polje. Dubinski u odnosu na sloj IV smješteni su tzv. infragranularni ili dubinski slojevi moždane kore – slojevi V i VI. Infragranularni sloj V sastoji se od srednjih i velikih modificiranih piramidalnih stanica. Infragranularni sloj VI sadrži niz tipova neurona različitog oblika i orijentacije, uključujući bipolarne vretenaste živčane stanice. Slojevi V i VI mogu se podijeliti u dva podsloja gdje je gornji sloj (Va, VIa) gušći, a donji (Vb, VIb) rjeđi (Rajkowska i Goldman-Rakic, 1995; Guillery, 2000; Fuster, 2015; Grow, 2018).

Dok DLPFC ima izražen tipični granularni šestoslojni homotipni izokorteks, mPFC i oPFC (s izuzetkom najrostralnijeg dijela oPFC-a) pripadaju velikim dijelom disgranularnoj i agranularnoj moždanoj kori, s istaknutim i gustim dubokim slojevima (V–VI) te slabije izraženim ili gotovo odsutnim slojem IV (Fuster, 2015).

Prvu topografsku podjelu kore mozga napravio je Brodmann 1909. godine koja se i danas koristi za mozak primata i čovjeka. Cijeli PFC može se citoarhitektonski podijeliti na Brodmannova polja (BA, engl. *Brodmann areas*). Za Brodmanna „*area praefrontalis*“ bila je manje ventromedijalno smještena regija, BA 11, unutar velike „*regio frontalis*“ koja sadrži Brodmannova polja koja danas ubrajamo u PFC (Tablica 1.1.) (Ongür i Price, 2000; Fuster, 2015).

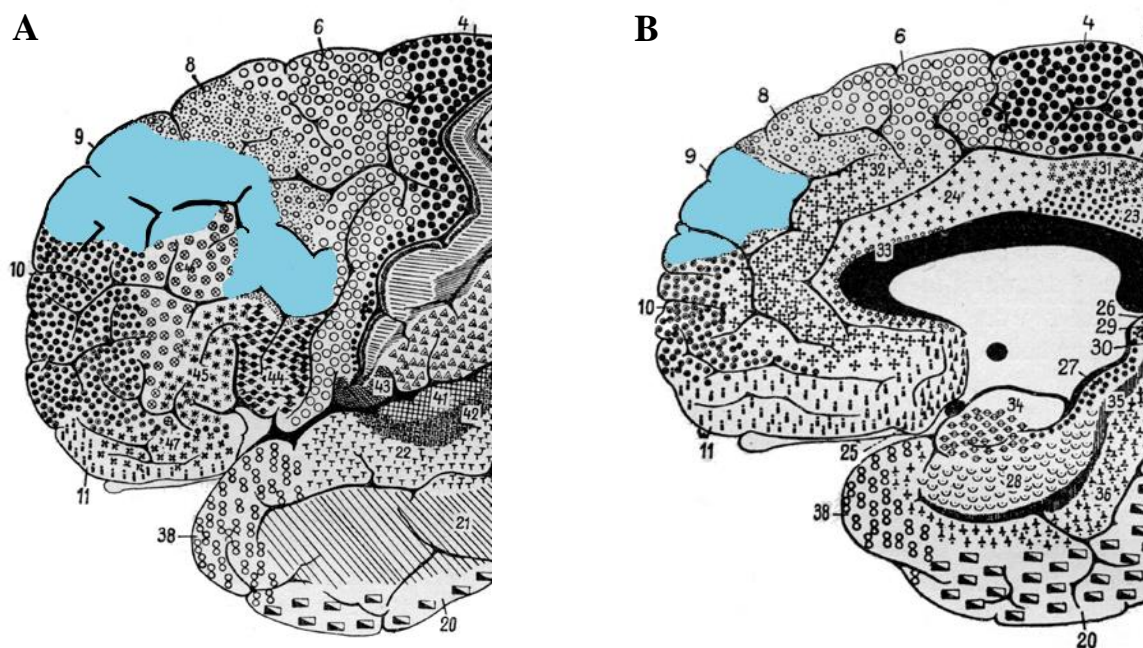
Tablica 1.1. Podjela prefrontalne kore mozga čovjeka u Brodmannova polja

Dijelovi prefrontalne kore mozga čovjeka		Brodmannova polja
Lateralna prefrontalna kora	dorzolateralna	8, 9, 10, 46
	ventrolateralna	44, 45, 47
Medijalna prefrontalna kora		24, 25, 32, 33
Orbitofrontalna prefrontalna kora		10, 11, 12, 13, 14

Zbog funkcionalne i citoarhitektonske razlike unutar različitih regija prefrontalne kore mozga čovjeka, može se pretpostaviti da postoje i razlike na molekularnoj razini između Brodmannovih polja. Zbog tih razlika zanimljivo je promatrati Brodmannova polja 9 i 14, budući da BA9 pripada DLPFC-u, a BA14 pripada oPFC-u.

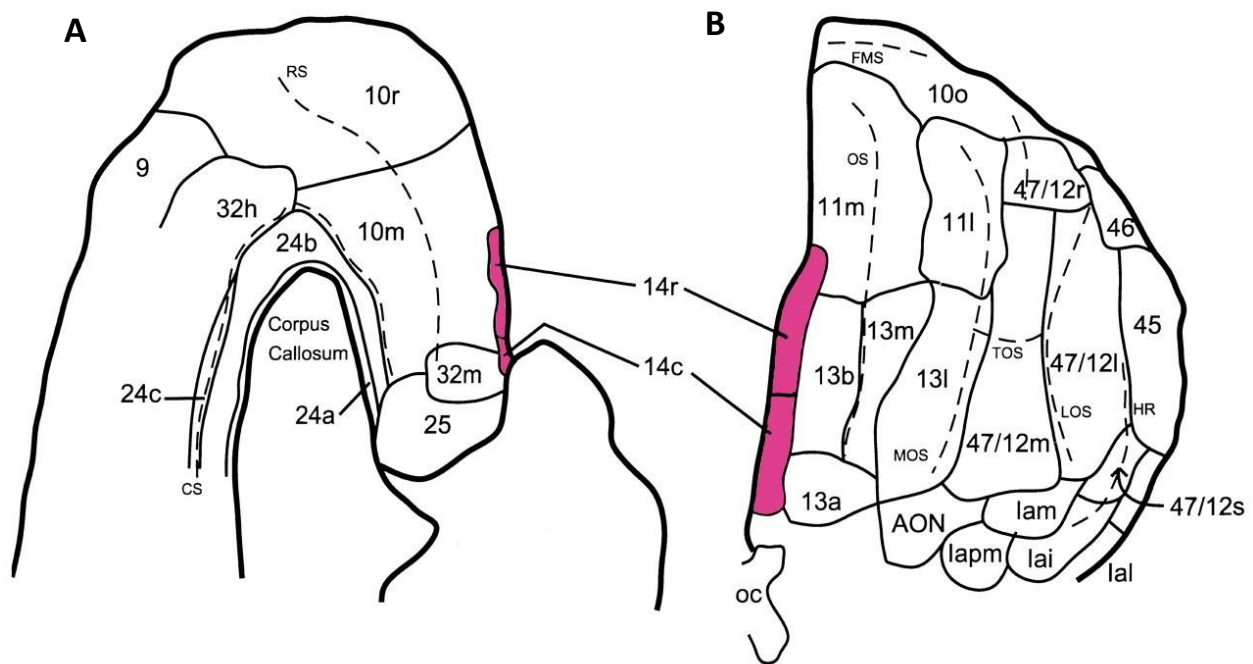
Brodmannovo polje 9 (*area frontalis granularis*) nalazi se u krajnjem dorzalnom dijelu PFC-a i pretežno je smješteno na površini vijuge, *gyrus frontalis superior* te se medijalno proteže do paracingularnog žlijeba (Slika 1.1.). BA9 se lateralno proteže kroz vijugu, *gyrus frontalis medius* kojom graniči s BA46, a ventralno završava na vijugi, *gyrus frontalis inferior*. S rostralne strane BA9 graniči s BA10 dok s kaudalne graniči s BA8 (Slika 1.1.) (Brodmann, 1909; Petrides i Pandya, 1999; Guillery, 2000; Morecraft i Yeterian, 2002; Brodmann i Gary, 2006). Funkcionalne uloge BA9 su više kognitivne funkcije poput epizodne i radne memorije, induktivnog razmišljanja i

teorije uma (Goel i Grafman, 1995; Gallagher i sur., 2002; Gallagher i Frith, 2003; Marklund i sur., 2007; Strotzer, 2009; Goulas i sur., 2012).



Slika 1.1. Anatomski smještaj Brodmannova polja 9 (označeno plavom bojom) u prefrontalnoj kori mozga čovjeka. Slike su modificirane iz Brodmann, 1909. (A) Dorzolateralna površina mozga gdje su vidljive granice BA9 smještenog u vijugama, *gyrus frontalis superior* i *gyrus frontalis medius*. (B) Medijalna površina mozga gdje je vidljiva medijalna granica BA9.

Brodmann u svojim citoarhitektonskim mapama inicijalno nije definirao polje 14 u PFC-u čovjeka, već samo u majmuna (Brodmann, 1909; Brodmann i Gary, 2006). Walker je 1940. godine podijelio oPFC i mPFC mozga kod vrste *Macaca fascicularis* gdje je polje 14 smjestio na ventromedijalni konveksitet (Walker, 1940). Beck (1949.) je prepoznao Brodmannovo polje 14 u vijugi, *gyrus rectus* u kori mozga čovjeka (Beck, 1949), a kasnije Ongür i sur. (2003.) ponovo definiraju Brodmannovo polje 14 kao polje smješteno unutar vijuge, *gyrus rectus*. BA14 lateralno graniči s poljima 13a i 13b, medijalno s poljima 32m i 10m te rostralno s poljem 11m (Ongür i Price, 2000; Ongür i sur., 2003) (Slika 1.2.).



Slika 1.2. Anatomski smještaj Brodmannova polja 14 (označeno ružičastom bojom) u prefrontalnoj kori mozga čovjeka. Slike su modificirane iz Ongür i Price, 2000. (A) Medijalna površina mozga gdje je vidljiva ravna vijuga, *gyrus rectus* koju zauzima Brodmannovo polje 14 te je prikaza i podjela u rostralni (BA14r) i kaudalni dio (BA14c). (B) Ventralna (orbitalna) površina mozga gdje je vidljivo Brodmannovo polje 14 također podijeljeno na BA14r i BA14c.

Dvije podregije polja 14, 14r (od engl. *rostral*) i 14c (od engl. *caudal*), opisane su prvo u majmuna (*Mucaca mulata*), a potom i u ljudskom mozgu. U BA14r i 14c je debljina moždane kore manja te su slojevi II i III slabije međusobno razgraničeni nego u poljima DLPFC-a. Oba navedena polja

karakterizira iznimno proširen sloj Vb u odnosu na okolna polja vmPFC-a. BA14c pripada agranularnoj moždanoj kori, dok BA14r pripada disgranularnoj moždanoj kori te se ova dva polja međusobno razlikuju prvenstveno prema odsutnosti, odnosno prisutnosti sloja IV. Funkcija Brodmannovog polja 14 nije u potpunosti istražena, ali s obzirom na to da se nalazi na vrhu i bočnom rubu vijuge, *gyrus rectus* odnosno na spoju „viscero-motoričkih” ili “emoto-motoričkih” sustava, vjerojatno je da služi za prijenos informacija između obaju sustava. Uz to, BA14 ima ulogu asocijacijske moždane kore za osjet njuha te je uključeno u obradu informacija iz autonomnog živčanog sustava (Ongür i Price, 2000; Ongür i sur., 2003).

1.2. Izvanstanični matriks moždane kore čovjeka

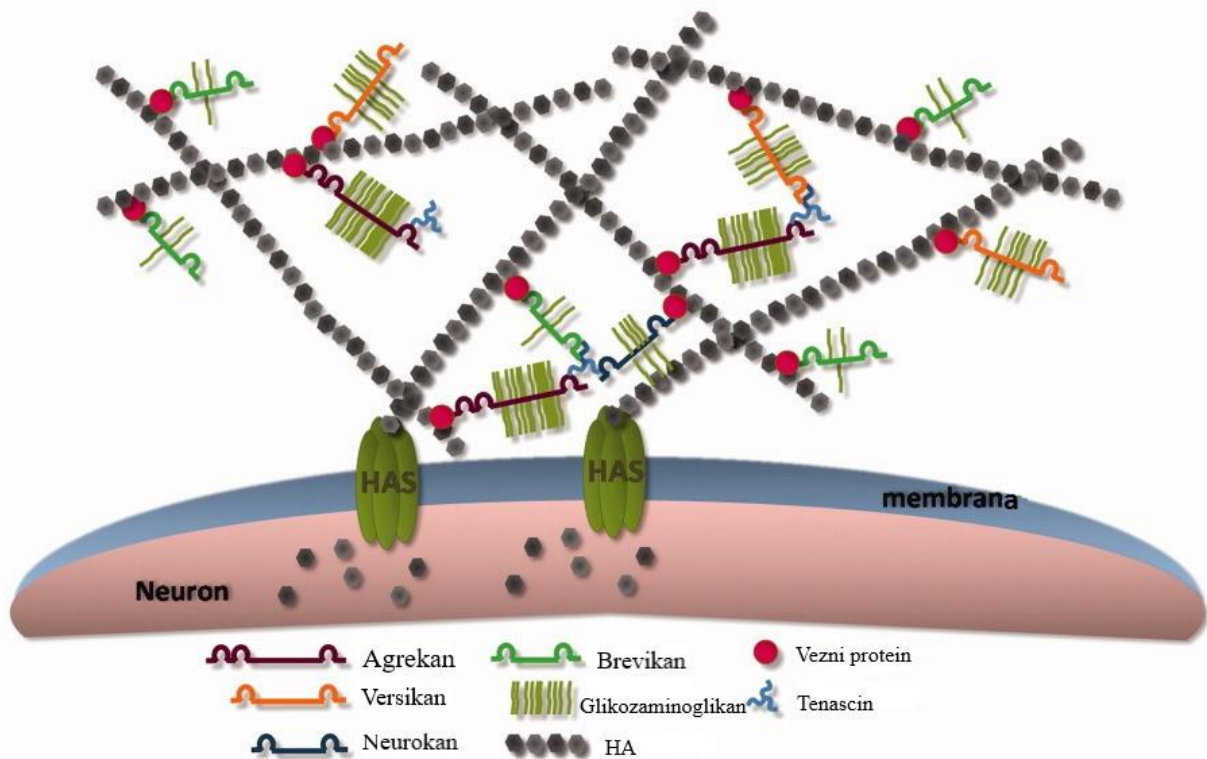
Moždana kora čovjeka sastoji se od živčanih stanica (neurona) i glija stanica te izvanstanične tvari, tj. izvanstaničnog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*). ECM je gusti supstrat koji čini 10 – 20 % ukupnog volumena mozga te zauzima prostor između neurona i glija stanica (Nicholson i Syková, 1998). ECM je uglavnom sastavljen od hijaluronske kiseline (HA, od engl. *hyaluronic acid*) koja stvara okosnicu za pričvršćivanje drugih molekula kao što su proteoglikani iz porodice lektikana (hondroitin-sulfatni proteoglikani) i glikoproteini poput tenascina i fibronektina. ECM stvara mikrokruženje koje je neophodno za preživljavanje stanica, plastičnost, odgovor na oštećenja i regeneraciju te olakšava organizaciju različitih područja mozga. Za vrijeme razvoja mozga utječe na migraciju stanica, aksonsko vođenje i sinaptogenezu, a promjene u ekspresiji i sastavu ECM-a zbog ozljeda ili bolesti mogu biti štetne za neuralni popravak (Zimmermann i Dours-Zimmermann, 2008; Burnside i Bradbury, 2014; Jovanov Milošević i sur., 2014; Dauth i sur., 2016).

