Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Tatjana Bordukalo Nikšić

SEROTONINSKI RECEPTORI: GENSKA VARIJABILNOST, EKSPRESIJA I FUNKCIJA U UVJETIMA PROMIJENJENE HOMEOSTAZE SEROTONINA

Doktorska disertacija
predložena Biološkom odsjeku
Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
radi stjecanja akademskog stupnja
doktora prirodnih znanosti biologije

Zagreb, 2008.

Ova je disertacija izrađena
u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju
Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu,
pod voditeljstvom prof. dr. sc. Branimira Jerneja i dr. sc. Lipe Čičin-Šain, znanstvenih savjetnika IRB,
a u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog studija
pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu.

Zahvaljujem svima koji su na bilo koji način pomogli u izradi ovog rada, a naročito:

-mentorima prof. dr. sc. Branimiru Jerneju i dr. sc. Lipi Čičin-Šain na predloženoj temi, osiguranim materijalnim uvjetima za provedbu eksperimenata te na kritičkom čitanju teksta disertacije;

-članovima Laboratorija za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju na pomoći u provedbi pojedinih eksperimenata, a posebno mr. sc. Gordani Mokrović i dipl. inž. Mislavu Novokmetu za pomoć u eksperimentima kroničnog stresa;

-obitelji i prijateljima na strpljenju i podršci.

SADRŽAJ

POPIS KRATICA VII

SAŽETAK X

SUMMARY XI

1. UVOD 1

1.1. Serotonin u organizmu sisavaca 1
1.2. Serotoninski receptori 3
1.2.1. 5HT-1A receptori 6
1.2.2. 5HT-1B receptori 9
1.2.3. 5HT-2A receptori 11
1.3. Štakori s promijenjenom serotoninskom homeostazom 13
1.4. Serotonin i stres 15
1.5. Serotonin i alkohol 19

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 22

3. MATERIJALI I METODE 24

3.1. Istraživanja na animalnom modelu 24
3.1.1. Materijali
3.1.1.1. Eksperimentalne životinje 24
3.1.1.2. Kemikalije 24
3.1.1.3. Tehnička oprema i pribor 27
3.1.2. Metode 28
3.1.2.1. Odabir životinja 28
3.1.2.2. Izlaganje životinja stresu 30
3.1.2.3. Uzimanje i obrada uzoraka mozga 31
3.1.2.3.1. Priprema uzoraka tkiva za izolaciju RNA 31
3.1.2.3.2. Priprema uzoraka tkiva za Western analizu 31
3.1.2.3.3. Priprema uzoraka tkiva za receptorsko vezivanje 32
3.1.2.4. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore 32
3.1.2.4.1. Izolacija RNA 32
3.1.2.4.2. Reverzna transkripcija 33
3.1.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom 34
3.1.2.4.4. Detekcija i analiza PCR produkata 34
3.1.2.5. Analiza receptorskih proteina 35
3.1.2.5.1. Western analiza 35
3.1.2.5.2. Receptorsko vezivanje 36
3.1.2.6. Statistička obrada podataka 38
3.2. Istraživanja na humanoj populaciji 38
3.2.1. Materijali 38
3.2.1.1. Uzorci DNA 38
3.2.1.2. Kemikalije 39
3.2.2. Metode 39
3.2.2.1. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor 39

3.2.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor 41
3.2.2.3. Statistička obrada podataka 41

4. REZULTATI 42

4.1. Istraživanja na animalnom modelu 42
4.1.1. Odabir životinja 42
4.1.2. Analiza ekspresije mRNA za serotoninske receptore metodom semi-kvantitativnog RT-PCR 42
4.1.2.1. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora 44
4.1.2.1.1. 5HT-1A receptor 44
4.1.2.1.2. 5HT-1B receptor 45
4.1.2.1.3. 5HT-2A receptor 47
4.1.2.2. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora nakon izlaganja kroničnom stresu 49
4.1.3. Analiza receptorskih proteina 51
4.1.3.1. Western analiza 5HT-2A receptora 51
4.1.3.2. Analiza funkcije 5HT-1A receptora metodom receptorskog vezivanja 52
4.1.3.2.1. Razrada metode 52
4.1.3.2.2. Aktivnost 5HT-1A receptora u moždanoj kori Wistar-Zagreb 5HT štakora 56
4.2. Istraživanja na humanoj populaciji 61
4.2.1. Podaci o ispitanicima 61
4.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor 62
4.2.2.1. Razrada metode 62
4.2.2.2. Polimorfizam G861C u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika 63
4.2.3. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor 64
4.2.3.1. Razrada metode 64
4.2.3.2. Polimorfizam -1438AG u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika 65

5. RASPRAVA 67

5.1. Serotoninski receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora 68
5.1.1. Serotoninski receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora u fiziološkim uvjetima 68
5.1.1.1. 5HT-1A receptori 70
5.1.1.2. 5HT-1B receptori 76
5.1.1.3. 5HT-2A receptori 77
5.1.2. Serotoninski receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora nakon izlaganja kroničnom stresu 79
5.2. Polimorfizmi gena za serotoninske receptore u alkoholizmu 83
5.2.1. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor u alkoholizmu 84
5.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor u alkoholizmu 86

6. ZAKLJUČCI 89

7. LITERATURA 91

8. ŽIVOTOPIS 107

POPIS KRATICA

ALDH2	***al**dehyd **deh**ydrogenase-**2***	aldehid-dehidrogenaza 2
AMV	***a**vian **m**yeloblastosis **v**irus*	
BLB	***bl**ocking **b**uffer*	pufer za blokiranje
B_{max}	***max**imal **b**ound*	maksimalna količina vezanog liganda
bp	***b**ase **p**airs*	parovi baza
cDNA	***c**omplementary **d**eoxyribo**n**ucleic **a**cid*	komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
cpm	***c**ounts **p**er **m**inute*	otkucaji u minuti
CRH	***c**orticotropin-**r**eleasing **h**ormone*	hormon za oslobađanje kortikotropina
CMS	***c**hronic **m**ild **s**tress*	kronični blagi stres
CUS	***c**hronic **u**npredictable **s**tress*	kronični nepredvidivi stres
DEPC	***die**thyl**p**yro**c**arbonate*	dietil-pirokarbonat
DG	***d**entate **g**yrus*	dentatni girus
DILB	***dil**ution **b**uffer*	pufer za razrjeđivanje
DNA	***d**eoxyribo**n**ucleic **a**cid*	deoksiribonukleinska kiselina
dNTP	***d**eoxyribo**n**ucleoside **t**ri**p**hosphate*	deoksiribonukleozid-trifosfat
DOB	*1-(2,5-**d**imeth**o**xy-4-**b**romophenyl) 2-aminopropane*	1-(2,5-dimetoksi)-4-bromofenil) 2-aminopropan
DOI	*1-(2,5-**d**imeth**o**xy-4-**i**odophenyl) 2-aminopropane*	1-(2,5-dimetoksi)-4-jodofenil) 2-aminopropan
DOM	*1-(2,5-**d**imeth**o**xy-4-**m**ethylphenyl) 2-aminopropane*	1-(2,5-dimetoksi)-4-metilfenil) 2-aminopropan
DRE	***d**ual **r**epressor **e**lement*	dvostruki represorski element
EDTA	***e**thylene-**d**iamino**t**etraacetic **a**cid*	etilen-diamino tetraoctena kiselina
FRAP	***5**-HT **r**eceptor-**a**ssociated **p**roteins*	proteini povezani s 5HT receptorima
GABA	***γ-a**mino**b**utyric **a**cid*	γ-amino-maslačna kiselina

GAPDH	***g**lycer**a**ldehide-**p**hosphate **de**h**y**drogenase*	gliceraldehid-fosfat-dehidrogenaza
GIP	***G**-protein coupled receptors-**i**nteracting **p**roteins*	proteini povezani s GPCR
GPCR	***G**-**p**rotein **c**oupled **r**eceptor*	receptor povezan s G-proteinom
GR	***g**lucocorticoid **r**eceptor*	glukokortikoidni receptor
5HIAA	***5**-**h**ydroxy**i**ndole**a**cetic **a**cid*	5-hidroksiindol-octena kiselina
HPA	***h**ypothalamic-**p**ituitary-**a**drenocortical (axis)*	(os) hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda
hpc	***h**i**pp**o**c**ampus*	hipokampus
5HT	***5**-**h**ydroxy**t**ryptamine*	5-hidroksitriptamin (serotonin)
5HTt	***5**-**h**ydroxy**t**ryptamine **t**ransporter*	5-hidroksitriptaminski prijenosnik (serotoninski prijenosnik)
kb		**k**ilo**b**aza
K_d		**k**onstanta **d**isocijacije
kDa		**k**ilo**da**lton
KO	***k**nock-**o**ut*	
LH	***l**earned **h**elplessness*	naučena bespomoćnost
LSD	***l**y**s**ergic acid **d**iethylamide*	dietilamid lizergične kiseline
M	***m**ean*	srednja vrijednost
mCPP	***m**eta-**c**hloro**p**henyl**p**iperazine*	meta-klorofenilpiperazin
MR	***m**ineralocorticoid **r**eceptor*	mineralokortikoidni receptor
mRNA	***m**essenger **r**ibo**n**ucleic **a**cid*	glasnička ribonukleinska kiselina
NMDA	***N**-**m**ethyl-**D**-**a**spartate*	N-metil-D-aspartat
8-OH-DPAT	***8**-hydroxy-2-(**d**i-N-**p**ropyl**a**mino) **t**etralin*	8-hidroksi-2-(di-N-propilamino)tetralin
oligo $d(T)_n$		**oligo**-**d**eoksi**t**imidin

PAGE	***p**olyacril**a**mide **g**el **e**lectrophoresis*	elektroforeza na poliakrilamidnom gelu
PBS	***p**hosphate **b**uffered **s**aline*	
PCR	***p**olymerase **c**hain **r**eaction*	lančana reakcija polimerazom
PRP	***p**latelet-**r**ich **p**lasma*	plazma bogata trombocitima
PTSP		**p**ost**t**raumatski **s**tresni **p**oremećaj
RFLP	***r**estriction **f**ragment **l**ength **p**olymorphism*	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata
RNA	***r**ibonucleic **a**cid*	ribonukleinska kiselina
RNasIn	***r**ibo**n**ucle**as**e **in**hibitor*	inhibitor ribonukleaza
RT-PCR	***r**everse **t**ranscription-**p**olymerase **c**hain **r**eaction*	lančana reakcija polimerazom nakon reverzne transkripcije
SD		**s**tandardna **d**evijacija
SDS	***s**odium **d**odecyl **s**ulfate*	natrijev dodecil-sulfat
SNP	***s**ingle **n**ucleotide **p**olymorphism*	polimorfizam jednog nukleotida
SSRI	***s**elective **s**erotonin **r**euptake **i**nhibitor*	selektivni inhibitor povratnog unosa serotonina
str	***str**iatum*	strijatum (prugasto tijelo)
Taq	***T**hermus **aq**uaticus*	
TBS	***T**ris-**b**uffered **s**aline*	
TFMPP	*1-(3-**t**rif**l**uoro**m**ethyl**p**henyl) **p**iperazine*	1-(3-trifluorometilfenil)piperazin
UV	***u**ltra**v**iolet*	ultraljubičasto
VTA	***v**entral **t**egmental **a**rea*	ventralno područje tegmentuma
WZ-5HT štakor		**W**istar-**Z**agreb **5HT** štakor

SAŽETAK

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorska disertacija

SEROTONINSKI RECEPTORI: GENSKA VARIJABILNOST, EKSPRESIJA I FUNKCIJA U UVJETIMA PROMIJENJENE HOMEOSTAZE SEROTONINA

Tatjana Bordukalo Nikšić
Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju
Zavod za molekularnu biologiju
Institut "Ruđer Bošković", Bijenička cesta 54, HR-10000 Zagreb

Serotonin (5HT) je uključen u regulaciju brojnih fizioloških funkcija i raznih oblika ponašanja, kao i u etiopatogenezu raznih psihijatrijskih poremećaja. Učinci serotonina posredovani su s 15 različitih serotoninskih receptora. U ovom radu, željeli smo pobliže istražiti tri najznačajnija serotoninska receptora: 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A, i to na dvije razine: eksperimentalnom animalnom modelu (štakor) i na humanoj populaciji.

Prvi, eksperimentalni dio rada, obuhvaća istraživanja serotoninskih receptora u originalnom animalnom modelu – sublinijama štakora s konstitucijski promijenjenom serotoninskom homeostazom (Wistar-Zagreb 5HT štakori, WZ-5HT štakori), u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja životinja kroničnom stresu. Razine mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor u nekoliko moždanih regija (hipokampus, strijatum, kora) između dviju sublinija uspoređene su pomoću semi-kvantitativnog RT-PCR, dok su receptorski proteini istraživani kvantitativnom Western analizom (5HT-2A receptor), odnosno metodom receptorskog vezivanja (5HT-1A receptor). U fiziološkim uvjetima nisu pronađene razlike između sublinija u ekspresiji serotoninskih receptora u ispitivanim regijama, ni na razini mRNA ni na razini količine proteina ili njihove funkcije. Izlaganje životinja kroničnom stresu dovelo je do smanjenja razine mRNA za 5HT-1A receptor u čeonoj kori 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora, iako s graničnom značajnošću.

Drugi, klinički dio rada, bio je usmjeren na istraživanje polimorfizama 5HT-1B (G861C) i 5HT-2A (-1438AG) receptora u zdravih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu. Nisu pronađene statistički značajne razlike u distribuciji genotipova odnosno alela navedenih polimorfizama između dviju skupina ispitanika, kao ni između podskupina oboljelih osoba s obzirom na dijagnozu (alkoholizam tipa I ili II). Primijećena je tendencija razlici u frekvencijama genotipova polimorfizma G861C koja doduše nije dosegla statističku značajnost.

(107 stranica, 33 slike, 26 tablica, 235 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Rad je pohranjen u Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, 10000 Zagreb, Hrvatska.

Ključne riječi: serotoninski receptori/WZ-5HT štakor/kronični stres/ovisnost o alkoholu/ receptorsko vezivanje/polimorfizam gena

Mentori: Prof. dr.sc. Branimir Jernej, znanstveni savjetnik IRB
Dr. sc. Lipa Čičin-Šain, znanstvena savjetnica IRB

Ocjenjivači: Doc. dr. sc. Dubravka Hranilović, Prof. dr. sc. Branimir Jernej, Dr. sc. Lipa Čičin-Šain, znan. savj., Prof. dr. sc. Branka Janićijević, Dr. sc. Dorotea Mück-Šeler, znan. savj.

Rad prihvaćen: 12. studenog 2008.

SUMMARY

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

SEROTONIN RECEPTORS: GENE VARIABILITY, EXPRESSION AND FUNCTION IN ALTERED SEROTONIN HOMEOSTASIS

Tatjana Bordukalo Nikšić
Laboratory of Neurochemistry and Molecular Neurobiology
Department of Molecular Biology
"Ruđer Bošković" Institute, Bijenička 54, HR-10000 Zagreb

Serotonin (5HT) is involved in the regulation of numerous physiological functions and types of behavior, as well as in etiopathogenesis of different psychiatric disorders. Its effects are mediated by 15 different receptors. In this work, we explored three most important serotonin receptors: 5HT-1A, 5HT-1B and 5HT-2A at two levels: experimental animal model (rat) and at the level of human population.

The experimental part of this work includes research of the serotonin receptors at the original animal model – sublines of rats with constitutionally altered serotonin homeostasis (Wistar-Zagreb 5HT rats, WZ-5HT rats), in physiological conditions and after exposure of the animals to the chronic stress. In two sublines, levels of mRNA for 5HT-1A, 5HT-1B and 5HT-2A receptor in several brain regions (hippocampus, striatum, cortex) were compared by semi-quantitative RT-PCR, while receptor proteins were investigated using quantitative Western blot analysis (5HT-2A) or by radioligand binding method (5HT-1A). In physiological conditions, we found no differences in expression of serotonin receptors in investigated brain regions between the sublines, neither at mRNA or at the protein level. Exposure of the animals to the chronic stress caused lowered 5HT-1A mRNA levels in prefrontal cortex of low-5HT subline of WZ-5HT rats, although with marginal level of significance.

The clinical part of the work was directed to the investigation of the polymorphisms of 5HT-1B (G861C) and 5HT-2A (-1438AG) receptors in healthy and alcohol-dependent subjects. No statistically significant differences in distributions of genotypes or allelles were found between two groups, as well as between subgroups of patients regarding their diagnosis (alcoholism type I or II). A tendency toward different distributions of genotypes of G861C polymorphism was observed, which however did not reach statistical significance.

(107 pages, 33 figures, 26 tables, 235 references, original in Croatian)

Thesis deposited in National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, 10000 Zagreb, Croatia.

Keywords: serotonin receptors/WZ-5HT rat/chronic stress/alcohol dependence
receptor binding/gene polymorphism

Supervisors: Prof. Branimir Jernej, MD, senior scientist, RBI
Lipa Čičin-Šain, PhD, senior scientist, RBI

Reviewers: Dr. Dubravka Hranilović, associate professor, Prof. dr. Branimir Jernej, Dr. Lipa Čičin-Šain, senior scientist, Prof. dr. Branka Janićijević, Dr. Dorotea Mück-Šeler, senior scientist

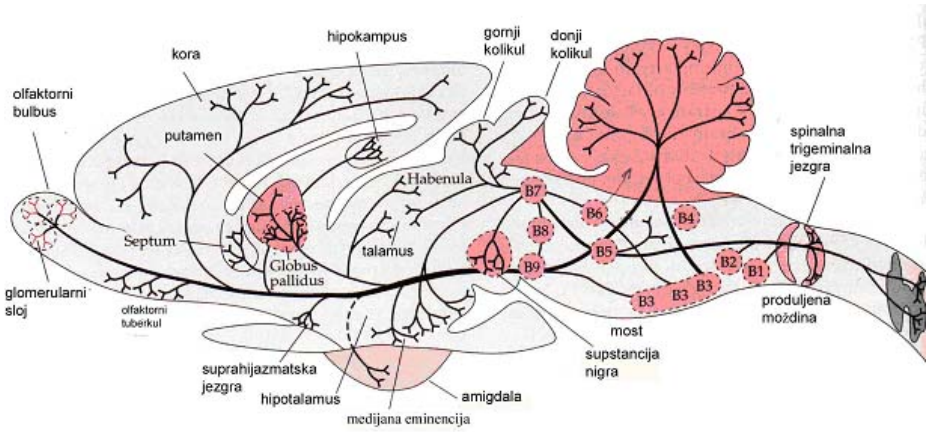
Thesis accepted: 12th Novembre 2008

1. UVOD

1.1. SEROTONIN U ORGANIZMU SISAVACA

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biogeni monoamin koji djeluje na velik broj fizioloških funkcija, kao što su kardiovaskularna regulacija, disanje i termoregulacija, kao i na različite vrste ponašanja, uključujući regulaciju cirkadijanih ritmova (npr. ciklusa spavanja i budnosti), apetita, agresije, seksualnog ponašanja, osjetljivosti na bol i kognitivnih funkcija kao što su pamćenje i učenje (Lucki, 1998). Nadalje, poremećaji funkcije serotoninskog sustava povezuju se s pojavama nekih psihičkih bolesti, kao što su depresija, ovisnosti, razne vrste anksioznih poremećaja, shizofrenija, anoreksija nervoza, te s osobinama ličnosti kao što su agresivnost, impulzivnost ili poremećaj pažnje.

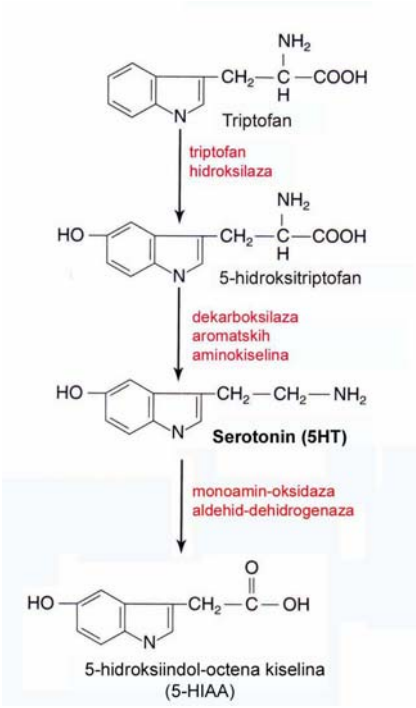
U središnjem živčanom sustavu, serotonin se sintetizira u području jezgara rafe koje se nalaze u moždanom deblu. Jezgre rafe čini devet grupa tijela neurona, označenih kao B_1-B_9. Većina ovih neurona su serotonergični neuroni, koji odašilju projekcije u gotovo sve dijelove mozga. Grupe B_1-B_5 čine tzv. kaudalni sustav serotonergičnih neurona, koji odašilje projekcije u kralježničnu moždinu, dok grupe B_6-B_9 čine rostralni serotonergični sustav koji šalje projekcije u veliki mozak. Među njima, najveće su grupe B_6 i B_7, koje se nazivaju i dorzalne jezgre rafe te B_8, tzv. medijane jezgre rafe (Jacobs i Azmitia, 1992, Feldman i sur., 1997, Gaspar i sur., 2003). Ukupan broj serotonergičnih neurona relativno je malen – u štakora ih je oko 20 000, u usporedbi s ukupno oko 10^{11} neurona u središnjem živčanom sustavu, međutim, serotonergični neuroni odašilju vrlo gustu mrežu aksona koji inerviraju gotovo sva područja mozga kao i kralježničnu moždinu (Gaspar i sur., 2003, v. sliku 1.1.).



Slika 1.1. Serotonergične jezgre i njihova projekcijska područja u mozgu štakora (prema Feldman i sur., 1997)

U mozgu sisavaca, serotoninska vlakna pojavljuju se među prvima u razvoju živčanog sustava i inerviraju korteks od samog početka formiranja mozga (Azmitia, 1999). U štakora, prvi serotonergični neuroni pojavljuju se već 12. embrionalnog dana, kad se počinju razvijati jezgre rafe. Istovremeno se razvijaju i projekcije ovih neurona u druga područja mozga (Lauder, 1995), te započinje ekspresija serotoninskih receptora. Među prvima se pojavljuju 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2B receptor, dok se 5HT-2A i 5HT-2C receptori eksprimiraju nešto kasnije (Gaspar i sur., 2003). Serotonin igra jednu od glavnih uloga u razvoju plastičnosti mozga djelovanjem na funkciju neurona, njihovo sazrijevanje, proliferaciju i apoptozu (Azmitia, 2001). Između ostalog, serotonin potiče glija-stanice na lučenje faktora rasta S-100β i time stimulira rast živčanih vlakana te sudjeluje u održavanju citoskeleta neurona (Whitaker-Azmitia, 2001; Azmitia, 2007).

Serotonin se sintetizira iz aminokiseline L-triptofana, koji se djelovanjem enzima triptofan-hidroksilaze prevodi u 5-hidroksitriptofan, a potom, djelovanjem dekarboksilaze aromatskih aminokiselina, u 5-hidroksitriptamin. Ovaj proces odvija se samo u stanicama koje sadrže triptofan-hidroksilazu, a to su, u prvom redu, serotonergični neuroni u jezgrama rafe moždanog debla te, na periferiji, enterokromafine stanice tankog crijeva. U razgradnji serotonina glavnu ulogu ima enzim monoamin-oksidaza, čijim djelovanjem nastaje 5-hidroksiindolacetaldehid. On se najvećim dijelom posredstvom aldehid-dehidrogenaze prevodi u konačni metabolit serotonina, 5-hidroksiindol-octenu kiselinu (5HIAA, v. sliku 1.2.).



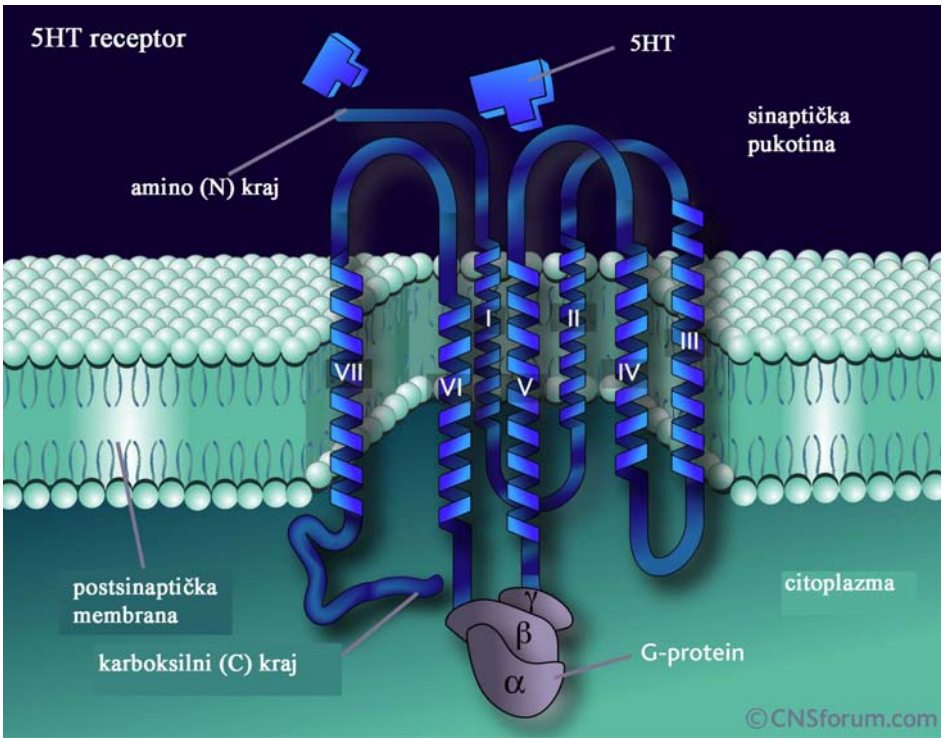
Slika 1.2. Sinteza i razgradnja serotonina

Aktivnost serotoninskog sustava u mozgu ovisna je o tri različita mehanizma: (1) sintezi i razgradnji serotonina, što reguliraju sintetski enzim triptofan-hidroksilaza i razgradni enzim, monoamin-oksidaza; (2) povratnom unosu serotonina iz sinaptičke pukotine u presinaptički neuron, što regulira serotoninski prijenosnik; i (3) funkciji i gustoći serotoninskih receptora (Popova, 2006). Od svega navedenog, serotoninski receptori posebno su interesantni, budući da oni posreduju učinke serotonina.

1.2. SEROTONINSKI RECEPTORI

Postojanje receptora za serotonin prvi su ustanovili Gaddum i Picarelli (1957) koji su u tankom crijevu sisavaca opisali dva tipa receptora: tzv. D- i M-receptor. Ubrzo su uslijedile mnoge farmakološke studije pomoću tehnika receptorskog vezivanja, koje su pokazale da je broj različitih serotoninskih receptora znatno veći. Klasifikacija serotoninskih receptora mijenjala se s novim otkrićima tijekom 80-tih i 90-tih godina prošlog stoljeća, da bi danas važeća nomenklatura razlikovala petnaest različitih receptora (Green, 2006). Prema svojim farmakološkim svojstvima, aminokiselinskom slijedu, genskoj strukturi i mehanizmima prijenosa signala, serotoninski receptori grupiraju se u sedam obitelji, koje se označavaju brojevima od 5HT-1 do 5HT-7. Osim 5HT-3 receptora, koji su ionski kanali, svi ostali 5HT receptori su metabotropni, tj. djeluju putem gvanin-nukleotid vezujućih proteina (G-proteina;

Raymond i sur., 2001). Po osnovnoj strukturi, slični su ostalim receptorima povezanim s G-proteinima (engl. *G-protein-coupled receptors*, GPCR): to su integralni membranski proteini sa sedam hidrofobnih transmembranskih domena, tri unutarstanične i tri izvanstanične petlje. Amino-kraj orijentiran je prema izvanstaničnom prostoru, dok je karboksilni kraj orijentiran prema citoplazmi (slika 1.3.).

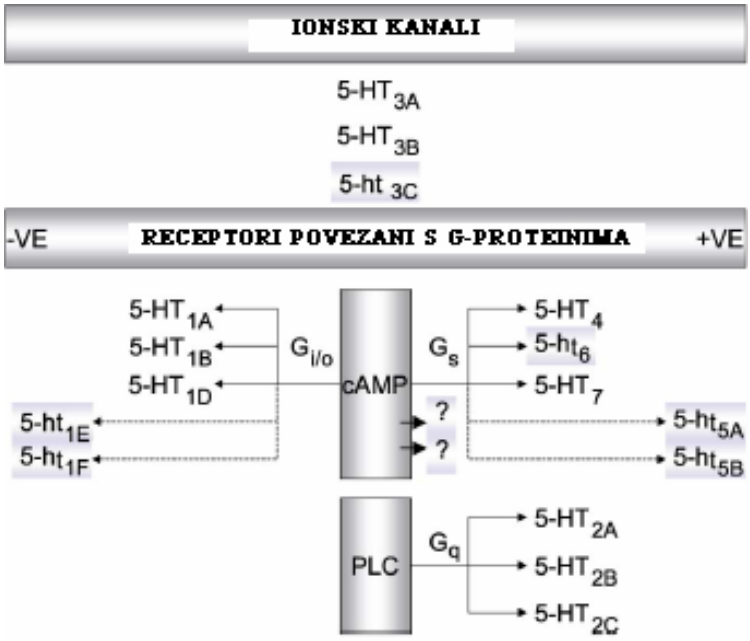


Slika 1.3. Položaj metabotropnog serotoninskog receptora u staničnoj membrani (izvor: www.cnsforum.com)

Metabotropni 5HT receptori mogu se, nadalje, grupirati u četiri grupe prema glavnim drugim glasnicima: 5HT-1 receptori (povezani s $G\alpha_i/G\alpha_o$ proteinima i inhibicijom adenilat-ciklaze), 5HT-2 receptori (povezani s $G\alpha_q$ proteinima i aktivacijom fosfolipaze C; 5HT-2A, 5HT-2B, 5HT-2C), grupa 5HT-4, 5HT-6 i 5HT-7 receptora (povezani s Gs proteinima i aktivacijom adenilat-ciklaze); te 5ht-5 receptori čiji mehanizam djelovanja još nije u potpunosti razjašnjen (Bockaert i sur., 2006b; Raymond i sur., 2001, slika 1.4.)

Istraživanja regulacije i funkcije 5HT receptora dovela su u novije vrijeme do otkrića proteina povezanih s 5HT receptorima (engl. *5HT receptor-associated proteins*, FRAP), a koji upravljaju unutarstaničnom raspodjelom 5HT receptora, posreduju u prijenosu signala i sudjeluju u desenzitizaciji 5HT receptora. Zajedno s 5HT receptorima, FRAP čine strukturno-funkcionalne proteinske komplekse zvane receptosomi (Xia i sur., 2006).

Obitelj 5HT-1 receptora sastoji se od 5 članova, imenovanih 5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-1D, 5ht-1E i 5ht-1F (nekadašnji 5HT-1C nakon novijih istraživanja uvršten je u grupu 5HT-2 receptora). Od nabrojanih, funkcija 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-1D receptora dokazana je u raznim tkivima iz različitih vrsta, dok su geni za 5ht-1E i 5ht-1F receptore klonirani, ali njihova funkcija još nije utvrđena, zbog čega se ovi receptori još uvijek obilježavaju malim slovom (Lanfumey i Hamon, 2004). Svima je zajednički mehanizam djelovanja preko $G_{i/o}$-proteina i inhibicija adenilat-ciklaze (Raymond i sur., 2001). Ovu skupinu receptora karakterizira visok afinitet za serotonin, visok stupanj homologije aminokiselinskog slijeda, te odsutnost introna u genima koji ih kodiraju (Barnes i Sharp, 1999).



Slika 1.4. Shematska podjela serotoninskih receptora prema mehanizmu djelovanja (prema Hoyer i sur., 2002).

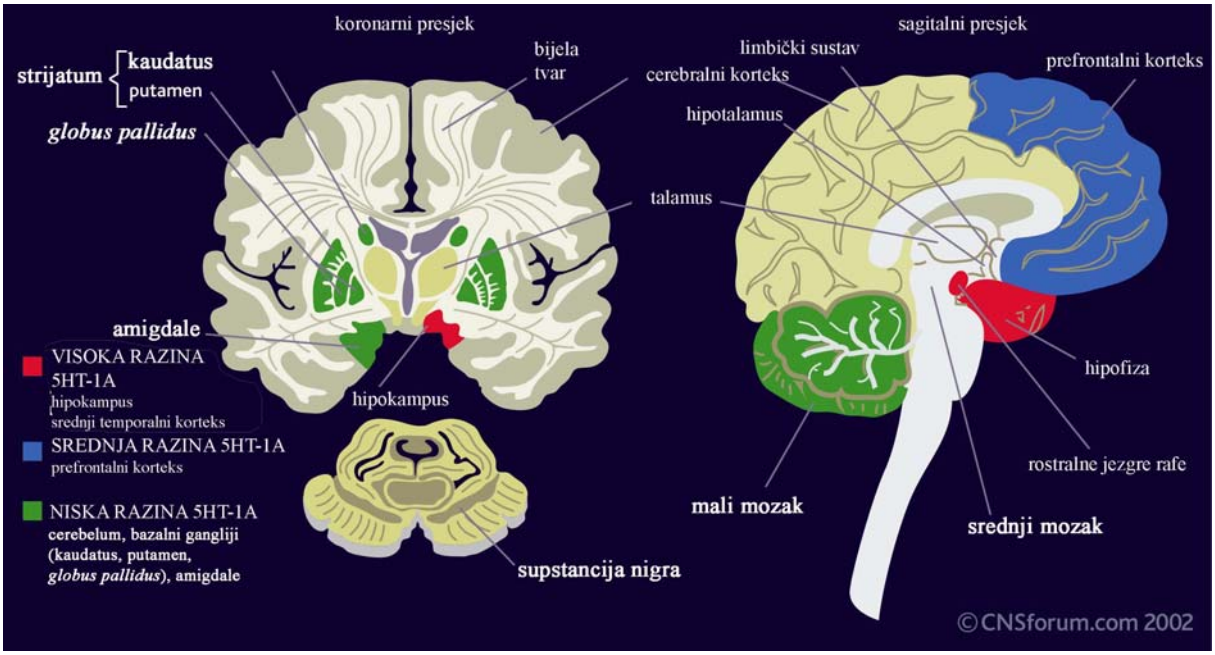
Heterogenost serotoninskih receptora dodatno povećavaju brojni polimorfizmi gena koji ih kodiraju te posttranskripcijske (uređivanje mRNA) i posttranslacijske (glikozilacija, palmitoilacija, fosforilacija) modifikacije. Brojne studije povezuju genske polimorfizme i posttranskripcijske promjene serotoninskih receptora s raznim patološkim stanjima. Od genskih polimorfizama, oko 80% raznih varijacija u nukleotidnom slijedu gena za 5HT receptore odnosi se na polimorfizme jednog nukleotida (engl. *single nucleotide polymorphism* – SNP) (Davies i sur., 2006).

1.2.1. 5HT-1A receptori

Od svih serotoninskih receptora najviše je proučavan 5HT-1A receptor, zahvaljujući postojanju specifičnih agonista koji omogućuju farmakološke studije. Kao i ostale 5HT-1 receptore, i ovoga karakterizira visok afinitet za serotonin, a također i visok afinitet za azapironske spojeve koji djeluju kao anksiolitici (buspiron, gepiron, ipsapiron) te za (±)8-hidroksi-2-(di-N-propilamino)tetralin (8-OH-DPAT). Svi nabrojani spojevi su specifični agonisti ovog receptora (Raymond i sur., 2001).

Kloniranje gena za 5HT-1A receptor štakora pokazalo je da se radi o genu bez introna koji kodira za protein od 422 aminokiseline, približne molekulske mase od 46,4 kDa (Albert i sur., 1990). U ljudi, gen za ovaj receptor nalazi se na 5. kromosomu (5q11.2-q13). Osim u mozgu, gen je eksprimiran i u limfnim tkivima, bubregu i crijevima (Pucadyil i sur., 2005).

Najveća gustoća 5HT-1A receptora ustanovljena je u limbičkim dijelovima mozga, naročito hipokampusu, amigdalama, septumu i kortikalnim područjima (naročito cingulatnom i entorinalnom korteksu), kao i u jezgrama rafe (dorzalnim i medijanim), dok je najslabija zastupljenost u ekstrapiramidalnim područjima kao što su bazalni gangliji, supstancija nigra i cerebelum (Pucadyil i sur., 2005; Barnes i Sharp, 1999, slika 1.5.). Distribucija mRNA za 5HT-1A receptor odgovara distribuciji receptorskih proteina (Pompeiano i sur., 1992).



Slika 1.5. Distribucija 5HT-1A receptora u mozgu čovjeka (izvor: www.cnsforum.com)

Navedene regije središnjeg živčanog sustava sudjeluju u regulaciji raznih fizioloških funkcija, kao što su termoregulacija, kardiovaskularne funkcije, raspoloženje, apetit, ciklus spavanja – budnosti i seksualno ponašanje (Pucadyil i sur., 2005). Osim toga, 5HT-1A receptori imaju i značajnu ulogu u konsolidaciji memorije (Luna-Munguía i sur., 2005; Meneses i Perez-Garcia, 2007), dok se u testovima agresivnosti pokazalo da njihova aktivnost smanjuje agresivno ponašanje (Popova i sur., 2007).

