

Kutana inervacija miša s isključenim genom St8sia1

Brčić, Renata

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:534960>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-08-24**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Renata Brčić

KUTANA INERVACIJA MIŠA S ISKLJUČENIM GENOM ST8SIA1

Diplomski rad

Akadska godina:

2020./2021.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

Split, srpanj 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

Renata Brčić

KUTANA INERVACIJA MIŠA S ISKLJUČENIM GENOM ST8SIA1

Diplomski rad

Akadska godina:

2020./2021.

Mentor:

Izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

Split, srpanj 2021.

1. UVOD	1
1.1. Inervacija kože.....	2
1.1.1. Osjetna inervacija kože	3
1.1.2. Autonomna inervacija kože	3
1.2. Neuron i njihova stanična membrana	4
1.3. Gangliozidi	5
1.3.1. Sinteza gangliozida	5
1.4. <i>St8sial</i> gen.....	6
1.4.1. Posljedice neaktivnosti gena <i>St8sial</i> i nedostatka gangliozid GD3 sintaze	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Etika.....	11
3.2. Eksperimentalne životinje	11
3.3. Priprema tkiva za bojanje	11
3.4. Imunohistokemijsko bojanje.....	12
3.5. Mikroskopiranje i kvantifikacija	12
3.6. Statistička analiza podataka	13
4. REZULTATI.....	14
4.1. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na tirozin hidroksilazu (TH)	15
4.2. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na Neurofilament 200 kDa (N52)	17
4.3. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na ChAT	19
4.4. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na CGRP	21
5. RASPRAVA.....	23
6. ZAKLJUČCI.....	27
7. POPIS LITERATURE	29
8. SAŽETAK.....	33
9. SUMMARY	35
10. ŽIVOTOPIS	37

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada, na trudu, strpljenju i vremenu, a posebno hvala na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici. Za mene ste uvijek bili primjer kakav profesor treba biti!

Zahvaljujem se svojim roditeljima i braći na beskrajnoj podršci, bezuvjetnoj ljubavi, motivaciji i razumijevanju. Hvala što ste uvijek vjerovali u mene i bili mi nit vodilja u svim teškim trenucima. Bez vas bi ovaj cilj bio nedostižan!

Zahvaljujem se prijateljima na svim lijepim trenucima, potpori i ohrabrenjima. Bili ste važan dio ovog mog životnog poglavlja!

POPIS KRATICA

Cer – ceramid, engl. *ceramide*

CGRP – peptid povezan s genom za kalcitonin, engl. *calcitonin gene-related peptide*

ChAT – kolin acetiltransferaza, engl. *choline O-Acetyltransferase*

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol, engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*

ER – endoplazmatski retikulum, engl. *endoplasmic reticulum*

GalCer – galaktozilceramid, engl. *galactosylceramide*

GD3 – disialogangliozid, engl. *disialoganglioside*

GlcCer – glukozilceramid, engl. *glucosylceramide*

GM3 – monosialodihexosilgangliozid, engl. *monosialodihexosylganglioside*

GSL – glikosfingolipid, engl. *glycosphingolipid*

GT3 – trisialosilaktozilceramid, engl. *trisialosyllactosylceramide*

IB4 – izolecitin B4, engl. *isolecitin B4*

KO – genetički modificirani organizam s inaktivacijom funkcije određenog gena, engl. *knockout*

LacCer – laktozilceramid, engl. *lactosylceramide*

N52 – neurofilament 200 kDa klon 52, engl. *neurofilament 200kDa clone 52*

PBS – fosfatni pufer, engl. *phosphate buffer saline*

TH – tirozin hidroksilaza, engl. *tyrosine hydroxylase*

WT – divlji tip, engl. *wild type*.

1. UVOD

1.1. Inervacija kože

Koža je dio pokrovnog sustava i smatra se najvećim organom ljudskog tijela. Sastoji se od tri sloja: epidermisa, dermisa i hipodermisa. Važna je za održavanje tjelesne temperature, sprječava gubitak vode i elektrolita, predstavlja prvu zaštitnu barijeru imunološkog sustava i važna je za percepciju okoliša i utjecaja okoline na organizam (1). Gusto je inervirana različitim živčanim vlaknima koja su uključena u brojna fiziološka i patofiziološka zbivanja kože (2). Kada govorimo o kožnoj inervaciji, poglavito se misli na inervaciju somatskim osjetnim živčanim vlaknima kojih je brojčano najviše. Senzorička su vlakna odgovorna za osjet boli, temperature, dodira, vibracije, pritiska i propiocepcije. Općenito govoreći, epidermalne živčane završetke možemo podijeliti na završetke peptidergičkih i nepeptidergičkih neurona. Peptid povezan s genom za kalcitonin (CGRP od engl. *calcitonin gene-related peptide*) je prisutan u peptidergičkim neuronima, dok se nepeptidergička živčana vlakna raspoznaju po njihovim veznim mjestima za biljni izolecitin B4 (IB4 od engl. *isolecitin B4*) (3). Uz živčana vlakna, u koži nalazimo i receptore koji se dijele na kapsulirane i nekapsulirane. Kapsulirani receptori uključuju Meissnerova i Vater–Pacinijeva tjelešca. Meissnerova tjelešca se nalaze u dermalnim papilama i imaju funkciju mehanoreceptora te posreduju osjet dodira, dok se Vater–Pacinijeva tjelešca nalaze na dermalno–hipodermalnom spoju i funkcioniraju kao receptori pritiska i vibracije. Nekapsulirani receptori uključuju slobodne živčane završetke i Merkelove stanice (1). Uz osjetna, u koži su prisutna i autonomna živčana vlakna, koja su odgovorna za održavanje tonusa krvnih žila, pilomotoriku i znojenje (2,3).

Osjetna funkcija kože iznimno je važna za održavanje homeostaze i važna je svakodnevna potreba organizma za normalno funkcioniranje. Kako bi istaknuli važnost kože kao senzoričkog organa, usporedit ćemo je s ostalim osjetilima. Čovjek može živjeti s oslabljenom funkcijom nekog drugog osjetnog organa, primjerice sa sljepoćom i gluhoćom. U ovim slučajevima ne dolazi do poremetnje unutarnjeg okoliša organizma i nema poremećaja bioritma. S druge strane, oštećenje kože kao senzoričkog organa može dovesti do velikih i ireverzibilnih poremećaja. Za primjer uzmimo termoregulaciju organizma. Termoregulacija organizma uključuje aktivnost osjetnih živčanih vlakana kože i autonomnog živčanog sustava. Ukoliko postoji defektan bilo osjetni, bilo autonomni živčani sustav kože, očigledno je da dolazi do poremećaja termoregulacije i reakcije organizma na okolišne čimbenike, što u konačnici dovodi do poremećaja homeostaze (2).

1.1.1. Osjetna inervacija kože

Osjetna vlakna kože potječu od neurona smještenih u spinalnom gangliju i oblikuju različite podtipove živčanih završetaka. Živčani završetci smješteni su epidermalno i općenito ih dijelimo na peptidergičke i nepeptidergičke živčane završetke (2). Osnovni neuropeptidi peptidergičkih živčanih vlakana su CGRP i tvar P dok su ostali neuropeptidi slabije izraženi. Peptidergička vlakna ekspimiraju i receptore visokog afiniteta za živčani faktor rasta neurotrofin. Nepeptidergični živčani završetci ne sintetiziraju peptide, ali ekspimiraju purinergični P2X3 receptor, vezuju biljni IB4 i ekspimiraju receptore za neurotrofni faktor izveden iz glija stanične linije (3,4).

Morfološki se osjetna vlakna dijele s obzirom na mijelinsku ovojnicu tako da postoje mijelinizirana A i nemijelinizirana C osjetna živčana vlakna koja se međusobno razlikuju po debljini vlakna i brzini provođenja živčanog impulsa (3). Mijelinizirana vlakna dodatno dijelimo na β i δ ovisno o debljini mijelinskog omotača. $A\beta$ vlakna u prosjeku su promjera 10 μm , imaju deblju mijelinsku ovojnicu i brzinu provođenja živčanog impulsa od 80 m/s. Tanju mijelinsku ovojnicu posjeduju $A\delta$ vlakna, a samim time imaju i manju brzinu provođenja impulsa koja u prosjeku iznosi 4-30 m/s. Nemijelinizirana C vlakna su tanka, promjera ispod 1 μm , a zbog nedostatka mijelinske ovojnice brzina provođenja je prosječno 1 m/s (2,3). Mehaničke podražaje primaju mehanoreceptori preko osjetnih tjelešaca koji su povezani s $A\beta$ vlaknima ili preko $A\delta$ slobodnih živčanih završetaka. Promjene temperature okoliša registriraju termoreceptori, a osjet se prenosi preko $A\delta$ i C vlakana, dok se bol prenosi nociceptorima preko $A\delta$ i C vlakana (2).

