Molekularna obilježja interneurona supragranularnih slojeva u frontalnoj kori mozga čovjeka

Banovac, Ivan

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:609164

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivan Banovac

Molekularna obilježja interneurona supragranularnih slojeva u frontalnoj kori mozga čovjeka

DISERTACIJA

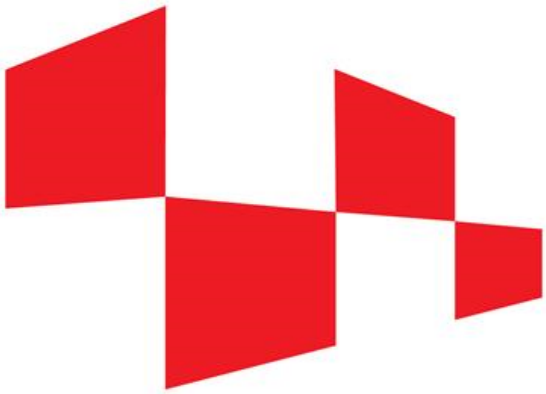
Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena u Zavodu za anatomiju i Hrvatskom institutu za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelji rada: dr. sc. Dora Sedmak, znanstveni suradnik
prof. dr. sc. Zdravko Petanjek

Zahvaljujem svojim mentorima, Dori Sedmak i Zdravku Petanjeku na velikoj podršci tijekom izrade doktorske disertacije.

Ovo istraživanje financirano je sredstvima Hrvatske zaklade za znanost, projekt „Moždana izvanstanična tvar u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“, šifra projekta: HRZZ-IP-2019-04-3182, voditelj: prof. dr. sc. Nataša Jovanov-Milošević te sredstvima Znanstvenog centra izvrsnosti za temeljnu, kliničku i translacijsku neuroznanost, projekt: „Eksperimentalna i klinička istraživanja hipoksijsko-ishemijskog oštećenja mozga u perinatalnoj i odrasloj dobi, KK.01.1.1.01.0007“, voditelj: prof. dr. sc. Miloš Judaš.



SADRŽAJ

1. UVOD 1

1.1. Prefrontalna moždana kora 1
1.1.1. Podjela prefrontalne moždane kore 1
1.1.2. Anatomska obilježja prefrontalne moždane kore 2
1.1.3. Osnovna citoarhitektonska i funkcionalna obilježja prefrontalne moždane kore 2

1.2. Živčane stanice u kori velikog mozga 6
1.2.1. Podjele kortikalnih interneurona 7
1.2.1.1. Morfološka podjela kortikalnih interneurona 7
1.2.1.2. Podjela kortikalnih interneurona prema molekularnim svojstvima 10
1.2.2. Uloga kortikalnih interneurona u regulaciji rada kortikalne neuralne mreže i lokalnih neuronskih krugova 13

2. HIPOTEZA 16

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 17

3.1. Opći cilj 17
3.2. Specifični ciljevi 17

4. MATERIJALI I METODE 18

4.1. Uzorak 18
4.1.1. Priprema tkiva 18
4.1.2. Određivanje citoarhitektonskih regija od interesa 20

4.2. Molekularne metode 22
4.2.1. Imunohistokemija 22
4.2.2. RNA in situ hibridizacija 25

4.3. Obrada i analiza histoloških preparata 27
4.3.1. Snimanje histoloških preparata 27
4.3.2. Kvalitativna analiza histoloških rezova 29
4.3.3. Kvantitativna analiza histoloških rezova 30
4.3.3.1. Ocrtavanje područja za kvantifikaciju 30
4.3.3.2. Kvantifikacija neurona obilježenih molekularnim biljezima 30
4.3.3.3. Morfometrijska analiza kortikalnih interneurona 34

4.4. Statistička analiza 35
4.4.1. Analiza raspodjele podataka i deskriptivna statistika 35
4.4.2. Analiza kompozitnih podataka 35
4.4.3. Statistički testovi 37

5. REZULTATI 38

5.1. Citoarhitektonska građa Brodmannovih polja 9 i 14r u čovjeka 38

5.2. Raspodjela pojedinih populacija kortikalnih interneurona po slojevima 44
5.2.1. Raspodjela kalretininskih neurona po slojevima 44
5.2.2. Raspodjela parvalbuminskih neurona po slojevima 50
5.2.3. Raspodjela kalbindinskih neurona po slojevima 55

5.2.4. Raspodjela somatostatinskih neurona po slojevima ... 58
5.2.5. Posebnosti ustroja kortikalnih interneurona u pojedinim slojevima prefrontalne moždane kore ... 63

5.3. Morfološka obilježja pojedinih populacija kortikalnih interneurona ... 71
5.3.1. Morfološka obilježja kalretininskih neurona ... 71
5.3.2. Morfološka obilježja parvalbuminskih neurona ... 73
5.3.3. Morfološka obilježja kalbindinskih neurona ... 75
5.3.4. Morfološka obilježja somatostatinskih neurona ... 78
5.3.5. Usporedba morfoloških obilježja pojedinih populacija interneurona ... 83

5.4. Koekspresija molekularnih biljega pojedinih populacija kortikalnih interneurona ... 90
5.4.1. Koekspresija kalretinina i drugih molekularnih biljega ... 90
5.4.2. Koekspresija parvalbumina i drugih molekularnih biljega ... 95
5.4.3. Koekspresija kalbindina i drugih molekularnih biljega ... 97
5.4.4. Koekspresija somatostatina i drugih molekularnih biljega ... 101
5.4.5. Populacija kortikalnih interneurona koja izražava kalbindin i/ili somatostatin ... 108

5.5. Neurotransmiterski fenotip pojedinih populacija kortikalnih interneurona ... 111
5.5.1. Ekspresija SLC17A7 i SLC32A1 mRNA u kortikalnim neuronima ... 112
5.5.2. Ekspresija GAD1 i GAD2 mRNA u kortikalnim neuronima ... 116

5.6. Ventro-dorzalne razlike u strukturi pojedinih populacija kortikalnih interneurona ... 121
5.6.1. Razlike u udjelima pojedinih populacija kortikalnih interneurona u ukupnom broju neurona ... 121
5.6.2. Razlike u omjerima broja pojedinih populacija kortikalnih interneurona ... 124
5.6.3. Razlike u ustrojstvu kortikalne mreže inhibicijskih interneurona ... 128

6. RASPRAVA ... 132

6.1. Kalretininski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka ... 132
6.2. Parvalbuminski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka ... 134
6.3. Kalbindinski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka ... 135
6.4. Somatostatinski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka ... 138
6.5. Laminarna i regionalna organizacija kortikalnih interneurona u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka ... 141
6.6. Ekspresija GABA-ergičkih molekularnih biljega u kortikalnim interneuronima ... 142
6.7. Značaj GABA-ergičke kortikalne mreže u neuropatološkim stanjima ... 144

7. ZAKLJUČAK ... 145

8. SAŽETAK ... 148

9. SUMMARY ... 149

10. POPIS LITERATURE ... 150

11. ŽIVOTOPIS ... 168

Popis kratica

5-HT_3a-R	receptor za serotonin iz 5-HT_3 skupine serotoninskih receptora
ACC	prednja cingularna kora (od engl. *anterior cingulate cortex*)
ANOVA	analiza varijance (od engl. *analysis of variance*)
BA	Brodmannovo polje (od engl. *Brodmann area*)
BT	bijela tvar
CB	kalbindin
CI	interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
CR	kalretinin
CV	koeficijent varijacije (od engl. *coefficient of variation*)
DLPFC	dorzolateralna prefrontalna moždana kora
ECM	izvanstanični matriks (od engl. *extracellular matrix*)
FI	fronto-inzularna kora
GABA	gama-amino maslačna kiselina (od engl. *gamma-amino butyric acid*)
GAD	glutamat dekarboksilaza (od engl. *glutamic acid decarboylase*)
GSD	geometrijska standardna devijacija
IG	infragranularni slojevi
IQR	interkvartilni raspon (od engl. *interquartile range*)
LPFC	lateralna prefrontalna moždana kora
MAP2	protein povezan s mirotubulima 2 (od engl. *microtubule-associated protein 2*)
mRNA	glasnička ribonukleinska kiselina (od engl. *messenger ribonucleic acid*)
mPFC	medijalna prefrontalna moždana kora
NDS	normalni serum magarca (od engl. *normal donkey serum*)
NF-H	neurofilament H (SMI-32)
nNOS	neuronalna sintaza dušikovog oksida (od engl. *neuronal nitric oxide synthase*)
OFC	orbitofrontalna moždana kora (od engl. *orbitofrontal cortex*)
oPFC	orbitalna prefrontalna moždana kora
PBS	fosfatni pufer (od engl. *phosphate-buffered saline*)
PFC	prefrontalna moždana kora (od engl. *prefrontal cortex*)
PING	Petilla skupina za nomeklaturu interneurona (od engl. *Petilla Interneuron Nomenclature Group*)
PV	parvalbumin
QCD	kvartilni koeficijent raspršenja (od engl. *quartile coefficient of dispersion*)

SD	standardna devijacija
SG	supragranularni slojevi
SOM	somatostatin (peptid)
SST	somatostatin (gen)
VEN	von Economo neuroni
VGAT	vezikularni GABA transporter
VGLUT1	vezikularni glutamatni transporter 1
VIP	vazoaktivni intestinalni polipeptid
vPFC	ventralna prefrontalna moždana kora
vmPFC	ventromedijalna prefrontalna moždana kora

1. UVOD

1.1. Prefrontalna moždana kora

1.1.1. Podjela prefrontalne moždane kore

Prefrontalna moždana kora (PFC, od engl. *prefrontal cortex*) dio je moždane kore smješten u rostralnom dijelu čeonog režnja. Riječ je o funkcionalnom dijelu krajnjeg mozga koji se može definirati na više različitih načina – anatomski, citoarhitektonski, funkcionalno i filogenetski.

Ovdje izdvajamo definiciju na temelju veza s drugim dijelovima mozga prema kojoj je PFC dio moždane kore koji prima recipročne projekcije iz mediodorzalne jezgre talamusa (1–4). Ova definicija često se koristi budući da relativno jasno i jednoznačno definira PFC kao funkcionalnu cjelinu, dok su anatomske i citoarhitektonske granice PFC-a manje jasno definirane te uglavnom primjenjive samo u čovjeka i drugih primata pa ne omogućavaju adekvatnu usporedbu između različitih životinjskih vrsta (5–8).

PFC se može podijeliti u lateralnu prefrontalnu koru (LPFC), koja prima projekcije iz lateralnih dijelova mediodorzalne jezgre talamusa, i ventromedijalnu prefrontalnu koru (vmPFC), koja prima projekcije iz medijalnih dijelova mediodorzalne jezgre talamusa. Ovisno o literaturi, vmPFC ponekad se potpuno ili djelomično poistovjećuje s tzv. orbitofrontalnom korom (OFC, od engl. *orbitofrontal cortex*), a ponekad se vmPFC i OFC razmatraju kao potpuno različiti entiteti. LPFC se dodatno dijeli na dorzolateralnu (DLPFC) i ventrolateralnu (VLPFC) koru, dok se vmPFC dodatno dijeli na ventralnu/orbitalnu (vPFC/oPFC) i medijalnu prefrontalnu koru (mPFC) (7). Opisani dijelovi PFC-a mogu se dalje citoarhitektonski podijeliti u Brodmannova polja (BA, od engl. *Brodmann areas*) (Tablica 1.1) (2, 8).

Tablica 1.1. Podjela prefrontalne moždane kore.

Dijelovi prefrontalne moždane kore		Brodmannova polja
lateralna prefrontalna kora	dorzolateralna	8, 9, 10, 46
	ventrolateralna	44, 45, 47
ventromedijalna prefrontalna kora	medijalna	12, 24, 25, 32, 33
	ventralna	11, 13, 14

U čovjeka, BA10 zahvaća i značajan dio medijalne stijenke mozga pa se taj dio BA10 može opisivati kao dio mPFC-a (9, 10).

1.1.2. Anatomska obilježja prefrontalne moždane kore

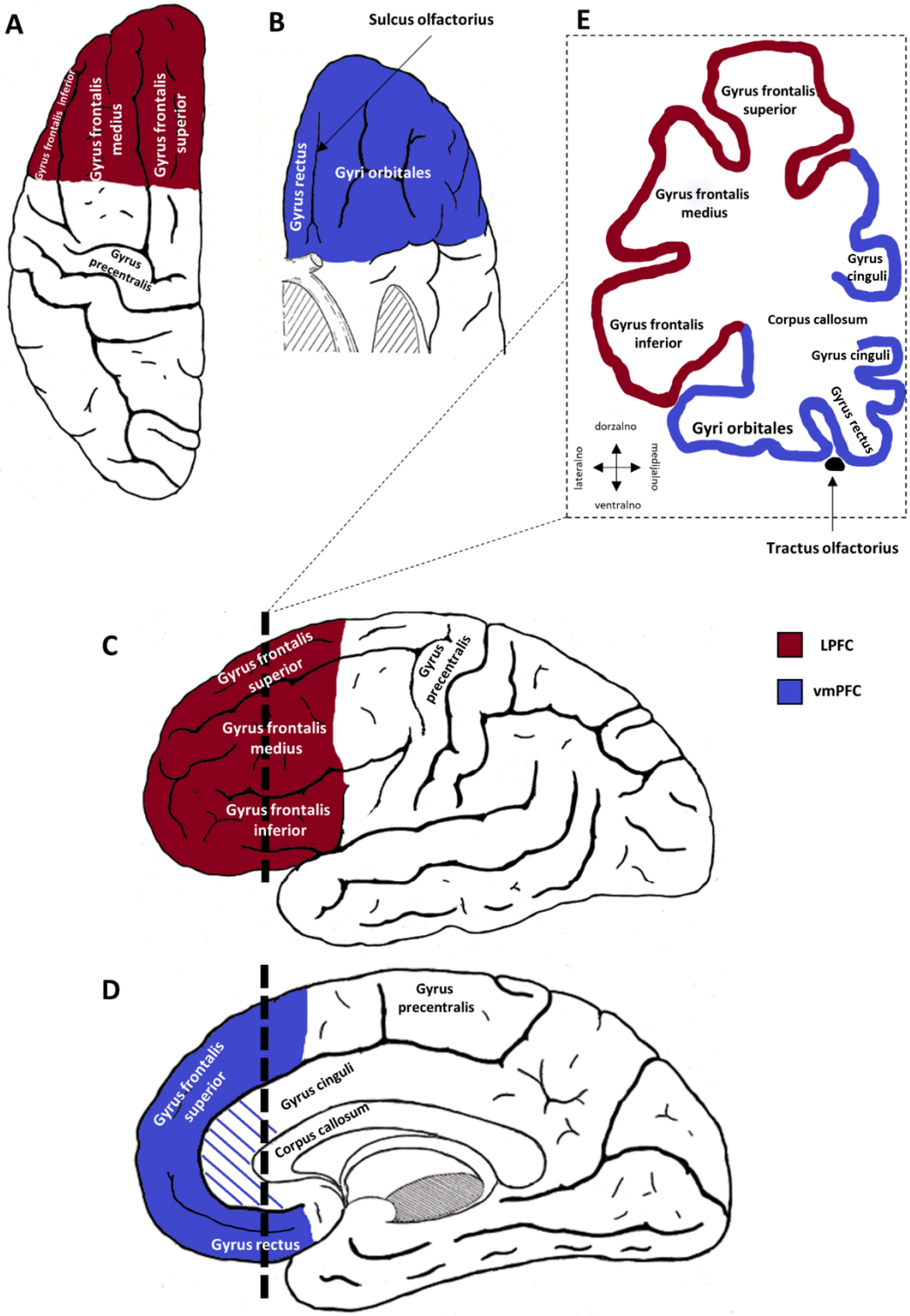
U anatomskom smislu, LPFC obuhvaća prvenstveno sljedeće vijuge: *gyrus frontalis superior* (lateralni dio vijuge), *gyrus frontalis medius* i *gyrus frontalis inferior*. Čeone vijuge međusobno odvajaju žlijebovi, *sulcus frontalis superior* i *sulcus frontalis inferior*. Svaka od čeonih vijuga zauzima otprilike trećinu volumena LPFC-a, a pojedine vijuge nerijetko su dodatno izbrazdane, što je vidljivo na frontalnom presjeku mozga (11). DLPFC čine prvenstveno lateralni dio vijuge, *gyrus frontalis superior* i vijuga, *gyrus frontalis medius*, dok VLPFC prvenstveno čini vijuga, *gyrus frontalis inferior*. *Gyrus frontalis superior* jedina je od ovih triju vijuga koja prelazi na medijalnu površinu mozga (Slika 1.1) (2, 11–13).

Medijalni PFC stoga čini medijalni dio vijuge, *gyrus frontalis superior*. Dodatno, mPFC-u pripadaju, u funkcionalnom smislu, i Brodmannova polja 24, 25 i 33 koja primaju projekcije iz mediodorzalne jezgre talamusa, a smještena su u prednjem dijelu vijuge, *gyrus cinguli* – području koje se naziva prednja cingularna kora (ACC, od engl. *anterior cingulate cortex*) (Slika 1.1) (14–17). Ipak, u anatomskom smislu *gyrus cinguli* pripada limbičkom, a ne čeonom režnju. *Gyrus frontalis superior* prema ventralno od vijuge, *gyrus cinguli* odvaja prednji/gornji dio žlijeba, *sulcus cinguli*. U kliničkoj terminologiji na medijalnoj stijenci mozga definira se dodatni žlijeb koji se naziva paracingularnim žlijebom. Taj žlijeb je paralelan s cingularnim žlijebom i vrlo je varijabilne morfologije koja se povezuje s određenim patološkim stanjima kao što su halucinacije u shizofreniji (18–20).

Orbitalni PFC obuhvaća pak prvenstveno sljedeće vijuge: *gyrus rectus* i *gyri orbitales* (često postoje četiri orbitalne vijuge: *gyrus orbitalis anterior, posterior, medialis, lateralis*). Ravna vijuga, *gyrus rectus* odvojena je od lateralnije smještenih orbitalnih vijuga žlijebom, *sulcus olfactorius* u kojem je smješten njušni tračak, *tractus olfactorius* (Slika 1.1). Prema dorzalno i medijalno, *gyrus rectus* graniči s izdankom vijuge, *gyrus frontalis superior* (koji se ponekad neformalno naziva rostralnom vijugom), a navedeni izdanak je još prema dorzalno odvojen od vijuge, *gyrus cinguli* donjim dijelom žlijeba, *sulcus cinguli* (2, 9–11).

1.1.3. Osnovna citoarhitektonska i funkcionalna obilježja prefrontalne moždane kore

Citoarhitektonski, moždana kora u području PFC-a pretežito je šestoslojni homotipni izokorteks, a manjim dijelom je riječ o heterotipnom (uglavnom agranularnom) izokorteksu. Molekularni sloj (sloj I) u PFC-u je, kao i u drugim kortikalnim regijama, slabo celularan.



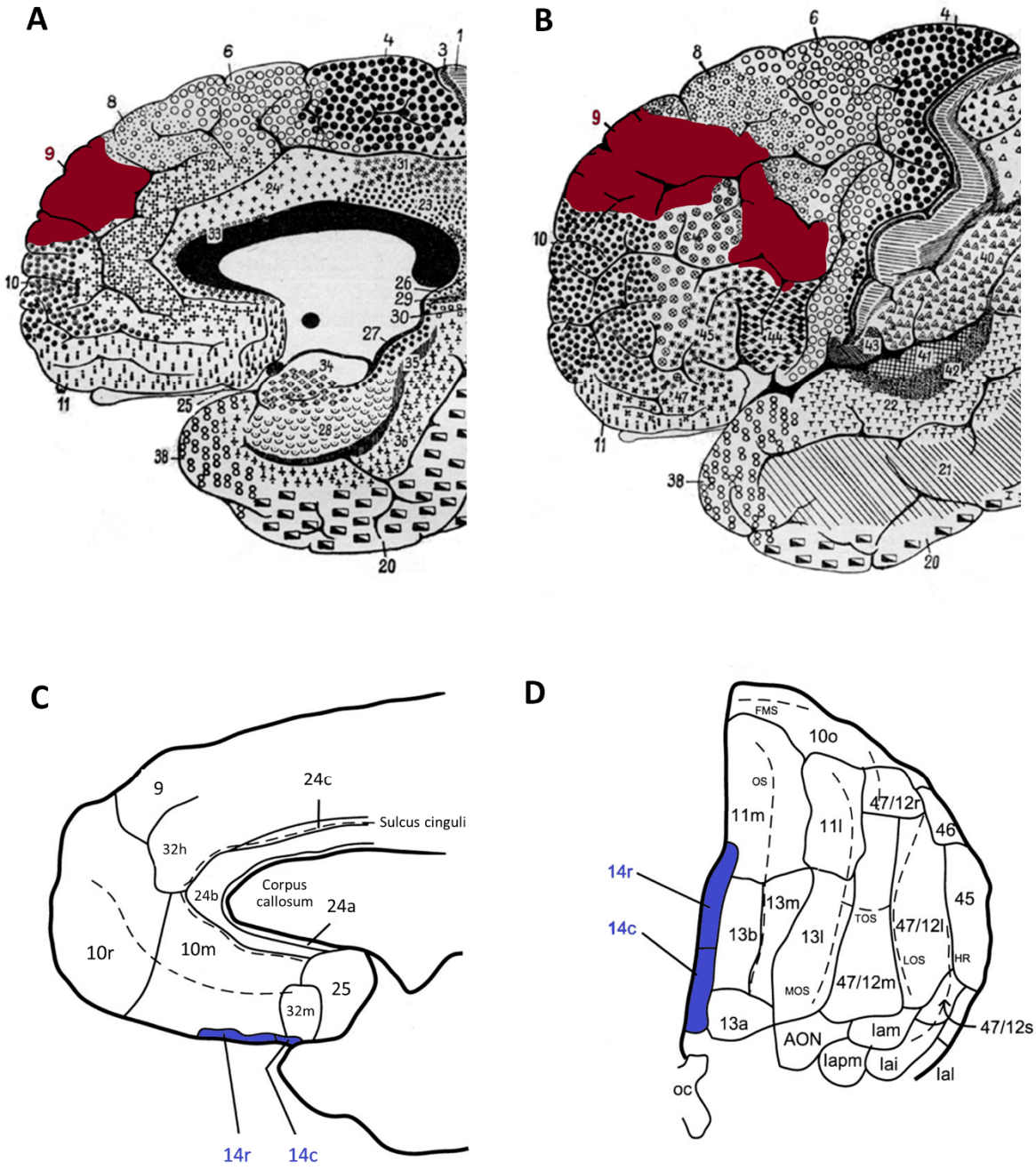
Slika 1.1. Anatomija prefrontalne moždane kore (slike u panelima A, B, C i D modificirane iz Gray i Lewis, 1918.). Lateralna prefrontalna kora označena je crvenom, a ventromedijalna prefrontalna kora plavom bojom. Isprekidana okomita crta predstavlja razinu frontalnog presjeka vidljivog u panelu E. (**A**) Pogled na dorzalnu (gornju) površinu velikog mozga. (**B**) Pogled na ventralnu (orbitalnu, donju) površinu velikog mozga. (**C**) Pogled na lateralnu površinu velikog mozga. (**D**) Pogled na medijalnu površinu velikog mozga. Površina iscrtana plavim crtama predstavlja prednje cingularno područje. (**E**) Frontalni presjek kroz prefrontalnu moždanu koru.

Supragranularni slojevi II i III PFC-a, koji su uključeni u kortiko-kortikalne (asocijacijske) projekcije, uglavnom su dobro razvijeni i relativno se jasno mogu razgraničiti u većini prefrontalnih polja. Načelno, izraženost sloja II nešto je veća u rostralnijim, nego u kaudalnijim poljima PFC-a (21–26). Sloj III u većini prefrontalnih polja osobito je izražen i često se može podijeliti u barem dva, a nerijetko i tri podsloja: IIIa (sadrži male piramidne stanice), IIIb (sadrži piramidne stanice srednje veličine) i IIIc (sadrži velike piramidne stanice). Većina prefrontalnih polja ima izražen granularni sloj (sloj IV), a slabije je razvijen u disgranularnim poljima 14r i 44 te se ne nalazi u agranularnim poljima 11, 14c i 47. Infragranularni slojevi V i VI obično se sastoje od po dva podsloja, od kojih je gornji (Va i VIa) gušći, a donji (Vb i VIb) rjeđi (21–26).

PFC prvenstveno ima ulogu u tzv. izvršnim funkcijama (engl. *executive functions*) – skupini kognitivnih procesa uključenih u kontrolu ponašanja. U kognitivne procese koji su uključeni u izvršne funkcije ubrajaju se kontrola pažnje, kognitivna inhibicija i kontrola, radno pamćenje, kognitivna fleksibilnost te složeni kognitivni procesi poput planiranja i rješavanja problema (2, 27). Pritom je vmPFC prvenstveno uključen u kontrolu emocija, nagona i motivacije te sustav nagrađivanja (2, 9, 10, 27, 28), dok je LPFC uključen u radnu memoriju, planiranje i rasuđivanje (2, 27, 29), ali i u procesuiranje govora i jezika (30). Važno je naglasiti da, iako je PFC najsnažnije razvijen u primata, i u ostalih sisavaca postoje korelati za vmPFC, ali samo primati imaju jasan korelat za LPFC (7, 31–33). Kognitivni procesi u koje je uključen LPFC osobito su snažno razvijeni u čovjeka koji ujedno ima i izrazito razvijen LPFC (2, 3, 32).

Uzimajući u obzir navedene razlike između funkcije i veza vmPFC-a i LPFC-a, može se pretpostaviti da bi između navedenih dijelova moždane kore mogle postojati i razlike koje će se očitovati na molekularnoj razini. Osobito zanimljive u takvom razmatranju su citoarhitektonske regije BA9 i BA14.

Citoarhitektonska regija BA9 (*area frontalis granularis*) smještena je pretežito u vijuzi, *gyrus frontalis superior* i najvećim dijelom zauzima lateralni dio ove vijuge te stoga pripada prvenstveno DLPFC-u (Slika 1.2). Prema medijalno BA9 doseže do paracingularnog žlijeba gdje graniči s BA32 koja pripada paralimbičkoj moždanoj kori (29, 34). Prema lateralno BA9 proteže se dijelom kroz vijugu, *gyrus frontalis medius* i završava ventrolateralno u području vijuge, *gyrus frontalis inferior*. Prema kaudalno BA9 graniči s BA8, a prema rostralno s BA10. Prema ventrokaudalno BA9 završava neposredno rostralno od vijuge, *gyrus precentralis* gdje graniči s BA6 (11, 21, 22).



Slika 1.2. Prikaz anatomskog smještaja Brodmannovih polja 9 (označeno crvenom bojom) i 14 (označeno plavom bojom) u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka. Slike u panelima A i B modificirane su iz Brodmann, 1909., a slike u panelima C i D modificirane su iz Ongür i Price, 2000. (**A**) Pogled na medijalnu površinu mozga. Vidljiva je medijalna granica Brodmannova polja 9. (**B**) Pogled na dorzolateralnu površinu mozga. Vidljive su granice Brodmannova polja 9 smještenog u vijugama, *gyrus frontalis superior* i *gyrus frontalis medius*. (**C**) Pogled na medijalnu površinu mozga. Prikazan je dio ravne vijuge, *gyrus rectus* koju zauzima Brodmannovo polje 14. Prikazana je i podjela Brodmannova polja 14 u rostralni (BA14r) i kaudalni dio (BA14c). (**D**) Pogled na ventralnu (orbitalnu) površinu mozga. Ponovno je prikazano Brodmannovo polje 14 s podjelom na BA14r i BA14c.

BA9 iznimno je razvijena u primata iz skupine *Simiiformes* (koja uključuje čovjeka i čovjekolike majmune), a nema jasnu homologiju u drugih sisavaca (35). Funkcionalne studije slikovnog prikaza pokazale su da je BA9 uključena u složene kognitivne procese kao što su induktivno razmišljanje, teorija uma te epizodno i radno pamćenje (36–40). Također, u BA9 i srodnim regijama DLPFC-a do sada su opisane brojne promjene koje se povezuju s neuropatološkim i neurodivergentnim stanjima (41–44).

Citoarhitektonska regija BA14 u čovjeka smještena je u kaudalne dvije trećine vijuge, *gyrus rectus* te se stoga nalazi na samoj ventralnoj površini mozga i predstavlja tipično polje vmPFC-a (Slika 1.2). Treba napomenuti da je Brodmann izvorno opisao BA14 u majmuna iz roda *Cercopithecus* te da je smatrao da ne postoji homologna regija u čovjeka (21, 45). U međuvremenu se nomenklatura kortikalnih polja više puta mijenjala te su razni autori ipak opisali polje 14 u čovjeka kao citoarhitektonsku regiju u području vijuge, *gyrus rectus* (9, 10, 29, 46, 47). Tako Ongür i sur. (2003.) definiraju BA14 kao polje smješteno u vršku vijuge, *gyrus rectus* koje prema lateralno graniči s poljima 13a (kaudalno) i 13b (rostralno), a prema medijalno s poljima 32m (kaudalno) i 10m (rostralno). Prema rostralno BA14 graniči s poljem 11m. Također, BA14 može se citoarhitektonski dodatno podijeliti u rostralni dio (BA14r) i kaudalni dio (BA14c) (9, 10). Za razliku od BA9, točna uloga BA14 u čovjeka nešto je manje istražena, ali smatra se da ima ulogu asocijacijske moždane kore za visceralne osjete i posebni osjet njuha. Vjerojatno je uključena i u obradu informacija iz autonomnog živčanog sustava (10).

1.2. Živčane stanice u kori velikog mozga

Živčane stanice (neuroni) kore velikog mozga mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine – ekscitacijske (pobuđujuće) neurone i inhibicijske (kočeće) neurone (48, 49).

Ekscitacijski neuroni luče neurotransmiter glutamat i tipično ostvaruju sinapse u regijama udaljenim od njihovih tijela pa ih se često opisuje i kao projekcijske neurone (50). Budući da glutamatergički projekcijski neuroni čine većinu kortikalnih neurona (prema većini izvora 70 – 80 % ukupnog broja neurona), nerijetko se nazivaju i glavnim stanicama (engl. *principal cells*) (48, 49, 51). Dendriti većine ekscitacijskih neurona obiluju dendritičkim trnovima (50, 52–54). Morfološka raznolikost ovih neurona je velika, ali većina se može svrstati u dvije glavne skupine – piramidne neurone i modificirane piramidne neurone (48, 50, 55–58).

Osim toga, unutar skupine modificiranih piramidnih neurona dodatno se definiraju posebne stanice (engl. *special cells*) koje imaju specifičnu morfologiju te laminarnu i regionalnu raspodjelu. Vrlo zanimljiv primjer takvih posebnih stanica su von Economo neuroni (VEN) koji imaju jedinstvenu morfologiju bazalnog dendrita i aksona. VEN-ovi su posebno brojni u čovjekolikih majmuna, a u čovjeka su smješteni u izuzetno velikom broju u svega dvije kortikalne regije – ACC-u i fronto-inzularnoj (FI) kori (17, 59).

Inhibicijski neuroni kao glavni neurotransmiter luče gama-amino maslačnu kiselinu (GABA, od engl. *gamma-aminobutyric acid*) i uglavnom ostvaruju sinapse unutar iste kortikalne regije te su dio lokalnih neuronskih krugova (engl. *local circuit neurons*) (49, 51, 60, 61). Stoga se kao sinonim za inhibicijske neurone moždane kore često koristi termin interneuroni („neuroni umetnuti u lokalne kortikalne krugove“), iako postoje i inhibicijski kortikalni neuroni s udaljenim projekcijama (engl. *long-projecting GABAergic neurons*) (62–64). Općenito se pod pojmom „kortikalni interneuron“ podrazumijeva ne-piramidna stanica koja u odrasle osobe ne sadrži dendritičke trnove (49). Kortikalni interneuroni su, iako malobrojni (čine svega 10 – 30 % kortikalnih neurona ovisno o regiji, sloju i životinjskoj vrsti), iznimno heterogeni po svojim molekularnim, funkcionalnim i morfološkim obilježjima (49, 51, 65, 66). Dapače, u odnosu na glavne stanice moždane kore, klasifikacija kortikalnih interneurona iznimno je složena i još uvijek neusuglašena u literaturi (49, 51, 60, 67–78).

1.2.1. Podjele kortikalnih interneurona

Prema različitim svojstvima, kortikalni interneuroni mogu se podijeliti u velik broj podvrsta. Najsveobuhvatniji prijedlog sistematizirane klasifikacije kortikalnih interneurona pružila je Petilla skupina za nomenklaturu interneurona (PING, od engl. *Petilla Interneuron Nomenclature Group*) koja je 2008. pokušala uspostaviti tzv. Petilla terminologiju koja bi služila za sustavan i detaljan opis svojstava GABA-ergičkih interneurona moždane kore (60). Prema Petilla terminologiji, podjele kortikalnih interneurona mogu se zasnivati na morfološkim, molekularnim i elektrofiziološkim kriterijima.

1.2.1.1. Morfološka podjela kortikalnih interneurona

Još uvijek postoje nesuglasice oko točne morfološke klasifikacije kortikalnih interneurona i različiti autori daju različita tumačenja i kriterije za pojedine morfološke oblike (49, 51, 60, 73, 79–92).

Ipak, sljedećih šest morfoloških oblika gotovo se uvijek opisuje: Cajal-Retziusove stanice, Martinottijeve stanice, bipolarne stanice (engl. *bipolar cells*), stanice s dva čuperka (engl. *bitufted cells*), košaraste stanice (engl. *basket cells*) i stanice oblika svijećnjaka (engl. *chandelier cells*). Iako se Cajal-Retziusove stanice uobičajeno opisuju kao morfološka vrsta kortikalnih (inhibicijskih) interneurona, valja napomenuti da njihov neurotransmiterski fenotip nije u potpunosti razjašnjen.

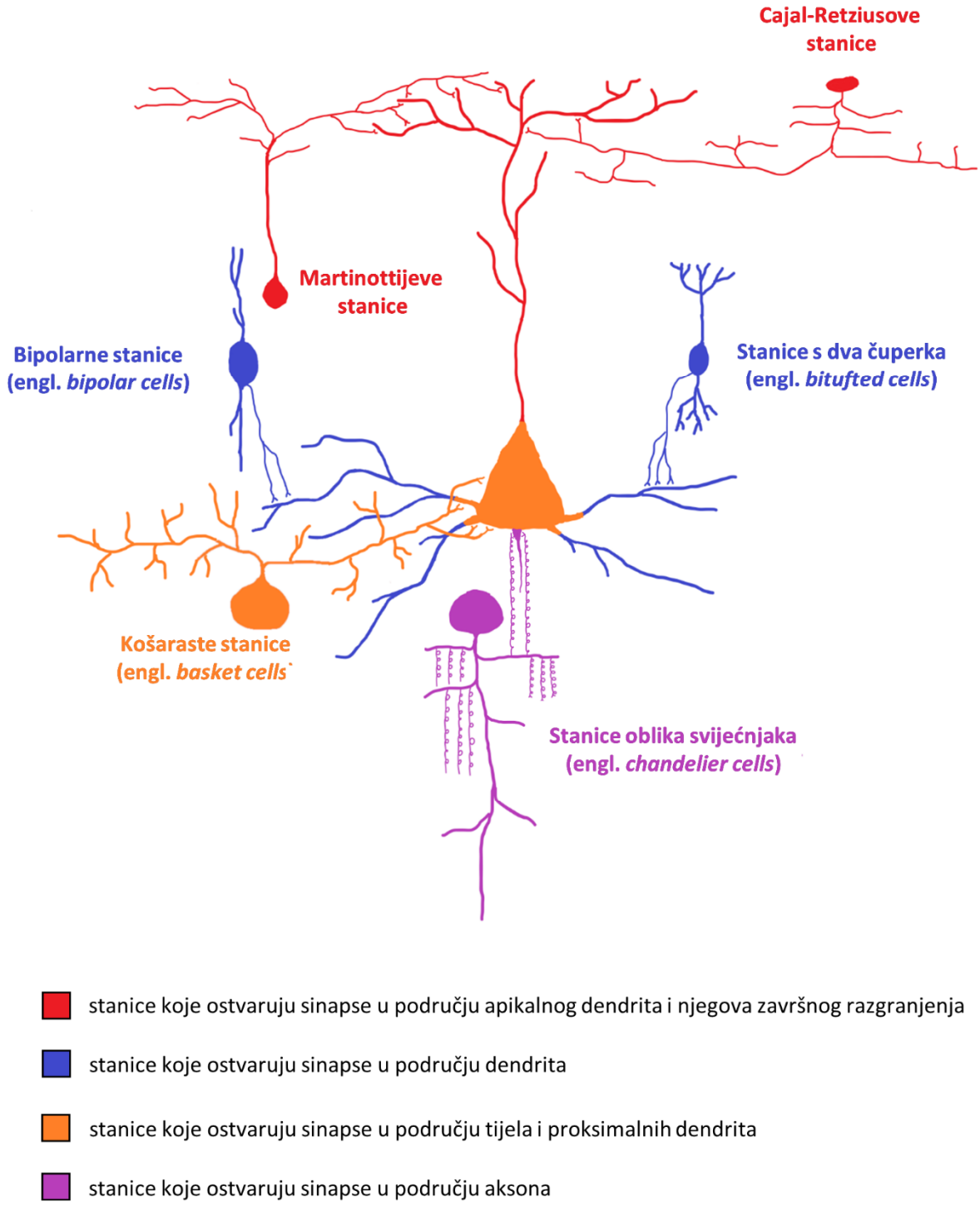
Nerijetko se dodatno opisuju podvrste košarastih stanica (male, velike i ugniježđene; engl. *small, large and nest basket cells*), stanice oblika dvostrukog buketa (engl. *double bouquet cells*) i neuroglijaformne stanice (93).

Nadalje, trnaste zvjezdaste stanice (engl. *spiny stellate cells*) su neuroni koji sudjeluju u lokalnim kortikalnim krugovima te ih se ponekad opisuje zajedno s inhibicijskim kortikalnim interneuronima. Međutim, razvojno su te stanice sličnije piramidnim neuronima, budući da početno imaju dugačke aksone koji se tijekom razvoja skraćuju (51, 94–96). Također, trnaste zvjezdaste stanice ekscitacijski su glutamatergički neuroni pa u tom pogledu dodatno odudaraju od ostalih kortikalnih interneurona te stoga nisu uključene u Petilla klasifikaciju (60).

Jedna od važnih posljedica raznolike morfologije interneurona jest da različiti morfološki oblici interneurona stvaraju sinapse s različitim dijelovima drugih neurona koje inhibiraju, odnosno morfološka obilježja kortikalnih interneurona prvenstveno odražavaju svojstva njihovih aksonskih projekcija što ujedno određuje i njihova funkcionalna svojstva (Slika 1.3).

Tako Cajal-Retziusove i Martinottijeve stanice dominantno stvaraju sinapse sa završnim razgranjenjem (engl. *dendritic tuft*) apikalnog dendrita piramidnih neurona, košaraste stanice stvaraju sinapse u području tijela i proksimalnih dijelova dendrita, bipolarne stanice i stanice s dva čuperka stvaraju sinapse samo s dendritima (npr. razgranatim bazalnim dendritima piramidnih neurona), dok stanice oblika svijećnjaka stvaraju sinapse u području aksonskog inicijalnog segmenta drugih neurona (engl. *axo-axonic cells*) (51).

Iako je morfologija interneurona važna za njihovu funkciju, oko značenja i definicija pojedinih morfoloških oblika postoji vjerojatno najviše razilaženja u literaturi (49). Osim toga, morfološki opisi ne odgovaraju sasvim molekularnim biljezima koje pojedine populacije interneurona izražavaju – primjerice, ne vrijedi nužno da će sve bipolarne stanice izražavati iste molekularne biljege i imati istu ulogu u lokalnim neuronskim krugovima.



Slika 1.3. Shematski prikaz odabranih morfoloških oblika kortikalnih interneurona: Cajal-Retziusove stanice, Martinottijeve stanice, bipolarne stanice, stanice s dva čuperka, košaraste stanice i stanice oblika svijećnjaka. Pojedini morfološki oblici ostvaruju sinapse s različitim dijelovima drugih neurona čime postižu različite oblike inhibicije.

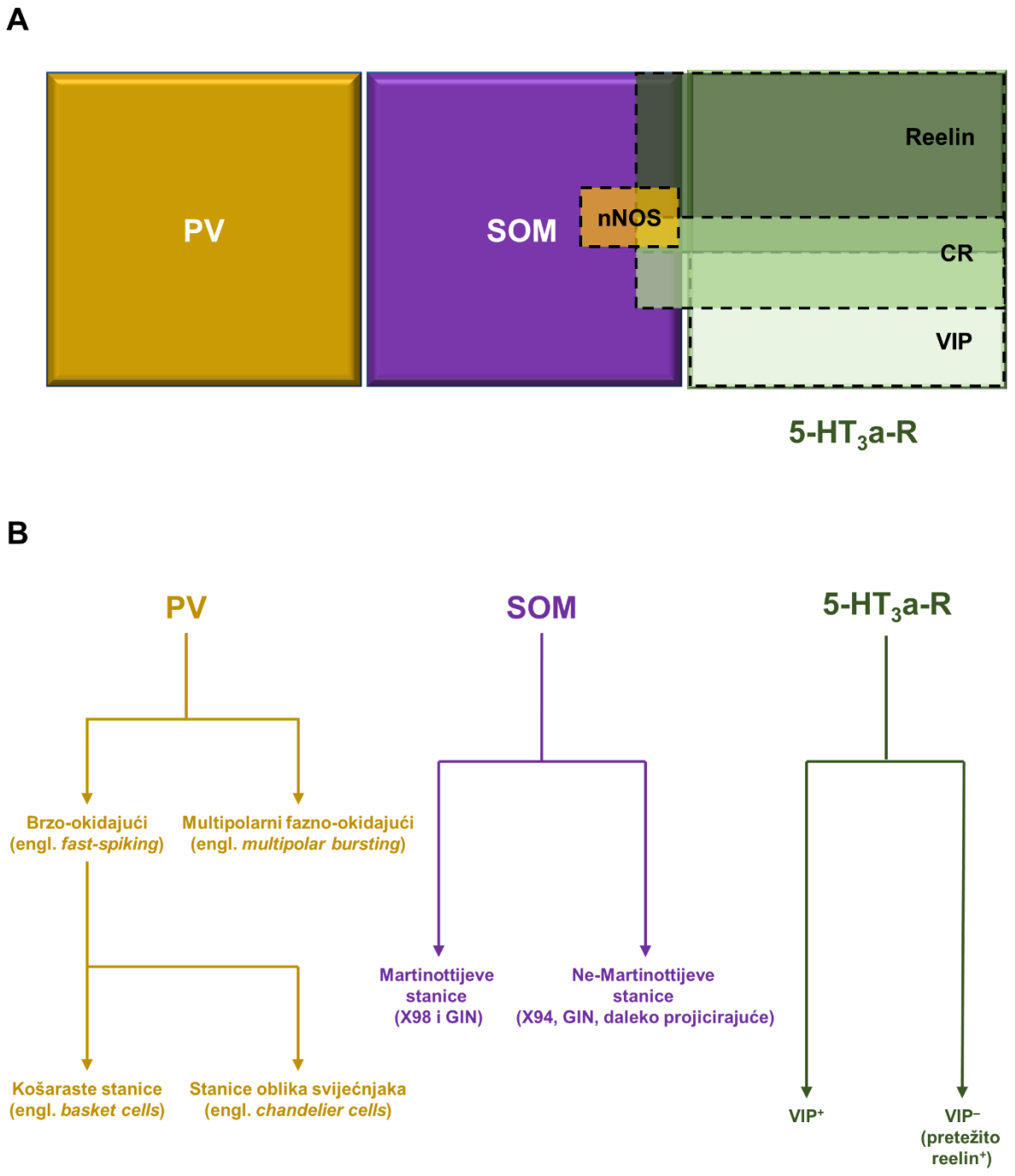
1.2.1.2. Podjela kortikalnih interneurona prema molekularnim svojstvima

Najčešće korištene podjele interneurona zasnovane su na njihovim molekularnim obilježjima koja uključuju ekspresiju transkripcijskih čimbenika, neurotransmitera (ili enzima koji ih sintetiziraju), neuropeptida, kalcij-vežućih proteina, receptora, strukturnih proteina, površinskih biljega te membranskih i vezikularnih transportera (49, 60, 76, 77, 97). Većina istraživanja o molekularnim svojstvima interneurona provedena su na glodavcima, poglavito na mišu (*Mus musculus*) i štakoru (*Rattus norvegicus*) (64, 65, 69–72, 76, 77, 98–109), dok je znatno manje istraživanja, pogotovo sustavnih, proveden na primatima – uglavnom u čovjeka i makaka majmuna (*Macaca mulatta* i *Macaca fascicularis*) (110–119). Iako relevantna literatura pokazuje da postoje određene razlike u molekularnim svojstvima kortikalnih interneurona ovisno o regiji, sloju i životinjskoj vrsti (49, 60), unazad 10 godina prihvaćena je opća klasifikacija kortikalnih interneurona u tri velike, pretežito odvojene populacije (Slika 1.4):

1. interneuroni koji izražavaju kalcij-vežući protein parvalbumin (PV);
2. interneuroni koji izražavaju peptid somatostatin (SOM);
3. interneuroni koji izražavaju receptor za serotonin (5-HT_3a-R).

Navedena tri markera obuhvaćaju gotovo sve GABA-ergičke kortikalne interneurone (67, 120). Ipak, treba imati na umu da se ova podjela temelji na podatcima koji su ekstrapolirani iz istraživanja na glodavcima. Prema ovoj podjeli, PV^+ neuroni su najbrojniji kortikalni interneuroni i čine oko 40 % interneurona u glodavaca. SOM^+ neuroni i 5-HT_3a-R^+ neuroni čine po 30 % kortikalnih interneurona (120). Nijedna od ove tri populacije nije homogena te obuhvaća morfološki i molekularno raznovrsne subpopulacije stanica (51, 120).

Tako se PV^+ neuroni dijele na barem dvije elektrofiziološke podvrste (brzo-okidajući, engl. *fast-spiking* i fazno okidajući, engl. *bursting*) i barem tri morfološke podvrste (multipolarne stanice, košaraste stanice i stanice oblika svijećnjaka) (120). SOM^+ neuroni obuhvaćaju dvije velike morfološke podvrste – Martinottijeve stanice (koje mogu izražavati X98 i GIN markere) (121) te ne-Martinottijeve stanice (koje mogu izražavati X94 i GIN markere, a uključuju i GABA-ergičke nerone s udaljenim projekcijama) (120). Ne-Martinottijeve stanice u literaturi su slabo opisane i njihova morfologija je raznolika, ali nedostatno proučena.



Slika 1.4. Pojednostavljeni shematski prikaz podjele interneurona na temelju njihovih molekularnih obilježja. Shema je nacrtana prema podatcima iz Rudy i sur., 2011. te Sultan i Shi, 2018., a prikazuje podjelu koja je prvenstveno primjenjiva u glodavaca. (**A**) Tri glavne molekularne populacije interneurona i odabrane subpopulacije. U glodavaca dio SOM^+ neurona izražava i CR, a sveukupno je SOM^+ populacija neurona opsežnija od CR^+ populacije. (**B**) Podjela triju glavnih populacija kortikalnih interneurona (PV^+, SOM^+ i 5-HT3a-R^+) na subpopulacije.

Konačno, 5-HT_3a-R^+ neuroni obuhvaćaju više molekularnih podvrsta, ali se mogu pojednostavljeno klasificirati u dvije velike skupine – neuroni koji izražavaju vazoaktivni intestinalni polipeptid (VIP^+) i neuroni koji ga ne izražavaju ($VIP^–$) (120). $VIP^–$ neuroni najvećim dijelom izražavaju glikoprotein reelin koji sudjeluje u tvorbi izvanstaničnog matriksa (ECM, od engl. *extracellular matrix*) (120).

Unatoč tome što PV, SOM i 5-HT_3a-R obilježavaju tri glavne populacije interneurona u glodavaca, u istraživanjima na primatima i dalje se koristi klasična podjela prema ekspresiji kalcij-vežućih proteina – kalretinina (CR), kalbindina (CB) i parvalbumina (PV) (111–113, 118, 119).

Preko 80 % kortikalnih GABA-ergičkih interneurona eksprimira jedan od triju navedenih kalcij-vežućih proteina, čime se definiraju tri glavne populacije kortikalnih interneurona (111–113, 118, 119). Prednost korištenja ove podjele interneurona jest u tome što se kalcij-vežući proteini, koji su stalno prisutni u velikoj količini u citoplazmi stanice, znatno jasnije prikazuju imunohistokemijskim metodama od manjih molekula poput peptida (npr. SOM i VIP) (122). Ovo je posebice važno za tkivo s velikim postmortalnim intervalom, kao što je tkivo ljudskog mozga koje načelno ima postmortalni interval od najmanje 6 h, osim u slučaju teže dostupnih intraoperativnih uzoraka.

U mozgu primata obično se CR^+ neuroni razmatraju kao subpopulacija 5-HT_3a-R^+ ili VIP^+ neurona, a CB^+ neuroni kao subpopulacija SOM^+ neurona, dok su PV^+ neuroni zasebna populacija, kao i u glodavaca (123).

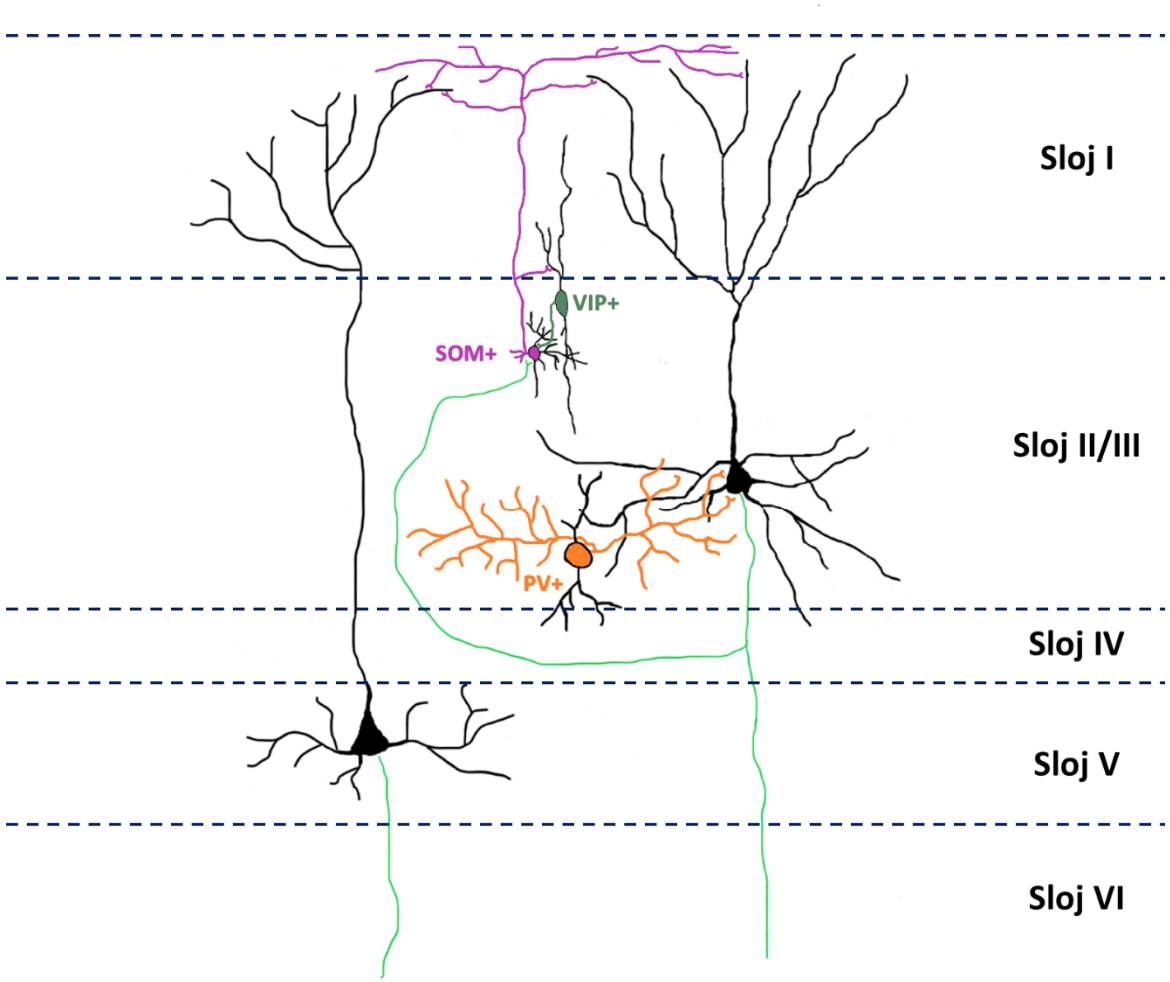
Istraživanja pokazuju veoma raznolike raspodjele CR^+, CB^+ i PV^+ neurona. U frontalnoj kori štakora nađen je visok stupanj kolokalizacije određenih kalcij-vežućih proteina (poglavito CB-a s PV-om), dok u DLPFC-u majmuna takve kolokalizacije nisu zabilježene (71, 72, 111, 119). Relativno visok stupanj kolokalizacije nađen je i između SOM i CR u miša (77, 124). Također, u frontalnoj kori miša i štakora, PV^+ neuroni predstavljaju glavnu populaciju interneurona, dok u prefrontalnoj kori primata dominiraju CR^+ neuroni (119). Nejasno je, stoga, imaju li pojedine populacije interneurona ista fiziološka, morfološka i funkcionalna svojstva u različitim vrstama. Razumijevanje uloge interneurona u čovjeka od iznimne je važnosti te je ključno za razumijevanje patofizologije neuropsihijatrijskih bolesti specifičnih za čovjeka (44, 125–130).

1.2.2. Uloga kortikalnih interneurona u regulaciji rada kortikalne neuralne mreže i lokalnih neuronskih krugova

Interneuroni su ključni regulatori kortikalne neuralne mreže, tj. njezinih izlaznih informacija (49, 61, 131). Tijekom evolucije, broj interneurona povećao se u primata više nego broj projekcijskih piramidnih neurona i to prvenstveno na račun kalretininske populacije interneurona (123). U slojevima II i III komplementarnog polja 14 moždane kore čovjeka, kalretininski neuroni ostvaruju udio od 20 % svih neurona, a u odnosu na štakorski mozak to je povećanje od osam puta (114, 132). Također, pokazano je da su u primata kalretininski neuroni dva puta brojniji u frontoparijetalnoj kori nego u ostalim dijelovima kore velikog mozga (133).

Zbog navedenih opažanja smatra se da su promjene u interneuronima iznimno važne u reorganizaciji kortikalne mreže u evoluciji sisavaca te da omogućuju složeniju i efikasniju obradu informacija (68). Smatra se da bi osobitu važnost u tome mogli imati kortikalni interneuroni supragranularnih slojeva, budući da upravo u slojevima II i III dolazi do najvećeg povećanja udjela GABA-ergičkih neurona. Naime, iako inhibicijski neuroni čine 20 – 30 % ukupnog broja kortikalnih neurona u primata, u supragranularnim slojevima oni mogu činiti čak 34 – 44 % svih neurona, dok su u infragranularnim slojevima (V i VI) općenito manje zastupljeni u odnosu na ukupnu populaciju neurona (65–67, 115).

U kortikalne krugove supragranularnih slojeva uključene su tri glavne skupine neurona (Slika 1.5): SOM^+ neuroni slojeva II i III (većinom Martinottijeve stanice), VIP^+ neuroni slojeva II i III (većinom bipolarne stanice i stanice s dva čuperka) te PV^+ neuroni (većinom košaraste stanice). Piramidni neuroni slojeva II i III svojim aksonskim kolateralama ekscitiraju SOM^+ neurone slojeva II i III koji svojim uzlaznim aksonima povratno inhibiraju apikalne dendrite piramidnih neurona koji se završno granaju u sloju I. Navedeni neuroni inhibiraju i apikalne dendrite piramidnih neurona infragranularnih slojeva. VIP^+ neuroni slojeva II i III pak inhibiraju SOM^+ neurone slojeva II i III čime postižu disinhibiciju piramidalnih neurona, dok SOM^+ neuroni inhibiraju VIP^+ neurone. PV^+ neuroni inhibiraju tijelo i proksimalne dendrite piramidnih neurona, a PV^+ neurone inhibiraju SOM^+ neuroni sloja IV, koji se razlikuju od prethodno opisani SOM^+ neurona slojeva II i III (67, 134–136).



Slika 1.5. Shematski prikaz najznačajnijih kortikalnih neuronskih krugova u supragranularnim slojevima moždane kore.

Budući da je većina sustavnih istraživanja o interneuronima provedena na glodavcima (64, 65, 69–72, 76, 77, 98–108), nema dovoljno podataka o molekularnim obilježjima interneurona u primata, a pogotovo u čovjeka. Novija istraživanja ukazuju da bi u primata mogle postojati specifičnosti u molekularnim obilježjima interneurona, kao i u njihovom broju i raspodjeli u različitim dijelovima moždane kore. Preliminarni podaci koji se odnose na CR^+ neurone pokazuju da bi se njihov udio u ukupnoj populaciji neurona mogao znatno razlikovati između dorzalnih i ventralnih/orbitalnih regija prefrontalne kore u čovjeka (114, 137).

Nadalje, novija istraživanja na primatima (137, 138) ukazuju da su SOM^+ neuroni slabo zastupljeni u frontalnoj kori rezus majmuna (*Macaca mulatta*), za razliku od podataka dobivenih u glodavaca gdje su somatostanski neuroni podjednako brojni kao kalretininski i parvalbuminski neuroni (71, 72). Nije razjašnjen ni odnos CB^+ i SOM^+ populacija u primata – postoje li preklapanja tih dviju populacija i u kojoj mjeri.

Budući da su već u majmuna pokazane razlike u broju, udjelu i molekularnom profilu interneurona u odnosu na glodavce (110), sljedeće važno pitanje jest postoje li na tim razinama i razlike između majmuna i čovjeka, tj. postoje li posebnosti u interneuronima koje bi mogle objasniti složenost kognitivnih procesa u čovjeka.

Kako bi se odgovorilo na ta pitanja, neophodno je provesti sustavno istraživanje na interneuronima u kori ljudskog mozga. Općeprihvaćeno je da su najveće morfološke i funkcionalne razlike između primata i glodavaca, ali i između čovjeka i drugih primata, prisutne upravo u prefrontalnoj moždanoj kori (1, 4, 28, 31, 32, 40, 139, 140). Stoga su interneuroni supragranularnih slojeva polja 9 i 14 prefrontalne moždane kore u fokusu ovoga istraživanja.

Da bi se bolje razumjela točna uloga interneurona u kortikalnoj mreži, potrebno je razjasniti njihova molekularne obilježja i neurotransmiterski fenotip. Iz prethodnog razmatranja proizlazi da su trenutne spoznaje o interneuronima, pogotovo u čovjeka, nedostatne za formiranje jasnih zaključaka o njihovom broju, obilježjima i specifičnim ulogama u moždanoj kori. Stoga je cilj ovoga istraživanja utvrditi molekularna obilježja interneurona u prefrontalnoj kori čovjeka i dobiti jasan uvid u strukturu GABA-ergičke kortikalne mreže što će dati temelj za istraživanje patofiziologije različitih neuropsihijatrijskih poremećaja i neurodivergentnih stanja povezanih s dezorganizacijom GABA-ergičke mreže.

2. HIPOTEZA

U čovjeka postoje ventro-dorzalne razlike u udjelu različitih populacija GABA-ergičkih neurona unutar frontalne kore velikoga mozga.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1. Opći cilj

Utvrditi razlike u udjelu, raspodjeli po slojevima i molekularnim obilježjima GABA-ergičkih interneurona između dorzalnih (Brodmannovo polje 9) i orbitalnih regija (Brodmannovo polje 14) frontalne moždane kore.

3.2. Specifični ciljevi

Specifični ciljevi ovoga istraživanja su:

1. Utvrditi udio glavnih populacija GABA-ergičkih interneurona (kalretininskih, kalbindinskih, parvalbuminskih i somatostatinskih) u dorzalnim i orbitalnim regijama u supragranularnim slojevima Brodmannovih polja 9 i 14.
2. Utvrditi postoji li u interneuronima supragranularnih slojeva u Brodmannovim poljima 9 i 14 koekspresija kalretinina, kalbindina, parvalbumina i somatostatina.
3. Utvrditi neurotransmiterski fenotip u glavnim interneuronskim populacijama.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Uzorak

U ovom istraživanju korišteni su blokovi tkiva prefrontalne moždane kore pet odraslih ljudskih mozgova Zagrebačke neuroembriološke zbirke (141, 142). Riječ je o već pohranjenom postmortalnom materijalu prikupljenom isključivo za vrijeme redovnih obdukcija. Tkivo je kodirano odgovarajućom oznakom, a podatci o dobi, spolu i uzroku smrti osobe od koje pojedino tkivo potječe navedeni su u posebnom izdvojenom protokolu. Identitet osoba od kojih potječe moždano tkivo nije dostupan istraživačima.

Osobe od koje potječe moždano tkivo umrle su bez preagonalnog stanja te stoga postmortalni interval predstavlja stvarni vremenski odmak od smrti živčanih stanica. Nadalje, osobe u povijesti bolesti nisu imale značajnih neuroloških oboljenja te prilikom obdukcije nisu nađena neuropatološka odstupanja u mozgu (Tablica 4.1).

Tablica 4.1. Uzorak korišten u istraživanju.

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

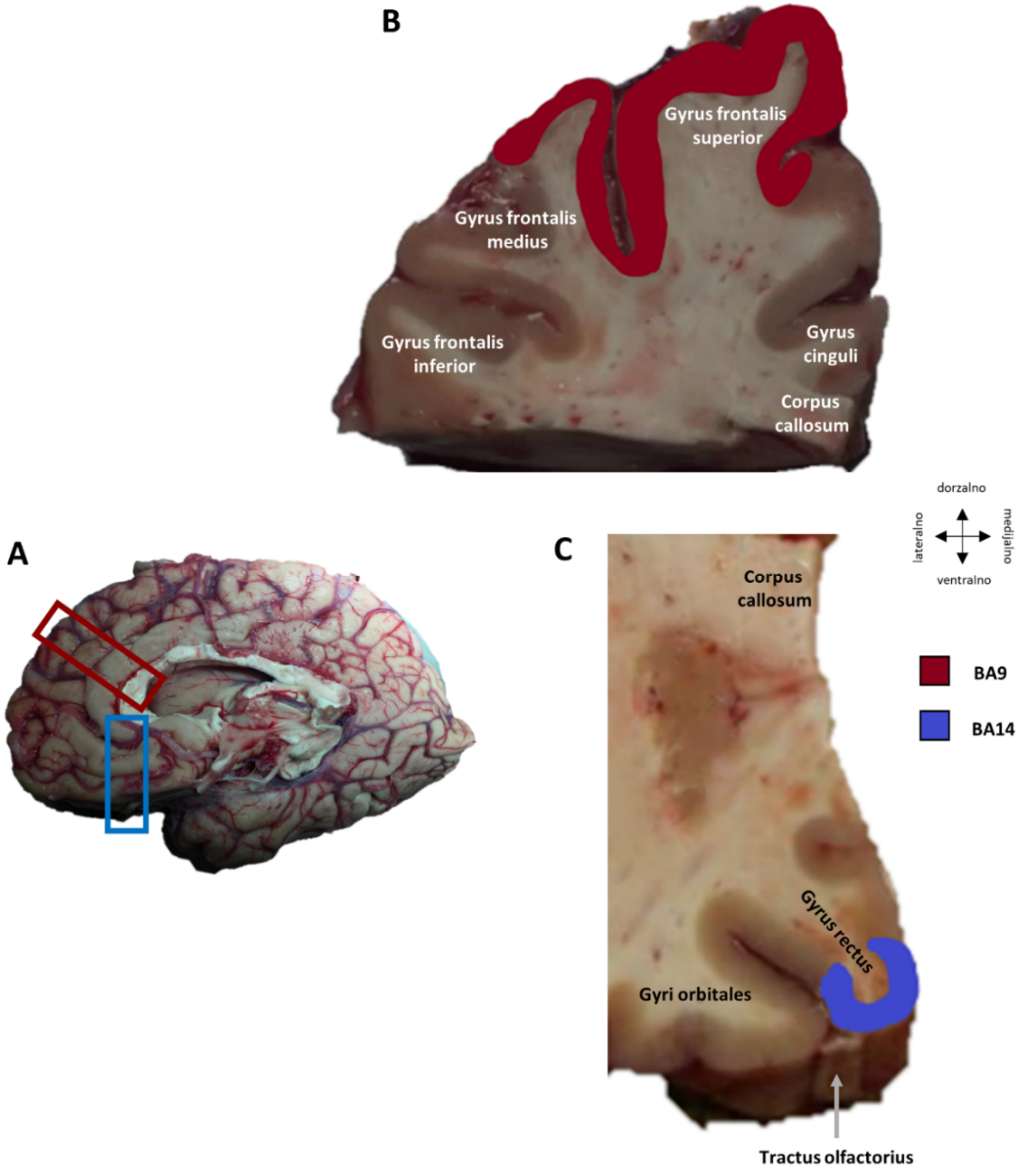
4.1.1. Priprema tkiva

Mozgovi su narezani u blokove tkiva (143) koji su potom fiksirani uranjanjem u 4%-tni formaldehid, a nakon fiksacije krioprotektirani su u otopinama saharoze (10 % i 20 %). Tkivo je zatim smrznuto i skladišteno na temperaturi od -80 °C.

Dio tkiva (jedna hemisfera) nakon toga je odmrznuto, isprano u fosfatnom puferu i dehidrirano kroz seriju etanola (70 %, 96 % i 100 %). Ovo tkivo zatim je uklopljeno u parafinske blokove (144) i potom narezano na mikrotomu u koronalne rezove debljine 20 μm (145) koji su odmah navučeni na VitroGnost Plus Ultra adhezivna predmetna stakla (Biognost, Hrvatska).

U ovom istraživanju daljnjim su histološkim bojenjima obrađena i analizirana sljedeća područja prefrontalne moždane kore (Slika 4.1):

1. dio Brodmannova polja 9 (BA9) smješten u vijuzi, *gyrus frontalis superior*,
2. rostralni dio Brodmannova polja 14 (BA14r) smješten u vijuzi, *gyrus rectus*.



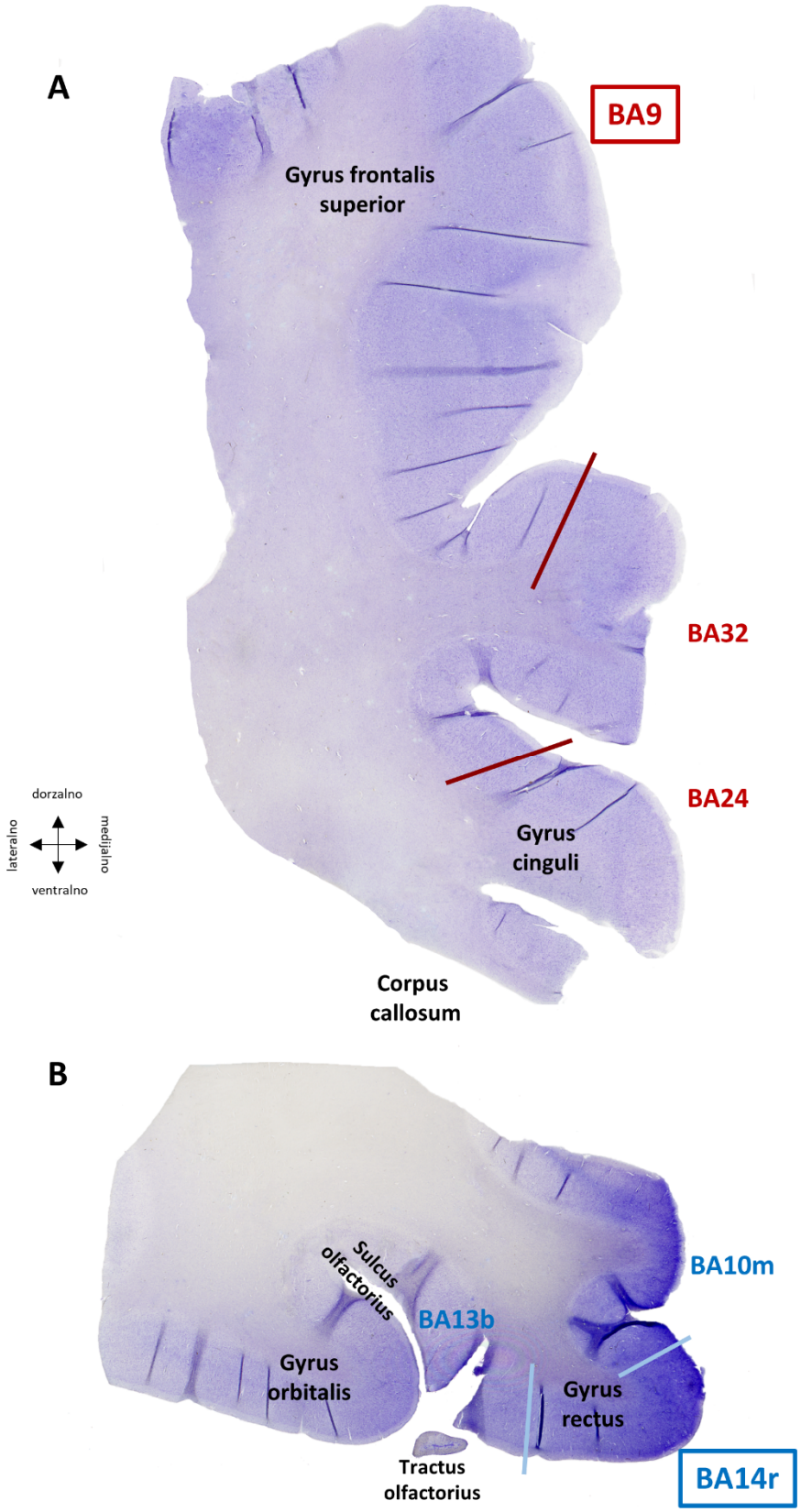
Slika 4.1. Prikaz blokova tkiva korištenih u istraživanju. (**A**) Pogled na medijalnu površinu mozga. Crveni pravokutnik označava izrezani blok tkiva koji sadrži Brodmannovo polje 9, a plavi pravokutnik označava blok tkiva koji sadrži Brodmannovo polje 14. (**B**) Blok tkiva koji sadrži Brodmannovo polje 9 (približni položaj polja ocrtan je crvenom bojom). (**C**) Blok tkiva koji sadrži Brodmannovo polje 14 (približni položaj polja ocrtan je plavom bojom).

