Morfološke promjene projekcijskih neurona strijatuma u miša s humaniziranim oblikom gena Foxp2

Bičanić, Ivana

Doctoral thesis / Disertacija

2017

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:105:241533

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

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Bičanić

Morfološke promjene projekcijskih neurona strijatuma u miša s humaniziranim oblikom gena *Foxp2*

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Ivana Bičanić

Morfološke promjene projekcijskih neurona strijatuma u miša s humaniziranim oblikom gena *Foxp2*

DISERTACIJA

Zagreb, 2017.

Disertacija je izrađena u Laboratoriju za neuromorfometriju Odsjeka za razvojnu neuroznanost Hrvatskog instituta za istraživanje mozga Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Zdravko Petanjek

Za vodstvo u izradi ove disertacije htjela bih zahvaliti mentoru, profesoru Zdravku Petanjeku. Profesoru Ivanu Vinteru hvala što mi je omogućio upisivanje poslijediplomskog studija, što je uvijek isticao važnost i znanstvenog i stručnog napredovanja, te mi trajno usadio ljubav za rad sa studentima.
Hvala Sanji i Domagoju na bezbrojnim satima diskutiranja o znanosti, nesebičnom dijeljenju svojih praktičnih iskustava i davanju primjera kako izgleda timski rad.
Hvala mojoj obitelji na bezgraničnoj podršci svih ovih godina, na učenju radnih navika, stalnom podsjećanju da u svemu što radim nikada ne zaboravim trajne vrijednosti i kako da, koliko god teško bilo, uvijek budem prvenstveno čovjek.

Financirano sredstvima Hrvatske zaklade za znanost

IP-11-2013-5943

COGNITIVECIRCUIT

Eksperimentalni postupci, analiza preparata i troškovi izrade ove disertacije financirani su sredstvima Hrvatske zaklade za zaklade za znanost, istraživački projekt HRZZ5943 – „Neuralna osnova viših kognitivnih funkcija“, voditelj prof.dr.sc. Zdravko Petanjek, koji se provodi na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Popis kratica

Foxp2 – eng. Forkhead box protein 2

Foxp2 – oznaka za gen u glodavaca

FOXP2 – oznaka za ljudski gen

FoxP2 – oznaka za gen u ostalih vrsta

Foxp2 ^{hum} – oznaka za transgenične životinje s ljudskom varijantom gena (supstitucija na poziciji T302N i N324S)

Foxp2 ^{wt} - oznaka za miševe divljeg tipa

Foxp ^{N324S} – oznaka za transgenične životinje sa supstitucijom u *Foxp2* genu na poziciji N324S

Foxp2 ^{T302N} – transgenične životinje sa supstitucijom u *Foxp2* genu na poziciji T302N

SMA – dodatno motoričko područje (eng. supplementary motor area)

fMRI – slikovni prikaz funkcionalnom magnetskom rezonancom

PET – pozitronska emisijska tomografija

CNTNAP2 – eng. Contactin associated protein-like 2

LTD – dugoročna depresija (eng. Long-term depression)

GABA – gama-amino-maslačna kiselina

MSN – trnasti srednje veliki neuron

GPi – lat. *globus pallidus, pars interna*

GPm – lat. *globus pallidus, pars medialis*

GPe – lat. *globus pallidus, pars externa*

KI – transgenične životinje

WT – životinje divljeg tipa

DMS (DM) – dorzomedijalni strijatum

DLS (DL) – dorzolateralni strijatum

ROST – rostralni strijatum

CAUD – kaudalni strijatum

WM – bijela tvar

TE – terminalni segment

IM – intermedijarni segment

IC – prekinuti segment

Thr – aminokiselina treonin

Asn – aminokiselina asparagin

Ser – aminokiselina serin

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA 1
1.1. Otkriće FOXP2 gena 1
1.1.1. Obitelj KE 1
1.1.2. Fenotip obitelji KE 1
1.1.3. Molekularna analiza poremećaja obitelji KE 3
1.2. Funkcija FOXP2 gena 3
1.2.1. Izražaj FOXP2 gena 3
1.2.2. Utjecaj FOXP2 gena na ostale gene 4
1.2.3. Uloga FOXP2 gena u razvoju živčanog sustava 4
1.3. FOXP2 gen u drugih vrsta 5
1.4. Funkcionalne studije FOXP2 gena na životinjskom modelu 6
1.4.1. Mišji model mutacije obitelji KE 6
1.4.2. Humanizirani miš 7
1.5. Projekcijski srednje veliki neuroni strijatuma-dio kortiko-strijatalnih neuralnih krugova 8
1.6. Dosadašnje spoznaje o morfologiji trnastih srednje velikih neurona strijatuma 10
2. HIPOTEZA 12
3. CILJEVI RADA 13
3.1. Opći cilj rada 11
3.2. Specifični ciljevi rada 11
4. MATERIJALI I METODE 14
4.1. Dobivanje i držanje životinja koje izražavaju *Foxp2* ^{hum}, *Foxp2* ^{T302N} i *Foxp2* ^{N324S} alel 14
4.2. Uzimanje i obrada materijala 16
4.3. Bojanje tkiva 17
4.4. Morfološka analiza 23
4.4.1. Identifikacija analiziranih regija 23
4.4.2. Rekonstrukcija dendritičkog stabla 25
4.4.3. Parametri morfološke analize 27
4.5. Statistička obrada podataka 28
5. REZULTATI 29
5.1. Kvalitativna analiza projekcijskih srednje velikih neurona u dorzalnom strijatumu 29
5.2. Kvantitativna analiza projekcijskih srednje velikih neurona u dorzalnom strijatumu 31
5.2.1. Neregionalna kvantitativna analiza 32
5.2.1.1.Prikaz vrijednosti morfoloških parametara u životinja divljeg tipa 32
5.2.1.2. Prikaz vrijednosti morfoloških parametara u transgeničnih životinja 38
5.2.1.3. Prikaz vrijednosti morfoloških parametara transgeničnih životinja u usporedbi s kontrolnom skupinom 43

5.2.2. Regionalna kvantitativna analiza 48
5.2.2.1. Regionalna analiza morfoloških parametara u životinja divljeg tipa 48
5.2.2.2. Regionalna analiza morfoloških parametara u transgeničnih životinja 53
5.2.2.3. Regionalna analiza morfoloških parametara transgeničnih životinja u usporedbi s kontrolnom skupinom 58
5.2.2.3.1. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{hum} u usporedbi s kontrolnom skupinom 59
5.2.2.3.2. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{N324S} u usporedbi s kontrolnom skupinom 63
5.2.2.3.3. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{T302N} u usporedbi s kontrolnom skupinom 67
6. RASPRAVA 71
6.1. Analiza morfoloških parametara trnastih srednje velikih neurona strijatuma u miševa divljeg tipa 71
6.2. Konzistentnost morfoloških parametara trnastih srednje velikih neurona strijatuma 72
6.3. Regionalne razlike u morfologiji trnastih srednje velikih neurona strijatuma 74
6.4. Usporedba morfologije projekcijskih srednje velikih neurona strijatuma između tri transgenične populacije miševa (*Foxp2*^{hum}, *Foxp2*^{N324S}, *Foxp2*^{T302N}) i miševa divljeg tipa 75
7. ZAKLJUČAK 78
8. SAŽETAK 79
9. SUMMARY 80
10. POPIS LITERATURE 81
11. ŽIVOTOPIS 86

1. UVOD I SVRHA RADA

Razumijevanje i istraživanje evolucije čovjeka u velikoj je mjeri potpomognuto razvojem znanosti kao što su usporedna genomika i njoj srodne znanosti.
Ona dovodi do spoznaja o genima koji su bili pozitivno selektirani u tom procesu, kao i o genima koji su bili izloženi procesu duplikacije, translokacije ili delecije. Unatoč rastućem znanju o evoluciji ljudskog genoma još nam uvijek ostaje nedovoljno jasan odnos između genetičkih promjena i promjena u fenotipu. Ta opažanja vrijede i za gen *FOXP2* koji spada među najproučavanije gene u posljednja dva desetljeća. Smatra se kako je ovaj gen prošao pozitivnu selekciju te da je imao ulogu u evoluciji ljudskog govora i jezika. Sposobnost govorenja i razumijevanja govora, sposobnost je karakteristična za čovjeka i kao takva sastavni je dio našega društva i kulture. Otkriće i istraživanja funkcije ovoga gena mogli bi upotpuniti naše razumijevanje o fenotipskim promjenama koje karakteriziraju današnjeg čovjeka.

1.1. Otkriće *FOXP2* gena

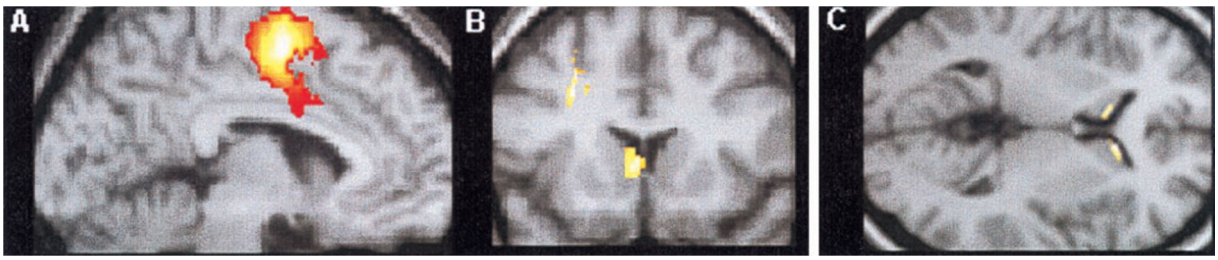
1.1.1. Obitelj KE

Početkom 90-ih godina 20. stoljeća u Velikoj Britaniji je opisana obitelj u kojoj je polovina njenih članova pokazivala poteškoće u artikulaciji govora, orofacijalnoj koordinaciji te nedostatke u ekspresivnim i receptivnim zadatcima, ali bez oštećenja ostalih kognitivnih funkcija [1]. Za potrebe istraživanja i očuvanja anonimnosti, obitelj je dobila ime KE.

1.1.2. Fenotip obitelji KE

U studiji objavljenoj 1998.godine [2] znanstvenici su otkrili kako su članovi obitelji KE koji su bili pogođeni oštećenjem, lošije rezultate postigli u tri testa: ponavljanju riječi, ponavljanju pseudoriječi te izvođenju simultanih i serijskih orofacijalnih pokreta. Daljnja istraživanja imala su za cilj točnije definirati deficit te su pokazala da je riječ o vrlo složenom poremećaju koji uz lingvistička ima i ne-lingvistička obilježja te ne može ući u dijagnostičku skupinu specifičnih jezičnih oštećenja.

Sljedeći korak bio je utvrditi postoje li razlike u slikovnim prikazima mozga između zdravih članova KE obitelji i članova zahvaćenih poremećajem. Korištenjem MRI uređaja uočeno je da u mozgovima zahvaćenih članova postoje područja koja su morfološki promijenjena, odnosno imaju povećanu ili smanjenu količinu sive tvari [2, 3]. Članovi KE obitelji zahvaćeni poremećajem imali su više sive tvari u lentiformnoj jezgri i *gyrus angularis* (bilateralno), a manje u dodatnom motoričkom području i cingularnoj kori, Brokinom području kao i u nukleusu kaudatusu (bilateralno). *Nucleus caudatus* je i u pozitronskoj emisijskoj tomografiji (PET) potvrdio znatno manje volumene obostrano nego što je to bio slučaj kod zdravih ispitanika, a analiza funkcionalnom magnetnom rezonancijom (fMRI) nedovoljnu aktivaciju Brokinog područja i putamena za vrijeme produkcije govora i ponavljanja riječi.



Slika 1.1 Rezultati PET i MRI analize. (A) Parasagitalni presjek kroz lijevu hemisferu, 6 mm od medijane ravnine. Obojano područje pokazuje regije koje su bile manje aktivne kod obitelji KE u odnosu na kontrolnu skupinu. (B) Koronarni presjek, 14 mm ispred koronarne ravnine kroz prednju komisuru. Obojana područja (lijevi *nucleus caudatus* i lijeva premotorička kora) pokazuju regije koje su bile aktivnije u obitelji KE u odnosu na kontrolnu skupinu. (C) Transverzalni presjek, 2 mm iznad transverzalne ravnine kroz prednju i stražnju komisuru. Obojana područja (glava nukleusa kaudatusa, obostrano) pokazuju regije s manje sive tvari u KE obitelji u odnosu na kontrolnu skupinu.
(Preuzeto iz rada Vargha-Khadem i suradnici, 1998 [2])

1.1.3. Molekularna analiza poremećaja obitelji KE

Paralelno s provođenjem istraživanja korištenjem slikovnih metoda i testova ponašanja, provođene su i genomske analize u svrhu traženja gena koji bi mogao biti odgovoran za poremećaj u polovine članova KE obitelji. Zahvaćanje polovine članova ukazalo je da bi se moglo raditi o autosomno-dominantnom poremećaju, što je poslije i potvrđeno. Pronađen je gen iz porodice "Forkhead box" proteina, velike skupine transkripcijskih faktora [4, 5] koji se nalazi na dugom kraku kromosoma 7. U kodirajućim regijama *FOXP2* gena obitelji KE utvrđena je mutacija krivog smisla (*missense*) u kojoj je aminokiselina arginin zamijenjena s histidinom u DNA-vezujućoj domeni na poziciji 553 proteina (R553H). Svi zahvaćeni članovi KE obitelji bili su heterozigoti za ovu mutaciju. Osim zahvaćenih pripadnika KE obitelji, neovisnim istraživanjima pronađeno je još slučajeva mutacije *FOXP2* gena (delecija, besmislena mutacija (*nonsense*) u kojima su pogođeni pojedinci pokazivali poremećaje govora slične onima u obitelji KE (oromotorna dispraksija, verbalna dispraksija, zaostajanje u razvoju, poteškoće u čitanju, motoričke poteškoće kod disleksije) [6, 7].

1.2. Funkcija *FOXP2* gena

1.2.1. Izražaj *FOXP2* gena

Sljedeći korak nakon otkrića gena koji je uzrokovao lingvističke, ali i nelingvističke poremećaje bio je utvrditi mehanizam kojim *FOXP2* gen dovodi do ovih deficita. Kao i svi transkripcijski faktori i FOXP2 protein se veže na genomsku DNA te ima mogućnost ili aktivirati ili potisnuti rad određenih gena, i na taj način povećati ili smanjiti transkripte tih gena.

Jak izražaj ovoga gena opažen je u fetalnom mozgu [4], a u odraslom mozgu u nukleusu kaudatusu, malom mozgu, talamusu i putamenu [8, 9]. Za vrijeme razvoja štakori i miševi izražavaju *Foxp2* u tkivu pluća, živčanom tkivu, crijevima i tkivima kardiovaskularnog sustava [5].

1.2.2. Utjecaj *FOXP2* gena na ostale gene

S obzirom na to da je *FOXP2* izražen u različitim regijama mozga, pretpostavljeno je kako bi mogao utjecati na različite gene koji bi mogli biti važni u govoru, jeziku i kontroli motorike.

Jedna studija je pronašla 303 ciljna mjesta djelovanja ovoga gena i to unutar bazalnih ganglija i donjeg frontalnog korteksa [10, 11], što govori u prilog da brojna ciljna mjesta djelovanja *FOXP2* vjerojatno utječu i na brojne funkcije kao što su razvoj živčanog sustava, provođenje signala te sinaptički prijenos. U svim tim mjerenjima *FOXP2* je na ciljna mjesta djelovao kao potiskivač njihovih funkcija.

1.2.3. Uloga *Foxp2* gena u razvoju živčanog sustava

Uloga *Foxp2* na razvoj živčanog sustava istražena je uz pomoć mišjeg modela u kojemu je onemogućeno djelovanje *Foxp2* gena (eng. *knockdown* za *Foxp2*). U moždanoj kori ovih miševa je spriječeno kretanje radijalnih prekursora u razvojnoj fazi, što ukazuje na to kako gen utječe na regulaciju izrastanja dendrita i aksona u vrijeme razvoja [12]. Međutim, jedino je za ljudski *FOXP2* pokazano da u slučaju njegove pretjerane izraženosti dolazi do dodatnog stvaranja stanica intermedijarnih progenitora i neurona. Kada se ovo otkriće primijeni na obitelj KE, onda je zamjena aminokiselina koja je pronađena u njihovom FOXP2 proteinu odgovorna za povećanje broja radijalnih prekursora, ali i smanjenje intermedijarnih progenitora i neurona [13].

Ovo pokazuje kako *FOXP2* gen ima značajnu ulogu u razvoju živčanog sustava, a posebice na izrastanje dendrita i aksona.

Potencijalni gen preko kojega bi *FOXP2* mogao utjecati na govor je *CNTNAP2* (eng. *Contactin associated protein-like 2*), gen koji kodira transmembranski protein CASPR2 koji je pronađen u Ranvierovim čvorovima. Taj protein je obilato izražen u ljudskom mozgu i to u regijama bitnima za govor (za razliku od drukčijeg tipa ekspresije u mozgu glodavaca) [14, 15].

Mutacije *CNTNAP2* dovode se u vezu s epilepsijom, jezičnom regresijom, mentalnom retardacijom[16], Touretteovim sindromom [17], a različite varijante u samom genu pokazale su kako je izražen u dobi u kojoj djeca s autizmom počinju govoriti [18].

Uloga *FOXP2* gena u različitim poremećajima, s obzirom na brojna ciljna mjesta djelovanja, govori u prilog njegovog raširenog utjecaja na vrlo složen fenotip.

1.3. *FoxP2* gen u drugih vrsta

FOXP2 nije pronađen samo u ljudi. Njegovi ortolozi se nalaze i među drugim kralježnjacima, a FOXP2 protein je dobro očuvan u različitih vrsta. Zbog toga je moguće proučavati ulogu ovog gena i u drugih vrsta, od kojih neke, kao i čovjek, vokalno komuniciraju.

FOXP2 protein miša i čovjeka razlikuje se u samo tri aminokiseline, dok se onaj u primata (čimpanza, gorila i rezus makaki majmuna) i čovjeka razlikuje u dvije od ukupno 715 aminokiselina: u jednoj se dogodila supstitucija treonina (Thr) u asparagin (Asn) na poziciji 303 (T303N), a u drugoj asparagina u serin na poziciji 325 (N325S).

Stoga se može zaključiti kako je humani oblik *FOXP2* gena evoluirao relativno nedavno jer se kroz evoluciju sisavaca tijekom proteklih 130 milijuna godina, od kada je došlo do odjeljivanja linije glodavaca od linije primata, promijenila samo jedna aminokiselina. Tako se *FoxpP2* gen čimpanze razlikuje od *Foxp2* gena miša u samo jednoj supstituiranoj aminokiselini i to na poziciji D80E. Nakon što se ljudska linija odijelila od zajedničkog pretka kojega je imala sa čimpanzom, došlo je do dodatne zamjene 2 aminokiseline i to na pozicijama T303N i N325S. To upućuje kako je *FOXP2* bio pozitivno selektiran, osobito u tijeku evolucije čovjeka [19, 20].

FOXP2 je visokoočuvani protein. Zamjena Thr u Asn na poziciji T303N čini se jedinstvena samo za čovjeka jer nije pronađena niti u jedne od 28 vrsta sisavaca koji su istraživani, dok se zamjena Asn u Ser na poziciji N325S neovisno dogodila i u mesoždera. To ukazuje kako ova zamjena aminokiseline sama za sebe nije bila dovoljna za pojavu jezika i govora [20].

Dvije aminokiselinske zamjene su istraživane i u drugih životinja te je pronađeno da ih kitovi i delfini, kao sisavci koji se vokalno glasaju, nemaju. Šišmiši pokazuju znatnu varijabilnost u sekvencama *FOXP2* gena te bi neke varijacije u egzonima 7 i 17 mogle biti povezane s tipom eholokacije, ukazujući na moguću ulogu *FoxP2* u razvoju tih eholokacijskih sustava [21].

Kod ptica isto tako ne postoje razlike u aminokiselinskom slijedu koji je kodiran egzonom 7 u *FoxP2*.

Nadalje, iste aminokiselinske zamjene kod današnjeg čovjeka pronađene su i u uzorcima kod dva neandertalca. Vrlo je vjerojatno da se selektivni zamah dogodio negdje prije 300 000 - 400 000 godina kod zajedničkog pretka neandertalca i današnjeg čovjeka [22].

Još se uvijek ne zna točna dinamika selektivnog zamaha, ali je otkriveno da regulatorni dio ljudskog *FOXP2* gena nije prisutan kod neandertalca što bi ga činilo dobrim kandidatom za selektivni zamah [23].

Prisutnost ortologa *FOXP2* kod ptica potakao je daljnja istraživanja kojima se htjelo utvrditi da li je kod ptica pjevica došlo do promjene u sekvenci *FOXP2* analogno onoj dokumentiranoj u čovjeka. Zebrasta zeba posebno je bila zanimljiva za promatranje upravo zbog toga što mužjak počinje pjevati s dostizanjem spolne zrelosti, prilikom čega životinja postupno oblikuje svoju pjesmu koja počinje nalikovati pjesmi tutora, obično oca. Kod ovih zeba *FOXP2* izražaj je osobito jak u arei X, ključnoj sastavnici za učenje pjevanja koja je homolog strijatumu sisavaca [24].

Area X kod zebrastih zeba i kanarinaca izražava za vrijeme razdoblja vokalnog učenja više *FOXP2* gena nego okolno tkivo strijatuma, a utjecaj ovoga gena potvrđen je sprječavanjem funkcije (*knockdown*) *FOXP2* gena u arei X, pri čemu kod životinje dolazi do otežanog učenja pjeva (ispuštanje tonova, neprecizno kopiranje duljine tona te netočne imitacije spektralnih karakteristika) [24]. Unatoč tome što *FOXP2* u zeba nema specifične nukleotidne zamjene koje su se pojavile u humanoj liniji, *FOXP2* vjerojatno sudjeluje u procesu razvoja pjevnog sustava.

Usporedne studije *FOXP2* tako još uvijek nemaju izravnu poveznicu između promjene sekvenca i sposobnosti za učenje glasanja, no samom činjenicom da je *FOXP2* pojačano izražen u ptica pjevica ukazuje kako ima utjecaj u neuralnim promjenama vezanim uz učenje.

1.4. Funkcionalne studije *FOXP2* gena na životinjskom modelu

1.4.1. Mišji model mutacije obitelji KE

Postoji još jedan pristup kojim su znanstvenici pokušali razumjeti ulogu *FOXP2* gena u ljudi. Uz pomoć mišjeg modela razvili su mutantni oblik *FOXP2* gena koji nosi mutaciju identičnu onoj kod obitelji KE (R552H) [25].

Homozigotni miševi ugibali bi 3-4 tjedna nakon rođenja s teškim zaostatkom u razvoju, abnormalno malim malim mozgom, a glasanja bi im bila rijetka u odnosu na heterozigotne miševe i miševe divljeg tipa. Za razliku od njih, heterozigotni miševi su bili zdravi i živahni, bez većih poremećaja motorike i anomalija u strijatumu i malom mozgu, što su bile glavne strukturne i funkcionalne promjene kod zahvaćenih članova obitelji KE.

Unatoč tome što nisu pokazivali znakove većeg deficita funkcija, pokazali su otežano motoričko učenje prilikom trčanja po kotaču i nisu uspjeli producirati dugoročnu depresiju

nakon visoko frekventne stimulacije (LTD), oblik sinaptičke plastičnosti prilikom stimulacije glutamatergičkih sinapsi [26].

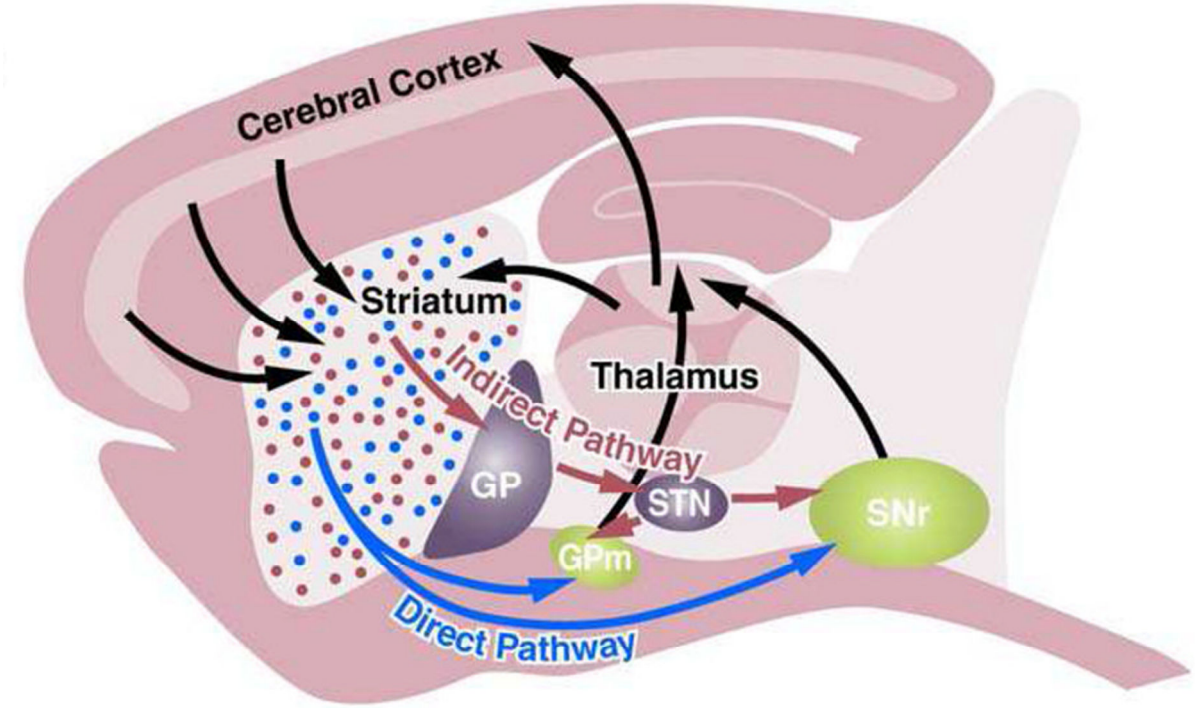
1.4.2. Humanizirani miš

Druga skupina znanstvenika ponudila je model za proučavanje stvaranjem transgeničnog miša koji izražava humani oblik *Foxp2* gena u miša, s aminokiselinskim zamjenama koje su karakteristične ljudskim (zamjena Thr u Asn na poziciji 303 i Asn u Ser na poziciji 325).
Daljnji zadatak koji su si postavili bio je istražiti čitav spektar utjecaja ovoga gena na fenotip, što je uključivalo usporedbe u ponašanju životinja te neurofiziološka, neurogenetička i neurohistološka istraživanja. Za razliku od homozigotnih miševa za mutaciju R552H, homozigotni humanizirani miševi su bili potpuno zdravi i normalno plodni te nisu pokazivali veća odstupanja u ponašanju ili neke anatomske abnormalnosti.
Ta studija je potvrdila regije u mozgu u kojima je *Foxp2* gen jako izražen. Riječ je o kori velikog mozga (osobito u stanicama sloja VI), strijatumu, talamusu i Purkinjeovim stanicama malog mozga. U ponašanju, miševi se nisu znatnije razlikovali od miševa divljeg tipa, iako su neki parametri pokazali nešto niže vrijednosti prilikom mjerenja sposobnosti istraživanja nove okoline. Neurokemijski, *Foxp2* miševi su imali niže koncentracije dopamina u moždanoj kori, globusu palidusu, strijatumu i malome mozgu, no drugi neurotransmitori (serotonin, glutamat i GABA) nisu pokazali promjene u koncentraciji u odnosu na miševe divljega tipa. Razlika prema miševima divljeg tipa pronađena je u genskoj izraženosti *Foxp2* u strijatumu, a pronađeno je i mnogo gena koji su u humaniziranome mišu izraženi u srednje velikim neuronima strijatuma i izražavaju dopaminski receptor D1, a regulirani su samim *Foxp2* genom [27].
Elektrofiziološka obilježja projekcijskih srednje velikih neurona strijatuma (MSN) u staničnoj kulturi također su ostvarila jaču dugoročnu depresiju nakon visoko frekventne stimulacije (LTD) od miševa divljeg tipa, a potpuno suprotno od miševa s mutacijom R552H.
Morfološka ispitivanja nasumičnim odabirom neurona pokazala su da humanizirani miševi imaju nešto dulje dendrite i aksone od miševa divljeg tipa isključivo u neuronima koji su dio kortiko-bazalnih neuralnih krugova, kao što su projekcijski srednje veliki neuroni strijatuma. Stupanj promjena na dendritima korelirao je sa stupnjem ekspresije *Foxp2* gena [28].

1.5. Projekcijski srednje veliki neuroni strijatuma - dio kortiko-strijatalnih neuralnih krugova

Strijatum (nucleus caudatus i putamen) su bazalni ganglij telencefalona koji primaju masivne projekcije iz gotovo svih područja kore velikoga mozga.
Najbrojniju skupinu neurona u strijatumu čine GABAergički trnasti srednje veliki neuroni i to čak 95% neurona strijatuma glodavaca. Stoga su oni glavni cilj ulaznih projekcija, ali i glavni izvor izlaznih projekcija strijatuma.
Najveći broj aferentnih vlakana dolazi iz kore velikoga mozga, supstancije nigre i talamusa. Vlakna koja dolaze iz kore velikog mozga projiciraju se povratno u koru preko talamusa. Unutar sustava kortiko-supkortiko-kortikalnih veza postoje dva različita puta, tzv. izravni i neizravni. Izravni put je sastavljen od ekscitacijskih kortiko-strijatalnih, inhibicijskih strijato-palidalnih, inhibicijskih palido-talamičkih i ekscitacijskih talamo-kortikalnih projekcija. Vlakna kortiko-strijatalnih projekcijskih neurona završavaju na srednje velikim neuronima koji sadrže i GABA i supstancu P kao neurotransmitore te nose D1 dopaminske receptore. Strijato-palidalni projekcijski neuroni se zatim projiciraju na unutarnji dio globus palidusa (GPi-*globus pallidus pars interna* u primata*, GPm- globus pallidus, pars medialis* u glodavaca) [29]. Aktivacija izravnog puta iz moždane kore dovodi do poticanja izlaznih talamičkih neurona natrag prema kori (*"positive feed-back"*) i dovodi do aktivacije kortikalnih premotoričkih krugova i selekciju ili facilitaciju pokreta.
Neizravni put uključuje ekscitacijske kortiko-strijatalne projekcije koje završavaju na trnastim srednje velikim neuronima koji sadrže i GABA i enkefalin kao neurotransmitore te nose D2 dopaminske receptore, inhibicijske strijato-palidalne projekcije koje završavaju na vanjskom dijelu globus palidusa (GPe-*globus pallidus pars externa* u primata, GP-*globus pallidus* u glodavaca), inhibicijske projekcije iz GPe do suptalamičke jezgre (*nucleus subthalamicus*) i ekscitacijskih projekcija iz suptalamičke jezgre do GPi. Kortikalna aktivacija neizravnog puta dovodi do disinhibicije suptalamičkih neurona što rezultira povećanjem suptalamičke aktivacije GPi. Konačno, povećanje aktivacije GPi smanjuje talamičku aktivaciju kortikalnih neurona. Dakle, rezultat kortikalne aktivacije neizravnog puta je suprotan onome izravnog puta - smanjenje aktivnosti kore velikog mozga (*"negative feed-back"*). *Substantia nigra, pars reticulata* dio je i izravnog i neizravnog strijatalnog puta.
Informacije koje iz moždane kore dolaze do bazalnih ganglija i koje se preko talamusa vraćaju natrag u moždanu koru tvore nekoliko paralelnih i funkcionalno odvojenih sustava

petlji. Najznačajnije su motorička petlja, koja uključuje motoričke i premotoričke dijelove korteksa; asocijativna ili kognitivna petlja, koja uključuje dorzolateralni prefrontalni korteks i limbička petlja koja uključuje orbitalni i medijalni prefrontalni korteks.
Protok informacija iz kore velikog mozga preko bazalnih ganglija je na razni strijatuma moduliran dopaminergičkim vlaknima koja dolaze iz ventralnog mezencefalona. Iako je njihova sinaptička aktivnost različita, dopaminergički utjecaj na izravni i neizravni put na kraju dovodi do sinergije aktivnosti: poticanja pozitivnog "feed-back" učinka (preko izravnog puta) i inhibiciju negativnog "feed-back" učinka na koru (preko neizravnog puta) [30].