U jezgrama rafe, 5HT-1A receptori smješteni su presinaptički, na somi i dendritima, gdje djeluju kao autoreceptori i sudjeluju u inhibiciji aktivnosti serotonergičnih neurona, i to uzrokovanjem hiperpolarizacije membrane neurona dvostrukim mehanizmom: povećanjem provodnosti membrane za ione K^+ i smanjenjem struje iona Ca^{2+} (Pineyro i Blier, 1999). U drugim regijama (npr. hipokampusu) smješteni su postsinaptički i kao heteroreceptori reguliraju aktivnost drugih (neserotonergičnih) neurona u tim regijama (Barnes i Sharp, 1999) te otpuštanje drugih neurotransmitera (acetil-kolina, noradrenalina, GABA; Fink i Göthert, 2007). Mehanizam prijenosa signala razlikuje se za presinaptičke i postsinaptičke 5HT-1A receptore, kao i za pojedine regije mozga – npr. u jezgrama rafe, aktivacija 5HT-1A autoreceptora ne dovodi do inhibicije adenilat-ciklaze kao u drugim regijama mozga (Clarke i sur., 1996).

Učinci aktivacije 5HT-1A receptora odvijaju se na tri razine. Na staničnoj razini, u pravilu dolazi do inhibicije adenilat-ciklaze posredstvom G_i proteina (iako, ovi receptori koriste i druge mehanizme djelovanje – v. Raymond i sur., 2001). Na elektrofiziološkoj razini, zbog mijenjanja propusnosti ionskih kanala, dolazi do hiperpolarizacije membrane, a na neurokemijskoj, do inhibicije otpuštanja serotonina i glutamata, uz istodobno pojačano otpuštanje noradrenalina i acetil-kolina. Od bihevioralnih učinaka aktivacije 5HT-1A receptora najčešće se spominju anksiolitički i antidepresivni učinak, hipotermija, i serotoninski bihevioralni sindrom (Barnes i Sharp, 1999). Osim toga, i presinaptički i postsinaptički 5HT-1A receptori igraju kompleksnu ulogu u kognitivnim procesima, naročito pamćenju (Meneses i Perez-Garcia, 2007).

U sklopu istraživanja funkcije ovih receptora, uzgojeni su miševi s inaktiviranim genom za 5HT-1A receptor (tzv. *knockout* miševi, KO). Za ove je životinje karakterističan anksiozni fenotip (uočljiv već kod +/- heterozigota), pojačana reaktivnost na stres i teškoće u učenju, te promijenjena reaktivnost na neke psihofarmake, kao što su fluoksetin i diazepam (Toth, 2003). Suprotno tome, miševi s prekomjernom ekspresijom ovog receptora (model komplementaran 5HT-1A KO) pokazuju smanjenu anksioznost, što ukazuje na ključnu ulogu

5HT-1A receptora u kontroli anksioznog ponašanja (Kusserow i sur., 2004). Čini se da su za regulaciju anksioznog ponašanja ključni postsinaptički 5HT-1A receptori u čeonim regijama mozga, i to u određenim periodima razvoja (Gross i sur., 2002). Također, stresna iskustva iz ranog postnatalnog perioda utječu na gustoću 5HT-1A receptora u odrasloj dobi (Stamatakis i sur., 2006; Vicentic i sur., 2006).

Farmakološki su 5HT-1A receptori dobro istraženi korištenjem ranije spomenutog specifičnog agonista, 8-OH-DPAT, koji se dugo vremena smatrao njihovim selektivnim agonistom. Otkrićem i karakterizacijom 5HT-7 receptora ustanovljeno je da se ovaj ligand u manjoj mjeri veže i na te receptore (Raymond i sur., 2001). Od ostalih 5HT-1A agonista treba spomenuti azapironske spojeve (buspiron, gepiron, ipsapiron, tandospiron), koji se koriste kao psihoaktivna sredstva s anksiolitičkim i antidepresivnim djelovanjem (Hensler, 2003). U novije vrijeme razvijeni su i selektivni antagonisti 5HT-1A receptora, kao npr. N-{2-[4-2-metoksifenil)-1-piperazinil}etil}-N-(2-piridinil) cikloheksan karboksamid hidroklorid (WAY 100635) (Müller i sur., 2007).

U istraživanjima funkcije 5HT-1A receptora još uvijek se kao ligand najčešće koristi već spomenuti 8-OH-DPAT, koji se, kad je radioaktivno obilježen (tricijem, kao [^{3}H]-OH-DPAT, ili radioaktivnim jodom, kao [^{125}I]-OH-DPAT), koristi za obilježavanje 5HT-1A receptora u membranskim pripravcima u otopini ili pomoću autoradiografskih tehnika (Gozlan i sur., 1983; Pou i sur., 1997). Studije receptorskog vezivanja pokazale su da 5HT-1A receptor posjeduje dva vezna mjesta za 8-OH-DPAT, jedno s visokim, i drugo s niskim afinitetom (Albert i sur., 1990), a eksperimentalno razlikovanje tih veznih mjesta ovisi u prvom redu o uvjetima mjerenja (Chamberlain i sur., 1993; Carli i sur., 1996; Pou i sur., 1997).

5HT-1A receptori povezuju se i s djelovanjem antidepresiva, i to specifičnih inhibitora povratnog unosa serotonina (engl. *specific serotonin reuptake inhibitors*, SSRI). Iako ovi lijekovi djeluju prvenstveno na serotoninski prijenosnik, eksperimentalno je pokazano da antagonisti 5HT-1A receptora ubrzavaju njihov učinak, što je dovelo do zaključka da je za antidepresivni učinak SSRI važna desenzitizacija 5HT-1A autoreceptora (Celada i sur., 2004). S obzirom na vrijeme djelovanja SSRI (za postizanje njihova učinka potrebna su 2-3 tjedna), smatra se da tijekom njihove primjene dolazi do dugoročnih adaptivnih promjena presinaptičkih 5HT-1A receptora, i to na razini transkripcije (Albert i Lemonde, 2004). Ipak, valja spomenuti i to da rezultati dobiveni *in vivo* nisu konzistentni i upućuju na potrebu dodatnih istraživanja međudjelovanja SSRI i serotoninskih receptora (Neumaister i sur., 2004), i to ne samo 5HT-1A, već i 5HT-1B receptora (Newman i sur., 2004).

Regulacija transkripcije 5HT-1A receptora najviše je istraživana na dvjema neuronalnim staničnim linijama koje posjeduju endogene 5HT-1A receptore: SN-48 i RN46A. Ustanovljeno je da gen za 5HT-1A receptor posjeduje proksimalni promotor, koji sadrži visoko konzervirane slijedove DNA. Oni potiču inicijaciju transkripcije vezanjem transkripcijskih faktora Sp1/MAZ1 i NF-κB (Albert i Lemonde, 2004). Uzvodno od promotora nalazi se represorska regija, tzv. dvostruki represorski element (DRE) koji se sastoji od 14-bp i 12-bp tandemska slijeda (Ou i sur., 2000) te još jedan represorski element, RE-1. Ova tri elementa djeluju na utišavanje ekspresije gena za 5HT-1A receptor. Također, na ekspresiju 5HT-1A receptora djeluje i prisutnost kortikosteroida, što ga dovodi u vezu s odgovorom na stres (Meijer i De Kloet, 1994).

U genu za 5HT-1A receptor čovjeka poznato je nekoliko polimorfizama, uglavnom SNP-ova. Ovi polimorfizmi uglavnom nemaju funkcionalne posljedice, tj. ne mijenjaju farmakološki profil receptora, iako ima i iznimki (Del Tredici i sur., 2004). Polimorfizam u promotorskoj regiji, C(-1019)G, povezuje se s pojavom depresije, pri čemu je moguće da se radi o utjecaju na ekspresiju gena (Lemonde i sur., 2003).

1.2.2. 5HT-1B receptori

5HT-1B receptori najprije su karakterizirani farmakološki, na temelju visokog afiniteta za serotonin i niskog afiniteta za spiperon (Lanfumey i Hamon, 2004). Kloniranje cDNA za 5HT-1B receptor štakora pokazalo je veliku sličnost ovog receptora s ljudskim 5HT-1Dβ receptorom. Neko se vrijeme smatralo da je 5HT-1B receptor karakterističan za glodavce, a 5HT-1D za ostale vrste, da bi se zbrka oko nomenklature na kraju riješila reklasifikacijom: ljudski 5HT-1Dα receptor i 5HT-1D receptor štakora grupirani su kao 5HT-1D receptori, a ljudski 5HT-1Dβ i svi 5HT-1B receptori pregrupirani su u 5HT-1B (Raymond i sur., 2001). Velike sličnosti u strukturi, distribuciji, mehanizmu djelovanja i farmakološkim svojstvima donedavno su otežavale razlikovanje 5HT-1B i 5HT-1D receptora, dok se u novije vrijeme razvijaju agonisti selektivni za jedan odnosno drugi receptor (Hoyer i sur., 2002; Lanfumey i Hamon, 2004).

5HT-1B receptor u štakora i miša sastoji se od 386 aminokiselina, dok je ljudski, 5HT-1Dβ receptor, građen od 390 aminokiselina. Kao i 5HT-1A receptori, i ovi su receptori mehanizmom djelovanja povezani s G-proteinima i kodirani su genima bez introna.

Najveća gustoća 5HT-1B receptora utvrđena je u bazalnim ganglijima (naročito regijama supstancija nigra i *globus pallidus*), ali i u drugim regijama mozga (strijatumu, čeonoj kori), dok je mRNA za ovaj receptor zastupljena u jezgrama rafe (dorzalne i medijane), strijatumu, hipokampusu i drugim regijama (Barnes i Sharp, 1999). Ovo neslaganje nalaza mRNA i proteina upućuje na to da su 5HT-1B receptori smješteni dalje od mjesta sinteze, tj. terminalno (presinaptički ili postsinaptički), te se sintetizirani receptorski protein transportira iz tijela neurona do aksonskog završetka (Sari, 2004).

Kao terminalni inhibicijski receptori, 5HT-1B receptori sudjeluju u kontroli otpuštanja serotonina (kao autoreceptori), ali i drugih neurotransmitera (kao heteroreceptori) – acetil-kolina, glutamata, dopamina, noradrenalina i GABA (Lanfumey i Hamon, 2004; Fink i Göthert, 2007).

5HT-1B receptori uključeni su u razne fiziološke funkcije, u prvom redu u regulaciju lokomotorne aktivnosti, agresivnog ponašanja i impulzivnosti, anksioznosti, migrene, razvoja ovisnosti (o alkoholu i opojnim drogama) te depresije (Clark i Neumaier, 2001; Sari, 2004). Naročito su proučavani agonisti 5HT-1B/1D receptora iz skupine triptana (sumatriptan, zolmitriptan i dr.), za koje se pokazalo da pomažu u akutnom liječenju migrene (Lanfumey i Hamon, 2004). Nadalje, kronična primjena antidepresiva dovodi do smanjenja broja 5HT-1B autoreceptora (Moret i Briley, 2000). U raznim testovima agresivnosti, pokazalo se da su protiv agresije najdjelotvorniji lijekovi koji djeluju kao agonisti 5HT-1B receptora, kao npr. 1-(3-trifluorometilfenil)piperazin (TFMPP) i meta-klorofenilpiperazin (mCPP) (Olivier i van Oorschot, 2005). Također se smatra da 5HT-1B receptor igra određenu ulogu u odgovoru na stres, budući da mu se ekspresija gena mijenja se pod utjecajem nekih stresnih situacija (Kaiyala i sur., 2003; Neumaier i sur., 2002).

Miševe s inaktiviranim genom za 5HT-1B receptor (5HT-1B KO) najprije su opisali Saudou i sur. (1994). Za njih je karakteristično da pokazuju veću eksploratornu aktivnost i sklonost agresivnom ponašanju, niži stupanj anksioznosti, te su osjetljiviji na konzumaciju kokaina i alkohola (Bouwknecht i sur., 2001b; Stark i Hen, 1999). Osim toga, ovi miševi pokazuju bolje rezultate u testovima memorije (Malleret i sur., 1999). Općenito, u testovima anksioznosti, eksploratorne aktivnosti i agresivnosti, 5HT-1B KO miševi pokazuju suprotan fenotip od 5HT-1A KO (Zhuang i sur., 1999).

Gen za 5HT-1B receptor u ljudi je smješten na 6. kromosomu (6q14.1). Kao i ostali geni za 5HT-1 receptore, ne sadrži introne (Olivier i van Oorschot, 2005). Dosad je pronađeno šesnaest različitih polimorfizama ovog gena, i to trinaest polimorfizama pojedinačnog nukleotida (SNP) i tri delecije. Od svih polimorfizama, u studijama se najčešće istražuje SNP

na položaju 861G>C (Proudnikov i sur., 2006). Taj se polimorfizam nalazi u kodirajućem dijelu gena za 5HT-1B receptor, ali radi se o tzv. mukloj (engl. *silent*) mutaciji koja ne dovodi do promjene aminokiseline (Sun i sur., 2002).

S obzirom na uključenost 5HT-1B receptora u razne bihevioralne funkcije, što je pokazano studijama na životinjama, polimorfizmi ovog receptora često se povezuju s raznim neuropsihijatrijskim poremećajima, kao što su alkoholizam i druge ovisnosti, depresija, anksioznost (Fehr i sur., 2000). Najčešće se rade asocijacijske studije, a rezultati, između ostalog, znatno ovise i o etničkom sastavu ispitanika (Proudnikov i sur., 2006). Tako npr. Lappalainen i sur. (1998) povezuju 861C varijantu s antisocijalnim alkoholizmom u finskoj populaciji, dok Huang i sur. (2003) i Sun i sur. (2002) nisu našli povezanost ovog polimorfizma s alkoholizmom. S obzirom na to da rezultati raznih istraživanja uloge ovog polimorfizma u alkoholizmu nisu jednoznačni, potrebna je opreznost u zaključivanju, naročito s obzirom na specifičnu dijagnozu (Gorwood i sur., 2002).

1.2.3. 5HT-2A receptori

Obitelj 5HT-2 receptora čine tri člana: 5HT-2A, 5HT-2B i 5HT-2C receptor. Svima im je zajednički mehanizam djelovanja putem aktivacije fosfolipaze C i porasta unutarstanične koncentracije kalcijevih iona (Raymond i sur., 2001). Za razliku od 5HT-1 receptora, geni za 5HT-2 receptore sadrže introne (2A i 2B sadrže dva introna, 2C tri introna) (Barnes i Sharp, 1999).

Gen za 5HT-2A receptor u čovjeka se nalazi na 13. kromosomu, na položaju 13q14-q21 i kodira za protein od 471 aminokiseline koji, glikoziliran, ima masu oko 60 kDa (Leysen, 2004). Ovaj je receptor široko rasprostranjen u perifernim tkivima i u mozgu, i odgovara nekadašnjem D-receptoru (Hoyer i sur., 2002). 5HT-2A receptori nalaze se i na periferiji, u stanicama glatkih mišića krvnih žila, u mrežnici i na trombocitima, te sudjeluju u kontrakciji glatkih mišića i agregaciji trombocita (Roth i sur., 1998). U središnjem živčanom sustavu 5HT-2A receptori smješteni su prvenstveno u moždanoj kori, te u bazalnim ganglijima i nešto manje u hipokampusu. Distribucija mRNA otprilike odgovara distribuciji proteina (tj. veznih mjesta za obilježene ligande) – najveće su količine mRNA za 5HT-2A receptor utvrđene u čeonoj kori, olfaktornom sustavu i bazalnim ganglijima (Pompeiano i sur., 1994), što upućuje na somatodendritičku lokalizaciju. 5HT-2A receptori smješteni su na postsinaptičkim neuronima (Barnes i Sharp, 1999).

Aktivacija 5HT-2A receptora dovodi do aktivacije fosfolipaze C, što ima za posljedicu nakupljanje inozitol-fosfata i porast razine unutarstaničnog kalcija. Ove promjene rezultiraju ekscitacijom neurona u raznim regijama mozga (Barnes i Sharp, 1999). Novija istraživanja 5HT-2A i 2C receptora ustanovila su postojanje posebne skupine proteina (tzv. GIP – *G protein coupled receptors-interacting proteins*), koji zajedno s receptorom unutar stanice tvore komplekse nazvane receptosomi. Ovi proteini sudjeluju u finoj regulaciji prijenosa signala s receptora unutar stanice, a njihova točna uloga u fiziološkim i patološkim stanjima još se istražuje (Bockaert i sur., 2006a).

Osim monoaminergične, 5HT-2A receptori moduliraju i kortikalnu GABA-ergičnu neurotransmisiju. Aktivacija 5HT-2A receptora na GABA-ergičnim interneuronima potiče oslobađanje GABA, inhibicijskog neurotransmitera, što dovodi do inhibicijskih postsinaptičnih potencijala na piramidalnim stanicama korteksa. Na ovaj način 5HT-2A receptori sudjeluju u održavanju ravnoteže aktivnosti inhibicijskih i ekscitacijskih neurona, što omogućuje normalnu funkciju korteksa (Leysen, 2004).

U farmakološkim studijama, najčešće se koriste derivati 4-jodo-, 4-bromo- ili 4-metil-1-(2,5-dimetoksifenil)-2-aminopropana, poznatiji kao DOI, DOB ili DOM. Ovi su ligandi parcijalni agonisti 5HT-2A receptora, dok potpuni agonisti još nisu razvijeni. Valja naglasiti da se ovi agonisti koriste samo u istraživanjima, ali nemaju kliničku primjenu. Međutim, pokazalo se da neki halucinogeni spojevi (dietilamid lizergične kiseline – LSD, zatim meskalin i derivati dimetoksifenil-aminopropana) svoj učinak postižu upravo aktivacijom 5HT-2A receptora (Leysen, 2004).

Od antagonista 5HT-2A receptora, u istraživanjima se najviše koriste ketanserin i spiperon. Ovi spojevi pokazuju određenu selektivnost prema 5HT-2A receptorima, ali vežu i druge monoaminske receptore (Barnes i Sharp, 1999). Noviji i selektivniji antagonist je MDL 100907. Postoje neke naznake da bi antagonisti 5HT-2A receptora mogli biti djelotvorni kao antipsihotici (Leysen, 2004).

Izlaganje 5HT-2A receptora agonistima dovodi do njihove desenzitizacije, zbog fosforilacije receptora djelovanjem kinaza (i time odvajanja od G-proteina), internalizacije receptora i moguće smanjene ekspresije. S druge strane, kronično izlaganje antagonistima ne dovodi do očekivanog povećanja broja 5HT-2A receptora, već do njegovog smanjenja. Razlog ovom netipičnom mehanizmu regulacije nije sasvim razjašnjen (Van Oekelen i sur., 2003).

5HT-2A receptori naročito su interesantni u istraživanjima djelovanja antipsihotika. Brojni atipični antipsihotici (risperidon, klozapin, olanzapin, itd) imaju visok afinitet prema ovim

receptorima (djeluju kao njihovi antagonisti), a pokazala se i povezanost između uspješnosti liječenja shizofrenije i nekih polimorfnih varijanti gena ovog receptora (Barnes i Sharp, 1999). Smatra se da bi antagonistično djelovanje antipsihotika na 5HT-2A receptore moglo biti osnova terapijskog djelovanja tih lijekova (Van Oekelen i sur., 2003). Nadalje, halucinogeni kao što su LSD i DOI izazivaju masovnu aktivaciju 5HT-2A receptora (Celada i sur., 2004), dok razni antidepresivi smanjuju njihovu aktivnost (Sibille i sur., 1997, Van Oekelen i sur., 2003).

Gen za 5HT-2A receptor u ljudi smješten je na 13. kromosomu (13q13-14q21), sastoji se od tri egzona i dva introna i obuhvaća oko 63 kb (Serretti i sur., 2007). U promotorskoj regiji poznato je devet polimorfizama (tzv. SNP, v. ranije), a najčešće je proučavan polimorfizam na položaju -1438 A/G (Sanders-Bush i Hazelwood, 2003). U kodirajućoj regiji poznato je sedam SNP-ova, a najčešće je proučavan 102 T/C u prvom egzonu, koji je u potpunoj neravnoteži vezivanja s -1438 A/G polimorfizmom, te se ova dva polimorfizma mogu razmatrati zajedno, pri čemu se alel A uvijek nasljeđuje s alelom T, a alel G uz alel C (Spurlock i sur., 1998). Oba ova polimorfizma često se povezuju s različitim psihijatrijskim poremećajima, kao što su depresija, opsesivno-kompulzivni poremećaj, shizofrenija i poremećaji uzimanja hrane (Myers i sur., 2007). Ekspresijske studije ukazuju na moguću funkcionalnost promotorskog polimorfizma, tj. njegov utjecaj na razinu transkripcije gena (Parsons i sur., 2004, Myers i sur., 2007).

1.3. ŠTAKORI S PROMIJENJENOM SEROTONINSKOM HOMEOSTAZOM

U istraživanjima serotoninskog sustava vrlo se često koriste specifični animalni modeli. Najčešće je riječ o miševima s inaktiviranim genom za neki od elemenata serotonergične sinapse (tzv. *knockout* miševi). U literaturi su opisani miševi s inaktiviranim genom za serotoninski prijenosnik (5HTt), monoamin-oksidazu A i B, te neke od receptora (5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-2A, 5HT-2C, 5HT-5A) (Gingrich i Hen, 2001). Osim miševa s inaktiviranim genom, koriste se i modeli miševa u kojima je genska ekspresija vremenski i prostorno promijenjena uvođenjem nukleotidnog slijeda komplementarnog slijedu mRNA (engl. *antisense*) na rekombinantnom plazmidu (Fabre i sur., 2000b), kao i transgenični miševi s pojačanom ekspresijom serotoninskog prijenosnika (Jennings i sur., 2006). Štakori su također česti modeli u neurobiologiji, a najčešće se koriste sublinije dobivene selektivnim parenjem prema nekom parametru (iako, u novije vrijeme radi se i na modelu štakora s inaktiviranim genom: v. Homberg i sur., 2007). Do danas je razvijen velik broj raznih štakorskih sojeva, od

kojih su poznatiji tzv. Fawn-Hooded štakori (nemaju mogućnost pohranjivanja serotonina u trombocitima; Aulakh i sur., 1994) ili npr. sublinije s većom ili manjom sklonosti uzimanju alkohola (Nowak i sur., 2000).

U Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković zadnjih se dvadesetak godina razvijaju genetički selekcionirane sublinije štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom. Pritom je korištena činjenica da je serotonin, osim u središnjem živčanom sustavu, prisutan i u perifernim tkivima, između ostalog u trombocitima koji sadrže neke elemente serotonergične sinapse (serotoninski prijenosnik, 5HT-2A receptor, vezikularni monoaminski prijenosnik, a u ljudi i monoamin-oksidazu B; Stahl, 1985). Selekcija životinja provedena je prema ekstremnim vrijednostima razine trombocitnog serotonina (Jernej i Čičin-Šain, 1990), a ubrzo se pokazalo da je taj parametar ovisan o kinetici unosa serotonina u trombocite (Čičin-Šain i sur., 1998), tj. o aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika, koji je identičan analognoj molekuli u mozgu (Lesch i sur., 1993). Daljnja selekcija odvijala se prema ekstremnim vrijednostima brzine unosa serotonina u trombocite, pri čemu su dobivene dvije sublinije s visokom odnosno niskom aktivnošću trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Sublinije su nazvane 5HT-visoka i 5HT-niska sublinija, a zajedno čine model Wistar Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakora (Čičin-Šain i sur., 2005). Budući da su serotoninski prijenosnik na trombocitima i u mozgu kodirani istim genom, pretpostavlja se da je kod 5HT-sublinija tijekom uzgoja došlo do određenih promjena u središnjoj serotoninskoj homeostazi. Na to ukazuju rezultati Romera i sur. (1998) koji su mjerenjem izvanstanične razine serotonina nakon farmakološkog izazova pokazali razlike u aktivnosti moždanog serotoninskog prijenosnika kod ovih životinja. Novija neurokemijska istraživanja upućuju na moguće promjene metabolizma serotonina u pojedinim regijama mozga (Bokulić i sur., 2003), dok je u testovima ponašanja pokazana razlika ponašanju nalik na anksioznost između dviju sublinija (Hranilović i sur., 2005), u nekim aspektima motorike i kognitivnog ponašanja (Quevedo i sur. 2003), te u sklonosti uzimanju alkohola (Čičin-Šain i sur., 2004; Mokrović, 2007). Navedeni rezultati upućuju na povećanu serotonergičnu transmisiju kod životinja iz 5HT-visoke sublinije u odnosnu na 5HT-nisku subliniju (Čičin-Šain i Jernej, 2008). Molekularno-biološke studije nisu pokazale postojanje značajnih razlika u ekspresiji gena za serotoninski prijenosnik u jezgrama rafe u mozgu (Bordukalo-Nikšić i sur., 2004) iako je na trombocitima ta razlika potvrđena, na razini mRNA (Jernej i sur., 1999b) i proteina (Hranilović i sur., 2001). Nije pokazana ni razlika u ekspresiji gena za dvije izoforme monoamin-oksidaze (enzima koji sudjeluje u razgradnji serotonina) u području jezgara rafe i moždane kore (Bordukalo-Nikšić, 2003), dok su u slučaju triptofan-

hidroksilaze (sintetski enzim serotonina) razlike u ekspresiji (u jezgrama rafe) između sublinija bile indikativne, ali ne i statistički značajne (Štefulj, 2005). Dosad još nisu provedena sustavna istraživanja serotoninskih receptora u ovim sublinijama štakora.

1.4. SEROTONIN I STRES

Stres, kao poremećaj homeostaze izazvan fizičkim faktorima, prvi je opisao Hans Selye, koji je opisane promjene na štakorima nazvao "generalni adaptacijski sindrom" (Selye, 1936). Danas se zna da faktori koji izazivaju stres, tzv. stresori, potiču fiziološke i bihevioralne odgovore organizma koji su usmjereni ponovnom uspostavljanju homeostaze. Odgovor na stres uključuje brzu aktivaciju simpatičkog živčanog sustava, pri čemu dolazi do pojačanog otpuštanja noradrenalina u sinapsama i adrenalina iz srži nadbubrežne žlijezde (De Kloet i sur., 2005).

Aktivaciju odgovora na stres koordiniraju dva neuropeptida iz hipotalamusa: hormon za oslobađanje kortikotropina (engl. *corticotropin-releasing hormone*, CRH) i vazopresin, koji aktiviraju osovinu hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (engl. *hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*, HPA), pri čemu dolazi do porasta razine kortikosteroidnih hormona u krvi. Svoje djelovanje kortikosteroidi (prvenstveno kortizol, odnosno kortikosteron kod štakora) ostvaruju putem dvije vrste receptora, mineralokortikoidnog receptora (MR) i glukokortikoidnog receptora (GR), koji djeluju kao regulatori transkripcije (De Kloet i sur., 2005).

Danas je poznato da su neki psihički poremećaji (depresija, anksioznost) povezani s promjenom funkcije HPA osi, što upućuje na vezu između stresa i pojave nekih psihijatrijskih bolesti. Ipak, mehanizmi te povezanosti u središnjem živčanom sustavu još nisu do kraja razjašnjeni. Djelovanje stresa na pojedine neurotransmiterske sustave intenzivno se istražuje, a čini se da je među njima serotoninski sustav jedan od značajnih faktora (Linthorst i Reul, 2007).

Aktivnost serotonergičnih neurona te metabolizam (sinteza/razgradnja) serotonina mijenjaju se pod utjecajem stresa. Osim toga, serotoninski sustav uključen je u stresnu reakciju i tako što gusto inervira glavne regije koje se i inače povezuju s odgovorom na stres (hipotalamus, hipokampus, moždano deblo, amigdale i dr.; Chaouloff, 1999). Nadalje, pokazalo se da u različitim stresnim situacijama dolazi do porasta izvanstanične razine serotonina i njegovog metabolita (5HIAA) u hipokampusu (Linthorst i sur., 2000; Linthorst i sur., 2002, Flügge i sur., 2004).

Od svih elemenata serotoninskog sustava, sa stresom se najčešće povezuje 5HT-1A receptor. Pokazalo se da glukokortikoidi, čija je razina u stresu povišena, reguliraju ekspresiju gena za 5HT-1A (Meijer i De Kloet, 1994; Lopez i sur., 1998; Flügge i sur., 2004). S obzirom na ulogu ovog receptora u regulaciji serotonergične transmisije (v. ranije), moguće je da upravo 5HT-1A predstavlja vezu između stresa i pojave depresije ili anksioznosti.

U istraživanjima kroničnog stresa često se koriste animalni modeli. Najčešće se primjenjuju procedure kroničnog nepredvidivog stresa (engl. *chronic unpredictable stress*, CUS; Katz i sur., 1981) ili kroničnog blagog stresa (engl. *chronic mild stress*, CMS; Papp i sur., 1996), koje se međusobno razlikuju po vrstama stresora i načinu izlaganja stresu. Obje procedure pokazale su se vrlo korisnima u istraživanjima animalnih modela depresije, kao i u istraživanjima veze između depresije i stresa.

Dosad su provedena mnoga istraživanja promjena 5HT-1A receptora u različitim modelima stresa, međutim, rezultati nisu jednoznačni. Sumarni prikaz nekih literaturnih podataka o promjenama 5HT-1A receptora štakora u raznim uvjetima stresa naveden je u Tablici 1.1.

Tablica 1.1. Rezultati istraživanja 5HT-1A receptora u različitim uvjetima stresa (štakori)

referenca	vrsta stresa	regija mozga	promjene 5HT-1A receptora
Neumaier i sur. (2000)	injekcije kortikosteroida	hipokampus* rafe	↑ mRNA u DG manji porast u CA1 i CA3 bez promjene mRNA
Harvey i sur. (2003)	stres ovisan o vremenu (simulacija PTSP)	hipokampus	promjene receptorskog vezivanja ↑ B_{max} i ↓ K_d
Lopez i sur. (1998)	kronični nepredvidivi stres prisilno plivanje	hipokampus	↓ mRNA (22 %) u CA1 i CA3 ↓ rec. vezivanje (15 %) bez promjene mRNA i proteina
Flügge (1995)	psihosocijalni stres (rovke)	hipokampus	↓ rec. vezivanje
McKittrick i sur. (1995)	kronični socijalni stres (model kolonije)	hipokampus kora	↓ rec. vezivanje bez promjene rec. vezivanja
Abumaria i sur. (2006)	kronični socijalni stres	hipokampus	bez promjene mRNA
Lanfumey i sur. (1999)	kronični, vrlo blagi stres	rafe moždano deblo, kora, hipokampus	desenzitizacija 5HT-1A autoreceptora bez promjene rec. vezivanja
Steciuk i sur. (2000)	akutni stres	čeona kora hipokampus	bez promjene rec. vezivanja

referenca	vrsta stresa	regija mozga	promjene 5HT-1A receptora
Kalynchuk i sur. (2006)	podraživanje amigdale	hipokampus rafe	↑ rec. vezivanje u DG, preostali dio hipokampusa bez promjene bez promjene rec. vezivanja
Briones-Aranda i sur. (2005)	prisilno plivanje	rafe, hipokampus talamus, hipotalamus, amigdala	↓ rec. vezivanje ↑ rec. vezivanje
Laaris i sur. (1999)	razni uvjeti akutnog stresa	hipokampus dorzalne jezgre rafe	↑ rec. vezivanje u DG, ne i u CA1 bez promjene
Lopez i sur. (1999)	akutni stres kraći kronični stres	hipokampus	↓ mRNA u CA1 i DG bez promjene
Vazquez i sur. (2002)	kronično davanje injekcija odvajanje od majke	hipokampus, rafe hipokampus (CA1) rafe	bez promjene mRNA ↑ mRNA ↓ mRNA

* istraživane regije hipokampusa: dentatni girus (DG), CA1 i CA3

Utjecaj stresa na 5HT-1A receptore najčešće se istražuje u hipokampusu, a nešto manje u drugim regijama mozga (jezgre rafe, kora). Promjene su često specifične za pojedine dijelove hipokampusa (Neumaier i sur., 2002; Lopez i sur., 1998; Kalynchuk i sur., 2006; Laaris i sur., 1999). Najčešće se provode studije u različitim uvjetima kroničnog stresa, dok je za akutni stres provedeno manje istraživanja.

Osim 5HT-1A, i drugi serotoninski receptori povezuju se s odgovorom na stres. Pritom se 5HT-1B receptor najčešće proučava na razini mRNA (Tablica 1.2.):

Tablica 1.2. Rezultati istraživanja 5HT-1B receptora u različitim uvjetima stresa (štakori)

referenca	vrsta stresa	regija mozga	promjene 5HT-1B receptora
Neumaier i sur. (2002)	štakori promijenjene reaktivnosti na stres	jezgre rafe strijatum hipokampus (CA1)	↑ mRNA u soju otpornom na stres ↓ mRNA u LH soju bez promjene mRNA
Neumaier i sur. (2000)	injekcije kortikosteroida	hipokampus, rafe	bez promjene mRNA
Kaiyala i sur. (2003)	različiti stresori	jezgre rafe	bez promjene mRNA
Nakamura i sur. (2008)	rano odvajanje od majke	hipokampus	↓ mRNA

referenca	vrsta stresa	regija mozga	promjene 5HT-1B receptora
Vazquez i sur. (2002)	kronično davanje injekcija odvajanje od majke	hipokampus	↓ mRNA ↑ mRNA
McKittrick i sur. (1995)	kronični socijalni stres (model kolonije)	dentatni girus	bez promjene rec. vezivanja
Neumaier i sur. (1997)	naučena bespomoćnost	jezgre rafe, čeona kora hipokampus	↑ mRNA bez promjene mRNA

Iz Tablice 1.2. vidljivo je da se i rezultati istraživanja 5HT-1B receptora u stresu razlikuju, ovisno o vrsti i duljini trajanja stresa.

Istraživanja 5HT-2A receptora u stresu također nisu dala jednoznačne podatke. Neki oblici opetovanog stresa uzrokuju porast razine mRNA ili broja 5HT-2A receptora u čeonoj kori, dok neke druge studije nisu pokazale nikakve promjene u ekspresiji ovog receptora (Tablica 1.3.).

Tablica 1.3. Rezultati istraživanja 5HT-2A receptora u različitim uvjetima stresa (štakori)

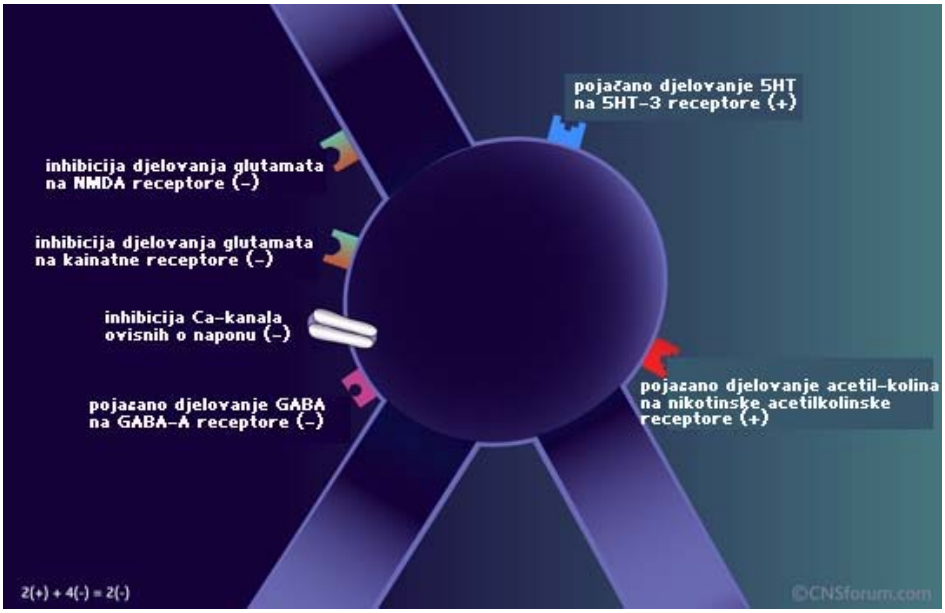
referenca	vrsta stresa	regija mozga	promjene 5HT-2A receptora
Vazquez i sur. (2002)	kronično davanje injekcija odvajanje od majke	kora	bez promjene ↑ mRNA
McKittrick i sur. (1995)	kronični socijalni stres (model kolonije)	kora	↑ rec. vezivanje
Katagiri i sur. (2001)	injekcije deksametazona	kora	↑ rec. vezivanje
Harvey i sur. (2003)	stres ovisan o vremenu (simulacija PTSP)	kora	↓ K_d B_{max} bez promjene
Dwivedi i sur. (2005)	naučena bespomoćnost	čeona kora	bez promjene mRNA opetovani stres: ↑ mRNA
Ossowska i sur. (2001)	kronični nepredvidivi stres	kora	↑ B_{max}

Iz navedenih podataka, vidljivo je da su rezultati istraživanja serotoninskih receptora u stresu vrlo heterogeni. Najčešće se istražuju 5HT-1A receptori, naročito zbog utjecaja kortikosteroida na njihovu ekspresiju (Meijer i De Kloet, 1994), ali i drugi receptori (5HT-1B, 5HT-2A) pokazali su promjene u nekim uvjetima stresa. Također, osim serotoninskog, u vezu sa stresom dovode se i drugi neurotransmiterski sustavi (npr. Ossowska i sur., 2001., pokazali su promjene dopaminskih D-1 receptora).

1.5. SEROTONIN I ALKOHOL

Alkohol je, nakon kofeina, druga najčešće konzumirana psihoaktivna tvar, pri čemu kronično i/ili prekomjerno pijenje alkohola predstavlja jedan od vodećih zdravstvenih problema u svijetu (Samson i Harris, 1992). Pritom se alkoholizam može definirati kao kronični ponavljajući poremećaj kojeg karakterizira pojačano (kompulzivno) pijenje alkohola, gubitak kontrole nad unosom alkohola te problemi u društvenom i profesionalnom životu (Koob, 2003). Na razvoj alkoholizma utječu genetički (određene varijante gena ili njihove kombinacije) i okolišni uvjeti (Enoch, 2006).