4.1.2. Određivanje citoarhitektonskih regija od interesa

U svakom je bloku tkiva Nissl metodom (krezil-violet bojenje) obrađen svaki dvadeseti histološki rez (146) kako bi se potvrdila osnovna citoarhitektonska obilježja odabrane regije (Slika 4.2). Citoarhitektonska obilježja dodatno su potvrđena i na rezovima obojenim anti-NeuN protutijelom. Granice odabranih regija (BA9 i BA14r) utvrđene su na temelju relevantne literature (21, 22, 9, 27, 29, 47, 147–149).

Citoarhitektonska obilježja dorzolateralne regije BA9 su sljedeća: jasno definiran sloj II u odnosu na sloj I s ponekad manje jasno izraženim prijelazom prema sloju III, razvijen sloj III s izraženim podslojevima i prisutnim velikim piramidnim neuronima u podsloju IIIc, izražen sloj IV s donekle nepravilnom granicom prema slojevima III i V, razvijeni slojevi V i VI s jasnom podjelom u podslojeve (29, 137). Na histološkim rezovima BA9 zauzima područje vijuge, *gyrus frontalis superior*, a prema inferomedijalno graniči s poljem BA32 koje čini prijelaz prema agranularnom mezokortikalnom polju BA24 (Slika 4.2-A). Granica prema BA32 određena je po pojavi sljedećih značajki u BA32 u odnosu na BA9: nejasna granica između slojeva Ib i II, nešto manje izražene velike piramidne stanice u sloju IIIc, rjeđi i slabije izražen sloj IV (pogotovo na preparatima obojenim Nissl metodom) te nepravilnija granica sloja IV prema slojevima III i V (137, 148, 149).

Za razliku od BA9, orbitalna regija BA14r ima sljedeća citoarhitektonska obilježja: prisutan sloj II, nešto slabije razvijen sloj III (u usporedbi s BA9), prisutan, ali slabo razvijen sloj IV (disgranularna kora), iznimno razvijen sloj V s ekspanzijom podsloja Vb, prisutan sloj VI s jasnom podjelom u podslojeve VIa i VIb (9, 147). Prema kaudalno BA14r prelazi u polje BA14c koje obilježava potpuno nepostojanje sloja IV (agranularna kora) te slabo izražen i nejasno ograničen sloj II. Prema lateralno BA14r graniči s poljem 13b koje zauzima medijalni dio žlijeba, *sulcus olfactorius* i obilježeno je križnim (horizontalnim i radijarnim) staničnim prugama u slojevima III i V. Prema medijalno BA14r graniči s poljem 10m, a prema rostralno s poljem 11m. Polja 10m i 11m karakterizira tanak, ali jasno izražen sloj IV te time predstavljaju tipičnu granularnu koru što ih razlikuje od polja 14r (9). Iz navedenog slijedi da na histološkim rezovima BA14r zauzima vršak vijuge, *gyrus rectus* (Slika 4.2-B), a iako je tek u 21. stoljeću ova regija terminološki dobila naziv „polje 14r“, treba napomenuti da su još von Economo i Koskinas (1925.) prepoznali posebnost citoarhitektonske građe tog dijela ravne vijuge nazvavši ga unutarnjom modifikacijom polja *Area recta*, tj. polje FG_i (23–25).



Slika 4.2. Histološki rezovi prefrontalne moždane kore obojeni Nissl metodom. (**A**) Rez kroz tkivni blok koji sadrži vijugu, *gyrus frontalis superior* te vijugu, *gyrus cinguli*. Prikazane su granice Brodmannova polja 9. (**B**) Rez kroz tkivni blok koji sadrži vijuge, *gyrus rectus* i *gyrus orbitalis (lateralis)*. Prikazane su granice Brodmannova polja 14r.

4.2. Molekularne metode

4.2.1. Imunohistokemija

U istraživanju je korištena metoda indirektne imunofluorescencije u kojoj su primarna protutijela neobilježena, a na koja se vežu sekundarna protutijela obilježena fluoroforom (150–152). Za detekciju GABA-ergičkih interneurona korištena su primarna protutijela na CR, CB, PV i SOM. Detaljnija molekularna karakterizacija i stupanj preklapanja između različitih populacija GABA-ergičkih interneurona određeni su dvostrukim obilježavanjem (engl. *double labelling*), pri čemu su na istim rezovima kombinirana primarna protutijela na CR, CB, PV i SOM, u svim kombinacijama. Nadalje, svako od navedenih protutijela kombinirano je i s protutijelom na neuronalni nuklearni antigen NeuN koji obilježava gotovo sve kortikalne neurone.

Imunofluorescencija je rađena prema standardnom protokolu za parafinske rezove (153). Parafinski rezovi prvo su izloženi jakom izvoru svjetlosti (svjetlosna lampa koja daje svjetljivost/luminaciju od 6000 lumena) u vremenu od najmanje 48 h kako bi se smanjila količina lipofuscinske autofluorescencije na preparatima (154, 155). Rezovi su zatim deparafinizirani i dehidrirani prema standardnom protokolu (dva ispiranja u ksilolu, dva ispiranja u 100%-tnom etanolu, jedno ispiranje u 96%-tnom etanolu i jedno ispiranje u 70%-tnom etanolu). Rezovi su potom isprani u fosfatnom puferu (1x PBS, od engl. *phosphate-buffered saline*; pH = 7,4), a zatim je proveden postupak povratka antigena (engl. *antigen retrieval*) u citratnom puferu (pH = 6,0) (156). Nakon toga, rezovi su tri puta isprani u PBS-u te je proveden postupak blokiranja proteina (engl. *protein blocking*) kako bi se smanjila nespecifičnost vezanja sekundarnih protutijela. Korištena je otopina za blokiranje proteina sljedećeg sastava: normalni serum magarca (NDS, od engl. *normal donkey serum*; Chemicon, SAD) razrijeđen u omjeru 1:30 u otopini za permeabilizaciju koju čini 0,3%-tni Triton X-100 (Sigma-Aldrich, SAD) razrijeđen u 1x PBS-u. Rezovi su inkubirani u otopini za blokiranje proteina 1 h na sobnoj temperaturi, a potom su inkubirani 12 – 36 h na 4 °C u primarnim protutijelima (Tablica 4.2) razrijeđenim u PBS-u s 0,3%-tnim Triton X-100 i 1%-tnim NDS-om.

Tablica 4.2. Primarna protutijela korištena u imunohistokemijskim metodama.

Primarno protutijelo (klon)	**Životinjska vrsta i klonalnost**	**Proizvođač, kataloški broj i broj lota**	**Korišteno radno razrjeđenje**	**Minimalno trajanje inkubacije (h)**
anti-CR	miš; monoklonalno	Swant; kat. br. 6B3; lot 010399	1:1000	12
anti-PV	zec; poliklonalno	abcam; kat. br. ab11427; lot GR3317380-2	1:1000	12
anti-PV (PARV-19)	miš; monoklonalno	Sigma Aldrich; kat. br. MAB1572; lot 128M4891V	1:4000	36
anti-CB D-28k	zec; poliklonalno	Swant; kat. br. CB-38a; lot 9.03	1:10000	12
anti-CB D-28k	miš; monoklonalno	Swant; kat. br. 300; lot 07 (F)	1:3000	36
anti-CB (CB-955)	miš; monoklonalno	Sigma Aldrich; kat. br. C9848; lot 126M4810V	1:3000	36
anti-SOM-14	zec; poliklonalno	Penninsula; kat. br. T-4101.0500; lot A1819	1:4000	12
anti-SOM (7G5)	miš; monoklonalno	ThermoFisher (Invitrogen); kat. br. MA5-17182; lot VK3133146	1:2000	12
anti-NeuN	zec; poliklonalno	abcam; kat. br. ab104225; lot GR3370892-1	1:1000	12
anti-NeuN (A60)	miš; monoklonalno	Merck Milipore; kat. br. MAB377; lot 3278580	1:500	12
anti-nNOS	zec; poliklonalno	Merck Milipore; kat.br. AB5380; lot 3169861	1:6000	12
anti-MAP2 (HM-2)	miš; monoklonalno	Sigma Aldrich; kat. br. M4403; lot 118M4875V	1:1000	12
anti-neurofilament H, nefosforilirani (SMI-32)	miš; monoklonalno	Biolegend; kat. br. 801702; lot B244245	1:1000	12

Nakon inkubacije u primarnim protutijelima, rezovi su isprani tri puta u PBS-u i potom inkubirani 2 h na sobnoj temperaturi u sekundarnim protutijelima razrijeđenima u PBS-u (Tablica 4.3). Rezovi su zatim ponovno isprani tri puta u PBS-u te na 2 min prekriveni sredstvom za smanjivanje lipofuscinske i pozadinske autofluorescencije (TrueBlack Lipofuscin Autofluorescence Quencher, Biotium, SAD) koje se razrjeđuje u 70%-tnom etanolu u omjeru 1:20. Nakon toga su rezovi ponovno ispirani tri puta u PBS-u te pokriveni sredstvom za pokrivanje fluorescentnih histoloških rezova (VECTASHIELD® Antifade Mounting Medium, Vector Laboratories, SAD).

Tablica 4.3. Sekundarna protutijela korištena u imunohistokemijskim metodama.

Sekundarno protutijelo	**Životinjska vrsta**	**Proizvođač, kataloški broj i broj lota**	**Korišteno radno razrjeđenje**	**Minimalno trajanje inkubacije (h)**
visoko križno-adsorbirano anti-mišje Alexa 488	magarac	ThermoFisher (Invitrogen); kat. br. A-21202; lot 1915874	1:1000	2
visoko križno-adsorbirano anti-mišje Alexa 555	magarac	ThermoFisher (Invitrogen); kat. br. A-31570; lot 2253917	1:1000	2
visoko križno-adsorbirano anti-zečje Alexa 488	magarac	ThermoFisher (Invitrogen); kat. br. A-21206; lot 1182675	1:1000	2
visoko križno-adsorbirano anti-zečje Alexa 546	magarac	ThermoFisher (Invitrogen); kat. br. A10040; lot 1833519	1:1000	2

U obje analizirane regije (BA9 i BA14r) obojeno je po pet histoloških rezova (svaki deseti rez) iz svakog mozga anti-NeuN protutijelom u kombinaciji s anti-CR protutijelom, dok su za ostale kombinacije primarnih protutijela obojena po tri histološka reza (svaki deseti rez) iz obje regije svakog mozga.

Za svako primarno i sekundarno protutijelo napravljene su odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole.

4.2.2. RNA *in situ* hibridizacija

Za potvrdu neurotransmiterskog fenotipa glavnih populacija interneurona korištena je metoda RNAscope *in situ* hibridizacije (Advanced Cell Diagnostics, SAD) koja omogućava detekciju ciljane glasničke RNA (mRNA, od engl. *messenger RNA*) na histološkim preparatima. Detekcijom određene mRNA u stanici dokazuje se ekspresija traženog gena. Metoda koristi dvostruke Z probe koje se vežu na ciljanu RNA. Ako su se na željenu RNA sekvencu zajedno vezale dvije Z probe, na njih se veže preamplifikator. Na preamplifikator se potom vežu brojni amplifikatori, a na njih se vežu probe obilježene fluoroforom. Na taj način se signal značajno povećava što povećava osjetljivost metode – vezanje triju dvostrukih Z proba dovoljno je za detekciju jedne RNA molekule. Specifičnost metode osigurava uporaba dvostrukih proba – vezanje samo jedne probe ne dovodi do amplifikacije što smanjuje pozadinski signal. U istraživanju je korišten RNAscope® Fluorescent Multiplex Assay (Advanced Cell Diagnostics) koji omogućuje detekciju triju različitih mRNA istovremeno u tri kanala. U pojedinom kanalu se umjesto RNA *in situ* hibridizacije može napraviti imunofluorescencija za potvrdu da se detektirani eksprimirani gen u konačnici translatira u odgovarajući protein. Za potrebu karakterizacije GABA-ergičkih interneurona i definiranja njihovoga neurotransmiterskog fenotipa korištene su probe za detekciju mRNA nastale prepisivanjem (transkripcijom) sljedećih gena: *SLC32A1* (gena za vezikularni GABA transporter, VGAT), *SLC17A7* (gen za vezikularni glutamatni transporter, VGLUT1), *GAD1* (gen za glutamat-dekarboksilazu 67, GAD67), *GAD2* (gen za glutamat dekarboksilazu 65, GAD65), *SST* (gen za SOM), i *VIP* (gen za VIP) (Tablica 4.4).

Tablica 4.4. RNAscope probe korištene u ovom istraživanju.

Naziv probe	**Proizvođač i kataloški broj**	***Gen* (protein)**	**Kanal**
RNAscope® Probe-Hs-SLC32A1-C2	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 415681-C2; lot 20261C	*SLC32A1* (VGAT)	C2
RNAscope® Probe-Hs-SLC17A7-C3	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 415611-C3; lot 20261C	*SLC17A7* (VGLUT1)	C3
RNAscope® Probe-Hs-GAD1-C2	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 404031-C2; lot 21137B	*GAD1* (GAD67)	C2
RNAscope® Probe-Hs-GAD2-C3	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 415621-C3; lot 20211E	*GAD2* (GAD65)	C3
RNAscope® Probe-Hs-SST-C3	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 310591-C3; lot 21034C	*SST* (SOM)	C3
RNAscope® Probe-Hs-VIP-C2	Advanced Cell Diagnostics; kat. br. 452751-C2; lot 20182C	*VIP* (VIP)	C1

RNAscope *in situ* hibridizacija provedena je u skladu s protokolom proizvođača (Advanced Cell Diagnostics) (157–159). Parafinski rezovi su prvo tijekom minimalno 48 h izloženi jakom izvoru svjetlosti te deparafinizirani i dehidrirani prema ranije opisanom standardnom protokolu. Rezovi su potom isprani tri puta u PBS-u s dietil pirokarbonatom (DEPC, od engl. *diethyl pyrocarbonate*) te provedeni kroz prvi predtretman koji uključuje inkubaciju tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi u 3%-tnom vodikovom peroksidu. Rezovi su ponovno isprani tri puta u DEPC-PBS-u te je zatim proveden drugi predtretman koji uključuje povratak ciljnih molekula (engl. *target retrieval*) u otopini proizvođača (Target Retrieval Reagents, Advanced Cell Diagnostics; razrjeđenje 1:10 u destiliranoj vodi) na temperaturi od 100 °C kroz 8 min. Nakon još tri ispiranja u DEPC-PBS-u rezovi su dehidrirani dva puta po 2 min u 100%-tnom etanolu i osušeni na sobnoj temperaturi. U trećem i posljednjem predtretmanu rezovi su inkubirani 30 min na 40 °C u proteazi (Protease Plus Reagent, Advanced Cell Diagnostics) i zatim ponovno isprani tri puta u DEPC-PBS-u. Slijedi postupak hibridizacije u kojem su rezovi inkubirani 2 h na 40 °C u otopini željenih proba (engl. *probe mix*) (Tablica 4.4) i zatim isprani u puferu za ispiranje proizvođača (1x Wash buffer, Advanced Cell Diagnostics). U daljnjem postupku slijedi hibridizacija amplifikatora (AMP1 i AMP2 – po 30 min na 40 °C te AMP3 – 15 min na 40 °C s ispiranjima između po 2 min u Wash buffer puferu) te aplikacija fluorescentnih boja ovisno o korištenim probama i kanalima: TSA™ Plus Fluorescein (Akoya Biosciences, Mariborough, MA, SAD; kat. br. NEL741001KT, lot 200925005), TSA™ Plus Cyanine 3 System (Akoya Biosciences; kat. br. NEL744001KT, lot 201006036) i/ili TSA™ Plus Cyanine 5 System (Akoya Biosciences; kat. br. NEL745001KT, lot 200908025).

Za svaku analiziranu regiju napravljene su i odgovarajuće pozitivne i negativne kontrole. Pozitivna kontrola napravljena je pomoću humane trostruke pozitivne kontrolne probe (engl. *3-plex RNAscope® Positive Control Probe*) koja u kanalu 1 sadrži probu za *POLR2A* (engl. *DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB1*; niske razine ekspresije: 3 – 15 kopija po stanici), u kanalu 2 probu za *PPIB* (ciklofilin B; srednje razine ekspresije: 10 – 30 kopija po stanici), a u kanalu 3 probu za *UBC* (ubikvitin C; srednje do visoke razine ekspresije: >20 kopija po stanici). Negativna kontrola napravljena je pomoću trostruke negative kontrolne probe koja u svim kanalima sadrži probu za *DapB* gen iz bakterije *Bacillus subtilis*.

Nakon RNAscope *in situ* hibridizacije napravljena je, na istim rezovima, imunofluorescencija na jedan od markera interneurona. Za imunofluorescenciju korišten je prethodno opisani protokol, uz napomenu da se nakon RNAscope *in situ* hibridizacije započinje s postupkom blokiranja proteina.

4.3. Obrada i analiza histoloških preparata

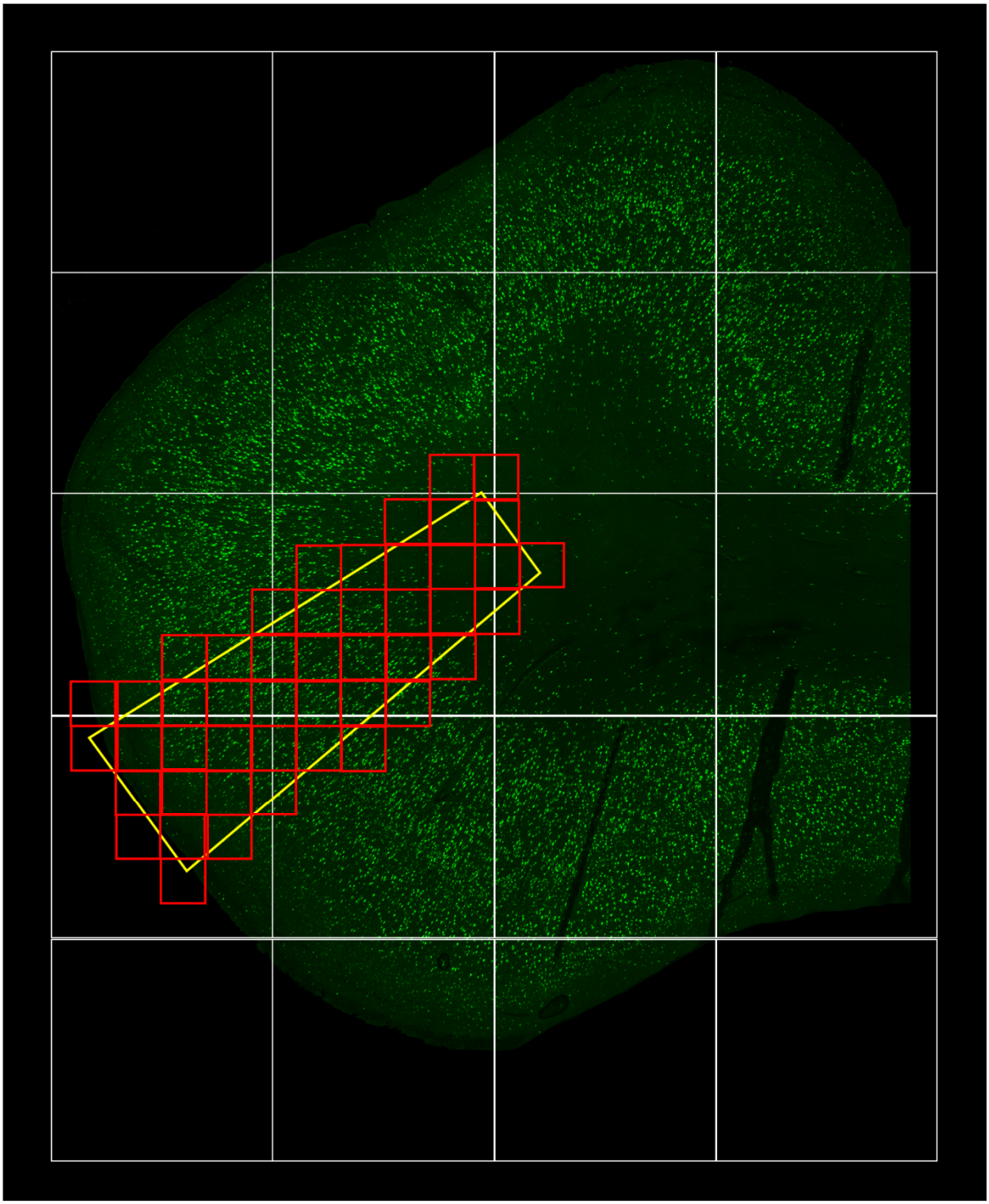
4.3.1. Snimanje histoloških preparata

Histološki preparati obrađeni imunofluorescencijom i RNAscope *in situ* hibridizacijom snimljeni su laserskim konfokalnim mikroskopom (Olympus FLUOVIEW FV3000RS, Japan) u Hrvatskom institutu za istraživanje mozga u Laboratoriju za konfokalnu mikroskopiju. Laserski konfokalni mikroskop omogućava snimanje fluorescentnih preparata u jednoj ili više konfokalnih ravnina, kao i snimanje cijele debljine preparata.

U prvom koraku snimanja, preparati su u cijelosti snimljeni u jednoj konfokalnoj ravnini na malom povećanju (4x) kako bi se utvrdila osnovna morfološka i citoarhitektonska obilježja reza te odredila regija od interesa (engl. *region of interest*). Snimka preparata na malom povećanju služi kao mapa za snimanje regije od interesa na većem povećanju (Slika 4.3).

U drugom koraku snimanja, na velikom je povećanju (20x) snimljena cijela regija od interesa koristeći značajku mapiranja preparata. To je učinjeno tako da je na mapi preparata (snimljenoj na malom povećanju) ručno ocrtana regija od interesa. Zatim je računalni program preračunao ocrtanu regiju od interesa u vidna polja za objektiv od 20x koja je potrebno snimiti da bi se na konačnoj snimci vidjela cijela regija od interesa (u prosjeku 30 – 50 vidnih polja po preparatu) (Slika 4.3). Automatizirano postolje mikroskopa pomiče preparat kako bi se snimanjem obuhvatila cijela regija od interesa. U svakom vidnom polju preparat je snimljen u četiri konfokalne ravnine (cijela debljina preparata, razmak između konfokalnih ravnina: 5 μm) u rezoluciji 1024x1024 piksela (čime je generirana slika sa skaliranjem od 0,6215 μm/piksel).

Za dvostruko ili višestruko obojene preparate odabiru se odgovarajući laseri, ovisno o korištenim fluoroforima, a snimanje se vrši na detektorima visoke rezolucije u jednoj ili više faza. Također, koristi se sekvencijalno snimanje (engl. *Sequential scan*) kako bi se izbjeglo tzv. „probijanje“ (engl. *bleed-through*) fluorescencije iz jednog u drugi kanal zbog djelomičnog preklapanja ekscitacijskih i emisijskih spektara korištenih fluorofora.



Slika 4.3. Prikaz snimanja fluorescentnog preparata na konfokalnom mikroskopu. Bijeli kvadrati predstavljaju pojedinačna vidna polja 4x objektiva koja su nakon snimanja spojena u jedinstvenu sliku mape preparata. Žutom bojom označeno je ručno ocrtano područje snimanja na 20x objektivu u četiri konfokalne ravnine. Crveni kvadrati predstavljaju računalno generirana vidna polja 20x objektiva koja pokrivaju ručno ocrtano područje snimanja.

Po završetku snimanja računalni program (Fluoview Software, Olympus) stvara integralnu sliku spajanjem snimki iz pojedinačnih vidnih polja (engl. *stitching*). Konačno, iz svake konfokalne ravnine u računalnom su programu za obradu konfokalnih snimki (cellSens, Olympus LS, Japan) izdvojene točke najvećeg intenziteta (engl. *maximum intensity Z projection*) kako bi se napravila kompozicijska slika s prikazom cijele debljine preparata.

4.3.2. Kvalitativna analiza histoloških rezova

U PFC-u se daleko najveći broj GABA-ergički kortikalnih interneurona nalazi u supragranularnim slojevima. Supragranularni slojevi ključni su za asocijacijske (kortiko-kortikalne) veze koje se smatraju važnima za složene funkcije PFC-a. Stoga su supragranularni slojevi odabrani za iscrpnu analizu. Također, s obzirom na pretpostavljene specifičnosti supragranularnih slojeva, rezultati analize uspoređeni su s rezultatima analize infragranularnih slojeva.

Kvalitativna analiza i digitalna obrada konfokalnih snimki napravljena je pomoću programa Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) (160) i Adobe Photoshop (Adobe Inc., Kalifornija, SAD).

Za razliku od mikrofotografija klasičnih histoloških preparata, konfokalne snimke fluorescentnih preparata obilježava značajka da se signal i pozadina (engl. *background*) mogu razdvojiti na temelju razlike u intenzitetu. Kod kvalitetne konfokalne snimke uspješnog fluorescentnog bojenja, signal ima značajno veći intenzitet od pozadine. Dijelovi tkiva koji pak nespecifično vežu sekundarno protutijelo/fluorescentnu boju ili tvari koje autofluoresciraju (primjerice lipofuscin, kolagen ili fiksativ u strukturi samog tkiva) imaju tipično veći intenzitet od signala reaktivnih stanica te pokazuju jednako veliki intenzitet signala u svim kanalima. Na temelju navedenih svojstava konfokalnih snimki, može se binarizacijom slike u crno-bijelu i odabirom praga (engl. *treshold*) intenziteta računalno izdvojiti specifični signal od pozadine i nespecifičnog signala.

Kvalitativnom analizom rezova obojenih imunofluorescencijom i rezova obojenih RNAscope *in situ* hibridizacijom utvrđeno je sljedeće u Brodmannovim poljima 9 i 14r:

a) stupanj koekspresije različitih molekularnih biljega kortikalnih interneurona,
b) molekularna obilježja i neurotransmiterski fenotip različitih populacija kortikalnih interneurona,
c) raspodjela tijela neurona i živčanih vlakana različitih populacija kortikalnih interneurona po slojevima.

Raspodjela tijela neurona po slojevima prikazana je grafički u obliku točkastih dijagrama (engl. *dot plot*) koji prikazuju prostornu raspodjelu različitih populacija kortikalnih interneurona po slojevima moždane kore.

Raspodjela živčanih vlakana po slojevima prikazana je grafički u obliku toplinske skale (engl. *heat map*).

4.3.3. Kvantitativna analiza histoloških rezova

Kvantitativna analiza histoloških rezova provedena je u programima Neurolucida 2020 (MBF Bioscience, Williston, Vermont, SAD) i Neurolucida Explorer (MBF Bioscience).

4.3.3.1. Ocrtavanje područja za kvantifikaciju

Kvantitativna obrada rezova obojenih imunofluorescencijom provedena je na konfokalnim snimkama opisanim ranije. Na svakom rezu u konfokalnom modulu Neurolucida programa određena je kolumna za brojenje unutar odgovarajućega Brodmannova polja. Budući da je NeuN marker isključivo živčanih stanica, anti-NeuN bojenje, za razliku od Nissl bojenja koje prikazuje i glija stanice, vrlo je pogodno za razlučivanje slojeva moždane kore, a pogotovo za određivanje sloja IV te podslojeva sloja I (Ia i Ib). Stoga je svaka kolumna za brojenje ocrtana na rezovima obojenim anti-NeuN protutijelom na način da na pijalnoj površini bude širine 1000 μm, a prema dubini prati usmjerenje neurona. Kolumna za brojenje sastojala se od pojedinačnih kontura (obrisa) gdje je svaka kontura ocrtavala jedan sloj, odnosno podsloj. Za rezove koji nisu bojeni anti-NeuN protutijelom korištene su konture sa susjednih rezova obojenih anti-NeuN protutijelom.

Svaki pojedini sloj moždane kore analiziran je zasebno, s time da je sloj I u analizi dodatno podijeljen na podslojeve Ia i Ib. To znači da su na pojedinom rezu analizirana sljedeća područja od interesa – slojevi Ia, Ib, II, III, IV, V i VI.

4.3.3.2. Kvantifikacija neurona obilježenih molekularnim biljezima

Unutar kontura (slojeva) u Neurolucida programu reaktivni neuroni (prikazani imunofluorescencijom ili RNAscope *in situ* hibridizacijom) obilježe se markerima. Svakom molekularnom biljegu dodijeljen je različiti marker u Neurolucida programu. Obilježavanje reaktivnih neurona markerima napravljeno je na sljedeći način. Program Neurolucida pomoću funkcije „pronalaženje stanica“ (engl. *Detect cells*) može računalnim algoritmom na konfokalnoj snimci detektirati tijela stanica. Ulazni parametri za tu funkciju su: regije od

interesa (konture koje predstavljaju slojeve moždane kore), kanal za analizu (zeleni, crveni ili plavi), maksimalni i minimalni promjer stanice (najveća i najmanja struktura koja se detektira kao stanica) te prag koji određuje granicu intenziteta između toga što program prepoznaje kao signal i što prepoznaje kao pozadinu. U prikazu za pregled (engl. *preview*) program prikazuje što je obilježeno kao stanica te nudi opciju dodatnog podešavanja parametara detekcije. Promjere stanica dovoljno je odrediti jednom na reprezentativnim rezovima, dok je prag potrebno povremeno prilagoditi koristeći prikaz za pregled, budući da se intenzitet signala između različitih rezova može znatno razlikovati. Nakon što se u prikazu za pregled dobije željeni rezultat (program prepoznaje većinu reaktivnih tijela stanica), program obilježi tijela stanica odabranim markerom. Dobiveni rezultati se još jednom provjere u cijeloj kolumni za brojenje i ručno se isprave eventualno krivo označene ili preostale neoznačene stanice. Na dvostruko obojenim rezovima cijeli postupak se potom ponovi za drugi molekularni biljeg, odnosno za drugi kanal konfokalne snimke.

Postupak kvantifikacije završava označavanjem kolokalizacijskog markera tako da se zada parametar koliko najviše dva markera mogu biti udaljeni jedan od drugoga da bi se smatrali kolokaliziranima (za kortikalne interneurone optimalna vrijednost jest 10 μm, budući da to odgovara prosječnom promjeru tijela kortikalnih interneurona) te program potom na mjestima koja zadovoljavaju navedeni kriterij automatski stavlja kolokalizacijski marker. Na kraju je potrebno još jednom provjeriti kolokalizacijske markere kako bi se potvrdilo da je zaista riječ o kolokalizaciji, budući da se ponekad dvije stanice, koje se nalaze jedna iznad druge, mogu lažno registrirati kao kolokalizacija.

Nakon kvantifikacije u Neurolucida programu, konture i oznake se analiziraju u programu Neurolucida Explorer koji računa broj pojedinih markera po konturi (sloju) te površinu pojedine konture. Iz navedenih podataka može se izračunati površinska gustoća pojedinog markera kao omjer broja markera u konturi i površine konture. Ovaj parametar razlikuje se od gustoće po kortikalnoj površini (broj stanica po površini moždane kore) – riječ je isključivo o parametru koji uprosječuje broj neurona s obzirom na veličinu konture što omogućuje usporedbu brojeva neurona na različitim rezovima, budući da se površina konture donekle razlikuje između histoloških rezova. Osim toga, površinska gustoća neurona ne odgovara stvarnoj volumnoj gustoći neurona u tkivu, iako postoji određen stupanj korelacije između ovih dvaju parametara.

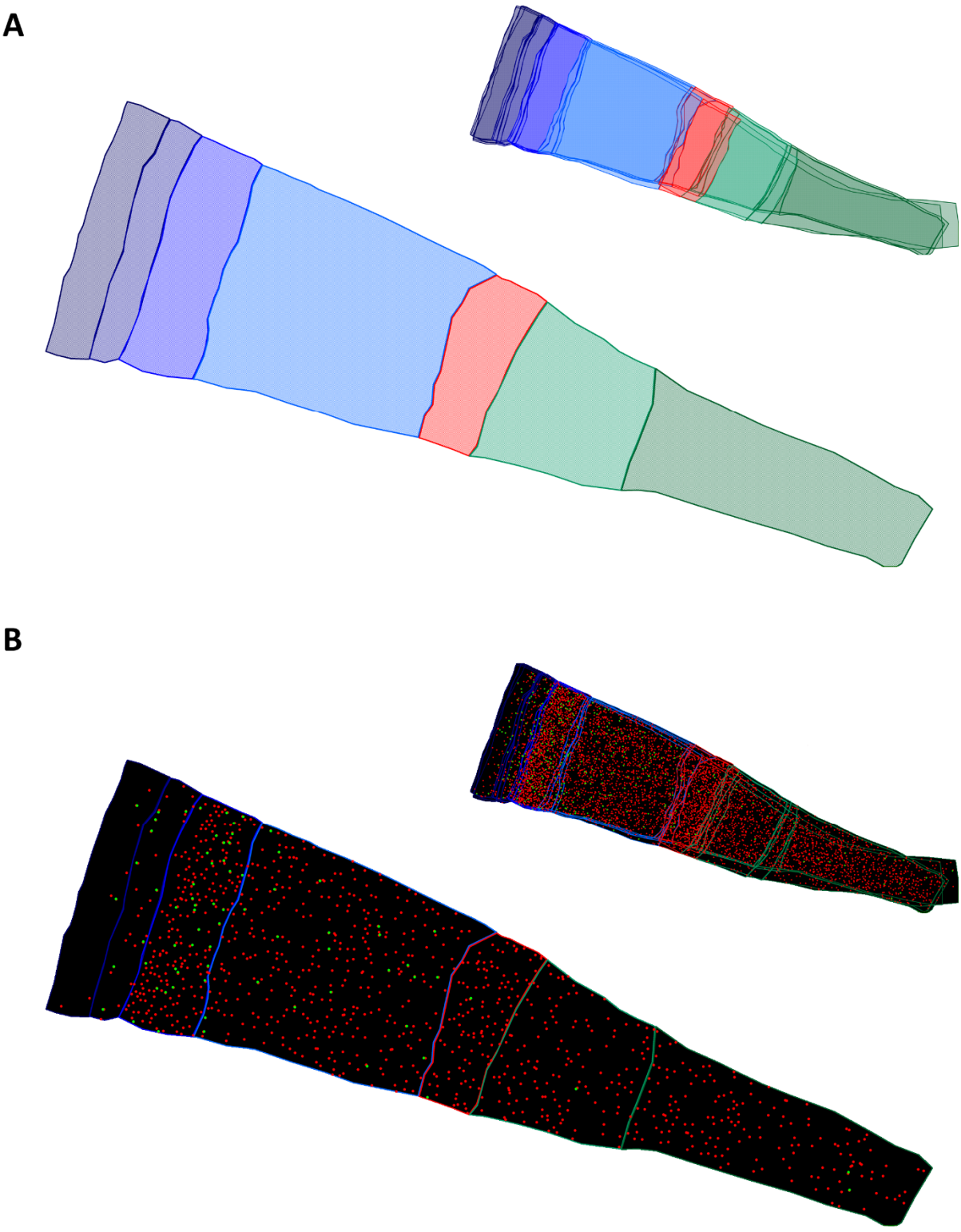
Kod kvantitativne analize Z-projekcija konfokalnih snimki treba imati u vidu da ne postoji mogućnost korištenja fizičkog ili optičkog disektora čime bi se dobio stereološki točan broj stanica u volumenu tkiva. Naime, bez korištenja metode disektora, brojenje profila stanica/objekata (engl. *profile count*) neminovno dovodi do većeg ili manjeg prekomjernog brojenja (engl. *overcount*) objekata u histološkom rezu. Riječ je o sustavnoj greški karakterističnoj za histološke rezove, a posljedica je činjenice da se prilikom rezanja tkiva dio objekata/stanica prereže na način da njihovi profili budu vidljivi na više histoloških rezova (161). Ta je greška manja što je debljina reza u odnosu na visinu objekta veća, a veličina greške može se procijeniti Abercrombievom formulom (162) prema kojoj vrijedi sljedeća zakonitost:

$$\text{stvarni broj objekata} = \text{broj objekata dobiven brojenjem} \times \frac{\text{debljina reza}}{\text{debljina reza} + \text{prosječan promjer objekata u Z-osi}}.$$

Kada je debljina reza 20 μm, a prosječan promjer neurona u Z-osi iznosi 10 μm (kao što je slučaj kod gotovo svih interneurona i velikog broja ostalih neurona u supragranularnim slojevima), onda će broj neurona dobiven brojenjem profila na snimci pojedinog reza biti oko 50 % veći od stvarnog broja neurona.

Za konture iz istog bloka tkiva može se u programu Neurolucida (pomoću funkcije „upravitelj serijskih rezova“, engl. *Serial section manager*) zadati da je riječ o serijskim rezovima pri čemu se upisuju podatci o debljini reza i razmaku između analiziranih rezova (svaki deseti rez). Konture se zatim poravnavaju (engl. *alignment*) na način da se referentne točke na vrhovima kontura preklope na susljednim rezovima (Slika 4.4). Iz navedenih podataka, uzimajući u obzir i Abercrombievu korekciju, u programu Neurolucida Explorer može se izračunati i procijenjeni broj neurona u volumenu.

Neovisno o veličini, sustavna greška histološkog reza ne utječe na daljnje analize, budući da se ovim istraživanjem određuje udio glavnih populacija GABA-ergičkih interneurona na dvostruko obojenim histološkim rezovima. To znači da je za kvantitativnu analizu u ovom istraživanju ključan podatak omjer broja različitih markera u istoj konturi – u slučaju kad je većina stanica podjednake veličine, pretjerano brojenje svakog od molekularnih biljega bit će podjednako izraženo, što znači da će omjer broja označenih markera na pojedinom rezu odgovarati omjeru stvarnog broja stanica.



Slika 4.4. **(A)** Ocrtavanje slojeva moždane kore u programu Neurolucida. Umanjena slika prikazuje poravnavanje kontura serijskih rezova iz istog tkivnog bloka. (**B**) Primjer postupka kvantifikacije reprezentativnog histološkog reza. Konture različitih boja predstavljaju slojeve moždane kore, a crveni i zeleni markeri imunoreaktivne stanice. Umanjena slika predstavlja serijske rezove iz istog tkivnog bloka.

Kvantitativnom analizom dvostruko obojenih rezova utvrđeno je sljedeće u supragranularnim slojevima Brodmannovih polja 9 i 14r:

a) udio CR^+, PV^+, CB^+ i SOM^+ neurona u ukupnom broju neurona ($NeuN^+$),
b) omjer broja pojedinih populacija kortikalnih interneurona (CR/PV, CR/CB, CR/SOM, PV/CB, PV/SOM i CB/SOM).

4.3.3.3. Morfometrijska analiza kortikalnih interneurona

Morfometrijska analiza kortikalnih interneurona napravljena je u Neurolucida programu na način da su na konfokalnim snimkama rekonstruirana tijela kortikalnih interneurona. Kriterij za odabir neurona za rekonstrukciju jest da je tijelo neurona vidljivo u cijelosti, odnosno da su vidljivi najproksimalniji dijelovi dendrita. Rekonstrukcija je napravljena tako da je ručno ocrtana kontura oko obrisa tijela neurona.

Rekonstruirana su tijela ukupno 1638 kortikalnih interneurona koji su zadovoljavali kriterije za rekonstrukciju, od toga 511 CR^+, 359 PV^+, 216 CB^+ i 552 SOM^+ neurona, a morfometrijski parametri tijela neurona analizirani su zbirno i po slojevima.

U morfometrijsku analizu uključeni su sljedeći parametri:

1. površina tijela (engl. *Area*) – površina (u μm^2) unutar ocrtane konture tijela neurona;
2. aspektni omjer (engl. *Aspect ratio*) – omjer najmanjeg i najvećeg promjera konture tijela neurona, može poprimiti vrijednosti u intervalu $\langle 0,1]$, pri čemu manji aspektni omjer odgovara izduženijem obliku tijela neurona;
3. kružnost (engl. *Roundness*) – parametar koji opisuje koliko je kontura bliska obliku kruga, računa se kao [kompaktnost]^2 (engl. *Compactness*) gdje je

$$\text{kompaktnost} = \frac{\sqrt{\frac{4}{\pi} \times \text{površina}}}{\text{maksimalni promjer}}.$$

   Kružnost može poprimiti vrijednost u intervalu $\langle 0,1]$, pri čemu veća kružnost odgovara tijelu neurona sličnijem krugu.

4.4. Statistička analiza

Statistička analiza podataka napravljena je u GraphPad Prism programu, inačica 9.2.0 (GraphPad Software, La Jolla, SAD).

4.4.1. Analiza raspodjele podataka i deskriptivna statistika

Na početku statističke analize, analizirana je raspodjela podataka u programu GraphPad Prism. Program GraphPad Prism za danu skupinu podataka provodi četiri testa normalnosti raspodjele i četiri testa log-normalnosti raspodjele te na temelju metode najveće vjerojatnosti (engl. *maximum likelihood method*) računa procjenu koliko je vjerojatno da su podatci uzorkovani iz populacije s normalnom, odnosno log-normalnom raspodjelom (ili nijednom od tih dviju raspodjela).

Podatci koji se odnose na različite mozgove za koje je utvrđeno da je vjerojatnija normalna raspodjela prikazani su kao aritmetička sredina ± standardna devijacija (SD) i medijan s interkvartilnim rasponom (IQR, od engl. *interquartile range*).

Podatci za koje je utvrđena vjerojatnija log-normalna raspodjela prikazani su kao geometrijska sredina ×÷ geometrijska standardna devijacija (GSD, engl. *geometric standard deviation factor*) i medijan s IQR-om.

U grafičkom prikazu raspodjela podataka korišteni su točkasti dijagrami raspršenja (engl. *scatter dot plots*) i pravokutni dijagrami (engl. *box plots*; *box and whiskers plots*).

Za morfometrijske podatke izračunate su i standardizirane mjere raspršenja: koeficijent varijacije (CV, od engl. *coefficient of variation*) i kvartilni koeficijent raspršenja (QCD, od engl. *quartile coefficient of dispersion*). Standardiziranim mjerama raspršenja mogu se okarakterizirati eventualne razlike u raspršenju različitih morfometrijskih parametera te specifičnosti u morfološkoj varijabilnosti različitih populacija kortikalnih interneurona.

4.4.2. Analiza kompozitnih podataka

Udjeli pripadaju vrsti podataka koji se nazivaju kompozitnim podatcima. Kompozitni podatci sadrže informaciju o relativnoj frekvenciji pojavnosti pojedine komponente, ali ne sadrže informaciju o stvarnoj/apsolutnoj frekvenciji pojedine komponente (npr. kompozitni podatak ne sadrži informaciju o točnom broju pojedine populacije interneurona i ukupnom broju neurona, ali sadrži informaciju o njihovom omjeru, tj. udjelu određene populacije interneurona u ukupnom broju neurona).

Nadalje, zbroj svih kompozitnih podataka određenog skupa mora biti 1 (engl. *constant sum constraint*), odnosno 100 %, a broj stupnjeva slobode definiran je kao broj sastavnica kompozicije umanjen za jedan (163, 164). Primjerice, ako su poznate vrijednosti za četiri populacije interneurona, bilo koje tri proporcije u potpunosti definiraju navedeni skup.

Osnovne pretpostavke analize kompozitnih podataka su sljedeće: analiza ne smije ovisiti o korištenoj skali (engl. *scale invariance*), analiza ne smije ovisiti o redoslijedu komponenti u kompoziciji (engl. *permutation invariance*) i analiza o pojedinom podskupu podataka mora ovisiti isključivo o podatcima o komponentama unutar tog podskupa, tj. rezultati analize unutar podskupa moraju biti isti kao i za cijeli skup (supkompozicijska koherencija, engl. *subcompositional coherence*) (163, 164). Načelo supkompozicijske koherencije nalaže da ako se, primjerice, međusobno uspoređuju samo dvije populacije interneurona, usporedba mora biti valjana bez obzira što nisu uključeni podatci o ostalim populacijama interneurona.

Prikaz kompozitnih podataka u podskupu kao mjere centralne tendencije s raspršenjem narušava načelo supkompozicijske koherencije. Primjerice, ako ukupan broj inhibicijskih interneurona nije poznat, a dostupni molekularni biljezi za populacije interneurona (CR, PV, CB, SOM) ne obilježavaju sve interneurone, onda sve obilježene populacije predstavljaju podskup unutar skupa „interneuroni“. U takvom podskupu primjereno je prikazivati omjere između pojedinih komponenti podskupa (npr. omjer CR^+ i PV^+ neurona), budući da ti omjeri zadovoljavaju načelo subkompozicijske koherencije (omjer je u istom uzorku uvijek isti, neovisno o tome kako se definiraju skup i podskupovi).

Ako pak postoji molekularni biljeg kojim se može obilježiti čitav odabrani skup (npr. kortikalni neuroni mogu se gotovo svi prikazati NeuN biljegom), onda se može prikazati mjera centralne tendencije s raspršenjem za komponente skupa (npr. može se iskazati prosječni udio CR^+ neurona u ukupnom broju neurona), ali treba imati u vidu da se ti podatci ne mogu koristiti za usporedbe s podatcima u podskupu.

Kompozitni podatci grafički su prikazani kružnim dijagramima (engl. *pie chart*, *doughnut chart*), kompozitnim stupčastim dijagramima (engl. *compositional bar chart*), dijagramima raspršenja omjera (engl. *scatterplot of ratios*) i ternarnim dijagramima (engl. *ternary diagram*) (163, 164). Ternarni dijagram jest jednakostranični trokut čiji vrhovi predstavljaju komponente cjelokupne kompozicije (npr. tri populacije kortikalnih interneurona). Točke

bliže određenom vrhu imaju veći udio komponente koju predstavlja taj vrh, dok točke u blizini težišta trokuta imaju podjednaki udio svih komponenti.

4.4.3. Statistički testovi

U daljnjoj statističkoj analizi, podatci iz istog mozga razmatrani su kao zavisni uzorci, a statističkim značajnom za sve statističke testove smatrana je *P*-vrijednost < 0,05.

Za testiranje razlika u udjelima pojedinih populacija interneurona u ukupnom broju neurona između Brodmannovih polja korišten je upareni t-test. Za testiranje razlika u omjerima pojedinih populacija interneurona (npr. CR/PV) između Brodmannovih polja korišteni su upareni t-test i upareni t-test omjera (engl. *ratio t-test*).

Za testiranje razlika u udjelima između različitih populacija interneurona unutar pojedinoga Brodmannova polja korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, od engl. *analysis of variance*) ponovljenih mjerenja s Tukeyjevim *post hoc* testom.

Za testiranje razlika u udjelima pojedinih populacija interneurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva korišten je upareni t-test.

Za testiranje razlika u morfometrijskim parametrima između supragranularnih i infragranularnih slojeva korišteni su Welchov t-test za podatke s normalnom raspodjelom (parametri kružnost i aspektni omjer) i Mann Whitneyev test za podatke s lognormalnom raspodjelom (parametar površina tijela).

Za testiranje razlika u morfometrijskim parametrima između različitih populacija kortikalnih interneurona korišteni su jednosmjerna ANOVA s Tukeyjevim *post hoc* testom za podatke s normalnom raspodjelom i Kruskal-Wallisov test s Dunnovim *post hoc* testom za podatke s lognormalnom raspodjelom.

U grafičkim prikazima razlika su, osim odgovarajuće mjere centralne tendencije, prikazani i 95%-tni intervali pouzdanosti (CI, od engl. *confidence interval*). Za grafički prikaz razlika između Brodmannovih polja korišteni su procjenski dijagrami (engl. *estimation plots*).

5. REZULTATI

5.1. Citoarhitektonska građa Brodmannovih polja 9 i 14r u čovjeka

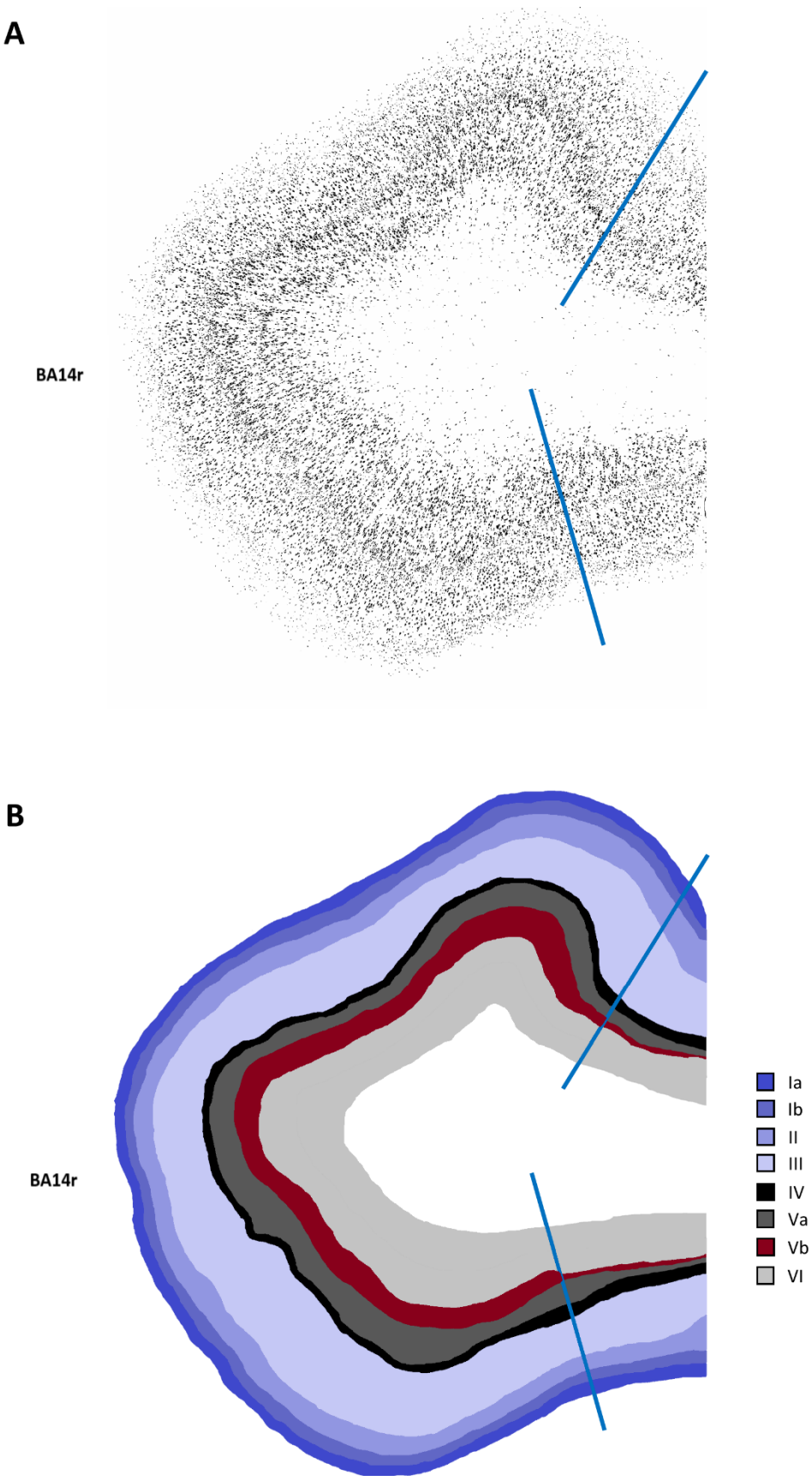
Citoarhitektonska građa BA9 i BA14r detaljno je analizirana na anti-NeuN bojenju. Određivanje granica BA9 bilo je jednostavno budući da to polje na odabranim tkivnim blokovima zauzima čitavu gornju čeonu vijugu pa je analiza provedena na dijelu BA9 u središtu/kupoli gornje čeone vijuge. Određivanje granica BA14r bilo je nešto složenije budući da to polje zauzima samo središnji dio ravne vijuge. Ključna citoarhitektonska razlika između BA14r i okolnih polja PFC-a jest prisutnost izraženog podsloja Vb u BA14r (Slika 5.1). Analiza BA14r provedena je u središtu polja koje se nalazi u samoj kupoli ravne vijuge.

Ključne razlike u citoarhitektonskoj građi BA9 i BA14r su (Tablica 5.1, Slika 5.2 i Slika 5.3):

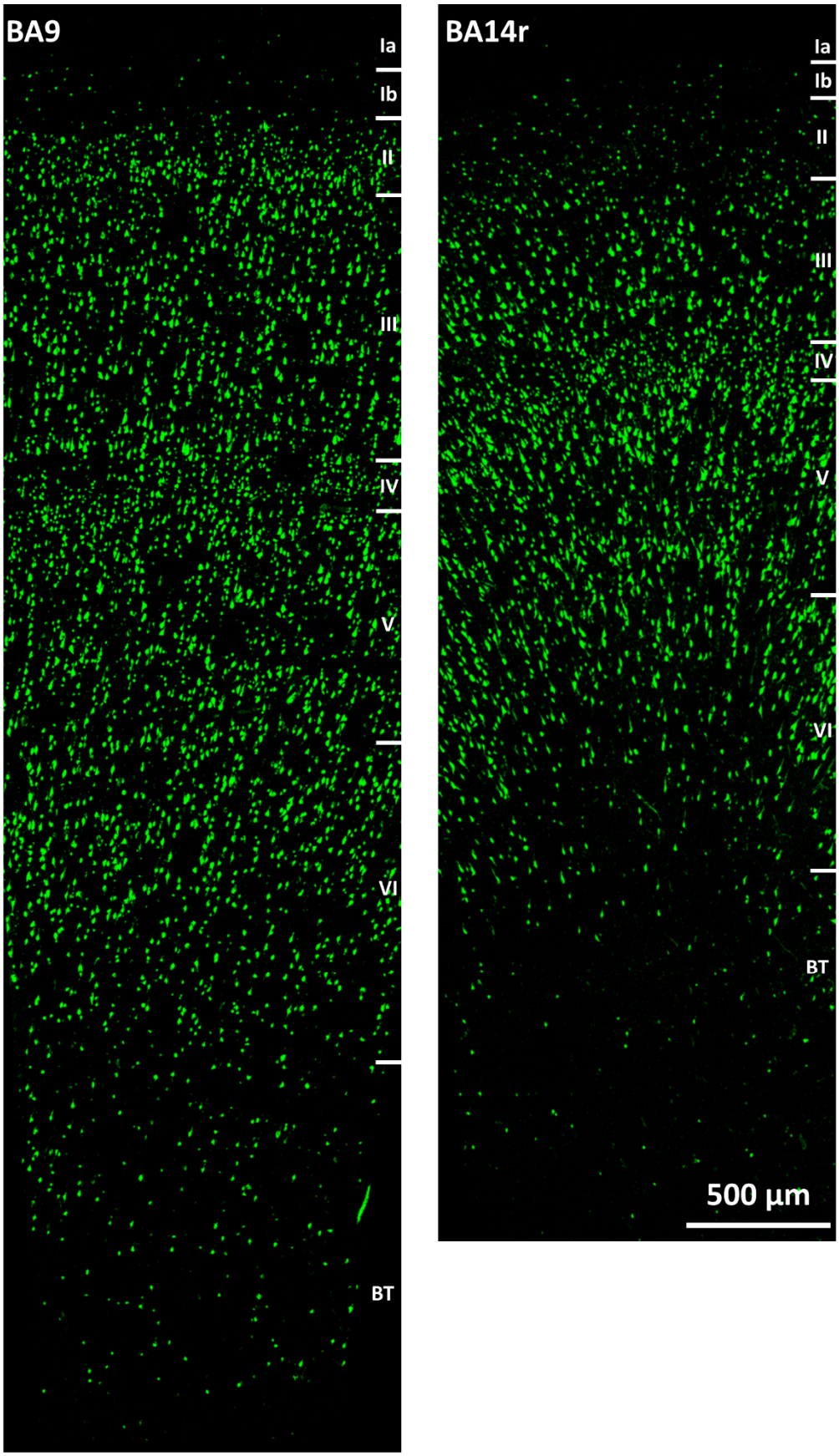
1. BA9 ima jasnije ograničen sloj II prema okolnim slojevima s izraženijom imunoreaktivnošću stanica na NeuN,
2. BA9 sadrži velike piramidne stanice u sloju IIIc koje su tek sporadično prisutne u BA14r,
3. BA9 ima nešto izraženiji i jasnije ograničen sloj IV,
4. BA14r ima izraženiji sloj V s ekspanzijom podsloja Vb.

Tablica 5.1. Usporedba citoarhitektonskih obilježja Brodmannovih polja 9 i 14r.

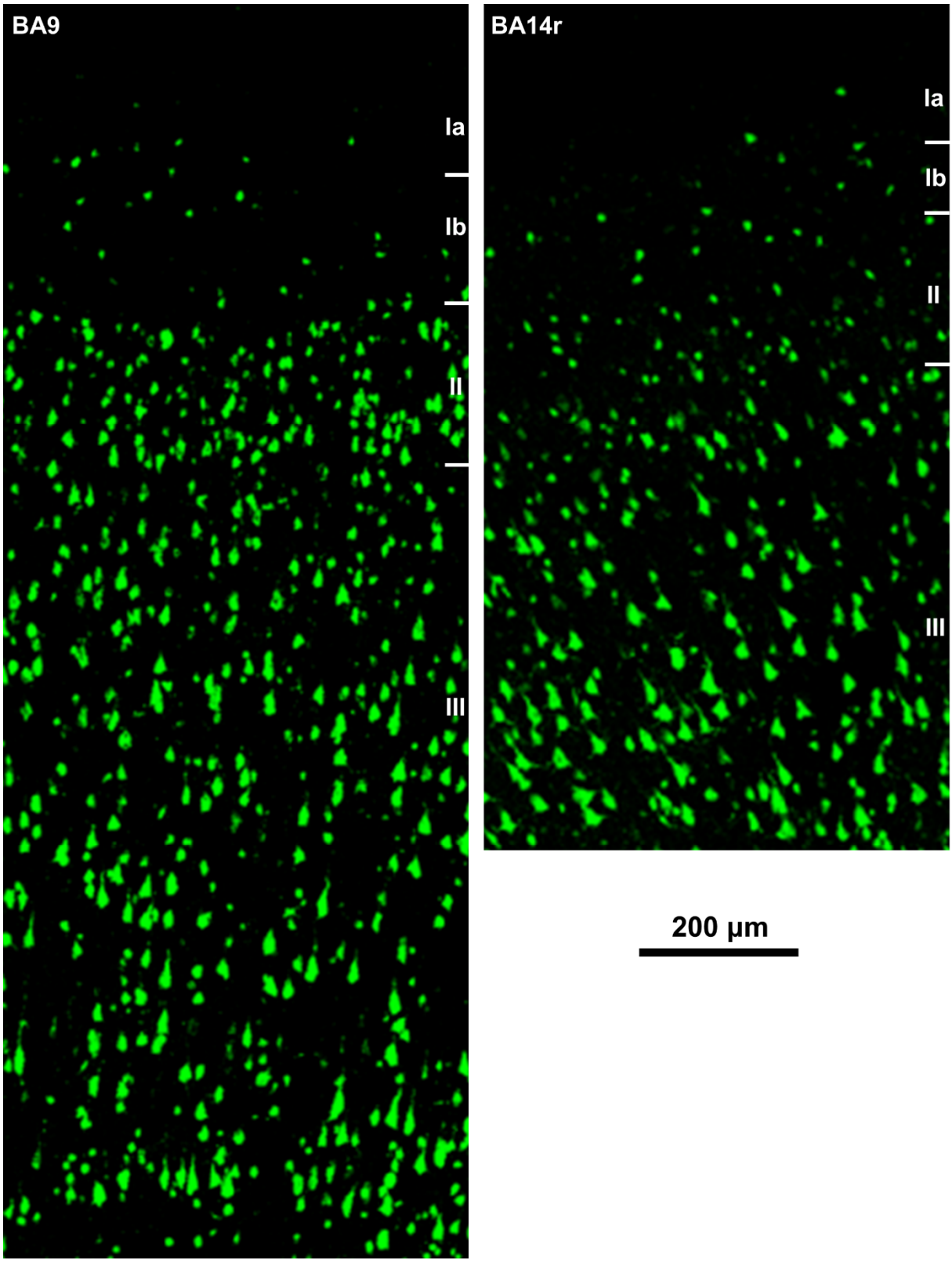
	Brodmannovo polje 9	**Brodmannovo polje 14r**
Sloj I	jasno podijeljen na podslojeve Ia i Ib	podijeljen na podslojeve Ia i Ib, postepeniji prijelaz između podslojeva
Sloj II	jasno definiran s izraženom granicom prema sloju I i većinom jasnom granicom prema sloju III; pravilno raspoređene stanice	prisutan, ali s manje jasnom granicom prema slojevima I i III; raspored stranica manje pravilan; slabija imunoreaktivnost na NeuN
Sloj III	vrlo izražen, jasno podijeljen na podslojeve, u sloju IIIc dominiraju velike piramidne stanice	izražen, podjela u podslojeve manje jasna, sporadično se nalaze velike piramidne stanice
Sloj IV	prisutan i dobro ograničen prema slojevima III i V	prisutan, ali nejasno ograničen prema slojevima III i V
Sloj V	razvijen i može se podijeliti u podslojeve Va i Vb	izrazito razvijen i jasno podijeljen u podslojeve Va i Vb s ekspanzijom podsloja Vb
Sloj VI	razvijen i može se podijeliti u podslojeve VIa i VIb	razvijen i jasno podijeljen u podslojeve VIa i VIb, jasnija granica prema bijeloj tvari



Slika 5.1. (**A**) Binarizirana konfokalna snimka anti-NeuN bojenja vijuge, *gyrus rectus*. (**B**) Rekonstrukcija slojeva moždane kore unutar vijuge, *gyrus rectus*. U BA14r izražen je podsloj Vb.



Slika 5.2. Konfokalna snimka anti-NeuN obojenih histoloških rezova s prikazom citoarhitektonske građe Brodmannovih polja 9 i 14r.



Slika 5.3. Konfokalna snimka anti-NeuN obojenih histoloških rezova s detaljnim prikazom citoarhitektonske građe supragranularnih slojeva Brodmannovih polja 9 i 14r. Slika prikazuje uvećane iste rezove kao i slika 5.2.

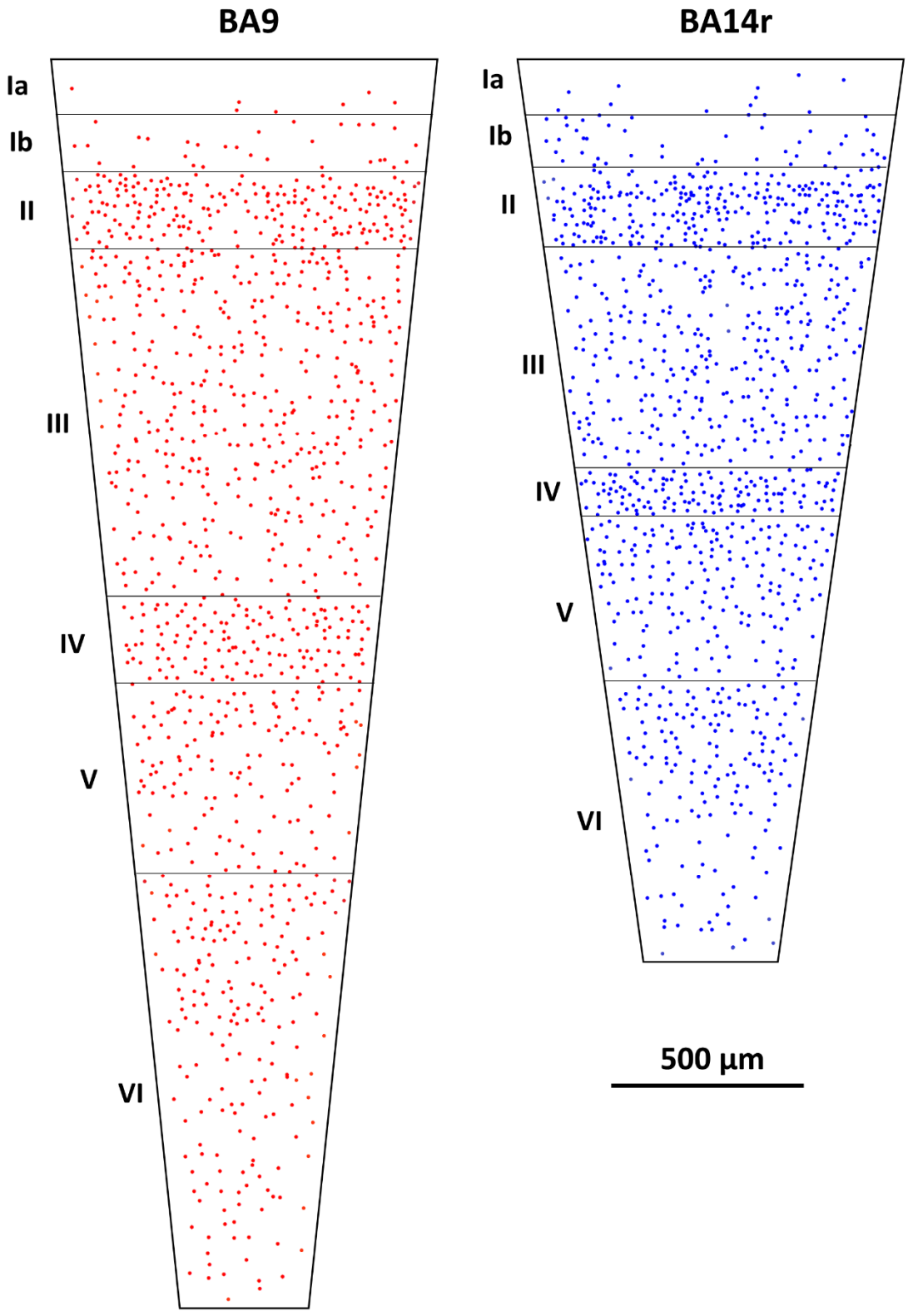
Ukupna debljina moždane kore (mjerena od pijalne površine do granice sloja VI prema bijeloj tvari) u prosjeku je veća u BA9 (3,27 ± 0,37 mm) nego u BA14r (2,21 ± 0,16 mm). Debljina supragranularnih slojeva veća je u BA9, prvenstveno na račun izrazito razvijenog sloja III (Tablica 5.2). U BA14r izražen je sloj V (s podslojem Vb) koji je približno iste debljine u oba polja, ali u BA14r čini veći udio ukupne debljine moždane kore (Slika 5.4).

Nadalje, procijenjena prosječna gustoća $NeuN^+$ stanica zbirno za sve slojeve moždane kore bila je veća u BA14r (17 940 ± 1 580 stanica/mm^3) u odnosu na BA9 (15 560 ± 1 870 stanica/mm^3), s time da ova razlika nije bila statistički značajna (P = 0,1425; upareni t-test). Procijenjena gustoća $NeuN^+$ stanica supragranularnih slojeva također je bila veća u BA14r nego u BA9 (Tablica 5.2), ali razlika ponovno nije bila statistički značajna (P = 0,1577).

Tablica 5.2. Prosječna debljina supragranularnih slojeva Brodmannovih polja 9 i 14r te procijenjena prosječna gustoća $NeuN^+$ stanica u supragranularnim slojevima (podatci prikazani kao: aritmetička sredina ± standardna devijacija).

Sloj	Prosječna debljina (mm)		Procijenjena prosječna gustoća (1000 stanica/mm^3)	
	BA9	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**
Ia	0,16 ± 0,03	0,13 ± 0,03	3,38 ± 0,71	3,87± 1,09
Ib	0,16 ± 0,02	0,12 ± 0,02	11,06 ± 1,66	11,40 ± 1,34
II	0,27 ± 0,06	0,19 ± 0,03	31,11 ± 5,51	33,40 ± 4,59
III	0,93 ± 0,14	0,56 ± 0,05	15,92 ± 2,40	19,65 ± 0,93
Ukupno supragranularni slojevi	**1,53 ± 0,24**	**1,00 ± 0,09**	**16,67 ± 2,29**	**18,87 ± 1,10**

Imunoreaktivnost stanica na NeuN ponešto se razlikovala između slojeva. U slojevima I, II i IV u obje regije reaktivnost stanica na NeuN bila je manje izražena (iako i dalje jasna) nego u slojevima III, V i VI. Imunoreaktivnost na NeuN između polja nije se značajno razlikovala, uz iznimku sloja II u kojem je u BA14r imunoreaktivnost na NeuN bila slabije izražena nego u BA9 (Slika 5.3).



Slika 5.4. Točkasti dijagram koji prikazuje raspodjelu $NeuN^+$ stanica po slojevima u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

5.2. Raspodjela pojedinih populacija kortikalnih interneurona po slojevima

Raspodjela po slojevima pojedinih populacija kortikalnih interneurona određena je na dvostruko obojenim rezovima gdje su molekularni biljezi za interneurone (CR, PV, CB i SOM) kombinirani s biljegom NeuN kojeg eksprimiraju svi neuroni.