Slika 1.2 Shematski prikaz izravnog i neizravnog puta neuralnih krugova bazalnih ganglija. Sagitalni prikaz mišjeg mozga u kojemu su prikazani neuralni krugovi: kora velikog mozga-bazalni gangliji-talamus- kora velikog mozga. Aksoni iz talamusa i strijatuma stvaraju ekscitacijske sinapse na strijato-nigralnim (izravni put-plavo) i strijato-palidalnim srednje velikim neuronima strijatuma (MSN) (crveno). U izravnom putu MSN šalju aksone direktno na izlazne jezgre bazalnih ganglija (*globus pallidus medialis*, GPm i *substantia nigra, pars reticulata*, SNr) gdje stvaraju inhibitorne sinapse. U neizravnom putu MSN inhibiraju neurone u globus palidusu (GP) koji zatim stvaraju

inhibitorne veze sa suptalamičkom jezgrom (STN). Projekcije iz STN odlaze do GPm i SNr gdje stvaraju ekscitacijske sinapse na GABAergičkim izlaznim neuronima bazalnih ganglija. Ti inhibitorni, izlazni neuroni šalju pak aksone u ventroposteriornu talamičku motornu jezgru. Na kraju se glutametergički neuroni u talamusu projiciraju natrag u moždanu koru, zatvarajući krug (preuzeto iz [29]).

1.6. Dosadašnje spoznaje o morfologiji trnastih srednje velikih neurona strijatuma

S obzirom na to da trnasti srednje veliki neuroni čine najbrojniju skupinu neurona strijatuma, podatci o njihovoj morfologiji i funkciji su bitni za razumijevanje strukture kortiko-bazalnih krugova i njihovu funkciju kako u normalnim uvjetima, tako i u različitim bolestima [31]. Morfološke studije koje su koristile Golgi metodu, kao i studije s unutarstaničnim bojanjem, kvalitativno su opisale različite tipove srednje velikih neurona strijatuma i to u miša [32], štakora [33, 34], majmuna [35] i čovjeka [36, 37].
Te su studije pružile podatke o ukupnoj dužini dendritičkog stabla, tipu grananja dendrita i gustoći dendritičkih trnova te time pokazale morfološke sličnosti između molekularno različitih podtipova ovih neurona [34, 35].
U mišjem strijatumu neuronalna klasifikacija se temelji na sljedećim kriterijima [32]: 1) veličini i obliku tijela neurona, 2) broju dendrita koji izlaze iz tijela, 3) dužini dendritičkog stabla i tipu grananja, i 4) prisustvu ili odsustvu trnova na tijelu stanice i/ili dendritima. Preko 90% neurona mišjeg strijatuma ima karakterističnо tijelo neurona koje je okruglo, ovalno, vretenasto ili trokutasto s promjerom duž dulje osi od 11 do 20 μm i površinom od 236 μm^2. Mnogo veća tijela nalaze se više kaudalno u strijatumu, dok se manja tijela nalaze više dorzalno i rostralno. U većini neurona 4-8 primarnih dendrita odlazi od tijela i grana se do dendrita četvrtoga reda. Ukupna dužina dendrita vrlo je varijabilna od stanice do stanice te dendrit ima u prosjeku dužinu od 200-350 μm, a usmjereni su u dva smjera: mediolateralno i dorzoventralno [38]. Debljina većine dendrita iznosi 1-2 μm. Dendritički završetci su uglavnom tanji prema kraju dendrita, prekriveni trnovima s gustoćom od 7.2 trna/10 μm po dužini dendrita [37]. Tijelo neurona, primarni dendriti te početni dijelovi sekundarnih dendrita su gotovo bez trnova. Ostatak dendrita prekriven je gusto poredanim trnovima. Akson uglavnom odlazi od tijela neurona ili od primarnog dendrita.
S obzirom da detaljne morfološke studije projekcijskih srednje velikih neurona strijatuma, osobito segmentalna dendritička analiza [39, 40] nisu učinjene, u ovoj disertaciji su po prvi

puta definirane detaljne trodimenzionalne vrijednosti morfoloških parametara projekcijskih neurona strijatuma, kao važnom neuroanatomskom dijelu bazalnih ganglija i to u miševa divljeg tipa te u transgeničnih životinja koje nose humanizirani *Foxp2* gen.

2. HIPOTEZA

Ova disertacija je temeljena na hipotezi da će u miša s humaniziranim oblikom *Foxp2* gena doći do promjene u morfologiji dendritičkog stabla i gustoći dendritičkih trnova na trnastim srednje velikim neuronima strijatuma te da su ove promjene vezane uz zamjenu aminokiselina na poziciji T302N koja je specifična samo za čovjeka. Očekuje se da će promjene u morfologiji pokazivati regionalne razlike.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj rada

Opći cilj ovog rada je detaljno istražiti način na koji humanizirani oblik *Foxp2* gena ($Foxp2^{hum}$) utječe na morfologiju trnastih srednje velikih neurona strijatuma u miša ($Foxp2^{hum}$ nosi supstituciju na pozicijama T302N i N324S koje razlikuju čovječji i mišji *Foxp2* gen). Koristeći dvije dodatne linije transgeničnih miševa koje nose samo jednu od ove dvije supstitucije (T302N ili N324S) cilj je otkriti da li je supstitucija na poziciji T302N u miša s potpuno humaniziranim genom ta koja utječe na morfološke promjene na neuronima s obzirom na to da je specifična samo za čovjeka.

3.2. Specifični ciljevi rada

Specifični ciljevi su bili trodimenzionalno rekonstruirati neurone u tri linije transgeničnih životinja ($Foxp2^{hum}$, $Foxp2^{T302N}$ i $Foxp2^{N324S}$) i vrijednosti usporediti s vrijednostima kontrolne skupine miševa divljeg tipa ($Foxp2^{wt}$) koje su uzgojene i eksperimentalno obrađene paralelno sa svakom transgeničnom linijom, s ciljem da se:

1) uspostave kvantitativni morfološki parametri dendritičkog stabla i broja dendritičkih trnova na trnastim srednje velikim neuronima dorzalnog strijatuma impregniranih Golgi Cox metodom koristeći *FD Rapid GolgiStain™ Kit* za cijeli strijatum,

2) uspostave kvantitativni morfološki parametri za pojedine regije dorzalnog strijatuma (rostralni, dorzomedijalni, dorzolateralni i kaudalni) i analiziraju:

a) regionalne razlike u miševa divljeg tipa,

b) razlike između pojedine transgenične linije i pripadajućeg kontrolnog uzorka divljeg tipa za svaku regiju i

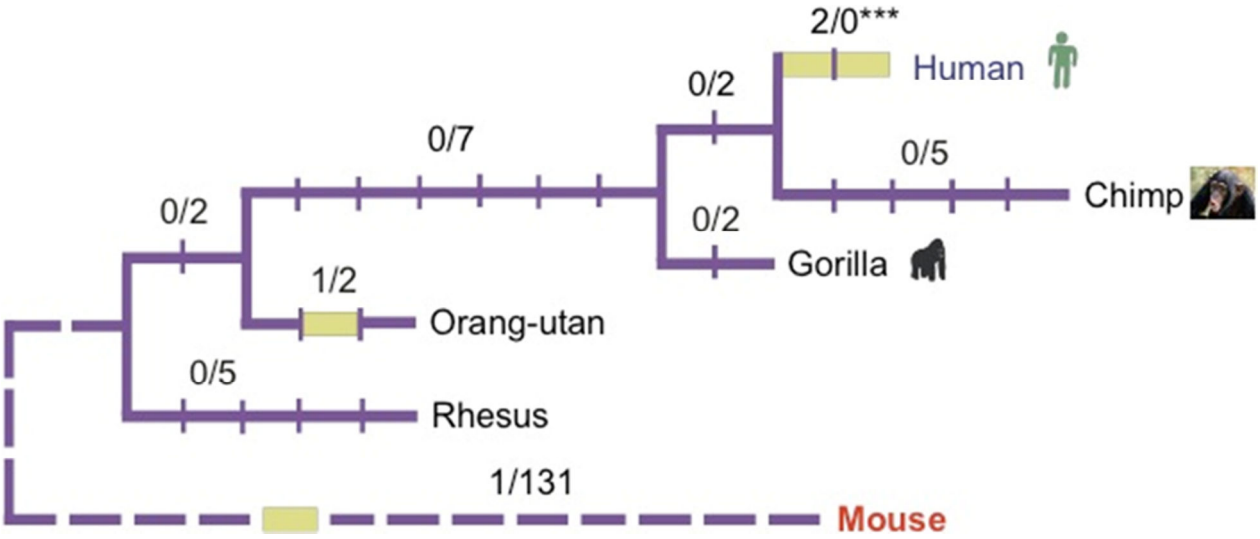
c) regionalne razlike u svakoj transgeničnoj liniji.

4. MATERIJALI I METODE

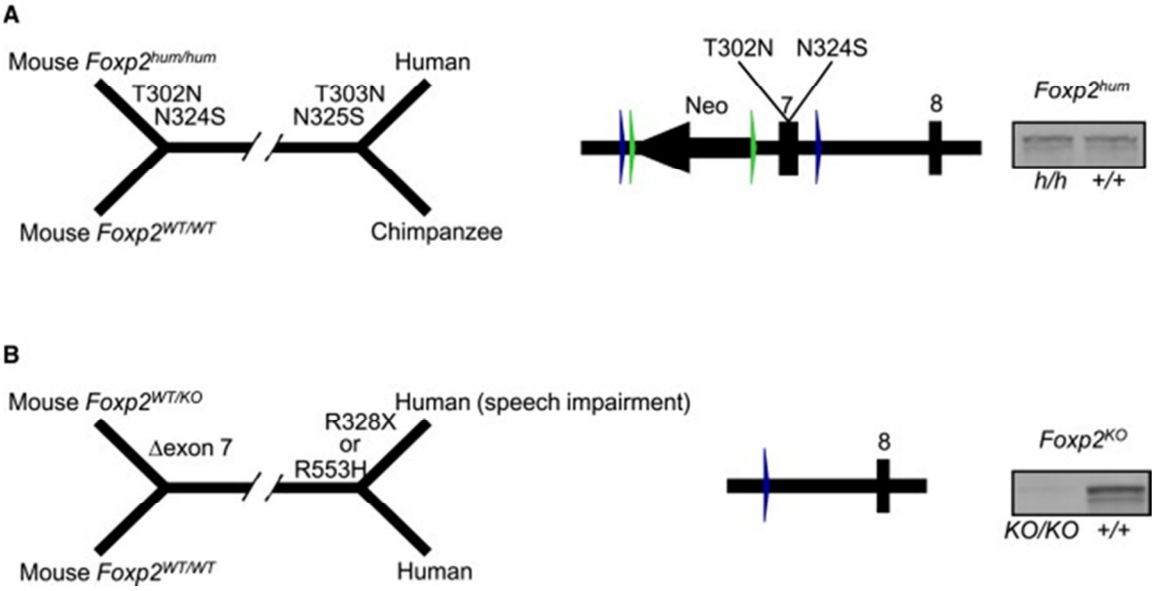
Za potrebe ovog istraživanja korišten je postmortalni materijal moždanog tkiva 30 miševa. (Tablice 4.1-4.3.) Žrtvovanje i obrada materijala moždanog tkiva izvedeni su u Institutu za evolucijsku antropologiju Max Planck instituta u Leipzigu u skladu s državnim i institucijskim smjernicama Republike Njemačke.

4.1. Dobivanje i držanje životinja koje izražavaju *Foxp2* ^{hum}, *Foxp2* ^{T302N} i *Foxp2* ^{N324S} alel

S obzirom na pretpostavku da je tijekom evolucije čovjeka došlo do zamjene dva nukelotida koji su smješteni na 7. egzonu *FOXP2* gena (slika 4.1.), te su dvije zamjene ubačene u ortologni egzon mišjeg *Foxp2* gena uz pomoć homologne rekombinacije u embrionalne matične stanice staničnog klona C57BL/6 pri čemu je stvoren miš s humaniziranim alelom (*Foxp2*^{hum}) (slika 4.2).
Genomskim metodama potvrđeno je da životinje nose točnu mutaciju.
Uz liniju s humaniziranim alelom stvorene su i dvije dodatne životinjske linije od kojih jedna u svom endogenom *Foxp2* genu ima zamijenjen treonin za asparagin na mjestu 302 (T302N; N303 u ljudi), a druga ima zamijenjen asparagin za treonin na mjestu 324 (N324S; S325 u ljudi).
Ciljni vektori za stvaranje alela *Foxp2* ^{T302N} i *Foxp2* ^{N324S} stvoreni su ciljanom mutagenezom istih ciljnih vektora koji su korišteni za dobivanje *Foxp2*^{hum} alela (detalji su opisani u radu Enarda i suradnika 2009. godine [27]).
Životinje s *Foxp2*^{hum} alelom dobivene su u kompaniji Ozgene Inc. (Bentley, Australija).
Uz ove tri linije miševa dobivena je i linija miševa divljega tipa.
Sve linije miševa korištene u ovom istraživanju dobivene su ili od heterozigotnih roditelja ili od različitih legala homozigotnih roditelja tako da *Foxp2*^{wt} miševi imaju svoju braću ili unuke u svakoj od tri linije.
Svaka linija životinja je prva četiri tjedna držana u kavezu zajedno s majkom, a nakon odvajanja su životinje podijeljene po spolu.
Životinje su držane u uvjetima 10h/14h noć/dan ciklusa unutar uobičajenih uvjeta.



Slika 4.1. Nukleotidne zamjene u filogenetskom stablu primata. Preuzeto iz [19]. Okomite linije pokazuju nukleotidne zamjene, a žuti pravokutnici zamijenjene aminokiseline. (Prijevod: human-čovjek, chimp-čimpanza, mouse-miš).



Slika 4.2. Ubacivanje humanog *FOXP2* u mišji genom. Preuzeto iz [27]: (A) Stvaranje *Foxp2* knock-in alela (*Foxp2*^{hum}). *Foxp2*^{hum} nosi zamjene T302N i N324S koje su ortologne humanim zamjenama. (B) Stvaranje nefunkcionalnog Foxp2^{ko} alela koji imitira besmislenu (*nonsense*) mutaciju R328X [41] i mutaciju krivog smisla (*missense*) R553H [4] u ljudi s poremećajima u govoru.

4.2. Uzimanje i obrada materijala

Mozgovi dobiveni za potrebe ovog istraživanja uzeti su od miševa starih u rasponu od 75 do 303 dana. Ukupno je obrađeno 30 mozgova, od čega je 26 miševa bilo u ranoj odrasloj dobi, starosti od 75-95 dana.

Izolirano tkivo obrađeno je prema protokolu FD Rapid GolgiStain kit (FD NeuroTechnologies, Ellicott City, MD, USA).

1. Eksperimentalne životinje duboko su anestezirane prije žrtvovanja. Mozgovi su u kratkom vremenskom roku odvojeni od lubanje.
2. Tkivo je brzo isprano u dvostruko destiliranoj vodi kako bi se uklonili ostatci krvi.
3. Tkivo je zatim uronjeno u impregnacijsku otopinu koja je dobivena miješanjem Otopine A i B u jednakom omjeru i pohranjeno na sobnu temperaturu u tamnoj prostoriji na 2 tjedna (uz jednu zamjenu nakon 12h).

Korišteno je najmanje 5 mL impregnacijske tekućine za svaki kubni centimetar uzetog tkiva. Dva puta tjedno su se posude s tkivom lagano miješale za trajanja impregnacije. Svi postupci su rađeni u zaštićenim uvjetima.

4. Tkivo je preneseno u Otopinu C i pohranjeno na sobnu temperaturu minimalno 72h. Tekućina je zamijenjena nakon 24 sata svježom otopinom.
5. Rezovi debljine 200 μm, prethodno kratkotrajno smrznuti na -20°C to -22°C (najmanje 4 sata), rezani su kriomikrotomom (Microm Thermo Scientific, Walldorf, Germany).

Svaki rez prebačen je potom u staklenu posudu i postavljen na predmetna stakalca prekrivena želatinom i Otopinom C. Višak tekućine uklonjen je Pasterovom pipetom i filter papirom. Preparati su ostavljeni da se prirodno suše na sobnoj temperaturi.

4.3. Bojanje tkiva

Golgi metoda

Golgi metoda je jedina metoda koja omogućava analizu cjelokupne morfologije pojedinačnog neurona. Otkrio ju je Camilo Golgi, a najveći doprinos u istraživanjima je tom metodom pružio Santiago Ramon y Cajal. Metoda je zasnovana na impregnaciji neurona srebrnim solima, gdje se prilikom uspješne impregnacije boji 1-4% (najviše do 10%) neurona. Unatoč impregnaciji samo manjeg postotka neurona, omogućena je analiza cjelokupne morfologije pojedinačnog neurona. Osnovna poteškoća metode je da uspijeva samo kada je kratko postmortalno vrijeme, a rezultati uspješnosti impregnacije mogu biti vrlo varijabilni [42, 43].

Moždano tkivo bojano je Golgi Cox metodom koristeći **FD Rapid GolgiStain™ Kit** (FD NeuroTechnologies, Ellicott City, MD, USA) prema uputi proizvođača (slika 4.3).

Sastav kutije

	PK401A	**PK401**
Otopina A	125 ml	250 ml
Otopina B	125 ml	250 ml
Otopina C	125 ml x 2	250 ml x 2
Otopina D	125 ml	250 ml
Otopina E	125 ml	250 ml
Staklena posuda za uzorke	2	2
Prirodni kist	2	2
Kapaljka	1	1
Plastični forceps	1	1

Ostali potreban materijal

1. Dvostruko destilirana ili Milli-Q voda
2. Plastične/staklene epruvete ili staklene bočice
3. Histološki pribor:

- Predmetna stakalca prekrivena želatinom
- Pokrovna stakalca
- Posude za bojanje
- Etanol
- Ksilen
- Permount®
- Svjetlosni mikroskop.

Postupak bojanja

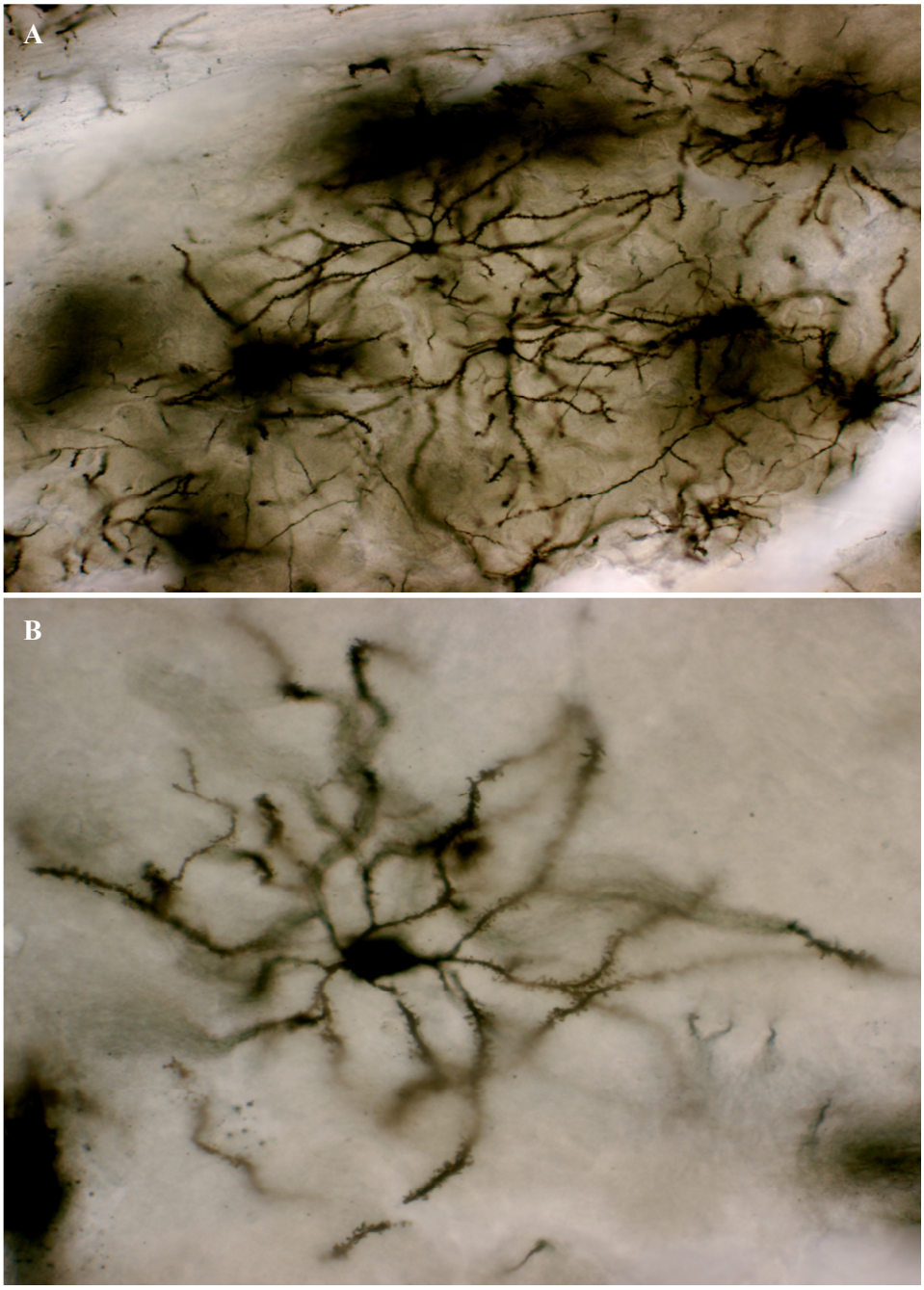
1. Rezovi su 2x isprani u dvostruko destiliranoj vodi, svaki po 4 minute.
2. Rezovi su stavljeni u mješavinu otopina u omjeru 1 količina Otopine D, 1 količina Otopine E i 2 količine dvostruko destilirane vode na 10 minuta.

(Npr. Otopina D 10 ml
Otopina E 10 ml
Dvostruko destilirana voda 20 ml).

- Radna otopina pripremljena je neposredno prije upotrebe i bila je dostatna za obradu do 100 presjeka na 100 mL (ovisno o debljini presjeka).
- Sva radna oprema (bočice i posuda za bojanje bili su prekriveni kako bi se izbjeglo hlapljenje reagensa).
- Za vrijeme inkubacije, radna otopina se često miješala i nije bilo dozvoljeno sušenje preparata između bilo kojeg koraka u tijeku bojanja ili prije stavljanja pokrovnice.

3. Presjeci su zatim isprani u dvostruko destiliranoj vodi 2x po 4 minute (destilirana voda se redovito zamjenjivala).
4. Dehidracija preparata rađena je u 50%, 75% i 95% etanolu i to u svakoj koncentraciji po 4 minute.
5. Posljednji stupanj dehidracije izvršen je u apsolutnom etanolu 4x po 4 minute za svaki presjek.
6. Zatim je uslijedilo ispiranje u ksilenu i to 3x po 4 minute za svaki preparat i na kraju je preparat pokriven s medijem za pokrivanje Permount® (Fisher Scientific).

 Preparati dobiveni Golgi bojanjem bili su zaštićeni od djelovanja svjetlosti kad god je to bilo moguće.



Slika 4.3 (A-B) Reprezentativne mikrofotografije trnastih srednje velikih neurona strijatuma impregniranih Golgi Cox metodom.

Tablica 4.1 ***Foxp2*** ^{hum}

(Kratice: F-ženski, M-muški; KI-transgenične životinje, WT-životinje divljeg tipa)

Podatci o životinji			
Broj životinje	**Starost (d)**	**Spol**	**Genotip**
3448	251	F	KI
3437	254	F	WT
3371	303	M	WT
3373	303	M	KI
3621	74	F	WT
3633	77	M	WT
3667	76	F	KI
3673	76	M	KI
3640	77	F	KI
3660	77	M	WT
3657	77	F	WT
3649	77	M	KI

Tablica 4.2 ***Foxp2*** ^{N324S}

(Kratice: F-ženski, M-muški; KI-transgenične životinje, WT-životinje divljeg tipa)

Podatci o životinji			
Broj životinje	**Starost (d)**	**Spol**	**Genotip**
542	92	M	KI
571	89	M	KI
580	77	F	KI
562	89	F	KI
538	92	M	WT
570	89	M	WT
581	77	F	WT
582	77	F	WT

Tablica 4.3 ***Foxp*** ^{T302N}

(Kratice: F-ženski, M-muški; KI-transgenične životinje, WT-životinje divljeg tipa)

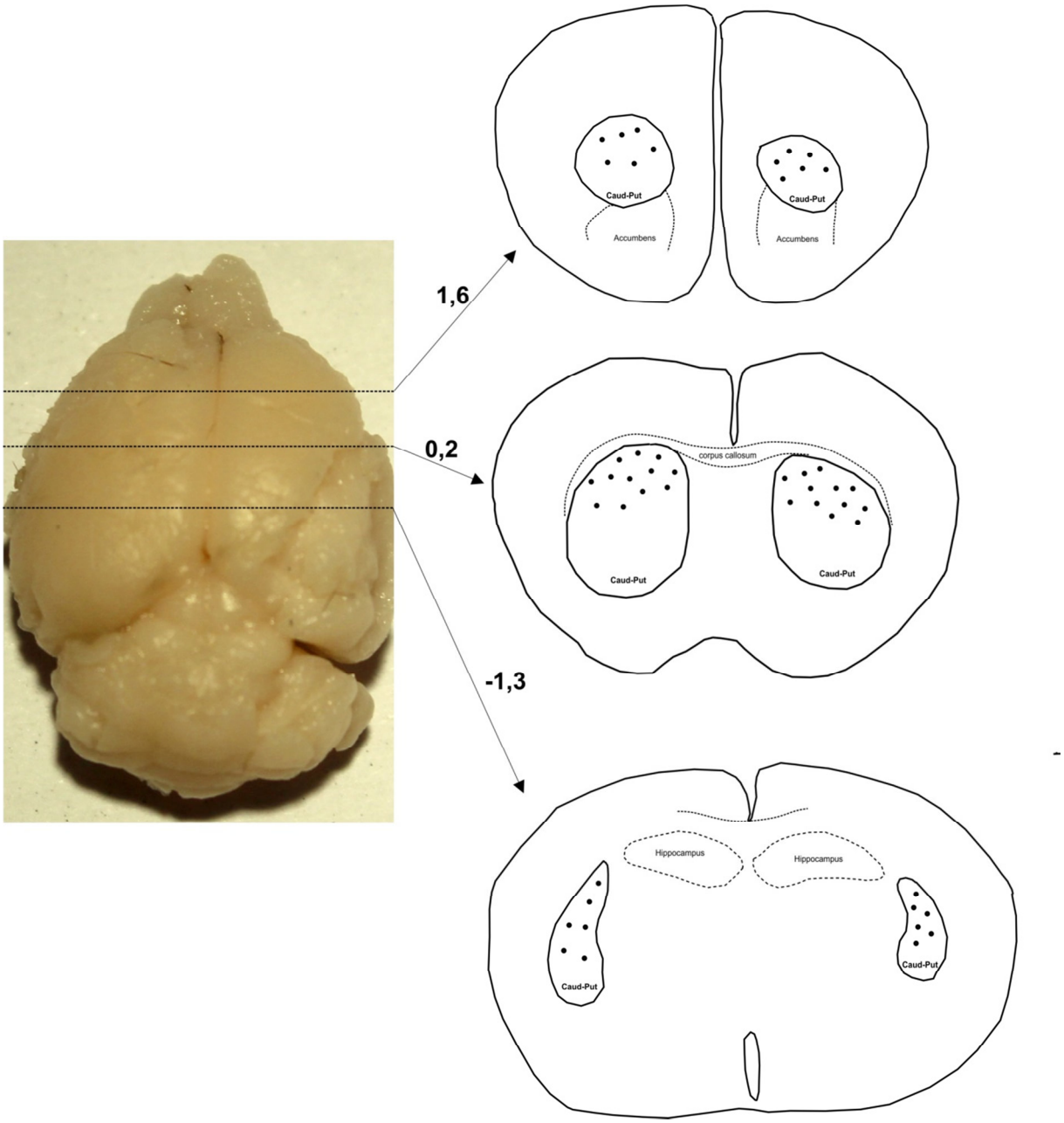
Podatci o životinji			
Broj životinje	**Starost (d)**	**Spol**	**Genotip**
219	95	F	KI
221	94	F	KI
223	95	M	KI
222	95	M	WT
225	95	M	KI
226	95	M	WT
248	83	F	KI
249	83	F	WT
241	89	M	KI
240	89	M	WT

4.4. Morfološka analiza

U ovome radu kvantitativno je analizirano dendritičko stablo i gustoća dendritičkih trnova projekcijskih srednje velikih neurona strijatuma.
Ukupno je analizirano 324 neurona.

4.4.1. Identifikacija analiziranih regija

Trnasti srednje veliki neuroni su analizirani u četiri regije (dorzomedijalni- DM, dorlolateralni-DL, rostralni-ROST i kaudalni-CAUD strijatum). U svakoj regiji je analizirano 3-5 neurona po životinji.
Podjela strijatuma je bazirana na prethodnim radovima u kojima su rađena elektrofiziološka mjerenja [27, 28].
Analizirani su samo presjeci s jasno ograničenim i očuvanim granicama strijatuma. Oštećeni i nedovoljno dobro obojani preparati nisu uzeti u analizu.
Rostralni strijatum u ovoj studiji predstavlja najrostralniji presjek u kojemu se mogu jasno definirati trnasti srednje veliki neuroni, a seže dorzalno do presjeka koji prolazi sredinom strijatuma.
Dorzalnim se strijatumom smatrao onaj dio strijatuma iznad transverzalne ravnine kroz sredinu strijatuma koja ga dijeli na dorzalni i ventralni dio. Sredina strijatuma se definira na mjestu gdje je strijatum na presjeku najširi.
Od tog dorzalnog strijatuma dorzomedijalni dio obuhvaća medijalnu polovicu dorzalnog dijela i to dio uz samu moždanu komoru, a dorzolateralni strijatum obuhvaća lateralnu polovicu dorzalnog strijatuma. Kaudalni strijatum je ovdje definiran granicom početka pojave hipokampusa na presjecima mozga i svi rezovi kaudalnije od toga presjeka do kraja vidljivosti strijatuma (slika 4.4).
Rekonstruirani su samo neuroni koji su očuvani kroz cijeli presjek ili koji su imali jasno vidljive dendrite s potpunim završetcima. Korekcijski faktor za skvrčavanje nije primijenjen.



Slika 4.4 Koronarni presjeci uzduž rostro-kaudalne osi strijatuma gdje su uzimani neuroni za 3D rekonstrukciju. Broj označava položaj presjeka u odnosu na bregmu (mm). Točkama su označeni neuroni odabrani za analizu unutar pojedinih regija kaudatus-putamen kompleksa (zaokruženi dijelovi označeni kao caud-put).

4.4.2. Rekonstrukcija dendritičkog stabla

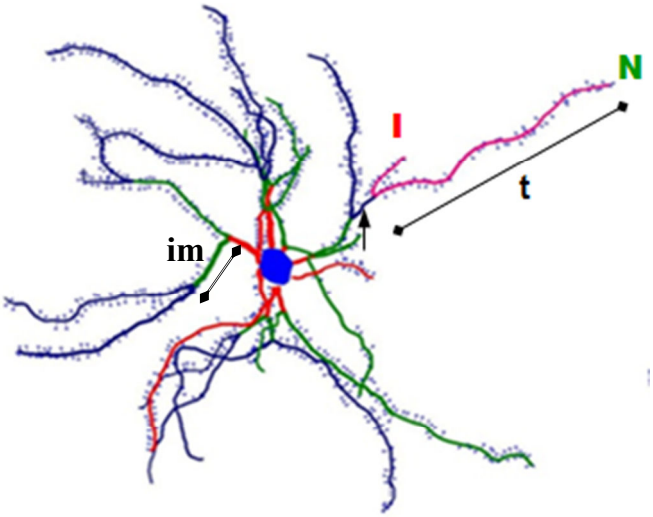
Za potrebe kvantitativne morfometrijske analize korišten je kompjutorski program Neurolucida software verzija 10 (MBF –Bioscience, Williston, ND, USA) i sustav koji se sastoji od motoriziranog Olympus BX61 mikroskopa s pokretanjem u dubinu (z-os) na kojemu je postavljen motorizirani stolić s pokretanjem naprijed-nazad i lijevo-desno (x-y-osi), a kojim se upravlja preko elektroničke poveznice (MAC5000) (Ludl Electronic Products Ltd). Mjerenja su rađena pod povećanjem 40x. Neuroni su crtani izravno na monitoru prilikom uživo dobivene slike preparata (slika 4.5). Nakon dovođenja slike u oštar fokus odredi se referentna točka koja služi kao kontrola da je preparat uvijek točno orijentiran, a zatim se određuju i ocrtavaju granice strijatuma i granice regije od interesa. Promjene u dubini (z-dimenzija) određuju se za svaku ucrtanu točku i automatski se ispravljaju. X-Y koordinate se također određuju za svaku točku u odnosu na referentnu točku.

