

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Darko Orešković

Razvoj perineuronskih mreža u sloju
pod kortikalnom pločom mozga čovjeka

Diplomski rad



Zagreb, 2014.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga uz mentorstvo prof.dr.sc. Nataše Jovanov Milošević i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2013/2014.

Popis kratica

CP	Kortikalna ploča, prema engl. <i>Cortical plate</i>
CSPG	Hondroitin sulfat proteoglikan, prema engl. <i>Chondroitin sulfate proteoglycan</i>
ECM	Izvanstanična tvar, prema engl. <i>Extracellular matrix</i>
IMZ	Intermedijarni sloj, prema engl. <i>Intermediate zone</i>
MRI	Slikovni prikaz magnetskom rezonancijom, prema engl. <i>Magnetic resonance imaging</i>
PNN	Perineuronske mreže, prema engl. <i>Perineuronal nets</i>
PSZ	Preteča sloja pod pločom, prema engl. <i>Presubplate zone</i>
RSZ	Ostatak sloja pod pločom, prema engl. <i>Remnants of subplate zone</i>
SZ	Sloj pod kortikalnom pločom, prema engl. <i>Subplate zone</i>
TG	Tjedan gestacije
WFA	Aglutinin <i>Wisteria-e floribunda-e</i> , prema engl. <i>Wisteria floribunda agglutinin</i>

1. Sažetak	1
2. Summary	2
3. Uvod	3
3.1. Perineuronske mreže i <i>Wisteria floribunda</i> aglutinin	3
3.2. Sloj pod kortikalnom pločom	4
4. Hipoteza	5
5. Ciljevi rada	5
5.1. Opći cilj	5
5.2. Specifični ciljevi	5
6. Materijal i metode	6
6.1. Materijali	6
6.1.1. Moždano tkivo	6
6.1.2. Aglutinin za histokemijsko bojanje	6
6.2. Metode	6
6.2.1. Priprema tkiva	6
6.2.2. Histokemijska metoda prikaza izražaja PNN pomoću <i>Wisteria floribunda</i> agglutinin-a	6
6.2.3. Bojenje metodom po Nisslu	7
6.2.4. Svjetlosna mikroskopija	7
7. Rezultati	9
8. Rasprava	14
9. Zaključci	17
10. Zahvale	18

1. Sažetak

Darko Orešković

Perineuronske mreže su strukture izvanstanične tvari u mozgu koje nastaju kada stanice izluče molekule hondroitin sulfata proteoglikana koje se kondenziraju i okružuju tijela određenih neurona i njihovih aksona. Danas je poznato da one imaju čitav niz važnih uloga u normalnom razvoju i funkciji mozga. U ovom radu su preparati ljudskog fetalnog i dječjeg mozga obojani *Wisteria floribunda agglutin*-om koji je prihvaćeni marker perineuronskih mreža, odnosno izvanstanične tvari. Cilj istraživanja je bio utvrditi intenzitet te prostornu i vremensku raspodjelu perineuronskih mreža u prvenstveno sloju pod pločom, a zatim i samoj kortikalnoj ploči tijekom razvoja ljudskog telencefalona. Rezultati su pokazali da su perineuronske mreže sa 13. gestacijskog tjedna izražene u *pre-subplate* zoni kao perisomatsko obojenje u dorzolateralnom telencefaličkom zidu. Nakon toga, perineuronske mreže su do 25. tjedna gestacije izražene kao difuzno obojenje u *subplate* zoni, najviše oko prospektivne inzule. Do 33. gestacijskog tjedna su pak vrlo slabo vidljive, dok se nakon toga, kao i u 40. gestacijskom tjednu vide kao intenzivno difuzno obojenje u *remnants of subplate* zoni. Ti rezultati, kao i oni drugih istraživanja upućuju na moguću vrlo bitnu ulogu koju perineuronske mreže imaju tijekom razvoja i normalnog funkcioniranja ljudskog mozga.

Ključne riječi: fetalni razvoj mozga, perineuronske mreže, WFA

2. Summary

Darko Orešković

Perineuronal nets (PNN) are structures formed when cells secrete molecules of chondroitin sulphate proteoglycan, which condense and surround certain neurons and their axons. Today it is known that they perform a wide variety of functions in the normal development and diseased brain. In this research, PNN of the human fetal and children brain were visualized using a histochemical staining with *Wisteria floribunda agglutinin* which is a well-established marker of the perineuronal nets and the extracellular matrix rich in. The aim of the study was to determine the intensity of expression, as well as its spatio-temporal allocation in the human telencephalon during development, focusing primarily on the subplate zone but also on the cortical plate. The results show that the perineuronal nets do have a specific pattern of expression, as well as a spatio-temporal distribution in the subplate zone. In the 13th week of gestation, perineuronal nets are expressed in the pre-subplate zone as a perisomatic staining in the dorso-lateral telencephalic wall. After that, until the 25th week of gestation, they are expressed as a diffuse staining in the subplate zone, mostly around the prospective insula. Until the 33rd gestation week the perineuronal nets are very faintly seen in the subplate zone. After that period they are expressed as an intense staining in the remnants of subplate zone. These results, as well as many others, suggest an important role that the perineuronal nets have during development and normal functioning of the brain.

Key words: fetal brain development, perineuronal nets, WFA

3. Uvod

3.1. Perineuronske mreže i *Wisteria floribunda* aglutinin

Izvanstanična tvar (engl. *Extracellular matrix*, ECM) se općenito može definirati kao izvanstanični dio višestanične strukture koji ne samo da pruža neophodnu strukturu i biokemijsku potporu okolnim stanicama, nego također sudjeluje i u morfogenezi, diferencijaciji i homeostazi tkiva i organa (Frantz i sur. 2010), a malogdje se ECM pokazao tako neophodan i bitan za normalan razvoj i funkcioniranje kao u mozgu.

Jedna od struktura koje tvore ECM mozga su perineuronske mreže (engl. *perineuronal nets*, PNN), strukture građene od hondroitin-sulfat proteoglikana (engl. *Chondroitin sulphate proteoglycans*, CSPGs) koje okružuju tijela određenih neurona (najčešće GABAergični interneuroni (Härtig i sur. 1992, Härtig i sur. 1994) i piramidne stanice korteksa (Hausen i sur. 1996), kao i njihove dendrite i proksimalne dijelove aksona (Wang i Fawcett-2012, Brückner i sur. 2006). Iako se danas još točno sa sigurnošću ne zna koje stanice točno proizvode PNN, pretpostavlja se da su to većinom upravo ti neuroni oko kojih ih se nalazi, kao i neke glialne stanice. Iako su PNN bile opisane još krajem 19. stoljeća, bilo je potrebno gotovo sto godina da bi se počele ozbiljno proučavati i shvaćati njihov značaj u rastu, razvoju i funkciji mozga. Danas znamo da, između ostalog, PNN imaju ili mogu imati veliku ulogu u plastičnosti mozga (Wang i Fawcett 2012), odnosno formiranju i stabilizaciji sinapsi (Geissler i sur. 2013), navođenju neurona tijekom njihove migracije kao i navođenju njihovih aksona tijekom rasta (Carulli i sur. 2005), omogućavanju dugoročnog pamćenja (Tsien 2013), nastanku post-traumatskog stresnog poremećaja (Gogolla i sur. 2009), zaštiti interneurona od oksidativnog stresa i nastanku šizofrenije (Cabungcal i sur. 2013, Mauney i sur. 2013).