5.2.1. Raspodjela kalretininskih neurona po slojevima

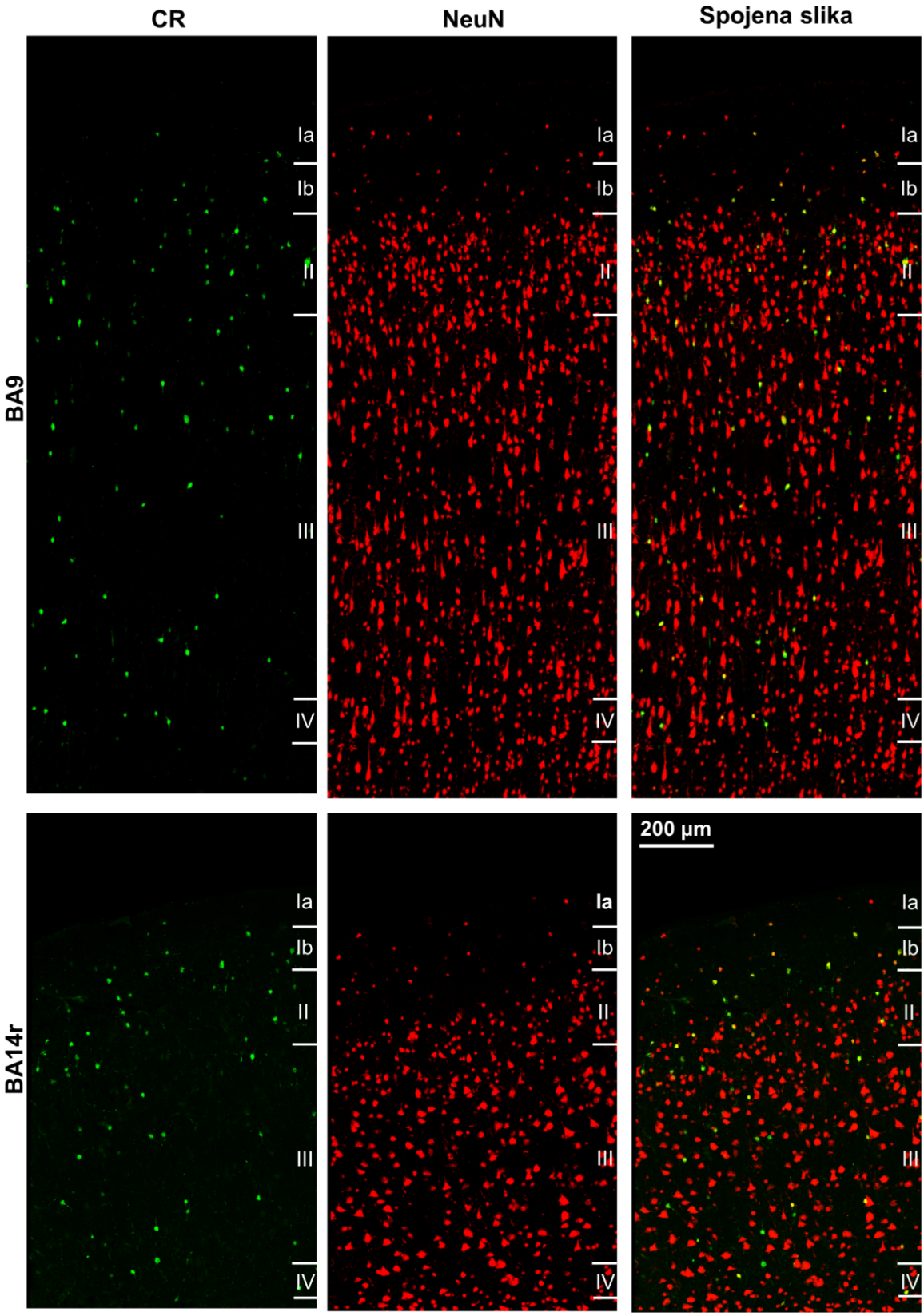
CR^+ neuroni činili su prosječno 8,21 % ukupnog broja neurona ($NeuN^+$ stanica) u BA9 te 10,24 % ukupnog broja neurona u BA14r. Bili su iznimno brojni u supragranularnim slojevima (Slika 5.5), a relativno malobrojni u infragranularnim slojevima (Slika 5.6). U granularnom sloju su CR^+ neuroni također bili zastupljeni u znatno manjem broju nego u supragranularnim slojevima.

CR^+ neuroni bili su najgušće raspoređeni u slojevima Ib i II, a zatim u slojevima III i Ia, dok su u slojevima IV, V i VI bili iznimno rijetko raspoređeni. U bijeloj tvari bio je prisutan mali broj CR^+ neurona (Slika 5.7).

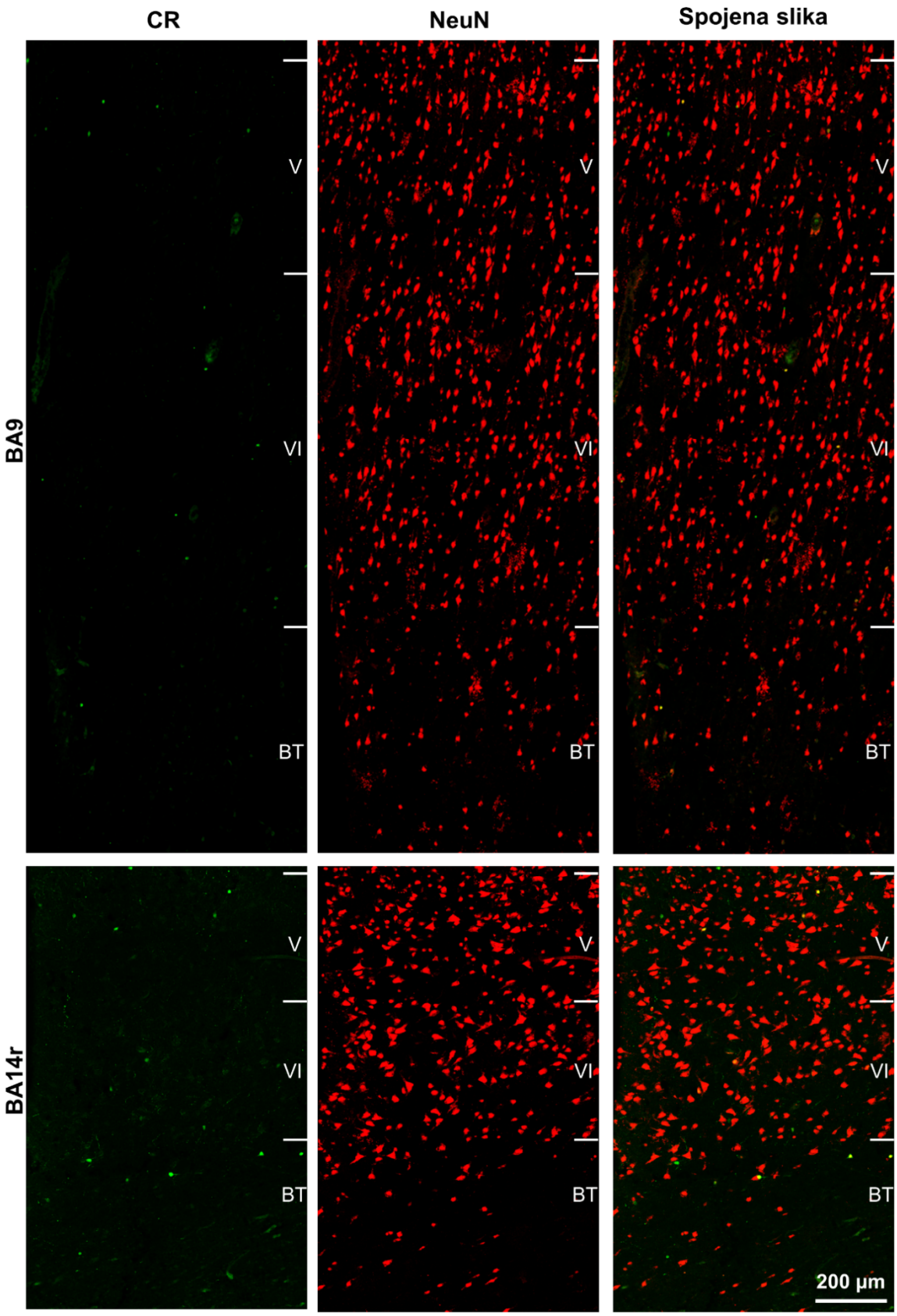
Živčana vlakna CR^+ neurona bila su najizraženija u slojevima Ib, II, III i V, iako općenito nisu bila izrazito imunoreaktivna kao primjerice vlakna PV^+ i SOM^+ neurona (Slika 5.7).

Općenito, CR^+ neuroni pokazivali su izraženu razliku u udjelima u ukupnom broju neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva. U supragranularnim slojevima CR^+ neuroni činili su prosječno 11,92 % svih neurona u BA9, odnosno 15,30 % u BA14r. U infragranularnim slojevima činili su pak svega 1,57 % ukupnog broja neurona u BA9 te 1,82 % u BA14r.

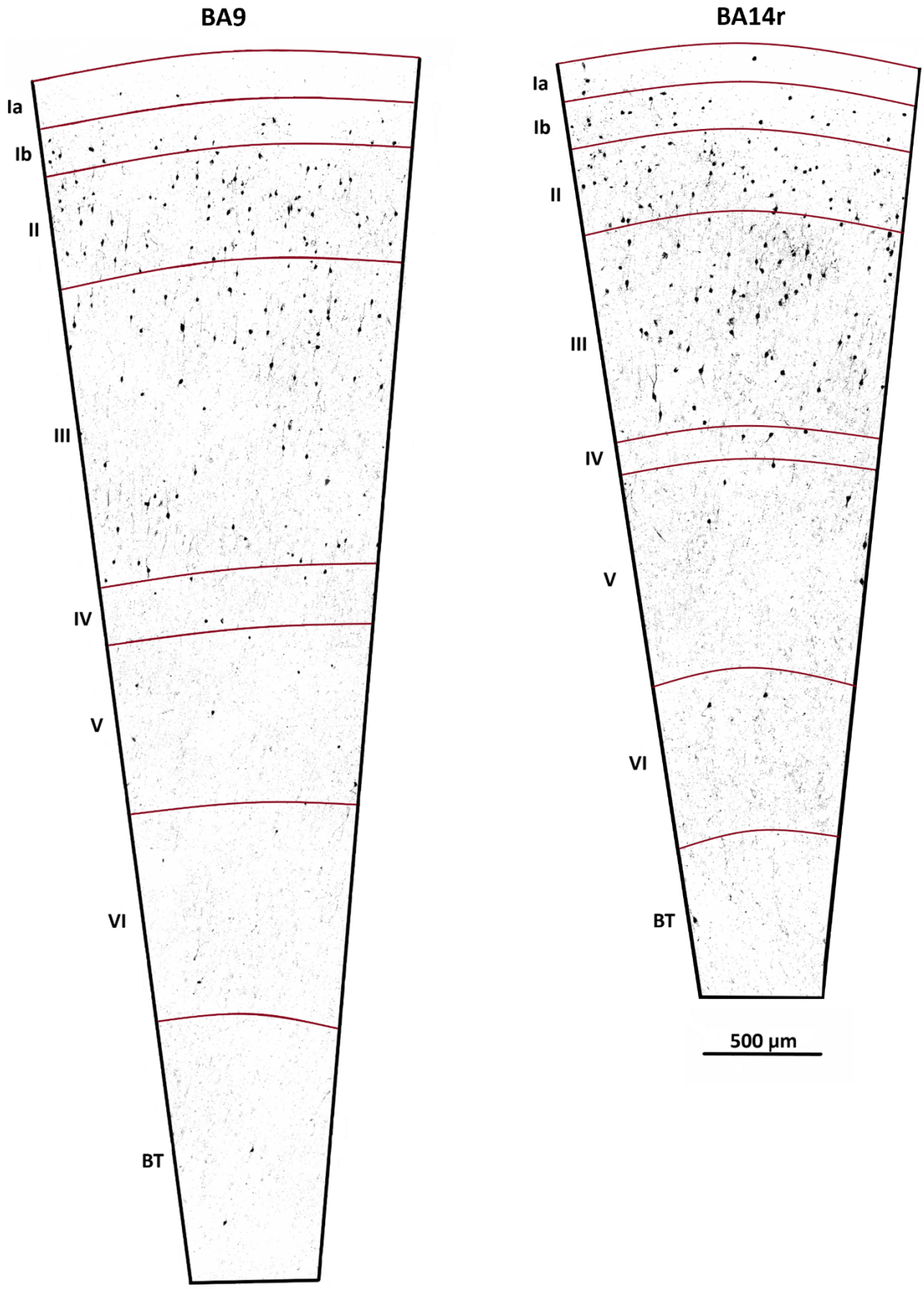
Detaljna analiza raspodjele CR^+ neurona po slojevima pokazala je da su CR^+ neuroni imali najveći udio u ukupnom broju neurona u sloju Ib gdje su prosječno činili 23,92 % svih neurona u BA9, odnosno 34,46 % svih neurona u BA14r. Po zastupljenosti u ukupnom broju neurona slijedili su redom slojevi Ia (20,85 % u BA9 i 24,47 % u BA14r), II (13,26 % u BA9 i 15,87 % u BA14r) i III (8,95 % u BA9 i 11,24 % u BA14r). Udio CR^+ neurona u ukupnom broju neurona progresivno se smanjivao s dubinom sloja u moždanoj kori pa je tako njihov udio bio malen u slojevima IV (2,65 % u BA9 i 3,49 % u BA14r), V (1,87 % u BA9 i 1,89 % u BA14r) i VI (1,26 % u BA9 i 1,70 % u BA14r) (Tablica 5.3 i Slika 5.8).



Slika 5.5. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom. Prikazani su supragranularni slojevi Brodmannovih polja 9 i 14r. U zelenom kanalu vidljive su CR^+ stanice, a u crvenom kanalu vidljive su $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija CR i NeuN molekularnih biljega.



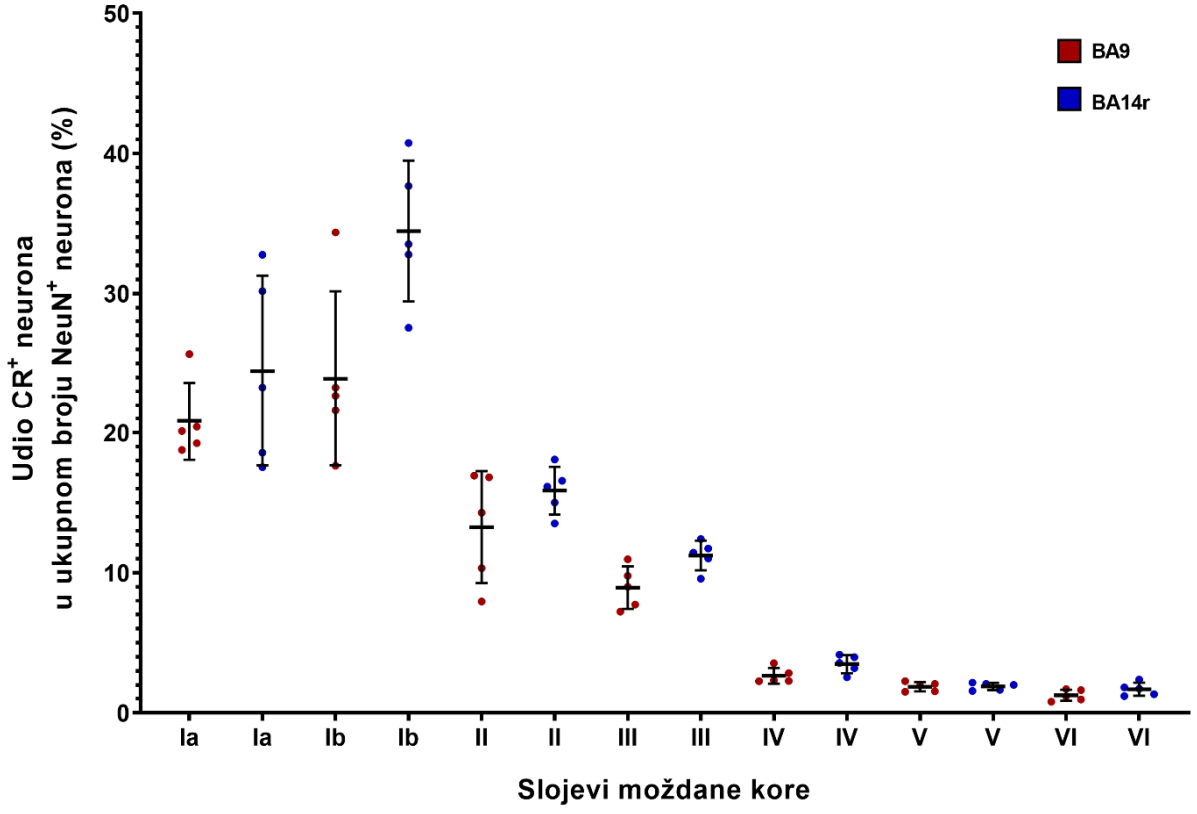
Slika 5.6. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom. Prikazani su infragranularni slojevi Brodmannovih polja 9 i 14r. U zelenom kanalu vidljive su CR^+ stanice, a u crvenom kanalu vidljive su $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija CR i NeuN molekularnih biljega.



Slika 5.7. Binarizirane konfokalne snimke anti-CR obojenih rezova iz Brodmannovih polja 9 i 14r.

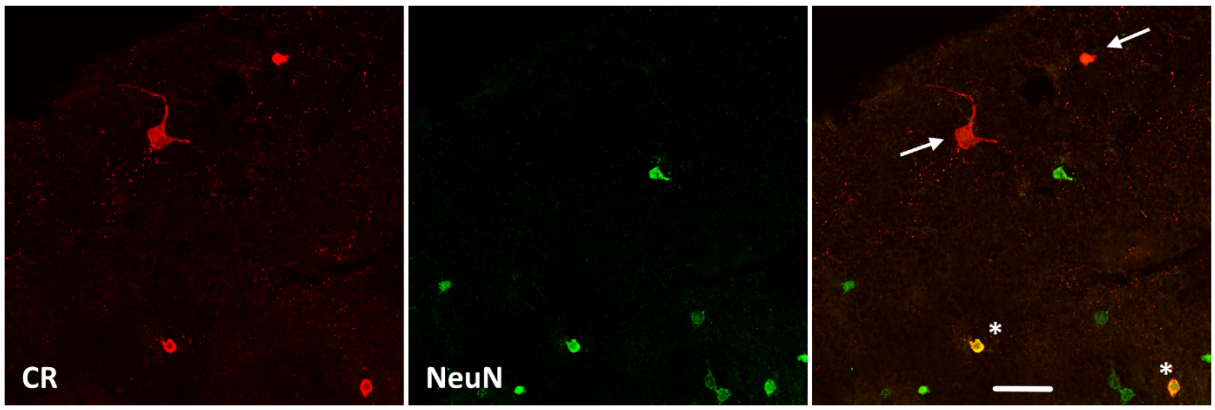
Tablica 5.3. Udio CR^+ neurona (u %) u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)
Ia	20,85 ± 2,78	20,12 (1,17)	24,47 ± 6,81	23,28 (11,59)
Ib	23,92 ± 6,24	22,70 (1,69)	34,46 ± 5,03	33,53 (4,89)
II	13,26 ± 4,00	14,29 (6,48)	15,87 ± 1,71	16,15 (1,54)
III	8,95 ± 1,52	9,01 (2,04)	11,24 ± 1,06	11,44 (0,71)
IV	2,65 ± 0,56	2,33 (0,56)	3,49 ± 0,64	3,56 (0,78)
V	1,87 ± 0,33	1,96 (0,54)	1,89 ± 0,26	2,00 (0,44)
VI	1,26 ± 0,40	1,17 (0,66)	1,70 ± 0,47	1,73 (0,50)
Supragranularni slojevi (I – III)	11,92 ± 2,46	12,50 (4,08)	15,30 ± 1,25	14,73 (1,53)
Infragranularni slojevi (V – VI)	1,57 ± 0,34	1,51 (0,52)	1,82 ± 0,27	1,82 (0,29)
Ukupno (I – VI)	**8,21 ± 1,24**	**7,94 (1,81)**	**10,24 ± 0,55**	**10,08 (0,82)**



Slika 5.8. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje raspodjelu udjela CR^+ neurona u ukupnom broju neurona po slojevima i unutar slojeva. Pojedinačne točke predstavljaju vrijednosti za pojedini analizirani mozak. Crvenom bojom označene su vrijednosti za Brodmannovo polje 9, a plavom bojom vrijednosti za Brodmannovo polje 14r. Dugačkom horizontalnom crtom prikazana je aritmetička sredina, a stupcima pogreške (engl. *error bars*) prikazana je SD.

CR^+ neuroni jedina su populacija kortikalnih interneurona čija su tijela konzistentno bila imunoreaktivna na svim analiziranim rezovima u sloju Ia. Vrlo mali broj CR^+ stanica u sloju Ia bio je položen horizontalno što je karakteristika Cajal-Retziusovih stanica. Također, vrlo mali broj CR^+ stanica u sloju Ia nije bio pozitivan na NeuN ($CR^+/NeuN^-$ stanice) (Slika 5.9).



Slika 5.9. Konfokalna snimka sloja I u Brodmannovom polju 9. U crvenom kanalu prikazane su CR^+ stanice, a u zelenom kanalu $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljive su dvije CR^+ stanice koje ne koeksprimiraju NeuN (označene strelicama) te dvije CR^+ stanice koje koeksprimiraju NeuN (označene zvjezdicom, kolokalizacija na spojenoj slici vidi se kao žuta boja). Bijela vodoravna crta predstavlja skalu od 20 μm.

5.2.2. Raspodjela parvalbuminskih neurona po slojevima

PV^+ neuroni činili su prosječno 7,14 % ukupnog broja neurona u BA9 te 6,33 % ukupnog broja neurona u BA14r. PV^+ neuroni bili su relativno mnogobrojni u slojevima III – VI.

PV^+ neuroni bili su podjednako gusto raspoređeni u slojevima III, IV, V i VI, nešto manje gusto u sloju II, a u sloju I bili su iznimno rijetko raspoređeni. U bijeloj tvari bio je prisutan iznimno mali broj PV^+ neurona (Slika 5.10).

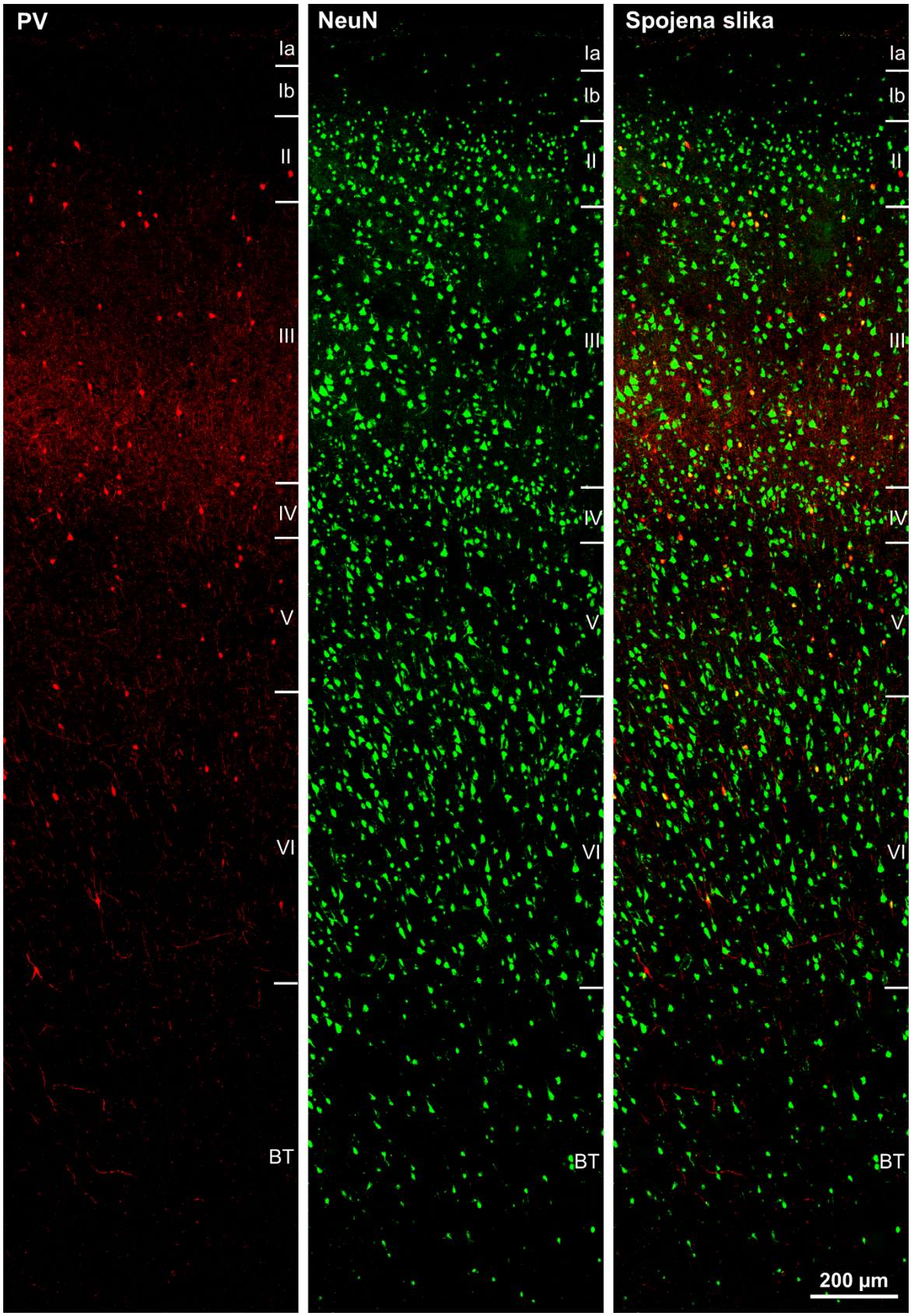
Dok su CR^+ neuroni u sloju II imali ujednačenu raspodjelu po cijelom sloju, PV^+ neuroni bili su prisutni samo u dubinskim dijelovima sloja II, na granici prema sloju III, a gotovo nikad nisu bili prisutni u sredini sloja II ili prema granici sa slojem I (Slika 5.10).

Živčana vlakna PV^+ neurona u BA9 bila su najizraženija u donjem dijelu sloja III i sloju IV, a zatim u površinskom dijelu sloja III te slojevima II i VI (Slika 5.10). U BA14r, PV^+ vlakna bila su također najizraženija u dubinskom dijelu sloja III i sloju IV, ali su bila jako izražena i u sloju VI te u dubinskom dijelu sloja V (Slika 5.11). U oba Brodmannova polja, u sloju I gotovo nije bilo vlakana imunoreaktivnih na PV. Općenito, PV^+ vlakna pokazivala su izrazito visok stupanj imunoreaktivnosti te su tvorila spletove uokolo tijela piramidnih neurona što je tipično inervacijsko područje košarastih stanica (Slika 5.12).

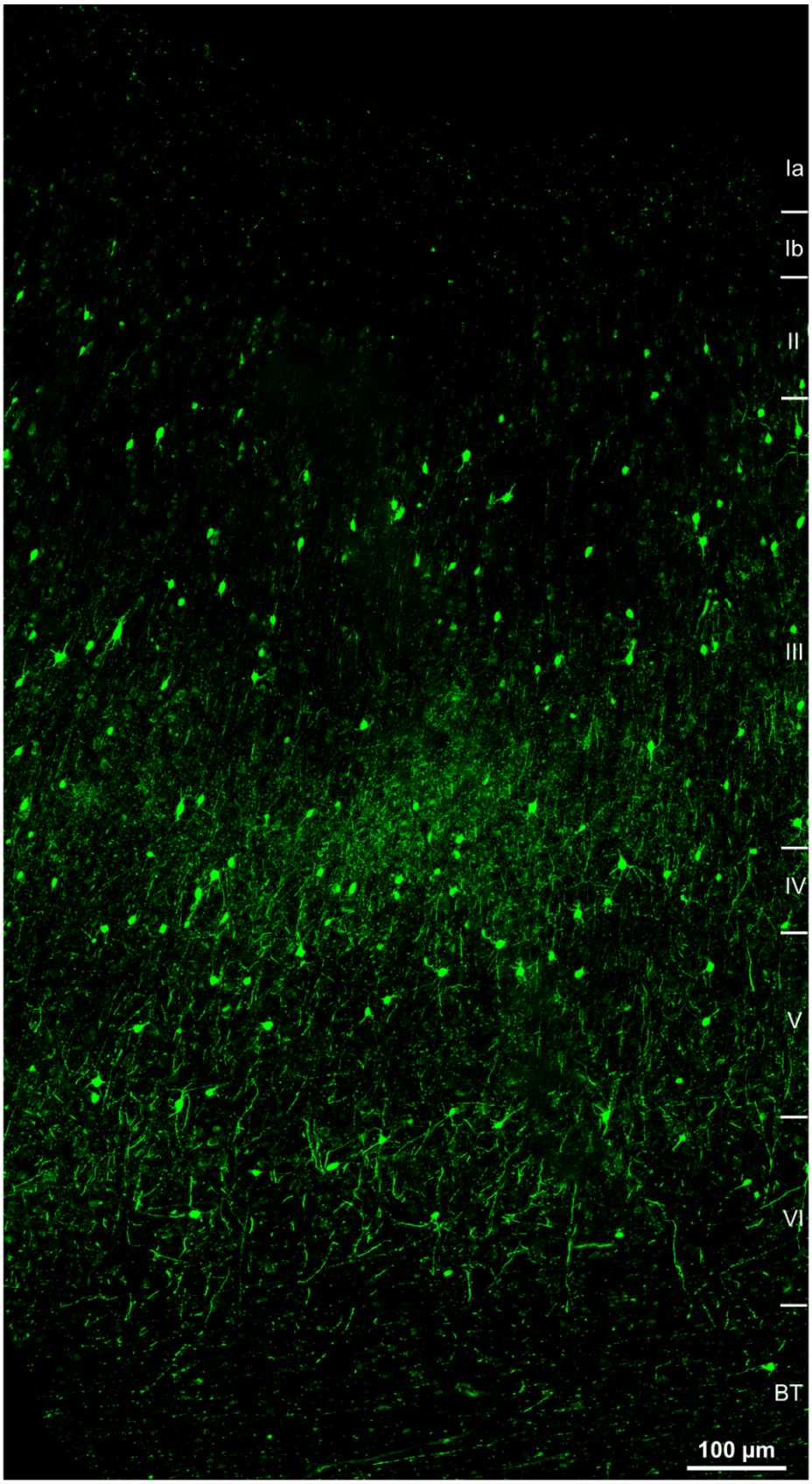
Za razliku od CR^+ neurona, PV^+ neuroni bili su podjednako zastupljeni i u supragranularnim i u infragranularnim slojevima. U supragranularnim slojevima PV^+ neuroni činili su prosječno 6,14 % svih neurona u BA9 te 5,63 % u BA14r, dok su u infragranularnim slojevima činili prosječno 6,13 % svih neurona u BA9 te 4,75 % u BA14r.

Analizom udjela po slojevima ustanovljeno je da su PV^+ neuroni najveći udio u ukupnom broju neurona imali u sloju IV gdje su prosječno činili 9,74 % svih neurona u BA9, odnosno 10,02 % u B14r, što je 1,5 – 1,8 puta više nego u supragranularnim i infragranularnim slojevima. Po zastupljenosti u ukupnom broju neurona slijedili su redom slojevi III (8,96 % u BA9 i 8,49 % u BA14r), V (7,85 % u BA9 i 4,53 % u BA14r), VI (4,59 % u BA9 i 5,60 % u BA14r) i II (2,27 % u BA9 i 3,86 % u BA14r). PV^+ neuroni u sloju I bili su prisutni svega u tri analizirana mozga (mozgovi ČO382, ČO383 i ČO386), a često u tim mozgovima nisu bili prisutni ni na svakom histološkom rezu. U oba podsloja sloja I, PV^+ neuroni činili su iznimno mali prosječni udio u ukupnom broju neurona: 3,24 % u BA9, odnosno 2,22 % u BA14r u sloju Ia te 0,52 % u BA9, odnosno 0,44 % u BA14r u sloju Ib (Tablica 5.4 i Slika 5.13).

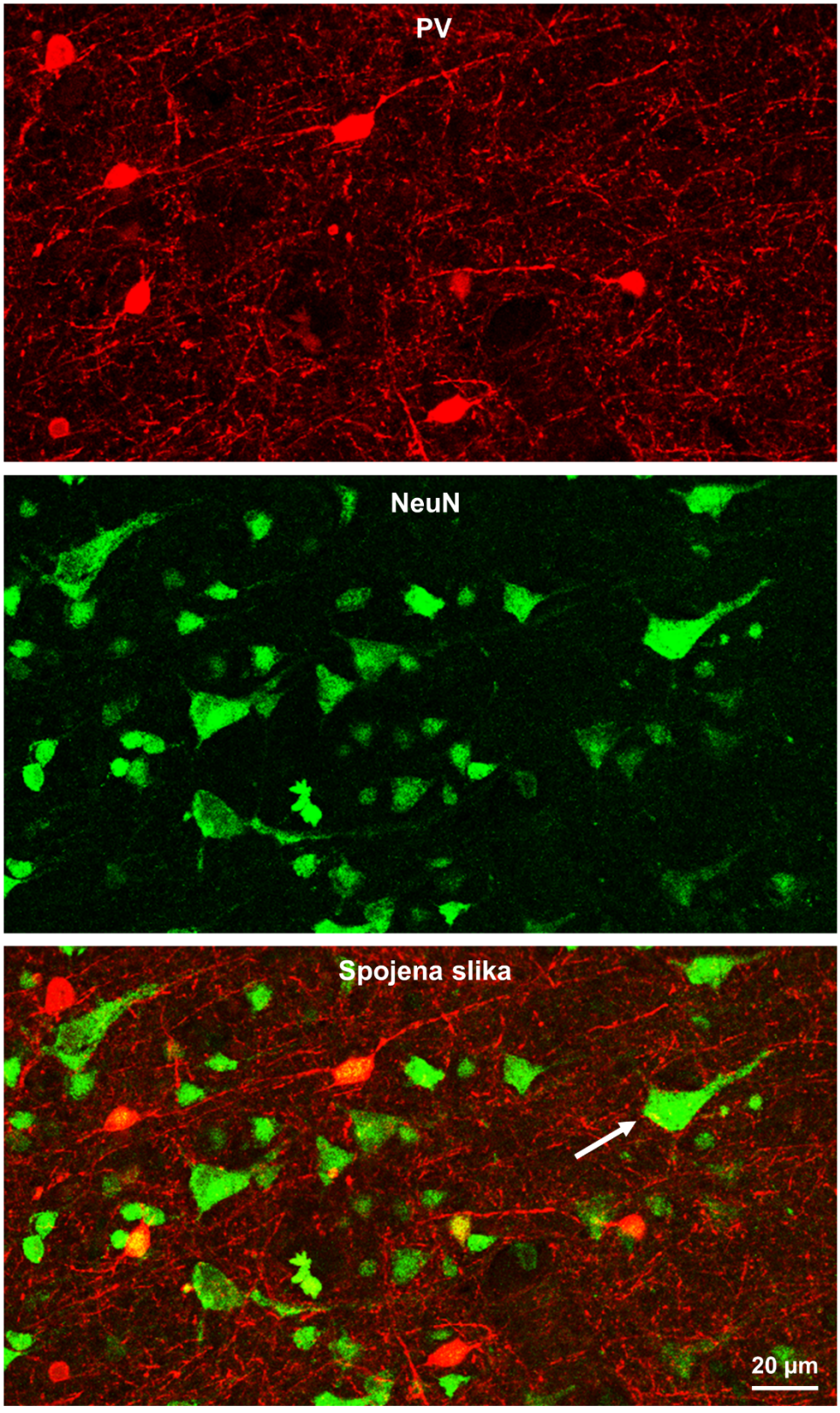
Sve PV^+ stanice koeksprimirale su biljeg NeuN, za razliku od dijela CR^+ stanica sloja Ia.



Slika 5.10. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom u Brodmannovom polju 9. U crvenom kanalu vidljive su PV^+ stanice, a u zelenom kanalu vidljive su $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija PV i NeuN molekularnih biljega.



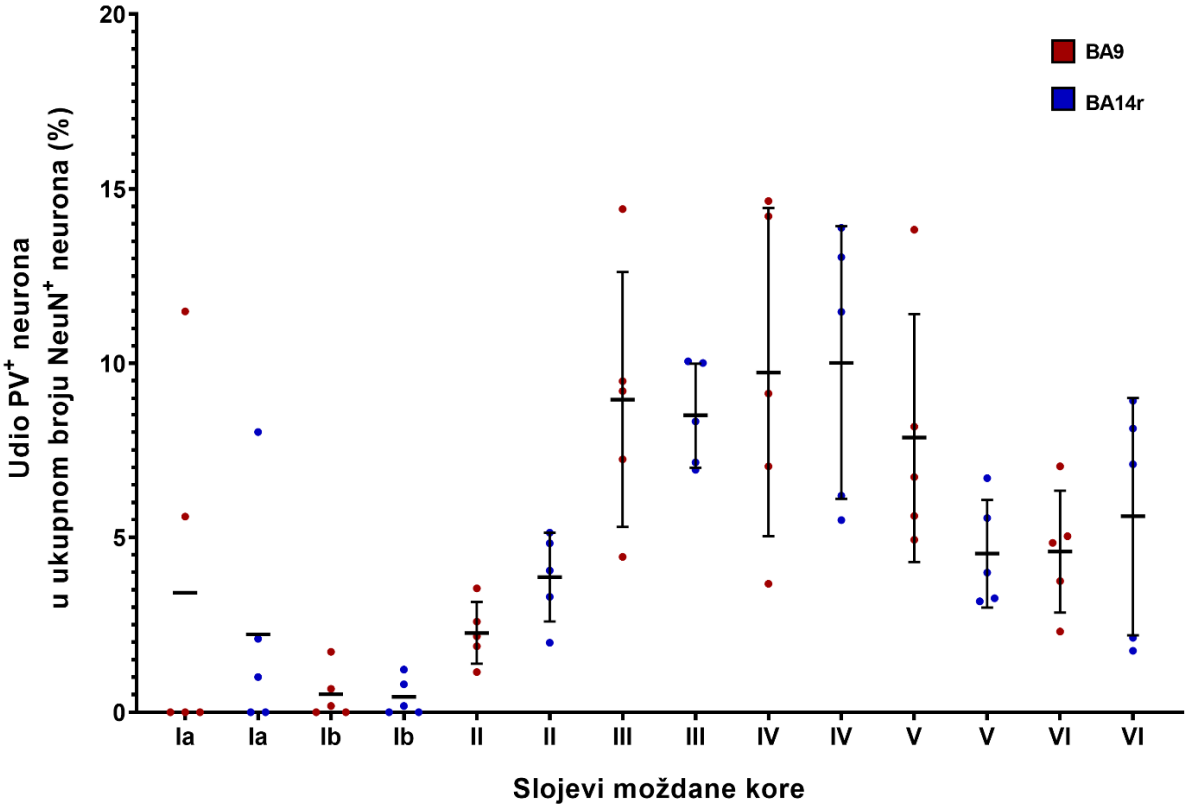
Slika 5.11. Konfokalna snimka anti-PV bojenja u Brodmannovom polju 14r. Vidljive su dvije odvojene pruge PV^+ vlakana – jedna izraženija u sloju IV i dubinskom dijelu sloja III te druga manje izražena u sloju VI i dubinskom dijelu sloja V.



Slika 5.12. Konfokalna snimka dvostruko obilježenog reza (anti-NeuN i anti-PV) na granici slojeva III i IV u Brodmannovom polju 9. U crvenom kanalu vidljive su PV^+ stanice, a u zelenom kanalu $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljivo je kako PV^+ vlakna obuhvaćaju tijelo velikog piramidnog neurona sloja IIIc (označeno bijelom strelicom).

Tablica 5.4. Udio PV^+ neurona (u %) u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)
Ia	3,42 ± 5,12	0,00 (5,59)	2,22 ± 3,35	1,01 (2,10)
Ib	0,52 ± 0,73	0,18 (0,67)	0,44 ± 0,55	0,18 (0,80)
II	2,27 ± 0,88	2,17 (0,7)	3,86 ± 1,26	4,05 (1,53)
III	8,96 ± 3,66	9,21 (2,26)	8,49 ± 1,51	8,31 (2,87)
IV	9,74 ± 4,71	9,14 (7,18)	10,02 ± 3,92	11,48 (6,85)
V	7,85 ± 3,56	6,72 (2,55)	4,53 ± 1,54	3,99 (2,29)
VI	4,59 ± 1,74	4,84 (1,28)	5,60 ± 3,41	7,09 (5,98)
Supragranularni slojevi (I – III)	6,14 ± 2,14	5,73 (1,25)	5,63 ± 0,52	5,63 (0,45)
Infragranularni slojevi (V – VI)	6,13 ± 2,40	5,82 (1,41)	4,75 ± 2,07	4,69 (3,14)
Ukupno (I – VI)	**7,14 ± 1,31**	**7,06 (0,79)**	**6,33 ± 0,81**	**6,53 (0,91)**



Slika 5.13. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje raspodjelu udjela PV^+ neurona u ukupnom broju neurona po slojevima i unutar slojeva. Pojedinačne točke predstavljaju prosječne vrijednosti za pojedini analizirani mozak. Crvenom bojom označene su vrijednosti za Brodmannovo polje 9, a plavom bojom vrijednosti za Brodmannovo polje 14r. Dugačkom horizontalnom crtom prikazana je aritmetička sredina, a stupcima pogreške prikazana je SD.

5.2.3. Raspodjela kalbindinskih neurona po slojevima

CB^+ neuroni činili su prosječno 4,73 % ukupnog broja neurona u BA9 te 5,02 % ukupnog broja neurona u BA14r. Bili su iznimno brojni u supragranularnim slojevima, a malobrojni u granularnom i infragranularnim slojevima.

CB^+ neuroni bili su najgušće raspoređeni u sloju II, a zatim u sloju III, dok su u slojevima IV, V i VI bili vrlo rijetko raspoređeni. Izuzetno rijetko su bili prisutni u sloju I, a u bijeloj tvari bio je prisutan tek pokoji CB^+ neuron po histološkom rezu (Slika 5.14).

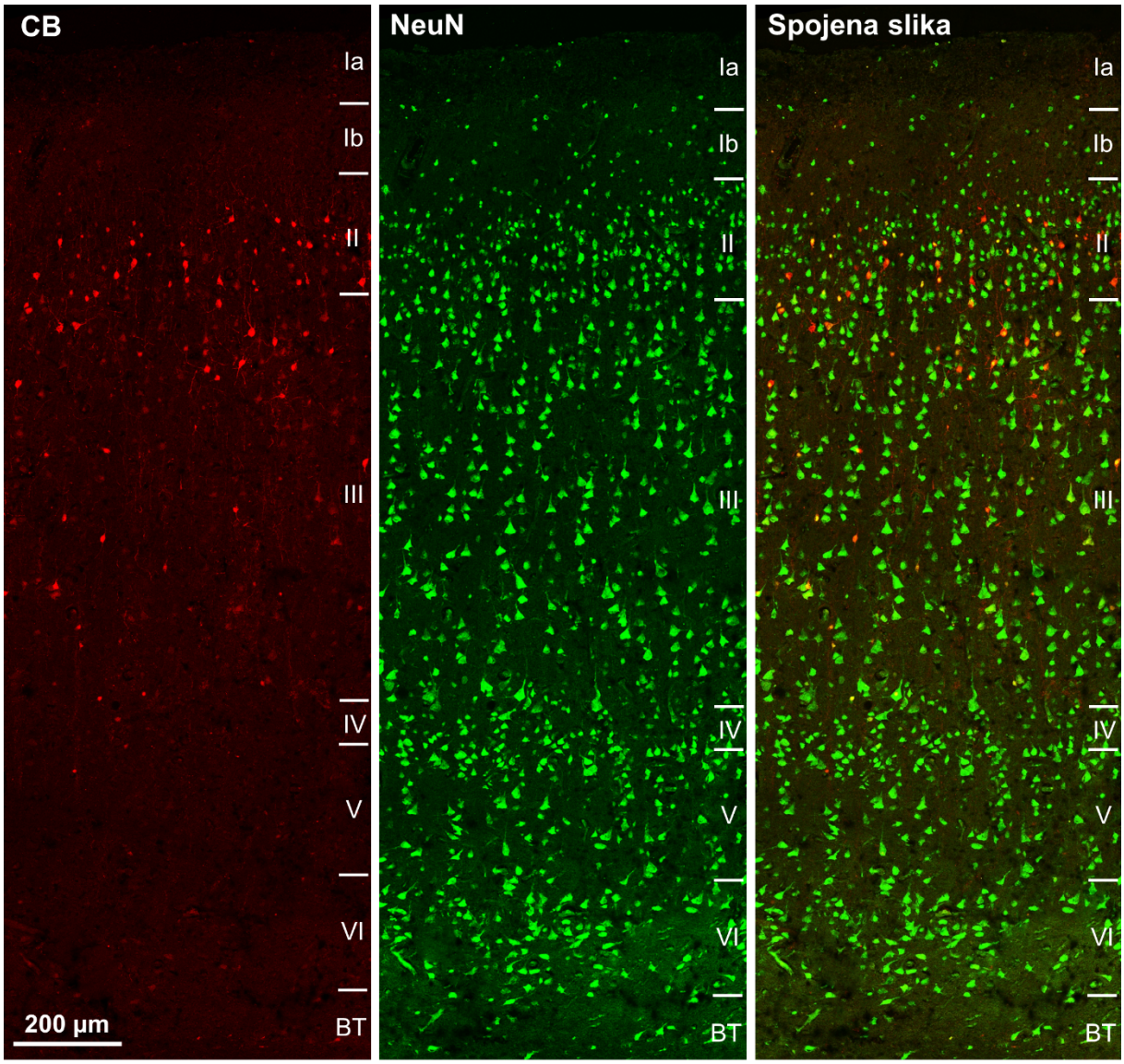
U sloju II, CB^+ neuroni obično su bili raspoređeni u sredini sloja, a rijetko uz granice prema slojevima I i III, čime su se razlikovali i od CR^+ i od PV^+ neurona po raspodjeli u tom sloju (Slika 5.14).

Živčana vlakna CB^+ neurona bila su najizraženija u sloju II, a zatim u sloju III. U ostalim slojevima bila su slabo izražena. Općenito, CB^+ vlakna pokazivala su nizak do umjeren stupanj imunoreaktivnosti (nešto veći u odnosu na CR^+ vlakna, ali značajno manji od PV^+ i SOM^+ vlakana) (Slika 5.14).

Slično kao i CR^+ neuroni, CB^+ neuroni pokazivali su izraženu razliku u raspodjeli između supragranularnih i infragranularnih slojeva. U supragranularnim slojevima CB^+ neuroni činili su prosječno 6,36 % svih neurona u BA9, odnosno 7,03 % u BA14r. U infragranularnim slojevima činili su pak svega 2,05 % ukupnog broja neurona u BA9 te 2,51 % u BA14r.

Analizom udjela po slojevima ustanovljeno je da su CB^+ neuroni najveći udio u ukupnom broju neurona imali u sloju II gdje su prosječno činili 11,97 % svih neurona u BA9, odnosno 12,35 % u B14r, a zatim je slijedio sloj III gdje su CB^+ neuroni prosječno činili 4,02 % svih neurona u BA9, odnosno 4,44 % u BA14r. Po zastupljenosti u ukupnom broju neurona slijedili su redom slojevi VI (2,47 % u BA9 i 3,40 % u BA14r), IV (1,35 % u BA9 i 1,78 % u BA14r), V (1,20 % u BA9 i 1,65 % u BA14r) i Ib (0,81 % u BA9 i 1,37 % u BA14r). U sloju Ia nađeno je svega nekoliko CB^+ stanica i to samo u jednom mozgu (ČO382), samo u BA14r. Slično kao i PV^+ neuroni, u sloju Ib CB^+ neuroni bili su prisutni samo u tri mozga (ponovno ČO382, ČO383 i ČO386). Za razliku od CR^+ neurona čiji se udio uvijek smanjivao s povećanjem dubine sloja u moždanoj kori, udio CB^+ neurona u sloju VI bio je oko dva puta veći nego u slojevima IV i V (Tablica 5.5 i Slika 5.15).

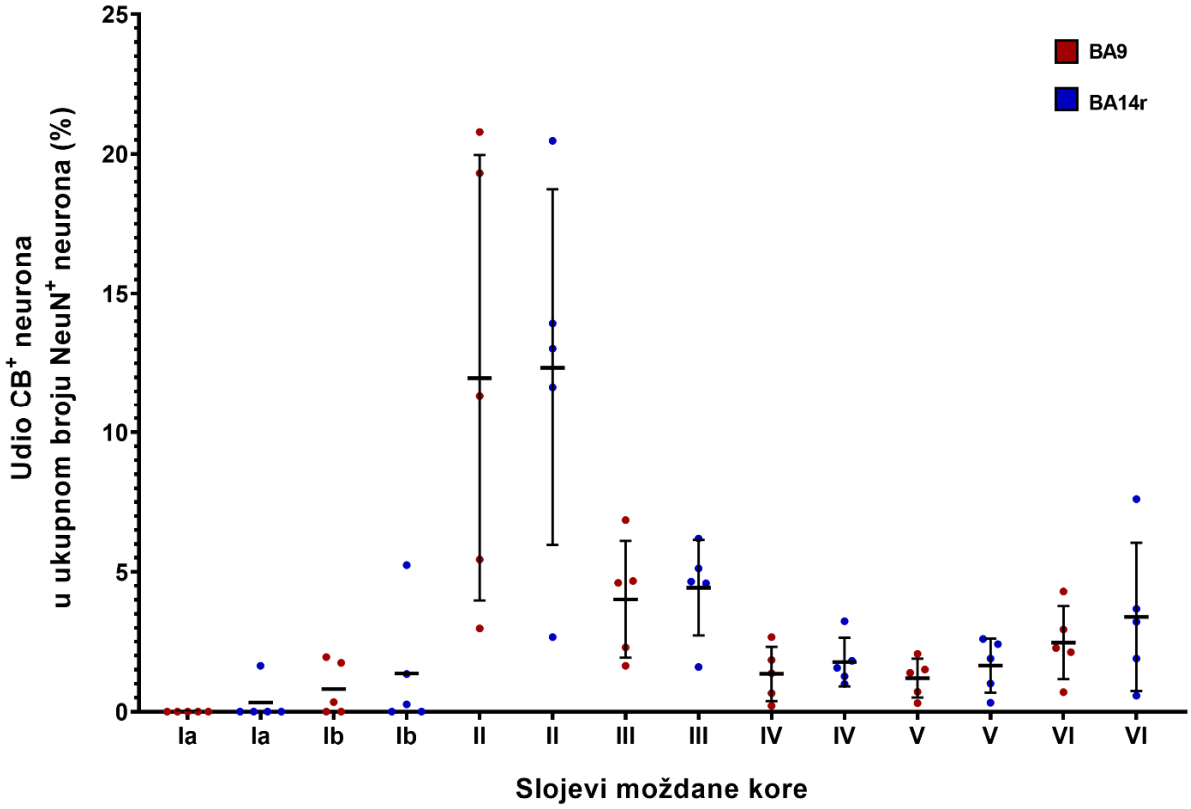
Kao i PV^+ stanice, sve CB^+ stanice koeksprimirale su biljeg NeuN.



Slika 5.14. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom u Brodmannovom polju 9. U crvenom kanalu vidljive su CB^+ stanice, a u zelenom kanalu vidljive su $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija CB i NeuN molekularnih biljega. Osim iznimno imunoreaktivnih CB^+ interneurona, anti-CB bojenjem prikazuju se i piramidni neuroni znatno niže imunoreaktivnosti na CB. Ti slabo imunoreaktivni piramidni neuroni smješteni su gotovo isključivo u slojevima II i III.

Tablica 5.5. Udio CB^+ neurona (u %) u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)
Ia	0	0	0,33 ± 0,73	0,00 (0,00)
Ib	0,81 ± 0,96	0,34 (1,75)	1,37 ± 2,24	0,26 (1,35)
II	11,97 ± 7,99	11,33 (13,86)	12,35 ± 6,39	13,03 (2,29)
III	4,02 ± 2,09	4,61 (2,38)	4,44 ± 1,71	4,66 (0,53)
IV	1,35 ± 0,97	1,38 (1,19)	1,78 ± 0,87	1,57 (0,55)
V	1,20 ± 0,69	1,39 (0,80)	1,65 ± 0,97	1,90 (1,41)
VI	2,47 ± 1,31	2,28 (0,81)	3,40 ± 2,65	3,22 (1,78)
Supragranularni slojevi (I – III)	6,36 ± 2,22	6,81 (3,24)	7,03 ± 1,30	6,97 (0,16)
Infragranularni slojevi (V – VI)	2,05 ± 0,18	2,01 (0,13)	2,51 ± 1,29	2,17 (1,00)
Ukupno (I – VI)	**4,73 ± 1,42**	**4,67 (2,09)**	**5,02 ± 1,17**	**5,37 (0,63)**



Slika 5.15. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje raspodjelu udjela CB^+ neurona u ukupnom broju neurona po slojevima i unutar slojeva. Pojedinačne točke predstavljaju prosječne vrijednosti za pojedini analizirani mozak. Crvenom bojom označene su vrijednosti za Brodmannovo polje 9, a plavom bojom vrijednosti za Brodmannovo polje 14r. Dugačkom horizontalnom crtom prikazana je aritmetička sredina, a stupcima pogreške prikazana je SD.

5.2.4. Raspodjela somatostatinskih neurona po slojevima

SOM^+ neuroni činili su prosječno 6,38 % ukupnog broja neurona u BA9 te 7,28 % ukupnog broja neurona u BA14r.

SOM^+ neuroni podjednako su gusto bili raspoređeni u slojevima II – VI, a u sloju I bili su iznimno rijetko prisutni. Za razliku od svih ostalih analiziranih populacija kortikalnih interneurona, SOM^+ neuroni bili su prisutni i u bijeloj tvari u relativno velikom broju, iako i dalje rijetko raspoređeni s obzirom na općenito malu gustoću neurona u bijeloj tvari (Slika 5.16, Slika 5.17 i Slika 5.18).

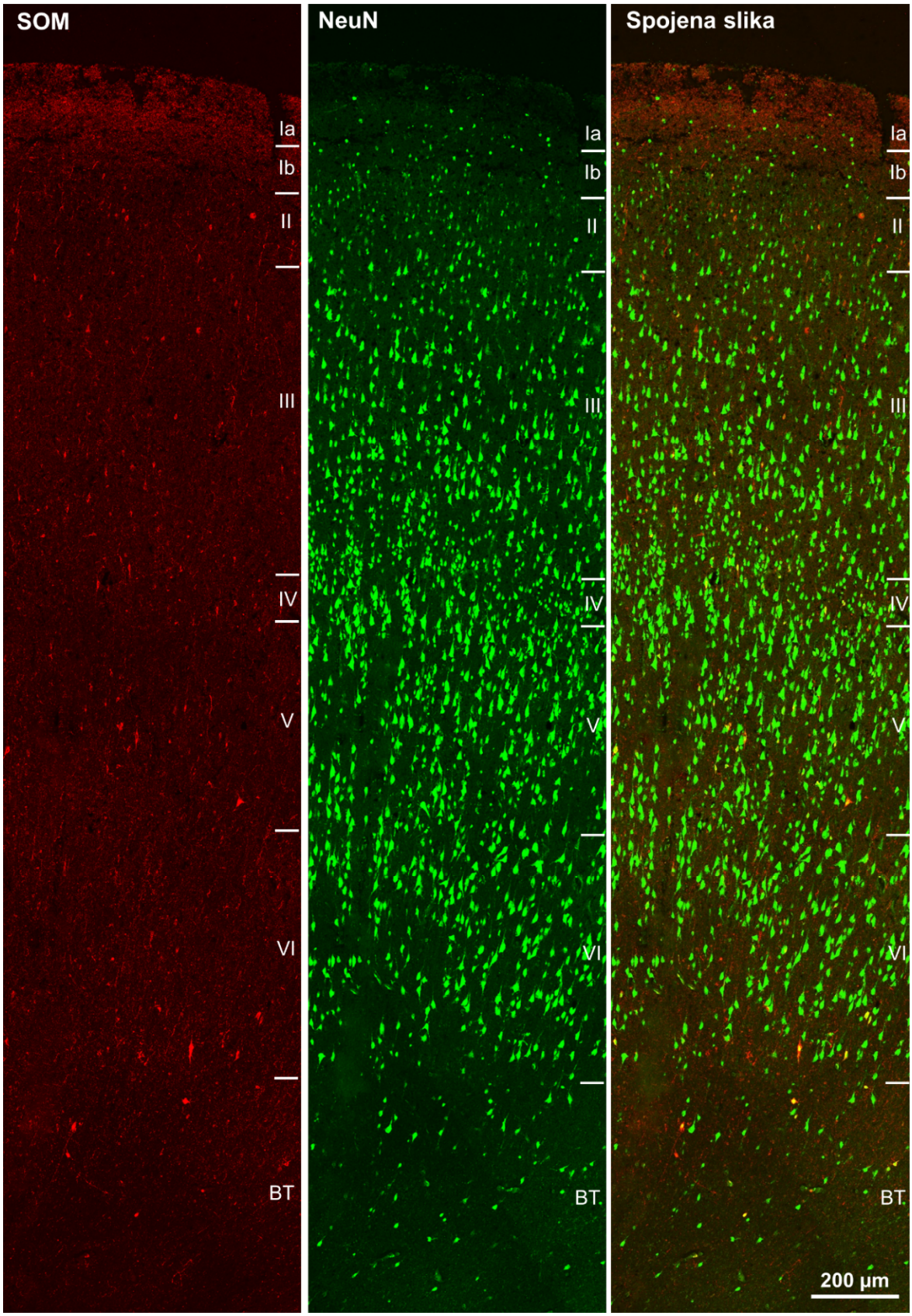
U sloju II, SOM^+ neuroni često su bili raspoređeni u sredini sloja, a rijetko uz granice prema slojevima I i III, tj. imali su vrlo sličnu raspodjelu kao i CB^+ neuroni u tom sloju (Slika 5.16).

Živčana vlakna SOM^+ neurona daleko su najviše bila izražena u sloju Ia, a zatim u sloju Ib, sloju IV i sloju VI. Vlakna su bila prisutna i u slojevima II, III i V, ali nešto manje gusto raspoređena u usporedbi s ostalim slojevima. SOM^+ vlakna bila su prisutna i u bijeloj tvari, iako su tamo bila slabo zastupljena u odnosu na moždanu koru. Općenito, SOM^+ vlakna pokazivala su izrazito visok stupanj imunoreaktivnosti, usporedivu s razinom imunoreaktivnosti PV^+ vlakana (Slika 5.16, Slika 5.17 i Slika 5.18).

Slično kao i PV^+ neuroni, SOM^+ neuroni bili su podjednako zastupljeni i u supragranularnim i u infragranularnim slojevima. U supragranularnim slojevima SOM^+ neuroni činili su prosječno 5,52 % svih neurona u BA9 te 6,66 % u BA14r, dok su u infragranularnim slojevima činili prosječno 6,58 % svih neurona u BA9 te 7,39 % u BA14r.

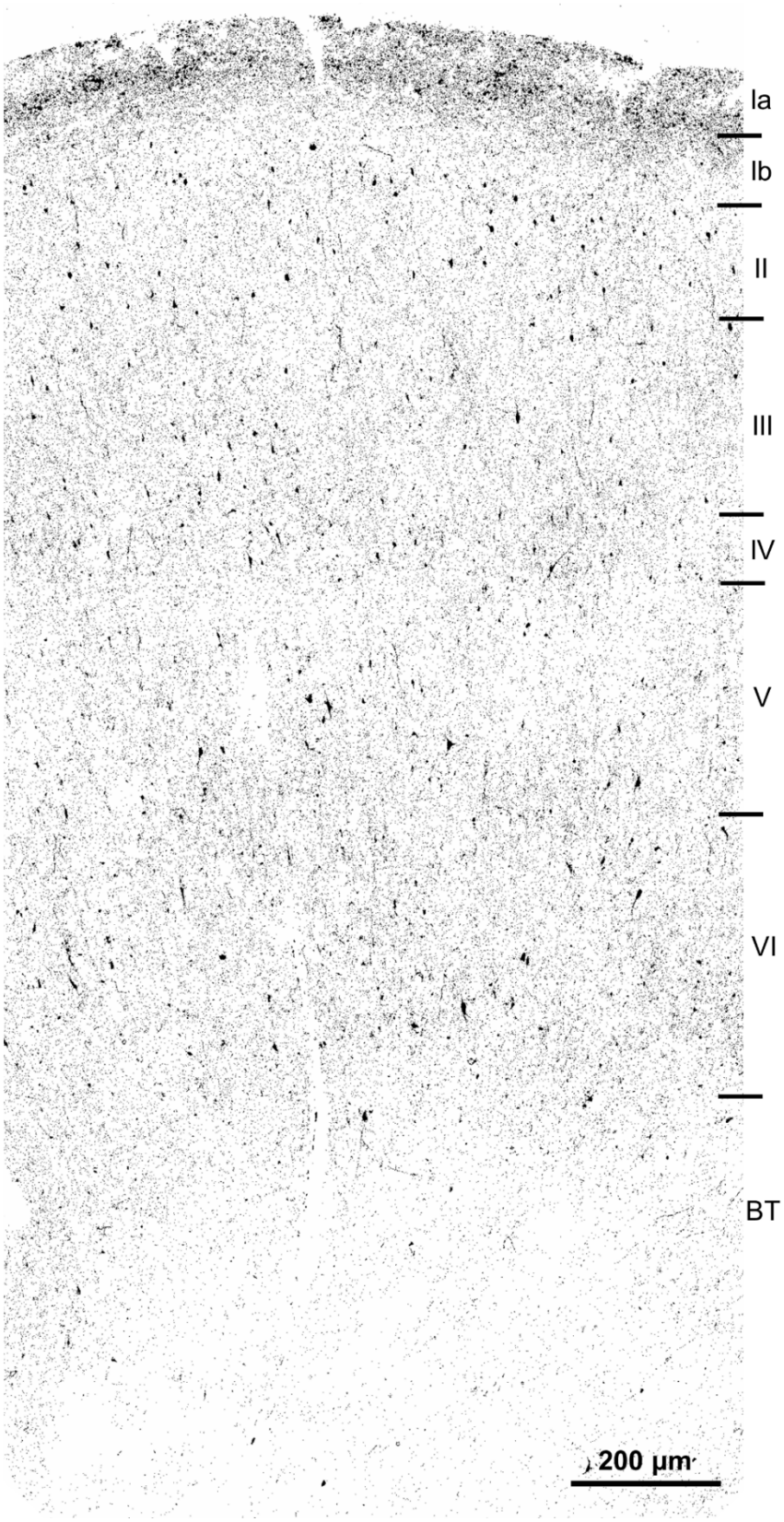
Analizom udjela po slojevima ustanovljeno je da su SOM^+ neuroni najveći udio u ukupnom broju neurona imali u sloju IV (kao i PV^+ neuroni) gdje su prosječno činili 7,31 % svih neurona u BA9, odnosno 8,47 % u B14r. Po zastupljenosti u ukupnom broju neurona slijedili su redom slojevi II (5,81 % u BA9 i 8,60 % u BA14r), V (5,63 % u BA9 i 6,22 % u BA14r), III (5,22 % u BA9 i 6,08 % u BA14r), VI (4,02 % u BA9 i 5,78 % u BA14r) i Ib (0,41 % u BA9 i 1,38 % u BA14r). U sloju Ia nije nađena nijedna SOM^+ stanica ni na jednom histološkom rezu. Slično kao i CB^+ neuroni, u sloju Ib SOM^+ neuroni nisu bili prisutni u svim mozgovima (u BA9 nađeni su samo u mozgovima ČO382 i ČO383, a u BA14r u mozgovima ČO383, ČO386 i ČO387) (Tablica 5.6 i Slika 5.19).

Kao i PV^+ te CB^+ stanice, sve SOM^+ stanice koeksprimirale su biljeg NeuN, uključujući i brojne SOM^+ stanice u bijeloj tvari.



Slika 5.16. Konfokalna snimka histoloških rezova dvostruko obilježenih imunofluorescencijom u Brodmannovom polju 14r. U crvenom kanalu vidljive su SOM^+ stanice, a u zelenom kanalu vidljive su $NeuN^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija SOM i NeuN molekularnih biljega.

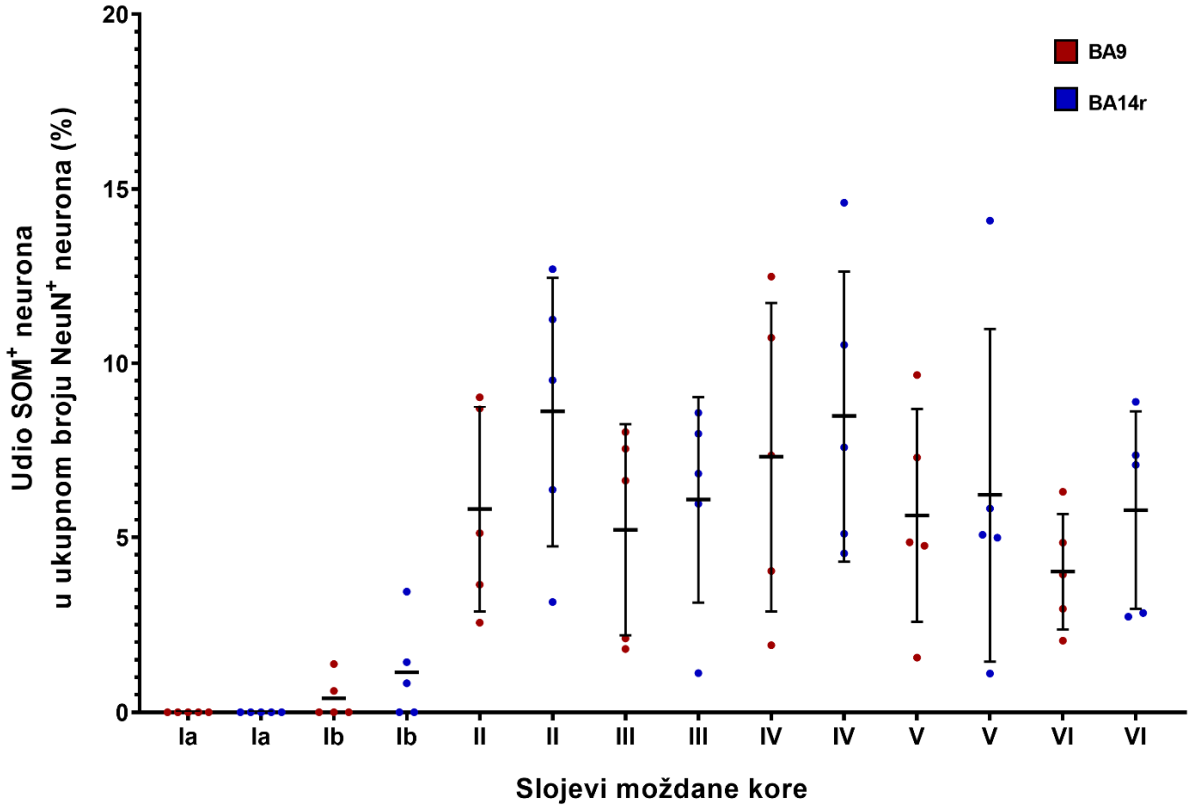
Slika 5.17. Binarizirana konfokalna snimka vijuge, *gyrus rectus* koja prikazuje raspodjelu SOM^+ neurona i vlakana u Brodmannovom polju 14r. Vidljive su i relativno mnogobrojne velike SOM^+ stanice u bijeloj tvari



Slika 5.18. Binarizirana konfokalna snimka koja prikazuje raspodjelu SOM^+ neurona i vlakana po slojevima u Brodmannovom polju 14r. Vidljivo je da su SOM^+ vlakana najizraženija u sloju I, a zatim u slojevima IV i VI.

Tablica 5.6. Udio SOM^+ neurona (u %) u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r.

Sloj moždane kore	BA9		BA14r	
	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)	Aritmetička sredina ± SD	Medijan (IQR)
Ia	0	0	0	0
Ib	0,40 ± 0,61	0,00 (0,61)	1,38 ± 1,46	1,43 (2,00)
II	5,81 ± 2,93	5,12 (5,03)	8,60 ± 3,86	9,52 (4,90)
III	5,22 ± 3,02	6,62 (5,42)	6,08 ± 2,95	6,82 (2,00)
IV	7,31 ± 4,43	7,34 (6,70)	8,47 ± 4,17	7,57 (5,43)
V	5,63 ± 3,04	4,86 (2,52)	6,22 ± 4,77	5,07 (0,83)
VI	4,02 ± 1,65	3,94 (1,89)	5,78 ± 2,82	7,07 (4,51)
Supragranularni slojevi (I – III)	5,52 ± 2,08	5,46 (2,14)	6,66 ± 1,57	6,77 (3,12)
Infragranularni slojevi (V – VI)	6,58 ± 1,99	6,47 (1,09)	7,39 ± 2,77	8,04 (3,49)
Ukupno (I – VI)	**6,38 ± 1,21**	**6,36 (1,42)**	**7,28 ± 1,84**	**8,03 (1,99)**



Slika 5.19. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje raspodjelu udjela SOM^+ neurona u ukupnom broju neurona po slojevima i unutar slojeva. Pojedinačne točke predstavljaju prosječne vrijednosti za pojedini analizirani mozak. Crvenom bojom označene su vrijednosti za Brodmannovo polje 9, a plavom bojom vrijednosti za Brodmannovo polje 14r. Dugačkom horizontalnom crtom prikazana je aritmetička sredina, a stupcima pogreške prikazana je SD.