Za razliku od nekih drugih psihoaktivnih spojeva, u mozgu ne postoji specifični receptor za etanol, već on djeluje na razne neurotransmiterske sustave. Naročito su osjetljivi neki ionski kanali (nikotinski acetilkolinski receptor, 5HT-3 receptor, glutamatni ionotropni receptori, kalcijevi kanali ovisni o naponu), a učinak alkohola na živčani sustav ovisi i o tome radi li se o akutnom ili kroničnom djelovanju. Primijećeno je da akutni unos alkohola pojačava transmisiju na nikotinskom tipu acetilkolinskog receptora i na 5HT-3 receptoru, dok su neki drugi ekscitacijski receptori (npr. glutamatni) inhibirani alkoholom (Samson i Harris, 1992, slika 1.6.). Kronični unos alkohola dovodi do povećanja broja NMDA glutamatnih receptora te uzrokuje porast unutarstanične koncentracije kalcija (Kalluri i sur., 1998), a osim toga dovodi i do promjene ekspresije serotoninskih 5HT-1A i 5HT-1B receptora (Nevo i sur., 1995).



Slika 1.6. Djelovanje alkohola na pojedine neurotransmiterske receptore (izvor: www.cnsforum.com)

Smatra se da je u podlozi djelovanja alkohola na središnji živčani sustav aktivacija mezolimbičnog dopaminskog sustava, tj. pojačana aktivnost dopaminskih neurona u ventralnom području tegmentuma (engl. *ventral tegmental area*, VTA) uslijed prisutnosti etanola, zbog čega dolazi do pojačanog oslobađanja dopamina u području jezgara u sklopu moždanog sustava za nagradu (Samson i Harris, 1992; McBride i sur., 1999).

Na ulogu serotonina u alkoholizmu upućuju podaci o sniženoj razini serotonina i njegovih metabolita u cerebrospinalnoj tekućini ovisnika o alkoholu. Kao i u nekim drugim stanjima (bulimija, opsesivno-kompulzivni poremećaj, nasilno ponašanje), vjerojatno se radi o smanjenoj 5HT transmisiji, čija je posljedica oslabljeni nadzor kontrole ponašanja. Studije na eksperimentalnim životinjama dodatno potvrđuju tu pretpostavku (Sellers i sur., 1992). Jedno od mogućih objašnjenja povezanosti serotonina i pojave ovisnosti o alkoholu uključuje pojačanu aktivnost 5HT-2 receptora i njihov utjecaj na kortikalnu inhibiciju (Nutt, 1999). I akutni i kronični unos alkohola uzrokuju promjene u aktivnosti serotoninskog sustava, a u podlozi tih promjena vjerojatno je i interakcija s dopaminskim sustavom (LeMarquand i sur., 1994).

Cloninger je 80-tih godina opisao dva oblika alkoholizma, nazvana tip I i tip II. Alkoholizam tipa I razvija se najčešće nakon 25. godine, karakteriziraju ga povremena opijanja i psihološka ovisnost o alkoholu (gubitak kontrole nad pijenjem), te tzv. anksiozan tip ličnosti. Za razliku od tipa I, alkoholizam tipa II razvija se u mlađoj dobi (prije 25. godine), a karakterizira ga stalna potreba za alkoholom, uz impulzivno (često i agresivno) ponašanje. Češći je kod muškaraca (Cloninger i sur., 1981). U osoba s razvijenim alkoholizmom tipa II često su ustanovljene niske razine serotonina i dopamina, kao i njihovih metabolita, u cerebrospinalnoj tekućini (Cloninger, 1987). Čini se da je alkoholizam tipa II, za razliku od tipa I, pod izrazitijim genetskim utjecajem i da su u podlozi ovog oblika alkoholizma upravo promjene serotoninskog sustava (Higley i sur., 1996; Higley i Bennett, 1999). Ova sistematizacija nije svugdje jednako prihvaćena, pa tako u službenom dijagnostičkom i statističkom priručniku za duševne poremećaje (DSM-IV) ne postoji podjela alkoholizma na tip I i tip II.

Brojne studije pokazale su da postoje određeni funkcionalni aleli pojedinih gena koji se češće povezuju s pojavom ovisnosti o alkoholu. To su varijante gena za alkohol-dehidrogenazu 1 i aldehid-dehidrogenazu 2, dopaminski receptor tipa 4, katehol-O-metil-

transferazu, serotoninski prijenosnik i monoamin-oksidazu A (Lesch, 2005). Od nabrojanih, čini se da je mutacija u genu za aldehid-dehidrogenazu 2, koja mijenja aminokiselinski sastav nastalog proteina, od presudnog utjecaja na konzumaciju alkohola (Tu i Israel, 1995). Od gena za elemente serotoninskog sustava, u vezu s alkoholizmom najčešće se dovode geni za serotoninski prijenosnik (Lichtermann i sur., 2000) te geni za pojedine serotoninske receptore, uglavnom 5HT-2A (Nakamura i sur., 1999) i 5HT-1B (Soyka i sur., 2004), iako rezultati dosadašnjih studija nisu jednoznačni (Gorwood i sur., 2002; v. poglavlje 1.2.2.) te su potrebna dodatna istraživanja.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kao važan modulacijski neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu, serotonin (5HT) sudjeluje u regulaciji brojnih fizioloških funkcija, a uključen je i u etiopatogenezu raznih neuropsihijatrijskih poremećaja, između ostalog, i u razvoj ovisnosti.

Učinci serotonina odvijaju se preko specijaliziranih serotoninskih receptora, čija raspodjela, brojnost i raznovrsnost objašnjavaju značajne modulacijske uloge ovog neurotransmitera. Do danas je poznato 15 različitih receptora za serotonin, grupiranih u sedam skupina (5HT-1 do 5HT-7), koji su predmet intenzivnog istraživanja, kako eksperimentalnih, tako i kliničkih.

Ova disertacija obuhvaća istraživanja tri serotoninska receptora: 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A, u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina. Istraživanja su provedena na animalnom modelu (štakor) i na čovjeku, a njihovi ciljevi bili su sljedeći:

1. Na eksperimentalnoj razini, nastaviti karakterizaciju štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom - Wistar-Zagreb 5HT štakora (WZ-5HT štakor). Dosadašnja istraživanja na ovom animalnom modelu bila su usmjerena prema drugim elementima serotonergične sinapse, poglavito prema serotoninskom prijenosniku, dok se moguće promjene serotoninskih receptora još nisu sustavno proučavale. S obzirom na to, cilj ovog istraživanja bio je istražiti ekspresiju gena za tri serotoninska receptora (5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A) na razini mRNA i razini proteina (količine, odnosno funkcije) u sublinijama WZ-5HT štakora i to:

   - U fiziološkim uvjetima – usporediti količine mRNA za navedene receptore: 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A u regijama mozga u kojima su ti receptori najviše zastupljeni (hipokampus, strijatum, korteks) metodom semi-kvantitativnog RT-PCR. Na razini proteina, cilj je bio usporediti funkciju 5HT-1A receptora metodom receptorskog vezivanja, te količinu proteina 5HT-2A receptora kvantitativnom Western analizom, u moždanoj kori.

   - Osim u fiziološkim uvjetima, ekspresija navedenih serotoninskih receptora istražena je u istim regijama mozga nakon izlaganja WZ-5HT štakora kroničnom stresu, za koji se smatra da utječe na aktivnost serotoninskog sustava. Mjerenja su provedena na razini

mRNA (5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor), te na razini proteina (kinetika receptorskog vezivanja za 5HT-1A).

2. Na kliničkoj razini, cilj je bio usporediti učestalost pojave polimorfizama gena za dva serotoninska receptora (5HT-1B i 5HT-2A) u zdravih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu, s poddijagnozama alkoholizma tipa I i tipa II.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. ISTRAŽIVANJA NA ANIMALNOM MODELU

3.1.1. Materijali

3.1.1.1. Eksperimentalne životinje

Istraživanja su provedena na Wistar štakorima iz genetički selekcioniranog uzgoja za ekstremne vrijednosti kinetike trombocitnog serotoninskog prijenosnika (Wistar-Zagreb 5HT štakori, v. Uvod, poglavlje 1.3.). Životinje su uzgajane u standardiziranim plastičnim kavezima, uz slobodan pristup vodi i peletiranoj hrani za glodavce (Mucedola, Italija), u uvjetima 12-satnog ciklusa svjetlo-tama, pri temperaturi 22 ± 2 °C. Svi postupci s eksperimentalnim životinjama bili su u skladu sa Zakonom o dobrobiti životinja (NN 19/99) i pravilima Europske unije (EEC Council Directive 86/609).

3.1.1.2. Kemikalije

Za određivanje trombocitnog serotonina

- HCl, 0,1 N vodena otopina
- $ZnSO_4$, 10 % vodena otopina
- NaOH, 1 N vodena otopina
- L-cistein, 1 % otopina u 0,1 N HCl (Merck, Njemačka)
- O-ftaldialdehid, OPT; 0,01 % otopina u 10 N HCl (Aldrich, SAD)
- Serotonin kreatinin sulfat, 200 μg/ mL u 0,1 M HCl (Sigma, SAD)

Za mjerenje kinetike aktivnog unosa serotonina u trombocite

- ^{14}C 5-hidroksitriptamin-kreatinin-sulfat, specifične aktivnosti 57 mCi/mmol (Amersham Pharmacia Biotech, Engleska)
- Krebs-Ringerov pufer bez $CaCl_2$, pH 7,4 (0,154 M NaCl, 0,154 M KCl, 0,154 M $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0,1 M fosfatni pufer)
- fiziološka otopina (0,9 % NaCl)
- scintilacijska tekućina - Aquasol (Du Pont, NEN, Njemačka)

Za mjerenje receptorskog vezivanja

- [^{3}H]8-hidroksi-2-(di-N-propilamino)tetralin (8-OH-DPAT), specifične aktivnosti 170,2 Ci/mmol (Perkin Elmer, SAD)
- serotonin-kreatinin sulfat, bezvodni (Sigma, SAD)
- 0,32 M saharoza
- 50 mM Tris-HCl pufer pH 7,4
- polietilen-imin, 0,1% otopina (Aldrich, SAD)

Za izolaciju RNA

- reagens za denaturaciju (G-otopina): 4 M gvanidin-tiocijanat (Sigma, SAD), 20 mM natrijev acetat, 0,5 % N-lauril-sarkozin (Sigma, SAD), 1 mM ditiotreitol (Serva, Njemačka)
- dietil-pirokarbonat (DEPC), 0,1 % otopina (Sigma, SAD)
- fenol zasićen vodom
- kloroform/izoamilni alkohol u omjeru 49:1
- 2-propanol
- etanol

Za pročišćavanje RNA i uklanjanje genomske DNA

- komplet za izolaciju RNA (RNeasy® Micro kit, Qiagen, Njemačka)

Za reverznu transkripciju

- 25 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems, SAD)
- 10 × RT pufer (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl, 1 % Triton X-100) (Promega, SAD)
- smjesa 10 mM deoksiribonukleotid-trifosfata dATP, dGTP, dTTP i dCTP (Applied Biosystems, SAD)
- oligo $d(T)_{16}$ početnici (Applied Biosystems, SAD)
- AMV reverzna transkriptaza, 20 U/μl (Promega, SAD)
- inhibitor ribonukleaza (RNasIn, 40 U/μl) (Promega, SAD)
- sterilna voda bez ribonukleaza (Promega, SAD)

Za lančanu reakciju polimerazom

- 25 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems, SAD)
- 10 × PCR pufer II (100 mM Tris-HCl, pH 8,3, 500 mM KCl) (Applied Biosystems, SAD)
- smjesa 10 mM deoksiribonukleotid-trifosfata dATP, dGTP, dTTP i dCTP (Applied Biosystems, SAD)
- Taq DNA polimeraza, 5 U/μl (Applied Biosystems, SAD)
- oligonukleotidni početnici

Korišteni su oligonukleotidni početnici za cDNA sljedećih gena štakora: GAPDH, β-aktin i ciklofilin B (kao referentni geni u semi-kvantitativnoj RT-PCR analizi) te serotoninske receptore 1A, 1B i 2A. Sekvence početnika za 5HT-1A receptor preuzete su iz Kulikov i sur. (2005), za 5HT-1B receptor iz Liu i sur. (2005), za 5HT-2A receptor iz Pierce i sur. (1996), a za GAPDH iz Ota i sur. (1999). Svi početnici nabavljeni su od tvrtke Life Technologies (Beč, Austrija). Iz liofilizata su priređene otopine koncentracije 100 μM iz kojih su potom priređene radne otopine koncentracije 10 μM, čuvane na -20 °C. Nukleotidni slijedovi početnika prikazani su u tablici 3.1.

Tablica 3.1. Oligonukleotidni početnici korišteni za umnažanje fragmenata pojedinih cDNA štakora

gen	nukleotidni slijed	položaj*	veličina PCR produkta
GAPDH	5' AGAACATCATCCCTGCATCC 3' 5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'	1454-1473 1820-1801 (AF106860)	367 bp
β-aktin	5' GAAACTACCTTCAACTCCATC 3' 5' CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGAT 3'	2708-2727 3134-3111 (V01217)	303 bp
ciklofilin B	5' CCATCGTGTCATCAAGGACTTCAT 3' 5' TTGCCGTCTAGCCAGGAGGTCT 3'	277-300 492-471 (AF071225)	216 bp
5HT-1A	5' CCCCCCAAGAAGAGCCTGAA 3' 5' GGCAGCCAGCAGAGGATGAA 3'	867-886 1201-1182 (J05276)	336 bp
5HT-1B	5' CTGCTAAAAGAACTCCCAAAA 3' 5' TTGGGTGTCTGTTTCAAAATC 3'	948-968 1209-1194 (M89954)	262 bp
5HT-2A	5' CATGCCTCTCCATTCTTCATCTCCAGGAA 3' 5' CAAGGTGGCTTCTTTCTGAAGTGACTTGA 3'	250-278 860-833 (GI8393582)	611 bp

* u zagradi su navedeni registracijski brojevi sekvenci u bazi podataka GenBank (dostupno na web-stranici www.ncbi.nlm.nih.gov)

Za elektroforezu na agaroznom gelu

- agaroza (LE, analytical grade) (Promega, SAD)
- TAE pufer (0,8 M Tris, 0,2 mM octena kiselina, 0,5 M EDTA)
- pufer za nanošenje uzoraka (50 % glicerol, 25 % bromfenol-plavo, 1 mM EDTA)
- molekularna ljestvica: Molecular Weight Marker, 50 bp (Fermentas, Kanada)
- etidij-bromid, 1 mg/ml (Sigma, SAD)

Za određivanje ukupnih proteina

- Coomassie Brilliant Blue, G-250 (Serva, Njemačka)
- etanol, 96 %
- fosfatna kiselina, 85 %
- goveđi serumski albumin, frakcija V (Serva, Njemačka)

Za pripremu uzoraka za Western analizu

- pufer za homogenizaciju (20 mM Tris-HCl, 250 mM saharoza, 2 mM EDTA)
- koktel proteaznih inhibitora (Sigma, SAD)
- 6× pufer za denaturaciju (0,375 M Tris-HCl, 12 % SDS, 40 % glicerol, brom-fenol plavo, 12 % 2-merkaptoetanol)

Za SDS-PAGE i elektrotransfer proteina

- 30 % otopina monomera akrilamid/bisakrilamid (29:1) (Sigma, SAD)
- 4× donji Tris-HCl pufer, pH 8,8 (1,875 M Tris)
- 4× gornji Tris-HCl pufer, pH 6,8 (1,25 M Tris)
- 10 % amonijev persulfat
- 10 % natrijev dodecil sulfat (SDS; Sigma, SAD)
- 10× pufer za elektroforezu (Tris-glicinski pufer), pH 8,3 (0,025 M Tris, 0,192 M glicin, 0,1 % SDS)
- molekularna ljestvica: Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas, Kanada)
- Towbin pufer, pH 8,3 (250 mM Tris, 192 mM glicin, 20 % metanol)
- DILB pufer (pufer za razrjeđivanje, 0,5 % mlijeka u prahu u TBS-T puferu)
- CBB otopina (50 % metanol, 10 % octena kiselina, 0,1 % Coomassie Brilliant Blue G-250)
- Ponceau S otopina (0,1 % Ponceau S, 3 % trikloroctena kiselina)

Za imunodetekciju i kemiluminiscentnu vizualizaciju signala

- PBS pufer, pH 7,5 (80 mM Na_2HPO_4, 20 mM $NaH_2PO_4 \times 2\ H_2O$, 100 mM NaCl)
- TBS pufer, pH 7,6 (20 mM Tris, 137 mM NaCl)
- PBS-T pufer (pufer za ispiranje) (0,1 % Tween-20 u PBS puferu)
- TBS-T pufer (0,1 % Tween-20 u TBS puferu)
- BLB (pufer za blokiranje, 10 % mlijeka u prahu u PBS-T puferu)
- komplet za kemiluminiscentnu detekciju signala (*ECL Western Blotting Detection Reagents*, Perkin Elmer, SAD)
- razvijač i fiksir (Fotokemika, Hrvatska)

Protutijela

- monoklonsko protutijelo za 5HT-2A receptor porijeklom iz miša (*Purified mouse anti-serotonin receptor (5-HT2AR) monoclonal antibody*), Pharmingen, SAD (kat. br. 556326)
- monoklonsko protutijelo za β-aktin porijeklom iz miša (Actin C-2), Santa Cruz Biotechnology Inc., SAD (kat. br. sc-8432)
- sekundarno protutijelo za IgG miša, obilježeno peroksidazom, Amersham Bioscience, SAD (kat. br. NIF825)

Kemikalije za koje nije naveden proizvođač proizvedene su u Kemici, Hrvatska.

3.1.1.3. Tehnička oprema i pribor

- ultrazvučni dezintegrator (Cole Parmer, SAD)
- homogenizator (Tehtnica, Slovenija)
- vorteks miješalica (Tehtnica, Slovenija)
- centrifuge (5417C, Eppendorf Research, Njemačka; Hettich, Njemačka; MSE, Engleska)
- vaga (MK-500C, Japan; Mettler, Njemačka)
- laboratorijska giljotina (Ugo Basile, Italija)
- digestor (Tlos, Hrvatska)
- hladnjak i zamrzivači (Gorenje, Slovenija; Snijders Scientific, Nizozemska)

- oprema za horizontalnu elektroforezu (Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska)
- oprema za vertikalnu elektroforezu i elektrotransfer (Amersham Biosciences, Engleska)
- aparatura za mjerenje kinetike serotoninskog prijenosnika (Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, Institut Ruđer Bošković, Hrvatska)
- sakupljač stanica (Brandel, SAD)
- filter-papiri GF/B i GF/C (Whatman, SAD)
- nitrocelulozne membrane (Amersham Biosciences, Engleska)
- PCR aparat (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, SAD)
- scintilacijski brojač (LKB Wallac, Rackbeta, Švedska)
- mikrovalna pećnica (J.S.C. MK-132, Njemačka)
- termostatirana vodena kupelj (NESLAB, Thermo Fisher Scientific, SAD)
- spektrofotometar (Ultrospec 2100 pro, Pharmacia Biotech, SAD)
- spektrofotofluorimetar (Perkin Elmer, SAD)
- transiluminator (UPV, SAD)
- skener gelova (Image Master VDS, Pharmacia Biotech, SAD)
- plastične epruvete od 200 μl (Eppendorf Research, Njemačka)
- automatske pipete (Eppendorf Research, Njemačka)

3.1.2. METODE

3.1.2.1. Odabir životinja

U svakoj roditeljskoj generaciji štakora svim je životinjama određena razina trombocitnog serotonina i brzina unosa serotonina u trombocite prema metodama ranije razrađenima u ovom laboratoriju (Jernej i sur., 1988; Jernej i sur., 1999a). Na temelju tih rezultata, izdvojene su jedinke s ekstremno visokim odnosno ekstremno niskim vrijednostima koje su parene da bi dale sljedeću generaciju. Nakon četiri do pet generacija, utvrđeno je da su sublinije štakora dovoljno razdvojene s obzirom na kinetiku unosa serotonina u trombocite. Tijekom zadnjih 15 godina, uzgoj je više puta pokretan od početka (tj. od roditeljske generacije neselekcioniranih životinja), a u ovim eksperimentima korištene su životinje oba spola iz 15. generacije prethodnog, te kasnije iz 4. generacije novog uzgoja.

Određivanje trombocitnog serotonina

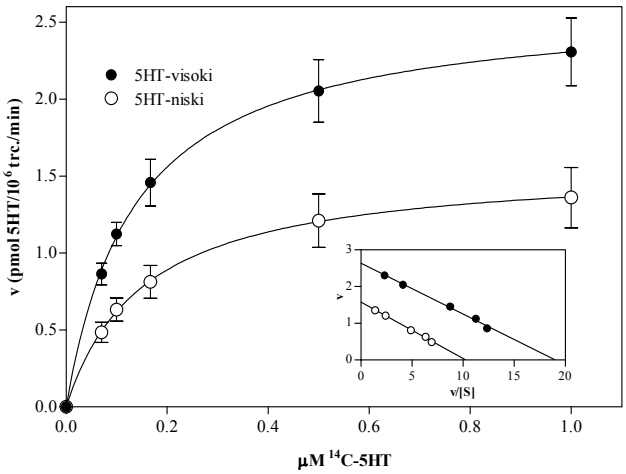
Sadržaj trombocitnog serotonina određen je prema Jernej i sur. (1988). Ukratko, uzorci krvi, pomiješani s antikoagulansom, centrifugirani su u horizontalnom rotoru na 1260 g kroz 30 sekundi. Tako dobivena supernatantna plazma bogata trombocitima (engl. *platelet-rich plasma*, PRP) istisnuta je iz štrcaljke u epruvetu prethodno napunjenu fiziološkom otopinom te su uzorci centrifugirani 10 min na 8960 g kako bi se dobio trombocitni talog. Talog je

soniciran u deioniziranoj vodi pri 20 000 Hz. Sonikat je pomiješan s 10 %-tnom otopinom $ZnSO_4$ i 1 N NaOH i centrifugiran 15 min na 1435 g kako bi se istaložili proteini. Potom je deproteinizirani supernatant pomiješan s 1 %-tnom otopinom L-cisteina i otopinom orto-ftaldialdehida u 10 N HCl, uzorci su prokuhani tijekom 10 min i ohlađeni, te je izmjerena fluorescencija na spektrofotofluorimetru na valnoj duljini od 485 nm, uz ekscitacijsku vrijednost od 345 nm.

Mjerenje aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika

Mjerenje kinetike serotoninskog prijenosnika temelji se na mjerenju unosa radioaktivno obilježenog supstrata (^{14}C-5HT) metodom ranije razrađenom u Laboratoriju (Fröbe i sur., 1995; Jernej i sur., 1999a). Ukratko, u 850 μL Krebs-Ringerovog fosfatnog pufera dodano je 50 μL PRP te su uzorci preinkubirani 15 minuta u vodenoj kupelji na 37 °C uz kontinuirano miješanje. Reakcija je započeta dodatkom 100 μL otopine ^{14}C-5HT koncentracije 0,5 μM, nakon čega su uzorci inkubirani 30 sekundi na 37 °C. Nakon 30 sekundi, inkubacija je naglo prekinuta dodavanjem 2 mL ledene fiziološke otopine i brzim odvajanjem trombocita od medija vakuum filtracijom kroz Whatman GF/C filter papir na 550 mm Hg. Filter papir je ispran s 2 × 4 mL fiziološke otopine i prenesen je u bočicu s 1 mL scintilacijske tekućine. Radioaktivnost vezana na filter-papiru izmjerena je na scintilacijskom beta-brojaču. Kao prazna proba korišteni su isti uzorci PRP-a inkubirani u ledenoj kupelji na 0 °C.

Aktivnost serotoninskog prijenosnika mjerena je pri koncentraciji supstrata 0,5 μM, gdje brzina unosa serotonina približno odgovara maksimalnoj (V_{max}). Na slici 3.1. prikazana je krivulja zasićenja unosa serotonina u trombocite WZ-5HT štakora (5HT-visoka i 5HT-niska sublinija).



Slika 3.1. Krivulja zasićenja unosa serotonina u trombocite WZ-5HT štakora i Eadie-Hofstee linearni prikaz (prema Čičin-Šain i sur., 2005)

U eksperimentima su korištene životinje iz obiju sublinija koje su se prema količini trombocitnog serotonina i brzini unosa serotonina u trombocite razlikovale 1,5-2 puta (prikazano u Rezultatima, Tablica 4.1.).

3.1.2.2. Izlaganje životinja stresu

U ovim pokusima korištene su ženke iz 15. generacije uzgoja, stare 14 mjeseci, težine 350-400 g. Životinje su izlagane kroničnom stresu u trajanju od 9 uzastopnih dana, a vrsta stresora, njihovo trajanje i redoslijed primjene prikazani su u Tablici 3.2. Desetog dana sve su životinje žrtvovane dekapitacijom.

Tablica 3.2. Izlaganje životinja kroničnom stresu

dan	vrsta stresa	opis
1	vješanje o rep	6 minuta životinja fiksirana o rep, glavom prema dolje
2	izolacija	24 sata životinja je sama u kavezu, između pojedinih kaveza su pregrade
3	prisilno plivanje	15 minuta boravi u bazenu promjera 20 cm i dubine 50 cm, temperatura vode ~24 °C
4	trešnja	tijekom 30 minuta kavez sa životinjama postavljen na platformu koja se trese uz 60 oscilacija u minuti
5	imobilizacija	60 minuta životinja je fiksirana u uskoj cijevi
6	pretrpavanje	24 sata životinja boravi u kavezu standardne veličine uz još 8 životinja
7	dugotrajna izloženost svjetlu	24 sata životinja izložena neprestanom osvjetljenju u prostoriji
8	prisilno plivanje u toploj vodi	5 minuta boravi u bazenu promjera 20 cm i dubine 50 cm, temperatura vode ~ 40 °C
9	imobilizacija	60 minuta životinja je fiksirana u uskoj cijevi

3.1.2.3. Uzimanje i obrada uzoraka mozga

Nakon dekapitacije štakora giljotinom, škarama je odstranjen gornji dio lubanje, a mozak je pomoću spatule izvađen na hladnu podlogu. Iz svježeg mozga izdvojene su regije hipokampusa, strijatuma i kore velikog mozga. Tkivo je preneseno u prethodno izvaganu Eppendorf epruvetu, nakon čega je epruveta ponovno izvagana na analitičkoj vagi i odmah potom uzorak je zamrznut u tekućem dušiku (za izolaciju RNA), odnosno u suhom ledu (za analize proteina). Razlika odvaga predstavlja masu tkiva. U nastavku, uzorci su obrađivani ovisno o daljnjem postupku.

3.1.2.3.1. Priprema uzoraka tkiva za izolaciju RNA

U smrznute uzorke dodano je 500 μL otopine za denaturaciju (G-otopine) te su homogenizirani ultrazvukom (20 000 Hz, 30 s). Homogenizirani uzorci pohranjeni su na -20 °C do daljnje obrade.

3.1.2.3.2. Priprema uzoraka tkiva za Western analizu

Uzorci tkiva homogenizirani su u deseterostrukom volumenu pufera za homogenizaciju (20 mM Tris-HCl, 250 mM saharoza, 2 mM EDTA, pH 7,4; neposredno prije korištenja u pufer su dodani inhibitori proteaza). Sastav pufera preuzet je iz Hirano i sur., 2005. Homogenat je centrifugiran 5 minuta na 800 g te je supernatant s proteinima prenesen u novu

epruvetu i centrifugiran 40 minuta na 18 000 g. Nastali talog resuspendiran je u odgovarajućem volumenu homogenizacijskog pufera (konačni volumen ovisio je o početnoj količini tkiva – talog dobiven homogenizacijom tkiva mase 300-400 mg resuspendiran je u 1 mL pufera). Koncentracija proteina u uzorku određena je metodom po M. Bradford (Bradford, 1976) uz goveđi serumski albumin kao standard. Uzorak je pomiješan s puferom za denaturaciju u omjeru 6:1 i pohranjen na -20 °C do daljnje obrade.

3.1.2.3.3. Priprema uzoraka tkiva za receptorsko vezivanje

Uzorci moždanog tkiva, pohranjeni na -70 °C (period čuvanja uzoraka trajao je od dva mjeseca do godinu dana), homogenizirani su u 10 volumena 0,32 M saharoze teflonskim homogenizatorom na 1000 rpm. Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 900 g, a dobiveni supernatant je odvojen u drugu epruvetu i centrifugiran 30 minuta na 16 000 g. Dobiveni talog homogeniziran je u 10 početnih volumena Tris-HCl pufera (pH 7,4) i inkubiran 15 minuta na 37 °C u vodenoj kupelji, kako bi se uklonili razni endogeni neurotransmiteri ili nukleotidi koji bi mogli utjecati na rezultat mjerenja. Homogenat je ponovno centrifugiran 30 minuta na 16 000 g. Ovako dobiven talog homogeniziran je u 80 početnih volumena Tris-HCl pufera. Tako priređeni homogenat odmah je korišten za mjerenje receptorskog vezivanja, a dio homogenata je pohranjen na -20 °C da bi se unutar tjedan dana odredila koncentracija proteina.

3.1.2.4. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore

3.1.2.4.1. Izolacija RNA

Ukupna stanična RNA iz tkivnog homogenata izolirana je modificiranom metodom kisele fenolne ekstrakcije (Chomczynski i Sacchi, 1987; Hranilović, 2007). Na 500 μL homogenata dodano je redom 50 μL 2 M natrijevog acetata (pH 4,00), 500 μL fenola zasićenog vodom i 200 μL smjese kloroform/izoamilnog alkohola (49:1). Nakon snažnog miješanja i inkubacije u ledu 20 minuta, uzorci su centrifugirani 20 minuta na 10 000 g (na temperaturi +4 °C), pri čemu su odvojene vodena i organska faza. Gornja, vodena faza (u kojoj se nalazi RNA) pažljivo je prenesena u novu epruvetu, dodan je jednaki volumen hladnog izopropanola (oko 600 μL) te su uzorci preko noći inkubirani na -20 °C. RNA je istaložena centrifugiranjem 20 minuta na 10 000 g, a talog je dvaput ispran s 500 μL 75 % etanola, uz centrifugiranje 10 minuta na 10 000 g. Talog je osušen u digestoru i otopljen u 20 μL vode tretirane DEPC-om. RNA je pohranjena na -70 °C.

Da bi se izbjegla kontaminacija ribonukleazama, nastavci za pipete i Eppendorf epruvete tretirani su 0,2 % otopinom DEPC (preko noći), a otopine korištene u izolaciji RNA autoklavirane su 30 minuta. Cijelo vrijeme postupka potrebno je nositi rukavice, koje je poželjno povremeno mijenjati. Budući da izoliranu RNA nije poželjno izlagati temperaturama višim od +4 °C, svi su postupci rađeni na ledu.

Kvaliteta izolirane RNA provjerena je elektroforezom manjeg alikvota RNA na 1 % agaroznom gelu, uz vizualizaciju pomoću etidij-bromida. Koncentracija RNA određena je spektrofotometrijski, mjerenjem apsorbancije na 260 nm i množenjem izmjerene apsorbancije s ekstincijskim faktorom (za RNA on iznosi 44) i faktorom razrijeđenja.

Izolirana RNA pročišćena je na kolonicama Quiagen-ovog kompleta za izolaciju RNA, pri čemu je dodan enzim deoksiribonukleaza I te je tako iz uzorka uklonjena genomska DNA. RNA je s kolonice eluirana u konačnom volumenu 14 μL. Nakon pročišćavanja, ponovno je elektroforezom provjerena kvaliteta RNA, a spektrofotometrijski je određena njezina koncentracija u uzorku.

3.1.2.4.2. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija provedena je prema već uhodanom protokolu koji je ranije korišten u ovom Laboratoriju (Bordukalo-Nikšić, 2007). Sastav reakcijske smjese i postupak reverzne transkripcije prikazani su u tablici 3.3. Da bi se smanjile pogreške u pipetiranju, za sve uzorke pripremana je skupna otopina (engl. *master mix*) zajedničkih sastojaka. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 μL.

Tablica 3.3. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju i uvjeti reakcije

sastojak	početna koncentracija	konačna koncentracija	V (μL)/uzorku
RNA + H_2O		1 μg RNA ukupno	8,25
oligo $d(T)_{16}$	0,25 μg/μL	0,025 μg/μL	2
RNasIn	40 U/μL	1 U/μL	0,5
inkubacija 5 min na 65 °C Potom su uzorci naglo ohlađeni na ledu i dodani su sljedeći sastojci:			
$MgCl_2$	25 mM	5 mM	4
RT pufer	10 ×	1 ×	2
dNTP	10 mM	1 mM	2
RNasIn	40 U/μL	1 U/μL	0,5
AMV r.t.	20 U/μL	0,75 U/μL	0,75

Nakon 10-minutne inkubacije na 25 °C, reakcija se odvijala 60 minuta na 42 °C, nakon čega je reakcijska smjesa zagrijavana 5 minuta na 95 °C, kako bi se inaktivirala reverzna

transkriptaza. Do izvođenja lančane reakcije polimerazom, dobivena cDNA pohranjena je na -20 °C.

3.1.2.4.3. Lančana reakcija polimerazom

Lančanom reakcijom polimerazom nakon reverzne transkripcije (engl. *reverse transcription - polymerase chain reaction*, RT-PCR) umnoženi su fragmenti pojedinih cDNA. Uz pretpostavku da je količina tako dobivenog PCR produkta proporcionalna početnoj količini kalupa cDNA (a time i količini pojedine mRNA u uzorku), mjerenjem količine produkata moguće je uspoređivati razine ekspresije određenih gena u pojedinim uzorcima.

U PCR su korišteni oligonukleotidni početnici navedeni u Tablici 3.1. Za svaku reakciju empirijski je određena optimalna koncentracija $MgCl_2$ i početnika, kao i temperatura nalijeganja početnika (engl. *annealing*). Reakcije su se odvijale u ukupnom volumenu od 20 μL, uz 0,2 mM dNTP i 0,6 jedinica Taq polimeraze po uzorku, te uz 1 μL kalupa cDNA po uzorku. Nakon što su određeni osnovni uvjeti umnažanja pojedinih fragmenata cDNA, za svaki par početnika izveden je PCR pri različitom broju ciklusa. Na taj je način određen optimalan broj ciklusa pri kojem su PCR produkti jasno vidljivi na gelu agaroze, a reakcija je još u linearnom području amplifikacije. Ti su podaci prikazani u Rezultatima (pogl. 4.1.2.).

Semi-kvantitativno određivanje razine ekspresije gena za serotoninske receptore 1A, 1B i 2A provedeno je uz korištenje triju referentnih gena čija je ekspresija u mozgu štakora konstantna: GAPDH, β-aktin i ciklofilin B. Svaka cDNA umnažana je u zasebnoj reakciji (tj. nije rađena koamplifikacija).

3.1.2.4.4. Detekcija i analiza PCR produkata

Alikvot od 10 μL svakog PCR produkta pomiješan je s 1 μL pufera za nanošenje uzorka na gel, te su produkti analizirani elektroforezom na 1,5 % agaroznom gelu u koji je dodano 0,1 % etidij-bromida. Nakon elektroforeze, gel je skeniran na aparatu Image Master VDS. Slika gela pohranjena je u tiff-formatu i denzitometrijski obrađena programom Image Master™ VDS Software, verzija 2.0. (Pharmacia Biotech, SAD). Na svakom gelu usporedno su analizirani uzorci iz obje sublinije štakora, pri čemu uvijek istovremeno analizirani ispitivani i referentni geni.

3.1.2.5. Analiza receptorskih proteina

3.1.2.5.1. Western analiza

SDS-PAGE i elektroprijenos proteina

Razina 5HT-2A receptorskog proteina određivana je kvantitativnom Western analizom (Burnette, 1981). Proteini su najprije razdvojeni vertikalnom elektroforezom na gelu poliakrilamida (engl. *polyacrilamide gel electorophoresis*, PAGE) uz dodatak anionskog detergenta natrijevog dodecilsulfata (engl. *sodium dodecylsulfate*, SDS) kao denaturirajućeg sredstva. Gornji gel (gel za sabijanje) bio je 5 %-tni, a donji gel (gel za razdvajanje) 10 %-tni. Elektroforeza je najprije tekla na 80 V, a po ulasku uzoraka u gel za razdvajanje na 120 V, uz 1× Tris-glicinski pufer. Optimalna količina proteina koja je nanošena na gel određena je u preliminarnim pokusima i iznosila je 10 μg. Po završetku elektroforeze, koja je trajala oko 2 h, proteini su pomoću aparature za elektroprijenos preneseni na nitrocelulozu membranu (engl. *blotting*). Elektroprijenos je trajao 1 h pri stalnoj jakosti struje 400 mA uz Towbin pufer. Učinkovitost prijenosa provjerena je bojenjem gela Coomassie Brilliant Blue (inkubacija preko noći) te reverzibilnim bojenjem membrane otopinom Ponceau S (inkubacija 10 min, odbojavanje u destiliranoj vodi).

Imunodetekcija i vizualizacija signala

Membrana je inkubirana 1 h u BLB puferu, čime su blokirana nespecifična vezna mjesta za proteine. Nakon kratkog ispiranja u PBS-T puferu, membrana je preko noći (4 °C) inkubirana u otopini primarnog protutijela za 5HT-2A receptor (razrijeđenje u DILB puferu u omjeru 1:1000). Sljedeći dan membrana je isprana PBS-T puferom (1 × 15 min, 3 × 5 min) i inkubirana 1 h sa sekundarnim protutijelom za IgG miša obilježenim peroksidazom (razrijeđenje 1:5000), te je ponovljeno ispiranje PBS-T puferom (1 × 15 min, 3 × 5 min).