Nakon označavanja referentne točke, kreće se u odabir neurona. Sustav prati svaki pomak i ovisno o tome automatski se pomiče u odnosu na referentnu točku. Nakon što se odaberu neuroni započinje se s rekonstrukcijom. Rekonstrukcija kreće redoslijedom od tijela neurona prema dendritima.

Kada se dođe do kraja dendrita posebno se označava normalni ili prekinuti završetak (za dendrite prerezane na rubu preparata ili ga zbog precipitata nije moguće ispratiti). Nakon toga se uređaj automatski vraća na posljednje grananje te se nastavlja s rekonstrukcijom sljedeće grane odgovarajućeg izdanka. Kada je dendrit u potpunosti rekonstruiran uređaj se automatski vraća na ishodište sljedećeg dendrita na tijelu neurona.

Nakon završetka rekonstrukcije dendritičkog stabla, prelazi se na obilježavanje dendritičkih trnova. Dendriti s najbolje vidljivim trnovima se odabiru i označavaju nakon što je u računalu naznačeno da slijedi obilježavanje trnova.

Nakon što su izvršena sva mjerenja, podatci se pohranjuju u računalo zajedno sa svim ostalim identifikacijskim podatcima o neuronu.



Slika 4.5 Rekonstrukcija srednje velikog neurona strijatuma Neurolucida sustavom.
Skala pokazuje jedan terminalni segment (t). Terminalni segment je segment između završne točke dendrita (N) i zadnje točke grananja prije završne točke (strelica). Završna točka dendrita je definirana kao normalna (N). Kada dendrit završava na rubu preparata ili se njegov nastavak dalje ne može pratiti do njegovog stvarnog kraja, segment se označava kao nepotpun (I). Intermedijarni segment je segment između polazišta dendrita i prve točke grananja ili između dvije uzastopne točke grananja (im).

4.4.3. Parametri morfološke analize

Parametri koji slijede korišteni su za potrebe morfološke analize trnastih srednje velikih neurona strijatuma:

a) opći morfološki parametri:

- površina tijela neurona (μm^2)
- broj segmenata (n)
- broj dendrita (n)
- broj segmenata po dendritu (n)
- ukupna dužina dendrita (μm)
- dužina po dendritu (μm)
- bazalni promjer dendrita (μm)
- prosječni promjer dendrita (μm)
- udaljenost terminalnih segmenata (μm)
- udaljenost nepotpunih segmenata (μm)
- površina dendrita (μm^2)
- volumen dendrita (μm^3)

b) specifični morfološki parametri:

- dužina terminalnog segmenata (μm)
- volumen terminalnog segmenata (μm^3)
- dužina intermedijarnog segmenta (μm)
- volumen intermedijarnog segmenta (μm^3)
- dužina nepotpunog segmenta (μm)
- volumen nepotpunog segmenta (μm^3)

c) parametri gustoće dendritičkih trnova:

- gustoća trnova po dužini dendrita ($n/\mu m$)
- gustoća trnova po površini dendrita ($n/\mu m^2$)
- gustoća trnova na terminalnim segmentima po dužini dendrita ($n/\mu m$)
- gustoća trnova na terminalnim segmentima po površini dendrita ($n/\mu m^2$)
- gustoća trnova na nepotpunim segmentima po dužini dendrita ($n/\mu m$)
- gustoća trnova na nepotpunim segmentima po površini dendrita ($n/\mu m^2$)

Intermedijarni segmenti su segmenti između polazišta dendrita i prve točke grananja ili između dvije uzastopne točke grananja.
Terminalni segmenti su segmenti između završne točke dendrita i zadnje točke grananja prije završne točke.
Nepotpuni segmenti su segmenti kod kojih je bilo nemoguće u potpunosti pratiti dendrit do njegova stvarnog završetka budući da je isti presječen na površini reza te su takvi dendriti isključeni iz analize dužine individualnih segmenata.
Broj dendritičkih trnova je uzet u obzir samo na onim dendritičkim stablima gdje su trnovi bili jasno vidljivi i pogodni za obilježavanje (slika 4.5).

4.5. Statistička obrada podataka

Prikupljeni podatci prikazani su kao srednje vrijednosti podataka po neuronu i životinji (mozgu) te je navedena i standardna devijacija (SD). Podatci između pojedine linije i njene kontrole, linije divljeg tipa, uspoređene su korištenjem Studentovog t-testa pri čemu se vrijednost $p < 0,05$ smatrala statistički značajnom. Deskriptivni parametri pokazali su homogenu distribuciju varijance zbog čega su razlike među linijama i regionalne razlike unutar iste linije testirane parametrijskim testom, jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) i *a posteriori* Student-Neuman-Keuls testom. Vrijednost $p < 0,05$ se smatrala statistički značajnom. Podatci srednjih vrijednosti po životinji (mozgu) su obrađeni dodatno i neparametrijskom analizom te posthoc Mann-Whitney U testom u cilju potvrde statistički značajne razlike između mjerenih parametara.

5. REZULTATI

5.1. Kvalitativna analiza projekcijskih srednje velikih neurona u dorzalnom strijatumu

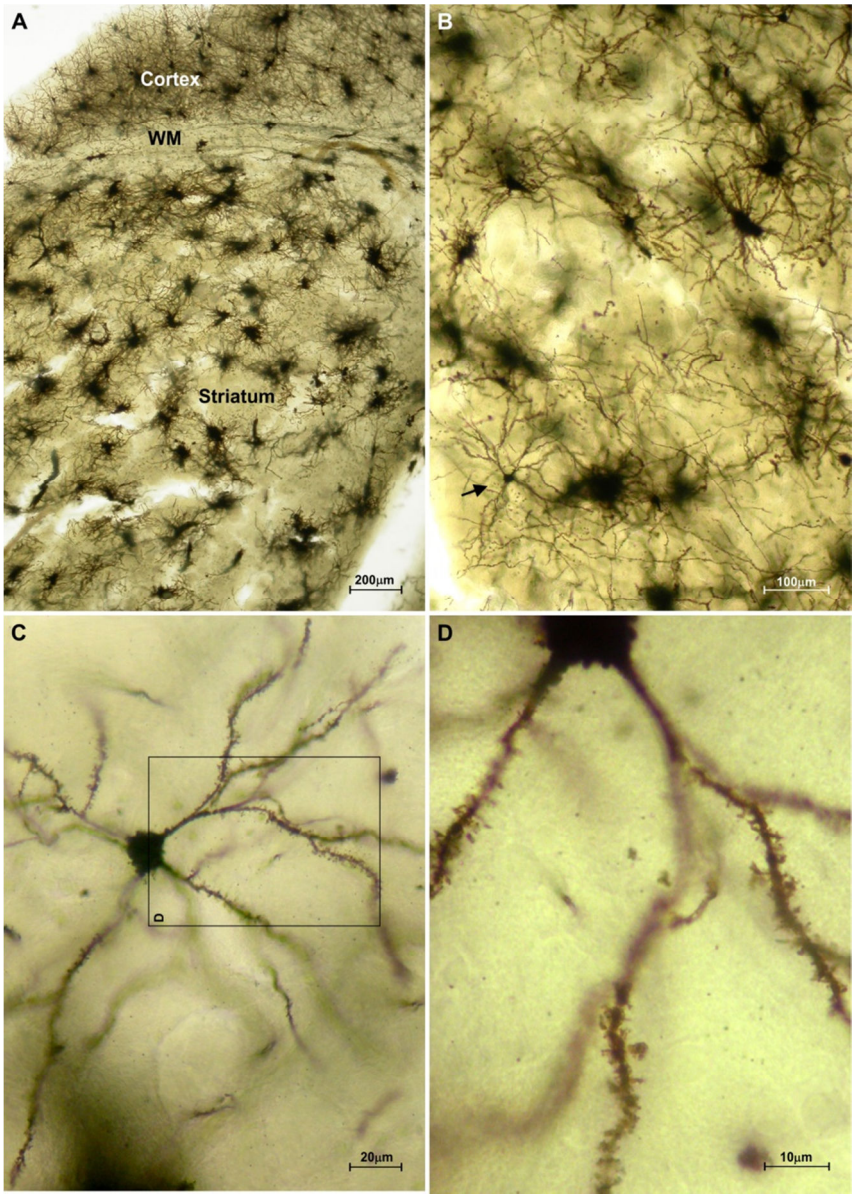
Strijatum je bio dobro impregniran uz vidljivu dominaciju glijalnih stanica s karakterističnim morfološkim oblikom poput „čupavih“ nakupina (slika 5.1A). Najzastupljenija skupina neurona u strijatumu (slika 5.1B) bile su stanice srednje velikog tijela i dobro razgranatih dendrita (slika 5.1C) koje su obilovale dendritičkim trnovima (slika 5.1D). Kod ponekih neurona aksoni su se mogli ispratiti na veće udaljenosti te su imali veliki broj kolateralnih nastavaka. Stanice koje su ispunile kriterije temeljem navedenog kvalitativnog opisa korištene su za kvantitativnu analizu.

U preparatima strijatuma ponekad su bili vidljivi i srednje veliki aspinozni neuroni (s tijelom u promjeru 30-40 μm) koji nisu bili uključeni u analizu.

Projekcijski srednje veliki neuroni strijatuma pokazali su i nerazmjer u odnosima veličine tijela neurona te broja i razgranatosti dendritičkih stabala. Na primjer, vidljive su bile stanice s relativno velikom površinom tijela, ali prosječnom veličinom i razgranatošću dendritičkog stabla (slika 5.2A), ali i male stanice s malim brojem dendrita (slika 5.2B) u odnosu na tipični, prosječno veliki i prosječno razgranati neuron (slika 5.2C). Nasuprot tome, neke stanice su imale relativno malu površinu tijela, ali veći broj razgranatih dendrita (slika 5.2D).

Kvalitativno nije bilo razlike u gustoći dendritičkih trnova između morfološki različitih srednje velikih trnastih neurona strijatuma. Gustoća trnova rasla je postupno prema distalnim dijelovima dendrita da bi najgušća bila na terminalnim segmentima (slika 5.1D). Poneki trnovi su bili vidljivi i na tijelima neurona i primarnim dendritima. Često je uočeno da dendriti imaju zakrivljene završetke gusto prekrivene trnovima.

Unatoč jasno vidljivim različitostima i odnosima tijela neurona i složenosti građe dendrita, nije bilo moguće definirati subpopulacije srednje velikih trnastih neurona na osnovi kvalitativnih morfoloških kriterija.



Slika 5.1. Reprezentativne mikrofotografije strijatuma i trnastih srednje velikih neurona strijatuma.

(A) Koronarni presjek kroz strijatum na malom povećanju gdje je primjetna dominacija glija stanica. (B) Strelica pokazuje tipičan trnasti srednje veliki neuron, (C) s tipičnom morfologijom dendritičkog stabla koje se ravnomjerno grana u svim smjerovima i ima (D) dendrite gusto pokrivene trnovima. Mjerka označava: (A) 200µm, (B) 100 µm, (C) 20 µm, (D)10 µm.

(Kratice: cortex- moždana kora; WM- supkortikalna bijela tvar)

Slika 5.2. Četiri trnasta srednje velika neurona rekonstruirana Neurolucida sustavom.
Svaki od neurona ima kvalitativno drukčiju morfologiju: (A) neuron s relativno velikim tijelom i prosječnim brojem dendrita; (B) neuron s prosječno manjim tijelom sa samo dva razgranata dendrita; (C) neuron s manjim tijelom i prosječnim brojem dendrita; (D) neuron s prosječnom veličinom tijela i vrlo bogato razgranatim dendritima.
Mjerka (A-D): 50 µm

5.2. Kvantitativna analiza projekcijskih srednje velikih neurona u dorzalnom strijatumu

Svi parametri dendritičke morfologije potrebni za kvantitativnu analizu prikazani su kao srednje vrijednosti za svaku eksperimentalnu grupu. Statističke analiza provedena je na dva načina što će biti naznačeno kod opisa grafičkog prikaza, i to tako da su kao osnovni podatci uzete morfološke vrijednosti po pojedinom neuronu, a u drugom slučaju prosječne vrijednosti po životinji, odnosno mozgu.
Kvantitativna analiza je prvo rađena za svaku pojedinu liniju za cijeli strijatum, a zatim je prikazana za svaku liniju prema regionalnoj podjeli strijatuma.
Svi mjereni parametri dendritičke morfologije bit će prikazani grafički, a oznake koje označavaju statistički značajne vrijednosti označene su kako slijedi:
** - označava skupinu (liniju ili regiju) koja se statistički značajno razlikuje od ostalih, * - označava skupine (linije ili regije) od kojih se skupina označena ** razlikuje; ukoliko se oznaka * nalazi između označenih skupina to označava statistički značajnu razliku između dvije susjedne skupine; ukoliko su sve skupine označene s ** to znači da su sve statistički značajno različite jedna od druge; + -označava da je statistički značajna razlika dobivena naknadno korištenim t-testom za usporedbu dvije skupine.

Zbog preglednosti su oznake označavane i s gornje i s donje strane kutijastog dijagrama, ali na isti način.
Kratice TE, IM, IC označavaju nazive segmenata i to kako slijedi: terminalni segmenti (TE), intermedijarni segmenti (IM) i prekinuti segmenti (IC), a PV označava prosječnu vrijednost.

5.2.1. Neregionalna kvantitativna analiza

5.2.1.1.Prikaz vrijednosti morfoloških parametara u životinja divljeg tipa

Za potrebe kvantitativne analize trnastih srednje velikih neurona strijatuma u transgeničnih životinja bilo je prvo potrebno definirati parametre normalne morfologije neurona u miševa divljeg tipa koja je korištena kao kontrolna skupina. Do danas u literaturi nisu opisani parametri segmentalne dendritičke analize, za svaki tip segmenata (terminalni, intermedijarni i nepotpuni), već samo površina tijela neurona i ukupna dužina dendrita [32]. U cijelom su istraživanju korištene tri linije transgeničnih životinja čije su morfološke vrijednosti uspoređivane s tri njima paralelno napravljene kontrole. U cilju utvrđivanja kvantitativnih parametara u životinja divljeg tipa i potvrde konzistentnosti metode kojom su materijali obojani, uspoređeni su međusobno i neuroni životinja divljeg tipa eksperimentalna uzorka.
Parametri dendritičke morfologije prikazani su u Tablici 1.
Dobivene kvantitativne vrijednosti podudaraju se s vrijednostima poznatima u literaturi [32] kojima se ispitivani neuroni definiraju kao srednje velike stanice s dendritima gusto prekrivenim dendritičkim trnovima. Površina tijela neurona iznosila je od 160-180 μm^2, a ukupna dužina neurona 2100 μm. Stanice su u prosjeku imale 5-6 primarnih dendrita, oko 40 segmenata po pojedinom neuronu i normalnu dendritičku razgranatost. Prosječna dužina pojedinog intermedijarnog segmenta iznosila je oko 22 μm, dok je za terminalni segment iznosila oko 100 μm.
Parametri koji se odnose na dužinu i tip grananja dendrita varirali su minimalno između grupa (slika 5.3a) bez statistički značajnih razlika, no sama populacija srednje velikih trnastih neurona bila je po pitanju kvantitativnih parametara vrlo raznolika. Tako je najmanja ukupna dužina dendrita iznosila 825 μm, a najveća 4825 μm; ukupan broj segmenata je varirao od 16 do 76; dužina po pojedinom dendritu iznosila je od 145 μm sve do 754 μm dok je broj segmenata po dendritu varirao od 3 do 18.

Za razliku od parametara dužine i razgranatosti, parametri površine tijela, volumeni i promjeri dendrita te gustoća spina pokazali su statistički značajne razlike među grupama.

U liniji 324wt u usporedbi s ostale dvije linije nalazimo statistički značajno manju površinu tijela neurona (slika 5.3a), a volumeni te bazalni i prosječni promjeri (slika 5.3b, 5.4) u svim segmentima su bili veći. Varijacije između linija u ta tri parametra bile su oko 15%. Treba napomenuti da je najmanji volumen individualnih segmenata bio u liniji 302wt kod koje su rezovi dodatno tretirani toluidinskim modrilom.

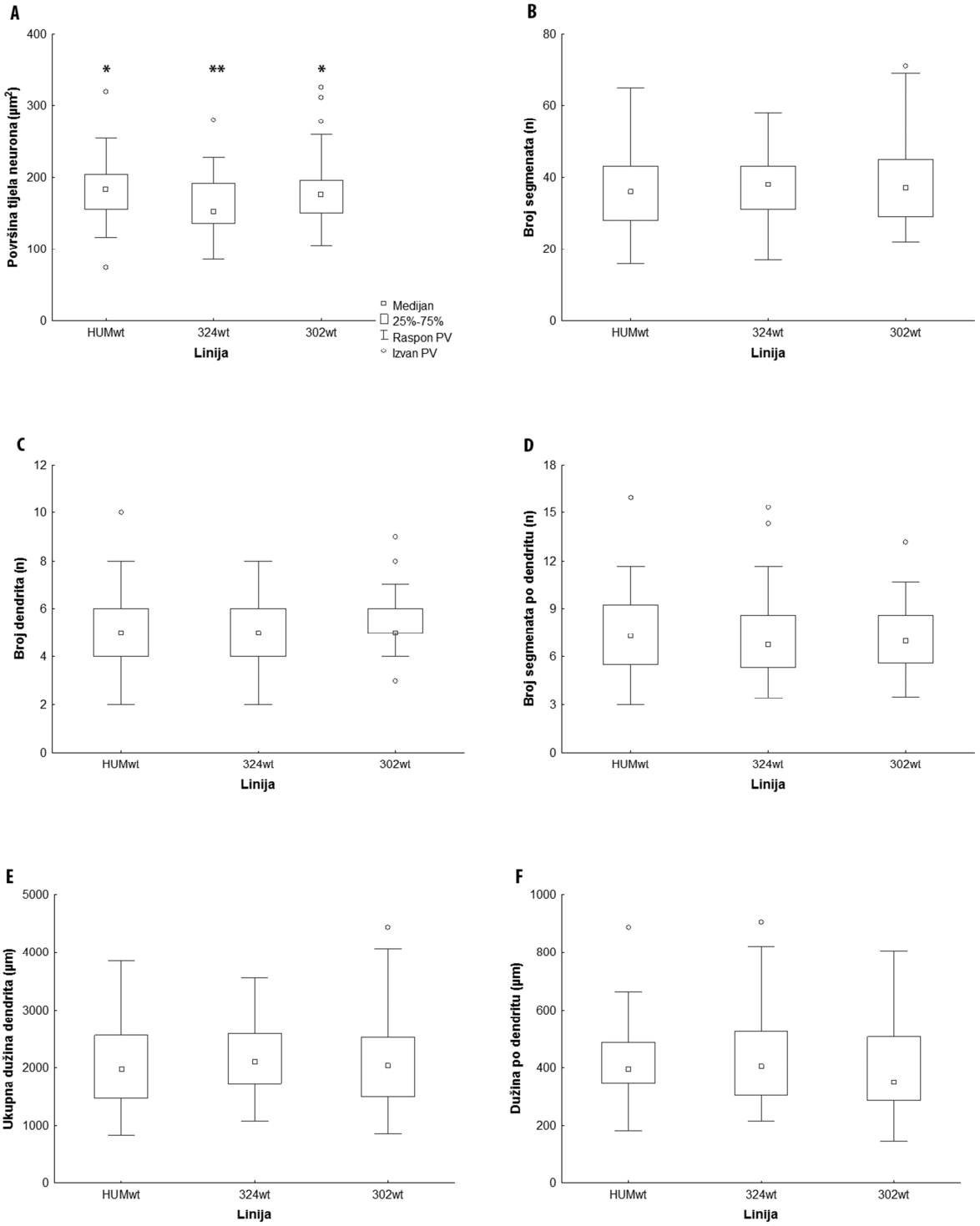
Statistički značajne razlike nalazimo i kod parametara gustoće dendritičkih trnova.

U svim mjerenim parametrima linija HUMwt je imala statistički najmanju gustoću u odnosu na ostale linije i to osobito u parametrima gustoće trnova po dužini dendrita i gustoći trnova na intermedijarnim segmentima kako po dužini tako i po površini dendrita.

U ostalim parametrima statistički značajne razlike su postojale između svih linija međusobno (slika 5.5).

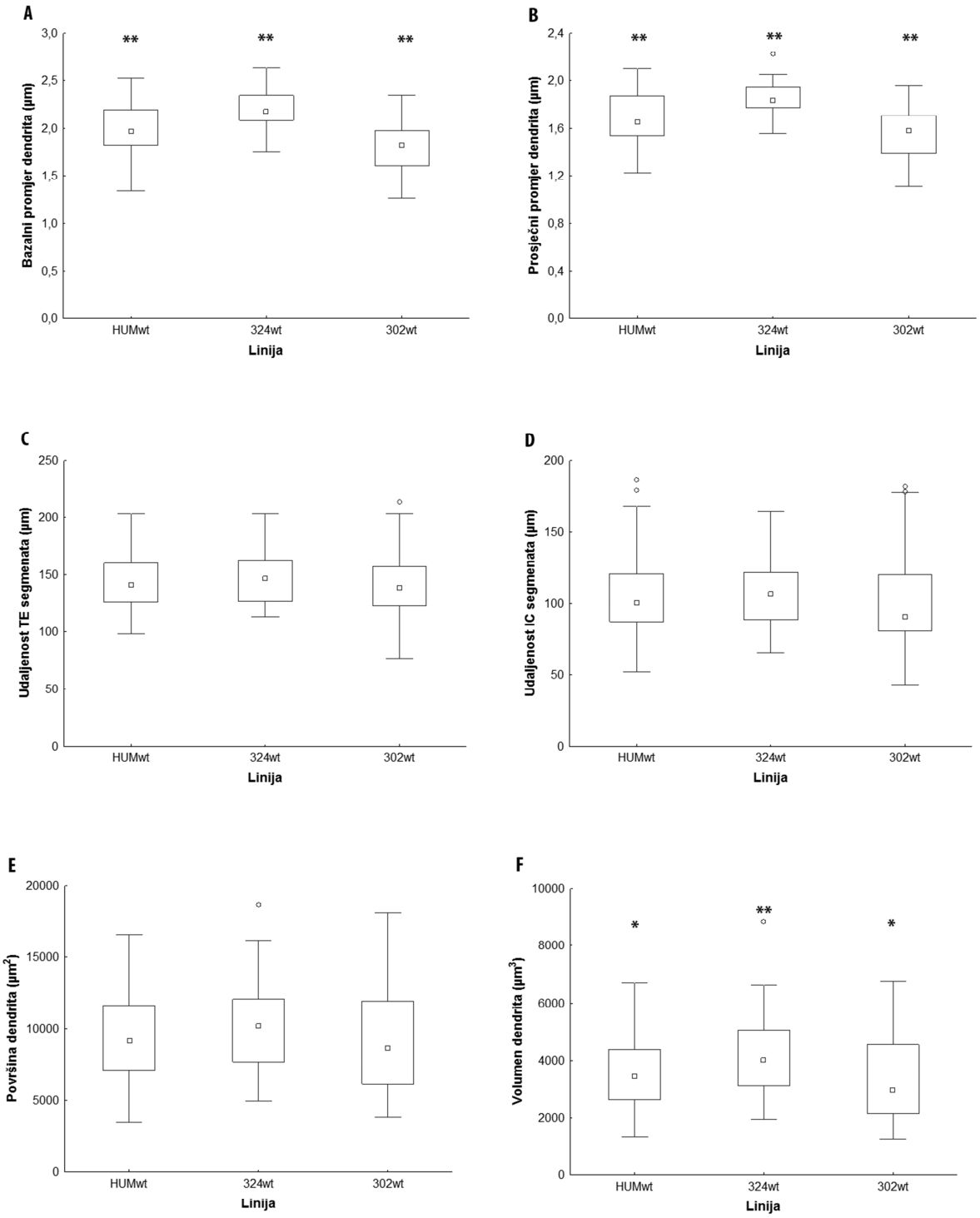
Tablica 1. Kvantitativni morfološki parametri trnastih srednje velikih neurona strijatuma u miševa divljeg tipa

	Prosječna vrijednost ± SD		
	HUMwt	**324wt**	**302wt**
1. Površina tijela neurona (μm^2)	182,0±38,3	161,1±39,0	178,8±42,4
2. Broj dendrita (n)	5,2±1,6	5,4±1,5	5,6±1,4
3. Broj segmenata (n)	36,6±11,6	37,4±9,8	38,8±11,5
4. Broj segmenata po dendritu (n)	7,38±2,5	7,36±2,6	7,09±1,9
5. Ukupna dužina dendrita (µm)	2014,7±700,3	2159,4±614,8	2146,4±836,8
6. Dužina po dendritu (µm)	430,6±173,9	426,1±153,0	396,1±151,0
7. Dužina terminalnih segm. (µm)	96,9±22,1	100,9±17,7	93,1±25,1
8. Dužina intermedijarnih segm.(µm)	23,2±7,1	21,6±5,4	21,8±6,1
9. Dužina nepotpunih segm. (µm)	65,7±18,1	69,6±17,3	63,3±25,0
10. Volumen terminalnih segm.(μm^3)	139,0±36,5	160,7±39,3	134,4±50,0
11. Volumen intermedijarnih segm.(μm^3)	61,5±21,3	71,8±22,2	48,1±16,4
12. Volumen nepotpunih segm. (μm^3)	104,5±36,4	123,4±36,4	94,2±44,8
13. Gustoća spina po dužini dendrita (n/µm)	0,48±0,1	0,7±0,1	0,7±0,1



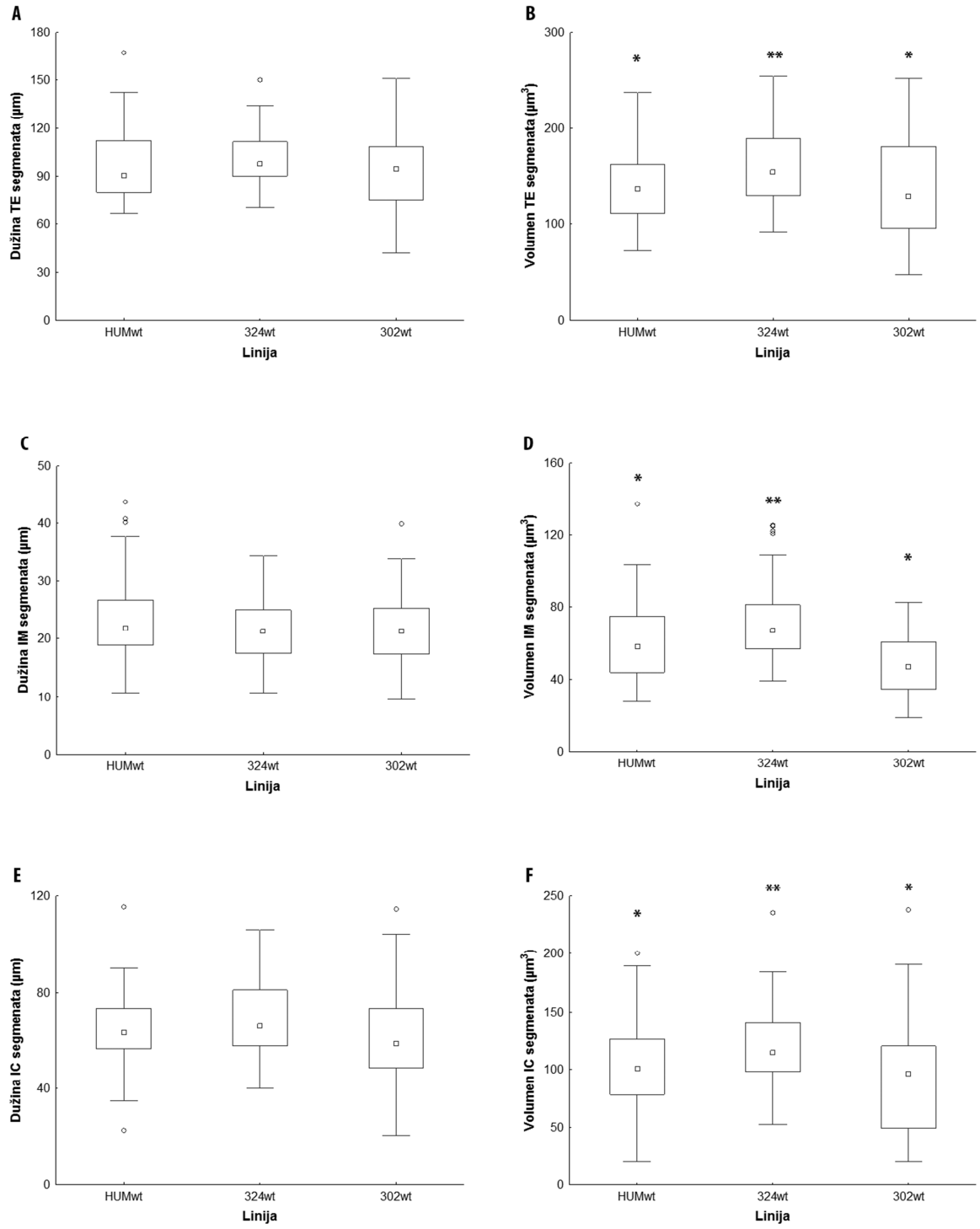
Slika 5.3a Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) površina tijela neurona linije 324wt statistički je značajno manja od ostale dvije linije ($p < 0,02$).



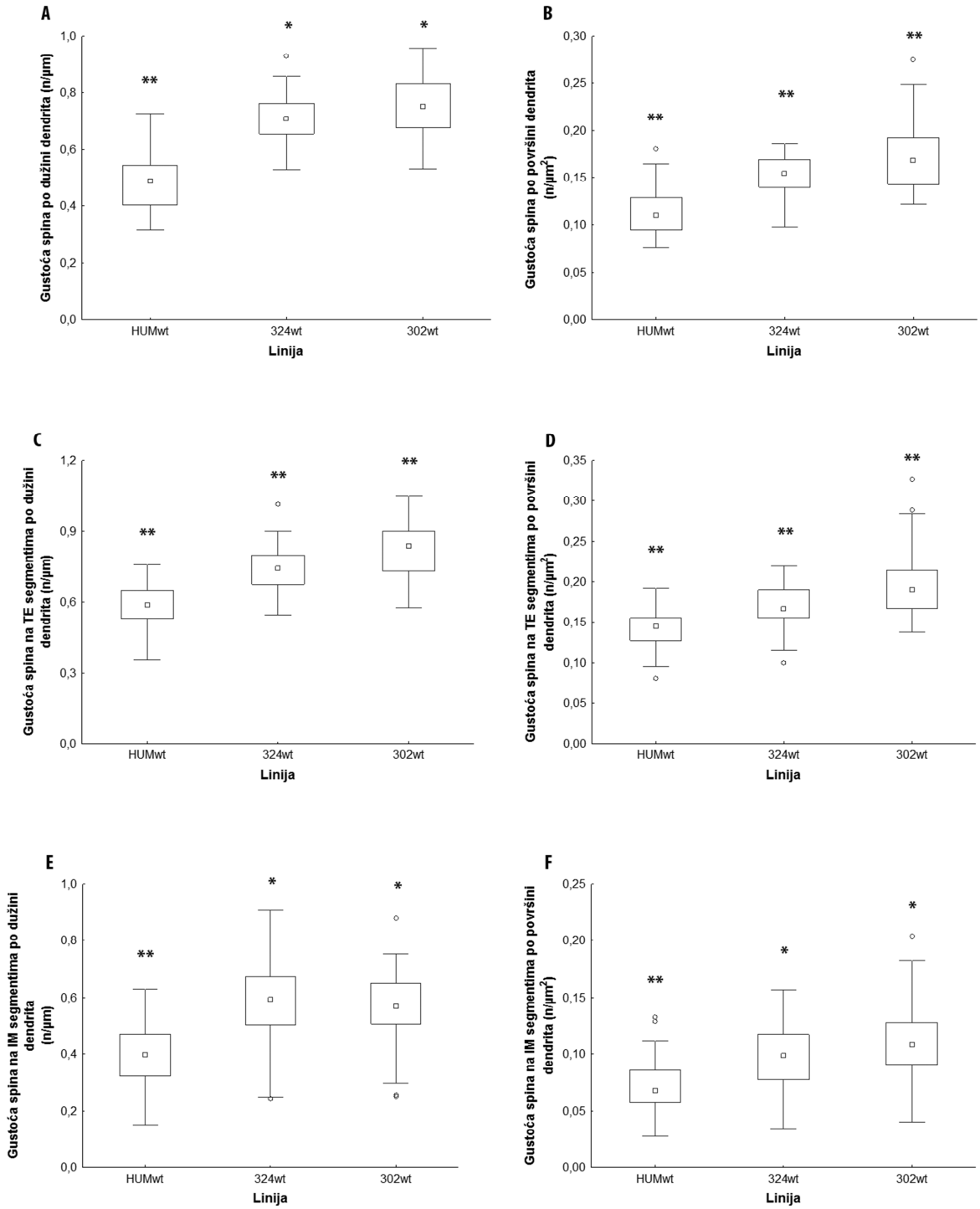
Slika 5.3b Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) Bazalni promjer dendrita statistički je najveći u liniji 324wt ($p< 0,0001$) u odnosu na ostale dvije linije, s tim da postoji statistički značajna razlika i između linija HUMwt i 302wt ($p<0,0001$). (B) Prosječni promjer dendrita pokazuje iste odnose kao i (A) sa statistički značajnom razlikom između svih linija ($p<0,0001$).