5.2.5. Posebnosti ustroja kortikalnih interneurona u pojedinim slojevima prefrontalne moždane kore

Analizom raspodjele kortikalnih interneurona po slojevima utvrđeno je da se struktura kortikalne neuralne mreže znatno razlikuje između slojeva. Ta razlika posebno je izražena između supragranularnih i infragranularnih slojeva te unutar supragranularnih slojeva gdje svaki pojedini supragranularni sloj ima jedinstvenu strukturu kortikalnih interneurona.

U supragranularnim slojevima najbrojnija populacija kortikalnih interneurona bili su CR^+ neuroni koji su prosječno činili 11,92 % svih neurona u BA9, odnosno 15,30 % svih neurona u BA14r. CB^+ neuroni bili su druga najzastupljenija populacija interneurona s prosječnim udjelom od 6,36 % u BA9 i 7,03 % u BA14r. Svega nešto manje brojni bili su PV^+ neuroni s prosječnim udjelom od 6,14 % u BA9 i 5,64 % u BA14r te SOM^+ neuroni s prosječnim udjelom od 5,52 % u BA9 i 6,66 % u BA14r (Tablica 5.7).

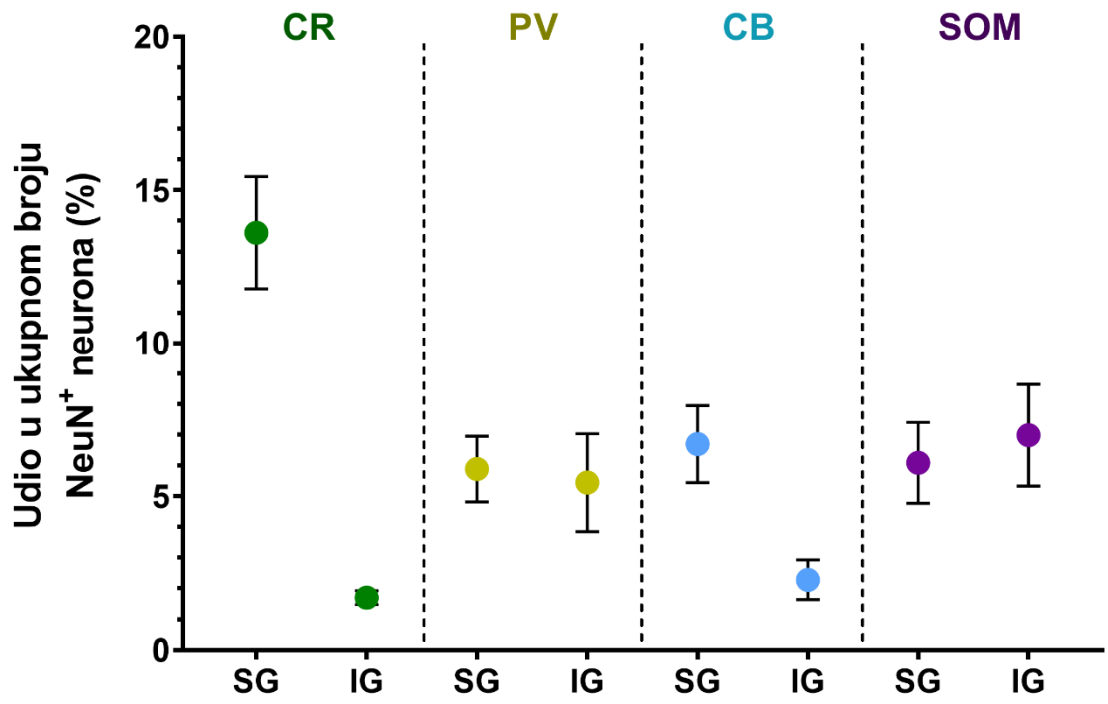
U infragranularnim slojevima najbrojniji su bili SOM^+ neuroni s prosječnim udjelom 6,58 % u BA9 i 7,39 % u BA14r, a nešto manje brojni bili su PV^+ neuroni s prosječnim udjelom 6,13 % u BA9 i 4,76 % u BA14r. CB^+ neuroni bili su slabo zastupljeni u infragranularnim slojevima s prosječnim udjelom od 2,05 % u BA9 i 2,51 % u BA14r, dok su CR^+ neuroni bili najmanje brojni s prosječnim odjelom od 1,57 % u BA9 i 1,82 % u BA14r (Tablica 5.7).

Tablica 5.7. Udjeli pojedinih populacija kortikalnih interneurona u ukupnom broju neurona (u %) u supragranularnim (SG) i infragranularnim (IG) slojevima te granularnom (G) sloju.

		CR		**PV**		**CB**		**SOM**	
		BA9	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**
SG	**Aritmetička sredina**	**11,92**	**15,30**	**6,14**	**5,64**	**6,36**	**7,03**	**5,52**	**6,66**
	SD	2,46	1,25	2,14	0,52	2,22	1,30	2,08	1,57
IG	**Aritmetička sredina**	**1,57**	**1,82**	**6,13**	**4,76**	**2,05**	**2,51**	**6,58**	**7,39**
	SD	1,25	0,27	2,40	2,07	0,18	1,29	1,99	2,77
G	**Aritmetička sredina**	**2,65**	**3,49**	**9,74**	**10,02**	**1,35**	**1,78**	**7,31**	**8,47**
	SD	0,56	0,64	4,71	3,92	0,97	0,87	4,43	4,17

Također, razlike između supragranularnih i infragranularnih slojeva u udjelima CR^+ i CB^+ neurona bile su statistički značajne ($P < 0,0001$ za CR i za CB; upareni t-test), dok razlike u udjelima PV^+ i SOM^+ neurona nisu bile statistički značajne ($P = 0,5819$ za PV; $P = 0,4423$ za SOM) (Slika 5.20).

Iz navedenog slijedi da su razlike u strukturi interneuronske mreže između supragranularnih i infragranularnih slojeva pretežito posljedica razlika u laminarnoj raspodjeli CR^+ i CB^+ neurona smještenih pretežito u supragranularnim slojevima.

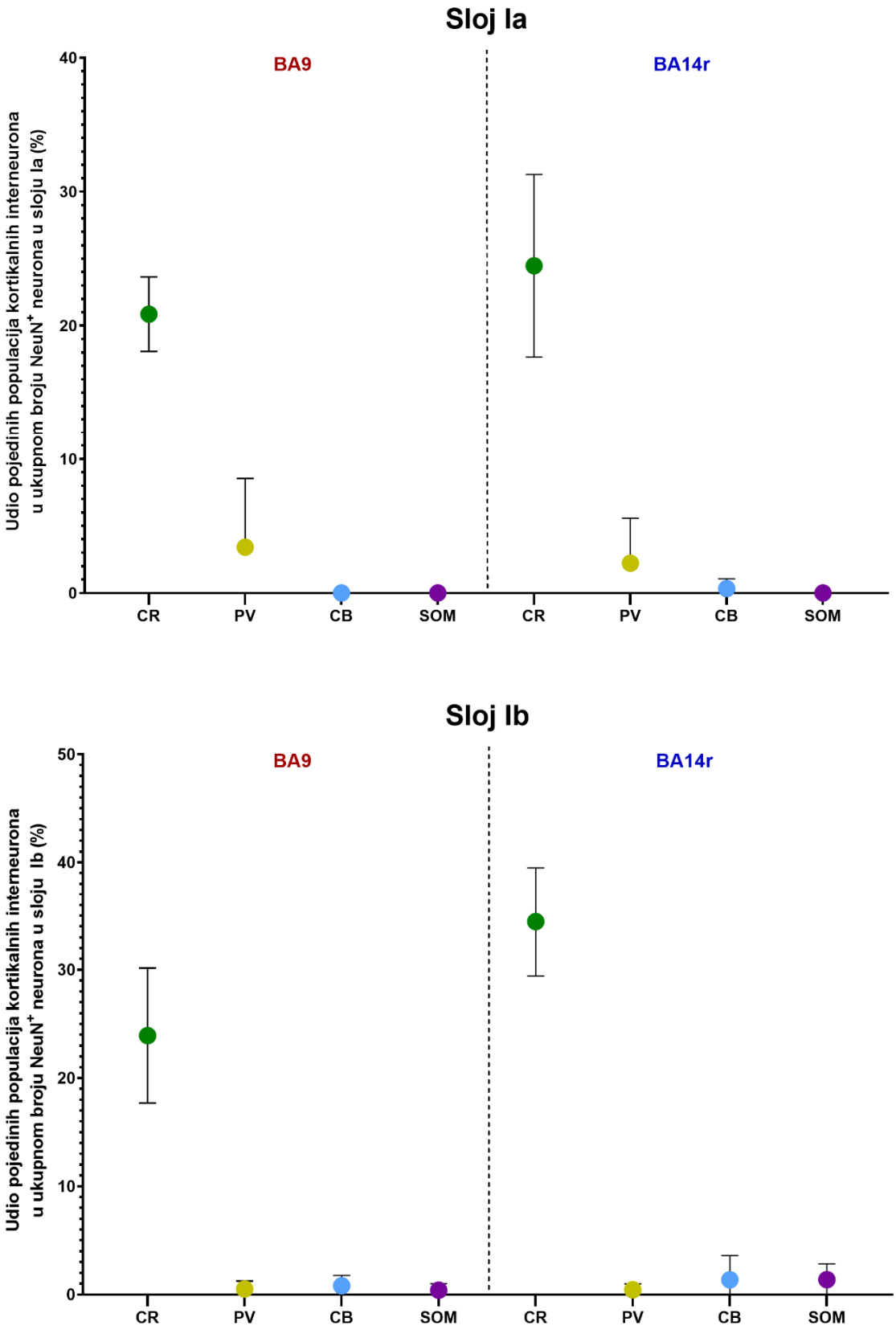


Slika 5.20. Usporedba udjela različitih populacija kortikalnih interneurona u supragranularnim i infragranularnim slojevima (zbirni prikaz za Brodmannova polja 9 i 14r). Podatci su prikazani kao aritmetička sredina s 95%-tnim CI.

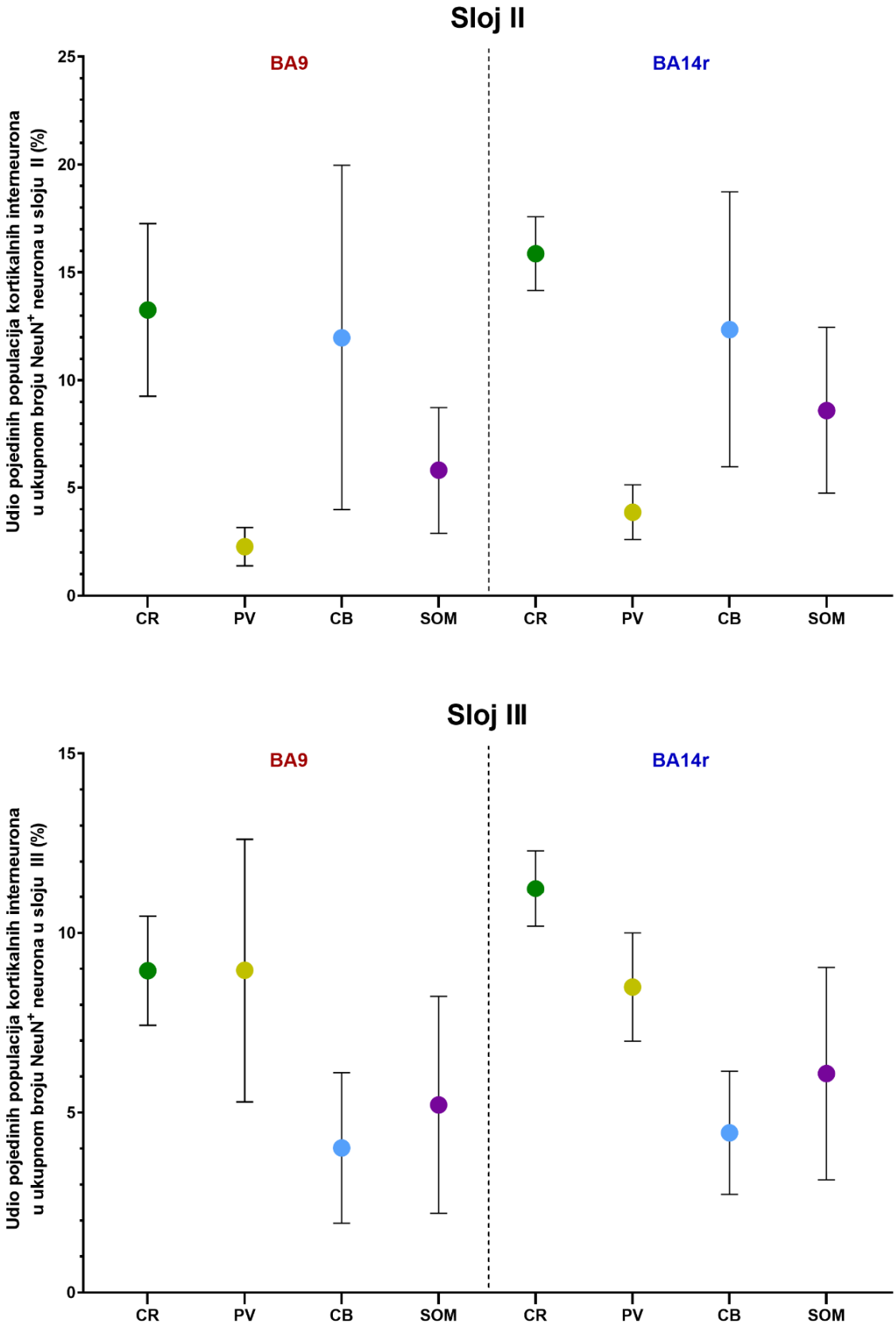
Slično kao i u infragranularnim slojevima, u granularnom sloju najbrojniji su bili PV^+ i SOM^+ neuroni, dok su CR^+ i CB^+ neuroni u tom sloju bili malobrojni.

Razmatrajući svaki sloj moždane kore zasebno, vidljivo je da postoji jedinstven omjer udjela pojedinih populacija kortikalnih interneurona u slojevima I, II i III.

Tako su u sloju I od kortikalnih interneurona bili prisutni gotovo isključivo CR^+ neuroni, s malim udjelima PV^+, CB^+ i SOM^+ neurona (Slika 5.21). U sloju II i dalje su najzastupljeniji bili CR^+ neuroni, ali se udio CB^+ neurona u ovom sloju značajno povećao i bio je vrlo blizak udjelu CR^+ neurona. Udio SOM^+ neurona bio je nešto manji od udjela CB^+ neurona u sloju II, dok su PV^+ neuroni imali najmanji udio od svih populacija u ovom sloju (Slika 5.22). U sloju III su ponovno prosječno najzastupljeniji bili CR^+ neuroni, uz velik udio PV^+ neurona. Treći po zastupljenosti u sloju III bili su SOM^+ neuroni, dok su CB^+ neuroni bili nešto manje brojni u tom sloju (Slika 5.22).

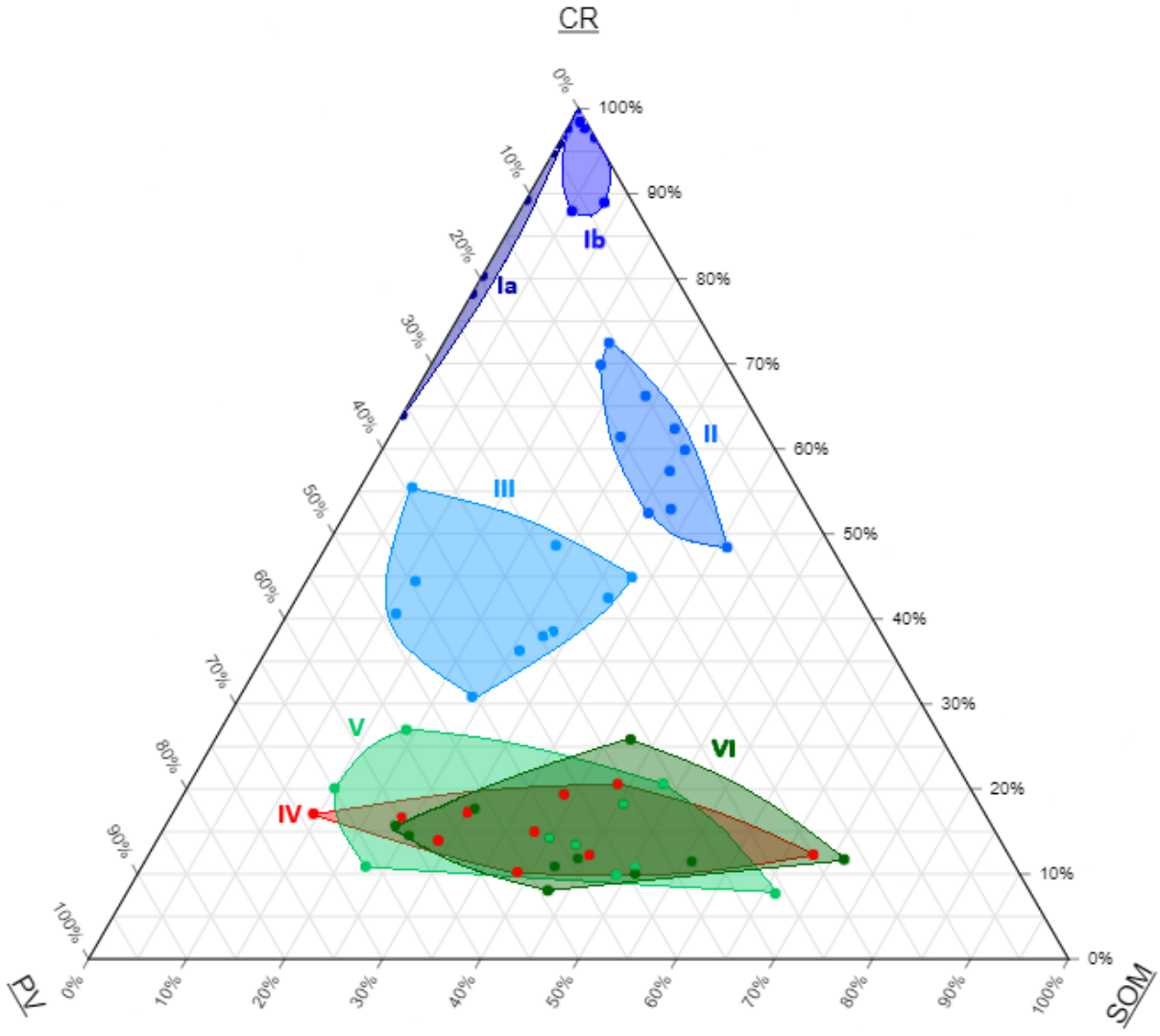


Slika 5.21. Prikaz udjela različitih populacija kortikalnih interneurona u slojevima Ia i Ib. Podatci su prikazani kao aritmetičke sredine, a stupci pogreške predstavljaju SD.



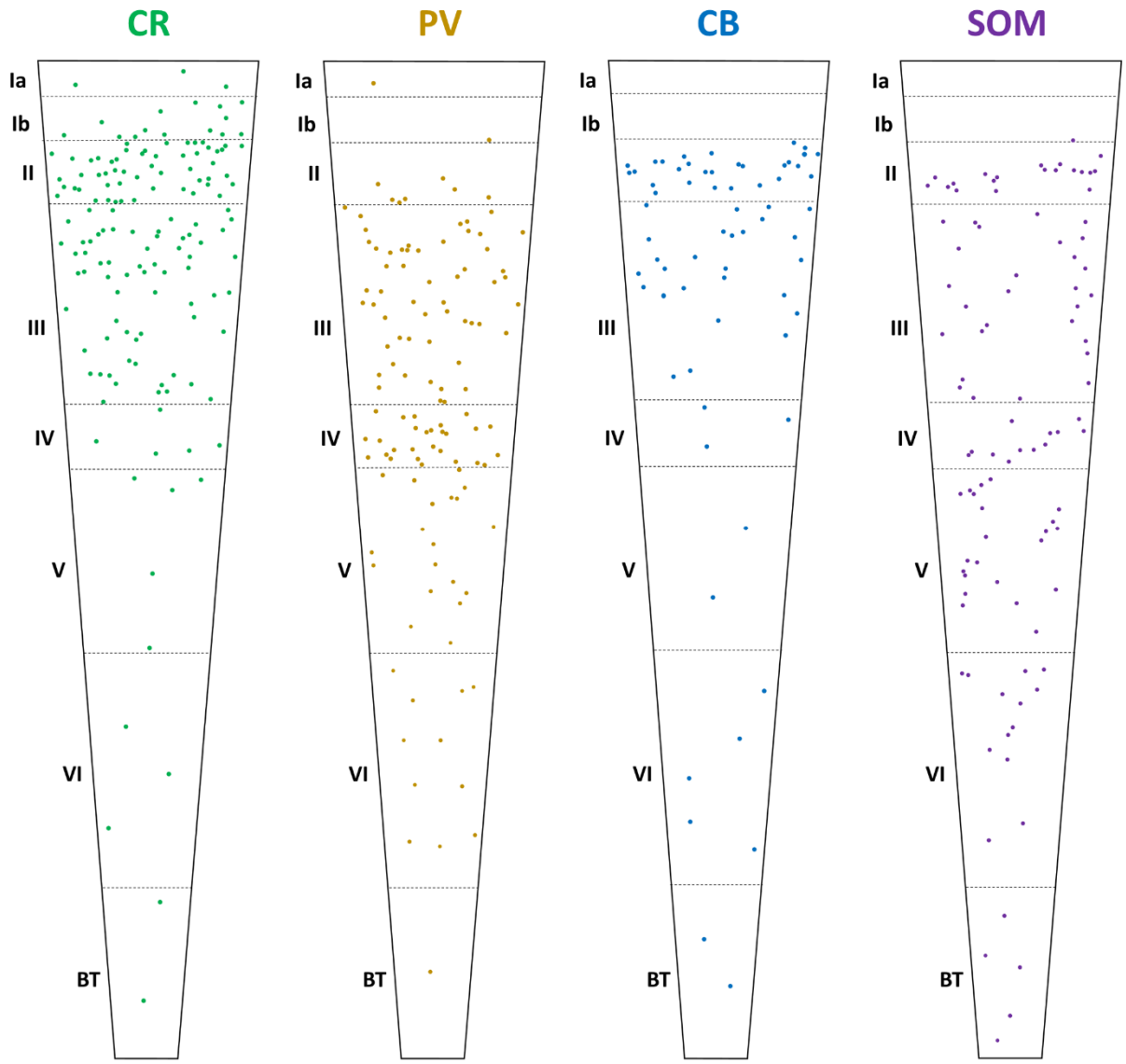
Slika 5.22. Prikaz udjela različitih populacija kortikalnih interneurona u slojevima II i III. Podatci su prikazani kao aritmetičke sredine, a stupci pogreške predstavljaju SD.

Za razliku od supragranularnih slojeva, omjeri udjela populacija kortikalnih interneurona u slojevima IV – VI približno su jednaki s preklapajućim raspodjelama omjera interneurona. U sva tri sloja, PV^+ i SOM^+ neuroni najbrojnije su populacije, a CR^+ i CB^+ neuroni vrlo su slabo zastupljeni (Slika 5.23).



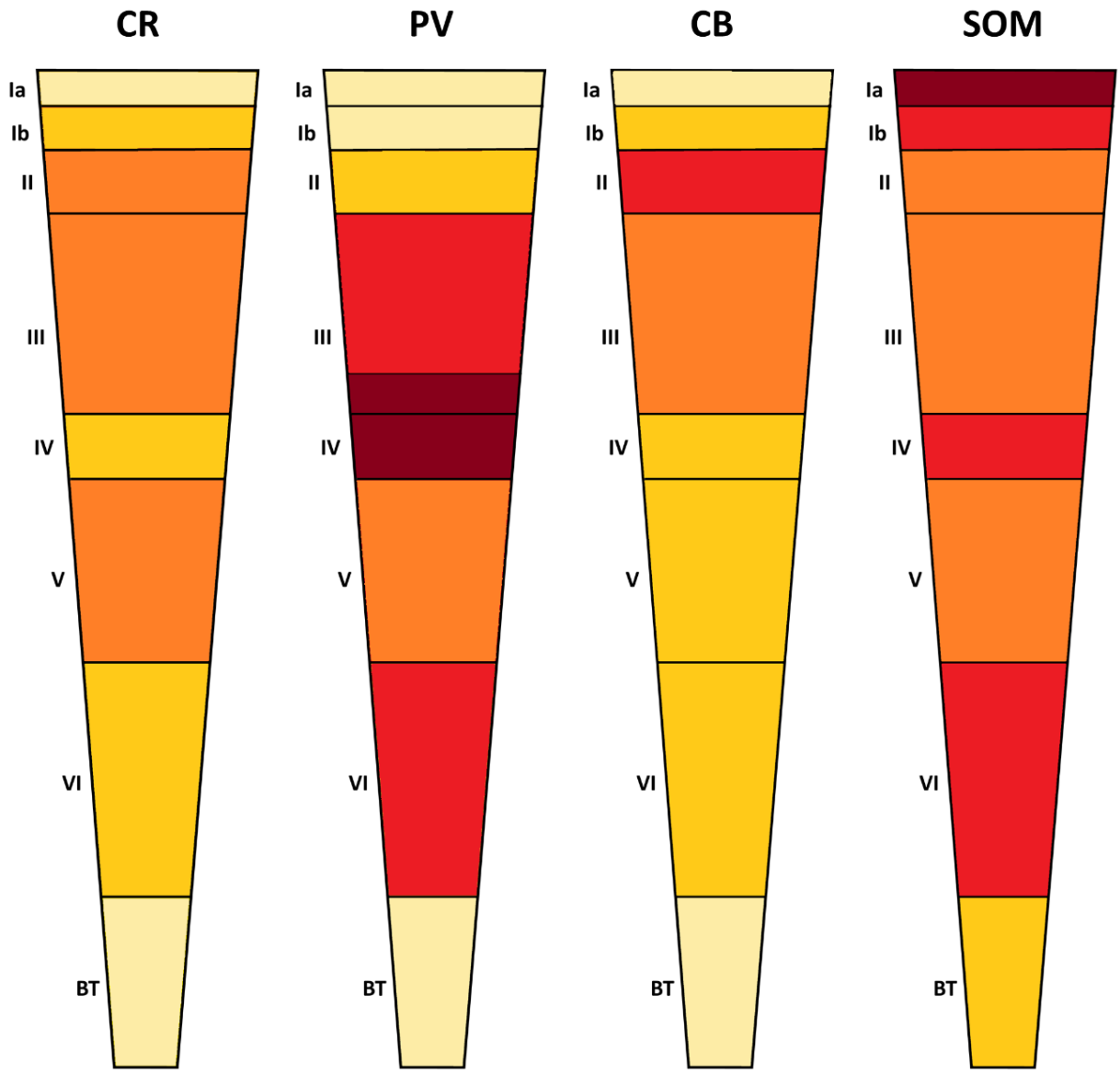
Slika 5.23. Ternarni dijagram koji prikazuje relativne udjele triju najvećih analiziranih populacija kortikalnih interneurona (CR, PV i SOM) u Brodmannovim poljima 9 i 14r. Slojevi I, II i III imaju nepreklapajuće raspodjele omjera populacija interneurona, dok slojevi IV, V i VI imaju preklapajuće raspodjele omjera.

Konačno, iz prikazanog je vidljivo da svaka analizirana populacija interneurona ima jedinstvenu raspodjelu po slojevima (Slika 5.24 i Tablica 5.8).



Slika 5.24. Točkasti dijagrami s prikazom raspodjele različitih populacija kortikalnih interneurona po slojevima moždane kore (zbirni prikaz za Brodmannova polja 9 i 14r). Vidljivo je da svaka populacija interneurona ima specifičnu raspodjelu po slojevima.

Osim toga, i živčana vlakana svake od analiziranih populacija interneurona imaju jedinstvenu raspodjelu po slojevima (Slika 5.25 i Tablica 5.8).



Slika 5.25. Kvalitativni prikaz gustoće živčanih vlakana pojedinih populacija kortikalnih interneurona pomoću toplinske skale (zbirni prikaz za Brodmannova polja 9 i 14r). Tamno crvena boja predstavlja vrlo visoku gustoću vlakana, zatim slijede svijetlo crvena boja koja predstavlja veliku gustoću vlakana, narančasta boja koja predstavlja srednju gustoću vlakana, žuta boja koja predstavlja nisku gustoću vlakana i svijetlo žuta boja koja predstavlja vrlo nisku gustoću vlakana.

Tablica 5.8. Kvalitativna usporedba laminarne raspodjele tijela i vlakana pojedinih populacija kortikalnih interneurona. Broj oznaka „+“ označava relativne odnose brojnosti tijela/gustoće vlakana interneurona. Oznaka „–“ označava gotovo potpunu odsutnost tijela neurona ili vlakana. Oznaka „*“ označava sporadičnu prisutnost tijela neurona.

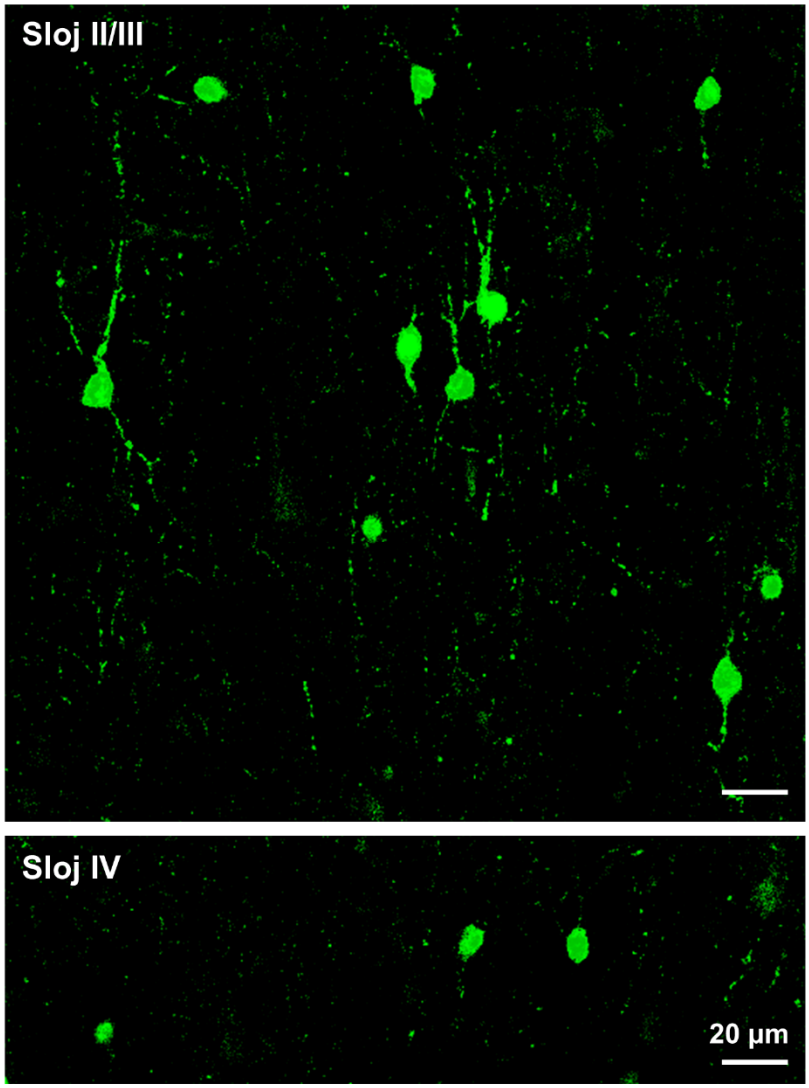
Sloj	CR		PV		CB		SOM	
	tijela	vlakna	tijela	vlakna	tijela	vlakna	tijela	vlakna
Ia	+	+	*	–	–	++	–	++++
Ib	+++	++	*	–	*	+	*	+++
II	++++	++	++	++	+++	+++	+++	++
III	+++	++	+++	++++	+++	++	+++	++
IV	+	+	++++	++++	+	+	++++	+++
V	+	++	+++	+++	+	+	+++	++
VI	+	+	+	++	++	+	+++	+++

5.3. Morfološka obilježja pojedinih populacija kortikalnih interneurona

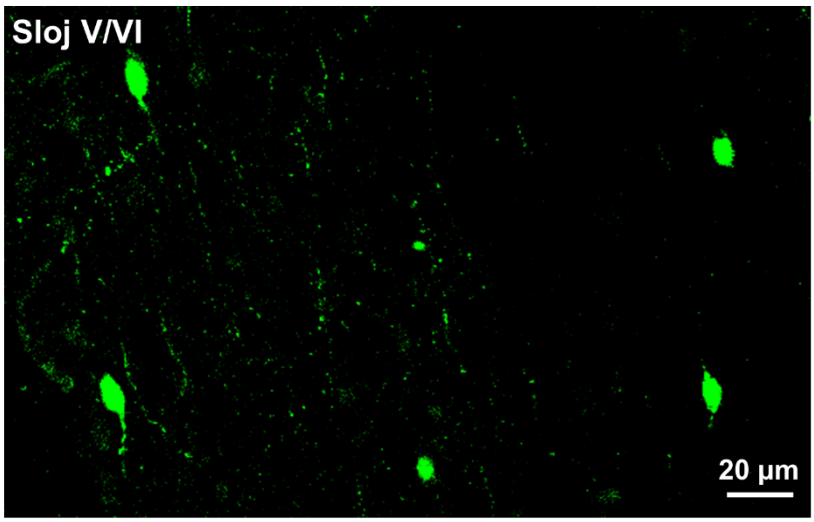
Statistička analiza pokazala je da ne postoje značajne razlike između BA9 i BA14r u morfometrijskim parametrima pa su u daljnjem tekstu rezultati morfometrijske analize prikazani zbirno za obje regije.

5.3.1. Morfološka obilježja kalretininskih neurona

Većina CR^+ neurona imala je ovalno tijelo položeno okomito na pijalnu površinu, a morfološki su često pripadali skupini bipolarnih stanica (Slika 5.26 i Slika 5.27). Dio CR^+ neurona u sloju Ia imao je vodoravno položeno tijelo tipično za Cajal-Retziusove stanice.

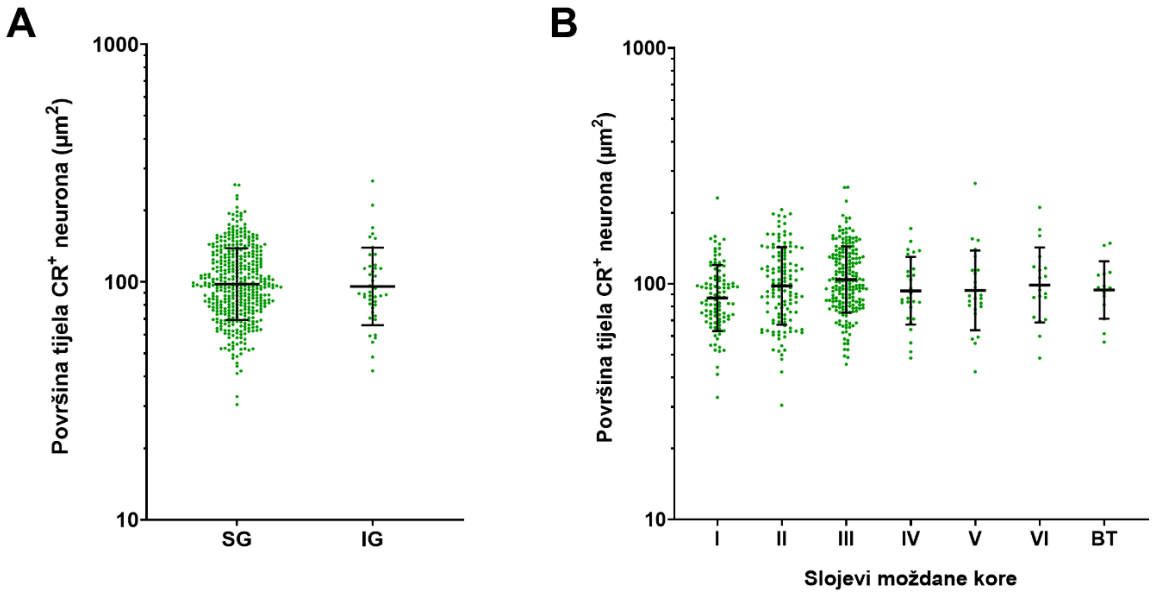


Slika 5.26. Konfokalne snimke koje prikazuju morfologiju CR^+ neurona na granici slojeva II i III te u sloju IV u Brodmannovom polju 9.



Slika 5.27. Konfokalna snimka koja prikazuje morfologiju CR^+ neurona u slojevima V i VI u Brodmannovom polju 9.

Površina tijela CR^+ neurona bila je prosječno 97,51 μm^2 ×÷ 1,41, bez značajne razlike između supragranularnih (98,06 μm^2 ×÷ 1,42) i infragranularnih (95,92 μm^2 ×÷ 1,46) slojeva (P = 0,5802, Mann-Whitneyev test) (Slika 5.28).

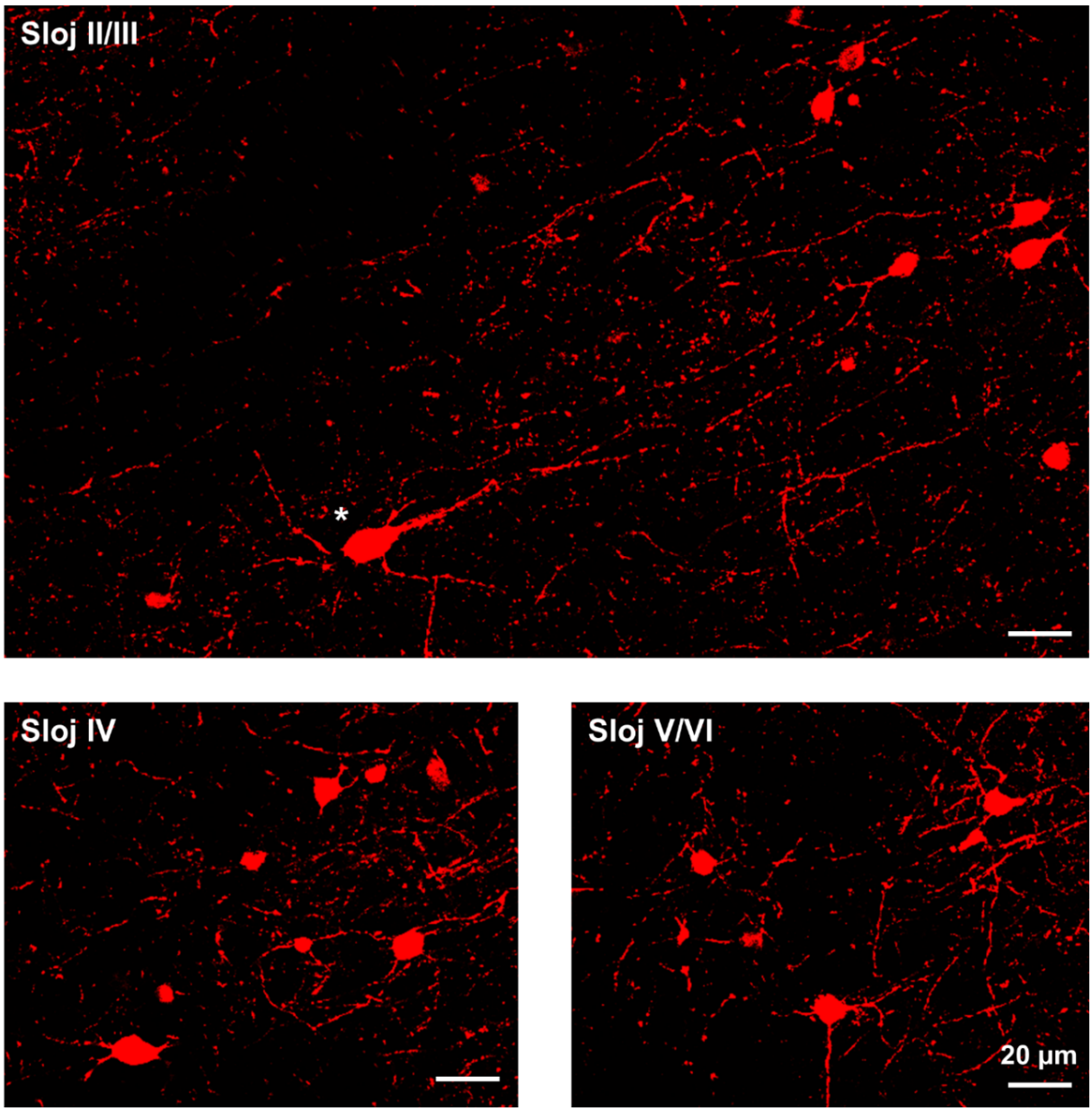


Slika 5.28. Točkasti dijagrami raspršenja s prikazom raspodjele površine tijela CR^+ neurona na logaritamskoj skali (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Dugačke horizontalne crte predstavljaju geometrijsku sredinu, a stupci pogreške GSD. (**A**) Usporedba površine tijela CR^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva. (**B**) Raspodjela površine tijela CR^+ neurona po slojevima moždane kore.

Kružnost CR^+ neurona bila je prosječno 0,64 ± 0,11 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, P = 0,8618, Welchov t-test), a aspektni omjer 0,68 ± 0,12 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, P = 0,5409, Welchov t-test).

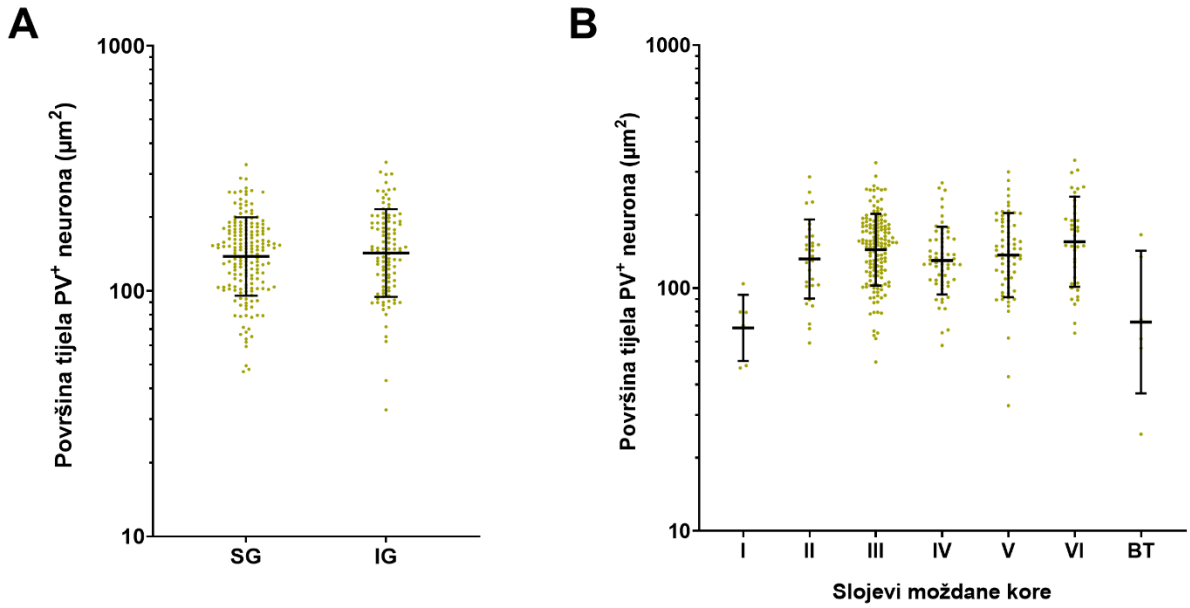
5.3.2. Morfološka obilježja parvalbuminskih neurona

PV^+ neuroni bili su multipolarni s pretežito okruglim, a rjeđe jajolikim oblikom tijela (Slika 5.29). Morfološki su PV^+ neuroni najčešće pripadali skupini košarastih stanica.



Slika 5.29. Konfokalne snimke koje prikazuju morfologiju PV^+ neurona u različitim slojevima moždane kore u Brodmannovom polju 9. Manji broj PV^+ neurona bio je nešto veći od prosjeka s jajolikim oblikom tijela (na slici označen zvjezdicom, *), obično smješten u sloju III ili sloju V.

Površina tijela PV^+ neurona bila je prosječno 136,70 μm^2 ×÷ 1,48, bez značajne razlike između supragranularnih (138,40 μm^2 ×÷ 1,45) i infragranularnih (143,00 μm^2 ×÷ 1,51) slojeva (P = 0,5120) (Slika 5.30).



Slika 5.30. Točkasti dijagrami raspršenja s prikazom raspodjele površine tijela PV^+ neurona na logaritamskoj skali (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Dugačke horizontalne crte predstavljaju geometrijsku sredinu, a stupci pogreške GSD. (**A**) Usporedba površine tijela PV^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva. (**B**) Raspodjela površine tijela PV^+ neurona po slojevima moždane kore.

Kružnost PV^+ neurona bila je prosječno 0,69 ± 0,10 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, P = 0,4443), a aspektni omjer 0,73 ± 0,10 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, P = 0,5637).

5.3.3. Morfološka obilježja kalbindinskih neurona

CB^+ neuroni u supragranularnim slojevima većinom su bili multipolarni s okruglim (manjeg maksimalnog promjera) ili jajolikim (većeg maksimalnog promjera) oblikom tijela. Valja napomenuti da je u supragranularnim slojevima i dio piramidnih neurona bio imunoreaktivan na CB, što gotovo nikad nije bio slučaj kod anti-CR i anti-PV bojenja. Ipak, imunoreaktivnost na CB u interneuronima bila je značajno jača od imunoreaktivnosti u piramidnim neuronima, što je potvrđeno i značajnom razlikom u intenzitetu signala između CB^+ interneurona i piramidnih neurona. Piramidni neuroni imunoreaktivni na CB bili su pretežito smješteni u sloju III, a manji broj takvih neurona bio je prisutan i u sloju II (Slika 5.31).

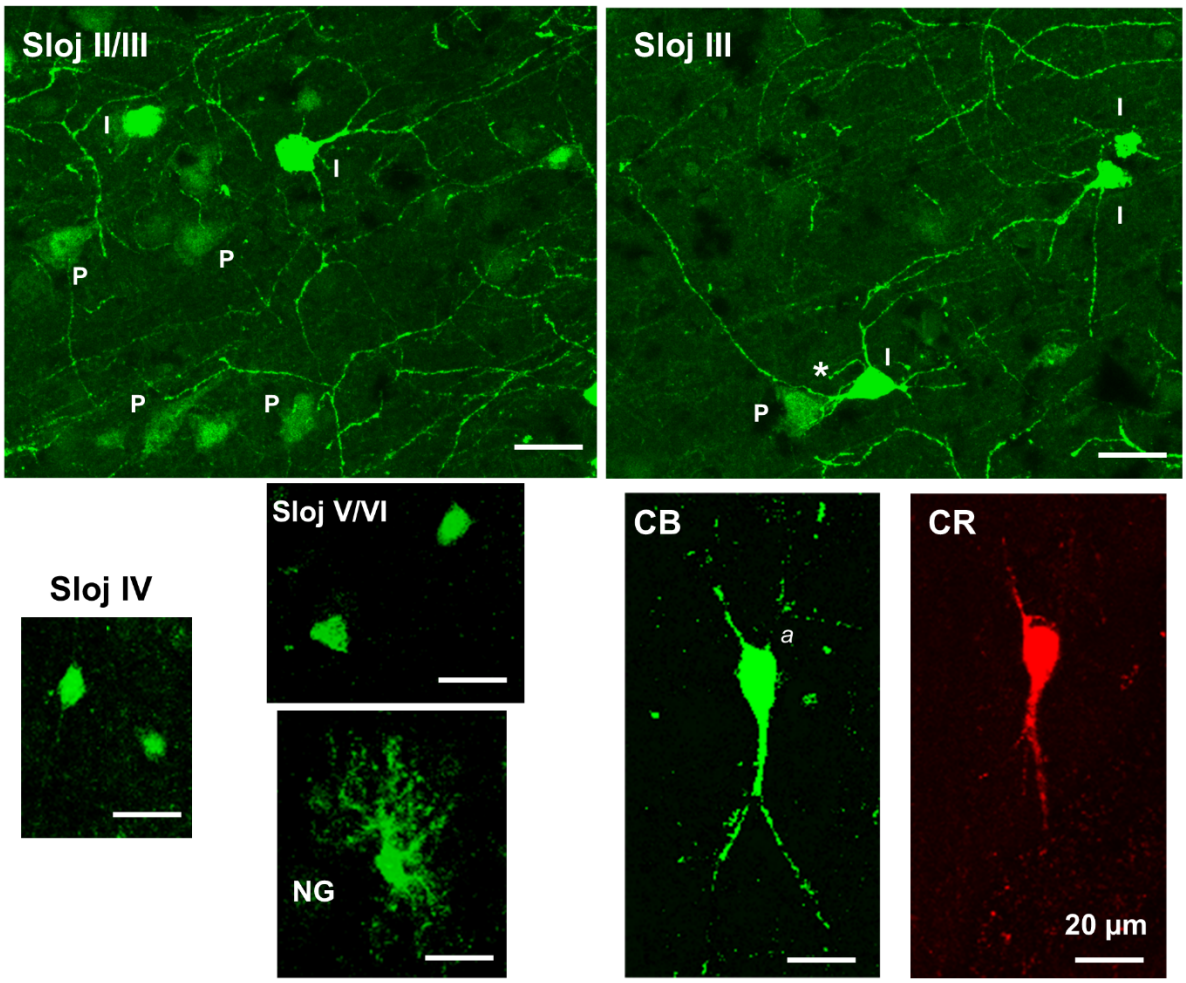
Većina CB^+ neurona u infragranularnim slojevima imala je mala okrugla tijela, a detaljnu morfologiju bilo je teško odrediti budući da su bili slabo imunoreaktivni u području dendrita (Slika 5.31). Pojedini CB^+ neuroni, smješteni prvenstveno u infragranularnim slojevima, imali su morfologiju tipičnu za neuroglijaformne stanice – imali su mala stanična tijela te brojne radijarno usmjerene kratke dendrite koji se rijetko granaju (Slika 5.31).

U infragranularnim slojevima ponekad je bio prisutan i pokoji veliki CB^+ neuron s tankim uzlaznim nastavkom (vjerojatno akson) i općenito morfologijom sličnom onoj opisanoj u rezus majmuna. Na dvostruko obilježenim anti-CR i anti-CB rezovima potvrđeno je da su te stanice imunoreaktivne samo na CB (CB^+/CR^-), ali su u supragranularnim slojevima nađene morfološki vrlo slične stanice koje su bile imunoreaktivne samo na CR (CR^+/CB^-) (Slika 5.31).

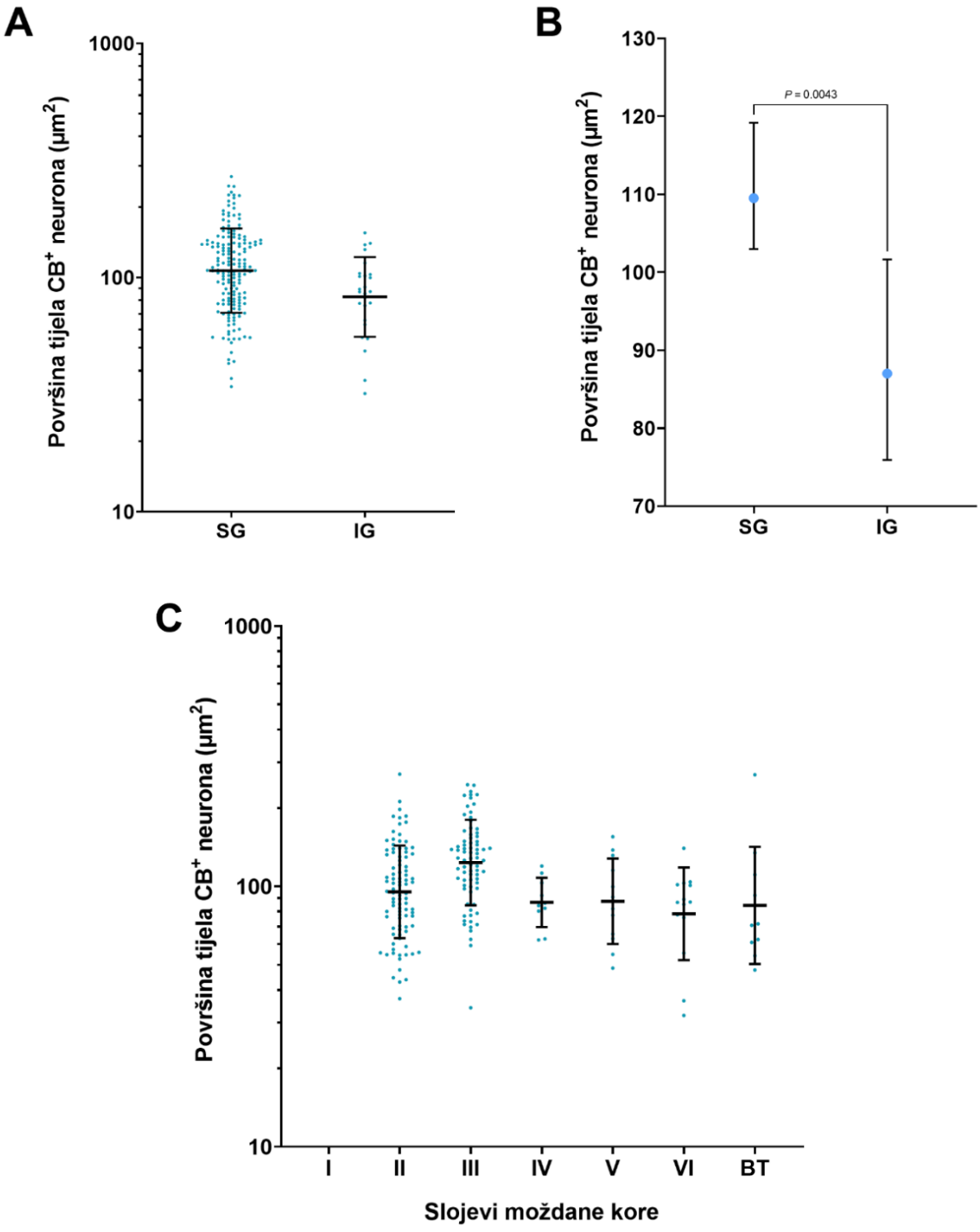
CB^+ neuroni u granularnom sloju imali su iznimno mala okrugla tijela, a također su bili slabo imunoreaktivni u području dendrita (Slika 5.31).

Površina tijela CB^+ interneurona bila je prosječno 101,70 μm^2 ×÷ 1,52, pri čemu je u supragranularnim slojevima bila značajno veća (107,10 μm^2 ×÷ 1,51) nego u infragranularnim slojevima (82,65 μm^2 ×÷ 1,48) ($P = 0{,}0043$) (Slika 5.32).

Kružnost CB^+ neurona bila je prosječno 0,68 ± 0,10 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, $P = 0{,}6292$), a aspektni omjer 0,70 ± 0,11 (bez značajne razlike između supra- i infragranularnih slojeva, $P = 0{,}8226$).



Slika 5.31. Konfokalne snimke koje prikazuju morfologiju CB^+ neurona u različitim slojevima moždane kore u Brodmannovim poljima 9 i 14r. U slojevima II i III vidljive su slabo imunoreaktivne piramidne stanice (P) i jako imunoreaktivni interneuroni (I). U sloju IV vidljivi su mali okrugli CB^+ neuroni, a većina CB^+ neurona u slojevima V i VI svega je malo veća od neurona u sloju IV. U slojevima V i VI ponekad se nalaze neuroglijaformne stanice (NG) te veliki CB^+ neuroni s tankim uzlaznim nastavkom (CB) koji vjerojatno predstavlja akson (*a*). Na dvostruko obilježenim anti-CR i anti-CB rezovima vidljivo je da se morfološki slični CR^+/CB^- neuroni nalaze u supragranularnim slojevima (CR).



Slika 5.32. Prikaz površine tijela CB^+ neurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Dugačke horizontalne crte u panelima A i C predstavljaju geometrijsku sredinu, a stupci pogreške GSD. (**A**) Usporedba površine tijela CB^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva na logaritamskoj skali. (**B**) Usporedba površine tijela CB^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva na linearnoj skali (vrijednosti prikazane kao medijan s 95%-tnim CI; budući da nema preklapanja CI, razlika je statistički značajna). (**C**) Raspodjela površine tijela CB^+ neurona po slojevima moždane kore prikazana na logaritamskoj skali.

5.3.4. Morfološka obilježja somatostatinskih neurona

Za razliku od do sada opisanih populacija kortikalnih interneurona, SOM^+ neuroni pokazivali su jasnu razliku u imunoreaktivnosti između supragranularnih i infragranularnih slojeva. SOM^+ neuroni u supragranularnim slojevima bili su znatno manje imunoreaktivni u odnosu na SOM^+ neurone u infragranularnim slojevima (Slika 5.33). Također, za razliku od ostalih molekularnih biljega (CR, PV i CB) kojima je imunofluorescencijom prikazano cijelo tijelo neurona, anti-SOM bojenje prikazivalo je poglavito citoplazmu u području tijela neurona, dok područje stanične jezgre većinom nije bilo imunoreaktivno.

Mnogi SOM^+ neuroni morfološki su pripadali skupini Martinottijevih stanica što potvrđuje velika gustoća SOM^+ vlakana u sloju Ia.

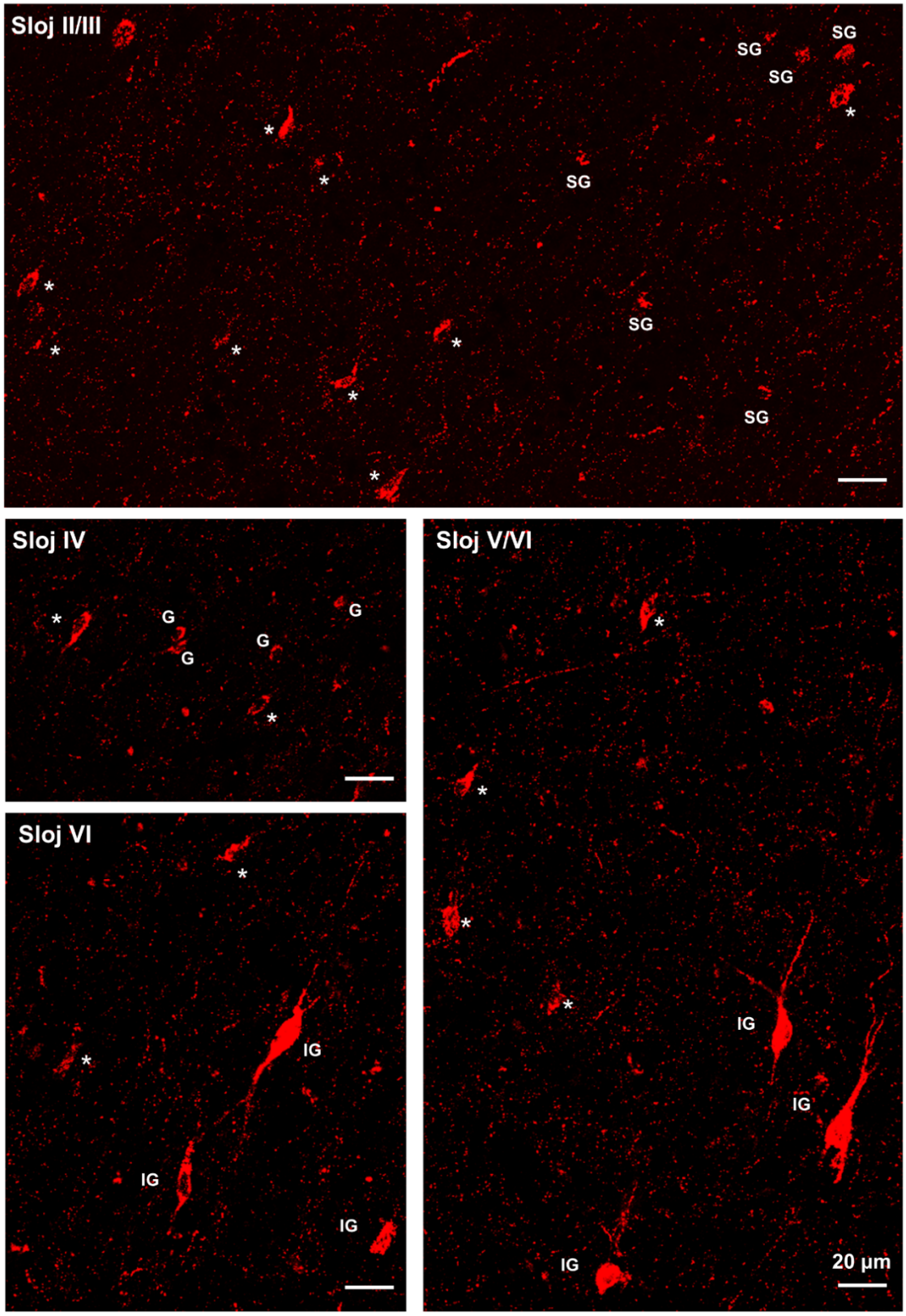
SOM^+ neuroni supragranularnih slojeva većinom su imali tijela okruglog (manjeg promjera tijela) ili ovalnog oblika (većeg promjera tijela), dok je dio SOM^+ neurona bio znatno veći s jako izduženim okomito usmjerenim tijelom vretenastoga oblika (Slika 5.33).

SOM^+ neuroni u infragranularnim slojevima sastojali su se od barem dvije morfološke skupine okomito usmjerenih stanica – manjih, pretežito ovalnih i malo izduženih stanica te većih, pretežito vretenastih i jako izduženih stanica. Valja naglasiti da je morfološka raznolikost velikih SOM^+ neurona infragranularnih slojeva iznimno velika te iako je većina tih stanica vretenastog oblika, dio ih je nepravilnog (polimorfnog) oblika tijela (Slika 5.33).

Za SOM^+ neurone u sloju IV bilo je teško odrediti detaljnu morfologiju budući da su pokazivali slabu imunoreaktivnost u području dendrita (Slika 5.33).

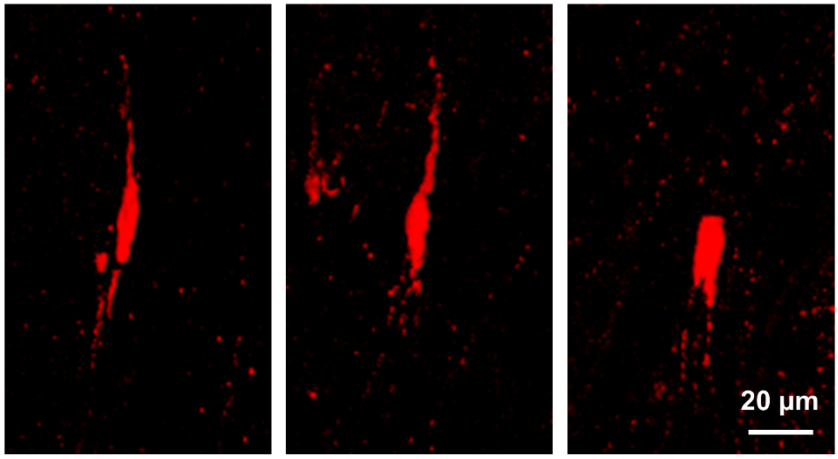
Općenito, moguće je definirati barem četiri velike morfološke skupine SOM^+ neurona u moždanoj kori, od kojih svaka ima specifičnu raspodjelu po slojevima:

1. umjereno imunoreaktivne, srednje velike i blago izdužene ovalne stanice prisutne u svim slojevima moždane kore (osim u sloju I),
2. slabo imunoreaktivne, male i okrugle stanice prisutne isključivo u supragranularnim slojevima (dominantno u sloju II),
3. slabo imunoreaktivne, iznimno male i okrugle stanice prisutne gotovo isključivo u sloju IV (i eventualno u gornjim dijelovima sloja V na granici sa slojem IV),
4. jako imunoreaktivne, iznimno velike i jako izdužene vretenaste (češće) ili polimorfne (rjeđe) stanice prisutne dominantno u infragranularnim slojevima te sporadično u sloju III.



Slika 5.33. Konfokalne snimke koje prikazuju morfologiju SOM^+ neurona moždane kore u Brodmannovom polju 14r. Vidljiva su barem četiri morfološka tipa stanica: srednje velike ovalne stanice (*), male okrugle stanice karakteristične za supragranularne slojeve (SG), iznimno male okrugle stanice karakteristične za granularni sloj (G) te velike vretenaste i polimorfne stanice karakteristične za infragranularne slojeve (IG).

U bijeloj tvari bile su prisutne isključivo velike vretenaste ili polimorfne SOM^+ stanice, slične velikim SOM^+ stanicama infragranularnih slojeva. Ipak, vretenaste SOM^+ stanice u bijeloj tvari bile su uglavnom još izduženije od vretenastih stanica u infragranularnim slojevima s često gotovo štapićastim oblikom tijela (Slika 5.34).



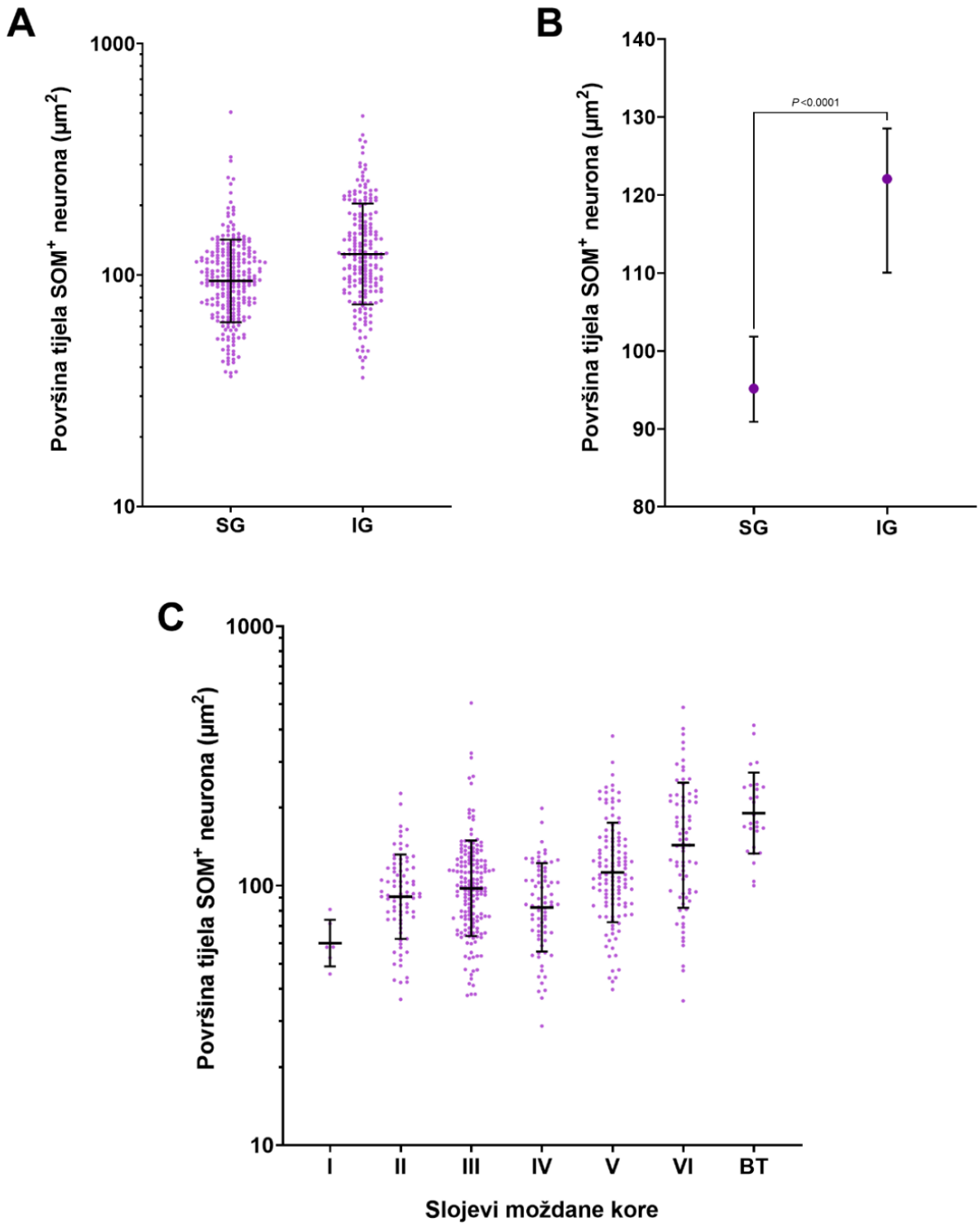
Slika 5.34. Konfokalne snimke koje prikazuju morfologiju SOM^+ neurona u bijeloj tvari u Brodmannovom polju 14r. Svi SOM^+ neuroni u bijeloj tvari su vrlo veliki, veličinom slični velikim SOM^+ neuronima u infragranularnim slojevima. Najveći broj SOM^+ neurona u bijeloj tvari je izuzetno izduženog vretenastog (gotovo štapićastog) oblika tijela (često izduženijeg nego u infragranularnim slojevima), a manji dio je nepravilnog, polimorfnog oblika tijela.