Vizualizaciju signala omogućila je kemiluminiscentna reakcija peroksidaze (prisutne na sekundarnom protutijelu) uz luminol kao supstrat, pri čemu svjetlost oslobođena u reakciji ostavlja signal na rendgenskom filmu. Na membranu je ravnomjerno nanesena smjesa dviju detekcijskih otopina Kompleta za kemiluminiscentnu detekciju, te je nakon jednominutne inkubacije membrana stavljena između dvije najlonske folije i namještena u kasetu za eksponiranje, a na nju je položen rendgenski film. Ovaj postupak odvijao se u mraku. Ekspozicija filma trajala je 5 minuta. Po završetku ekspozicije, film je uronjen u razvijač do pojave prvih signala, te je signal fiksiran u odgovarajućoj otopini. Nakon fiksiranja, film je

ispran tekućom vodom, osušen i skeniran. Signali su denzitometrijski analizirani programom Image Master™ VDS Software, verzija 2.0. (v. 3.1.2.4.4.).

Ista membrana kasnije je preko noći inkubirana u otopini primarnog protutijela za β-aktin (razrijeđenje u DILB puferu u omjeru 1:250), te je sljedeći dan isprana PBS-T puferom i inkubirana s obilježenim sekundarnim protutijelom za IgG miša kako je već opisano.

Količina 5HT-2A receptora izražena je kao omjer intenziteta denzitometrijskog signala za 5HT-2A receptor i β-aktin.

3.1.2.5.2. Receptorsko vezivanje

Za mjerenje aktivnosti serotoninskog 1A receptora kao ligand je korišten 8-hidroksi-2-(di-N-propilamino)tetralin (8-OH-DPAT), obilježen radioaktivnim izotopom vodika (^{3}H). Metoda je po prvi put primijenjena u ovom Laboratoriju, a kao osnova za razradu metode korišteni su radovi Burnet i sur. (1992) i Bylund i Toews (1993). Detaljan opis razrade metode prikazan je u Rezultatima, a ovdje su navedeni konačno odabrani uvjeti mjerenja.

400 μL homogenata moždanog tkiva, priređenog kao što je opisano u poglavlju 3.1.2.3.3., što je otprilike odgovaralo količini 5 mg tkiva (60-80 μg proteina), inkubirano je uz dodatak radioaktivno obilježenog 8-OH-DPAT 1h na 30 °C. Za određivanje nespecifičnog vezivanja u duplikat svakog uzorka dodana je 10 μM otopina serotonina, koji djeluje kao kompetitivni inhibitor i veže sva specifična vezna mjesta. U tim se uvjetima mjeri samo vezanje obilježenog liganda na nespecifična mjesta, a razlika između ukupnog i nespecifičnog vezivanja predstavlja specifično vezivanje. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 500 μL. Reakcija je prekinuta vakuum filtracijom kroz GF-B filter papir (veličine pora 1,0 μm) pri tlaku od 18 mm Hg te ispiranjem s 2 × 5 mL fiziološke otopine. Da bi se smanjilo nespecifično vezivanje, filter papir je prethodno 30 min inkubiran u 0,1 %-tnoj otopini polietilen-imina. Nakon filtriranja i ispiranja, filter papir prenesen je u bočicu s 1 mL scintilacijske tekućine te je radioaktivnost izbrojana na scintilacijskom beta-brojaču. Svaki uzorak rađen je u dva duplikata: u dvije paralelne epruvete mjereno je ukupno, a u druge dvije epruvete nespecifično vezivanje (uz dodatak serotonina). Razlike između paralelno rađenih uzoraka iznosile su u većini slučajeva do 20 %. Rezultati su obrađeni u računalnom programu GraphPad Prism 3.0.

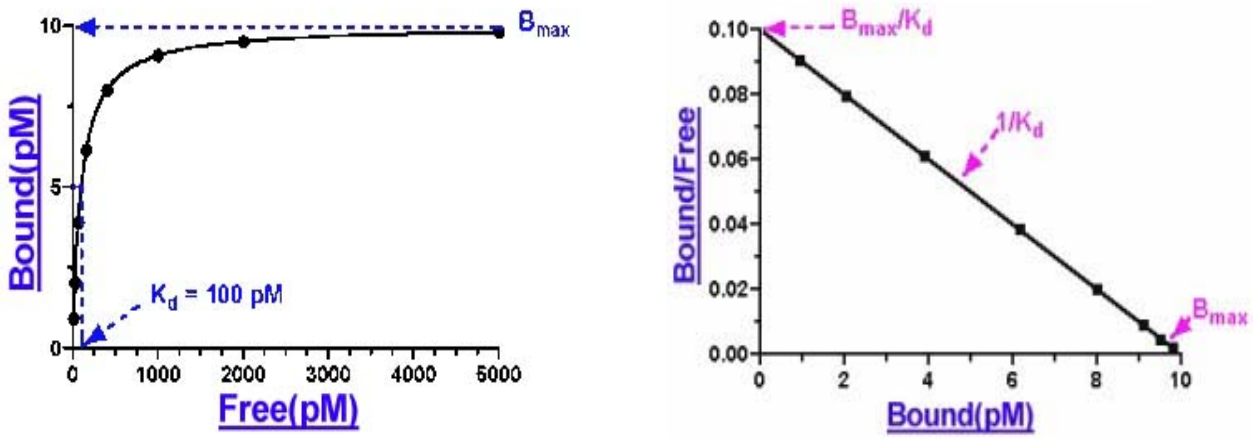
U svakom eksperimentu, osim uzoraka, izmjerena je i radioaktivnost radne otopine [^{3}H]8-OH-DPAT, a tako dobivene vrijednosti korištene su kao standardi za preračunavanje dobivenih otkucaja u minuti (engl. *counts per minute*, cpm) u količinu vezanog liganda

(pmol). U konačnom prikazu, rezultati mjerenja prikazani su u jedinicama količine vezanog liganda po masi proteina u uzorku (pmol [^{3}H]8-OH-DPAT/mg proteina).

Receptorsko vezivanje može se opisati jednadžbom analognom Michaelis-Menten jednadžbi enzimske kinetike, a koja ovdje glasi:

$$Bound = \frac{B_{max} \times Free}{K_d + Free}$$

gdje je Bound = količina vezanog liganda, Free = količina nevezanog (slobodnog) liganda, K_d = konstanta disocijacije, B_{max} = maksimalna količina liganda koja se može vezati na receptor. U praksi, konstanta K_d opisuje afinitet receptora za ligand, a B_{max} broj receptora u uzorku (tkivu). Na slici 3.2. lijevo prikazana je krivulja zasićenja vezanja liganda na receptor:



Slika 3.2. Lijevo: krivulja zasićenja vezanja liganda na receptor; desno: linearizacija saturacijske krivulje receptorskog vezivanja prema Rosenthalu. Free = koncentracija nevezanog liganda, Bound = koncentracija vezanog liganda. Preuzeto s web stranice www.unmc.edu/Pharmacology/receptortutorial/.

Konstante K_d i B_{max} moguće je odrediti na dva načina: metodom nelinearne regresije (tzv. *curve fit*, pomoću računalnog programa) ili linearnom transformacijom saturacijske krivulje. Najčešće korištena linearizacija je tzv. Rosenthal-Scatchardov prikaz, prikazan na slici 3.2. desno, čija jednadžba glasi:

$$\frac{Bound}{Free} = \frac{B_{\max}}{K_d} - \frac{Bound}{K_d}$$

U idealnom slučaju, eksperimentalno dobijene točke čine pravac, čiji nagib odgovara $-1/K_d$, a odsječak na apscisi B_{max}.

U početnim eksperimentima konstante su izračunate na oba načina, a kasnije samo nelinearnom regresijom.

3.1.2.6. Statistička obrada podataka

Ekspresija mRNA izražena je kao omjer intenziteta PCR produkta ispitivanog i referentnog gena. Dobiveni rezultati analizirani su dvosmjernim t-testom uz granicu značajnosti $p < 0,05$. Za obradu podataka korišten je statističko-grafički program GraphPad Prism®, verzija 3.02 i demo-verzija programa GraphPad StatMate 2.00 (GraphPad Software, SAD, www.graphpad.com).

Denzitometrijski podaci o količini 5HT-2A receptorskog proteina analizirani su dvosmjernim t-testom, uz granicu značajnosti $p < 0,05$.

Rezultati mjerenja receptorskog vezivanja obrađeni su u programu GraphPad Prism®. Za određivanje konstanti K_d i B_{max} korištena je nelinearna regresijska analiza, izračunate su srednje vrijednosti i standardne devijacije, a za testiranje razlika između sublinija korišten je dvosmjerni t-test uz granicu značajnosti $p < 0,05$.

3.2. ISTRAŽIVANJA NA HUMANOJ POPULACIJI

3.2.1. Materijali

3.2.1.1. Uzorci DNA

U istraživanjima polimorfizama gena za 5HT-1B i 5HT-2A receptor korišteni su uzorci DNA izolirane iz krvi pacijenata liječenih od ovisnosti o alkoholu u Kliničkoj bolnice Sestara milosrdnica u Zagrebu. Ukupno su genotipizirana 172 uzorka DNA pacijenata, čija je dijagnoza alkoholizma donesena na temelju strukturiranog intervjua prema kriterijima DSM-IV. Pacijenti su dodatno podijeljeni u grupe prema vrsti alkoholizma (90 s alkoholizmom tipa I i 82 s alkoholizmom tipa II; prema Cloninger, 1987). Dok se alkoholizam tipa I javlja u osoba oba spola, blažeg je tijeka, započinje u pravilu nakon 25. godine i ne uključuje

antisocijalno ponašanje, alkoholizam tipa II javlja se gotovo isključivo kod muškaraca, započinje ranije (prije 25. godine života) i prati ga antisocijalno ponašanje, uz izraženu nasljednu komponentu bolesti (Parsian i Cloninger, 2001). Kao kontrolni uzorci korišteni su uzorci DNA dobrovoljnih davatelja krvi, korišteni u prethodnim studijama provedenima u ovom Laboratoriju (Štefulj, 2005; Babić, 2006; Mokrović i sur., 2008). Genotipizirano je 219 kontrolnih uzoraka. Svi ispitanici (i pacijenti i kontrolni ispitanici) bili su muškog spola. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

3.2.1.2. Kemikalije

Za lančanu reakciju polimerazom

Korištene su iste kemikalije za lančanu reakciju polimerazom kao što je navedeno u poglavlju 3.1.1.2., uz korištenje specifičnih oligonukleotidnih početnika za DNA čovjeka. Njihov sastav preuzet je iz Štefulj i sur., 2004 (za 5HT-1B receptor) odnosno Collier i sur., 1997 (za 5HT-2A receptor). Detalji o ovim početnicima prikazani su u tablici 3.4.

Tablica 3.4. Oligonukleotidni početnici korišteni za umnažanje fragmenata DNA čovjeka

gen	nukleotidni slijed	veličina PCR produkta
5HT-1B	5' GAAACAGACGCCCAACAGGAC 3' 5' CCAGAAACCGCGAAAGAAGAT 3'	548 bp
5HT-2A	5' AACCAACTTATTTCCTACCAC 3' 5' CGACAACGATGGAACGTCGAA 3'	468 bp

Za digestiju produkata PCR

- restrikcijski enzim *Hinc*II, 10U/μL (Fermentas, Kanada)
- restrikcijski enzim *Msp*I, 10U/μL (Fermentas, Kanada)

Za elektroforezu na agaroznom gelu

Korištene su iste kemikalije kao što je navedeno u poglavlju 3.1.1.2.

3.2.2. METODE

3.2.2.1. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor

Polimorfizmi gena za 5HT-1B i 5HT-2A receptor analizirani su na uzorcima DNA osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika. Uzorci DNA izolirani su iz krvi ispitanika u sklopu prethodnih istraživanja (Štefulj, 2005; Mokrović i sur., 2008).

Polimorfizam G861C za 5HT-1B receptor je analiziran metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata (engl. *restriction fragment length polymorphism*, RFLP). U prvom koraku, u lančanoj reakciji polimerazom pomoću specifičnih oligonukleotidnih početnika umnožen je odsječak DNA koji sadrži polimorfno mjesto. Reakcija se odvijala u ukupnom volumenu od 15 μL, uz 50 ng genomske DNA, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 0,6 μM početnika, 0,75 U Taq polimeraze, te uz dodatak Q-otopine koja smanjuje učestalost nespecifičnih produkata. Nakon početne denaturacije (5 minuta na 94 °C) reakcija se odvijala u 30 ciklusa denaturacije (30 s, 94 °C), nalijeganja početnika (30 s, 60 °C) i produljenja lanca DNA (30 s, 72 °C), nakon čega je uslijedila završna ekstenzija produkata (7 minuta na 72 °C). Ovakvom reakcijom dobiva se jedinstveni produkt duljine 548 bp. Ovaj produkt podvrgnut je digestiji restrikcijskom endonukleazom *Hinc*II (*Hind*III). Digestija se odvijala preko noći na 37 °C, a reakcijska smjesa, ukupnog volumena 20 μL, sadržavala je 3 μL PCR produkta, 1× pufer Tango i 1U *Hinc*II. Produkti digestije razdvojeni su na 2%-tnom gelu agaroze (uz dodatak 0,1 % etidij-bromida) tijekom 75 minuta pri 80 V i vizualizirani pomoću UV zraka. U slučaju alela 861G, digestijom su dobiveni produkti duljine 452 i 96 bp, a kod alela 861C produkti duljine 310, 142 i 96 bp. Zbog uvjeta elektroforeze i vizualizacije produkata, na gelu su bili vidljivi samo najveći fragmenti – u slučaju alela G, 452 bp, a kod alela C, 310 bp (slika 3.4.).

gaaacagacg cccaacagga ccggcaagcg cttgacccga gcccagctga taaccgactc
ccccgggtcc acgtcctcgg tcacctctat taactcgcgg gttcccgacg tgcccagcga
atccggatct cctgtgtat***g tC/Gaac***caagt caaagtgcga gtctccgacg ccctgctgga
aaagaagaaa ctcatggccg ctagggagcg caaagccacc aagaccctag ggatcatttt
gggagccttt attgtgtgtt ggctaccctt cttcatcatc tccctagtga tgcctatctg
caaagatgcc tgctggttcc acctagccat ctttgacttc ttcacatggc tgggctatct
caactccctc atcaacccca taatctatac catgtccaat gaggacttta aacaagcatt
ccataaactg atacgtttta agtgcacaa***g ttgac***ttgcc gtttgcagtg tgcctaagcg
acctttgggg accaagttgt gtctggttcc acaggtaggt cgaatcttct ttcgcggttt
ctgg

	G-alel	C-alel
↓		
H*inc*II: 5'... G T Py Pu A C...3'	452 bp	142 bp
3'... C A Pu Py T G...5'	96 bp	310 bp
↑		96 bp

Slika 3.4. Nukleotidni slijed odsječka DNA koji sadrži G861C polimorfno mjesto, umnoženog u lančanoj reakciji polimerazom uz korištenje početnika iz Štefulj i sur. (2004). Podcrtani slijedovi odgovaraju mjestu nalijeganja početnika. Mjesta prepoznavanja restrikcijske endonukleaze H*inc*II označena su kurzivom (v. donji dio slike). U slučaju G-alela, nastaju dva restrikcijska fragmenta, a u slučaju C-alela, tri.

3.2.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor

Analognim postupkom (RFLP) analiziran je i polimorfizam gena za 5HT-2A receptor (-1438A/G). Lančanom reakcijom polimerazom, uz 150 ng genomske DNA, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2 mM dNTP, 0,5 μM početnika i 0,55 U Taq polimeraze, i temperaturu nalijeganja početnika 60 °C kroz 35 ciklusa, dobiven je produkt veličine 468 bp. Digestija produkta restrikcijskom endonukleazom *Msp*I (*Hpa*II) odvijala se preko noći na 37 °C, uz 7,5U *Msp*I. U slučaju prisutnosti alela -1438A, produkt se ne cijepa, a u slučaju alela G digestijom nastaju dva fragmenta veličine 244 i 224 bp (slika 3.5.).

```
aagctgcaag gtagcaacag ccaggagggc ggaccaaaca ggctttttct tctccctctt
tttgctacat attaatattg ggaagttttc ctttgctttt gagagaaact ggagaaatgg
ccttttgtgc agattcccat taaggtaggt aagtggcact gtggtaattt tttaggctga
agggtgaaga gagaacataa ataaggctag aaaacagtat gtcctcggag tgctgtgagt
gtcT/Cggcact tccatccaaa gccaacagtg tttgtgtcca gagtggaatt actgacattg
gccacatagg ctcagggtgg ctaggcacgt ctgtggtgat aactctgata aactattagc
actattttta tttaatagat acaccattga actggcttat tttcttcagc agaaatatgc
cacccagata ttattcaaaa cctcacatgt ggtaggaaat aagttggtt
```

		A-alel	G-alel
	↓		
M*sp*I:	5'... CCGG...3'	468 bp (ne cijepa)	244 bp
	3'... GGCC...5'		224 bp
	↑		

Slika 3.5. Nukleotidni slijed odsječka DNA koji sadrži -1438AG polimorfno mjesto, umnoženog u lančanoj reakciji polimerazom uz korištenje početnika iz Collier i sur. (1997). Potcrtani slijedovi odgovaraju mjestu nalijeganja početnika. Mjesto prepoznavanja restrikcijske endonukleaze M*sp*I označeno je kurzivom (v. donji dio slike). U slučaju A-alela, produkt se ne cijepa, dok u slučaju G-alela nastaju dva fragmenta sličnih veličina (244 i 224 bp), koji na gelu komigriraju.

3.2.2.3. Statistička obrada podataka

Rezultati genotipizacije uneseni su u računalnu bazu podataka (Microsoft Excel). Razlike među populacijama, kao i Hardy-Weinbergova ravnoteža, računate su dvosmjernim hi-kvadrat (χ^2) testom (distribucije genotipova) odnosno dvosmjernim Fisherovim egzaktnim testom (distribucije alela). Sve analize rađene su pomoću računalnog programa GraphPad InStat (verzija 3.01, GraphPad Software, SAD, www.graphpad.com).

4. REZULTATI

4.1. ISTRAŽIVANJA NA ANIMALNOM MODELU

4.1.1. ODABIR ŽIVOTINJA

U eksperimentima su korištene životinje odabrane na temelju koncentracije trombocitnog serotonina i aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika, iz 15. generacije uzgoja (ekspresijske studije, Western analiza, izlaganje kroničnom stresu), te iz 4. generacije novog uzgoja (receptorsko vezivanje). Sumarni podaci o trombocitnim serotoninskim parametrima odabranih životinja prikazani su u Tablicama 4.1.a i b.

Tablica 4.1.a. Trombocitni serotoninski parametri životinja korištenih u svim pokusima. Podaci su izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija.

generacija	sublinija	N	razina serotonina (μg 5HT/mg trc. prot.)	brzina unosa serotonina (nmol 5HT/mg trc. prot./min)
F15	5HT-visoki	18	1,29 ± 0,14	1,41 ± 0,28
	5HT-niski	17	0,84 ± 0,13	0,70 ± 0,12
F4	5HT-visoki	16	1,58 ± 0,20	1,13 ± 0,19
	5HT-niski	16	0,89 ± 0,22	0,88 ± 0,13

Tablica 4.1.b. Trombocitni parametri životinja korištenih u pokusu izlaganja kroničnom stresu izraženi kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

sublinija	skupina u pokusu	N	razina serotonina (μg 5HT/mg trc. prot.)	brzina unosa serotonina (nmol 5HT/mg trc. prot./min)
5HT-visoki	fiziološki uvjeti	9	1,28 ± 0,19	1,42 ± 0,35
	kronični stres	9	1,31 ± 0,08	1,40 ± 0,22
5HT-niski	fiziološki uvjeti	8	0,83 ± 0,12	0,74 ± 0,11
	kronični stres	9	0,81 ± 0,14	0,68 ± 0,13

4.1.2. ANALIZA EKSPRESIJE mRNA ZA SEROTONINSKE RECEPTORE METODOM SEMI-KVANTITATIVNOG RT-PCR

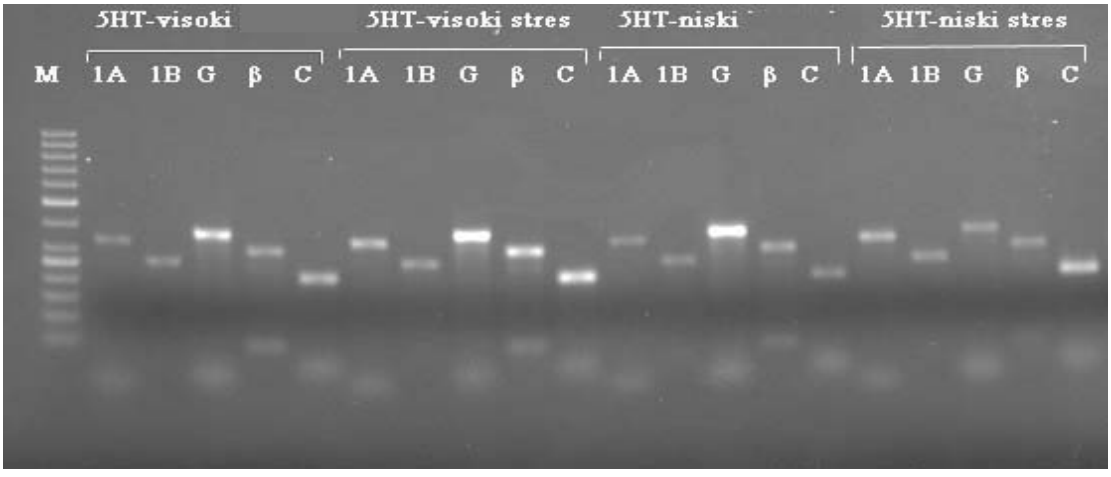
Ekspresija mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptore analizirana je metodom semi-kvantitativnog RT-PCR koja je ranije uhodana u ovom Laboratoriju (Bordukalo-Nikšić, 2003). RNA za pojedine receptore analizirana je u regijama njihove najveće zastupljenosti (v. Barnes i Sharp, 1999): 5HT-1A u hipokampusu (hpc) i čeonoj kori, 5HT-1B u hipokampusu, strijatumu (str) i čeonoj kori, a 5HT-2A u čeonoj kori. Ukupna stanična RNA izolirana je iz 30-50 mg moždanog tkiva (ovisno o veličini pojedinih regija). Nakon pročišćavanja, ukupna količina RNA iznosila je 15-20 μg po uzorku.

Uvjeti lančane reakcije polimerazom za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor te tri odabrana referentna gena (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B) utvrđeni su u preliminarnim eksperimentima, a optimalne koncentracije $MgCl_2$ i početnika, kao i broj ciklusa PCR za svaku reakciju naveden je u tablici 4.2.

Tablica 4.2. Optimalni uvjeti PCR pri kojima je reakcija u linearnom području amplifikacije

cDNA	koncentracija $MgCl_2$ (mM)	koncentracija početnika (mM)	veličina PCR produka (bp)	optimalan broj ciklusa PCR
GAPDH	2,0	0,4	367	24
β-aktin	2,0	0,4	303	26
ciklofilin B	2,0	0,4	216	26
5HT-1A	1,0	0,8	336	28
5HT-1B	1,5	0,8	262	32
5HT-2A	2,5	0,8	611	30

Slika 4.1. prikazuje tipičan agarozni gel nakon elektroforetske separacije PCR produkata. Produkti dobiveni umnažanjem cDNA za sve 5HT-receptore i referentne gene iz jedne životinje naneseni su na isti gel. PCR je rađen usporedno na životinjama iz obje sublinije u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu. Sumarni podaci prikazani su u Tablicama 4.3 – 4.5, a u nastavku teksta, najprije je uspoređena ekspresija gena za 5HT receptore u sublinijama WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima, a zatim u uvjetima kroničnog stresa.



Slika 4.1. Produkti RT-PCR iz hipokampusa štakora nakon elektroforeze na 1,5 % agaroznom gelu. Oznake produkata: 1A, 5HT-1A receptor (336 bp); 1B, 5HT-1B receptor (262 bp); G, GAPDH (367 bp); β, β-aktin (303 bp); C, ciklofilin B (216 bp); M, ljestvica DNA (50 bp). Iznad produkata navedene su oznake sublinija i skupina štakora.

4.1.2.1. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora u fiziološkim uvjetima

4.1.2.1.1. 5HT-1A receptor

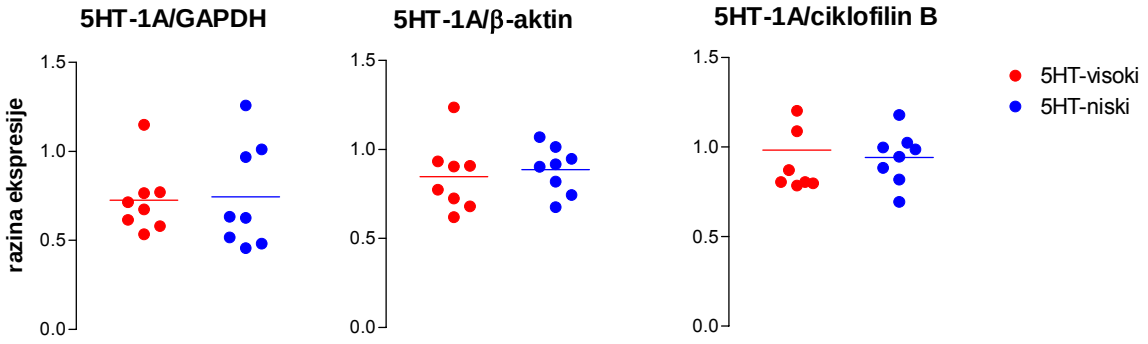
Ekspresija mRNA za serotoninski 1A receptor proučena je u dvije regije mozga WZ-5HT štakora: hipokampusu i čeonoj kori. Razina ekspresije izražena je kao omjer količine PCR produkata za 5HT-1A receptor i tri referentna gena (GAPDH, β-aktin i ciklofilin B). Rezultati mjerenja sumarno su prikazani u Tablici 4.3, a individualne vrijednosti za svaki receptor u odnosu na svaki od korištena tri referentna gena prikazane su na slikama 4.2., 4.3. i 4.5.

Tablica 4.3. Razine mRNA za 5HT-1A receptor u hipokampusu i čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu* izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

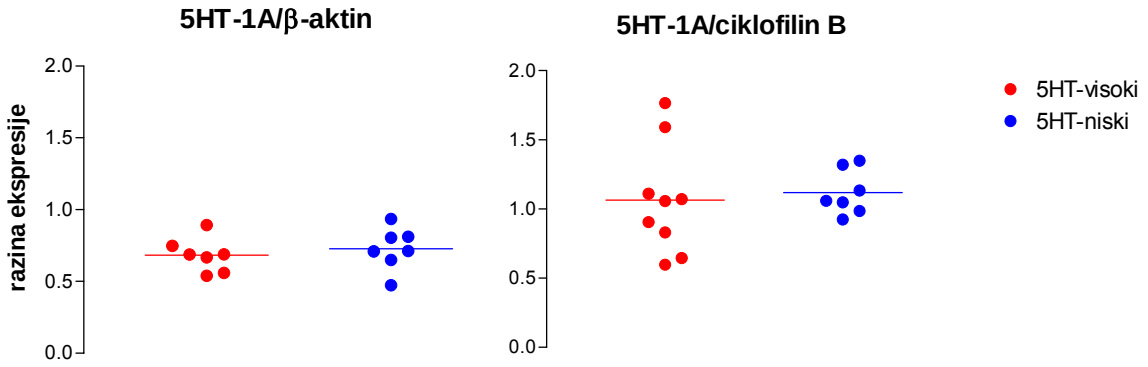
sublinija	N	5HT-1A mRNA				
		hipokampus			čeona kora	
		5HT-1A/ GAPDH	5HT-1A/ β-aktin	5HT-1A/ ciklofilin B	5HT-1A/ β-aktin	5HT-1A/ ciklofilin B
5HT-visoki	7-9	0,73 ± 0,19	0,85 ± 0,19	0,98 ± 0,26	0,68 ± 0,12	1,06 ± 0,39
5HT-niski	7-8	0,74 ± 0,29	0,88 ± 0,13	0,94 ± 0,14	0,73 ± 0,14	1,12 ± 0,16
5HT-visoki uz stres	8-9	0,81 ± 0,43	1,02 ± 0,32	1,14 ± 0,32	0,73 ± 0,24	1,07 ± 0,37
5HT-niski uz stres	8-9	0,81 ± 0,29	0,92 ± 0,22	1,05 ± 0,24	0,62 ± 0,18	0,92 ± 0,29

* radi lakše usporedbe, u tablici su usporedno prikazani podaci o ekspresiji u fiziološkim uvjetima i nakon stresa, a obrada rezultata ekspresije nakon izlaganja stresu prikazana je u poglavlju 4.1.2.2.

Na slikama 4.2.a i b prikazana je ekspresija mRNA za 5HT-1A receptor u hipokampusu i čeonoj kori WZ-5HT štakora kod pojedinih životinja, uz naznačene srednje vrijednosti skupine. Razina ekspresije izražena je kao omjer jačine signala za 5HT-1A i tri referentna gena (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B). Nema razlika u količini mRNA za 5HT-1A receptor između dviju sublinija, neovisno o istraživanoj regiji mozga i referentnom genu.



Slika 4.2.a. Ekspresija mRNA za 5HT-1A receptor u hipokampusu sublinija WZ-5HT štakora



Slika 4.2.b. Ekspresija mRNA za 5HT-1A receptor u čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora

4.1.2.1.2. 5HT-1B receptor

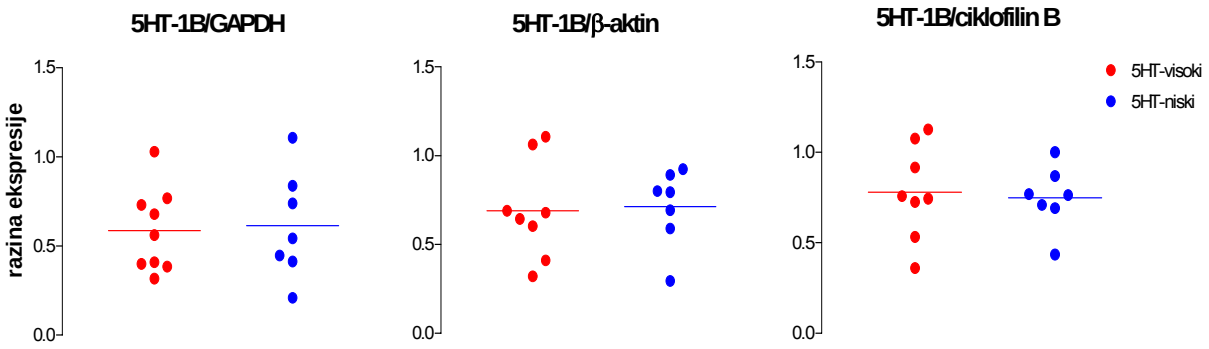
Ekspresija mRNA za 5HT-1B receptor proučena je u hipokampusu, čeonoj kori i strijatumu obiju sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora. Kao i kod 5HT-1A receptora, razina ekspresije izražena je kao omjer jačine signala za 5HT-1B i referentne gene (GAPDH, β-aktin i ciklofilin B). Rezultati mjerenja prikazani su u Tablici 4.4.

Tablica 4.4. Razine mRNA za 5HT-1B receptor u hipokampusu, čeonoj kori i strijatumu sublinija WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu* izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

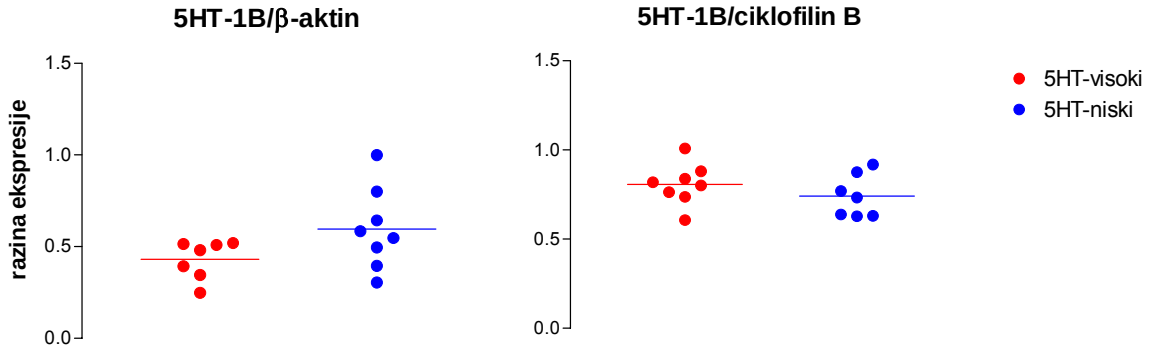
sublinija	N	5HT-1B mRNA							
		hipokampus			čeona kora		strijatum		
		5HT-1B/ GAPDH	5HT-1B/ β-aktin	5HT-1B/ ciklofilin B	5HT-1B/ β-aktin	5HT-1B/ ciklofilin B	5HT-1B/ GAPDH	5HT-1B/ β-aktin	5HT-1B/ ciklofilin B
5HT-visoki	7-9	0,58 ± 0,23	0,69 ± 0,28	0,78 ± 0,26	0,43 ± 0,10	0,81 ± 0,11	0,44 ± 0,06	0,62 ± 0,10	1,22 ± 0,27
5HT-niski	7-8	0,61 ± 0,30	0,71 ± 0,21	0,75 ± 0,17	0,59 ± 0,22	0,74 ± 0,12	0,42 ± 0,09	0,62 ± 0,17	1,23 ± 0,39
5HT-visoki uz stres	8-9	0,58 ± 0,31	0,71 ± 0,20	0,78 ± 0,14	0,59 ± 0,15	0,86 ± 0,21	0,40 ± 0,08	0,58 ± 0,09	1,06 ± 0,22
5HT-niski uz stres	8-9	0,61 ± 0,28	0,68 ± 0,18	0,80 ± 0,28	0,51 ± 0,13	0,78 ± 0,24	0,41 ± 0,12	0,61 ± 0,17	1,07 ± 0,25

* v. komentar uz Tablicu 4.3.

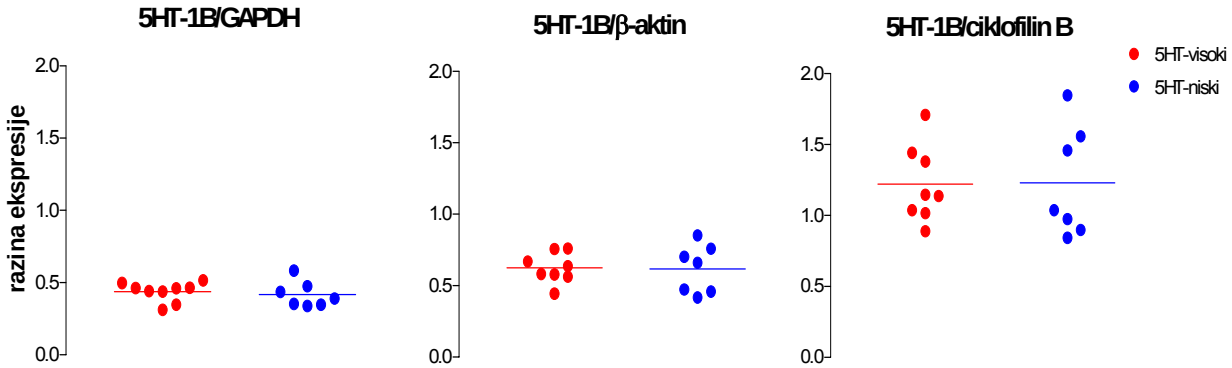
Na slikama 4.3.a, b i c prikazana je ekspresija mRNA za 5HT-1B receptor u hipokampusu, čeonoj kori i strijatumu Wistar-Zagreb 5HT štakora. Razina ekspresije izražena je kao omjer jačine signala za 5HT-1B i tri referentna gena (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B). Ni u jednoj od navedenih regija nema razlika u količini mRNA za 5HT-1B receptor između dviju sublinija.



Slika 4.3.a. Ekspresija mRNA za 5HT-1B receptor u hipokampusu sublinija WZ-5HT štakora



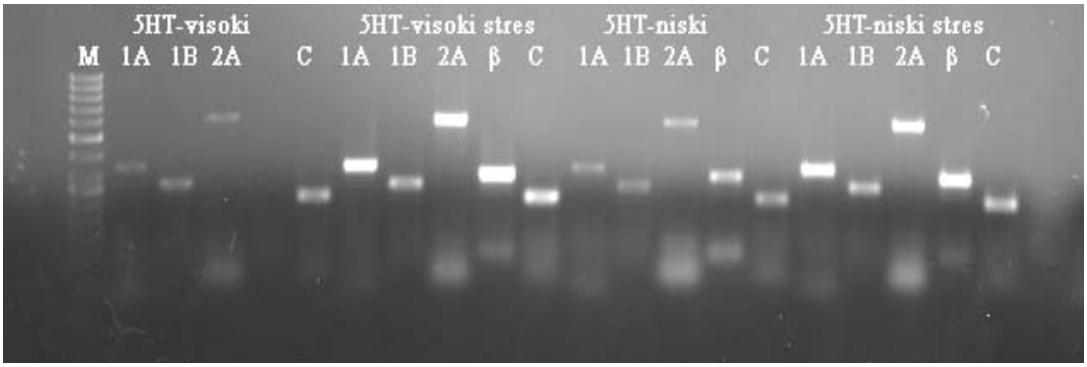
Slika 4.3.b. Ekspresija mRNA za 5HT-1B receptor u čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora



Slika 4.3.c. Ekspresija mRNA za 5HT-1B receptor u strijatumu sublinija WZ-5HT štakora

4.1.2.1.3. 5HT-2A receptor

Ekspresija mRNA za 5HT-2A receptor istražena je u čeonoj kori obiju sublinija WZ-5HT štakora. Tipičan agarozni gel nakon elektroforetske separacije PCR produkata dobivenih iz cDNA u čeonoj kori prikazan je na slici 4.4.