Kao dio somatosenzoričkog aparata u dermisu i epidermisu nalazimo osjetne receptore, a dijelimo ih na mehanoreceptore, termoreceptore i nociceptore. Postoji nekoliko vrsta mehanoreceptora, a to su Ruffinijeva, Meissnerova i Pacinijeva tjelešca koje nalazimo u dermisu te Merkelove stanice i slobodne živčane završetke koje nalazimo u epidermisu (2).

1.1.2. Autonomna inervacija kože

Autonomni živčani sustav dijelimo na simpatički i parasimpatički sustav. Zajednička anatomski karakteristika im je ta da su preganglijska autonomna vlakna omotana tankom mijelinskom ovojnicom, dok postganglijski neuroni locirani u ganglijima izvan centralnog sustava šalju nemijelinizirana postganglijska vlakna autonomnog sustava i inerviraju brojne organe i tkiva (5). Vlakna autonomnog živčanog sustava čine manjinu kutane inervacije u usporedbi sa osjetnim vlaknima. Ograničena su na dermis, inerviraju krvne i limfne žile,

pilorične mišiće, apokrine i ekrine žlijezde te dlačne folikule. Autonomni živčani sustav ima veoma važnu ulogu u održavanju homeostaze, temperature tijela, znojenja i krvnog protoka kroz kožu (2). Većina autonomnih vlakana u koži su simpatička živčana vlakna, kojima je noradrenalin glavni neurotransmiter, a njihov tipičan marker je imunoreaktivnost na tirozin hidroksilazu. Parasimpatička vlakna su acetilkolinna vlakna, kolinesteraza su pozitivna i reagiraju na acetilkolinne agoniste (3).

1.2. Neuron i njihova stanična membrana

Neuron ili živčana stanica je osnovna građevna jedinica živčanog sustava. Tipični neuron se sastoji od tijela (soma) i dvije vrste neuronskih nastavaka, aksona i dendrita. Dendriti su kratki nastavci koji služe za primanje informacija, dok aksoni predstavljaju duge neuronske nastavke na čijem se kraju nalazi presinaptički završetak koji sudjeluje u procesu prenošenja informacija. Danas je poznato da se živčani sustav za prijenos informacija koristi električnim signalima koji duž neurona putuju prolaznim promjenama membranskog potencijala (6).

Plazmatska membrana neuronske stanice je funkcionalno podijeljena na nekoliko segmenata, a to su somatodendritička membrana i nekoliko različitih segmenata aksonske membrane. Ovi membranski odjeljci važni su za neometano provođenje akcijskog potencijala (7). Živčana stanica je omotana plazmatskom membranom kao i ostale stanice u organizmu, tako da je i neuronska membrana zapravo dvosloj fosfolipida organiziran na način da je pozitivno nabijeni polarni dio smješten izvanstanično, a negativno nabijen dio unutarstanično. Stanične membrane su složene strukture građene od lipida i proteina te razdvajaju unutrašnjost stanice od vanjskog okruženja. Tipična plazmatska membrana sadržava stotinu različitih lipida čiji sastav stanica aktivno regulira (8). Osim fosfolipida i proteina, važnu ulogu u građi stanične membrane imaju i glikolipidi te kolesterol. Glikolipidi čine samo 2% ukupnih lipida staničnih membrana, a kolesterol, uz fosfolipide, predstavlja glavnu komponentu staničnih membrana eukariotskih stanica. Jedan od važnijih lipidnih spojeva je i sfingomijelin, koji ima važnu strukturnu ulogu u staničnim membranama, što je od posebne važnosti u membranama aksona živčanih stanica (9).

Lipidi i proteini nisu jednakomjerno raspoređeni u plazmatskoj membrani. Na dijelovima stanične membrane dolazi do formiranja lipidnih mikrodomena građeni od kolesterola i sfingomijelina. Lipidne mikrodomene se organiziraju oko glikoproteina tvoreći lipidne splavi (9). Do sada je dokazano da su glikosfingolipidi, točnije gangliozidi, jako važna komponenta lipidnih splavi. Gangliozidi posreduju važne fiziološke funkcije kao što su

adhezija stanica i provođenje signala te utječu na stanični fenotip i staničnu funkciju (10). Smatralo se da lipidne splavi imaju samo ulogu u transportu lipida i proteina, međutim danas nam je poznato da imaju ulogu i u procesu neurotransmisije, endocitoze i regulaciji proteolize (9,11).

1.3. Gangliozidi

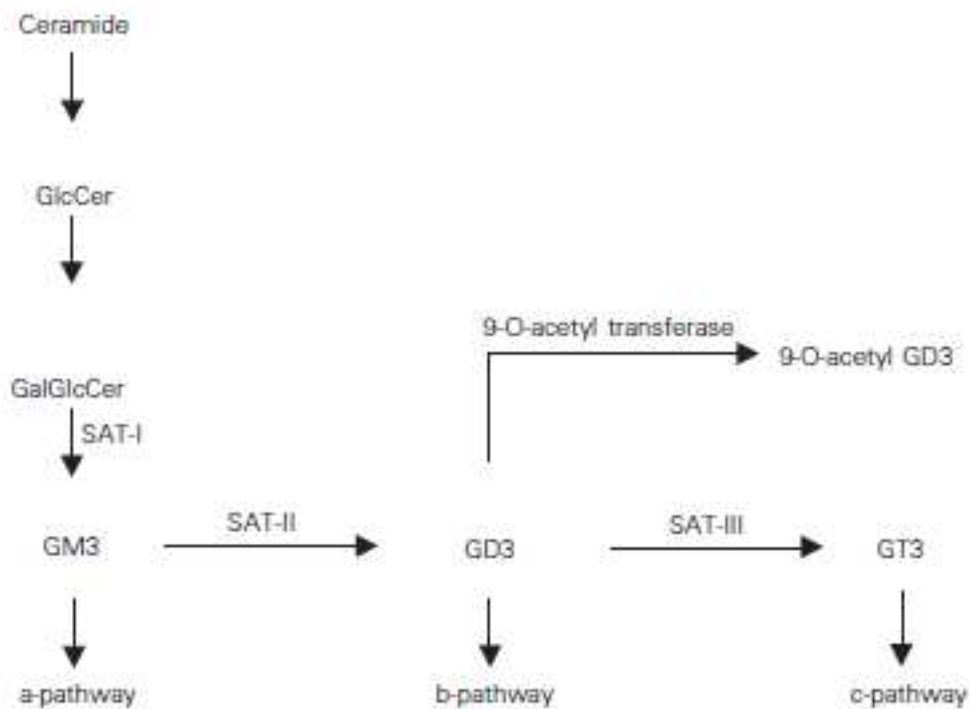
Gangliozidi su glikosfingolipidi (GSL od engl. *glycosphingolipid*) koji sadržavaju sijalinsku kiselinu. Široko su rasprostranjeni u tkivima, a najviše ih nalazimo u staničnim membranama. Najviše su izraženi u stanicama živčanog sustava. Gangliozidi se sastoje od jezgre ceramida (Cer od engl. *ceramide*) na koju su vezani glikani jednom glikozidnom vezom. Lanci glikana, zasnovani na kombinaciji glukoze, galaktoze i N-acetilgalaktozamina, sadrže između jedan i četiri, u nekim slučajevima čak i do sedam sijalnih ostataka te su vrlo heterogeni, što rezultira velikom strukturnom i funkcionalnom raznolikošću. S obzirom na heterogenost u građi ugljikohidratnih lanaca, do sada je u kralježnjaka opisano 188 različitih gangliozida (12,13). Gangliozidi se nalaze u vanjskom sloju stanične membrane i uglavnom su lokalizirani u membranskim mikrodomenama, koje su poznatije pod nazivom lipidne splavi, gdje su smješteni zajedno s drugim sfingolipidima i kolesterolom (13).

Danas je dobro poznata uloga gangliozida na razini stanice. Poznata je njihova uloga u staničnoj proliferaciji, migraciji, adheziji i u međustaničnim interakcijama. Također mogu djelovati i kao receptori za bakterijske toksine (14). Nekoliko je studija pokazalo da su važni i za staničnu diferencijaciju i to poglavito neuronskih stanica i osteoblasta (13–15).