U moždanoj kori, ECM se javlja u dva osnovna oblika – difuzni i kondenzirani. Dok je difuzni ECM raspršen u međustaničnom prostoru, kondenzirani ECM tvori nakupine molekula uokolo stanica moždane kore. Posebno zanimljiv oblik kondenziranog ECM-a su tzv. perineuronske mreže (PNN, od engl. *perineuronal nets*) koje se nalaze uokolo tijela živčanih stanica i njihovih nastavaka (dendrita i aksona) (Trnski i sur., 2022).

1.3. Perineuronske mreže u prefrontalnoj kori mozga čovjeka

PNN-ove u središnjem živčanom sustavu (SŽS) tvore komponente ECM-a kao što su HA, vezni proteini (engl. *link proteins*), hondroitin-sulfatni proteoglikani (CPSG, od engl. *hondroitin sulfate proteoglycans*) te tenascin. PNN-ove je prvi puta opisao Camilo Golgi 1882. godine kao retikularne strukture smještene uokolo soma živčanih stanica (Vitellaro-Zuccarello i sur., 1998). Danas je poznato da predstavljaju stabilne agregate molekula ECM-a stvorene specifičnim interakcijama koje okružuju some i proksimalne dendrite živčanih stanica SŽS-a. Na molekularnoj razini organizacija PNN-ova stvara se tako da lektikani (proteoglikani kao što su agrekan, brevikan, versikan i neurokan) u izvanstaničnom prostoru stupaju u interakciju s linearnim, nesulfatiranim polimernim lancima HA na površini stanice, a njihova interakcija stabilizirana je veznim proteinima (Slika 1.3.). Molekule koje tvore PNN-ove stvaraju neuroni i glija stanice. Glija stanice stvaraju tenascin, versikan i hijaluronasku kiselinu, a neuroni CPSG-ove (Kwok i sur., 2011; Wang i Fawcett, 2012).

Vizualizacija PNN-ova može postići na više načina: (1) upotrebom biljnih lektina kao što su aglutinin vlasastodlakave grahorice (VVA, od *Vicia villosa agglutinin*), aglutinin japanske glicinije (WFA, od *Wisteria floribunda agglutinin*) te aglutinin zrna soje (SBA, od engl. *soybean agglutinin*) (biljni lektini vežu se selektivno i s visokim afinitetom na terminalne alfa ili beta ostatke N-acetilogalaktozamina); (2) pomoću proteoglikana koji su sulfatni glikokonjugati pa se mogu detektirati pomoću anionskog ili kationskog koloida željeza; (3) bojenjem Kopshovim srebrnim nitratom ili metilenskim modrilom koji vizualiziraju središnje proteine proteoglikana. Danas se najčešće koristi imunohistokemijsko bojenje za lokalizaciju perineuronkih mreža (Karetko i Skangiel-Kramska, 2009; Wang i Fawcett, 2012). Većina PNN-ova veže WFA koji se najviše koristi kao biljeg PNN-ova u histološkim analizama. Postoje i WFA negativni PNN-ovi kao što su oni koji okružuju određene vrste živčanih stanica moždane kore te se njih može prikazati koristeći različita anti-lektikanska protutijela (Fawcett i sur., 2019).



Slika 1.3. Prikaz molekularne formacije perineuronskih mreža. Slika je modicifirana iz Kwok i sur. 2011. Hijaluron sintetaza (HAS, od engl. *hyaluronan synthases*) nalazi se na površini neurona i sintetizira HA te je izlučuje u perineuronsko područje. Molekule agrekan, neurokan, versikan i brevikan iz porodice lektikana vežu se za HA okosnicu nakon čega su te veze učvršćene veznim proteinima. Molekule lektikana na N-terminalnoj domeni ima HA veznu domenu, a u sredini molekule se nalazi GAG vezna domena čija veličina varira među različitim molekulama iz porodice. C-terminalne domene lektikana vežu se na tenascin i tako tvore čvrstu mrežu.

Gotovo svi dijelovi SŽS-a sadrže PNN-ove, no njihova raspodjela unutar mozga nije ravnomjerna. U zrelom SŽS-u čovjeka PNN-ovi su povezani s motoričkim strukturama. Osim toga, PNN-ovi su uočeni uokolo živčanih stanica u vidnoj moždanoj kori, somatosenzornoj moždanoj kori, dubinskim jezgrama malog mozga, supstanciji nigri, hipokampusu i kralježničnoj moždini. Različite strukture proteina i ugljikohidratnih komponenti CPSG-a sugeriraju da PNN-ovi mogu obavijati različite vrste neurona. U dubinskim cerebralnim jezgrama, moždanom deblu, kao i u leđnoj moždini, PNN-ovi okružuju projekcijske neurone (Karetko i Skangiel-Kramska, 2009; Kwok i sur., 2011). U mozgu većina PNN-ova okružuje nepiramidalne neurone koji izražavaju

biljege specifične za inhibitorne GABA-ergičke interneurone. Većina GABA-ergičkih interneurona u PFC-u izražava barem jedan protein koji veže kalcij: parvalbumin (PV), kalbindin (CB) i kalretinin (CR) te se u primata uobičajeno i dijele u tri velike populacije ovisno o tome koji od navedenih proteina izražavaju. S obzirom na to da je većina istraživanja o interneuronima provedena na glodavcima, u njih se koristi i drugačija podjela. Interneuroni su klasificirani u tri populacije: interneuroni koji izražavaju kalcij-vežući protein parvalbumin (PV), interneuroni koji izražavaju peptid somatostatin (SOM) te interneuroni koji izražavaju receptor za serotonin (5-HT_{3a}-R). U mozgu primata obično se CR⁺ neuroni smatraju subpopulacijom 5-HT_{3a}-R⁺ neurona, a CB⁺ neuroni subpopulacijom SOM⁺ neurona, dok PV⁺ neuroni čine zasebnu populaciju, kao i u glodavaca. Međutim, novija istraživanja na ljudskom mozgu ukazuju na to da podjelu interneurona u glodavaca nije moguće ovako jednostavno translirati na PFC čovjeka (Banovac i sur., 2022; Prkačin i sur., 2023).

U BA9 i BA14r najbrojnija populacija interneurona su CR⁺ neuroni, zatim slijede PV⁺ neuroni, dok su CB⁺ neuroni najmanje brojni (Gabbott i Bacon, 1996). U samoj kori mozga čovjeka PNN-ovi su najčešće povezani s PV⁺ GABA-ergičkim interneuronima. Osim uokolo inhibicijskih interneurona, PNN-ovi se ponekad mogu nalaziti i uokolo određenih projekcijskih (ekscitacijskih) neurona (Karetko i Skangiel-Kramska, 2009; Kwok i sur., 2011; Fawcett i sur., 2019).

Pretpostavlja se da je uloga nezrelih PNN-ova stvaranje veze između izvanstaničnog prostora i unutarstaničnog citoskeleta. Nezreli PNN-ovi privlače i hvataju neurotrofne tvari kao što su čimbenici rasta zbog čega mogu regulirati sazrijevanje te stimulirati rast neurona. Neke komponente PNN-ova eksprimiraju se prije vrhunca postnatalne sinaptogeneze i važne su za formiranje sinapsi (Karetko i Skangiel-Kramska, 2009). Postoje mnoge pretpostavke o funkciji zrelih PNN-ova, a najviše je istraživana uloga PNN-ova u kontroli plastičnosti SŽS-a. Istraživanja ukazuju na to da sazrijevanje PNN-ova smanjuje plastični potencijal neurona čime se stabiliziraju sinaptičke interakcije. Osim toga PNN-ovi vjerojatno imaju ulogu u održavanju homeostaze vode jer sadrže hidrofilne molekule kao što je CPSG, a smatra se da bi mogli biti važni i u neuroprotekciji (Karetko i Skangiel-Kramska, 2009; Kwok i sur., 2011).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Hipoteza ovog diplomskog rada jest da postoje razlike u udjelu, raspodjeli po slojevima i fenotipskim obilježjima (oblik, veličina i sastavnica) perineuronskih mreža između ventralnih i dorzalnih dijelova prefrontalne kore čovjeka.

Na temelju hipoteze definirana su tri cilja. Prvi cilj jest odrediti udio perineuronskih mreža u ukupnom broju neurona u ventralnim i dorzalnim dijelovima prefrontalne moždane kore čovjeka. Drugi cilj jest odrediti raspodjelu perineuronskih mreža po slojevima moždane kore. Treći cilj jest odrediti stupanj kolokalizacije perineuronskih mreža i biljega interneurona u ventralnim i dorzalnim dijelovima prefrontalne moždane kore čovjeka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci i priprema tkiva

Uzorci koji su korišteni u ovom istraživanju blokovi su arhiviranog tkiva prefrontalne kore pet različitih ljudskih mozgova iz Zagrebačke neuroembriološke zbirke (Tablica 3.1.) (Kostovic i sur., 1991; Judaš i sur., 2011). Korišteno tkivo je već pohranjeni postmortalni materijal prikupljen isključivo za vrijeme redovnih obdukcija te je kodirano odgovarajućom oznakom, a podaci o dobi, spolu i uzroku smrti osobe od koje tkivo potječe navedeni su u posebnom izdvojenom protokolu. Osobe od kojih je prikupljeno moždano tkivo nisu bolovale od neuroloških ni psihijatrijskih bolesti, a prilikom obdukcije nisu nađeni znakovi neuropatoloških odstupanja u mozgovima. Sve osobe umrle su bez preagonalnog stanja te postmortalnim interval stoga predstavlja stvarni vremenski interval od trenutka smrti živčanih stanica. Svi uzorci prikupljeni su sukladno Helsinškoj deklaraciji iz 2000. godine i etičkim dopusnicama Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj etičkih dopusnica: 380–59-10106–14-55/152, 380-59-10106-19-111/210).

Tablica 3.1. Uzorak korišten u istraživanju.

Mozak	Spol	Dob (godine)	Postmortalni interval (h)	Uzrok smrt/relevantna patologija
ČO382	M	40	6,5	nagla srčana smrt
ČO383	M	51	11	nagla srčana smrt
ČO385	M	29	8	politrauma
ČO386	M	37	6	nagla srčana smrt
ČO387	M	44	6	predoziranje metadonom/benzodiazepinima

Blokovi moždanog tkiva fiksirani su uranjanjem u 4 %-tni formaldehid te kiroprotektirani u otopinama saharoze (10 % i 20 %). Blokovi tkiva su zatim smrznuti i pohranjeni na temperaturi od -80°C. Dio blokova tkiva je odmrznut i uklopljen u parafin (Sadeghipour i Babaheidarian, 2019), te sam ih takve rezala mikrotomom (LEICA HI1210) na rezove debljine 20 µm (Sy i Ang, 2019) koje sam potom stavila na VitroGnost Plus Ultra adhezivna predmetna stakla (Biognost, Hrvatska) i pohranila do daljnje analize.

Ovaj rad usmjeren je na analizu dva polja PFC-a: Brodmannovo polje 9 (BA9) i rostralni dio Brodmannova polja 14 (BA14r). Iz svakog mozga analizirala sam za svako imunohistokemijsko bojenje po tri histološka reza za svako Brodmannovo polje.

3.2. Imunohistokemijska analiza histoloških rezova

Za analizu histoloških rezova kore mozga koristila sam metodu indirektno imunofluorescencije u kojoj se neobilježena primarna protutijela vežu za ciljanu molekulu, a sekundarno protutijelo, koje je obilježeno fluoroforom, prepoznaje i veže se na primarno protutijelo (Betterle i Zanchetta, 2012). Za detekciju neurona koristila sam primarna protutijela koja se vežu na neuronalni nuklearni antigen NeuN koji obilježava gotovo sve živčane stanice moždane kore, a za prikaz PV⁺ interneurona primarna protutijela koja se vežu na protein parvalbumin (PV). U kombinaciji s anti-NeuN ili anti-PV protutijelima koristila sam fluorescentno obilježeni WFA za detekciju PNN-ova. Imunohistokemijsko bojanje provedeno je prema standardnom protokolu za parafinske rezove (Banovac i sur., 2019; Zaqout i sur., 2020; Banovac i sur., 2022). Rezove sam prije imunohistokemijske analize osvijetlila jakim izvorom svjetlosti u razdoblju od 48 sati kako bi se smanjila količina lipofuscinske autofluorescencije na preparatima (Neumann i Gabel, 2002; Sun i sur., 2017). Nakon 48 sati rezove sam deparafinizirala uranjanjem dva puta u ksilol po 10 minuta te dehidrirala uranjanjem u etanol, po 5 minuta, u padajućem nizu koncentracija (dva uranjanja u 100 %-tni etanolu, jedno uranjanje u 96 %-tni etanolu i jedno uranjanje u 70 %-tni etanol). Rezove sam zatim ispirala u fosfatnom puferu (1x PBS, od engl. *phosphate buffered saline*, pH=7,4) i provela postupak povratka antigena (engl. *antigen retrieval*) u citratnom puferu (pH = 6,0) (Boenisch, 2005). Rezove sam potom ponovo ispirala tri puta u PBS-u te ih osušila i okružila hidrofobnom olovkom (Liquid blocker, PAP pen, Biognost, Hrvatska). Nakon toga provela sam postupak blokiranja proteina (engl. *protein blocking*) kako bi se smanjila nespecifičnost vezanja sekundarnog protutijela. Postupak blokiranja provela sam u razdoblju od jedan sat pomoću otopine koja sadrži normalni magareći serum (NDS, od engl. *normal donkey serum*, Chemicon, SAD) razrijeđen u omjeru 1:30 u otopini za permeabilizaciju (0,3 %-tni Triton X-100, Sigma-Aldrich, SAD). Nakon ovog postupka, rezove sam inkubirala 24 sata u otopini koja sadrži NDS i jedno primarno protutijelo (anti-NeuN zečje poliklonalno protutijelo, abcam, UK, kat. br. ab104225, lot: GR3370892-1 ili anti-PV zečje poliklonalno protutijelo, abcam, UK, kat. br. ab11427, lot: GR3317380-2) u kombinaciji s fluorescentno obilježenim WFA (Vector Laboratories, SAD, kat.

br. FL-1351, lot: ZG0903). Nakon inkubacije rezove sam ponovo ispirala u PBS-u, te ih inkubirala dva sata u otopini koja sadrži sekundarno visoko križno-adsorbirano protu-zečje Alexa 546 protutijelo (ThermoFisher, SAD, kat. br. A10040, lot: 1833519). Rezove sam zatim ponovo ispirala te potom tretirala dvije minute otopinom za smanjivanje lipofuscinske i pozadinske autofluorescencije (TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher, Biotium, SAD). Rezove sam nakon toga posljednji put ispirala u PBS-u nakon čega sam ih pokrila sredstvom za pokrivanje fluorescentnih histoloških rezova (VectaMount® AQ Aqueous Mounting Medium, Vector Laboratories, SAD) i pohranila u hladnjak na +4°C.

Za oba Brodmannova polja obojana su po tri reza anti-NeuN protutijelom u kombinaciji s fluorescentno obilježenim WFA te po tri reza anti-PV protutijelom isto u kombinaciji s fluorescentno obilježenim WFA.