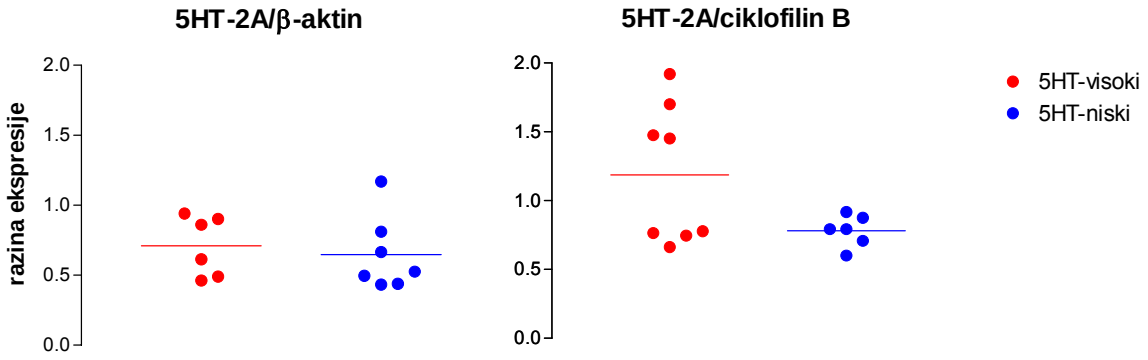
Slika 4.4. Produkti RT-PCR iz čeone kore štakora nakon elektroforeze na 1,5% agaroznom gelu. Oznake produkata: 1A, 5HT-1A receptor (336 bp); 1B, 5HT-1B receptor (262 bp); 2A, 5HT-2A receptor (611 bp); β, β-aktin (303 bp); C, ciklofilin B (216 bp); M, ljestvica DNA (50 bp). Iznad produkata navedene su oznake sublinija i skupina štakora.

Razina ekspresije izražena je kao omjer jačine signala za 5HT-2A i dva referentna gena (β-aktin i ciklofilin B) i prikazana je u Tablici 4.5. i na slici 4.5. Zbog nezadovoljavajuće kvalitete PCR produkta za 5HT-2A u nekim uzorcima, broj uzoraka u pojedinim skupinama životinja manji je nego što je isprva bilo predviđeno. Nisu opažene razlike u ekspresiji ovog receptora između dviju sublinija.

Tablica 4.5. Razine mRNA za 5HT-2A receptor u čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu* izražene kao srednja vrijednost ± standardna devijacija

sublinija	N	5HT-2A mRNA	
		5HT-2A/β-aktin	5HT-2A/ciklofilin B
5HT-visoki	6-8	0,71 ± 0,21	1,19 ± 0,50
5HT-niski	6-7	0,65 ± 0,26	0,78 ± 0,11
5HT-visoki uz stres	8	0,64 ± 0,17	0,96 ± 0,33
5HT-niski uz stres	6	0,63 ± 0,15	0,94 ± 0,24

* v. komentar uz Tablicu 4.3.



Slika 4.5. Ekspresija mRNA za 5HT-2A receptor u čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora

Valja napomenuti da su mjerenja ekspresije mRNA za 5HT-2A receptor u WZ-5HT štakora rađena i ranije, na životinjama oba spola iz ranijeg uzgoja (10., 11. i 12. generacija, ukupno 22 životinje u svakoj subliniji). Ekspresija 5HT-2A receptora u tom je pokusu bila izražena prema tri referentna gena (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B). Taj pokus također nije pokazao razlike u ekspresiji 5HT-2A receptora između sublinija.

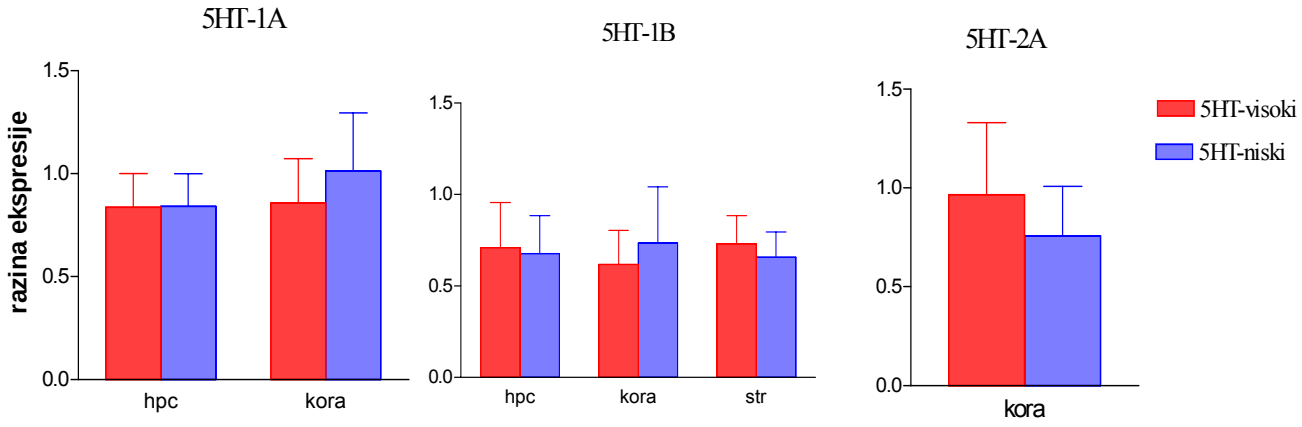
Za daljnju obradu, izračunata je geometrijska sredina signala sva tri referentna gena (prema formuli $G = \sqrt[n]{x_1 \times x_2 \times ... \times x_n}$), te je jačina signala pojedinih serotoninskih receptora normirana prema tako dobivenoj vrijednosti. Ti su rezultati prikazani u Tablici 4.6. i na slici 4.6.

Tablica 4.6. Razine mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor u sublinijama WZ-5HT štakora, izražene prema geometrijskoj sredini referentnih gena (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B), u tri istraživane regije mozga (srednja vrijednost ± standardna devijacija)

sublinija	N	mRNA					
		hipokampus		čeona kora			strijatum
		5HT-1A/ ref. geni	5HT-1B/ ref. geni	5HT-1A/ ref. geni	5HT-1B/ ref. geni	5HT-2A/ ref. geni	5HT-1B/ ref. geni
5-HT visoki	8-9	0,83 ± 0,16	0,71 ± 0,25	0,86 ± 0,22	0,62 ± 0,19	0,96 ± 0,36	0,73 ± 0,15
5HT-niski	7-8	0,84 ± 0,16	0,68 ± 0,21	1,01 ± 0,28	0,73 ± 0,31	0,76 ± 0,25	0,66 ± 0,14

Ni u jednoj od ispitivanih regija mozga nisu opažene razlike u ekspresiji gena za ove serotoninske receptore između dviju sublinija štakora. Ekspresija pojedinih receptora u 5HT-niskoj subliniji kretala se između 90 i 110 % u odnosu na 5HT-visoku subliniju, dok su se koeficijenti varijabilnosti kretali 20 - 30 % (hipokampus), 25 - 40 % (čeona kora) odnosno

oko 20 % (strijatum). Kod rezultata izraženih po geometrijskoj sredini ekspresije referentnih gena koeficijenti varijabilnosti su niži nego kad se ekspresija izražava po pojedinačnom referentnom genu.



Slika 4.6. Ekspresija mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor u hipokampusu (hpc), čeonoj kori i strijatumu (str) dviju sublinija WZ-5HT štakora. Razina ekspresije izražena je prema geometrijskoj sredini signala triju referentnih gena.

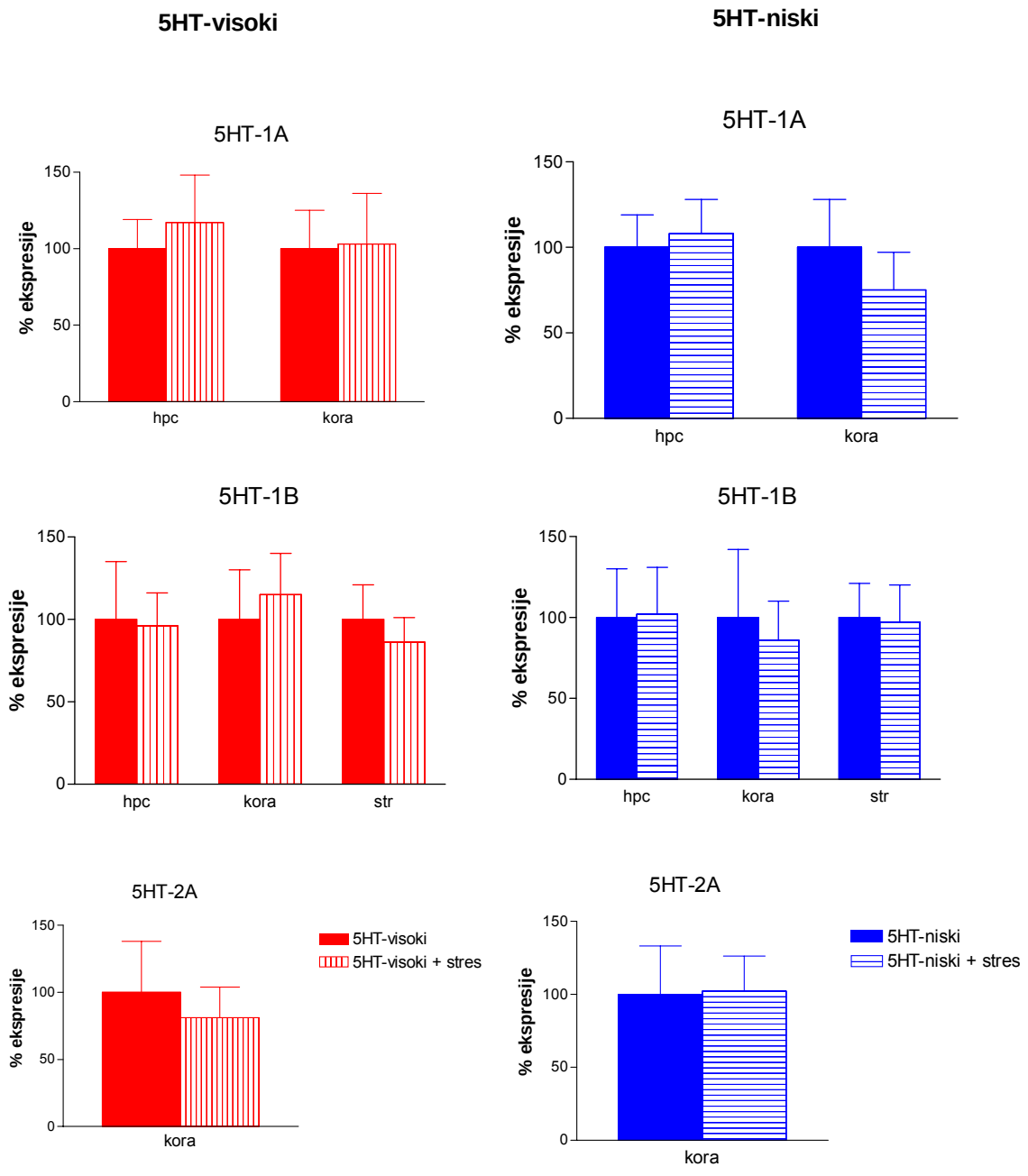
4.1.2.2. Ekspresija mRNA za serotoninske receptore u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora nakon izlaganja kroničnom stresu

Osim u fiziološkim uvjetima, ekspresija mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptore proučena je i u sublinija WZ-5HT štakora nakon izlaganja kroničnom stresu. Razine ekspresije izražena prema pojedinačnim referentnim genima prikazane su u Tablicama 4.3 – 4.5., a razina ekspresije izražena prema geometrijskoj sredini signala triju referentnih gena u Tablici 4.7:

Tablica 4.7. Ekspresija mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptore u tri regije mozga sublinija WZ-5HT štakora, u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu. Razina ekspresije pojedinih receptora izražena je kao omjer prema geometrijskoj sredini signala za tri (GAPDH, β-aktin, ciklofilin B), odnosno dva referentna gena (β-aktin, ciklofilin B u čeonoj kori). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna devijacija. Hpc = hipokampus, str = strijatum.

sublinija/ skupina	N	5HT-1A		5HT-1B			5HT-2A
		hpc	kora	hpc	kora	str	kora
5HT-visoki	8-9	0,84 ± 0,16	0,86 ± 0,22	0,71 ± 0,25	0,62 ± 0,19	0,73 ± 0,15	0,96 ± 0,36
5HT-visoki + stres	8-9	0,98 ± 0,26	0,88 ± 0,28	0,68 ± 0,14	0,71 ± 0,15	0,63 ± 0,11	0,78 ± 0,22
5HT-niski	7-8	0,84 ± 0,16	1,01 ± 0,28	0,68 ± 0,21	0,73 ± 0,31	0,66 ± 0,14	0,76 ± 0,25
5HT-niski + stres	6-9	0,91 ± 0,17	0,75 ± 0,22	0,69 ± 0,19	0,63 ± 0,18	0,64 ± 0,15	0,77 ± 0,18

Usporedba ekspresije mRNA za tri navedena serotoninska receptora u pojedinim regijama WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu prikazana je na slici 4.7. Za svaku subliniju, ekspresija mRNA u stresnim uvjetima izražena je kao postotak ekspresije u fiziološkim uvjetima.



Slika 4.7. Ekspresija mRNA za 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor u tri regije mozga WZ-5HT štakora, u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu.

Iako nigdje nisu pokazane statistički značajne razlike, u čeonoj kori 5HT-niske sublinije opažena je tendencija smanjenju ekspresije 5HT-1A receptora nakon izlaganja kroničnom stresu (*p = 0,0629*).

4.1.3. ANALIZA RECEPTORSKIH PROTEINA

4.1.3.1. Western analiza 5HT-2A receptora

Analiza 5HT-2A receptorskih proteina u čeonoj kori Wistar-Zagreb 5HT štakora provedena je kvantitativnom Western analizom.

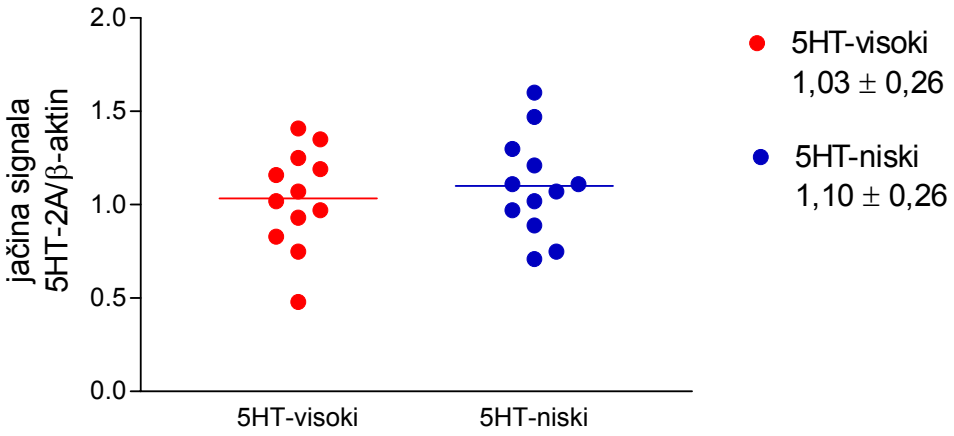
Protokol za Western analizu 5HT-2A receptora već je ranije uhodan u Laboratoriju i opisan je u Adriani i sur., 2006. te je dodatno prilagođen. Mase tkiva moždane kore izolirane iz svake životinje kretale su se od 120 do 170 mg, a koncentracije proteina u uzorcima od 1,5 do 2,5 μg/μL. U prethodnom pokusu, nanošenjem različitih količina proteina na gel, provjeren je linearni odnos količine proteina i jačine signala za 5HT-2A receptor. Linearan odnos opažen je u rasponu od 5 do 35 μg proteina, a u kasnijim eksperimentima na gel je nanošeno 10 μg.

Na jednu membranu naizmjence su nanošeni uzorci iz obiju sublinija. Svaka membrana inkubirana je uz primarno protutijelo za 5HT-2A receptor i, nakon toga, za β-aktin. Gornji signal na membrani odgovara 5HT-2A receptoru (55 kDa), a donji β-aktinu (43 kDa, slika 4.8.).

Slika 4.8. Signali 5HT-2A receptora i β-aktina iz čeone kore 5HT-visoke (V) i 5HT-niske (N) sublinije WZ-5HT štakora nakon detekcije kemiluminiscencijom. Gornji signal odgovara 5HT-2A receptoru (protein mase 55 kDa), a donji β-aktinu (protein mase 43 kDa).

Denzitometrijskom obradom skeniranih filmova dobiveni su podaci o jačini signala za 5HT-2A receptor, odnosno β-aktin, izraženi u jedinicama integrirane optičke gustoće (IOG). Količina 5HT-2A receptora izražena je kao omjer jačine signala za 5HT-2A i jačine signala za

β-aktin. Rezultati su prikazani na slici 4.9. Nisu pronađene razlike u količini 5HT-2A receptorskog proteina između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije.



Slika 4.9. Pojedinačne vrijednosti ekspresije 5HT-2A receptora u čeonoj kori sublinija WZ-5HT štakora, izražene kao omjer jačine signala (IOG) 5HT-2A i β-aktina. Sa strane su navedene srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

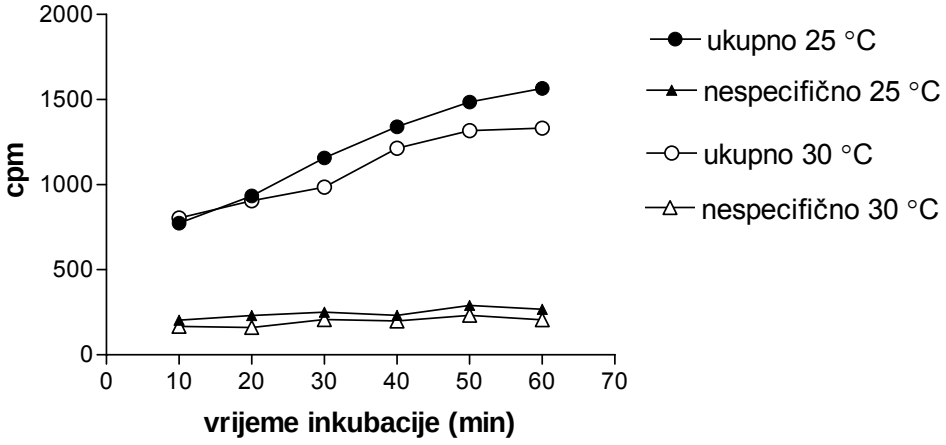
4.1.3.2. Analiza 5HT-1A receptora metodom receptorskog vezivanja

4.1.3.2.1. Razrada metode

Receptorsko vezivanje [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor određivano je u uzorcima moždane kore štakora. S obzirom da metoda receptorskog vezivanja dosad još nije korištena u Laboratoriju, prvi dio eksperimenata odnosio se na uhodavanje metode i testiranje različitih uvjeta reakcije. U prvom koraku testirana su tri različita načina pripreme sinaptosoma koji su se razlikovali u broju (re)centrifugiranja i primijenjenoj gravitacijskoj sili. Nakon zajedničkog početnog centrifugiranja homogenata na 900 g, isprobani su sljedeći uvjeti centrifugiranja: 1) dvaput na 48 000 g; 2) dvaput na 16 000 g i 3) triput na 48 000 g. Pri koncentraciji liganda od 1,5 nM ukupno vezivanje za sva tri načina preparacije sinaptosoma iznosilo je od 1000-1300 cpm, uz udio nespecifičnog vezivanja od 16 do 19 %, te je za daljnje pokuse odabran postupak koji je uključivao dva centrifugiranja na 16 000 g (v. poglavlje 3.1.2.3.3.).

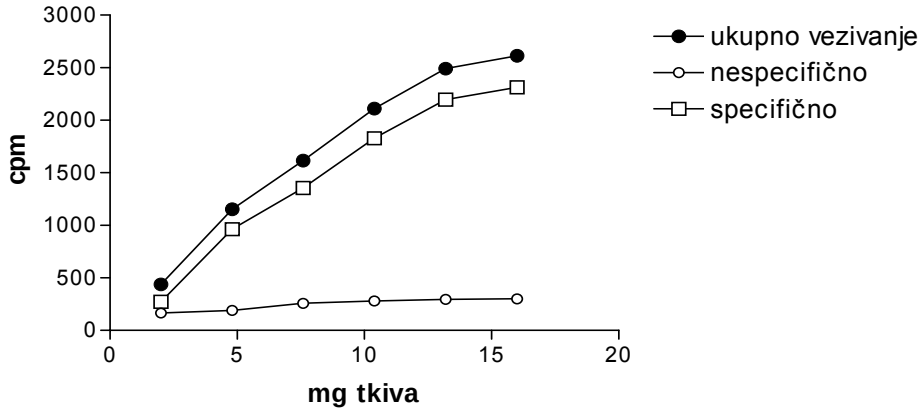
U sljedećem koraku testirana je ovisnost receptorskog vezivanja o vremenu inkubacije, tj. određeno je vrijeme potrebno da reakcija vezivanja radioaktivno obilježenog liganda na receptore postigne stanje koje je približno ravnotežnom (ustaljeno stanje, engl. *steady-state*).

U nekoliko eksperimenata isprobana su različita vremena reakcije (od 10 do 60 min) pri različitim temperaturama (25, 30 i 37 °C) inkubacijske smjese, uz konstantnu koncentraciju tkiva (oko 9 mg/mL) i liganda (1,5 nM) te smo se, temeljem dobivenih rezultata, na kraju odlučili za inkubaciju u trajanju od 60 minuta pri 30 °C. Pri takvim uvjetima inkubacije, nakon 40 minuta reakcija dolazi u zasićenje, dok se nespecifično vezivanje kretalo oko 200 cpm i nije raslo s duljinom trajanja inkubacije (slika 4.10.).



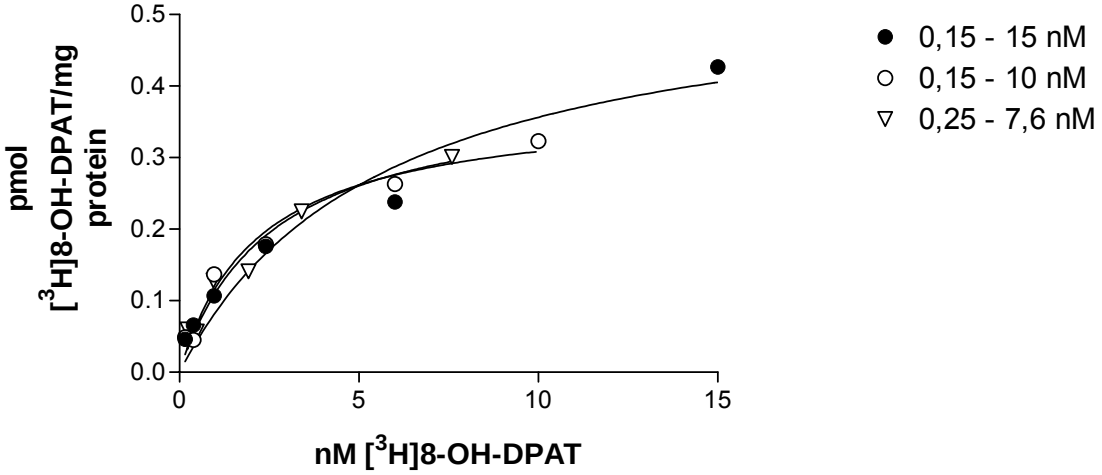
Slika 4.10. Ovisnost receptorskog vezivanja o vremenu i temperaturi reakcije pri koncentraciji [^{3}H]8-OH-DPAT od 1,5 nM te koncentraciji tkiva 9 mg/mL.

Nakon odabira vremena inkubacije, istražena je ovisnost receptorskog vezivanja o količini tkiva, odnosno proteina u inkubacijskoj smjesi. Testirane su količine tkiva od 2 do 16 mg, a linearnost je pokazana u rasponu od 2 do 13 mg. Nespecifično vezivanje kretalo se od oko 200 do 300 cpm, a njegov udio nije rastao s povećanjem količine tkiva (slika 4.11.). U sljedećim eksperimentima korišteno je oko 5 mg tkiva, odnosno oko 60-80 μg proteina po uzorku (0,4 mL homogenata).



Slika 4.11. Ovisnost receptorskog vezivanja o količini tkiva u inkubacijskoj smjesi, uz koncentraciju [^{3}H]8-OH-DPAT od 1,5 nM. Specifično vezivanje odgovara razlici između ukupnog i nespecifičnog vezivanja.

Uz odabrano vrijeme inkubacije i količinu tkiva u inkubacijskoj smjesi, napravljene su saturacijske krivulje pri različitim koncentracijama liganda. Krivulje dobivene u tri eksperimenta uz različit raspon koncentracija [^{3}H]8-OH-DPAT prikazane su na slici 4.12:



Slika 4.12. Ovisnost receptorskog vezivanja o koncentraciji [^{3}H]8-OH-DPAT u tri eksperimenta. Prikazano je samo specifično vezivanje, dok se udio nespecifičnog vezivanja u svim pokusima, ovisno o koncentracijama liganda, kretao od 4 do 32 %.

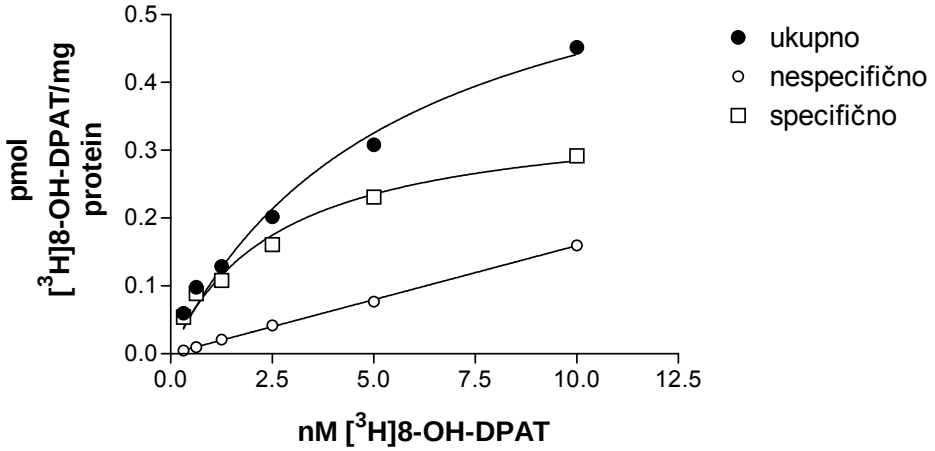
Konstante receptorskog vezivanja, K_d i B_{max}, izračunate su na dva načina: nelinearnom regresijom ili linearnom transformacijom dobivenih podataka (Rosenthal-Scatchardov prikaz). Usporedba podataka iz tri navedena eksperimenta, dobivenih na ova dva načina prikazana je u Tablici 4.8.

Tablica 4.8. Konstante vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori štakora, izračunate pomoću nelinearne regresijske analize odnosno linearne transformacije.

pokus br.	raspon koncentracija liganda	nelinearna regresija		linearna transformacija	
		K_d (nM)	B_{max} (pmol DPAT/mg protein)	K_d (nM)	B_{max} (pmol DPAT/mg protein)
1	0,15 - 15 nM	5,68	0,559	1,78	0,392
2	0,15 - 10 nM	2,18	0,376	1,39	0,336
3	0,25 - 7,6 nM	2,55	0,394	1,56	0,347

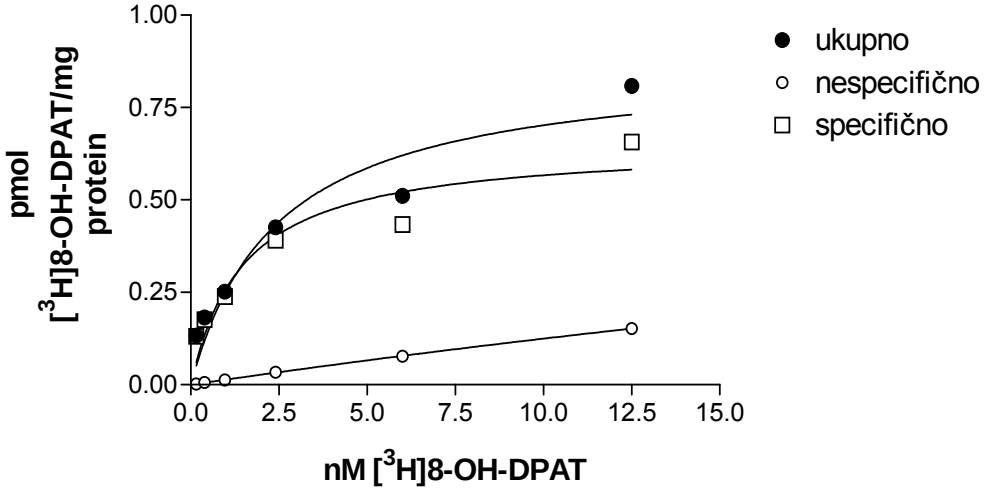
Iz prikazanih rezultata vidi se da se konstante dobivene linearnom transformacijom prilično razlikuju od onih dobivenih nelinearnom regresijom, naročito konstanta K_d. U kasnijim eksperimentima, zbog veće preciznosti izračuna, sve konstante računate su pomoću nelinearne regresijske analize.

Za daljnje eksperimente odabran je raspon koncentracija [^{3}H]8-OH-DPAT od 0,3 do 10 nM, a izgled tipične krivulje, kao i odnos nespecifičnog i specifičnog vezivanja, vidljivi su sa slike 4.13:

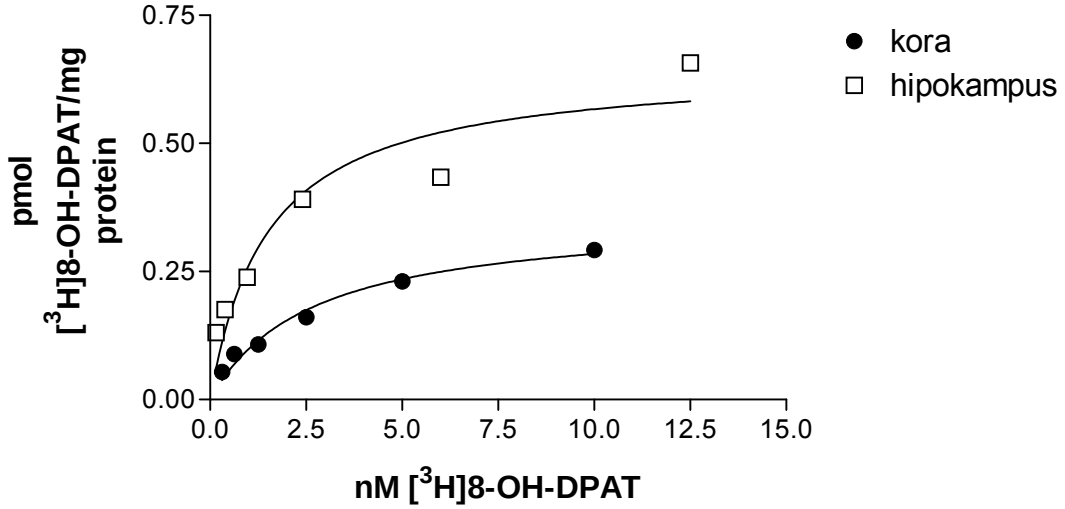


Slika 4.13. Tipična krivulja vezivanja različitih koncentracija [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori štakora.

Osim u kori velikog mozga, receptorsko vezivanje je uz iste eksperimentalne uvjete izmjereno i u hipokampusu (slika 4.14.a), gdje se, prema literaturnim podacima, očekuje jače vezivanje liganda, tj. veći broj 5HT-1A receptora. Vrijednost B_{max} u hipokampusu iznosila je 0,652 pmol [^{3}H]8-OH-DPAT/mg proteina, a vrijednost K_d 1,5 nM. Usporedni prikaz saturacijskih krivulja u moždanoj kori i hipokampusu vidljiv je na slici 4.14.b.



Slika 4.14.a. Krivulja vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u hipokampusu štakora. Udio nespecifičnog vezivanja iznosio je od 1,5 do 18 % ukupnog vezivanja.



Slika 4.14.b. Usporedba receptorskog vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori i hipokampusu štakora. Prikazano je samo specifično vezivanje.

4.1.3.2.2. Aktivnost 5HT-1A receptora u moždanoj kori Wistar-Zagreb 5HT štakora

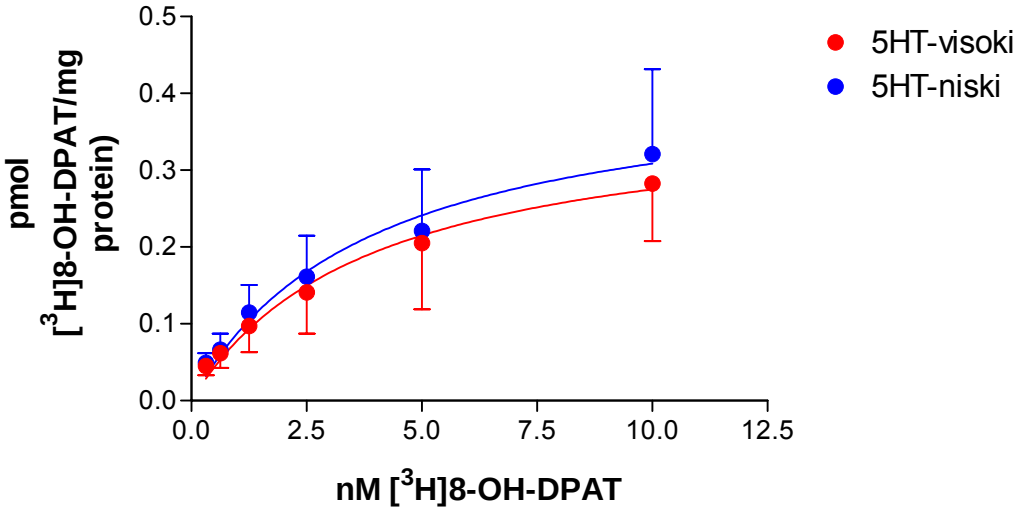
Nakon uhodavanja metode mjerenja receptorskog vezivanja, napravljene su saturacijske krivulje vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka Wistar-Zagreb 5HT-štakora (podaci o životinjama navedeni su u Tablici 4.1.). Svi eksperimenti rađeni su pri temperaturi 30 °C i uz vrijeme inkubacije 60 minuta, uz otprilike 5 mg tkiva odnosno 0,9 mg proteina po uzorku (u 0,5 mL inkubacijske smjese), a raspon koncentracija

liganda [^{3}H]8-OH-DPAT iznosio je od 0,3 do 10 nM. U svakom eksperimentu analizirane su životinje iz obiju sublinija (5HT-visoke i 5HT-niske), a srednje vrijednosti mjerenja za obje sublinije prikazane su u Tablici 4.9.

Tablica 4.9. Srednje vrijednosti mjerenja receptorskog vezivanja u moždanoj kori mužjaka Wistar-Zagreb 5HT štakora (5HT-visoka i 5HT-niska sublinija). U svakoj subliniji analizirano je po 8 životinja.

