

Kvantitativna morfometrijska trodimenzionalna analiza dendritičkih trnova

Božić, Fran

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:356760>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-09-21**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Fran Božić

**Kvantitativna morfometrijska
trodimenzionalna analiza
dendritičkih trnova**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Hrvatskom institutu za istraživanje mozga, pod vodstvom prof.dr.sc. Marija Vukšića, dr.med., i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2019./2020.

Popis i objašnjenje korištenih kratica

2D	dvodimenzionalan
3D	trodimenzionalan
4D	četverodimenzionalan
AB	Alzheimerova bolest (eng. <i>Alzheimer's disease</i>)
ABP	aktin-vežući proteini (eng. <i>actin-binding proteins</i>)
AMPA	α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kiselina (eng. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
AMPA	receptor α -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionske kiseline (eng. <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>)
Arp2/3	protein-2/3 povezan s aktinom (eng. <i>actin-related protein-2/3</i>)
BDNF	neurotrofni faktor moždanog porijekla (eng. <i>brain-derived neurotrophic factor</i>)
Ca²⁺	kalcijev ion
CaM	kalmodulin (eng. <i>calmodulin</i>)
CaN	kalcineurin (eng. <i>calcineurin</i>)
CaMKII	protein kinaza II ovisna o kalcij-kalmodulin kompleksu (eng. <i>Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II</i>)
CLSM	konfokalna laserska skenirajuća mikroskopija (eng. <i>confocal laser scanning microscopy</i>)
cryo-ET	krioelektronska tomografija (eng. <i>cryo-electron tomography</i>)
DiD	1,1'-dioktadecil-3,3,3',3'-tetrametilindodikarbocijanin
DiI	1,1'-dioktadecil-3,3,3',3'-tetrametilindokarbocijanin
DiO	3,3'-dioktadeciloksakarbocijanin
E-LTP	rana dugoročna potencijacija (eng. <i>early long-term potentiation</i>)
eGFP	poboljšani zeleni fluorescentni protein (eng. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)

EGFR	receptor epidermalnog faktora rasta (eng. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
EM	elektronski mikroskop
Eps8	supstrat 8 EGFR kinaze (eng. <i>EGFR kinase substrate 8</i>)
ER	endoplazmatski retikulum
ExM	ekspanzijska mikroskopija (eng. <i>expansion microscopy</i>)
FIB-SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija koja koristi fokusiranu ionsku zraku (eng. <i>focused ion beam scanning electron microscopy</i>)
FPALM	mikroskopija fluorescentne fotoaktivacijske lokalizacije (eng. <i>fluorescence photoactivated localisation microscopy</i>)
GABA	γ -aminomaslačna kiselina (eng. <i>γ-aminobutyric acid</i>)
GFP	zeleni fluorescentni protein (eng. <i>green fluorescent protein</i>)
L-LTP	kasna dugoročna potencijacija (eng. <i>late long-term potentiation</i>)
LTD	dugoročna depresija (eng. <i>long-term depression</i>)
LTP	dugoročna potencijacija (eng. <i>long-term potentiation</i>)
MAGUK	gvanilat kinaze vezane uz membranu (eng. <i>membrane-associated guanylate kinases</i>)
MPM	multifotonska mikroskopija (eng. <i>multi-photon microscopy</i>)
mRFP	monomerni crveni fluorescentni protein (eng. <i>monomeric red fluorescent protein</i>)
NCAM	adhezijska molekula živčanih stanica (eng. <i>neural cell adhesion molecule</i>)
NL-SIM	mikroskopija strukturirane iluminacije nelinearnog oblika (eng. <i>nonlinear form of structured illumination</i>)
NMDA	N-metil-D-aspartat (eng. <i>N-methyl-D-aspartate</i>)
NMDAR	receptor N-metil-D-aspartata (eng. <i>N-methyl-D-aspartate receptor</i>)
PAINT	topografija nakupljanjem točaka za prikaz u nanorezoluciji (eng. <i>point accumulation for imaging in nanoscale topography</i>)
PALM	mikroskopija fotoaktivacijske lokalizacije (eng. <i>photoactivated localisation microscopy</i>)
PSD	postsinaptičko zgusnuće (eng. <i>postsynaptic density</i>)

PSD-93	protein 93 postsinaptičkog zgusnuća (eng. <i>postsynaptic density protein 93</i>)
PSD-95	protein 95 postsinaptičkog zgusnuća (eng. <i>postsynaptic density protein 95</i>)
RESOLFT	reverzibilne zasitljive optičke linearne fluorescencijske tranzicije (eng. <i>reversible saturable optical linear fluorescence transitions</i>)
SAP-90	protein 90 povezan sa sinapsom (eng. <i>synapse-associated protein 90</i>)
SAP-97	protein 97 povezan sa sinapsom (eng. <i>synapse-associated protein 97</i>)
SAP-102	protein 102 povezan sa sinapsom (eng. <i>synapse-associated protein 102</i>)
SBF-SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija koja serijski koristi naličje bloka (eng. <i>serial block-face scanning electron microscopy</i>)
SEM	skenirajuća elektronska mikroskopija (eng. <i>scanning electron microscopy</i>)
SIM	mikroskopija strukturirane iluminacije (eng. <i>structured illumination microscopy</i>)
sLTD	strukturna dugoročna depresija (eng. <i>structural long-term depression</i>)
sLTP	strukturna dugoročna potencijacija (eng. <i>structural long-term potentiation</i>)
SMLM	mikroskopija lokalizacije pojedine molekule (eng. <i>single-molecule localisation microscopy</i>)
ssEM	elektronska mikroskopija sa serijskim presjecima (eng. <i>serial section electron microscopy</i>)
STED	stimulirana emisija s deplecijom (eng. <i>stimulated emission depletion</i>)
STEM	skenirajuća transmisijska elektronska mikroskopija (eng. <i>scanning transmission electron microscopy</i>)
STORM	mikroskopija stohastičke optičke rekonstrukcije (eng. <i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>)
SŽS	središnji živčani sustav
TARP	transmembranski regulatorni proteini AMPA receptora (eng. <i>transmembrane AMPA receptor regulatory proteins</i>)

TB	terabajt (eng. <i>terabyte</i>)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija (eng. <i>transmission electron microscopy</i>)
TPM	dvofotonska mikroskopija (eng. <i>two-photon microscopy</i>)
YFP	žuti fluorescentni protein (eng. <i>yellow fluorescent protein</i>)

Sadržaj

Stranica

Sažetak

Summary

1 Uvod	1
1.1 Povijesni pregled	1
1.2 Suvremeni koncepti	2
2 Klasifikacija morfoloških tipova dendritičkih trnova	4
2.1 Gljivasti (eng. <i>mushroom</i>)	4
2.2 Tanki (eng. <i>thin</i>)	5
2.3 Kratki (eng. <i>stubby</i>)	5
2.4 Filopodiji	5
2.5 Ostali	6
3 Razvoj dendritičkih trnova	7
3.1 Nastanak	7
3.2 Maturacija i stabilizacija	8
4 Dendritički trnovi kao sinaptički markeri	11
4.1 MAGUK proteini	12
4.2 Aktin	14
4.3 Proteini vezani uz promet Ca^{2+}	15
4.4 Ostali proteini dendritičkih trnova	16
5 Dinamika dendritičkih trnova	19
5.1 Razvojne promjene u dinamici trnova	20
5.2 Dinamičke klase trnova	21
5.3 Korelacija dinamike i morfologije trnova	22
6 Uloga dendritičkih trnova	24
6.1 Dendritički mikroodjeljci	24
6.2 Učenje i pamćenje	25
6.3 Neurodegenerativne i druge bolesti	26

7	Vizualizacija dendritičkih trnova	29
7.1	Svjetlosna mikroskopija	29
7.2	Fluorescencijska mikroskopija	31
7.3	Elektronska mikroskopija	33
7.4	Konfokalna mikroskopija	35
7.5	Dvofotonska i multifotonska mikroskopija	36
7.6	Ostale suvremene metode mikroskopije visoke rezolucije	38
7.6.1	STED mikroskopija	39
7.6.2	SMLM mikroskopija	41
7.6.3	MINIFLUX mikroskopija	42
7.6.4	Ekspanzijska mikroskopija	42
7.6.5	Krioelektronska tomografija	43
7.6.6	Fiberoptička endomikroskopija	43
8	Metode kvantitativne morfometrije i trodimenzionalne analize dendritičkih trnova	45
8.1	Koraci analize	46
8.1.1	Predprocesiranje	46
8.1.2	Segmentacija	47
8.1.3	Označavanje trnova	48
8.1.4	Postprocesiranje	49
8.2	Vrste analiza	49
8.2.1	Manualna	50
8.2.2	Semiautomatska	51
8.2.3	Automatska	55

Zahvale

Literatura

Životopis

Sažetak

Naziv rada: Kvantitativna morfometrijska trodimenzionalna analiza dendritičkih trnova

Ime autora: Fran Božić

Za stare Egipćane mozak je bio punjenje za lubanju, a za Aristotela organ za hlađenje krvi – takva uvjerenja je promijenila klasična neuroznanost na način da su tipične karakteristike srca poput osobnosti, inteligencije i uma dodijeljene upravo mozgu kao novome centralnom organu ljudskoga tijela. S druge strane, moderna neuroznanost je započela hipotezom Santiaga Ramón y Cajala krajem 19. stoljeća da se mozak sastoji od pojedinačnih stanica koje međusobno komuniciraju, a malene protruzije tih stanica koje je uočio poslužile su mu kao potencijalni medijatori takvih veza. Iako svoje pretpostavke nije mogao dokazati zbog ograničenih tehnoloških mogućnosti svojega doba, do današnjega dana većina se pokazala ispravnima, a dendritički trnovi su postali centralne strukture osnovnih procesa mozga poput učenja i pamćenja. Za trnove je utvrđeno da se javljaju u raznim veličinama i oblicima te da su skloni promjeni oblika, ali i da mogu jednostavno nastati i nestati s dendrita. Takve dinamičke promjene su postale plodno tlo za istraživanja procesa učenja i pamćenja jer se uspješnost upamćivanja povezala s promjenama veličine pojedinih trnova. Iz takve povezanosti morfologije i funkcije započela su aktivna proučavanja morfometrije trnova kako bi se objasnili njihovi funkcionalni aspekti. Osim toga, kvantitativne promjene na razini populacije ili pojedinačnih trnova utvrđene su kao potencijalna strukturna podloga simptoma u neuropsihijatrijskim poremećajima. Zbog rezolucijskih ograničenja klasičnih metoda vizualizacije, suvremena istraživanja usmjerena su na razvoj metoda prikaza u nanorezoluciji kako bi morfometrijska mjerenja bila vjerodostojna i kako bi se analizom rezultata moglo doći do vrijednih zaključaka. Problemi većine postojećih metoda prikaza su teško izvođenje i visoka cijena, a kvantitativne analize morfometrijskih vrijednosti su dugotrajne, izrazito kompleksne i zahtijevaju ekstenzivnu intervenciju korisnika jer još uvijek ne postoji kvalitetan softverski alat kojime bi se takve analize u potpunosti automatizirale.

Ključne riječi: analiza dendritičkih trnova, morfometrija, 3D rekonstrukcija, dinamika dendritičkih trnova, neuralna plastičnost

Summary

Thesis title: Quantitative morphometric three-dimensional analysis of dendritic spines

Author's name: Fran Božić

The ancient Egyptians thought of the brain as a stuffing for the skull and Aristotle considered it to be a blood-cooling organ - such beliefs were changed by classical neuroscience in such a way that typical characteristics of the heart such as personality, intelligence and mind were assigned to the brain as the new central organ of the human body. On the other hand, modern neuroscience began with Santiago Ramón y Cajal's hypothesis in the late 19th century that the brain is made up of individual cells that communicate with each other and the small protrusions of these cells that he previously observed served as potential mediators of such connections. Although he could not prove his assumptions due to the limited technological possibilities of his time, to this day most have been proved correct and dendritic spines have become central structures of basic brain processes such as learning and memory. Spines have been found to occur in a variety of sizes and shapes and to be prone to change of their shape, but also to easily form and disappear from dendrites. Such dynamic changes have become fertile ground for research into the learning and memory process because the success of memorisation has been associated with changes in the size of individual spines. From such a connection between morphology and function, active studies of the morphometry of spines began to explain their functional aspects. Besides, quantitative changes at the population or individual spine level have been identified as a potential structural basis for symptoms in neuropsychiatric disorders. Due to the resolution limitations of classical visualisation methods, modern research is focused on the development of nanoresolution imaging methods to make morphometric measurements credible and to allow valuable conclusions to be drawn from the analysis of the results. The problems of most existing imaging methods are performance difficulties and high cost and quantitative analyses of morphometric values are time-consuming, extremely complex and require extensive user intervention because there is still no quality software tool to completely automate such analyses.

Key words: dendritic spine analysis, morphometry, 3D reconstruction, spine dynamics, neuroplasticity

1. Uvod

Maleni izdanci koji se nalaze gusto poredani na dendritima velikoga broja neurona i koji služe kao postsinaptičke strukture za ostvarivanje ekscitatornoga tipa sinapse nazivaju se dendritički trnovi. Mogu se pronaći i na inhibitornim i na ekscitatornim neuronima središnjega živčanog sustava te im je uloga upravo posredovanje u sinaptičkoj transmisiji signala, a u sklopu toga su i nositelji neuralne plastičnosti. Njihova trodimenzionalna struktura je raznovrsna, a točna funkcija u pojedinoj sinapsi upravo ovisi o specifičnoj strukturi svakoga trna. Postojanje dendritičkih trnova je uočeno prije gotovo 150 godina razvojem tehnika bojenja neuralnoga tkiva, a istraživanje njihove morfologije traje i danas, osobito u području analize trodimenzionalne strukture svakoga pojedinačnog trna i povezivanje iste s njihovom točnom funkcijom i regulacijom sinaptičkoga prijenosa impulsa.

1.1 Povijesni pregled

Prvi znanstvenik koji je uočio dendritičke trnove bio je talijanski neuropatolog Camillo Golgi koji je razvojem svoje tehnike bojenja živčanoga tkiva kalijevim dikromatom i srebrovim nitratom pod svjetlosnim mikroskopom uspio u

potpunosti prikazati cjelovite neurone sa svim svojim strukturnim elementima. Uočene dendritičke trnove smatrao je artefaktima koji nastaju zbog neprecizne impregnacije dendrita nakupljanjem boje u staničnoj membrani, ali i unatoč tome, zbog uvođenja nove tehnike bojenja neurona, revolucionarizirao je područje neurohistologije i omogućio nastanak moderne neuroznanosti (1,2).

Odbacivanjem Golgijeve teorije o dendritičkim trnovima kao artefaktima tehnike bojenja te postavljanjem pretpostavke o njihovoj ulozi kao mjestima kontakta aksona jednoga neurona i dendrita drugoga neurona Santiago Ramón y Cajal je postavio temelje moderne neuroanatomije (3,4). Takvu teoriju je mogao postaviti tek nakon što je također odbacio do tada uvriježeno mišljenje, čiji gorljivi zagovornik je bio i sam Golgi, da centralni živčani sustav čini neprekinuta mreža neuralnoga tkiva (tzv. retikularna teorija) i utvrdio da ga naprotiv čine pojedinačni neuroni koji međusobno komuniciraju (tzv. neuronska doktrina) (5,6). Zbog svojih istraživanja i zaključaka danas se smatra ocem moderne neuroznanosti, a za rad mu je dodijeljena i Nobelova nagrada za fiziologiju i medicinu 1906. godine koju je podijelio s Camillom Golgijem. Do kraja svojega života bio je uporno u sukobu

s ostatkom znanstvene zajednice zbog čvrstoga mišljenja da dendritički trnovi nisu artefakti, već stvarne strukture u neuronima (2,4).

Edward George Gray je pomoću elektronskoga mikroskopa prvi utvrdio da su dendritički trnovi mjesta sinaptičkoga kontakta čime je potvrdio Cajalovu neuronsku doktrinu i pretpostavku da služe kao mjesta kontakta dvaju neurona. Također je prvi opisao njihovu morfologiju te intracelularne strukture unutar trnova, a otkrio je i sustav "vrećica, vezikula ili neprekinutih kanala" koji je nazvao spinozним aparatom. Opisao je i dva potpuno različita tipa sinapsi na temelju izgleda PSD (7).

Uchizono (8) i Colonnier (9) su razvili Grayevu teoriju o dva različita tipa sinapsi nazvavši ih simetričnim i asimetričnim tipom, a zatim i opisali da se dendritički trnovi nalaze gotovo isključivo na postsinaptičkome kraju ekscitacijskih sinapsi. Zbog tako uvriježene pretpostavke da postojanje trna podrazumijeva i postojanje ekscitatorne sinapse, velik broj istraživača ih smatra markerima ekscitatorne signalizacije premda nezreli oblici dendritičkih trnova često nemaju razvijene sinaptičke elemente koji omogućavaju transmisiju signala (10–16). Unatoč tome, njihova funkcija je još dugo ostala nerazjašnjena, a osobito zbog otkrića da i sami dendriti mogu stvarati ekscitacijske sinapse s drugim neuronima bez posredovanja svojih trnova (10,11).

1.2 Suvremeni koncepti

Morfologija i funkcija dendritičkih trnova danas su predmet mnogobrojnih istraživanja pogotovo zbog činjenica da su strukturne ili funkcijske abnormalnosti trnova pronađene u velikome broju neuroloških poremećaja te da su posrednici procesa učenja i pamćenja (17,18). Stoga se dendritički trnovi danas smatraju ključnim elementima za normalnu funkciju neurona i nositeljima neuralne plastičnosti (18).

Suvremena istraživanja morfologije dendritičkih trnova nastoje utvrditi brzu i jednostavnu metodu za detekciju, mjerenje i analizu trnova gdje najveći izazov predstavlja kvantifikacija trodimenzionalnih veličina trnova tj. izračun volumena. Postojeće slikovne metode omogućavaju veliku rezoluciju prikaza pojedinačnih trnova (eng. *spine imaging*), a što daje izvrstan uvid u morfološke detalje te olakšava zaključivanje o potencijalnoj povezanosti strukture i funkcije samoga trna (10). S obzirom da poznavanje strukture nema nikakvu svrhu samo po sebi, detaljna istraživanja u tome području opravdana su upravo zbog pronađenih povezanosti između raznih morfoloških oblika trnova i njihovih funkcija, a što je osobito potkrijepljeno povezanošću abnormalnosti morfologije dendritičkih trnova i raznih psihijatrijskih te neuroloških stanja (17,18). Također, mnogobrojna istraživanja su posvećena proučavanju specifičnih funkcija trnova, posebice njihove dinamične karakteristike koje su u podlozi

neuralne plastičnosti i temelj procesa učenja i pamćenja kao i njihove interakcije s ostalim sinaptičkim elementima s jedne strane i dendritom s druge strane. Raznovrsni proteini koji se nalaze vezani uz postsinaptičku membranu i čine PSD pokazuju stupanj zrelosti trna i snagu sinapse pa je njihovo ekstenzivno proučavanje nužno za otkrivanje fiziološke uloge te podloge patoloških procesa (11,18).

Unatoč velikome broju istraživanja koja se trenutačno provode, odnos između promjena u morfologiji dendritičkih trnova i sinaptičke funkcije još uvijek nije poznat. Moderne metode slikovnog prikaza pojedinačnih trnova omogućile su veće mogućnosti njihove detekcije i mjerenja, ali značaj dobivenih vrijednosti još uvijek nije jasan te je analiza podataka još uvijek jako dugotrajna i podložna brojnim procesnim greškama.

2. Klasifikacija morfoloških tipova dendritičkih trnova

Zbog jednostavnijega pregleda i lakše usporedbe velik broj istraživača koji se bave morfometrijom dendritičkih trnova pokušavaju dobivene rezultate mjerenja grupirati u nekoliko skupina i na taj način stvoriti grupe trnova koji imaju zajedničke morfološke karakteristike. Na temelju takvih morfoloških skupina za svaku se nastoje utvrditi sličnosti i zajedničke funkcije pa se onda pojedini oblik trna povezuje s određenom sinaptičkom funkcijom. Takav kategorički i analitički pristup je veoma koristan kod usporedbe rezultata različitih istraživanja te omogućava jednostavnu interpretaciju rezultata (11). Prema Petersu i Kaiserman-Abramofu (19), koji su prvi opisali morfološke kategorije trnova, postoje 3 različite skupine na temelju postojanja i veličine "vrata" i "glave" svakoga trna, a to su gljivasti, tanki i kratki trnovi. U većini suvremenih klasifikacija opisuju se i četvrta kategorija (filopodiji) kao najmanji oblik dendritičke protruzije. Kategorije se mogu također postaviti i na temelju svojstava trnova i njihove funkcije pa se tako razlikuju nezrele strukture nalik filopodijima, nezreli trnovi i zreli trnovi.

S druge strane, velik broj istraživača smatra da su kategorički pristup i sistematizacija trnova po morfološkim karak-

teristikama prerigidni pa ih promatraju u spektru koji se proteže od najmanjih, nezrelih izdanaka dendrita pa do najvećih, zrelih trnova. Takav kontinuum je bliži suvremenome promišljanju o trnovima kao dinamičnim strukturama koje podliježu procesima nastanka, mature i nestanka čime se formira vjerniji prikaz stvarnih fizioloških procesa (20). Bez obzira na pristup, različiti oblici trnova se lako uočavaju i povezani su s različitim intracelularnim procesima te je stoga bitno istaknuti razlike između morfoloških oblika trnova.

2.1 Gljivasti (eng. *mushroom*)

Gljivasti dendritički trnovi se lako uočavaju na dendritu zbog velike, proširene glave i mnogo tanjega vrata koji izlazi iz dendritičke osnovice. Ukupna duljina takvoga trna je prosječno oko $1.5 \mu\text{m}$, promjer glave je oko $1 \mu\text{m}$, a promjer vrata oko $0.2 \mu\text{m}$. Čine oko 25% trnova u SŽS-u odrasle osobe, ali su kod djece slabije zastupljeni (10–12). S obzirom na to da su najzreliji oblici dendritičkih trnova, imaju potpuno razvijene sinaptičke elemente koji se jasno uočavaju pod elektronskim

mikroskopom te stvaraju najveće i najjačnije sinapse između neurona. Po svojim su karakteristikama strukturno i funkcijski zreli jer ne mijenjaju svoj oblik i jako dugo se zadržavaju na dendritima pa zbog toga čine stabilne sinapse između neurona s malom vjerojatnošću nestanka. Zbog male dinamičnosti nemaju veliku ulogu u sinaptičkoj plastičnosti, ali se zbog togase povezuju s procesom pamćenja tj. stvaranja trajne memorije (11,16,21,22).

2.2 Tanki (eng. *thin*)

Tanki trnovi se razlikuju od gljivastih po tome što nemaju karakterističnu glavu, već su jednolični duguljasti izdanci dendrita. Ukupna duljina takvoga trna je prosječno oko 1 μm , a promjer je konstantan duž trna i iznosi oko 0.1 μm . Oni čine oko 65% trnova u SŽS-u odrasle osobe, ali im udio pada s dobi te u patološkim stanjima u kojima se javlja gubitak kognitivnih sposobnosti (10–12).

Premda nisu zreli oblici trnova, njihovi sinaptički elementi poput PSD-a su u potpunosti razvijeni i uočljivi pri vizualizaciji EM-om, a sinapse koje tvore su manje nego kod gljivastih trnova. Po svojim svojstvima većinom su nezreli trnovi visokog stupnja dinamičnosti, a što znači da u kratkome vremenu mogu nastati i stvarati sinaptičke veze s drugim neuronima, ali i da iste sinapse mogu biti kratkoga trajanja ukoliko ne dođe do procesa osnaživanja pa i sam trn može nestati s dendrita. Takva svojstva im omogućavaju visok stupanj plas-

tičnosti pa se smatra da su izrazito važni za procese učenja i upamćivanja (11,16,21,22).

2.3 Kratki (eng. *stubby*)

Značajke kratkih dendritičkih trnova se razlikuju i od gljivastih i od tankih trnova. Teže se uočavaju na dendritu jer im je duljina veoma mala, do 0.5 μm , a promjer im je veći u odnosu na promjer vrata gljivastih trnova i promjer tankih trnova, do 0.45 μm . Mali broj dendritičkih trnova kod odrasle osobe se može svrstati u ovu skupinu, dok su kod fetusa i male djece najučestaliji tip (10–12).

Kako su u odraslih osoba kratki trnovi rijetki onda se smatraju privremenim strukturama potrebnima za sinaptogenezu u fetalno i dječje doba. Sinapse koje stvaraju su slične sinapsama kod tankih trnova te im je stupanj plastičnosti podjednak pa su vjerojatno također važni za procese uključene u rani psihomotorni razvoj djece (11,16,21,22).

2.4 Filopodiji

Filopodiji su izduljene i veoma tanke dendritičke protruzije koje se također teže uočavaju na dendritu zbog maloga promjera. Oblikom su jednaki kao tanki trnovi, a razliku čini jedino promjer pa se kod analize i kategorizacije trnova teško mogu međusobno razgraničiti. Zajedno s kratkim trnovima čine do 10% svih trnova u SŽS-u odrasle osobe (12,19). Najnezreliji su tip trnova, pretežno niti ne stvaraju sinapsu s drugim neuron-

ima, a niti ne sadrže uobičajene sinaptičke strukture poput PSD. Njihova uloga je relativno nepoznata, a zbog izostanka tipične ekscitacijske sinapse znatan broj istraživača ih niti ne smatra posebnom vrstom dendritičkoga trna (11,16).

2.5 Ostali

Osim prethodno navedenih trnova postoje i drugi oblici koji se ne mogu ubrojiti u uobičajene skupine.

Razgranati trnovi (eng. *branched*) sastoje se od jedne osnovice koja se podijeli i dviju glava na kraju svakoga dijela gdje svaka formira vlastitu sinapsu.

Atipični trnovi i prijelazni oblici nemaju karakterističnu morfologiju, već se po postavljenim kriterijima istraživanja klasificiraju u preostale skupine. Morfološka klasifikacija dendritičkih trnova je često neprikladna upravo zbog velikoga broja ovakvih oblika pa dio istraživača pribjegava isključivo klasifikaciji na temelju zrelosti i funkcija trnova (12,20).

3. Razvoj dendritičkih trnova

Dendritički trnovi se razvijaju prenatalno i postnatalno paralelno sa sinaptogenezom na način da povećanje broja funkcionalnih i jakih sinapsi prati povećanje broja zrelih trnova na dendritu, a razvojno se mogu promatrati iz nekoliko aspekata (23). Jedan od razvojnih parametara je ukupan broj dendritičkih trnova koji se nalaze na pojedinome dendritu, a drugi parametar je gustoća trnova na dendritu koja se definira kao omjer broja trnova i duljine dendrita. Njihovim vrijednostima se opisuju razvojni procesi na razini cjelokupne populacije trnova na jednome dendritu, a prosječna gustoća dendritičkih trnova varira $1-10/\mu\text{m}$ što ovisi o specifičnom tipu neurona i razvojnome stadiju. S druge strane, razvojni procesi se mogu proučavati i na razini pojedinačnoga trna, a upravo morfološki oblik i morfometrijske vrijednosti dobro koreliraju s razvojnim stupnjem trna (11,18).