3.3. Obrada i kvantitativna analiza histoloških rezova

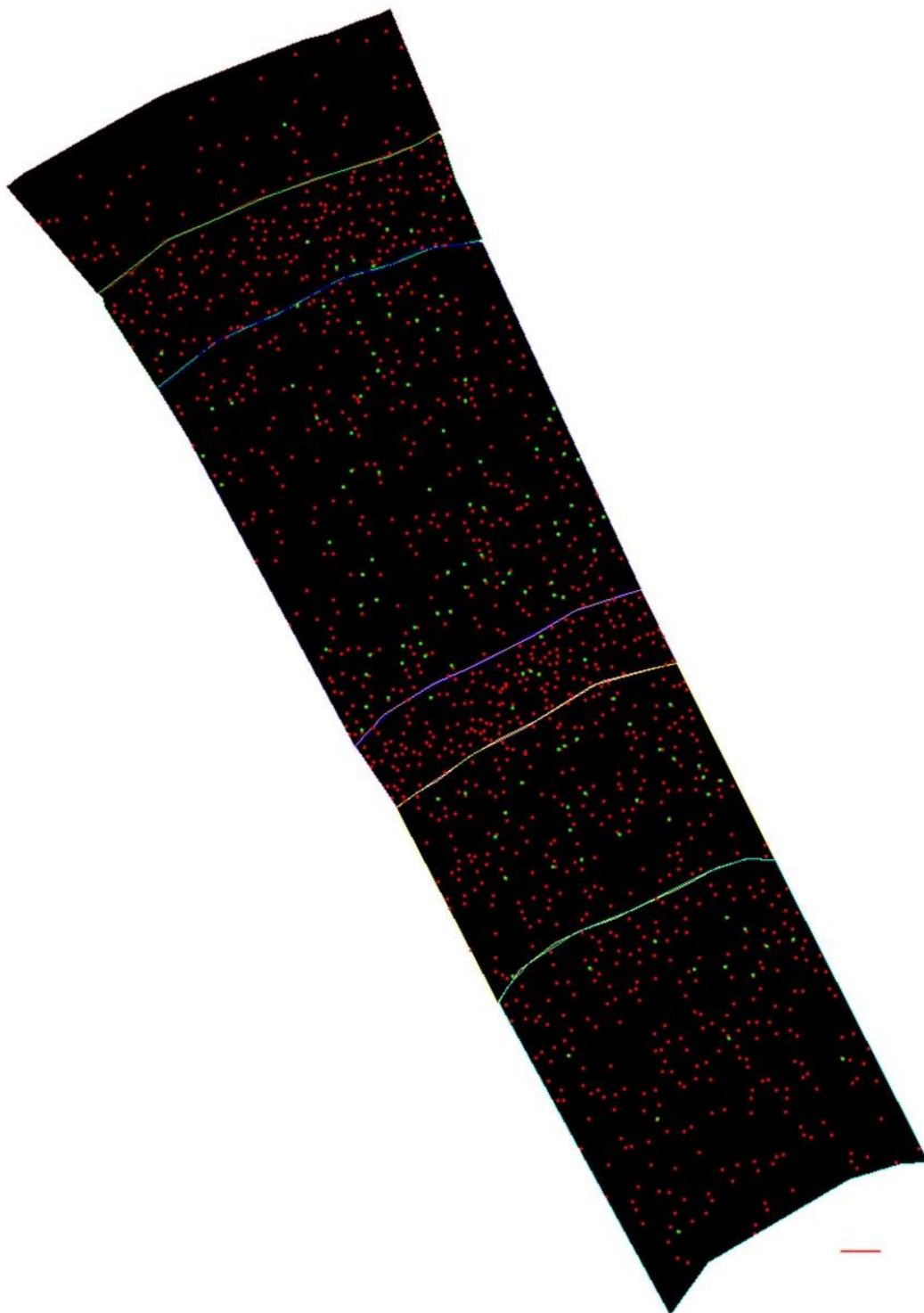
Rezovi su nakon imunohistokemijskog bojanja mikroskopirani i snimljeni laserskim konfokalnim mikroskopom (Olympus FLUOVIEW FV3000RS, Japan) u Laboratoriju za konfokalnu mikroskopiju (Hrvatski institut za istraživanje mozga, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu – HIIM). Konfokalni mikroskop omogućuje snimanje preparata u više ravnina i više fluorescentnih biljega istovremeno. Na preparatima je snimljena cijela regija od interesa na velikom povećanju (20x) u više vidnih polja (30 – 50). U svakom vidnom polju preparat je snimljen u pet konfokalnih ravnina kroz cijelu debljinu preparata (razmak između konfokalnih ravnina: 4 µm) u rezoluciji 1024x1024 piksela. Time je generirana kompozicijska slika u kojoj jedan piksel odgovara duljini od 0,6215 µm (Banovac i sur., 2022).

Dobivene slike preparata obrađivala sam u programu Neurolucida 2020 (MBF Bioscience, Vermont, SAD) u Laboratoriju za neuromorfometriju (HIIM). Na slici svakog reza odredila sam kolumne za brojanje živčanih stanica i PNN-ova unutar odgovarajućeg Brodmannovog polja. Preparati koji su obojeni anti-NeuN protutijelima prikazuju isključivo živčane stanice što je pogodno za razlučivanje slojeva unutar moždane kore. Kolumne sam ocrtala tako da na pijalnoj površini budu širine 1000 µm, a prema dubini prate usmjerenje neurona. Kolumna za brojenje sastojala se od pojedinačnih kontura (obrisa) gdje je svaka kontura ocrtavala jedan sloj (Slika 3.1.). Za rezove koji su obojeni anti-PV protutijelima koristila sam kolumne za brojenje susjednih rezova

obojenih anti-NeuN protutijelima. Na svakom rezu analizirala sam slojeve I, II, III, IV, V, VI zasebno. Slojeve sam odjeljivala na temelju citoarhitektonske građe oba analizirana Brodmannova polja. Prvi sloj razlikuje se od ostalih po tome što ima vrlo malo raspršenih živčanih stanica. Drugi sloj sadrži gusto raspoređene stanice okruglog oblika tijela, dok treći sloj sadrži uglavnom piramidalne stanice što ga razlikuje od drugog i četvrtog sloja. U četvrtom sloju sam naišla na najveću razliku između BA9 i BA14r, gdje je on puno jasnije odijeljen u BA9 nego u BA14r. Četvrti sloj sadrži manje, gusto raspoređene granularne stanice. Peti i šesti sloj sam razlikovala jer oba imaju gušću raspodjelu stanica u gornjem dijelu sloja, a u donjem dijelu stanice su manje gusto raspoređene. Također, u petom sloju nalaze se modificirane piramidalne stanice, a u šestom sloju dominantno su prisutne vretenaste bipolarne stanice.

Svakom sam molekularnom biljegu (NeuN, PV i WFA) unutar programa NeuroLucida dodijelila različiti marker. Živčane stanice sam obilježila na način da sam unutar programa koristila funkciju „pronalaženje stanica“ (engl. *Detect cells*) koja može računalnim algoritmom na konfokalnoj snimci detektirati tijela stanica. Za korištenje te funkcije potrebno je odabrati regije interesa (ocrtane kolumne), odrediti minimalni i maksimalni promjer stanice te prag koji određuje granicu intenziteta između toga što program prepoznaje kao signal i što prepoznaje kao pozadinu. Nakon što je program obilježio tijela stanica markerom, kolumne sam još jednom provjerila i ručno ispravila krivo označene ili preostale neoznačene stanice (Banovac i sur., 2022). Budući da opisani računalni algoritam nije prilagođen za prepoznavanje PNN-ova, njih sam označavala isključivo ručno. Nakon pojedinačnog označavanja PV i WFA markera, odredila sam i kolokalizacijski marker tako da sam zadala koliko najviše dva markera mogu biti udaljena, a da i dalje pripadaju istoj stanici (za kortikalne interneurone optimalna vrijednost jest 10 μm , jer odgovara njihovom prosječnom promjeru tijela). Program na mjestima koja zadovoljavaju kriterij udaljenosti stavlja kolokalizacijski marker. Na kraju sam sve kolokalizacijske markere ručno provjerila.

Nakon kvantitativne analize u programu NeuroLucida, konture i oznake analizirala sam u programu NeuroLucida Explorer koji računa broj pojedinih markera po konturi (sloju) te površinu pojedine konture.



Slika 3.1. Ocrtavanje slojeva moždane kore u programu Neurolucida. Primjer postupka kvantifikacije reprezentativnog histološkog reza. Konture različitih boja predstavljaju slojeve moždane kore, crveni marker NeuN imunoreaktivne stanice, a zeleni marker perineuronske mreže. Mjerka: 100 μm .

3.4. Statistička analiza

Statističku obradu podataka napravila sam u programu GraphPad Prism, inačica 9.2.0 (GraphPad Software, La Jolla, SAD). Za sve podatke prikazala sam deskriptivnu statistiku (mjere centralne tendencije i raspršenja) te testove razlika.

Za prikaz udjela PV⁺ neurona te PNN-ova u ukupnom broju neurona izračunala sam aritmetičku sredinu podataka iz svih mozгова u svakom sloju u oba Brodmannova polja. Podatke sam prikazala kao aritmetičku sredinu \pm standardnu devijaciju. Osim aritmetičke sredine, za sve podatke izračunala sam i medijan. Sve rezultate izračuna prikazala sam tablično.

Za testiranje razlika udjela PNN-ova u ukupnom broju neurona između BA9 i BA14r koristila sam upareni t-test. Podatke iz istog mozga analizirala sam kao zavisne podatke, a statistički značajnu razliku za sve testove smatrala sam P -vrijednost $< 0,05$. Upareni t-test koristila sam u testiranju razlika ukupnog udjela PNN-ova te u testiranju razlika udjela unutar slojeva između Brodmannovih polja.

Razlike ukupnog udjela PNN-ova te razlike udjela po slojevima između Brodmannovih polja prikazane su procjenskim dijagramima (engl. *estimation plots*).

4. REZULTATI

4.1. Morfologija perineuronskih mreža u Brodmannovim poljima 9 i 14r

Raspodjelu perineuronskih mreža u BA9 i BA14r analizirala sam anti-NeuN bojenjem neurona u kombinaciji s fluorescentno obilježenim WFA koji obilježava perineuronske mreže.

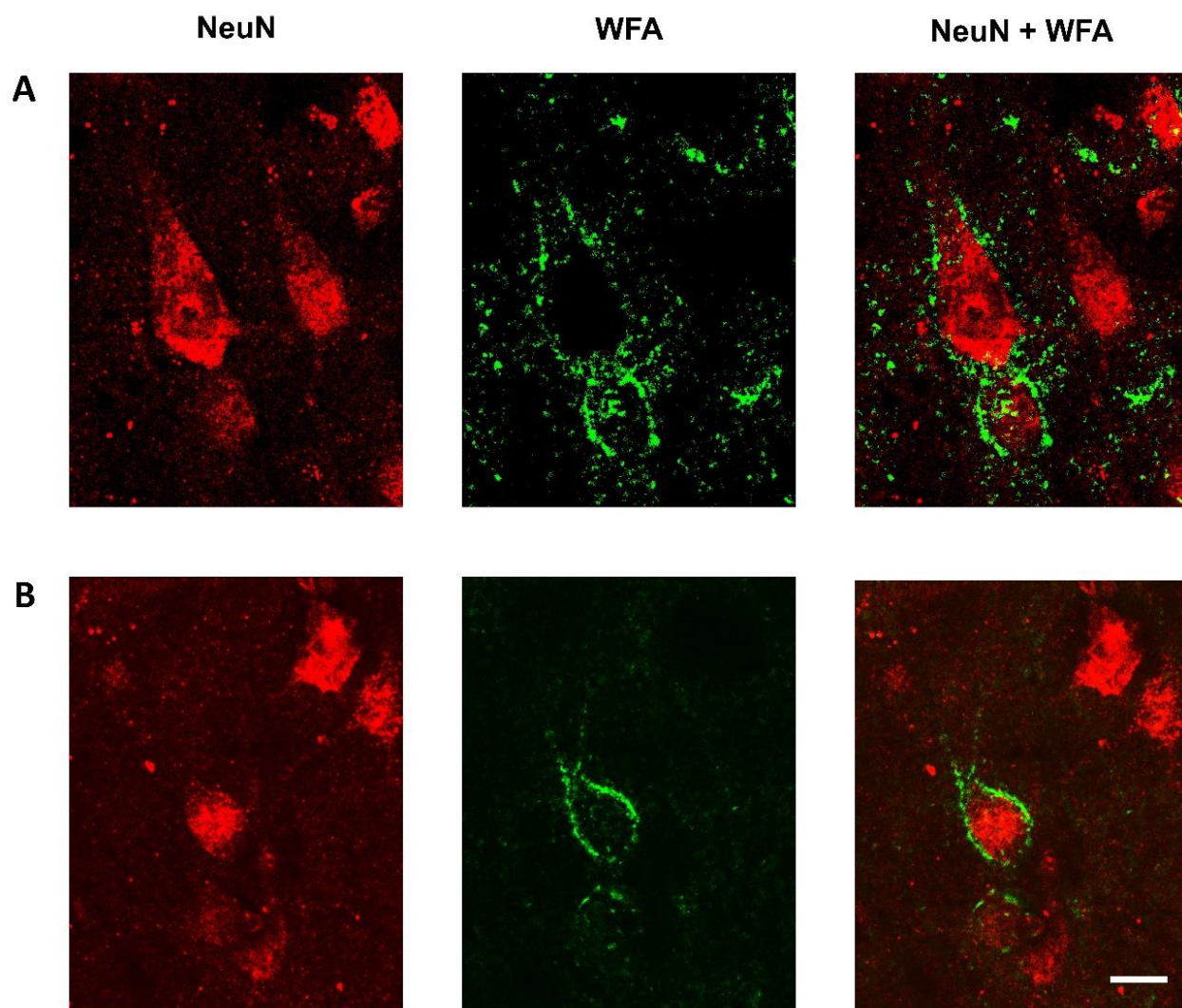
Anti-NeuN bojenje prikazuje prvenstveno tijela živčanih stanica (jezgru i perikarion – citoplazmu uokolo jezgre u području tijela stanice), a gotovo sve živčane stanice u moždanoj kori čovjeka izražavaju NeuN kao biljeg. Za razliku od NeuN bojenja, WFA bojenjem prikazuju se PNN-ovi koji su smješteni uokolo tijela živčanih stanica i početnih dijelova njihovih staničnih nastavaka (dendrita i aksona).

Budući da PNN-ovi prate obrise stanice, njihova osnovna morfologija odgovarala je morfologiji stanica koje okružuju. Kvalitativnom analizom utvrdila sam da je većina WFA⁺ PNN-ova bila smještena uokolo dva morfološka tipa živčanih stanica – piramidalnih stanica i nepiramidalnih stanica okruglog staničnog tijela (Slika 4.1.).

PNN-ovi smješteni uokolo piramidalnih stanica okružuju tijelo stanice i početne dijelove staničnih nastavaka, ali u području staničnih nastavaka ne dosežu do razine njihova prvog grananja (Slika 4.1.-A).

PNN-ovi smješteni uokolo nepiramidalnih stanica okrugla staničnog tijela ponekad pak dosežu do razine prvog grananja staničnih nastavaka te stoga prate morfologiju dendritičkog stabla nepiramidalnih stanica (Slika 4.1.-B).