1.3.1. Sinteza gangliozida

Strukturni temelj svih glikosfingolipida životinjskog podrijetla čini ceramidno lipidno sidro koje nastaje procesom kondenzacije sfingozina s molekulom acetil koenzima A, a reakciju katalizira ceramid sintaza. Navedeni proces se odvija *de novo* primarno u endoplazmatskom retikulumu (ER od engl. *endoplasmic reticulum*), a predstavlja početak sinteze svih GSL-a, pa tako i gangliozida (16,17). Nakon sinteze ceramidnog sidra, proces se može odvijati u dva smjera, odnosno prema sintezi galaktozilceramida (GalCer od engl. *galactosylceramide*) ili prema sintezi glukozilceramida (GlcCer od engl. *glucosylceramide*). GalCer se sintetizira reakcijom galaktolizacije, odnosno procesom kojim se na prvu hidroksilnu grupu ceramidnog lipidnog sidra prenosi galaktoza s uridin difosfat galaktoze. Enzim koji katalizira reakciju galaktozilacije naziva se GalCer sintaza, a proces se odvija u ER (18). S druge strane, Cer se može transportirati do Golgijevog aparata i to pomoću dva

alternativna puta. Jedan od puteva je prijenos ceramida u trans odjeljak Golgijevog aparata pomoću CERT-a, proteina koji prenosi ceramid i tada se Cer primarno koristi za sintezu sfingomijelina. Drugi put predstavlja vezikularni prijenos ceramida do cis odjeljka Gogijevog aparata i tada Cer podliježe procesu glukolizacije u kojem nastaje GlcCer. Reakcija je katalizirana GlcCer sintazom. U konačnici, GlcCer se pretvara u laktozilceramid (LacCer od engl. *lactosylceramide*) reakcijom koju katalizira LacCer sintaza (16,18). Zatim, na luminalnoj strani Golgijevog aparata dolazi do sijalinizacije LacCer i formiranja prekursora gangliozida (GM3, GD3 i GT3). Prekursori podliježu djelovanju glikoziltransferaza koje će dovršiti proces sinteze gangliozida. Sintetizirani gangliozidi vezikularnim putem dosežu površinu stanice gdje se uklapaju u lipidne splavi (16).



Slika 1. Biosinteza gangliozida. Cer = ceramid; Gal = galaktoza; Glc = glukoza; SAT-I = GM3 sintaza; Sat-II = GD3 sintaza; SAT-III = GT3 sintaza (preuzeto i prilagođeno iz (10))

1.4. *St8sial* gen

Gen *St8sial1* je protein kodirajući gen čiji je produkt protein gangliozid GD3 sintaza (Alfa-N-acetilneuraminid alfa-2,8-sialiltransferaza) koji je zaslužan za prijenos sijalinske kiseline na alfa-2,8 slobodnu vezu gangliozida GM3 da bi se sintetizirao gangliozid GD3 (19).

Enzim se nalazi u Golgijevom aparatu te je snažno eksprimiran u staničnim linijama melanoma, mozgu odraslih i fetusa dok se u manjoj mjeri nalazi u stanicama pluća odraslih i fetusa. Osim što sudjeluje u procesu sinteze sfingolipida, ovaj enzim je uključen i u procese proteinske glikolizacije (20).

Pomoću fluorescentne *in situ* hibridizacije određena je lokacija gena *St8sial1* u čovjeka i miša. Ljudski gen *St8sial1* lociran je na kromosomu 12 (p12.1–p11.2) dok je mišji homolog mapiran 2.8 cM distalno od D6Mit52 i 4.3 cM proksimalno od D6Mit25, na području koje se podudara s kratkim krakom ljudskog kromosoma 12 (21).

1.4.1. Posljedice neaktivnosti gena *St8sial1* i nedostatka gangliozid GD3 sintaze

Gangliozid GD3 sintaza je enzim koji je zaslužan za prijenos sijalinske kiseline na GM3 i sintezu b-serije gangliozida koji su preteča c-seriji (19). Temeljem poznavanja funkcije GD3 sintaze jednostavno je za pretpostaviti koje su posljedice nedostatka ili smanjene aktivnosti enzima, a to su gomilanje GM3 i njegovih preteča te nedostatak gangliozida b i c-serije. Dokazano je da je b-serija gangliozida važna za neuralnu diferencijaciju i regeneraciju aksona. Naime, kada se 9–O–acetyl GD3 inkorporira u staničnu membranu, odmah je uključen u procese staničnog dijeljenja za vrijeme razvoja i regeneracije perifernog i centralnog živčanog sustava. Uslijed nedostatka GD3 sintaze neće doći do stvaranja GD3 gangliozida koji je preteča 9–O–acetyl GD3 (22). Također je dokazano da su mutacije gena *St8Sial1* povezane s neurodegeneracijom i povećanim rizikom od nastanka multiple skleroze (23). Nadalje, dokazani su patološki utjecaji manjka b-serije GSL-a na mikturicijska središta u mozgu, što za posljedicu ima mokraćnu retenciju i nepotpuno pražnjenje mokraćnog mjehura. Navedeno je posljedica gubitka funkcije detruzorskog mišića koja nastaje zbog denervacije mokraćnog mjehura (24). Prema istraživanjima, deficit GD3 sintaze uključen je patofiziološki put nastanka inzulinske rezistencije i šećerne bolesti. Naime, u slučaju nedostatka gena *St8Sial1* dolazi do neuravnotežene sinteze GSL-a, a poremećena sinteza dovodi do poremećaja u raspodjeli proteina lipidnih splavi kao što su epidermalni faktor rasta i inzulinu sličan faktor rasta 1. Neučinkovita sinteza GD3 sintaze prisutna je u šećernoj bolesti tipa 1 i tipa 2, a pošto je uočeno nakupljanje GM3 u distalnim i proksimalnim tubulima nefrona, postoji mogućnost da nakupljanje GM3 igra važnu ulogu u nastanku dijabetičke nefropatije. Povišene koncentracije GM3 inhibiraju regeneraciju mezengijskih stanica i bubrežnih pericita (25). Isto tako, istraživanja su pokazala da nakupljanje GM3 ima negativan učinak na signalni put posredovan inzulinom i da zbog toga možda ima ulogu u patogenezi nastanka inzulinske rezistencije i šećerne bolesti tipa 2 (26).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Uzevši u obzir da se mutacije gena *St8Sial1* i posljedični nedostatak GD3 sintaze povezuju s neurodegenerativnim procesima, željeli smo istražiti da li će isključivanje gena *St8sial1* utjecati na perifernu inervaciju kože uške miša i na gustoću različitih tipova živčanih vlakana.

Naša hipoteza bila je da će isključivanje gena *St8Sial1* i posljedični nedostatak GD3 sintaze rezultirati oštećenjem periferne inervacije koje će se očitovati bilo smanjenjem gustoće vlakana, bilo njihovom kompenzatornom hipertrofijom te da su pojedini tipovi vlakana osjetljiviji na gore navedene promjene.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Etika

Protokol istraživanja odobren je od strane nacionalnog Bioetičkog povjerenstva i Ministarstva poljoprivrede, Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane (klasa 641–01/15–01/49, ur.broj: 525–61–07–15–07). Animalni eksperimenti provedeni su u nastambi za laboratorijske životinje Medicinskog fakulteta Sveučilišta Josip Juraj Strossmayer u Osijeku. Dio istraživanja je proveden u Laboratoriju za eksperimentalnu neurokardiologiju na Medicinskom fakultetu u Splitu.

3.2. Eksperimentalne životinje

Miševi su boravili u kontroliranim laboratorijskim uvjetima primjerene vlažnosti, temperature od 22°C s ciklusima izmjenjivanja svjetla i tame svakih 12 sati. Životinje su hranjene standardnom laboratorijskom hranom (4RF21 GLP, Mucedola srl, Settimo Milanese, Italija).

U istraživanju smo koristili trinaest miševa od kojih je pet kontrolnih miševa divljeg tipa (C57BL/6 soj, WT), a osam je miševa s isključenim genom *St8sial1* (*St8sial1* KO), originalnog porijekla od The Scripps Research Institute, La Jolla, California, kao dijela konzorcija za funkcionalnu glikomiku (Consortium for Functional Glycomics). U obje skupine miševi su starosti šest mjeseci. Kao uzorak korišteno je tkivo uške miševa.

3.3. Priprema tkiva za bojanje

Nakon primjene opće anestezije (Narketan®, 80 mg/kg + Xylapan®, 12 mg/kg, Vétoquinol, Bern, Švicarska) miševi su eutanazirani dekapitacijom. Uzeta tkiva uške miša su fiksirana u puferiranom 4%-tnom paraformaldehidu. Nakon fiksiranja tkiva su isprana u fosfatnom puferu (PBS od engl. *phosphate buffer saline*), zatim su dehidrirana u otopinama etanola rastućih koncentracija u rasponu od 75% do 100% te su u konačnici uklopljena u parafin. Dobiveni parafinski blokovi su rezani na debljinu od 5 µm korištenjem mikrotoma (Leica RM2155, Pittsburg, PA, SAD). Rezovi tkiva su postavljeni na predmetna stakalca.