Za potpunu formaciju zrelih trnova potrebni su procesi maturacije i stabilizacije koji omogućavaju nastanak snažnih sinapsi čime trnovi ostvaruju svoju funkciju kao glavne postsinaptičke strukture u tipu I sinapse. Takvi stabilizacijski procesi su zaduženi za stupanj izmjene (eng. *turnover*) tj. dinamiku u određenome razvojnom stadiju trnova

– ukoliko su su snažni, trnovi dulje perzistiraju na dendritu i stvaraju stabilne i snažne sinapse, a ukoliko izostaju, trnovi su skloni brzom resorpciji i dolazi do nestanka aksono-dendritičkog spoja (18,24,25).

3.1 Nastanak

Dendritički trnovi su prisutni u >90% ekscitacijskih sinapsi u SŽS-u (26) pa se pretpostavlja da je cijeli proces njihova nastanka vezan uz stvaranje funkcionalnoga aksono-dendritičkoga spoja tj. sinapse. U najranijim stadijima sinaptogeneze većina ekscitacijskih sinapsi nastaje direktnom sinapsom aksona s dendritičkom osnovicom, a nakon toga se sinapse većinom ostvaruju s veoma nezrelim oblicima dendritičkih protruzija – filopodijima (27). Purpura (28) opisuje da kortikalni dendriti u ranim stadijima sinaptogeneze sadrže samo filopodije, a neuroni u odrasle jedinke sadrže jako malen broj takvih morfoloških oblika trnova (10–12). Iz te činjenice su proizašla dva suprotstavljena mišljenja o nastanku zrelih oblika trnova.

Prema Daileyju i Smithu (24) najnezreliji oblici dendritičkih protruzija tj. filopodiji od svoga nastanka u veoma kratkome vremenskom periodu (<10 min) prolaze

opsežne strukturne promjene pa se tako dio filopodija izdužuje i širi te tvori prave dendritičke trnove i paralelno uspješno stvara sinapse s drugim neuronima, a takve promjene nazivaju "stereotipnom sekvencom morfološke maturacije", a filopodiji koji ekstenzijom i retrakcijom ne uspiju stvoriti sinapsu se resorbiraju. Također su uočili da se većina zrelih trnova ne elongira, niti ne skraćuje te da perzistira tjednima bez ikakve morfološke promjene, ali da i kod njih postoji određen stupanj *turnover*-a tj. pojedini nestaju s dendritičke osnovice.

Prema Zivu i Smithu (25) filopodiji su prekursori svih dendritičkih trnova pa je ukupan broj filopodija koji su nastali u SŽS-u jednak zbroju postojećih vidljivih dendritičkih protruzija, što uključuje sve morfološke oblike trnova, i filopodija koji su se resorbirali zbog izostanka procesa maturacije i stabilizacije. Zbog toga smatraju da velik broj studija koje procjenjuju broj i gustoću različitih morfoloških oblika trnova griješi u procjeni filopodija upravo zbog njihove kratke perzistencije i česte resorpcije. Nadalje, utvrdili su da pad broja filopodija na dendritu vremenski koincidira s porastom broja stabilnih oblika trnova, a što pak koincidira s porastom broja stabilnih i funkcionalnih sinapsi.

S druge strane, Fiala i sur. (29) tvrde da filopodiji vjerojatno nisu strukturne preteče zrelijih oblika dendritičkih trnova, već strukture čija je glavna uloga omogućavanje nastanka aksono-dendritičke interakcije, a razvojem sinapse formira se i dendritički trn.

Nadalje, Goda i Davis (30) te Calabrese i sur. (18) smatraju da je uloga filopodija navođenje aksona do ishodišnoga dendrita kako bi se međustaničnim interakcijama ostvarili preduvjeti za nastanak sinapse između dvaju neurona. Takvu tezu podupiru i istraživanja koja su utvrdila da brojni neuroni koji ne sadrže dendritičke trnove u odrasloj dobi na svojim dendritima imaju brojne filopodije u razdoblju prenatalne i postnatalne sinaptogeneze (31,32). Prema Portera-Cailliau i sur. (33), filopodiji nastaju i resorbiraju se u ranijim stadijima razvoja nego što nastaju prvi zreli dendritički trnovi sa svojom sinapsom. Stoga smatraju da su u ranijim stadijima razvoja filopodiji važniji za generiranje aksono-dendritičkih spojeva, a da u kasnijim stadijima razvoja i kod odraslih filopodiji mogu služiti i kao prekursori za nastanak pravih trnova.

Iz navedenoga se može uvidjeti da funkcija filopodija do danas nije razjašnjena te da ne postoji jasan dokaz koji potvrđuje da su filopodiji prekursorske strukture zrelih dendritičkih trnova, ali niti da su isključivo ekstenzijske i retrakcijske strukture koje služe za usmjerenje aksona prema dendritu kako bi se započela formirati sinapsa (33).

3.2 Maturacija i stabilizacija

Prema Holtmaat i sur., Trachtenberg i sur. te Zuo i sur. (16,21,22), najnezreliji oblici dendritičkih protruzija veoma lako

nastaju, ali se i veoma lako resorbiraju, dok zreli oblici trnova tj. gljivasti trnovi mogu perzistirati tijekom više mjeseci u relativno nepromijenjenome obliku pa su sazrijevanje trnova i njihova stabilizacija nužni kako bi se sinapsa održala. Dominantna teorija o sudbini sinaptičke veze vezana je uz fenomene sinaptičke plastičnosti tj. preciznije dugoročnu potencijaciju (LTP) i dugoročnu depresiju (LTD) pa se smatra da je i opstanak trnova rezultat glutamatne signalizacije u sinapsi (34). Premda se o fenomenima LTP i LTD govori većinom u kontekstu samo nekih ekscitacijskih sinapsi, primjerice u CA1 regiji hipokampusa ili cerebelluma, prema Malenki i Bearu (35) oni bi se mogli odvijati i u svim ekscitacijskim sinapsama u SŽS-u pa bi i snaga sinapse te perzistencija trnova uvelike ovisili o ulaznim signalima koji generiraju LTP ili LTD.

Prema Engertu i Bonhoefferu (36), LTP na dendritu CA1 hipokampalnog neurona može inducirati nastanak filopodija na dijelu gdje prethodno oni nisu postojali čime se postavlja temelj za stvaranje novih sinapsi između dvaju neurona. Također, prethodno nezreli trnovi povećavaju svoje dimenzije te postaju stabilniji ukoliko se sinapsa osnažuje putem LTP-a (37,38). S druge strane, LTD potiče smanjivanje dendritičkih trnova i pomiče ih ka nezrelijem dijelu morfološkoga spektra uz mogućnost resorpcije i konačno gubitka aksonodendritičkoga spoja (38).

Lambert i sur. (39) govoreći o specifičnim stabilizatorima dendritičkih trnova

ih dijele u rane i kratkotrajne te kasne i dugotrajne stabilizatore. Proteini koji su vezani uz ranu stabilizaciju trna javljaju se odmah po formiranju sinapse te privremeno sprječavaju njegovu resorpciju. Njihovo kratkoročno djelovanje vjerojatno se temelji na principu dosezanja praga potrebnog za dugoročno stabiliziranje trna. Drugim riječima, ukoliko sinapsa ima tendenciju postati trajna, onda se sintetiziraju u dovoljnoj količini da se aktiviraju mehanizmi dugoročne stabilizacije. Primjeri takvih proteina su PSD-93, SAP-102 i SAP-97. Glavni protein koji se javlja u zrelijem stadiju trnova te ih dugoročno stabilizira je PSD-95, jedan od glavnih elemenata postsinaptičkoga zgusnuća koje se nalazi u svakoj ekscitacijskoj sinapsi. On nije prisutan u nascentnim sinapsama, već se započinje sintetizirati tek nekoliko sati nakon njihove formacije (40,41), a njegova prisutnost označava trnove koji se nalaze u zreлом dijelu spektra s relativno snažnom pripadajućom ekscitacijskom sinapsom i velikom vjerojatnošću dugotrajne perzistencije. Ehrlich i sur. (41) su međutim utvrdili da u kulturama hipokampalnih neurona *Psd-95 knock-down* štakora dolazi do nemogućnosti stabilizacije dendritičkih trnova i njihove resorpcije unatoč postojanju LTP-a, iako morfologija trna i ekscitatorne sinapse ostaju nepromijenjeni (42).

Svi navedeni stabilizacijski proteini dio su kompleksne strukture PSD te imaju važne interakcije s NMDAR i AMPAR glutamatnim receptorima, posrednicima

LTP i LTD u neuronima (43). Kako su LTP i LTD rezultat recentne sinaptičke signalizacije onda se i cijeli proces stabilizacije sinapse naziva stabilizacijom ekscitatornih sinapsi i trnova ovisnom o aktivnosti (eng. *activity-dependent stabilization*).

Jasna veza između sinaptičke aktivnosti, LTP-a i LTD-a, morfološkoga oblika dendritičkoga trna, stabilnosti trna te snage sinapse može se uočiti u radovima Malenke i Beara (35) te Zito i sur. (44). Naime, tipična simultana sinaptička aktivnost koja je potrebna za ostvarivanje LTP-a u sinapsi djeluje na razini dendritičkoga trna u dvije vremenski odvojene faze – u fazi E-LTP-a aktivacija NMDAR i povećan ulaz kalcijevih iona u dendritičkome trnu povećavaju broj AMPAR na membrani translokacijom receptora pohranjenih u jukstapozicioniranim vezikulama, dok u fazi L-LTP-a povećana koncentracija kalcijevih iona u trnu potiče gensku transkripciju i sintezu mnogobrojnih proteina, a među ostalima i AMPAR-a. Zito i sur. (44) su utvrdili da nascentni dendritički trnovi hipokampalnih piramidnih neurona, tj. filopodiji, dominantno imaju NDMAR kao glutamatne receptore, dok morfološki zreli i stabilni oblici dendritičkih trnova, tj. gljivasti trnovi, obiluju AMPAR, a NMDAR se nalaze u manjoj količini. Stoga se može izvesti zaključak da omjer broja AMPAR i NMDAR na trnovima raste s veličinom, zrelošću i stabilnošću trna. Dakle, morfološki veći i zreliji trnovi posreduju glutamatergičnu ekscitacijsku signalizaciju u snažnim sinap-

sama između neurona, a sve kao rezultat povećanja broja AMPAR na njihovoj membrani uslijed LTP-a koji inducira stabilizaciju trnova.

4. Dendritički trnovi kao sinaptički markeri

Od Cajalova otkrića dendritičkih trnova, preko istraživanja Uchizonoa (8) i Coloniera (9) koja su povezala trnove s Grayevim asimetričnim tipom I sinapse pa sve do danas, velik broj istraživača je postojanje dendritičkoga izdanka prihvaćalo kao surogat za postojanje aksono-dendritičkoga spoja na tome mjestu. Prema Harris i sur. (12) i prema LeVayu (13), svaki dendritički trn je vezan uz isključivo jednu sinapsu (uz izuzetak razgranatih trnova) pa se detekcija trna uistinu i mogla prihvatiti kao detekcija sinapse. Međutim, novijim istraživanjima (10,14,15,29,41,45) utvrđeno je da samo postojanje dendritičke protruzije nije nužno uvijek vezano uz morfološki cjelovitu, a kamoli funkcionalnu sinapsu. Također, velik udio trnova podliježe dinamičkim promjenama i skloni su brznoj resorpciji pa i nastali sinaptički elementi nisu dugotrajni.

Jedna od najvažnijih sinaptičkih struktura koja je dio dendritičkoga trna je postsinaptičko zgusnuće. To je kompaktna struktura širine 250-500 nm i debljine 25-50 nm koja se sastoji od mnoštva proteina nužnih za sinaptičku funkciju, a smještena je tik do postsinaptičke membrane kako bi osigurala dostupnost svih proteina i receptora za prijenos impulsa iz sinaptičke pukotine (18,46,47,48). Na-

jvažniji proteini koji čine PSD su PSD-95 i ostali proteini iz MAGUK veleobitelji proteina, NMDAR, AMPAR, neuroligin, CaMKII i aktin, ali procjenjuje se da je nekoliko stotina proteina u raznim dijelovima SŽS-a i svim fazama sinaptogeneze uključeno u strukturu PSD-a, što uključuje i brojne adhezijske i signalne molekule (46,47,49,50). Ti proteini tvore kompleksnu proteinsku mrežu kojoj je najvažnija funkcija osiguravanje normalne funkcije glutamatnih receptora te drugih ionskih kanala u ekscitacijskoj sinapsi. Osim toga, za održavanje uske sinaptičke pukotine i usklađivanje presinaptičke i postsinaptičke membrane zaduženi su također razni kortikalni citoskeletni proteini, integralni membranski proteini te proteini iz vastaničnoga matriksa koji nisu dio PSD, ali interagiraju s njegovim proteinima.

PSD je struktura koja je ključna za prijenos signala u glutamatergičnim ekscitacijskim sinapsama pa se dendritički trnovi bez PSD-a ne mogu smatrati surogatom ekscitacijske sinapse. Prema Cane i sur. (14) te Villa i sur. (15), filopodiji najčešće nemaju potpuno formiran PSD, a kod onih kod kojih PSD postoji često nedostaju ključni proteini poput PSD-95 potrebni za maturaciju i stabilizaciju. Zapravo, filopodiji od sinaptičkih struktura najčešće imaju

samo malu sinaptičku pukotinu i veoma mali broj sinaptičkih vezikula (29). Iz toga proizlazi da se u ranim stadijima sinaptogeneze, kada predominiraju filopodiji na dendritima, dendritički trnovi ne mogu *per se* smatrati dijelom prave sinapse jer ona nije funkcionalna. S druge strane, većina dendritičkih trnova u odraslih jedinki zbog zrelije strukture, specifično gljivasti i tanki trnovi, imaju potpuno formirane sinaptičke elemente (10), makar je i tada oko 10% trnova u nezrelome dijelu morfološkoga spektra (10,12,19). Uslijed toga, teško je na temelju morfoloških značajki dendritičkih trnova zaključiti o postojanju sinapse, već je potrebna dublja analiza na proteinskoj razini kako bi se utvrdila razina zrelosti trnova pa zbog toga dendritički trnovi nisu dobri sinaptički markeri kako se smatralo u ranijim istraživanjima.

Da bi se bolje utvrdile promjene u trnovima u raznim stadijima sazrijevanja potrebno je u potpunosti definirati koji se sve strukturni elementi nalaze u trnovima i sinapsama te koja je njihova funkcija. Kako mnogim proteinima u trnovima nije poznata specifična funkcija, provode se mnoga istraživanja koja pokušavaju ekstenzivno utvrditi koji su proteini prisutni u sinapsi i trnovima u raznim maturacijskim fazama (49,50) te koja je specifična funkcija svakoga proteina. S obzirom da su LTP i LTD fenomeni koje se odvijaju na razini trnova, onda je i jedan od ciljeva istraživanja utvrditi koje se strukturne promjene trnova nalaze u njihovoj podlozi, koji su signalizacijski putevi koji induci-

raju takve promjene te kako se te promjene mogu povezati s procesima učenja i pamćenja.

4.1 MAGUK proteini

MAGUK proteini su veleobitelj proteina koji su specijalizirani za proteinsko-proteinske interakcije s proteinima citoskeleta, mikrotubulima tj. aktinom te raznim molekulama uključenima u prijenos signala u sinapsi. Zbog toga su uključeni u organizaciju postsinaptičke membrane u sklopu PSD te okupljaju NMDA glutamatne receptore i povezuju ih s unutarstaničnim molekulama povezanim s mehanizmom sinaptičke plastičnosti tj. s LTP-om i LTD-om. Svi MAGUK proteini imaju jednake proteinske domene kojima ostvaruju većinu svojih funkcija, a to su tri PDZ domene na N-terminalnom kraju, zatim SH3 domena i zatim GUK domena na C-terminalnom kraju, ali neki imaju i druge domene poput CaMKII. Geni koji kodiraju za te proteine nalaze se na različitim kromosomima te su eksprimirani u različitim vrstama tkiva, ali zajedničko im je da su eksprimirani u neuronima te da se njihovi proteinski produkti nalaze samo u PSD dendritičkih trnova. Proteini koji čine MAGUK veleobitelj su SAP-97 (gen *DLG1*), kapsin-110/PSD-93 (gen *DLG2*), SAP-102 (gen *DLG3*), SAP-90/PSD-95 (gen *DLG4*) i DLG5 (gen *DLG5*) (51,52). SAP-97 protein je uključen u intracelularni promet ionotropnih transmembranskih receptora, specifično NMDAR i AMPAR, od ER do stanične membrane den-

dritičkoga trna, a također je uključen i u izmjenu AMPAR receptora na membrani kao dio procesa sinaptičke plastičnosti (52,53).

DLG5 protein smješten je i u citoplazmi neurona i u membrani dendritičkih trnova, a njegova vjerojatna uloga je transdukcija signala s proteina izvanstaničnog matriksa na proteine citoskeleta neurona (54).

Kapsin-110 ili PSD-93 je protein koji formira heterodimere s drugim MAGUK proteinima i ima interakcije s NMDAR-ima te kalijevim voltažnim kanalima na postsinaptičkoj membrani na način da ih sabija i okuplja na membrani kako bi bili dostupniji oslobođenim neurotransmitorima iz presinaptičkih vezikula (55).

SAP-102 je MAGUK protein specifičan za neuralno i endokrino tkivo, a njegova najpoznatija interakcija je s NMDAR receptorom putem svoje PDZ proteinske domene. Također, interagira i s kalmodulinom, SAP-90/PSD-95 te kalijevim voltažnim kanalima, a funkcija mu je ista kao i kod PSD-93 proteina tj. organizacija NMDAR i kalijevih kanala na postsinaptičkoj membrani u nakupine za bolju sinaptičku funkciju (56,57).

SAP-90 tj. PSD-95 je najvažniji protein u PSD koji je ključan za stabilizaciju dendritičkih trnova i perzistenciju sinapse pa je stoga i najviše istraživanja usmjereno na interakcije i funkciju tog proteina iz MAGUK skupine. Zajedno s PSD-93 i SAP-102 tvori multimere i čini nakupine (eng. *clusters*) s transmembranskim proteinima na način da se veže za citoplazmatske krajeve kali-

jevih voltažnih kanala, za NR2 modulatornu podjedinicu NMDAR-a putem svoje PDZ domene te za AMPAR putem TARP-ova, a formiranje takvih nakupina nužno je za adekvatnu transdukciju signala (11,57,58,59). Nalazi se isključivo u PSD-u dendritičkoga trna pa se stoga može smatrati markerom dendritičkih trnova (60).

Tijekom rane sinaptogeneze, kada preovladavaju nezreli oblici trnova, veoma malen udio od ukupnoga broja trnova sadrži PSD-95 i PSD-93, ali je udio ostalih MAGUK proteina veći, dok se kod odraslih takav trend obrne pa preovladavaju PSD-95 i PSD-93 nad preostalima (61).

Cane i sur. (14) te Villa i sur. (15) su utvrdili da do 20% svih dendritičkih trnova u odrasle jedinke ne sadrži PSD-95, što djelomično odgovara udjelu od ~10% nezrelih morfoloških oblika (12,19), dok se preostali dio može pripisati trnovima u sredini razvojnog spektra koji se nisu potpuno stabilizirali. Također su utvrdili da veoma mali broj novoformiranih trnova sadrži PSD-95 te je njegova pojava sporija i manja garancija stabilizacije trna *in vivo* nego *in vitro*. Naposljetku, utvrdili su i da izrazito stabilni gljivasti trnovi, ako i budu resorbirani, prije nestanka s dendrita gube svoje PSD-95 proteine.

Nadalje, kao što je već navedeno, *knockdown* gena *DLG4* u štakora koji kodira za PSD-95 protein, unatoč indukciji sinaptičke plastičnosti u smjeru jačanja sinapse, dovodi do izostanka stabilizacije trnova i njihove resorpcije

te do pada omjera broja AMPAR i NMDAR, dok morfologija trnova i sinapse ostaje nepromijenjena (41,42).

Meyer i sur. (48) su zapazili u svojim pokusima koristeći TPM, EM i tehniku oslobađanja glutamata da povećanjem trnova uslijed sinaptičke plastičnosti dolazi do odgođenog povećanja količine PSD-95 tj. potrebno je barem 3h stabilnoga povećanja trna da bi količine PSD-95 znatnije odstupale od prestimulacijske vrijednosti. Također, ako kod trnova ne bi došlo do stabilizacije onda su i razine PSD-95 u njima pale. Druge skupine (41,62,63) su prema tome utvrdile da PSD-95, kao i aktin i kadherin, ima jednu od ključnih uloga u stabilizaciji strukturne plastičnosti trnova.

Može se stoga zaključiti da je postojanje PSD-95 u trnu prediktivni čimbenik za stabilizaciju trna, ali ga ipak većina novoformiranih trnova nema čime neuroni održavaju dinamičnost i lako mijenjaju svoje lokalne sinaptičke sklopove jer samo kratkotrajno uspostavljaju sinaptičke veze s drugim neuronima kako bi testirali hoće li se sinapsa održati ili neće. Osim toga, s obzirom na to da PSD-95 značajno doprinosi funkcionalnosti sinapse i detektira se u snažnim sinapsama s izraženom sinaptičkom plastičnošću po tipu LTP-a i visokim omjerom broja AMPAR i NMDAR, može se smatrati i dobrim sinaptičkim markerom (11,14,15,16).

4.2 Aktin

Strukturna plastičnost trnova, preciznije sLTP i sLTD, naziv je za intracitoplazmatsku molekularnu reorganizaciju strukturnih elemenata dendritičkih trnova u sklopu LTP-a i LTP-a. Matsuzaki i sur. (64) te Zhou i sur. (65) prvi su utvrdili koja je točna strukturna podloga morfoloških promjena trnova u sinaptičkoj plastičnosti – aktin.

Aktin je glavni citoskeletni protein dendritičkih trnova koji pruža strukturnu podršku morfološkim promjenama dendritičkih trnova te osigurava potpunu stabilizaciju svih struktura u trnovima kao što su transmembranski ionski kanali, adhezijski proteini i svi proteini koji čine PSD. Svaki aktinski mikrofilament tj. F-aktin građen je od globularnih monomera G-aktina koji se međusobno povezuju i disociraju pa su dio neprestanog ciklusa ovisnog o ATP-u. Molekula ATP-a se veže za G-aktinski monomer i omogućava njegovu polimerizaciju na rastućem kraju mikrofilamenta, a hidrolizom fosfatne skupine dolazi do disocijacije ADP-vezanog monomera. Cijela dinamika aktina uključuje i mnoge druge proteine koji čine enzimsku ili strukturnu podršku mreži aktinskih filamenata kao što su Arp2/3 kompleks koji inducira grananje polimera i tako stvara mrežu filamenata, profilin koji potiče polimerizaciju G-aktina vezanjem ATP-a umjesto ADP-a te Eps8 koji stabilizira aktinske filamente, a zajedničkim imenom se nazivaju aktin-vežući proteini (ABP)

(66,67,68).

Honkura i sur. (69) su utvrdili da je upravo kompleksna dinamika aktinskih mikrofilamenata u podlozi strukturalnih promjena trnova koje nastaju uslijed aktivnosti sinapse. Zamijetili su i da dio populacije aktinskih polimera koji se nalazi na dnu trnova tik do dendritičke osnovice ima smanjen intenzitet dinamičkih promjena pa su mnogo stabilniji, a značenje toga još uvijek nije jasno. Stoga se izvodi zaključak da se u sklopu sinaptičke plastičnosti pomiče ravnoteža između polimerizacije i depolimerizacije aktinskih mikrofilamenata te se na taj način mijenja struktura samih dendritičkih trnova. Bosch i sur. (70) su utvrdili da povećanjem i maturacijom trnova dolazi i do povećane polimerizacije aktina čime se filamenti produljuju i podržavaju rast i stabilizaciju trnova.

Iz navedenoga proizlazi da je potrebna dobra koordinacija aktina i ABP-ova kako bi strukturalna plastičnost trnova bila funkcionalna. Točne promjene u dinamici aktina u sklopu sinaptičke plastičnosti još uvijek nisu poznate, premda su Okamoto i sur. (71) utvrdili da u LTP-u i LTD-u dolazi do pomaka ravnoteže F-aktina i G-aktina u smjeru monomernog oblika, a pretpostavljaju da do toga dolazi zbog odvajanja ABP-ova od aktinske mreže filamenata čime se polimeri destabiliziraju i preslože u novu stabilnu strukturu pa se tako promijeni i makromorfologija dendritičkoga trna. Prema Star i sur. (72), 85% svih molekula aktina u trnu je dinamično i neovisno o veličini trna iz čega se može zaključiti

da postoji neprestana remodelacija aktinske mreže filamenata i da je samo malen dio aktina zadužen isključivo za strukturalnu stabilizaciju trna, a veći dio je zadužen za promjene vezane uz strukturalnu plastičnost i interakcije s drugim proteinima.

Dodatna važnost aktina u citoarhitektonici u samome dendritičkom trnu proizlazi i iz istraživanja Husi i sur. (73) koji su utvrdili da u samome dendritičkome trnu gotovo da nema mikrotubula ili intermedijarnih filamenata pa, za razliku od dendritičke osnovice, teret strukturalne regulacije trnova pada isključivo na aktinske filamente.

4.3 Proteini vezani uz promet Ca^{2+}

Sve aktinske citoskeletne promjene u sklopu strukturalne plastičnosti dendritičkih trnova proizlaze iz promjena na razini ABP-a koje su rezultat promjena koncentracije Ca^{2+} u citoplazmi trnova, a što su detaljno iznijeli Nishiyama i Yasuda (74). Naime, porastom postsinaptičkih razina Ca^{2+} u ekscitacijskoj sinapsi putem NMDAR i kalcijevih voltažnih kanala dolazi do vezanja Ca^{2+} za CaM, a takav kompleks aktivira brojne kinaze i fosfataze poput CaMKII i CaN. Specifično, CaMKII se dominantno aktivira za vrijeme indukcije sLTP-a (74), a CaN dominantno za vrijeme indukcije sLTD-a (75), premda se porast oba proteina može uočiti za vrijeme indukcije oba oblika strukturalne plastičnosti (76).

CaMKII nakon aktivacije vrši autofosforilaciju i tako se dugotrajno aktivira bez obzira na vezanost $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleksa (76,77). S obzirom na to da razine Ca^{2+} u trnu padaju neposredno nakon influksa iz izvanstaničnog matriksa, Lisman i sur. (77) smatraju da je autofosforilacija CaMKII oblik biokemijskoga pamćenja u sklopu procesa LTP-a. To je potkrijepljeno i istraživanjem Buard i sur. (78) koji su utvrdili da transgenični miševi sa specifičnom točkastom mutacijom koja uzrokuje nemogućnost autofosforilacije CaMKII ne mogu razviti normalan LTP te imaju poteškoće s učenjem i pamćenjem. Aktivirani CaMKII u trnovima putem GTPaza Rac1, Ras, RhoA i Cdc42 interagiraju s mnogim ABP-ovima poput Arp23, Eps8 i ADF/kofilina te tako potiče polimerizaciju aktina i povećanje dendritičkih trnova. Na taj način Ca^{2+} posredno putem CaM i CaMKII djeluje na citoskelet trnova i potiče maturaciju (67,70).