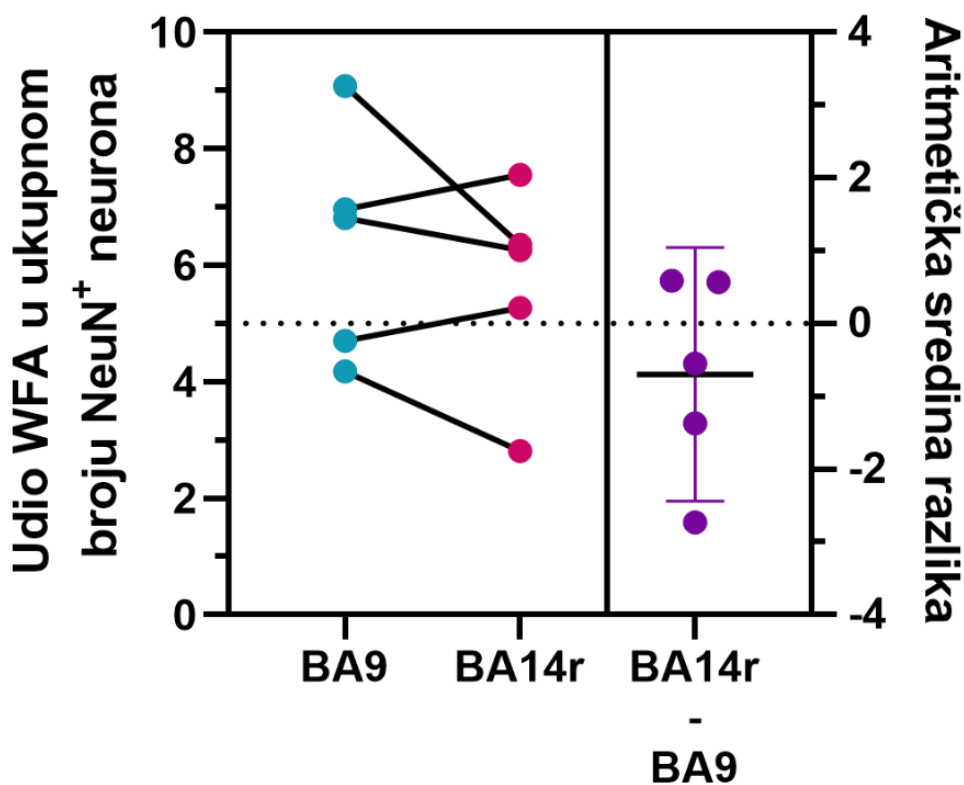
Kvalitativnom analizom nisam utvrdila razlike u osnovnoj morfologiji PNN-ova između Brodmannovih polja 9 i 14r.



Slika 4.1. Konfokalna snimka NeuN⁺ stanica te WFA⁺ PNN-ova. Crvenom bojom prikazane su piramidalne (A) i nepiramidalne (B) NeuN⁺ stanice, a zelenom bojom prikazani su PNN-ovi koji ih okružuju. Također su vidljive i NeuN⁺ stanice koje nisu okružene perineuronskim mrežama. Mjerka za sve slike: 10 μ m.

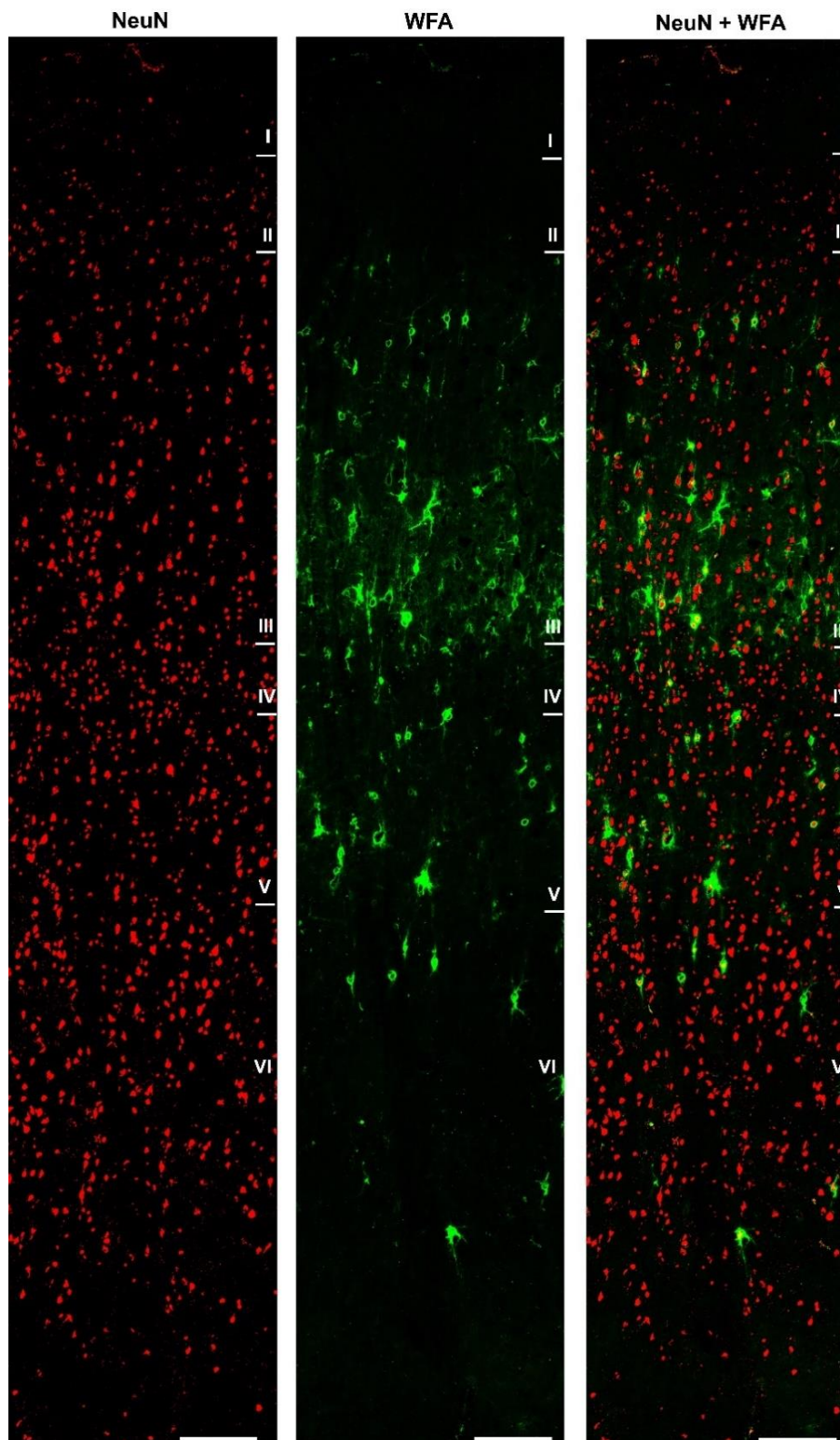
4.2. Raspodjela perineuronskih mreža u Brodmannovim poljima 9 i 14r

Kvantifikacijom NeuN⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova u oba Brodmannovom polju izračunala sam udio PNN-ova u odnosu na ukupan broj neurona. Prosječan udio PNN-ova u ukupnom broju neurona iznosio je 6,35 % u BA9 te 5,65 % u BA14r. Rezultati statističke analize pokazali su da ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom udjelu PNN-ova između BA9 i BA14r ($P = 0,3282$; upareni t-test) (Slika 4.1.).

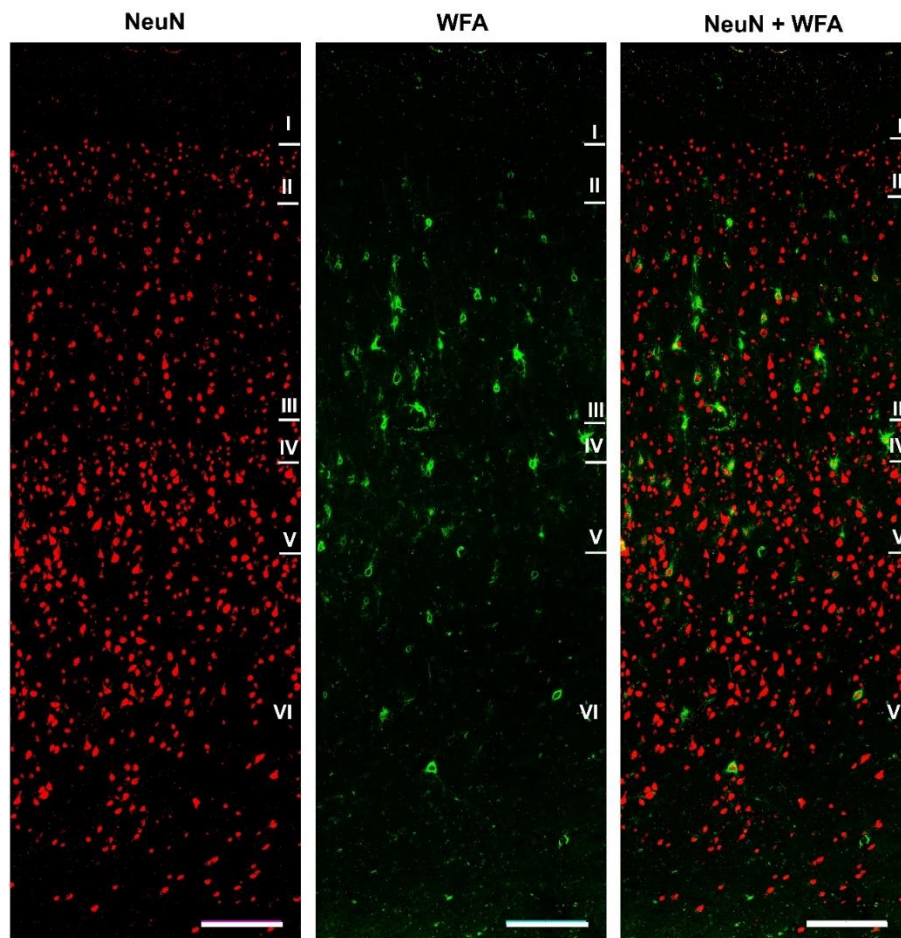


Slika 4.2. Procjenski dijagrami usporedbe udjela WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona između BA9 i BA14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za BA9 (plave točke) i za BA14r (ružičaste točke). Crte povezuju plave i ružičaste točke iz istog mozga. Desni dio dijagrama prikazuje aritmetičku sredinu razlike između vrijednosti u dvama Brodmannovim poljima s 95 %-tnim CI. Razlika je statistički značajna ako CI ne obuhvaća vrijednost 0 (prikazana isprekidanom crtom).

Kvalitativnom analizom utvrdila sam da su WFA⁺ PNN-ovi u oba analizirana Brodmannova polja bili manje zastupljeni u slojevima II i VI, a više u slojevima III, IV i V. U sloju I su WFA⁺ PNN-ovi bili tek sporadično prisutni. (Slika 4.3. i Slika 4.4.).



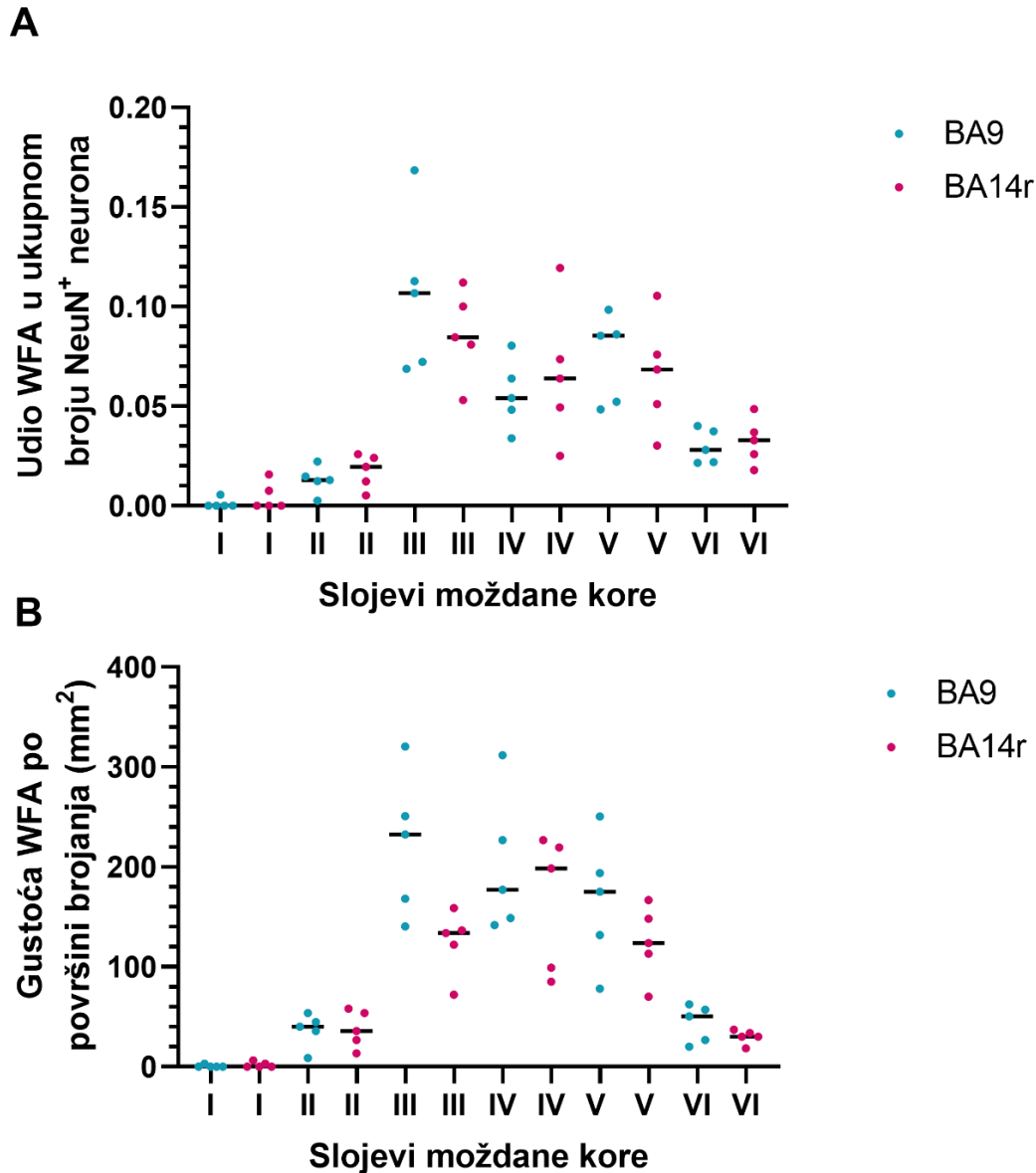
Slika 4.3. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom. Prikazani su slojevi moždane kore u Brodmannovom polju 9. Crvenom bojom prikazane su NeuN⁺ stranice, a zelenom bojom WFA⁺ PNN-ovi. Mjerka: 200 μ m.



Slika 4.4. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom. Prikazani su slojevi moždane kore u Brodmannovom polju 14r. Crvenom bojom prikazane su NeuN⁺ stanice, a zelenom bojom WFA⁺ PNN-ovi. Mjerka: 200 μ m.

Kvantitativnom analizom utvrdila sam udjele WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju živčanih stanica po slojevima te sam time potvrdila nalaz kvalitativne analize (Slika 4.5.). Prosječan udio WFA⁺ PNN-ova u sloju I iznosio je 0,11% u BA9 i 0,47 % u BA14r, u sloju II 1,30 % u BA9 i 1,74 % u BA14r, u sloju III 10,58 % u BA9 i 8,62 % u BA14r, u sloju IV 5,65 % u BA9 i 6,63 % u BA14r, u sloju V 7,41 % u BA9 i 6,63 % u BA14r te sloju VI 2,98 % u BA9 i 3,24 % u BA14r.