Slika 5.4 Grafički prikaz vrijednosti specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (B) Volumen TE segmenata najveći je u liniji 324wt ($p<0,01$ prema HUMwt, $p<0,004$ prema 302wt). (D) Volumen IM segmenata najveći je u liniji 324wt ($p<0,03$ prema HUMwt, $p<0,0001$ prema 302wt). (F) Volumen IC segmenata najveći je u liniji 324wt ($p<0,02$ prema HUMwt, $p<0,0001$ prema 302wt).



Slika 5.5 Grafički prikaz vrijednosti parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A-F) Gustoća trnova u svim je parametrima najmanja u HUMwt ($p<0,0001$) u odnosu na linije 324wt i 302wt. (B-D) Gustoća trnova je statistički značajno veća u liniji 302wt u odnosu na liniju 324wt ($p<0,0001$).

5.2.1.2. Prikaz vrijednosti morfoloških parametara u transgeničnih životinja

Nakon analize morfoloških parametara u tri linije miševa divljeg tipa bilo je potrebno pokazati postoje li statistički značajne razlike u morfološkim parametrima u tri linije transgeničnih miševa čiji su preparati rađeni paralelno sa svojom kontrolnom skupinom (tri linije miševa divljeg tipa prethodno analizirane) i vidjeti postoje li iste varijacije određenih morfoloških parametara kao u analizi parametara u miševa divljeg tipa.

Dobiveni kvantitativni podatci za opće parametre neuronske morfologije odgovaraju onima opisanima u miševa divljeg tipa. Površina tijela neurona u ovoj analizi se prosječno kretala između 160 i 170 μm, ukupna dužina dendrita oko 2000 μm, broj dendrita po pojedinom neuronu oko 5, broj segmenata po neuronu oko 37, prosječna dužina pojedinog intermedijarnog segmenta oko 20 μm te prosječna dužina pojedinog terminalnog segmenta oko 94 μm.

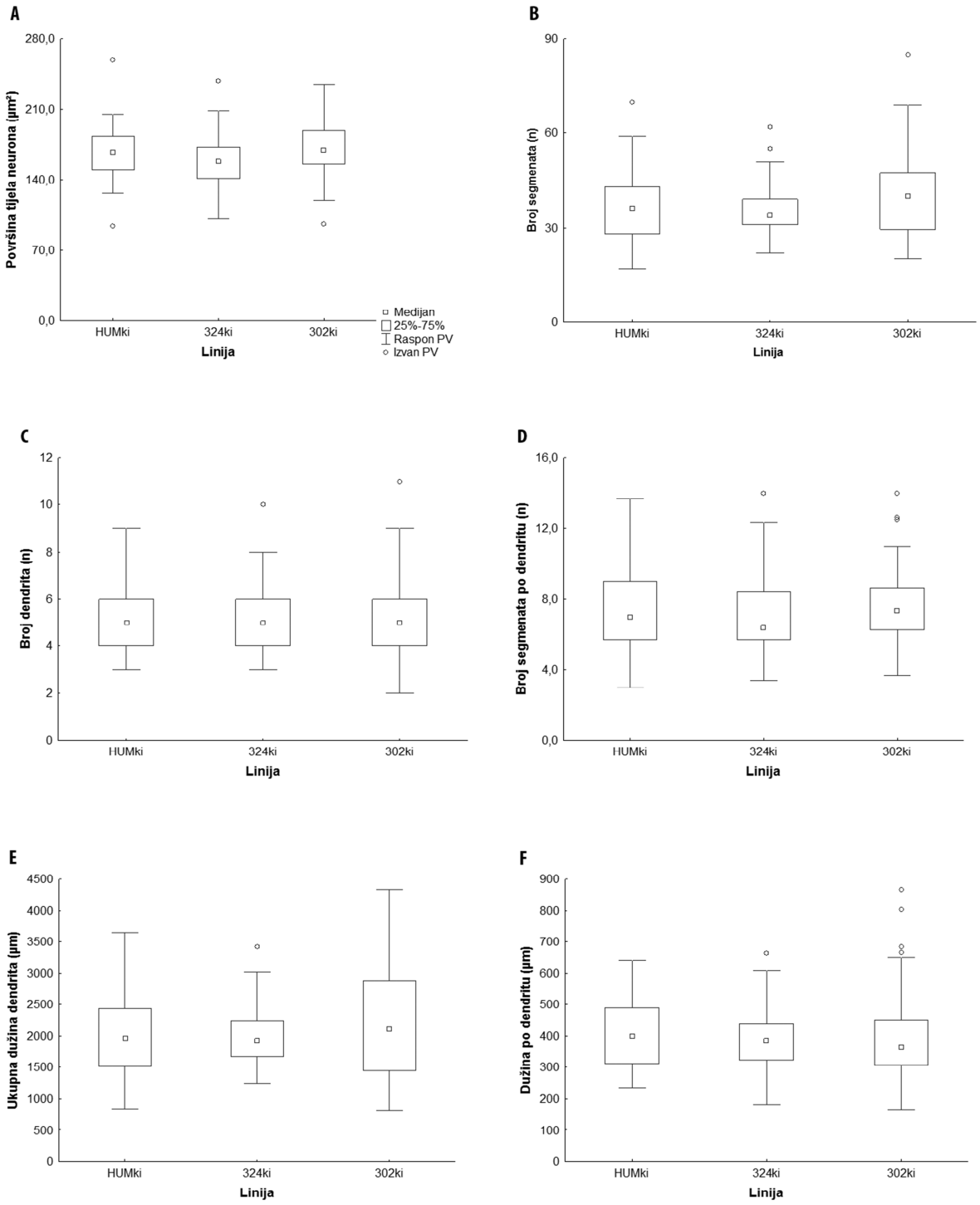
Parametri koji se odnose na dužinu i tip grananja dendrita (slika 5.6a) varirali su minimalno između grupa bez statistički značajnih razlika, kao i kod linija miševa divljeg tipa.

Podatci po pojedinom neuronu pokazali su kako je najmanja ukupna dužina dendrita iznosila 814 μm, a najveća 4326 μm; ukupan broj segmenata varirao je od 17 do 85 u najrazgranatijih neurona; dužina po pojedinom dendritu kretala se između 164 μm kod najmanjeg i 865 μm kod najvećeg dendrita; najmanji broj segmenata po dendritu iznosio je 3, a najveći 14.

Statistički značajne razlike bile su prisutne u svim parametrima volumena, bazalnom i prosječnom promjeru dendrita i svim parametrima gustoće trnova. Promjeri dendrita su bili najveći u liniji 324ki (slika 5.6b), kao i ukupni volumen dendrita te volumeni svih segmenata (terminalni, intermedijarni i prekinuti) (slika 5.7). U svim mjerenim parametrima gustoće (slika 5.8) trnova linija HUMki je imala statistički najmanju gustoću u odnosu na ostale linije i to osobito u parametrima gustoće trnova po dužini dendrita i gustoći trnova na intermedijarnim segmentima kako po dužini tako i po površini dendrita.

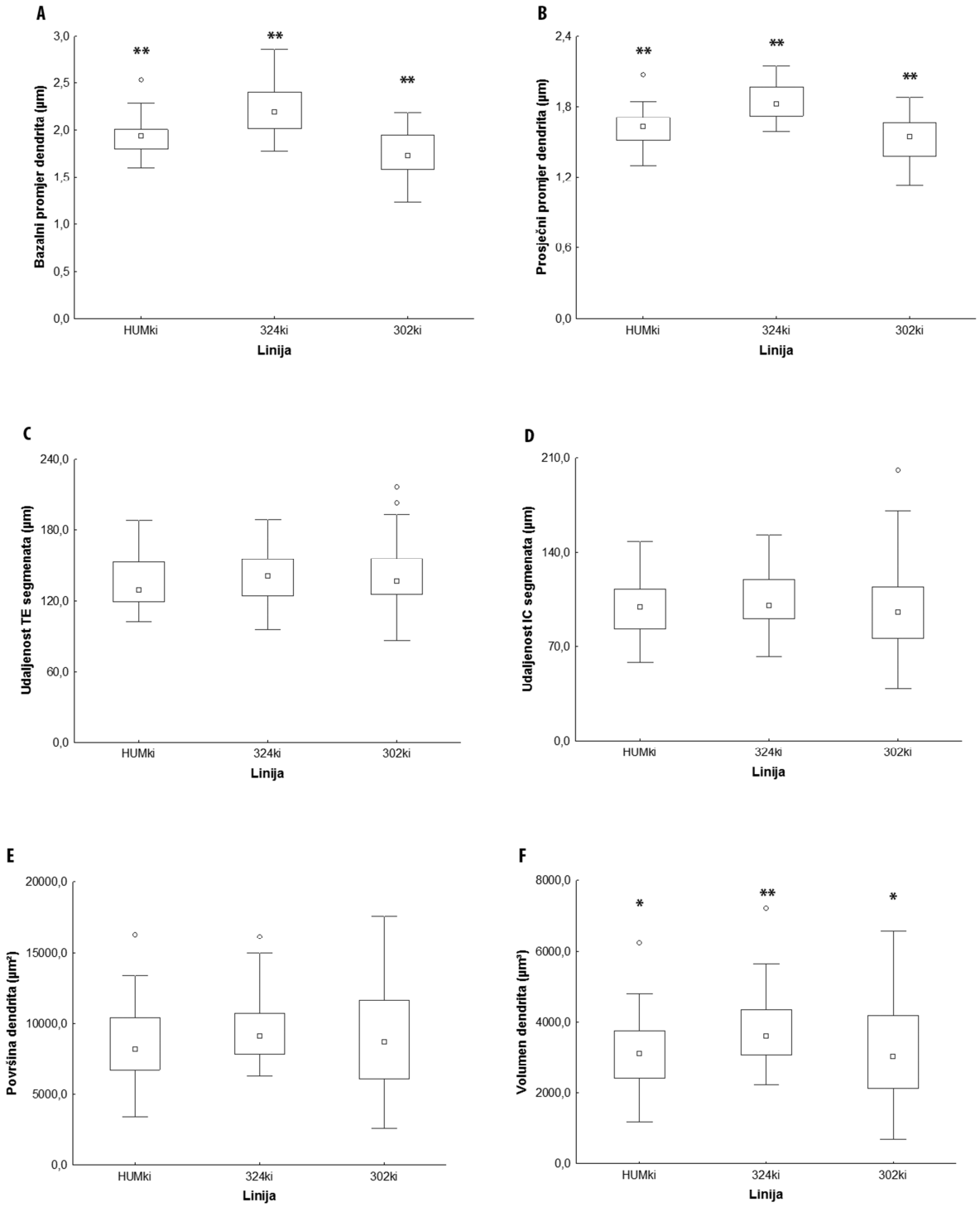
U ostalim parametrima statistički značajne razlike su postojale i između ostalih linija međusobno.

Zaključno, analiza morfoloških parametara pokazuje da statistički značajne razlike u linijama transgeničnih životinja odgovaraju onima dobivenima kod miševa divljeg tipa.



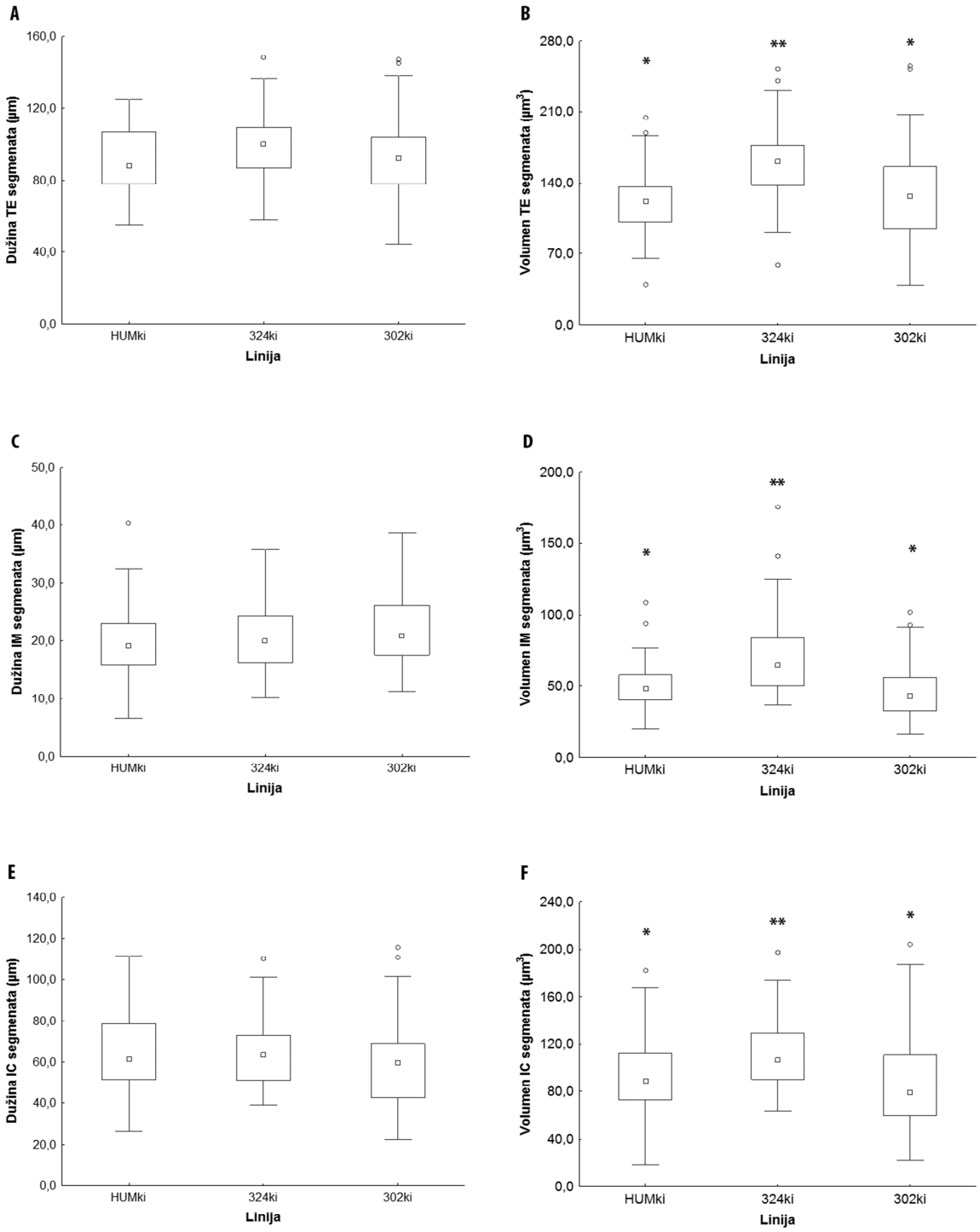
Slika 5.6a Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu.



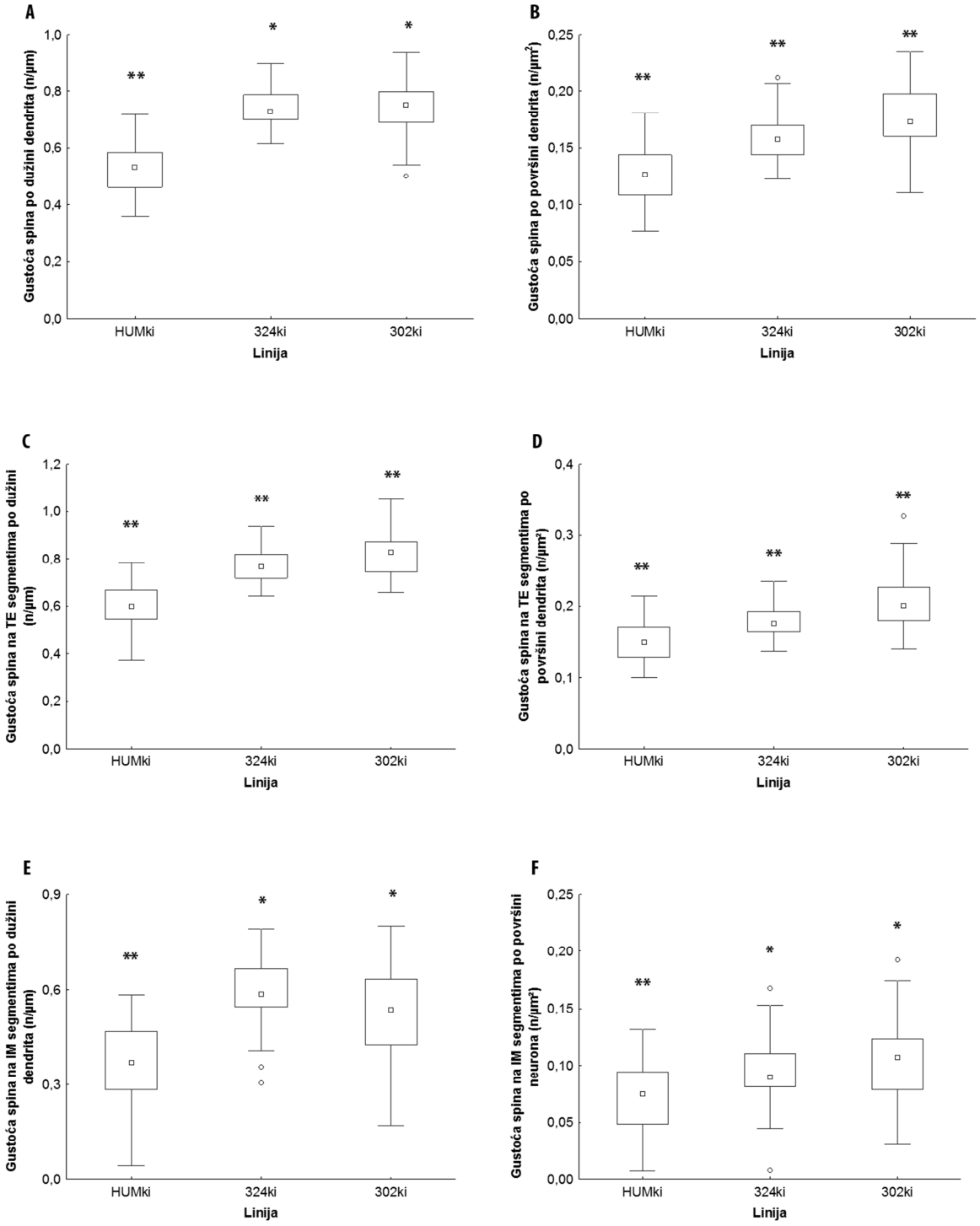
Slika 5.6b Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) Bazalni promjer dendrita statistički je najveći u liniji 324ki ($p< 0,0001$) u odnosu na ostale dvije linije, s tim da postoji statistički značajna razlika i između linija HUMki i 302ki ($p<0,0001$). (B) Prosječni promjer dendrita pokazuje iste odnose kao i (A) sa statistički značajnom razlikom između svih linija ($p<0,0001$). (F) Volumen dendrita je najveći u liniji 324ki ($p<0,03$ prema HUMki i $p<0,02$ prema 302ki).



Slika 5.7 Grafički prikaz vrijednosti specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (B) Volumen TE segmenata najveći je u liniji 324ki ($p<0,0001$ prema HUMki i prema 302ki). (D) Volumen IM segmenata najveći je u liniji 324ki ($p<0,0001$ prema HUMki i prema 302ki). (F) Volumen IC segmenata najveći je u liniji 324ki ($p<0,04$ prema HUMki, $p<0,01$ prema 302ki).



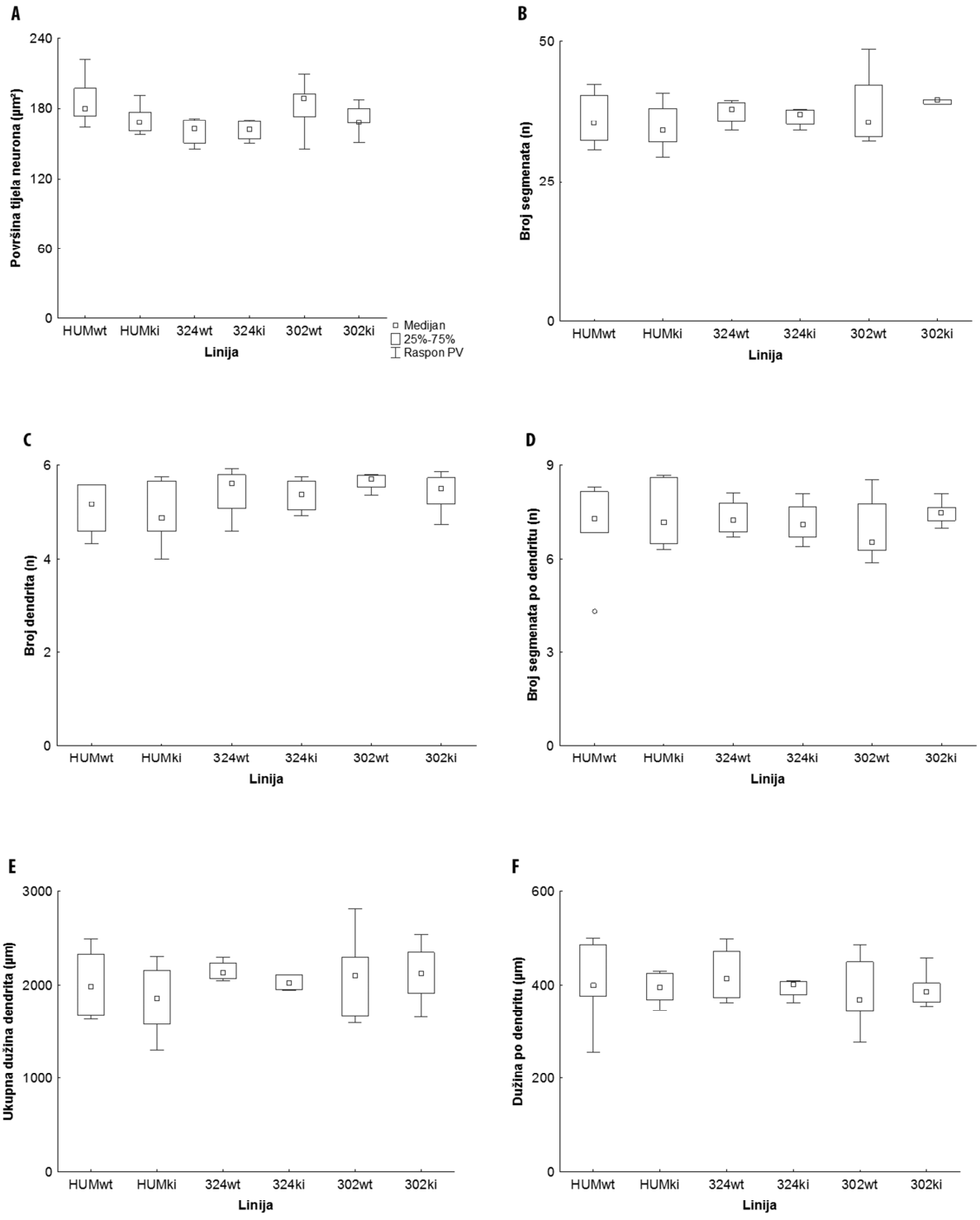
Slika 5.8 Grafički prikaz vrijednosti parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A-F) Gustoća trnova u svim parametrima najmanja je u HUMki ($p<0,0001$) u odnosu na linije 324ki i 302ki. (B-C) Gustoća trnova je statistički značajno veća u liniji 302ki u odnosu na liniju 324ki ($p<0,0001$), dok prema HUMki razlika ima značajnost od $p<0,01$(D).

5.2.1.3. Prikaz vrijednosti morfoloških parametara transgeničnih životinja u usporedbi s kontrolnom skupinom

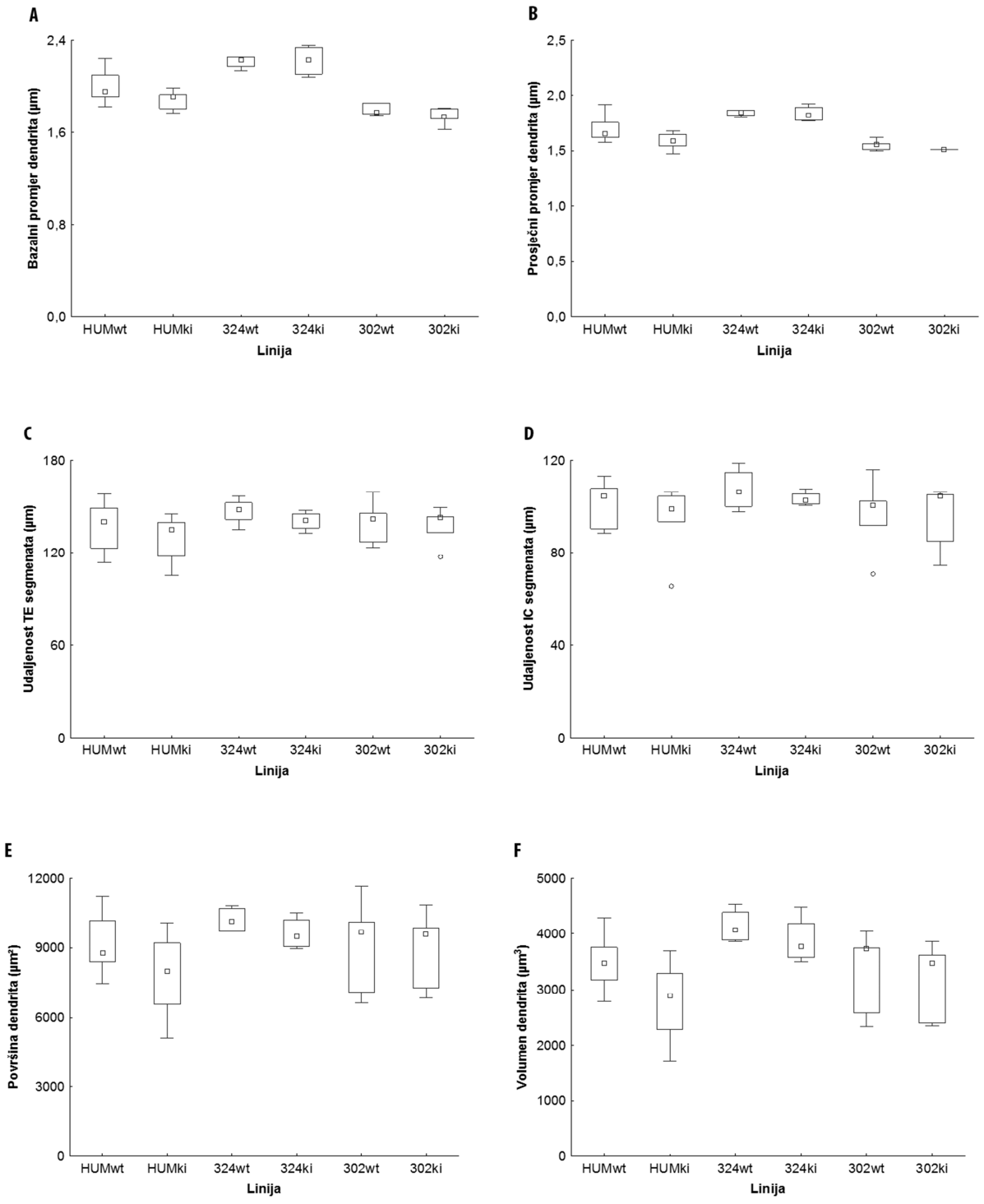
Statistički značajne razlike dobivene statističkim grupiranjem po jednom neuronu, bilo je potrebno provjeriti i grupiranjem po pojedinoj životinji, i to tako da se svaka linija prikaže istovremeno sa svojom kontrolnom skupinom.

U genotipu HUM nalazimo statistički značajne razlike u parametrima volumena terminalnih i intermedijarnih segmenata gdje je linija HUMwt imala statistički značajno veće volumene od linije HUMki (slika 5.10). Gustoća trnova (slika 5.11) po dužini dendrita pokazuje statistički značajnu razliku također u genotipu HUM, no ovdje linija HUMwt ima značajno manje trnova od linije HUMki.