PNN se, dakle, sastoje od hondroitin-sulfat proteoglikana, molekule sa proteinskom jezgrom i pobočnim lancem hondroitin-sulfata (glikozaminoglikana sa vezanim sulfatom). Taj glikozaminoglikan se nadalje sastoji od ponavljajućeg niza disaharida koji su pak građeni od amino-šećera (N-acetil-glukozamin i N-acetil-galaktozamin). Upravo se na taj drugi amino-šećer, N-acetil-galaktozamin veže *Wisteria Floribunda Agglutinin* (WFA).

WFA je lektin (protein koji ima veliki afinitet prema šećerima), dobiven iz biljke *Wisteria floribunda*, koji se veže specifično za šećerni dio glikoproteina, što ga čini dobrim markerom za PNN, a time i ECM (Hilbig i sur. 2001). Do sada je WFA bio uglavnom korišten za istraživanje PNN na životinjskim modelima. Kod ljudi je uglavnom korišten za kategorizaciju kortikalnih područja i njihovih

dijelova (Hilbig i sur. 2001), kao i u istraživanjima promjena maturirane moždane kore u shizofreniji (Mauney i sur. 2013).

3.2. Sloj pod kortikalnom pločom

Sloj pod kortikalnom pločom (engl. *subplate zone*, SZ) je jedna od rijetkih novih struktura otkrivenih i opisanih u središnjem živčanom sustavu u drugoj polovici 20. stoljeća (Ayoub i Kostović 2009). Zanemarena od strane čitavog niza velikih neuroanatora tijekom desetljeća, *subplate* zona je prvi put opisana kao zaseban sloj između kortikalne ploče (engl. *cortical plate*, CP) i intermedijarne zone (IMZ) tek 1974. godine kod čovjeka (Kostović i Molliver 1974), a 1977. godine kod majmuna (Rakić 1977).

SZ se razvija iz *presubplate* (PSP) zone, koja nastaje oko 7./8. tjedna gestacije (TG) (Ayoub i Kostović 2009), te se od 13. Do 15. TG preoblikuje u SZ (Chervenak i Kurjak 1995, Kostović i Jovanov-Milošević 2008), kada se vidi kao sloj između IMZ i CP, sa relativno malo stanica, no bogat vlaknima (Kostović i Rakić 1990). Od tada se SZ ubrzano razvija i raste i vrlo brzo postaje najdeblji sloj ljudskog fetalnog korteksa, te je na početku zadnje trećine gestacijskog perioda (oko 27 tjedana) čak 4 do 5 puta šira od CP. Postupna involucija SZ počinje tijekom zadnje trećine gestacije degeneracijom nekih neurona, te prelaskom krajeva vlakana u CP (Kostović i Rakić 1990, Kostović i Jovanov-Milošević 2008), te ona većinom iščezne do kraja prvog post-natalnog mjeseca, a ponegdje (prefrontalni korteks) se mogu naći tragovi još do 6 mjeseci nakon rođenja (Chervenak i Kurjak 1995), dok poneki neuroni iz te zone ostaju sve do odrasle dobi (Kostović i sur. 1989, Kostović i Rakić 1980, Kostović i Jovanov-Milošević 2008).

SZ je, dakle, prolazna, filogenetski novija struktura koja je najrazvijenija kod ljudi (Kostović i Rakić 1990, Kostović i Jovanov-Milošević 2008) i nastaje urastanjem vlakana iz produžene moždine, talamusa, ipsi- te kontra-lateralne hemisfere u područje između CP i IMZ. Ona je mjesto gdje ta vlakna urastaju, akumuliraju se i maturiraju za daljnji rast i urastanje u kortikalnu ploču, pri tome stvarajući sinapse i neuronske krugove (Moore i sur. 2009, Kostović i sur. 2002) s drugim neuronima (Kostović i Rakić 1990, Kanold 2009), što su ključni procesi za kasniji razvoj moždane kore.

Danas znamo da osim kortikokortikalnih i talamokortikalnih vlakana, te neurona, značajan volumen SZ zauzima i ECM, što se vidi i slikovnim prikazom magnetskom rezonancom (engl. magnetic resonance imaging, MRI) (Kostović i sur. 2014, Kostović i Jovanov-Milošević 2008, Radoš i sur. 2006).

4. Hipoteza

Iz pokusa *in vitro* i na animalnim modelima, danas je poznato da PNN imaju, između ostalog, važnu ulogu u inhibiciji regeneracije neurona i navođenju aksona tijekom rasta (Carulli i sur. 2005, Man i sur. 2014), formiranju putova migracije aksona (Kawano i sur. 1999), zaštiti neurona od oksidativnog stresa (Cabungcal i sur. 2013, Mauney i sur. 2013)...

Predmnijevamo da se PNN oblikuju vrlo rano tijekom prenatalnog razvitka telencefalona čovjeka. Predmnijevamo također da se njihov izražaj mijenja vremenski, prostorno i kvalitativno sukladno morfogenetskim procesima u prolaznim telencefaličkim strukturama i zonama.

5. Ciljevi rada

5.1. Opći cilj

Pokazati najraniji izražaj i raspodjelu izražaja WFA pozitivnih PNN, prvenstveno u sloju pod pločom dorzo-lateralnog telencefaličkog zida fetalnog ljudskog mozga.

5.2. Specifični ciljevi

1. Utvrditi fetalni vremenski obrazac izražaja WFA pozitivnih PNN, odnosno kada počinje, kada dostiže maksimum, te prestaje li njihov izražaj.
2. Utvrditi prostornu raspodjelu WFA reaktivnih PNN, odnosno položaj u zoni ili sloju u kojem su izražene, prvenstveno u dorzo-lateralnom telencefalonu.
3. Ustanoviti može li se utvrđeni obrazac izražaja korelirati i interpretirati sa poznatim morfološkim i funkcionalnim razvojnim procesima kortikalnih putova čovjeka

6. Materijal i metode

6.1. Materijali

6.1.1. Moždano tkivo

Za ovaj rad korišteno je postmortalno tkivo fetalnih ljudskih mozgova, dobiveno nakon obaveznih obdukcija fetusa nakon spontanih ili medicinski potpomognutih pobačaja na Klinici za ženske bolesti i porode u Zagrebu. Korištenje uzoraka sukladno je odobrenju Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta u Zagrebu te pravnim propisima iz 1984. i 1996. Godine i Helsinškoj deklaraciji iz 2000. Starost fetusa procijenjena je na temelju dužine fetusa od glave do zatka te temeljem anamnestičkih i ginekoloških podataka o trudnoći.

6.1.2. Aglutinin za histokemijsko bojanje

Za ovaj rad korišten je biotinizirani lektin dobiven iz *Wisteria-e floribunda-e* (WFA-SIGMA L1516)

6.2. Metode

6.2.1. Priprema tkiva

Moždano tkivo je fiksirano imerzijom 4%-tne otopine paraformaldehida puferiranoj fosfatnim solima tijekom 48 sati. Nakon toga, blokovi tkiva su rezani kliznim mikrotomom na rezove debljine 20 μm u koronarnoj, horizontalnoj ili sagitalnoj ravnini. Rezovi su montirani na silanizirana predmetna stakalca. Rezovi mozga su (nakon postupka deparafinizacije) dalje bili podvrgnuti procesu histokemijskog bojenja. Susjedni rezovi su bojani Nissl-ovom metodom za prikaz citoarhitektonike fetalnog mozga.