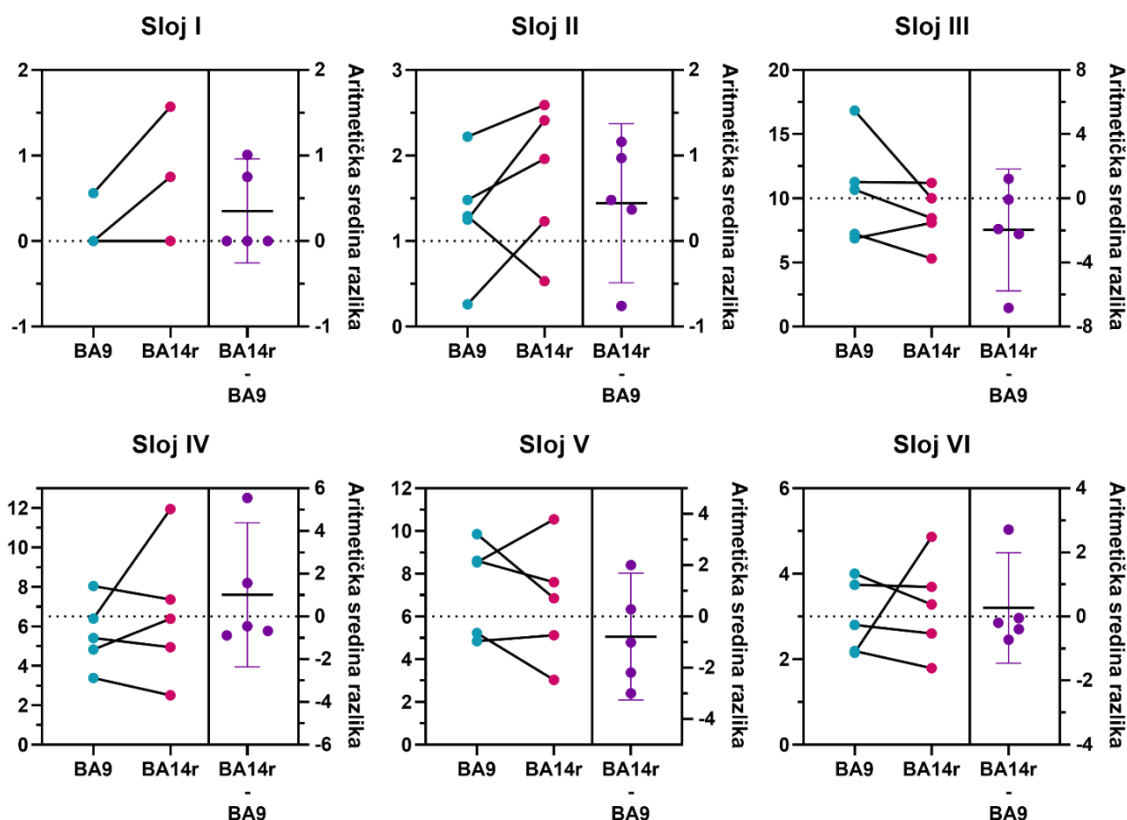
Također, kvantitativnom analizom utvrdila sam i gustoću WFA⁺ PNN-ova po površini područja brojavanja u milimetrima kvadratnim(Slika 4.5.).



Slika 4.5. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje: (A) raspodjelu udjela WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona te (B) gustoću WFA⁺ PNN-ova po slojevima. Pojedinačne točke predstavljaju prosječne vrijednosti za pojedini analizirani mozak. Plavom bojom označene su vrijednosti za Brodmannovo polje 9, a ružičastom bojom vrijednosti za Brodmannovo polje 14r. Dugačkom horizontalnom crtom prikazana je aritmetička sredina.

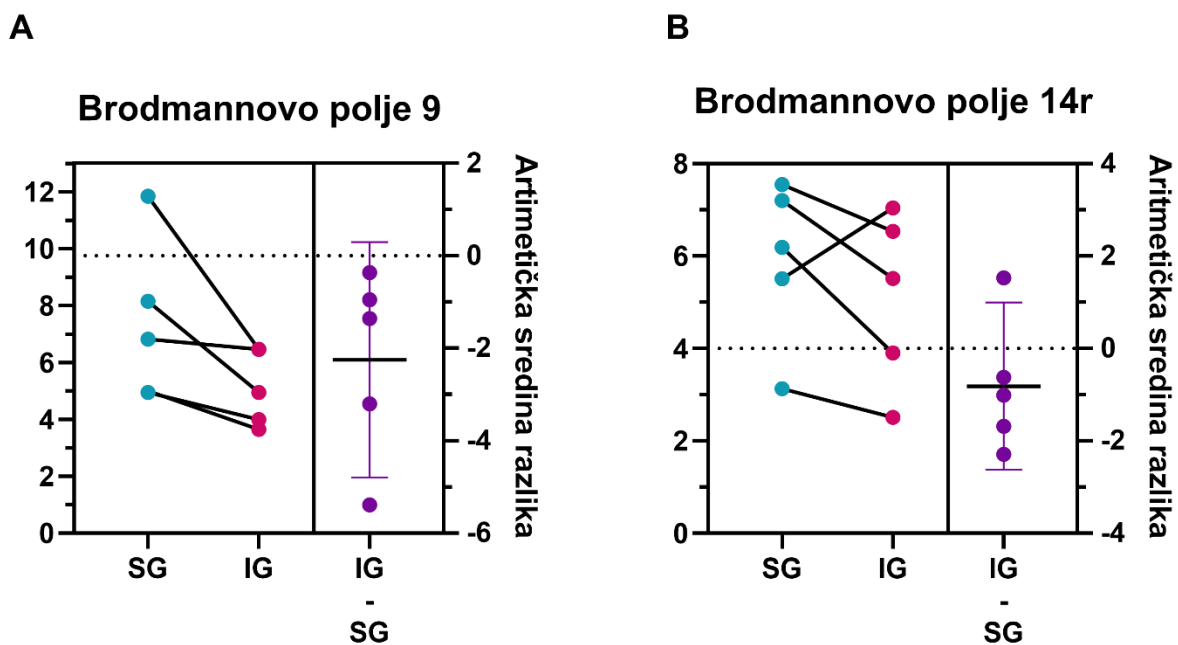
WFA⁺ PNN-ovi su u obje regije najgušće raspoređeni u slojevima III (222,5 WFA⁺ PNN/mm² za BA9 i 124,8 PNN/mm² za BA14r), IV (201,2 PNN/mm² za BA9 i 165,8 PNN/mm² za BA14r) i V (165,9 PNN/mm² za BA9 i 124,4 PNN/mm² za BA14r), a manje u slojevima I (0,7 PNN/mm² za BA9 i 2,0 PNN/mm² za BA14r), II (36,7 PNN/mm² za BA9 i 36,6 PNN/mm² za BA14r) i VI (43,5 PNN/mm² za BA9 i 30,0 PNN/mm² za BA14r).

Osim ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova, usporedila sam i udio PNN-ova u pojedinim slojevima između BA9 i BA14r. Analiza je pokazala da nema statistički značajne razlike po slojevima između regija ($P = 0,1841$ za sloj I, $P = 0,2589$ za sloj II, $P = 0,2250$ za sloj III, $P = 0,4499$ za sloj IV, $P = 0,4271$ za sloj V, $P = 0,6917$ za sloj VI; upareni t-test) (Slika 4.6.).



Slika 4.6. Procjenski dijagrami usporedbe udjela WFA u ukupnom broju neurona po slojevima između BA9 i BA14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za BA9 (plave točke) i za BA14r (ružičaste točke). Crte povezuju plave i ružičaste točke iz istog mozga. Desni dio dijagrama prikazuje aritmetičku sredinu razlike između vrijednosti u dvama Brodmannovim poljima s 95 %-tnim CI. Razlika je statistički značajna ako CI ne obuhvaća vrijednost 0 (prikazana isprekidanom crtom).

Unutar samih regija analizirala sam i usporedila udio WFA⁺ PNN-ova između supragranularnih (I – III) i infragranularnih (V i VI) slojeva. U BA9 prosječan ukupan udio WFA⁺ PNN-ova u supragranularnim slojevima iznosio je 7,35 %, a u infragranularnim slojevima 5,10 %. Statističkom analizom ustanovila sam da ne postoji statistički značajna razlika između supragranularnih i infragranularnih slojeva u BA9 ($P=0,0698$; upareni t-test). U BA14r prosječan ukupan udio WFA⁺ PNN-ova u supragranularnim slojevima iznosio je 5,92 %, a u infragranularnim slojevima 5,10 %. Statistička analiza također je pokazala da ne postoji značajna razlika između supragranularnih i infragranularnih slojeva ($P = 0,2797$; upareni t-test) (Slika 4.6.).

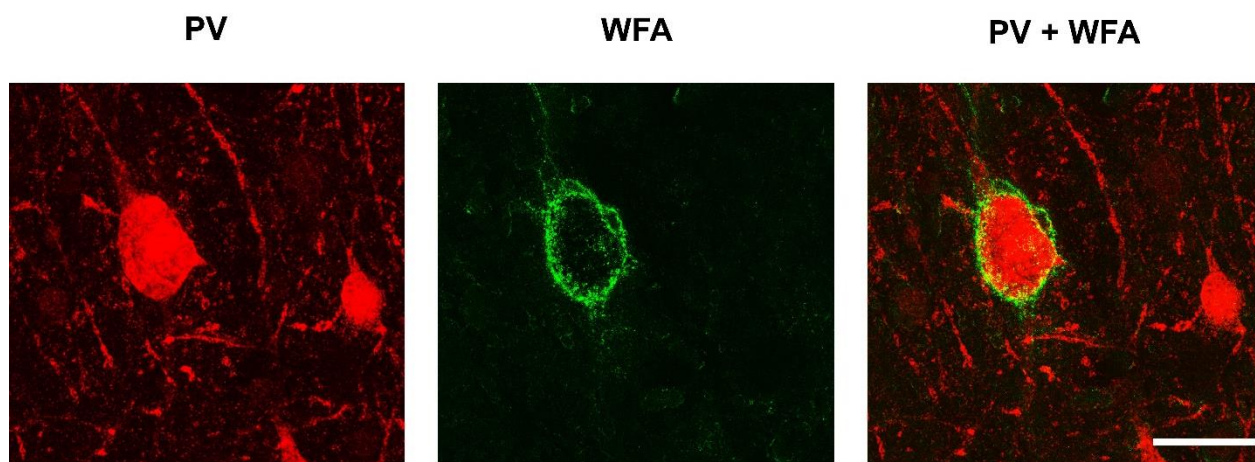


Slika 4.7. Procjenski dijagrami usporedbe udjela WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona između supragranularnih (SG) i infragranularnih slojeva (IG) u Brodmannovom polju 9 i 14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za SG slojeve (plave točke) i za IG slojeve (ružičaste točke). Crte povezuju plave i ružičaste točke iz istog mozga. Desni dio dijagrama prikazuje aritmetičku sredinu razlike između vrijednosti u dvama Brodmannovim poljima s 95 %-tnim CI. Razlika je statistički značajna ako CI ne obuhvaća vrijednost 0 (prikazana isprekidanom crtom).

4.3. Koekspresija perineuronskih mreža i biljega interneurona parvalbumina

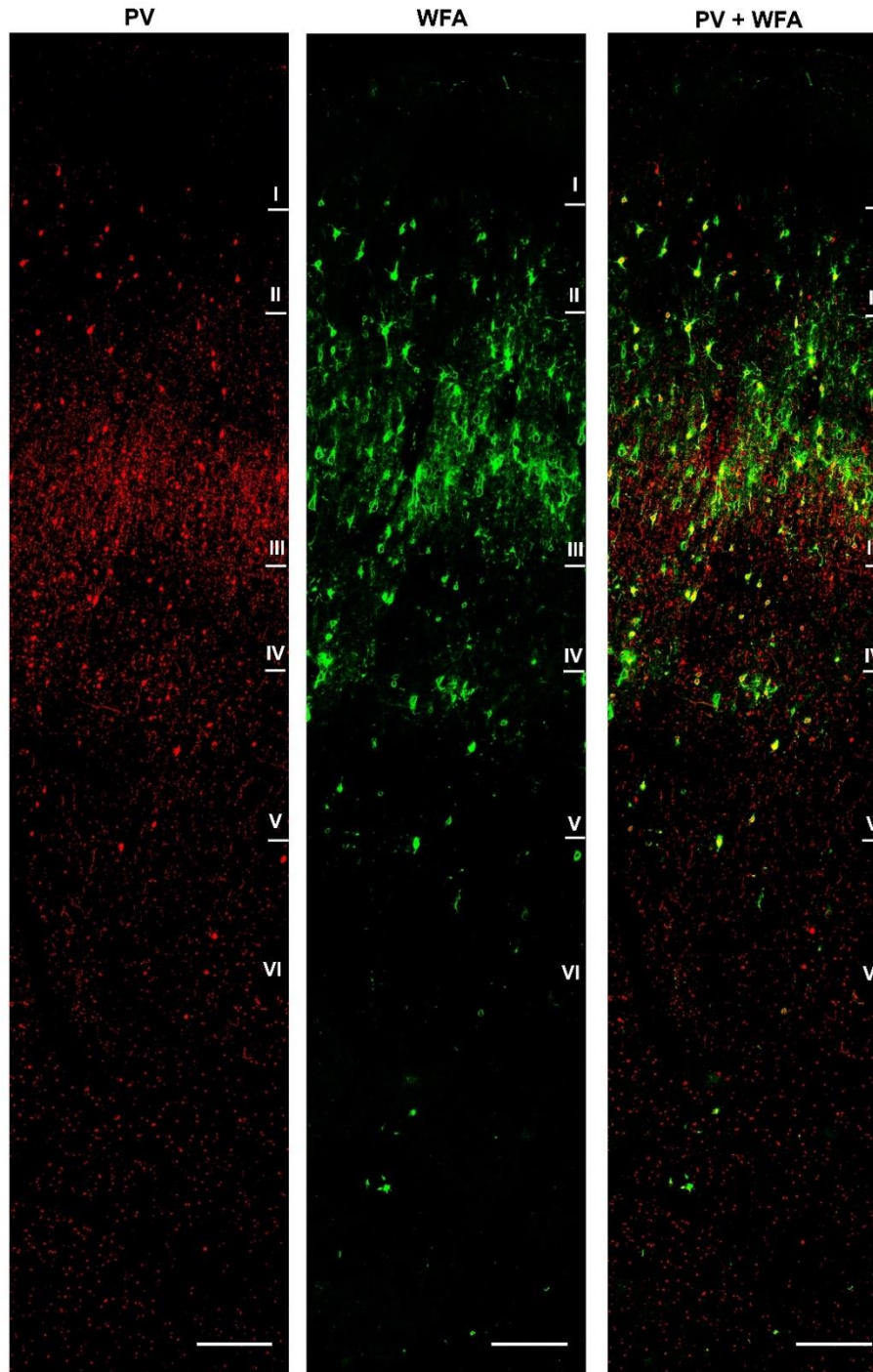
Osim bojenja u kojem su kombinirani anti-NeuN protutijelo i WFA, provela sam i imunohistokemijsko bojenje u kojem su kombinirani anti-PV primarno protutijelo koje predstavlja biljeg za PV⁺ neurone te biljeg za PNN-ove (WFA). Imunohistokemijski sam obojila rezove koji su bili susjedni rezovima obojeni NeuN i WFA biljezima. Kvantifikacijom tih susjednih rezova izračunala sam udio PV⁺ neurona i WFA u ukupnom broju neurona te udio njihove koekspresije.

Za razliku od anti-NeuN bojenja, anti-PV bojenje karakterizira da se osim tijela detaljno prikazuju i stanični nastavci (dendriti i aksoni). PNN-ove sam ponovo prepoznavala kao raspršene mreže uokolo tijela stanica i također su poprimali oblik tijela te pratili početne dijelove staničnih nastavaka (Slika 4.8.).