S obzirom da je CaMKII dominantnije izražen u sLTP-u onda su njegovi efekti putem ABP-a usmjereni na pomak aktinske ravnoteže u smjeru polimerizacije kako bi došlo do povećanja i stabilizacije trna, a kako je CaN više izražen u sLTD-u pretpostavlja se da su njegovi efekti više usmjereni ka depolimerizaciji aktinskih filamenata (67).

Osim toga, Ca^{2+} -ovisni proteini poput CaMKII i CaN ne djeluju samo na aktinski citoskelet, već na izrazito velik broj proteina kroz veliku i kompleksnu signalizacijsku mrežu. U toj signal-

izaciji uključene su interakcije velikog broja proteina, ali i $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ kompleksom posredovana aktivacija genske transkripcije gena koji kodiraju za razne proteine uključene u dinamičke promjene dendritičkih trnova. Zbog toga je važno naglasiti da je kratkotrajna promjena koncentracija Ca^{2+} u trnu inicijalni proces gotovo svih strukturnih i funkcionalnih promjena. Svi procesi koji doprinose jačanju sinapse i stabilizaciji trnova ili pak slabljenju sinapse i destabilizaciji trnova započinju influkom Ca^{2+} , a zatim kompleksna Ca^{2+} -ovisna signalizacijska mreža posreduje u strukturnom i funkcionalnom remodeliranju trnova (74–78).

4.4 Ostali proteini dendritičkih trnova

U trnovima su prisutni i razni proteini koji imaju razne strukturne, enzimske ili signalizacijske uloge. Interakcije između brojnih proteina su potrebne kako bi se održala pravilna struktura sinaptičke pukotine i omogućio prijenos neurotransmitora do postsinaptičke membrane te kako bi se održala signalizacijska funkcija na razini sinapse (18,73,79).

Najvažnije strukturne molekule na membrani ili unutar dendritičkih trnova su N-kadherini, protokadherini, neureksini i neuroigini, NCAM te razni proteoglikani. Oni omogućavaju međustaničnu povezanost na razini sinapse, ali zbog asimetrije u ekscitacijskim sinapsama

potrebna je njihova drugačija interakcija nego što je to inače slučaj kod adhezijskih proteina u drugim tkivima (79–81). N-kadherini su proteini koji su dominantno smješteni u nakupinama na rubovima trnova te međusobno formiraju snažne veze između presinaptičke i postsinaptičke membrane, a s aktinskim citoskeletom su direktno povezani preko α - i β -katenina te indirektno preko ABP-ova. Oni su najvažniji proteini za uspostavljanje stabilne sinaptičke pukotine svojom stanično-staničnom adhezijom (79–83). Iz obitelji kadherina za održanje strukture sinapse izrazito su važni i α - i γ -protokadherini koji se na jednak način kao i N-kadherini međusobno povezuju i tako tvore čvrstu presinaptičko-postsinaptičku vezu (84). Neureksini i neuroligini čine transsinaptički sustav međustaničnih adhezijskih proteina koji imaju i regulatornu ulogu u sinapsi. Neureksini su lokalizirani na presinaptičkoj membrani te se vežu za neuroligine koji se nalaze na postsinaptičkoj strani čime tvore interneuronske veze, a njihova regulatorna uloga se odnosi na diferencijaciju sinapse u specifičan fenotip za vrijeme sinaptogeneze. Uočeno je da razne izoforme neureksina i neuroligina usmjeravaju diferencijaciju sinapse u specifičan ekscitatorni ili inhibitorni fenotip na način da induciraju promjene u membrani drugoga neurona, dok njihov nestanak s membrane pak uzrokuje dediferencijaciju sinapse (80,81,85–87). Molekule poput NCAM i ekstracelularnih proteoglikana nemaju samo strukturnu

ulogu na način da se vežu s kadherinima i integrinima preko kojih su povezani s aktinskim citoskeletom u dendritičkim trnovima, već također mogu i utjecati na diferencijaciju sinapse kao i neureksini i neuroligini te su uključeni i u remodeliranje citoskeleta dendritičkih trnova. Točan mehanizam njihovoga djelovanja na remodelaciju F-aktina još uvijek nije razjašnjen. Uz njih je važno istaknuti i BDNF kao jedan od najvažnijih ekstracelularnih elemenata koji doprinose sLTP-u (80,81,88). Prema Harwardu i sur. (88), oslobađanjem BDNF-a dolazi do brze i dugotrajne aktivacije njegovoga receptora TrkB u dendritičkome trnu, a unutarstanično receptor djeluje na aktivaciju GTPaza čime se pokreće kaskada prema ABP-ovima i remodelaciji aktinskih filamenata. Osim toga, uočili su da aktivacijom TrkB receptora dolazi do lokalne sinteze CaMKII i drugih proteina u trnu koji djeluju na remodelaciju aktinske citoskeletne mreže.

Može se zaključiti da je potrebna kompleksna i visoko sofisticirana mreža proteina i drugih molekula u dendritičkim trnovima kako bi se održao *status quo* na razini sinapse jer je za to potrebno postojanje uske sinaptičke pukotine (što omogućuju kadherini, neureksini i neuroligini), stabilna struktura presinaptičkih i postsinaptičkih elemenata (što omogućuje aktinski citoskelet) te nakupine receptora na postsinaptičkoj membrani (što omogućuju proteini PSD-a) (11,67). Takva cjelovita struktura je temelj svih dinamičkih promjena na razini dendritičkih

trnova, a koje su pak temelj procesa učenja te konsolidacije naučenoga (18,89).

5. Dinamika dendritičkih trnova

Dinamika dendritičkih trnova opisuje se kao sposobnost promjene svoje morfologije, broja, gustoće i pokretljivosti u relativno kratkim vremenskim razmacima (20). Kao što je već opisano, postojanje sinapse uvelike ovisi o strukturi, funkciji i stabilnosti dendritičkih trnova pa je njihova dinamika temelj povezanosti neurona u ekscitatornim sinapsama. Dinamika obuhvaća sve opisane procese nastanka, maturacije i stabilizacije te resorpcije dendritičkih trnova, ali ih stavlja u kontekst induktora dinamičkih promjena poput LTP-a i LTD-a te ih zatim pokušava povezati s osnovnim funkcijama SŽS-a poput učenja, pamćenja i ponašanja, kao i s patološkim procesima koji se javljaju kod poremećaja dinamike trnova (11,20).

Prvi koji je pretpostavio da su dendritički trnovi dinamičke strukture sklone nastajanju i nestajanju s dendrita bio je Ramón y Cajal nakon što je uočio da je gustoća trnova veća u fazi razvoja SŽS-a nego u odraslih, a također je iznio hipotezu da je dinamika trnova temelj procesa učenja i pamćenja (90). Tadašnje tehnike vizualizacije trnova omogućavale su samo generalnu usporedbu gustoće i morfologije trnova u različitim životinja te u različitim stadijima razvoja SŽS-a sve do odrasle dobi. Međutim, suvremeno

shvaćanje dinamike trnova proizlazi iz činjenice da moderne tehnike vizualizacije omogućavaju *in vitro* i *in vivo* kontinuirano praćenje istih neurona kroz duži period zbog mogućnosti trajnoga označavanja fluorescentnim markerima (22,91). Zbog toga se danas može govoriti o dinamici pojedinačnoga trna te ukupnoj dinamici trnova na razini neurona te na razini SŽS-a, a također je danas poznato i da se njihova morfologija i gustoća aktivno mijenjaju kod učestale aktivnosti u istoj sinapsi, kod raznih senzornih podražaja iz okruženja te u odnosu na endogene promjene hormona, a što opisuju Markham i Greenough (92) te Lippman i Dunaevsky (93). Zanimljivo je da se o dinamici trnova može govoriti i kod neurona koji fiziološki nemaju trnove (eng. *aspiny neurons*). Passafaro i sur. (94) su utvrdili da se hiperekspresijom GluR2 podjedinice AMPAR može inducirati nastanak trnova na GABA-ergičnim interneuronima koji inače nemaju trnove na svojim dendritima, a Roussignol i sur. (95) su utvrdili da hiperekspresija proteina iz Shank skupine, proteina PSD-a koji povezuju aktinski citoskelet s raznim transmembranskim proteinima postsinaptičke membrane (96), također potiče formiranje trnova na inhibitornim neuronima koji uobičajeno nemaju trnove.

5.1 Razvojne promjene u dinamici trnova

U početnim fazama razvoja jedine dendritičke protruzije su filopodiji koji su izrazito dinamični u smislu elongacije i retrakcije kako bi omogućili primarni kontakt dvaju neurona i postavili temelje za sinaptičku veze između njih (10–12,24,25,28,29). Takve strukture se ne mogu opisivati u klasičnome smislu "dinamike trnova" jer niti ne sadrže strukturne elemente kojima bi mogli biti dio funkcionalne sinapse pa se samo zreliji oblici protruzija tj. "pravi" dendritički trnovi, koji se javljaju u malo kasnijoj fazi razvoja, mogu smatrati dijelom sinaptogenetskog procesa (29–33).

Papa i sur. (97) su u primarnoj kulturi hipokampalnih neurona pratili morfologiju trnova tijekom 4 tjedna razvoja i utvrdili da u 1. tjednu razvoja više od 50% dendritičkih protruzija nema formiranu glavu, ali su jednake duljine kao i protruzije s glavom, a što bi odgovaralo filopodijima. Protekom vremena sve više trnova formira glavu te sve više postaju vidljivi sinaptički markeri poput sinaptofizina. Morfologija trnova kod početnih oblika sinapsi je odgovarala kratkom tipu trnova, a u 3. tjednu praćenja morfologija trnova je počinjala sve više nalikovati na *in vivo* morfologiju. Prema Zecevic i sur. (98) te Bourgeois i Rakic (99), dendritički trnovi su veoma dinamične strukture koje dosežu najviši stupanj plastičnosti u kasnijim fazama razvoja, ali je na nižoj razini zadržavaju i

tijekom cijeloga života kad predominiraju stabilniji oblici trnova. Trachtenberg i sur. (22) su *in vivo* praćenjem promjena dendritičkih trnova u miševa tijekom više mjeseci utvrdili da potpuno razvijen SŽS u odraslih jedinki zadržava sposobnost *de novo* stvaranja dendritičkih trnova, kao i mogućnost resorpcije potpuno formiranih i stabilnih trnova.

Iz tih istraživanja može se zaključiti da je proces nastanka i resorpcije trnova fiziološki nužan u svakoj životnoj dobi, a ne samo u razdoblju prenatalne i postnatalne sinaptogeneze pa je važno da trnovi održe svoj dinamički potencijal i nakon dovršetka razvoja SŽS-a, premda se taj potencijal razlikuje između regija mozga te pada s dobi (18,100).

Razlikovanje stupnja dinamičnosti između različitih moždanih regija je i intuitivna pretpostavka s obzirom na to neki neuralni krugovi moraju zadržati stabilne sinapse kako bi dugoročno mogli komunicirati po istome obrascu (npr. kao kod trajne memorije), dok drugi neuralni krugovi moraju samo kratkotrajno formirati sinapse i zatim ih ukloniti kako bi postojalo "osvježavanje" obrazaca komunikacije između neurona (npr. kao kod radne memorije). Drugim riječima, u neuralnim krugovima koji dugotrajno opstaju povećavana je stabilnost trnova te je tako osigurana pohrana informacija koje su dio tih krugova, a u kratkotrajnim neuralnim krugovima povećan stupanj dinamičkih izmjena trnova omogućava da se stabilizira samo malen dio trnova čije sinapse postepeno postaju dio dugotrajnih kru-

gova, dok ostatak čini funkcijsku rezervu za stvaranje novih kontakata između neurona (11,18).

5.2 Dinamičke klase trnova

Iz istraživanja Holtmaat i sur. (16), Trachtenberg i sur. (22) te Villa i sur. (15) proizlazi da se novoformirani trnovi prema duljini opstanka mogu klasificirati u dvije dinamičke skupine. U jednu skupinu se mogu smjestiti oni trnovi koji perzistiraju na dendritu tijekom više mjeseci ili godina te su dio stabilnih sinapsi u dugoročnim neuralnim krugovima (perzistentni trnovi), a u drugu skupinu pripadaju trnovi koji se formiraju, kratko sazrijevaju i zatim se resorbiraju unutar 4 dana od nastanka te su tako dio kratkotrajnih neuralnih krugova koji su skloni brzom izmjeni (privremeni trnovi). Osim toga, utvrdili su da u ranim razvojnim stadijima ~35% trnova pripada u perzistentnu skupinu, dok je u odraslih taj udio ~70%, ali također i da trnovi bilo koje morfologije i veličine mogu pripadati u obje dinamičke kategorije.

Velik broj istraživanja je utvrdio korelaciju između količine aferentnih signala senzoričkih sustava i stupnja dinamičke izmjene trnova na dendritima pa su tako svi oblici senzorne deprivacije povezani s povećanjem omjera perzistentnih i privremenih trnova u nedepripriviranim dijelovima senzoričkog korteksa (21). S druge strane, senzoričko obogaćivanje okoline (eng. *environmental enrichment*) u kojoj su smješteni

miševi povezano je s povećanim udjelom privremenih trnova (22).

Slični rezultati su vidljivi i u istraživanjima koja su uspoređivala promjenu dinamike trnova u motoričkom kontekstu za vrijeme učenja neke motoričke vještine. Utvrđeno je da u miševa za vrijeme učenja motoričke vještine dolazi do povećanog *turnover*-a trnova tj. povećanog broja trnova iz privremene dinamičke kategorije, a nakon razdoblja učenja gustoća i dinamički tip trnova se vraćaju na početnu razinu (101). Osim toga, zapaženo je i da su trnovi formirani za vrijeme razdoblja učenja skloniji povećanoj stabilizaciji i perzistenciji, dok su trnovi resorbirani za vrijeme razdoblja učenja oni koji su postojali i prije obavljanja motoričke vještine. Iz toga proizlazi da proces učenja inducira formiranje stabilnih trnova koji dugotrajno perzistiraju, a odgovaraju novonastalim interneuronskim vezama koje služe za pohranjivanje naučene vještine (102).

Cane i sur. (14) su utvrdili da ~20% trnova u SŽS-u odrasle jedinke ne sadrži PSD-95, ali oni čine znatnu većinu svih trnova koji pripadaju u dinamičnu skupinu privremenih trnova. Kako je PSD-95 jedan od najvažnijih markera koji pokazuju stabilnost formirane sinapse, onda se može zaključiti da većina visoko dinamičnih trnova nema stabilnu sinapsu premda je ona funkcionalna, za razliku od filopodija čija sinapsa nije niti stabilna niti funkcionalna, ukoliko uopće i postoji. Zbog toga se privremeni trnovi mogu

percipirati i kao trnovi koji, u pokušaju da stvore novu vezu između dvaju neurona, nisu uspjeli doseći stabilizacijski prag za formiranje PSD-95 čime bi vjerojatno postali perzistentni trnovi i bili dio trajnih neuralnih krugova (38–41).

Berry i Nedivi (11) u svome radu, prema istraživanjima Cane i sur. (14) te Villa i sur. (15), smatraju da su nizak stupanj dinamičnosti i prisutnost PSD-95 omogućavaju postojanost uspostavljenih veza između neurona, a u slučaju da dođe do resorpcije takvih stabilnih trnova da dolazi do trajnih i nenadomjestivih promjena na razini toga neuralnog kruga. Nadalje smatraju da se klasifikacija pojedinoga trna u određenu dinamičku skupinu treba temeljiti na procjeni utjecaja toga trna na opstojnost neuralnog kruga čiji je on dio, a ne na morfološkim ili drugim kriterijima. Zapravo, za novoformirani trn se može odrediti pripada li u skupinu perzistentnih ili privremenih trnova isključivo *post hoc* tj. nakon što se vidi utjecaj njegove formacije ili resorpcije na lokalnu neuronsku povezanost. Stoga predlažu da se razvrstavanje vrši na temelju dvaju kriterija – dovoljno dugoga i učestaloga praćenja trna te prisutnosti tj. odsutnosti PSD-95 markera.

5.3 Korelacija dinamike i morfologije trnova

Dinamičke procese dendritičkih trnova relativno dobro opisuju morfometrijske vrijednosti poput promjera glave, volu-

mena glave, širine vrata, duljine vrata i sl. S obzirom da su to kontinuirane, a ne diskretne vrijednosti, onda i iz toga proizlazi da je morfologiju trnova bolje promatrati i analizirati kao spektar, a ne kao kategorije (10,103).

Prema Harris i sur. (12), veličina trna je proporcionalna veličini PSD-a i broju sinaptičkih vezikula s neurotransmitorima, a prema Béique i sur. (45) te prema Noguchi i sur. (104), volumen trna je proporcionalan snazi sinapse. Nadalje, površina PSD-a korelira s brojem receptora na postsinaptičkoj membrani (105), a broj sinaptičkih vezikula je proporcionalan količini neurotransmitora dostupnog za egzocitozu u sinaptičku pukotinu (106). Osim toga, sinaptička plastičnost po tipu LTP-a povećava gustoću trnova i promjer glave, a gustoća i promjer glave trnova pak korelira s jačinom sinapse (107–110). S druge strane, LTD uzrokuje smanjenje istih morfometrijskih parametara te konačno može uzrokovati potpunu retrakciju trna s dendrita (38,65).

Arellano i sur. (10) su pokušali utvrditi postoji li međusobna korelacija između morfometrijskih parametara samih dendritičkih trnova. Zaključili su da ne postoji korelacija između volumena glave i duljine vrata trna te da postoji jako slaba korelacija između volumena glave i širine vrata. Osim toga iz njihovih rezultata je vidljivo da površina PSD-a dobro korelira s volumenom glave i širinom vrata, ali ne i s duljinom vrata.

Tønnesen i sur. (111) su utvrdili da širina i duljina vrata trna bolje ko-

reliraju sa snagom njegove pripadajuće sinapse nego volumen i promjer glave, ali treba istaknuti da postoje velike nepodudarnosti u rezultatima istraživanja koja utvrđuju koji morfometrijski parametar trnova je optimalan za procjenu snage njihove sinapse i stabilnosti. Gipson i Olive (20) navode da je potreban velik oprez kod interpretacije funkcije sinapse na temelju izmjerenih morfometrijskih vrijednosti trnova jer niti jedna vrijednost ne pokazuje jako veliku korelaciju sa snagom sinapse pa zbog toga predlažu da bi bilo potrebno kvantificirati veći broj parametara trnova vezanih uz same receptore ili PSD koji su bliži funkcijskom aspektu sinapse.

Yuste i Bonhoeffer (112) te DeRoo i sur. (110) dodatno ističu da se morfološke promjene trnova uslijed LTP-a ili LTD-a ne mogu smatrati jednakima na razini cijeloga neurona, a čak ni na razini cijeloga dendrita, već da samo manja skupina trnova na jednom dendritičkom odsječku ima jednaku dinamiku, a što je uzrokovano kompartmentalizacijskom ulogom trnova.

6. Uloga dendritičkih trnova

6.1 Dendritički mikrodjeljci

Već je istaknuto da se ekscitacijske sinapse između neurona mogu formirati između trna i terminalnog dijela aksona ili između same dendritičke osnovice i aksonskog završetka (11). Stoga se postavlja pitanje zašto su trnovi uopće potrebni ako se sinapsa može formirati i na samome dendritu, a sami ne doprinose povećanju broja mogućih sinapsi jer svi morfološki tipovi dosljedno stvaraju sinapsu sa samo jednim aksonom, izuzev razgranatih trnova koji su relativno rijetko prisutni (12,13).

Ramón y Cajal je smatrao da dendritički trnovi služe povećanju površine dendrita kako bi se povećale šanse za nastanak sinapse na dendritu (113). Premda je ta hipoteza i danas točna u fazi razvoja SŽS-a kada filopodiji svojom elongacijom s dendrita traže potencijalne aksonske partnere za uspostavljanje sinapse, danas su poznate i druge uloge trnova.

Calabrese i sur. (18) smatraju da sva istraživanja upućuju na to da su dendritički trnovi autonomni odjeljci s vlastitom regulacijom membranskih i citoplazmatskih procesa u odnosu na dendrite. Također, trnovi imaju proteom koji se bitno razlikuje od ostatka neurona te ima vlastitu

signalizacijsku mrežu koja koordinira morfološke promjene u odgovoru na sinaptičku aktivnost i stabilizacijske procese (46,47,49,50). Anatomske se takva kompartmentalizacija trnova ostvaruje postojanjem uskoga dendritičkog vrata s posebnim obilježjima aktina koji u bazi trnova formira prstenaste strukture, a filamenti F-aktina su mnogo stabilniji nego u ostatku trna (66–69). Na taj način dendritički trnovi postaju biokemijski i električni mikrodjeljci u kojima promjene koncentracija iona i aktivacija signalizacijskih molekula samo selektivno utječu na preostale trnove i dendrit (114,115). Calabrese i sur. (18) pretpostavljaju da tako dolazi do amplifikacije pridošlih signala ili pak njihove izolacije i atenuacije na razini pojedinačnoga trna. Zapravo, odijeljenost trnova od ostatka dendrita pruža mogućnost ulazne specifičnosti signala (eng. *input specificity*), a što znači da se pri prijenosu signala u neuralnome krugu taj signal prenosi isključivo preko trnova uključenih u taj krug bez mogućnosti neželjene prostorne difuzije signala u druge trnove istoga neurona (116,117).

6.2 Učenje i pamćenje

Hebb (118) je prvi iznio mogućnost da neuralna aktivnost može utjecati na strukturu neuralnih krugova makar je u tome kontekstu spominjao samo sinapse, a izostavio dendritičke trnove. Unatoč tome, opisao je mehanizme kojima sinaptička aktivnost mijenja neuralne mreže. Većina istraživanja koja se nakon toga provodila odnosila se na dendritičke karakteristike kao što su duljina i razgranatost te pokušala povezati njihove morfološke promjene s procesom učenja (119).

Nakon što su Peters i Kaiserman-Abramof opisali morfološke oblike dendritičkih trnova (19), istraživanja su se pomaknula u njihovom smjeru. U odgovoru na doživljaje iz okoline te bihevioralnim odgovorom na iste doživljaje, trnovi prolaze velike promjene zbog svoje ovisnosti o sinaptičkoj aktivnosti pa se zbog toga počelo smatrati da su glavni akteri procesa učenja i pamćenja, a što je još u počecima moderne neuroznanosti pretpostavio Ramón y Cajal (90). Istraživanja su pokazala da se broj, gustoća, morfologija, struktura receptora i brojna druga svojstva dendritičkih trnova mijenjaju u odnosu na primljene senzoričke signale (21,22) te pri obavljanju motoričkih zadataka (101,102) u odgovarajućim regijama mozga. Osim toga, Leggio i sur. (120) su utvrdili da obogaćivanje okoline u štakora poboljšava sposobnosti učenja i pamćenja.

Stoga se počelo smatrati gljivaste oblike trnovima pamćenja, a tanke ob-

like trnovima učenja, što su detaljno obrazložili Bourne i Harris u svome radu (121). Naime, smatra se da su tanki trnovi nezreli trnovi koji nastaju u početku procesa učenja, a osnaživanjem sinapse putem LTP-a dolazi do djelovanja na aktinske filamente u smjeru produljivanja i grananja čime se formiraju zreli gljivasti trnovi koji predstavljaju upamćene informacije nakon učenja. Prvo se smatralo da je gustoća trnova na dendritu parametar koji se najviše mijenja za vrijeme učenja, a kasnije se utvrdilo da su morfološke karakteristike važnije (122). Morfološke promjene su se stoga povezale s procesom akvizicije novih informacija te su postale odlučujući faktor u stvaranju memorije. Naime, kako su pokazali Xu i sur. (101), za vrijeme procesa učenja dolazi do povećanog formiranja trnova, a nakon razdoblja učenja gustoća trnova se vraća na početne vrijednosti, ali oni trnovi koji postaju dio perzistentne kategorije su upravo oni koji su se formirali za vrijeme učenja. Van der Zee (122) ističe da nije nužno da je sam proces učenja inducirao stvaranje novih trnova, već da postoji mogućnost da su to trnovi koji bi se i bez aktivnosti spontano formirali, ali zbog razdoblja učenja aktivnost u sinapsama je selekcionirala one koji će perzistirati i biti strukturna podloga konsolidiranoj memoriji.

Dodatna istraživanja su nastojala pokazati da se fenomen selekcije perzistentnih trnova odvija u bilo kojem dijelu korteksa shodno tipu zadataka koji se obavlja. Tako su Roberts i sur. (123)

pokazali da se dinamičke promjene trnova poput povećanog *turnover*-a za vrijeme učenja i povećane stabilizacije novoformiranih trnova nakon učenja javljaju i u ptica u dijelu mozga gdje se ulazne slušne informacije stapaju s izlaznim motoričkim signalima za vrijeme učenja nove pjesme. Takva istraživanja pokazuju da svaki oblik učenja djeluje na specifične neuralne putove tj. samo u regijama mozga sukladno vrsti ulaznih informacija koje se uče.

Nadalje, danas je poznato da dinamička svojstva koja se zadržavaju i nakon faze razvoja SŽS-a omogućavaju dendritičkim trnovima veliku razinu plastičnosti u adultnom razdoblju pa zbog toga i imaju mogućnost reakcije na sinaptičku aktivnost. Ipak, plastičnost mozga je na najvećem stupnju u vrijeme razvoja SŽS-a, a što odgovara fetalnoj dobi te ranoj postnatalnoj dobi, a stupanj plastičnosti zatim prema odrasloj dobi pada. Bourne i Harris (124) su pokazali da indukcija LTP-a u hipokampusu odraslih štakora uzrokuje povećanje postojećih dendritičkih trnova, ali ne i formiranje novih trnova. S druge strane, Watson i sur. (125) su pokazali da u ranom postnatalnom razdoblju, kada je sinaptogeneza na svom vrhuncu, indukcija LTP-a aktivira postojeće sinapse, uzrokuje povećanje postojećih trnova, ali i potiče formiranje novih trnova što pokazuje izrazito veliku razinu plastičnosti u toj dobi.

Iz navedenoga proizlazi da se paradigma dodatno mijenja (20,122). Velik broj suvremenih istraživača

odbacuje podjelu trnova u kategorije, a činjenica da svi morfološki oblici trnova mogu pripadati u bilo koju dinamičku kategoriju (15,16,22) dodatno pomiče smjer proučavanja procesa učenja i pamćenja od morfologije prema dinamičkim klasama trnova. Osim toga, selekcija perzistentnih trnova iz bazena privremenih trnova na temelju aktivnosti u sinapsi omogućava da se dugoročno pamćenje objašnjava na principu podražaja koji su dovoljno snažni da prijeđu prag stabilizacije trnova. Na taj način se biološki procesi učenja i pamćenja mogu lako konceptualizirati na temelju dinamičkih klasa i selekcije trnova ovisne o sinaptičkoj aktivnosti, a što još uvijek počiva na mehanizmima koje je iznio Hebb (118).