	5HT-visoki				5HT-niski			
[^{3}H]8-OH-DPAT (nM)	ukupno (cpm)	nespecifično (cpm)	specifično (cpm)	udio nespecifičnog vezivanja (%)	ukupno (cpm)	nespecifično (cpm)	specifično (cpm)	udio nespecifičnog vezivanja (%)
0,3125	478	44	434	9	456	44	413	10
0,625	676	90	586	13	625	81	544	13
1,25	1091	180	912	17	1101	170	931	16
2,5	1669	353	1316	22	1612	306	1306	19
5	2596	710	1886	27	2415	631	1784	26
10	4155	1476	2679	36	3790	1180	2610	31

Faktori preračunavanja cpm u pmol kretali su se od 7,2 do 7,8 × 10^{-3}. Sumarni prikaz srednjih vrijednosti specifičnog vezivanja za obje sublinije dan je na slici 4.15:



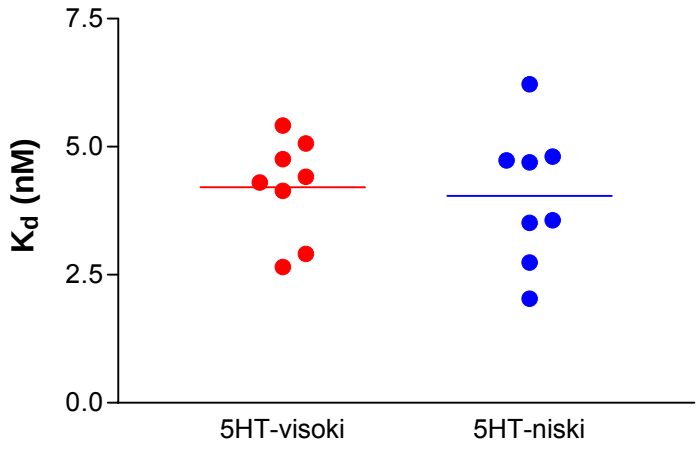
Slika 4.15. Srednje vrijednosti specifičnog vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka obiju sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora. U svakoj subliniji analizirano je po 8 životinja. Prikazane su srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Iz svake pojedinačne krivulje metodom nelinearne regresijske analize izračunate su vrijednosti K_d i B_{max}. Srednje vrijednosti dobivenih konstanti prikazane su u Tablici 4.10:

Tablica 4.10. Srednje vrijednosti konstanti K_d i B_{max} za vezivanje [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka obiju sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

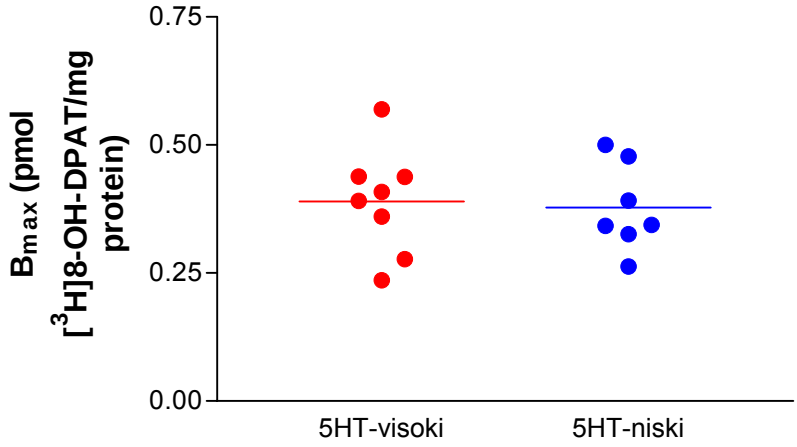
sublinija	N	K_d (nM)	B_{max} (pmol [^{3}H]8-OH-DPAT/mg proteina)
5HT-visoki	8	4,21 ± 0,97	0,389 ± 0,103
5HT-niski	8	4,04 ± 1,33	0,378 ± 0,085

Na slici 4.16 prikazane su distribucije pojedinačnih vrijednosti konstante K_d za 5HT-visoku i 5HT-nisku subliniju Wistar-Zagreb 5HT štakora, uz naznačene srednje vrijednosti. Nema razlika u K_d, a time ni u afinitetu 5HT-1A receptora za [^{3}H]8-OH-DPAT, između dviju sublinija.



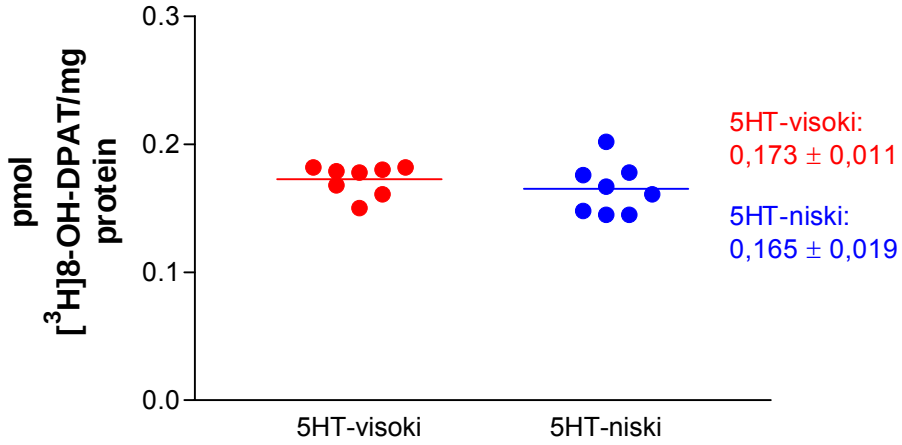
Slika 4.16. Distribucija pojedinačnih vrijednosti konstante K_d za vezivanje [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka obiju sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora.

Slika 4.17. prikazuje pojedinačne vrijednosti konstante B_{max} u obje sublinije Wistar-Zagreb 5HT štakora, uz naznačene srednje vrijednosti. Nisu utvrđene razlike u vrijednosti B_{max}, a time ni u broju receptorskih mjesta, između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije.



Slika 4.17. Distribucija pojedinačnih vrijednosti konstante B_{max} za vezivanje [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora.

Nakon eksperimenata na mužjacima, provedeno je mjerenje receptorskog vezivanja i na ženkama iste (četvrte) generacije Wistar-Zagreb 5HT štakora. Nakon preliminarnog eksperimenta u kojem je na životinjama oba spola usporedno napravljena saturacijska krivulja, usporedba receptorskog vezivanja na većim skupinama životinja rađena je samo pri koncentraciji 5 nM [^{3}H]8-OH-DPAT. Rezultati su prikazani na slici 4.18.:

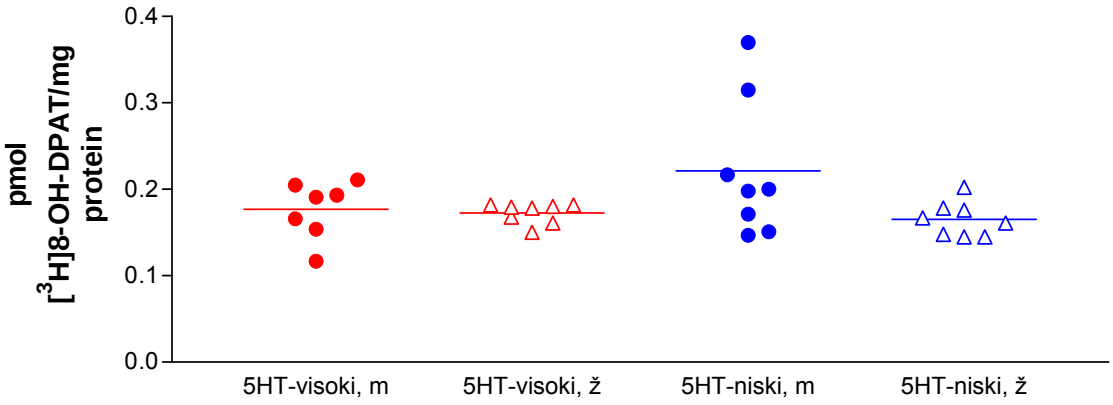


Slika 4.18. Distribucija pojedinačnih vrijednosti vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT (u koncentraciji 5,0 nM) za 5HT-1A receptor u moždanoj kori ženki obiju sublinija Wistar-Zagreb 5HT štakora. Navedene su srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

Kao i kod mužjaka, tako ni kod ženki nisu uočene razlike u vezivanju [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori, što je vidljivo iz Tablice 4.11 i na slici 4.19:

Tablica 4.11. Srednje vrijednosti vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT u koncentraciji 5,0 nM za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka i ženki obiju sublinija WZ-5HT štakora. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija.

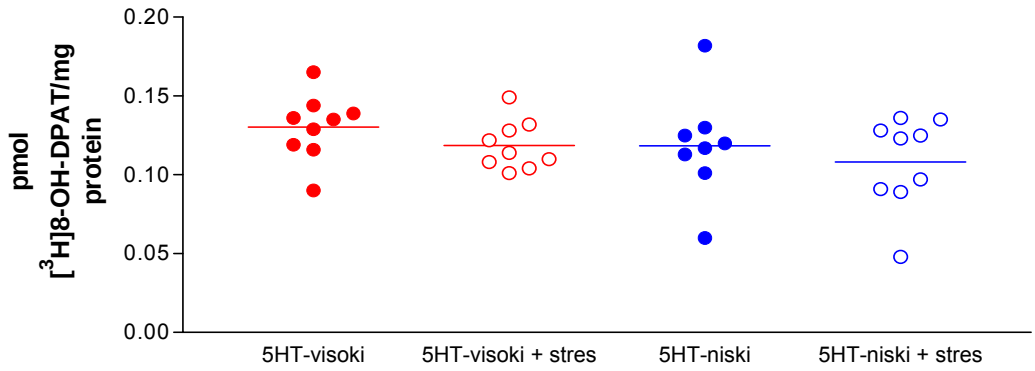
sublinija	N	B_5 (pmol [^{3}H]8-OH-DPAT/mg proteina)
5HT-visoki, mužjaci	7	0,177 ± 0,033
5HT-visoki, ženke	8	0,173 ± 0,011
5HT-niski, mužjaci	8	0,221 ± 0,080
5HT-niski, ženke	8	0,165 ± 0,019



Slika 4.19. Distribucija pojedinačnih vrijednosti vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT (5,0 nM) za 5HT-1A receptor u moždanoj kori mužjaka (m) i ženki (ž) sublinija WZ-5HT štakora.

Aktivnost 5HT-1A receptora u moždanoj kori Wistar-Zagreb 5HT štakora nakon izlaganja kroničnom stresu

Nakon mjerenja vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor u moždanoj kori Wistar-Zagreb 5HT štakora u fiziološkim uvjetima, analogna mjerenja provedena su i na uzorcima moždane kore štakora koji su bili izloženi kroničnom stresu. Mjerenja su provedena pri koncentraciji 4 nM [^{3}H]8-OH-DPAT, a u svakom eksperimentu rađeni su uzorci iz sve četiri skupine životinja (svaka sublinija u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja stresu). Nešto niže (15-20 %) vrijednosti receptorskog vezivanja dobivene u ovom pokusu, u usporedbi s prethodnim pokusima, mogu biti posljedica dužeg čuvanja tkiva (oko 18 mjeseci na -70 °C). Rezultati su prikazani na slici 4.20.:



Slika 4.20. Distribucija pojedinačnih vrijednosti vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT (u koncentraciji 4,0 nM) za 5HT-1A receptor u moždanoj kori ženki obiju sublinija WZ-5HT štakora u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja kroničnom stresu.

Nisu uočene razlike u vezivanju [^{3}H]8-OH-DPAT za 5HT-1A receptor, ni u fiziološkim uvjetima, ni nakon izlaganja kroničnom stresu. U svakoj subliniji mogu se opaziti nešto niže vrijednosti nakon izlaganja stresu (~9 % razlike), ali ta promjena nije statistički značajna.

4.2. ISTRAŽIVANJA NA HUMANOJ POPULACIJI

4.2.1. Podaci o ispitanicima

Podaci o ispitanicima prikazani su u Tablici 4.12. Ispitanici iz kontrolne skupine bili su dobrovoljni davatelji krvi bez osobne i obiteljske anamneze psihijatrijskih poremećaja. Skupinu pacijenata činile su osobe ovisne o alkoholu liječene u Kliničkoj bolnici sestara milosrdnica. Dijagnoza je postavljena na temelju strukturiranog intervjua prema DSM-IV. Osim dijagnoze alkoholizma, dio ispitanika imao je i komorbidnu dijagnozu (7 – depresija, 3 – anksiozno-depresivni poremećaj, 6 – posttraumatski stresni poremećaj, 7 – poremećaj osobnosti, 2 – apstinencijski sindrom, 2 – ovisnost o benzodiazepinima). Pacijenti su dodatno podijeljeni u grupe prema tipu alkoholizma (alkoholizam tipa I i II; Cloninger, 1987). Kriterij za svrstavanje u grupu alkoholizma tipa II bila je rana dob početka problema s alkoholizmom (prije 21. godine) i rani socijalni problemi vezani uz alkohol (Cloninger i sur., 1981; Čičin-Šain i sur., 2007). U obje skupine bili su samo ispitanici muškog spola. Istraživanje je odobreno od strane Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

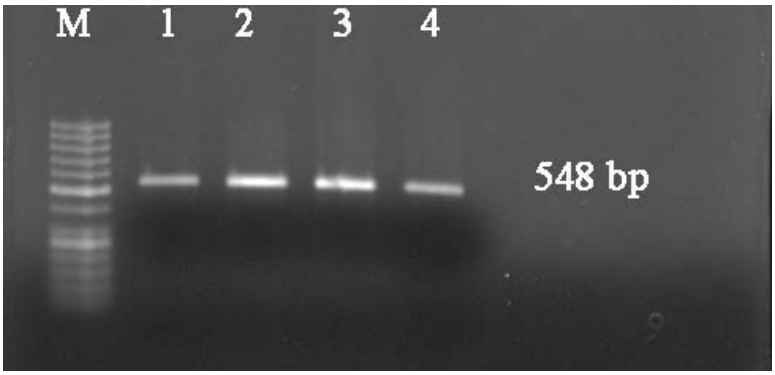
Tablica 4.12. Podaci o ispitanicima. N = broj ispitanika, M = srednja vrijednost, SD = standardna devijacija.

Ispitanici	N	pušenje	dob; M ± SD (godine)
kontrolna skupina	219	43 pušača 93 nepušača 83 nema podatka	40,8 ± 12,1
osobe ovisne o alkoholu	172	123 pušača 38 nepušača 11 nema podatka	40,4 ± 11,1
alkoholizam tipa I	90	54 pušača 29 nepušača 7 nema podatka	48,8 ± 7,2
alkoholizam tipa II	82	69 pušača 9 nepušača 4 nema podatka	31,6 ± 6,5

4.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor

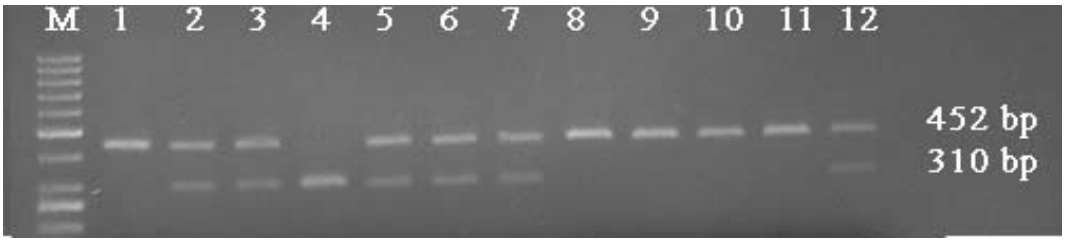
4.2.2.1. Razrada metode

Polimorfizam G861C u genu za 5HT-1B receptor čovjeka analiziran je metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata. Metoda je opisana u Štefulj i sur. (2004), a uvjeti PCR prilagođeni su za naše uvjete (temperatura nalijeganja početnika povišena je na 60 °C, te je u reakcijsku smjesu dodana Q-otopina koja smanjuje mogućnost nastajanja nespecifičnih produkata). Dobiveni produkti PCR prikazani su na slici 4.21:



Slika 4.21. Produkti umnožavanja odsječka DNA koji sadrži G861C polimorfno mjesto, uz optimalne uvjete lančane reakcije polimerazom. Elektroforeza je provedena na 1,2%-tnom agaroznom gelu pri naponu 70 V tijekom 45 minuta. M = molekularna ljestvica DNA, bp = bazni parovi

U sljedećem koraku, PCR produkti podvrgnuti su digestiji restrikcijskom endonukleazom H*inc*II (H*ind*II) i zatim razdvojeni elektroforezom na 2 %-tnom agaroznom gelu. Digestijom nastaju dva, odnosno tri fragmenta DNA, ovisno o polimorfizmu. Zbog uvjeta elektroforeze i vizualizacije produkata na gelu su vidljiva samo dva najveća fragmenta: u slučaju G-alela, 452 bp, kod C-alela 310 bp, a kod GC heterozigota oba ova fragmenta, dok manje fragmente od 142 i 96 bp nije moguće vidjeti (slika 4.22.).



Slika 4.22. Produkti digestije umnoženih odsječaka DNA djelovanjem enzima H*inc*II. Uzorci pod brojevima 1, 8, 9, 10 i 11 su homozigoti GG; uzorci 2, 3, 5, 6, 7 i 12 su heterozigoti GC, a uzorak 4 je homozigot CC. M = molekularna ljestvica.

4.2.2.2. Polimorfizam G861C u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika

Frekvencije genotipova i alela polimorfizma G861C gena za 5HT-1B receptor u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika prikazane su u Tablici 4.13. Opažene frekvencije genotipova u obje skupine ispitanika bile su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (kontrola: $p = 0,9209$; pacijenti: $p = 0,8546$).

Tablica 4.13. Frekvencije genotipa i alela polimorfizma G861C gena za 5HT-1B receptor u kontrolnih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu

skupina	N	Genotip, N (%)			Aleli, N (%)	
		GG	GC	CC	G	C
kontrolni ispitanici	219	109 (49,8)	93 (42,5)	17 (7,8)	311 (71,0)	127 (29,0)
osobe ovisne o alkoholu	172	98 (57,0)	61 (35,5)	13 (7,6)	257 (74,7)	87 (25,3)
alkoholizam tipa I	90	52 (57,8)	30 (33,3)	8 (8,9)	134 (74,4)	46 (25,6)
alkoholizam tipa II	82	46 (56,1)	31 (37,8)	5 (6,1)	123 (75,0)	41 (25,0)

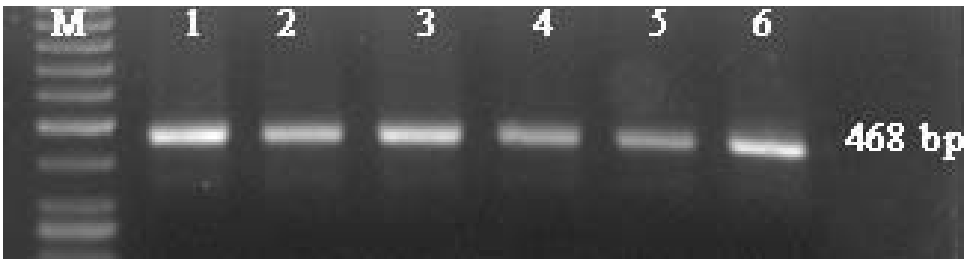
Nema statistički značajnih razlika u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela između kontrolnih ispitanika i osoba oboljelih od alkoholizma ($p = 0,3415$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,2589$ u Fisherovom egzaktnom testu).

Analizirana je i distribucija genotipova odnosno alela u pojedinim podskupinama alkoholizma (tip I i tip II), u usporedbi s kontrolnom populacijom. Ni ovdje nisu pronađene razlike u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela polimorfizma G861C gena za 5HT-1B receptor (tip I: $p = 0,3294$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,4305$ u Fisherovom egzaktnom testu; tip II: $p = 0,6052$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,3593$ u Fisherovom egzaktnom testu). Međusobna usporedba ovih dviju dijagnostičkih podskupina također nije pokazala razlike u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela ($p = 0,7028$ u χ^2-testu, odnosno $p = 1,0000$ u Fisherovom egzaktnom testu).

4.2.3. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor

4.2.3.1. Razrada metode

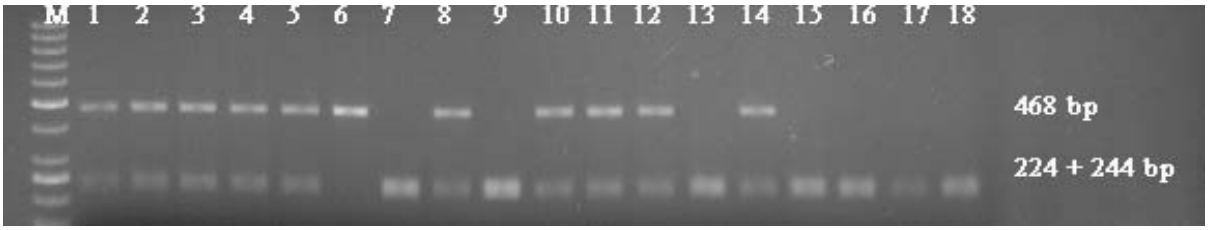
Kao i kod 5HT-1B receptora, i ovaj je polimorfizam proučen metodom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata. Metoda je opisana u Collier i sur. (1997), a uhodana je i u našem Laboratoriju (Babić, 2006). Ukratko, uz korištenje početnika čiji su slijedovi navedeni u Tablici 3.4. (poglavlje 3.2.1.2.), umnožen je odsječak DNA duljine 468 bp, što je prikazano na slici 4.23:



Slika 4.23. Produkti umnožavanja odsječka DNA koji sadrži -1438AG polimorfno mjesto, uz optimalne uvjete lančane reakcije polimerazom. Elektroforeza je provedena na 1,2%-tnom agaroznom gelu pri naponu 70 V tijekom 45 minuta. M = molekularna ljestvica DNA, bp = bazni parovi

U sljedećem koraku, PCR produkti podvrgnuti su digestiji restrikcijskom endonukleazom M*sp*I (H*pa*II) i zatim razdvojeni elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu. U slučaju A-

alela produkt ostaje nepocijepan, dok G-alel digestijom daje dva produkta veličine 244 i 224 bp koji komigriraju. Slika 4.24. prikazuje produkte restrikcije PCR produkta endonukleazom M*sp*I, nakon razdvajanja na 2 %-tnom agaroznom gelu.



Slika 4.24. Produkti digestije umnoženih odsječaka DNA djelovanjem enzima M*sp*I. Uzorci pod brojevima 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12 i 14 su heterozigoti AG; uzorci broj 7, 9, 13, 15, 16, 17 i 18 su homozigoti GG, a uzorak broj 6 je homozigot AA. M = molekularna ljestvica.

4.2.3.2. Polimorfizam -1438AG u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika

Frekvencije genotipova i alela polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika prikazane su u Tablici 4.14. Opažene frekvencije genotipova u obje skupine ispitanika bile su u Hardy-Weinbergovoj ravnoteži (kontrola: $p = 0,9809$; pacijenti: $p = 0,9749$).

Tablica 4.14. Frekvencije genotipa i alela polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor u kontrolnih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu

skupina	N	Genotip, N (%)			Aleli, N (%)	
		AA	AG	GG	A	G
kontrolni ispitanici	219	37 (16,9)	109 (49,8)	73 (33,3)	183 (41,8)	255 (58,2)
osobe ovisne o alkoholu	172	26 (15,1)	85 (49,4)	61 (35,5)	137 (39,8)	207 (60,2)
alkoholizam tipa I	90	14 (15,6)	46 (51,1)	30 (33,3)	74 (41,1)	106 (58,9)
alkoholizam tipa II	82	12 (14,6)	39 (47,6)	31 (37,8)	63 (38,4)	101 (61,6)

Nema statistički značajnih razlika u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela između kontrolnih ispitanika i osoba oboljelih od alkoholizma ($p = 0,8524$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,6083$ u Fisherovom egzaktnom testu).

Analizirana je i distribucija genotipova odnosno alela u pojedinim podskupinama alkoholizma (tip I i tip II), u usporedbi s kontrolnom populacijom. Ni ovdje nisu pronađene

razlike u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor (tip I: $p = 0,9550$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,9285$ u Fisherovom egzaktnom testu; tip II: $p = 0,5919$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,5146$ u Fisherovom egzaktnom testu). Međusobna usporedba ovih dviju dijagnostičkih podskupina također nije pokazala razlike u frekvencijama pojedinih genotipova ili alela ($p = 0,3754$ u χ^2-testu, odnosno $p = 0,6596$ u Fisherovom egzaktnom testu).

5. RASPRAVA

Djelovanje serotonina na velik broj različitih fizioloških funkcija objašnjava se, između ostalog, i postojanjem velikog broja serotoninskih receptora. Danas važeća nomenklatura razlikuje petnaest različitih serotoninskih receptora, grupiranih u sedam skupina (Bockaert i sur., 2006b). Među njima, najznačajniji su receptori iz 5HT-1 i 5HT-2 skupine, kako po svojoj rasprostranjenosti u različitim regijama mozga, tako i po broju funkcija u kojima sudjeluju. U ovoj disertaciji proučavali smo tri podtipa 5HT receptora, koji imaju značajnu ulogu u regulaciji serotonergične neurotransmisije: 5HT-1A i 5HT-1B receptore, kao glavne inhibicijske regulatore aktivnosti serotonergičnih neurona (5HT-1A, kao somatodendritički autoreceptor, inhibira aktivnost 5HT neurona, a 5HT-1B kao terminalni receptor regulira otpuštanje serotonina; Celada i sur., 2006), te 5HT-2A, ekscitacijski receptor koji ima važnu ulogu u održavanju ravnoteže ekscitacijske i inhibicijske aktivnosti neurona, što je neophodno za normalnu aktivnost moždane kore u kojoj je najviše zastupljen (Leysen, 2004).

Laboratorij za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju već se godinama bavi istraživanjem serotoninskog sustava u organizmu sisavaca. U tim istraživanjima središnju ulogu predstavlja originalno razvijen model štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom, gdje su selekcijom za ekstremne vrijednosti brzine unosa serotonina u trombocite razvijene dvije sublinije životinja s konstitucijski povišenom odnosno sniženom aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika: Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakori. Budući da su sublinije WZ-5HT štakora razvijene genetičkom selekcijom za ekstremne vrijednosti fiziološkog parametra (brzine trombocitnog 5HTt), i da njegove vrijednosti kod selekcioniranih sublinija ne izlaze značajno izvan fizioloških okvira, možemo pretpostaviti da je promjena serotoninske homeostaze kod tih sublinija znatno bliža fiziološkim uvjetima nego kod nekih drugih modela, dobivenih genetskom manipulacijom (npr. modela s inaktiviranim genom, engl. *knockout*), ili specifičnim farmakološkim tretmanom.

Budući da je serotoninski prijenosnik na trombocitima i u mozgu kodiran istim genom (Lesch i sur., 1993), pretpostavlja se da je kod sublinija WZ-5HT štakora tijekom selekcije došlo do promjena homeostaze središnjeg serotoninskog sustava, na što upućuju dosadašnja neurokemijska (Romero i sur., 1998; Bokulić i sur., 2003) i bihevioralna istraživanja (Quevedo i sur., 2003; Hranilović i sur., 2005), iako te promjene još nisu potvrđene na molekularnoj razini.

U prvom dijelu ovog rada željeli smo dodatno karakterizirati sublinije Wistar-Zagreb 5HT štakora s obzirom na serotoninske receptore. 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor u mozgu

WZ-5HT štakora proučavani su na razini mRNA i na razini proteina, u fiziološkim uvjetima i nakon izazova (izloženosti kroničnom stresu).

U kliničkom dijelu rada, željeli smo dati doprinos istraživanju polimorfizama dvaju od navedenih serotoninskih receptora (5HT-1B i 5HT-2A) u etiopatogenezi alkoholizma, složenog poremećaja čija pojava se povezuje i s promjenama serotonergične transmisije.

5.1. SEROTONINSKI RECEPTORI U MOZGU WISTAR-ZAGREB 5HT ŠTAKORA

Ovaj dio rada obuhvaća istraživanja ekspresije i aktivnosti tri serotoninska receptora u mozgu 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije WZ-5HT štakora, i to na dvije razine: razini mRNA i razini proteina. Osim u fiziološkim uvjetima, serotoninski receptori proučavani su i nakon izlaganja životinja obiju sublinija kroničnom stresu, stanju koje se povezuje s promjenama aktivnosti središnjeg 5HT sustava (v. Uvod, poglavlje 1.4.).

5.1.1. Serotoninski receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora u fiziološkim uvjetima

Model štakora s konstitucijski promijenjenom serotoninskom homeostazom, nazvan Wistar-Zagreb 5HT štakor, istražuje se već 20-ak godina. Sublinije WZ-5HT štakora, nazvane "5HT-visoka" i "5HT-niska", razvijene su selektivnim parenjem za ekstremne vrijednosti perifernog biokemijskog parametra – aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika. Međutim, rezultati različitih istraživanja upućuju na to da je tijekom selekcije došlo i do promjena 5HT sustava u mozgu ovih životinja (Čičin-Šain i Jernej, 2008). Romero i sur. (1998) su pokazali znatno višu koncentraciju izvanstaničnog serotonina u hipokampusu 5HT-visokih životinja nakon specifičnog farmakološkog izazova. Nadalje, Bokulić i sur. (2003) ustanovili su razlike u metaboličkom obratu 5HT u nekoliko regija mozga (pri čemu je u životinja iz 5HT-visoke sublinije pokazan viši udio glavnog serotoninskog metabolita, 5HIAA), dok su Hranilović i sur. (2005) pokazali da se sublinije međusobno razlikuju u nekim oblicima ponašanja (5HT-visoki štakori pokazali su veću učestalost nekih oblika anksioznog ponašanja). S druge strane, 5HT-niske životinje pokazale su veću učestalost ponašanja nalik na depresiju (Čičin-Šain i Jernej, 2008), kao i povećanu sklonost uzimanju alkohola (Mokrović, 2007). Ovi nalazi upućuju na promjenu središnje 5HT transmisije u sublinija WZ-5HT štakora, pri čemu se pretpostavlja da je kod 5HT-visokih životinja pojačana 5HT transmisija. Prema tome, moguće

je očekivati i adaptacijske, odnosno kompenzacijske promjene u ekspresiji i/ili funkciji serotoninskih receptora u životinja iz ovih sublinija.

U literaturi, brojna istraživanja učinka promijenjene aktivnosti serotonergičnog sustava provedena su na modelu miša s inaktiviranim serotoninskim prijenosnikom (5HTt *knockout*, ili 5HTt KO), kod kojeg je funkcija 5HT prijenosnika potpuno ukinuta (Bengel i sur., 1998). U novije vrijeme, razvijen je i model 5HTt KO štakora (Homberg i sur., 2007), a bihevioralni testovi provedeni na tom modelu pokazali su višu razinu anksioznosti, ali i depresivnog ponašanja u ovih životinja (Olivier i sur., 2008). 5HTt KO miševi također su pokazali višu razinu anksioznosti u bihevioralnim testovima (Holmes i sur., 2003), te učestaliju pojavu nekih simptoma serotoninskog sindroma (Kalueff i sur., 2007). I kod 5HTt KO miša (Fabre i sur., 2000a; Mathews i sur., 2004) i 5HTt KO štakora (Homberg i sur., 2007) pokazana je značajno povišena razina izvanstaničnog (ekstraneuronalnog) serotonina, a taj je nalaz usporediv s onim u 5HT-visoke sublinije WZ-5HT štakora nakon farmakološkog izazova (v. Romero i sur., 1998). S druge strane, miševi kojima je pojačana ekspresija serotoninskog prijenosnika u bihevioralnim testovima pokazali su manje anksiozan fenotip, te smanjenu koncentraciju izvanstaničnog serotonina, što upućuje na smanjenu 5HT transmisiju u ovih životinja (Jennings i sur., 2006).

Istraživanja serotoninskih receptora na 5HTt KO miševima pokazala su da je kod njih došlo do značajnih promjena u ekspresiji 5HT-1A i 5HT-1B receptora (Fabre i sur., 2000a), pri čemu smjer tih promjena ovisi o istraživanoj regiji mozga. Tako je u jezgrama rafe 5HTt KO miševa opaženo smanjenje ekspresije 5HT-1A na razini mRNA i proteina (Fabre i sur., 2000a; Li i sur., 1999; Li i sur., 2000), dok su u hipokampusu neki autori opazili porast ekspresije mRNA za 5HT-1A (Fabre i sur., 2000a), a neki nisu našli promjene ekspresije ovog receptora (Li i sur., 2000). Promjene su također pokazane i na razini aktivnosti 5HT neurona, što upućuje na desenzitizaciju 5HT-1A receptora (Li i sur., 1999; Mannoury La Cour i sur., 2001). 5HT-2A receptori također su pokazali promjene u 5HTt KO miševa, ali na razini funkcije proteina, tj. receptorskog vezivanja u moždanoj kori (Rioux i sur., 1999), dok promjene na razini mRNA nisu pokazane (Li i sur., 2003). Osim na spomenutim genetičkim modelima učinak promijenjene aktivnosti 5HT sustava istražuje se i nakon sistemske, akutne ili kronične, primjene specifičnih farmaka. Farmakološke studije pokazale su da kronični tretman štakora specifičnim inhibitorom povratnog unosa serotonina (SSRI) uzrokuje

značajno smanjenje ekspresije mRNA za 5HT-1A u jezgrama rafe (slično kao u 5HTt KO miševa), dok ekspresija u moždanoj kori nije bila promijenjena (Le Poul i sur., 2000).

Imajući u vidu važnost 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptora u regulaciji serotoninske transmisije, promjene ovih receptora u spomenutim animalnim modelima, kao i dosad pokazane neurokemijske i bihevioralne promjene u WZ-5HT štakora (Čičin-Šain i Jernej, 2008), u ovom radu željeli smo ustanoviti je li tijekom usmjerene selekcije za ekstremne vrijednosti trombocitnog 5HTt došlo do posljedične promjene u ekspresiji i/ili funkciji navedenih 5HT receptora.

5.1.1.1. 5HT-1A receptori

5HT-1A receptori u sublinija WZ-5HT štakora proučavani su na razini mRNA u hipokampusu i čeonoj kori, a na razini funkcije proteina u čeonoj kori. Regije su odabrane na temelju literaturnih podataka o zastupljenosti ovog receptora, odnosno njegove mRNA u različitim područjima mozga (Chalmers i Watson, 1991; Pompeiano i sur., 1992; Barnes i Sharp, 1999; Sari, 2004), uz uvjet da je iz jedne životinje raspoloživim tehnikama bilo moguće istodobno izdvojiti više različitih regija. Čeona kora (i strijatum u kojem su mjereni 5HT-1B receptori) predstavljaju projekcijsko područje dorzalnih jezgara rafe, dok u hipokampus dolaze projekcije iz medijanih, a u manjoj mjeri i iz dorzalnih jezgara rafe (Jacobs i Azmitia, 1992).

Budući da se 5HT sublinije neurokemijski i bihevioralno razlikuju u aspektima u čiju su regulaciju uključeni upravo 5HT-1A receptori, kao što je npr. anksiozno ponašanje (Toth, 2003; Kusserow i sur., 2004), moguće je očekivati promjene ovog receptora u pojedinim moždanim regijama WZ-5HT štakora, na razini ekspresije mRNA ili na razini funkcije proteina.

Metodički osvrt

Na razini **mRNA**, mjerenja su provedena semi-kvantitativnom RT-PCR metodom koja je ranije uhodana u laboratoriju (Bordukalo-Nikšić, 2003). Metoda se temelji na umnožavanju fragmenta određene komplementarne DNA (cDNA) dobivene obrnutim prepisivanjem (reverznom transkripcijom) molekule RNA, te na mjerenju količine nastalog produkta. Na taj je način moguće umnožiti i one molekule mRNA koje su u stanici prisutne u vrlo malim

količinama, što ovoj metodi daje prednost pred nekim drugim metodama (Freeman i sur., 1999).

Iako je ova metoda vrlo osjetljiva, glavni njezin nedostatak je mogućnost velike varijabilnosti među uzorcima. Budući da je PCR eksponencijalne prirode, napredovanjem reakcije umnažaju se i eventualne pogreške koje na kraju reakcije postaju izrazitije u usporedbi s malim početnim varijacijama između uzoraka. Zbog toga je nužno koristiti standarde, a to su najčešće uobičajeno eksprimirani, tzv. domaćinski ili *housekeeping* geni. Pri njihovu izboru treba voditi računa o mogućoj varijaciji njihove ekspresije u eksperimentalnim uvjetima (Thellin i sur., 1999), te se u literaturi preporučuje korištenje nekoliko referentnih gena istovremeno (Vandesompele i sur., 2002; Huggett i sur., 2005). U ovom radu koristili smo tri referentna gena: GAPDH, β-aktin i ciklofilin B. Radi točnijeg izražavanja rezultata, kao faktor normalizacije korištena je geometrijska sredina jačine signala triju korištenih referentnih gena, kako se preporučuje u literaturi (Vandesompele i sur., 2002). Na taj je način koeficijent varijacije nešto niži u usporedbi sa situacijom kad je ekspresija izražena po pojedinačnim referentnim genima.

Na razini **funkcije proteina,** 5HT-1A receptori proučavani su metodom receptorskog vezivanja. Kako je ova metoda po prvi put korištena u ovom laboratoriju, detaljnije ćemo se osvrnuti na nekoliko aspekata važnih za ispravno mjerenje kinetike receptorskog vezivanja.

Mjerenje vezivanja radioaktivno obilježenog liganda na receptor često se koristi za određivanje biokemijskih svojstava receptora ili receptorskih skupina, kao i za određivanje gustoće receptora u tkivu. Osim što opisuje biokemijska svojstva receptora u uzorku, metoda je vrlo pogodna i za farmakološke studije, naročito za ispitivanje novih spojeva (liganda). U neurokemiji, mjerenje receptorskog vezivanja često se primjenjuje u istraživanjima neurotransmiterskih receptora i njihovih liganda (agonista/antagonista). Dvije su osnovne vrste eksperimenata receptorskog vezivanja: saturacijski i kompeticijski. Saturacijskim eksperimentima određuje se afinitet (tj. K_d, koja je obrnuto proporcionalna afinitetu, v. poglavlje 3.1.2.5.2.) receptora za ligand te broj receptora u uzorku/tkivu (tj. B_{max}), dok se kompeticijske studije koriste u istraživanjima novih spojeva i mjere afinitet neobilježenog liganda za receptor (koji odgovara vrijednosti $1/K_i$), te omogućuju razlikovanje više podtipova receptora (Deupree i Bylund, 2002).

Od presudne važnosti za uspješnost eksperimenta je izbor odgovarajućeg radioaktivno obilježenog liganda. Poželjni su ligandi s visokim afinitetom za receptor i sa što nižim stupnjem nespecifičnog vezivanja (tj. vezivanja za druge receptore u uzorku). Također je

važna i specifična radioaktivnost liganda, koja zbog osjetljivosti metode ne bi trebala biti manja od 30 Ci/mmol (Deupree i Bylund, 2002). Najčešće se kao radioizotopi koriste ^{3}H ili ^{125}I, pri čemu ^{125}I ima višu specifičnu aktivnost (što je pogodno kod rada s malom količinom tkiva), dok je prednost liganda obilježenih ^{3}H veća stabilnost i izostanak kemijske modifikacije spoja (Bylund i Toews, 1993).