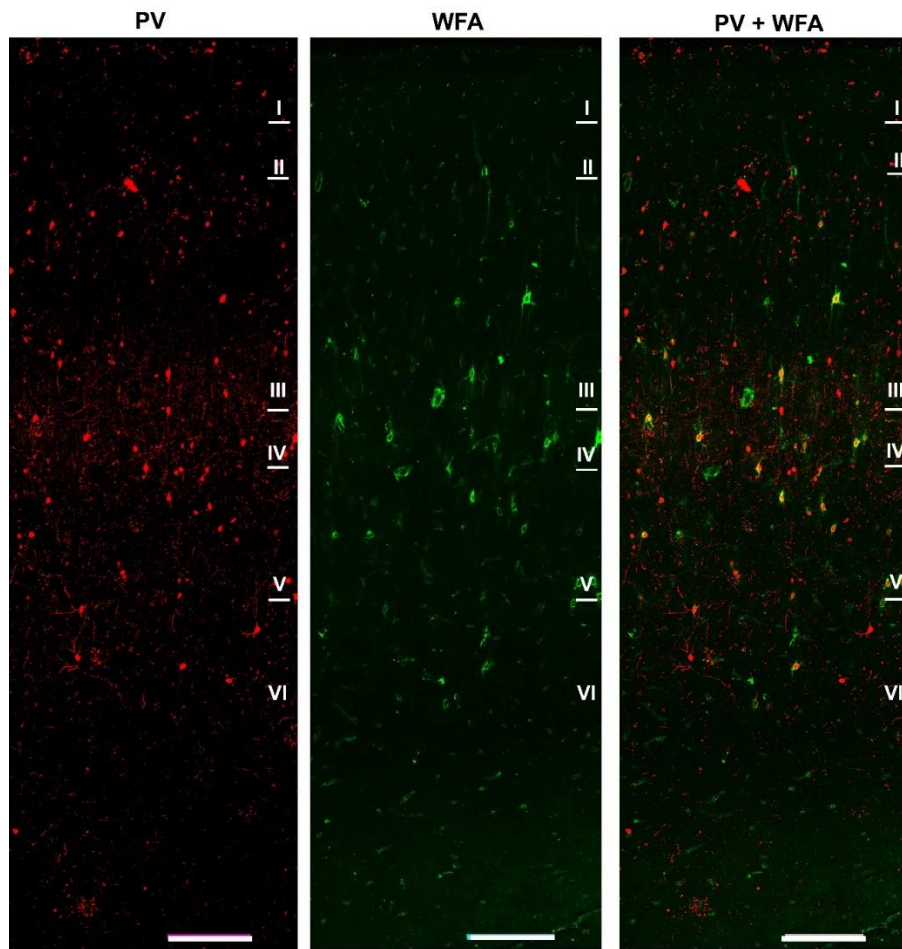


Slika 4.8. Konfokalna snimka PV⁺ stanica (crveno) i WFA⁺ PNN-a (zeleno). Vidljivo je da su osim tijela stanica obojeni i dendriti. Vidljivo je da se WFA⁺ PNN-ovi nalaze samo uokolo specifičnih PV⁺ neurona, a ne uokolo čitave populacije PV⁺ interneurona. Mjerka za sve slike: 20 μ m.

Bojenjem isključivo PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova nisam mogla odjeljivati slojeve u BA9 i BA14r, zbog čega su korištene konture susjednih rezova korištenih za bojenje NeuN⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova. PV⁺ neurona bilo je znatno manje u odnosu na NeuN⁺ neurona u svim slojevima u oba Brodmannova polja. WFA⁺ PNN-ovi su ponovo u oba polja bili najzatupljeniji u sloju III, a najmanje u slojevima I i II (Slika 4.9. i Slika 4.10.). U analizi sam proučavala odnos PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova te stupanj njihove koekspresije,



Slika 4.9. Konfokalna snimka PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova. Prikazano je Brodmannovo polje 9 gdje su crvenom bojom prikazani PV⁺ neuroni, a zelenom bojom WFA⁺ PNN-ovi. Vidljivo je intenzivno bojenje PV⁺ živčanih vlakana u slojevima III, IV i V. Mjerka: 200 μ m.



Slika 4.10. Konfokalna slika PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova. Prikazano je Brodmannovo polje 14r gdje su crvenom bojom prikazani PV⁺ neuroni, a zelenom bojom WFA⁺ PNN-ovi. Vidljivo je intenzivno bojenje PV⁺ živčanih vlakana u slojevima III, IV i gornjem dijelu sloja V te u gornjem dijelu sloja VI. Mjerka: 200 μ m.

U sloju I u oba Brodmannova polja bili su prisutni samo sporadični PV⁺ neuroni koji nisu bili okruženi PNN-ovima (Tablica 4.1.). Tijekom analize dvostruko obilježenih PV/WFA rezova nisam pronašla WFA⁺ PNN-ove u sloju I (Tablica 4.2.).

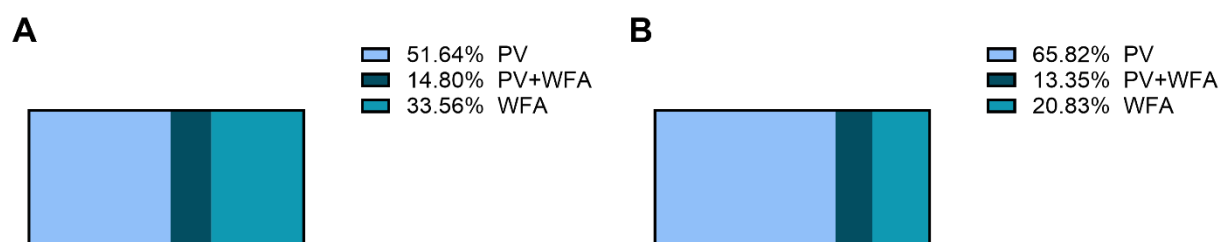
Tablica 4.1. Udio PV⁺ neurona (u %) koji nisu okruženi WFA⁺ PNN-ovima u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan	Aritmetička sredina ± SD	Medijan
I	0,38 ± 0,51	0,00	0,91 ± 0,71	0,79
II	2,14 ± 0,94	1,85	3,30 ± 0,95	3,19
III	3,37 ± 0,78	3,08	3,94 ± 1,59	3,82
IV	3,19 ± 0,93	3,20	3,33 ± 1,01	3,36
V	2,97 ± 0,94	2,81	3,51 ± 0,44	3,38
VI	1,19 ± 0,40	1,21	2,66 ± 1,44	1,84
Supragranularni slojevi (I-III)	2,83 ± 0,82	2,74	3,46 ± 1,20	3,51
Infragranularni slojevi (V-VI)	2,17 ± 0,37	2,13	3,09 ± 0,59	3,10
Ukupno (I-VI)	2,64 ± 0,53	2,38	3,33 ± 0,82	3,13

Tablica 4.2. Udio WFA⁺ PNN-ova (u %) koji ne okružuje PV⁺ neurone u ukupnom broju neurona u Brodmannovima poljima 9 i 14r.

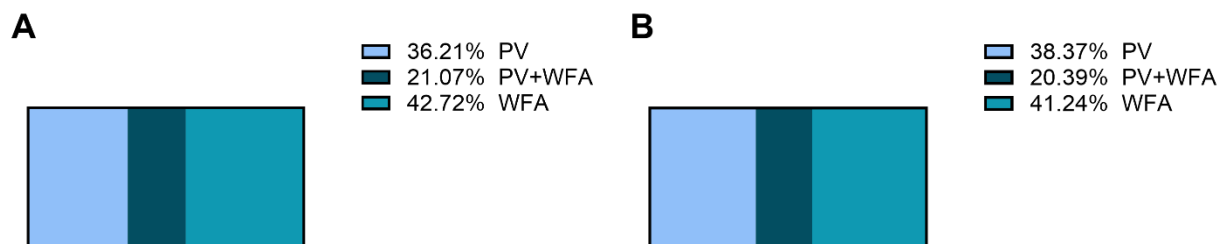
Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan	Aritmetička sredina ± SD	Medijan
I	0,00	0,00	0,00	0,00
II	1,10 ± 0,42	0,92	0,47 ± 0,44	0,37
III	4,82 ± 1,51	4,08	4,57 ± 1,94	4,36
IV	1,36 ± 0,61	1,21	1,52 ± 0,79	1,46
V	3,17 ± 0,86	3,21	3,52 ± 0,70	3,78
VI	1,00 ± 0,30	0,88	2,00 ± 0,94	1,55
Supragranularni slojevi (I-III)	3,46 ± 0,96	3,27	3,03 ± 1,45	2,76
Infragranularni slojevi (V-VI)	2,09 ± 0,35	2,04	2,85 ± 0,71	2,45
Ukupno (I-VI)	2,71 ± 0,62	2,63	2,79 ± 0,88	2,56

U sloju II u oba Brodmannova polja ukupni udio PV⁺ neurona u ukupnom broju neurona bio je veći nego ukupni udio WFA⁺ PNN-ova. Otprilike podjednak udio stanica u ukupnom broju neurona, koje su iskoprimirale PV ili WFA u sloju II, koeksprimirao je PV i WFA u oba polja, 14,80 % u BA9 te 13,35% u BA14r (Slika 4.11.). Međutim, detaljnija analiza relativnih udjela ukazala je i na određene razlike između ovih Brodmannovih polja. U BA9, svega 30,01 % PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima. S druge strane, čak 43,98 % WFA⁺ PNN-ova bilo je smješteno uokolo PV⁺ neurona. U BA14r je pak svega 20,00 % PV⁺ neurona bilo okruženo PNN-ovima, dok je čak 52,89 % WFA⁺ PNN-ova bilo smješteno uokolo PV⁺ neurona (Tablica 4.3. i Tablica 4.4.).



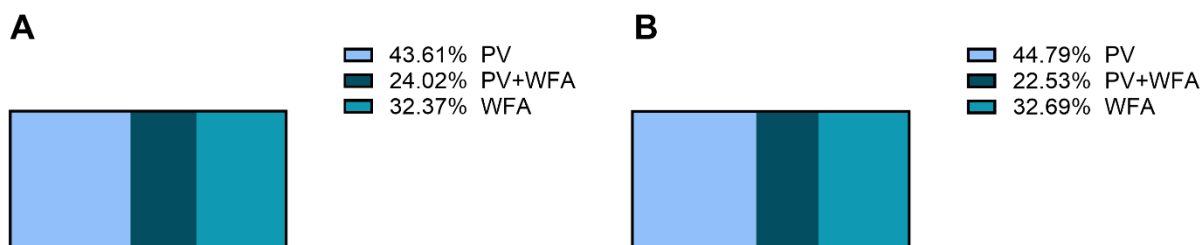
Slika 4.11. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspressije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u sloju II u (A) BA9 i (B) BA14r.

U sloju III u oba Brodmannova polja ukupni udio WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona veći je nego ukupni udio PV⁺ neurona. Od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale PV ili WFA, 21,07 % ih je koeksprimiralo PV i WFA u BA9 te 20,39 % u BA14r (Slika 4.12 U BA9 58,29 % PV⁺ neurona je bilo okruženo WFA⁺ PNN-ovima, a 49,92 % WFA⁺ PNN-ova bilo je smješteno uokolo PV⁺ neurona. U BA14r, 53,40 % PV⁺ neurona je bilo okruženo WFA⁺ PNN-ovima, dok je 49,96 % WFA⁺ PNN-ova smješteno uokolo PV⁺ neurona (Tablica 4.3. i Tablica 4.4.).



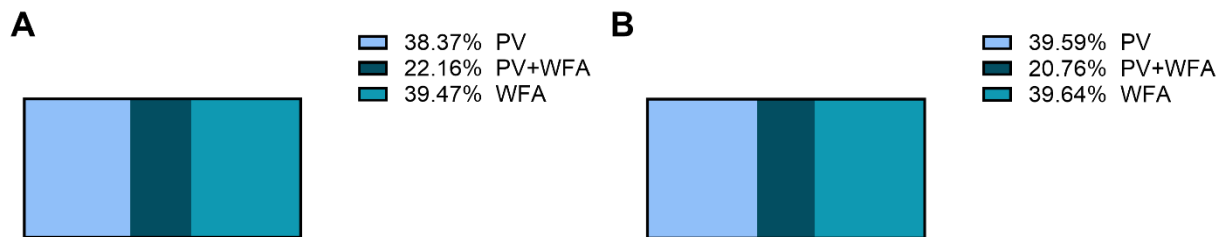
Slika 4.12. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u sloju III u (A) BA9 i (B) BA14r.

U sloju IV u oba Brodmannova polja ukupni je udio PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona bio podjednak. Udio koekspresije PV i WFA, od stanica u ukupnom broju neurona koje su esprimirale PV ili WFA, bio otprilike podjednak u oba Brodmannova polja, kao i u prethodna dva sloja, te je iznosio 24,02 % u BA9 i 22,53 % u BA14r (Slika 4.13.) .) U odnosu na ostale slojeve sloj IV imao je najveći udio koekspresije PV i WFA u oba Brodmannova polja. U BA9, 55,06 % PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima. S druge strane čak je 74,19 % WFA⁺ PNN-ova okruživalo PV⁺ neurone. U BA14r, 49,89 % PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima. Slično kao i u BA9, većina WFA⁺ PNN-ova nalazila se uokolo PV⁺ neurona, čak 67,44 %. U četvrtom sloju je, u odnosu na ostale slojeve, najveći postotak WFA⁺ PNN-ova okruživao PV⁺ neurone (Tablica 4.3. i Tablica 4.4.).



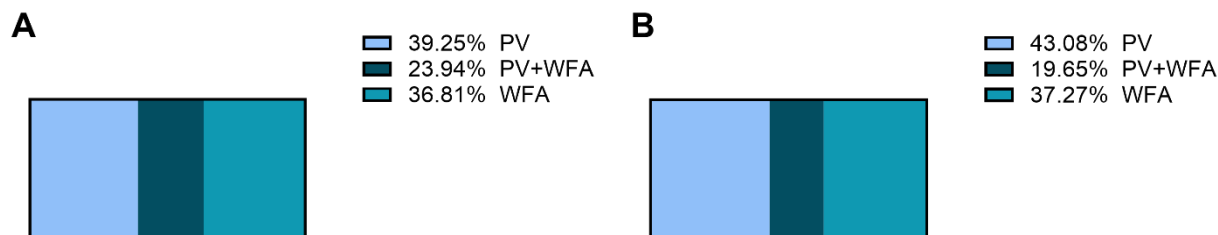
Slika 4.13. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u sloju IV u (A) BA9 i (B) BA14r.

U sloju V u oba Brodmannova polja udio PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona bio je podjednak. Udio koekspresije, od stanica u ukupnom broju neurona koje su ekspimirale PV ili WFA, bio je također podjednak u oba polja te je iznosio 22,16 % u BA9, a 20,76 % u BA14r (Slika 4.14.). U BA9, 57,73 % ukupnog udjela PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima, a 56,02 % ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova okruživalo je PV⁺ neurone. U BA14r, 52,01 % ukupnog udjela PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima, a 52,17 % ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova okruživalo je PV⁺ neurone (Tablica 4.3. i Tablica 4.4.).



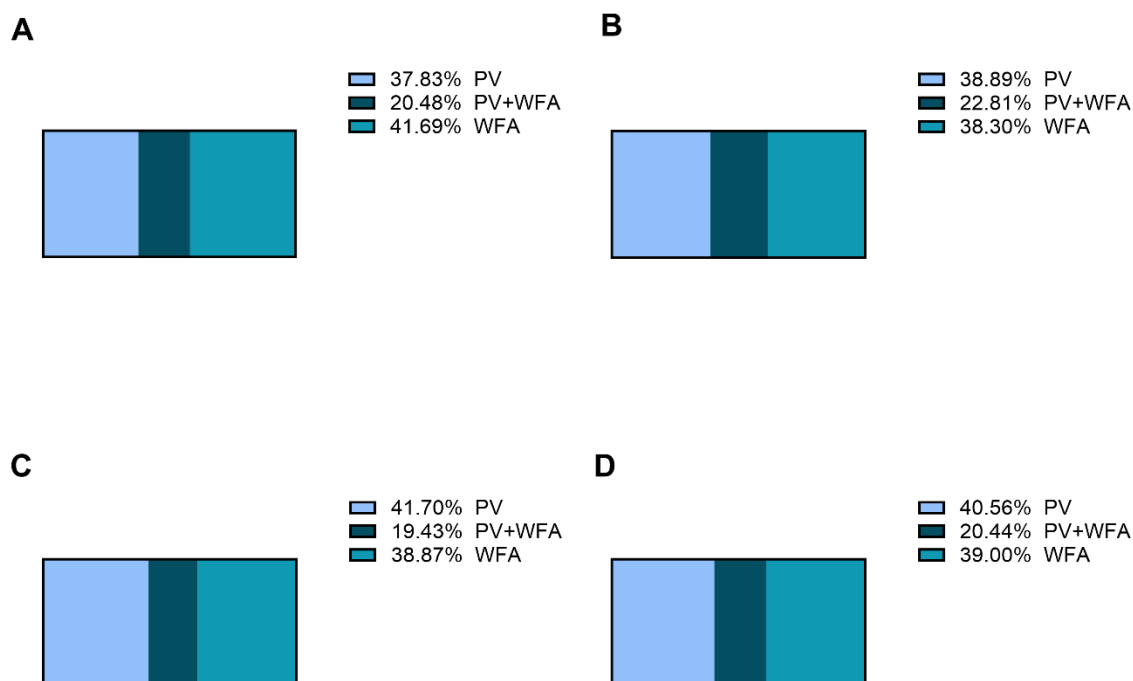
Slika 4.14. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u sloju V u (A) BA9 i (B) BA14r.