6.2.2. Histokemijska metoda prikaza izražaja PNN pomoću *Wisteria floribunda agglutinin-a*

Rezovi su, nakon postupka deparafinizacije, ispirani u PBS-u tijekom 10 minuta. Zatim su kuhani u citratnom puferu (pH 6.0), nakon čega je uslijedilo hlađenje od 30 minuta, te tri ispiranja PBS-om po 10 minuta. Nakon toga su podvrgnuti predtretmanu metanolom, vodikovim peroksidom i

vodom (75mL MeOH + 25mL H₂O + 75μL 30%-tnog H₂O₂), nakon čega su ponovo ispirani 3 puta po 10 minuta PBS-om. Rezovi su zatim „blokirani“ 5%-tnim albuminom goveđeg seruma (TBS-BSA) tokom sat vremena, nakon čega su 40 sati na 4°C inkubirani biotilniliranim WFA (Sigma L-1516) u koncentraciji 6 μg/mL, nakon čega je uslijedilo ispiranje PBS-om (3 puta po 10 minuta). Nakon toga su inkubirani 1h u Avidin-u DH i biotilniliranom enzimu (Vectastain ABC kit, Vector labs. SAD). Zatim su opet 3 puta isprani po 10 minuta PBS-om, nakon čega su mjesta vezanja lektina prikazana diaminobenzidinom (DAB/H₂O₂, Sigmafast DAB D-0426). Rezovi su zatim prošli još 3 ispiranja po 10 minuta PBS-om, nakon čega su ispirani u nizu rastućih koncentracija alkohola i ksilola i prije pokrivanja pokrovnicom držani 2 puta po 10 minuta u Histoclear-u („Histological cleaning agent“, National diagnostics). Nakon toga je dodan Histomount (National diagnostics) i rezovi su pokriveni pokrovnicom.

6.2.3. Bojenje metodom po Nisslu

Za razaznavanje citoarhitektonskih granica zona, slojeva i staničnih odjeljaka telencefalona, susjedni rezovi onih bojanih histokemijski, obojeni su metodom po Nisslu (Cruz-Rizzolo i sur. 2011).

Nakon postupka deparafinizacije uzorci su tretirani, ovisno o preparatu, 3-4 minute 0.5%-tnom otopinom krezil-violeta razrijeđenoj u vodi u omjeru 1:4. Nakon toga su isprani destiliranom vodom, a nakon toga 70%-tnim etanolom. Zatim su isprani u kiselom alkoholu (70%-zni etanol kojemu se doda nekoliko kapi 10%-tne octene kiseline). Preparati su nakon toga isprani u 70%-tnom i 97%-tnom etanolu, te se pročišćeni u 100%-tnom etanolu i ksilolu. Nakon što su preparati posušeni, dodala se kapljica Histomount-a i prekriveni su pokrovnicom.

6.2.4. Svjetlosna mikroskopija

Kvalitativna analiza obojanih rezova učinjena je svjetlosnim mikroskopom Olympus Provis AX70, a fotografije su napravljene digitalnom kamerom Nikom DXM1200 u programu Nikon ACT-1.

Tablica 1. Podaci o uzorcima moždanog tkiva obuhvaćenih ovim radom

Razvojna dob (TG)	Spol	Uzrok smrti (klinički ili patoanatomski nalaz)
13	M	Abortus
16	Ž	Abortus
16 (+2)	Ž	Abortus
17	Ž	Abortus
18	nepoznat	Graviditas tubaria
20	nepoznat	Kardio-respiratorna insuficijencija
20	M	Mrtvorođenče
22	Ž	Nepoznat
22/23	Ž	Spontani abortus
27	M	nepoznat
28	M	nepoznat
33	nepoznat	Atresia laringis Intestinum breve Atresia ani
40	nepoznat	Abrupcija placente

7. Rezultati

U najranijem ispitivanom razdoblju u dorzolateralnom zidu čeonog režnja (prospektivni post-centralni girus), WFA reaktivnost se vidi u *pre-subplate*(PSP) zoni, i to poglavito u površinskom dijelu, na samoj granici s CP. Tamo se nalaze pojedine stanice zrelije morfologije (slične *subplate* neuronima) koje pokazuju izraženo perisomatsko bojanje. Također, kao i na većini kasnijih preparata, može se vidjeti da se osim takvog bojanja stanica, boje stijenki krvnih žila (perivaskularno). Slika 1

Od 16. TG, pa sve do 25. može se vidjeti difuzna WFA specifična obojenost SZ. Iako se može, više ili manje, vidjeti kroz čitavu SZ, pogotovo kod starijih mozgova, najjače vezanje za WFA se vidi na području prospektivne inzule i okolnih regija (superiorni temporalni i inferiorni frontalni režanj, Slika 2 i Slika 3). Također, ono je sve jače izraženo idući prema površnim podslojevima SZ. Osim difuzno obojane SZ može se vidjeti i perisomatska obojanost, tj PNN u kortikalnoj ploči, kao i difuzna obojanost marginalne zone iznad toga. Isto tako, u svim preparatima u ovom razdoblju vidi se obojanost subikuluma, odnosno kortikalne ploče prospektivnog entorinalnog korteksa. Slika 2

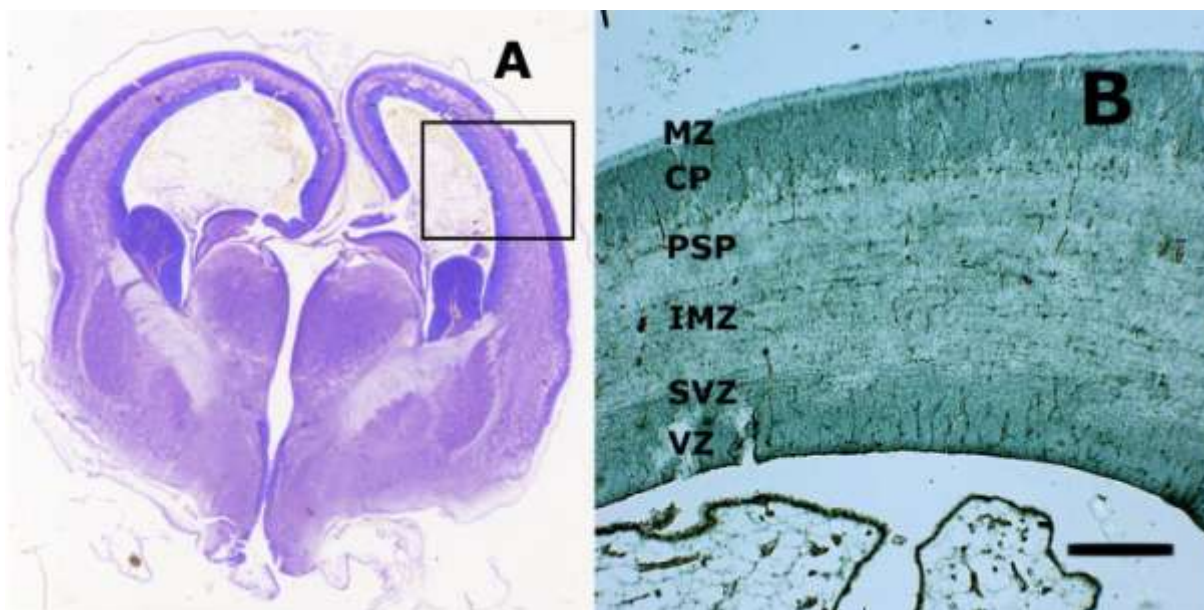
Sa 27. TG izražaj se mijenja. Više se ne primjećuje jaka difuzna obojanost kao ranije, već se vidi da se sada nalazi većinom kao perisomatsko bojenje oko stanica u CP. PNN su jasno izražene na granici duboke i srednje trećine CP (prospektivni 5. i 6. sloj), gdje se vide kao perisomatsko bojenje oko zrelih stanica. Izražaj se očitava uzduž gotovo cijele kortikalne ploče, ali najviše u dorzalnom dijelu, prospektivnom pre-centralnom girusu. Gustoća i intenzitet izražaja je ovdje puno snažniji nego u SZ, gdje se nalazi vrlo blijedo i to najviše u lateralnom zidu. Također, reaktivnost nije više izražena u subikulumu kao ranije. Slika 3