6.3 Neurodegenerativne i druge bolesti

Postoji jako velik broj istraživanja koja istražuju ulogu dendritičkih trnova u raznim neurološkim bolestima, ponajviše neurodegenerativnog tipa.

Fiala i sur. (126) u svome članku opisuju patološka stanja trnova na razini broja, veličine i oblika pa tako navode da se smanjena gustoća trnova javlja kod mentalne retardacije, alkoholizma, epilepsija, Alzheimerove bolesti i sl., povećana gustoća kod sindroma fragilnog X kromosoma i ovisnosti o drogama sa stimulacijskim učinkom, a smanjenje veličine trnova kod shizofrenije i Downovog sindroma

(127,128). Osim toga, navode da je deformacija trnova povezana s mentalnom retardacijom, epilepsijom, malnutricijom, alkoholizmom, otrovanjima i spongiformnim encefalitisom. Uz to opisuju i poremećaje poput varikoziteta trnova koji se javljaju kod traumatskih ozljeda, edema mozga i hipoksičnih stanja te poput ektopičnih trnova koji se javljaju kod olivopontocerebelarne atrofije, Menkesove bolesti i raznih metaboličkih bolesti nakupljanja, a navode i druge ultrastrukturalne poremećaje na razini staničnih organela. Iz toga se može zaključiti da postoje razni patološki procesi u dendritičkim trnovima koji bi mogli sudjelovati u etiopatogenezi neuroloških bolesti.

Jedan od najčešćih primjera poremećaja na razini dendritičkih trnova povezanog s neurološkom bolesti je Alzheimerova bolest. Dorostkar i sur. (129) te Knobloch i Mansuy (130) navode da je gubitak dendritičkih trnova s neurona jedna od prvih strukturnih promjena u mozgu kod incipijentne AB. Gubitak trnova vodi i do gubitka sinaptičke povezanosti neurona, a vjerojatno je posljedica nakupljanja β -amiloida, hiperfosforilacije tau proteina, neuroinflamacije, disfunkcije staničnog citoskeleta i drugih promjena vidljivih kod osoba s AB. Fischer i sur. (131) su pokušali na mišjem modelu AB (CK-p25 Tg) utvrditi molekularne mehanizme kojima obogaćivanje okoline uzrokuje poboljšanje sposobnosti učenja i pamćenja kako su to utvrdili Leggio i sur. (120). Utvrdili su prvo da kod takvih miševa dolazi do nas-

tanka novih trnova i sinapsi te obnove sposobnosti učenja i pamćenja ukoliko se nalaze u obogaćenoj okolini. Osim toga, zapazili su da obogaćivanje okoline u takvih miševa uzrokuje epigenetske modifikacije u vidu povećane acetilacije histonskog repa. Zatim su *wild-type* miševima intraperitonealno instilirali inhibitor histonskih deacetilaza tijekom 4 tjedna te pokušali utvrditi nastaju li jednake promjene kao kod CK-p25 Tg miševa u obogaćenoj okolini, a rezultati su pokazali da je došlo do znatnog povećanja u acetilaciji H3 i H4 histona u neuronima hipokampusu. Naposljetku pokušali su utvrditi uzrokuje li primjena inhibitora histonskih deacetilaza u CK-p25 Tg miševa nastanak novih trnova i sinapsi te obnove sposobnosti učenja i pamćenja te uvidjeli da je u hipokampusu tih miševa došlo do *de novo* formiranja dendritičkih trnova, povećanja broja sinapsi i poboljšanja sposobnosti učenja i pamćenja. Iz toga rada proizlazi da bi se epigenetskim intervencijama u neuronima koje bi povećale dinamiku dendritičkih trnova mogla poboljšati klinička slika u bolesnika s AB i drugim bolestima povezanim s poteškoćama u učenju i pamćenju.

Osim u AB, promjene dendritičkih trnova se povezuju s kroničnom stresom te sa starenjem. Primjerice, Sotiropoulos i Sousa (132) navode da tau proteini u kroničnome stresu mogu na sličan način kao i u AB uzrokovati gubitak dendritičkih trnova, a Morrison i Baxter (133) ističu da neuralni krugovi koji su skloni degenerativnim promjenama

u starenju su upravo glutamatergični piramidni neuroni prefrontalnog korteksa i hipokampusa koji obiluju dendritičkim trnovima.

Iz toga se može zaključiti da je potrebna još velika količina istraživanja kako bi se pokazalo koliki je utjecaj patologije dendritičkih trnova na specifične neuralne krugove te postoji li mogućnost restitucije plastičnosti mozga kao obrambeni mehanizam protiv neurodegenerativnih bolesti.

7. Vizualizacija dendritičkih trnova

Morfologiju dendritičkih trnova započeo je analizirati još Ramón y Cajal jedinom tada dostupnom metodom svjetlosne mikroskopije uz korištenje Golgijeve impregnacije (1). Ta metoda je sljedećih nekoliko desetljeća bila zlatni standard u istraživanjima morfologije neurona sve do otkrića elektronske mikroskopije (20). Međutim, niti njenim uvođenjem nije bilo moguće *in vivo* praćenje morfologije trnova u realnome vremenu, već su se istraživanja morfologije bazirala na analizi statičkoga postmortalnog tkiva u trenutku fiksiranja. Zbog toga dinamičke promjene individualnih trnova nisu bile niti zabilježene, a i postmortalna svojstva trnova su se mogla znatno razlikovati od zaživotnoga stanja (11,134).

Razvojem suvremenih fluorescentnih markera, uvođenjem multifotonske mikroskopije te korištenjem transgeničnih eksperimentalnih životinja započela je era istraživanja dinamičnih promjena pojedinačnih dendritičkih trnova u realnome vremenu (eng. *time-lapse imaging*) (11,20). Takve moderne metode, kada se međusobno kombiniraju, omogućavaju relativno dobar *in vitro* i *in vivo* prikaz morfologije dendritičkih trnova u dvije dimenzije, a što podrazumijeva mogućnost mjerenja morfometrijskih vrijednosti poput duljina i površina, dok su 3D prikaz i procjena

volumena trnova trenutačno jedan od najvećih izazova u neuroznanosti.

7.1 Svjetlosna mikroskopija

Svjetlosna ili optička mikroskopija označava mikroskopsku tehniku koja koristi vidljivo svjetlo koje prolazi kroz uzorak i sustav leća za uvećanje tkiva koje se proučava. Slika koja se dobiva takvim mikroskopom može se proučavati direktno okom, ali se može i trajno zabilježiti. Takav osnovni optički sustav, uz moguću primjenu kontrastnih sredstava, pripada klasičnoj svjetlosnoj mikroskopiji, a primjenom drugih metoda poboljšanja slike razvijene su ostale vrste svjetlosne mikroskopije (135).

Klasična svjetlosna mikroskopija nužno mora koristiti kontrastnu boju s obzirom na to da su sve stanične strukture prozirne pod svjetlosnim mikroskopom bez primjene kontrastne histokemijske tehnike. Golgijeva metoda bojenja (1) izvodi se na tankim rezovima postmortalnoga moždanog tkiva na način da se urone u otopinu kalijevoga dikromata i srebrovoga nitrata tijekom nekoliko tjedana, a zatim se postavljaju na predmetna stakalca za prikaz pod mikroskopom. Ta tehnika je

omogućila izvrstan kontrast zbog obojenja nekolicine nasumičnih neurona, boja je duogoročno veoma stabilna u živčanome tkivu te je cijena postupka izrazito niska. Međutim, Maiti i sur. (134) navode nekoliko nedostataka te tehnike – vremenska zahtjevnost postupka, nemogućnost *in vivo* primjene, nekonzistentno bojenje neurona i mala reproducibilnost, nemogućnost dobrog bojenja tkiva fiksiranoga u formalinu duže vrijeme, malen broj obojenih neurona u uzorku, nemogućnost utvrđivanja točne lokacije neurona u CNS-u zbog nasumičnosti bojenja, izostanak bojenja jezgre i mitohondrija neurona, preklapanje struktura te izostanak 3D i ultrastrukturnog prikaza uz posljedičnu neobjektivnost kod analize zbog dvodimenzionalnosti.

Kako bi uklonio dio nedostataka Cox je 1891. godine (136) objavio rad kojime opisuje modificiranu Golgijevu metodu koja koristi natrijev karbonat ili amonijak umjesto srebrovoga nitrata, a ta tehnika je danas poznata kao Golgi-Cox tehnika bojenja. Ta metoda bolje prikazuje neurone i trnove pa je i sama morfologija trnova jasnija te oboji veći broj neurona u uzorku uz održan dobar kontrast, ali ne otklanja preostale mane izvorne Golgijeve metode.

Do današnjega dana brojni istraživači su uvodili razne modifikacije Golgi-Cox tehnike kako bi ubrzali proces bojenja i otklonili druge nedostatke poput promjene pH vrijednosti otopine, korištenja mikrovalne energije, promjene temperature inkubacije tkiva, korištenja drugih

kontrastnih spojeva i sl. (134). Takve izmjene omogućile su bojenje debljih odsječaka tkiva te bojenje i neurona i glija stanica, ali značajniji pomak se dogodio samo u vremenskome aspektu bojenja skraćivanjem trajanja postupka te u kvaliteti prikaza, a niti jedna modifikacija nije omogućila dobivanje visoko kvalitetne 2D ili 3D slike kako bi se mogla izvršiti kvalitetna morfometrijska analiza. Međutim, moguće je korištenje softverskih alata za analizu trnova kako bi se grubo utvrdile morfometrijske vrijednosti trnova prikazanih ovom tehnikom.

Glavno ograničenje svjetlosne mikroskopije je rezolucija dobivene slike (11,135). Prema Merriam-Webster rječniku, rezolucija se definira kao "proces ili sposobnost raspoznavanja individualnih dijelova predmeta, veoma bliskih optičkih slika ili izvora svjetlosti" (137). Relativno niska rezolucija je inherentna samoj metodi upravo zbog korištenja vidljive svjetlosti kao sredstva iluminacije uzorka (138). Naime, morfometrijske vrijednosti dendritičkih trnova su izrazito malene pa je potrebna metoda visoke rezolucije kako bi se mogli precizno diskriminirati njihovi obrisi i izvršiti mjerenja. Holtmaat i sur. (139) navode da su najveći dendritički trnovi reda veličine 10^{-6} m tj. $1 \mu\text{m}$, dok je lateralna rezolucija svjetlosne mikroskopije u X- i Y-osima $0.2 \mu\text{m}$, a aksijalna rezolucija u Z-osi $0.4\text{--}0.5 \mu\text{m}$. Takva maksimalna rezolucija uvjetovana je samom valnom duljinom vidljive svjetlosti tj. difrakcijskim ograničenjima svjetlosnih mikroskopa, a aksijalna re-

zolucija je uvijek lošija od lateralne pa stoga tako niska rezolucija nije podobna za proučavanje malenih staničnih struktura kao što su dendritički trnovi jer se nezreli trnovi (poput filopodija) ili izrazito dinamični trnovi (poput tankih trnova) često ne mogu niti uočiti kao zasebne strukture od svojih dendrita, a kamoli izvršiti njihova morfometrijska analiza. Zbog navedenoga rezolucijskog ograničenja, Berry i Nedivi (11) smatraju da se klasičnom svjetlosnom mikroskopijom ne može vršiti ni morfološka analiza dendritičkih trnova, kao ni analizirati dinamika na razini pojedinačnih trnova.

7.2 Fluorescencijska mikroskopija

Otkriće fluorescentnih markera otvorilo je nove mogućnosti u prikazu neurona na način da je pomaknulo istraživanja iz postmortalnoga živčanog tkiva u *in vitro* kulture neurona (134), a takve metode su zatim omogućile otkrivanje dinamičke prirode samih dendritičkih trnova (11). Osim toga, fluorescentni biljezi se mogu primjenjivati i *in vivo*, ali metodama klasične fluorescencijske mikroskopije nije moguće prikazati neurone *in situ*, već isključivo na razini staničnih kultura i postmortalnoga moždanog tkiva. Danas postoje 3 različita načina fluorescentnoga obilježavanja stanica – fluorescentne boje, fluorescentni proteini te protutijela obilježena fluoroforom (134). Mnogi istraživači su sredinom 1990-ih

godina razvijali brojne tehnike obilježavanja neurona fluorescentnim bojama pa su tako Ziv i Smith (25) započeli koristiti lipofilne DiO, DiD i DiI boje koje u roku od 20-30 minuta od primjene difundiraju u stanične membrane dendrita i aksona te ih tako obilježe, a danas se koriste i druge boje poput Fluoro-Gold, [3H]-L-leucina i sl. Te boje se lokalno primjenjuju u *in vitro* kulturu neurona ili postmortalno moždano tkivo, a raznim mehanizmima dolazi do njihovog ulaska i preraspodjele unutar svih neurona u kulturi tj. tkivu (eng. *bulk dye loading*) (140). S druge strane, Belichenko i Dahlstrom (141) su započeli s korištenjem fluorescentne boje *Lucifer Yellow* za vizualizaciju neurona koja omogućava visoku kvalitetu prikaza trnova, ali se mora primijeniti tehnikom intracelularne injekcije. Naime, selektivno označavanje pojedinačnih neurona korištenjem intracelularne injekcije fluorescentne boje staklenom mikropipetom omogućava precizno bojenje isključivo neurona od interesa, ali se kao glavni nedostatak ukazivala potreba za manualnom primjenom boje u svaki pojedinačni neuron koji se želi prikazati. Zbog toga su danas razvijene modernije metode intracelularne primjene takvih boja u cijele odsječke tkiva korištenjem automatskih mikromanipulatora, a učinkovitost označavanja stanica je gotovo jednaka učinkovitosti Golgi-Cox tehnike. Druge fluorescentne boje koje se primjenjuju na jednak način su biocitin i biotinamid (134,140). Važni nedostaci obiju vrsta boja su dugoročna

nestabilnost u neuronima gdje dolazi do gubitka obojenosti neurona nakon višemjesečnoga pohranjivanja uzoraka ili kod produljenoga osvjetljavanja istoga uzorka (eng. *photobleaching*), vremenska zahtjevnost tehnike, obilježavanje maloga broja neurona te visoka cijena automatskih mikromanipulatora. Međutim, fluorescentne boje su adekvatan način prikazivanja neurona za kvantifikaciju i morfološku analizu njihovih trnova (20,134), a razvojem posebnih fluorescentnih boja osjetljivih na kalcij otvorile su se nove mogućnosti u istraživanju funkcionalnih fizioloških promjena u trnovima s praćenjem njihove dinamike i s ciljem razjašnjavanja njihove supcelularne fiziologije (eng. *functional spine imaging*) pa se na taj način može doći do većih saznanja o signalizaciji unutar sinapse te procesima sinaptičke plastičnosti (142).

Veliku revoluciju u fluorescencijskoj tehnici prikaza neurona i njihovih strukturnih elemenata uveo je postupak transfekcije fluorescentnih proteina. Taj postupak se vrši pomoću plazmida koji sadrži gen koji kodira za fluorescentni protein poput GFP ili YFP te promotorsku regiju kojom se kontrolira ekspresija proteina. Danas su razvijeni i drugi fluorescentni proteini kojima se mogu označavati neuroni poput eGFP, mRFP i sl., a koriste se i razni promotori koji vrše ekspresiju gena za odgovarajuće proteine isključivo u neuronima poput CaMKII i sinaptofizina što omogućava razlikovanje neurona od glija stanica (142). Korištenje fluorescentnih pro-

teina danas se smatra jednom od najboljih metoda obilježavanja neurona zbog izrazito dobre specifičnosti, iako je obilježavanje fluorescentnim bojama jeftinije, brže i preciznije (143). Ostale mane korištenja fluorescentnih proteina su i niska stopa uspješnosti transfekcije te visoka podložnost staničnoj smrti kod stanica u kojima je izvršena transfekcija (134). Međutim, ova tehnika obilježavanja neurona omogućava njihovo dugoročno *in vitro* praćenje te daje dobar prikaz dendritičkih trnova pa se tako može pratiti dinamika trnova i njihove morfološke promjene, ali i vršiti morfometrijska mjerenja (11,134,144). Moriyoshi i sur. (91) su primijenili metodu prema Chalfie i sur. (145) za obilježavanje neurona fluorescentnim proteinom GFP pomoću rekombinantnoga adenovirusnog vektora čime su izbjegnute neke negativne strane transfekcije, a sintetizirane su i razne molekule koje su obilježene fluorescentnim proteinom poput GFP-obilježenog PSD-95 proteina (146) kako bi se specifičnije obilježili dijelovi neurona. Maiti i sur. (134) smatraju da su lipofilne fluorescentne boje, unatoč postojanju brojnih i specifičnih fluorescentnih proteina, bolje za označavanje individualnih neurona i analizu morfologije njihovih dendritičkih trnova.

Osim toga, fluorescencijska mikroskopija se može koristiti za prikaz morfologije i dinamike dendritičkih trnova i u sklopu tehnike imunooznačavanja stanica ili tkiva (eng. *immunolabeling*). U imunohistokemijskim i imunocitokemijskim is-

traživanjima koriste se fluorescentne probe za obilježavanje specifičnih protutijela na proteine samih trnova poput PSD-95, a zatim se takve probe detektiraju i prati se količina i raspored vezanja protutijela za svoje ciljne proteine. Međutim, Mancuso i sur. (142) navode da je ova metoda veoma neuspješna zbog loše penetracije protutijela u sami uzorak.

Kod svih metoda prikaza dendritičkih trnova fluorescentnim markerima također postoji rezolucijsko ograničenje zbog korištenja vidljive svjetlosti, a slika koja se dobiva je dvodimenzionalna pa se ne mogu izvršiti prikladna morfometrijska mjerenja 3D veličina (20,142). Međutim, mogu se kao i kod Golgi-Cox metode primijeniti razne semiautomatske i automatske metode za 3D rekonstrukciju i analizu trnova kako bi se dobile morfometrijske vrijednosti prikazanih trnova (142).

7.3 Elektronska mikroskopija

Elektronski mikroskop koristi zraku akceleriranih elektrona kao sredstvo osvjetljavanja uzorka. Korištenje elektrona umjesto fotona je glavna prednost elektronske mikroskopije jer omogućava izrazito visoku prostornu rezoluciju zbog činjenice da je valna duljina elektrona i do 100 000 puta kraća od valne duljine fotona vidljive svjetlosti čime se znatno umanjuju difrakcijska ograničenja mikroskopa koja postoje u

svjetlosnoj mikroskopiji. Osim visoke rezolucije od <1 nm, pruža izrazito veliko uvećanje te je omogućava uvid u veću dubinu analiziranog polja. S druge strane, ograničenja EM su nemogućnost prikaza nefiksiranoga tkiva, potreba za izradom izrazito tankoga preparata zbog male penetrantnosti elektrona, mala veličina uzorka, visoka cijena, izrazita zahtjevnost korištenja te osjetljivost opreme na vanjske utjecaje (147).

Početak uporabe EM za proučavanje dendritičkih trnova napravio je revoluciju u istraživanjima morfologije trnova. Rezolucijski skok koji je nastao osigurao je elektronskoj mikroskopiji dominaciju u preciznoj morfološkoj analizi dendritičkih trnova jer je takvo uvećanje pružalo jednostavna morfometrijska mjerenja za razliku od prethodnih metoda svjetlosne mikroskopije, a takva dominacija djelomično postoji i danas. Osim toga, EM je omogućio uvid u ultrastrukturne elemente dendritičkih trnova koji su se do tada samo nazirali pod svjetlosnim mikroskopom kao što su PSD, aktinski citoskelet, ABP i drugi proteini (11,134,142). Posebnom metodom zamrzavanja i slamanja tkiva (eng. *freeze-fracture technique*) postalo je moguće i detaljno analizirati strukturu membranskih proteina i njihove odnose (148). Takva supcelularna rezolucija EM postavlja optimalne mogućnosti za proučavanje strukture trnova i njihovih elemenata, ali zbog potrebe za prethodnim fiksiranjem tkiva nije moguće dobiti uvid u *in vitro* ili *in vivo* dinamične promjene neurona i njihovih dendritičkih

trnova. Naime, kako navode Berry i Nedivi (11), elektronskom mikroskopijom nije moguće razlikovati privremene od perzistentnih dinamičkih klasa trnova jer je u statičkom EM prikazu moguće isključivo utvrditi morfološku zrelost sinaptičkih struktura, ali ne i njihove promjene, niti prisutnost važnih markera održanja sinapse poput PSD-95 ili stabilnih AMPA receptora. Iz toga se može zaključiti da je EM izrazito dobra metoda za 2D i 3D morfometriju dendritičkih trnova u fiksnim razmacima, ali nije moguće kontinuirano pratiti morfometrijske promjene trnova u sklopu njihove dinamike jer se EM-om ne mogu proučavati žive stanice pa zbog navedenoga ograničenja, istraživanja koja se fokusiraju na dinamičke promjene dendritičkih trnova koriste metode poput konfokalne mikroskopije ili multifotonske mikroskopije (134).

TEM je, kao elektronski pandan klasičnoj svjetlosnoj mikroskopiji, prva pružila informacije o morfometrijskim veličinama trnova koje se svjetlosnom mikroskopijom nije moglo razaznati poput širine vrata ili promjera glave, ali i omogućio bolje morfološke razlikovanje sličnih kategorija trnova poput tankih trnova i filopodija. Također se pomoću TEM može na razini jednoga neurona odrediti broj postsinaptičkih krajeva sinapsi, a prema čemu se može odrediti broj i gustoća dendritičkih trnova bez obzira na morfologiju i veličinu. Takav pristup nije moguć u svjetlosnoj mikroskopiji jer rezolucija ograničava razlikovanje manjih trnova od njihovih

dendritičkih osnovica, a često dolazi i do preklapanja trnova i previda trnova položenih u z-osi (137,154).

Na temelju EM slike moguće je izvršiti i 3D rekonstrukciju trnova. ssEM je tehnika koja koristi serijske presjeke kroz proučavani uzorak tanje od 100 nm te tako služi kao podloga za 3D rekonstrukciju dendritičkih trnova, cijelih neurona, lokalnih neuralnih krugova (151) ili čak cijeloga konektoma SŽS-a (152). Osim toga, Kuwajima i sur. (150) navode da se može koristiti za bolje shvaćanje utjecaja učenja i pamćenja na strukturu sinapse te za promjene sinapsi u patološkim stanjima. ssEM se može koristiti na temelju TEM, SEM ili STEM metode elektronske mikroskopije. Danas se najčešće koriste FIB-SEM ili SBF-SEM tehnike kojima se dobivaju izrazito tanki presjeci pa je rezolucija dobivenih slika u z-osi jako velika i ne dolazi do previda struktura zbog debljine presjeka te je stoga moguće izvršiti vjernu rekonstrukciju vizualiziranih objekata. Najveća mana im je što uništavaju prethodno zabilježen sloj tkiva kako bi bila moguća vizualizacija novoga presjeka pa nisu mogući naknadni pregledi ili obrade tkiva nakon što su primijenjene (150). Uz to, 3D rekonstrukcija dendritičkih trnova iz ssEM tehnike je naporan i vremenski zahtjevan posao ukoliko se koriste semiautomatske metode morfometrijske analize dobivenih serijskih presjeka pa se nastoje uvesti nove automatske metode obrade kako bi se proces ubrzao i pojednostavio (153).

7.4 Konfokalna mikroskopija

Konfokalna mikroskopija je optička slikovna metoda koja povećava rezoluciju i kontrast dobivene slike uzorka na način da osvjetljava samo mali dio uzorka i sprječava prolazak svjetlosti koja ne dolazi iz promatranoga fokusa do razine oka tj. detektora pomoću uske rupice (eng. *pinhole*). Kao i klasična fluorescencijska mikroskopija, djeluje na principu detekcije fluorescentnoga signala iz uzorka nakon osvjetljavanja svjetlošću karakteristične valne duljine. Najčešće korišten oblik konfokalne mikroskopije se naziva konfokalnom laserskom skenirajućom mikroskopijom (CLSM) jer koristi laser za "skeniranje" cijele površine uzorka da bi se dobila 2D slika jednoga sloja uzorka, a promjenom dubine fokusa moguće je zabilježiti serijske 2D slike uzorka u velikome broju dubinskih slojeva (tzv. *z-stack*). Dobivanjem serijskih 2D slika i korištenjem suvremenih softverskih alata zatim je moguće izvršiti potpunu 3D rekonstrukciju promatranoga tkiva čime se ova metoda značajno razlikuje od klasične svjetlosne ili fluorescencijske mikroskopije (154). Naime, kod tih metoda dolazi do superpozicije svjetlosti koja dolazi iz svih dubinskih slojeva tkiva što uzrokuje zamućenje i lošu kvalitetu dobivene slike te ne omogućava uvid u volumne karakteristike proučavanoga tkiva. Upravo su kontrola nad dubinom fokusa, blokiranje

svjetlosti koja ne dolazi iz promatranoga fokusa, mogućnost zabilježavanja serijskih optičkih slika te relativno visoka rezolucija u z-osi one karakteristike CLSM koje joj omogućavaju dobivanje trodimenzionalnih mjera tkiva (134,135).

CLSM se najčešće koristi za istraživanja koja povezuju strukturu i funkciju trnova, a kombiniranjem s novim metodama fluorescentnoga obilježavanja neurona može se jasnije istraživati upravo funkcijski, dinamični aspekt samih trnova (142). Primjerice, Vecellio i sur. (155) te Wallace i Bear (156) su koristili fluorescentne boje primijenjene intracelularnom injekcijom u kombinaciji s CLSM kako bi dobili 3D rekonstrukcije neurona i dendritičkih trnova u visokoj rezoluciji, a Couch i sur. (157) su koristili fluorescentne markere bazirane na bioenzimima zajedno s CLSM i softverskim alatom za morfometrijsku analizu dendritičkih trnova.

Nadalje, danas se CLSM metoda pomaknula od prethodno korištenoga standarda detekcije isključivo fluorescentnoga signala. Naime, smatralo se da se korištenje *pinhole* tehnike u konfokalnoj mikroskopiji može koristiti isključivo s fluorescentnim biljezima (154). Međutim, Spiga i sur. (158) su koristili istovremeno metodu imunofluorescencije i Golgi-Cox tehniku na tkivu uz konfokalni mikroskop kako bi iskoristili prednosti svake metode. Golgi-Cox impregnacija je omogućila izvrstan prikaz strukture neurona, imunofluorescencijsko obilježavanje dobru biokemijsku specifičnost prema ciljnim antigenima, a

konfokalna mikroskopija mogućnost 3D rekonstrukcije i visoku rezoluciju. Takav postupak je pružio veću specijalnu rezoluciju u z-osi, pa su poboljšane i detekcija trnova i morfometrijske mogućnosti. Zbog toga autori istraživanja smatraju da je njihova tehnika obilježavanja tkiva veoma moćan alat za buduća istraživanja SŽS-a, osobito uz korištenje konfokalne mikroskopije jer istovremeno omogućava 3D uvid i u morfološke i u biokemijske elemente trnova.