U ovom radu uhodana je metoda mjerenja aktivnosti 5HT-1A receptora u mozgu štakora, kroz saturacijski tip eksperimenta, uz korištenje liganda [^{3}H]8-hidroksi-2-(di-N-propilamino)tetralina ([^{3}H]8-OH-DPAT) specifične aktivnosti 170,2 Ci/mmol. Ovaj spoj specifičan je agonist 5HT-1A receptora i široko je korišten u brojnim istraživanjima, mada je u novije vrijeme pokazano da posjeduje i afinitet prema 5HT-7 receptorima (Vanhoenacker i sur., 2000; Raymond i sur., 2001), što treba imati u vidu pri interpretaciji rezultata.

Prvi korak u studijama receptorskog vezivanja predstavlja priprema uzorka koji sadrži receptore u aktivnom obliku (vezanom za membrane). Najčešće se uzorak tkiva homogenizira u odgovarajućem puferu, te se tako dobiveni tkivni homogenat centrifugira i rehomogenizira jednom ili više puta pri gravitaciji reda veličine od oko tisuću, pa do nekoliko desetaka tisuća gravitacijskih jedinica. Naši rezultati pokazali su da ovaj korak nije presudan za ispravno mjerenje receptorskog vezivanja.

Sljedeći važan faktor u ovim eksperimentima je vrijeme inkubacije. Mjerenja receptorskog vezivanja pretpostavljaju da je reakcija postigla ustaljeno stanje (engl. *steady state*), a da bi se to stanje postiglo, inkubacija mora trajati dovoljno dugo (obično 20-60 minuta). Budući da vrijeme potrebno za postizanje ustaljenog stanja ovisi o koncentraciji liganda, za određivanje optimalnog vremena inkubacije koriste se niže koncentracije radioaktivno obilježenog liganda – najčešće u području očekivane K_d. Inkubacija se većinom provodi na sobnoj (22-25 °C), a rjeđe na fiziološkoj temperaturi (37 °C). Nakon nekoliko eksperimenata u kojima smo testirali temperaturu i vrijeme inkubacije, odlučili smo se za inkubaciju u trajanju od 60 minuta pri 30 °C (slika 4.10.).

U sljedećem koraku optimizirana je količina tkiva u uzorku. Budući da se u teoriji receptorskog vezivanja podrazumijeva da koncentracija slobodnog (nevezanog) liganda ostaje nepromijenjena (tj. da se na receptor veže manje od 10 % liganda), tom uvjetu potrebno je prilagoditi količinu receptora u homogenatu odnosno inkubacijskoj smjesi (Deupree i Bylund,

2002). U našim eksperimentalnim uvjetima to je postignuto korištenjem 60-80 μg proteina (5 mg tkiva) u inkubacijskoj smjesi ukupnog volumena 500 μL (slika 4.11.).

U sljedećem koraku odabrali smo koncentracije [^{3}H]8-OH-DPAT, tako da je njihov raspon obuhvaćao tri koncentracije manje od očekivane K_d, i tri veće koncentracije (Deupree i Bylund, 2002), te smo usporedili vrijednosti konstanti K_d i B_{max} izračunatih na dva različita načina iz dobivenih saturacijskih krivulja (v. Materijale i metode, poglavlje 3.1.2.5.2.). Vrijednosti dobivene linearizacijom pomoću Rosenthal-Scatchardove jednadžbe, koja se u literaturi najčešće koristi, prilično su se razlikovale od konstanti dobivenih nelinearnom regresijom, a to se pogotovo odnosi na konstantu K_d (v. Tablicu 4.8. u Rezultatima). Zbog toga su u kasnijim eksperimentima konstante računate samo nelinearnom regresijskom analizom.

U više eksperimenata dobivene su konzistentne vrijednosti konstanti K_d i B_{max}, koje su u skladu s literaturnim podacima (Tablica 5.1.). U usporedbi s literaturom, u našim eksperimentalnim uvjetima dobivena je nešto viša gustoća 5HT-1A receptora u području moždane kore (tj. viša vrijednost B_{max}), ali i niži afinitet (tj. viša vrijednost K_d).

Tablica 5.1. Usporedba uvjeta reakcije i dobivenih vrijednosti za K_d i B_{max} u literaturi i našim eksperimentima

referenca	regije	koncentracije uvjeti inkubacije	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg prot.)
Burnet i sur., 1992.	korteks hipokampus hipotalamus strijatum srednji mozak	0,125-8,00 nM; 8 koncentracija 25 °C 30 min	1,62-1,77 1,32-1,61 2,44-2,55 3,29-3,81 2,95-3,26	109-149 280-339 75,1-78,5 52,9-55,5 61,5-65,8
Popova i sur., 1998.	korteks hipokampus hipotalamus amigdala srednji mozak	0,125-4,00 nM; 6 koncentracija 37 °C 15 min	1,06-1,13 1,16-1,61 0,60-0,77 0,56-0,66 1,28-1,78	92,2-145 218-222 39,7-64,8 54,2-211 25,8-26,5
Popova i sur., 2005.	korteks hipokampus hipotalamus amigdala srednji mozak	0,125-4,00 nM; 6 koncentracija 37 °C 15 min	nema podataka	100-150 220 50-60 50-200 30
Kulikov i sur., 1995.	srednji mozak hipokampus	0,25-2,00 nM; 6 koncentracija 35 °C 15 min	0,98-1,16 0,84-1,01	56-65 580-646

referenca	regije	koncentracije uvjeti inkubacije	K_d (nM)	B_{max} (fmol/mg prot.)
Chaouloff i sur., 1997.	srednji mozak	0,25-4,00 nM; 6 koncentracija 35 °C 15 min	1,25-1,50	40-45
Assie i Koek, 2000.	jezgre rafe	0,25-8,00 nM s.t. 30 min	3,72	12,3 fmol/mg tkiva
Lund i Mjellem, 1993.	hipokampus korteks leđna moždina	0,2-8,00 nM	1,92 2,27 2,20	610 276 30,7
naši podaci	korteks hipokampus	0,31-10,00 nM 6 koncentracija 30 °C 60 min	2,55 1,49	359 651

Osjetljivost metode provjerena je mjerenjem receptorskog vezivanja, uz iste eksperimentalne uvjete i na tkivu hipokampusa, gdje se prema literaturnim podacima očekuje znatno veći broj receptora, što je dobiveno i u našim uvjetima (slika 4.14.).

5HT-1A receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT štakora

Usporedba ekspresije mRNA za 5HT-1A receptor u dvije regije mozga (hipokampusu i čeonoj kori) nije pokazala razlike između dviju sublinija WZ-5HT štakora (slike 4.2. i 4.6.). Na razini funkcije proteina također nisu uočene razlike među sublinijama ni u broju receptora (B_{max}), ni u afinitetu receptora za ligand (K_d) (slike 4.15-4.17). Razlike između sublinija nisu uočene ni kod ženki, kod kojih su mjerenja napravljena pri jednoj koncentraciji liganda (5 nM; slika 4.18), a jednako tako nije uočena ni razlika u receptorskom vezivanju između mužjaka i ženki (slika 4.19).

Jedno od mogućih objašnjenja negativnog nalaza je niska vrijednost očekivanih promjena 5HT-1A receptora. S obzirom da su sublinije WZ-5HT štakora razvijene selekcijom prema fiziološkim vrijednostima biokemijskog parametra (brzini trombocitnog 5HTt), malo je vjerojatno da je došlo do drastičnih promjena 5HT receptora u mozgu ovih životinja. Za usporedbu, ekspresija mRNA za 5HT-1A receptore u jezgrama rafe homozigotnih 5HTt KO miševa smanjena je samo 30-40 % (Fabre i sur., 2000b; Li i sur., 2000). Dosadašnja istraživanja genske ekspresije u mozgu WZ-5HT štakora nisu pokazala značajne promjene u ekspresiji moždanog 5HTt (Hranilović, 2000; Bordukalo-Nikšić, 2003), dok su istovremeno prisutne značajne razlike u ekspresiji perifernog (trombocitnog) 5HTt između sublinija (Jernej i sur., 1999b). Imajući u vidu spomenuti opseg promjena kod 5HTt KO životinja, eventualne razlike u ekspresiji ili funkciji 5HT-1A receptora kod naših 5HT sublinija su male, a samim

tim i teško mjerljive. Za pouzdano otkrivanje malih razlika (npr. 10-20 %, koliko bi u našem slučaju bilo realno očekivati), broj uzoraka morao bi biti mnogo veći: za statističku snagu uzorka od 80 % broj životinja po skupini trebao bi iznositi 25-30, a za statističku snagu od 90 % trebalo bi ih biti čak 100-150 po skupini, što je praktički neizvedivo. Drugo metodičko ograničenje je relativno visok koeficijent varijacije u mjerenju ekspresije mRNA u pojedinoj skupini, što smo donekle smanjili upotrebom geometrijske sredine ekspresije triju referentnih gena prilikom normalizacije rezultata. Ipak, treba imati na umu da reakcija semi-kvantitativnog RT-PCR uključuje više koraka od kojih svaki može unijeti dodatnu varijaciju mjerenja (reverzna transkripcija, PCR, elektroforeza, denzitometrija), zbog čega je moguće da je, u našem slučaju, metoda nedovoljno osjetljiva.

Još jedno moguće objašnjenje odsutnosti razlika među sublinijama mogle bi biti regionalne razlike u regulaciji ekspresije 5HT-1A. Naime, studije na 5HTt KO miševima pokazale su jasne regionalne razlike, kako u količini 5HT-1A mRNA, tako i u količini i aktivnosti receptorskog proteina. Tako su, npr., Li i sur. (2000) pokazali razlike u količini mRNA za 5HT-1A u jezgrama rafe 5HTt KO miševa, dok u hipotalamusu i hipokampusu tih razlika nije bilo. Štoviše, promjene su pronađene samo u dorzalnim, a ne i u medijanim jezgrama rafe, što je moguće utvrditi hibridizacijom *in situ*, ali ne i RT-PCR metodom. Nadalje, Fabre i sur. (2000a) su pokazali smanjenu razinu mRNA za 5HT-1A u jezgrama rafe (45 %), uz istovremeno pojačanu ekspresiju u hipokampusu (23 %), dok su promjene na razini proteina bile manjeg opsega, ali u istom smjeru (jezgre rafe: smanjenje od 36 %, hipokampus: porast od 10 %). Elektrofiziološke studije (Mannoury la Cour i sur., 2001) pokazale su desenzitizaciju 5HT-1A autoreceptora u jezgrama rafe, ali ne i u hipokampusu 5HTt KO miševa. Čini se da su jezgre rafe, kao izvorište serotonergičnih neurona i središnje mjesto regulacije serotoninskog sustava, najosjetljivije na promjene drugih elemenata serotonergične sinapse, te će se u nastavku ovih istraživanja obuhvatiti i autoreceptori u jezgrama rafe, kako na razini mRNA, tako i na razini funkcije proteina.

Sumarno, nismo pokazali razlike u ekspresiji postsinaptičkih 5HT-1A receptora u hipokampusu i čeonoj kori između sublinija WZ-5HT štakora, ni na razini mRNA, ni na razini funkcije proteina, ali to ne isključuje mogućnost promjena u ekspresiji 5HT-1A autoreceptora u drugim regijama mozga.

5.1.1.2. 5HT-1B receptori

Glavna je uloga 5HT-1B receptora, kao terminalnih auto- i heteroreceptora, regulacija otpuštanja raznih neurotransmitera (serotonina, ali i drugih, npr. glutamata, acetil-kolina i GABA) (Sari, 2004). Za razliku od 5HT-1A receptora, koji su smješteni somatodendritički (pa distribucija mRNA odgovara distribuciji receptorskih proteina), 5HT-1B receptori smješteni su aksoterminalno te je zbog toga u praksi često teško pripisati učinke 5HT-1B receptora određenoj populaciji neurona (Clark i sur., 2004).

Miševi s inaktiviranim genom za 5HT-1B receptor (5HT-1B KO) pokazuju veću agresivnost i impulzivnost od životinja divljeg tipa (Saudou i sur., 1994), te veću sklonost uzimanju alkohola (Crabbe i sur., 1996). Smatra se da je povećana agresivnost ovih životinja posljedica smanjene anksioznosti, odnosno smanjenja cjelokupne 5HT transmisije (Clark i Neumaier, 2001). U 5HT-1B KO miševa opaženo je i pojačano otpuštanje serotonina u hipokampusu i moždanoj kori (Rutz i sur., 2006). Nadalje, studije na štakorima pokazale su da kronični tretman SSRI (npr. fluoksetinom) uzrokuje promjene 5HT-1B receptora na razini mRNA u jezgrama rafe (smanjenje ekspresije; Anthony i sur., 2000) te strijatumu i korteksu (porast ekspresije; Le Poul i sur., 2000).

Imajući u vidu navedene literaturne podatke, kao i razlike u anksioznom ponašanju između sublinija WZ-5HT štakora (Hranilović i sur., 2005), te pojačanu sklonost unosu alkohola u 5HT-niske sublinije (Mokrović, 2007), moguće je očekivati promjene ekspresije 5HT-1B receptora u ovih životinja.

Zbog toga smo u ovom radu istražili ekspresiju mRNA za 5HT-1B receptor u tri regije mozga: hipokampusu, strijatumu i čeonoj kori. U sve tri regije 5HT-1B receptori prisutni su kao heteroreceptori, tj. nalaze se na neserotonergičnim neuronima. Rezultati ne pokazuju razlike između sublinija WZ-5HT štakora (slike 4.3. i 4.6.), što međutim ne isključuje mogućnost promjena na razini receptorskog proteina. Tako npr. studije miševa s inaktiviranim genom za 5HTt nisu pokazale promjene u ekspresiji 5HT-1B, iako su na istim životinjama potvrđene razlike u gustoći receptora, tj. receptorskog proteina (Fabre i sur., 2000a). Ovi podaci upućuju na to da je u 5HTt KO miševa došlo do promjena 5HT-1B receptora na posttranskripcijskoj razini. S druge strane, kronična primjena SSRI dovela je do promjena u količini mRNA za ovaj receptor, ali ne i do promjena u funkciji proteina (Le Poul i sur., 2000). U slučaju sublinija WZ-5HT štakora, razvijenih u fiziološkim uvjetima (nasuprot drastičnoj promjeni kakva nastaje potpunom inaktivacijom određenog gena), čini se da ne postoji kompenzacija na razini mRNA za 5HT-1B receptor, ni u jednoj od istraživanih regija.

Pokušaj da kod sublinija WZ-5HT štakora ekspresiju gena za 5HT-1B receptor, osim na razini mRNA, odredimo i mjerenjem količine proteina (Western analizom), nije dao zadovoljavajuće rezultate zbog nedovoljne specifičnosti raspoloživog protutijela za 5HT-1B receptor. S druge strane, mjerenje receptorskog vezivanja, što bi dalo uvid i u funkcionalnost ovih receptora, a ne samo u njihovu količinu, otežano je nedostatkom specifičnih liganada.

5.1.1.3. 5HT-2A receptori

Kao glavni ekscitacijski postsinaptički 5HT receptor, 5HT-2A najzastupljeniji je u moždanoj kori, gdje sudjeluje u regulaciji ravnoteže između ekscitacijske i inhibicijske neuronalne aktivnosti (Leysen, 2004). Razni psihofarmaci, neki atipični antipsihotici, a i neki halucinogeni djeluju upravo putem 5HT-2A receptora. Nadalje, čini se da ovaj receptor sudjeluje i u regulaciji anksioznog ponašanja, budući da su nedavno razvijeni 5HT-2A KO miševi pokazali smanjenu anksioznost u testovima ponašanja (Weisstaub i sur., 2006). Osim toga, u sojeva štakora koji pojačano unose alkohol, pokazana je smanjena aktivnost kortikalnih 5HT-2A receptora (Ciccocioppo i sur., 1999), a 5HT-2A receptor igra ulogu i u razvoju serotoninskog sindroma, složenog bihevioralnog sindroma s potencijalno letalnim ishodom (Kalueff i sur., 2008; Van Oekelen i sur., 2002).

Uz ranije spomenute neurokemijske i bihevioralne razlike među 5HT sublinijama, koje bi mogle biti vezane uz adaptacijske promjene 5HT-2A receptora, dodatni poticaj za mjerenje ovih receptora kod 5HT sublinija bili su rezultati istraživanja serotoninskog sindroma na WZ-5HT štakorima koji su pokazali su da životinje iz 5HT-visoke sublinije pokazuju izraženije upravo one simptome za koje se smatra da su posredovani aktivacijom 5HT-2A receptora (Fröbe, 2006). I ovdje se može primijetiti sličnost s 5HTt KO miševima, koji, češće od životinja divljeg tipa, izražavaju neke simptome serotoninskog sindroma (Kalueff i sur., 2007).

5HT-2A receptori WZ-5HT štakora proučeni su u moždanoj kori na razini mRNA, semi-kvantitativnim RT-PCR, i na razini proteina, kvantitativnom Western analizom.

Na razini mRNA, nisu pokazane razlike u ekspresiji 5HT-2A receptora između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije štakora (slike 4.5. i 4.6.). Isti rezultat ponovljen je u dva neovisna pokusa na životinjama iz različitih uzgoja. Za usporedbu, studije miševa s inaktiviranim genom za 5HTt pokazale su adaptivne promjene 5HT-2A receptora, ali samo na razini

funkcije proteina, tj. receptorskog vezivanja (Rioux i sur., 1999), dok promjene na razini mRNA nisu pokazane (Li i sur., 2003).

Western analiza 5HT-2A receptora u moždanoj kori WZ-5HT štakora također nije pokazala razlike u količini ovih receptora između dviju sublinija (slika 4.9.). Srednje vrijednosti količine 5HT-2A receptora, normalizirane prema referentnom proteinu – β-aktinu, u obje sublinije bile su podjednake, a vrlo slični rezultati dobiveni su i u repliciranom pokusu. Treba međutim napomenuti da izostanak razlika u količini receptorskog proteina između sublinija ne isključuje prisutnost razlika u njegovoj aktivnosti ili distribuciji unutar stanica, naročito ako se uzmu u obzir složeni mehanizmi regulacije ovog receptora (Roth i sur., 1998; Bockaert i sur., 2006a).

U literaturi, Western analize serotoninskih receptora razmjerno su rijetke. Razlog tome je dijelom nedostatak odgovarajućih specifičnih protutijela (kao npr. za 5HT-1 receptore), ali i dostupnost drugih metoda, npr. imunohistokemijskih studija, koje omogućuju uvid u količinu receptora po pojedinim regijama mozga, ili studija receptorskog vezivanja, koje, osim podatka o broju funkcionalnih receptorskih mjesta, daju i informaciju o afinitetu receptora za ligand. Iz tog razloga, daljnje studije ovog receptora u sublinijama WZ-5HT štakora bit će usmjerene prema istraživanju funkcionalnosti proteina.

Istraživanja 5HT receptora u ovom radu provodila su se jednim dijelom paralelno na životinjama oba spola. Prema literaturnim podacima, utjecaj spola, odnosno spolnih hormona na funkciju serotoninskog sustava značajan je: tako npr. mozak muškaraca pokazuje znatno jaču sintezu serotonina (Nishizawa i sur., 1997), u mozgu žena utvrđeno je slabije vezivanje za 5HT-2A receptor (Biver i sur., 1996), te različito vezivanje za 5HT-1A receptor i serotoninski prijenosnik u usporedbi s muškarcima (Jovanovic i sur., 2008), a čini se da i utjecaj raznih polimorfizama gena 5HT sustava, osim o etnicitetu, ovisi i o spolu (Williams i sur., 2003). Tome treba pridodati i veću učestalost afektivnih poremećaja (posebice depresije) u žena (Kessler, 2003).

U 5HTt KO miševa primijećeno je da promjene ekspresije 5HT-1A receptora ovise i o spolu, pri čemu je smanjenje razine mRNA bilo izraženije u ženki (Li i sur., 2000). S obzirom na to da estrogen utječe na funkciju 5HT-1A receptora (Österlund i sur., 2000), kao i na ekspresiju gena za 5HTt (Pecins-Thompson i sur., 1998), jasno je da u istraživanjima ekspresije pojedinih elemenata 5HT sustava treba uzeti u obzir utjecaj spola. U ovom radu, u

eksperimentima provedenima na životinjama oba spola nisu opažene razlike između sublinija WZ-5HT štakora s obzirom na spol.

U zaključku možemo reći da usporedbom serotoninskih receptora u mozgu sublinija WZ-5HT štakora, nismo pronašli razlike u ekspresiji 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A podtipova, ni na razini mRNA, ni na razini količine, odnosno funkcije proteina, što govori da genetička selekcija nije dovela do mjerljivih promjena tih receptora u u fiziološkim uvjetima u istraživanim regijama. Ipak, s obzirom na razlike među sublinijama, koje su jasno uočljive nakon farmakoloških ili bihevioralnih izazova (Čičin-Šain i Jernej, 2008) moguće je da postoje latentne razlike u navedenim 5HT receptorima koje nisu mjerljive u fiziološkim uvjetima, ali bi mogle postati vidljive nakon određenog izazova koji bi serotoninski sustav izbacio iz ravnoteže. Jedan takav mogući izazov je stres, te smo u nastavku ovog rada istražili 5HT receptore kod životinja iz sublinija koje su prethodno bile izložene kroničnom stresu.

5.1.2. Serotoninski receptori u mozgu Wistar-Zagreb 5HT-štakora nakon izlaganja kroničnom stresu

Iz dosadašnjih istraživanja WZ-5HT štakora može se zaključiti da su razlike između sublinija uočljivije nakon izazova (farmakološkog, okolišnog, itd.) koji sustav izbacuje iz ravnoteže. Tako je npr. farmakološki izazov akutnom primjenom SSRI (citalopram) doveo do znatno većeg porasta koncentracije izvanstaničnog 5HT u hipokampusu životinja iz 5HT-visoke sublinije, a na sličan način djelovala je i depolarizirajuća infuzija hipertonične otopine KCl (Romero i sur., 1998). Također, bihevioralni izazovi doveli su do različitih reakcija dviju sublinija: izazivanje serotoninskog sindroma pokazalo je jače izražene simptome, kao i češću pojavu letalnog ishoda, u životinja iz 5HT-visoke sublinije (Fröbe, 2006), a ovdje valja navesti i već spomenute razlike u anksioznom ponašanju (Hranilović i sur., 2005) te jače izraženu komponentu depresivnog ponašanja (Čičin-Šain i Jernej, 2008) i veću sklonost uzimanju alkohola (Mokrović, 2007) u životinja iz 5HT-niske sublinije. Budući da bihevioralni testovi u pravilu uključuju izloženost novoj okolini, što u određenoj mjeri predstavlja blagi stres za životinju, nije isključeno da razlike u određenim oblicima ponašanja između sublinija proizlaze iz njihovog različitog odgovora na stres (Čičin-Šain i Jernej, 2008).

U odgovoru organizma na stres ključnu ulogu igra tzv. osovina hipotalamus-hipofiza-nadbubrežna žlijezda (HPA, v. pogl. 1.4. u Uvodu). Danas se smatra da su razni psihijatrijski poremećaji za koje se pretpostavlja da su vezani uz disfunkciju 5HT transmisije, popraćeni

promjenama funkcije HPA osi. Na primjer, izloženost traumi u ranoj životnoj dobi predstavlja povećani rizik za kasnije poremećaje neuroendokrine regulacije (De Kloet i sur., 2005) te, posljedično, moguću pojavu depresije (Heim i Nemeroff, 2001), odnosno posttraumatskog stresnog poremećaja (Davidson i sur., 2004). Miševi s genetski modificiranim komponentama HPA osi pokazuju smanjenu anksioznost (Tronche i sur., 1999), dok izlaganje štakora kronično visokoj razini kortikosterona povećava učestalost depresivnog ponašanja u bihevioralnim testovima (Gregus i sur., 2005). Osim toga, čini se da kronična izloženost stresu utječe i na kasniji razvoj ovisnosti o alkoholu i opojnim drogama (Kreek i Koob, 1998; Brady i Sonne, 1999).

Serotonin, kao važan modulator brojnih fizioloških funkcija, sudjeluje i u reakciji organizma na stres. Serotonergični neuroni inerviraju neuroendokrino područje, kao i regije uključene u kontrolu ponašanja (amigdale, strijatum, hipokampus, koru), te tijekom stresa konstantno primaju informacije o promjenama u organizmu (Chaouloff, 1999). Nadalje, stres uzrokuje porast koncentracije izvanstaničnog 5HT i njegovih metabolita, a utječe i na njegovu sintezu (Flügge i sur., 2004). Čini se da na pojačano otpuštanje 5HT iz serotonergičnih neurona u stresu izravno utječe povišena razina glukokortikoida (Linthorst i sur., 2000).

Uzevši u obzir brojne literaturne podatke o povezanosti serotonergične transmisije i odgovora na stres, moguće je da životinje iz 5HT sublinija, kod kojih pretpostavljamo različitu aktivnost 5HT sustava, pokazuju i različit odgovor na stres. Zbog toga smo istražili utjecaj kroničnog stresa na 5HT receptore u mozgu WZ-5HT sublinija. Pritom je istraživan utjecaj stresa na pojedine receptore (5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A), ali i utjecaj konstitucijske promjene 5HT homeostaze na reakciju na stres (usporedbom 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije).

Kako je već spomenuto u Uvodu (pogl. 1.4.), od svih serotoninskih receptora, s odgovorom na stres najčešće se povezuje 5HT-1A receptor, na čiju ekspresiju izravno utječe prisutnost glukokortikoida (Meijer i De Kloet, 1994). Rezultati istraživanja na modelima kroničnog stresa nisu jednoznačni - neke studije (Lopez i sur., 1998; Neumaier i sur., 2002; Vazquez i sur., 2002) pokazale su promjene u ekspresiji mRNA za 5HT-1A, neke su pokazale promjene na razini funkcije proteina (Harvey i sur., 2003; Kalynchuk i sur., 2006; Briones-Aranda i sur., 2005), a neke nisu pokazale nikakve promjene (Abumaria i sur., 2006). Studije akutnog stresa nešto su rjeđe, a ni njihovi rezultati nisu jednoznačni (Steciuk i sur., 2000; Lopez i sur., 1999; Laaris i sur., 1999; v. Tablicu 1.1. u Uvodu). S druge strane, studije na miševima sa inaktiviranim genom za 5HT-1A receptor nisu pokazale značajne promjene u reakciji na stres,

u usporedbi s miševima divljeg tipa (Groenink i sur., 2003). Slično se pokazalo i u studijama na 5HT-1B KO miševima (Bouwknecht i sur., 2001a).

U istraživanjima stresa često se koriste animalni modeli (v. pogl. 1.4. u Uvodu). Većina modela kroničnog stresa temelji se na izlaganju životinja višednevnom stresu, kao što je imobilizacija, svakodnevno izmjenjivanje nasumičnih stresora ili socijalni stres (De Kloet i sur., 2005). Od psiholoških stresora koristi se izlaganje životinje predatoru (mački, ukoliko se stres istražuje na štakorima; Mashoodh i sur., 2008), odvajanje tek okoćenih životinja od majke (Vazquez i sur., 2002), te razni oblici socijalnog stresa (npr. model kolonije, McKittrick i sur., 1995; odnosno izlaganje dominantnom mužjaku, Abumaria i sur., 2006). Među modelima kroničnog stresa, najčešće se primjenjuju model kroničnog nepredvidivog stresa (Katz i sur., 1981), odnosno kroničnog blagog stresa (Papp i sur., 1996), koji smo i mi primijenili u ovom radu.

Izlaganje WZ-5HT štakora devetodnevnom stresu nije dovelo do značajnih promjena u ekspresiji mRNA za 5HT-1A između 5HT-visoke i 5HT-niske sublinije (slika 4.7.), iako su u čeonoj kori opažene nešto niže vrijednosti u 5HT-niske sublinije nakon izlaganja stresu (~ 25 % razlike), ali uz graničnu statističku značajnost ($p = 0,0629$). U životinja iz 5HT-visoke sublinije ovaj učinak nije opažen.

Osim na transkripcijskoj razini, djelovanje stresa na 5HT-1A receptore u sublinija WZ-5HT štakora istraženo je i na razini funkcije proteina, mjerenjem receptorskog vezivanja. Nakon izlaganja stresu opažene su nešto niže vrijednosti receptorskog vezivanja [^{3}H]8-OH-DPAT u obje sublinije (v. sliku 4.20.), ali te razlike nisu dosegle prag statističke značajnosti.

Tendencija smanjenju količine mRNA za 5HT-1A receptor u 5HT-niske sublinije nakon izlaganja stresu u skladu je s literaturnim podacima koji su pokazali smanjenu ekspresiju ovog receptora u pojedinim dijelovima hipokampusa u stresu (Lopez i sur., 1998). Smanjenje ekspresije 5HT-1A receptora u našim je pokusima opaženo samo u moždanoj kori, a ne i u hipokampusu, što upućuje na mogućnost regionalno specifičnih promjena. Smanjena ekspresija 5HT-1A receptora u moždanoj kori u skladu je sa smanjenjem broja 5HT-1A receptora u moždanoj kori pokazanim kod nekih oblika stresa (Flügge, 1995), kao i podatkom o sniženoj aktivnosti 5HT-1A receptora u moždanoj kori depresivnih pacijenata (Sargent i sur., 2000). Može se pretpostaviti da je i u moždanoj kori životinja iz 5HT-niske sublinije uslijed kroničnog stresa došlo do određenih promjena na razini transkripcije gena za ovaj receptor, koje u drugim regijama mozga (hipokampusu) nisu izražene. Međutim, ne treba

isključiti ni mogućnost promjena ekspresije 5HT-1A u pojedinim dijelovima hipokampusa, koje metodom RT-PCR nije bilo moguće otkriti (usp. Lopez i sur., 1998). Ipak, budući da nisu opažene promjene funkcije 5HT-1A receptorskog proteina, eventualne promjene na transkripcijskoj razini kod životinja iz 5HT-niske sublinije vjerojatno se uspješno kompenziraju na posttranslacijskoj razini.

Osim 5HT-1A, u ovom radu istraživana je i ekspresija mRNA za 5HT-1B i 5HT-2A receptore nakon izlaganja WZ-5HT štakora kroničnom stresu, i to u istim regijama mozga kao što je rađeno u fiziološkim uvjetima (hipokampus, čeona kora, strijatum). Nisu pokazane promjene u ekspresiji navedenih receptora nakon stresa ni u jednoj ispitivanoj regiji (slika 4.7.).

Iako u literaturi postoje radovi koji dovode u vezu ekspresiju 5HT-1B i stres, većina tih istraživanja usmjerena je na 5HT-1B autoreceptore u jezgrama rafe (Kaiyala i sur., 2003; Clark i sur., 2002; Clark i sur., 2004), koji nisu istraživani kod WZ-5HT sublinija, iako postoje i studije mRNA za 5HT-1B u drugim regijama mozga. Tako je selekcija štakora prema njihovoj reaktivnosti na stres pokazala da takve životinje imaju promijenjenu ekspresiju 5HT-1B u jezgrama rafe i strijatumu, ali ne i u hipokampusu (Neumaier i sur., 2002). Studije 5HT-1B KO miševa nisu pokazale značajne razlike u reaktivnosti ovih životinja na stres (Bouwknecht i sur., 2001a). Čini se da uloga 5HT-1B receptora u odgovoru na stres nije još razjašnjena, a naši rezultati u skladu su s dijelom literature koji također ne navodi razlike u ekspresiji ovog 5HT receptora nakon izlaganja stresu (v. Tablicu 1.2. u Uvodu).

Što se tiče 5HT-2A receptora, u literaturi su štakori opetovano izlagani određenom obliku stresa (nepredvidivom neizbježnom šoku) pokazali znatno povišenu razinu mRNA za 5HT-2A receptor u čeonoj kori (Dwivedi i sur., 2005), što, uzevši u obzir naše rezultate izostanka promjena (slika 4.7.), ukazuje da vrsta i jačina stresa kojem su životinje izložene mogu utjecati na promjene u ekspresiji 5HT-2A. Utjecaj stresa na 5HT-2A receptore pokazan je i u nekim drugim studijama (Ossowska i sur., 2001; Katagiri i sur., 2001; Harvey i sur., 2003), ali tu se radilo o promjeni aktivnosti receptorskog proteina, a ne količine mRNA, što za sada nije istaživano kod naših sublinija.

Sumarno možemo reći da u fiziološkim uvjetima nisu pronađene razlike u ekspresiji 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptora između sublinija WZ-5HT štakora, ni na razini mRNA ni na razini količine, odnosno funkcije proteina. Međutim, izlaganje životinja kroničnom stresu

pokazalo je tendenciju smanjenju ekspresije mRNA za 5HT-1A receptor u moždanoj kori 5HT-niske sublinije, što upućuje na moguće regionalno specifične promjene ekspresije ovog receptora koje dolaze do izražaja nakon stresnog izazova.

5.2. POLIMORFIZMI GENA ZA SEROTONINSKE RECEPTORE U ALKOHOLIZMU

Ovisnost o alkoholu, ili alkoholizam, kompleksan je, kroničan i ponavljajući poremećaj koji predstavlja ozbiljan zdravstveni problem u svijetu. Na pojavu alkoholizma utječu nasljedni i okolišni faktori koji su u međusobno vrlo složenoj interakciji. Dosadašnja eksperimentalna i klinička istraživanja pokazala su da serotonin, kao važan modulator brojnih neurobioloških procesa, igra značajnu ulogu u razvoju ovisnosti, pa tako i ovisnosti o alkoholu.

Kako je već spomenuto u Uvodu (pogl. 1.5.), suvremena medicina pokušava razlikovati dva oblika bolesti: tip I i tip II alkoholizma. Smatra se da da je povećani unos alkohola povezan sa smanjenom serotonergičnom transmisijom, što je naročito izraženo u alkoholizmu tipa II (Nutt, 1999). Naši rezultati dobiveni na modelu WZ-5HT štakora, koji pokazuju značajno veću sklonost alkoholu kod životinja iz 5HT-niske sublinije (Čičin-Šain i Jernej, 2008; Mokrović, 2007), potvrđuju tu pretpostavku. Ipak, treba reći da podjela alkoholizma na tip I i tip II nije svugdje prihvaćena, npr. nema je u službenom dijagnostičkom priručniku za psihijatrijske bolesti (DSM-IV).

U genetičkim istraživanjima veze alkoholizma i serotoninskog sustava, najviše studija napravljeno je na polimorfizmima gena za serotoninski prijenosnik, koji djeluje kao središnji regulator serotonergične sinapse (Lichtermann i sur., 2000). Polimorfizmi nekih serotoninskih receptora u literaturi se također povezuju s razvojem ovisnosti o alkoholu, naročito kad je alkoholizam popraćen agresivnim ponašanjem (Gorwood i sur., 2004).

U ovom dijelu disertacije istražili smo moguću povezanost polimorfizama dvaju gena za serotoninske receptore: 5HT-1B i 5HT-2A, s pojavom alkoholizma.

5.2.1. Polimorfizam gena za 5HT-1B receptor u alkoholizmu

U istraživanjima povezanosti 5HT-1B receptora i alkoholizma važnu ulogu imao je animalni model miševa s inaktiviranim genom za 5HT-1B receptor. Naime, ovi su miševi pokazali veću agresivnost u testovima ponašanja (Saudou i sur., 1994), kao i povećan unos alkohola (Crabbe i sur., 1996). Na temelju istraživanja na animalnom modelu, gen za 5HT-1B receptor predložen je kao gen kandidat za razvoj ovisnosti o alkoholu (Crabbe i sur., 1999).

Prvo istraživanje povezanosti varijabilnosti gena za 5HT-1B receptora i alkoholizma proveli su Lappalainen i sur. (1998). Oni su pokazali povezanost antisocijalnog oblika alkoholizma s polimorfizmom G861C u genu za 5HT-1B receptor (uz prevalenciju alela C u grupi alkoholičara). Nakon ove studije, i drugi su autori istraživali povezanost ovog polimorfizma s alkoholizmom, međutim, rezultati tih studija nisu jednoznačni (Tablica 5.2.).

Tablica 5.2. Rezultati istraživanja povezanosti polimorfizma G861C s pojavom alkoholizma

referenca	etnička skupina	broj ispitanika	dijagnoza	nalaz u pacijenata
Lappalainen i sur., 1998	Finci	166	alkoholizam + kriminalitet	veći udio alela C
Hasegawa i sur., 2002	Japanci	1385	alkoholizam + inaktivna ALDH2 + antisocijalno ponašanje	veći udio alela C
Fehr i sur., 2000	Nijemci	209	alkoholizam	veći udio alela G
Soyka i sur., 2004	Nijemci	164	alkoholizam + antisocijalno ponašanje	veći udio alela G
Gorwood i sur., 2002	Francuzi	136	alkoholizam + antisocijalni simptomi	nema povezanosti
Huang i sur., 2003	SAD – miješana populacija	97	alkoholizam	nema povezanosti
Sinha i sur., 2003	SAD – bijelačka populacija	133	alkoholizam tipa I i tipa II	nema povezanosti
Sun i sur., 2002	Kinezi	158	alkoholizam	nema povezanosti

O funkcionalnosti ovog polimorfizma ne zna se mnogo. Huang i sur. (1999) su pokazali veći broj 5HT-1B receptorskih mjesta na uzorcima ljudskog mozga *post mortem*, u osoba s genotipom G861G (u usporedbi s genotipom G861C, koji je povezan s oko 20 % manjom vrijednošću B_{max}). Međutim, ova veza nije u potpunosti razjašnjena. Pretpostavlja se da je polimorfizam G861C u neravnoteži vezivanja (engl. *linkage disequilibrium*) s nekim drugim polimorfizmom istog gena, koji bi mogao imati utjecaja na transkripciju. Tako je za

polimorfizam promotora gena za 5HT-1B receptor, A-161T, pokazano da utječe na afinitet vezivanja trankripcijskog faktora AP-1 (Duan i sur., 2003), a neke studije pokazale su i određen stupanj neravnoteže vezivanja između polimorfizama A-161T i G861C (Sanders i sur., 2001).