Dok je sa 27 TG mjesto najjačeg izražaja bila dorzolateralna CP, sa 28 TG se izražaj mijenja. Vidljiva je slaba reaktivnost duž cijele CP (sloj 5), također kao pericelularno bojenje. Reaktivnost je jače izražena u kortikalnoj ploči prospektivnog pre-centralnog girusa, i u inferiornom frontalnom girusu na granici s inzulom, kao i u kortikalnoj ploči same inzule. Također, PNN se prikazuju u kortikalnoj ploči medijalnog dijela temporalnog režnja. U SZ je difuzna obojenost, kao i sa 27 TG, vrlo blijeda. Slika 4

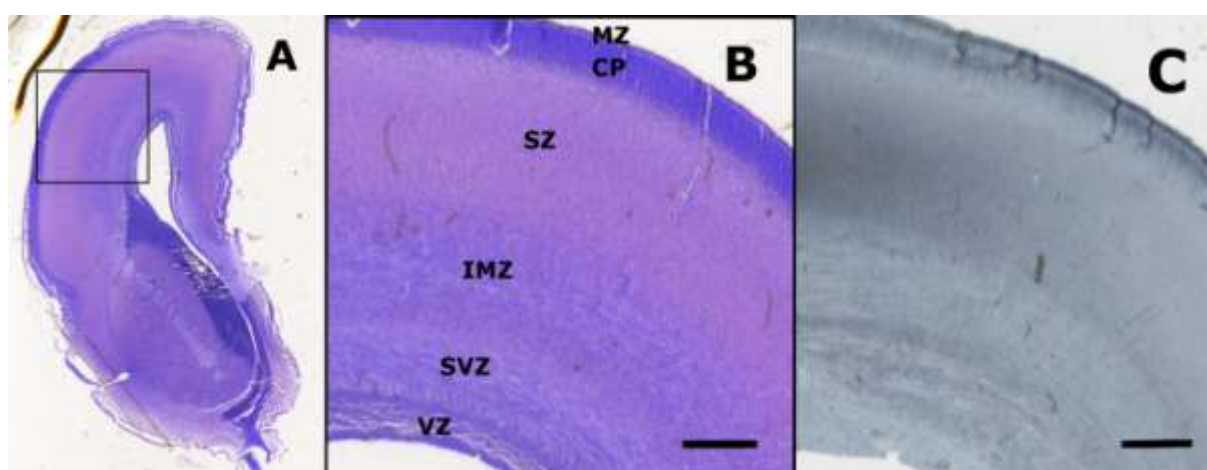
U slijedećem ispitivanom razdoblju, 33 TG (Slika 5), WFA reaktivnost jasno pokazuje fronto-okcipitalni gradijent izražaja, kao i specifični izražaj u pojedinim sub-slojevima kortikalne ploče. Frontalni presjeci imaju sličan izražaj kao u prethodnom razdoblju tj. najviše izraženu oko lateralne fisure, dakle donji dio inferiornog frontalnog girusa i gornji dio inzule. Također, iako manje, reaktivnost se vidi i na granici cingularnog i pre-centralnog girusa, kao i u parahipokampalnom girusu. Posteriojniji presjeci imaju također najjaču izraženost WFA specifične reaktivnosti oko lateralne

fisure, i sve jaču izraženost u dorzo-lateralnom dijelu. Uz to, WFA specifičnu reaktivnost vidimo i u parahipokampalnom girusu. Što se tiče raspodjele po slojevima, najpovršnija, marginalna zona je pozitivna, iako blago. I dok budući supragranularni slojevi CP ne prikazuju reaktivnost, dublji infragranularni slojevi prikazuju i difuzno i perisomatsko WFA specifično obojenje tipično za PNN. Ostatak SZ (engl. *remnants of subplate*, RS) prikazuje difuzno obojenje, dok dublji slojevi ne izražavaju WFA specifičnu reaktivnost. Slika 5

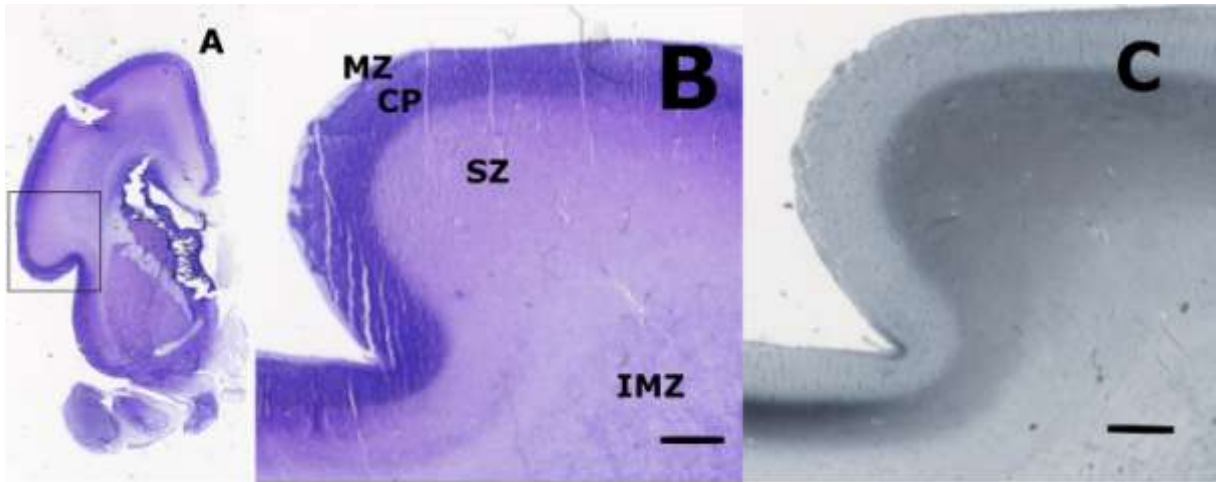
Sa 40 TG (Slika 6), CP također pokazuje WFA imunoreaktivnost. I dok su drugi i treći sloj najjače, difuzno obojani, četvrti sloj ne izražava reaktivnost. U petom i šestom pak sloju nalazimo perisomatsko obojenje tipično za PNN, dok u RS nalazimo difuzno WFA obojenje. Isto tako, u IMZ se ponegdje nalaze WFA reaktivne PNN. Za razliku od prošlog razdoblja gdje se izražaj reaktivnosti pojačavao u dorzo-lateralnom dijelu na posteriornijim presjecima, ovdje je obrnuto. U najrostralnijem presjeku kroz frontalni režanj se duž cijele kore može vidjeti reaktivnost, dok posteriorno ostaje samo oko lateralne fisure (inferiorni frontalni girus, inzula i superiorni temporalni girus), te u parahipokampusu, dok u dorzolateralnom dijelu nema reaktivnosti. Slika 6