Glavni nedostaci CLSM su slaba penetrantnost korištenoga lasera ($<50 \mu\text{m}$), malo vidno polje, izražen *photobleaching* te izrazito velika zahtjevnost manualnih i semiautomatskih metoda kvantitativne morfometrijske analize slike dobivene ovom metodom često uz velik broj procesnih grešaka (134). Zbog toga su danas istraživanja usmjerena na pronalaženje dobre metode za automatsku morfološku analizu dendritičkih trnova kako bi se proces analize dobivene slike ubrzao i poboljšao te smanjio broj pogrešaka nastalih zbog humanog faktora, kao i kod ssEM (134,159–162).

7.5 Dvofotonska i multifotonska mikroskopija

Otkriće fluorescentnih boja i raznih načina unosa fluorescentnih proteina u neurone uz korištenje klasične fluorescencijske ili konfokalne mikroskopije omogućilo je detaljan uvid u morfologiju i dinamiku trnova, ali su sva istraživanja

ipak bila ograničena na stanice iz post-mortalnih ili *in vitro* uzoraka. Međutim, otkrićem dvofotonske i multifotonske mikroskopije konačno su mogla biti započeta prava *in vivo* istraživanja morfologije i dinamičkih promjena dendritičkih trnova jer je ta tehnika omogućila vizualizaciju neurona i njihovih strukturnih elemenata u svim slojevima korteksa kao i u dubljim dijelovima SŽS-a *in vivo* (11,20,163).

TPM koristi efekt simultane ekscitacije fluorofora dvama fotonima čime dolazi do emisije fluorescentnoga signala te ga kombinira s laserskom skenirajućom mikroskopijom koja se koristi i kod konfokalne mikroskopije u obliku CLSM. Simultana ekscitacija fluorescentnoga markera dvama fotonima ostvaruje se ultrabrzim pulsirajućim laserom na način da pri pulsevima trajanja ~ 100 fs i frekvencije ~ 80 MHz dolazi do povećane šanse za apsorpciju dvaju fotona u isto vrijeme, a čime dolazi do povećanja unutarnje energije s posljedičnom ekscitacijom i fluorescencijom (163). MPM djeluje na jednak način samo koristi drugačije parametre ultrabrzih lasera za simultanu ekscitaciju fluorofora većim brojem fotona.

Nadalje, kombinacija fluorescentnih markera i TPM/MPM omogućila je prikaz stanica i tkiva koja se nalaze duboko ispod površinskoga sloja stanica (20) što je našlo izvrsnu primjenu u istraživanjima neurona i dendritičkih trnova *in situ* kod žive eksperimentalne životinje (16,22,100), ali je također bila i komplementarna metoda CLSM i EM za istraži-

vanja trnova u fiksiranome tkivu ili u *in vitro* kulturama (164). S obzirom na veliku sličnost CLSM i TPM/MPM metoda važno je istaknuti da je najznačajnija razlika činjenica da TPM/MPM koristi dva fotona iz infracrvenoga dijela spektra što ekscitira fluorofore, ali uz ograničen volumen tkiva koji je ekscitiran do razine emisije fluorescentnoga signala čime su smanjeni fototoksični učinci vizualizacije na fluorofore (163), a tako se osigurava dovoljno jak fluorescentni signal. Osim toga, korištenje infracrvene svjetlosti smanjuje raspršenje čime se omogućava bolja penetrantnost kod istraživanja neurona *in vivo* (165).

Zapravo, prije korištenja TPM/MPM za vizualizaciju neurona *in situ* najveći problemi za prikaz stanica SŽS-a *in vivo* su bili niska penetrantnost dostupnih optičkih i elektronskih metoda, gubitak fluorescentnog signala zbog destrukcije fluorofora osvjetljavanjem, a također i opacitet koji stvara intaktna lubanja (142). Stoga se *in vivo* vizualizacija trnova u TPM/MPM postiže kombiniranjem prisutnosti fluorescentnih proteina poput GFP ili YFP u neuronima tj. korištenjem transfekcije, transgениčnih životinja ili virusnih vektora i postupaka približavanja optičkog sustava TPM/MPM površini mozga stanjivanjem lubanje, stvaranjem kraniotomijskog prozora ili korištenjem mikroendoskopske kamere (20,166). Od navedenih postupaka, stanjivanje lubanje se smatra najlošijim jer dolazi do proporcionalnoga gubitka kvalitete dobivene slike s dubinom na kojoj se nalaze proučavani neuroni

(166,167). Metode uklanjanja opaciteta lubanje kod ranije korištenih metoda nisu omogućile prikaz neurona ispod površinskoga sloja upravo zbog svoje niske penetrantnosti jer npr. CLSM koristi vidljivu ili ultraljubičastu svjetlost, a to ograničenje je uklonjeno kod TPM/MPM upravo zbog korištenja infracrvene svjetlosti koja se ne raspršuje u tolikoj mjeri u moždanome tkivu (167,168). Također, niska razina *photobleachinga* osigurava dostatan fluorescentni signal za dobivanje slike bez gubitka emisije iz velikoga broja fluorofora u tkivu kao što je to slučaj kod CLSM i klasične fluorescencijske mikroskopije. Tome je tako jer, kako navode Oheim i sur. (169), TPM/MPM koristi laserske pulseve koji fokusiraju usku i specifičnu točku od interesa u tkivu u jednome sloju te tako ograničavaju toksične učinke osvjetljavanja na maleno područje samo u proučavanome sloju.

Važno je za istaknuti da je TPM/MPM metoda prikazivanja dendritičkih trnova u živućih eksperimentalnih životinja koja omogućava prikaz intaktnih neurona, a može se kombinirati i s elektrofiziološkim i drugim metodama kojima se ispituju funkcionalni aspekti trnova poput tehnike farmakološkog oslobađanja neurotransmitora što je zapravo revolucionariziralo istraživanja dendritičkih trnova (142). Tako su primjerice, kombiniranjem TPM i funkcionalnih metoda istraživanja trnova, Matsuzaki i sur. (64) pokazali da je veličina pojedinačnoga trna proporcionalna snazi njegove ekscitatorne

sinapse, a Yasumatsu i sur. (168) otkrili da trnovi mijenjaju svoju veličinu čak i kod odsutnosti signalizacije u pripadajućoj sinapsi. Slijedom toga, korištenjem TPM/MPM dobiva se uvid u najvažniji aspekt dendritičkih trnova – dinamičke promjene u odgovoru na sinaptičku aktivnost, vanjske stimuluse ili u sklopu procesa učenja i pamćenja (20,64).

Premda TPM/MPM ne pruža veću 3D rezoluciju od CLSM, pruža uvid u intaktne *in vivo* neurone u dubini tkiva, a CLSM je isključivo metoda visoke rezolucije za dobivanje 3D slike tkiva u tankome površinskom sloju (163). Također, moguće je kombiniranje tehnike dvofo- tonske ekscitacije s *pinhole* tehnikom konfokalne mikroskopije za povećanje rezolucije dobivene slike u sve 3 osi (163). Zbog toga je TPM/MPM dobra metoda za istraživanja 3D morfologije i morfoloških promjena trnova u *in vitro* kulturama te fiksiranome moždanom tkivu te je trenutačno najraširenija metoda za istu vrstu istraživanja den- dritičkih trnova *in vivo* zbog mogućnosti prikaza intaktnih *in situ* neurona SŽS-a u visokoj rezoluciji uz mogućnost kombini- ranja s funkcionalnim ispitivanjima neu- rona, a što bi primjerice bilo važno u is- traživanjima patoloških procesa vezanih uz neurodegenerativne bolesti i dendri- tičke trnove u hipokampusu. Ipak, velik broj dubokih regija mozga nedostupan je za *in vivo* vizualizaciju čak i korištenjem TPM/MPM jer visoka rezolucija značajno pada nakon 1-2 mm debiljine tkiva pa je potrebno razviti nove metode za prikaz takvih regija, a kao najbolji primjer ističe

se upravo hipokampus.

7.6 Ostale suvremene metode mikroskopije visoke rezolucije

Osnovno ograničenje svih prethodno navedenih metoda vizualizacije temeljenih na vidljivoj svjetlosti jesu difrakcijska ograničenja koja se opisuju Abbeovim difrakcijskim limitom za mikroskop (170) prema sljedećoj formuli:

$$d = \frac{\lambda}{2NA}$$

gdje d označava rezoluciju, λ valnu duljinu upadne svjetlosti, a NA numeri- čku aperturu mikroskopa koja iznosi 1.4–1.6 u suvremenoj optici. Iz nave- dene formule vidljivo je da je valna duljina svjetlosti ona koja ograničava re- zolucijski doseg vizualizacijske metode, a s obzirom da je valna duljina svjet- losti iz infracrvenog, vidljivog i ultralju- bičastog dijela elektromagnetnog spek- tra relativno velika za stanične pojmove, onda su i pripadajuće metode svjetlosne mikroskopije neadekvatne za dobivanje prikaza visoke rezolucije.

Kako bi se nadišla ograničenja svih opisanih metoda vizualizacije neurona i dendritičkih trnova osmišljene su nove metode koje se danas primjenjuju kako bi se trnovi mogli prikazati *in vivo* u vi- sokoju rezoluciji bez obzira na lokalizaciju u SŽS-u, a zbog prikaza stanica u nanometarskoj rezoluciji nazivaju se i

metodama nanoskopije (134,142).

7.6.1 STED mikroskopija

STED mikroskopija je suvremena metoda mikroskopije izrazito visoke rezolucije koja je razvijena upravo s ciljem zaobilazanja difrakcijskog ograničenja svih oblika svjetlosne mikroskopije radi povećanja rezolucije dobivene slike. Razvili su je Stefan W. Hell i Jan Wichmann 1994. godine, a Hell je dobio i Nobelovu nagradu za kemiju 2014. godine za razvoj te tehnike (171).

Slike visoke rezolucije nastaju na način da dolazi do selektivne deaktivacije fluoroformata u tkivu i minimiziranja područja osvjetljenja u točki fokusa. Zapravo, koriste se slični principi za stvaranje slike kao kod CLSM, ali dobivena slika je puno veće rezolucije nego ona dobivena ili CLSM ili TPM/MPM metodama (172). STED mikroskop vrši detekciju signala iz izrazito maloga područja gdje stimulira emisiju iz fluoroformata, a okolne signale anulira kako bi dobio povećao rezoluciju u točki fokusa. To čini na način da koristi dva sinkronizirana laserska pulsa gdje jedan puls stimulira emisiju u fokusu, a drugi, deplecijski kružni puls inhibira sve fluoroformate iz okoline koji bi mogli biti ekscitirani i emitirati fluorescentne signale, a zatim jednofotonski detektor zabilježi središnji emitirani signal i tako stvara sliku (134).

Na taj način dolazi do sljedeće modifikacije Abbeove formule:

$$d = \frac{\lambda}{2NA\sqrt{1+\sigma}}$$

gdje σ označava saturacijski faktor koji je omjer maksimalnog intenziteta STED lasera i saturacijskog intenziteta tj. $\sigma = I_{max}/I_{sat}$. Na taj način porastom saturacijskog faktora dolazi do smanjenja vrijednosti d što označava da se mogu međusobno razlučiti točke koje su na manjoj udaljenosti (173).

Ovom metodom moguće je detaljno izvršiti morfometrijska mjerenja trnova *in vivo* u dubini tkiva, a moguće je zabilježiti i supcelularne strukture i molekule unutar dendritičkih trnova. Osim toga, ova metoda zbog svoje rezolucije pruža izrazito detaljne 3D prikaze trnova pa su tako Nägerl i sur. (174) postigli rezoluciju od ~60 nm pri istraživanju aktinskoga citoskeleta u trnovima. Zbog takve razine detalja i kvalitete slike danas je moguće korištenjem STED mikroskopije pratiti dinamiku i glave i vrata trnova, a moguće je i razlikovanje svih morfoloških oblika trnova međusobno i od dendritičke osnovice. Zbog toga se može istaknuti da je u posljednjih 30 godina, od razvoja modernih fluorescentnih tehnika pa do danas, došlo do izrazito velikoga pomaka u mogućnostima karakterizacije i praćenja dendritičkih trnova i u morfološkom i u funkcionalnom aspektu (134). Zapravo, jedini nedostatak ovakve tehnike je izrazito visoka cijena aparature i pratećega softvera za analizu dobivenih slika, ali je moguće i fotooštećenje uzorka zbog korištenja laserskih pulseva visokoga intenziteta (174).

Nadalje, Mancuso i sur. (175) navode da su Bethge i sur. (176) razvili metodu

mikroskopije koja kombinira dvofoton-sku mikroskopiju sa STED mikroskopijom te tako dobili sliku na svjetlosnom mikroskopu nanometarske rezolucije zaobišavši difrakcijsku barijeru. Osim toga navode da takav pristup otvara brojne mogućnosti istraživanja dendritičkih trnova *in vivo* jer je moguće dobiti gotovo rezoluciju elektronskog mikroskopa, ali u neuralnome tkivu *in situ* što je prethodno bilo nezamislivo. Također, Bethge i sur. (176) navode da nova metoda mikroskopije unaprjeđuje lateralnu prostornu rezoluciju TPM za 4-6 puta te je kompatibilna s promatranjem tkiva u realnome vremenu (eng. *time-lapse imaging*) te prikazom tkiva *in vivo* u dvije boje u visokoj rezoluciji (eng. *two-colour superresolution imaging in living cells*) kako na površini moždanih rezova, tako i u njihovoj dubini. Detaljnije istu metodu opisuju i Loew i Hell u svome članku (177) te navode da je potrebno razviti metodu trodimenzionalne deplecije ekscitiranih fluorofora za dobivanje boljeg prikaza te da optičke distorzije koje nastaju zbog deplecijskog signala u vidljivom dijelu spektra bi se mogle kompenzirati prilagodljivim optičkim alatima. Također, nije se pokazalo da se ovakvom metodom može poboljšati aksijalna rezolucija u z-osi što je važno za rekonstrukciju trnova koji se protežu u z-osi, ali i općenito za svaki oblik dobre 3D rekonstrukcije (178).

Metode slične STED mikroskopiji koje su kasnije razvijene poput RESOLFT, SIM i NL-SIM na relativno sličan način, ali koristeći drugačije načine deplecije i izo-

lacije centralnog signala, dobivaju konačnu sliku (134).

Kako bi potpuno iskoristili kompatibilnost svih metoda, Tønnesen i sur. (111) su koristili STED mikroskopiju u realnome vremenu u kombinaciji s metodom oporavka fluorescencije nakon *photo-bleachinga*, dvofotonskim oslobađanjem glutamata, elektrofiziološkim ispitivanjima te simulacijama kako bi utvrdili dinamičku povezanost strukture trnova u nanorezoluciji s njihovom kompartmentalizacijskom ulogom u *in vivo* neuronima CA1 područja hipokampusa u mišjim rezovima mozga. Na taj način dobili su anatomske prikaze visoke rezolucije koji je omogućavao uvid i u strukturu i u ultrastrukturu dendritičkih trnova, a što su zatim mogli povezati s dinamičkim funkcionalnim procesima unutar trnova. Na taj način su utvrdili da postoji veza između kompartmentalizacije u trnovima i njihove morfologije, a morfometrijske vrijednosti vrata trnova su se, logično, pokazale kao najvažniji parametar za postojanje semiizoliranog mikroodjeljka. Osim toga, zbog prikaza u visokoj rezoluciji, mogli su utvrditi dinamičke promjene na razini širine vrata trnova u odgovoru na LTP, a što prethodno nije bilo moguće zbog difrakcijskih ograničenja ostalih metoda koje koriste vidljivu svjetlost te zbog potrebe fiksacije tkiva kod elektronske mikroskopije.

7.6.2 SMLM mikroskopija

Adrian i sur. (178) te Huang i sur. (179,180) opisuju u svojim člancima i metode koje koriste tehnike utvrđivanja pozicije pojedinačnih fluorofora koji emitiraju signal u isto vrijeme, a točnost je na razini od 1-10 nm. Ponavljanjem postupka velik broj puta za različite fluorofofe dobiva se kompletna slika visoke rezolucije njihovoga rasporeda u tkivu temeljena na izrazito preciznome određivanju njihove pozicije. Takve tehnike nazivaju se zajedničkim imenom SMLM mikroskopijom, a nisu usmjerene kao STED mikroskopija na samu konstrukciju i funkcije mikroskopskog uređaja, već ovise o specifičnim svojstvima fluorofofa koji se različitim postupcima odvojeno detektiraju kako bi se dobila visoka rezolucija slike. Također, Adrian i sur. (178) navode da se korištenje ovih metoda preferira u fiksiranim uzorcima zbog potrebe za dugotrajnim repetitivnim oslikavanjem uzorka za dobivanje konačne slike premda je moguće i *in vivo* korištenje, ali je tada potrebno kompenzirati prostornu rezoluciju temporalnom rezolucijom te je stoga važno odrediti što je bitnije za cilj pojedinoga istraživanja. Varijante koje čine SMLM mikroskopiju su mikroskopija stohastičke optičke rekonstrukcije (STORM), mikroskopija fotoaktivacijske lokalizacije (PALM), mikroskopija fluorescentne fotoaktivacijske lokalizacije (FPALM) i topografija nakupljanjem točaka za prikaz u nanorezoluciji (PAINT). Svaka od tih metoda se na neki način razlikuje, ali svima je

zajedničko precizno određivanje pozicije fluorofora na temelju čega nastaje konačna slika. Primjerice, STORM i PALM tehnike funkcioniraju na principu uključivanja i isključivanja aktivnosti pojedinoga fluorofora s lateralnom rezolucijom od ~20 nm i aksijalnom rezolucijom od ~50 nm. Maiti i sur. (134) navode da su te metode u početku bile relativno spore i dugotrajne za dobivanje konačne slike, ali je razvojem novih fluorofora i softvera za obradu slike donekle došlo do ubrzavanja istih pa se mogu koristiti i *in vivo*. Osim toga, mogu se koristiti i protein-specifični fluorescentni markeri za utvrđivanje lokalizacije proteina od interesa (181) ili čak i pratiti dinamika proteina od interesa (182,183).

Sigal i sur. (184) ističu da ove metode, kao ni STED, RESOLFT i SIM, nemaju teoretski limit rezolucije premda on postoji ovisno o ekscitacijskim i detekcijskim pristupima tehnike, kao i svojstvima fluorescentnih proba te gustoći njihovog rasporeda u tkivu. Navode da je korištenjem interferometrije uz STORM ili PALM tehniku (185) moguće postići aksijalnu rezoluciju <10 nm što je mnogo veća rezolucija od CLSM ili TPM/MPM, ali i drugih sličnih metoda izrazito visoke rezolucije. Osim toga, zbog visoke 3D rezolucije SMLM mikroskopije na temelju tih metoda također je moguće i izvršiti 3D rekonstrukciju tkiva s izrazito dobrim prikazom dendritičkih trnova visoke vjerodostojnosti (179,184).

Glavni nedostaci ovih metoda su potreba za repetitivnim oslikavanjem čime dolazi do *photobleaching*-a te fo-

tooštećenja tkiva, a i u konačnici zahtijevaju dulje vrijeme za dobivanje slike što im ne ide u korist kod *in vivo* oslikavanja trnova (179,180,184).

7.6.3 MINIFLUX mikroskopija

Balzarotti i sur. (186) su razvili i opisali novu metodu prikazivanja fluorescentno obilježenoga tkiva u visokoj rezoluciji koja koristi elemente i SMLM i STED mikroskopije. Naime, MINIFLUX metoda koristi stohastičko uključivanje i isključivanje pojedinih fluorofora poput STORM i PALM tehnika, ali istovremeno i selektivnu indukciju fluorescentne emisije posebnim načinima osvjetljavanja tkiva poput STED mikroskopije. Navode da su tom metodom postigli lokaliziranje individualnih molekula izrazito visokom preciznošću s rezolucijom od samo ~6 nm, a da su temporalnu rezoluciju povećali i do 100x u odnosu na STED mikroskopiju. Na taj način postignuta je gotovo maksimalna rezolucija suvremenih elektronskih mikroskopa, ali bez potrebe za proučavanjem isključivo fiksiranoga tkiva u izrazito tankim presjecima što je nužan preduvjet za vizualizaciju EM-om. Zbog toga smatraju da će ovakva tehnika svojim daljnjim razvojem omogućiti proučavanje strukture, distribucije i dinamike ciljanih makromolekula u realnome vremenu *in vivo* što statičkim prikazima stanica elektronskom mikroskopijom do sada nije bilo moguće.

7.6.4 Ekspanzijska mikroskopija

ExM (187) je metoda koja se potpuno razlikuje od ostalih metoda nanoskopije. Naime, njome se slike visoke rezolucije ne dobivaju razvojem novih metoda mikroskopije ili označavanja tkiva, već se nastoji alterirati fiziološko stanje tkiva njegovim fizičkim uvećanjem tako da isto postane dostupno vizualizaciji klasičnim metodama mikroskopije, ali u puno većoj rezoluciji. Na taj način se ne zaobilazi difrakcijsko ograničenje svjetlosne mikroskopije, već se dobiva skaliran prikaz tkiva unutar istih ograničenja.

Metoda koristi uklapanje uzorka u polimerni gel koji sadrži kovalentno vezane fluorescentne probe rezistentne na proteolizu, a nakon što probe obilježe stanične elemente uzorak se podliježe razgradnji proteazama pa u gelu preostaju samo one probe koje su obilježile stanice. Nakon toga se polimer podliježe bubrenju radi fizičke ekspanzije kako bi došlo do prostornoga razdvajanja proba u 3 dimenzije čime nastaje uvećana slika uklopljenog uzorka pri korištenju klasičnih metoda fluorescentne mikroskopije.

Chen i sur. (187) su tim postupkom postigli lateralnu rezoluciju od ~70 nm i u staničnim kulturama neurona i u moždanim rezovima koristeći konfokalnu mikroskopiju, prividno zaobiljevši Abbeovo ograničenje svjetlosne mikroskopije. Osim toga, izvršili su usporedbu morfometrijskih mjerenja membranskih struktura SIM nanoskopskom

metodom prije ekspanzije s mjerenjima istih struktura konfokalnom mikroskopijom poslije ekspanzije i utvrdili da su dobivene slike opisno veoma slične, a kvantitativno su pogreške mjerenja iznosile ~1%.

7.6.5 Krioelektronska tomografija

Nova tehnika koja koristi EM za tomografski 3D prikaz ultrastrukture stanica naziva se krioelektronska tomografija. S obzirom da koristi elektronsku mikroskopiju za vizualizaciju tkiva onda se znatno razlikuje od preostalih navedenih metoda mikroskopije visoke rezolucije, ali je također novija metoda koja u visokoj rezoluciji može prikazati molekularnu organizaciju stanica u nativnome stanju. Harapin i sur. (188) navode da se cryo-ET danas dominantno koristi za povezivanje funkcije neurona i njihovoga supcelularnog ustrojstva.

Prednost ove tehnike je gotovo potpuno zadržavanje originalne strukture stanice s očuvanjem krhkih staničnih struktura podložnih degradaciji kod manipulacije koja se provodi pri korištenju drugih tehnika vizualizacije. Tehnika se sastoji od zamrzavanja uzoraka te oslikavanja koristeći EM, a uzorak se pri vizualizaciji rotira za 140° i bilježe se serijske 2D slike (eng. *tilt-series*). Softverskim alatom se zatim pomoću raznovrsnih algoritama vrši spajanje takvih 2D prikaza u jedinstveni 3D tomogram u nanometarskoj rezoluciji

(175,188).

Kvaliteta dobivenoga tomograma ovisi o ukupnome broju 2D slika kojima se vrši rekonstrukcija, a važan nedostatak je gubitak dijela uzorka koji se nalazi izvan raspona od 140°. Taj nedostatak se može smanjiti oslikavanjem tkiva na jednak način iz dvije međusobno okomite projekcije, ali velik problem predstavlja poravnavanje okomitih prikaza za dobru 3D rekonstrukciju.

7.6.6 Fiberoptička endomikroskopija

Velik problem svih tehnika mikroskopije visoke rezolucije (nanoskopije), ali i fluorescencijske mikroskopije općenito je nemogućnost vizualizacije neurona i dendritičkih trnova kod eksperimentalnih životinja dok se slobodno kreću zbog kompleksnosti aparature i optičkoga sustava koji zahtijevaju relativnu statičnost proučavanoga uzorka. Takve tehnike se mogu primijeniti *in vivo* u sediranih životinja za praćenje dinamičkih promjena morfologije, ali na taj način se ne mogu pratiti morfološke promjene koje se odvijaju u trnovima dok životinja aktivno interagira s okolišem u kojemu se nalazi (134,189). Razvoj tehnologije omogućio je stvaranje mini-jaturnih fluorescentnih mikroskopa koji se mogu uporabiti kao endoskopi, a na taj način se mogu koristiti za prikazivanje mikrostruktura SŽS-a i u sediranih i u slobodno krećućih životinja bez obzira na regiju mozga (189).

Ovaj maleni optički uređaj se primjen-

juje na način da se postavlja u lubanjsku šupljinu s pregledom nad područjem od interesa, a sastoji se od optičkih vlakana koja omogućavaju osvjetljenje u dubokim strukturama mozga, mikroleća te mikroskenera koji omogućavaju brzu analizu ulaznih signala. Takva tehnika ima izrazito velik kontrast i široko vidno polje pa se uspješno primjenjuje za *in situ* pregled prethodno fluorescentno obilježenih dendritičkih trnova, a utjecaj *photobleaching*-a je znatno manji nego u drugim metodama fluorescencijske mikroskopije. Također, fiberoptički endomikroskopi su jednostavni za korištenje, lako prenosivi i mnogo jeftiniji od metoda visoke rezolucije poput STED i STORM mikroskopije. Osim toga, fiberoptička mikroskopija omogućava i 3D rekonstrukciju trnova na temelju dobivenih slika. Međutim, s obzirom na to da je bazirana na metodama jednofotonske ili dvofotonske ekscitacije fluorescentnog signala poput TPM, prisutno je ograničenje rezolucije u smislu Abbeovoga difrakcijskog limita pa su maksimalna lateralna i aksijalna rezolucija veće od $1 \mu\text{m}$ što je nedostavno za prikaz ultrastrukture trnova. Bez obzira na navedeno, fiberoptička mikroskopija je trenutačno jedina tehnika koja omogućava potpuni nadzor nad aktivnim dinamičkim promjenama dendritičkih trnova u eksperimentalnih životinja koje nisu sedirane (189–194).