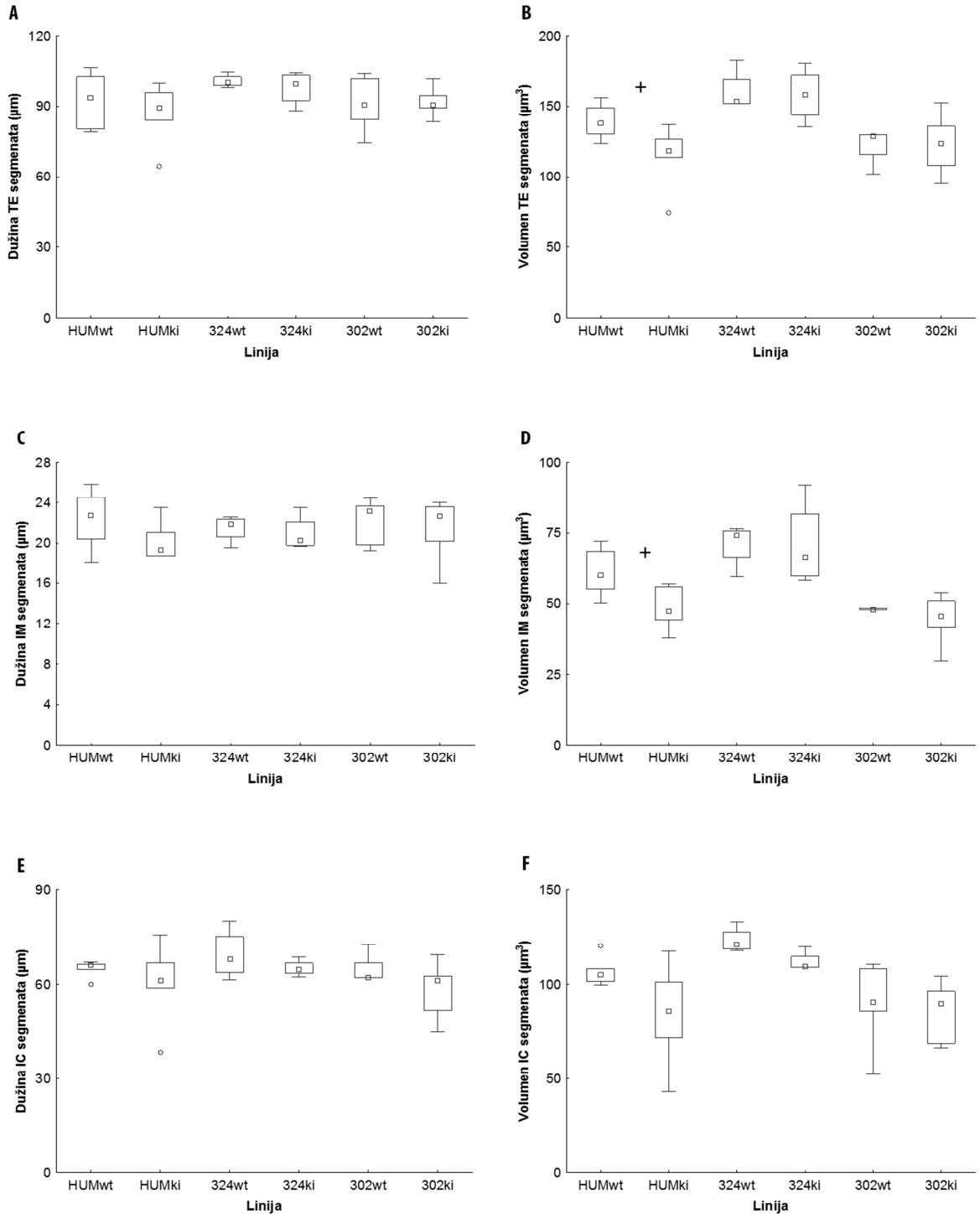
Slika 5.9a Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



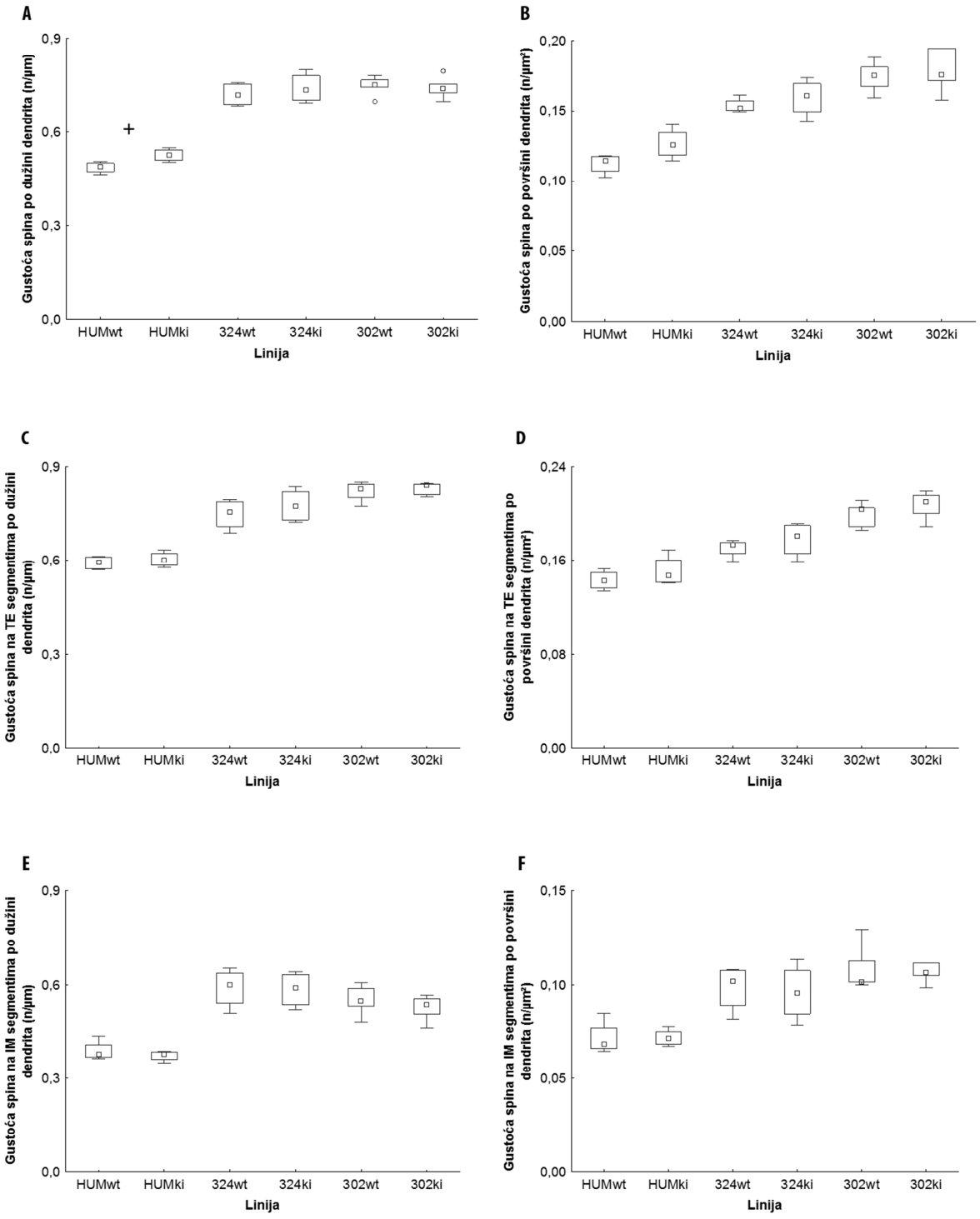
Slika 5.9b Grafički prikaz vrijednosti općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



Slika 5.10 Grafički prikaz vrijednosti specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (B) Volumen TE segmenata je u liniji HUMwt statistički značajno veći nego u liniji HUMki ($p<0,03$). (D) Volumen IM segmenata je u liniji HUMwt statistički značajno veći nego u liniji HUMki ($p<0,01$).



Slika 5.11 Grafički prikaz vrijednosti parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A) Linija HUMwt ima statistički značajno manju gustoću trnova po dužini dendrita od linije HUMki ($p<0,02$).

5.2.2. Regionalna kvantitativna analiza

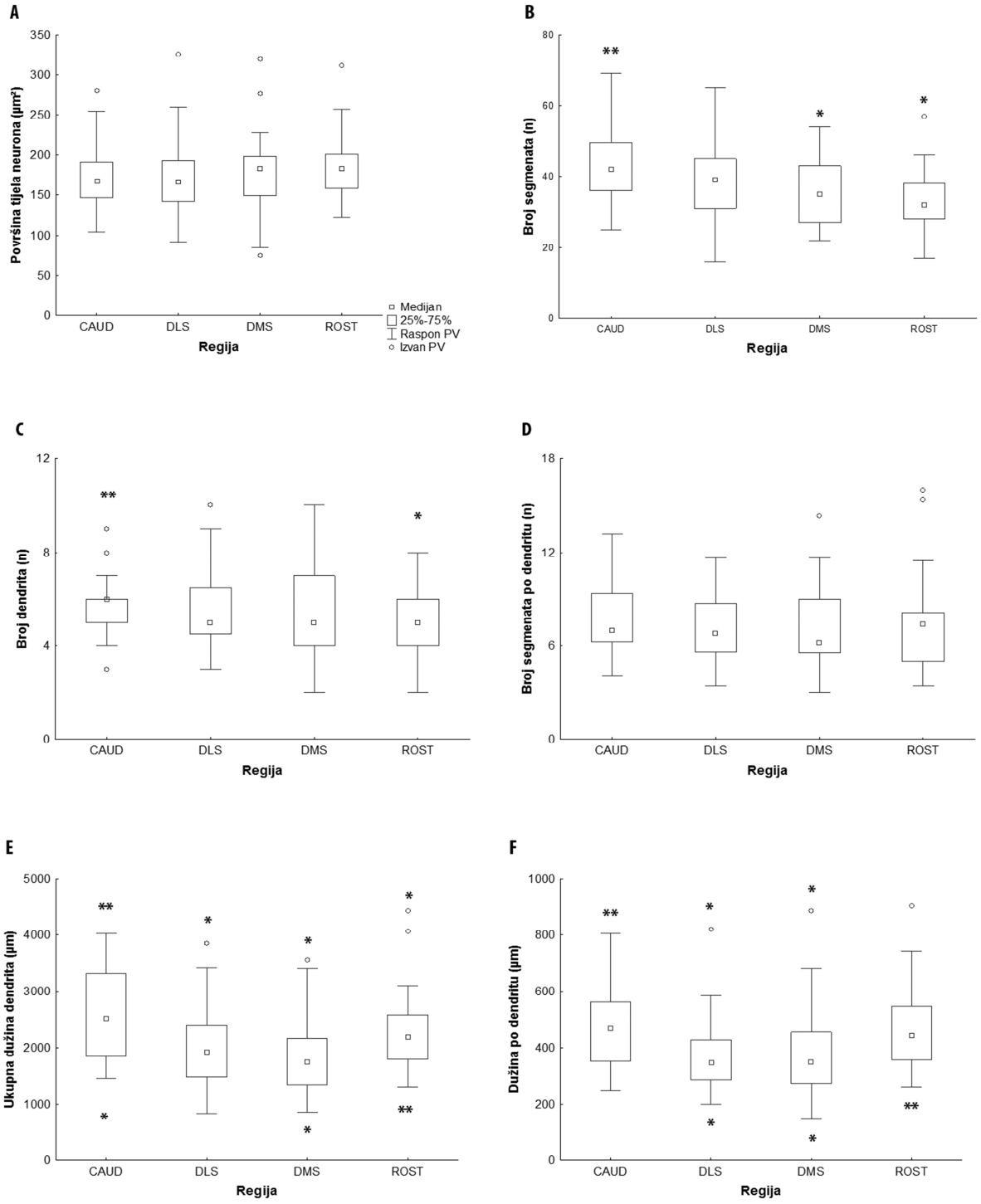
Nakon analize morfologije trnastih srednje velikih neurona strijatuma po genotipovima eksperimentalnih životinja, bilo je potrebno ispitati i postoje li razlike u morfološkim parametrima unutar regija dorzalnog strijatuma. Poput prethodnih analiza i ovdje je prvo prikazana analiza u životinja divljeg tipa, zatim u transgeničnih životinja i to na način da su rezultati grupirani po neuronu, a zatim su rezultati prikazani grupirani po životinji za svaku od tri linije.

5.2.2.1. Regionalna analiza morfoloških parametara u životinja divljeg tipa

Analiza morfoloških parametara i usporedba morfologije neurona u miševa divljeg tipa ovisno o regionalnoj pripadnosti unutar strijatuma pokazuju razlike u neuronalnoj morfologiji. Opći parametri morfologije (slika 5.12a) pokazuju da neuroni u kaudalnom strijatumu imaju veći broj segmenata i veći broj dendrita, dok su ukupna dužina dendrita i dužina po dendritu veće i u kaudalno i u rostralno smještenim neuronima, s time da su neuroni u dorzolateralnom strijatumu statistički najmanji od svih ostalih regija. Bazalni i prosječni promjeri (slika 5.12b) dendrita najveći su kaudalno, a parametri udaljenosti segmenata od tijela neurona najveći su u kaudalnom i rostralnom strijatumu. Površina i volumen dendrita statistički značajno su najveći u kaudalnom strijatumu.

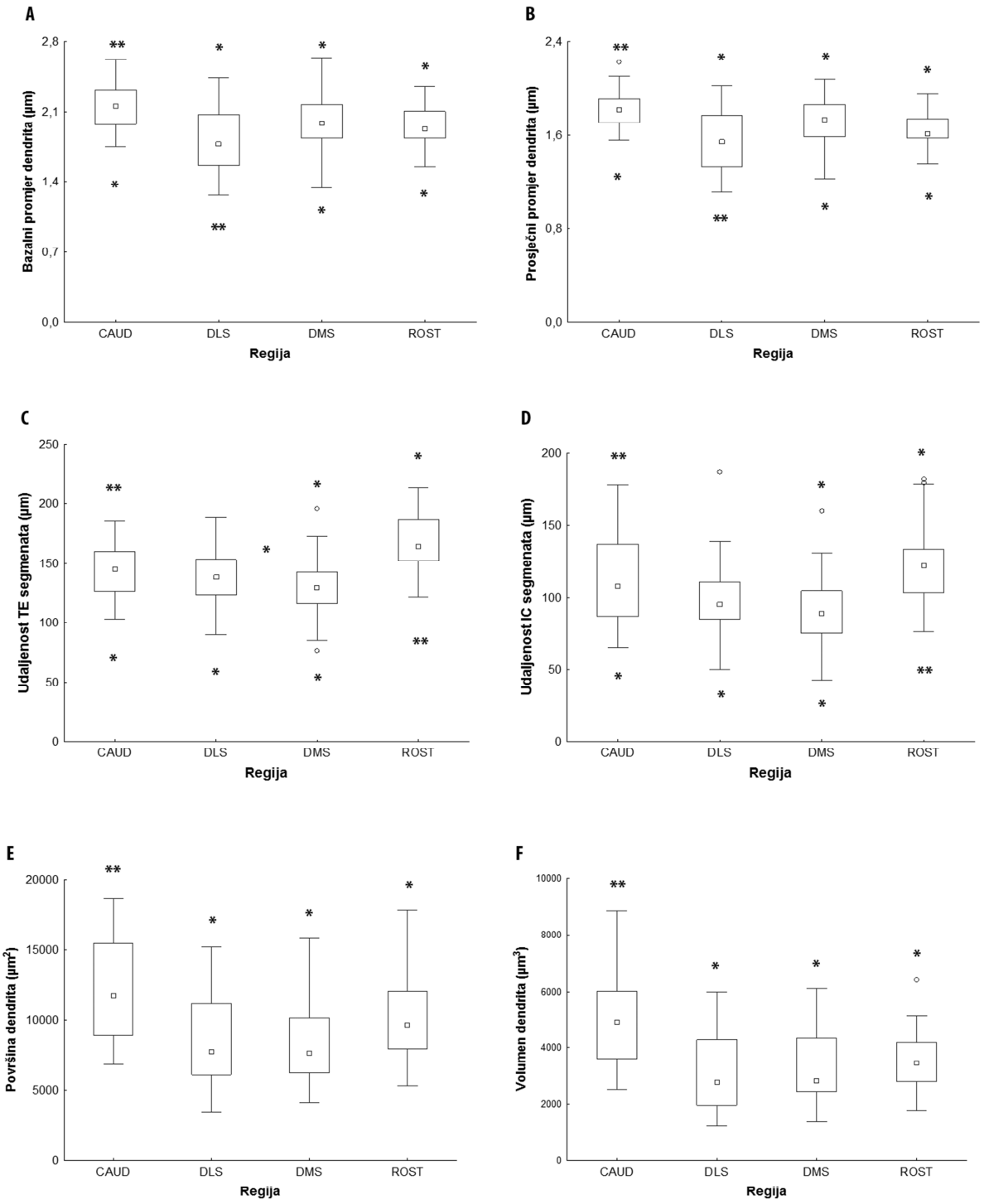
Specifični parametri (slika 5.13) koji se odnose na segmentalnu dendritičku analizu pokazali su kako su i dužine i volumeni pojedinih segmenata najveći u kaudalnom i rostralnom strijatumu dok između regija dorzomedijalnog i dorzolateralnog strijatuma nije bilo statistički značajnih razlika.

Parametri gustoće dendritičkih trnova (slika 5.14) po dužini i površini neurona, kao i njihova gustoća na terminalnim segmentima po dužini dendrita, statistički su značajno najmanji u rostralnom strijatumu.



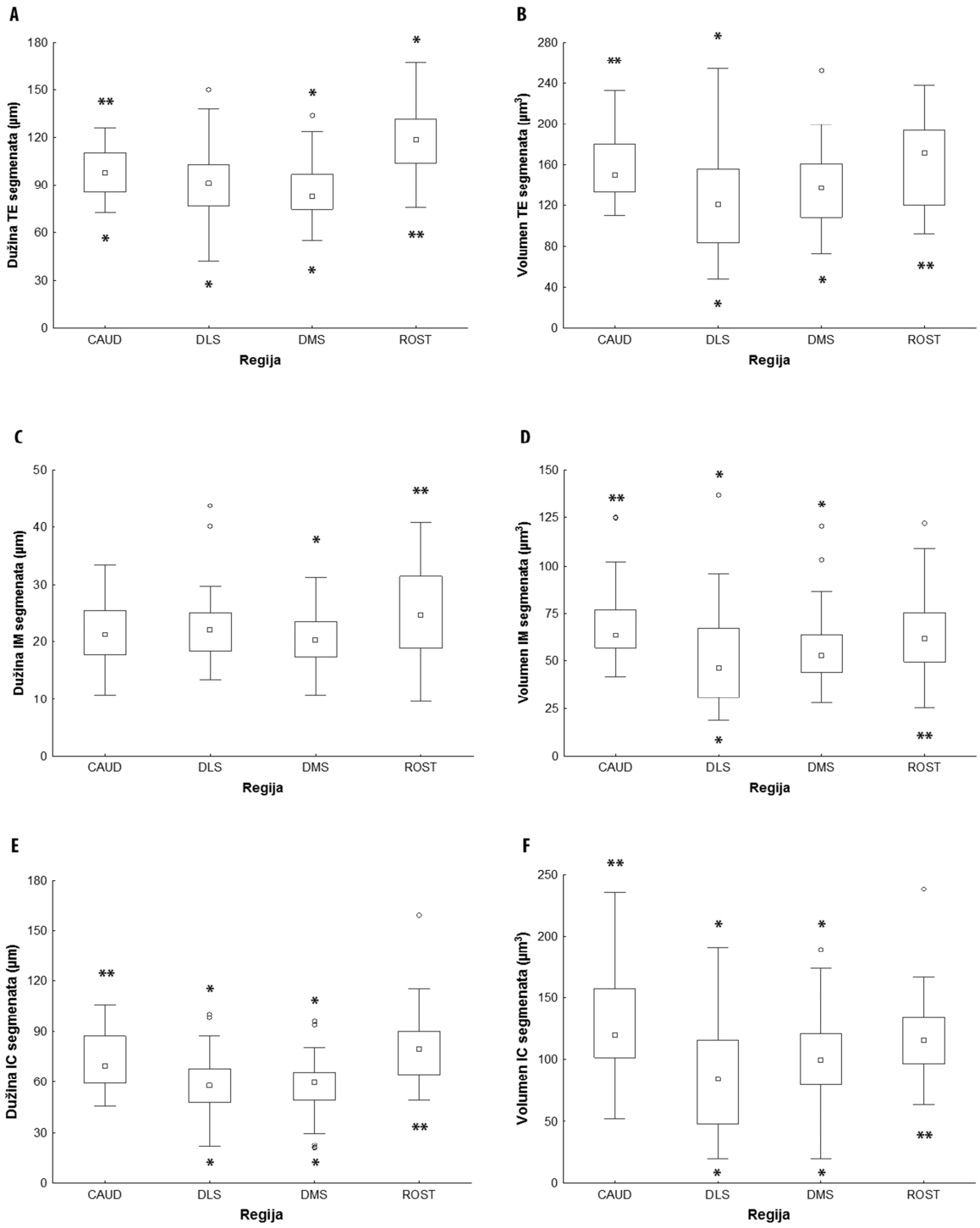
Slika 5.12a Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (B) Regija CAUD značajno odstupa od regija DMS i ROST ($p<0,0001$). (C) CAUD odstupa od ROST ($p<0,01$). (E) CAUD odstupa od DLS i DMS ($p<0,0001$) i ROST ($p<0,03$), a ROST odstupa od DMS ($p<0,009$) i CAUD.
(F) CAUD odstupa od DLS i DMS ($p<0,01$), a ROST odstupa od DLS i DMS ($p<0,001$, $p<0,002$).



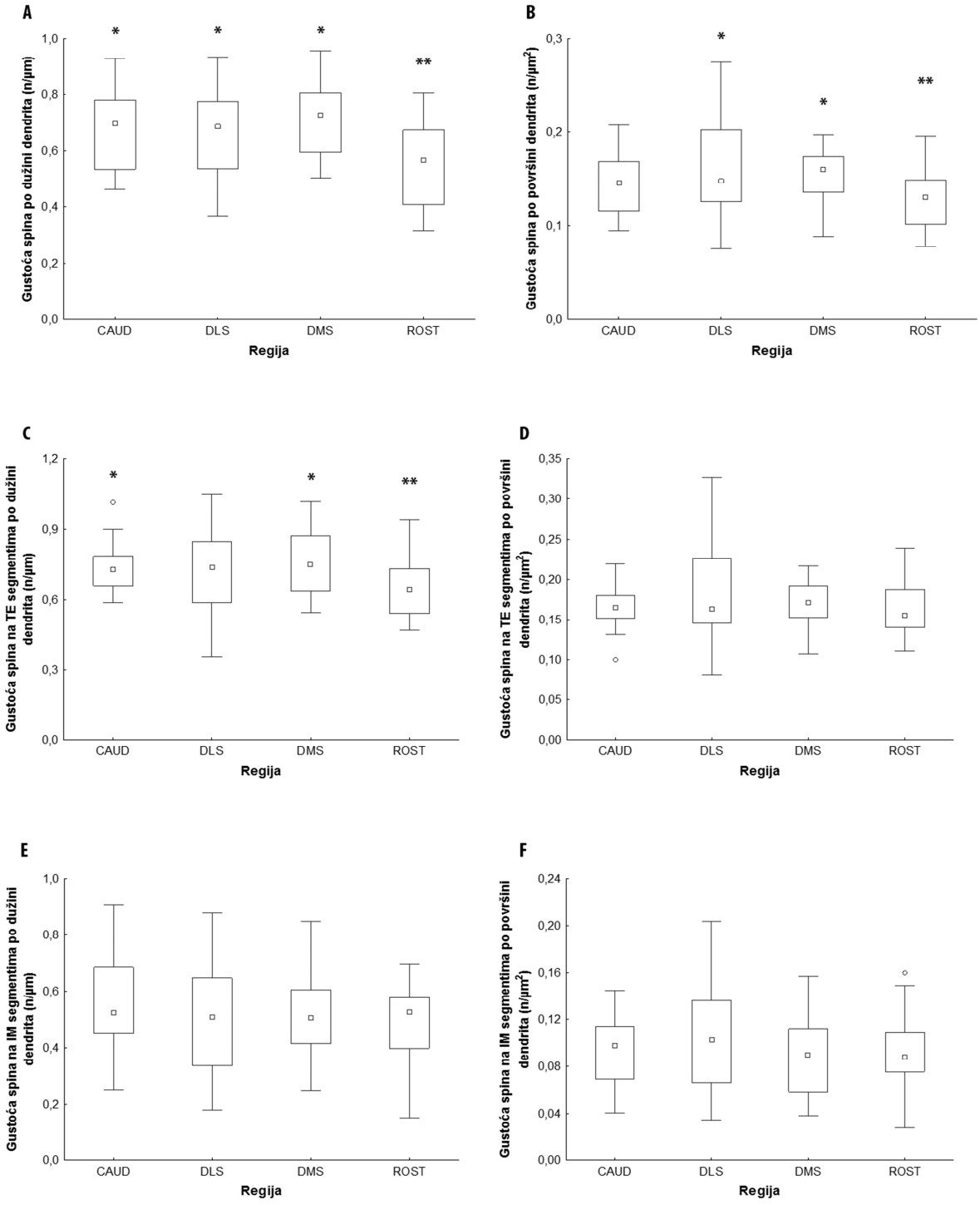
Slika 5.12b Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A-B) CAUD odstupa od DLS,DMS i ROST ($p<0,0001$, $p<0,02$, $p<0,002$), a DLS od CAUD, DMS ($p<0,02$) i ROST ($p<0,03$). (C-D) CAUD odstupa od DMS ($p<0,003$), ROST od CAUD, DLS, DMS ($p<0,0001$), a između DLS i DMS (C) postoji statistički značajna razlika ($p<0,02$) . (E-F) CAUD odstupa od DLS, DMS, ROST ($P<0,0001$).



Slika 5.13 Regionalni grafički prikaz specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) CAUD odstupa od DMS ($p<0,008$) i ROST ($p<0,0001$), a ROST odstupa od CAUD, DLS i DMS ($p<0,0001$). (B) CAUD odstupa od DLS ($p<0,002$), a ROST od DLS i DMS ($p<0,0001$, $p<0,04$). (C) ROST odstupa od DMS ($p<0,007$). (D) CAUD odstupa od DLS i DMS ($p<0,002$, $p<0,04$), a ROST od DLS ($p<0,02$). (E-F) CAUD odstupa od DLS i DMS ($p<0,001$, $p<0,002$), a ROST od DLS i DMS ($p<0,0001$).



Slika 5.14 Regionalni grafički prikaz parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) ROST odstupa od CAUD, DLS i DMS ($p<0,001$,$p<0,0001$, $p<0,0001$). (B) ROST odstupa od DLS i DMS ($p<0,001$, $p<0,02$). (C) ROST odstupa od CAUD i DMS ($p<0,03$, $p<0,01$).

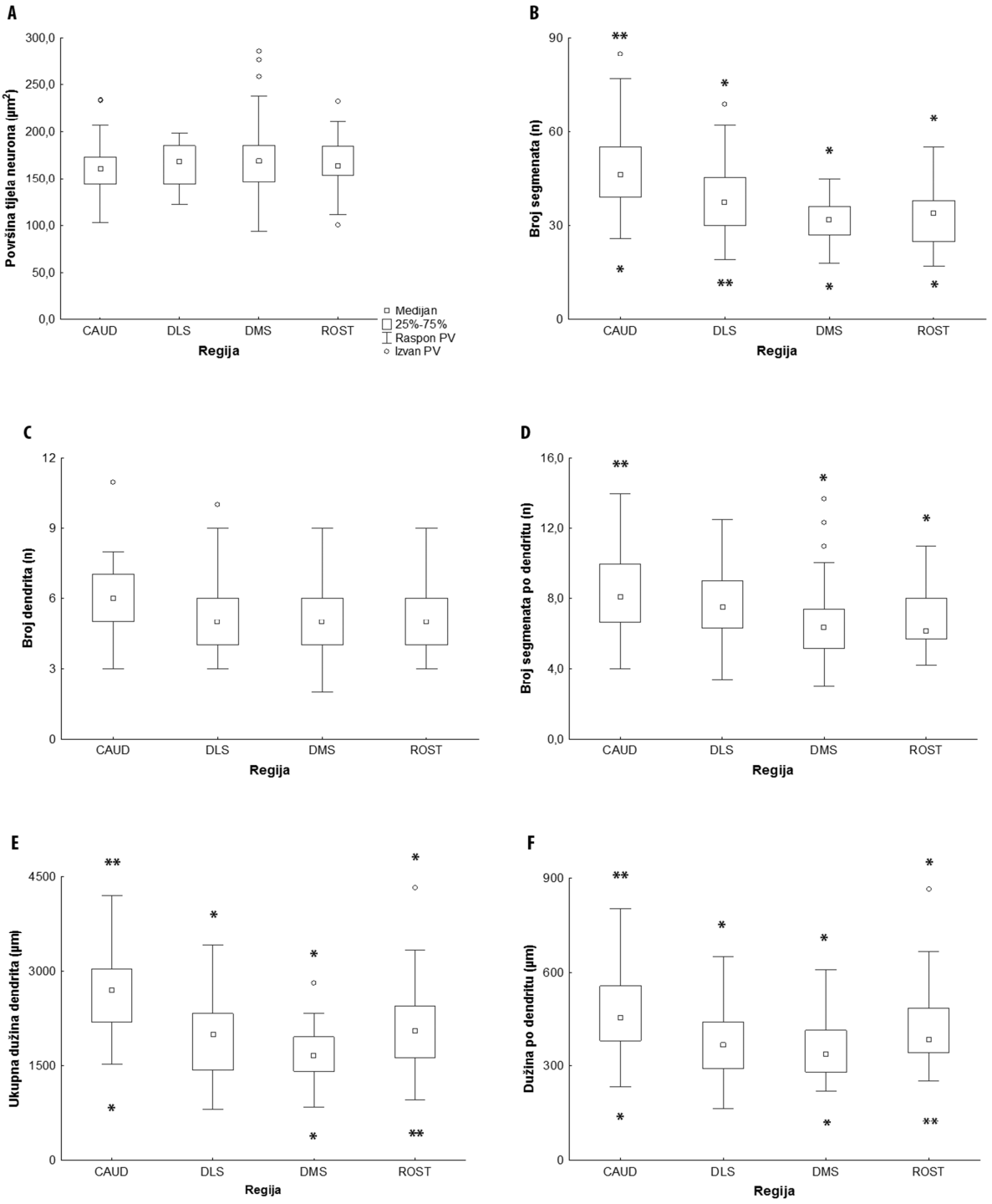
5.2.2.2. Regionalna analiza morfoloških parametara u transgeničnih životinja

Analiza morfoloških parametara i usporedba morfologije neurona u transgeničnih miševa ovisno o regionalnoj pripadnosti unutar strijatuma također pokazuje razlike u neuronalnoj morfologiji. Opći neuronski parametri (slika 5.15a) pokazuju da neuroni smješteni kaudalno i dorzolateralno u strijatumu imaju veći broj segmenata dok je broj dendrita u prosjeku bio stalan i nije bilo razlika između regija. Ukupna dužina dendrita i dužina po dendritu veće su kao i u miševa divljeg tipa kaudalno i rostralno, kao i bazalni i prosječni promjer dendrita koji su najmanji u dorzolateralnoj regiji u odnosu na sve ostale regije (slika 5.15b). Parametri udaljenosti segmenata od tijela neurona najveći su u kaudalnom i rostralnom strijatumu.

Površina i volumen dendrita statistički su značajno najveći u kaudalnom i rostralnom strijatumu (slika 5.15b).

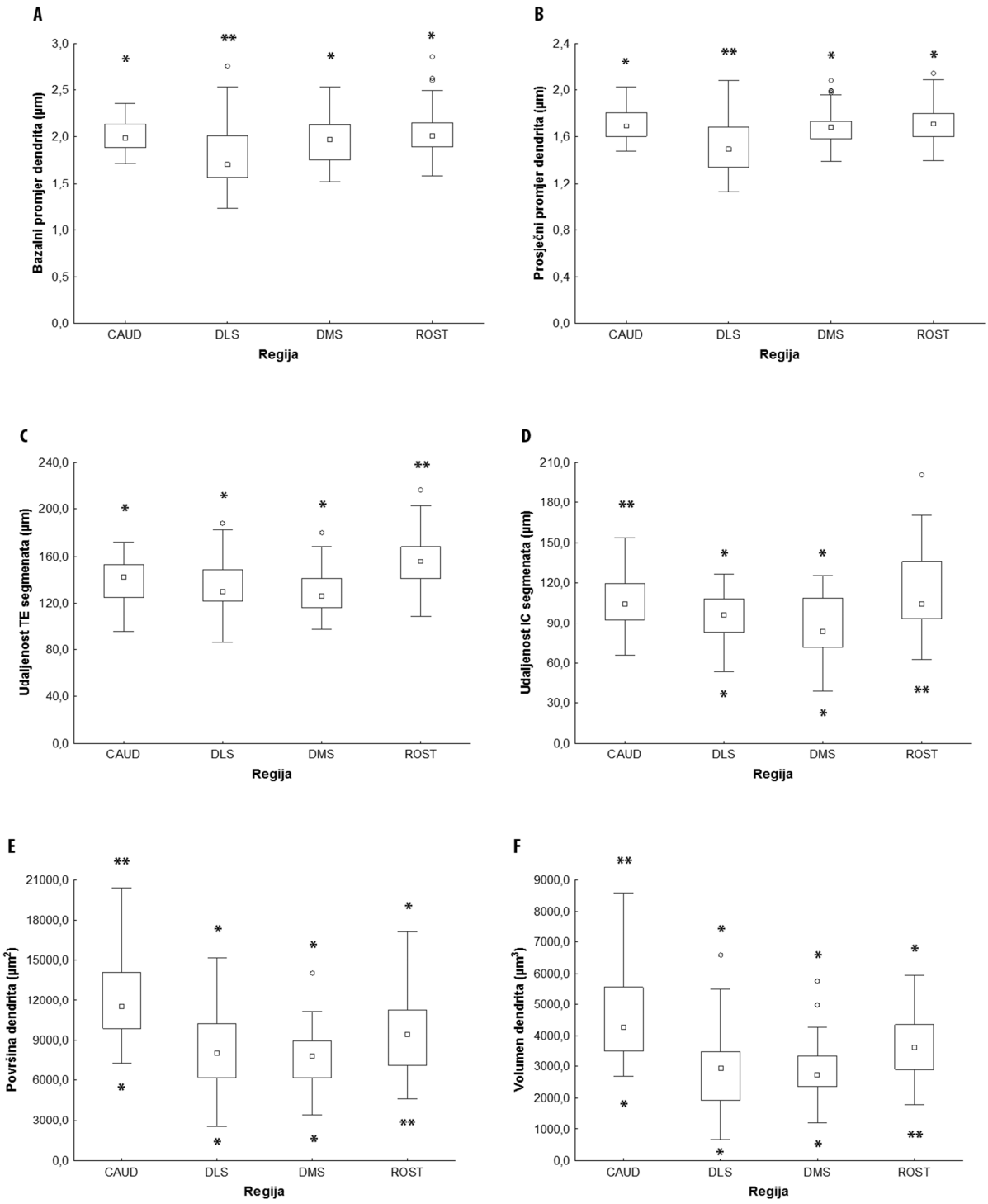
Specifični parametri koji se odnose na segmentalnu dendritičku analizu (slika 5.16) pokazali su da su dužine pojedinih segmenata najveće u rostralnom strijatumu dok su volumeni intermedijarnih i prekinutih segmenata najveći u kaudalnom strijatumu. Statistički značajno najmanji volumen terminalnih segmenata imali su neuroni u dorzolateralnom strijatumu.