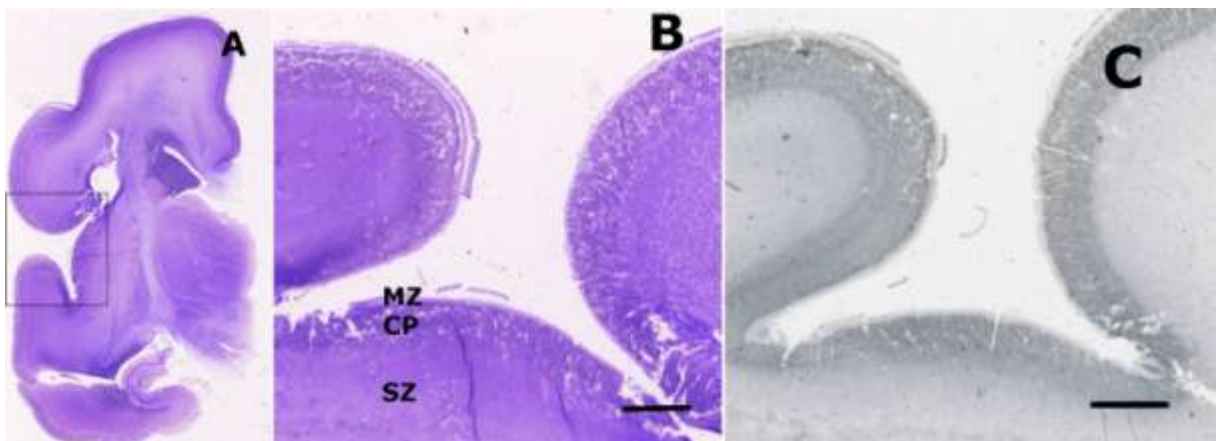
Slika 1. Frontalni presjek kroz fetalni telencefal gestacijske dobi 13 tjedana, obojan metodom po Nisslu (A) i lektinom WFA (B). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se perisomatska obojanost stanica koje imaju morfologiju neurona u PSP (B). MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; PSP- *presubplate*; IMZ- intermedijarna zona; SVZ- subventrikularna zona; VZ- ventrikularna zona. (mjerna skala: 0.2mm)



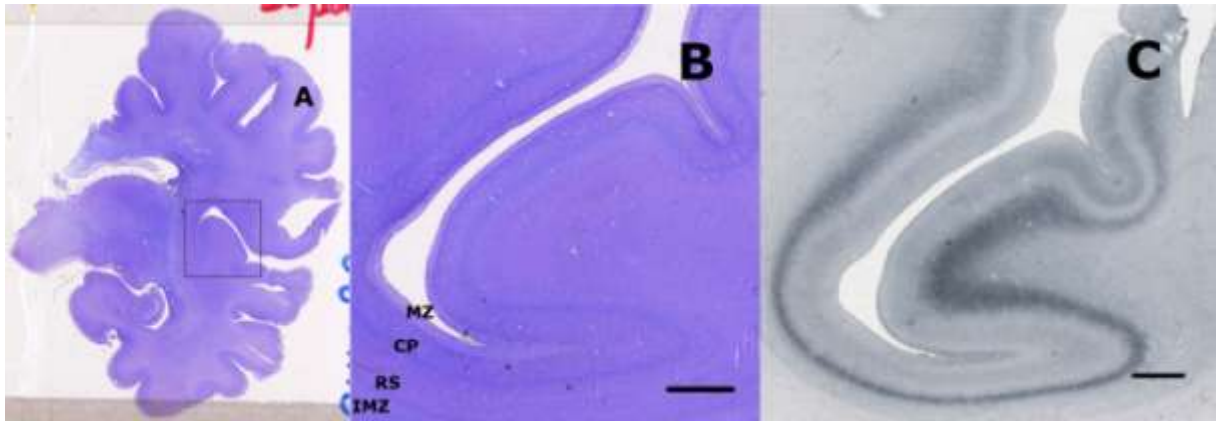
Slika 2. Frontalni presjek kroz fetalni telencefal gestacijske dobi 16 tjedana, obojan metodom po Nisslu (A,B) i lektinom WFA (C). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se difuzna obojanost SZ u lateralnom zidu telencefalona (C). MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; SZ- *subplate*; IMZ- intermedijarna zona; SVZ- subventrikularna zona; VZ- ventrikularna zona. (mjerna skala: 0.8mm)



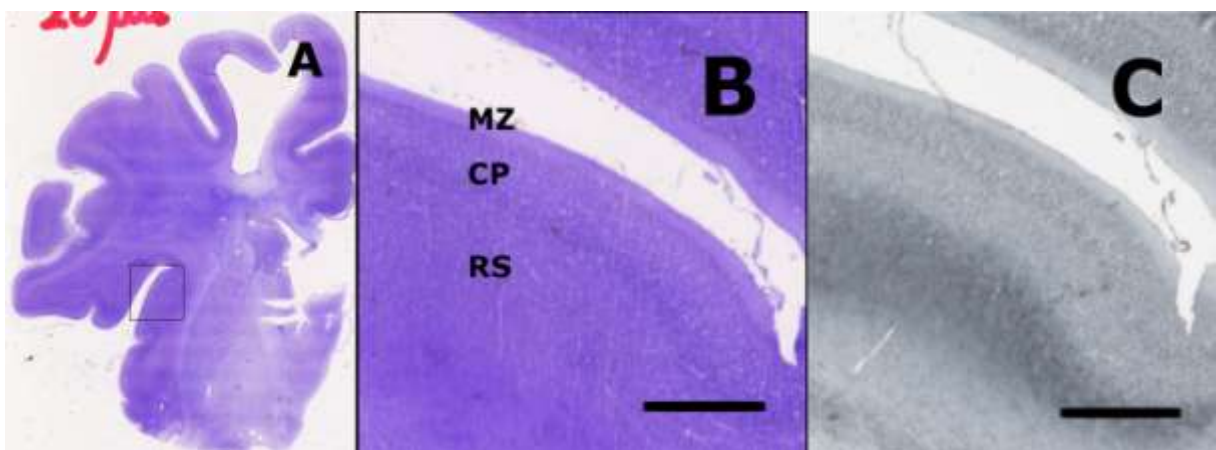
Slika 3. Frontalni presjek kroz fetalni telencefalon gestacijske dobi 22 tjedna, obojan metodom po Nisslu (A,B) i lektinom WFA (C). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se difuzna obojanost SZ ispod CP- u lateralnom zidu telencefalona (C). MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; SZ- *subplate*; IMZ- intermedijarna zona. (mjerna skala: 1.5mm)



Slika 4. Frontalni presjek kroz fetalni telencefalon gestacijske dobi 27 tjedana, obojan metodom po Nisslu (A,B) i lektinom WFA (C). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se perisomska obojanost stanica koje imaju morfologiju neurona u prospektivnom 5. i 6. sloju CP, kao i blijeda difuzna obojanost u SZ (C). MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; SZ- *subplate* zona. (mjerna skala: 1.5mm)