Zatim je uslijedio postupak deparafinizacije tkiva. Provedena je standardna deparafinizacija u ksilenu tri puta po 5 minuta, nakon čega je uslijedila rehidracija tkiva u otopinama etanola padajućih koncentracija (2 puta po 10 minuta u 100%, zatim 1 put u 95% i 70%) uz kratko ispiranje destiliranom vodom. Nakon ispiranja preparati su zagrijavani 30 minuta u citratnom puferu, ohlađeni na sobnu temperaturu i isprani PBS-om.

3.4. Imunohistokemijsko bojanje

Nakon hlađenja i ispiranja preparati su prekriveni otopinom za blokiranje tijekom 20 minuta, a zatim su inkubirani s primarnim protutijelima preko noći. Primarna protutijela koja su se koristila su: Anti-neurofilament 200kDa antitijelo (klon 52, MAB5266, razrjeđenje 1:100, Sigma-Aldrich), Anti-CGRP antitijelo (ab36001, razrjeđenje 1:500, Abcam), Anti-tirozin hidroksilaza antitijelo (ab113, razrjeđenje 1:500, Abcam) i Anti-kolin acetiltransferaza antitijelo (AB144P, razrjeđenje 1:150, Milipore). Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, uzorci su višestruko ispirani s PBS-om te su nakon ispiranja inkubirani sat vremena sa sekundarnim protutijelima. Sekundarna protutijela su: magareća anti-kuničja antitijela IgG, Alexa Fluor® 488 (711-545-152, Jackson Immuno Research Laboratories) i magareća anti-ovčja antitijela IgG H+L Alexa Fluor® 488 (ab150177, razrjeđenje 1:400, Abcam). Poslije inkubacije uzorci su ponovno ispirani s PBS-om. Zatim je nanjena DAPI (4'6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid) boja tijekom 2 minute kako bi se prikazale jezgre. Nakon ispiranja s destiliranom vodom stakalca su ostavljena da se suše na zraku pa su nakon sušenja pokrivena pokrovnim stakalcem. Pripremljena stakalca čuvana su u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

3.5. Mikroskopiranje i kvantifikacija

Histološki preparati pregledani su mikroskopom BX51 (Olympus, Tokio, Japan) pri povećanju objektiva od 40 puta i fotografirani su hlađenom digitalnom kamerom DS-Ri2 (Nikon, Tokio, Japan) opremljenom NIS-Elements F softverom. Fotografirani su samo neoštećeni dijelovi uzoraka, tako da smo u prosjeku imali 12 do 16 fotografija po životinji koje smo koristili za daljnju analizu. Za obradu i analizu fotografija korišten je program Adobe Photoshop CS2 (verzija 9.0., Adobe Photoshop CS., 2004, Berkeley, CA: Peachpit Press). Koristeći se opcijom Color balance i postavljanjem magente na -100 sa originalne fotografije se uklone crveni i plavi tonovi. Zatim su se gumicom ručno obrisali okolina, artefakti i dijelovi tkiva (mišić, elastična hrskavica) kako bi se za analizu u Threshold funkciji ostavili koža i potkožno tkivo. Granični prag (Threshold) je postavljen na 128 za analizu ekspresije TH i ChAT te na 170 za analizu ekspresije N52 i CGRP. Uz pomoć opcija Select (Color range) i Magic Wand u pikselima su se izrazile površine koje su bile potrebne za izračun postotka živčanih vlakana u koži i potkožnom tkivu. Postotak vlakana je izračunat preko formule: % vlakana = (ukupno bijelo-okoliš) / (slika-okoliš) = vlakna/tkivo. Ukupni broj piksela za svaku fotografiju iznosio je 2585664.

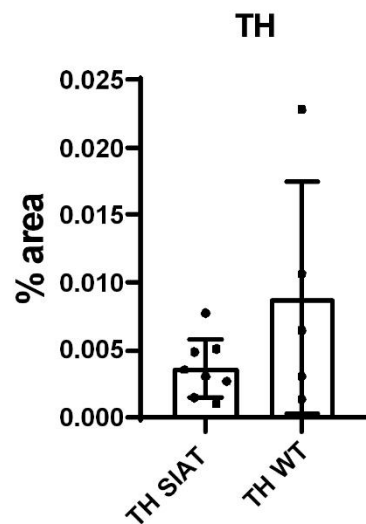
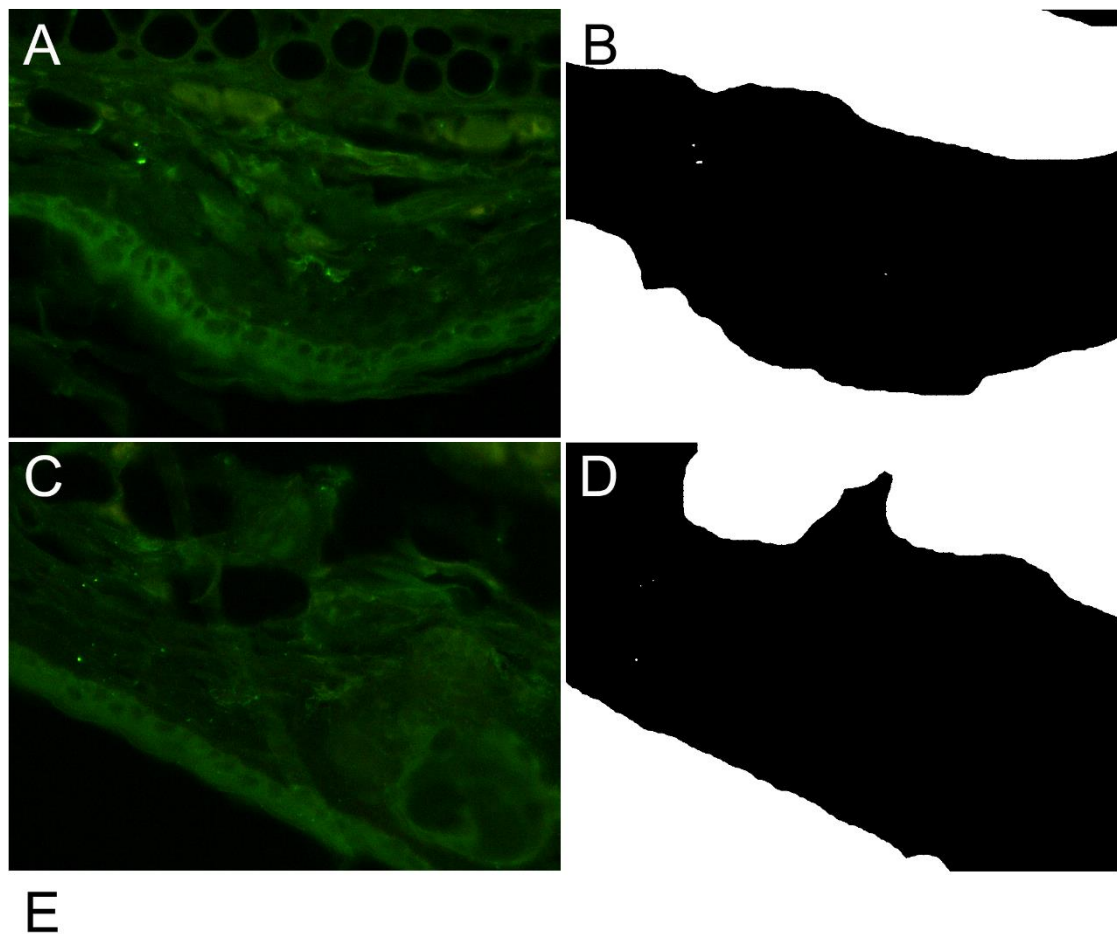
3.6. Statistička analiza podataka

Za statističku analizu podataka koristio se program GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, California). Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilk testom. Za usporedbu gustoće vlakana između skupina kontrolnih i miševa s isključenim genom *Stδsial* korišten je T-test po Studentu. Uzevši u obzir odstupanje od normalne distribucije, podatci za gustoću ChAT-imunoreaktivnih vlakana su logaritamski transformirani. Grafički su prikazani netransformirani podatci. Za statistički značajnu razliku postavljena je vrijednost $P < 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na tirozin hidroksilazu (TH)