U sloju VI, u oba Brodmannova polja udio PV⁺ neurona bio je nešto veći u odnosu na udio WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona, s time da je razlika u BA14r bila malo izražajnije. Udio koekspresije, od stanica u ukupnom broju neurona koje su ekspimirale PV ili WFA, bio je veći u BA9 gdje je iznosio 23,94 % dok je u BA14r iznosio svega 19,65 % (Slika 4.15.). Sukladno tome, u BA9, 60,79 % ukupnog udjela PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima, a 64,47 % ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova okruživalo je PV⁺ neurone, što je više nego u BA14r. U BA14r je samo 46,21 % ukupnog udjela PV⁺ neurona bilo je okruženo WFA⁺ PNN-ovima, a 52,57 % ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova okruživalo je PV⁺ neurone (Tablica 4.3. i Tablica 4.4.).



Slika 4.15. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u sloju VI u (A) BA9 i (B) BA14r.

Unutar Brodmannovih polja 9 i 14r uspoređivala sam udjele PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije između supragranularnih i infragranularnih slojeva. U obje regije naišla sam na gotovo podjednaku zastupljenost PV⁺ neurona, WFA⁺ PNN-ova i njihovih koekspresija u supragranularnim i infragranularnim slojevima (Slika 4.16.).



Slika 4.16. Prikaz udjela PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova te njihove koekspresije od stanica u ukupnom broju neurona koje su izražavale bilo PV bilo WFA u supragranularnim (A) i infragranularnim (B) slojevima BA9, te supragranularnim (C) i infragranularnim (D) slojevima BA14r.

Osim po pojedinim slojevima, analizirala sam i ukupnu koekspresiju PV⁺ neurona i WFA⁺ PNN-ova u oba Brodmannova polja.

U BA9, prosječno je 55,21 % ukupnih PV⁺ interneurona bilo okruženo WFA⁺ PNN-ovima, dok je u BA14r taj udio bio nešto malo manji – u toj regiji je prosječno 47,96 % PV⁺ interneurona bilo okruženo WFA⁺ PNN-ovima (Tablica 4.3., Tablica 4.4.).

Slične podatke utvrdila sam i za udjele WFA⁺ PNN-ova koji okružuju PV⁺ neurone. U BA9, prosječno je 54,63 % WFA⁺ PNN-ova okruživalo PV⁺ neurone, dok se 45,37 % WFA⁺ PNN-ova nalazilo uokolo stanica koje nisu izražavale PV. U BA14r su ovi udjeli bili vrlo slični – prosječno je 52,72% WFA⁺ PNN-ova okruživalo PV⁺ neurone, dok se 47,28 % WFA⁺ PNN-ova nalazilo uokolo stanica koje nisu izražavale PV (Tablica 4.3., Tablica 4.4.).

Tablica 4.3. Udio PV⁺ neurona (u %) koji su okruženi WFA⁺ PNN-ovima u ukupnom broju PV⁺ neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan	Aritmetička sredina ± SD	Medijan
I	0,00	0,00	0,00	0,00
II	30,01 ± 11,41	33,33	20,00 ± 13,59	25,00
III	58,29 ± 4,66	60,64	53,40 ± 10,24	56,70
IV	55,06 ± 8,43	53,57	49,89 ± 11,70	50,00
V	57,73 ± 8,48	60,00	52,01 ± 5,94	52,83
VI	60,79 ± 13,59	59,26	46,21 ± 14,07	38,89
Supragranularni slojevi (I-III)	54,46 ± 6,15	57,55	46,67 ± 10,25	46,61
Infragranularni slojevi (V-VI)	58,28 ± 8,66	62,50	49,92 ± 5,63	48,84
Ukupno (I-VI)	55,21 ± 4,21	55,79	47,96 ± 7,35	48,77

Tablica 4.4. Udio WFA⁺ PNN-ova (u %) koje okužuju PV⁺ neurone u ukupnom udjelu WFA⁺ PNN-ova u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan	Aritmetička sredina ± SD	Medijan
I	0,00	0,00	0,00	0,00
II	43,98 ± 14,68	44,44	52,89 ± 32,70	66,67
III	49,92 ± 8,16	49,57	49,96 ± 9,53	50,33
IV	74,19 ± 9,75	77,27	67,44 ± 17,30	64,29
V	56,02 ± 6,84	52,94	52,17 ± 7,02	54,69
VI	64,47 ± 9,51	66,67	52,57 ± 9,93	58,06
Supragranularni slojevi (I-III)	49,44 ± 6,71	49,19	51,19 ± 9,04	50,00
Infragranularni slojevi (V-VI)	59,24 ± 7,11	62,50	52,20 ± 8,05	55,79
Ukupno (I-VI)	54,63 ± 4,82	55,79	52,72 ± 5,87	53,51

5. RASPRAVA

U ovom istraživanju napravila sam detaljnu kvantifikaciju PNN-ova u Brodmannovim poljima 9 i 14r prefrontalne kore mozga čovjeka. Nadalje, utvrdila sam razinu koekspresije perineuronskih mreža i parvalbumin pozitivnih interneurona u Brodmannovom polju 9 i 14r. Perineuronske mreže vizualizirala sam pomoću aglutinina japanske glicinije, a PV⁺ interneurone pomoću anti-PV protutijela, kvantificirala ih te napravila usporedbe ukupnih udjela i udjela po slojevima između dvaju analiziranih Brodmannovih polja.

Prethodna istraživanja ukazala su da PNN-ovi u različitim dijelovima SŽS-a vjerojatno okružuju samo određene subpopulacije živčanih stanica. U moždanoj kori, PNN-ovi najvećim dijelom okružuju GABA-ergičke interneurone, od kojih većina izražava parvalbumin, što je u skladu s ulogom PNN-ova u održavanju i zaštiti energetski učinkovitog i brzog prijenosa informacija. Osim GABA-ergičkih interneurona uočeno je da PNN-ovi manjim dijelom okružuju i piramidalne neurone (Härtig i sur., 1999; Beebe i sur., 2016). U skladu s pretpostavkom da PNN-ovi okružuju samo određene subpopulacije neurona, u ovom istraživanju pokazala sam da njihova brojnost u odnosu na ukupan broj neurona u oba analizirana Brodmannova polja nije bila velika. Mueller i sur. (2016.) proučavali su moždanu koru rezus majmuna (*Macaca mulatta*) te štakora i uočili su da je postotak PNN-ova u ukupnom broju neurona manji od 10 % u svim regijama moždane kore. Udio PNN-ova dobiven u ovom istraživanju na ljudskoj moždanoj kori također je bio manji od 10 % u oba Brodmannova polja u svim analiziranim mozgovima.

U oba Brodmannova polja pronašla sam veći udio PNN-ova u slojevima III, IV i V nego u ostalim slojevima. Pritom je najveći udio PNN-ova bio u sloju III, nešto manji u slojevima IV i V, a najmanji u slojevima II i VI, što je u skladu dosadašnjim istraživanjima (Hylín i sur., 2013; Mauney i sur., 2013; Enwright i sur., 2016). U tim istraživanjima evidentirano je da ne postoje PNN-ovi u sloju I, dok je u ovom istraživanju utvrđena sporadična prisutnost WFA⁺ PNN-ova u sloju I. Enwright i sur. (2016.) te Mauney i sur. (2013.) proučavali BA9 u postmortalnom tkivu moždane kore čovjeka te je u oba istraživanja korišten WFA za vizualizaciju PNN-ova. Jedan od razloga zbog kojeg se rezultati razlikuju u sloju I između ovog i prijašnjih istraživanja može biti razlika u postmortalnom vremenu koje je prošlo do istraživanja. Postmortalni interval tkiva korištenog u ovom istraživanju bio je puno kraći te je iznosio $7,75 \pm 2,36$ sati, dok je u istraživanju koje su proveli Enwright i sur. (2016.) iznosio $13,1 \pm 6,2$ sati, a u istraživanju koje su proveli Mauney i

sur. (2013.) $18,9 \pm 6,1$ i $27,4 \pm 4,5$ sati. Također, postoje razlike u pripremi tkiva prije i nakon tretiranja s otopinom WFA što je moglo utjecati na vizualizaciju PNN-ova. Konačno, u ovom istraživanju su PNN-ovi u sloju I detektirani na dvostruko obojenim NeuN/WFA rezovima koji vjerojatno omogućuju precizniju identifikaciju nježnih PNN-ova i njihovu precizniju lokalizaciju u točne slojeve.

S obzirom na to da je u dosadašnjim istraživanjima uočeno da većina PNN-ova okružuje PV⁺ GABA-eričke interneurone, utvrdila sam i razinu koekspresije WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ interneurona.

U ljudskim mozgovima koje sam koristila za analizu udjela WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona nisam uočila WFA⁺ PNN-ove u sloju I, što, za razliku od rezultata dobivenih na mozgovima koji su bojani anti-NeuN-om i WFA, što se poklapa s prijašnjim istraživanjima (Hylín i sur., 2013; Mauney i sur., 2013; Enwright i sur., 2016). U njima se također koristilo anti-PV i WFA bojanje, pa bih i na temelju toga mogla pretpostaviti da se WFA⁺ PNN-ovi u sloju I bolje uočavaju na NeuN/WFA dvostruko obilježenim rezovima. PV⁺ interneurone uočila sam pak u svim slojevima moždane kore u oba Brodmannova polja, iako su u sloju I bili tek sporadično prisutni.

Cilj ovog istraživanja bio je vizualizirati koekspresiju PV⁺ interneurona i WFA⁺ PNN-ova, no uočila sam i PV⁺ interneurone te WFA⁺ PNN-ove u kojih nije bilo koekspresije ovih dvaju biljega. Od ukupnog udjela WFA⁺ PNN-ova, u oba Brodmannova polja, samo malo više od 50% WFA⁺ PNN-ova okruživala je PV⁺ neurone. Alcaide i sur. (2019.) su proučavajući DLPFC zdrave ljudske moždane kore zaključili da čak oko 70% WFA⁺ PNN-ova okružuje PV⁺ neurone (Alcaide i sur., 2019). Ovakva razlika u dobivenim rezultatima može se objasniti razlikama u metodologiji. Alcaide i sur. (2019.) koristili su smrznute rezove moždanog tkiva dok sam ja koristila parafinske rezove. Također, korišteno je različito PV protutijelo, a postoji i razlika u postmortalnom intervalu tkiva koji je u ovom istraživanju puno kraći. Alcaide i sur (2019.) proučavali su rezove samo u jednoj ravnini dok sam ja proučavala cijelu debljinu reza i izostavili su analizu sloja II koji je imao najmanji stupanj koekspresije u BA9 u ovom istraživanju.

Brückner i sur. (1999.) zaključili su da u ostalim Brodmannovim poljima moždane kore čovjeka PNN-ovi najviše okružuju PV⁺ interneurone u slojevima II, IV, i VI. S druge strane, u sloju III te nešto manje u sloju V, utvrdili su da PNN-ovi više okružuju piramidalne stanice. U ovom istraživanju udio WFA⁺ PNN-ova koji okružuje PV⁺ neurone u oba Brodmannova polja najveći je u slojevima IV i VI. U sloju III u oba Brodmannova polja postotak WFA⁺ PNN-ova koji okružuje

PV⁺ neurone je manji od 50 %. U sloju II u BA14r nešto više od 50 % WFA⁺ PNN-ova okružuje PV⁺ neurone, dok je taj postotak nešto manji od 50 % u BA9. Dakle, rezultati ovog istraživanja upućuju na sličnost s rezultatima Brückner i sur. (1999.). Iako se u ovom istraživanju nisu koristile metode koje specifično obilježavaju piramidalne stanice, prema uočenoj morfologiji stanica koje su okruživali PNN-ovi može se pretpostaviti da su PNN-ovi u pojedinim slojevima, a ponajviše u sloju III, okruživali i piramidalne stanice. Zbog toga je moguć dobiveni manji udio WFA⁺ PNN-ova koji okružuje PV⁺ neurone u sloju III u odnosu na slojeve IV i VI u oba Brodmannova polja.

Nadalje, udio koekspresije WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona od njihovog ukupnog broja u oba Brodmannova polja bio je najveći u sloju IV. Ti rezultati u skladu su s rezultatima istraživanja kojeg su proveli Brückner i sur. (1999.) gdje je uočeno da PNN-ovi najviše okružuju PV⁺ interneurone u slojevima II, IV i VI te s rezultatima istraživanja Alcaide i sur. (2019.) koji su uočili da PV⁺ neuroni u DLPFC-u moždane kore čovjeka najzastupljeniji u slojevima III i IV. Iako u ovom istraživanju nisam provela detaljnu kvantifikaciju PV⁺ neurona po slojevima, mogu pretpostaviti da zbog najveće zastupljenosti PV⁺ neurona te zbog najvećeg udjela WFA⁺ PNN-ova koji okružuju PV⁺ neurone u sloju IV u oba Brodmannova polja slijedi i najveći udio njihove koekspresije u tom sloju.

Kao što sam navela, osim samostalnih WFA⁺ PNN-ova, u ovom istraživanju pronašla sam i PV⁺ neurone koji nisu okruženi PNN-ovima. U BA9, samo 55% PV⁺ neurona bilo je okruženo PNN-ovima, dok je taj postotak bio manji u BA14r i iznosio je oko 48%. Rezultat mog istraživanja može upućivati na to da postoje različite vrste PV⁺ neurona zbog čega su neki okruženi PNN-ovima, dok drugi nisu. Yamada i sur. (2015.) proučavajući hipokampus mišjeg mozga također su pronašli PV⁺ neurone okružene PNN-ovima te one koji nisu bili okruženi. Oni su uočili da su PV⁺ neuroni koji su bili intenzivnije obojeni okruženi PNN-ovima, dok oni manje intenzivno obojeni nisu bili okruženi PNN-ovima. Tijekom kvantifikacije WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona u svom istraživanju uočila sam sličnost s prijašnjim istraživanjem (Yamada i sur., 2015), gdje su intenzivnije obojeni neuroni također često bili okruženi i WFA⁺ PNN-ovima, ali ovo opažanje trebalo bi dodatno potvrditi analizom intenziteta PV i WFA bojenja koja nije rađena u ovom istraživanju.

Rezultati ovog istraživanja nisu pokazali statistički značajnu razliku u udjelu WFA⁺ PNN-ova između BA9 i BA14r, ali je nešto manji udio bio u BA14r u odnosu na BA9. Što se tiče razlike po slojevima između BA9 i BA14r, WFA⁺ PNN-ovi bili su podjednako raspoređeni po slojevima u

oba Brodmannova polja te rezultati također nisu ukazali na statistički značajnu razliku u njihovim udjelima. PNN-ovi su u BA9 bili nešto brojniji u supragranularnim slojevima nego u infragranularnim (zbog najveće brojnosti u sloju III), dok su u BA14r bili podjednako brojni u supragranularnim i infragranularnim slojevima. U oba Brodmannova polja nije postojala statistički značajna razlika u brojnosti PNN-ova između supragranularnih i infragranularnih slojeva.