Slika 5. Frontalni presjek kroz fetalni telencefalon gestacijske dobi 33 tjedna, obojan metodom po Nisslu (A,B) i lektinom WFA (C). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se kako površni dijelovi RS prikazuju jako, difuzno obojenje, dok dublji slojevi ne izražavaju reaktivnost (C). MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; RSZ- *remnants of subplate zone*; IMZ- intermedijarna zona. (mjerna skala: 1.2mm)



Slika 6. Frontalni presjek kroz fetalni telencefalon gestacijske dobi 40 tjedana, obojan metodom po Nisslu (A,B) i lektinom WFA (C). Kvadrat pokazuje područje iz kojega su uzete mikrofotografije (A). Vidi se difuzno obojenje u RS. MZ- marginalna zona; CP- kortikalna ploča; RSZ- *remnants of subplate zone*; IMZ- intermedijarna zona. (mjerna skala: 2mm)

8. Rasprava

Ovo istraživanje opisuje izražaj WFA reaktivnih perineuronskih mreža prvenstveno u *subplate* zoni, a zatim i kortikalnoj ploči dorzolateralnog zida fetalnog ljudskog telencefalona. Prethodna istraživanja PNN označenih sa WFA se uglavnom odnose na distribuciju PNN u životinjskom mozgu (Hilbig i sur. 2007), kao i na istraživanja izražaja PNN u pojedinim strukturama (naprimjer amigdala, Pantazopoulos i sur. 2008) maturiranog mozga. Sustavnog pregleda izražaja WFA reaktivnih PNN u fetalnom ljudskom telencefalonu tijekom razvitka zasada, još uvijek nema.

Kao što je prije rečeno, iz prijašnjih istraživanja je poznato da PNN imaju ili mogu imati veliko značenje u brojnim razvojnim (Carulli i sur. 2005) i funkcionalnim (Geissler i sur. 2013) procesima u mozgu, kao i nastanku nekih bolesti središnjeg živčanog sustava (Brückner i sur. 1999, Gogolla i sur. 1999). Jedna od najzanimljivijih i najistraživanijih funkcija PNN je svakako njihova uloga u kontroli rasta te kretanja neurona i njihovih aksona (Man i sur. 2014), te u sinaptičkoj plastičnosti (Corveti i Rossi 2005).

Najčešći postupak kojim se istražuje uloga CSPG-a je njihova razgradnja pomoću enzima hondroitinaze (Crespo i sur. 2007, Corveti i Rossi 2005). Tako je već dugo poznato da upravo molekula koja tvori PNN, CSPG ima ključnu ulogu u regulaciji ponovnog rasta aksona, prije svega negativno djelujući na rast neurita, koji ga izbjegava u svom rastu, odnosno neuroni oko kojih je razgrađen CSPG počinju rasti i ne prikazuju inhibiciju kao oni koji su okruženi njime (Man i sur. 2014). Osim toga, on negativno djeluje i na diferencijaciju oligodendrocita (Siebert i sur. 2011). No istraživanja pokazuju da to ni približno nije sve. CSPG su samo jedan dio vrlo kompleksnog sustava razvoja živčanog sustava. I dok oni djeluju inhibicijski na rast neurona, mnoge druge molekule djeluju pozitivno, potičući rast (laminini, fibronektin). No te molekule djeluju na rast neurona različito, ovisno o tome djeluju li u isto vrijeme sa CSPG-om ili ne (Hynds i sur. 2001). Isto tako, inhibitorni učinak CSPG-a je vrlo različit ovisno o brojnim čimbenicima poput njegove koncentracije, sulfatacije, molekulama za koje je vezan i, što je možda najznačajnije za ovaj rad, tome jeli vezan za stanice ili je otopljen (Snow i sur. 1996).

Pokazano je tako da CSPG, dok je vezan za molekule ECM-a ili staničnu površinu ima uglavnom negativni učinak na rast neurita (Man i sur. 2014). No otopljeni CSPG ima vrlo različite, još nedovoljno istražene učinke koji ovise o brojnim čimbenicima među kojima je prisustvo laminina i fibronektina među najvažnijima (Hynds i sur. 2001). WFA aglutinin se veže na šećernu komponentu N-acetil galaktozamin proteoglikana, te na preparatima oslikava PNN kao perisomatsko obojenje, odnosno šećernu komponentu CSPG i drugih proteoglikana, ili kao difuzno obojenje bez vidljivih stanica oko kojih bi se nalazile PNN. Moguće objašnjenje je da difuzno obojenje predstavlja otopljeni

CSPG, dok perisomatsko predstavlja onaj vezan za površinu stanice (Snow i sur. 1996). Znajući da je SZ mjesto gdje vlakna iz brojnih dijelova mozga urastaju i akumuliraju se, te čekaju trenutak za daljnji rast u ploču, može se pretpostaviti da je upravo u tom području potrebna izrazita kontrola rasta i razvoja, kao i stabilizacija sinapsi i neuronskih krugova koje se tamo privremeno stvaraju (Kostović i Rakić 1990). Može se uočiti kako su u svakom ispitivanom razdoblju PNN bile izražene u nekom dijelu SZ i/ili CP. Vidi se kako su u najranijim ispitivanim razdobljima PNN izražene kao perisomatsko obojenje oko velikih stanica samo u PSZ. U tjednima nakon toga SZ ne pokazuje perisomatsku, već difuznu obojanost. U 20. TG prvi je put vidljiv PNN izražaj i u CP. I to najviše u dubljim, infragranularnim slojevima. U kasnijim razdobljima nalazimo najčešće vrlo sličnu raspodjelu WFA reaktivnosti, dakle perisomatsko obojenje u CP, i difuzno u SZ. Kao što je spomenuto ranije, otopljeni CSPG može djelovati na razne načine (Snow i sur. 1996), dok onaj vezan za stanice djeluje inhibitorски na rast (Man i sur. 2014). Zbog toga možemo zaključiti da PNN koje vidimo kao perisomatsko obojenje tada vjerojatno predstavljaju granicu do koje neka vlakna koja urastaju smiju doći. To se ugrubo poklapa sa prijašnjim saznanjima koja kažu da je sloj 4 CP najpovršniji sloj u koja vlakna iz SZ urastaju (Kanold 2009). Nadalje, treba spomenuti i nalaz nakon 40. TG, gdje se izražaj perisomatski obojenih mreža pomaknuo u površnije slojeve CP. To se također može povezati sa prijašnjim rezultatima jer u tom periodu postoji samo ostatak SZ, odnosno područja gdje vlakna moraju čekati prije urastanja u ploču. Urastanje tih vlakana u CP znači i nestanak SZ. Dakle, općenito se može vidjeti pomak perisomatskog obojenja iz SZ u ranom periodu do dubokih dijelova kortikalne ploče u srednjem, te prema površnijim dijelovima CP pri kraju trudnoće i nakon rođenja.