Barretto i sur. (194) su, koristeći jednofotonsku i dvofotonsku ekscitacijsku fiberoptičku endomikroskopiju, ti-

jekom više tjedana pratili promjene dendrita piramidnih neurona CA1 regije hipokampusa u realnome vremenu kod odraslih miševa koji su se slobodno kretali. Utvrdili su da su praćeni dendriti izrazito stabilni i veoma rijetko podložni strukturnim promjenama. Također su u dubokim regijama mozga pratili i gliomske neoplastične mase te vizualizirali tumorsku vaskulaturu s 3D rekonstrukcijom neovaskularizacije. Slijedom svojih istraživanja smatraju da će se endomikroskopski pristup moći primjenjivati u velikome broju daljnjih istraživanja neurovaskularnih, neuroloških, tumorskih i posttraumatskih stanja.

Za detaljniji pregled i objašnjenje načina rada suvremenih metoda visoke rezolucije koje su izrazito perspektivne u području *in vivo* praćenja morfoloških promjena i dinamike dendritičkih trnova čitatelja se upućuje na članke Eggeling i sur. (195), Sahl i sur. (196) te Heintzmann i Gustafssona (197).

8. Metode kvantitativne morfometrije i trodimenzionalne analize dendritičkih trnova

Analiza dobivenih prikaza dendritičkih trnova bilo kojom vizualizacijskom metodom pokazala se kao najveća prepreka u njihovome istraživanju. Štoviše, upravo su se suvremene metode visoke rezolucije s mogućnošću 3D rekonstrukcije pokazale najizazovnijima za analizu jer je količina dobivenih kvantitativnih podataka izrazito velika pa je snalaženje u tolikoj količini informacija teško. Naime, prikaz visoke rezolucije omogućava precizna mjerenja tipičnih morfometrijskih varijabli trnova poput promjera glave, širine vrata, duljine vrata i sl., ali je broj korištenih vizualizacijskih metoda s različitim rezolucijskim limitima relativno velik pa takvi rezultati međusobno nisu potpuno usporedivi, a dobivene vrijednosti se ne mogu jasno interpretirati. Zapravo, interpretacija takvih podataka je trenutačno veoma slobodna jer ne postoji konkluzivno mišljenje o tome koja je najbolja vrsta analize za pojedinu metodu prikaza (134,142,175). Nadalje, potrebno je istaknuti da je istraživanje neurona i njihovih strukturnih elemenata izrazito mukotrpan proces upravo zbog njihove brojnosti. Naime, i za istraživanje samo pojedinih neuralnih krugova potrebno je izvršiti vizualizaciju i morfometrijsku analizu desetaka neurona i tisuća njihovih pripada-

jućih trnova. Za potpunu analizu svih neurona SŽS-a neuroznanost bi morala biti spremna odjednom se suočiti s brojem reda veličine 10^{11} , a za analizu njihovih sinaptičkih veza i dendritičkih trnova takav broj je reda veličine 10^{14} . Također, osim same kvantitete, za takvu komprehenzivnu analizu potrebno je osigurati vjerodostojan skup podataka koji je dobiven istom metodom i u ravnopravnim uvjetima za svaku živčanu stanicu SŽS-a što se trenutačno ukazuje gotovo nemogućim (142,198). Moderne metode visoke rezolucije omogućavaju prikupljanje enormne količine podataka o svakom pojedinačnom trnu pa je, prema Mancuso i sur. (142), upravo softverska podrška za analizu podataka usko grlo svih trenutnih istraživanja. Drugim riječima, dosadašnje manualne i softverski potpomognute semiautomatske analitičke metode nisu prikladne kod tako velikoga seta podataka jer su izrazito spore i zahtjevne te varijabilnoga ishoda zbog subjektivnosti pojedinoga istraživača. Postojeći softverski alati široke upotrebe koji omogućavaju analizu dobivenih slika i 3D rekonstrukciju trnova zahtijevaju značajnu razinu uključenosti humanoga faktora u proces, a što produljuje i otežava cijeli postupak te ga

čini podložnim procesnim greškama (134,142,175). U ovome trenutku brojne istraživačke skupine nastoje razviti vlastitu automatsku metodu morfometrijske analize na temelju raznovrsnih matematičkih algoritama i koristeći najsvremenije bioinformatičke alate poput neuronskih mreža kako bi se konačni rezultati temeljili na objektivnim kriterijima, a ne na slobodnoj interpretaciji pojedine istraživačke skupine (159–162). Naposljetku, cilj morfološke analize trnova je donošenje zaključaka o njihovim dinamičkim odnosima te povezivanje istih s funkcijskim aspektom trnova. S obzirom na to da su morfološke promjene trnova vidljive u fiziološkom starenju te u velikom broju patoloških stanja poput neurodegenerativnih bolesti, epilepsije, psihijatrijskih poremećaja i sl., kvalitetno shvaćanje morfoloških karakteristika trnova omogućilo bi razumijevanje razine njihove uključenosti u etiopatogenezu takvih stanja, a na temelju toga bi se mogle razviti i adekvatne intervencije za očuvanje zdravoga *statusa quo* ili čak i unaprjeđenje fizioloških funkcija SŽS-a (175).

8.1 Koraci analize

S obzirom na to da neuroni koji se istražuju imaju na svojim dendritima mnoštvo trnova, a dobivena digitalna slika u kontinuitetu prikazuje dendritičku osnovicu i pripadajuće trnove zajedno sa svim okolnim tkivom, proces kvantitativne morfometrijske trodimenzionalne

analize trnova provodi se u nekoliko koraka koje opisuju Weaver i sur. (199) u svojem radu, a također navedene korake opisuju i Mancuso i sur. (142,175). Neki od ovih koraka zahtijevaju korištenje softverskih alata za procesiranje slike pa su nužno dio semiautomatskih i automatskih metoda analize. Koraci analize se mogu i pojednostaviti na primjeru shvatiti kao stadiji u raspoznavanju i analizi strukture drveta na njegovoj 2D ili 3D fotografiji.

8.1.1 Predprocesiranje

Prvi korak sastoji se od predprocesiranja dobivene slike. Naime, potrebno je na dobivenome prikazu otkloniti šum i distorzije nastale samim postupkom vizualizacije, a sve kako bi se daljnji koraci analize proveli s boljim prikazom struktura od interesa u visokome kontrastu. Drugim riječima, taj korak omogućava da se u sljedećim koracima ispravno analiziraju samo oni signali koji potječu iz proučavanoga tkiva, a ne signali koji nastaju zbog nesavršenosti pojedine vizualizacijske metode tj. da se poveća omjer signala i šuma (eng. *signal-to-noise ratio*) (175,199).

Originalni signal koji dolazi iz tkiva biva modificiran interferencijom sa signalom šuma te na taj način do detektora u mikroskopu dolazi rezultatni signal koji se razlikuje od originalnoga. Matematički se takav proces opisuje kao modulacija jedne valne funkcije drugom čime kao rezultat nastaje konačna valna funkcija drugačijih karakteristika prema

sljedećoj formuli:

$$f * g = h$$

gdje f označava valnu funkciju originalnoga signala, g valnu funkciju modifikacijskoga šuma, a h valnu funkciju rezultantnoga signala koji se detektira.

Prema takvome modelu, šum se može ukloniti na 2 načina – prvi način je fizičko uklanjanje postavljanjem specifičnih filtera prije razine detektora u mikroskopu, a drugi način je primjena postupka dekonvolucije. Dekonvolucija je naziv za matematički proces poboljšavanja detektiranoga signala u smjeru originalnoga signala uklanjanjem konvolucijskoga faktora. U slučaju poznate valne funkcije šuma provodi se deterministička dekonvolucija, a ukoliko g nije poznat potrebna je njegova procjena korištenjem statističkih postupaka. Potrebno je istaknuti da kod značajne konvolucije originalnoga signala uz nepoznatu valnu funkciju šuma g dolazi do pogrešne statističke procjene šuma, a dekonvolucijom se onda dobivaju i neispravni rezultati za originalni signal f pa čak i djelomično poznavanje vrste šuma omogućava ispravniju procjenu i poboljšava postupak. Sam postupak dekonvolucije vrši se korištenjem Fourierove transformacije za signale g i h i zatim izračunavanjem dekonvolviranoga signala f (200).

Ovaj korak može se na primjeru objasniti kao filtriranje i digitalne izmjene neželjenih osvjetljenja i zatamnjenja na fotografiji drveta.

8.1.2 Segmentacija

Drugi korak uključuje segmentaciju dobivene slike kako bi se proučavane strukture od interesa razlučile od pozadine. Taj postupak vrši se pomoću softverskih alata za obradu slike na način da se iz slike uklanjaju signali koji ne čine objekte koji se proučavaju tj. neurone, dendrite i njihove trnove (175,199).

Ovaj postupak se može jednostavno izvesti tako da se proizvoljno odredi univerzalni prag jačine signala prema kojemu se signali iznad praga smatraju proučavanom strukturom, a signali ispod praga nevažnom pozadinom. Problem kod takvoga pristupa je gubitak tankih i rubnih dijelova objekta poput tankih dendritičkih trnova ukoliko je prag previsok ili uključivanja neželjenih struktura u sliku koja se analizira ukoliko je prag prenizak, a u oba slučaja dolazi do morfološke distorzije proučavanoga objekta od interesa.

Kako bi se izbjegao univerzalni pristup, Cheng i sur. (201) u svojem automatskom postupku analize koriste prilagodljive pragove za jačinu signala koji se prema specifičnome algoritmu izračunavaju lokalno za svaki dio slike pa se na taj način prikladnije razgraničava pozadina od dendrita i trnova, ali osim toga postoje i drugi postupci koji po raznim matematičkim algoritmima vrše segmentaciju slike. Potrebno je istaknuti da ovaj postupak može izrazito promijeniti stvarnu morfologiju proučavanoga objekta ukoliko je *signal-to-noise ratio* malen, a dekonvolucijom se nije znatno

poboljšala kvaliteta slike u smjeru originalnoga signala.

Na danome primjeru se ovaj korak može shvatiti kao iscrtavanje na fotografiji svih dijelova drveta poput pojedinih grana i listova od okolnoga drveća, neba i zemlje kako bi se fotografija izrezala i za daljnje proučavanje preostali samo dijelovi uslikanoga drveta.

8.1.3 Označavanje trnova

Treći korak sastoji se od ekstrakcije strukture središnje linije te identifikacije, mjerenja i klasifikacije trnova. Ovo je najteži korak u cjelokupnoj analizi dobivenih slika jer ne postoje jasni objektivni kriteriji prema kojima bi se ovaj korak vršio bilo manualno, bilo automatski (175,199).

Naime, da bi se 2D prikaz ili 3D rekonstrukcija mogli kvantitativno analizirati potrebno je identificirati koja struktura na njima predstavlja dendrit kao osnovnu strukturu prema kojoj se zatim određuju protruzije tj. trnovi. Ekstrakcija strukture središnje linije je naizgled jednostavna jer se dendriti svojom veličinom i kontinuitetom lako raspoznaju, ali problem predstavljaju dodirne plohe s bazama trnova, osobito kod trnova sa širokom bazom kod kojih se teško određuje ravnina do koje seže dendrit tj. ravnina od koje započinje trnoviti izdanak. Zbog toga je izrazito velik izazov u trenutnim istraživanjima točna detekcija trnova tj. identifikacija protruzije u odnosu na dendrit. Trodimenzionalan raspored trnova u odnosu na dendritičku osnovicu

čini njihovo razlikovanje ponekad izrazito teškim s obzirom na presjek, a također postoji i jasna dvojba treba li i minimalno odstupanje od središnje linije smatrati trnom ili samo strukturnom aberacijom dendrita. Upravo je u ovome koraku definicija dendritičkoga trna podložna slobodnoj interpretaciji jer istraživačke skupine na temelju različitih kriterija određuju postojanje ili nepostojanje trnova. Također, Mancuso i sur. (175) smatraju da je taj korak kod primjene automatskih metoda detekcije najteži za optimizirati jer je tanka granica između dendritičkoga zadebljanja i dendritičke protruzije, a rezolucija slike ovdje također postavlja ograničenja u uspješnosti detektiranja trnova automatskim softverskim alatom. Zbog toga smatraju da su trenutačno manualne metode detekcije uspješnije jer se još uvijek okom lakše određuje spinozni proces kao zasebna stuktura.

Nakon identifikacije trnova na dendritu i postavljanja granice između protruzija i dendritičke osnovice, koriste se softverski alati kojima se vrše morfometrijska mjerenja i potom klasifikacija trnova s obzirom na izmjerene vrijednosti. Specifično, vrši se mjerenje tipičnih veličina dendritičkih trnova poput promjera glave, širine vrata, duljine vrata, površine PSD i sl., a na temelju tih morfometrijskih vrijednosti nastoji se izvršiti procjena volumena svakoga trna jer predstavlja jedini trodimenzionalni morfometrijski parametar trna koji se može koristiti u istraživanjima. Klasifikacija trnova se može vršiti manualno ili automatski, ali se nas-

toje razviti dobri algoritmi prema kojima bi se klasifikacija vršila na temelju prikladnih matematičkih modela čime bi se postupak objektivizirao (142,150,175).

Korak označavanja trnova se na primjeru fotografije drveta može smatrati kao postupak razgraničavanja debla od grana s preciznim određivanjem mjesta početka grane, a također i određivanjem je li određeno ispupčenje debla grana ili strukturni defekt debla. Osim toga, u ovome koraku je zatim uključeno i mjerenje dimenzija grana poput duljine i širine te klasifikacija u grupe debelih, vitkih ili kratkih grana prema dobivenim mjerama.

8.1.4 Postprocesiranje

Posljednji korak kvantitativne morfometrijske analize dendritičkih trnova je postprocesiranje koje uključuje optimizaciju izvršenih postupaka kako bi se poboljšali konačni rezultati te ispravile potencijalne greške iz prethodnih koraka. U ovome koraku najviše je uključen humani faktor jer velik broj postojećih softverskih alata još uvijek nije dovoljno sofisticiran da sam izvrši takve dorade slika. Primjerice, u ovome koraku se manualno ispravljaju defekti poput lažno spojenih trnova ili artefakata nastalih zbog superpozicije drugih struktura (175,199).

Na navedenome primjeru ovaj korak se može prikazati kao razdvajanje slučajno pogrešno spojenih grana ili kao uklanjanje grana koje su se greškom pripisale promatranome drvetu, a ne pripadaju

mu.

8.2 Vrste analiza

U vrijeme mikroskopije niske rezolucije na mikrometarskoj skali dendritički trnovi su zapravo bili teško razlučivi izdanci dendrita čije morfometrijske vrijednosti nisu mogle biti precizno određene upravo zbog rezolucije prikaza. Također, takav prikaz je bio isključivo dvodimenzionalan pa su mogle biti izmjerene samo duljine i površine trnova, a volumen se rijetko izračunavao i to u obliku grubih aproksimacija (134,142,175). Iz toga razloga detaljna morfometrijska analiza nije bila niti potrebna jer su cijeli trnovi *per se* bili na granici detektabilnosti.

Razvojem elektronske mikroskopije u obliku ssEM (150) postalo je moguće izvršiti 3D rekonstrukcije trnova u izrazito visokoj rezoluciji u fiksiranim uzorcima, a razvojem konfokalne mikroskopije i TPM/MPM isto je postalo moguće u difrakcijom ograničenoj rezoluciji u *in vivo* neuronima. Nadalje, razvojem suvremenih tehnika vizualizacije 3D rekonstrukcija neurona i trnova u visokoj rezoluciji je postala moguća i u sediranih (171–188) te čak i u slobodno krećućih eksperimentalnih životinja (189–194). S obzirom na rezolucijski doseg i veliku količinu morfometrijskih podataka koji su na taj način dobiveni, bilo je potrebno razviti metode analize dobivenih slika neurona, dendrita i trnova kako bi se velika količina podataka mogla brzo procesirati i dobiti usporedivi rezultati za

potrebe daljnjih istraživanja.

8.2.1 Manualna

Manualna analiza je prvi oblik analize korišten za morfometrijsku kvantifikaciju trnova. Prije razvoja računala i softverskih alata za digitalnu obradu slike s 3D rekonstrukcijom, prethodno navedeni koraci su se jedino manualno mogli izvršavati. Koraci predprocesiranja slike i segmentacije nisu mogli biti izvršeni jer se na razini fizičkih slika dendrita s trnovima tako nešto nije moglo učiniti. Stoga su slike na kojima su se vršili identifikacija trnova i morfometrijska mjerenja bile mnogo nepreciznije i neoštre zbog velike količine šuma koji je izmijenio osnovni signal iz uzoraka. Danas se potpuno manualna analiza trnova više ne primjenjuje zbog velikoga broja razvijenih softverskih alata koji pružaju mogućnost semiautomatske ili gotovo automatske analize, ali ipak ne mogu u potpunosti nadomjestiti ručno vođenu analizu. Prema tome, danas se obično govori o manualnim postupcima ili manualnim intervencijama u sklopu automatiziranih analitičkih metoda zbog čega se takva analiza onda naziva semiautomatskom (142,175).

Mancuso i sur. (142,175) ističu da svi oblici uključivanja humanoga faktora u analizu dendritičkih trnova imaju velike nedostatke. Manualni postupci analize su izrazito spori jer su suočeni s velikom količinom podataka u visokoj rezoluciji. Osim toga, postoji varijabilnost u rezultatima analize jer poje-

dinac vrši korake analize prema svojim subjektivnim kriterijima. Nadalje, navode da su manualne analize veoma loše za 3D i 4D analizu te da pri manualnoj klasifikaciji trnova dolazi do formiranja subjektivnih grupa trnova što ne odgovara stvarnome stanju gdje se trnovi javljaju u spektru morfoloških oblika. Ključan problem se također javlja u suvremenim *in vivo* istraživanjima koja prate dinamičke morfološke promjene trnova jer je izrazito zahtjevno praćenje promjena pojedinačnih trnova u realnome vremenu. Naposljetku, morfološke alteracije trnova u patološkim stanjima dovode do promjene klasifikacijskih kriterija trnova prema vlastitome nahođenju istraživača što ne može biti temelj daljnjih istraživanja jer se znanstvene činjenice mogu temeljiti isključivo na objektivnosti i kvantifikaciji. Prednost manualnoj analizi se trenutno još uvijek daje pri identifikaciji trnova u odnosu na dendritičku osnovicu jer ne postoje dovoljno dobre automatske metode da bi se takav postupak izvršio precizno i bez potrebe za manualnim izmjenama u postprocesiranju. Stoga većina dostupnih softverskih alata ima potrebu za manualnom validacijom automatski provedene analize što je čini visoko objektivnom, ali relativno sporom (175).

Impresivna je činjenica da su Bock i sur. (151) u svojem istraživanju morfologije trnova u malenome djeliću mozga dobili više od 35 TB podataka, a velik dio analize je proveden potpuno manualnim metodama što čini takvo istraživanje

pravim pothvatom koji je zahtijevao ulaganje velike količine vremena i truda.

8.2.2 Semiautomatska

Semiautomatska analiza je standard obrade slika neurona i trnova dobivenih suvremenim vizualizacijskim metodama. Takva analiza uključuje korištenje široko dostupnih softverskih alata kojima se zahtjevni i dugotrajni postupci automatiziraju i time značajno ubrzavaju. Međutim, točnost takvih analiza nije na dostatnoj razini da bi dobiveni rezultati bili potpuno validni pa je potrebna manualna intervencija radi korekcije (142).

Analitički softveri

Razvijeni programi koji omogućavaju prikaz, 3D rekonstrukciju i primjenu raznih metoda trodimenzionalne analize su mnogobrojni (175). Jedan od najčešće korištenih softvera je Imaris koji pruža funkcionalnosti vizualizacije, segmentacije i interpretacije 3D i 4D podataka, a putem svojega Filament Tracer modula pruža mogućnosti i automatske detekcije trnova i procesiranje velikoga broja slika u *time-lapse* obliku. Drugi često korišteni softverski alat je Neurolucida 360 u kojemu je moguća 3D rekonstrukcija trnova i neurona te kvantitativna analiza, a njegov modul AutoSpine omogućava također automatsku detekciju trnova. Nadalje, NeuronStudio je program koji omogućava automatsko praćenje, vizualizaciju i 3D rekonstrukciju dendrita prema *z-stacku* slika dobivenih konfokalnom mikroskopi-

jom. Pored toga, ImageJ je također veoma popularan bioinformatički program za 3D rekonstrukciju i analizu trnova koji je vrlo jednostavan za korištenje. Dodatno, često korišteni programi su i neuTube (202), Neuromantic, TREES toolbox itd. Pored navedenih programa koji sadrže razne uklopljene funkcionalnosti, MATLAB je programski jezik koji se često koristi za razvoj prilagođenih i specijaliziranih alata potrebnih za vizualizaciju, rekonstrukciju i analizu trnova koji se mogu komplementarno koristiti s ostalim softverskim rješenjima (203,204).

Postoji znatna razlika između navedenih programa u podržanim funkcionalnostima, podržanoj veličini slika za analizu, postojanju modula za automatsku detekciju ili klasifikaciju trnova te cijeni. Primjerice, NeuronStudio je program koji je specifično dizajniran samo za analizu dendritičkih trnova te je izrazito jednostavan za korištenje, ali nije moguće dodavanje vlastitih funkcionalnosti i analitičkih metoda u sami program. S druge strane, ImageJ je program namijenjen za nespecifičnu obradu slike, ali omogućava programiranje vlastitih funkcionalnosti poput metoda analize dendritičkih trnova koje se zatim mogu koristiti unutar sustava ImageJ-a (203,204). Imaris (205–210) i Neurolucida 360 (211) su primjeri izrazito kvalitetnih programa s brojnim funkcionalnostima, ali čija je cijena korištenja izrazito visoka što nije pogodno za pojedine istraživače.

Anton-Sanchez i sur. (212) su proveli

zanimljivu analizu koristeći detaljnu i potpunu 3D rekonstrukciju ljudskih piramidnih neurona temporalnoga korteksa iz 3. sloja Brodmannove aree 20 dobivenih postmortalno. Naime, nakon intracelularne injekcije *Lucifer Yellow* fluorescentne boje izvršena je potpuna 3D rekonstrukcija, koristeći Imaris softversku podršku, cjelovitih 5 neurona koji su sadržavali ukupno više od 32 000 trnova te je izvršena 3D analiza distribucije trnova duž svih dendrita. Navode da je izvršena rekonstrukcija bila izrazito precizna te objektivna bez potrebe za velikim brojem manualnih intervencija. Kvantitativnom 3D analizom su utvrdili da duž dendrita postoji varijacija u gustoći trnova koja ovisi o udaljenosti od stanične some, a koristeći specifičnu matematičku funkciju za analizu prostorne distribucije utvrdili su da ne postoji međusobna razlika u gustoći trnova između bazalnih dijelova dendrita istoga neurona i različitih neurona. S druge strane, utvrdili su da se značajno razlikuju gustoće apikalnih i bazalnih dijelova dendrita istoga neurona i različitih neurona na način da se u apikalnim dijelovima češće javljaju nakupine trnova. Ovo istraživanje pokazuje dosege suvremenih metoda analize dendritičkih trnova jer je pomoću softverskoga alata Imaris izvršena gotovo potpuno automatizirana 3D rekonstrukcija cjelovitih neurona sa svim dendritima i trnovima visoke vjerodostojnosti, a na temelju takve rekonstrukcije se mogla izvesti i detaljna prostorna analiza kvantitativnih parametara dendrita i trnova.

Nadalje, ista istraživačka skupina (213) je koristeći 7 000 individualno 3D semi-automatski rekonstruiranih trnova ljudskih piramidnih neurona pokušala temeljem matematičkoga modela distribucije utvrditi broj morfoloških *clustera* trnova te postoji li varijacija u udjelu pojedinoga *clustera* s obzirom na poziciju na dendritu i dob. 3D morfometrijska analiza je obuhvaćala 54 kvantitativna parametra trnova prema kojima se vršila analiza distribucije. Istraživanje je pokazalo da prema analizi 54 parametra postoji 6 morfoloških *clustera* trnova, a da neki dominiraju u apikalnome dijelu dendrita, dok drugi dominiraju u bazalnome dijelu dendrita. Također se pokazalo da postoji i varijacija u udjelu pojedinoga *clustera* s obzirom na dob.

Aguiar i sur. (214) su, kako bi zaobišli neka ograničenja dostupnih programa, razvili novi softverski alat Py3DN koji omogućava izgradnju matematičkih reprezentacija neuronske topologije i mogućnost definiranja nestandardnih morfometrijskih varijabli u analizi dendritičkih trnova. Ističu da takve opcije nisu bile dostupne u dostupnim alatima poput NeuroLucide 360 pa je uvođenje ovakvoga rješenja bilo potrebno za detaljniju morfološku analizu trnova. Također su nove alate razvili i Basu i sur. (215), Toharia i sur. (216), Srinivasan i sur. (217), Varando i sur. (218) itd., a sve kako bi nadopunili nedostatke postojećih softverskih rješenja.

Problemi dostupnih programa i njihovih analitičkih metoda nažalost postoje što je ograničavajući korak u potpunoj au-

tomatizaciji analize trnova. Kao prvo, gotovo svi navedeni softverski alati su prilagođeni isključivo procesiranju slika na kojima su neuroni i trnovi obilježeni metodama koje daju visok kontrast i jak signal pa se teško mogu primjenjivati u kombinaciji s vizualizacijskim metodama koje dobivaju puno slabiji kontrast slike. Nadalje, točnost automatske identifikacije i klasifikacije dendritičkih trnova znatno pada na prikazima gdje dendriti nisu samostalni i izolirani od okolnih struktura te kod dendrita koji imaju veliku gustoću trnova na sebi. U konačnici, ti programi su osmišljeni isključivo za morfološku analizu trnova, a ne mogu uključivati i analizu funkcionalnih podataka na razini makromolekula ili sinaptičke aktivnosti u trnovima kako bi se isti povezali s morfološkim podacima (142,175).

Automatski algoritmi za označavanje trnova

U sklopu nekih programa ili zasebno istraživačke skupine razvijaju specijalizirane alate za automatizaciju detekcije ili klasifikacije trnova na temelju individualno razvijenih algoritama. Jedan od prvih algoritama za automatsku detekciju dendritičkih trnova razvili su Koh i sur. (219), a omogućavala je i 3D kvantifikaciju trnova. Metoda je pokazala 95%-tnu osjetljivost pri automatskoj detekciji trnova, ali su rezultati također uključivali i velik broj lažno prisutnih trnova zbog neprikladno izvršenoga segmentacijskog koraka. Daljnje automatske algoritme za analizu

trnova razvijale su istraživačke skupine Benavides-Piccione i sur. (220,221), Rodriguez i sur. (222), Bai i sur. (223), Zhang i sur. (224), Singh i sur. (225) itd., a Blumer i sur. (153) su razvili algoritam za automatsku analizu dinamičkih promjena trnova.

Zanimljivo je i provođenje automatskih analiza dinamičkih promjena na temelju *time-lapse* vizualizacije dendritičkih trnova *in vivo*. Naime, kod takvih algoritama nije dovoljno samo statičko razlikovanje dendrita od pozadine i trnova od dendrita, već je nužno i individualno praćenje promjena svakoga pojedinačnog trna kao i detekcija formiranja ili resorpcije trna na dendritu u vremenskoj dimenziji (tzv. 4D analiza), a što se pokazuje izrazito kompleksnim i zahtjevnim.