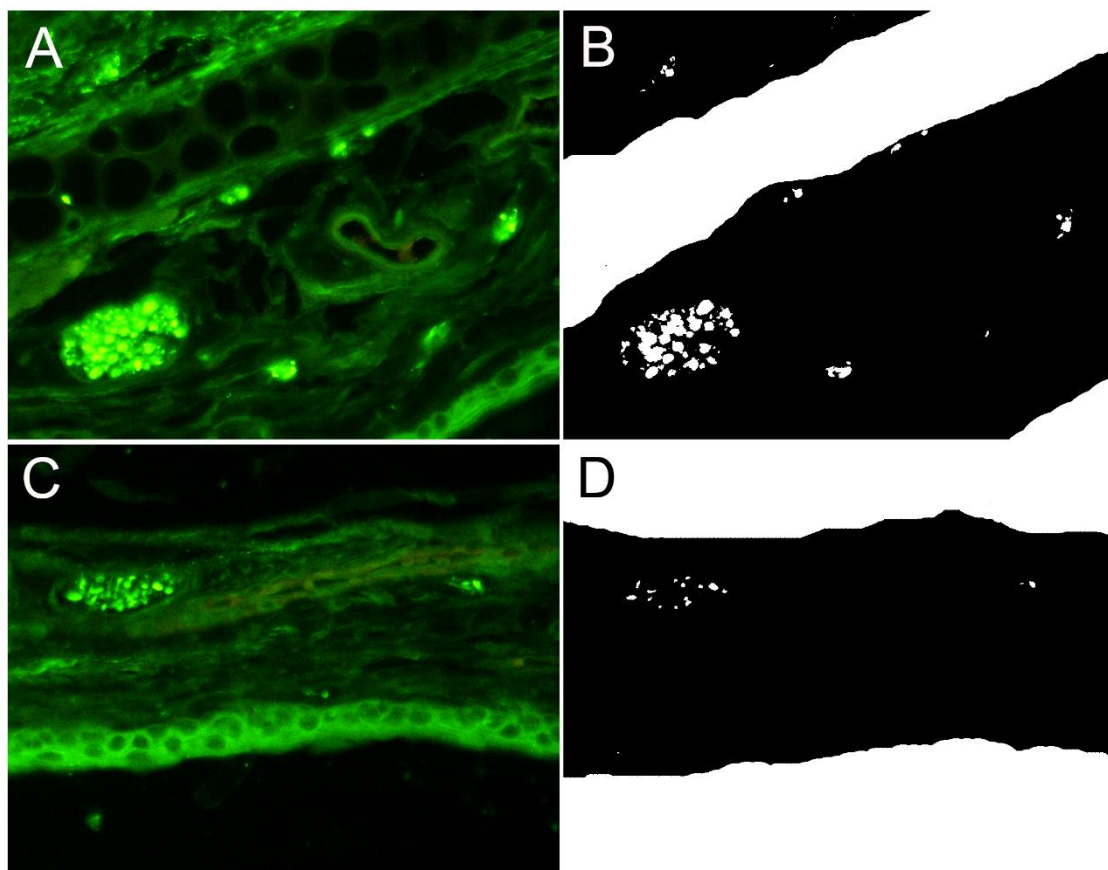
Analizom postotka površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na TH u koži i potkožnom tkivu uške KO i WT miševa, nije pronađena statistički značajna razlika u gustoći inervacije simpatičkim živčanim vlaknima ($P = 0,122$).



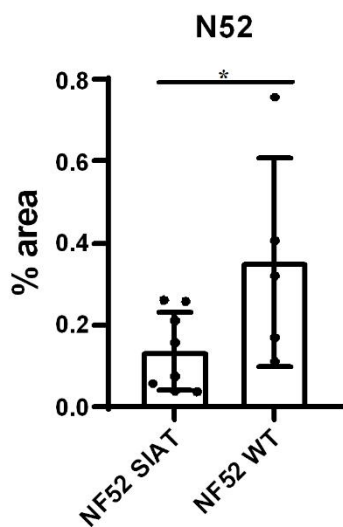
Slika 2. Prikaz simpatičke inervacije kože i potkožnog tkiva uške WT i KO miševa. A) Simpatička inervacija kože i potkožnog tkiva kontrolne skupine; B) Threshold prikaz slike A; C) Simpatička inervacija kože i potkožnog tkiva miša s isključenim genom *St8sial1*; D) Threshold prikaz slike C; E) Grafički prikaz gustoće inervacije simpatičkim živčanim vlaknima u skupinama WT i KO miševa (SIAT). Rezultati su prikazani kao postotak površine živčanih vlakana u odnosu na površinu tkiva ($P > 0,05$).

4.2. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na Neurofilament 200 kDa (N52)

U skupini miševa s isključenim genom *St8sial1* pronađeno je statistički značajno smanjenje u gustoći inervacije kože i potkožnog tkiva mijeliniziranim živčanim vlaknima imunoreaktivnim na N52 u odnosu na kontrolne miševe divljeg tipa ($P = 0,049$)



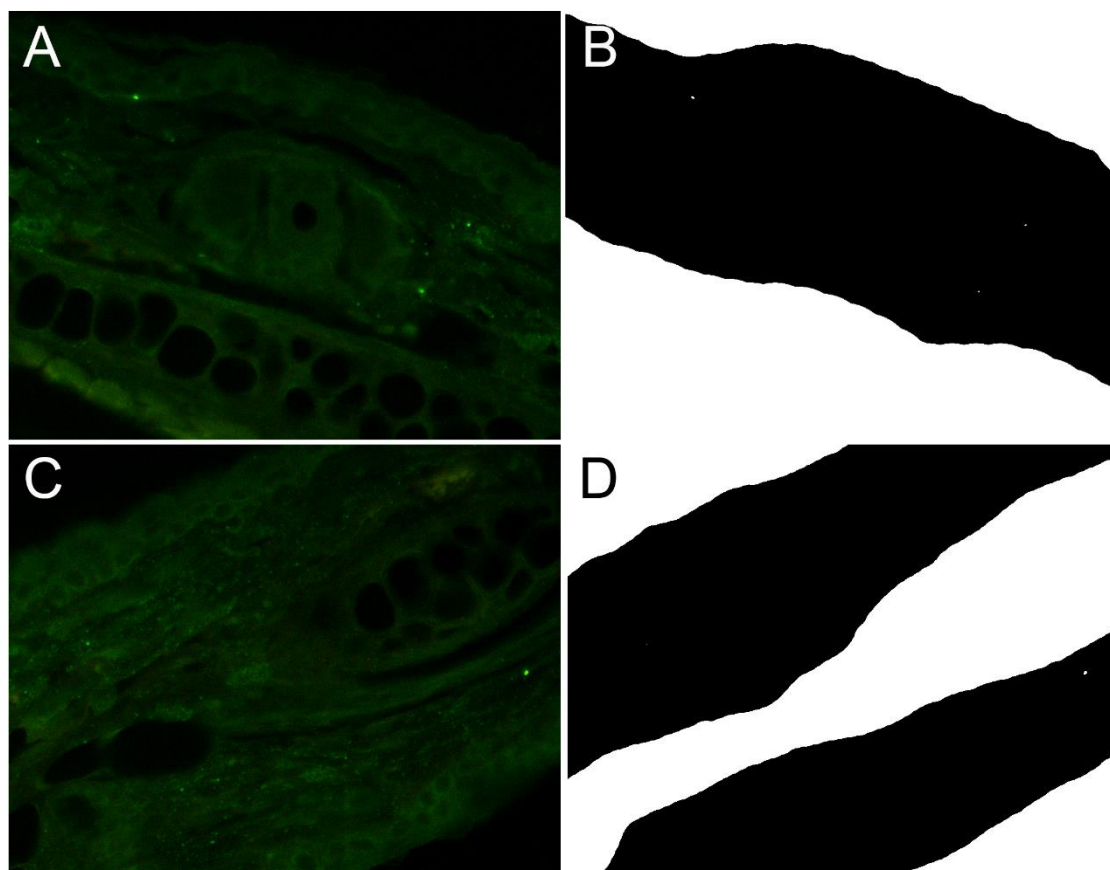
E



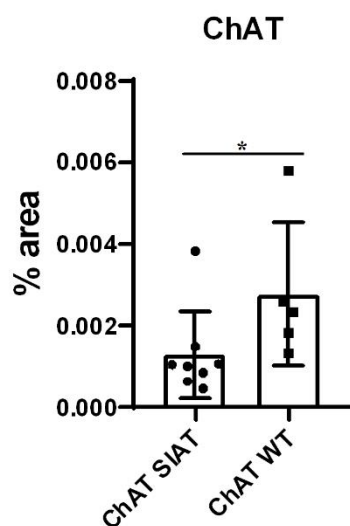
Slika 3. Prikaz inervacije kože i potkožnog tkiva WT i KO miševa živčanim vlaknima imunoreaktivnim na N52. A) Senzorna inervacija kože i potkožnog tkiva mijeliniziranim vlaknima kontrolne skupine; B) Threshold prikaz slike A; C) Inervacija kože i potkožnog tkiva mijeliniziranim vlaknima miša s isključenim genom *St8sial*; D) Threshold prikaz slike C; E) Grafički prikaz gustoće inervacije mijeliniziranim živčanim vlaknima imunoreaktivnim na N52 u skupinama WT i KO miševa (SIAT). Rezultati su prikazani kao postotak površine živčanih vlakana u odnosu na površinu tkiva (zvjezdica označava $P < 0,05$).