Osim perisomatske, rezultati pokazuju i difuznu WFA obojanost koja označava šećernu komponentu solubilnih proteoglikana. Ta obojanost postaje uglavnom vidljiva u 16. TG i ostaje jako vidljiva i u post-natalnom periodu. Difuzno su obojana razna područja, kako u CP (gdje ponegdje ista područja prikazuju i perisomatsko i difuzno obojenje), tako i u SZ i RSZ (perisomatsko obojenje je bilo prisutno samo u PSZ, dok je u kasnijim periodima vidljivo difuzno obojenje). Ovakav ekspresijski obrazac pokazuje da su te WFA reaktivne molekule vjerojatno vrlo bitne za specifikaciju pojedinih stanica, staničnih nastavaka, zona i sublamina, kao i za kontrolu rasta i razvoja mozga, te da je njihovo djelovanje još uvijek nedovoljno istraženo.

Slijedeća važna funkcija koju PNN imaju je stabilizacija sinapsi (Brückner i sur. 1999). Naime, pokazano je da ako se razgradi CSPG, neki neuroni i njihovi aksoni počinju bujati i rasti, no ne mogu stvarati stabilne sinapse (Corvetti i Rossi 2005), odnosno neuroni ne dođu do tzv. kritičnog perioda kada se njihove sinapse stabiliziraju, već se plastičnost reaktivira (Brückner i sur. 1999, Pizzorusso i sur. 2002, Berandi i sur. 2004, Geissler i sur. 2013). A budući da je već dugo poznato da je SZ među prvim mjestima gdje se stvaraju sinapse i prvi neuronski krugovi (Kostović i Rakić 1990,

Kostović i sur. 2002, Kanold 2009, Moore i sur. 2009), možemo zaključiti da je tamo, kao i u CP, osim kontrole rasta i razvoja neurona i aksona, potrebna vrlo precizna kontrola i stabilizacija sinapsi. Stoga ne čudi nalaz PNN, koje imaju dokazani takav učinak, u SZ i CP. Znajući funkcije dijelova mozga u kojim se vidi izražaj PNN, možemo pretpostaviti da je regulacija rasta i razvoja, kao i stabilizacija sinapsi pomoću PNN vjerojatno vrlo bitna u normalnom razvoju i funkcioniranju brojnih funkcija mozga od svijesti, percepcije, emocija, homeostaze tijela (izraženost u inzuli), preko viših funkcija poput jezika, računanja, rješavanja problema i donošenja odluka (izraženost u dorzolateralnom korteksu prefrontalnog režnja), pa sve do pamćenja (izraženost u parahipokampusu odnosno entorinalnom korteksu).

Novija istraživanja pokazuju da PNN također vjerojatno imaju veliku ulogu u brojnim drugim procesima, pa tako i u bolestima. Kod osoba oboljelih od šizofrenije se, naprimjer, pokazalo da imaju puno manje izražene PNN u moždanoj kori pre-frontalnog korteksa (Mauney i sur. 2013). Isto tako se pokazalo da PNN na neki način štite neurone od oksidativnog stresa kojem su izloženi (Cabungcal i sur. 2013). Stanice sa izraženim PNN su također bile otpornije na oštećenja izazvana Alzheimerovom bolešću, odnosno stanice bez PNN se povezuju sa pojačanim rizikom za oštećenje u demenciji (Brückner i sur 1999, Adams i sur. 2001, Härtig i sur. 2001). Abnormalna funkcija PNN se, osim toga, povezuje i sa brojnim drugim bolestima poput PTSP-a (Gogolla i sur. 2009), pa čak i malignih bolesti (Chekenya i sur. 1999, Schrappe i sur. 1991). Navedena i brojna druga istraživanja ukazuju na izrazitu, još nedovoljno istraženu važnost PNN u normalnom funkcioniranju živčanog sustava, kao i u patofiziologiji mnogih bolesti, te upućuju na važnost budućih istraživanja PNN, posebice u fetalnom mozgu.

9. Zaključak

Analizom izražaja WFA pozitivnih PNN metodom histokemije u ljudskom telencefalonu tijekom njegova razvoja, utvrđen je da se izražaj mijenja prostorno, vremenski i intenzitetom tijekom razvoja mozga. U tada još PSZ perisomatsko obojenje vidimo već sa 13 TG, i to najviše u dorzolateralnom dijelu telencefaličkog zida. Nakon toga, do 25. TG SZ je obojana difuzno, najviše u području oko inzule i to u površnijim dijelovima. Do 33. TG izražaj je pak puno slabije vidljiv u SZ nego u CP, a nakon toga počinje biti izrazito vidljiv kao difuzno obojenje u površnom dijelu RSZ i to najviše u dorzolateralnom dijelu, parahipokampusu te oko lateralne fisure. U 40. TG RSZ prikazuje difuzno obojenje. Također, utvrđeno je da se izražaj PNN prikazuje i u CP i to prvo malo u 20. TG u dorzalnom dijelu zida, u prospektivnom četvrtom sloju kao perisomatsko obojenje. Sa 27/28 TG slično perisomatsko obojenje se može vidjeti duž cijele kore, no najviše oko lateralne fisure. Nakon 33. TG PNN se nalaze u CP. Nakon 40. TG perisomatsko WFA pozitivno bojenje se pomiče u površnije slojeve CP, dok je difuzno izraženo diljem CP i dubljih slojeva.

S obzirom na prisutnost brojnih vlakana u tim područjima (talamokortikalnih, kalozalnih i sl.) zaključili smo da WFA reaktivna šećerna komponenta proteoglikana i PNN imaju ključnu ulogu u modulaciji rasta vlakana, u usmjeravanju i oblikovanju aksona i stabilizaciji sinapsi, a time sudjeluju kao važan čimbenik u oblikovanju i funkciji ljudskog mozga.

10. Zahvale

Hvala prof. Jovanov na strpljenju i razumijevanju, kao i gđi. Danici, Ani, Ljiljani, Iris i Nikolini na savjetima i pomoći.

Literatura

1. Adams I, Brauer K, Arélin C, Härtig W, Fine A, Mäder M, Arendt T, Brückner G. Perineuronal nets in the rhesus monkey and human basal forebrain including basal ganglia. *Neuroscience*. 2001;108(2):285-98.
2. Ayoub AE, Kostovic I. New horizons for the subplate zone and its pioneering neurons. *Cereb Cortex*. 2009 Aug;19(8):1705-7
3. Berardi N, Pizzorusso T, Maffei L. Extracellular matrix and visual cortical plasticity: freeing the synapse. *Neuron*. 2004;44(6):905-8.
4. Brückner G, Hausen D, Härtig W, Drlicek M, Arendt T, Brauer K. Cortical areas abundant in extracellular matrix chondroitin sulphate proteoglycans are less affected by cytoskeletal changes in Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 1999;92(3):791-805.
5. Brückner G, Szeöke S, Pavlica S, Grosche J, Kacza J. Axon initial segment ensheathed by extracellular matrix in perineuronal nets. *Neuroscience*. 2006;138(2):365-75
6. Cabungcal JH, Steullet P, Morishita H, Kraftsik R, Cuenod M, Hensch TK, Do KQ. Perineuronal nets protect fast-spiking interneurons against oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(22):9130-5
7. Carulli D, Laabs T, Geller HM, Fawcett JW. Chondroitin sulfate proteoglycans in neural development and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*. 2005;15(1):116-20.
8. Chekenya M, Rooprai HK, Davies D, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: role in malignant progression of human brain tumours. *Int J Dev Neurosci*. 1999;17(5-6):421-35.
9. Chervenak F.A., Kurjak A. *Ultrasound and the fetal brain*; CRC Press, 1995
10. Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ. Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*. 2007 Sep;28(5):931-7.
11. Corvetti L, Rossi F. Degradation of chondroitin sulfate proteoglycans induces sprouting of intact purkinje axons in the cerebellum of the adult rat. *J Neurosci*. 2005;25(31):7150-8.
12. Crespo D, Asher RA, Lin R, Rhodes KE, Fawcett JW. How does chondroitinase promote functional recovery in the damaged CNS? *Exp Neurol*. 2007;206(2):159-71
13. Cruz-Rizzolo RJ, De Lima MA, Ervolino E, de Oliveira JA, Casatti CA. Cyto-, myelo- and chemoarchitecture of the prefrontal cortex of the Cebus monkey. *BMC Neurosci*. 2011;12:6.
14. Dityatev A, Schachner M, Sonderegger P. The dual role of the extracellular matrix in synaptic plasticity and homeostasis. *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(11):735-46.
15. Frantz C, Stewart K, Weaver V. The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci* 2010;123:4195-4200
16. Geissler M, Gottschling C, Aguado A, Rauch U, Wetzel CH, Hatt H, Faissner A. Primary hippocampal neurons, which lack four crucial extracellular matrix molecules, display abnormalities of synaptic structure and function and severe deficits in perineuronal net formation. *J Neurosci*. 2013;33(18):7742-55
17. Gogolla N, Caroni P, Lüthi A, Herry C. Perineuronal Nets Protect Fear Memories from Erasure. *Science* 2009; 325(5945), 1258-1261