Površina tijela SOM^+ neurona bila je prosječno 105,80 μm^2 $\times\div$ 1,62, pri čemu je u infragranularnim slojevima bila značajno veća (123,30 μm^2 $\times\div$ 1,65) nego u supragranularnim slojevima (94,33 μm^2 $\times\div$ 1,51) ($P < 0{,}0001$) (Slika 5.35).

Općenito, površina tijela SOM^+ neurona povećavala se progresivno s dubinom sloja u moždanoj kori, uz iznimku sloja IV u kojem su SOM^+ neuroni prosječno imali manju površinu tijela od oba susjedna sloja (82,51 μm^2 $\times\div$ 1,48) zbog dominacije iznimno malih okruglih SOM^+ neurona u tom sloju.

Porast veličine tijela SOM^+ neurona u infragranularnim slojevima posljedica je većeg broja izuzetno velikih vretenastih i polimorfnih stanica koje su veličinom usporedive sa srednje velikim piramidnim stanicama (300 – 500 μm^2).

Budući da su u bijeloj tvari bile prisutne isključivo velike SOM^+ stanice, prosječna površina SOM^+ stanica bila je najveća upravo u bijeloj tvari (190,50 μm^2 $\times\div$ 1,43).

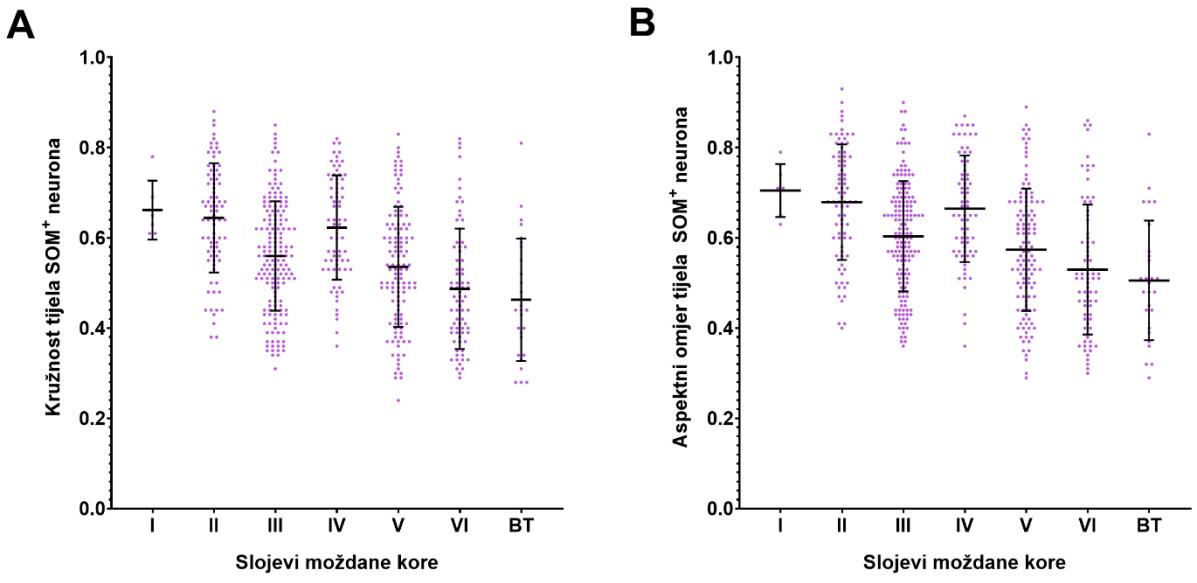


Slika 5.35. Prikaz površine tijela SOM⁺ neurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Dugačke horizontalne crte u panelima A i C predstavljaju geometrijsku sredinu, a stupci pogreške GSD. (**A**) Usporedba površine tijela SOM⁺ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva na logaritamskoj skali. (**B**) Usporedba površine tijela SOM⁺ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva na linearnoj skali (vrijednosti prikazane kao medijan s 95%-tnim CI; budući da nema preklapanja CI, razlika je statistički značajna). (**C**) Raspodjela površine tijela SOM⁺ neurona po slojevima moždane kore prikazana na logaritamskoj skali.

Kružnost SOM$^+$ neurona bila je prosječno 0,56 ± 0,14, pri čemu je kružnost u supragranularnim slojevima bila značajno veća (0,59 ± 0,13) od kružnosti u infragranularnim slojevima (0,52 ± 0,14) (P < 0,0001) (Slika 5.36).

Aspektni omjer SOM $^+$ neurona bio je prosječno 0,60 ± 0,14, a kao i kružnost, značajno veći bio je u supragranularnim slojevima (0,63 ± 0,13) nego u infragranularnim slojevima (0,56 ± 0,14) (P < 0,0001) (Slika 5.36).

Smanjenje kružnosti i aspektnog omjera tijela SOM$^+$ neurona u infragranularnim slojevima ponovno je posljedica prisutnosti značajnog broja velikih izuzetno izduženih vretenastih stanica.



Slika 5.36. Točkasti dijagrami raspršenja s prikazom raspodjele kružnosti (**A**) i aspektnog omjera (**B**) tijela SOM$^+$ neurona po slojevima (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Dugačke horizontalne crte predstavljaju aritmetičku sredinu, a stupci pogreške SD.

5.3.5. Usporedba morfoloških obilježja pojedinih populacija interneurona

Osim u laminarnoj raspodjeli, analizirane populacije kortikalnih interneurona razlikovale su se međusobno i u određenim morfometrijskim parametrima. Tako su PV^+ neuroni imali prosječno uvjerljivo najveću površinu tijela (136,70 μm^2), a CR^+ neuroni najmanju (97,51 μm^2). SOM^+ neuroni imali su drugu po veličini prosječnu površinu tijela (105,80 μm^2), dok su CB^+ neuroni imali nešto manju prosječnu površinu tijela (101,70 μm^2) (Tablica 5.9 i Slika 5.37).

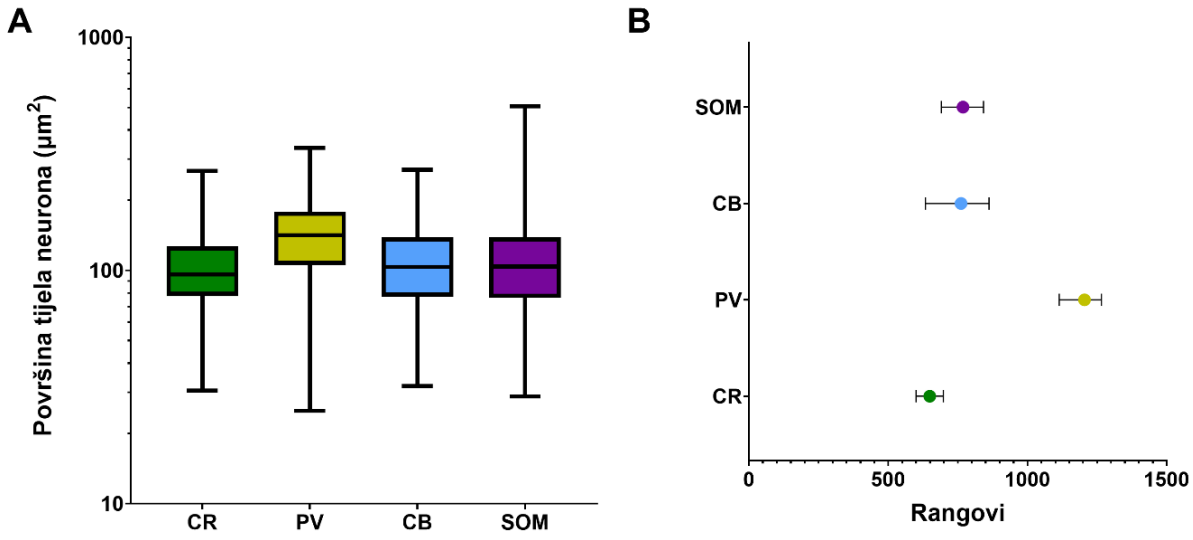
Razlike u površini tijela između PV^+ neurona i svih ostalih populacija kortikalnih interneurona bile su statistički značajne ($P < 0,0001$ za sve usporedbe, Kruskal-Wallisov test s Dunnovim *post hoc* testom), kao i razlika između CR^+ i SOM^+ neurona ($P = 0,0196$) (Slika 5.37).

Tablica 5.9. Prosječne površine tijela i varijabilnost površine tijela pojedinih populacija interneurona.

	CR	PV	CB	SOM
Geometrijska sredina (μm^2)	**97,51**	**136,70**	**101,70**	**105,80**
GSD	1,41	1,48	1,52	1,62
Medijan (μm^2)	**96,27**	**141,50**	**103,60**	**103,90**
IQR (μm^2)	49,11	73,20	61,41	62,60
CV (%)	35,43	36,84	42,09	55,35
QCD (%)	24,02	25,76	28,48	29,09

Treba naglasiti da su se populacije interneurona dodatno razlikovale i u varijabilnosti površine tijela. Od svih populacija interneurona, SOM^+ neuroni imali su daleko najveću varijabilnost površine tijela (CV = 55,35 %), a zatim slijede redom CB^+ neuroni (CV = 42,09 %), PV^+ neuroni (CV = 36,84 %) te CR^+ neuroni (CV = 35,43 %) (Tablica 5.9).

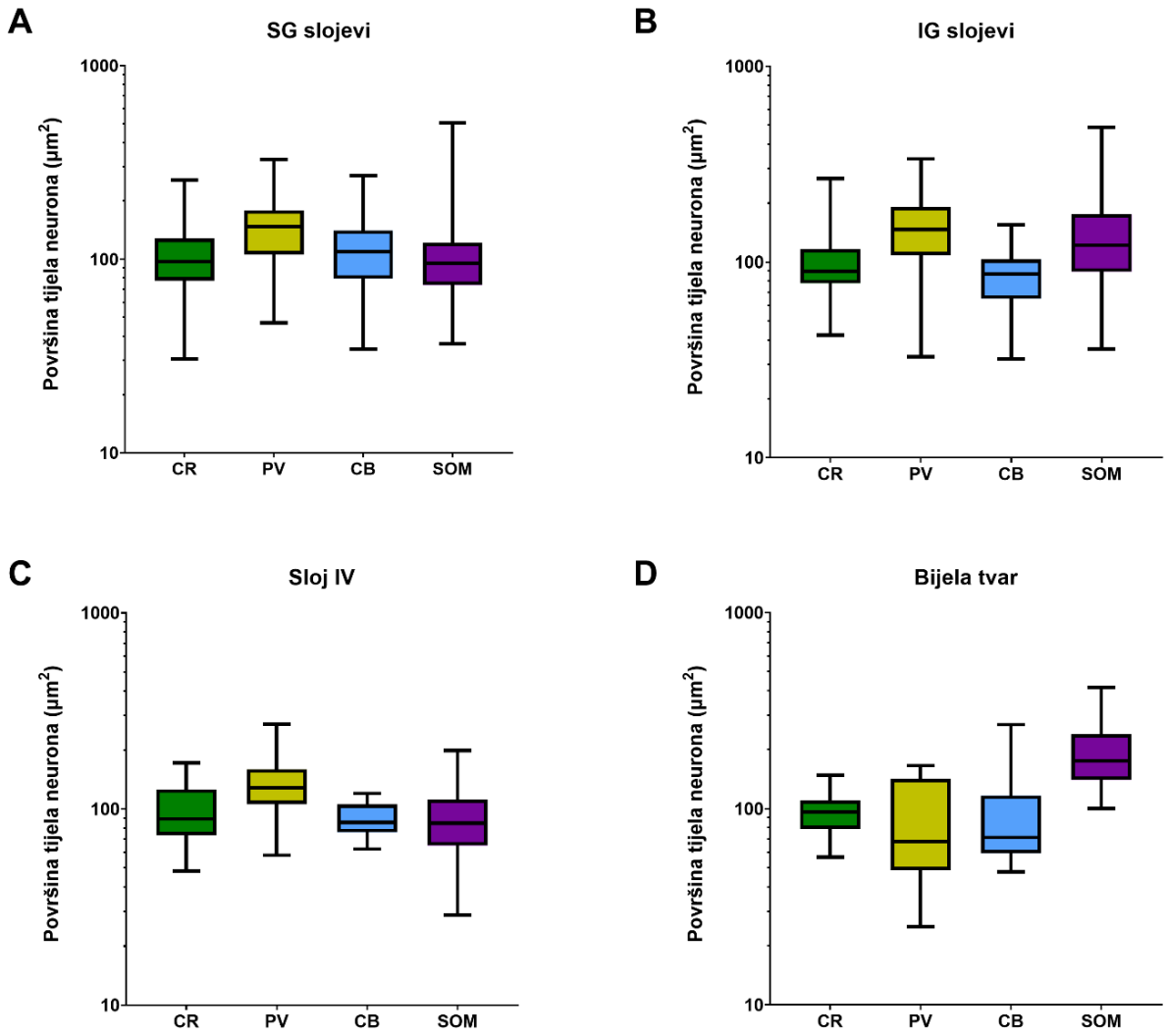
Izuzetno velika varijabilnost površine tijela SOM^+ neurona posljedica je prisutnosti velikih vretenastih i polimorfnih stanica (pretežito u infragranularnim slojevima), dok je velika varijabilnost površine tijela CB^+ neurona posljedica prisutnosti malih CB^+ neurona u infragranularnim slojevima.



Slika 5.37. (**A**) Pravokutni dijagrami koji prikazuju na logaritamskoj skali raspodjelu površina tijela neurona za različite populacije kortikalnih interneurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Središnja horizontalna crta predstavlja medijan, gornja i donja stranica pravokutnika predstavljaju treću, odnosno prvu kvartilu, a stupci pogreške predstavljaju ukupni raspon (maksimalnu i minimalnu vrijednost). (**B**) Dijagram rangova kao rezultat analize Kruskal-Wallisovim testom. Prikazani su medijani rangova s 95%-tnim CI. Statistički značajne su razlike između populacija interneurona čiji se CI ne preklapaju.

Budući da su se površine tijela CB^+ i SOM^+ neurona značajno razlikovale između supragranularnih i infragranularnih slojeva, napravljena je dodatna usporedba površina tijela u supragranularnim i infragranularnim slojevima te u granularnom sloju i bijeloj tvari (Slika 5.38).

U supragranularnim slojevima najveću površinu tijela imali su PV^+ neuroni (138,40 μm^2), a najmanju SOM^+ neuroni (94,33 μm^2). CB^+ neuroni imali su drugu najveću površinu tijela (107,10 μm^2), a CR^+ neuroni bili su treći po veličini (98,06 μm^2) (Slika 5.38). Statistički značajne su ponovno bile razlike između PV^+ neurona i ostalih populacija interneurona ($P < 0,0001$ za sve usporedbe), kao i razlike između CB^+ i SOM^+ neurona ($P = 0,0038$) te CB^+ i CR^+ neurona ($P = 0,0428$). Nadalje, unatoč tome što su SOM^+ neuroni imali prosječno najmanju površinu tijela u supragranularnim slojevima, najveći SOM^+ neuron (506,07 μm^2) površinom tijela nadmašuje najveći PV^+ neuron (328,05 μm^2) (Slika 5.38).



Slika 5.38. Pravokutni dijagrami koji prikazuju na logaritamskoj skali raspodjelu površina tijela neurona za različite populacije kortikalnih interneurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Središnja horizontalna crta predstavlja medijan, gornja i donja stranica pravokutnika predstavljaju treću, odnosno prvu kvartilu, a stupci pogreške predstavljaju ukupni raspon (maksimalnu i minimalnu vrijednost). (**A**) Usporedba površina tijela neurona u supragranularnim slojevima. (**B**) Usporedba površina tijela neurona u infragranularnim slojevima. (**C**) Usporedba površina tijela neurona u granularnom sloju. (**D**) Usporedba površina tijela neurona u bijeloj tvari.

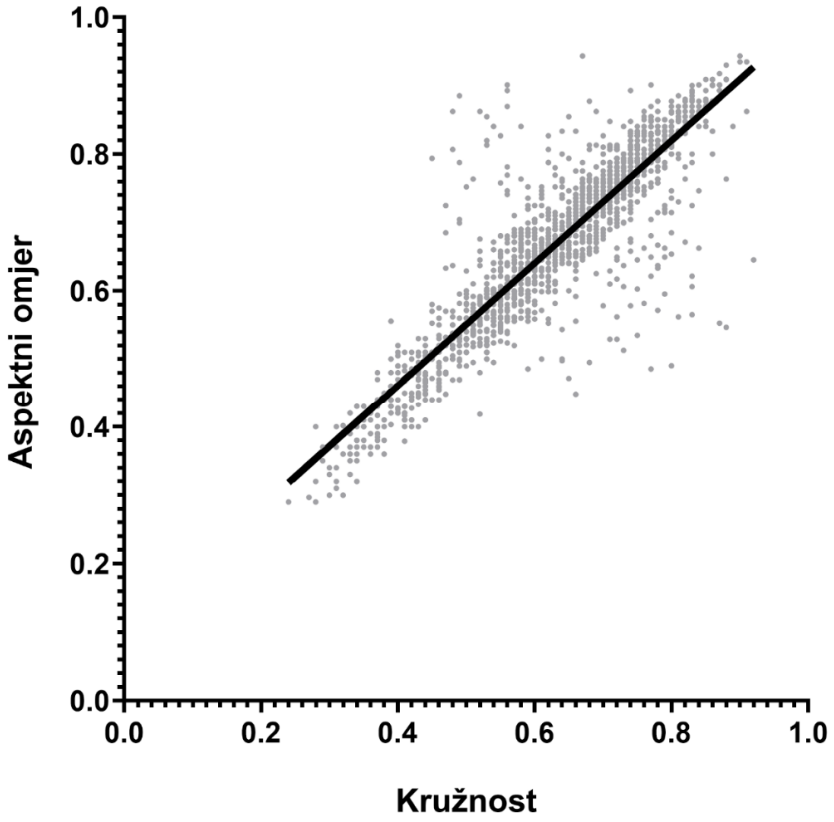
U infragranularnim slojevima najveću površinu tijela prosječno su ponovno imali PV^+ neuroni (143,00 μm^2), ali su za razliku od supragranularnih slojeva SOM^+ neuroni bili na drugom mjestu po veličini (123,30 μm^2), s time da najveći SOM^+ neuron (486,90 μm^2) površinom tijela nadmašuje najveći PV^+ neuron (335,64), kao što je to bio slučaj i u supragranularnim slojevima (Slika 5.38).

Razlike u površini tijela između PV^+ neurona i ostalih populacija kortikalnih interneurona u infragranularnim slojevima bile su statistički značajne ($P < 0,0001$ za usporedbe PV-CR i PV-CB, $P = 0,0187$ za usporedbu PV-SOM), kao i razlike između SOM^+ i CB^+ neurona ($P = 0,0006$) te SOM^+ i CR^+ neurona ($P = 0,0043$).

U granularnom sloju prosječna površina tijela svih kortikalnih interneurona bila je najmanja, s time da su PV^+ neuroni u sloju IV prosječno bili daleko veći (129,70 μm^2 ×÷ 1,38) od ostalih populacija koje se međusobno nisu znatno razlikovale po površini tijela u ovom sloju (CR: 93,38 μm^2 ×÷ 1,39; CB: 86,85 μm^2 ×÷ 1,24; SOM: 82,51 μm^2 ×÷ 1,48) (Slika 5.38). Daljnjom analizom utvrđeno je da su u sloju IV jedino razlike između PV^+ neurona i ostalih populacija bile statistički značajne ($P < 0,0001$ za usporedbu PV-SOM, $P = 0,0013$ za usporedbu PV-CR te $P = 0,0046$ za usporedbu PV-CB), dok razlike između ostalih populacija nisu bile statistički značajne.

U bijeloj tvari općenito je bilo prisutno malo interneurona, a daleko najveću površinu tijela imali su u prosjeku SOM^+ neuroni (190,50 μm^2 ×÷ 1,43) koji u bijeloj tvari gotovo isključivo pripadaju morfološkom tipu velikih vretenastih (štapićastih) ili polimorfnih stanica. Sve ostale populacije kortikalnih interneurona u bijeloj tvari imale su izrazito male prosječne površine tijela (CR: 94,11 μm^2 ×÷ 1,32; PV: 72,47 μm^2 ×÷ 1,97; CB: 84,57 μm^2 ×÷ 1,70) (Slika 5.38). Razlike između SOM^+ neurona i ostalih populacija bile su statistički značajne ($P = 0,0002$ za usporedbu SOM-CR, $P = 0,0003$ za usporedbu SOM-CB te $P = 0,0029$ za usporedbu SOM-PV), dok razlike između ostalih populacija nisu bile statistički značajne.

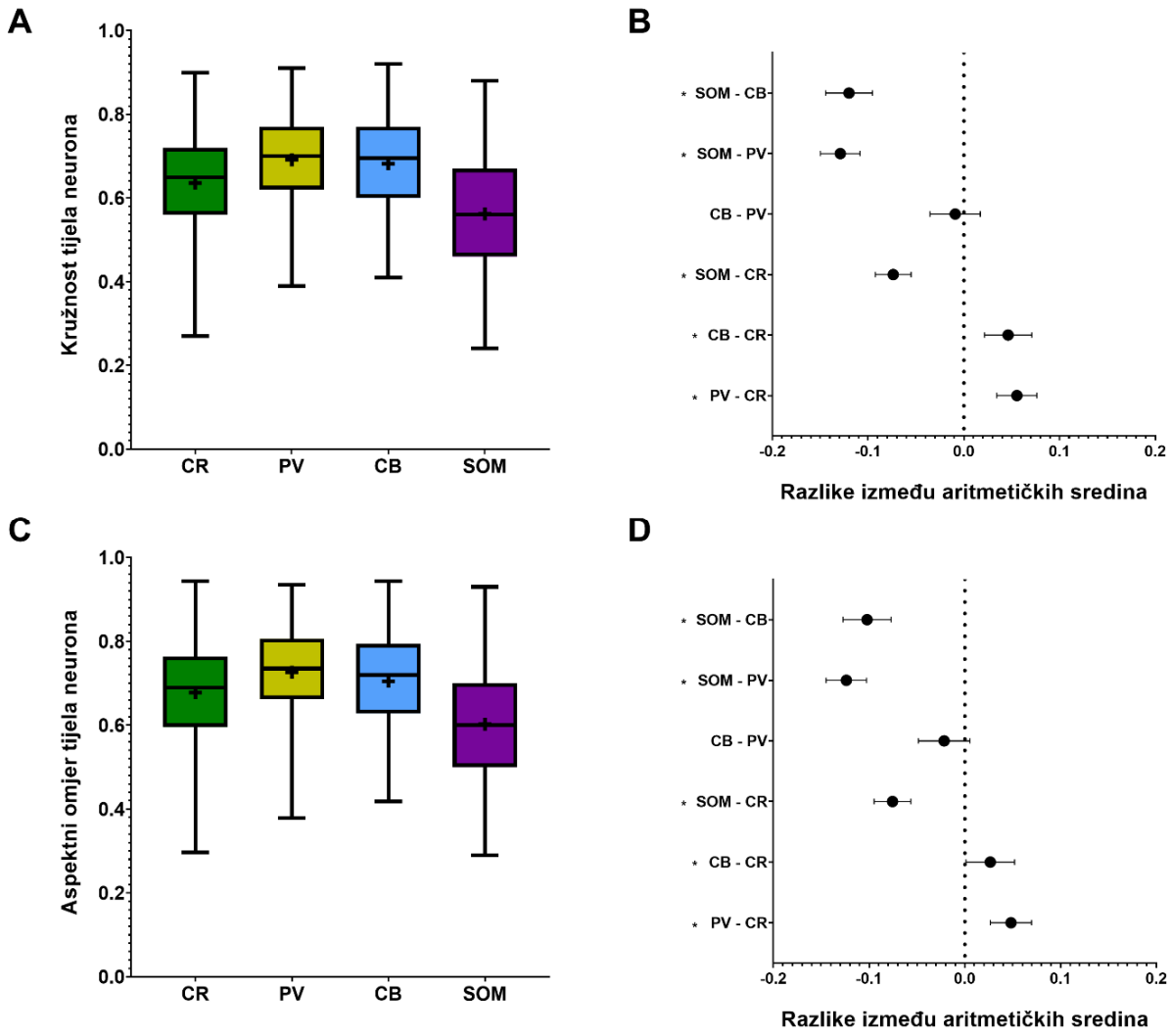
Pri analizi kružnosti i aspektnog omjera treba uzeti u obzir da su ta dva parametra blisko povezani, iako ne opisuju identična obilježja stanica. Naime, stanica čije tijelo ima oblik sličniji krugu (veću kružnost) imat će, načelno, i oblik koji je manje izdužen (veći aspektni omjer). Stoga je razina korelacije između kružnosti i aspektnog omjera izuzetno velika (Pearsonov koeficijent korelacije, r = 0,8847, 95%-tni CI: 0,8737 – 0,8948; koeficijent determinacije $r^2 = 0,7826$) i statistički značajna ($P < 0,0001$; t-test) (Slika 5.39).



Slika 5.39. Dijagram raspršenja koji prikazuje korelaciju između aspektnog omjera i kružnosti tijela (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). Središnja crta predstavlja linearni regresijski pravac.

Najveću prosječnu kružnost (0,69) i najveći prosječni aspektni omjer (0,73) imali su PV^+ neuroni što znači da su tijela PV^+ neurona bila najsličnija krugu i najmanje izdužena. Po obliku tijela najsličniji PV^+ neuronima bili su CB^+ neuroni koji su imali prosječnu kružnost (0,68) i aspektni omjer (0,70) vrlo bliskih vrijednosti. CR^+ neuroni bili su više ovalnog oblika pa je njihova prosječna kružnost bila manja (0,64), a izduženost tijela veća, što se očituje manjim aspektnim omjerom (0,68). Mnogi SOM^+ neuroni bili su vretenastog oblika pa su prosječno imali najmanju kružnost (0,56) i aspektni omjer (0,60) (Tablica 5.10 i Slika 5.40).

Kao i kod površine tijela, SOM^+ neuroni imali su daleko najveću varijabilnost kružnosti (CV = 24,21 %) i aspektnog omjera (CV = 23,02 %), a zatim slijede redom CR^+ neuroni (CV = 17,71 % za kružnost, 17,19 % za aspektni omjer), CB^+ neuroni (CV = 15,75 % za kružnost, 15,55 % za aspektni omjer) te PV^+ neuroni (CV = 14,76 % za kružnost, 14,44 % za aspektni omjer) (Tablica 5.10).



Slika 5.40. (**A**) Prikaz raspodjele kružnosti tijela različitih populacija kortikalnih interneurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). (**B**) Dijagram razlika aritmetičkih sredina kružnosti tijela neurona. (**C**) Prikaz raspodjele aspektnog omjera tijela različitih populacija kortikalnih interneurona (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r). (**D**) Dijagram razlika aritmetičkih sredina aspektnog omjera tijela neurona. U pravokutnim dijagramima središnja horizontalna crta predstavlja medijan, gornja i donja stranica pravokutnika predstavljaju treću, odnosno prvu kvartilu, stupci pogreške predstavljaju ukupni raspon (maksimalnu i minimalnu vrijednost), a oznaka „+“ predstavlja aritmetičku sredinu. U dijagramima razlika rezultati jednosmjerne ANOVA-e prikazani su kao aritmetička sredina razlike aritmetičkih sredina s 95%-tnim CI. Ako CI križa isprekidanu crtu koja predstavlja razliku 0, razlika između dviju populacija interneurona nije statistički značajna. Statistički značajne razlike označene su zvjezdicom (*).

Tablica 5.10. Usporedba kružnosti i aspektnog omjera tijela različitih populacija kortikalnih interneurona.

	CR		**PV**	
	Kružnost	**Aspektni omjer**	**Kružnost**	**Aspektni omjer**
Aritmetička sredina	**0,64**	**0,68**	**0,69**	**0,73**
SD	0,11	0,12	0,10	0,10
Medijan	**0,65**	**0,69**	**0,70**	**0,74**
IQR	0,16	0,17	0,15	0,14
CV (%)	17,71	17,19	14,76	14,44
QCD (%)	12,50	12,38	10,79	9,82
	CB		**SOM**	
	Kružnost	**Aspektni omjer**	**Kružnost**	**Aspektni omjer**
Aritmetička sredina	**0,68**	**0,70**	**0,56**	**0,60**
SD	0,11	0,11	0,14	0,14
Medijan	**0,70**	**0,72**	**0,56**	**0,60**
IQR	0,17	0,17	0,21	0,20
CV (%)	15,75	15,55	24,21	23,02
QCD (%)	12,41	11,66	18,58	16,67

SOM^+ neuroni jedina su populacija kortikalnih interneurona čiji se oblik tijela značajno razlikovao između supragranularnih i infragranularnih slojeva, što se očitovalo kao manja kružnost i manji aspektni omjer u infragranularnim slojevima zbog prisutnosti većeg broja velikih vretenastih stanica. Razlike u kružnosti i aspektnom omjeru između svih populacija interneurona bile su statistički značajne, osim između CB^+ i PV^+ neurona (Tablica 5.11).

Tablica 5.11. Rezultati usporedbe kružnosti i aspektnog omjera jednosmjernom ANOVA-om. Statistički značajne razlike naznačene su zvjezdicom (*).

Usporedba	***P*-vrijednost (Kružnost)**	***P*-vrijednost (Aspektni omjer)**
PV-CR	< 0,0001*	< 0,0001*
CB-CR	< 0,0001*	0,0365*
SOM-CR	< 0,0001*	<0,0001*
CB-PV	0,8066	0,1650
SOM-PV	< 0,0001*	<0,0001*
SOM-CB	< 0,0001*	<0,0001*

5.4. Koekspresija molekularnih biljega pojedinih populacija kortikalnih interneurona

Dvostrukim obilježavanjem utvrđena je koekspresija molekularnih biljega CR, PV, CB i SOM te su potvrđeni relativni omjeri broja različitih populacija kortikalnih interneurona.

5.4.1. Koekspresija kalretinina i drugih molekularnih biljega

CR^+ neuroni gotovo nikad nisu eksprimirali nijedan od drugih molekularnih biljega – svega 0,79 % CR^+ neurona je istovremeno eksprimiralo PV, a svega 0,41 % CB, dok nijedan CR^+ neuron nije istovremeno eksprimirao SOM. Analiza dvostruko obilježenih rezova stoga je potvrdila da CR^+ neuroni predstavljaju zasebnu populaciju kortikalnih interneurona koja se uglavnom ne preklapa s drugim glavnim interneuronskim populacijama.

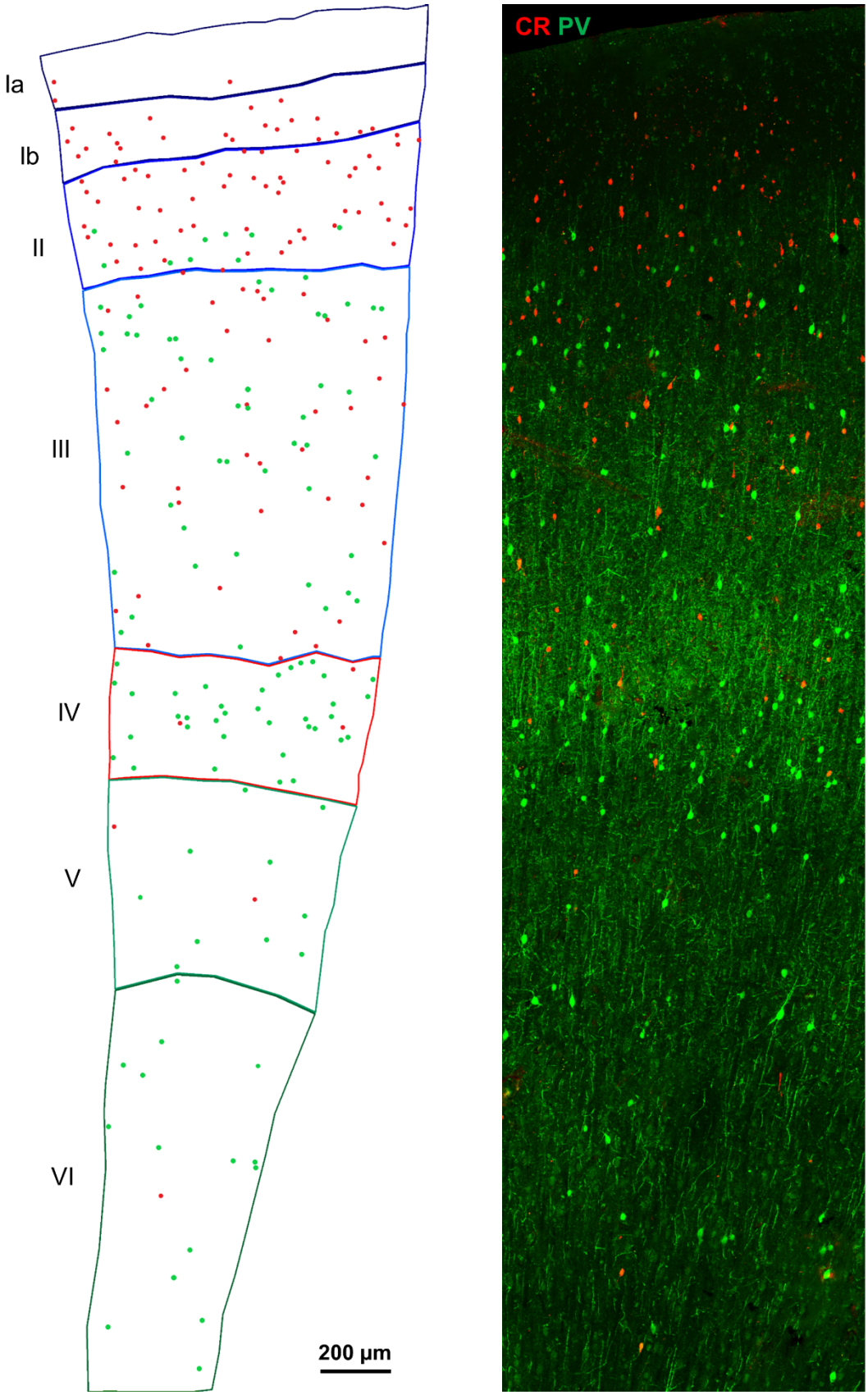
Od zabilježenih CR^+/PV^+ stanica, 70,59 % nađeno je u supragranularnim slojevima (podjednako u slojevima I – III), 16,18 % u granularnom sloju, a 13,23 % u infragranularnim slojevima. Dvostruko obilježene CR^+/PV^+ stanice nađene su u mozgovima ČO382 i ČO383 u obje regije te u mozgu ČO386 samo u BA9.

Na dvostruko obilježenim anti-CR/anti-PV histološkim rezovima CR^+ neuroni bili su brojniji od PV^+ neurona u supragranularnim slojevima, dok su PV^+ neuroni bili brojniji u granularnom i infragranularnim slojevima (Slika 5.41).

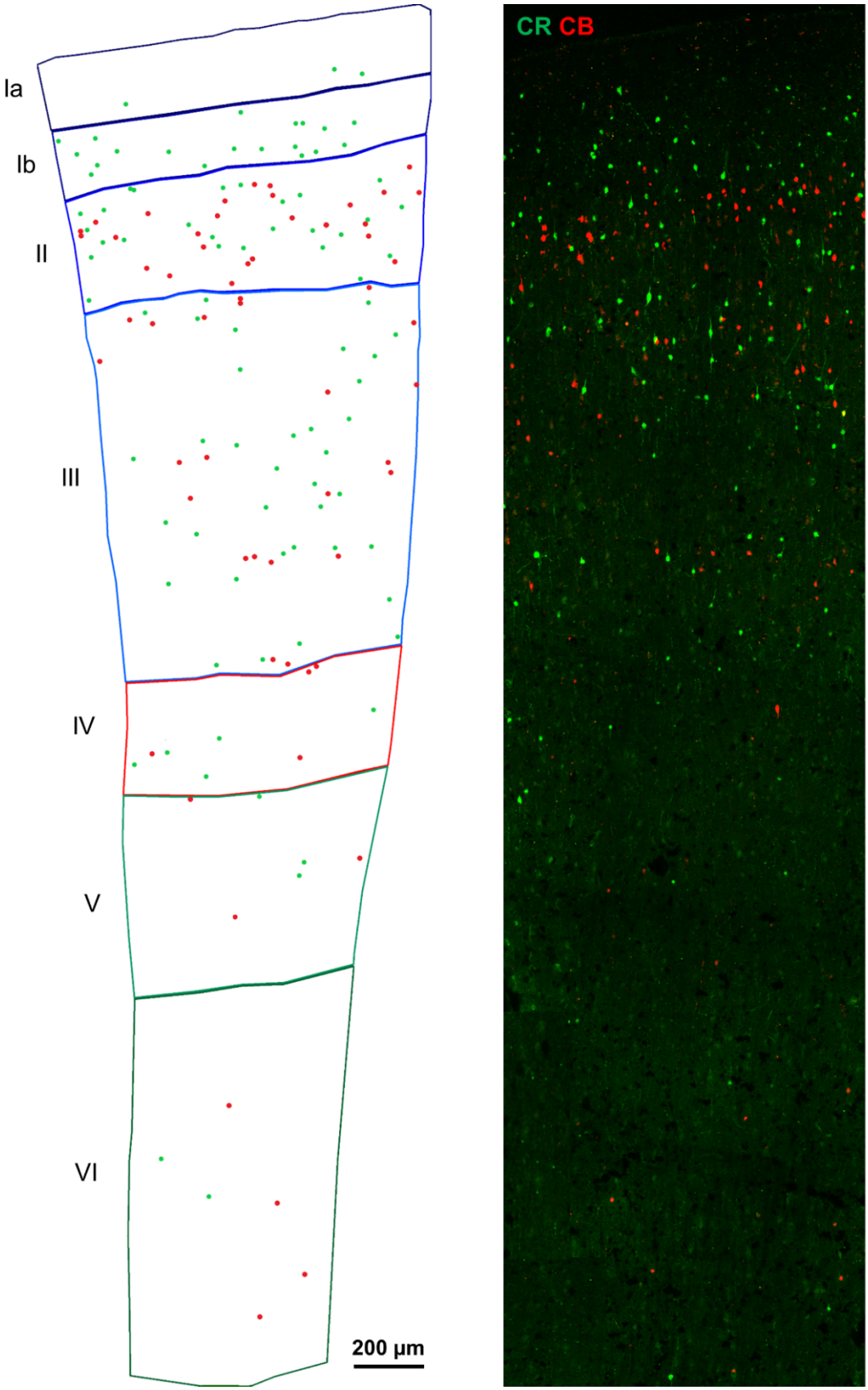
Od zabilježenih CR^+/CB^+ stanica, 88,46 % nađeno je u supragranularnim slojevima, a svega 11,54 % u infragranularnim slojevima. Nijedna dvostruko obilježena CR^+/CB^+ stanica nije nađena u granularnom sloju. Dvostruko obilježene CR^+/CB^+ stanice nađene su u mozgovima ČO382 i ČO383 u obje regije te u mozgu ČO387 samo u BA14r.

Na dvostruko obilježenim anti-CR/anti-CB histološkim rezovima i CR^+ neuroni i CB^+ neuroni bili su brojniji u supragranularnim slojevima nego u infragranularnim slojevima (Slika 5.42). U supragranularnim slojevima CR^+ neuroni bili su brojniji od CB^+ neurona, zbog velikog broja CR^+ neurona u sloju I u kojem gotovo nikad nema CB^+ neurona. U infragranularnim slojevima, CB^+ neuroni bili su nešto brojniji, zbog njihove veće gustoće u sloju VI u odnosu na sloj V, dok je gustoća CR^+ neurona u sloju VI bila manja u odnosu na sloj V.

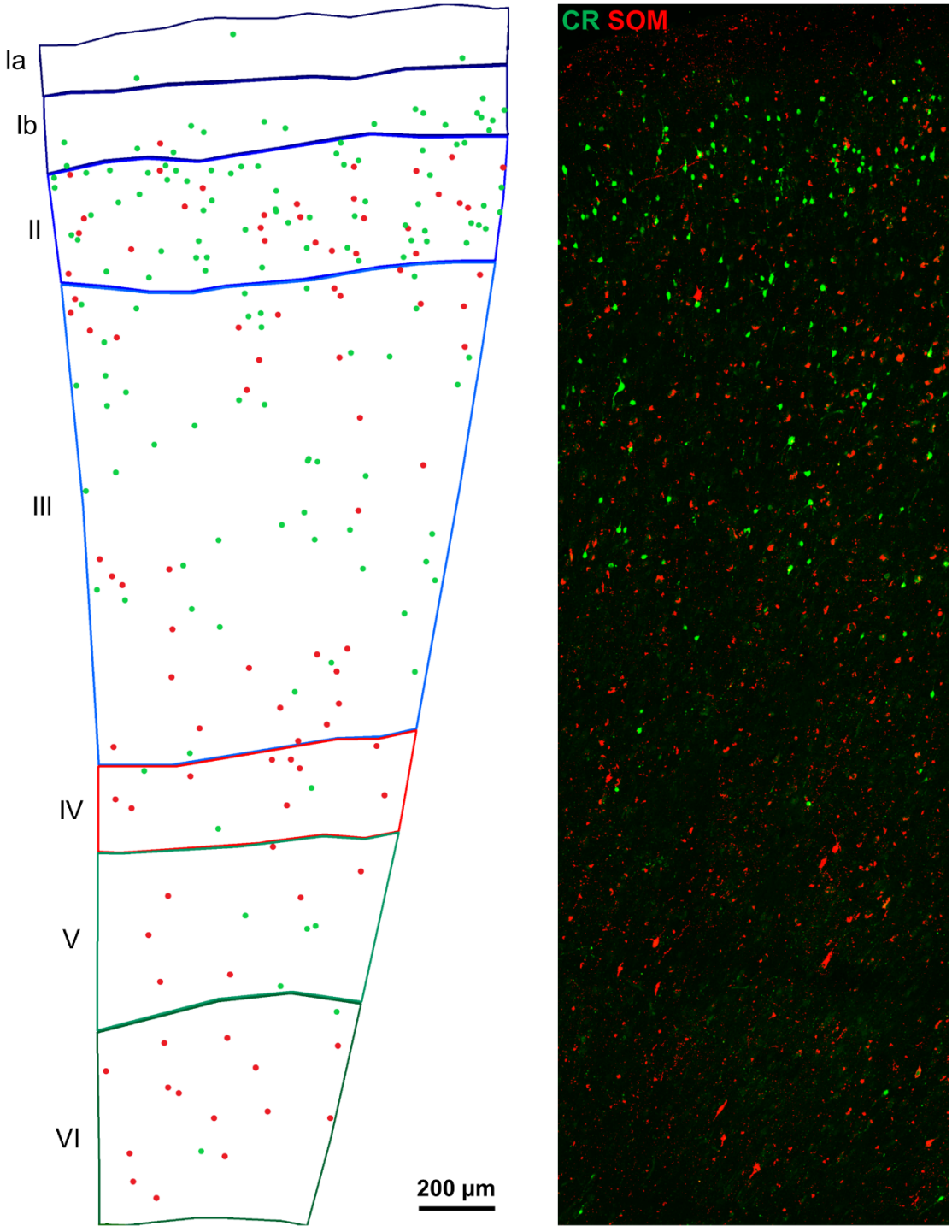
Na dvostruko obilježenim anti-CR/anti-SOM histološkim rezovima, CR^+ neuroni bili su brojniji od SOM^+ neurona u supragranularnim slojevima, dok su SOM^+ neuroni bili brojniji u granularnom i infragranularnim slojevima (Slika 5.43).



Slika 5.41. Točkasti dijagram (lijevo) koji pokazuje laminarnu raspodjelu CR^+ (crveno) i PV^+ (zeleno) neurona na dvostruko obilježenim rezovima te konfokalna snimka (desno) dvostruko obilježenog histološkog reza koji prikazuje CR^+ (crveni kanal) i PV^+ (zeleni kanal) stanice u BA9.

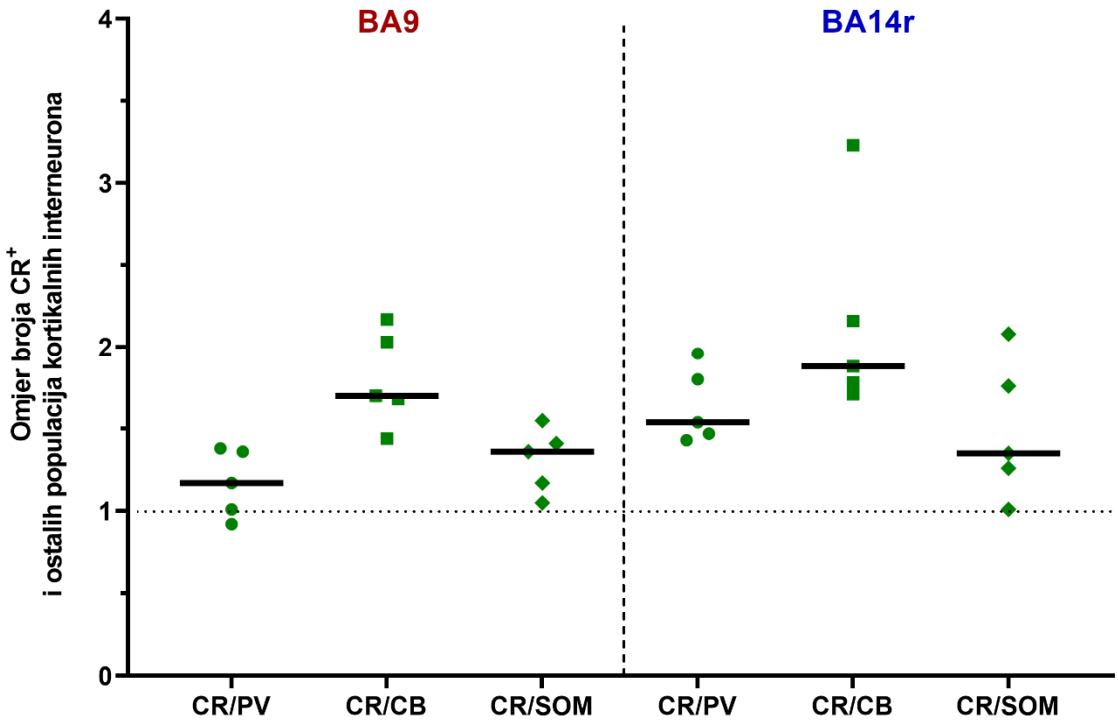


Slika 5.42. Točkasti dijagram (lijevo) koji pokazuje laminarnu raspodjelu CR^+ (zeleno) i CB^+ (crveno) neurona na dvostruko obilježenim rezovima te konfokalna snimka (desno) dvostruko obilježenog histološkog reza koji prikazuje CR^+ (zeleni kanal) i CB^+ (crveni kanal) stanice u BA9.



Slika 5.43. Točkasti dijagram (lijevo) koji pokazuje laminarnu raspodjelu CR^+ (zeleno) i SOM^+ (crveno) neurona na dvostruko obilježenim rezovima te konfokalna snimka (desno) dvostruko obilježenog histološkog reza koji prikazuje CR^+ (zeleni kanal) i SOM^+ (crveni kanal) stanice u BA9.

Kvantitativnom analizom dvostruko obilježenih histoloških rezova potvrđeno je da su CR^+ neuroni bili najbrojnija analizirana populacija interneurona. Omjer CR^+ i PV^+ neurona (CR/PV) bio je prosječno 1,15 u BA9 te 1,62 u BA14r. Omjer CR/CB bio je prosječno 1,74 u BA9 te 2,04 u BA14r, a omjer CR/SOM bio je prosječno 1,29 u BA9 te 1,41 u BA14r (Slika 5.44).



Slika 5.44. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje omjere broja CR^+ neurona s ostalim populacijama kortikalnih interneurona. Točke na dijagramu prikazuju prosječni omjer za pojedini mozak, a vodoravne pune crte predstavljaju medijan. Isprekidana vodoravna crta označava omjer vrijednosti 1, tj. prikazuje vrijednosti gdje je omjer broja dviju populacija interneurona približno jednak.

5.4.2. Koekspresija parvalbumina i drugih molekularnih biljega

PV^+ neuroni također su rijetko eksprimirali druge molekularne biljege – svega 1,07 % je istovremeno eksprimiralo CR, 1,77 % istovremeno je eksprimiralo CB, dok nijedan PV^+ neuron nije istovremeno eksprimirao SOM.

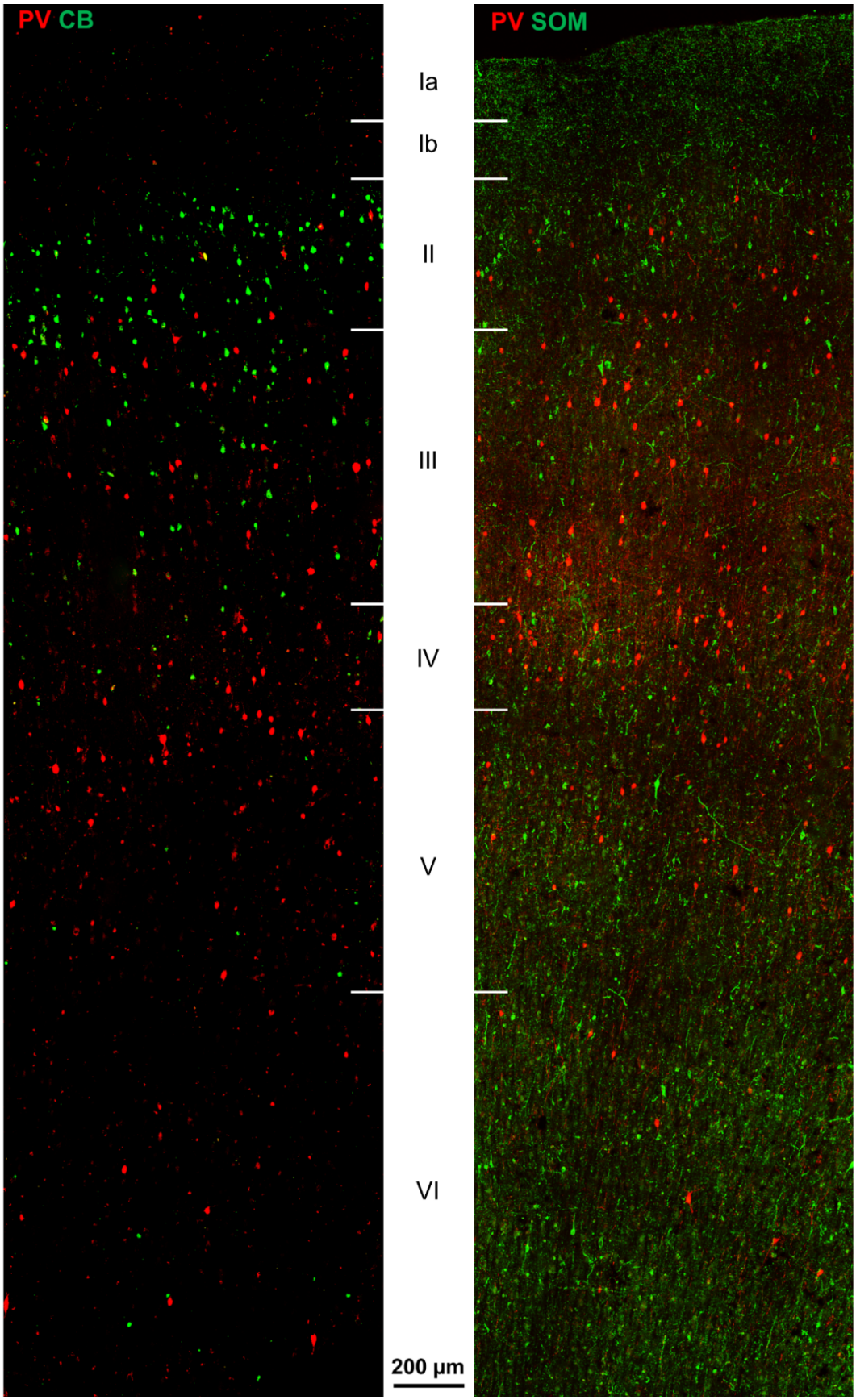
Dvostruko obilježene PV^+/CB^+ stanice bile su prisutne u različitim slojevima moždane kore bez određene pravilnosti.

Analiza dvostruko obilježenih rezova potvrdila je da PV^+ neuroni predstavljaju zasebnu populaciju kortikalnih interneurona koja se uglavnom ne preklapa s drugim glavnim interneuronskim populacijama.

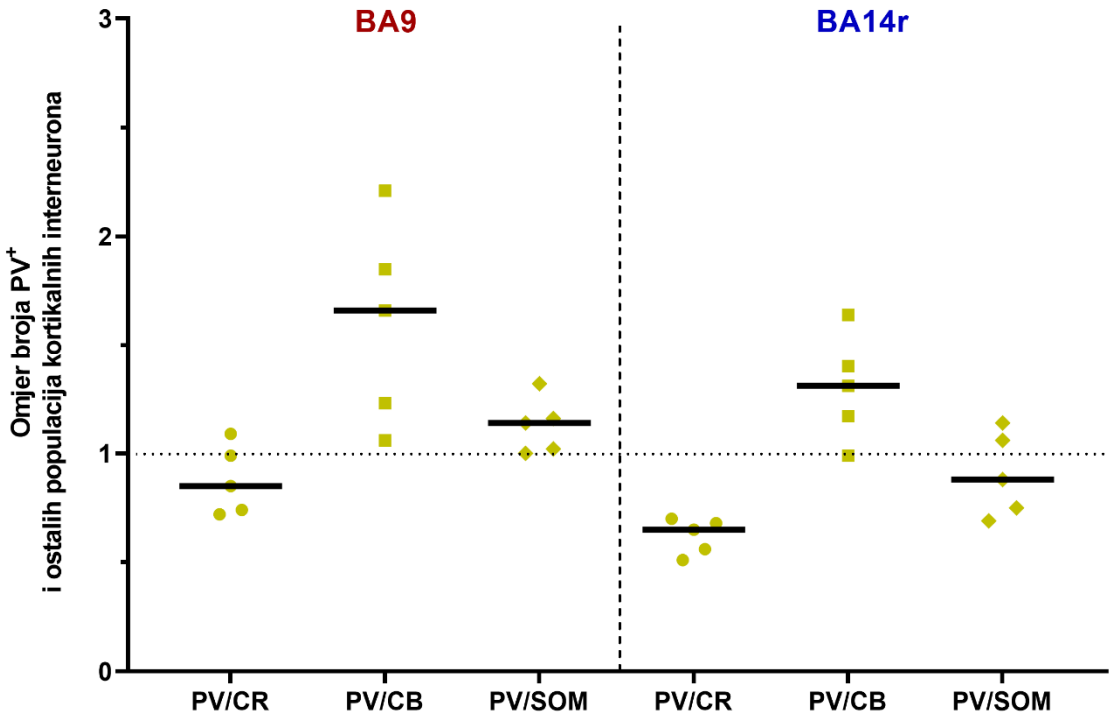
Na dvostruko obilježenim anti-PV/anti-CB histološkim rezovima CB^+ neuroni bili su nešto brojniji od PV^+ neurona u supragranularnim slojevima, pogotovo u sloju II. PV^+ neuroni bili su pak znatno brojniji od CB^+ neurona u granularnom i infragranularnim slojevima. S obzirom na iznimno mali broj CB^+ neurona u infragranularnim slojevima, PV^+ neuroni bili su i ukupno brojniji ako se razmatraju svi slojevi (Slika 5.45).

Dvostruko obilježeni anti-PV/anti-SOM rezovi potvrdili su da su PV^+ i SOM^+ neuroni brojni u svim slojevima, osim u sloju I. PV^+ neuroni bili su nešto brojniji od SOM^+ neurona u sloju IV, a SOM^+ neuroni bili su brojniji od PV^+ neurona u sloju II. U ostalim slojevima moždane kore, obje populacije kortikalnih interneurona bile su podjednako brojne, uz određene regionalne razlike (Slika 5.45 i Slika 5.46).

Kvantitativnom analizom dvostruko obilježenih histoloških rezova potvrđeni su i međusobni omjeri broja PV^+ neurona i drugih populacija kortikalnih interneurona. Tako je omjer PV/CR bio prosječno 0,87 u BA9 te 0,62 u BA14r, omjer PV/CB bio je 1,51 u BA9 te 1,26 u BA14r, a omjer PV/SOM bio je 1,12 u BA9 te 0,87 u BA14r (Slika 5.46).



Slika 5.45. Konfokalna snimka dvostruko obilježenih histoloških rezova koji prikazuju PV^+ (crveni kanal u obje slike) i CB^+, odnosno SOM^+ (zeleni kanal u obje slike) stanice u BA9.



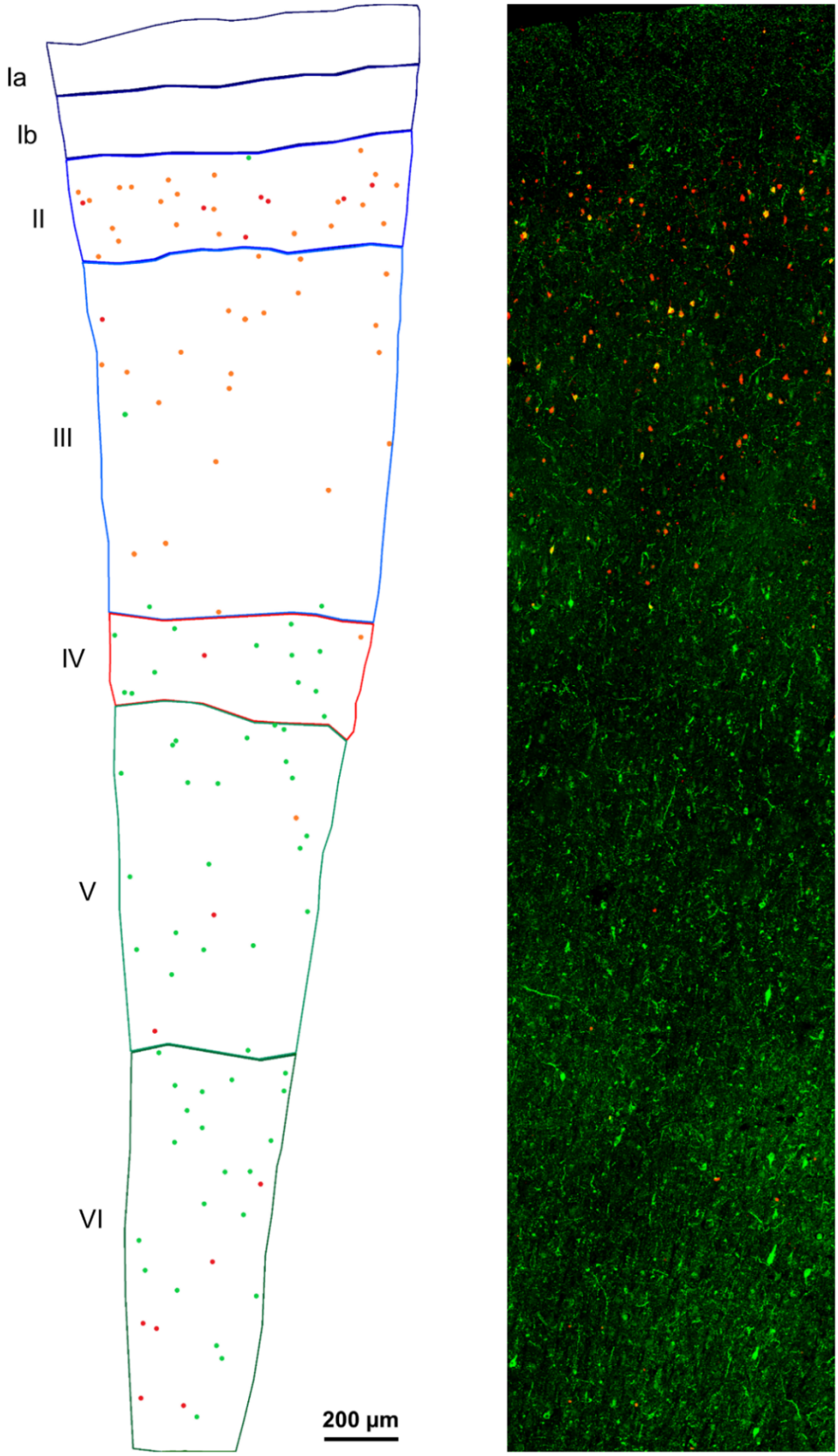
Slika 5.46. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje omjere broja PV^+ neurona s ostalim populacijama kortikalnih interneurona. Točke na dijagramu prikazuju prosječni omjer za pojedini mozak, a vodoravne pune crte predstavljaju medijan. Isprekidana vodoravna crta označava omjer vrijednosti 1, tj. prikazuje vrijednosti gdje je omjer broja dviju populacija interneurona približno jednak.

5.4.3. Koekspresija kalbindina i drugih molekularnih biljega

CB^+ neuroni pokazivali su nizak stupanj koekspresije CR i PV, ali visok stupanj koekspresije SOM u supragranularnim slojevima. Svega 0,72 % CB^+ neurona koeksprimiralo je CR, a svega 2,86 % PV.

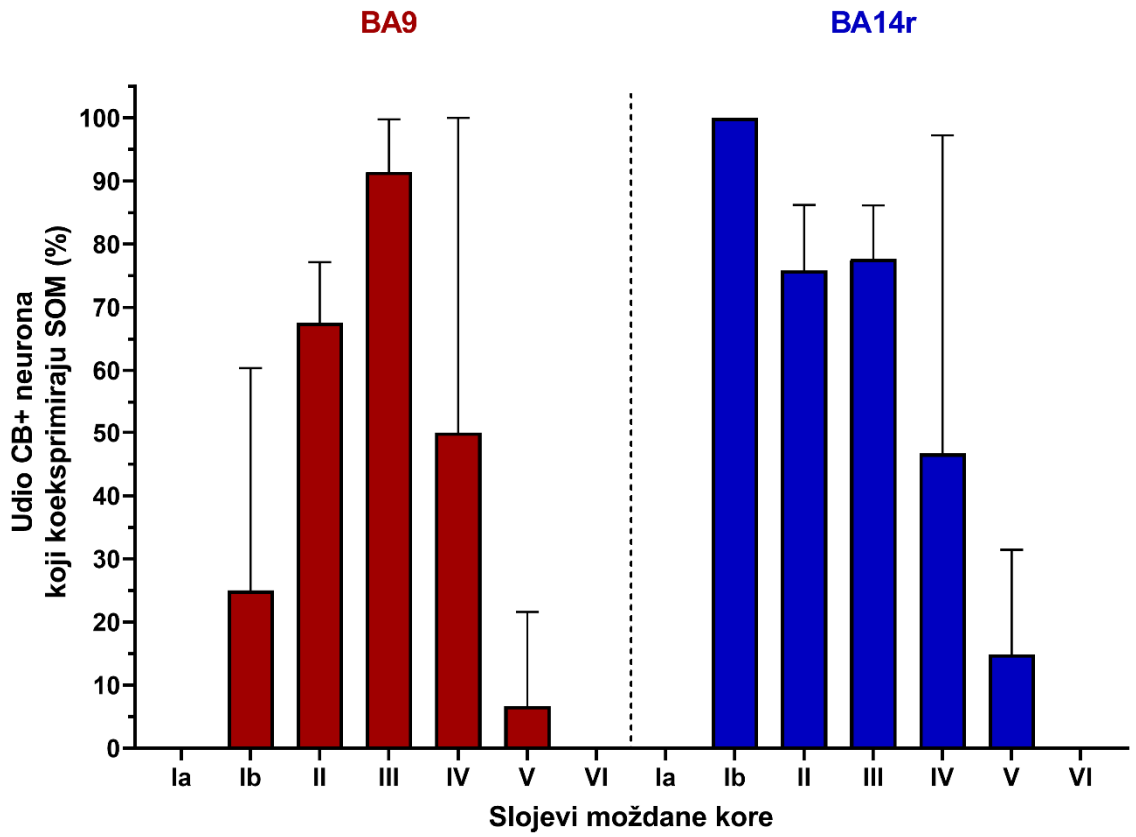
Na dvostruko obilježenim anti-CB/anti-SOM histološkim rezovima CB^+ neuroni bili su malo brojniji od SOM^+ neurona u supragranularnim slojevima, dok su SOM^+ neuroni bili značajno brojniji u granularnom i infragranularnim slojevima (Slika 5.47).

Nadalje, dvostruko obilježavanje pokazalo je da je u BA9 čak 67,63 % CB^+ neurona koeksprimiralo SOM, a u BA14r 67,83 %. Između supragranularnih i infragranularnih slojeva uočljiva je velika razlika u koekspresiji SOM pa je tako u supragranularnim slojevima 78,93 % CB^+ neurona u BA9, odnosno 77,64 % u BA14r koeksprimiralo SOM, dok je u infragranularnim slojevima svega 2,33 % CB^+ neurona u BA9, odnosno 10,26 % u BA14r koeksprimiralo SOM.



Slika 5.47. Točkasti dijagram (lijevo) koji pokazuje laminarnu raspodjelu CB^+ (crveno) i SOM^+ (zeleno) neurona na dvostruko obilježenim rezovima te konfokalna snimka (desno) dvostruko obilježenog histološkog reza koji prikazuje CB^+ (crveni kanal) i SOM^+ (zeleni kanal) stanice u BA9. Dvostruko obilježene CB^+/SOM^+ stanice prikazane su žuto-narančastom bojom.

Udio CB^+ neurona koji su koeksprimirali SOM bio je sljedeći: 25,00 % u BA9 i 100,00 % u BA14r u sloju Ib, 67,54 % u BA9 i 75,81 % u BA14r u sloju II, 91,47 % u BA9 i 77,66 % u BA14r u sloju III, 50,00 % u BA9 i 46,67 % u BA14r u sloju IV te 6,67 % u BA9 i 14,86 % u BA14r u sloju V. U sloju VI nijedan CB^+ neuron nije koeksprimirao SOM ni u jednoj od analiziranih regija, a u sloju Ia nije nađena nijedna SOM^+ stanica pa u tom sloju također nije bilo dvostruko obilježenih CB^+/SOM^+ stanica (Slika 5.48).

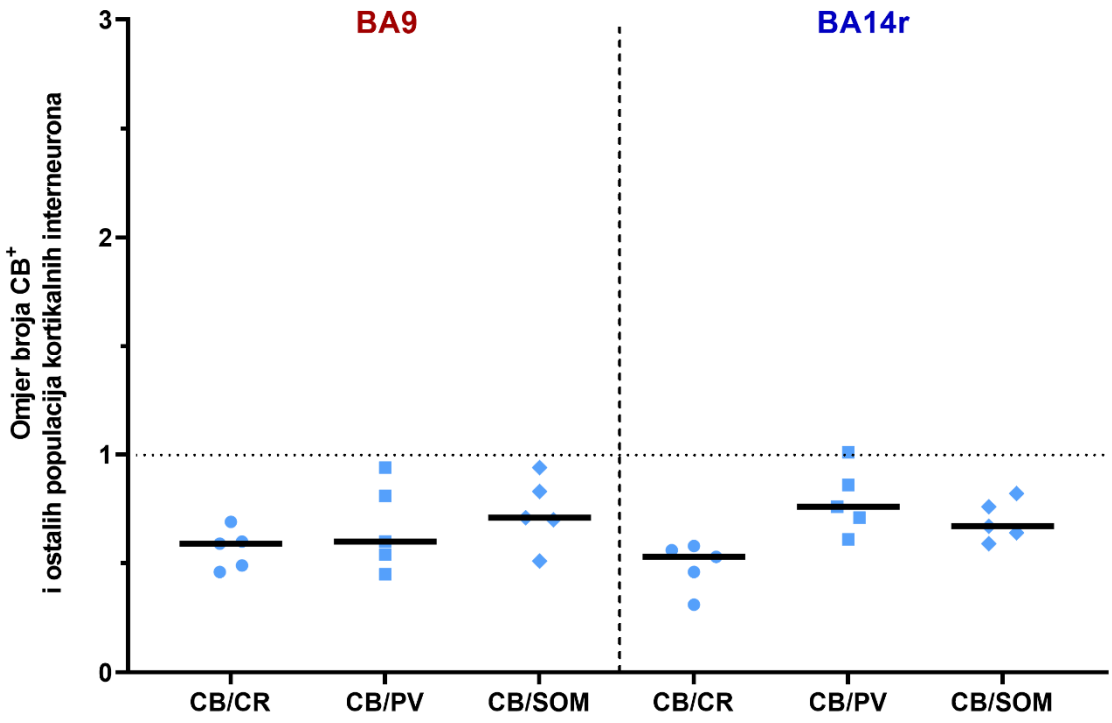


Slika 5.48. Stupčasti dijagram koji prikazuje prosječne udio CB^+ neurona koji koeksprimiraju SOM po slojevima. Vrh stupca označava aritmetičku sredinu, a stupci pogreške predstavljaju SD.

Od zabilježenih CB^+/SOM^+ stanica, u supragranularnim slojevima nađeno ih je 97,63 % u BA9 te 94,85 % u BA14r, u granularnom sloju 1,90 % u BA9 te 3,09 % u BA14r, a u infragranularnim slojevima svega 0,47 % u BA9 te 2,06 % u BA14r. Dvostruko obilježene CB^+/SOM^+ stanice nađene su u svim mozgovima i u obje analizirane regije te za razliku od CR^+/PV^+, CR^+/CB^+ i PV^+/CB^+ stanica predstavljaju jasno definiranu subpopulaciju kortikalnih interneurona.

Općenito, stupanj koekspresije SOM opadao je s dubinom sloja u moždanoj kori, ali valja naglasiti da je u supragranularnim slojevima razina koekspresije ipak bila najveća u sloju III, a ne u sloju II. Naizgled velika razlika između Brodmannovih polja u stupnju koekspresije u sloju Ib posljedica je vrlo malog ukupnog broja CB^+ i SOM^+ stanica u tom sloju.