Swanger i sur. (226) su primjerice koristili fluorescentno označene neurone i klasičnu fluorescencijsku mikroskopiju te konfokalnu mikroskopiju u za dobivanje serijskih slika *in vivo* neurona u z-osi, a automatsku 4D analizu trnova su izvršili koristeći i NeuronStudio i FilamentTracer modul Imarisa kako bi pratili dinamičke promjene trnova u neuronima hipokampusa kod miševa nakon primjene moždanog neurotrofnog faktora te također u mišjem modelu sindroma fragilnog X kromosoma. Smatraju da je izvršena analiza precizna i da su dobiveni rezultati zadovoljavajući i objektivni. Iste softverske alate koristili su i Bertlingi sur. (227) za 4D kvantifikaciju trnova hipokampalnih neurona miševa pri primjeni latrunculina B. Na

ovim, ali i sličnim primjerima istraživanja (228–230), NeuronStudio se pokazao kao izvrstan softverski alat za analizu 3D podataka dobivenih konfokalnom mikroskopijom i TPM/MPM metodom, a osobito implementirajući automatski algoritam za označavanje trnova koji su razvili Rodriguez i sur. (222).

Maiti i sur. (134) te Sala i Segal (231) navode da postoje razvijeni alati koji se koriste u kombinaciji s CLSM i TPM/MPM za potpuno automatsku 3D rekonstrukciju trnova koji su mnogo brži i točniji nego postojeći semiautomatski alati koji za 3D rekonstrukciju trnova zahtijevaju manualnu intervenciju. Premda postoji rezolucijsko ograničenje CLSM i TPM/MPM vizualizacijskih metoda, navode da su razvijeni i novi softveri sa sofisticiranim algoritmima za obradu slike kojima se mogu prikupiti velike količine podataka iz serija slika u *z-stacku* čime izvršena 3D rekonstrukcija postaje dovoljno precizna.

Daljnji razvoj novih algoritama automatske analize primjenjivao se u kombinaciji s raznim vizualizacijskim metodama pa su tako Lang i sur. (232) razvili algoritam za 3D analizu trnova kod slika dobivenih SBF-SEM metodom vizualizacije. Kuwajima i sur. (150) koriste softverski alat RECONSTRUCT™ za semiautomatsku 3D rekonstrukciju iz serijskih zabilježenih slika metodom ssEM te ističu da se trenutačne metode 3D rekonstrukcije pretežno koriste samo za parcijalnu rekonstrukciju dendrita s pripadajućim trnovima jer je potpuna rekonstrukcija, koja je i najtočnija u vidu

kvantifikacijske analize, pomoću trenutačno dostupnih alata izrazito zahtjevna i dugotrajna. Osim automatske 3D rekonstrukcije, uvedeni su i novih alati i algoritmi kojima se automatiziraju i koraci segmentacije i kvantitativne morfometrije trnova prema prikazima dobivenima ssEM metodom. Mishchenko i sur. (152) navode da je trenutačno ipak potrebna kontrola ljudskoga oka za preciznu analizu serijskih EM slika unatoč postojanju raznih algoritama automatske analize.

Risher i sur. (233) također koriste RECONSTRUCT™ alat, ali za 3D rekonstrukciju dendrita s trnovima na temelju klasične Golgi-Cox metode bojenja jer je još uvijek jedna od najboljih metoda za cjelovit strukturni prikaz neurona s visokim kontrastom. Blazquez-Llorca i sur. (234) koriste RECONSTRUCT™ alat za 3D rekonstrukciju trnova kako bi usporedili dvofotosku *in vivo* mikroskopiju s FIB-SEM mikroskopijom, Takahashi-Nakazato i sur. (235) također koriste isti alat za 3D rekonstrukciju sinapsi u kombinaciji s FIB-SEM mikroskopijom, a Domínguez-Álvaro i sur. (236) pak koriste EspINA softver za 3D rekonstrukciju i kvantifikaciju trnova i sinapsi prema slikama dobivenima FIB-SEM metodom.

Ruszczycki i sur. (237) u svojem članku detektiraju probleme s kojima se suočavaju automatske kvantitativne analize morfologije dendritičkih trnova. Naime, navode da utvrđene razlike kod usporedbenih istraživanja morfologije trnova između istraživane i kontrolne

skupine trnova mogu biti pogrešno interpretirane zbog *a priori* razlika u populacijama trnova između skupina. Ističu da broj, gustoća i morfološka varijabilnost trnova u svakoj skupini utječu na ishod analize te da bi se u takvoj vrsti istraživanja trebala obratiti pozornost na sam proces uzorkovanja.

Trenutačno postoji jako velik broj algoritama koji su razvijeni za automatsku detekciju, 3D analizu i klasifikaciju trnova. Svaki od tih algoritama nastoji identificirati trnove korištenjem drugačijega pristupa za razlikovanje centralne dendritičke osnovice od protruzija (201) ili pak drugačijega matematičkog modela prema kojemu klasificira trnove na temelju izmjerenih morfometrijskih parametara (238). Sama podloga tih algoritama je izrazito kompleksna, ali važno je istaknuti da se u konačnici svi postojeći algoritmi automatske analize suočavaju s prethodno navedenim problemima te ne mogu potpuno automatizirati proces pa su stoga ovdje i svrstani pod semiautomatske metode analize. Međutim, razvijene metode ipak pružaju mnogo objektivniju alternativu nego isključivo manualna analiza koja je sklona pristranosti istraživača pa dobiveni rezultati i klasifikacija imaju mnogo veću vjerodostojnost. Osim toga, brzina procesiranja podataka kod softverskih alata je neusporedivo brža od bilo koje manualne metode brojanja ili mjerenja trnova pa se i uz potrebu za manje manualne intervencije ukupna analiza znatno skraćuje (142,175). Kvalitetan pregled

dostupnih softverskih alata i algoritama za segmentaciju, detekciju, 3D analizu i klasifikaciju dendritičkih trnova može se naći u članku kojega su objavili Basu i sur. (239).

8.2.3 Automatska

Potpuno automatske metode su one koje sve postupke analize trnova, od predprocesiranja slike pa do dobivanja morfometrijskih vrijednosti i objektivne klasifikacije trnova, vrše bez potrebe za manualnom validacijom ili intervencijom. Takve metode se trenutno razvijaju s tri važna cilja – uklanjanje pogrešaka i pristranosti iz analize, objektivno definiranje morfoloških parametara s kvantifikacijom i klasifikacijom u nesubjektivno definirane morfološke grupe te brza i automatska analiza velikoga skupa podataka (142). Trenutačno ne postoji niti jedna metoda koja ispunjava sva tri cilja, a da ujedno nema potrebu bar za manualnom validacijom. Međutim, uključivanjem novih bioinformatičkih sustava poput neuronskih mreža i strojnoga učenja (159–162,240–243) postupno dolazi do izražaja premoć automatskih metoda detekcije, mjerenja i klasifikacije trnova nad manualnom analizom i prethodno dostupnim softverskim alatima.

Mancuso i sur. (142,175) navode da je trenutačno potreban moćan alat za obradu slika koji može analizirati sve parametre trnova u velikome skupu podataka koji seže do količine od više desetaka TB. Takav alat bi također tre-

bao biti vremenski optimiziran tako da analizu provodi u dovoljno kratkome vremenu kako bi se takva komprehenzivna analiza mogla izvesti u vremenski prihvatljivome periodu, a čime bi se buduća istraživanja mogla izvršavati na razini većih regija mozga i neuralnih krugova.

Zahvale

Prije svega zahvaljujem prof.dr.sc. Mariju Vukšiću na velikoj stručnoj pomoći pri izradi ovoga rada te na izdvojenome vremenu i strpljenju.

Nadalje, zahvaljujem i Dinku Smiloviću, dr.med., na izdvojenome vremenu i davanju smjernica pri pripremi i pisanju ovoga diplomskog rada.

Zahvaljujem i članovima Stručnog povjerenstvu za ocjenu diplomskih radova prof.dr.sc. Goranu Šimiću, prof.dr.sc. Zdravku Petanjeku i prof.dr.sc. Mariju Vukšiću na čitanju i ocjenjivanju ovoga diplomskog rada.

Također, zahvaljujem svojoj djevojci Ivani na najvećoj podršci i razumijevanju što mi je mogla pružiti, ali i trudu da mi život bude što ljepši i ispunjeniji. Neizmjerne mi je pomogla u životu i za vrijeme mog studija, a pomogla mi je i naći u medicini ono najbolje i najvažnije te joj se iskreno zahvaljujem na tome. Hvala ti što postojiš i što si uvijek uz mene.

Zahvaljujem se i svojim roditeljima Nataši i Romanu te bratu Kristijanu što su me uvijek podržavali i pomagali mi, a osobito tijekom studiranja. Bez njihove svesrdne pomoći i podrške nikada ne bih dogurao do ovdje.

Veliko hvala upućujem i svojim bakama Jeli i Olgici te djedovima Nikoli i Miji što su uvijek bili uz mene za vrijeme mog školovanja te uvijek vjerovali u mene.

Naposlijetku, zahvaljujem i svim svojim prijateljima na tome što me čine sretnijim i što druženjem s njima zaboravljam na sve probleme.

*"We must find time to stop and thank the people
who make a difference in our lives."*

— John F. Kennedy

Literatura

1. Golgi C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gaz Med Ital Lomb.* 1873;33:244–246.
2. DeFelipe J. The dendritic spine story: an intriguing process of discovery. *Front Neuroanat.* 2015;9:14.
3. Ramón y Cajal S. Estructura de los centros nerviosos de las aves. *Rev Trim Histol Norm Pat.* 1888;1:1-10.
4. Yuste R. The discovery of dendritic spines by Cajal. *Front Neuroanat.* 2015;9:18.
5. Raviola E, Mazzarello P. The diffuse nervous network of Camillo Golgi: Facts and fiction. *Brain Research Reviews.* 2011;66(1–2):75–82.
6. Bock O. Cajal, Golgi, Nansen, Schäfer and the neuron doctrine. *Endeavour.* 2013;37(4):228–234.
7. Gray EG. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature.* 1959;183(4675):1592–1593.
8. Uchizono K. Characteristics of excitatory and inhibitory synapses in the central nervous system of the cat. *Nature.* 1965;207(997):642-643.
9. Colonnier M. Synaptic patterns on different cell types in the different laminae of the cat visual cortex. An electron microscope study. *Brain Res.* 1968;9(2):268-287.
10. Arellano JI, Benavides-Piccione R, Defelipe J, Yuste R. Ultrastructure of dendritic spines: correlation between synaptic and spine morphologies. *Front Neurosci.* 2007;1(1):131-143
11. Berry KP, Nedivi E. Spine dynamics: Are they all the same?. *Neuron.* 2017;96(1):43-55.
12. Harris KM, Jensen FE, Tsao B. Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J Neurosci.* 1992;12(7):2685-2705.
13. LeVay S. Synaptic patterns in the visual cortex of the cat and monkey. Electron microscopy of Golgi preparations. *J Comp Neurol.* 1973;150(1):53-85.
14. Cane M, Maco B, Knott G, Holtmaat A. The relationship between PSD-95 clustering and spine stability in vivo. *J Neurosci.* 2014;34(6):2075-2086.
15. Villa KL, Berry KP, Subramanian J, et al. Inhibitory synapses are repeatedly assembled and removed at persistent sites in vivo. *Neuron.* 2016;89(4):756-769.
16. Holtmaat AJ, Trachtenberg JT, Wilbrecht L, et al. Transient and persistent dendritic spines in the neocortex in vivo. *Neuron.* 2005;45(2):279-291.
17. Blanpied TA, Ehlers MD. Microanatomy of dendritic spines: emerging principles of synaptic pathology in psychiatric and neurological disease. *Biol Psychiatry.* 2004;55(12):1121-1127.
18. Calabrese B, Wilson MS, Halpain S. Development and regulation of dendritic spine synapses. *Physiology (Bethesda).* 2006;21:38-47.
19. Peters A, Kaiserman-Abramof IR. The small pyramidal neuron of the rat cerebral cortex. The perikaryon, dendrites and spines. *Am J Anat.* 1970;127(4):321-355.
20. Gipson CD, Olive MF. Structural and functional plasticity of dendritic spines – root or result of behavior?. *Genes, Brain and Behavior.* 2017;16:101-117.
21. Zuo Y, Lin A, Chang P, Gan WB. Development of long-term dendritic spine stability in diverse regions of cerebral cortex. *Neuron.* 2005;46(2):181-189.
22. Trachtenberg JT, Chen BE, Knott GW, et al. Long-term in vivo imaging of experience-dependent synaptic plasticity in adult cortex. *Nature.* 2002;420(6917):788-794.

23. Petanjek Z, Judaš M, Šimić G, Rašin MR, Uylings HBM, Rakić P, Kostović I. Extraordinary neoteny of synaptic spines in the human prefrontal cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(32):13281-13286.
24. Dailey ME, Smith SJ. The dynamics of dendritic structure in developing hippocampal slices. *J Neurosci*. 1996;16(9):2983-2994.
25. Ziv NE, Smith SJ. Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron*. 1996;17(1):91-102.
26. Harris KM, Kater SB. Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:341-371.
27. Yuste R, Bonhoeffer T. Genesis of dendritic spines: insights from ultrastructural and imaging studies. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(1):24-34.
28. Purpura DP. Dendritic differentiation in human cerebral cortex: Normal and aberrant development patterns. U: Kreutzberg GW, ur. *Advances in neurology*. 14. izd. New York: Raven; 1975. Str. 91-116.
29. Fiala JC, Feinberg M, Popov V, Harris KM. Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci*. 1998;18(21):8900-8911.
30. Goda Y, Davis GW. Mechanisms of synapse assembly and disassembly. *Neuron*. 2003;40(2):243-264.
31. Lund JS, Boothe RG, Lund RD. Development of neurons in the visual cortex (area 17) of the monkey (*Macaca nemestrina*): A Golgi study from fetal day 127 to postnatal maturity. *The Journal of Comparative Neurology*. 1977;176(2):149-187.
32. Linke R, Soriano E, Frotscher M. Transient dendritic appendages on differentiating septohippocampal neurons are not the sites of synaptogenesis. *Developmental Brain Research*. 1994;83(1):67-78.
33. Portera-Cailliau C, Pan DT, Yuste R. Activity-regulated dynamic behavior of early dendritic protrusions: evidence for different types of dendritic filopodia. *J Neurosci*. 2003;23(18):7129-7142.
34. Bear MF. Mechanism for a sliding synaptic modification threshold. *Neuron*. 1995;15(1):1-4.
35. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
36. Engert F, Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 1999;399(6731):66-70.
37. Hill TC, Zito K. LTP-induced long-term stabilization of individual nascent dendritic spines. *J Neurosci*. 2013;33(2):678-686.
38. Nägerl UV, Eberhorn N, Cambridge SB, Bonhoeffer T. Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron*. 2004;44(5):759-767.
39. Lambert JT, Hill TC, Park DK, Culp JH, Zito K. Protracted and asynchronous accumulation of PSD95-family MAGUKs during maturation of nascent dendritic spines. *Dev Neurobiol*. 2017;77(10):1161-1174.
40. De Roo M, Klauser P, Mendez P, Poglia L, Muller D. Activity-dependent PSD formation and stabilization of newly formed spines in hippocampal slice cultures. *Cereb Cortex*. 2008;18(1):151-161.
41. Ehrlich I, Klein M, Rumpel S, Malinow R. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(10):4176-4181.
42. Migaud M, Charlesworth P, Dempster M, et al. Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein. *Nature*. 1998;396(6710):433-439.
43. Elias GM, Elias LAB, Apostolides PF, Kriegstein AR, Nicoll RA. Differential trafficking of AMPA and NMDA receptors by SAP102 and PSD-95 underlies synapse development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(52):20953-20958.
44. Zito K, Scheuss V, Knott G, Hill T, Svoboda K. Rapid functional maturation of nascent dendritic spines. *Neuron*. 2009;61(2):247-258.
45. Béique JC, Lin DT, Kang MG, Aizawa H, Takamiya K, Haganir RL. Synapse-specific regulation of AMPA receptor function by PSD-95. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51):19535-19540.

46. Banker G. Proteins of the postsynaptic density. *The Journal of Cell Biology*. 1974;63(2):456–465.
47. Cohen R. The structure of postsynaptic densities isolated from dog cerebral cortex: I. overall morphology and protein composition. *The Journal of Cell Biology*. 1977;74(1):181–203.
48. Meyer D, Bonhoeffer T, Scheuss V. Balance and stability of synaptic structures during synaptic plasticity. *Neuron*. 2014;82(2):430-443.
49. Walikonis RS, Jensen ON, Mann M, Provance DW Jr, Mercer JA, Kennedy MB. Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J Neurosci*. 2000;20(11):4069-4080.
50. Jordan BA, Fernholz BD, Boussac M, Xu C, Grigorean G, Ziff EB, Neubert TA. Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2004;3(9):857–871.
51. Godreau D, Neyroud N, Vranckx R, Hatem S. Les MAGUK: au-delà de l'accrochage des canaux ioniques. *Médecine/sciences*. 2004;20(1):84–88.
52. Leonard AS, Davare MA, Horne MC, Garner CC, Hell JW. SAP97 is associated with the α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor GluR1 subunit. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(31):19518–19524.
53. Sans N, Racca C, Petralia RS, Wang YX, McCallum J, Wenthold RJ. Synapse-associated protein 97 selectively associates with a subset of AMPA receptors early in their biosynthetic pathway. *J Neurosci*. 2001;21(19):7506-7516.
54. Wakabayashi M, Ito T, Mitsushima M, Aizawa S, Ueda K, Amachi T, Kioka N. Interaction of Ip-dlg/KIAA0583, a membrane-associated guanylate kinase family protein, with vinexin and β -catenin at sites of cell-cell contact. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(24):21709–21714.
55. Kim E, Cho KO, Rothschild A, Sheng M. Heteromultimerization and NMDA receptor-clustering activity of Chapsyn-110, a member of the PSD-95 family of proteins. *Neuron*. 1996;17(1):103-113.
56. Masuko N, Makino K, Kuwahara H, et al. Interaction of NE-dlg/SAP102, a neuronal and endocrine tissue-specific membrane-associated guanylate kinase protein, with calmodulin and PSD-95/SAP90. A possible regulatory role in molecular clustering at synaptic sites. *J Biol Chem*. 1999;274(9):5782-5790.
57. Stathakis DG, Hoover KB, You Z, Bryant PJ. Human postsynaptic density-95 (PSD95): Location of the gene (DLG4) and possible function in nonneural as well as in neural tissues. *Genomics*. 1997;44(1):71-82.
58. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science*. 1995;269(5231):1737-1740.
59. Nicoll RA, Tomita S, Bredt DS. Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science*. 2006;311(5765):1253-1256.
60. Hunt CA, Schenker LJ, Kennedy MB. PSD-95 is associated with the postsynaptic density and not with the presynaptic membrane at forebrain synapses. *J Neurosci*. 1996;16(4):1380-1388.
61. Sans N, Petralia RS, Wang YX, Blahos J 2nd, Hell JW, Wenthold RJ. A developmental change in NMDA receptor-associated proteins at hippocampal synapses. *J Neurosci*. 2000;20(3):1260-1271.
62. Kramár EA, Lin B, Rex CS, Gall CM, Lynch G. Integrin-driven actin polymerization consolidates long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(14):5579-5584.
63. Krucker T, Siggins GR, Halpain S. Dynamic actin filaments are required for stable long-term potentiation (LTP) in area CA1 of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(12):6856-6861.
64. Matsuzaki M, Honkura N, Ellis-Davies GC, Kasai H. Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*. 2004;429(6993):761-766.
65. Zhou Q, Homma KJ, Poo MM. Shrinkage of dendritic spines associated with long-term depression of hippocampal synapses. *Neuron*. 2004;44(5):749-757.
66. Colgan LA, Yasuda R. Plasticity of dendritic spines: subcompartmentalization of signaling. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:365-385.

67. Nakahata Y, Yasuda R. Plasticity of spine structure: Local signaling, translation and cytoskeletal reorganization. *Front Synaptic Neurosci.* 2018;10:29.
68. Spence EF, Soderling SH. Actin out: Regulation of the synaptic cytoskeleton. *J Biol Chem.* 2015;290(48):28613-28622.
69. Honkura N, Matsuzaki M, Noguchi J, Ellis-Davies GC, Kasai H. The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. *Neuron.* 2008;57(5):719-729.
70. Bosch M, Castro J, Saneyoshi T, Matsuno H, Sur M, Hayashi Y. Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. *Neuron.* 2014;82(2):444-459.
71. Okamoto K, Nagai T, Miyawaki A, Hayashi Y. Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. *Nat Neurosci.* 2004;7(10):1104-1112.
72. Star EN, Kwiatkowski DJ, Murthy VN. Rapid turnover of actin in dendritic spines and its regulation by activity. *Nat Neurosci.* 2002;5(3):239-246.
73. Husi H, Ward MA, Choudhary JS, Blackstock WP, Grant SG. Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat Neurosci.* 2000;3(7):661-669.
74. Nishiyama J, Yasuda R. Biochemical computation for spine structural plasticity. *Neuron.* 2015;87(1):63-75.
75. Lee SJ, Escobedo-Lozoya Y, Szatmari EM, Yasuda R. Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature.* 2009;458(7236):299-304.
76. Chang JY, Parra-Bueno P, Laviv T, Szatmari EM, Lee SR, Yasuda R. CaMKII autophosphorylation is necessary for optimal integration of Ca²⁺ signals during LTP induction, but not maintenance. *Neuron.* 2017;94(4):800-808.
77. Lisman J, Schulman H, Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(3):175-190.
78. Buard I, Coultrap SJ, Freund RK, et al. CaMKII "autonomy" is required for initiating but not for maintaining neuronal long-term information storage. *J Neurosci.* 2010;30(24):8214-8220.
79. Zhang W, Benson DL. Development and molecular organization of dendritic spines and their synapses. *Hippocampus.* 2000;10(5):512-526.
80. Togashi H, Sakisaka T, Takai Y. Cell adhesion molecules in the central nervous system. *Cell Adh Migr.* 2009;3(1):29-35.
81. Konietzny A, Bär J, Mikhaylova M. Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:147.
82. Takeichi M, Abe K. Synaptic contact dynamics controlled by cadherin and catenins. *Trends Cell Biol.* 2005;15(4):216-221.
83. Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991;251(5000):1451-1455.
84. Phillips GR, Tanaka H, Frank M, et al. Gamma-protocadherins are targeted to subsets of synapses and intracellular organelles in neurons. *J Neurosci.* 2003;23(12):5096-5104.
85. Scheiffele P. Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci.* 2003;26:485-508.
86. Graf ER, Zhang X, Jin SX, Linhoff MW, Craig AM. Neurexins induce differentiation of GABA and glutamate postsynaptic specializations via neuroligins. *Cell.* 2004;119(7):1013-1026.
87. Chih B. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 2005;307(5713):1324-1328.
88. Harward SC, Hedrick NG, Hall CE, et al. Autocrine BDNF-TrkB signalling within a single dendritic spine. *Nature.* 2016;538(7623):99-103.
89. Oe Y, Tominaga-Yoshino K, Hasegawa S, Ogura A. Dendritic spine dynamics in synaptogenesis after repeated LTP inductions: dependence on pre-existing spine density. *Sci Rep.* 2013;3:1957.
90. Ramón y Cajal S. Neue darstellung vom histologischen bau des centralnervensystem. *Arch Anat Entwickl.* 1893;319-428.

91. Moriyoshi K, Richards LJ, Akazawa C, O'Leary DD, Nakanishi S. Labeling neural cells using adenoviral gene transfer of membrane-targeted GFP. *Neuron*. 1996;16(2):255-260.
92. Markham JA, Greenough WT. Experience-driven brain plasticity: beyond the synapse. *Neuron Glia Biol*. 2004;1(4):351-363.
93. Lippman J, Dunaevsky A. Dendritic spine morphogenesis and plasticity. *J Neurobiol*. 2005; 64(1):47-57.
94. Passafaro M, Nakagawa T, Sala C, Sheng M. Induction of dendritic spines by an extracellular domain of AMPA receptor subunit GluR2. *Nature*. 2003;424(6949):677-681.
95. Roussignol G, Ango F, Romorini S, et al. Shank expression is sufficient to induce functional dendritic spine synapses in aspiny neurons. *J Neurosci*. 2005;25(14):3560-3570.
96. Boeckers TM, Bockmann J, Kreutz MR, Gundelfinger ED. ProSAP/Shank proteins - a family of higher order organizing molecules of the postsynaptic density with an emerging role in human neurological disease. *J Neurochem*. 2002;81(5):903-910.
97. Papa M, Bundman M, Greenberger V, Segal M. Morphological analysis of dendritic spine development in primary cultures of hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(1): 1-11.
98. Zecevic N, Bourgeois JP, Rakic P. Changes in synaptic density in motor cortex of rhesus monkey during fetal and postnatal life. *Brain Res Dev Brain Res*. 1989;50(1):11-32.
99. Bourgeois JP, Rakic P. Changes of synaptic density in the primary visual cortex of the macaque monkey from fetal to adult stage. *J Neurosci*. 1993;13(7):2801-2820.
100. Grutzendler J, Kasthuri N, Gan WB. Long-term dendritic spine stability in the adult cortex. *Nature*. 2002;420(6917):812-816.
101. Xu T, Yu X, Perlik AJ, et al. Rapid formation and selective stabilization of synapses for enduring motor memories. *Nature*. 2009;462(7275):915-919.
102. Yang G, Pan F, Gan WB. Stably maintained dendritic spines are associated with lifelong memories. *Nature*. 2009;462(7275):920-924.
103. Yuste R, Majewska A. On the function of dendritic spines. *Neuroscientist*. 2001;7(5):387-395.
104. Noguchi J, Nagaoka A, Watanabe S, et al. In vivo two-photon uncaging of glutamate revealing the structure-function relationships of dendritic spines in the neocortex of adult mice. *J Physiol*. 2011;589(Pt 10):2447-2457.
105. Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P. Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*. 1998;21(3):545-559.
106. Dobrunz LE, Stevens CF. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron*. 1997;18(6):995-1008.
107. Fifková E, Anderson CL. Stimulation-induced changes in dimensions of stalks of dendritic spines in the dentate molecular layer. *Exp Neurol*. 1981;74(2):621-627.
108. Fifková E, Van Harrevelde A. Long-lasting morphological changes in dendritic spines of dentate granular cells following stimulation of the entorhinal area. *J Neurocytol*. 1977;6(2):211-230.
109. Chang FL, Greenough WT. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. *Brain Res*. 1984;309(1):35-46.
110. De Roo M, Klausner P, Garcia PM, Poglia L, Muller D. Spine dynamics and synapse remodeling during LTP and memory processes. *Prog Brain Res*. 2008;169:199-207.
111. Tønnesen J, Katona G, Rózsa B, Nägerl UV. Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci*. 2014;17(5):678-685.
112. Yuste R, Bonhoeffer T. Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1071-1089.
113. Ramón y Cajal S. *Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados*. Madrid: Moya; 1899
114. Yuste R, Denk W. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*. 1995;375(6533):682-684.