4.3. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na ChAT

Analiza postotka površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na ChAT pokazala nam je da u skupini KO miševa postoji statistički značajno smanjenje u gustoći inervacije živčanim vlakanim imunoreaktivnim na ChAT u odnosu na kontrolne miševe divljeg tipa ($P = 0,035$).



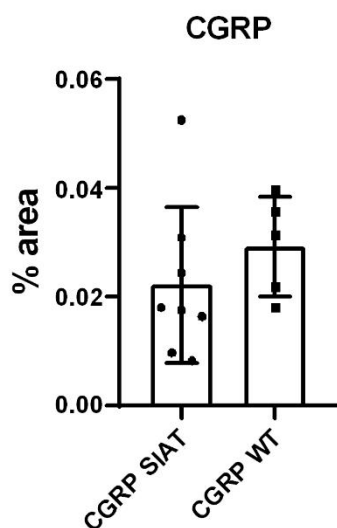
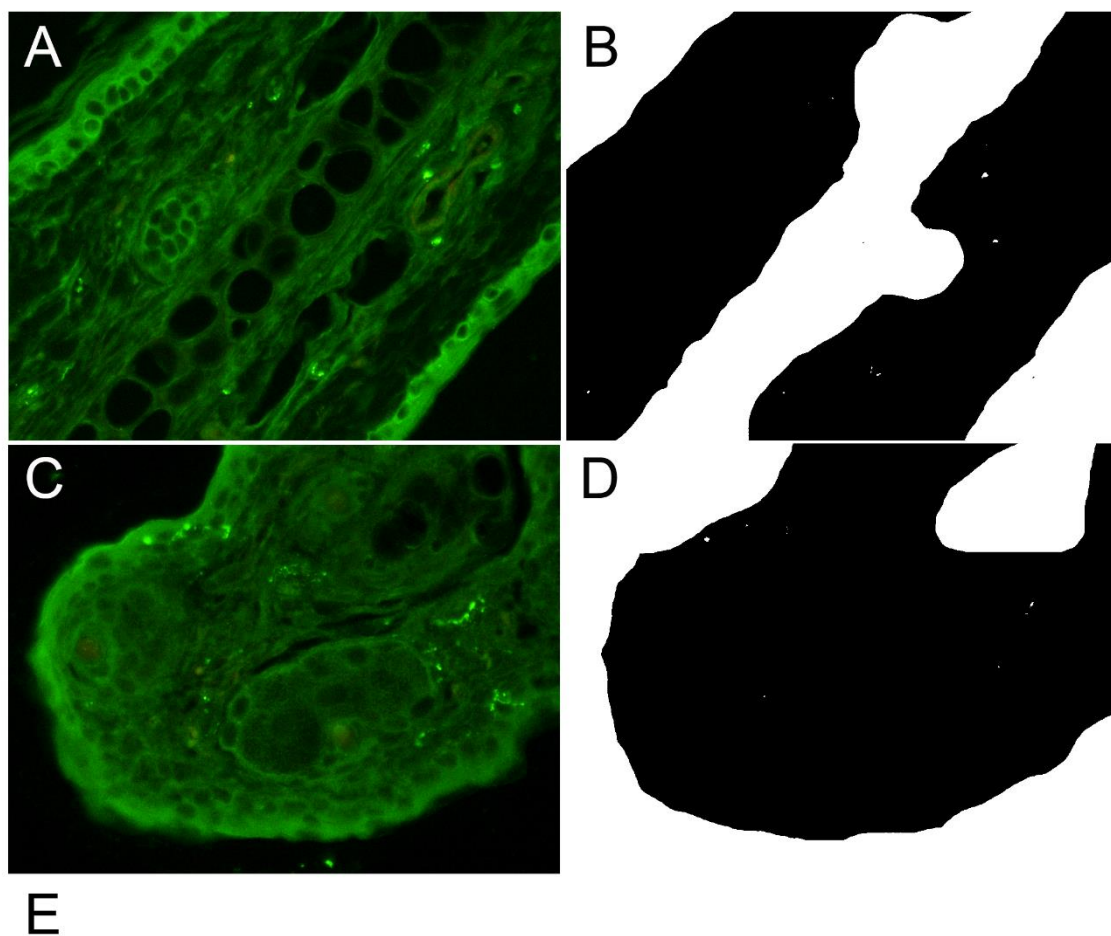
E



Slika 4. Prikaz inervacije kože i potkožnog tkiva WT i KO miševa ChAT-imunoreaktivnim živčanim vlaknima. A) Inervacija kože i potkožnog tkiva kontrolne skupine ChAT-imunoreaktivnim živčanim vlaknima; B) Threshold prikaz slike A; C) Inervacija kože i potkožnog tkiva miša s isključenim genom *St8sial* ChAT-imunoreaktivnim živčanim vlaknima; D) Threshold prikaz slike C; E) Grafički prikaz gustoće inervacije ChAT-imunoreaktivnim živčanim vlaknima u skupinama WT i KO (SIAT) miševa. Rezultati su prikazani kao postotak površine živčanih vlakana u odnosu na površinu tkiva (zvjezdica označava $P < 0,05$).

4.4. Postotak površine živčanih vlakana imunoreaktivnih na CGRP

U ovom istraživanju nije pronađena statistički značajna razlika u postotku površine živčanih vlakana koja vezuju Anti-CGRP antitijela između skupina KO i WT miševa ($P = 0,349$).



Slika 5. Prikaz inervacije kože i potkožnog tkiva WT i KO miševa vlaknima koja vezuju Anti-CGRP antitijela. A) Inervacija kože i potkožnog tkiva vlaknima koja vezuju anti-CGRP antitijela kontrolne skupine; B) Threshold prikaz slike A; C) Inervacija kože i potkožnog tkiva živčanim vlaknima imunoreaktivnim na CGRP miša s isključenim *St8sia1*. genom; D) Threshold prikaz slike C; E) Grafički prikaz gustoće inervacije živčanim vlaknima koja vezuju anti-CGRP antitijela u skupinama WT i KO miševa. Rezultati su prikazani kao postotak površine živčanih vlakana u odnosu na površinu tkiva ($P > 0,05$).

5. RASPRAVA

Cilj ovog istraživanja bio je istražiti utjecaj isključivanja gena *St8sial1* i posljedičnog nedostatka GD3 sintaze na perifernu inervaciju kože uške miša. Uzorci tkiva miševa divljeg tipa i onih s isključenim genom *St8sial1* uklopljeni su u parafin te su pripremljeni histološki rezovi obojani imunohistokemijski korištenjem primarnih protutijela za različite neuronalne markere. Gustoća pojedinih tipova živčanih vlakana određena je analizom digitalnih mikrofotografija.

Kao biljeg simpatičkih vlakana koristili smo enzim tirozin hidroksilazu (TH). Analizom postotka površine TH imunoreaktivnih živčanih vlakana, nije pronađena značajna razlika u gustoći simpatičke inervacije kože i potkožnog tkiva između divljeg tipa miševa i skupine s isključenim genom *St8sial1*. Za razliku od prethodnog, gustoća mijeliniziranih (N52-imunoreaktivnih) živčanih vlakana bila je smanjena u *St8sial1* KO miševa, u usporedbi s WT. Gustoća ChAT-imunoreaktivnih živčanih vlakana također je bila smanjena u miševa s isključenim genom *St8sial1*. Nadalje, gustoća inervacije peptidergičkim, CGRP imunoreaktivnim, živčanim vlaknima nije se razlikovala između dvaju istraživanih sojeva.

Rezultati našeg istraživanja djelomično su u suglasju s poznatom ulogom gangliozid GD3 sintaze, čiju sintezu kodira gen *St8sial1*. Enzim GD3 sintaza ključan je u prijenosu sijalinske kiseline na GM3 i sintezi gangliozida GD3, koji su preteča seriji GT3 (19). Posljedice nedostatka ili smanjene aktivnosti GD3 sintaze su gomilanje GM3 i njegovih preteča te nedostatak gangliozida b i c-serije, od kojih je posebice b-serija važna za diferencijaciju neurona i regeneraciju aksona (22). Stoga je bilo za očekivati da mutacije gena *St8Sial1* i nedostatak GD3 sintaze mogu dovesti do neurodegenerativnih procesa, što pokazuju i neka istraživanja(23,24).

U skladu s našim rezultatima, Ribeiro-Resende i suradnici su utvrdili znatno manju debljinu ishijadičnog živca i poprečnog presjeka neurofilament 200-imunoreaktivnih aksona kod drugog mišjeg modela s nedostatkom GD3 sintaze, u usporedbi s miševima divljeg tipa. Nadalje, u miševa s nedostatkom GD3 sintaze pronašli su također i smanjenu debljinu mijelinske ovojnice te motoričke i senzorne deficite tijekom testiranja (unatoč normalnoj motorici u okruženju bez podražaja i normalnome ponašanju) (22).