Parametri gustoće dendritičkih trnova (slika 5.17) po dužini neurona nisu pokazali značajne razlike između regija. Gustoća trnova po površini neurona bila je statistički najmanja u kaudalnoj regiji u odnosu na dorzolateralnu regiju, dok su parametri gustoće na terminalnim segmentima statistički značajno najveći bili u dorzomedijalnom i dorzolateralnom u odnosu na rostralni strijatum.



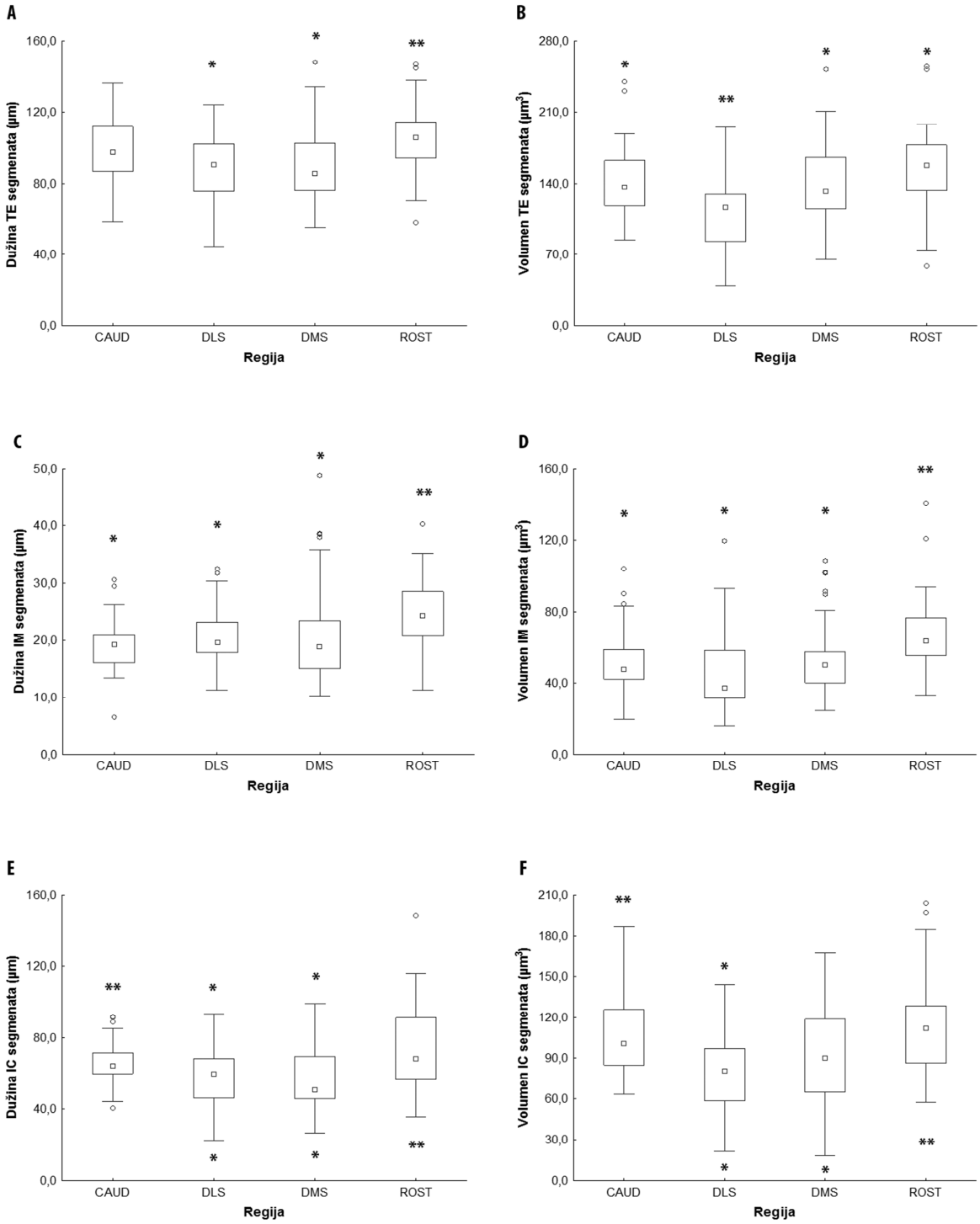
Slika 5.15a Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (B) Regija CAUD značajno odstupa od svih regija ($p<0,0001$), a regija DLS odstupa od regija CAUD, DMS ($p<0,005$) i ROST ($p<0,02$). (D) CAUD značajno odstupa od DMS i ROST ($p<0,0001$). (E-F) CAUD značajno odstupa od svih regija ($p<0,0001$), a ROST od CAUD i DMS ($p<0,001$).



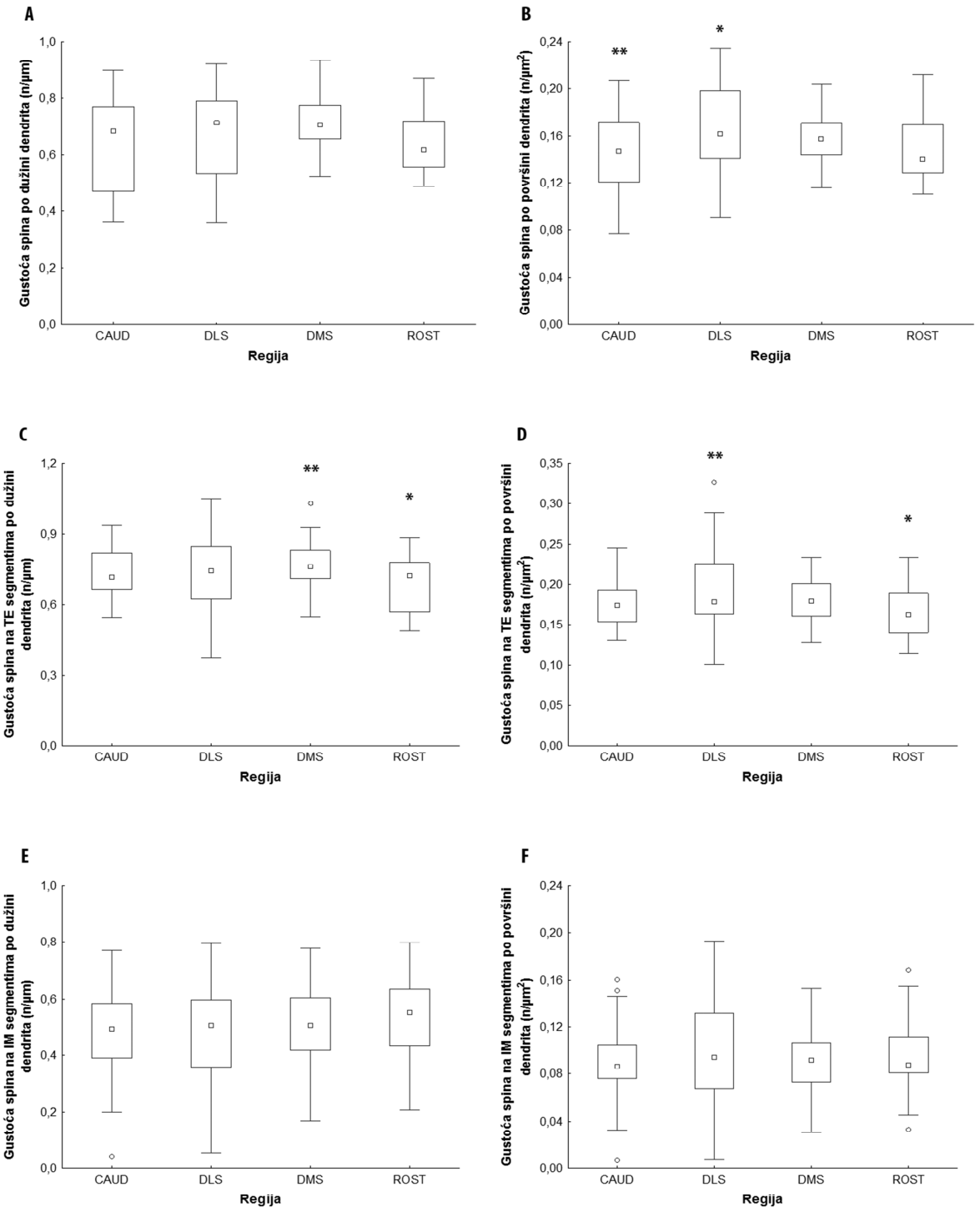
Slika 5.15b Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A-B) Regija DLS odstupa od regija CAUD ($p<0,001$), DMS ($p<0,002$) i ROST ($p<0,0001$). (C) ROST odstupa od svih ostalih regija ($p<0,0001$). (D) CAUD i ROST odstupaju od DLS ($p<0,01$) i DMS ($p<0,0001$). (E-F) CAUD i ROST značajno odstupaju od ostalih regija ($p<0,001$).



Slika 5.16 Regionalni grafički prikaz specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (A) Regija ROST značajno odstupa od regija DLS i DMS ($p<0,002$). (B) DLS značajno odstupa od regija CAUD, DMS ($p<0,002$) i ROST ($p<0,0001$). (C-D) ROST značajno odstupa od svih ostalih regija ($p<0,001$). (E-F) ROST značajno odstupa od DLS i DMS ($p<0,001$), a CAUD značajno odstupa od DLS ($p<0,01$) i (E) DMS ($p<0,03$).



Slika 5.17 Regionalni grafički prikaz parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po neuronu. (B) Regija CAUD pokazuje značajno odstupanje u odnosu na regiju DLS ($p<0,03$). (C) Regija DMS značajno odstupa od regije ROST ($p<0,03$). (D) Regija DLS značajno odstupa od ROST ($p<0,01$).

5.2.2.3. Regionalna analiza morfoloških parametara transgeničnih životinja u usporedbi s kontrolnom skupinom

Statistički značajne razlike dobivene grupiranjem po jednom neuronu bilo je potrebno potvrditi i grupiranjem po pojedinoj životinji i to tako da se svaka linija pokaže istovremeno sa svojom kontrolnom skupinom.

U genotipu HUM nalazimo statistički značajne razlike u parametrima: površina tijela neurona (slika 5.18a) i to u rostralnoj regiji gdje linija ROSTki ima značajno manju površinu od linije ROSTwt te bazalnom i prosječnom promjeru dendrita (slika 5.18b) gdje u regiji CAUD linija CAUDwt ima statistički značajno veći promjer od linije CAUDki.

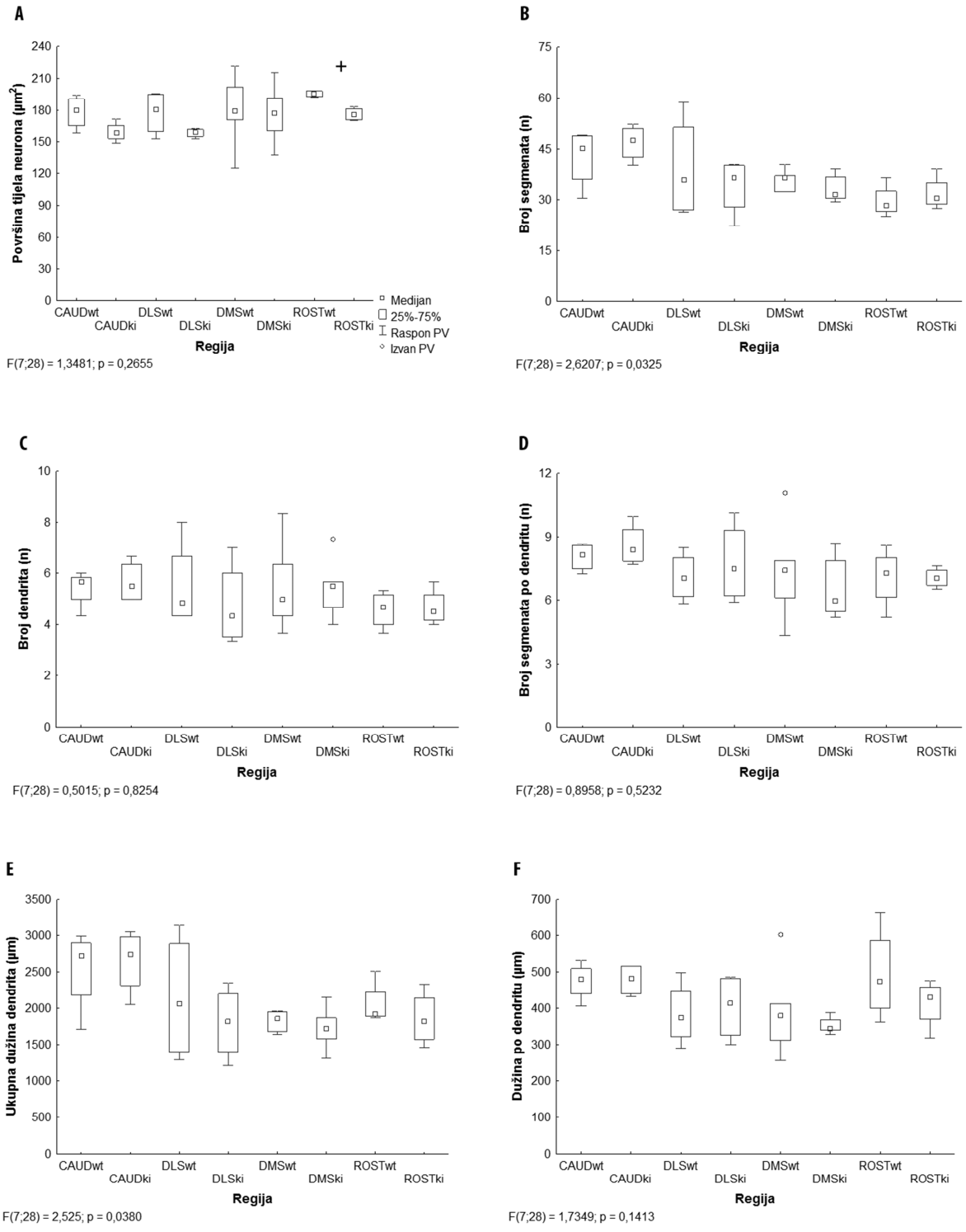
Segmentalna dendritička analiza (slika 5.19) pokazuje značajnu razliku u parametru dužine terminalnih segmenata u rostralnoj regiji gdje linija ROSTwt ima značajno veću dužinu od linije ROSTki. Također, volumeni intermedijarnih i prekinutih segmenata pokazuju odstupanja u kaudalnom strijatumu gdje linija CAUDwt ima značajno veći volumen od linije CAUDki.

Rostralni strijatum ima značajna odstupanja u gustoći dendritičkih trnova po dužini i površini dendrita (slika 5.20) i to u oba slučaja linija ROSTki ima statistički značajno veću gustoću trnova od linije ROSTwt.

U genotipu N324S nije bilo statistički značajnih razlika u regionalnoj analizi između transgeničnih miševa i kontrolne skupine.

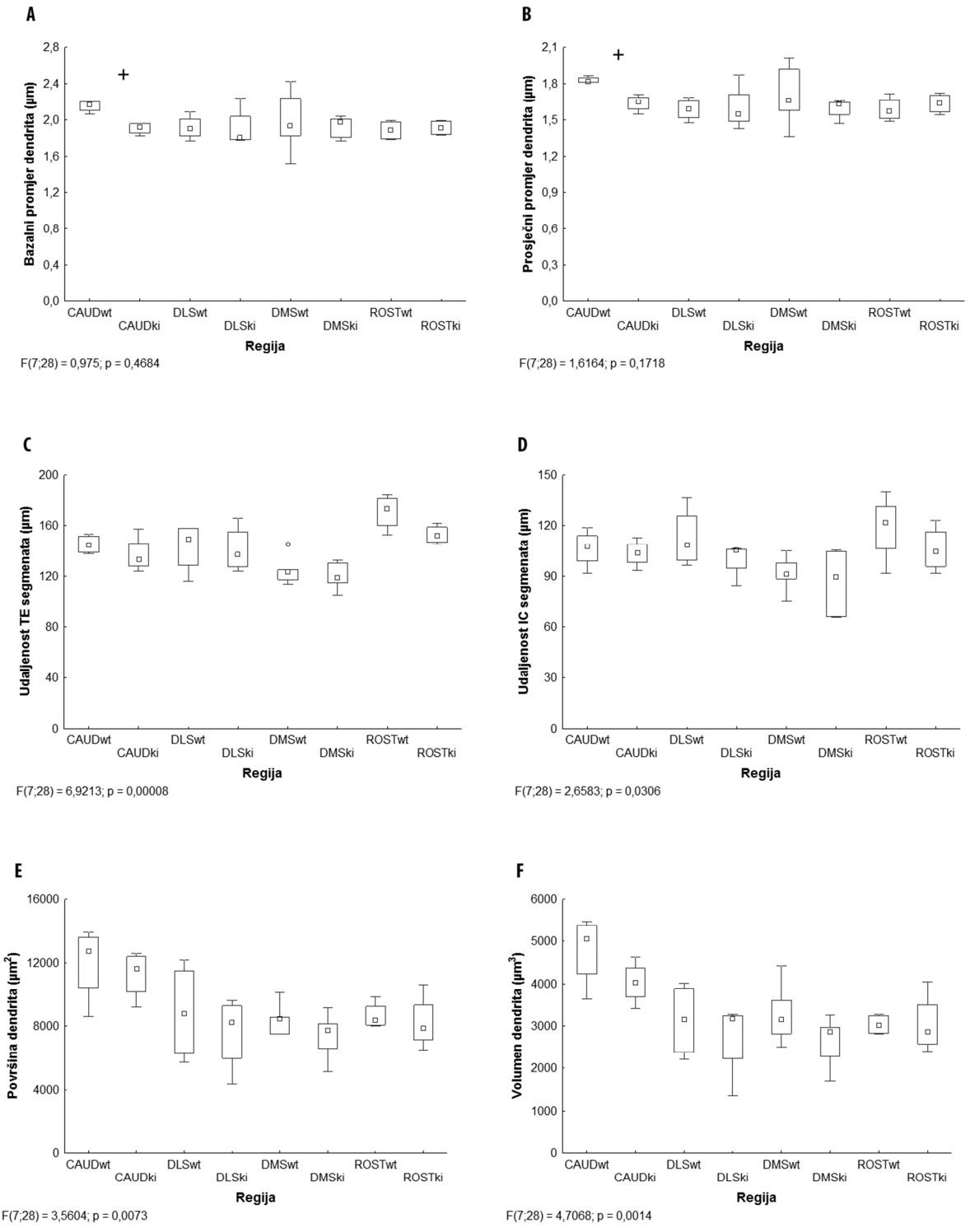
U genotipu T302N u parametrima volumena terminalnih i intermedijarnih segmenata (slika 5.25) statistički značajna razlika između linija postoji u kaudalnom strijatumu gdje linija CAUDwt ima veći volumen od linije CAUDki.

5.2.2.3.1. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{hum} u usporedbi s kontrolnom



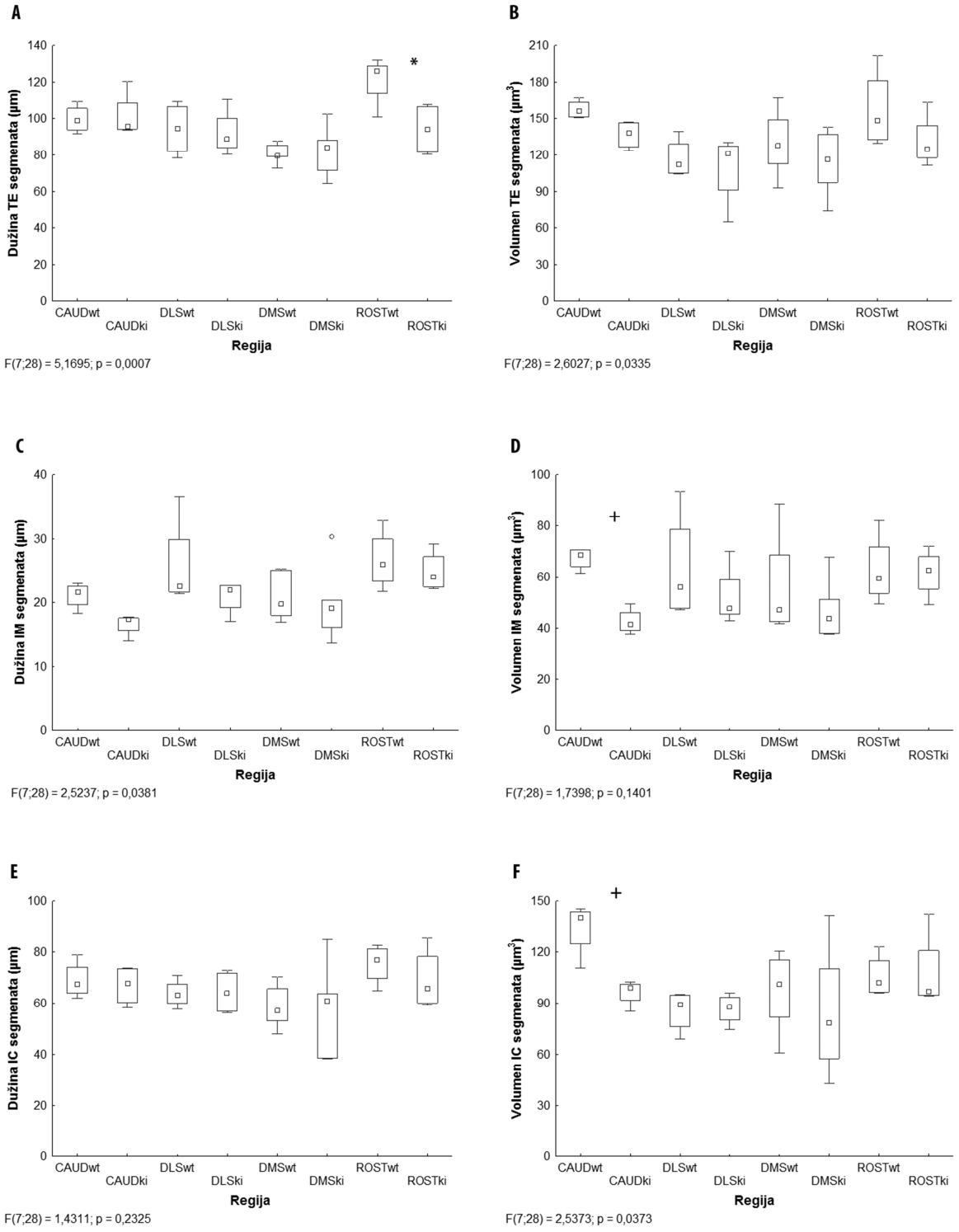
Slika 5.18a Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A) U regiji ROST između linija ROSTwt i ROST ki postoji značajna razlika ($p<0,001$).



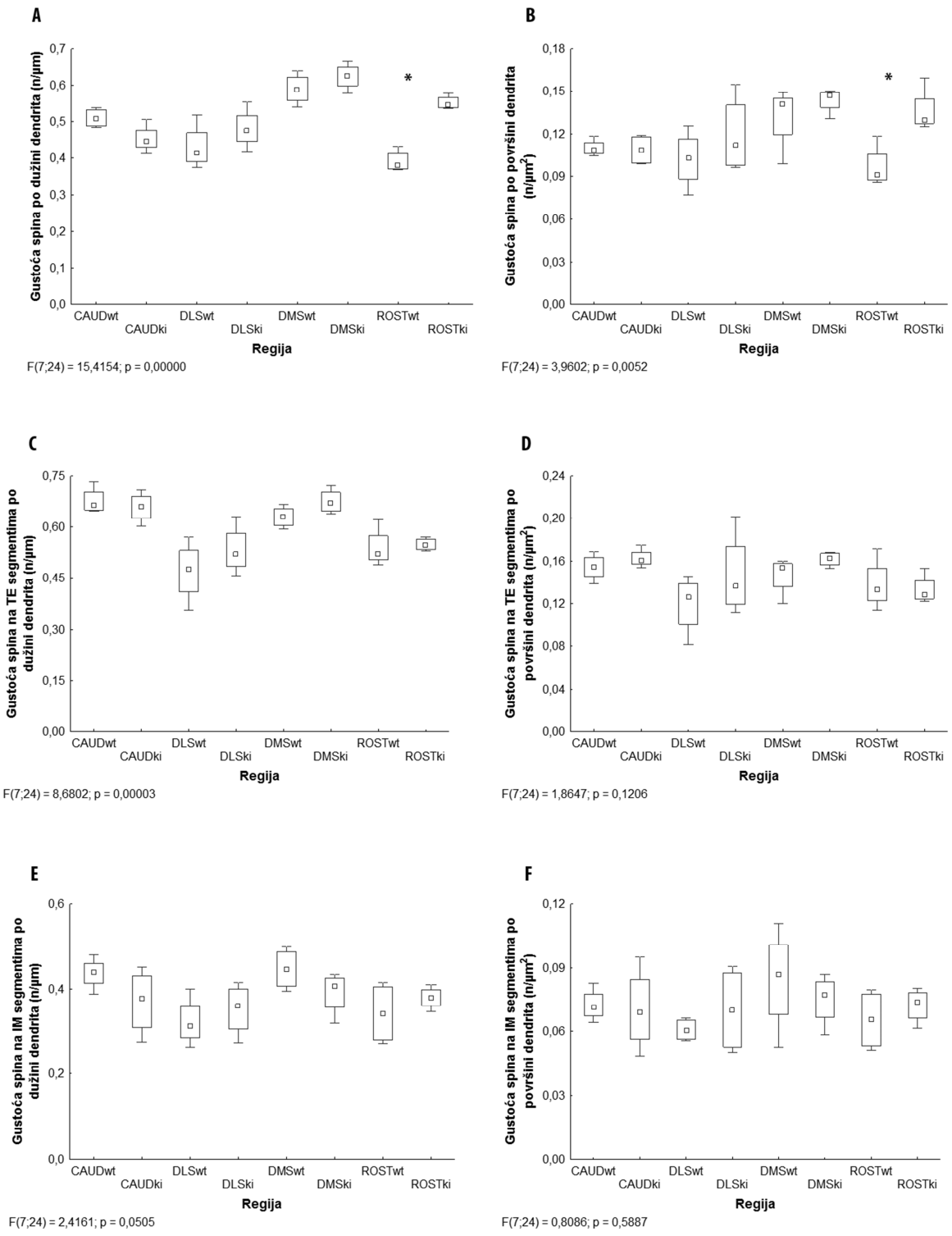
Slika 5.18b Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A-B) U regiji CAUD linija CAUDwt ima značajno veće promjere od linije CAUDki ($p<0,001$).



Slika 5.19 Regionalni grafički prikaz specifičnih morfoloških parametara.

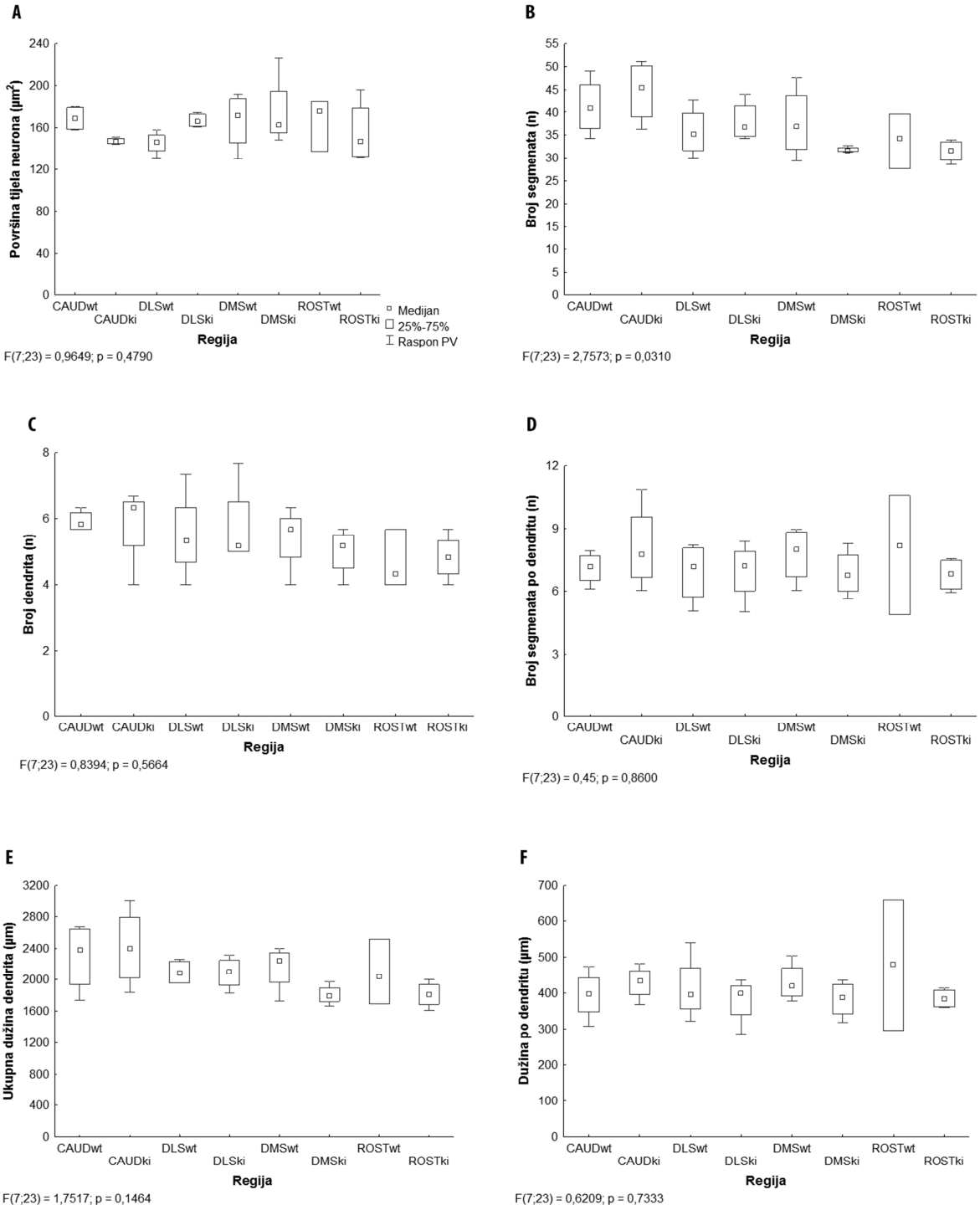
Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A) U regiji ROST linija ROSTwt je značajno različita od linije ROSTki ($p<0,03$). (D) U regiji CAUD linija CAUDwt je značajno različita od linije CAUDki ($p<0,0001$). (F) U regiji CAUD linija CAUDwt je značajno različita od linije CAUDki ($p<0,005$).



Slika 5.20 Regionalni grafički prikaz parametara gustoće dendritičkih trnova.