Omjer CB/CR bio je prosječno 0,58 u BA9 te 0,49 u BA14r, omjer CB/PV bio je 0,66 u BA9 te 0,79 u BA14r, a omjer CB/SOM bio je 0,74 u BA9 te 0,69 u BA14r (Slika 5.49).



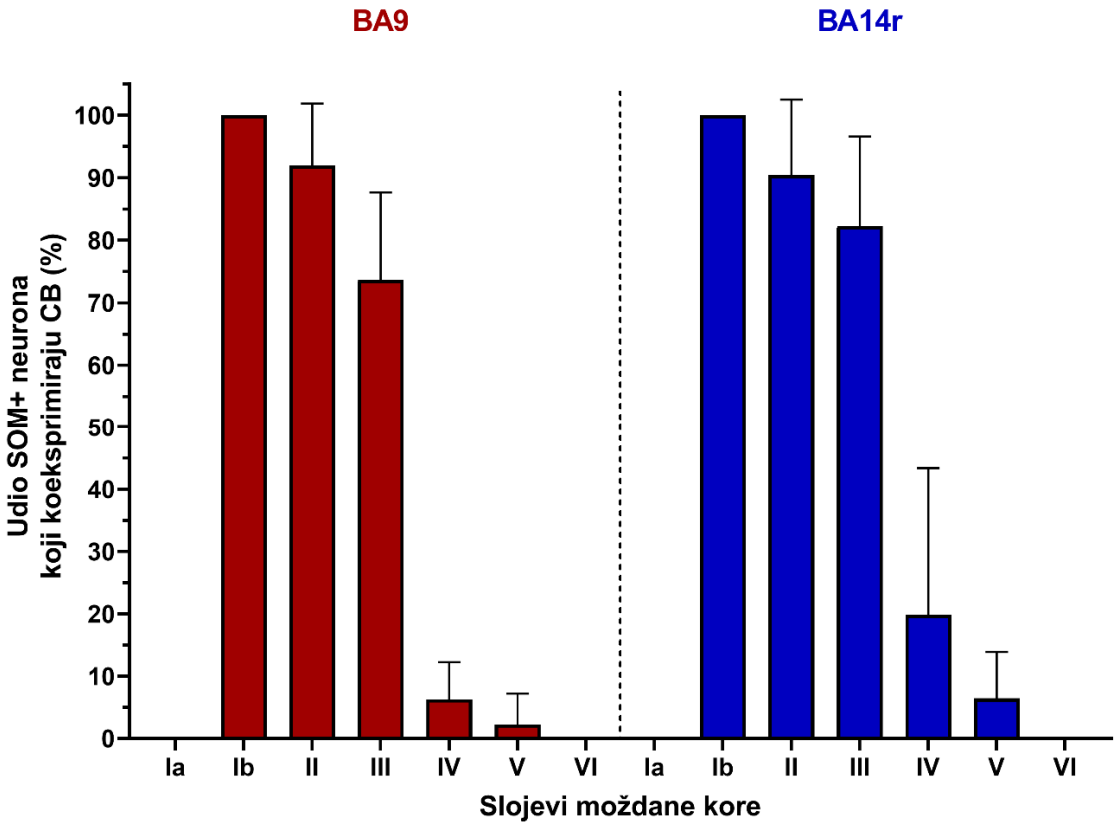
Slika 5.49. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje omjere broja CB^+ neurona s ostalim populacijama kortikalnih interneurona. Točke na dijagramu prikazuju prosječni omjer za pojedini mozak, a vodoravne pune crte predstavljaju medijan. Isprekidana vodoravna crta označava omjer vrijednosti 1, tj. prikazuje vrijednosti gdje je omjer broja dviju populacija interneurona približno jednak.

5.4.4. Koekspresija somatostatina i drugih molekularnih biljega

SOM^+ neuroni nisu pokazivali koekspresiju CR i PV, ali su u supragranularnim slojevima imali visok stupanj koekspresije CB.

U BA9 čak 46,27 % SOM^+ neurona koeksprimiralo je CB, a u BA14r 54,65 %. Između supragranularnih i infragranularnih slojeva bila je velika razlika u koekspresiji CB pa je tako u supragranularnim slojevima 85,12 % SOM^+ neurona u BA9, odnosno 86,79 % u BA14r koeksprimiralo SOM, dok je u infragranularnim slojevima svega 0,65 % SOM^+ neurona u BA9, odnosno 3,54 % u BA14r koeksprimiralo CB.

Stupanj koekspresije CB po slojevima bio je sljedeći: 100,00 % u BA9 i BA14r u sloju Ib, 92,00 % u BA9 i 90,41 % u BA14r u sloju II, 73,62 % u BA9 i 82,25 % u BA14r u sloju III, 6,25 % u BA9 i 19,82 % u BA14r u sloju IV te 2,22 % u BA9 i 6,42 % u BA14r u sloju V. U sloju VI nijedan SOM^+ neuron nije koeksprimirao CB ni u jednoj od analiziranih regija, a u sloju Ia nije nađena nijedna SOM^+ stanica pa u tom sloju također nije bilo dvostruko obilježenih CB^+/SOM^+ stanica (Slika 5.50).



Slika 5.50. Stupčasti dijagram koji prikazuje prosječne udio SOM^+ neurona koji koeksprimiraju CB po slojevima. Vrh stupca označava aritmetičku sredinu, a stupci pogreške predstavljaju SD.

Općenito, stupanj koekspresije CB opadao je progresivno s dubinom sloja u moždanoj kori, s najvećim padom između slojeva III i IV.

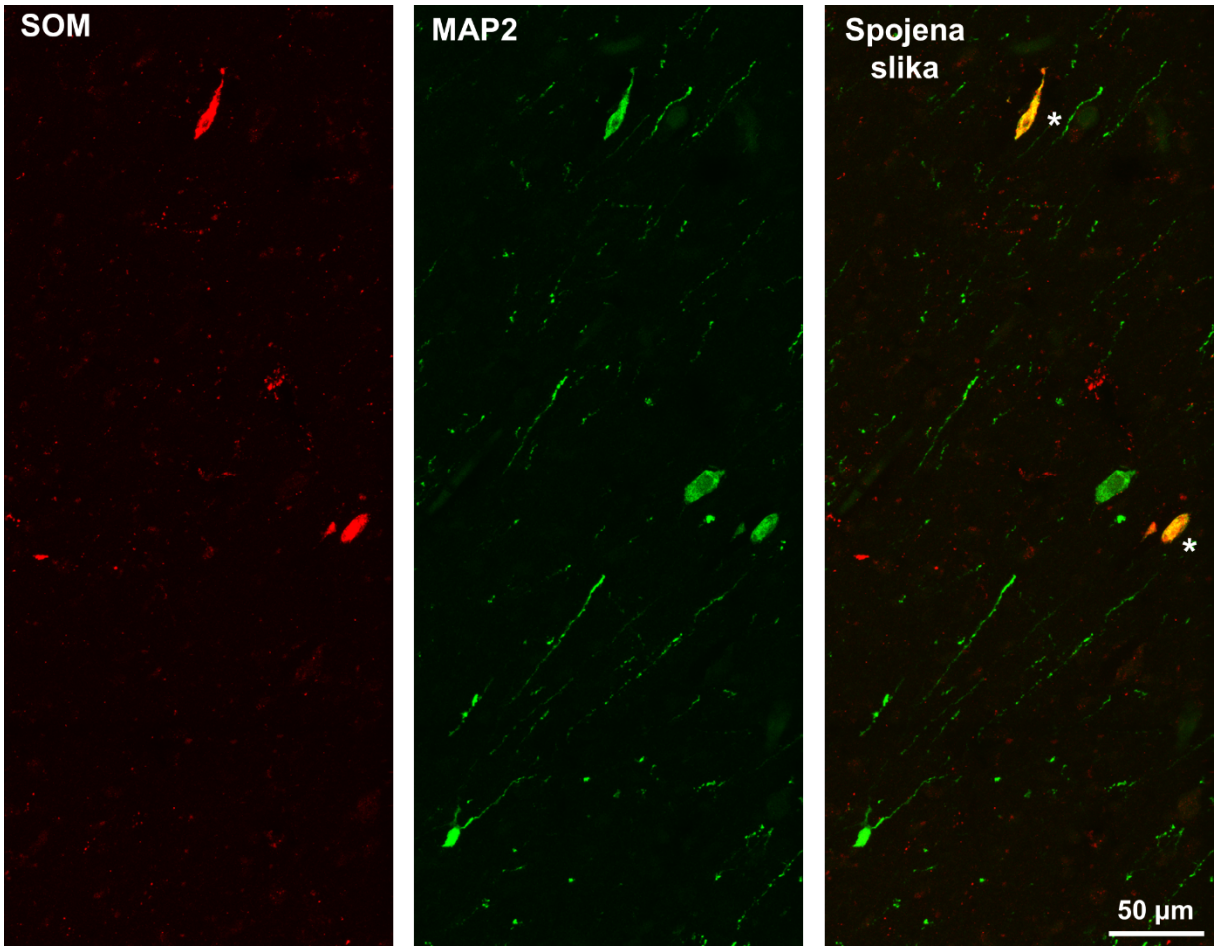
Budući da su SOM^+ neuroni bili izrazito imunoreaktivni u površinskoj bijeloj tvari ispod moždane kore, a u literaturi se opisuje da bi takvi SOM^+ neuroni mogli biti inhibicijski projekcijski neuroni, u ovom istraživanju napravljeno je i dvostruko obilježavanje rezova anti-SOM protutijelom u kombinaciji s anti-MAP2 (protein povezan s mikrotubulima 2, od engl. *microtubule-associated protein 2*) i anti-SMI-32 (neurofilament H) protutijelima. MAP2 i SMI-32 tipični su molekularni biljezi neurona s dugim projekcijama i obično su izraženi samo u glutamatergičkim (ekscitacijskim) piramidnim neuronima.

Kvalitativnom analizom utvrđeno je da gotovo svi SOM^+ neuroni u bijeloj tvari koeksprimiraju MAP2 (Slika 5.51), ali SOM^+ neuroni u moždanoj kori ne pokazuju koekspresiju MAP2. S druge strane, nijedan SOM^+ neuron nije koeksprimirao SMI-32, ni u bijeloj tvari ni u moždanoj kori.

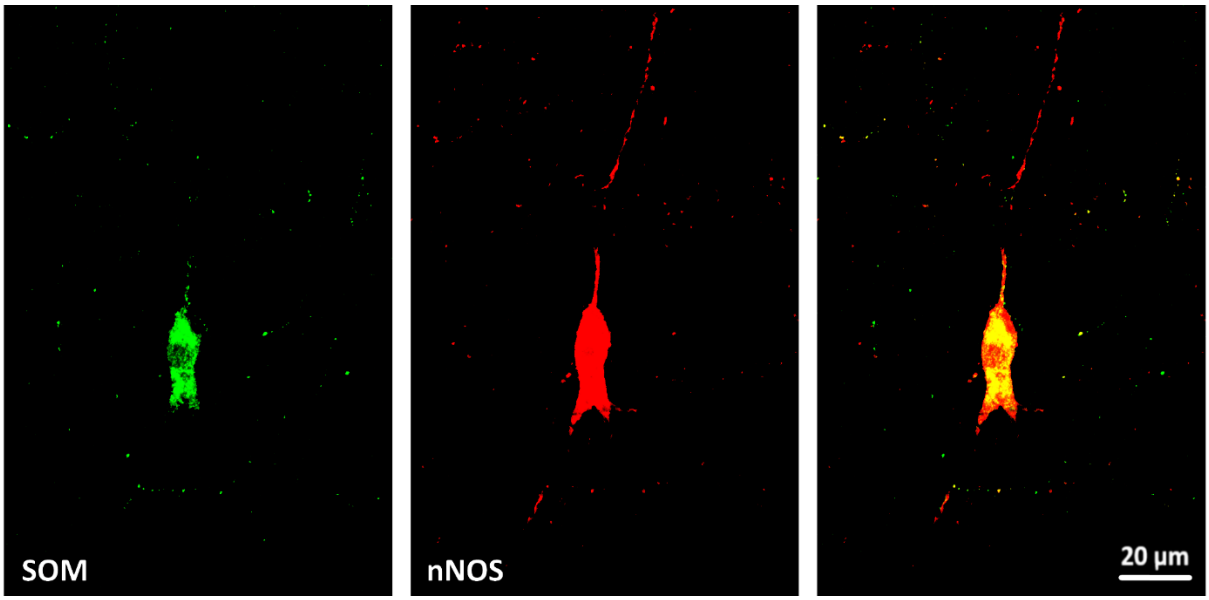
Budući da se $nNOS^+$ neuroni nerijetko opisuju kao subpopulacija SOM^+ neurona, dvostrukim obilježavanjem anti-SOM protutijela s anti-nNOS protutijelom provjerena je i koekspresija biljega SOM i neuronalne sintaze dušikovog oksida (nNOS, od engl. *neuronal nitric oxide synthase*).

Kvalitativnom analizom utvrđeno je da su gotovo svi SOM^+ neuroni u bijeloj tvari i mnogi SOM^+ neuroni u infragranularnim slojevima koeksprimirali nNOS (Slika 5.52), ali je zato stupanj koekspresije SOM i nNOS u supragranularnim slojevima bio nizak. U supragranularnim slojevima znatno je manji broj SOM^+ neurona koeksprimirao nNOS, a prisutne su bile i $nNOS^+$ stanice koje nisu koeksprimirale SOM.

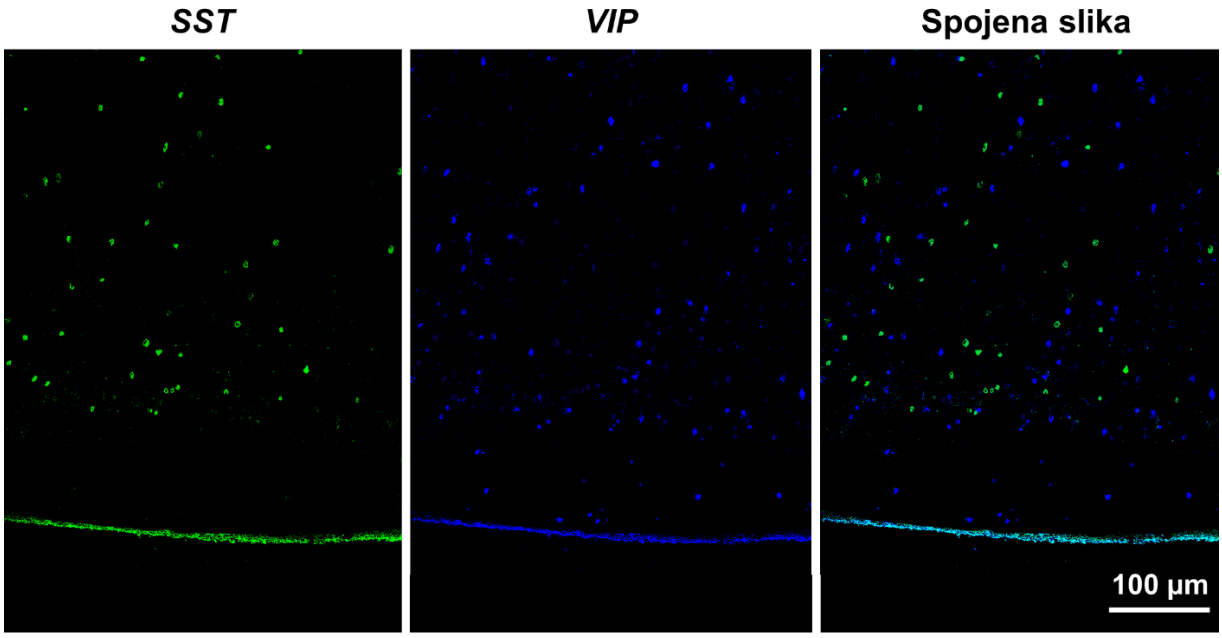
RNAscope *in situ* hibridizacijom provjerena je i eventualna koekspresija *SST* (somatostatin) i *VIP* mRNA. Dvostruko obilježavanje *SST* i *VIP* pokazalo je da je riječ o dvije pretežito odvojene populacije stanica (Slika 5.53), čime je potvrđen nalaz imunofluorescencije kojom je utvrđeno da u ljudskoj prefrontalnoj kori nema koekspresije SOM i CR (koji koeksprimira VIP).



Slika 5.51. Konfokalna snimka dvostruko obilježenog reza (anti-SOM i anti-MAP2) u bijeloj tvari u Brodmannovom polju 14r. U crvenom kanalu vidljive su SOM^+ stanice, a u zelenom kanalu $MAP2^+$ stanice. Na spojenoj slici vidljiva je kolokalizacija SOM i MAP2 u dvjema velikim stanicama (označene zvjezdicom).



Slika 5.52. Konfokalna snimka velikog vretenastog SOM^+ neurona (zeleni kanal) sloja V koji koeksprimira nNOS (crveni kanal) u Brodmannovom polju 9.

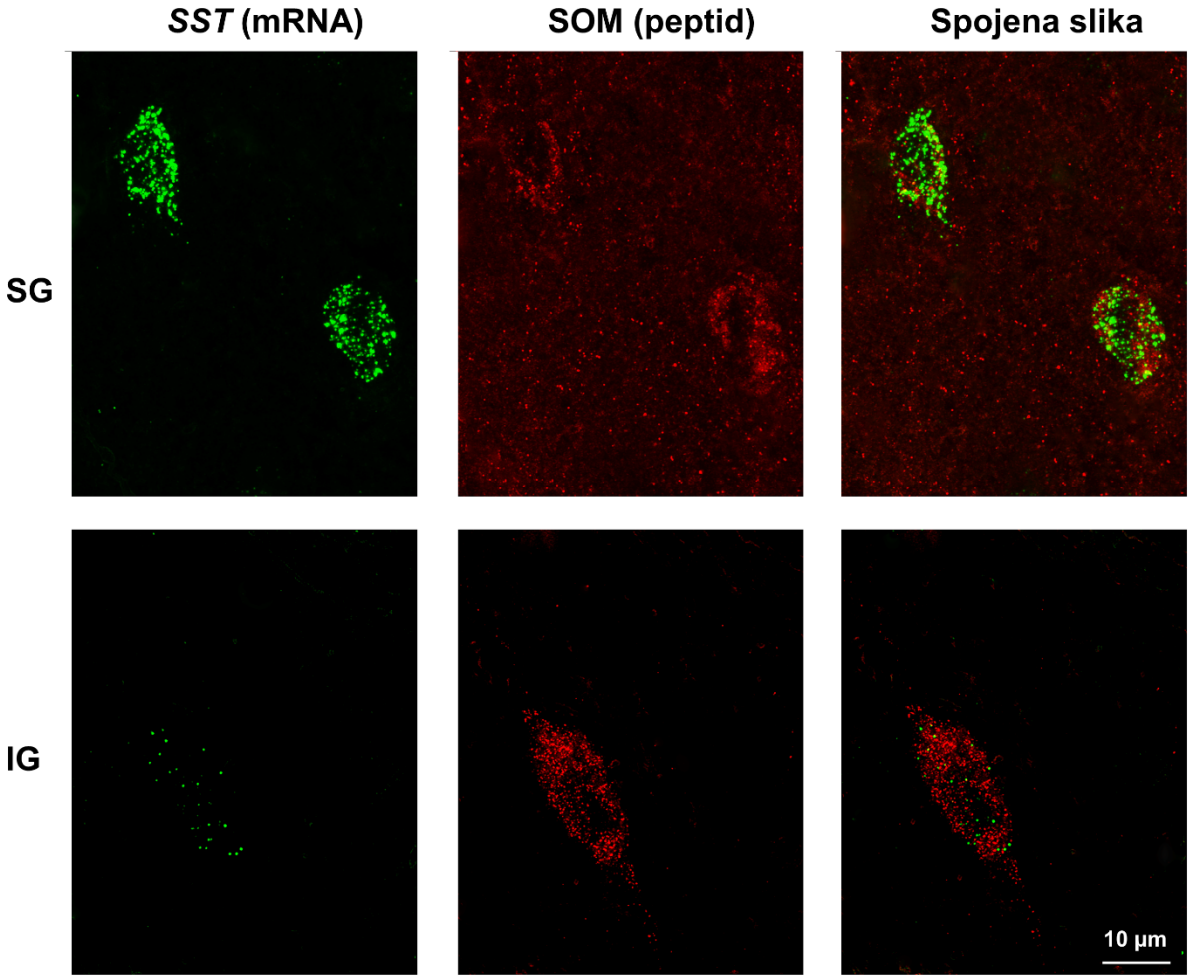


Slika 5.53. Konfokalna snimka dvostruko obilježenog reza koji prikazuje ekspresiju *SST* (zeleni kanal) i *VIP* (plavi kanal) mRNA u BA14r. Na spojenoj slici vidljivo je da je stupanj kolokalizacije nizak.

S obzirom na nisku razinu imunoreaktivnosti SOM^+ stanica u supragranularnim slojevima, RNAscope *in situ* hibridizacijom provjerena je i ekspresija *SST* mRNA u kombinaciji s anti-SOM imunofluorescencijom (Slika 5.54).

Gotovo sve stanice koje su bile obilježene imunofluorescencijom bile su obilježene i RNAscope *in situ* hibridizacijom (i obrnuto) što ukazuje da postoji visok stupanj korelacije između ekspresije *SST* mRNA i konačne translacije peptida u SOM^+ kortikalnim interneuronima.

Ipak, za razliku od imunofluorescencije kojom je utvrđeno da je imunoreaktivnost SOM^+ neurona niska u supragranularnim, a visoka u infragranularnim slojevima, RNAscope *in situ* hibridizacijom pokazano je da je ekspresija *SST* mRNA u supragranularnim slojevima visoka, a niska u infragranularnim slojevima. Navedeno ukazuje na razlike u molekularnoj ekspresiji SOM^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva.



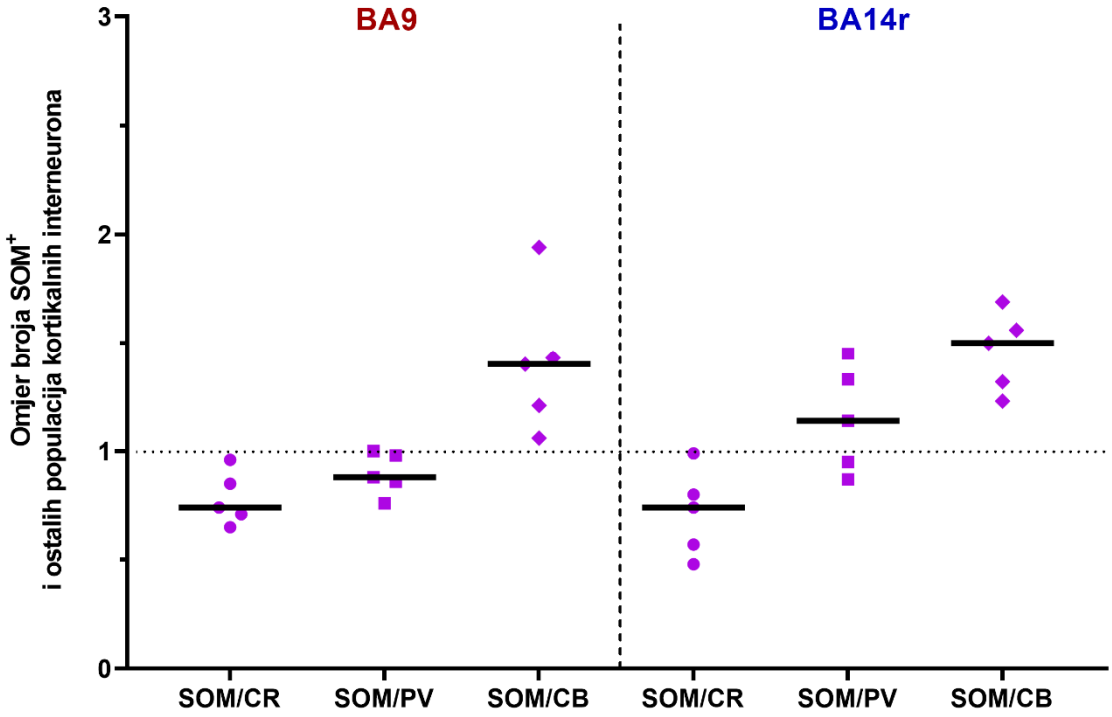
Slika 5.54. Konfokalna snimka dvostruko obilježenog histološkog reza koji prikazuje ekspresiju SST mRNA (zeleni kanal) i imunoreaktivnost SOM peptida (crveni kanal) u Brodmannovom polju 14r. Vidljiva je visoka ekspresija mRNA i niska imunoreaktivnost u supragranularnim slojevima (SG) te niska ekspresija mRNA i visoka imunoreaktivnost u infragranularnim slojevima (IG).

Sve navedeno pokazuje da su SOM^+ neuroni populacija kortikalnih interneurona s najvećom raznolikošću između slojeva, kako morfološkom, tako i molekularnom (Tablica 5.12). Posebno su izražene morfološke i molekularne razlike između SOM^+ neurona supragranularnih i infragranularnih slojeva. S druge strane, zanimljivo je da SOM^+ neuroni imaju najuniformniju raspodjelu udjela u ukupnom broju neurona po slojevima uz najmanje razlike između slojeva od svih analiziranih populacija kortikalnih interneurona.

Tablica 5.12. Prikaz morfološke i molekularne raznolikosti SOM^+ neurona u različitim slojevima prefrontalne moždane kore (zbirni podatci za Brodmannova polja 9 i 14r).

	Supragranularni slojevi	**Sloj IV**	**Infragranularni slojevi**	**Bijela tvar**
Prosječni udio u ukupnom broju neurona (%)	5,52 – 6,58	7,31 – 8,47	6,66 – 7,39	-
Morfologija	pretežito manje okrugle ili jajolike stanice, nešto velikih vretenastih stanica	male stanice okruglog tijela	mnogo velikih vretenastih i polimorfnih stanica, nešto manjih jajolikih stanica	isključivo velike vretenaste i polimorfne stanice
Prosječna površina tijela (μm^2)	94,33	82,51	123,30	190,50
Kružnost	0,59	0,62	0,52	0,46
Aspektni omjer	0,63	0,66	0,56	0,51
Imunoreaktivnost	niska – srednja	niska	srednja – visoka	visoka
Ekspresija *SST* mRNA	srednja – visoka	niska	niska	vrlo niska
Stupanj koekspresije CB (%)	85 – 87	6 – 20	0,5 – 3,5	0
Stupanj koekspresije nNOS	nizak	nizak	visok	vrlo visok
Stupanj koekspresije MAP2	nema koekspresije			vrlo visok
Stupanj koekspresije CR, PV, SMI-32 i *VIP*	nema koekspresije			

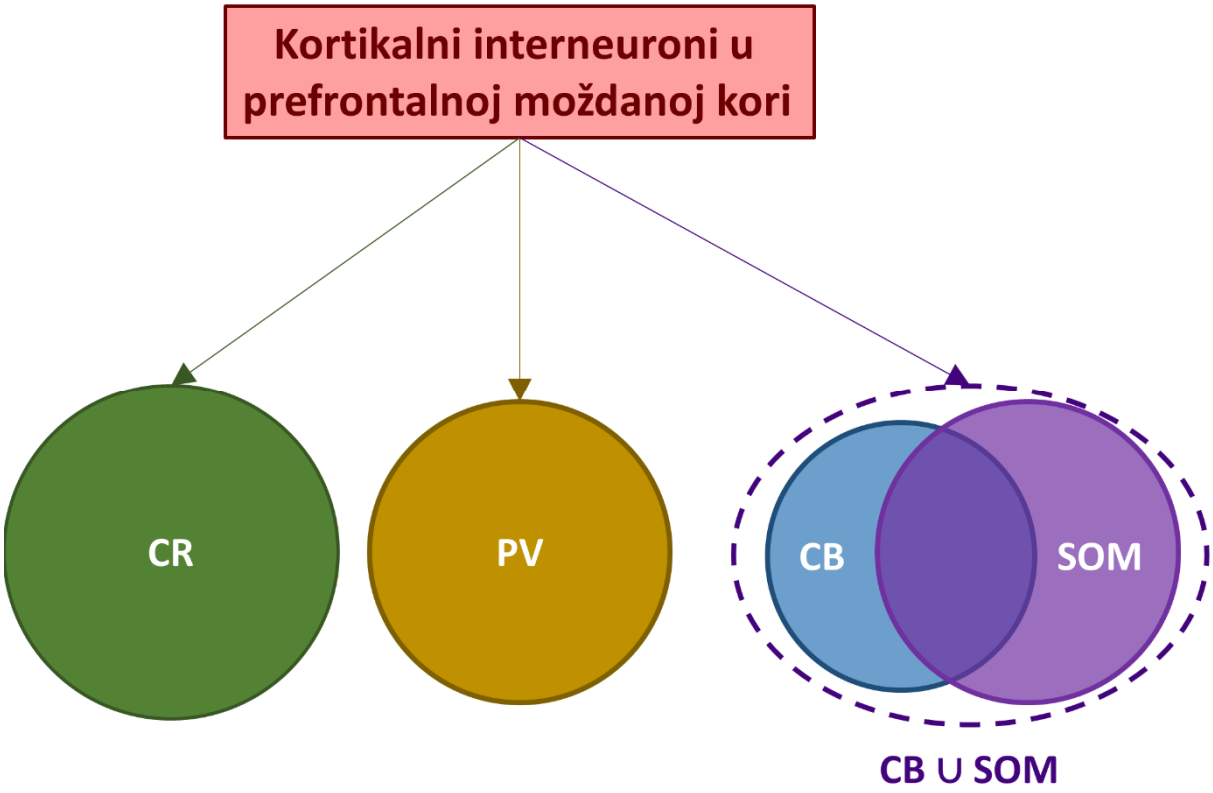
Konačno, analizom dvostruko obilježenih rezova potvrđeno je da je omjer SOM/CR bio prosječno 0,78 u BA9 te 0,71 u BA14r. Omjer SOM/PV bio je 0,89 u BA9 te 1,15 u BA14r, a omjer SOM/CB bio je 1,35 u BA9 te 1,45 u BA14r.



Slika 5.55. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje omjere broja SOM^+ neurona s ostalim populacijama kortikalnih interneurona. Točke na dijagramu prikazuju prosječni omjer za pojedini mozak, a vodoravne pune crte predstavljaju medijan. Isprekidana vodoravna crta označava omjer vrijednosti 1, tj. prikazuje vrijednosti gdje je omjer broja dviju populacija interneurona približno jednak.

5.4.5. Populacija kortikalnih interneurona koja izražava kalbindin i/ili somatostatin

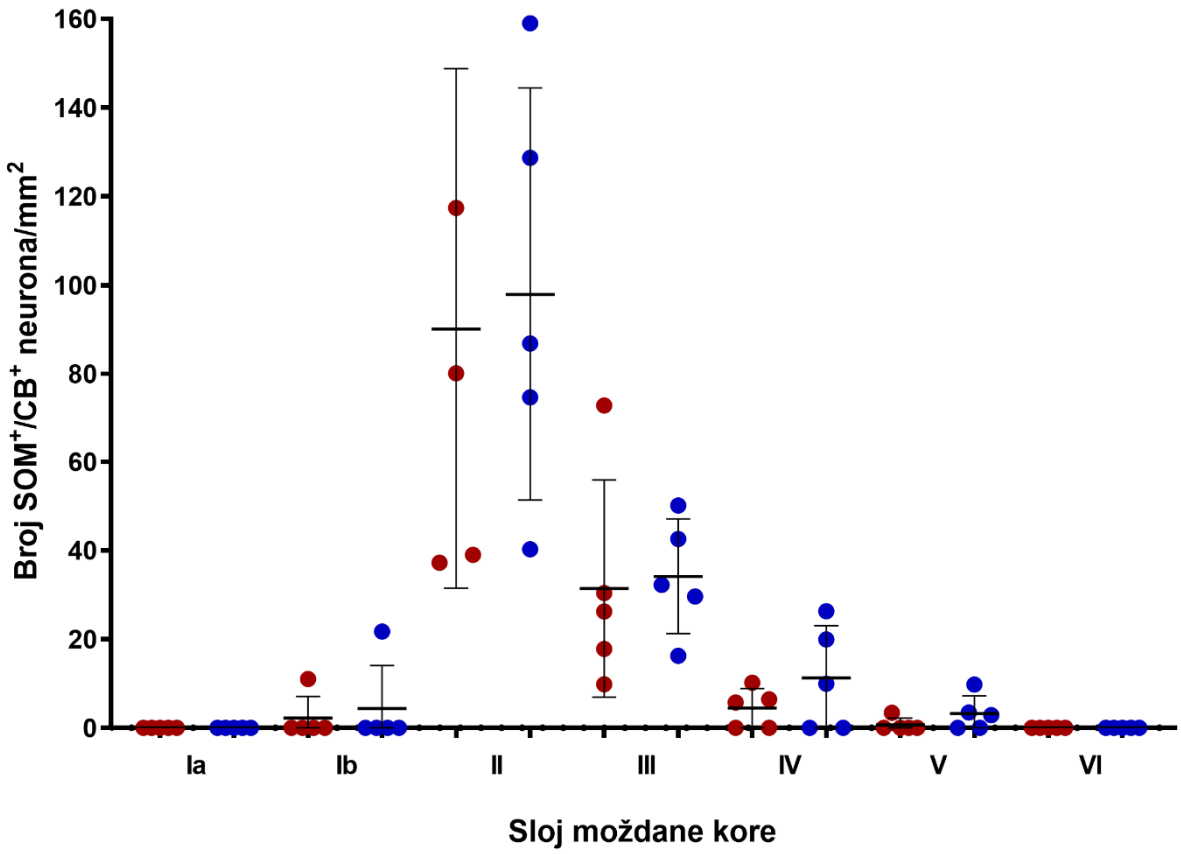
Iz do sada prikazanih rezultata vidljivo je da se molekularnim biljezima CB i SOM mogu definirati tri subpopulacije kortikalnih interneurona: jedna subpopulacija dvostruko obilježenih stanica (CB^+/SOM^+) i dvije subpopulacije jednostruko obilježenih stanica (CB^+/SOM^- i CB^-/SOM^+). Također, ni skup SOM^+ neurona niti skup CB^+ neurona zasebno ne obuhvaćaju u cijelosti skup kortikalnih interneurona koji nisu reaktivni na CR i PV (CR^-/PV^-), ali jesu reaktivni na barem jedan od korištenih molekularnih biljega. Jedino unija skupova SOM^+ i CB^+ neurona obuhvaća potonji skup interneurona pa će za populaciju kortikalnih interneurona koja je imunoreaktivna na CB i/ili SOM u daljnjem tekstu biti korištena oznaka CB ∪ SOM.



Slika 5.56. Prikaz triju glavnih nepreklapajućih (CR, PV i CB ∪ SOM) populacija kortikalnih interneurona u PFC-u koje se mogu definirati s četiri molekularna biljega (CR, PV, CB i SOM).

Neuroni koji su koeksprimirali CB i SOM (CB^+/SOM^+ neuroni) bili su najbrojniji u sloju II (94,02 ± 50,09/mm^2), a zatim u sloju III (32,80 ± 18,52/mm^2). Vrlo malobrojni bili su u slojevima IV (7,86 ± 9,12/mm^2), Ib (3,27 ± 7,34/mm^2) i V (1,96 ± 3,15/mm^2), a u sloju VI nije bio prisutan nijedan takav neuron. U sloju Ia također nije bilo CB^+/SOM^+ neurona budući da u tom sloju nisu zabilježeni SOM^+ neuroni.

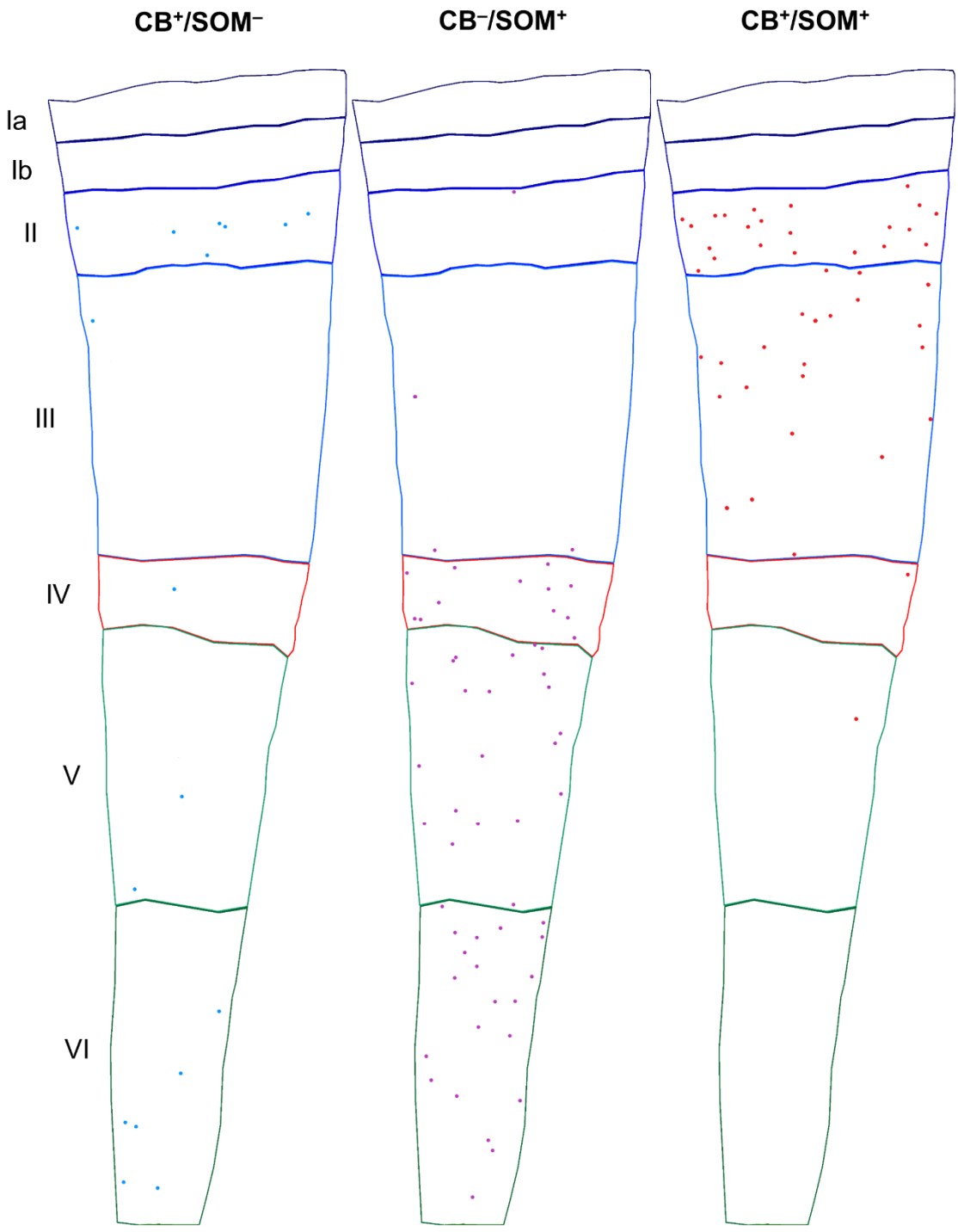
CB^+/SOM^+ neuroni činili su prosječno 35,67 % CB ∪ SOM neurona u BA9, odnosno 42,42 % u BA14r. CB^-/SOM^+ neuroni činili su prosječno 45,20 % CB ∪ SOM neurona u BA9, odnosno 36,90 % u BA14r. CB^+/SOM^- neuroni činili su prosječno 19,13 % CB ∪ SOM neurona u BA9, odnosno 20,68 % u BA14r. Iz navedenog slijedi da SOM kao biljeg obilježava 79 – 81 % svih CB ∪ SOM neurona, dok CB kao biljeg obilježava svega 55 – 63 % svih CB ∪ SOM neurona, uz veću varijabilnost između regija.



Slika 5.57. Točkasti dijagram raspršenja koji prikazuje broj dvostruko obilježenih CB^+/SOM^+ stanica po analiziranoj površini u pojedinim slojevima moždane kore. Crvene točke prikazuju vrijednosti za BA9, a plave točke vrijednosti za BA14r.

Svaka od triju subpopulacija CB ∪ SOM neurona imala je specifičnu raspodjelu po slojevima. CB^+/SOM^+ neuroni bili su smješteni dominantno u supragranularnim slojevima, dok su CB^-/SOM^+ neuroni bili smješteni dominantno u infragranularnim slojevima. Za razliku od ove dvije subpopulacije, CB^+/SOM^- neuroni bili su smješteni dominantno u slojevima II i VI, dok su u ostalim slojevima moždane kore bili slabo zastupljeni.

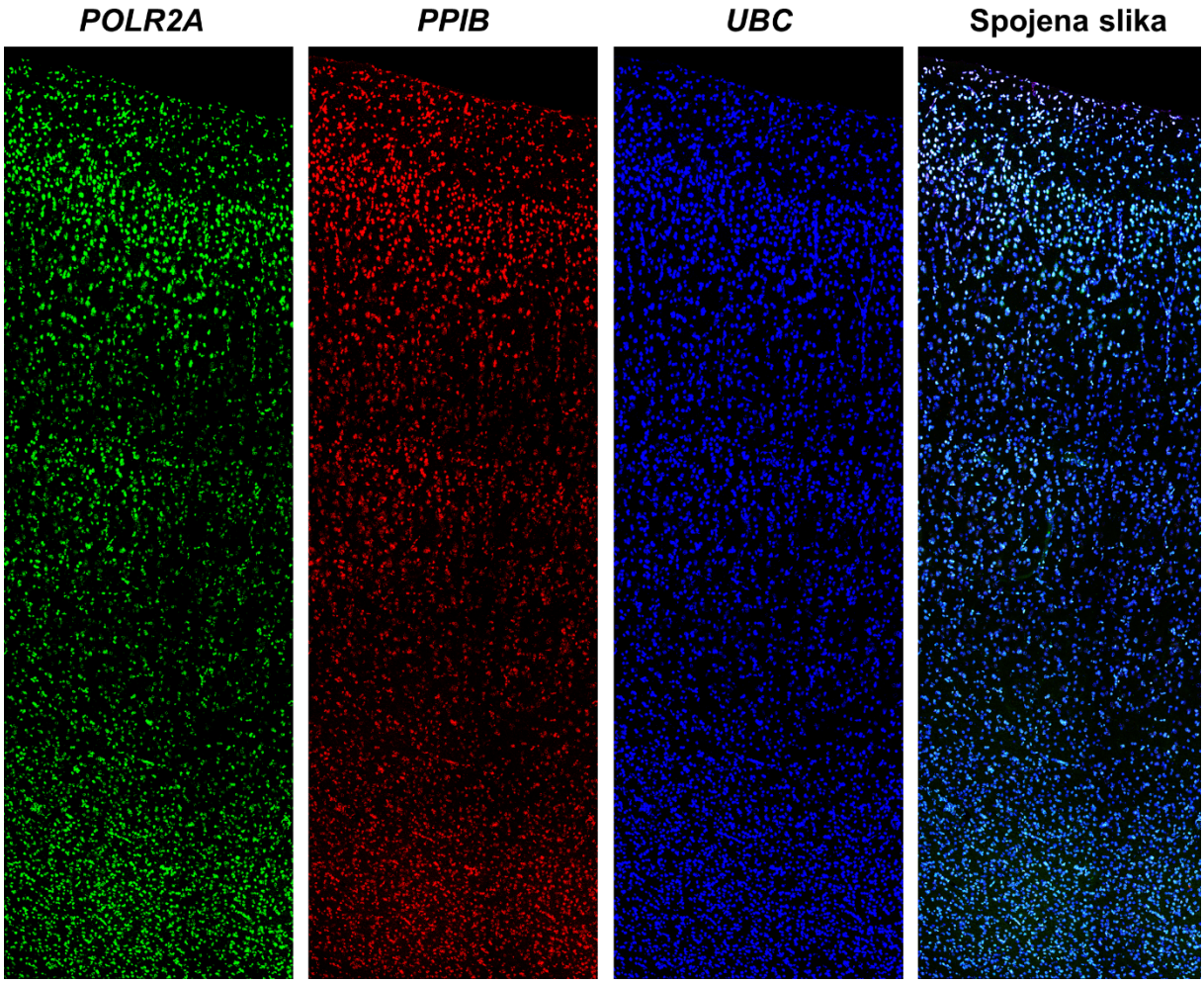
Navedene jasne razlike u raspodjeli po slojevima dodatno govore u prilog tome da je riječ o zasebnim molekularnim subpopulacijama kortikalnih interneurona.



Slika 5.58. Točkasti dijagrami koji prikazuju raspodjelu triju subpopulacija CB ∪ SOM neurona po slojevima (zbirni prikaz za Brodmannova polja 9 i 14r).

5.5. Neurotransmiterski fenotip pojedinih populacija kortikalnih interneurona

Osnovni preduvjet za RNAscope *in situ* hibridizaciju jest da tkivo koje se analizira ima adekvatnu količinu mRNA koja se može detektirati. Načelno, ako tkivo pokazuje reaktivnost na trostruku pozitivnu kontrolnu probu, onda sadrži dovoljno mRNA da bi se detektirala prisutnost mRNA s visokom, srednjom i niskom ekspresijom. Svi uzorci u ovom istraživanju imali su adekvatnu ekspresiju mRNA za daljnju analizu, budući da su pokazivali reaktivnost na sve pozitivne kontrolne probe (Slika 5.59), s time da je ekspresija mRNA općenito bila nešto niža u infragranularnim nego u supragranularnim slojevima.



Slika 5.59. Pozitivna kontrola za RNAscope *in situ* hibridizaciju (Brodmannovo polje 14r). U zelenom kanalu prikazana je pozitivna proba za mRNA niske ekspresije (*POLR2A*), u crvenom kanalu pozitivna proba za mRNA umjerene ekspresije (*PPIB*), a u plavom kanalu pozitivna proba za mRNA visoke ekspresije (*UBC*). Na spojenoj slici vidljivo je da sve stanice eksprimiraju sve tri vrste mRNA što znači da je tkivo prikladne kvalitete za daljnju analizu RNAscope *in situ* hibridizacijom.

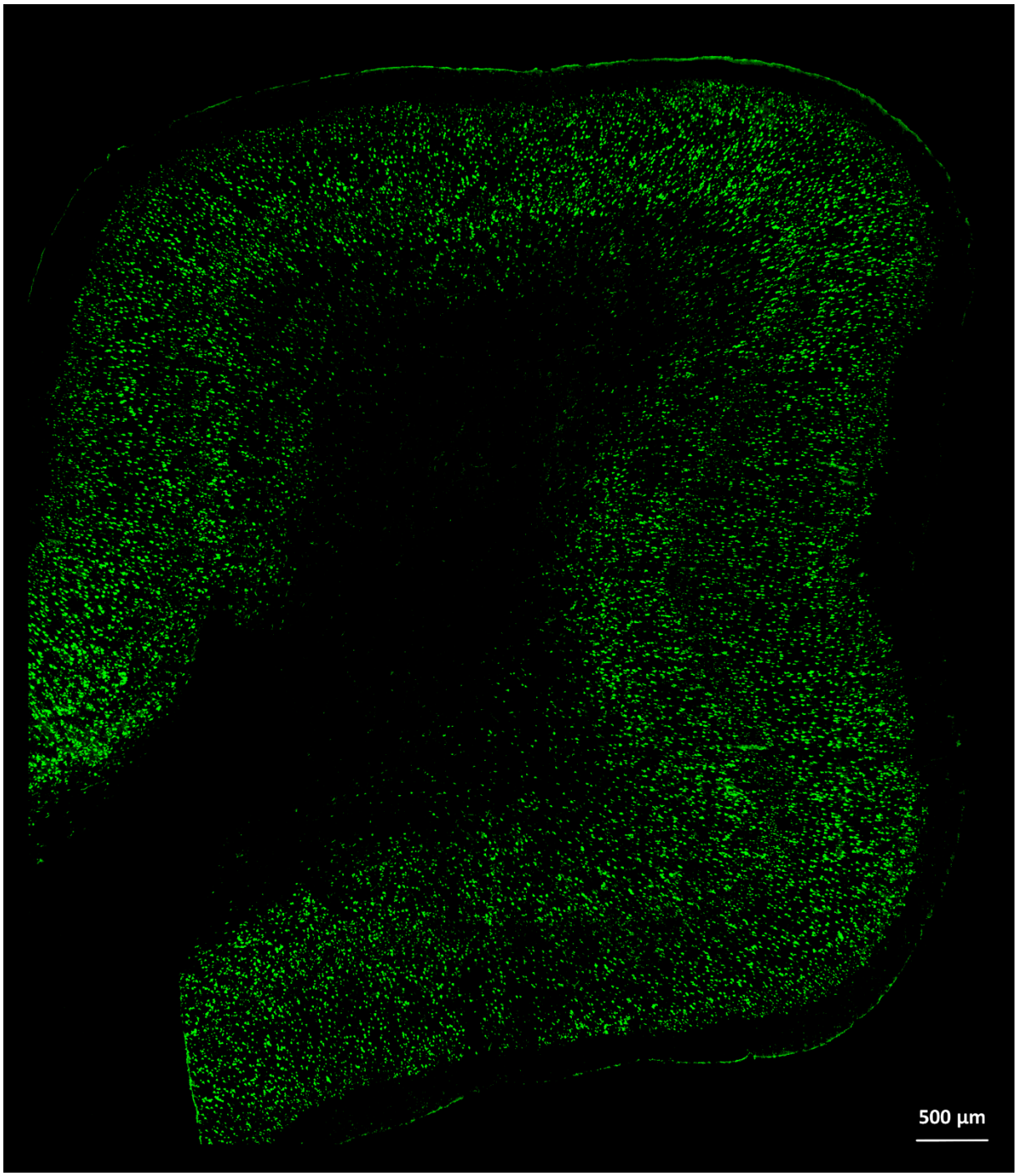
5.5.1. Ekspresija *SLC17A7* i *SLC32A1* mRNA u kortikalnim neuronima

Nakon što je utvrđena pogodnost tkiva za RNAscope *in situ* hibridizaciju, napravljena su višestruka bojenja u kojima je svaki molekularni biljeg za kortikalne interneurone (CR, PV, CB i SOM – detektirani imunofluorescencijom) kombiniran s mRNA probama na biljege za ekscitacijske i inhibicijske neurone (*SLC17A7* i *SLC32A1*).

Gen *SLC17A7* kodira za transporter VGLUT1 – protein koji djeluje kao glutamat/proton izmjenjivač na membranama sinaptičkih mjehurića i karakterističan je za kortikalne glutamatergičke (ekscitacijske) neurone. *SLC17A7* mRNA pokazivala je općenito izrazito visoku razinu ekspresije u prefrontalnoj moždanoj kori. Ekspresija *SLC17A7* mRNA bila je toliko visoka da se na histološkim rezovima mogla uočiti i laminacija moždane kore (Slika 5.60). U odnosu na anti-NeuN bojenje, nije bilo moguće odrediti sublaminaciju sloja I na histološkim rezovima koji prikazuju isključivo *SLC17A7* ekspresiju, budući da je općenito u sloju I ekspresija ovoga gena bila izrazito slaba sa svega pokojom jasno pozitivnom stanicom, ali je zato granicu slojeva I i II bilo jednostavnije odrediti nego na anti-NeuN rezovima. Također, postoje i određene razlike u ekspresiji *SLC17A7* između slojeva II – VI; ekspresija *SLC17A7* bila je najizraženija u slojevima III i V, a najslabije izražena u sloju IV. Razina ekspresije *SLC17A7* mRNA bila je visoka i u jezgri i u citoplazmi u području tijela neurona, tako da su se ovim bojenjem djelomično vizualizirali čak i obrisi tijela stanica (Slika 5.61).

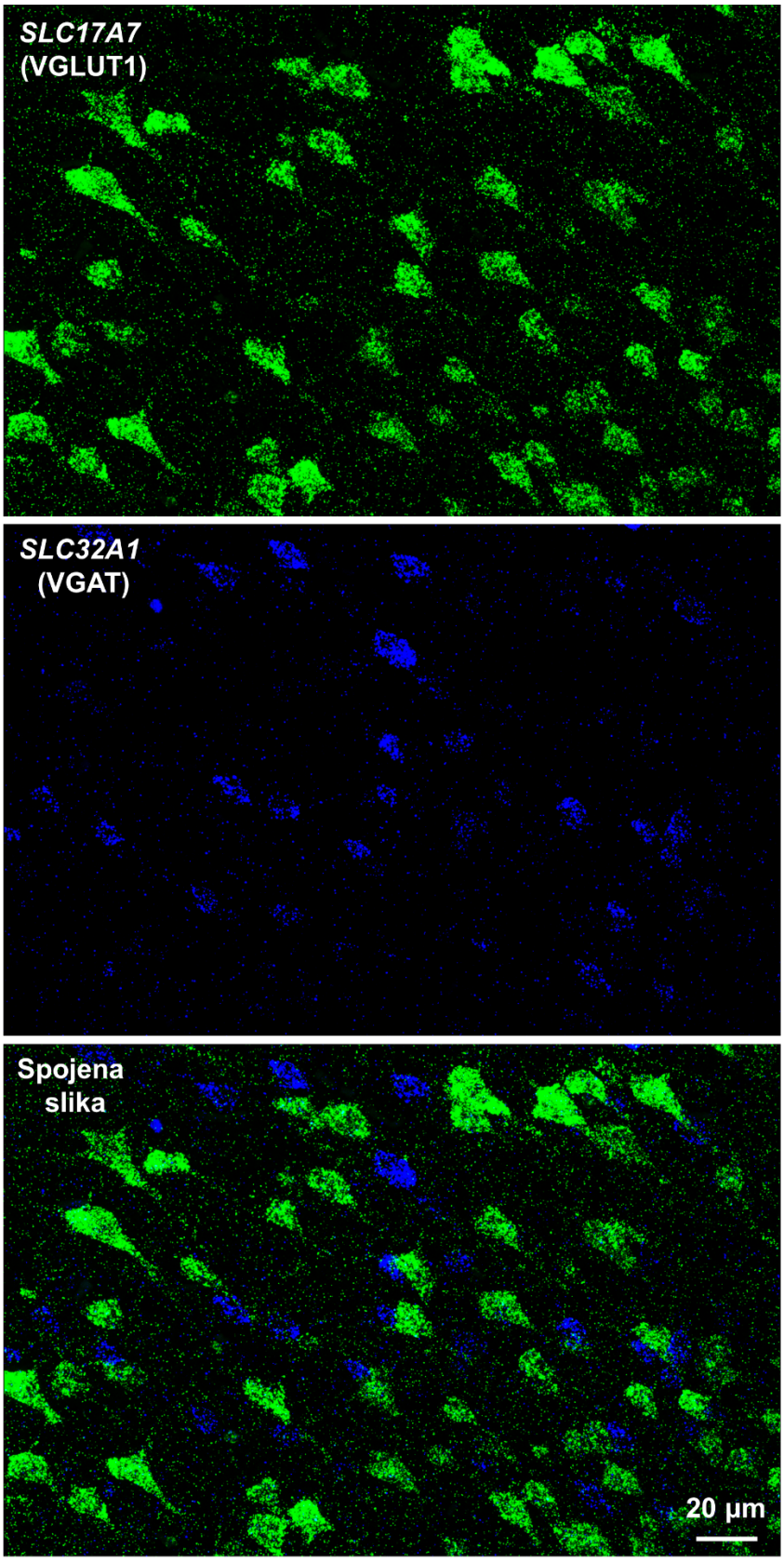
Gen *SLC32A1* koji kodira za VGAT (protein za prijenos neurotransmitera GABA koji ubacuje GABA iz citoplazme neurona u sinaptičke mjehuriće te je prisutan samo u GABA-ergičkim, inhibicijskim neuronima), pokazivao je srednju do visoku razinu ekspresije mRNA u prefrontalnoj moždanoj kori. Za razliku od *SLC17A7*, *SLC32A1* mRNA pretežito je bila eksprimirana u području stanične jezgre, a nešto manje u citoplazmi u odnosu na *SLC17A7* mRNA. Općenito, ekspresija *SLC32A1* mRNA bila je izraženija u supragranularnim slojevima, dok je u infragranularnim slojevima bila manje izražena te je manji broj stanica u infragranularnim slojevima eksprimirao *SLC32A1*.

Stanice koje su pokazivale jasnu ekspresiju *SLC32A1* nisu pokazivale ekspresiju *SLC17A7* i obrnuto (Slika 5.61) što pokazuje da su inhibicijski i ekscitacijski neuroni u moždanoj kori čovjeka odvojene populacije po svom molekularnom profilu.

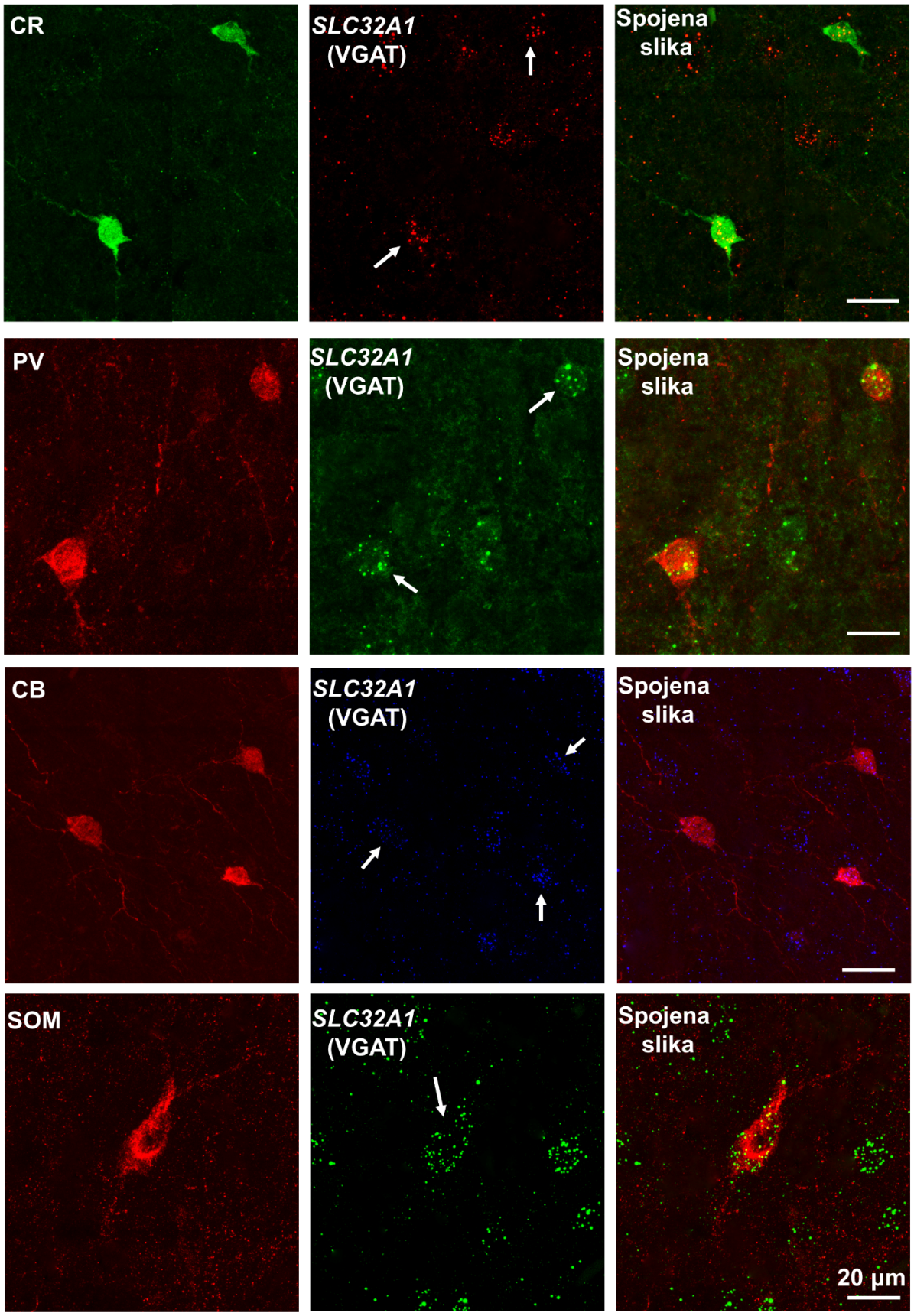


Slika 5.60. Konfokalna snimka histološkog reza iz vijuge, *gyrus rectus* s prikazom ekspresije *SLC17A7* mRNA. Vidljiva je izrazito visoka ekspresija *SLC17A7* u svim slojevima moždane kore, izuzev sloja I. Ekspresija *SLC17A7* u bijeloj tvari znatno je slabija, ali i dalje jasno vidljiva.

Svi CR^+, PV^+, CB^+ i SOM^+ interneuroni u BA9 i BA14r pokazivali su mRNA ekspresiju gena *SLC32A1*, dok nijedna od analiziranih populacija kortikalnih interneurona nije eksprimirala *SLC17A7* (Slika 5.62). Važno je naglasiti da su CB^+ piramidni neuroni eksprimirali *SLC17A7*, a nisu eksprimirali *SLC32A1* što dokazuje njihov glutamatergički fenotip i potvrđuje da nije riječ o interneuronima.



Slika 5.61. Konfokalna snimka dvostruko obilježenog reza na kojem je vidljiva ekspresija *SLC17A7* mRNA (zeleni kanal) i *SLC32A1* mRNA (plavi kanal) na granici slojeva II i III u BA14r. Na spojenoj slici vidljivo je da stanice koje eksprimiraju *SLC17A7* ne eksprimiraju *SLC32A1* i obrnuto.



Slika 5.62. Konfokalne snimke koje prikazuju koekspresiju biljega interneurona (CR, PV, CB i SOM) i *SLC32A1* (VGAT) mRNA u supragranularnim slojevima prefrontalne moždane kore u BA9 i BA14r.

5.5.2. Ekspresija *GAD1* i *GAD2* mRNA u kortikalnim neuronima

Nakon što je potvrđeno da su sve populacije kortikalnih interneurona GABA-ergičke, molekularni biljezi interneurona (CR, PV, CB i SOM – detektirani imunofluorescencijom) kombinirani su s probama na dodatne biljege inhibicijskih neurona (*GAD1* i *GAD2*).

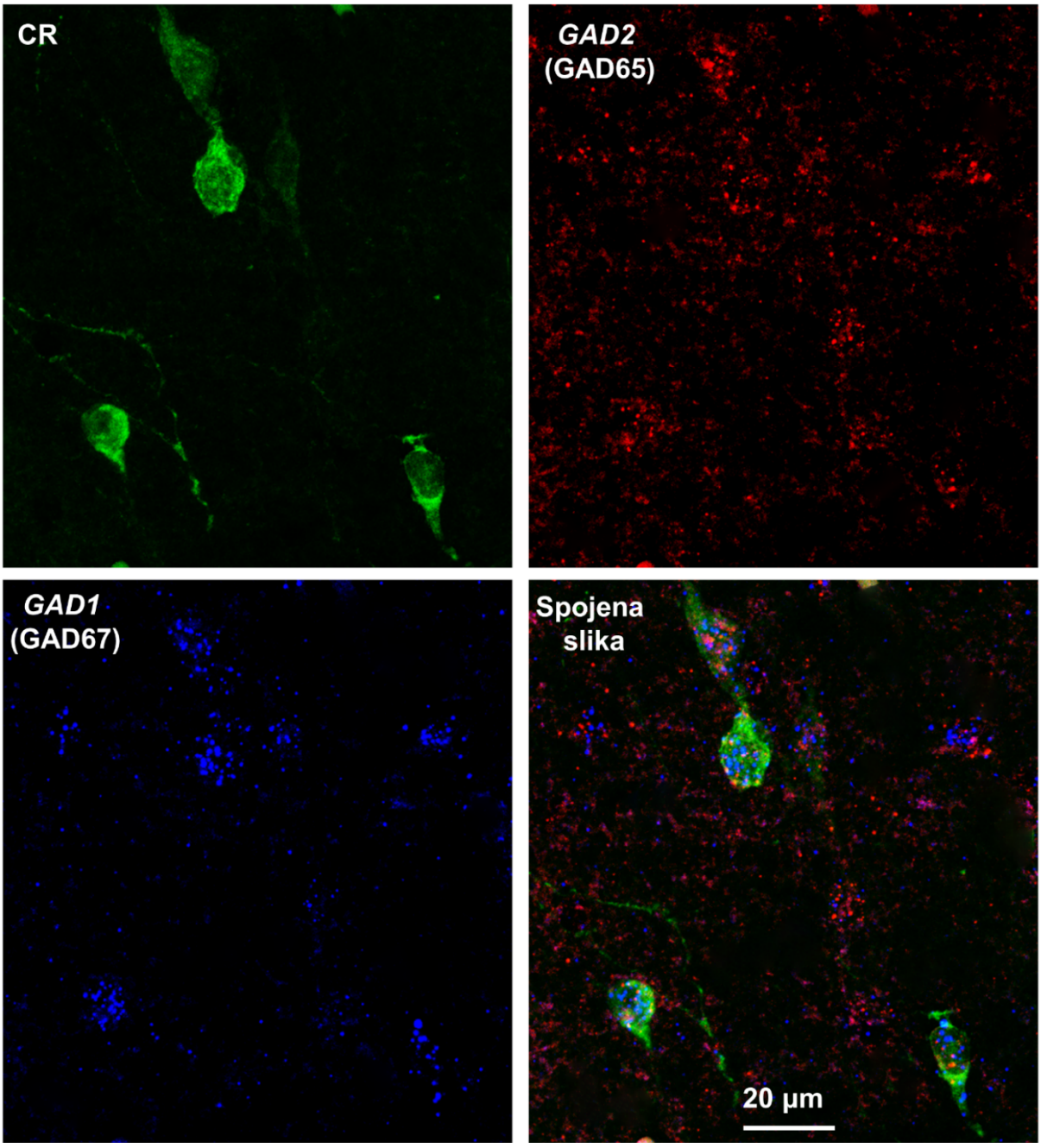
Gen *GAD1* kodira za GAD67 – enzim smješten u citoplazmi koji katalizira pretvorbu glutamata u GABA. Ovako sintetizirana GABA iskorištava se u inhibicijskim neuronima u razne metaboličke svrhe. *GAD1* mRNA pokazivala je srednju do visoku razinu ekspresije u prefrontalnoj moždanoj kori. *GAD1* mRNA pretežito je bila eksprimirana u području stanične jezgre i u citoplazmi neposredno uokolo stanične jezgre.

Gen *GAD2* kodira za GAD65 – membranski protein koji je prvenstveno smješten u živčanim završetcima i sintetizira GABA iz glutamata za potrebe neurotransmisije. *GAD2* mRNA pokazivala je nisku do srednju razinu ekspresije u prefrontalnoj moždanoj kori. *GAD2* mRNA također je pretežito bila eksprimirana u području stanične jezgre i u citoplazmi neposredno uokolo stanične jezgre.

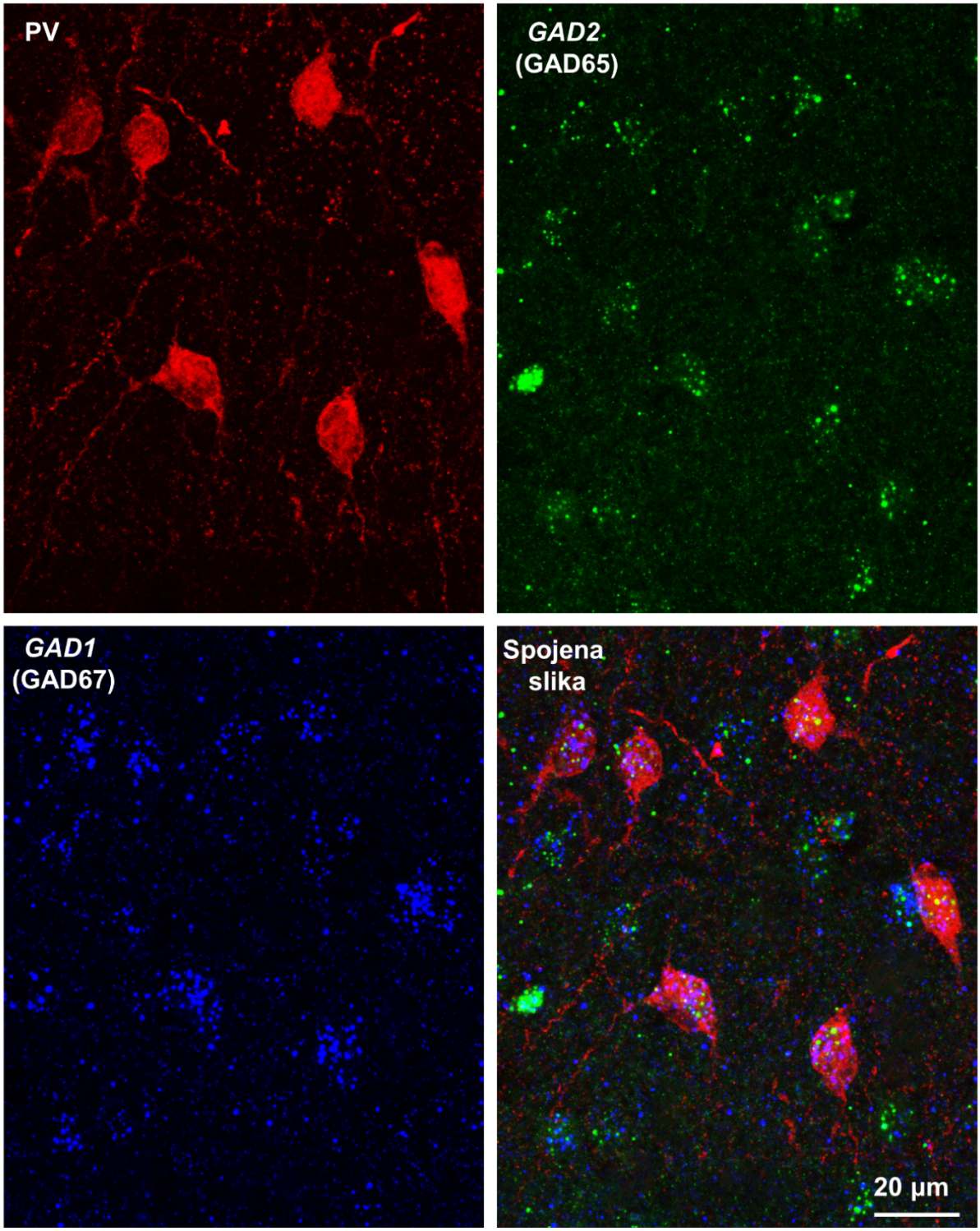
Gotovo svi kortikalni interneuroni eksprimirali su i *GAD1* i *GAD2* mRNA, s time da je *GAD1* mRNA tipično imala višu razinu ekspresije od *GAD2* mRNA (Slika 5.63, Slika 5.64, Slika 5.65 i Slika 5.66). Među različitim populacijama kortikalnih interneurona nisu uočene kvalitativne razlike u razini ekspresije *GAD1* i *GAD2* mRNA, a nisu uočene ni kvalitativne razlike u ekspresiji između dvaju analiziranih Brodmannovih polja.