Rezultati našeg istraživanja pokazuju da kod isključenja gena *St8sial1* i posljedičnog nedostatka GD3 sintaze prvenstveno dolazi do oštećenja mijeliniziranih vlakana, u našem slučaju N52-imunoreaktivnih (što je sukladno prethodno spomenutom istraživanju) te ChAT-imunoreaktivnih vlakana (za koja pretpostavljamo da su motorička vlakna koja nalazimo na mjestima gdje prolaze do mišića). Suprotno navedenome, u gustoći nemijeliniziranih simpatičkih postganglijskih vlakana (TH-imunoreaktivnih), kao i peptidergičkih CGRP-

imunoreaktivnih vlakana (velikim dijelom vazomotornih) nismo pronašli nikakvu razliku usporedbom WT i *St8sia1*-KO miševa. Navedeno se može objasniti u literaturi opisanom ulogom GD3 sintaze i njezinog posrednog produkta 9-O-acetil GD3 je u Schwannovim stanicama u ranim fazama periferne neuronske regeneracije (22). Imunološka bojanja i HTCL analiza pokazali su povećanje u biosintezi gangliozida za vrijeme neuralne diferencijacije humanih mezenhimalnih matičnih stanica. Točnije, primijećeno je značajno povećanje ekspresije GD3 i GD1a za vrijeme neuralne diferencijacije. Kako bi se prikazala važnost gangliozida u neuralnoj diferencijaciji, gen *UGCG* je utišan kako bi se blokirala sinteza gangliozida, a rezultati su pokazali da gangliozidi imaju ulogu u neuralnoj diferencijaciji. Također je prikazano da je ekspresija GD3 povećana u ranoj neuronalnoj diferencijaciji embrionalnih matičnih stanica. GD3 i GD1a su uključeni u indukciju rane neuralne diferencijacije, u razvoj mozga i dozrijevanje neuronskih stanica (14).

Miševi s deficitom GD3 i gangliozida b-serije imali su poremećen neuralni razvoj u hipokampusu koji je rezultirao progresivnim gubitkom populacije neuralnih matičnih stanica i doveo do ponašanja sličnog depresiji. U ljudi, deficit GD3 sintaze rezultira nedostatkom GD3 i ključnih gangliozida, što je predispozicija nastanka nasljednih oblika epilepsije koje se manifestiraju ne samo konvulzivnim napadajima nego i sljepoćom te neurološkim otklonima. 9-O-acetil GD3 uključen je u neuralnu migraciju vođenu glijalnim stanicama i u razvoj neuronskih vlakana u već razvijenim neuronima, ali i tijekom njihovog razvoja. Osim toga, utvrđeno je da spomenuti GD3 pospješuje aksonalni rast i mijelinizaciju Schwannovim stanicama tijekom razvoja i regeneracije perifernih živčanih vlakana u miševa (13). Nadalje, rezultati genetičkih studija ukazuju na povezanost između varijanti gena *St8sia1* i razvoja multiple skleroze, kao jedne od najučestalijih neurodegenerativnih bolesti (23).

U sažetku, rezultati našeg istraživanja pokazali su smanjenje gustoće periferne inervacije kože u miševa s isključenim genom *St8sia1*, što ukazuje na važnost ovog gena, odnosno njegovog produkta GD3 sintaze u razvoju i obnavljanju perifernih živčanih vlakana. Sukladno podacima iz literature, isključivanje ovog gena imalo je selektivni učinak samo na populacije mijeliniziranih neurona, dok istraživane populacije nemijeliniziranih neurona nisu bile zahvaćene, a što se može objasniti donekle razjašnjenom ulogom GD3 sintaze u procesima mijelinizacije i aksonalnog rasta.

Ograničenja ovog istraživanja su mali broj životinja, njih ukupno trinaest, od kojih je osam *St8sia1*-KO i pet miševa divljeg tipa (WT). Nadalje, za analizu nisu korišteni cijeli uzorci, nego samo neoštećeni dijelovi preparata, tako da smo u konačnici imali 12 do 16 mikrofotografija koje smo podvrgnuli daljnjim analizama. Obrada fotografija (ručno brisanje

artefakata i dijelova tkiva koji nisu bili od interesa) i postavljanje graničnog praga (Treshold) za analizu fotografija bili su subjektivna procjena ispitivača, tako da je to dio istraživanja kojeg bi bilo potrebno objektivizirati.

6. ZAKLJUČCI

Na temelju ovog istraživanja mogu se donijeti sljedeći zaključci:

1. Isključivanje gena *St8sial1* u miševa rezultira poremećajem periferne inervacije, koji se očituje smanjenjem gustoće perifernih živčanih vlakana u koži;
2. Poremećaj periferne inervacije uzrokovan isključivanjem gena *St8sial1* ima selektivni učinak samo na populacije mijeliniziranih neurona, dok istraživane populacije nemijeliniziranih neurona nisu bile zahvaćene, a što se može objasniti donekle razjašnjenom ulogom GD3 sintaze u procesima mijelinizacije i aksonalnog rasta.

7. POPIS LITERATURE

1. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: histology, physiology, and pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2011;19(2):229–34.
2. Laverdet B, Danigo A, Girard D, Magy L, Demiot C, Desmoulière A. Skin innervation: Important roles during normal and pathological cutaneous repair. *Histol Histopathol.* 2015;30(8):875–92.
3. Oaklander AL, Siegel SM. Cutaneous innervation: Form and function. *J Am Acad Dermatol.* 2005;53(6):1027–37.
4. Saeed AW, Ribeiro-da-Silva A. Non-peptidergic primary afferents are presynaptic to neurokinin-1 receptor immunoreactive lamina I projection neurons in rat spinal cord. *Mol Pain.* 2012;8(1):1.
5. Gibbons CH. Basics of autonomic nervous system function. *Handbook of Clinical Neurology.* Elsevier B.V.; 2019. 407–418 p.
6. Luo L. Principles of neurobiology. Garland Science, Taylor and Francis group, NY, USA 2016; 6-23.
7. Kuge H, Akahori K, Yagyu KI, Honke K. Functional compartmentalization of the plasma membrane of neurons by a unique acyl chain composition of phospholipids. *J Biol Chem.* 2014;289(39):26783–93.
8. Ingólfsson HI, Carpenter TS, Bhatia H, Bremer PT, Marrink SJ, Lightstone FC. Computational Lipidomics of the Neuronal Plasma Membrane. *Biophys J.* 2017;113(10):2271–80.
9. Cooper MG, Hausman RE. Stanica – Molekularni pristup. 5. izd. Zagreb: Medicinska naklada 10000 Zagreb; 2010;58-63.
10. Mendez-Otero R, Santiago MF. Functional role of a specific ganglioside in neuronal migration and neurite outgrowth. *Brazilian J Med Biol Res.* 2003;36(8):1003–13.
11. Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM. Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(2):128–40.
12. Yu RK, Tsai YT, Ariga T, Yanagisawa M. Structures, biosynthesis, and functions of gangliosides-an overview. *J Oleo Sci.* 2011;60(10):537–44.
13. Palmano K, Rowan A, Guillermo R, Guan J, McJarrow P. The role of gangliosides in

- neurodevelopment. *Nutrients*. 2015;7(5):3891–913.
14. Moussavou G, Kwak DH, Lim MU, Kim JS, Kim SU, Chang KT, et al. Role of gangliosides in the differentiation of human mesenchymal-derived stem cells into osteoblasts and neuronal cells. *BMB Rep*. 2013;46(11):527–32.
 15. Lee SH, Ryu JS, Lee JW, Kwak DH, Ko K, Choo YK. Comparison of ganglioside expression between human adipose and dental pulp-derived stem cell differentiation into osteoblasts. *Arch Pharm Res*. 2010;33(4):585–91.
 16. Sandhoff K, Harzer K. Gangliosides and gangliosidoses: Principles of molecular and metabolic pathogenesis. *J Neurosci*. 2013;33(25):10195–208.
 17. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*. 2010;62(5):347–56.
 18. D'Angelo G, Capasso S, Sticco L, Russo D. Glycosphingolipids: Synthesis and functions. *FEBS J*. 2013;280(24):6338–53.
 19. GeneCards. Human gene database. *St8sial* gene. Dostupno na adresi: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene>. Datum pristupa: 27.05.2021.
 20. UniProtKB - Q92185 (SIA8A_HUMAN). Dostupno na adresi: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q92185#subcellular>. Datum pristupa: 27.05.2021.
 21. Matsuda Y, Nara K, Watanabe Y, Saito T, Sanai Y. Chromosome mapping of the GD3 synthase gene (*SIAT8*) in human and mouse. *Genomics*. 1996;32(1):137–9.
 22. Ribeiro-Resende VT, Gomes TA, De Lima S, Nascimento-Lima M, Bargas-Rega M, Santiago MF, et al. Mice lacking GD3 synthase display morphological abnormalities in the sciatic nerve and neuronal disturbances during peripheral nerve regeneration. *PLoS One*. 2014;9(10):1–12.
 23. Husain S, Yildirim-Toruner C, Rubio JP, Field J, Schwalb M, Cook S, et al. Variants of *ST8SIA1* are associated with risk of developing multiple sclerosis. *PLoS One*. 2008;3(7):1–6.
 24. Gil-tommee C, Vidal-martínez G, Reyes CA, Vargas- J, Herrera G V, Martin SM, et al. *HHS Public Access*. 2019;265–73.
 25. Novak A, Režić Mužinić N, Čikeš Čulić V, Božić J, Tičinović Kurir T, Ferhatović L, et