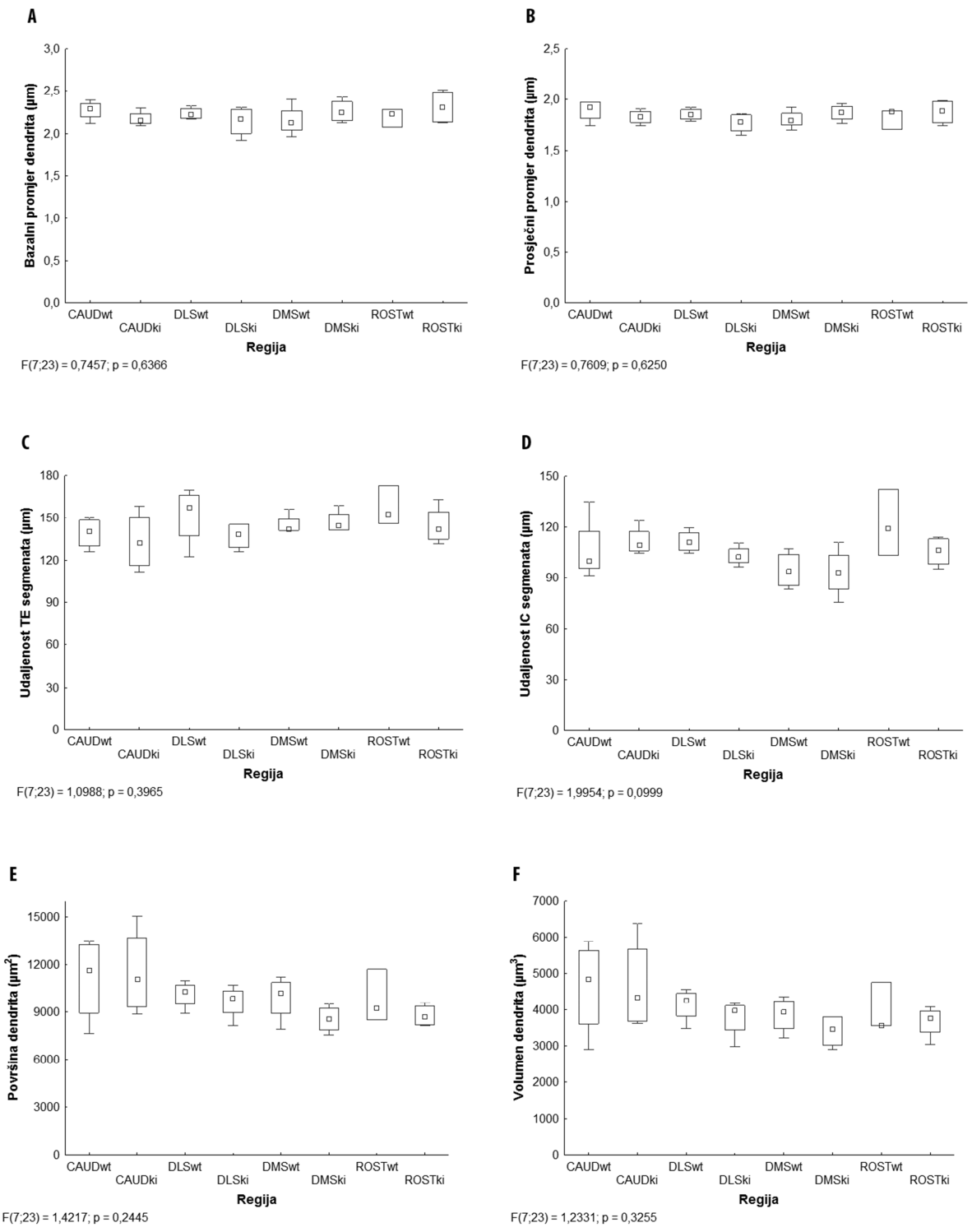
Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A-B) U regiji ROST linija ROSTwt je značajno različita od linije ROSTki ($p<0,0001$).

5.2.2.3.2. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{N324S} u usporedbi s kontrolnom skupinom



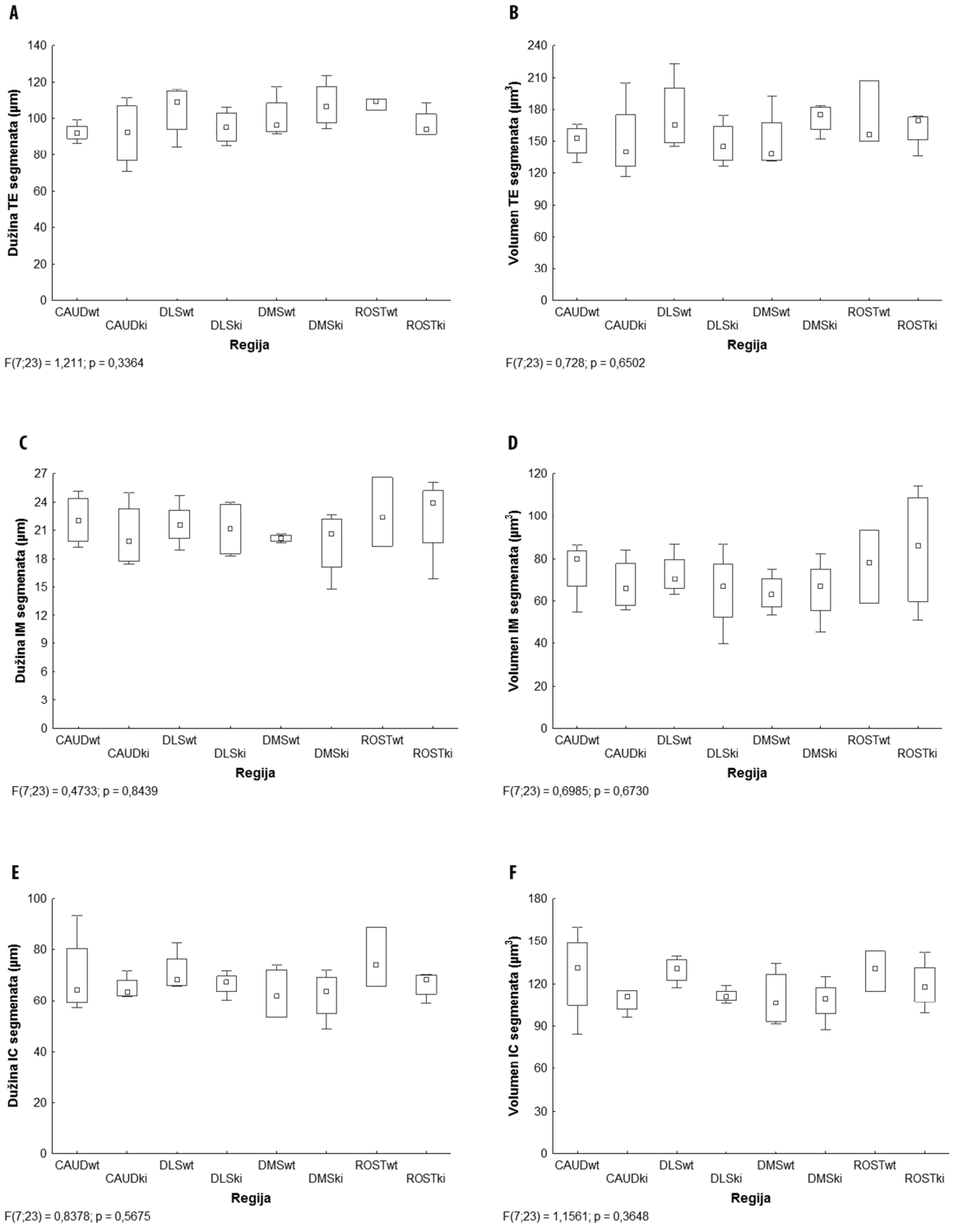
Slika 5.21a Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



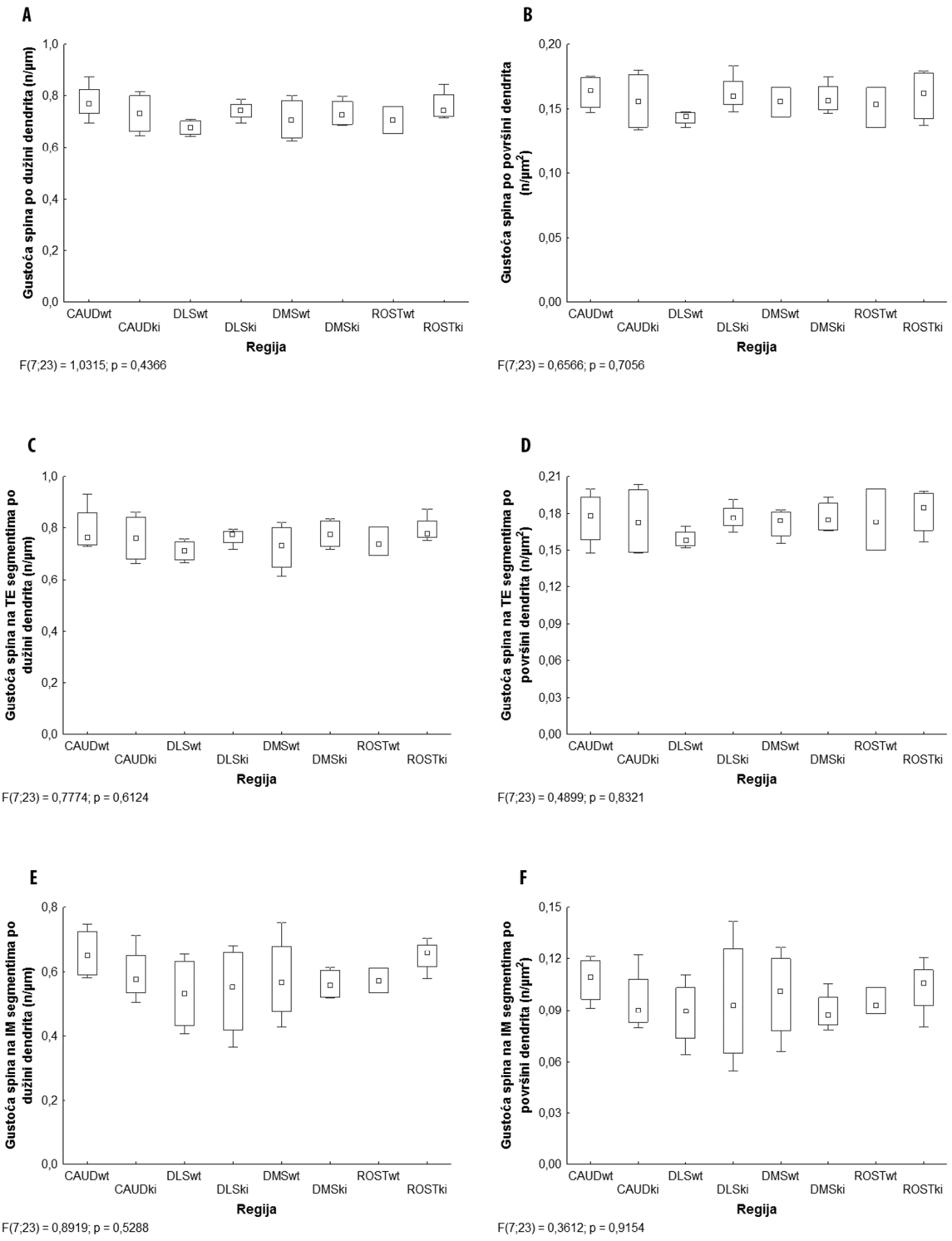
Slika 5.21b Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



Slika 5.22 Regionalni grafički prikaz specifičnih morfoloških parametara.

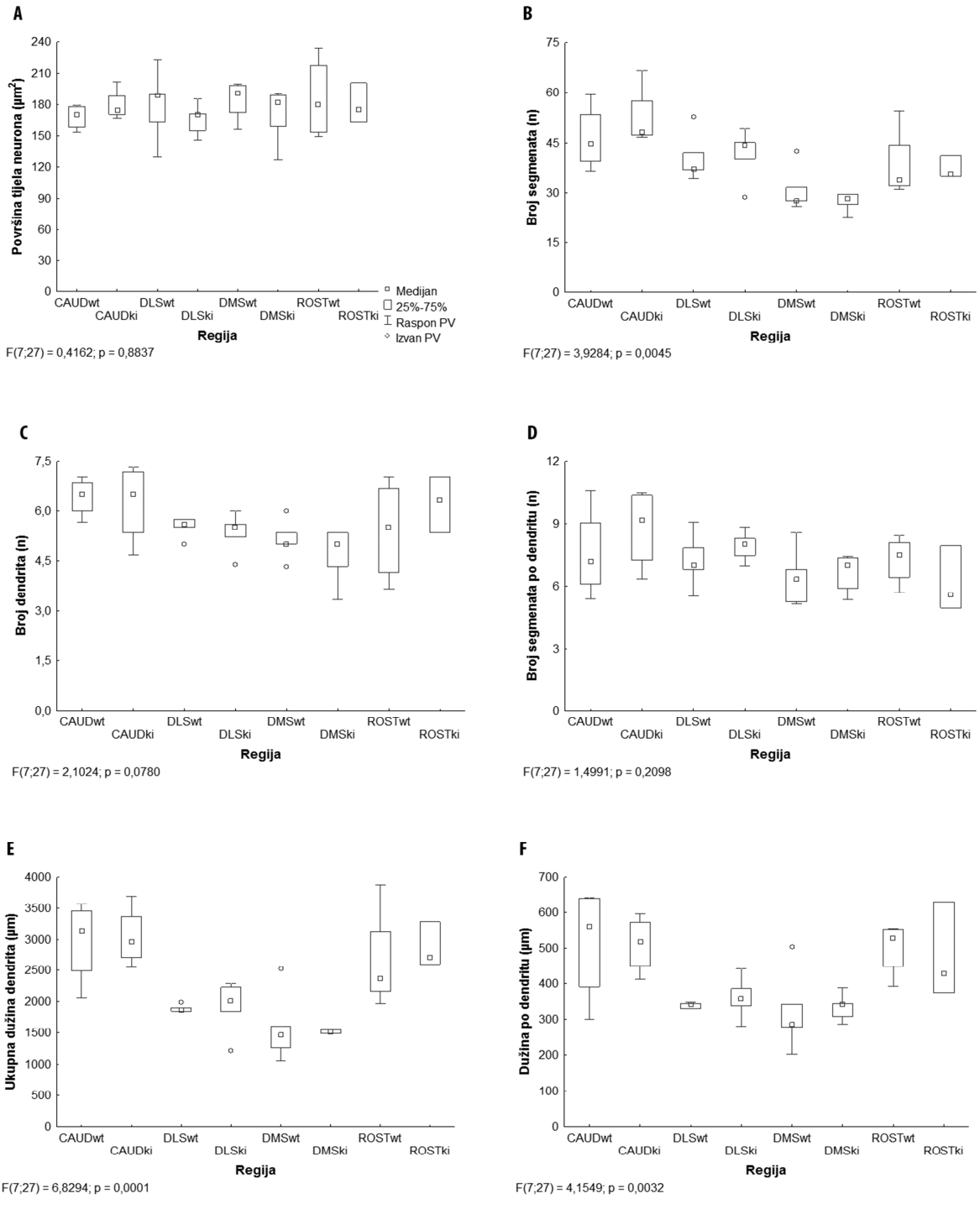
Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



Slika 5.23 Regionalni grafički prikaz parametara gustoće dendritičkih trnova.

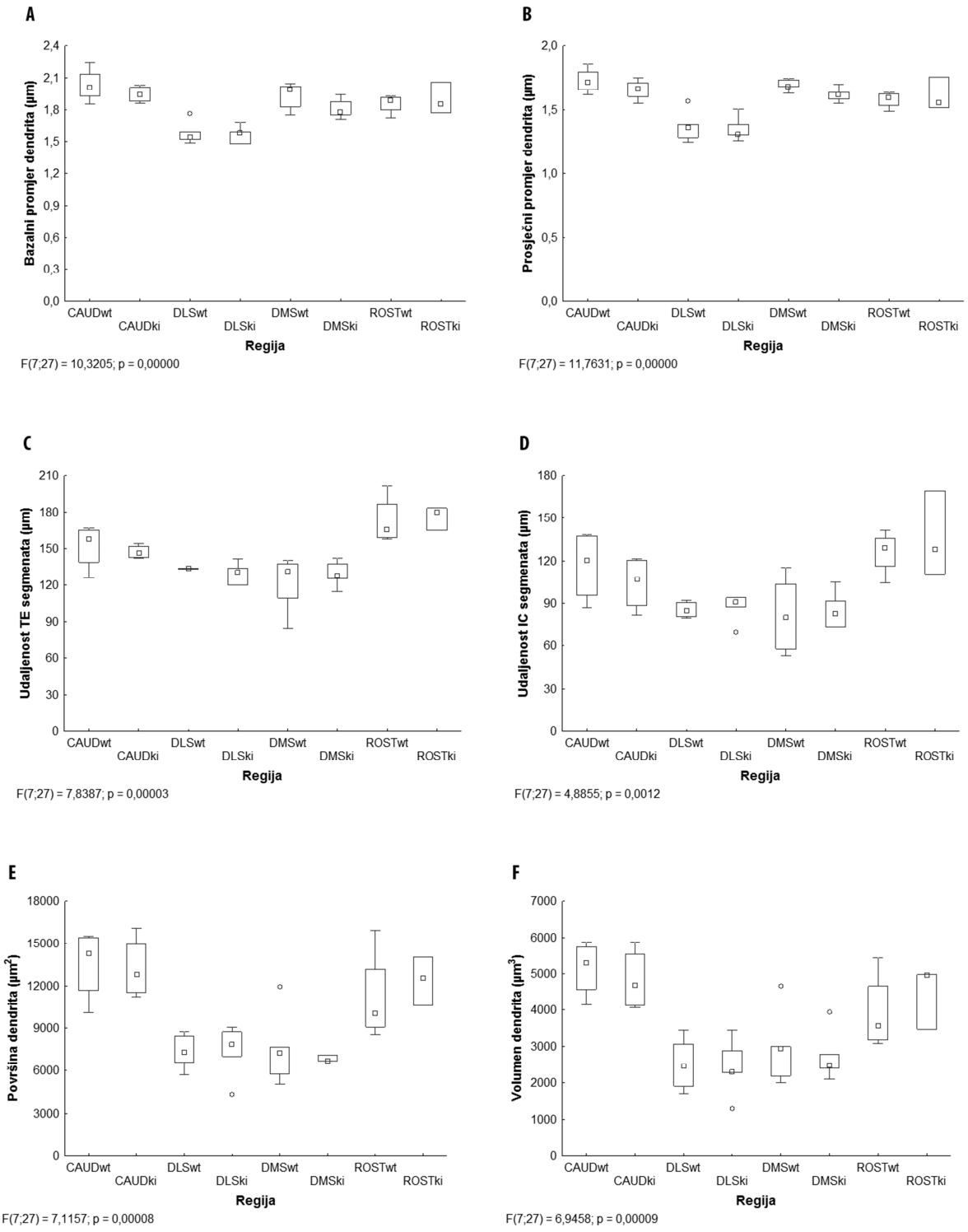
Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.

5.2.2.3.3. Prikaz morfoloških parametara linije *Foxp2* ^{T302N} u usporedbi s kontrolnom skupinom



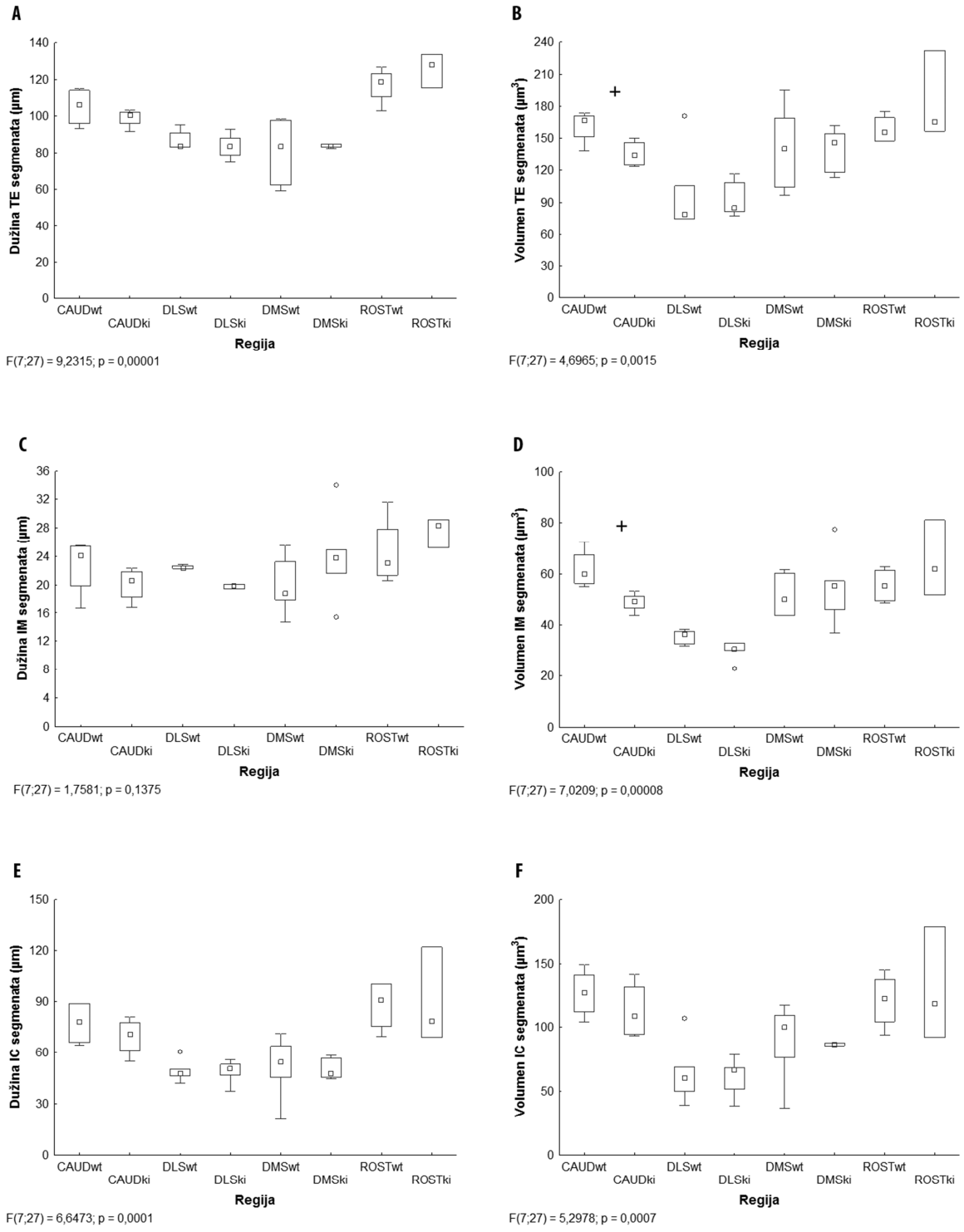
Slika 5.24a Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



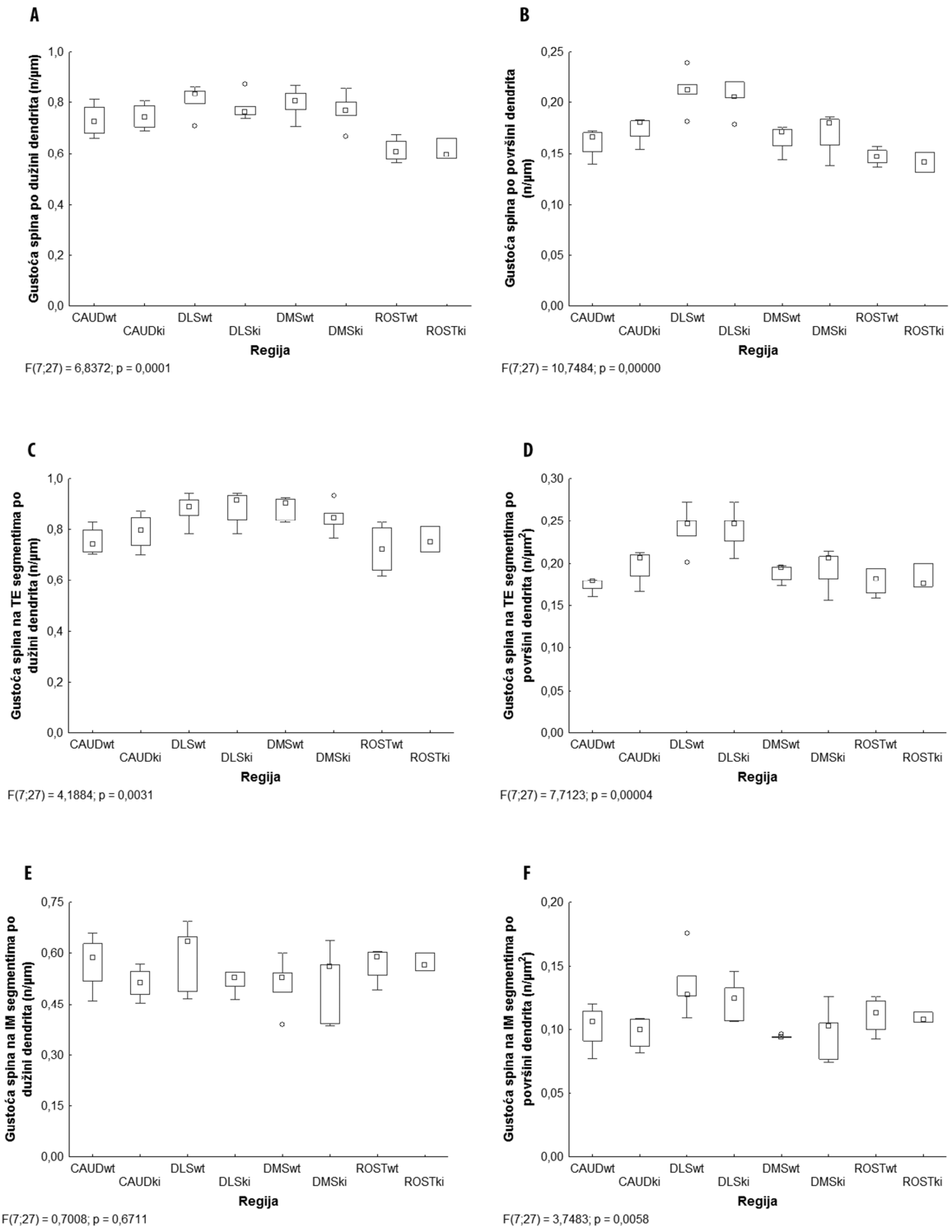
Slika 5.24b Regionalni grafički prikaz općih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.



Slika 5.25 Regionalni grafički prikaz specifičnih morfoloških parametara.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu. (A) U regiji CAUD linija CAUDwt statistički značajno odstupa od linije CAUDki ($p<0,04$). (B) U regiji CAUD linija CAUDwt statistički značajno odstupa od linije CAUDki ($p<0,02$).



Slika 5.26 Regionalni grafički prikaz parametara gustoće dendritičkih trnova.

Svi parametri su prikazani kao prosječne vrijednosti po mozgu.

6. RASPRAVA

6.1. Analiza morfoloških parametara trnastih srednje velikih neurona strijatuma u miševa divljeg tipa

U dosadašnjim istraživanjima o morfologiji najbrojnije populacije neurona u strijatumu, trnastih srednje velikih neurona, kvalitativno su opisane varijacije u njihovoj morfologiji, no kvantitativni podatci ograničeni su samo na parametre oblika i površine tijela neurona, ukupne dužine dendritičkog stabla te gustoću trnova na dendritima, ali bez detaljne segmentalne analize dendrita. Osim studije koja je istraživala funkcionalne i morfološke razlike između trnastih srednje velikih neurona koji izražavaju različite vrste dopaminskih receptora, u kojoj je analizirana morfologija 31 neurona [44], ostale studije nisu uključile trodimenzionalnu analizu dendritičkog stabla.

Kako je cilj istraživanja bio proučiti odstupanja u morfologiji ovih neurona u transgeničnih životinja s humaniziranim oblikom *Foxp2* gena, prvo je bilo potrebno detaljno analizirati morfološke parametre u životinja divljeg tipa.

Analiza je izvršena u tri serije eksperimenata koje su provedene u različito vrijeme te je usporedbom vrijednosti između ove tri kontrolne skupine životinja ujedno analizirana i ujednačenost morfoloških parametara.

Tako dobiveni parametri dužine dendrita u skladu su s rezultatima dobivenima u prethodnim studijama u miševa i štakora [32-34, 38, 44], kao i u drugih vrsta sisavaca [35-37, 45] te gmazova [46]. Njihove prosječne vrijednosti pokazuju visok stupanj konzistencije. Ipak, naši podatci, kao i podatci iz prethodno navedene literature pokazuju velik stupanj raznolikosti u morfologiji pojedinačnih neurona. Kvantitativni podatci mogu se u pojedinačnih neurona razlikovati i više od 5 puta, iako distribucija uzorka kao i standardna devijacija ukazuju da se radi o homogenoj skupini neurona. Iako su morfološka istraživanja opisala odstupanja od tipičnih oblika srednje velikih trnastih neurona, ovakvi oblici imaju vrlo mali udio u ukupnoj populaciji srednje velikih trnastih neurona strijatuma, a moguće je da se radi i o odvojenim populacijama.

Do sada su samo u jednoj studiji pronađene morfološke razlike između neurona koji izražavaju D1 i onih koji izražavaju D2 dopaminske receptore, i to na modelu transgeničnog miša čiji neuroni izražavaju zeleni fluorescentni protein [44].

Ta je studija pokazala da su ukupna dužina dendrita, broj točaka grananja i terminalnih završetaka te broj primarnih dendrita signifikantno veći u neurona odraslih miševa koji izražavaju D1 receptor.
Na našem uzorku nije pronađena bilaminarna distribucija neurona koja bi ukazivala na postojanje morfološki dvije jasno odvojene populacije, što i nije iznenađenje s obzirom da su razlike opisane između D1 i D2 neurona pokazale da se ne radi o razdvojenim populacijama koje bi se mogle definirati na temelju kvalitativnih i kvantitativnih podataka, već se velikim dijelom ova svojstva preklapaju između populacija. Tako bi razlike opisane u ovom istraživanju mogle biti odraz različite distribucije D1 i D2 subpopulacije trnastih srednje velikih neurona unutar samog strijatuma.

Dužine intermedijarnih i terminalnih segmenata dobivene u ovoj disertaciji ukazuju da trnasti srednje veliki neuroni imaju sličan tip grananja kao bazalni dendriti V. sloja piramidnih neurona u ljudskoj prefrontalnoj moždanoj kori [47] koji su manje razgranati od piramidnih neurona III. sloja iste regije [48]. Kada se pak usporede s ostalim Golgi Cox analizama rađenima u našem laboratoriju, veličina i složenost dendritičkih stabala trnastih srednje velikih neurona odgovara bazalnim dendritičkim stablima najvećih piramidnih neurona u primarnoj motoričkoj kori miševa [49], iako su veličina i tip grananja trnastih srednje velikih neurona puno veće i složenije nego one piramidnih neurona asocijativne moždane kore [50] i granularnih stanica dentatusa štakora [51].
Za razliku od gore spomenutih parametara, parametri volumena i površine tijela neurona pokazali su se dosta nekonzistentni između uspoređivanih linija eksperimentalnih životinja.

6.2. Konzistentnost morfoloških parametara trnastih srednje velikih neurona strijatuma

U životinja divljeg tipa utvrđene su razlike u parametru površine tijela neurona, ukupnom volumenu dendrita, volumenima dendrita u svim segmentima te gustoći dendritičkih trnova. Promjene volumena bile su posljedica promjena u promjeru dendrita jer nije bilo značajnih razlika u ukupnoj dužini i dužini individualnih segmenata.
S obzirom da je i kod transgeničnih životinja uočena istovjetna tendencija, a transgenične životinje su također paralelno procesirane u serijama, kao i kontrolni divlji tip, te razlike najvjerojatnije su metodološki uzrokovane. Treba spomenuti kako je u sve tri serije strogo primijenjen istovjetan protokol, točno prema uputi proizvođača. Kako je volumen dendrita bio najmanji u skupini koja je dodatno bila bojana toluidinskim modrilom, moguće je da je zbog

dodatnog bojanja došlo do skvrčavanja samog reza, iako se ne može isključiti niti razlika u skvrčavanju tkiva u proceduri prije samoga rezanja [47]. Rezovi su bili izvorno debljine 200 μm, a mjerenjem debljine nakon rezanja može se pretpostaviti stanjivanje od 5-10%, odnosno do 20% u rezova dodatno obrađenih toluidinom. Zbog velike krtosti blokova impregniranih Golgi metodom, tijekom rezanja dolazi do značajnog oštećenja rubova pa tako nije moguće ove podatke o debljini smatrati potpuno konzistentnima. Uz to, kod rezova obrađenih toluidinskim bojanjem teže se zbog dodatnog obojenja može odrediti gornja i donja granica reza, što je dodatni razlog zašto se rezultati mjerenja debljine reza ne mogu smatrati konzistentnim za kvantifikaciju. Iz tog razloga rezultati o potencijalnom stanjivanju reza kao razlog promjena u promjeru dendrita nisu prikazani u dijelu rezultata.