Iako između Brodmannovih polja nisam utvrdila razlike u udjelu WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona, utvrdila sam određene razlike između BA9 i BA14r u koekspresiji WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona u slojevima II i VI. U sloju II utvrdila sam da je udio WFA⁺ PNN-ova koji okružuju PV⁺ neurone u BA14r veći za 10 % u odnosu na BA9, dok je s druge strane u BA9 bio veći udio PV⁺ neurona koji su bili okruženi WFA⁺ PNN-ovima u odnosu na BA14r. U sloju VI za udio WFA⁺ PNN-ova koji okružuju PV⁺ neurone utvrdila sam obrnuto – udio u BA9 bio je veći za 12 % u odnosu na BA14r, a udio PV⁺ neurona koji su bili okruženi WFA⁺ PNN-ovima bio je također veći u BA9 u odnosu na BA14r. Osim toga, u tom sloju utvrdila sam i najveću razliku u udjelu koekspresije WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona gdje je udio koekspresije bio veći u BA9 u odnosu na BA14r.

Nakon provedenog istraživanja mogu zaključiti da u samom udjelu WFA⁺ PNN-ova u ukupnom broju neurona ne postoji značajna razlika između BA9 i BA14r. S druge strane, utvrdila sam određene razlike po slojevima u koekspresiji WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona između ta dva Brodmannova polja. S obzirom na to da još nije u potpunosti istražena uloga PNN-ova i da do sada nisu uspoređivani njihovi udjeli između BA9 i BA14r, razlog ovakve distribucije i koekspresije nije moguće sa sigurnošću utvrditi. Razlike između slojeva II i VI u BA9 i BA14r mogla bi biti posljedica funkcionalnih razlika tih slojeva između ovih dvaju regija, no potrebna su daljnja istraživanja da bi se utvrdila točnost te pretpostavke.

6. ZAKLJUČCI

Hipoteza ovog istraživanja bila je da postoje razlike u udjelu, raspodjeli po slojevima i fenotipskim obilježjima PNN-ova između ventralnih i dorzalnih dijelova prefrontalne kore čovjeka. U raspodjeli po slojevima i udjelu PNN-ova u ukupnom broju neurona nije pronađena razlika između BA9 i BA14. S druge strane, uočene su određene razlike između BA9 i BA14r u raspodjeli PNN-ova uokolo pojedinih subpopulacija živčanih stanica.

U ovom istraživanju utvrdila sam udio PNN-ova u ukupnom broju živčanih stanica u Brodmannovim poljima 9 i 14r na temelju čega sam zaključila sljedeće:

1. Udio PNN-ova u ukupnom broju neurona manje je od 10 % u BA9 i BA14r, što ukazuje na to da okružuju samo određene subpopulacije neurona.
2. Ne postoji statistički značajna razlika u ukupnom udjelu PNN-ova u ukupnom broju neurona između BA9 i BA14r.

U ovom istraživanju utvrdila sam i raspodjelu PNN-ova po slojevima moždane kore u Brodmanovim poljima 9 i 14r na temelju čega sam zaključila sljedeće:

1. PNN-ovi su najbrojniji su u sloju III, a najmanje brojni u slojevima I i II.
2. Ne postoji statistički značajna razlika u udjelu PNN-ova u ukupnom broju neurona po slojevima između BA9 i BA14r.
3. Ne postoji statistički značajna razlika u udjelima PNN-ova u ukupnom broju neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva u BA9 i BA14r.

U ovom istraživanju utvrdila sam stupanj kolokalizacije PNN-ova i PV⁺ neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r na temelju čega sam zaključila sljedeće:

1. PNN-ovi uglavnom okružuju PV⁺ neurone, ali ne isključivo njih te ne okružuju sve PV⁺ neurone.
2. Postoji razlika u koekspresiji WFA⁺ PNN-ova i PV⁺ neurona između BA9 i BA14r u slojevima II i VI.

7. LITERATURA

- Alcaide J., Guirado R., Crespo C., Blasco-Ibáñez J. M., Varea E., Sanjuan J., Nacher J. (2019): Alterations of perineuronal nets in the dorsolateral prefrontal cortex of neuropsychiatric patients. *Int J Bipolar Disord* 7(1): 24.
- Banovac I., Sedmak D., Džaja D., Jalšovec D., Jovanov Milošević N., Rašin M.R., Petanjek Z. (2019): Somato-dendritic morphology and axon origin site specify von Economo neurons as a subclass of modified pyramidal neurons in the human anterior cingulate cortex. *J Anat* 235: 651–669.
- Banovac I., Sedmak D., Esclapez M., Petanjek Z. (2022): The Distinct Characteristics of Somatostatin Neurons in the Human Brain. *Mol Neurobiol* 59: 4953–4965.
- Banovac I. (2021): Molekularna obilježja interneurona supragranularnih slojeva u frontalnoj kori mozga čovjeka. Disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet, Zagreb.
- Barbas H. (2015): General cortical and special prefrontal connections: principles from structure to function. *Annu Rev Neurosci* 38: 269–289.
- Beck E. A. (1949): Cytoarchitectural investigation into the boundaries of cortical areas 13 and 14 in the human brain. *J Anat* 83: 147–157.
- Beebe N. L., Young J. W., Mellott J. G., Schofield B. R. (2016): Extracellular Molecular Markers and Soma Size of Inhibitory Neurons: Evidence for Four Subtypes of GABAergic Cells in the Inferior Colliculus. *J Neurosci* 36 (14): 3988–3999.
- Betterle C., Zanchetta R. (2012): The immunofluorescence techniques in the diagnosis of endocrine autoimmune diseases. *Auto Immun Highlights* 3: 67–78.
- Boenisch T. (2005): Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 13(3): 283–286.
- Brodmann K., Gary L.J. (2006): Brodmann's localisation in the cerebral cortex: The principles of comparative localisation in the cerebral cortex based on cytoarchitectonics. Springer, New York.
- Brodmann K. (1909): Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Barth, Leipzig.

Brückner G., Hausen D., Härtig W., Drlicek M., Arendt T., Brauer K. (1999): Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92 (3): 791–805.

Burnside E. R., Bradbury E. J. (2014): Manipulating the extracellular matrix and its role in brain and spinal cord plasticity and repair. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40 (1): 26–59.

Dauth S., Grevesse T., Pantazopoulos H., Campbell P. H., Maoz B. M., Berretta S., Parker K. K. (2016): Extracellular matrix protein expression is brain region dependent. *J Comp Neurol* 524 (7): 1309–1336.

Enwright J. F., Sanapala S., Foglio A., Berry R., Fish K. N., Lewis D. A. (2016): Reduced Labeling of Parvalbumin Neurons and Perineuronal Nets in the Dorsolateral Prefrontal Cortex of Subjects with Schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* 41 (9): 2206–2214.

Fawcett J.W., Oohashi T., Pizzorusso T. (2019): The roles of perineuronal nets and the perinodal extracellular matrix in neuronal function. *Nat Rev Neurosci* 20 (8): 451–465.

Fuster J. M. (2015): *The prefrontal cortex*. 5. izd. Academic Press, Amsterdam.

Gabbott P. L.; Bacon S. J. (1996): Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: I. Cell morphology and morphometrics. *J Comp Neurol* 364 (4): 567–608.

Gallagher H.L., Frith C.D. (2003): Functional imaging of ‘theory of mind’. *Trends Cogn Sci* 7: 77–83.

Gallagher H.L., Jack A.I., Roepstorff A., Frith C.D. (2002): Imaging the intentional stance in a competitive game. *NeuroImage* 16: 814–821.

Goel V., Grafman J. (1995): Are the frontal lobes implicated in “planning” functions? Interpreting data from the Tower of Hanoi. *Neuropsychologia* 33(5): 623–642.

Golgi C. (1882): *Sistema nervoso*. EnciclopediaMedica. Vallardi, Milano.

Goulas A., Uylings H.B.M., Stiers P. (2012): Unravelling the intrinsic functional organization of the human lateral frontal cortex: a parcellation scheme based on resting state fMRI. *J Neurosci* 32(30): 10238–10252.

Groenewegen H.J., Uylings H.B. (2000): The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. *Prog Brain Res* 126: 3–28.

Grow W. A. (2018): *The Cerebral Cortex. U: Fundamental Neuroscience for Basic and Clinical Applications*. Amsterdam, Elsevier, str. 468-479.

Guillery R. W. (2000): Brodmann's 'Localisation in the Cerebral Cortex'. *J Anatomy* 196 (3): 493–496.

Härtig W., Derouiche A., Welt K., Brauer K., Grosche J., Mäder M., Reichenbach A., Brückner G. (1999): Cortical neurons immunoreactive for the potassium channel Kv3.1b subunit are predominantly surrounded by perineuronal nets presumed as a buffering system for cations. *Brain Res* 842 (1): 15–29.

Hladnik A., Džaja D., Darmopil S., Jovanov-Milošević N., Petanjek Z. (2014) Spatio-temporal extension in site of origin for cortical calretinin neurons in primates. *Front Neuroanat* 8: 50.

Hylin M. J., Orsi S. A., Moore A. N., Dash P. K. (2013): Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning. *Learn Mem* 20 (5): 267–273.

Jovanov Milošević N., Judaš M., Aronica E., Kostovic I. (2014): Neural ECM in laminar organization and connectivity development in healthy and diseased human brain. *Prog Brain Res* 214: 159–178.

Judaš M., Šimić G., Petanjek Z., Jovanov Milošević N., Pletikos M., Vasung L., Vukšić M., Kostović I. (2011): The Zagreb Collection of human brains: a unique, versatile, but underexploited resource for the neuroscience community. *Ann N Y Acad Sci* 1225 Suppl 1: E105-30.

Karetko M., Skangiel-Kramska J. (2009): Diverse functions of perineuronal nets. *Acta Neurobiol Exp* 69 (4): 564–577.

Kostovic I., Judas M., Kostovic-Knezevic L., Simic G., Delalle I., Chudy D., Sajin B., Petanjek Z. (1991): Zagreb research collection of human brains for developmental neurobiologists and clinical neuroscientists. *Int J Dev Biol* 35(3): 215–230.

Kwok J. C., Dick G., Wang D., Fawcett J. W. (2011): Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair. *Dev Neurobiol* 71 (11): 1073–1089.

Marklund P., Fransson P., Cabeza R., Petersson K.M., Ingvar M., Nyberg L. (2007): Sustained and Transient Neural Modulations in Prefrontal Cortex Related to Declarative Long-Term Memory, Working Memory, and Attention. *Cortex* 43(1): 22–37.

Mauney S. A., Athanas K. M., Pantazopoulos H., Shaskan N., Passeri E., Berretta S., Woo T.U. (2013): Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 74 (6): 427–435.

Morecraft R. J., Yeterian E. H. (2002): Prefrontal Cortex. U: Ramachandran V.S. (ur.) *Encyclopedia of the Human Brain*. Amsterdam, Academic press, str. 11–26.

Mueller A.L., Davis A., Sovich S., Carlson S.S., Robinson F.R. (2016): Distribution of N-Acetylgalactosamine-Positive Perineuronal Nets in the Macaque Brain: Anatomy and Implications. *Neural Plas* 2016: 6021428.

Neumann M., Gabel D. (2002): Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* 50(3): 437–439.

Nicholson, C., Syková, E. (1998): Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21 (5): 207–215.

Ongür D., Ferry A.T., Price J.L. (2003): Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *J Comp Neurol* 460 (3): 425–449.

Ongür, D., Price, J. L. (2000): The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cereb Cortex* 10 (3): 206–219.

Petrides M., Pandya D. N. (1999): Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. *Eur J Neurosci* 11 (3): 1011–1036.

Petrides M., Tomaiuolo F., Yeterian E. H., Pandya D. N. (2012): The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. *Cortex* 48 (1): 46–57.

Preuss T.M. (1995): Do rats have prefrontal cortex? The rose-woolsey-akert program reconsidered. *J Cogn Neurosci* 7(1): 1–24.

- Prkačin M.V., Banovac I., Petanjek Z., Hladnik A. (2023): Cortical interneurons in schizophrenia - cause or effect? *Croat Med J* 64: 110–122.
- Rajkowska G., Goldman-Rakic P. S. (1995): Cytoarchitectonic definition of prefrontal areas in the normal human cortex: I. Remapping of areas 9 and 46 using quantitative criteria. *Cereb Cortex* 5 (4): 307–322.
- Rudy B., Fishell G., Lee S., Hjerling-Leffler J. (2011) Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. *Dev Neurobiol* 71(1): 45–61.
- Sadeghipour A., Babaheidarian P. (2019): Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. *Methods Mol Biol* 1897: 253–268.
- Sarı E., Erbaş O. (2022): Human Prefrontal Cortex: Regions and Functions. *JEB Med Sci* 3 (2): 134–139.
- Strotzer M. (2009): One century of brain mapping using Brodmann areas. *Klin Neuroradiol* 19 (3): 179–186.
- Sun Y., Ip P., Chakrabarty A. (2017): Simple Elimination of Background Fluorescence in Formalin-Fixed Human Brain Tissue for Immunofluorescence Microscopy. *J Vis Exp* 127: 56188.
- Sy J., Ang L.C. (2019): Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. *Methods Mol Biol* 1897: 269–278.
- Teffer K., Semendeferi K. (2012): Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. *Prog Brain Res* 195: 191–218.
- Trnski S., Nikolić B., Ilic K., Drlje M., Bobic-Rasonja M., Darmopil S., Petanjek Z., Hranilovic D., Jovanov Milosevic N. (2022): The Signature of Moderate Perinatal Hypoxia on Cortical Organization and Behavior: Altered PNN-Parvalbumin Interneuron Connectivity of the Cingulate Circuitries. *Front Cell Dev Biol* 10: 810980.
- Uylings H.B., van Eden C.G. (1990): Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. *Prog Brain Res* 85: 31–62.
- Uylings H.B.M., Groenewegen H.J., Kolb B. (2003): Do rats have a prefrontal cortex? *Behav Brain Res* 146: 3–17.

Vitellaro-Zuccarello L., De Biasi S., Spreafico R. (1998): One hundred years of Golgi's „perineuronal net“: history of a denied structure. *Ital J Neurol Sci* 19(4): 249–253.

Walker A.E. (1940): A cytoarchitectural study of the prefrontal area of the macaque monkey. *J Comp Neurol* 73: 59–86.

Wang D.; Fawcett J. (2012): The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res* 349 (1): 147–160.

Yamada J., Ohgomori T., Jinno S. (2015): Perineuronal nets affect parvalbumin expression in GABAergic neurons of the mouse hippocampus. *Eur J Neurosci* 41 (3): 368–378.

Zaqout S., Becker L.L., Kaindl A.M. (2020): Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. *Front Neuroanat* 14: 582218.

Zimmermann D.R., Dours-Zimmermann M.T. (2008): Extracellular matrix of the central nervous system: from neglect to challenge. *Histochem Cell Biol* 130 (4): 635–653.

8. ŽIVOTOPIS

Ivona Kirchbaum rođena je 14. kolovoza 1998. godine u Varaždinu. Nakon završene VI. Osnovne škole i Prve gimnazije Varaždin napušta rodni grad te nastavlja školovanje na Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, na odjelu za biologiju. Godine 2020. stječe titulu prvostupnika biologije (univ. bacc. biol.) i odlazi u Zagreb s ciljem nastavljanja školovanja na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na kojem upisuje diplomski studij eksperimentalne biologije, smjer Fiziologija i imunobiologa. Tijekom studiranja u Zagrebu odlazi na Erasmus+ studentsku razmjenu na Sveučilište Vic u Španjolskoj gdje provodi 3. semestar diplomskog studija. Povratkom u Zagreb započinje izradu svog diplomskog rada u Laboratoriju za imunohistokemiju na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc. dr. sc. Ivana Banovca.