- al. Renal distribution of ganglioside GM3 in rat models of types 1 and 2 diabetes. *J Physiol Biochem.* 2013;69(4):727–35.
26. Vukovic I, Bozic J, Markotic A, Ljubicic S, Kurir TT. The missing link -Likely pathogenetic role of GM3 and other gangliosides in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Blood Press Res.* 2015;40(3):306–14.

8. SAŽETAK

Ciljevi: Cilj ovog rada bio je istražiti da li će isključivanje gena *Stδsial1* utjecati na perifernu inervaciju kože uške miša i na gustoću različitih tipova živčanih vlakana s obzirom na to da se mutacije gena *Stδsial1* povezuju s neurodegenerativnim procesima.

Materijali i metode: U istraživanju je korišteno trinaest miševa u dobi od šest mjeseci, od kojih je osam miševa s isključenim genom *Stδsial1*, a pet je kontrolnih miševa divljeg tipa (C57BL/6 soj). Nakon eutanazije, uzeto je tkivo uške miša koje je zatim uklopljeno u parafinske blokove. Dobiveni histološki preparati bojani su imunohistokemijski po standardnom postupku. Primarna protutijela koja su se koristila su Anti-NF52, Anti-CGRP, Anti-TH i Anti-ChAT. Nakon inkubacije s primarnim protutijelima, uzorci su ispirani s PBS-om te su nakon ispiranja inkubirani sat vremena sa sekundarnim protutijelima. Korištena sekundarna protutijela su: Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 i Donkey Anti-Sheep IgG H+L Alexa Fluor® 488. Preparati su pregledani BX51 Olympus mikroskopom opremljenim hlađenom digitalnom kamerom te su uzete fotografije za daljnju analizu. Mikrofotografije su dalje analizirane u Adobe Photoshop CS2 programu, a područje od interesa bili su koža i potkožno tkivo uške miša. Rezultati su statistički obrađeni u GraphPad Prism 8.0.1. programu, a za statistički značajnu razliku postavljena je vrijednost $P < 0,05$.

Rezultati: Analizom postotaka površine N52 imunoreaktivnih živčanih vlakana pronađena je statistički značajna razlika u smanjenu gustoće inervacije kože miša uspoređujući WT i KO skupine ($P = 0,049$). Isto tako, gustoća ChAT-imunoreaktivnih živčanih vlakana bila je smanjena u miševa s isključenim genom *Stδsial1* ($P = 0,035$). Za razliku od prethodnog, nije pronađena značajna razlika u gustoći simpatičke inervacije kože (TH marker) i potkožnog tkiva između miševa divljeg tipa i miševa s isključenim genom *Stδsial1* ($P = 0,122$). Nadalje, gustoća inervacije peptidergičkim, CGRP imunoreaktivnim, živčanim vlaknima nije se razlikovala između dvaju istraživanih sojeva ($P = 0,349$).

Zaključci: Isključivanje gena *Stδsial1* u miševa rezultira poremećajem periferne inervacije, koji se očituje smanjenjem gustoće perifernih živčanih vlakana u koži. Poremećaj periferne inervacije ima selektivan učinak samo na mijelinizirana živčana vlakna, dok nemijelinizirani neuroni nisu bili zahvaćeni.

9. SUMMARY

Diploma thesis title: Cutaneous innervation of *St8sia1* knockout mice

Objectives: The aim of this study was to investigate whether the knock-out of the *St8sia1* gene will affect peripheral innervation of mouse ear skin and the density of different types of nerve fibers since mutations in the *St8sia1* gene are associated with neurodegenerative processes.

Materials and methods: Thirteen six-month-old mice were used in the study, eight of them were *St8sia1* knock out mice and five of them were control-type wild-type mice (C57BL / 6 strain). After euthanasia, mouse ear tissue was taken and then embedded in paraffin blocks. Obtained histological preparations were stained immunohistochemically according to standard procedures. The primary antibodies used were Anti-NF52, Anti-CGRP, Anti-TH and Anti-ChAT. After incubation with the primary antibodies, the samples were washed with PBS and after being washed out the samples were incubated for one hour with the secondary antibodies. Secondary antibodies that were used are Donkey Anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor® 488 and Donkey Anti-Sheep IgG H + L Alexa Fluor® 488. Histological preparations were examined with a BX51 Olympus microscope equipped with a cooled digital camera and photographs were taken for further analysis. The microphotographs were further analyzed in Adobe Photoshop CS2 and the areas of interest were the skin and subcutaneous tissue of the mouse ear. The results were statistically processed in GraphPad Prism 8.0.1. program and for a statistically significant difference was set the value of $P < 0,05$.

Results: Analysis of the percentage of N52 surface area of immunoreactive nerve fibers has shown a statistically significant difference in the reduced innervation density of mouse skin comparing WT and KO groups ($P = 0,049$). Likewise, the density of ChAT-immunoreactive nerve fibers was reduced in the *St8sia1* knock out mice ($P = 0,035$). Unlike the previous one, no significant difference was found in the density of sympathetic innervation (TH-immunoreactive) of the skin and subcutaneous tissue between wild-type mice and *St8sia1* knock out mice ($P = 0,122$). Furthermore, the density of innervation by peptidergic CGRP immunoreactive nerve fibers did not differ between the two studied strains ($P = 0,349$).

Conclusions: Knock-out of the *St8sia1* gene in mice results in a disturbance of peripheral innervation, which is manifested by a decrease in the density of peripheral nerve fibers in the skin. Peripheral innervation disorder has a selective effect only on myelinated nerve fibers, while unmyelinated neurons were not affected.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODATCI:

Ime i prezime: Renata Brčić

Datum rođenja: 24.02.1996.

Mjesto rođenja: Split, Republika Hrvatska

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa stanovanja: Karlovo 46, Kaštel Kambelovac

E-mail: renata.brcic@gmail.com

OBRAZOVANJE:

2014.–2021. Medicinski fakultet Split, smjer medicina

2010.–2014. IV. Gimnazija „Marko Marulić“, Split

2002.–2010. Osnovna škola kneza Trpimira, Kaštel Gomilica

JEZICI:

Engleski jezik (aktivni korisnik)

Talijanski jezik (pasivni korisnik)

RADNO ISKUSTVO:

2015.–Agentica za telefonsko anketiranje i unos podataka, Ipsos puls d.o.o. (sezonski posao)

2017.–2019. - prodavačica, Mlinar pekare (sezonski posao)

2020.–Trijaža pacijenata za vrijeme COVID-19 pandemije, KBC Split

2021.–Administrativni poslovi na cjepnom punktu u Spaladium Areni

AKTIVNOSTI:

2014.–danas - volonterka Gradskog društva Crvenog križa Split

2014.–danas – članica Interventnog tima Crvenog križa Split (Interventni tim Zajednice društava Crvenih križeva Splitsko–dalmatinske županije)

2017. i 2018. - sudjelovanje na skupu predavanja i radionica „Praktična znanja za studente“

2018.–organizatorica aktivnosti „Upoznajmo ljudsko tijelo“ na Festivalu znanosti, pri studentskoj sekciji NeuroSplit

2018.–2021. Članica Udruge CroMSIC (Hrvatska udruga studenata medicine)

2018.–2021.– vršnjačka edukatorica na projektu „Promicanje mentalnog zdravlja mladih– Pogled u sebe“

2019.–sudjelovanje na Nacionalnom natjecanju ekipa prve pomoći Hrvatskog Crvenog križa; osvojeno 3. (treće) mjesto kao dio ekipe Crvenog križa Split

2019.–2021. – asistentica koordinatorice projekta „Promicanje mentalnog zdravlja mladih– Pogled u sebe“

2021.–demonstratorica na Katedri za kliničke vještine