Ekspresija *GAD1* i *GAD2* mRNA u supragranularnim slojevima bila je nešto veća nego u infragranularnim slojevima, ali i u infragranularnim slojevima su sve analizirane populacije kortikalnih interneurona pokazivale jasnu ekspresiju oba GABA-ergička biljega.

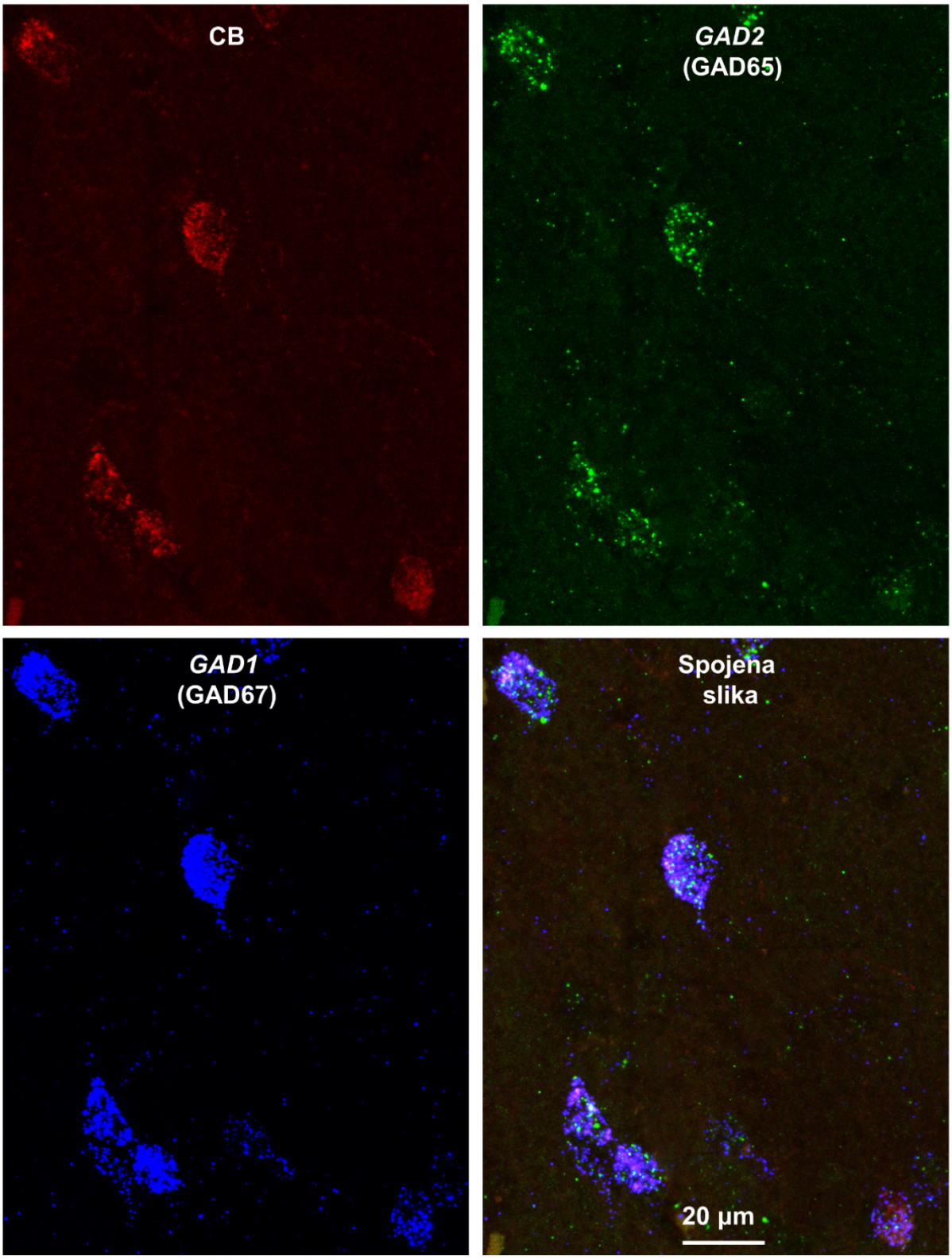
Ovime je dodatno potvrđen GABA-ergički neurotransmiterski fenotip kortikalnih interneurona koji su imunoreaktivni na CR, PV, CB ili SOM.



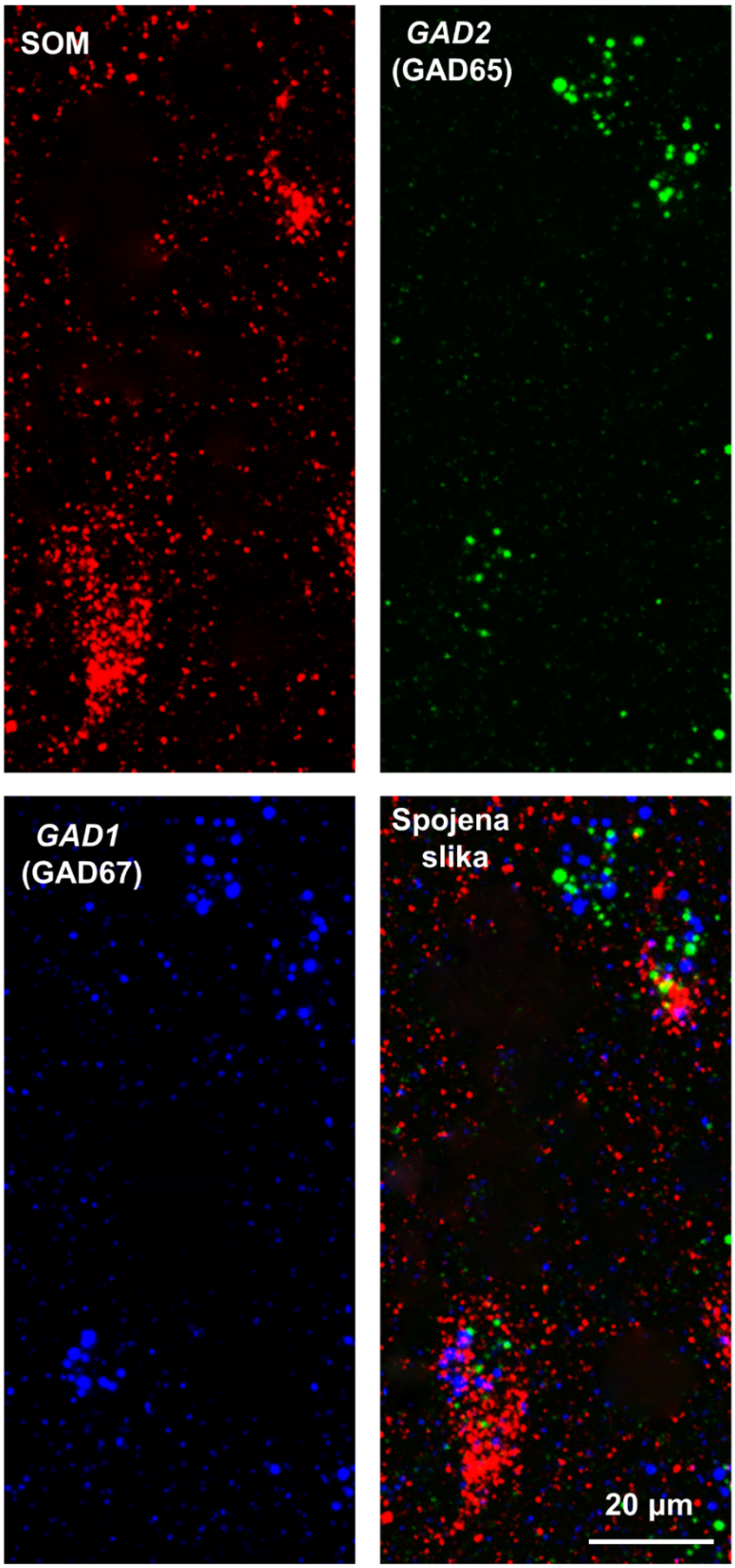
Slika 5.63. Prikaz koekspresije CR (zeleni kanal) te *GAD2* (GAD65, crveni kanal) i *GAD1* (GAD67, plavi kanal) mRNA u supragranularnim slojevima u Brodmannovom polju 9. Svi prikazani CR^+ neuroni izražavaju oba GABA-ergička biljega, s time da je ekspresija *GAD1* mRNA jače izražena.



Slika 5.64. Prikaz koekspresije PV (crveni kanal) te *GAD2* (GAD65, zeleni kanal) i *GAD1* (GAD67, plavi kanal) mRNA u supragranularnim slojevima u Brodmannovom polju 9. Svi prikazani PV^+ neuroni izražavaju oba GABA-ergička biljega, s time da je ekspresija *GAD1* mRNA jače izražena.



Slika 5.65. Prikaz koekspresije CB (crveni kanal) te *GAD2* (GAD65, zeleni kanal) i *GAD1* (GAD67, plavi kanal) mRNA u supragranularnim slojevima u Brodmannovom polju 14r. Svi prikazani CB^+ neuroni izražavaju oba GABA-ergička biljega, s time da je ekspresija *GAD1* mRNA jače izražena.



Slika 5.66. Prikaz koekspresije SOM (crveni kanal) te *GAD2* (GAD65, zeleni kanal) i *GAD1* (GAD67, plavi kanal) mRNA u supragranularnim slojevima u Brodmannovom polju 14r. Svi prikazani SOM^+ neuroni izražavaju oba GABA-ergička biljega, s time da je ekspresija *GAD1* mRNA jače izražena.

5.6. Ventro-dorzalne razlike u strukturi pojedinih populacija kortikalnih interneurona

Usporedbom udjela i omjera različitih populacija kortikalnih interneurona između Brodmannovih polja 9 i 14r utvrđene su određene razlike u strukturi interneuronske mreže između ventralnih (BA14r) i dorzalnih (BA9) dijelova PFC-a (Tablica 5.13).

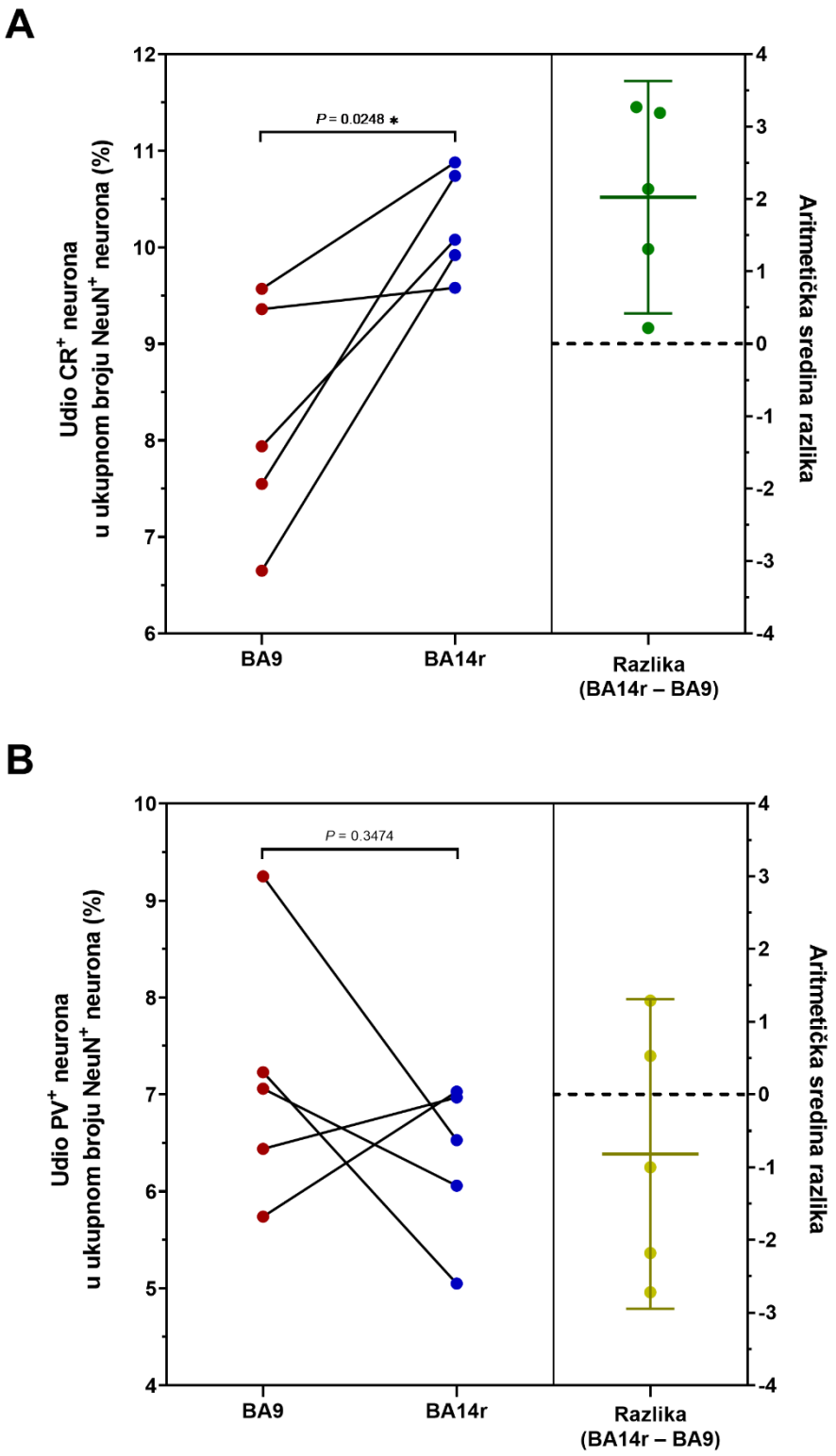
5.6.1. Razlike u udjelima pojedinih populacija kortikalnih interneurona u ukupnom broju neurona

Razmatrajući ukupne udjele pojedinih populacija interneurona, razlike između dviju analiziranih regija bile su statistički značajne samo za jednu populaciju – CR^+ neurone (P = 0,0248; upareni t-test). Iako su se prosječni udjeli drugih populacija u određenoj mjeri razlikovali između regija, analiza zavisnih uzoraka pokazala je da razlike nisu konzistentno uvijek u prilog istoj regiji (tj. u dijelu mozgova udio je bio veći u BA9, a u dijelu u BA14r) te stoga nisu bile statistički značajne (Slika 5.67 i Slika 5.68).

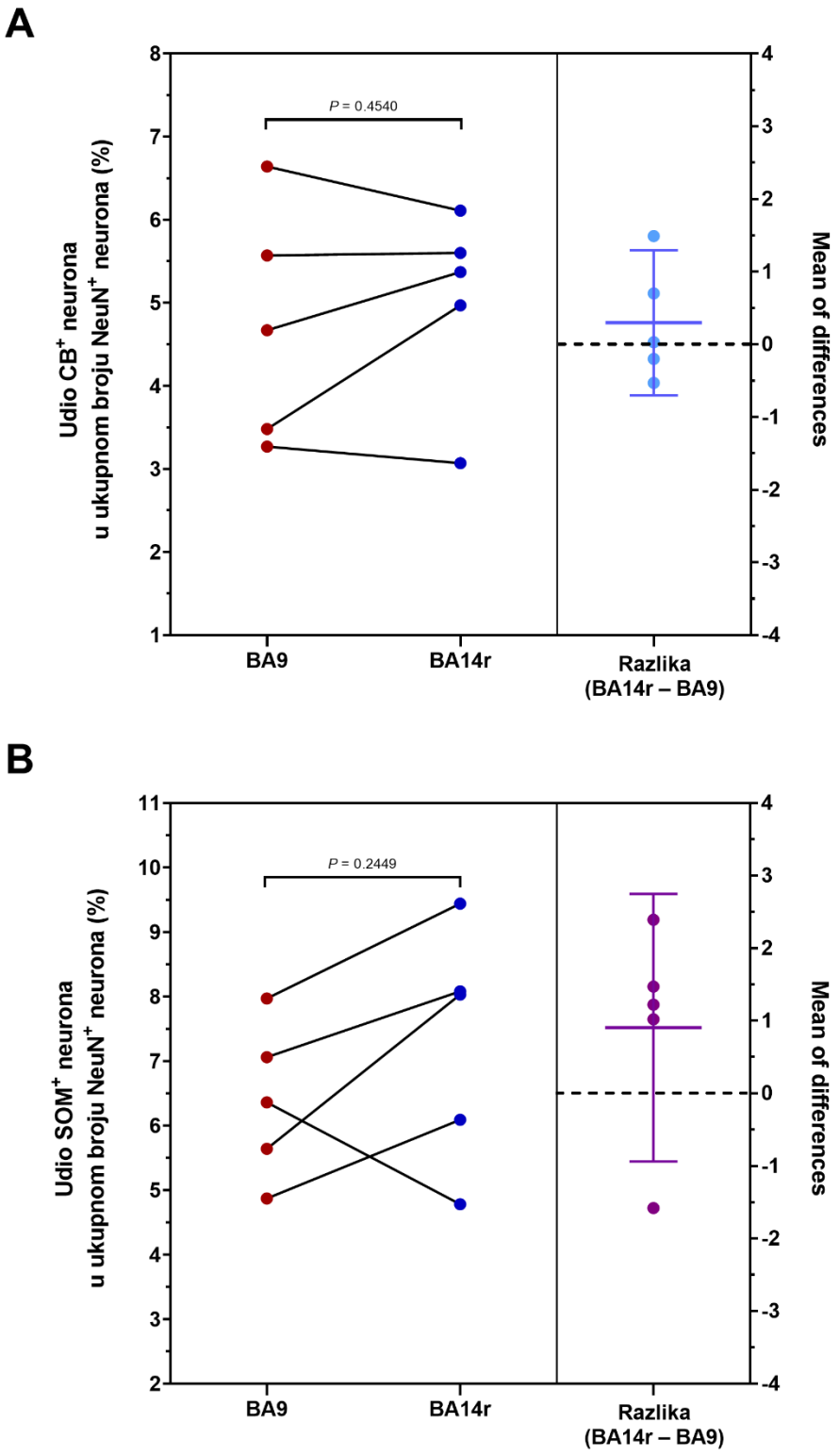
CR^+ neuroni su u BA9 imali prosječan udio od 8,21 % u ukupnoj populaciji neurona, dok su u BA14r imali prosječan udio od 10,24 %. U svakom od analiziranih mozgova udio CR^+ neurona u BA14r bio je veći nego u BA9 pa je stoga i analiza zavisnih uzoraka potvrdila statističku značajnost ove razlike (Slika 5.67). Također, najmanja vrijednost udjela CR^+ neurona u BA14r bila je 9,58 %, dakle više od najveće vrijednosti udjela CR^+ neurona u BA9 (9,57 %), što znači da nema preklapanja raspona udjela između regija (Tablica 5.13 i Slika 5.67). Navedeno nije bilo utvrđeno ni kod jedne druge analizirane populacije interneurona.

Tablica 5.13. Prikaz udjela (u %) pojedinih populacija kortikalnih interneurona u ukupnom broju neurona za svaki analizirani mozak.

	CR		**PV**		**CB**		**SOM**	
Mozak	**BA9**	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**	**BA9**	**BA14r**
ČO382	9,36	9,58	9,25	6,53	5,57	5,60	7,97	9,44
ČO383	9,57	10,88	7,06	6,06	6,64	6,11	7,06	8,08
ČO385	6,65	9,92	7,23	5,05	3,27	3,07	6,36	4,78
ČO386	7,94	10,08	5,74	7,03	4,67	5,37	5,64	8,03
ČO387	7,55	10,74	6,44	6,97	3,48	4,97	4,87	6,09
Artimetička sredina	**8,21**	**10,24**	**7,14**	**6,33**	**4,73**	**5,02**	**6,38**	**7,28**
SD	1,24	0,55	1,31	0,81	1,42	1,17	1,21	1,84
Medijan	**7,94**	**10,08**	**7,06**	**6,53**	**4,67**	**5,37**	**6,36**	**8,03**
IQR	1,81	0,82	0,79	0,91	2,09	0,63	1,42	1,99



Slika 5.67. Procjenski dijagrami usporedbe udjela CR^+ neurona (**A**) i PV^+ neurona (**B**) u ukupnom broju neurona između Brodmannovih polja 9 i 14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje u obliku uparenog točkastog dijagrama vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za BA9 (crvene točke) i za BA14r (plave točke). Crte povezuju crvene i plave 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).



Slika 5.68. Procjenski dijagrami usporedbe udjela CB^+ neurona (**A**) i SOM^+ neurona (**B**) u ukupnom broju neurona između Brodmannovih polja 9 i 14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje u obliku uparenog točkastog dijagrama vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za BA9 (crvene točke) i za BA14r (plave točke). Crte povezuju crvene i plave 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).

Daljnjom analizom udjela po slojevima utvrđeno je da razlike u udjelima CR^+ neurona između regija nisu značajne niti unutar supragranularnih (P = 0,0605) niti unutar infragranularnih slojeva (P = 0,3064). To je i očekivano, budući da je ukupno značajno povećanje udjela CR^+ neurona u BA14r posljedica niza manjih povećanja u svakom sloju moždane kore (Slika 5.8). Valja ipak naglasiti da supragranularni slojevi ukupno više doprinose apsolutnom povećanju udjela CR^+ neurona u BA14r, budući da je većina CR^+ neurona smještena u supragranularnim slojevima.

5.6.2. Razlike u omjerima broja pojedinih populacija kortikalnih interneurona

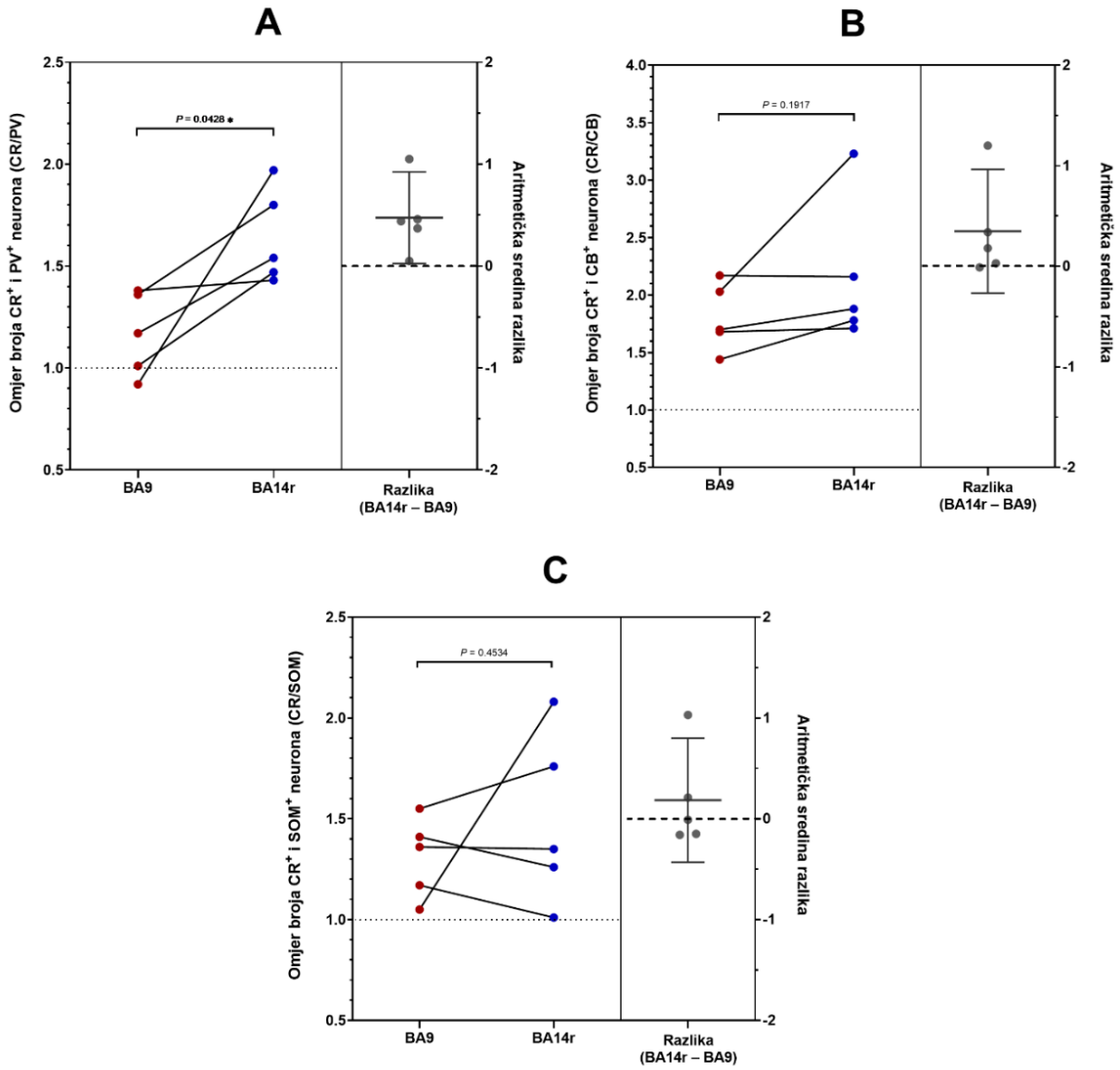
Analizom omjera broja pojedinih populacija interneurona utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika u omjeru CR^+ i PV^+ neurona (CR/PV) između BA9 i BA14r (P = 0,0428 za upareni t-test; P = 0,0431 za upareni t-test omjera) (Slika 5.69).

U svakom od analiziranih mozgova omjer CR/PV bio je veći u BA14r, prvenstveno zbog značajno većeg udjela CR^+ neurona u toj regiji. Omjeri CR/CB i CR/SOM nisu se značajno razlikovali između BA9 i B14r.

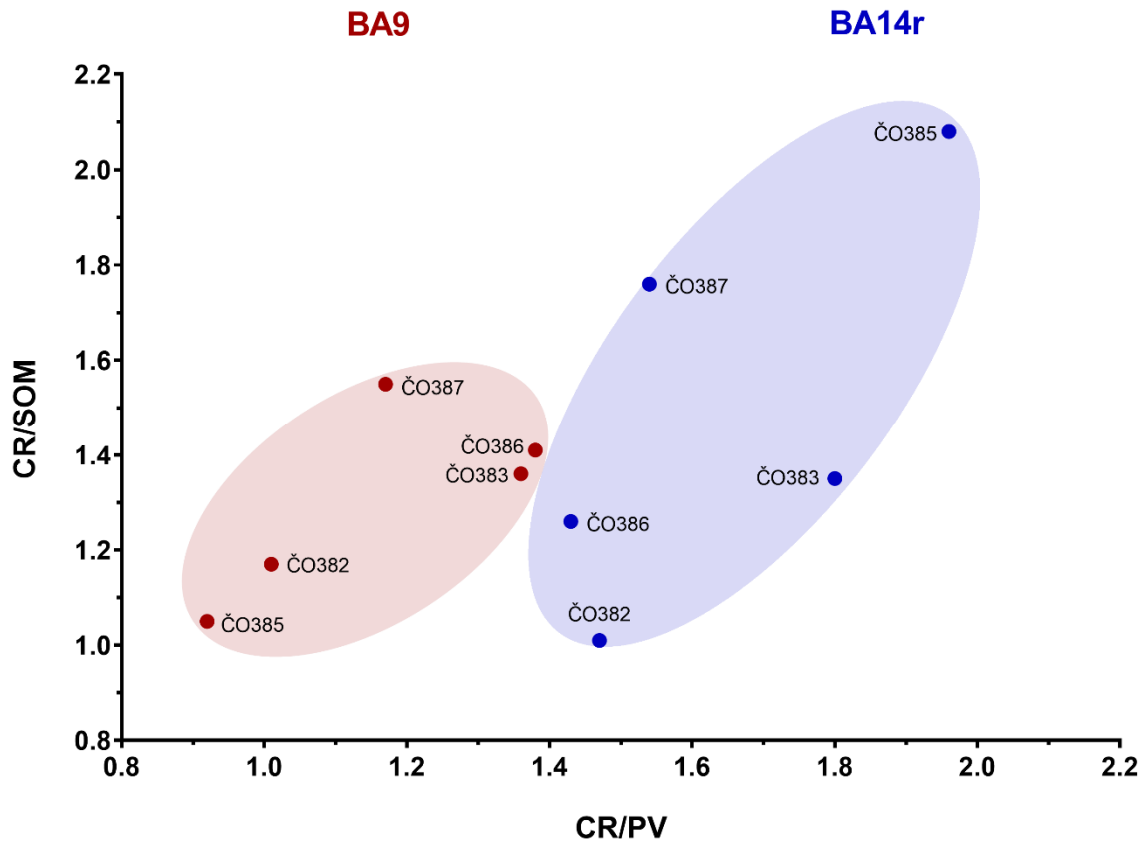
Budući da kompozitni podatci imaju svojstvo da navedeni omjeri zapravo sadrže podatke i o preostalim omjerima (za četiri komponente skupa, bilo koja tri omjera u potpunosti definiraju sve proporcije u skupu), detaljno su grafički prikazani samo omjeri CR^+ neurona s ostalim populacijama neurona (Slika 5.69).

Osim omjera CR/PV, između dvaju Brodmannovih polja značajno se razlikovao i omjer PV/SOM (P = 0,0293 za upareni t-test; P = 0,0414 za upareni t-test omjera). Za razliku od omjera CR/PV, omjer PV/SOM bio je manji u BA14r u svakom od analiziranih mozgova, što je posljedica prosječno nešto manjeg udjela PV^+ neurona i nešto većeg udjela SOM^+ neurona u BA14r u odnosu na BA9.

Razlike između regija u omjerima pojedinih populacija interneurona dodatno su potvrđene grafički. Dijagramom raspršenja koji prikazuje asocijaciju omjera CR/SOM i CR/PV utvrđeno je jasno odvojeno grupiranje podataka iz BA9 i BA14r što pokazuje da između ovih dvaju Brodmannovih polja postoje značajne razlike u omjerima pojedinih populacija kortikalnih interneurona (Slika 5.70).



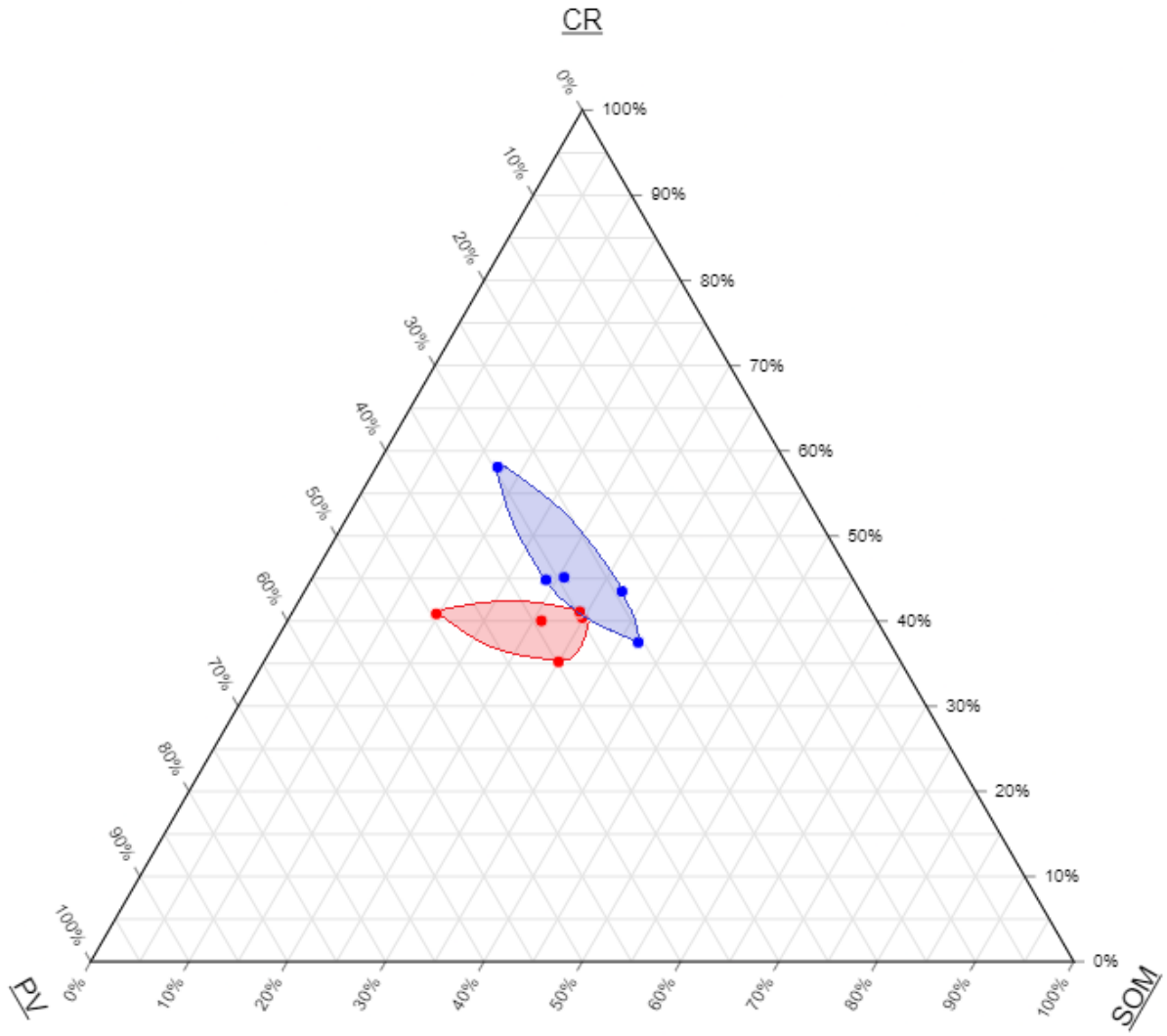
Slika 5.69. Procjenski dijagrami usporedbe omjera CR/PV (**A**), CR/CB (**B**) i CR/SOM (**C**) između Brodmannovih polja 9 i 14r. Lijevi dio dijagrama prikazuje u obliku uparenog točkastog dijagrama vrijednosti udjela za svaki pojedini mozak za BA9 (crvene točke) i za BA14r (plave točke). Crte povezuju crvene i plave 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).



Slika 5.70. Dijagram raspršenja koji pokazuje asocijaciju omjera CR/SOM i CR/PV. Vidljivo je jasno odvojeno grupiranje podataka iz BA9 (crveno) i BA14r (plavo).

Ternarnim dijagramom koji prikazuje relativne odnose CR^+, PV^+ i SOM^+ neurona (tri najbrojnije analizirane populacije kortikalnih interneurona) također je utvrđeno jasno odvojeno grupiranje podataka iz BA9 i BA14r što dodatno potvrđuje postojanje značajnih razlika u strukturi kortikalnih interneurona između ovih dviju regija (Slika 5.71).

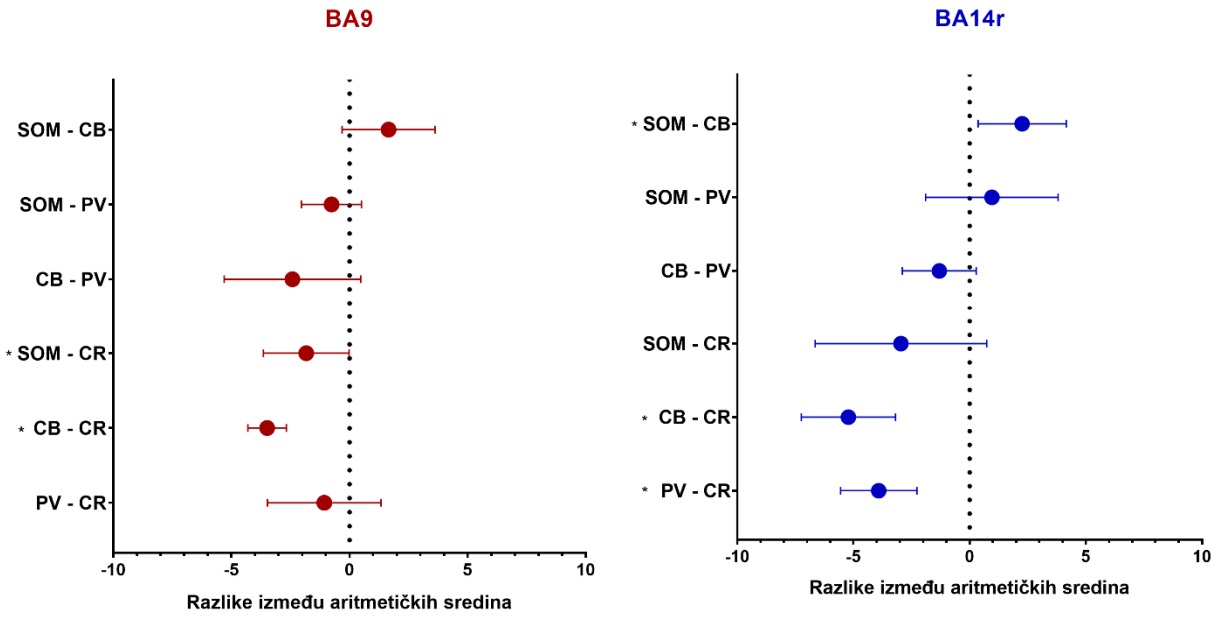
Iz ternarnog dijagrama vidljivo je da je u BA9 relativni udio PV^+ neurona veći nego u BA14r, dok su u BA14r veći relativni udjeli CR^+ i SOM^+ neurona.



Slika 5.71. Ternarni dijagram koji istovremeno prikazuje relativne odnose broja CR^+, PV^+ i SOM^+ neurona. Vidljivo je jasno odvojeno grupiranje podataka iz Brodmannova polja 9 (crveno) i Brodmannova polja 14r (plavo).

Konačno, jednosmjernom ANOVA-om ponovljenih mjerenja utvrđeno je da su u BA9 statistički značajne bile razlike u udjelima između CR^+ i CB^+ neurona (P = 0,0002) te CR^+ i SOM^+ neurona (P = 0,0483), dok su u BA14r statistički značajne bile razlike u udjelima između CR^+ i CB^+ neurona (P = 0,0016), CR^+ i PV^+ neurona (P = 0,0022) te SOM^+ i CB^+ neurona (P = 0,0280) (Slika 5.72).

Značajna razlika između CR^+ i PV^+ neurona u BA14r očituje se i u značajnom povećanju omjera CR/PV u BA14r.

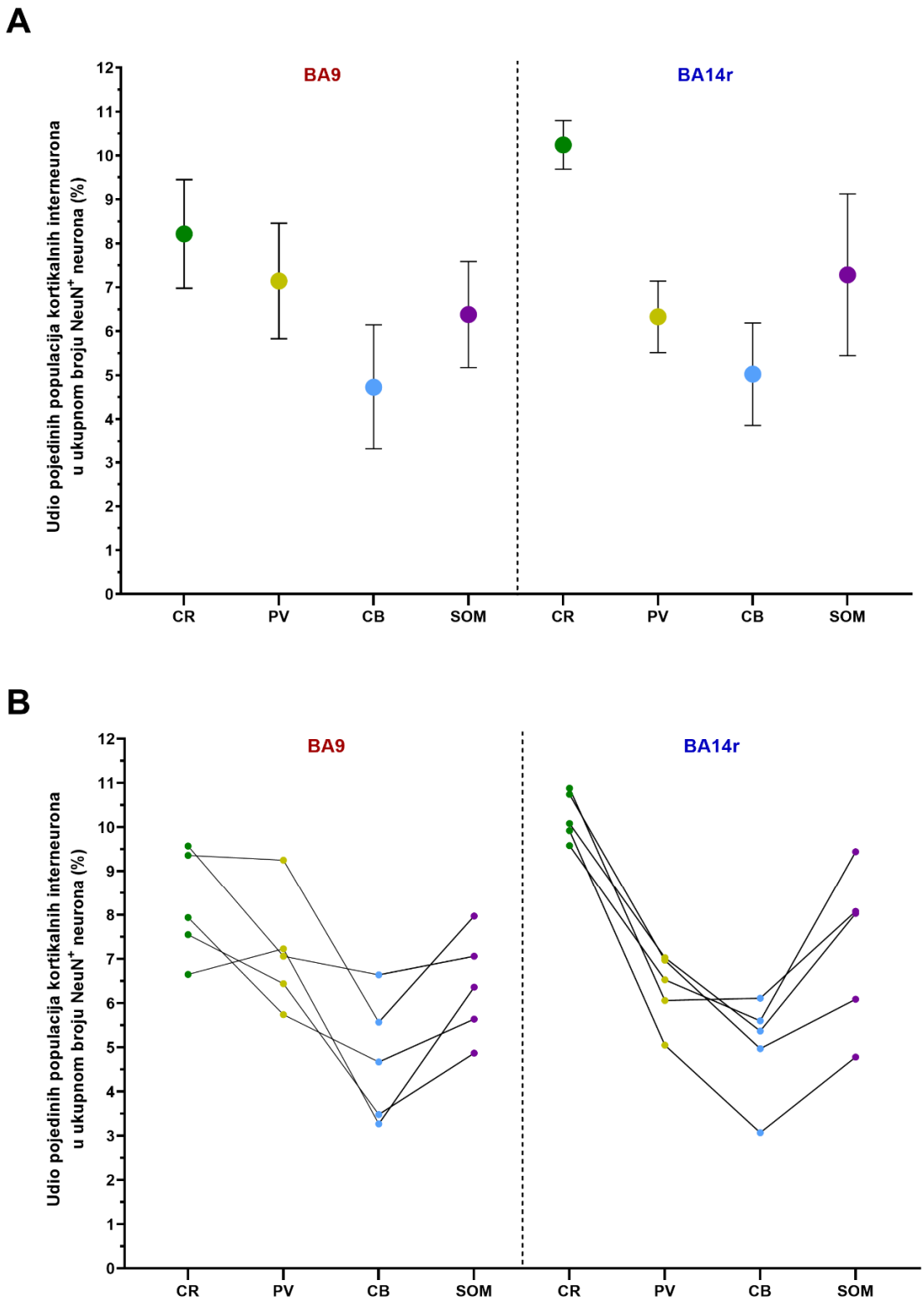


Slika 5.72. Razlike između prosječnih aritmetičkih sredina udjela pojedinih populacija interneurona kao rezultat jednosmjerne ANOVA-e ponovljenih mjerenja. Stupci pogreške predstavljaju 95%-tne CI. Razlika je statistički značajna ako CI ne obuhvaća vrijednost 0 (prikazana isprekidanom crtom).

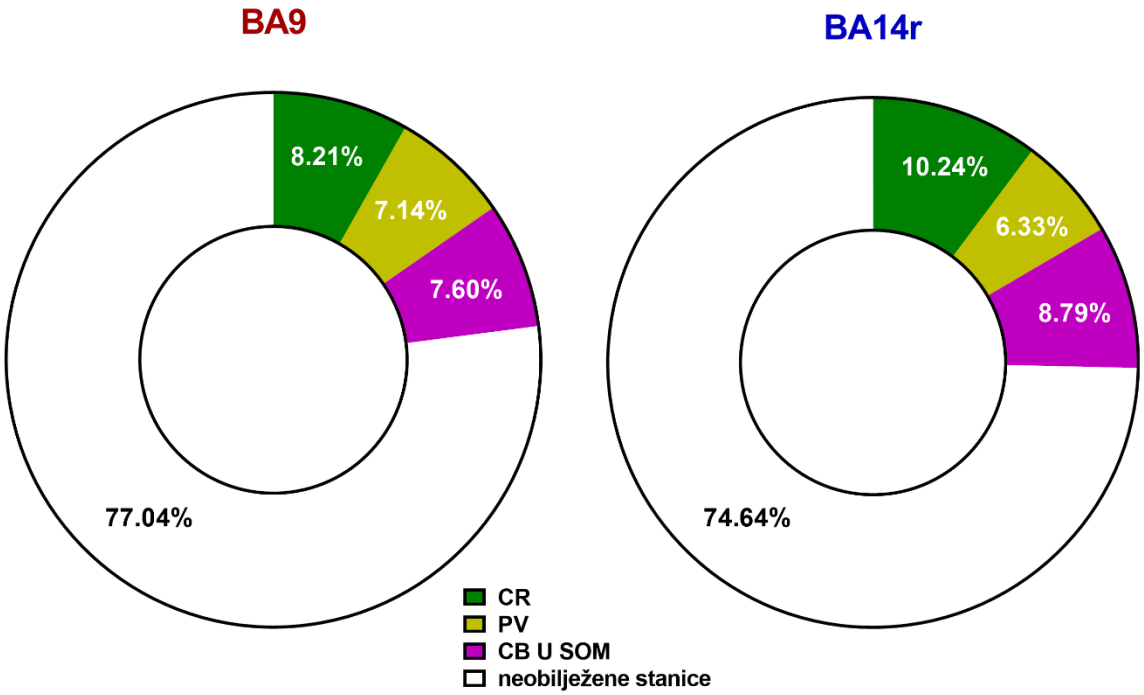
5.6.3. Razlike u ustrojstvu kortikalne mreže inhibicijskih interneurona

Prikazani podatci ukazuju da postoje značajne razlike u ustrojstvu kortikalne mreže inhibicijskih interneurona između BA9 i BA14r. Ključne razlike u sastavu kortikalnih interneurona između ove dvije regiju su sljedeće: u BA14r značajno je veći udio CR^+ neurona te prosječno (ali ne i značajno) nešto veći udio SOM^+ neurona i prosječno (ali ne i značajno) nešto manji udio PV^+ neurona. Udio CB^+ neurona u obje regije je podjednak i vrlo malo utječe na razlike u sastavu populacija interneurona (Slika 5.73). Ključna razlika između regija jest značajno povećanje omjera CR/PV u BA14r, kao posljedice značajnog povećanja udjela CR^+ neurona i prosječnog smanjenja udjela PV^+ neurona u toj regiji.

Iz podataka dobivenih dvostrukim obilježavanjem CB i SOM moguće je napraviti procjenu ukupnog udjela CB ∪ SOM neurona. Uzevši u obzir tri velike populacije interneurona definirane ovim istraživanjem (CR, PV i CB ∪ SOM), sastav kortikalnih interneurona u BA9 je sljedeći: 8,21 % CR, 7,14 % PV i 7,60 % CB ∪ SOM. Sastav interneurona u BA14r je sljedeći: 10,24 % CR, 6,33 % PV i 8,79 % CB ∪ SOM (Slika 5.74). Ovo pokazuje da se u BA14r prosječno povećava udio CR i CB ∪ SOM, a prosječno smanjuje udio PV u odnosu na BA9.



Slika 5.73. (**A**) Udjeli pojedinih populacija interneurona u ukupnom broju neurona u Brodmannovim poljima 9 i 14r prikazani kao aritmetička sredina sa SD. (**B**) Udjeli pojedinih populacija interneurona u ukupnom broju neurona prikazani u obliku točkastog dijagrama gdje svaka točka predstavlja vrijednost za pojedini mozak. Crte povezuju vrijednosti iz istog mozga.

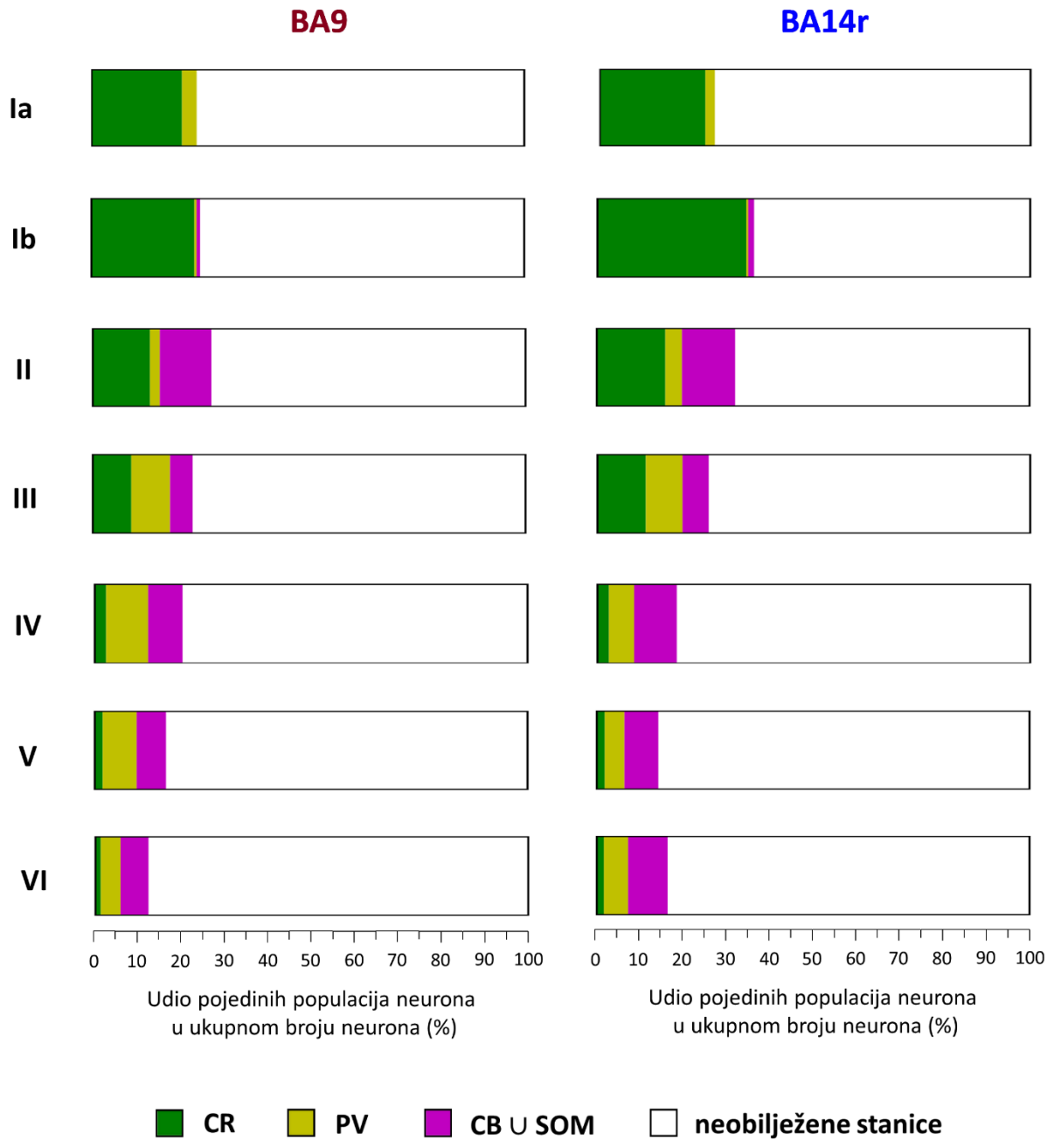


Slika 5.74. Kružni dijagram koji prikazuje udjele triju glavnih populacija interneurona (CR, PV i CB ∪ SOM) u Brodmannovim poljima 9 i 14r te postotak neobilježenih stanica.

Procijenjeni ukupni postotak obilježenih stanica (CR^+, PV^+ i CB^+ ili SOM^+) bio je 22,95 % u BA9, a 25,36 % u BA14r, dok je postotak neobilježenih stanica ($NeuN^+$, ali nereaktivne na ostale biljege) bio 77,04 % u BA9 te 74,64 % u BA14r. Budući da je za sve analizirane populacije interneurona potvrđen GABA-ergički neurotransmiterski fenotip, može se zaključiti da u ljudskom PFC-u inhibicijski interneuroni čine barem 23 – 25 % svih neurona.

Procijenjeni ukupni postotak obilježenih stanica bio je znatno veći u supragranularnim slojevima gdje je 24,42 % neurona u BA9, odnosno 27,96 % neurona u BA14r bilo obilježeno barem jednim od korištenih molekularnih biljega. U infragranularnim slojevima svega je 16,34 % neurona u BA9 te 16,48 % neurona u BA14r bilo obilježeno nekim od korištenih molekularnih biljega.

Općenito, udio obilježenih stanica (tj. udio kortikalnih interneurona) u ukupnom broju neurona postepeno se smanjivao s povećanjem dubine sloja u moždanoj kori (Slika 5.75). Ovo potvrđuje i kvalitativnu opservaciju da u infragranularnim slojevima manji broj stanica izražava *SLC32A1* mRNA.



Slika 5.75. Kompozitni stupčasti dijagram koji prikazuje udjele triju glavnih populacija interneurona (CR, PV i CB ∪ SOM) u Brodmannovim poljima 9 i 14r te postotak neobilježenih stanica po slojevima moždane kore.

6. RASPRAVA

U ovom istraživanju napravljena je detaljna kvantifikacija inhibicijskih kortikalnih interneurona koji eksprimiraju kalretinin, parvalbumin, kalbindin i somatostatin u Brodmannovim poljima 9 i 14r prefrontalne kore čovjeka. Nadalje, utvrđena je razina koekspresije navedenih molekularnih biljega na temelju čega su definirane tri velike nepreklapajuće populacije kortikalnih interneurona. RNAscope *in* situ hibridizacijom potvrđen je GABA-ergički neurotransmiterski fenotip svih analiziranih populacija kortikalnih interneurona. Napravljena je i detaljna morfometrijska analiza tijela kortikalnih interneurona. Konačno, napravljene su usporedbe udjela i morfometrijskih parametara između slojeva te između dvaju analiziranih Brodmannovih polja.

6.1. Kalretininski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka

CR^+ neuroni prosječno su najbrojnija populacija kortikalnih interneurona PFC-a. Također, jedina su populacija kortikalnih interneurona čiji se udio u ukupnoj populaciji neurona značajno razlikuje između ventralnih (BA14r) i dorzalnih (BA9) regija PFC-a.

CR^+ neuroni najbrojnija su populacija interneurona u supragranularnim slojevima i jedina populacija interneurona koja je zastupljena u izuzetno velikom broju u sloju I. U infragranularnim slojevima CR^+ neuroni su pak najmanje brojna populacija interneurona te stoga pokazuju daleko najveće razlike u udjelu između supragranularnih i infragranularnih slojeva. S druge strane, morfologija CR^+ neurona vrlo je slična u svim slojevima moždane kore, što pokazuje i mala varijabilnost u morfometrijskim parametrima (površini tijela, kružnosti i aspektnom omjeru) kroz slojeve.

Raspodjela CR^+ neurona po slojevima u PFC-u čovjeka u skladu je s u literaturi opisanim raspodjelama u primata (111, 114, 123, 137). Proučavanjem referentne literature može se zaključiti da do sada nije rađena detaljnija morfometrijska analiza kalretininskih neurona u primata, ali morfološki opisi CR^+ neurona u čovjeka konzistentni su s morfološkim opisima u rezus majmuna (111).

Vrlo mali broj CR^+ stanica u sloju Ia bio je položen horizontalno i nije bio imunoreaktivan na NeuN – određena istraživanja ukazuju da bi izostanak NeuN imunoreaktivnosti mogla biti karakteristika Cajal-Retziusovih horizontalnih stanica (165), a postoje i istraživanja koja pokazuju i $NeuN^+$ Cajal-Retziusove stanice (166). U ovom istraživanju nađeno je svega

nekoliko $CR^+/NeuN^-$ stanica u sloju Ia na ukupno 50 dvostruko obilježenih histoloških rezova, od čega je samo jedna imala tipičan morfološki oblik Cajal-Retziusove stanice.

Nadalje, ovim istraživanjem pokazano je da u PFC-u čovjeka CR^+ neuroni predstavljaju zasebnu populaciju inhibicijskih kortikalnih interneurona budući da ne eksprimiraju u značajnoj mjeri nijedan od drugih molekularnih biljega kortikalnih interneurona, tj. koekspresija drugih molekularnih biljega je rijetko prisutna i sporadična. Osobito je važno naglasiti da CR^+ neuroni u čovjeka uopće ne koeksprimiraju SOM (ni u jednom analiziranom mozgu imunofluorescencijom nije nađena nijedna dvostruko obilježena CR^+/SOM^+ stanica), s obzirom na to da je stupanj koekspresije CR i SOM u miša izuzetno velik (oko 30 %) (77, 124).

Budući da su živčana vlakna CR^+ neurona bila slabo imunoreaktivna, ciljne stanice ove populacije interneurona bilo je teško odrediti na histološkim rezovima. Unatoč tome, činjenica da je najveća gustoća vlakana bila u slojevima II i III govori u prilog tome da većina CR^+ neurona ima kratke aksone i da ostvaruje sinapse u istom ili susjednim slojevima. To je u skladu s relevantnom literaturom u kojoj se uglavnom opisuje da VIP^+ stanice smještene u supragranularnim slojevima inhibiraju druge skupine kortikalnih interneurona u supragranularnim slojevima (uglavnom SOM^+ neurone) (67, 78, 135). S obzirom na to da je već pokazano da i u primata brojni CR^+ neuroni koeksprimiraju VIP (110, 116), moguće je da i CR^+ neuroni sudjeluju u inhibiciji drugih populacija kortikalnih interneurona u supragranularnim slojevima. Navedeno sugerira da bi jedna od glavnih uloga CR^+ neurona u supragranularnim slojevima mogla biti disinhibicija. Uloga CR^+ neurona u regulaciji drugih interneurona potvrđena je primjerice u hipokampusu štakora (167). U recentnoj literaturi postoje i oprečni nalazi koji sugeriraju da CR^+ neuroni u primarnoj vidnoj kori miša ne pokazuju jasnu disinhibicijsku ulogu, već da njihova *in vivo* aktivacija optogenetikom sumarno dovodi do inhibicije kortikalne aktivnosti (168). Za točno utvrđivanje funkcije CR^+ neurona potrebno je provesti dodatna funkcionalna istraživanja u primata, pogotovo u PFC-u, budući da je moguće da se uloga CR^+ neurona u PFC-u i vidnoj kori razlikuje.

Konačno, iako su preliminarna istraživanja ukazivala da bi mogle postojati ventro-dorzalne razlike u udjelu CR^+ neurona u PFC-u (132, 137), ovim je istraživanjem to i izravno potvrđeno. Naime, u prijašnjim radovima analizirane su zasebno BA9 i BA14 na različitim mozgovima, a podatci su ukazivali da bi udio CR^+ neurona u BA14 mogao biti veći nego u BA9. Ovim istraživanjem taj je nalaz potvrđen na nešto većem uzorku te je razlika statistički

značajna. Nadalje, razlike su dobivene uspoređujući BA9 i BA14r u istim mozgovima i koristeći istu metodologiju, što govori u prilog tome da je razlika u dobivenim udjelima posljedica stvarne razlike u organizaciji kortikalne mreže CR^+ neurona između te dvije regije, a ne posljedica metodoloških razlika u istraživanjima.

Povećanje udjela CR^+ neurona u BA14r posljedica je niza manjih povećanja udjela u svakom sloju moždane kore. U pojedinim slojevima ta povećanja nisu bila statistički značajna, ali je ukupno povećanje udjela u cijeloj moždanoj kori bilo značajno. Ipak, budući da su CR^+ neuroni znatno brojniji u supragranularnim slojevima, upravo supragranularni slojevi proporcionalno najviše doprinose ukupnom povećanju udjela CR^+ u BA14r.

6.2. Parvalbuminski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka

PV^+ neuroni prosječno su gotovo podjednako brojni kao CR^+ neuroni u BA9, ali značajno manje brojni od CR^+ neurona u BA14r. Udio PV^+ neurona ne razlikuje se značajno između regija, ali je ipak prosječno manji u BA14r.

PV^+ neuroni podjednako su brojni u supragranularnim i infragranularnim slojevima, a najbrojniji su u sloju IV gdje čine najveći udio neurona od svih populacija kortikalnih interneurona. Od supragranularnih slojeva, PV^+ neuroni najbrojniji su u sloju III, dok su u sloju I prisutni tek sporadično. Morfologija PV^+ neurona također se ne razlikuje značajno između supragranularnih i infragranularnih slojeva. Dapače, PV^+ neuroni čak i u sloju IV imaju vrlo sličnu veličinu i morfologiju kao i u drugim slojevima, što pokazuju približno jednake vrijednosti morfometrijskih parametara u svim slojevima. To nije slučaj s drugim populacijama interneurona – CR^+, CB^+ i SOM^+ stanice sloja IV iznimno su male i okruglog oblika tijela te svojom površinom tijela i kružnošću/aspektnim omjerom odudaraju od stanica u drugim slojevima. PV^+ neuroni sloja IV su pak gotovo jednako veliki kao i PV^+ neuroni okolnih slojeva, a značajno su veći od svih ostalih populacija interneurona u tom sloju.

Ovim istraživanjem potvrđeno je da PV^+ neuroni u PFC-u čovjeka, kao i CR^+ neuroni, predstavljaju zasebnu populaciju inhibicijskih kortikalnih interneurona te da ne eksprimiraju u značajnoj mjeri nijedan od drugih molekularnih biljega kortikalnih interneurona. Značajna razlika u odnosu na glodavce jest da PV^+ neuroni u čovjeka pokazuju nizak stupanj koekspresije CB, budući da je u frontalnoj kori štakora nađen značajan stupanj koekspresije PV i CB (71, 72). To je u skladu s nalazima u primata poput rezus majmuna gdje je pokazano da PV^+ i CB^+ neuroni predstavljaju pretežito odvojene populacije interneurona (111, 119).

Također, činjenica da u čovjeka PV^+ neuroni ne koeksprimiraju SOM (ni u jednom analiziranom mozgu nije nađena nijedna dvostruko obilježena PV^+/SOM^+ stanica) podudara se s nalazom niske koekspresije PV i CB, budući da je stupanj koekspresije CB i SOM u PFC-u čovjeka visok.

Živčana vlakna PV^+ neurona općenito su bila vrlo imunoreaktivna, a ciljne stanice ove populacije kortikalnih interneurona uglavnom su piramidni neuroni istog ili susjednih slojeva. PV^+ vlakna su oko tijela piramidnih neurona tvorila guste spletove što je karakteristika košarastih stanica. Iako se u literaturi navodi da su i stanice oblika svijećnjaka tipično imunoreaktivne na PV (91), ovu morfološku varijantu stanica nije bilo moguće sa sigurnošću identificirati budući da se korištenim histološkim bojenjima aksoni i inicijalni segmenti piramidnih neurona, s kojima bi stanice oblika svijećnjaka trebale uspostavljati sinapse, ne prikazuju.

Konačno, potrebno je naglasiti da između BA9 i BA14r u čovjeka postoji značajna razlika u omjeru broja CR^+ i PV^+ neurona, iako se udjeli PV^+ neurona između BA9 i BA14r nisu značajno razlikovali. Dok su u BA9 CR^+ neuroni i PV^+ neuroni podjednako zastupljeni s blagom prevagom CR^+ neurona (prosječni omjer CR/PV: 1,15), u BA14r CR^+ neuroni jasno su brojnija populacija (prosječni omjer CR/PV: 1,62). Ta značajna razlika u omjeru CR/PV posljedica je prvenstveno značajnog povećanja udjela CR^+ neurona u BA14r, a manjim dijelom prosječnog (ali ne i značajnog) smanjenja udjela PV^+ neurona u BA14r.

6.3. Kalbindinski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka

CB^+ neuroni prosječno su najmanje zastupljena populacija kortikalnih interneurona i u BA9 i u BA14r. Udio CB^+ neurona ne razlikuje se značajno između regija te pokazuje daleko najmanje varijacije između regija od svih analiziranih populacija interneurona.

CB^+ neuroni druga su najbrojnija populacija interneurona u supragranularnim slojevima, nakon CR^+ neurona. U infragranularnim slojevima CB^+ neuroni su pak iznimno malobrojni, zastupljeni s tek nešto većim udjelom od CR^+ neurona. Kao i CR^+ neuroni, CB^+ neuroni stoga pokazuju značajne razlike u udjelu između supragranularnih i infragranularnih slojeva. Iako raspodjele CB^+ i CR^+ neurona po slojevima pokazuju određene sličnosti, postoje i dvije važne razlike: CB^+ neuroni vrlo rijetko su prisutni u sloju I, a u granularnim i infragranularnim slojevima je udio CB^+ neurona najveći u sloju VI, dok se udio CR^+ neurona u granularnim i infragranularnim slojevima progresivno smanjuje s dubinom sloja (pa je stoga udio CR^+

neurona najmanji u sloju VI). Također, za razliku od CR^+ neurona koji imaju vrlo ujednačenu površinu tijela u svim slojevima, površina tijela CB^+ neurona značajno je manja u infragranularnim nego u supragranularnim slojevima.

U morfologiji CB^+ interneurona posebno su zanimljiva dva specifična morfološka oblika stanica. Prva morfološka skupina su neuroglijaformne stanice koje su na svim analiziranim rezovima imunoreaktivne isključivo na CB. Osim toga, neuroglijaformne stanice nađene su iznimno rijetko, uglavnom kao pojedinačne stanice na svega nekoliko histoloških rezova i to u infragranularnim slojevima moždane kore. Nalaz CB^+ neuroglijaformnih stanica pretežito u infragranularnim slojevima konzistentan je s istraživanjima u primata (111) i s inicijalnim Cajalovim opisima takvih stanica (169, 170), s time da postoje istraživanja koja pokazuju da se neuroglijaformne stanice nalaze i u supragranularnim slojevima gdje vjerojatno izražavaju druge molekularne biljege poput reelina ili neuropeptida Y (92). U ovom istraživanju nisu ni na jednom histološkom rezu u supragranularnim slojevima nađene stanice koje bi se mogle jasno okarakterizirati kao neuroglijaformne. Neovisno o tome, iznimno mala okrugla tijela pojedinih interneurona slojeva I i II mogla bi potencijalno odgovarati somatskoj morfologiji neuroglijaformnih stanica. Daljnja istraživanja svakako su potrebna da bi se utvrdilo je li to slučaj u PFC-u čovjeka.

Druga specifična morfološka skupina CB^+ interneurona su malobrojne velike CB^+ stanice u infragranularnim slojevima s uzlaznim nastavkom koji najvjerojatnije predstavlja akson. Takve stanice opisane su kao sporadično prisutne u rezus majmuna (111), a i u ljudskom PFC-u bile su prisutne tek na nekoliko histoloških rezova. Zanimljivo je da su i sporadični CR^+ neuroni u supragranularnim slojevima pokazivali vrlo sličnu morfologiju te da su na dvostruko obilježenim anti-CB/anti-CR rezovima te velike stanice u infragranularnim slojevima uvijek eksprimirale samo CB, a u supragranularnim samo CR. Ovo govori u prilog tome da mogu postojati vrlo slične morfološke varijante interneurona s različitim molekularnim karakteristikama.

Budući da je i nemali broj piramidnih (ekscitacijskih) neurona u supragranularnim slojevima imunoreaktivan na CB, kvantifikacija CB^+ kortikalnih interneurona metodološki je zahtjevnija od kvantifikacije CR^+ i PV^+ interneurona. Naime, kod anti-CR i anti-PV bojenja, gotovo svaka imunoreaktivna stanica ujedno je i interneuron, dok je kod anti-CB bojenja potrebno isključiti dio imunoreaktivnih stanica. Iako je i kvalitativnom analizom moguće relativno jasno razlikovati inhibicijske CB^+ interneurone od ekscitacijskih CB^+ piramidnih neurona na

temelju izgleda stanica, kako bi kvantitativna analiza CB^+ interneurona bila što točnija, izdvojeni su ključni parametri koji razlikuju ove dvije skupine CB^+ neurona. Osnovne razlike između CB^+ inhibicijskih interneurona i CB^+ ekscitacijskih piramidnih neurona su sljedeće: veličina stanica (interneuroni su promjera manjeg od 20 μm), oblik tijela stanice (interneuroni imaju stanična tijela kuglastog oblika, dok piramidni neuroni imaju tipičan piramidni oblik tijela) te stupanj imunoreaktivnosti, tj. intenzitet fluorescentnog signala na konfokalnoj snimci (interneuroni imaju u prosjeku znatno veći intenzitet signala/jaču imunoreaktivnost od piramidnih neurona). Na temelju parametara veličine i intenziteta signala moguće je računalnim algoritmom jednostavno iz analize isključiti stanice promjera većeg od 20 μm i intenziteta signala manjeg od intenziteta tipičnog interneurona. Na konfokalnim snimkama može se pomoću histograma namjestiti koji raspon intenziteta signala će se prikazivati, a u analizi se pomoću praga intenziteta signala određuje granica između onoga što algoritam analizira kao pozadinu i onoga što analizira kao stanicu. Na kraju, potrebno je dodatno provjeriti oblik stanice i isključiti malobrojne piramidne stanice čiji je intenzitet blizak intenzitetu okolnih interneurona. Nalaz piramidnih neurona slabo imunoreaktivnih na CB u supragranularnim slojevima konzistentan je s opisom anti-CB bojenja u rezus majmuna (111).