- 115.** Araya R, Eiselthal KB, Yuste R. Dendritic spines linearize the summation of excitatory potentials. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(49):18799-18804.
- 116.** Malenka RC, Nicoll RA. Long-term potentiation – a decade of progress?. *Science*. 1999; 285(5435):1870-1874.
- 117.** Koch C, Zador A. The function of dendritic spines: devices subserving biochemical rather than electrical compartmentalization. *J Neurosci*. 1993;13(2):413-422.
- 118.** Hebb D. *The organization of behavior: A neuropsychological theory*. New York: Wiley; 1949. Str. 26.
- 119.** Bailey CH, Kandel ER. Structural changes accompanying memory storage. *Annu Rev Physiol*. 1993;55:397-426.
- 120.** Leggio MG, Mandolesi L, Federico F, et al. Environmental enrichment promotes improved spatial abilities and enhanced dendritic growth in the rat. *Behav Brain Res*. 2005;163(1):78-90.
- 121.** Bourne J, Harris KM. Do thin spines learn to be mushroom spines that remember?. *Curr Opin Neurobiol*. 2007;17(3):381-386.
- 122.** van der Zee EA. Synapses, spines and kinases in mammalian learning and memory, and the impact of aging. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;50:77-85.
- 123.** Roberts TF, Tschida KA, Klein ME, Mooney R. Rapid spine stabilization and synaptic enhancement at the onset of behavioural learning. *Nature*. 2010;463(7283):948-952.
- 124.** Bourne JN, Harris KM. Coordination of size and number of excitatory and inhibitory synapses results in a balanced structural plasticity along mature hippocampal CA1 dendrites during LTP. *Hippocampus*. 2011;21(4):354-373.
- 125.** Watson DJ, Ostroff L, Cao G, Parker PH, Smith H, Harris KM. LTP enhances synaptogenesis in the developing hippocampus. *Hippocampus*. 2016;26(5):560-576.
- 126.** Fiala JC, Spacek J, Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders?. *Brain Res Brain Res Rev*. 2002;39(1):29-54.
- 127.** Vukšić M, Petanjek Z, Rašin MR, Kostović I. Perinatal growth of prefrontal layer III pyramids in Down syndrome. *Pediatr Neurol*. 2002;27(1):36-38.
- 128.** Vukšić M, Petanjek Z, Kostović I. Development of prefrontal layer III pyramidal neurons in infants with Down syndrome. *Translational Neuroscience*. 2011;2(3):225-232.
- 129.** Dorostkar MM, Zou C, Blazquez-Llorca L, Herms J. Analyzing dendritic spine pathology in Alzheimer's disease: problems and opportunities. *Acta Neuropathol*. 2015;130(1):1-19.
- 130.** Knobloch M, Mansuy IM. Dendritic spine loss and synaptic alterations in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol*. 2008;37(1):73-82.
- 131.** Fischer A, Sananbenesi F, Wang X, Dobbin M, Tsai LH. Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*. 2007;447(7141):178-182.
- 132.** Sotiropoulos I, Sousa N. Tau as the converging protein between chronic stress and Alzheimer's disease synaptic pathology. *Neurodegener Dis*. 2016;16(1-2):22-25.
- 133.** Morrison JH, Baxter MG. The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13(4):240-250.
- 134.** Maiti P, Manna J, McDonald MP. Merging advanced technologies with classical methods to uncover dendritic spine dynamics: A hot spot of synaptic plasticity. *Neurosci Res*. 2015;96:1-13.
- 135.** Abramowitz M, Davidson MW. *Molecular Expressions* [Internet]. 2007 - [pristupljeno 12.08.2020.]. Dostupno na: <https://micro.magnet.fsu.edu>
- 136.** Cox WH. Imprägation des centralen Nervensystems mit Quecksilbersalzen. *Arch Mikrosk Anat*. 1891;37:16–21.
- 137.** "resolution." Merriam-Webster.com [Internet]. 2020 - [pristupljeno 12.08.2020.]. Dostupno na: <https://www.merriam-webster.com>
- 138.** Sorra KE, Harris KM. Overview on the structure, composition, function, development, and plasticity of hippocampal dendritic spines. *Hippocampus*. 2000;10(5):501-511.
- 139.** Holtmaat A, Svoboda K. Experience-dependent structural synaptic plasticity in the mammalian brain. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10(9):647-658.

- 140.** Parekh R, Ascoli GA. Neuronal morphology goes digital: A research hub for cellular and system neuroscience. *Neuron*. 2013;77(6):1017–1038.
- 141.** Belichenko PV, Dahlström A. Studies on the 3-dimensional architecture of dendritic spines and varicosities in human cortex by confocal laser scanning microscopy and Lucifer yellow microinjections. *J Neurosci Methods*. 1995;57(1):55-61.
- 142.** Mancuso JJ, Chen Y, Li X, Xue Z, Wong ST. Methods of dendritic spine detection: from Golgi to high-resolution optical imaging. *Neuroscience*. 2013;251:129-140.
- 143.** Colello RJ, Tozer J, Henderson SC. Confocal laser scanning microscopic photoconversion: A new method to stabilize fluorescently labeled cellular elements for electron microscopic analysis. *Curr. Protoc. Neurosci*. 2012;58(1):2.15.1-2.15.12
- 144.** Vukšić M, Del Turco D, Bas Orth C, Burbach GJ, Feng G, Müller CM, Schwarzacher SW, Deller T. 3D-reconstruction and functional properties of GFP-positive and GFP-negative granule cells in the fascia dentata of the Thy1-GFP mouse. *Hippocampus*. 2008;18(4):364-375.
- 145.** Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 1994;263(5148):802–805.
- 146.** Ehrlich I, Malinow R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. *J Neurosci*. 2004;24(4):916-927.
- 147.** Aryal S. Microbe Notes [Internet]. 2018 - [pristupljeno 14.08.2020.]. Dostupno na: <https://microbenotes.com/electron-microscope-principle-types-components-applications-advantages-limitations>
- 148.** Severs NJ. Freeze-fracture electron microscopy. *Nat Protoc*. 2007;2(3):547-576.
- 149.** Castejón OJ, Valero CJ. Scanning electron microscopy of human cerebellar cortex. *Cell Tissue Res*. 1980;212:363–374.
- 150.** Kuwajima M, Spacek J, Harris KM. Beyond counts and shapes: studying pathology of dendritic spines in the context of the surrounding neuropil through serial section electron microscopy. *Neuroscience*. 2013;251:75-89.
- 151.** Bock DD, Lee WC, Kerlin AM, et al. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature*. 2011;471(7337):177-182.
- 152.** Mishchenko Y, Hu T, Spacek J, Mendenhall J, Harris KM, Chklovskii DB. Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. *Neuron*. 2010;67(6):1009-1020.
- 153.** Blumer C, Vivien C, Genoud C, et al. Automated analysis of spine dynamics on live CA1 pyramidal cells. *Med Image Anal*. 2015;19(1):87-97.
- 154.** Castano P, Gioia M, Barajon I, Rumio C, Miani A. A comparison between rapid Golgi and Golgi-Cox impregnation methods for 3-D reconstruction of neurons at the confocal scanning laser microscope. *Ital J Anat Embryol*. 1995;100 Suppl 1:613-622.
- 155.** Vecellio M, Schwaller B, Meyer M, Hunziker W, Celio MR. Alterations in Purkinje cell spines of calbindin D-28 k and parvalbumin knock-out mice. *Eur J Neurosci*. 2000;12(3):945-954.
- 156.** Wallace W, Bear MF. A morphological correlate of synaptic scaling in visual cortex. *J Neurosci*. 2004;24(31):6928-6938.
- 157.** Couch BA, DeMarco GJ, Gourley SL, Koleske AJ. Increased dendrite branching in AbetaPP/PS1 mice and elongation of dendrite arbors by fasudil administration. *J Alzheimers Dis*. 2010;20(4):1003-1008.
- 158.** Spiga S, Acquas E, Puddu MC, Mulas G, Lintas A, Diana M. Simultaneous Golgi-Cox and immunofluorescence using confocal microscopy. *Brain Struct Funct*. 2011;216(3):171-182.
- 159.** Zhang Y, Chen K, Baron M, et al. A neurocomputational method for fully automated 3D dendritic spine detection and segmentation of medium-sized spiny neurons. *Neuroimage*. 2010;50(4):1472-1484.
- 160.** Mukai H, Hatanaka Y, Mitsuhashi K, et al. Automated analysis of spines from confocal laser microscopy images: application to the discrimination of androgen and estrogen effects on spinogenesis. *Cereb Cortex*. 2011;21(12):2704-2711.
- 161.** Rodriguez A, Ehlenberger DB, Dickstein DL, Hof PR, Wearne SL. Automated three-dimensional detection and shape classification of dendritic spines from fluorescence microscopy images. *PLoS One*. 2008;3(4):e1997.

- 162.** Shen H, Sesack SR, Toda S, Kalivas PW. Automated quantification of dendritic spine density and spine head diameter in medium spiny neurons of the nucleus accumbens. *Brain Struct Funct*. 2008;213(1-2):149-157.
- 163.** Denk W, Strickler J, Webb W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248(4951):73–76.
- 164.** Yap K, Drakew A, Smilović D, Vukšić M, Rietsche M, Del Turco D, Deller T. The actin-modulatin protein Synaptopodin mediates long-term survival of dendritic spines. *bioRxiv*. 2020; 10.1101/2020.05.08.080374.
- 165.** Theer P, Hasan MT, Denk W. Two-photon imaging to a depth of 1000 microm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier. *Opt Lett*. 2003;28(12):1022-1024.
- 166.** Isshiki M, Tanaka S, Kuriu T, Tabuchi K, Takumi T, Okabe S. Enhanced synapse remodeling as a common phenotype in mouse models of autism. *Nat Commun*. 2014;5:4742.
- 167.** Conchello JA, Lichtman JW. Optical sectioning microscopy. *Nat Methods*. 2005;2(12):920-931.
- 168.** Yasumatsu N, Matsuzaki M, Miyazaki T, Noguchi J, Kasai H. Principles of long-term dynamics of dendritic spines. *J Neurosci*. 2008;28(50):13592-13608.
- 169.** Oheim M, Michael DJ, Geisbauer M, Madsen D, Chow RH. Principles of two-photon excitation fluorescence microscopy and other nonlinear imaging approaches. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(7):788-808.
- 170.** Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv Für Mikroskopische Anatomie*. 1873;9(1):413–418.
- 171.** Hell, SW, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters*. 1994;19(11):780.
- 172.** Schmidt R, Wurm CA, Jakobs S, Engelhardt J, Egner A, Hell SW. Spherical nanosized focal spot unravels the interior of cells. *Nat Methods*. 2008;5(6):539-544.
- 173.** Blom H, Brismar H. STED microscopy: increased resolution for medical research? *Journal of Internal Medicine*. 2014;276(6):560–578.
- 174.** Nägerl UV, Willig KI, Hein B, Hell SW, Bonhoeffer T. Live-cell imaging of dendritic spines by STED microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008;105(48):18982–18987.
- 175.** Mancuso JJ, Cheng J, Yin Z, et al. Integration of multiscale dendritic spine structure and function data into systems biology models. *Front Neuroanat*. 2014;8:130.
- 176.** Bethge P, Chéreau R, Avignone E, Marsicano G, Nägerl UV. Two-photon excitation STED microscopy in two colors in acute brain slices. *Biophysical Journal*. 2013;104(4):778–785.
- 177.** Loew LM, Hell SW. Superresolving dendritic spines. *Biophys J*. 2013;104(4):741-743.
- 178.** Adrian M, Kusters R, Wierenga CJ, Storm C, Hoogenraad CC, Kapitein LC. Barriers in the brain: resolving dendritic spine morphology and compartmentalization. *Front Neuroanat*. 2014;8:142.
- 179.** Huang B, Bates M, Zhuang X. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:993-1016.
- 180.** Huang B. Super-resolution optical microscopy: multiple choices. *Curr Opin Chem Biol*. 2010;14(1):10-14.
- 181.** Dani A, Huang B, Bergan J, Dulac C, Zhuang X. Superresolution imaging of chemical synapses in the brain. *Neuron*. 2010;68(5):843-856.
- 182.** Tatavarty V, Kim EJ, Rodionov V, Yu J. Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PLoS One*. 2009;4(11):e7724.
- 183.** Manley S, Gillette JM, Patterson GH, Shroff H, Hess HF, Betzig E, Lippincott-Schwartz J. High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods*. 2008;5(2):155–157.
- 184.** Sigal YM, Zhou R, Zhuang X. Visualizing and discovering cellular structures with super-resolution microscopy. *Science*. 2018;361(6405):880-887.
- 185.** Shtengel G, Galbraith JA, Galbraith CG, et al. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3125-3130.

- 186.** Balzarotti F, Eilers Y, Gwosch KC, et al. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*. 2017;355(6325):606-612.
- 187.** Chen F, Tillberg PW, Boyden ES. Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*. 2015;347(6221):543-548.
- 188.** Harapin J, Eibauer M, Medalia O. Structural analysis of supramolecular assemblies by cryo-electron tomography. *Structure*. 2013;21(9):1522–1530.
- 189.** Gu M, Bao H, Kang H. Fibre-optical microendoscopy. *J Microsc*. 2014;254(1):13-18.
- 190.** Bocarsly ME, Jiang WC, Wang C, Dudman JT, Ji N, Aponte Y. Minimally invasive microendoscopy system for in vivo functional imaging of deep nuclei in the mouse brain. *Biomed Opt Express*. 2015;6(11):4546-4556.
- 191.** Jung JC, Schnitzer MJ. Multiphoton endoscopy. *Opt Lett*. 2003;28(11):902-904.
- 192.** Jung JC, Mehta AD, Aksay E, Stepnoski R, Schnitzer MJ. In vivo mammalian brain imaging using one- and two-photon fluorescence microendoscopy. *Journal of Neurophysiology*. 2004;92(5):3121–3133.
- 193.** Bao H, Allen J, Pattie R, Vance R, Gu M. Fast handheld two-photon fluorescence microendoscope with a 475 microm x 475 microm field of view for in vivo imaging. *Opt Lett*. 2008;33(12):1333-1335.
- 194.** Barretto RPJ, Ko TH, Jung JC, Wang TJ, Capps G, Waters AC, Schnitzer MJ. Time-lapse imaging of disease progression in deep brain areas using fluorescence microendoscopy. *Nature Medicine*. 2011;17(2):223–228.
- 195.** Eggeling C, Willig KI, Sahl SJ, Hell SW. Lens-based fluorescence nanoscopy. *Q Rev Biophys*. 2015;48(2):178-243.
- 196.** Sahl SJ, Hell SW, Jakobs S. Fluorescence nanoscopy in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017;18(11):685-701.
- 197.** Heintzmann R, Gustafsson MGL. Subdiffraction resolution in continuous samples. *Nature Photonics*. 2009;3(7):362–364.
- 198.** Williams RW, Herrup K. The control of neuron number. *Annu Rev Neurosci*. 1988;11:423-453.
- 199.** Weaver CM, Hof PR, Wearne SL, Lindquist WB. Automated algorithms for multiscale morphometry of neuronal dendrites. *Neural Comput*. 2004;16(7):1353-1383.
- 200.** Wikipedia: the free encyclopedia [Internet]. St. Petersburg (FL): Wikimedia Foundation, Inc. 2001 – Deconvolution; [ažurirano 08.08.2020; pristupljeno 20.08.2020.]. Dostupno na: <https://en.wikipedia.org/wiki/Deconvolution>
- 201.** Cheng J, Zhou X, Miller E, et al. A novel computational approach for automatic dendrite spines detection in two-photon laser scan microscopy. *J Neurosci Methods*. 2007;165(1):122-134.
- 202.** Feng L, Zhao T, Kim J. neuTube 1.0: A new design for efficient neuron reconstruction software based on the SWC format. *eNeuro*. 2015;2(1):ENEURO.0049-14.2014.
- 203.** Cheng C, Trzcinski O, Doering LC. Fluorescent labeling of dendritic spines in cell cultures with the carbocyanine dye "DiI". *Front Neuroanat*. 2014;8:30.
- 204.** Kelly EA, Opanashuk LA, Majewska AK. The effects of postnatal exposure to low-dose bisphenol-A on activity-dependent plasticity in the mouse sensory cortex. *Front Neuroanat*. 2014;8:117.
- 205.** Urban BE, Xiao L, Dong B, Chen S, Kozorovitskiy Y, Zhang HF. Imaging neuronal structure dynamics using 2-photon super-resolution patterned excitation reconstruction microscopy. *J Biophotonics*. 2018;11(3):10.1002/jbio.201700171.
- 206.** Avila JA, Alliger AA, Carvajal B, Zanca RM, Serrano PA, Luine VN. Estradiol rapidly increases GluA2-mushroom spines and decreases GluA2-filopodia spines in hippocampus CA1. *Hippocampus*. 2017;27(12):1224-1229.
- 207.** Verbich D, Becker D, Vlachos A, Mundel P, Deller T, McKinney RA. Rewiring neuronal microcircuits of the brain via spine head protrusions – a role for synaptopodin and intracellular calcium stores. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4:38.

- 208.** Mikhaylova M, Bär J, van Bommel B, et al. Caldendrin directly couples postsynaptic calcium signals to actin remodeling in dendritic spines. *Neuron*. 2018;97(5):1110-1125.e14.
- 209.** Mulholland PJ, Teppen TL, Miller KM, Sexton HG, Pandey SC, Swartzwelder HS. Donepezil reverses dendritic spine morphology adaptations and Fmr1 epigenetic modifications in hippocampus of adult rats after adolescent alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*. 2018;42(4):706-717.
- 210.** Eyal G, Verhoog MB, Testa-Silva G, et al. Human cortical pyramidal neurons: From spines to spikes via models. *Front Cell Neurosci*. 2018;12:181.
- 211.** Dickstein DL, Dickstein DR, Janssen WG, et al. Automatic dendritic spine quantification from confocal data with Neurolucida 360. *Curr Protoc Neurosci*. 2016;77:1.27.1-1.27.21.
- 212.** Anton-Sanchez L, Larrañaga P, Benavides-Piccione R, Fernaud-Espinosa I, DeFelipe J, Bielza C. Three-dimensional spatial modeling of spines along dendritic networks in human cortical pyramidal neurons. *PLoS One*. 2017;12(6):e0180400.
- 213.** Luengo-Sanchez S, Fernaud-Espinosa I, Bielza C, Benavides-Piccione R, Larrañaga P, DeFelipe J. 3D morphology-based clustering and simulation of human pyramidal cell dendritic spines. *PLoS Comput Biol*. 2018;14(6):e1006221.
- 214.** Aguiar P, Sousa M, Szucs P. Versatile morphometric analysis and visualization of the three-dimensional structure of neurons. *Neuroinformatics*. 2013;11(4):393-403.
- 215.** Basu S, Plewczynski D, Saha S, et al. 2dSpAn: semiautomated 2-d segmentation, classification and analysis of hippocampal dendritic spine plasticity. *Bioinformatics*. 2016;32(16):2490-2498.
- 216.** Toharia P, Robles OD, Fernaud-Espinosa I, et al. PyramidalExplorer: A new interactive tool to explore morpho-functional relations of human pyramidal neurons. *Front Neuroanat*. 2016;9:159.
- 217.** Srinivasan A, Muñoz-Estrada J, Bourgeois JR, et al. BranchAnalysis2D/3D automates morphometry analyses of branching structures. *J Neurosci Methods*. 2018;294:1-6.
- 218.** Varando G, Benavides-Piccione R, Muñoz A, et al. MultiMap: A tool to automatically extract and analyse spatial microscopic data from large stacks of confocal microscopy images. *Front Neuroanat*. 2018;12:37.
- 219.** Koh IY, Lindquist WB, Zito K, Nimchinsky EA, Svoboda K. An image analysis algorithm for dendritic spines. *Neural Comput*. 2002;14(6):1283-1310.
- 220.** Benavides-Piccione R, Ballesteros-Yáñez I, DeFelipe J, Yuste R. Cortical area and species differences in dendritic spine morphology. *J Neurocytol*. 2002;31(3-5):337-346.
- 221.** Ballesteros-Yáñez I, Benavides-Piccione R, Elston GN, Yuste R, DeFelipe J. Density and morphology of dendritic spines in mouse neocortex. *Neuroscience*. 2006;138(2):403-409.
- 222.** Rodríguez A, Ehlenberger DB, Hof PR, Wearne SL. Rayburst sampling, an algorithm for automated three-dimensional shape analysis from laser scanning microscopy images. *Nat Protoc*. 2006;1(4):2152-2161.
- 223.** Bai W, Zhou X, Ji L, Cheng J, Wong ST. Automatic dendritic spine analysis in two-photon laser scanning microscopy images. *Cytometry A*. 2007;71(10):818-826.
- 224.** Zhang Y, Zhou X, Witt RM, Sabatini BL, Adjeroh D, Wong ST. Dendritic spine detection using curvilinear structure detector and LDA classifier. *Neuroimage*. 2007;36(2):346-360.
- 225.** Singh PK, Hernandez-Herrera P, Labate D, Papadakis M. Automated 3-D detection of dendritic spines from in vivo two-photon image stacks. *Neuroinformatics*. 2017;15(4):303-319.
- 226.** Swanger SA, Yao X, Gross C, Bassell GJ. Automated 4D analysis of dendritic spine morphology: applications to stimulus-induced spine remodeling and pharmacological rescue in a disease model. *Molecular Brain*. 2011;4(1):38.
- 227.** Bertling E, Ludwig A, Koskinen M, Hotulainen P. Methods for three-dimensional analysis of dendritic spine dynamics. *Methods Enzymol*. 2012;506:391-406.
- 228.** Dumitriu D, Laplant Q, Grossman YS, et al. Subregional, dendritic compartment, and spine subtype specificity in cocaine regulation of dendritic spines in the nucleus accumbens. *J Neurosci*. 2012;32(20):6957-6966.
- 229.** Dumitriu D, Rodríguez A, Morrison JH. High-throughput, detailed, cell-specific neuroanatomy of dendritic spines using microinjection and confocal microscopy. *Nat Protoc*. 2011;6(9):1391-1411.

- 230.** Selvas A, Coria SM, Kastanauskaite A, et al. Rat-strain dependent changes of dendritic and spine morphology in the hippocampus after cocaine self-administration. *Addict Biol.* 2017;22(1):78-92.
- 231.** Sala C, Segal M. Dendritic spines: the locus of structural and functional plasticity. *Physiol Rev.* 2014;94(1):141-188.
- 232.** Lang S, Drouvelis P, Tafaj E, Bastian P, Sakmann B. Fast extraction of neuron morphologies from large-scale SBFSEM image stacks. *J Comput Neurosci.* 2011;31(3):533-545.
- 233.** Risher WC, Ustunkaya T, Singh Alvarado J, Eroglu C. Rapid Golgi analysis method for efficient and unbiased classification of dendritic spines. *PLoS One.* 2014;9(9):e107591.
- 234.** Blazquez-Llorca L, Hummel E, Zimmerman H, et al. Correlation of two-photon in vivo imaging and FIB/SEM microscopy. *J Microsc.* 2015;259(2):129-136.
- 235.** Takahashi-Nakazato A, Parajuli LK, Iwasaki H, Tanaka S, Okabe S. Ultrastructural observation of glutamatergic synapses by focused ion beam scanning electron microscopy (FIB/SEM). *Methods Mol Biol.* 2019;1941:17-27.
- 236.** Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, DeFelipe J, Alonso-Nanclares L. 3D electron microscopy study of synaptic organization of the normal human transentorhinal cortex and its possible alterations in Alzheimer's disease. *eNeuro.* 2019;6(4):ENEURO.0140-19.2019.
- 237.** Ruszczycki B, Szepesi Z, Wilczynski GM, Bijata M, Kalita K, Kaczmarek L, Włodarczyk J. Sampling issues in quantitative analysis of dendritic spines morphology. *BMC Bioinformatics.* 2012;13(1):213.
- 238.** Ghani MU, Mesadi F, Kanık SD, Argunşah AÖ, Hobbiss AF, Israely I, Çetin M. Dendritic spine classification using shape and appearance features based on two-photon microscopy. *Journal of Neuroscience Methods.* 2017;279:13–21.
- 239.** Basu S, Saha PK, Roszkowska M, Magnowska M, Baczynska E, Das N, Włodarczyk J. Quantitative 3-D morphometric analysis of individual dendritic spines. *Scientific Reports.* 2018;8(1):3545.
- 240.** Xiao X, Djurisic M, Hoogi A, Sapp RW, Shatz CJ, Rubin DL. Automated dendritic spine detection using convolutional neural networks on maximum intensity projected microscopic volumes. *J Neurosci Methods.* 2018;309:25-34.
- 241.** Smirnov MS, Garrett TR, Yasuda R. An open-source tool for analysis and automatic identification of dendritic spines using machine learning. *PLoS One.* 2018;13(7):e0199589.
- 242.** Shi P, Huang Y, Hong J. Automated three-dimensional reconstruction and morphological analysis of dendritic spines based on semi-supervised learning. *Biomed Opt Express.* 2014;5(5):1541-1553.
- 243.** Wang S, Chen M, Li Y, Zhang Y, Han L, Wu J, Du S. Detection of dendritic spines using wavelet-based conditional symmetric analysis and regularized morphological shared-weight neural networks. *Computational and Mathematical Methods in Medicine.* 2015;2015:1–12.

Životopis

Rođen sam u Zagrebu 26.12.1995. godine. Osnovnoškolsko obrazovanje završio sam u Osnovnoj školi Otok u Zagrebu, a srednjoškolsko obrazovanje u Petoj gimnaziji Zagreb, matematičko-informatički smjer, gdje sam maturirao 2014. godine. Tijekom školovanja sam sudjelovao na raznim i mnogobrojnim natjecanjima, a na natjecanjima iz geografije, logike i latinskoga jezika došao sam do državne razine.

Iste godine upisao sam studij medicine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija bio sam demonstrator na Katedri za anatomiju i kliničku anatomiju, na Zavodu za patofiziologiju te na Katedri za internu medicinu, kao demonstrator na kolegiju Klinička propedeutika. Za postignut uspjeh tijekom studija medicine u akademskoj godini 2017./2018. dobio sam dekanovu nagradu. Tijekom studija uključio sam se u znanstveni rad na Odjelu za molekularnu dijagnostiku i genetiku u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu.

Od početka studija pa do sredine 2018. godine kao student sam radio u odvjetničkom uredu Milana Ličine u Zagrebu, a od sredine 2018. godine pa nadalje radim u odvjetničkom uredu Jasminke Trubelja u Zagrebu gdje obavljam posao tajnika i daktilografa te sam stekao veliko znanje u području prava.

Služim se engleskim i francuskim jezikom na naprednoj razini te započinjem učiti švedski jezik.

U slobodno vrijeme omiljene aktivnosti su mi čitanje knjiga i druženje sa svojim kućničem Mrkvicom.