Također, ukoliko su metodološki uvjetovane, primarni razlog razlika u debljini dendrita trebao bi se vezati uz proces dehidracije samog bloka, kada dolazi do izvlačenja vode iz tkiva pa tako i samih stanica. Kako se radi o malim blokovima i vrlo malim razlikama u skvrčavanju, ovakve promjene je iznimno teško konzistentno utvrditi.

Golgi Cox metoda u obliku kita koja je korištena u ovoj studiji nije prije korištena za analize u našem laboratoriju, niti je u literaturi opisana njena konzistentnost u bojanju u odnosu na klasičnu Golgi Cox metodu. Ono što je važno napomenuti je da su podatci o duljini i razgranatosti bili iznimno konzistentni, što je bitno za vjerodostojnost rezultata kada se eksperimentalni postupak ne provodi potpuno paralelno i u isto vrijeme, što je slučaj u većini istraživanja.

Promjene u promjeru dendrita iznimno su dinamične i brzo se mijenjaju ovisno o funkcionalnom stanju neurona [52] tako da uočene razlike ne moraju nužno biti posljedica obrade tkiva u postupku Golgi impregnacije, već mogu biti odraz funkcionalnog stanja neurona u trenutku žrtvovanja. Unatoč tome što su sve životinje držane u istim uvjetima i prema istom protokolu, nemoguće je bilo standardizirati ponašanje majki i ostalih životinja koje su bile u okruženju, tako da je moguće da su životinje bile pod utjecajem različitog socijalnog okruženja ili uvjeta u životinjskoj nastambi što je također moglo utjecati na debljinu dendrita osobito u vrijeme razvoja [52-55].

Većina životinja u ovoj studiji žrtvovana je u ranoj odrasloj dobi, tako da razlike dobivene između grupa mogu podržati prethodna istraživanja koja su pokazala kako na debljinu dendrita izrazito utječe okolina u vrijeme razvoja [52-55]. Za odrasli strijatum je isto tako dokazano da u određenim okolnostima pokazuje sinaptičku plastičnost [56]. Podatci dobiveni u ovoj disertaciji isto tako sugeriraju da su u vrijeme razvoja dendriti trnastih srednje velikih

neurona u miša posebno osjetljivi na stimulaciju iz okoline, kao što je prethodno sugerirano u štakora [57].

Unatoč uočenim neujednačenostima u debljini dendrita i površini tijela neurona koje su moguće metodološki uvjetovane, skladnost ostalih parametara dendritičke morfologije omogućava njihovo korištenje kao referentnih vrijednosti u daljnjim morfološkim istraživanjima koja koriste različite modele genetski modificiranih životinja za opisivanje patoloških stanja koja mogu zahvatiti trnaste srednje velike neurone strijatuma.

6.3. Regionalne razlike u morfologiji trnastih srednje velikih neurona strijatuma

Dosadašnja istraživanja nisu ukazala na to da bi mogle postojati morfološke razlike trnastih srednje velikih neurona u različitim dijelovima strijatuma, iako je jedna studija pokazala da kroz odraslu dob dolazi do različitih promjena u morfologiji ovih neurona u kaudalnom dijelu strijatuma [58]. Ta je studija pokazala da veličina dendritičkog stabla trnastih srednje velikih neurona u rostralnom strijatumu ostaje stabilna sa starenjem, dok u neuronima kaudalnog strijatuma dolazi do značajnog povećanja ukupne dužine dendrita između 25. i 30. mjeseca života i to najvećim dijelom zbog izduženja, a ne izrastanja novih segmenata.

Usporedba vrijednosti morfoloških parametara unutar sve četiri ispitane regije strijatuma u ovoj disertaciji (rostralne, dorzomedijalne, dorzolateralne, kaudalne) pokazala je da se morfologija dendrita razlikuje između rostralnog, središnjeg i kaudalnog dijela strijatuma. Regionalne razlike opažene unutar miševa divljeg tipa opažene su i unutar transgeničnih životinja kada su sve tri linije analizirane zajedno. U središnjem dijelu strijatuma nije uočena razlika između medijalnog i lateralnog dijela, što pokazuje da su uočene razlike prisutne samo u rostro-kaudalnom smjeru. Ovdje treba napomenuti kako je u središnjem dijelu analizirana samo dorzalna polovica strijatuma, a u rostralnom i kaudalnom dijelu neuroni nisu uzeti iz ventralnog dijela (*nucleus accumbens*). Stoga rezultati ovog istraživanje ne isključuju i postojanje ventro-dorzalnih razlika u morfologiji srednje velikih trnastih neurona.

Kako su razlike unutar same populacije srednje velikih trnastih neurona vrlo izražene, vidljivo je da dobivene razlike u rostro-kaudalnom smjeru ne predstavljaju razlike u kvalitativnom smislu, već se radi o razlikama u određenim oblicima dendritičkog stabla koje su i statistički značajne. Iako je dendritičko stablo neurona u rostralnom i kaudalnom dijelu veće u odnosu na središnji dio, zanimljivo je kako se topološki primjećuje različita tendencija. Tako neuroni

u kaudalnom strijatumu imaju duže i razmjerno tome razgranatije dendritičko stablo koje sadrži više segmenata, dok kod neurona u rostralnom strijatumu povećanje dužine ne prati i povećanje broja segmenata. Također, u kaudalnom strijatumu dendriti imaju i veći promjer pa shodno tome i značajno veći volumen, čak i na razini individualnih segmenata kod kojih nema razlike u prosječnoj dužini. Za razliku od toga, u rostralnom strijatumu dendriti su duži, ali manjeg prosječnog promjera i u prosjeku s dužim segmentima.
Ovakve regionalne promjene mogu biti odraz razlika u projekcijama unutar različitih dijelova strijatuma koji imaju pravilnu topografsku organizaciju u odnosu na koru velikoga mozga. S obzirom da su rostralni i kaudalni dijelovi strijatuma povezani s asocijativnim područjima moždane kore, to može pojasniti veću složenost dendritičkog stabla u tim dijelovima strijatuma. Razlike u topolgiji dendrita između ova dva dijela strijatuma ujedno pokazuju funkcionalnu i strukturnu specijalizaciju između različitih projekcija i područja mozga.

6.4. Usporedba morfologije projekcijskih srednje velikih neurona strijatuma između tri transgenične populacije miševa (*Foxp2*^{hum}, *Foxp2*^{N324S}, *Foxp2*^{T302N}) i miševa divljeg tipa

U istraživanju Enarda i suradnika [27] je pokazano kako neuroni kortiko-strijatalnih krugova humaniziranog miša (sa zamjenom obje aminokiseline), koji imaju visok stupanj ekspresije *Foxp2* gena, imaju i do 50% veću duljinu dendritičkog stabla od neurona životinja divljeg tipa. Osim promjena u morfologiji neurona, opisan je i utjecaj humaniziranog *Foxp2* gena na koncentraciju dopamina, elektrofiziološke promjene na trnastim srednje velikim neuronima strijatuma, promjene u glasanju životinja te promjene u motoričkom ponašanju životinja.
Humanizirani alel tako utječe na smanjenje sposobnosti životinja za istraživanje okoline, sniženje koncentracije dopamina u različitim dijelovima mozga, pojačanje dugoročne depresije nakon visoko frekventne stimulacije (LTD) i diskretno smanjenje vokalnog glasanja životinja.

Kako je cilj ovog istraživanja bio primarno utvrditi u kojoj mjeri su prije opisane promjene na neuronima strijatuma vezane uz promjenu samo na jednom od dva mjesta na *Foxp2* genu te utvrditi postoje li regionalne razlike u promjenama na neuronima strijatuma, rezultati nisu uspjeli jasno potvrditi rast dendritičkog stabla na trnastim srednje velikim neuronima strijatuma dobiven u prethodno spomenutoj studiji.

Međutim, u humaniziranog miša je pokazana tendencija prethodno opisanim promjenama jer su volumeni terminalnih i intermedijarnih segmenata u kaudalnom dijelu bili statistički značajno manji nego u kontrolnoj skupini. To ukazuje na mogućnost blagog produljenja dendritičkog stabla, iako su promjene volumena bile najvećim dijelom posljedica smanjivanja promjera dendrita. Istovremeno, gustoća trnova je u rostralnom dijelu po duljini dendrita bila značajno veća nego u kontrolnoj skupini. Prosječna dužina terminalnog segmenta bila je kod *Foxp2* ^{hum} linije značajno manja u rostralnom dijelu, kao i površina tijela. To ukazuje na mogućnost da je u rostralnom dijelu došlo do blagog skraćivanja dužine dendrita, ali bez smanjivanja broja trnova s obzirom da je njihova gustoća veća u *Foxp2* ^{hum} liniji miševa.
Te promjene ne potvrđuju hipotezu postavljenu u prethodnim radovima da promjene u *Foxp2* genu tijekom evolucije čovjeka utječu intrinzički na rast dendritičkog stabla trnastih srednje velikih neurona. Uočene promjene morfologije neurona vezane su uz parametre i u opsegu koji prije ukazuje na promjene u funkcionalnoj aktivnosti unutar neuralnih krugova strijatuma. Značajno viša dugoročna depresija nakon visoko frekventne stimulacije (LTD) na trnastim srednje velikim neuronima strijatuma humaniziranog miša u odnosu na kontrolnu skupinu tako pokazuje veću razinu sinaptičke plastičnosti u transgenične životinje [27].
Zanimljivo je kako su istovjetne i statistički značajne promjene u funkcionalnoj aktivnosti trnastih srednje velikih neurona pronađene i u *Foxp2*^{T302N} liniji, ali ne i u *Foxp2*^{N324S} [59].
To ukazuje kako je promjena na poziciji T302N posebno važna u reorganizaciji neuralne mreže kortiko-strijatalnih krugova i indukciji strukturnih i funkcionalnih promjena koje će omogućiti procesuiranje govora.
U našoj studiji u *Foxp2*^{N324S} liniji nisu uočene nikakve značajne razlike u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su u *Foxp2*^{T302N} liniji uočene istovjetne promjene volumena kao i u humaniziranog miša. Ipak promjene u rostralnom dijelu koje su bile prisutne u humaniziranog miša nisu zamijećene.
Regionalne razlike u razinama dopamina i serotonina, kao i njihovih razgradnih produkata unutar strijatuma u sve tri linije miševa istraživane su unutar jedne veće studije (rezultati nisu objavljeni). Zanimljivo je kako se razina dopamina i serotonina najviše smanjila upravo u kaudalnom dijelu strijatuma humaniziranog miša. Promjene su također zabilježene i u drugim dijelovima: u dorzo-medijalnom strijatumu su smanjene razine i dopamina i serotonina, a u rostralnom se smanjila samo razina serotonina, dok u dorzolateralnom dijelu nije bilo promjena.
U *Foxp2*^{T302N} liniji promjene su bile istovjetne kao i u humanizirane linije, ali je ovdje smanjenje u dorzo-medijalnom dijelu bilo više izraženo.

Zanimljivo je da u liniji *Foxp2*^{N324S} nije bilo nikakvog odstupanja u dorzo-medijalnom, ali je u kaudalnom dijelu također smanjena razina dopamina, kao i u rostralnom dijelu.

Ovi podatci pokazuju da postoje strukturne, kemijske i funkcionalne promjene na trnastim srednje velikim neuronima strijatuma u humaniziranog miša koje su najvećim dijelom izražene u kaudalnom dijelu gdje su istovjetne promjene izražene i u liniji *Foxp2*^{T302N}. Podatci pokazuju i da su te promjene prvenstveno vezane uz funkcionalne promjene i da ne dovode do većih promjena u strukturi same neuralne mreže.

7. ZAKLJUČCI

1. Trnasti srednje veliki neuroni strijatuma morfološki su homogena populacija, ali uz širok raspon kada se parametri prikažu kao prosječne vrijednosti po pojedinom neuronu.
2. Postoje značajne regionalne razlike u morfologiji gdje neuroni u rostralnim i kaudalnim dijelovima imaju u prosjeku 15-20% veće dendritičko stablo, ali uz različitu topologiju; u kaudalnim se dijelovima proporcionalno povećava broj segmenata, dok u rostralnim dijelovima to nije slučaj tako da su u prosjeku pojedinačni segmenti značajno duži.
3. Nisu uočene veće promjene u morfologiji dendrita trnastih srednje velikih neurona strijatuma u životinja s humaniziranim oblikom *Foxp2* gena, što ukazuje da promjene u strukturi ovog gena nisu izravno povezane s izrastanjem dendrita, kao što je bilo pretpostavljeno na temelju rezultata prethodnih istraživanja.
4. Značajnije razlike vidljive su samo na malom broju parametara i odnose se na parametre koji prikazuju volumen, gustoću dendritičkih trnova, ali i prosječnu dužinu terminalnog segmenta. Ove promjene su najviše izražene u rostalnom dijelu strijatuma dok se manji broj parametara razlikuje u kaudalnom dijelu, a u središnjim dijelovima koji su vezani uz motorna i somatosenzibilna područja razlike nisu pronađene.
5. Kod linije miševa sa zamjenom samo jedne aminokiseline nisu uočene značajne razlike niti u jednom parametru, osim razlika u prosječnim volumenima pojedinačnih segmenata u kaudalnom dijelu strijatuma kod linije miševa s promjenom na mjestu T302N (*Foxp2* ^{T302N}).
6. Taj rezultat pokazuje da su promjene prisutne kod humaniziranog oblika *Foxp2* gena vezane uz obje supstitucije u genu (*Foxp2* ^{T302N} i *Foxp2* ^{N324}).

8. SAŽETAK

Smatra se da *FOXP2* gen ima važnu ulogu u neuralnim krugovima koji omogućavaju procesiranje govora. Protein koji kodira taj gen se između čimpanze i čovjeka razlikuje u samo dvije aminokiseline što govori u prilog njegove visoke konzerviranosti. U ljudi sa samo jednim funkcionalnim alelom *FOXP2* gena najizraženije strukturne promjene se nalaze u strijatumu, što korelira s poremećajima govora. Transgenična varijanta čovječjeg gena dovela je u miša do različitih elektrofizioloških promjena i promjena u ponašanju. Dosadašnja istraživanja su implicirala i njegov utjecaj na rast dendritičkog stabla u neuronima u kojih je izraženost *Foxp2* najveća, a to su trnasti srednje veliki neuroni strijatuma. Cilj ovoga istraživanja je bio detaljno analizirati morfologiju trnastih srednje velikih neurona strijatuma u miševa divljeg tipa koristeći Golgi Cox metodu, utvrditi regionalne razlike u morfologiji unutar strijatuma te vidjeti kako na njihovu morfologiju utječe humanizirani *Foxp2* gen i njegove dvije varijante ($Foxp2^{T302N}$ i $Foxp2^{N324S}$). Naše istraživanje je pokazalo da između transgeničnih životinja i njihovih kontrolnih skupina nije bilo značajnijih razlika u neuronalnoj morfologiji, no uočene su regionalne razlike i to osobito u rostralnom i kaudalnom dijelu strijatuma gdje neuroni u prosjeku imaju 15-20% veće dendritičko stablo, ali uz različitu topologiju. Tako se u kaudalnim dijelovima proporcionalno povećava broj segmenata, dok u rostralnim dijelovima to nije slučaj pa su u prosjeku pojedinačni segmenti značajno duži.

Iako razlike nisu značajne, one ukazuju na to da promjene u strukturi ovog gena nisu izravno povezane s izrastanjem dendrita, već da dolazi do promjene aktivnosti kortiko-strijatalnih krugova povezanih s čeonom i zatiljnom moždanom korom. U linijama miševa koje nose samo jednu zamijenjenu aminokiselinu nisu uočene značajne razlike u morfologiji dendritičkog stabla.

Dobiveni rezultati ukazuju da su promjene koje se mogu pripisati humaniziranom obliku *Foxp2* gena vezane uz potrebu zamjene obje aminokiseline u njegovom proteinu.

9. SUMMARY

Title: Changes in morphology of projection striatal neurons in mice with humanized versions of *Foxp2* gene

It has been proposed that the *FOXP2* gene has an important role in the function of neural circuitries involved in speech processing. A protein coded by this gene differs between chimpanzee and man in only two amino acids, which means that it is extremely conserved. Individuals with only one functional *FOXP2* allele suffer from speech impairment and have structural changes predominantly found in the striatum.

When a human variant of the gene was experimentally introduced into the *Foxp2* gene of mice, experiments showed that this gene caused electrophysiological as well as different behavioural changes in the experimental animals. Research studies implicated its role in dendritic outgrowth of neurons that highly express *Foxp2*, like medium spiny neurons of striatum.

The goal of this research was to analyse the morphology of medium spiny neurons in the wild type animals using Golgi-Cox method, to determine regional differences in their morphology throughout dorsal striatum and to see the possible effect of humanized *Foxp2* gene and two additional lines of transgenic animals ($Foxp2^{T302N}$ and $Foxp2^{N324S}$) on their morphology.

The results showed that there were no major morphological differences between the neurons of transgenic animals and their control group but there were regional differences in neuronal morphology, especially in the rostral and caudal striatum where the neurons had on average 15-20% greater dendritic trees but with different topology. Accordingly, the number of segments was proportionally increased in the caudal parts, as opposed to the rostral parts that had longer average length of individual segments.

Although these differences were not significant, they implied structural changes influenced by *Foxp2* gene, which were not directly related to dendritic outgrowth but rather with changes in activity of the corticostriatal loops associated with frontal and occipital cortex.

The results showed that in order to influence changes present in the humanized animals, both amino acid changes in the protein structure are needed.

10. POPIS LITERATURE

1. Vargha-Khadem F, Watkins K, Alcock K, Fletcher P, Passingham R. Praxic and nonverbal cognitive deficits in a large family with a genetically transmitted speech and language disorder. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(3):930-3.
2. Vargha-Khadem F, Watkins KE, Price CJ, Ashburner J, Alcock KJ, Connelly A i sur. Neural basis of an inherited speech and language disorder. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95(21):12695-700.
3. Watkins KE, Vargha-Khadem F, Ashburner J, Passingham RE, Connelly A, Friston KJ i sur. MRI analysis of an inherited speech and language disorder: structural brain abnormalities. Brain. 2002; 125(Pt 3):465-78.
4. Lai CS, Fisher SE, Hurst JA, Vargha-Khadem F, Monaco AP. A forkhead-domain gene is mutated in a severe speech and language disorder. Nature. 2001; 413(6855):519-23.
5. Shu W, Yang H, Zhang L, Lu MM, Morrisey EE. Characterization of a new subfamily of winged-helix/forkhead (Fox) genes that are expressed in the lung and act as transcriptional repressors. J Biol Chem. 2001; 276(29):27488-97.
6. Zeesman S, Nowaczyk MJ, Teshima I, Roberts W, Cardy JO, Brian J i sur. Speech and language impairment and oromotor dyspraxia due to deletion of 7q31 that involves FOXP2. Am J Med Genet A. 2006; 140(5):509-14.
7. Peter B, Raskind WH, Matsushita M, Lisowski M, Vu T, Berninger VW i sur. Replication of CNTNAP2 association with nonword repetition and support for FOXP2 association with timed reading and motor activities in a dyslexia family sample. J Neurodev Disord. 2011; 3(1):39-49.
8. Bruce HA, Margolis RL. FOXP2: novel exons, splice variants, and CAG repeat length stability. Hum Genet. 2002; 111(2):136-44.
9. Lai CS, Gerrelli D, Monaco AP, Fisher SE, Copp AJ. FOXP2 expression during brain development coincides with adult sites of pathology in a severe speech and language disorder. Brain. 2003; 126(Pt 11):2455-62.
10. Spiteri E, Konopka G, Coppola G, Bomar J, Oldham M, Ou J i sur. Identification of the transcriptional targets of FOXP2, a gene linked to speech and language, in developing human brain. Am J Hum Genet. 2007; 81(6):1144-57.

11. Vernes SC, Spiteri E, Nicod J, Groszer M, Taylor JM, Davies KE i sur. High-throughput analysis of promoter occupancy reveals direct neural targets of FOXP2, a gene mutated in speech and language disorders. Am J Hum Genet. 2007; 81(6):1232-50.
12. Vernes SC, Oliver PL, Spiteri E, Lockstone HE, Puliyadi R, Taylor JM i sur. Foxp2 regulates gene networks implicated in neurite outgrowth in the developing brain. PLoS Genet. 2011; 7(7):e1002145.
13. Tsui D, Vessey JP, Tomita H, Kaplan DR, Miller FD. FoxP2 regulates neurogenesis during embryonic cortical development. J Neurosci. 2013; 33(1):244-58.
14. Abrahams BS, Tentler D, Perederiy JV, Oldham MC, Coppola G, Geschwind DH. Genome-wide analyses of human perisylvian cerebral cortical patterning. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(45):17849-54.
15. Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L i sur. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K+ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. J Cell Biol. 2003; 162(6):1149-60.
16. Strauss KA, Puffenberger EG, Huentelman MJ, Gottlieb S, Dobrin SE, Parod JM i sur. Recessive symptomatic focal epilepsy and mutant contactin-associated protein-like 2. N Engl J Med. 2006; 354(13):1370-7.
17. Verkerk AJ, Mathews CA, Joosse M, Eussen BH, Heutink P, Oostra BA. CNTNAP2 is disrupted in a family with Gilles de la Tourette syndrome and obsessive compulsive disorder. Genomics. 2003; 82(1):1-9.
18. Alarcon M, Abrahams BS, Stone JL, Duvall JA, Perederiy JV, Bomar JM i sur. Linkage, association, and gene-expression analyses identify CNTNAP2 as an autism-susceptibility gene. Am J Hum Genet. 2008; 82(1):150-9.
19. Enard W, Przeworski M, Fisher SE, Lai CS, Wiebe V, Kitano T i sur. Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. Nature. 2002; 418(6900):869-72.
20. Zhang J, Webb DM, Podlaha O. Accelerated protein evolution and origins of human-specific features: Foxp2 as an example. Genetics. 2002; 162(4):1825-35.
21. Li G, Wang J, Rossiter SJ, Jones G, Zhang S. Accelerated FoxP2 evolution in echolocating bats. PLoS One. 2007; 2(9):e900.
22. Krause J, Lalueza-Fox C, Orlando L, Enard W, Green RE, Burbano HA i sur. The derived FOXP2 variant of modern humans was shared with Neandertals. Curr Biol. 2007; 17(21):1908-12.

23. Maricic T, Gunther V, Georgiev O, Gehre S, Curlin M, Schreiweis C i sur. A recent evolutionary change affects a regulatory element in the human FOXP2 gene. Mol Biol Evol. 2013; 30(4):844-52.
24. Haesler S, Rochefort C, Georgi B, Licznerski P, Osten P, Scharff C. Incomplete and inaccurate vocal imitation after knockdown of FoxP2 in songbird basal ganglia nucleus Area X. PLoS Biol. 2007; 5(12):e321.
25. Groszer M, Keays DA, Deacon RM, de Bono JP, Prasad-Mulcare S, Gaub S i sur. Impaired synaptic plasticity and motor learning in mice with a point mutation implicated in human speech deficits. Curr Biol. 2008; 18(5):354-62.
26. French CA, Jin X, Campbell TG, Gerfen E, Groszer M, Fisher SE i sur. An aetiological Foxp2 mutation causes aberrant striatal activity and alters plasticity during skill learning. Mol Psychiatry. 2012; 17(11):1077-85.
27. Enard W, Gehre S, Hammerschmidt K, Holter SM, Blass T, Somel M i sur. A humanized version of Foxp2 affects cortico-basal ganglia circuits in mice. Cell. 2009; 137(5):961-71.
28. Reimers-Kipping S, Hevers W, Paabo S, Enard W. Humanized Foxp2 specifically affects cortico-basal ganglia circuits. Neuroscience. 2011; 175:75-84.
29. Kreitzer AC, Malenka RC. Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. Neuron. 2008; 60(4):543-54.
30. Nieuwenhuys R VJ, Van Huijzen C., *The Human Central Nervous System*. Vol. 5. izd. 2007: Springer Verlag.
31. Yamada K, Takahashi S, Karube F, Fujiyama F, Kobayashi K, Nishi A i sur. Neuronal circuits and physiological roles of the basal ganglia in terms of transmitters, receptors and related disorders. J Physiol Sci. 2016; 66(6):435-446.
32. Rafols JA, Cheng HW, McNeill TH. Golgi study of the mouse striatum: age-related dendritic changes in different neuronal populations. J Comp Neurol. 1989; 279(2):212-27.
33. Kawaguchi Y, Wilson CJ, Emson PC. Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. J Neurosci. 1990; 10(10):3421-38.
34. Preston RJ, Bishop GA, Kitai ST. Medium spiny neuron projection from the rat striatum: an intracellular horseradish peroxidase study. Brain Res. 1980; 183(2):253-63.
35. DiFiglia M, Pasik P, Pasik T. A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. Brain Res. 1976; 114(2):245-56.

36. Braak H, Braak E. Neuronal types in the striatum of man. Cell Tissue Res. 1982; 227(2):319-42.
37. Graveland GA, Williams RS, DiFiglia M. A Golgi study of the human neostriatum: neurons and afferent fibers. J Comp Neurol. 1985; 234(3):317-33.
38. Iwahori N, Kiyota E. A Golgi study on the neuronal organization of the neostriatum in the mouse. Neurosci Res. 1987; 4(6):454-74.
39. Uylings HB, van Pelt J. Measures for quantifying dendritic arborizations. Network. 2002; 13(3):397-414.
40. van Pelt J, Uylings HB. Branching rates and growth functions in the outgrowth of dendritic branching patterns. Network. 2002; 13(3):261-81.
41. MacDermot KD, Bonora E, Sykes N, Coupe AM, Lai CS, Vernes SC i sur. Identification of FOXP2 truncation as a novel cause of developmental speech and language deficits. Am J Hum Genet. 2005; 76(6):1074-80.
42. Braak H, Braak E. Golgi preparations as a tool in neuropathology with particular reference to investigations of the human telencephalic cortex. Prog Neurobiol. 1985; 25(2):93-139.
43. Zaqout S, Kaindl AM. Golgi-Cox Staining Step by Step. Front Neuroanat. 2016; 10:38.
44. Gertler TS, Chan CS, Surmeier DJ. Dichotomous anatomical properties of adult striatal medium spiny neurons. J Neurosci. 2008; 28(43):10814-24.
45. Fisher RS, Buchwald NA, Hull CD, Levine MS. The GABAergic striatonigral neurons of the cat: demonstration by double peroxidase labeling. Brain Res. 1986; 398(1):148-56.
46. Gonzalez C, Mendoza J, Avila-Costa MR, Arias JM, Barral J. Golgi Study of Medium Spiny Neurons from Dorsolateral Striatum of the Turtle Trachemys scripta elegans. Neurosci Lett. 2013.
47. Koenderink MJ, Uylings HB. Morphometric dendritic field analysis of pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: relation to section thickness. J Neurosci Methods. 1996; 64(1):115-22.
48. Koenderink MJ, Uylings HB, Mrzljak L. Postnatal maturation of the layer III pyramidal neurons in the human prefrontal cortex: a quantitative Golgi analysis. Brain Res. 1994; 653(1-2):173-82.
49. Dobrovic B, Curic G, Petanjek Z, Heffer M. Dendritic morphology and spine density is not altered in motor cortex and dentate granular cells in mice lacking the

ganglioside biosynthetic gene B4galnt1 - A quantitative Golgi cox study. Coll Antropol. 2011; 35 Suppl 1:25-30.

50. Rasin MR, Darmopil S, Petanjek Z, Tomic-Mahecic T, Mohammed AH, Bogdanovic N. Effect of environmental enrichment on morphology of deep layer III and layer V pyramidal cells of occipital cortex in oldest-old rat - A quantitative golgi cox study. Coll Antropol. 2011; 35 Suppl 1:253-8.
51. Darmopil S, Petanjek Z, Mohammed AH, Bogdanovic N. Environmental enrichment alters dentate granule cell morphology in oldest-old rat. J Cell Mol Med. 2009; 13(8B):1845-56.
52. Petanjek Z, Judas M, Kostovic I, Uylings HB. 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. Groc L, Petanjek Z, Gustafsson B, Ben-Ari Y, Hanse E, Khazipov R. In vivo blockade of neural activity alters dendritic development of neonatal CA1 pyramidal cells. Eur J Neurosci. 2002; 16(10):1931-8.
54. Groc L, Petanjek Z, Gustafsson B, Ben-Ari Y, Khazipov R, Hanse E. Compensatory dendritic growth of CA1 pyramidal cells following growth impairment in the neonatal period. Eur J Neurosci. 2003; 18(5):1332-6.
55. Mohammed AH, Zhu SW, Darmopil S, Hjerling-Leffler J, Ernfors P, Winblad B i sur. Environmental enrichment and the brain. Prog Brain Res. 2002; 138:109-33.
56. Fujiyama F, Takahashi S, Karube F. Morphological elucidation of basal ganglia circuits contributing reward prediction. Front Neurosci. 2015; 9:6.
57. Comery TA, Stamoudis CX, Irwin SA, Greenough WT. Increased density of multiple-head dendritic spines on medium-sized spiny neurons of the striatum in rats reared in a complex environment. Neurobiol Learn Mem. 1996; 66(2):93-6.
58. McNeill TH, Koek LL, Brown SA, Rafols JA. Quantitative analysis of age-related dendritic changes in medium spiny I (MSI) striatal neurons of C57BL/6N mice. Neurobiol Aging. 1990; 11(5):537-50.
59. Bornschein U, Enard W, Paabo S, Hevers W. Characterization of striatal long-term plasticity in mice expressing a humanized version of FOXP2. Poster prezentacija održana na skupu: Neuroscience 2011; 2011 Nov 16; Washington DC, USA.

11. ŽIVOTOPIS

Ivana Bičanić je rođena 11. listopada 1984. godine u Sisku u Republici Hrvatskoj u obitelji Damira i Ksenije Bičanić (rođ. Dunger). Osnovnu školu Viktorovac pohađa od 1991. do 1999. godine te iste godine upisuje opću gimnaziju Gimnazija Sisak. Gimnaziju je završila 2003. godine s odličnim uspjehom te zatim upisuje Medicinski fakultet u Zagrebu na kojemu 2009. godine stječe zvanje doktora medicine. Za znanstveni rad pokazuje interes još kao studentica na Klinici za psihološku medicinu te pod mentorstvom prof.dr.sc.Marijane Braš sudjeluje kao koautor u izradi dva znanstvena rada i poglavlja u udžbeniku Komunikacija u medicini. Nakon kraćeg rada u Neuropsihijatrijskoj bolnici „Dr. Ivan Barbot“ u lipnju 2011.godine se zapošljava na mjesto asistenta na Zavodu za anatomiju „Drago Perović“ Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje i danas radi te iste godine upisuje poslijediplomski studij „Biomedicina i zdravstvo“. Prijedlog disertacije pod naslovom: „Morfološke promjene projekcijskih neurona strijatuma u miša s humaniziranim oblicima *Foxp2* gena“ prihvaćen je 18. lipnja 2013.godine pod mentorstvom prof.dr.sc. Zdravka Petanjeka. Do sada je kao koautor objavila 5 znanstvenih radova od kojih je jedan indeksiran u bazi podataka *Current Contents*, a 4 rada u *Science Citation Index- Expanded* i sudjelovala na 10 domaćih i međunarodnih znanstvenih skupova.

U stručnom radu je osobito zanima edukacija nastavnika u visokom obrazovanju, razvoj i unaprjeđenje kurikuluma, implementacija novih nastavnih metoda i pomagala u radu sa studentima te rad na međunarodnom povezivanju medicinskih fakulteta. Vrlo je posvećena učenju stranih jezika te se do sada služi s engleskim, njemačkim, talijanskim, španjolskim, hebrejskim i francuskim jezikom.