Za razliku od CR^+ i PV^+ neurona koji predstavljaju nepreklapajuće populacije kortikalnih interneurona, CB^+ neuroni pokazuju visok stupanj koekspresije SOM i to dominantno u supragranularnim slojevima. Unatoč tome, u ljudskom PFC-u nije moguće smatrati CB^+ neurone isključivo subpopulacijom SOM^+ neurona kako se uobičajeno tumači (123), budući da je u infragranularnim slojevima stupanj koekspresije SOM vrlo nizak. Također, i u sloju II postoji određen broj CB^+ neurona koji ne koeksprimiraju SOM. Navedeno govori u prilog tome da su CB^+ i SOM^+ neuroni preklapajuće populacije kortikalnih interneurona, ali nijedna od tih dviju populacija zasebno ne obilježava sve interneurone koji nisu imunoreaktivni na CR ili PV.

Živčana vlakna CB^+ neurona općenito su bila slabo imunoreaktivna u odnosu na PV^+ i SOM^+ vlakna, slično kao što je pokazano u rezus majmuna (111), pa je ciljne stanice ove populacije interneurona bilo teško odrediti na histološkim rezovima. Budući da je u supragranularnim slojevima koekspresija CB i SOM izuzetno visoka, može se neizravno zaključiti da vjerojatno značajan dio CB^+ neurona supragranularnih slojeva ima iste ciljne stanice kao i SOM^+ neuroni. Prema raspodjeli živčanih vlakana SOM^+ neurona, vjerojatno je barem dijelom riječ o Martinottijevim stanicama koje inhibiraju završna razgranjenja apikalnih dendrita piramidnih neurona.

6.4. Somatostatinski neuroni u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka

SOM^+ neuroni treća su po brojnosti populacija kortikalnih interneurona u BA9, a druga najbrojnija u BA14r. Udio SOM^+ neurona prosječno je veći u BA14r (u četiri od pet analiziranih mozgova), ali razlika ipak nije statistički značajna.

Slično kao i PV^+ neuroni, SOM^+ neuroni podjednako su brojni u supragranularnim i infragranularnim slojevima, a najbrojniji su u sloju IV gdje su drugi po udjelu od svih populacija kortikalnih interneurona. U supragranularnim slojevima SOM^+ neuroni su svega nešto manje brojni od CB^+ neurona, a prosječno podjednako brojni kao PV^+ neuroni. Ipak, dok su PV^+ neuroni u supragranularnim slojevima brojniji u sloju III, SOM^+ neuroni tipično su brojniji u sloju II. U infragranularnim slojevima SOM^+ neuroni podjednako su brojni kao PV^+ neuroni, a značajno brojniji od CR^+ i CB^+ neurona. Dok se udjeli CR^+ neurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva značajno razlikuju, a morfometrijski parametri se vrlo malo razlikuju između slojeva, kod SOM^+ neurona je obrnuto pa se udjeli između supragranularnih i infragranularnih slojeva vrlo malo razlikuju, a morfometrijski parametri se značajno razlikuju. Također, za razliku od CB^+ neurona čija je površina manja u infragranularnim slojevima, a veća u supragranularnim, za SOM^+ neurone vrijedi upravo obrnuto. Nadalje, prosječna površina SOM^+ i CB^+ neurona u supragranularnim slojevima razlikuje se manje nego u infragranularnim slojevima gdje je razlika između površina ovih dviju populacija interneurona znatno veća.

Vrlo karakterističnu morfološku skupinu SOM^+ neurona predstavljaju velike vretenaste i polimorfne stanice koje su vrlo brojne u infragranularnim slojevima, a rijetko su prisutne u supragranularnim slojevima. Ove velike SOM^+ stanice čine progresivno sve veći udio SOM^+ neurona kako se povećava dubina sloja, dok su u bijeloj tvari gotovo sve SOM^+ stanice tog morfološkog oblika. Iako PV^+ neuroni prosječno imaju nešto veću površinu tijela od SOM^+ neurona, same velike SOM^+ stanice značajno su veće i od PV^+ neurona te su veličinom tijela vrlo slične okolnim modificiranim (vretenastim) piramidnim stanicama i piramidnim stanicama srednje veličine. Osim svojom veličinom, velike vretenaste SOM^+ stanice odlikuju se izuzetnom izduženošću tijela, puno većom od bilo koje druge skupine interneurona, a usporedivom s izduženošću tijela modificiranih (vretenastih) piramidnih stanica slojeva V i VI.

Također, analizom morfologije SOM^+ neurona definirane su još tri dodatne morfološke skupine SOM^+ neurona: male okrugle stanice karakteristične za supragranularne slojeve,

iznimno male okrugle stanice karakteristične za sloj IV te srednje velike jajolike stanice koje se pojavljuju u svim slojevima moždane kore (osim sloja I).

Zanimljivo je da je do sada u literaturi ova raznovrsna morfologija SOM^+ neurona vrlo slabo opisana te većina istraživanja razlikuje samo Martinottijeve i ne-Martinottijeve stanice, od kojih su jedino Martinottijeve stanice relativno jednoznačno definirane svojim uzlaznim aksonom koji ostvaruje sinapse u sloju I s apikalnim dendritima piramidnih neurona, a smatra se da su smještene u slojevima II – VI. Ne-Martinottijeve stanice definirane su jedino kao stanice koje ne tvore aksonski splet u sloju I te se smatra da su smještene isključivo u slojevima IV i V, pri čemu ne-Martinottijeve stanice sloja IV tvore aksonski splet oko PV^+ neurona u sloju IV, a ne-Martinottijeve stanice sloja V tvore aksonski splet oko neurona u slojevima IV i V. Dendritička stabla Martinottijevih i ne-Martinottijevih stanica uglavnom se opisuju kao multipolarna ili stabla s dva čuperka (78). Ako se navedeni opis korelira s morfologijom SOM^+ neurona u ljudskom PFC-u, može se zaključiti da su srednje velike jajolike stanice koje se nalaze u slojevima II – VI najvjerojatnije Martinottijeve stanice s uzlaznim aksonom. Ostale morfološke oblike znatno je teže svrstati u postojeću morfološku klasifikaciju, budući da je na histološkim rezovima obojenim imunofluorescencijom teško utvrditi točan položaj i tok aksona SOM^+ neurona.

Osim velike morfološke raznolikosti između supragranularnih i infragranularnih slojeva, SOM^+ neuroni u PFC-u čovjeka pokazuju i veliku molekularnu raznolikost. U supragranularnim slojevima gotovo svi SOM^+ neuroni koeksprimiraju CB, dok je stupanj koekspresije CB u infragranularnim slojevima vrlo nizak. Obrnuto vrijedi za koekspresiju nNOS, enzim koji predstavlja jedan od dodatnih molekularnih biljega kortikalnih interneurona. Stupanj koekspresije SOM i nNOS visok je u infragranularnim slojevima i bijeloj tvari, a relativno nizak u supragranularnim slojevima. Zanimljivo je da se u glodavaca $nNOS^+$ neuroni obično smatraju subpopulacijom SOM^+ neurona (67, 78), slično kao što se CB^+ neuroni nerijetko smatraju subpopulacijom SOM^+ neurona (123). Kvalitativna analiza dvostruko obilježenih anti-nNOS/anti-SOM i anti-CB/anti-SOM rezova u PFC-u čovjeka ukazuje da postoje i $nNOS^+$ i CB^+ neuroni koji ne koeksprimiraju SOM. Ovim istraživanjem već je utvrđeno da CB^+/SOM^- neuroni nisu obuhvaćeni drugim molekularnim biljezima (CR i PV), dok je za $nNOS^+/SOM^-$ neurone to tek potrebno dokazati dodatnim istraživanjima. Važno je naglasiti da SOM^+ neuroni ne pokazuju koekspresiju ni CR ni PV, a na razini mRNA ne pokazuju ni značajnu koekspresiju *VIP*.

Posebno su zanimljivi SOM^+ neuroni u bijeloj tvari. Osim što su morfološki vrlo upečatljivi s velikim izduženim (štapićastim) ili polimorfnim tijelima, njihov broj je relativno velik, a gotovo svi u većoj ili manjoj mjeri koeksprimiraju biljeg MAP2 karakterističan za određene vrste projekcijskih neurona. Također, eksprimiraju i nNOS te sve GABA-ergičke biljege (VGAT, GAD1 i GAD2) što ukazuje da je vjerojatno riječ o projekcijskim GABA-ergičkim neuronima.

Postoje naznake da se i metabolička aktivnost SOM^+ neurona razlikuje između supragranularnih i infragranularnih slojeva, budući da je ekspresija *SST* mRNA u supragranularnim slojevima visoka, a imunoreaktivnost na SOM peptid niska, dok obrnuto vrijedi u infragranularnim slojevima. Ovo ukazuje da bi SOM^+ neuroni u supragranularnim slojevima mogli imati veći obrtaj SOM (produciraju više mRNA i brže izmjenjuju peptid) nego u infragranularnim slojevima (produciraju manje mRNA i dulje zadržavaju peptid u stanici).

Kvantifikacija SOM^+ neurona općenito je bila zahtjevna u supragranularnim slojevima s obzirom na nizak stupanj imunoreaktivnosti. Za konzistentnu kvantifikaciju i donošenje ispravne odluke o tome što označiti kao imunoreaktivnu stanicu ključni su bili dvostruko obilježeni rezovi (anti-NeuN/anti-SOM, anti-CB/anti-SOM i *SST*/anti-SOM) na kojima je značajno jednostavnije razlučiti imunoreaktivnost u području tijela stanice.

Živčana vlakna SOM^+ neurona općenito su bila jako imunoreaktivna, slično kao i PV^+ vlakna. Ipak, dok su vlakna PV^+ neurona bila jednolično obojena, anti-SOM bojenje je punktiformno pa se živčana vlakna prikazuju kao isprekidana i nije im jednostavno odrediti odredište. Uzimajući u obzir visoku gustoću vlakana u sloju I može se zaključiti da velik broj SOM^+ stanica u PFC-u čovjeka pripada skupini Martinottijevih stanica s uzlaznim aksonima koji inerviraju apikalne dendrite piramidnih neurona.

6.5. Laminarna i regionalna organizacija kortikalnih interneurona u prefrontalnoj moždanoj kori čovjeka

Organizacija GABA-ergičke mreže u PFC-u čovjeka razlikuje se između slojeva i između regija. Općenito, laminarne razlike više su izražene od regionalnih razlika budući da se udio pojedinih populacija interneurona (prvenstveno CR^+ neurona) više razlikuje između slojeva nego što se razlikuje između regija.

Laminarne razlike u organizaciji kortikalnih interneurona očituju se na dvije razine. Prva razina su razlike između supragranularnih i infragranularnih slojeva, a značajna razlika u omjerima različitih populacija interneurona između supragranularnih i infragranularnih slojeva prvenstveno je posljedica laminarne raspodjele CR^+ neurona. U supragranularnim slojevima tako dominiraju CR^+ i CB^+/SOM^+ neuroni, a u infragranularnim PV^+ i CB^-/SOM^+ neuroni. Druga razina su razlike unutar supragranularnih slojeva – svaki supragranularni sloj ima jedinstven omjer različitih populacija interneurona, a postoje i suptilne razlike između podslojeva Ia i Ib. Ovo ne vrijedi za infragranularne slojeve, budući da slojevi V i VI imaju vrlo slične omjere različitih populacija interneurona. Zanimljivo je istaknuti da je sloj IV po omjerima populacija interneurona vrlo sličan infragranularnim slojevima, a znatno različit od supragranularnih slojeva. Moguće je da su različiti omjeri različitih populacija interneurona u pojedinim slojevima moždane kore odraz različitih veza i funkcionalnih svojstava tih slojeva. U hipokampusu je, primjerice, utvrđeno da interneuroni, koji šalju aksone u iste slojeve, dobivaju slične ulazne sinapičke signale (171).

Iako su regionalne razlike bile manje izražene u odnosu na laminarne razlike, i dalje su bile jasne. Već je naglašeno da ključnu razliku u organizaciji kortikalnih interneurona između BA9 i BA14r predstavlja značajno veći udio CR^+ neurona i posljedično značajno veći omjer CR/PV. Ove razlike između regija mogle bi biti posljedica funkcionalnih razlika između BA9 i BA14r. Moguće je da je za ispravnu funkcionalnu povezanost BA14r važnija disinhibicija što bi objasnilo veći udio CR^+ neurona u toj regiji. S druge strane, za BA9 važnija bi mogla biti inhibicija tijela i aksonskih inicijalnih segmenata piramidnih neurona što bi objasnilo broj PV^+ neurona sličan broju CR^+ neurona u toj regiji. U svakom slučaju, daljnja funkcionalna istraživanja nužna su da bi se razjasnila točna podloga razlika u udjelima upravo CR^+ neurona između BA9 i BA14r.

Neovisno o regiji i slojevima moždane kore, korištenim molekularnim biljezima (CR, PV, CB i SOM) moguće je definirati tri nepreklapajuće populacije inhibicijskih kortikalnih

interneurona: CR^+, PV^+ i CB ∪ SOM (interneuroni koji eksprimiraju CB i/ili SOM). Navedenim biljezima može se prikazati otprilike četvrtina svih neurona u PFC-u čovjeka. Budući da je brojnim istraživanjima pokazano da je udio GABA-ergičkih neurona u frontalnoj moždanoj kori između 20 i 30 % (49, 51, 114), vjerojatno je da ova četiri molekularna biljega prikazuju veliku većinu inhibicijskih kortikalnih interneurona u PFC-u. Valja napomenuti da u slojevima I i II korišteni molekularni biljezi obilježavaju gotovo jednu trećinu svih neurona što znači da je omjer inhibicijskih i ekscitacijskih neurona u tim slojevima vjerojatno barem 1:2. Potencijalni molekularni biljezi kojima bi se mogao prikazati veći broj GABA-ergičkih neurona u moždanoj kori su: VIP, reelin i 5-HT3a-R. Također, moguće je da bi se dodatni manji broj GABA-ergičkih neurona mogao prikazati i biljezima poput neuropeptida Y ili nNOS.

6.6. Ekspresija GABA-ergičkih molekularnih biljega u kortikalnim interneuronima

Proteinski produkt gena *SLC17A7* jest VGLUT1, vezikularni transporter glutamata koji se nalazi pretežito u živčanim završetcima u sinaptičkim mjehurićima (172–174). VGLUT1 visoko je specifičan za kortikalne ekscitacijske neurone pa je njegova detekcija zlatni standard za identifikaciju glutamatergičkih neurona (175). Osim VGLUT1, postoje barem još dva glutamatna vezikularna transportera – VGLUT2 kojeg kodira gen *SLC17A6* i koji je eksprimiran pretežito u subkortikalnim strukturama (176, 177) te VGLUT3 kojeg kodira gen *SLC17A8* i koji je eksprimiran u raznim vrstama stanica, uključujući i živčanim stanicama tankog i debelog crijeva (178, 179). Proteinski produkt *SLC32A1* gena je VGAT, vezikularni GABA transporter koji se nalazi na staničnoj membrani u živčanim završetcima i služi ponovnom unosu GABA-e iz sinaptičke pukotine pa je stoga karakterističan za inhibicijske (GABA-ergičke) neurone (180, 181). Budući da se ni VGLUT1 ni VGAT ne nalaze u velikoj količini u području tijela stanice koja ih eksprimira (182), imunohistokemijom je zahtjevno utvrditi eksprimiraju li pojedine populacije interneurona ove biljege. S druge strane, *SLC17A7* i *SLC32A1* mRNA eksprimirana je u području tijela stanica pa se koekspresija s drugim molekularnim biljezima kortikalnih interneurona može lako odrediti koristeći RNAscope *in situ* hibridizaciju. Kvalitativnom analizom trostruko obilježenih histoloških rezova, u kojima su probe za *SLC17A7* i *SLC32A1* mRNA kombinirane s protutijelima za svaku pojedinu populaciju kortikalnih interneurona (CR, PV, CB i SOM), utvrđeno je da svi analizirani kortikalni interneuroni jasno eksprimiraju *SLC32A1* mRNA te da ne pokazuju ekspresiju

SLC17A7 mRNA. Ovaj nalaz pokazuje da odabrani molekularni biljezi ne obilježavaju ekscitacijske interneurone, kao što su trnaste zvjezdaste stanice, već samo inhibicijske interneurone.

Proteinski produkt *GAD1* gena, enzim GAD67, citoplazmatski je protein smješten poglavito u području staničnog tijela te sintetizira GABA-u za raznolike metaboličke uloge (trofički čimbenik za sinaptogenezu u ranim stadijima razvoja, zaštita nakon neuronalnih ozljeda, izvor energija putem GABA šanta, regulacija redukcijsko-oksidacijskog potencijala u oksidativnom stresu), dok je proteinski produkt *GAD2* gena, enzim GAD65, membranski protein smješten gotovo isključivo u živčanim završetcima gdje prvenstveno sintentizira GABA-u u svrhu neurotransmisije (183–188). Stoga je imunohistokemijskim metodama zahtjevno potvrditi koekspresiju ova dva proteina u istim stanicama, a pogotovo u pojedinim populacijama interneurona (189), slično kao što je to slučaj za VGAT i VGLUT1. Činjenica da su obje mRNA dominantno eksprimirane u području staničnog tijela, kao i većina molekularnih biljega kortikalnih interneurona, značajno olakšava utvrđivanje koekspresije *GAD1* i *GAD2* u istoj stanici. Kvalitativnom analizom trostruko obilježenih histoloških rezova, u kojima su probe za *GAD1* i *GAD2* mRNA kombinirane s protutijelima za svaku pojedinu populaciju kortikalnih interneurona (CR, PV, CB i SOM), utvrđeno je da gotovo svi kortikalni interneuroni jasno eksprimiraju i *GAD1* i *GAD2* mRNA.

U gotovo svim kortikalnim interneuronima *GAD1* mRNA bila je jače eksprimirana od *GAD2* mRNA. Na histološkim rezovima obrađenim RNAscope *in situ* hibridizacijom ova razlika u ekspresiji vidljiva je u broju kopija detektirane mRNA. Naime, RNAscope *in situ* hibridizacija daje točkasti (punktiformni) signal gdje jedna izolirana točka predstavlja pojedinačnu kopiju mRNA (190). Pojednostavljeno, veća količina signala (veći broj točaka, *puncta*) odgovara većem broju kopija detektirane mRNA, a u većini analiziranih kortikalnih interneurona detektirano je više kopija *GAD1* nego *GAD2* mRNA.

Prethodna istraživanja pokazala su da je u moždanoj kori štakora ekspresija *GAD1* mRNA tipično jača od ekspresije *GAD2*, s time da je unatoč ovim razlikama velika većina GABA-ergičkih neurona eksprimirala obje vrste mRNA (189, 191, 192).

S druge strane, postoje naznake da bi u primata dio GABA-ergičkih stanica mogao eksprimirati samo *GAD1*, ali ne i *GAD2*, kao što je to slučaj u vidnoj moždanoj kori makaka majmuna (*Macaca nemestrina*) (193) te u BA46 PFC-a rezus majmuna (110). Budući da je u ovom istraživanju rađena samo kvalitativna analiza ekspresije mRNA, nije moguće sa

sigurnošću utvrditi postoji li u PFC-u čovjeka populacija GABA-ergičkih stanica koja eksprimira samo *GAD1* mRNA. Ipak, ni u jednoj od GABA-ergičkih stanica koje su snimljene u visokoj rezoluciji na velikom povećanju (100x) nije nađena ekspresija samo *GAD1* mRNA, već je u tim stanicama uvijek bila koeksprimirana i *GAD2* mRNA, ali uglavnom u manjem broju kopija. Razlike između histološkog nalaza u ovom istraživanju i istraživanja u makaka majmuna potencijalno su posljedica nekog od sljedećih čimbenika: razlika između vrsta (čovjek i makaka majmun) u ekspresiji *GAD1* i *GAD2* mRNA, razlika između kortikalnih regija u ekspresiji mRNA te razlika u metodologiji.

6.7. Značaj GABA-ergičke kortikalne mreže u neuropatološkim stanjima

Brojna istraživanja u posljednjih nekoliko desetljeća sugeriraju da u različitim neuropatološkim, neuropsihijatrijskim i neurodivergentnim stanjima dolazi do značajnih promjena u ustroju GABA-ergičke mreže u moždanoj kori. GABA-ergički mehanizmi često se opisuju kao moguća podloga u patogenezi shizofrenije (42–44, 126, 128, 129, 183, 90, 194–197), a poznato je i da su poremećaji GABA-ergičke inhibicije u podlozi određenih vrsta epilepsije (198–201). Promjene GABA-ergičke transmisije mogu se očitovati i kao kognitivne smetnje u poremećajima poput depresije (202), a ispravno i uravnoteženo funkcioniranje GABA-ergičke i glutamatergičke transmisije važno je i za ciklus spavanja (203).

Iz navedenog je vidljivo da je razumijevanje ustroja GABA-ergičke mreže u moždanoj kori iznimno važno za razumijevanje mehanizama raznih klinički relevantnih stanja. Posebno korisno može biti jasno definiranje pojedinih populacija kortikalnih interneurona, budući da mnoga istraživanja ukazuju na manje ili više selektivne promjene u samo određenim dijelovima GABA-ergičke mreže. Ovo istraživanje daje detaljan opis GABA-ergičkih neurona u prefrontalnoj kori mozga čovjeka što predstavlja podlogu za daljnja postmortalna istraživanja na patološkom materijalu, ali i za potencijalna klinička i funkcionalna istraživanja.

7. ZAKLJUČAK

Ovim istraživanjem potvrđena je hipoteza da u čovjeka postoje ventro-dorzalne razlike u udjelu različitih populacija GABA-ergičkih neurona unutar frontalne kore velikoga mozga.

U ovom istraživanju utvrđeni su udjeli glavnih populacija GABA-ergičkih interneurona (kalretininskih, parvalbuminskih, kalbindinskih i somatostatinskih) u Brodmannovim poljima 9 i 14r na temelju čega je zaključeno sljedeće:

1. Većina inhibicijskih kortikalnih interneurona može se okarakterizirati s četiri molekularna biljega: kalretininom, parvalbuminom, kalbindinom i somatostatinom.
2. Kalretininski neuroni najbrojnija su populacija kortikalnih interneurona i čine prosječno 8,21 % svih neurona u Brodmannovom polju 9 te 10,24 % svih neurona u Brodmannovom polju 14r.
3. Parvalbuminski neuroni druga su najbrojnija populacija kortikalnih interneurona u Brodmannovom polju 9 gdje čine prosječno 7,14 % svih neurona, a treća najbrojnija populacija u Brodmannovom polju 14r gdje čine prosječno 6,33 % svih neurona.
4. Kalbindinski neuroni najmanje su brojna populacija kortikalnih interneurona i čine prosječno 4,73 % svih neurona u Brodmannovom polju 9 te 5,37 % svih neurona u Brodmannovom polju 14r.
5. Somatostatinski neuroni treća su najbrojnija populacija kortikalnih interneurona u Brodmannovom polju 9 gdje čine prosječno 6,33 % svih neurona, a druga najbrojnija populacija u Brodmannovom polju 14r gdje čine prosječno 7,28 % svih neurona.
6. Populacija kortikalnih interneurona koja izražava kalbindin i/ili somatostatin čini prosječno 7,60% svih neurona u Brodmannovom polju 9 te 8,79 % svih neurona u Brodmannovom polju 14r, što znači je u oba kortikalna polja brojnija od parvalbuminske populacija, ali manje brojna od kalretininske populacije kortikalnih interneurona.
7. Udio kalretininskih neurona u ukupnom broju neurona značajno je veći u Brodmannovom polju 14r nego u Brodmannovom polju 9.
8. Razlike u udjelima parvalbuminskih, kalbindinskih i somatostatinskih neurona između Brodmannovih polja 9 i 14r nisu statistički značajne.

U ovom istraživanju utvrđena su morfometrijska obilježja i raspodjela glavnih populacija GABA-ergičkih interneurona po slojevima, na temelju čega je zaključeno sljedeće:

1. Između Brodmannovih polja 9 i 14r nema značajnih razlika u raspodjeli pojedinih populacija kortikalnih interneurona po slojevima.
2. Između Brodmannovih polja 9 i 14r nema značajnih razlika u morfometrijskim obilježjima kortikalnih interneurona.
3. Međusobni omjeri pojedinih populacija kortikalnih interneurona značajno se razlikuju između supragranularnih i infragranularnih slojeva prefrontalne kore čovjeka.
4. Međusobni omjeri pojedinih populacija kortikalnih interneurona značajno se razlikuju unutar supragranularnih slojeva, ali ne i unutar infragranularnih slojeva prefrontalne kore čovjeka.
5. Omjer broja kalretininskih i parvalbuminskih neurona značajno je veći u Brodmannovom polju 14r nego u Brodmannovom polju 9 zbog značajnog povećanja udjela kalretininskih neurona u Brodmannovom polju 14r i prosječnog smanjenja udjela parvalbuminskih neurona u tom polju.
6. Razlike u udjelima pojedinih populacija kortikalnih interneurona između slojeva veće su od razlika između Brodmannovih polja prefrontalne kore čovjeka.
7. Kalretininski neuroni glavna su populacija kortikalnih neurona u supragranularnim, a somatostatinski u infragranularnim slojevima prefrontalne kore čovjeka.
8. Kalretininski i kalbindinski neuroni značajno su brojniji u supragranularnim nego u infragranularnim slojevima.
9. Parvalbuminski i somatostatinski neuroni podjednako su brojni u supragranularnim i infragranularnim slojevima, a najbrojniji su u granularnom sloju.
10. Morfološka i molekularna obilježja somatostatinskih neurona značajno se razlikuju između supragranularnih i infragranularnih slojeva prefrontalne kore čovjeka.
11. Somatostatinski neuroni pokazuju najveću morfološku i molekularnu raznolikost od svih analiziranih populacija kortikalnih interneurona.

Ovim istraživanjem utvrđena je i koekspresija kalretinina, parvalbumina, kalbindina i somatostatina u Brodmannovim poljima 9 i 14r, na temelju čega je zaključeno sljedeće:

1. Četiri molekularna biljega (kalretinin, parvalbumin, kalbindin i somatostatin) definiraju tri gotovo potpuno odvojene populacije inhibicijskih kortikalnih interneurona: interneuroni koji eksprimiraju kalretinin, interneuroni koji eksprimiraju parvalbumin i interneuroni koji eksprimiraju kalbindin i/ili somatostatin.
2. Populacija inhibicijskih kortikalnih interneurona koja eksprimira kalbindin i/ili somatostatin sastoji se od barem tri subpopulacije: interneurona koji eksprimiraju samo kalbindin, interneurona koji eksprimiraju samo somatostatin i interneurona koji eksprimiraju i kalbindin i somatostatin.
3. Stupanj koekspresije kalbindina i somatostatina visok je u supragranularnim slojevima prefrontalne kore čovjeka, a izuzetno nizak u infragranularnim slojevima.
4. Somatostatinski neuroni u prefrontalnoj kori čovjeka ne koeksprimiraju kalretinin i vazoaktivni intestinalni polipeptid.
5. Somatostatinski neuroni u bijeloj tvari i infragranularnim slojevima prefrontalne kore čovjeka koeksprimiraju neuronalnu sintazu dušikovog oksida.
6. Somatostatinski neuroni u bijeloj tvari koeksprimiraju protein povezan s mikrotubulima 2 koji je biljeg neurona s udaljenim projekcijama.
7. Stupanj koekspresije parvalbumina i kalbindina u prefrontalnoj kori čovjeka općenito je nizak.
8. Koekspresija kalretinina i parvalbumina u prefrontalnoj kori čovjeka tek je sporadično prisutna.
9. Koekspresija kalretinina i kalbindina u prefrontalnoj kori čovjeka tek je sporadično prisutna.

Konačno, ovim istraživanjem utvrđen je i neurotransmiterski fenotip u glavnim populacijama interneurona, na temelju čega je zaključeno sljedeće:

1. Svi kalretininski, parvalbuminski, kalbindinski i somatostatinski interneuroni su inhibicijski i eksprimiraju GABA-ergički molekularni biljeg VGAT, a ne eksprimiraju glutamatergički molekularni biljeg VGLUT1.
2. Kalretininski, parvalbuminski, kalbindinski i somatostatinski interneuroni izražavaju i GABA-ergičke biljege GAD65 i GAD67.

8. SAŽETAK

GABA-ergički kortikalni interneuroni raznovrsna su skupina neurona lokalnih neuronskih krugova, a poznavanje njihovih molekularnih obilježja preduvjet je za razumijevanje složenih kognitivnih funkcija i poremećaja koji se njima povezuju. Cilj ovoga istraživanja jest usporediti svojstva kalretininskih, parvalbuminskih, kalbindinskih i somatostatinskih interneurona između ventralnih (Brodmannovo polje 14r) i dorzalnih (Brodmannovo polje 9) dijelova prefrontalne moždane kore čovjeka. Koristeći imunofluroescenciju s dvostrukim obilježavanjem utvrđeni su udjeli pojedinih populacija interneurona u ukupnom broju neurona te omjeri broja pojedinih populacija interneurona. RNAscope *in situ* hibridizacijom utvrđen je neurotransmiterski fenotip pojedinih populacija interneurona. Ovim istraživanjem pokazano je da se međusobni omjeri pojedinih populacija interneurona značajno razlikuju između supragranularnih i infragranularnih slojeva, kao i unutar pojedinih supragranularnih slojeva prefrontalne kore. Najbrojnija populacija su kalretininski neuroni čiji je udio u ukupnom broju neurona značajno veći u Brodmannovom polju 14r (prosječno 10,24 %) nego u Brodmannovom polju 9 (prosječno 8,21 %). Također, omjer kalretininskih i parvalbuminskih neurona značajno je veći u Brodmannovom polju 14r (prosječno 1,62) nego u Brodmannovom polju 9 (prosječno 1,15). Konačno, potvrđeno je da sve analizirane populacije interneurona izražavaju GABA-ergičke molekularne biljege: vezikularni GABA transporter te glutamat dekarboksilazu 65 i 67. Na temelju rezultata ovoga istraživanja može se zaključiti da postoje značajne ventro-dorzalne razlike u udjelima pojedinih populacija interneurona u prefrontalnoj kori čovjeka koje su najvećim dijelom posljedica povećanja udjela kalretininskih neurona u ventralnim dijelovima prefrontalne kore.

9. SUMMARY

Molecular characteristics of supragranular layer interneurons in the human frontal cortex

Ivan Banovac, MD

GABAergic cortical interneurons are a diverse group of local circuit neurons. Understanding their molecular characteristics is a prerequisite for the comprehension of higher cognitive functions and related disorders. The aim of this research is to compare the characteristics of calretinin, parvalbumin, calbindin, and somatostatin interneurons between ventral (Brodmann area 14r) and dorsal (Brodmann area 9) regions of the human prefrontal cortex. Double labelling immunofluorescence was used to determine the proportion of each interneuron population within the total neuron population as well as the relative ratios of individual interneuron populations. The neurotransmitter phenotype of each interneuron population was determined using RNA scope *in situ* hybridization. This research revealed that the ratios of different interneuron populations differed significantly between supragranular and infragranular cortical layers as well as within individual supragranular layers. Calretinin neurons were the most numerous, with a significantly higher total proportion in Brodmann area 14r (average: 10.24%) than in Brodmann area 9 (average: 8.21%). Furthermore, the ratio between calretinin and parvalbumin neurons was significantly higher in Brodmann area 14r (average: 1.62) than in Brodmann area 9 (average: 1.15). Finally, all analyzed interneuron populations were confirmed to express GABAergic molecular markers: vesicular GABA transporter and glutamate decarboxylase 65 and 67. In conclusion, there are significant ventro-dorsal differences in the proportions of certain interneuron populations in the human prefrontal cortex, which are predominantly the result of a significant increase of calretinin neurons in the ventral prefrontal cortex.

10. POPIS LITERATURE

1. Uylings HB, van Eden CG. Qualitative and quantitative comparison of the prefrontal cortex in rat and in primates, including humans. Prog Brain Res 1990; 85:31–62.

2. Fuster JM. The prefrontal cortex. 5. izd. Amsterdam: Academic Press; 2015.

3. Barbas H. General cortical and special prefrontal connections: principles from structure to function. Annu Rev Neurosci 2015; 38:269–89.

4. Teffer K, Semendeferi K. Human prefrontal cortex: evolution, development, and pathology. Prog Brain Res 2012; 195:191–218.

5. Uylings HBM, Groenewegen HJ, Kolb B. Do rats have a prefrontal cortex? Behav Brain Res 2003; 146(1-2):3–17.

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

7. Striedter GF. Principles of brain evolution. Sunderland, Mass., Great Britain: Sinauer Associates; 2005.

8. Murray EA, Graham KS, Wise SP. The Evolution of memory systems: Ancestors, anatomy, and adaptations. Oxford, United Kingdom, New York, NY: Oxford University Press; 2017.

9. Ongür D, Ferry AT, Price JL. Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. J Comp Neurol 2003; 460(3):425–49.

10. Ongür D, Price JL. The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. Cereb Cortex 2000; 10(3):206–19.

11. Mai JK, Majtanik M, Paxinos G. Atlas of the human brain. 4. izd. Amsterdam: Academic Press; 2015.

12. Gray H, Lewis WH. Anatomy of the Human Body. 20. izd. Philadelphia: Lea & Febiger; 1918.

13. Standring S, Gray H. Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 41. izd. Oxford: Elsevier; 2016.

14. Stevens FL, Hurley RA, Taber KH. Anterior cingulate cortex: unique role in cognition and emotion. J Neuropsychiatry Clin Neurosci 2011; 23(2):121–5.

15. Lavin C, Melis C, Mikulan E, Gelormini C, Huepe D, Ibañez A. The anterior cingulate cortex: an integrative hub for human socially-driven interactions. Front Neurosci 2013; 7:64.

16. Brockett AT, Tennyson SS, deBettencourt CA, Gaye F, Roesch MR. Anterior cingulate cortex is necessary for adaptation of action plans. Proc Natl Acad Sci U S A 2020; 117(11):6196–204.

17. Banovac I, Sedmak D, Džaja D, Jalšovec D, Jovanov Milošević N, Rašin MR i sur. 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 2019; 235(3):651–69.

18. Garrison JR, Fernyhough C, McCarthy-Jones S, Haggard M, Simons JS. Paracingulate sulcus morphology is associated with hallucinations in the human brain. Nat Commun 2015; 6:8956.

19. Wei X, Yin Y, Rong M, Zhang J, Wang L, Wu Y i sur. Paracingulate Sulcus Asymmetry in the Human Brain: Effects of Sex, Handedness, and Race. Sci Rep 2017; 7:42033.

20. Garrison JR, Fernyhough C, McCarthy-Jones S, Simons JS, Sommer IEC. Paracingulate Sulcus Morphology and Hallucinations in Clinical and Nonclinical Groups. Schizophr Bull 2019; 45(4):733–41.

21. Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Grosshirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues. Leipzig: Barth; 1909.

22. Brodmann K, Gary LJ. Brodmann's localisation in the cerebral cortex: The principles of comparative localisation in the cerebral cortex based on cytoarchitectonics. New York NY: Springer; 2006.

23. von Economo CF, Koskinas GN. Die Cytoarchitektonik der Hirnrinde des erwachsenen Menschen. Wien: J. Springer; 1925.

24. von Economo C. Zellaufbau der Grosshirnrinde des Menschen. Berlin: J. Springer; 1927.

25. von Economo C, Triarhou LC. Cellular structure of the human cerebral cortex. New English ed. Basel, New York: Karger; 2009.

26. Sanides F. Die Architektonik des Menschlichen Stirnhirns. vol. 98 of Monographien aus dem Gesamtgebiete der Neurologie und Psychiatrie: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1962.

27. Petrides M, Tomaiuolo F, Yeterian EH, Pandya DN. The prefrontal cortex: comparative architectonic organization in the human and the macaque monkey brains. Cortex 2012; 48(1):46–57.

28. Groenewegen HJ, Uylings HB. The prefrontal cortex and the integration of sensory, limbic and autonomic information. Prog Brain Res 2000; 126:3–28.

29. Petrides M, Pandya DN. Dorsolateral prefrontal cortex: comparative cytoarchitectonic analysis in the human and the macaque brain and corticocortical connection patterns. Eur J Neurosci 1999; 11(3):1011–36.

30. Hertrich I, Dietrich S, Blum C, Ackermann H. The Role of the Dorsolateral Prefrontal Cortex for Speech and Language Processing. Front Hum Neurosci 2021; 15:645209.

31. Rakic P. Evolution of the neocortex: a perspective from developmental biology. Nat Rev Neurosci 2009; 10(10):724–35.

32. Semendeferi K, Lu A, Schenker N, Damasio H. Humans and great apes share a large frontal cortex. Nat Neurosci 2002; 5(3):272–6.

33. Preuss TM, Goldman-Rakic PS. Myelo- and cytoarchitecture of the granular frontal cortex and surrounding regions in the strepsirhine primate Galago and the anthropoid primate Macaca. J Comp Neurol 1991; 310(4):429–74.

34. Rajkowska G, Goldman-Rakic PS. Cytoarchitectonic Definition of Prefrontal Areas in the Normal Human Cortex: I. Remapping of Areas 9 and 46 using Quantitative Criteria. Cereb Cortex 1995; 5(4):307–22.

35. Goldman-Rakic PS. Chapter 16 Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. U: The Prefrontal Its Structure, Function and Cortex Pathology. Elsevier; 1991. Str. 325–36.

36. Goel V, Grafman J. Are the frontal lobes implicated in “planning” functions? Interpreting data from the Tower of Hanoi. Neuropsychologia 1995; 33(5):623–42.

37. Gallagher HL, Jack AI, Roepstorff A, Frith CD. Imaging the intentional stance in a competitive game. Neuroimage 2002; 16(3):814–21.

38. Gallagher HL, Frith CD. Functional imaging of ‘theory of mind’. Trends in Cognitive Sciences 2003; 7(2):77–83.

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

40. Goulas A, Uylings HBM, Stiers P. Unravelling the intrinsic functional organization of the human lateral frontal cortex: a parcellation scheme based on resting state fMRI. J Neurosci 2012; 32(30):10238–52.

41. Banovac I, Sedmak D, Rojnić Kuzman M, Hladnik A, Petanjek Z. Axon morphology of rapid Golgi-stained pyramidal neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. Croat Med J 2020; 61(4):354–65.

42. Datta D, Arnsten AFT. Unique Molecular Regulation of Higher-Order Prefrontal Cortical Circuits: Insights into the Neurobiology of Schizophrenia. ACS Chem Neurosci 2018; 9(9):2127–45.

43. Sullivan CR, Koene RH, Hasselfeld K, O'Donovan SM, Ramsey A, McCullumsmith RE. Neuron-specific deficits of bioenergetic processes in the dorsolateral prefrontal cortex in schizophrenia. Mol Psychiatry 2019; 24(9):1319–28.

44. Kaar SJ, Angelescu I, Marques TR, Howes OD. Pre-frontal parvalbumin interneurons in schizophrenia: a meta-analysis of post-mortem studies. J Neural Transm (Vienna) 2019.

45. Judaš M, Cepanec M, Sedmak G. Brodmann's map of the human cerebral cortex — or Brodmann's maps? Translational Neuroscience 2012; 3(1).

46. Amunts K, Zilles K. Architectonic Mapping of the Human Brain beyond Brodmann. Neuron 2015; 88(6):1086–107.

47. Henssen A, Zilles K, Palomero-Gallagher N, Schleicher A, Mohlberg H, Gerboga F i sur. Cytoarchitecture and probability maps of the human medial orbitofrontal cortex. Cortex 2016; 75:87–112.

48. Defelipe J, Fariñas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: Morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. Progress in Neurobiology 1992; 39(6):563–607.

49. Defelipe J, López-Cruz PL, Benavides-Piccione R, Bielza C, Larrañaga P, Anderson S i sur. New insights into the classification and nomenclature of cortical GABAergic interneurons. Nat Rev Neurosci 2013; 14(3):202–16.

50. Braak H. Architectonics of the Human Telencephalic Cortex. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1980.

51. Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C. Interneurons of the neocortical inhibitory system. Nat Rev Neurosci 2004; 5(10):793–807.

52. Petanjek Z, Judas M, Kostović I, Uylings HBM. Lifespan alterations of basal dendritic trees of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a layer-specific pattern. Cereb Cortex 2008; 18(4):915–29.

53. Petanjek Z, Judaš M, Šimic G, Rasin MR, Uylings HBM, Rakic P i sur. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 2011; 108(32):13281–6.

54. Sedmak D, Hrvoj-Mihić B, Džaja D, Habek N, Uylings HB, Petanjek Z. Biphasic dendritic growth of dorsolateral prefrontal cortex associative neurons and early cognitive development. Croat Med J 2018; 59(5):189–202.

55. Petanjek Z, Kostović I. Golgi morphology of neurons in the adult human prefrontal cortex: I. pyramidal neurons. Period. Biol 1994; 96(1):91–2.

56. Petanjek Z, Kostović I. Golgi morphology of neurons in the adult human prefrontal cortex: II. modified pyramidal neurons. Period. Biol 1994; 96(1):93–4.

57. Rasia-Filho AA, Guerra KTK, Vásquez CE, Dall'Oglio A, Reberger R, Jung CR i sur. The Subcortical-Allocortical- Neocortical continuum for the Emergence and Morphological Heterogeneity of Pyramidal Neurons in the Human Brain. Front Synaptic Neurosci 2021; 13:616607.

58. Petanjek Z, Sedmak D, Džaja D, Hladnik A, Rašin MR, Jovanov-Milosevic N. The Protracted Maturation of Associative Layer IIIC Pyramidal Neurons in the Human Prefrontal Cortex During Childhood: A Major Role in Cognitive Development and Selective Alteration in Autism. Front Psychiatry 2019; 10:122.

59. Banovac I, Sedmak D, Judaš M, Petanjek Z. Von Economo Neurons – Primate-Specific or Commonplace in the Mammalian Brain? Front Neural Circuits 2021; 15:714611.

60. Ascoli GA, Alonso-Nanclares L, Anderson SA, Barrionuevo G, Benavides-Piccione R, Burkhalter A i sur. Petilla terminology: nomenclature of features of GABAergic interneurons of the cerebral cortex. Nat Rev Neurosci 2008; 9(7):557–68.

61. Jones EG. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. Cereb Cortex 1993; 3(5):361–72.

62. Higo S, Udaka N, Tamamaki N. Long-range GABAergic projection neurons in the cat neocortex. J Comp Neurol 2007; 503(3):421–31.

63. Tamamaki N, Tomioka R. Long-Range GABAergic Connections Distributed throughout the Neocortex and their Possible Function. Front Neurosci 2010; 4:202.

64. Tomioka R, Okamoto K, Furuta T, Fujiyama F, Iwasato T, Yanagawa Y i sur. Demonstration of long-range GABAergic connections distributed throughout the mouse neocortex. Eur J Neurosci 2005; 21(6):1587–600.

65. Beaulieu C. Numerical data on neocortical neurons in adult rat, with special reference to the GABA population. Brain Res 1993; 609(1-2):284–92.

66. Hendry SH, Schwark HD, Jones EG, Yan J. Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. J Neurosci 1987; 7(5):1503–19.

67. Sultan KT, Shi S-H. Generation of diverse cortical inhibitory interneurons. Wiley Interdiscip Rev Dev Biol 2018; 7(2).

68. Burkhalter A. Many specialists for suppressing cortical excitation. Front Neurosci 2008; 2(2):155–67.

69. Gonchar Y, Burkhalter A. Three distinct families of GABAergic neurons in rat visual cortex. Cereb Cortex 1997; 7(4):347–58.

70. Gonchar Y, Wang Q, Burkhalter A. Multiple distinct subtypes of GABAergic neurons in mouse visual cortex identified by triple immunostaining. Front Neuroanat 2007; 1:3.

71. Kawaguchi Y, Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. Cereb Cortex 1997; 7(6):476–86.

72. Kubota Y, Hattori R, Yui Y. Three distinct subpopulations of GABAergic neurons in rat frontal agranular cortex. Brain Res 1994; 649(1-2):159–73.

73. Laturnus S, Kobak D, Berens P. A Systematic Evaluation of Interneuron Morphology Representations for Cell Type Discrimination. Neuroinformatics 2020; 18(4):591–609.

74. Monyer H, Markram H. Interneuron Diversity series: Molecular and genetic tools to study GABAergic interneuron diversity and function. Trends Neurosci 2004; 27(2):90–7.

75. Sherwood CC, Raghanti MA, Stimpson CD, Spocter MA, Uddin M, Boddy AM i sur. Inhibitory interneurons of the human prefrontal cortex display conserved evolution of the phenotype and related genes. Proc Biol Sci 2010; 277(1684):1011–20.

76. Uematsu M, Hirai Y, Karube F, Ebihara S, Kato M, Abe K i sur. Quantitative chemical composition of cortical GABAergic neurons revealed in transgenic venus-expressing rats. Cereb Cortex 2008; 18(2):315–30.

77. Xu X, Roby KD, Callaway EM. Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: three chemically distinct classes of inhibitory cells. J Comp Neurol 2010; 518(3):389–404.

78. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. Neuron 2016; 91(2):260–92.

79. Mihaljević B, Larrañaga P, Benavides-Piccione R, Hill S, Defelipe J, Bielza C. Towards a supervised classification of neocortical interneuron morphologies. BMC Bioinformatics 2018; 19(1):511.

80. Hendry SH, Jones EG, Emson PC. Morphology, distribution, and synaptic relations of somatostatin- and neuropeptide Y-immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. J. Neurosci. 1984; 4(10):2497–517.

81. Gabbott PL, Bacon SJ. 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 1996; 364(4):567–608.

82. Raghanti MA, Spocter MA, Butti C, Hof PR, Sherwood CC. A comparative perspective on minicolumns and inhibitory GABAergic interneurons in the neocortex. Front Neuroanat 2010; 4:3.

83. Zhou X, Mansori I, Fischer T, Witte M, Staiger JF. Characterizing the morphology of somatostatin-expressing interneurons and their synaptic innervation pattern in the barrel cortex of the GFP-expressing inhibitory neurons mouse. J Comp Neurol 2020; 528(2):244–60.

84. Defelipe J, Ballesteros-Yáñez I, Inda MC, Muñoz A. Double-bouquet cells in the monkey and human cerebral cortex with special reference to areas 17 and 18. In: Visual Perception - Fundamentals of Vision: Low and Mid-Level Processes in Perception. Elsevier; 2006. Str. 15–32.

85. Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(6):3217–22.

86. Chrysanthidis N, Fiebig F, Lansner A. Introducing double bouquet cells into a modular cortical associative memory model. J Comput Neurosci 2019; 47(2-3):223–30.

87. Yáñez IB, Muñoz A, Contreras J, Gonzalez J, Rodriguez-Veiga E, Defelipe J. Double bouquet cell in the human cerebral cortex and a comparison with other mammals. J Comp Neurol 2005; 486(4):344–60.

88. Armstrong C, Soltesz I. Basket cell dichotomy in microcircuit function. J Physiol 2012; 590(4):683–94.

89. Szocsics P, Papp P, Havas L, Watanabe M, Maglóczky Z. Perisomatic innervation and neurochemical features of giant pyramidal neurons in both hemispheres of the human primary motor cortex. Brain Struct Funct 2021; 226(1):281–96.

90. Wang Y, Zhang P, Wyskiel DR. Chandelier Cells in Functional and Dysfunctional Neural Circuits. Front Neural Circuits 2016; 10:33.

91. Inan M, Anderson SA. The chandelier cell, form and function. Curr Opin Neurobiol 2014; 26:142–8.

92. Overstreet-Wadiche L, McBain CJ. Neurogliaform cells in cortical circuits. Nat Rev Neurosci 2015; 16(8):458–68.

93. Niquille M, Limoni G, Markopoulos F, Cadilhac C, Prados J, Holtmaat A i sur. Neurogliaform cortical interneurons derive from cells in the preoptic area. Elife 2018; 7.

94. Vercelli A, Assal F, Innocenti GM. Emergence of callosally projecting neurons with stellate morphology in the visual cortex of the kitten. Exp Brain Res 1992; 90(2):346–58.

95. Nieuwenhuys R. The neocortex. An overview of its evolutionary development, structural organization and synaptology. Anat Embryol (Berl) 1994; 190(4):307–37.

96. Schubert D, Kötter R, Zilles K, Luhmann HJ, Staiger JF. Cell Type-Specific Circuits of Cortical Layer IV Spiny Neurons. J. Neurosci. 2003; 23(7):2961–70.

97. Rees CL, White CM, Ascoli GA. Neurochemical Markers in the Mammalian Brain: Structure, Roles in Synaptic Communication, and Pharmacological Relevance. Curr Med Chem 2017; 24(28):3077–103.

98. Rogers JH. Immunohistochemical markers in rat cortex: co-localization of calretinin and calbindin-D28k with neuropeptides and GABA. Brain Res 1992; 587(1):147–57.

99. Helm J, Akgul G, Wollmuth LP. Subgroups of parvalbumin-expressing interneurons in layers 2/3 of the visual cortex. J Neurophysiol 2013; 109(6):1600–13.

100. Akgul G, Wollmuth LP. Synapse-associated protein 97 regulates the membrane properties of fast-spiking parvalbumin interneurons in the visual cortex. J. Neurosci. 2013; 33(31):12739–50.

101. Chang MC, Park JM, Pelkey KA, Grabenstatter HL, Xu D, Linden DJ i sur. Narp regulates homeostatic scaling of excitatory synapses on parvalbumin-expressing interneurons. Nat Neurosci 2010; 13(9):1090–7.

102. Halabisky B, Shen F, Huguenard JR, Prince DA. Electrophysiological classification of somatostatin-positive interneurons in mouse sensorimotor cortex. J Neurophysiol 2006; 96(2):834–45.

103. Kawaguchi Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. J. Neurosci. 1995; 15(4):2638–55.

104. Kawaguchi Y, Kondo S. Parvalbumin, somatostatin and cholecystokinin as chemical markers for specific GABAergic interneuron types in the rat frontal cortex. J Neurocytol 2002; 31(3-5):277–87.

105. Kawaguchi Y, Kubota Y. Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. J Neurophysiol 1993; 70(1):387–96.

106. Kawaguchi Y, Kubota Y. Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. Neuroscience 1998; 85(3):677–701.

107. Kuhlman SJ, Huang ZJ. High-resolution labeling and functional manipulation of specific neuron types in mouse brain by Cre-activated viral gene expression. PLoS One 2008; 3(4):e2005.

108. Ma Y, Hu H, Berrebi AS, Mathers PH, Agmon A. Distinct subtypes of somatostatin-containing neocortical interneurons revealed in transgenic mice. J. Neurosci. 2006; 26(19):5069–82.

109. Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J-I, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. J Comp Neurol 2003; 467(1):60–79.

110. Rocco BR, Sweet RA, Lewis DA, Fish KN. GABA-Synthesizing Enzymes in Calbindin and Calretinin Neurons in Monkey Prefrontal Cortex. Cereb Cortex 2016; 26(5):2191–204.

111. Condé F, Lund JS, Jacobowitz DM, Baimbridge KG, Lewis DA. Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. J Comp Neurol 1994; 341(1):95–116.

112. del Río MR, DeFelipe J. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. J Comp Neurol 1996; 369(3):472–82.

113. del Río MR, DeFelipe J. Colocalization of parvalbumin and calbindin D-28k in neurons including chandelier cells of the human temporal neocortex. J Chem Neuroanat 1997; 12(3):165–73.

114. Džaja D, Hladnik A, Bičanić I, Baković M, Petanjek Z. Neocortical calretinin neurons in primates: increase in proportion and microcircuitry structure. Front Neuroanat 2014; 8:103.

115. Gabbott PL, Bacon SJ. Local circuit neurons in the medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 25 and 32) in the monkey: II. Quantitative areal and laminar distributions. J Comp Neurol 1996; 364(4):609–36.

116. Gabbott PL, Jays PR, Bacon SJ. Calretinin neurons in human medial prefrontal cortex (areas 24a,b,c, 32', and 25). J Comp Neurol 1997; 381(4):389–410.

117. Melchitzky DS, Eggan SM, Lewis DA. Synaptic targets of calretinin-containing axon terminals in macaque monkey prefrontal cortex. Neuroscience 2005; 130(1):185–95.

118. van Brederode JF, Mulligan KA, Hendrickson AE. Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. J Comp Neurol 1990; 298(1):1–22.

119. Zaitsev AV, Gonzalez-Burgos G, Povysheva NV, Kröner S, Lewis DA, Krimer LS. Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. Cereb Cortex 2005; 15(8):1178–86.

120. Rudy B, Fishell G, Lee S, Hjerling-Leffler J. Three groups of interneurons account for nearly 100% of neocortical GABAergic neurons. Dev Neurobiol 2011; 71(1):45–61.

121. Wang Y, Toledo-Rodriguez M, Gupta A, Wu C, Silberberg G, Luo J i sur. Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat. J Physiol 2004; 561(1):65–90.

122. Ivell R, Teerds K, Hoffman GE. Proper application of antibodies for immunohistochemical detection: antibody crimes and how to prevent them. Endocrinology 2014; 155(3):676–87.

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

124. Xu X, Roby KD, Callaway EM. Mouse cortical inhibitory neuron type that coexpresses somatostatin and calretinin. J Comp Neurol 2006; 499(1):144–60.

125. Dinocourt C, Petanjek Z, Freund TF, Ben-Ari Y, Esclapez M. Loss of interneurons innervating pyramidal cell dendrites and axon initial segments in the CA1 region of the hippocampus following pilocarpine-induced seizures. J Comp Neurol 2003; 459(4):407–25.

126. Marín O. Interneuron dysfunction in psychiatric disorders. Nat Rev Neurosci 2012; 13(2):107–20.

127. Panthi S, Leitch B. The impact of silencing feed-forward parvalbumin-expressing inhibitory interneurons in the cortico-thalamocortical network on seizure generation and behaviour. Neurobiol Dis 2019:104610.

128. Volk DW, Matsubara T, Li S, Sengupta EJ, Georgiev D, Minabe Y i sur. Deficits in transcriptional regulators of cortical parvalbumin neurons in schizophrenia. Am J Psychiatry 2012; 169(10):1082–91.

129. Volk DW, Lewis DA. Prenatal ontogeny as a susceptibility period for cortical GABA neuron disturbances in schizophrenia. Neuroscience 2013; 248:154–64.

130. Wiebe S, Nagpal A, Truong VT, Park J, Skalecka A, He AJ i sur. Inhibitory interneurons mediate autism-associated behaviors via 4E-BP2. Proc Natl Acad Sci U S A 2019; 116(36):18060–7.

131. Silberberg G, Wu C, Markram H. Synaptic dynamics control the timing of neuronal excitation in the activated neocortical microcircuit. J Physiol 2004; 556(1):19–27.

132. Džaja D, Petanjek Z, Esclapez M. The orbitofrontal cortex: Higher density of calretinin interneurons in primates than in rodents. U: Proceedings of the 9th FENS Forum of Neuroscience; Milan; 2014.

133. Ma T, Wang C, Wang L, Zhou X, Tian M, Zhang Q i sur. Subcortical origins of human and monkey neocortical interneurons. Nat Neurosci 2013; 16(11):1588–97.

134. Riedemann T. Diversity and Function of Somatostatin-Expressing Interneurons in the Cerebral Cortex. Int J Mol Sci 2019; 20(12).

135. Scheyltjens I, Arckens L. The Current Status of Somatostatin-Interneurons in Inhibitory Control of Brain Function and Plasticity. Neural Plast 2016; 2016:8723623.

136. Urban-Ciecko J, Barth AL. Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. Nat Rev Neurosci 2016; 17(7):401–9.

137. Sedmak D. Calretinin neurons in the primate prefrontal cortex [disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2019.

138. Petanjek Z, Berger B, Esclapez M. Origins of cortical GABAergic neurons in the cynomolgus monkey. Cereb Cortex 2009; 19(2):249–62.

139. Goulas A, Uylings HBM, Stiers P. Mapping the hierarchical layout of the structural network of the macaque prefrontal cortex. Cereb Cortex 2014; 24(5):1178–94.

140. Semendeferi K, Teffer K, Buxhoeveden DP, Park MS, Bludau S, Amunts K i sur. Spatial organization of neurons in the frontal pole sets humans apart from great apes. Cereb Cortex 2011; 21(7):1485–97.

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

142. Kostovic I, Judas M, Kostovic-Knezevic L, Simic G, Delalle I, Chudy D i sur. Zagreb research collection of human brains for developmental neurobiologists and clinical neuroscientists. Int J Dev Biol 1991; 35(3):215–30.

143. Talairach J, Szikla G. Application of stereotactic concepts to the surgery of epilepsy. Acta Neurochir Suppl (Wien) 1980; 30:35–54.

144. Sadeghipour A, Babaheidarian P. Making Formalin-Fixed, Paraffin Embedded Blocks. Methods Mol Biol 2019; 1897:253–68.

145. Sy J, Ang L-C. Microtomy: Cutting Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections. Methods Mol Biol 2019; 1897:269–78.

146. Kádár A, Wittmann G, Liposits Z, Fekete C. Improved method for combination of immunocytochemistry and Nissl staining. J Neurosci Methods 2009; 184(1):115–8.

147. Carmichael ST, Price JL. Architectonic subdivision of the orbital and medial prefrontal cortex in the macaque monkey. J Comp Neurol 1994; 346(3):366–402.

148. Vogt BA, Nimchinsky EA, Vogt LJ, Hof PR. Human cingulate cortex: surface features, flat maps, and cytoarchitecture. J Comp Neurol 1995; 359(3):490–506.

149. Vogt BA, Hof PR, Zilles K, Vogt LJ, Herold C, Palomero-Gallagher N. Cingulate area 32 homologies in mouse, rat, macaque and human: cytoarchitecture and receptor architecture. J Comp Neurol 2013; 521(18):4189–204.

150. Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. Methods Mol Biol 2019; 1897:289–98.

151. Marshall J, Johnsen S. Fluorescence as a means of colour signal enhancement. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2017; 372(1724).

152. Ramos-Vara JA. Technical aspects of immunohistochemistry. Vet Pathol 2005; 42(4):405–26.

153. Zaqout S, Becker L-L, Kaindl AM. Immunofluorescence Staining of Paraffin Sections Step by Step. Front Neuroanat 2020; 14:582218.

154. Neumann M, Gabel D. Simple method for reduction of autofluorescence in fluorescence microscopy. J Histochem Cytochem 2002; 50(3):437–9.

155. Sun Y, Ip P, Chakrabartty A. Simple Elimination of Background Fluorescence in Formalin-Fixed Human Brain Tissue for Immunofluorescence Microscopy. J Vis Exp 2017; (127):56188.

156. Boenisch T. Effect of heat-induced antigen retrieval following inconsistent formalin fixation. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2005; 13(3):283–6.

157. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang L-C, Bui S, Nielson A i sur. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. J Mol Diagn 2012; 14(1):22–9.

158. Wang H, Su N, Wang L-C, Wu X, Bui S, Nielsen A i sur. Quantitative ultrasensitive bright-field RNA in situ hybridization with RNAscope. Methods Mol Biol 2014; 1211:201–12.

159. Jolly S, Lang V, Koelzer VH, Sala Frigerio C, Magno L, Salinas PC i sur. Single-Cell Quantification of mRNA Expression in The Human Brain. Sci Rep 2019; 9(1):12353.

160. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T i sur. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nat Methods 2012; 9(7):676–82.

161. Guillery RW. On counting and counting errors. J Comp Neurol 2002; 447(1):1–7.

162. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. Anat Rec 1946; 94:239–47.

163. Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ, Tolosana-Delgado R. Modelling and analysis of compositional data. Chichester: Wiley; 2015.

164. Greenacre MJ. Compositional data analysis in practice. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group; 2019.

165. Ma J, Yao X-H, Fu Y, Yu Y-C. Development of layer 1 neurons in the mouse neocortex. Cereb Cortex 2014; 24(10):2604–18.

166. Bloch J, Kaeser M, Sadeghi Y, Rouiller EM, Redmond DE, Brunet J-F. Doublecortin-positive cells in the adult primate cerebral cortex and possible role in brain plasticity and development. J Comp Neurol 2011; 519(4):775–89.

167. Gulyás AI, Hájos N, Freund TF. Interneurons Containing Calretinin Are Specialized to Control Other Interneurons in the Rat Hippocampus. J. Neurosci. 1996; 16(10):3397–411.

168. Camillo D, Ahmadlou M, Saiepour MH, Yasaminshirazi M, Levelt CN, Heimel JA. Visual Processing by Calretinin Expressing Inhibitory Neurons in Mouse Primary Visual Cortex. Sci Rep 2018; 8(1):12355.

169. Cajal SR. Textura del Sistema Nervioso del Hombre y de los Vertebrados, Tomo II. Facsimile Edition, Insti- tuto de Neurociencias, Universidad de Alicante, 1992. Alicante: Graficas Vidal Leuka. Madrid: Nicolas Moya.; 1899.

170. Cajal SR. Histology of the nervous system of man and vertebrates. New York, London: Oxford University Press; 1995.

171. Cossart R, Petanjek Z, Dumitriu D, Hirsch JC, Ben-Ari Y, Esclapez M i sur. Interneurons targeting similar layers receive synaptic inputs with similar kinetics. Hippocampus 2006; 16(4):408–20.

172. Nakakubo Y, Abe S, Yoshida T, Takami C, Isa M, Wojcik SM i sur. Vesicular Glutamate Transporter Expression Ensures High-Fidelity Synaptic Transmission at the Calyx of Held Synapses. Cell Rep 2020; 32(7):108040.

173. Du X, Li J, Li M, Yang X, Qi Z, Xu B i sur. Research progress on the role of type I vesicular glutamate transporter (VGLUT1) in nervous system diseases. Cell Biosci 2020; 10:26.

174. Martineau M, Guzman RE, Fahlke C, Klingauf J. VGLUT1 functions as a glutamate/proton exchanger with chloride channel activity in hippocampal glutamatergic synapses. Nat Commun 2017; 8(1):2279.

175. Brumovsky PR, Robinson DR, La J-H, Seroogy KB, Lundgren KH, Albers KM i sur. Expression of vesicular glutamate transporters type 1 and 2 in sensory and autonomic neurons innervating the mouse colorectum. J Comp Neurol 2011; 519(16):3346–66.

176. Wozny C, Beed P, Nitzan N, Pössnecker Y, Rost BR, Schmitz D. VGLUT2 Functions as a Differential Marker for Hippocampal Output Neurons. Front Cell Neurosci 2018; 12:337.

177. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of Differentiation-Associated Brain-Specific Phosphate Transporter as a Second Vesicular Glutamate Transporter (VGLUT2). J. Neurosci. 2001; 21(22):RC182-RC182.

178. Amilhon B, Lepicard E, Renoir T, Mongeau R, Popa D, Poirel O i sur. VGLUT3 (vesicular glutamate transporter type 3) contribution to the regulation of serotonergic transmission and anxiety. J. Neurosci. 2010; 30(6):2198–210.

179. Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J i sur. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99(22):14488–93.

180. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH i sur. The Vesicular GABA Transporter, VGAT, Localizes to Synaptic Vesicles in Sets of Glycinergic as Well as GABAergic Neurons. J. Neurosci. 1998; 18(23):9733–50.

181. Saito K, Kakizaki T, Hayashi R, Nishimaru H, Furukawa T, Nakazato Y i sur. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. Mol Brain 2010; 3:40.

182. Navarro D, Alvarado M, Figueroa A, Gonzalez-Liencres C, Salas-Lucia F, Pacheco P i sur. Distribution of GABAergic Neurons and VGluT1 and VGAT Immunoreactive Boutons in the Ferret (Mustela putorius) Piriform Cortex and Endopiriform Nucleus. Comparison With Visual Areas 17, 18 and 19. Front Neuroanat 2019; 13:54.

183. Dracheva S, Elhakem SL, McGurk SR, Davis KL, Haroutunian V. GAD67 and GAD65 mRNA and protein expression in cerebrocortical regions of elderly patients with schizophrenia. J Neurosci Res 2004; 76(4):581–92.

184. Lariviere K, MacEachern L, Greco V, Majchrzak G, Chiu S, Drouin G i sur. GAD(65) and GAD(67) isoforms of the glutamic acid decarboxylase gene originated before the divergence of cartilaginous fishes. Mol Biol Evol 2002; 19(12):2325–9.

185. Martin DL, Barke KE. Are GAD65 and GAD67 associated with specific pools of GABA in brain? Perspect Dev Neurobiol 1998; 5(2-3):119–29.

186. Martin DL, Rimvall K. Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. J Neurochem 1993; 60(2):395–407.

187. Pinal CS, Tobin AJ. Uniqueness and redundancy in GABA production. Perspect Dev Neurobiol 1998; 5(2-3):109–18.

188. Mower GD, Guo Y. Comparison of the expression of two forms of glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65) in the visual cortex of normal and dark-reared cats. Developmental Brain Research 2001; 126(1):65–74.

189. Esclapez M, Tillakaratne NJ, Kaufman DL, Tobin AJ, Houser CR. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. J. Neurosci. 1994; 14(3):1834–55.

190. Grabinski TM, Kneynsberg A, Manfredsson FP, Kanaan NM. A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. PLoS One 2015; 10(3):e0120120.

191. Esclapez M, Tillakaratne NJ, Tobin AJ, Houser CR. Comparative localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase with nonradioactive in situ hybridization methods. J Comp Neurol 1993; 331(3):339–62.

192. Houser CR, Esclapez M. Localization of mRNAs encoding two forms of glutamic acid decarboxylase in the rat hippocampal formation. Hippocampus 1994; 4(5):530–45.

193. Hendrickson AE, Tillakaratne NJ, Mehra RD, Esclapez M, Erickson A, Vician L i sur. Differential localization of two glutamic acid decarboxylases (GAD65 and GAD67) in adult monkey visual cortex. J Comp Neurol 1994; 343(4):566–81.

194. Egerton A, Modinos G, Ferrera D, McGuire P. Neuroimaging studies of GABA in schizophrenia: a systematic review with meta-analysis. Transl Psychiatry 2017; 7(6):e1147.

195. Inan M, Petros TJ, Anderson SA. Losing your inhibition: linking cortical GABAergic interneurons to schizophrenia. Neurobiol Dis 2013; 53:36–48.

196. Jonge JC de, Vinkers CH, Hulshoff Pol HE, Marsman A. GABAergic Mechanisms in Schizophrenia: Linking Postmortem and In Vivo Studies. Front Psychiatry 2017; 8:118.

197. Lewis DA, Curley AA, Glausier JR, Volk DW. Cortical parvalbumin interneurons and cognitive dysfunction in schizophrenia. Trends Neurosci 2012; 35(1):57–67.

198. Esclapez M, Houser CR. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy. J Comp Neurol 1999; 412(3):488–505.

199. Cossart R, Dinocourt C, Hirsch JC, Merchan-Perez A, Felipe J de, Ben-Ari Y i sur. Dendritic but not somatic GABAergic inhibition is decreased in experimental epilepsy. Nat Neurosci 2001; 4(1):52–62.

200. Boulland J-L, Ferhat L, Tallak Solbu T, Ferrand N, Chaudhry FA, Storm-Mathisen J i sur. Changes in vesicular transporters for gamma-aminobutyric acid and glutamate reveal vulnerability and reorganization of hippocampal neurons following pilocarpine-induced seizures. J Comp Neurol 2007; 503(3):466–85.

201. Bernard C, Cossart R, Hirsch JC, Esclapez M, Ben-Ari Y. What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy? Epilepsia 2000; 41 Suppl 6:S90-5.

202. Prévot T, Sibille E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders. Mol Psychiatry 2021; 26(1):151–67.

203. Billwiller F, Castillo L, Elseedy H, Ivanov AI, Scapula J, Ghestem A i sur. GABA-Glutamate supramammillary neurons control theta and gamma oscillations in the dentate gyrus during paradoxical (REM) sleep; Brain Struct Funct 2020; 225(9):2643-2668.

11. ŽIVOTOPIS

Ivan Banovac rođen je 13. prosinca 1992. u Zagrebu. Studij medicine upisao je 2011. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu kao prvi na rang listi. Diplomirao je 2017. godine s prosjekom ocjena 5,00. Tijekom studija dobio je Dekanovu nagradu za uspjeh, Rektorovu nagradu za individualni znanstveni rad te Nagradu Zaklade „Perović-Krmpotić“ za najboljeg studenta medicine diplomiranog na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u akademskoj godini 2016./2017. Po završetku studija završio je Pripravnički staž doktora medicine.

Od 2018. zaposlen je u Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na radnom mjestu asistenta.

Sudjelovao je kao suradnik na znanstvenim projektima „Investigation of the neuropathology of autism spectrum disorder and schizophrenia“ (šifra: HR_HUN_2018_02, voditelj: Miloš Judaš) i „Moždana izvanstanična tvar u razvitku i perinatalnoj hipoksiji“ (šifra: IP-2019-04-3182, voditelj: Nataša Jovanov-Milošević).

Autor je pet znanstvenih radova, od toga dva u časopisima s čimbenikom odjeka u prvoj kvartili, jednog stručnog rada i devet kongresnih sažetaka. Prevoditelj je triju poglavlja udžbenika „Anatomija“ (Duale Reihe).

Položio je ispite za stjecanje međunarodnih certifikata za engleski i njemački jezik (C2 razinu) te francuski i ruski jezik (B2 razinu). Položio je i ECDL ispite AM3 – Napredna obrada teksta i AM4 – Napredne proračunske tablice.