18. Härtig W, Brauer K, Brückner G. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*. 1992;3(10):869-72.
19. Härtig W, Klein C, Brauer K, Schüppel KF, Arendt T, Bigl V, Brückner G. Hyperphosphorylated protein tau is restricted to neurons devoid of perineuronal nets in the cortex of aged bison. *Neurobiol Aging*. 2001;22(1):25-33.
20. Hausen D, Brückner G, Drlicek M, Härtig W, Brauer K, Bigl V. Pyramidal cells ensheathed by perineuronal nets in human motor and somatosensory cortex. *Neuroreport*. 1996;7(11):1725-9.
21. Hilbig H, Bidmon HJ, Blohm U, Zilles K. Wisteria floribunda agglutinin labeling patterns in the human cortex: a tool for revealing areal borders and subdivisions in parallel with immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*. 2001;203(1):45-52.
22. Hilbig H, Nowack S, Boeckler K, Bidmon HJ, Zilles K. Characterization of neuronal subsets surrounded by perineuronal nets in the rhesus auditory brainstem. *J Anat*. 2007;210(5):507-17.
23. Hynds DL, Snow DM. Fibronectin and laminin elicit differential behaviors from SH-SY5Y growth cones contacting inhibitory chondroitin sulfate proteoglycans. *J Neurosci Res*. 2001;66(4):630-42.
24. Kawano H, Fukuda T, Takeuchi K, Kawamura K. Molecular mechanisms of the pathway formation in the fetal rat cerebral neocortex. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 1999;19(2):79-84.
25. Kanold PO. Subplate neurons: crucial regulators of cortical development and plasticity. *Front Neuroanat*. 2009 Aug;3:16
26. Kawano H, Fukuda T, Takeuchi K, Kawamura K. Molecular mechanisms of the pathway formation in the fetal rat cerebral neocortex. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. 1999;19(2):79-84.
27. Kostović I, Lukinović N, Judas M, Bogdanović N, Mrzljak L, Zecević N, Kubat M. Structural basis of the developmental plasticity in the human cerebral cortex: the role of the transient subplate zone. *Metab Brain Dis*. 1989;4(1):17-23.
28. Kostović I, Jovanov-Milosević N. Subplate zone of the human brain: historical perspective and new concepts. *Coll Antropol*. 2008;32 Suppl 1:3-8.
29. Kostović I, Jovanov-Milošević N, Radoš M, Sedmak G, Benjak V, Kostović-Srzentić M, Vasung L, Čuljat M, Radoš M, Hüppi P, Judaš M. Perinatal and early postnatal reorganization of the subplate and related cellular compartments in the human cerebral wall as revealed by histological and MRI approaches. *Brain Struct Funct*. 2014;219(1):231-53.
30. Kostović I, Judas M, Rados M, Hrabac P. Laminar organization of the human fetal cerebrum revealed by histochemical markers and magnetic resonance imaging. *Cereb Cortex*. 2002;12(5):536-44.
31. Kostovic I, Molliver ME, A new interpretation of the laminar development of the cerebral cortex: synaptogenesis in different layers of neopallium in the human fetus. *American association of anatomists. Eighty seventh annual session. Anat Rec* 1974;178:395

32. Kostovic I, Rakic P. Cytology and time of origin of interstitial neurons in the white matter in infant and adult human and monkey telencephalon. *J Neurocytol.* 1980;9(2):219-42.
33. Kostovic I, Rakic P. Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol.* 1990;297(3):441-70.
34. Man AJ, Leach JK, Bannerman P. Redirection of neurite outgrowth by coupling chondroitin sulfate proteoglycans to polymer membranes. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(6):1271-81
35. Mauney SA, Athanas KM, Pantazopoulos H, Shaskan N, Passeri E, Berretta S, Woo TU. Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2013;74(6):427-35
36. Moore AR, Filipovic R, Mo Z, Rasband MN, Zecevic N, Antic SD. Electrical excitability of early neurons in the human cerebral cortex during the second trimester of gestation. *Cereb Cortex.* 2009;19(8):1795-805
37. Pantazopoulos H, Murray E, Berretta S. Total number, distribution, and phenotype of cells expressing chondroitin sulphate proteoglycans in the normal human amygdala. *Brain Res.* 2008; 1207: 84–95.
38. Perkins L, Hughes E, Srinivasan L, Allsop J, Glover A, Kumar S, Fisk N, Rutherford M. Exploring cortical subplate evolution using magnetic resonance imaging of the fetal brain. *Dev Neurosci.* 2008;30(1-3):211-20.
39. Pizzorusso T, Medini P, Berardi N, Chierzi S, Fawcett JW, Maffei L. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science.* 2002;298(5596):1248-51.
40. Rados M, Judas M, Kostović I. In vitro MRI of brain development. *Eur J Radiol.* 2006;57(2):187-98
41. Rakic P. Prenatal development of the visual system in rhesus monkey. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1977;278(961):245-60.
42. Schrappe M, Klier FG, Spiro RC, Waltz TA, Reisfeld RA, Gladson CL. Correlation of chondroitin sulfate proteoglycan expression on proliferating brain capillary endothelial cells with the malignant phenotype of astroglial cells. *Cancer Res.* 1991;51(18):4986-93.
43. Siebert JR, Osterhout DJ. The inhibitory effects of chondroitin sulfate proteoglycans on oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2011;119(1):176-88.
44. Snow DM, Brown EM, Letourneau PC. Growth cone behavior in the presence of soluble chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), compared to behavior on CSPG bound to laminin or fibronectin. *Int J Dev Neurosci.* 1996;14(3):331-49.
45. Tsien RY. Very long-term memories may be stored in the pattern of holes in the perineuronal net. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(30):12456-61.
46. Wang D, Fawcett J. The perineuronal net and the control of CNS plasticity. *Cell Tissue Res.* 2012;349(1):147-60
47. Zecevic N. Cellular composition of the telencephalic wall in human embryos. *Early Hum Dev.* 1993;32(2-3):131-49.