U ovom radu, istražili smo učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma G861C u osoba ovisnih o alkoholu te u zdravih kontrolnih ispitanika. Dio kontrolnih uzoraka genotipiziran je u sklopu ranijih istraživanja (Štefulj i sur., 2004).

Uspoređujući učestalost pojedinih genotipova i alela polimorfizma G861C u naših kontrolnih ispitanika s literaturnim podacima, može se primijetiti da se rezultati podudaraju s rezultatima drugih asocijacijskih studija dobivenima na europskoj ili angloameričkoj populaciji, dok su značajne razlike ($p < 0,0001$) primijećene u odnosu na istočnoazijske populacije (veći udio alela C u istočnoazijskim populacijama, Tablica 5.3.).

Tablica 5.3. Usporedba frekvencija genotipova i alela polimorfizma G861C gena za 5HT-1B receptor u kontrolnih ispitanika različitih populacija

referenca	etnička skupina	broj kontrolnih uzoraka	frekvencije genotipova			frekvencije alela	
			GG	GC	CC	G	C
Fehr i sur., 2000.	Nijemci	74	0,37	0,51	0,11	0,66	0,34
Gorwood i sur., 2002.	Francuzi	72	0,54	0,36	0,10	0,72	0,28
Sinha i sur., 2003.	SAD – bijelačka populacija	88	0,59	0,36	0,03	0,78	0,22
Huang i sur., 2003.	SAD – miješana populacija	96	0,56	0,38	0,06	0,72	0,25
Hasegawa i sur., 2002.	Japanci	200	0,31	0,52	0,17	0,57	0,43
Sun i sur., 2002.	Tajvanski Kinezi	145	0,29	0,54	0,16	0,56	0,44
naši rezultati	Hrvati	219	0,50	0,42	0,08	0,71	0,29

Usporedba frekvencija genotipova i alela polimorfizma G861C na našem uzorku pacijenata oboljelih od alkoholizma i kontrolnih ispitanika nije pokazala statistički značajne razlike. U tom smislu, rezultati su u skladu s dijelom literature (v. Tablicu 5.2.) koja također ne nalazi povezanost ovog polimorfizma s alkoholizmom. Ipak, uspoređujući naše rezultate s literaturnima, treba uzeti u obzir znatne razlike u dijagnostičkim pristupima alkoholizmu. Tako neki autori razlikuju podtipove alkoholizma, a neki ne (v. Tablicu 5.2.). U ovom istraživanju, otprilike polovici ispitanika postavljena je dijagnoza alkoholizma tipa I, a polovica je imala dijagnozu alkoholizma tipa II. Budući da se ove dijagnostičke podskupine

međusobno nisu razlikovale u distribucijama alela ili genotipova, kao ni u usporedbi s kontrolnom populacijom, analizirane su zajedno kako bi se povećala statistička snaga uzorka. U usporedbi s kontrolnom populacijom, u skupini pacijenata ovisnih o alkoholu može se primijetiti nešto veći udio genotipa GG (57 %, nasuprot 49,8 % u kontrolnoj populaciji), ali bez statističke značajnosti. Za pouzdanije utvrđivanje povezanosti ovog polimorfizma s pojavom ovisnosti o alkoholu, potrebno je provesti genotipizaciju na većem broju ispitanika, što je u tijeku.

5.2.2. Polimorfizam gena za 5HT-2A receptor u alkoholizmu

Slično kao i u slučaju 5HT-1B receptora, pretpostavka o povezanosti 5HT-2A receptora s alkoholizmom potječe iz studija na animalnim modelima. U sojeva štakora koji pojačano uzimaju alkohol pokazana je smanjena aktivnost 5HT-2A receptora (Ciccocioppo i sur., 1999), dok je kronična primjena antagonista 5HT-2A receptora dovela do manjeg unosa alkohola (Myers i sur., 1993). Najnovija istraživanja na ljudima pokazala su smanjenu aktivnost 5HT-2A receptora u moždanoj kori osoba ovisnih o alkoholu (Underwood i sur., 2008).

Moguću povezanost polimorfizama gena za 5HT-2A receptor s alkoholizmom prvi su uočili Nakamura i sur. (1999), koji su u podgrupi alkoholičara s inaktivnom aldehid-dehidrogenazom 2 ustanovili znatno veću učestalost alela G promotorskog polimorfizma -1438AG. Nakon ovog, provedena su i druga slična istraživanja, ali, rezultati nisu bili jednoznačni (Tablica 5.4.)

Tablica 5.4. Rezultati istraživanja povezanosti polimorfizma -1438AG s pojavom alkoholizma

referenca	etnička skupina	broj ispitanika	dijagnoza	nalaz u pacijenata
Nakamura i sur., 1999	Japanci	225	alkoholizam + inaktivna ALDH2	veći udio alela G
Preuss i sur., 2001	Nijemci	135	alkoholizam + impulzivno ponašanje	manji udio alela A
Schuckit i sur., 1999*	SAD – bijelačka populacija	450	niska razina odgovora na alkohol	nema povezanosti
Fehr i sur., 2001*	Nijemci	176	alkoholizam	nema povezanosti
Hwu i Chen, 2000*	Kinezi	85	alkoholizam + poremećaji ponašanja	veći udio alela T102 u kombinaciji alkoholizma i poremećaja ponašanja

* proučavan je polimorfizam T102C, koji je u gotovo 100 %-tnoj neravnoteži vezivanja s polimorfizmom -1438AG

Funkcionalni značaj promotorskih polimorfizama gena za 5HT-2A receptor još nije posve razjašnjen. U početnim istraživanjima činilo se da polimorfizam -1438AG nema utjecaja na transkripcijsku aktivnost gena za 5HT-2A receptor (Spurlock i sur., 1998), ali kasnije studije pokazale su da određene kombinacije alela u promotoru gena za 5HT-2A receptor utječu na količinu nastale mRNA u ekspresijskim sustavima *in vitro* (Parsons i sur., 2004; Myers i sur., 2007).

U ovom radu, istraživali smo učestalost pojedinih genotipova i alela promotorskog polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor u osoba ovisnih o alkoholu i kontrolnih ispitanika. Dio kontrolnih uzoraka genotipiziran je u sklopu ranijih istraživanja (Babić, 2006).

Dobivene frekvencije genotipova i alela u kontrolnoj populaciji usporedili smo s literaturnim podacima. Slično kao i kod polimorfizma gena za 5HT-1B receptor, pokazana je podudarnost naših rezultata s rezultatima dobivenima na europskoj odnosno angloameričkoj populaciji, dok su značajne razlike ($p < 0,0003$) primijećene u odnosu na istočnoazijsku populaciju (veći udio alela A u istočnoazijskoj populaciji, v. Tablicu 5.5.).

Tablica 5.5. Usporedba frekvencija genotipova i alela polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor u kontrolnih ispitanika različitih populacija

referenca	etnička skupina	broj kontrolnih uzoraka	frekvencije genotipova			frekvencije alela	
			AA	AG	GG	A	G
Berggård i sur., 2003.	Šveđani	202	0,12	0,50	0,38	0,37	0,63
Ricca i sur., 2002.	Talijani	115	0,11	0,51	0,38	0,36	0,64
Saiz i sur., 2008.	Španjolci	420	0,21	0,48	0,31	0,45	0,55
Enoch i sur., 1999.	SAD – bijelačka populacija	69	0,09	0,55	0,36	0,36	0,64
Myers i sur., 2007.	SAD – miješana populacija	156	0,14	0,53	0,33	0,40	0,60
Choi i sur., 2005.	Korejci	157	0,26	0,56	0,18	0,54	0,46
Nakamura i sur., 1999.	Japanci	361	0,29	0,50	0,21	0,54	0,46
naši rezultati	Hrvati	219	0,17	0,50	0,33	0,42	0,58

Frekvencije alela i genotipova polimorfizma -1438AG nisu se razlikovale u podskupinama pacijenata s obzirom na dijagnozu (alkoholizam tipa I i II) u njihovoj međusobnoj usporedbi,

kao ni u usporedbi s kontrolnom populacijom. Kako bismo povećali statističku snagu uzorka, dvije podskupine pacijenata su spojene, te su frekvencije alela i genotipa polimorfizma -1438AG uspoređene s kontrolnom populacijom, i opet bez statistički značajnih razlika. U tom smislu, ovaj rezultat je u skladu s negativnim rezultatima utvrđenima u literaturi (v. ranije). Iz ovih rezultata može se zaključiti da u našem uzorku ispitanika nema povezanosti promotorskog polimorfizma -1438AG gena za 5HT-2A receptor s pojavom ovisnosti o alkoholu.

Treba naglasiti kako je alkoholizam vrlo kompleksan poremećaj, naročito s obzirom na utjecaj okolišnih faktora, koji je u alkoholizmu kompleksniji nego u drugih bolesti (npr. u usporedbi sa shizofrenijom, v. Buckland, 2001). Zbog toga je utjecaj gena na razvoj alkoholizma teže odrediti nego u drugim poremećajima (Hill, 1998), te je potreban poseban oprez pri donošenju zaključaka. U genetsku podlogu alkoholizma uključen je veći broj gena, svaki s manjim utjecajem. Imajući na umu da je za detekciju utjecaja gena s malim doprinosom potreban velik uzorak ispitanika, u nastavku istraživanja planiramo povećati uzorak, kao i proširiti istraživanja prema drugim genima serotoninskog sustava.

6. ZAKLJUČCI

U regulaciji serotonergične transmisije, posebnu ulogu imaju serotoninski receptori, a njihov velik broj (petnaest različitih receptora) i različiti mehanizmi djelovanja dijelom objašnjavaju postojanje brojnih učinaka serotonina. Ovim radom željeli smo pobliže istražiti tri serotoninska receptora: 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A receptor, u uvjetima promijenjene serotoninske homeostaze, na eksperimentalnom animalnom modelu (štakor) te, na kliničkoj razini, u osoba ovisnih o alkoholu.

1. U prvom dijelu istraživanja, koji se odnosio na eksperimentalni animalni model, cilj nam je bio istražiti serotoninske receptore 5HT-1A, 5HT-1B i 5HT-2A u sublinijama štakora s konstitucijski promijenjenom serotonergičnom homeostazom – Wistar-Zagreb 5HT štakora (WZ-5HT štakori). Istraživanja su provedena na razini mRNA i proteina, u fiziološkim uvjetima i nakon izlaganja životinja kroničnom stresu. Zaključci ovog dijela istraživanja su sljedeći:

   - U fiziološkim uvjetima nisu pokazane razlike u ekspresiji serotoninskih receptora između sublinija WZ-5HT štakora u istraživanim regijama mozga (hipokampus, strijatum, čeona kora), ni na razini mRNA (5HT-1A, 5HT-1B, 5HT-2A), ni na razini količine (5HT-2A) ili funkcije proteina (5HT-1A), što upućuje na to da genetička selekcija prema aktivnosti 5HTt nije dovela do adaptacijsko/kompenzacijskih promjena 5HT receptora u navedenim regijama. Buduća istraživanja 5HT receptora kod WZ-5HT štakora uključit će i druge regije mozga (jezgre rafe).

   - Nakon izlaganja WZ-5HT štakora kroničnom stresu pokazana je tendencija smanjenoj ekspresiji mRNA za 5HT-1A receptor u moždanoj kori životinja iz 5HT-niske sublinije, uz graničnu statističku značajnost, dok u ekspresiji 5HT-1B i 5HT-2A receptora nisu opažene promjene, ni u moždanoj kori, ni u hipokampusu, odnosno strijatumu. Ovakav rezultat upućuje na moguću regionalno specifičnu promjenu ekspresije 5HT-1A receptora u 5HT-niske sublinije, koja dolazi do izražaja tek nakon izazova (u ovom slučaju, stresa).

2. Drugi dio istraživanja proveden je na humanoj populaciji, a bio je usmjeren na istraživanje polimorfizama gena za 5HT-1B i 5HT-2A receptor u zdravih ispitanika i osoba ovisnih o alkoholu, s dijagnozom alkoholizma tipa I i II. Pokazano je da se učestalost pojedinih

genotipova, odnosno alela, polimorfizma G861C u genu za 5HT-1B receptor i polimorfizma promotora -1438AG u genu za 5HT-2A receptor, ne razlikuje u osoba ovisnih o alkoholu u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika, ni u skupnoj analizi, ni s obzirom na poddijagnozu (alkoholizam tipa I ili II). Budući da je opažena tendencija većoj učestalosti genotipa GG 5HT-1B receptora u osoba ovisnih o alkoholu, u planu je nastavak ovih istraživanja na većem broju pacijenata.

7. LITERATURA

Abumaria N, Rygula R, Havemann-Reinecke U, Rüther E, Bodemer W, Roos C, Flügge G (2006) Identification of genes regulated by chronic social stress in the rat dorsal raphe nucleus. Cellular and Molecular Neurobiology 26:145-162

Adriani W, Giannakopoulou D, Bokulić Z, Jernej B, Alleva E, Laviola G (2006) Response to novelty, social and self-control behaviors, in rats exposed to neonatal anoxia: modulatory effects of an enriched environment. Psychopharmacology 184:155-165

Albert PR, Lemonde S (2004) 5-HT1A receptors, gene repression and depression: guilt by association. Neuroscientist 10:575-593

Albert PR, Zhou QY, Van Tol H, Bunzow JR, Civelli O (1990) Cloning, functional expression and mRNA tissue distribution of the rat 5-hydroxytryptamine$_{1A}$ receptor gene. Journal of Biological Chemistry 265:5825-5832

Anthony JP, Sexton TJ, Neumaier JF (2000) Antidepressant-induced regulation of 5-HT$_{1B}$ mRNA in rat dorsal raphe nucleus reverses rapidly after drug discontinuation. Journal of Neuroscience Research 61:82-87

Assie MB, Koek W (2000) [^{3}H]-8-OH-DPAT binding in rat brain raphe area: involvement of 5-HT$_{1A}$ and non-5-HT$_{1A}$ receptors. British Journal of Pharmacology 130:1348-1352

Aulakh CS, Tolliver T, Wozniak KM, Hill JL, Murphy DL (1994) Functional and biochemical evidence for altered serotonergic function in the Fawn-Hooded rat strain. Pharmacology Biochemistry and Behavior 49:615-620

Azmitia EC (1999) Serotonin neurons, neuroplasticity, and homeostasis of neural tissue. Neuropsychopharmacology 21:33S-45S

Azmitia EC (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. Brain Research Bulletin 56:413-424

Azmitia EC (2007) Serotonin and brain: evolution, neuroplasticity, and homeostasis. International Review of Neurobiology 77:31-56

Babić M (2006) Polimorfizam gena za 5-HT$_{2A}$ receptor i autizam: ispitivanje povezanosti u stanovništva Hrvatske. Diplomski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Barnes NM, Sharp T (1999) A review of central 5-HT receptors and their function. Neuropharmacology 38:1083-1152

Bengel D, Murphy DL, Andrews AM, Wichems CH, Feltner D, Heils A, Mössner R, Westphal H, Lesch KP (1998) Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice. Molecular Pharmacology 53:649-655

Berggård C, Damberg M, Longato-Stadler E, Hallman J, Oreland L, Garpenstrand H (2003) The serotonin 2A – 1438 G/A receptor polymorphism in a group of Swedish male criminals. Neuroscience Letters 347:196-198

Biver F, Lotstra F, Monclus M, Wikler D, Damhaut P, Mendlewicz J, Goldman S (1996) Sex differences in 5HT$_2$ receptor in the living human brain. Neuroscience Letters 204:25-28

Bockaert J, Bécamel C, Joubert L, Gavarini S, Dumuis A, Marin P (2006a) Identification of 5-HT2 and 5-HT4 receptor-interacting proteins. U: The Serotonin Receptors, Roth BL (ur.), Humana Press, 237-255

Bockaert J, Claeysen S, Bécamel C, Dumuis A, Marin P (2006b) Neuronal 5-HT metabotropic receptors: fine-tuning of their structure, signaling, and roles in synaptic modulation. Cell & Tissue Research 326:553-572

Bokulić Z, Čičin-Šain L, Jernej B (2003) Wistar-Zagreb 5HT rats: study of serotonergic activity in brain regions. Neurologia Croatica (Zurak N, Zagreb, School of Medicine, University of Zagreb) 91 (sažetak)

Bordukalo-Nikšić T (2003). Ekspresija gena za elemente serotonergične sinapse u mozgu štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom. Magistarski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Bordukalo-Nikšić T (2007) Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR). U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović-Ristov A (ur.), Institut Ruđer Bošković, 380-383

Bordukalo-Nikšić T, Čičin-Šain L, Jernej B (2004) Expression of brain and platelet serotonin transporter in rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. Neuroscience Letters 369: 44-49

Bouwknecht JA, van der Gugten J, Hijzen T, Maes RAA, Hen R, Olivier B (2001a) Corticosterone responses in 5-HT_{1B} receptor knockout mice to stress or 5-HT_{1A} receptor activation are normal. Psychopharmacology 153:484-490

Bouwknecht JA, Hijzen TH, van der Gugten J, Maes RAA, Hen R, Olivier B (2001b) Absence of 5-HT_{1B} receptors is associated with impaired impulse control in male 5-HT_{1B} knockout mice. Biological Psychiatry 49:557-568

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72:248-254

Brady KT, Sonne SC (1999) The role of stress in alcohol use, alcoholism treatment, and relapse. Alcohol Research & Health 23:263-271

Briones-Aranda A, Rocha L, Picazo O (2005) Influence of forced swimming stress on 5-HT_{1A} receptors and serotonin levels in mouse brain. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 29:275-281

Buckland PR (2001) Genetic association studies of alcoholism – problems with the candidate gene approach. Alcohol & Alcoholism 36:99-103

Burnet PWJ, Mefford IN, Smith CC, Gold PW, Sternberg EM (1992) Hippocampal 8-[^{3}H] hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin binding site densities, serotonin receptor (5-HT_{1A}) messenger ribonucleic acid abundance, and serotonin levels parallel the activity of the hypothalamopituitary-adrenal axis in rat. Journal of Neurochemistry 59:1062-1070

Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate – polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Analytical Biochemistry 112:195-203

Bylund DB, Toews ML (1993) Radioligand binding methods: practical guide and tips. American Journal of Physiology (Lung and Cellular Molecular Physiology) 265:L421-L429

Carli M, Afkhami-Dastjerdian S, Reader TA (1996) [^{3}H]8-OH-DPAT binding and serotonin content in rat cerebral cortex after acute fluoxetine, desipramine, or pargyline. Journal of Psychiatry and Neuroscience 21:114-122

Celada P, Adell A, Artigas F (2006) Modulation of the neuronal activity and neurotransmitter release by 5-HT_{1A} and 5-$HT_{1B/1D}$ receptors. U: The Serotonin Receptors, Roth BL (ur.), Humana Press, 365-401

Celada P, Puig V, Amargos-Bosch M, Adell A, Artigas F. (2004) The therapeutic role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} receptors in depression. Journal of Psychiatry and Neuroscience 29:252-265

Chalmers DT, Watson SJ (1991) Comparative anatomical distribution of 5-HT_{1A} receptor mRNA and 5-HT_{1A} binding in rat brain – a combined in situ hybridisation/in vitro receptor autoradiographic study. Brain Research 561:51-60

Chaouloff F (1999) Serotonin and stress. Neuropsychopharmacology 21:28S-32S

Chaouloff F, Berton O, Aquerre S, Hay M, Mormede P (1997) Effects of food deprivation on midbrain 5-HT_{1A} autoreceptors in Lewis and SHR rats. Neuropharmacology 36:483-488

Chomczynski S, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlorophorm extraction. Analytical Biochemistry 162:156-159

Ciccocioppo R, Angeletti S, Colombo G, Gessa G, Massi M (1999) Autoradiographic analysis of 5-HT_{2A} binding sites in the brain of Sardinian alcohol-preferring and nonpreferring rats. European Journal of Pharmacology 373:13-19

Clark MS, Neumaier JF (2001) The 5-HT_{1B} receptor: behavioral implications. Psychopharmacology Bulletin 35:170-185

Clark MS, Sexton TJ, McClain M, Root D, Kohen R, Neumaier JF (2002) Overexpression of 5-HT1B receptor in dorsal raphe nucleus using herpes simplex virus gene transfer increases anxiety behavior after inescapable stress. Journal of Neuroscience 22:4550-4562

Clark MS, Vincow ES, Sexton TJ, Neumaier JF (2004) Increased expression of 5-HT_{1B} receptor in dorsal raphe nucleus decreases fear-potentiated startle in a stress dependent manner. Brain Research 1007:86-97

Clarke WP, Yocca FD, Maayani S (1996) Lack of 5-hydroxytryptamine1A-mediated inhibition of adenylyl cyclase in dorsal raphe of male and female rats. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 277:1259-1266

Cloninger CR (1987) Neurogenetic adaptive mechanisms in alcoholism. Science 236:410-416

Cloninger CR, Bohman M, Sigvardsson S (1981) Inheritance of alcohol abuse: cross-fostering analysis of adopted men. Archives of General Psychiatry 38:861-868

Collier DA, Arranz MJ, Li T, Mupita D, Brown N, Treasure J (1997) Association between 5-HT_{2A} gene promoter polymorphism and anorexia nervosa. Lancet 350:412

Crabbe JC, Phillips TJ, Buck KJ, Cunningham CL, Belknap JK (1999) Identifying genes for alcohol and drug sensitivity: recent progress and future directions. Trends in Neuroscience 22:173-179

Crabbe JC, Phillips TJ, Feller DJ, Hen R, Wenger CD, Lessov CN, Schafer GL (1996) Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. Nature Genetics 14:98-101

Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2004) Wistar Zagreb 5HT rat: a new animal model of alcoholism. 2nd Croatian Conference on Alcoholism and other Addictions and 6th Alpe-Adria Conference on Alcoholism

Čičin-Šain L, Fröbe A, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B. (2005) Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. Life Sciences 77: 452-461

Čičin-Šain L, Fröbe A, Jernej B (1998) Physiological characteristics of serotonin transporters on rat platelets. Comparative Biochemistry and Physiology Part A 120:723-729

Čičin-Šain L, Jernej B (2008) Wistar-Zagreb 5HT rats: A rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter. U: AV Kalueff (ur) Experimental models in serotonin transporter research, Cambridge University Press (u tisku)

Čičin-Šain L, Matošić A, Mokrović G, Balija M, Marušić S, Jernej B (2007) Platelet monoamine oxidase kinetics, alcoholism subtypes and cigarette smoking. Neuropsychobiology 56:138-145

Davidson JRT, Stein DJ, Shalev AY, Yehuda R (2004) Posttraumatic stress disorder: acquisition, recognition, course, and treatment. Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences 16:135-147

Davies MA, Chang CY, Roth BL (2006) Polymorphic and posttranscriptional modifications of 5-HT receptor structure. U: The Serotonin Receptors, Roth BL (ur.), Humana Press, 59-90

De Kloet ER, Joëls M, Holsboer F (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. Nature Reviews Neuroscience 6:463-475

Del Tredici AL, Schiffer HH, Burstein ES, Lameh J, Mohell N, Hacksell U, Brann MR, Weiner DM (2004) Pharmacology of polymorphic variants of the human 5-HT_{1A} receptor. Biochemical Pharmacology 67:479-490

Deupree JD, Bylund DB (2002) Basic principles and techniques for receptor binding. Tocris Reviews No. 18

Duan J, Sanders AR, Vander Molen JE, Mrtinolich L, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV (2003) Polymorphisms in the 5'-untranslated region of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene affect gene expression. Molecular Psychiatry 8:901-910

Dwivedi Y, Mondal AC, Payappagoudar GV, Rizavi HS (2005) Differential regulation of serotonin $(5HT)_{2A}$ receptor mRNA and protein levels after single and repeated stress in rat brain: role in learned helplessness behavior. Neuropharmacology 48:204-214

Enoch MA (2006) Genetic and environmental influences on the development of alcoholism. Annals of New York Academy of Sciences 1094:193-201

Fabre V, Beaufour C, Evrard A, Rioux A, Hanoun N, Lesch KP, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP (2000a) Altered expression and functions of serotonin 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter. European Journal of Neuroscience 12:2299-2310

Fabre V, Boutrel B, Hanoun N, Lanfumey L, Fattaccini CM, Demeneix B, Adrien J, Hamon M, Martres MP (2000b) Homeostatic regulation of serotonergic function by the serotonin transporter as revealed by nonviral gene transfer. Journal of Neuroscience 20:5065-5075

Fehr C, Grintschuk N, Szegedi A, Anghelescu I, Klawe C, Singer P, Hiemke C, Dahmen N (2000) The HTR1B 861G>C receptor polymorphism among patients suffering from alcoholism, major depression, anxiety disorders and narcolepsy. Psychiatry Research 97:1-10

Fehr C, Schleicher A, Szegedi A, Anghelescu I, Klawe C, Hiemke C, Dahmen N (2001) Serotonergic polymorphisms in patients suffering from alcoholism, anxiety disorders and narcolepsy. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 25:965-982

Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF (1997) Serotonin. U: Principles of Neuropsychopharmacology, Sinauer Associates, 345-379

Fink KB, Göthert M (2007) 5-HT receptor regulation of neurotransmitter release. Pharmacological Reviews 59:360-417

Flügge G (1995) Dynamics of central nervous 5-HT_{1A}-receptors under psychosocial stress. Journal of Neuroscience 15:7132-7140

Flügge G, van Kampen M, Janneke Mijnster M (2004) Perturbations in brain monoamine systems during stress. Cell and Tissue Research 315:1-14

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999) Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. Biotechniques 26:112-125

Fröbe A (2006) Serotoninski (5HT-2) receptor i njegov glasnički sustav: istraživanja receptorske kinetike i unutarstaničnog kalcija u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina. Doktorska disertacija, Zagreb: Medicinski fakultet

Fröbe A, Čičin-Šain L, Reiner E, Banović M, Jernej B (1995) Methodological considerations on kinetic measurements of serotonin transport into rat platelets. Periodicum Biologorum 97:217-222

Gaddum JH, Picarelli ZP (1957) Two kinds of tryptamine receptor. British Journal of Pharmacology 912:323-328

Gaspar P, Cases O, Maroteaux L (2003) The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. Nature Reviews Neuroscience 4:1002-1012

Gingrich JA, Hen R. (2001) Dissecting the role of the serotonin system in neuropsychiatric disorders using knockout mice. Psychopharmacology 155: 1-10

Gorwood P, Aissi F, Batel P, Ades J, Cohen-Salmon C, Hamon M, Boni C, Lanfumey L (2002) Reappraisal of the serotonin 5-HT_{1B} receptor gene in alcoholism: of mice and men. Brain Research Bulletin 57:103-107

Gorwood P, Lanfumey L, Hamon M (2004) Polymorphismes géniques de marqueurs sérotoninergiques et alcoolodépendance. Medecine/Sciences 20:1132-1138

Gozlan H, El Mestikawi S, Pichat L, Glowinski J, Hamon M (1983) Identification of presynaptic serotonin autoreceptor using a new ligand ^{3}H-PAT. Nature 305:140-142

Green AR (2006) Neuropharmacology fo 5-hydroxytryptamine. British Journal of Pharmacology 147:S145-S152

Gregus A, Wintink AJ, Davis AC, Kalynchuk LE (2005) Effect of repeated corticosterone injections and restraint stress on anxiety and depression-like behavior in male rats. Behavioural Brain Research 156:105-114

Groenink L, van Bogaert MJV, van der Gugten J, Oosting RS, Olivier B (2003) 5-HT_{1A} receptor and 5-HT_{1B} receptor knockout mice in stress and anxiety paradigms. Behavioural Pharmacology 14:369-383

Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R (2002) $Serotonin_{1A}$ receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. Nature 416:396-400

Harvey BH, Naciti C, Brand L, Stein DJ (2003) Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical $5HT_{1A/2A}$ receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (TDS) stress model in rats. Brain Research 983:97-107

Hasegawa Y, Higuchi S, Matsushita S, Miyaoka H (2002) Association of a polymorphism of the serotonin 1B receptor gene and alcohol dependence with inactive aldehyde dehydrogenase-2. Journal of Neural Transmission 109:513-521

Heim C, Nemeroff CB (2001) The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. Biological Psychiatry 49:1023-1039

Hensler JG (2003) Regulation of 5-HT_{1A} receptor function in brain following agonist or antidepressant administration. Life Sciences 72:1665-1682

Higley JD, Bennett AJ (1999) Central nervous system serotonin and personality as variables contributing to excessive alcohol consumption in non-human primates. Alcohol & Alcoholism 34:402-418

Higley JD, Suomi SJ, Linnoila M (1996) A nonhuman primate model of type II excessive alcohol consumption? Part 1. Low cerebrospinal fluid 5-hydroxyindoleacetic acid concentrations and diminished social competence correlate with excessive alcohol consumption. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 20:629-642

Hill SY (1998) Alternative strategies for uncovering genes contributing to alcoholism risk: unpredictable findings in a genetic wonderland. Alcohol 16:53-59

Hirano K, Seki T, Sakai N, Kato Y, Hashimoto H, Uchida S, Yamada S (2005) Effects of continuous administration of paroxetine on ligand binding site and expression of serotonin transporter protein in mouse brain. Brain Research 1053:154-161

Holmes A, Yang RJ, Lesch KP, Crawley JN, Murphy DL (2003) Mice lacking the serotonin transporter exhibit 5-HT_{1A} receptor-mediated abnormalities in tests for anxiety-like behavior. Neuropsychopharmacology 28:2077-2088

Homberg JR, Olivier JDA, Smits BMG, Mul JD, Mudde J, Verheul M, Nieuwenhuizen OFM, Cools AR, Ronken E, Cremers T, Schoffelmeer ANM, Ellenbroek BA, Cuppen E (2007) Characterization of the serotonin transporter knockout rat: a selective change in the functioning of the serotonergic system. Neuroscience 146:1662-1676

Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002) Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. Pharmacology Biochemistry and Behavior 71:533-554

Hranilović D (2000) Struktura i ekspresija gena za serotoninski prijenosnik u uvjetima promijenjene homeostaze serotonina.Doktorska disertacija, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Hranilović D (2007) Izdvajanje RNA iz animalnih stanica i tkiva. U: Metode u molekularnoj biologiji, Ambriović-Ristov A (ur.), Institut Ruđer Bošković, 242-243

Hranilović D, Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2005) Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: differences in anxiety-related behavior. Behavioural Brain Research 165: 271-277

Hranilović D, Herak-Kramberger CM, Čičin-Šain L, Sabolić I, Jernej B (2001) Serotonin transporter in rat platelets: level of protein expression underlies inherited differences in uptake kinetics. Life Sciences 69:59-65

Huang Y, Oquendo MA, Harkavy Friedman JM, Greenhill LL, Brodsky B, Malone KM, Khait V, Mann JJ (2003) Substance abuse disorder and major depression are associated with the human 5-HT_{1B} receptor gene (HTR1B) G861C polymorphism. Neuropsychopharmacology 28:163-169

Huang Y, Grailhe R, Arango V, Hen R, Mann JJ (1999) Relationship of psychopathology to the human serotonin$_{1B}$ genotype and receptor binding kinetics in postmortem brain tissue. Neuropsychopharmacology 21:238-246

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes and Immunity, doi:10.1038/sj.gene.6364190

Hwu HG, Chen CH (2000) Association of 5HT2A receptor gene polymorphism and alcohol abuse with behavior problems. American Journal of Medical Genetics 96:797-800

Jacobs BL, Azmitia EC (1992) Structure and function of the brain serotonin system. Physiological Reviews 72:165-229

Jennings KA, Loder MK, Sheward WJ, Pei Q, Deacon RMJ, Benson MA, Olverman HJ, Hastie ND, Harmar AJ, Shen S, Sharp T (2006) Increased expression of the 5-HT transporter confers a low-anxiety phenotype linked to decreased 5-HT transmision. Journal of Neuroscience 26:8955-8964

Jernej B, Čičin-Šain L (1990) Platelet serotonin level in rats is under genetic control. Psychiatry Research 32:167-174

Jernej B, Čičin-Šain L, Iskrić S (1988) A simple and reliable method for monitoring platelet serotonin levels in rats. Life Sciences 43:1663-1670

Jernej B, Fröbe A, Hranilović D, Čičin-Šain L (1999a) Platelet serotonin transporter: *ex vivo* monitoring of kinetic parameters in the individual rat. Neuroscience Research Communications 24:163-171

Jernej B, Hranilović D, Čičin-Šain L (1999b) Serotonin transporter on rat platelets: levels of mRNA underlie inherited differences in uptake kinetics. Neurochemistry International 33:519-523

Jovanovic H, Lundberg J, Karlsson P, Cerin A, Saijo T, Varrone A, Halldin C, Nordström AL (2008) Sex differences in the serotonin 1A receptor and serotonin transporter binding in the human brain measured by PET. NeuroImage 39:1408-1419

Kaiyala KJ, Vincow ES, Sexton TJ, Neumaier JF (2003) 5-HT_{1B} receptor mRNA levels in dorsal raphe nucleus: inverse association with anxiety behavior in the elevated plus maze. Pharmacology Biochemistry and Behavior 75:769-776

Kalluri HSG, Mehta AK, Ticku MK (1998) Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. Molecular Brain Research 58:221-224

Kalueff AV, Fox MA, Gallagher PS, Murphy DL (2007) Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. Genes, Brain and Behavior 6:389-400

Kalueff AV, LaPorte JL, Murphy DL (2008) Perspectives on genetic animal model of serotonin toxicity. Neurochemistry International 52:649-658
Kalynchuk LE, Pinel JPJ, Meaney MJ (2006) Serotonin receptor binding and mRNA expression in the hippocampus of fearful amygdala-kindled rats. Neuroscience Letters 396:38-43

Katagiri H, Kagaya A, Nakae S, Morinobu S, Yamawaki S (2001) Modulation of serotonin2A receptor function in rats after repeated treatment with dexamethasone and L-type calcium channel antagonist nimodipine. Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry 25:1269-1281

Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ (1981) Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression. Neuroscience & Biobehavioral Reviews 5:247-251

Kessler RC (2003) Epidemiology of women and depression. Journal of Affective Disorders 74:5-13

Koob GF (2003) Alcoholism: allostasis and beyond. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 27:232-243

Kreek MJ, Koob GF (1998) Drug dependence: stress and dysregulation of brain reward pathways. Drug and Alcohol Dependence 51:23-47

Kulikov A, Castanon N, Mormede P, Chaouloff F (1995) Cerebral tryptophan hydroxylase activity, and 5-HT_{1A} receptor, 5-HT_{2A} receptor, and 5-HT transporter binding in grouped and isolated Roman RHA and RLA rats: relationships with behaviours in two models of anxiety. Psychopharmacology 121:385-395

Kulikov AV, Naumenko VS, Voronova IP, Tikhonova MA, Popova NK (2005) Quantitative RT-PCR assay of 5-HT_{1A} and 5-HT_{2A} serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard. Journal of Neuroscience Methods 141:97-101

Kusserow H, Davies B, Hörtnagl H, Voigt I, Stroh T, Bert B, Deng DR, Fink H, Veh RW, Theuring FT (2004) Reduced anxiety-related behaviour in transgenic mice overexpressing serotonin$_{1A}$ receptors. Molecular Brain Research 129:104-116

Laaris N, Le Poul E, Laporte AM, Hamon M, Lanfumey L (1999) Differential effects of stress on presynaptic and postsynaptic 5-hydroxytryptamine-1A receptors in the rat brain: an in vitro electrophysiological study. Neuroscience 91:947-958

Lanfumey L, Hamon M (2004) 5-HT_1 receptors. Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders 3:1-10

Lanfumey L, Pardon MC, Laaris N, Joubert C, Hanoun N, Hamon M, Cohen-Salmon C (1999) 5-HT_{1A} autoreceptor desensitization by chronic ultramild stress in mice. Neuroreport 10:3369-3374

Lappalainen J, Long JC, Eggert M, Ozaki N, Robin RRW, Brown GL, Naukkarinen H, Virkkunen M, Linnoila M, Goldman D (1998) Linkage of antisocial alcoholism to the serotonin 5-HT1B receptor gene in 2 populations. Archives of General Psychiatry 55:989-994

Lauder JM (1995) Ontogeny of neurotransmitter systems: substrates for developmental disabilities? Mendal Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews 1:151-168

LeMarquand D, Pihl RO, Benkelfat C (1994) Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies. Biological Psychiatry 36:395-421

Lemonde S, Turecki G, Bakish D, Du L, Hrdina PD, Bown CD, Sequeira A, Kushwaha N, Morris SJ, Basak A, Ou XM, Albert PR (2003) Impaired repression at a 5-hydroxytryptamine 1A receptor gene polymorphism associated with major depression and suicide. Journal of Neuroscience 23:8788-8799

Le Poul E, Boni C, Hanoun N, Laporte AM, Laaris N, Chauveau J, Hamon M, Lanfumey L (2000) Differential adaptation of brain 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. Neuropharmacology 39:110-122

Lesch KP (2005) Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: is serotonin the link? European Journal of Pharmacology 526:113-124

Lesch KP, Wolozin B, Murphy DL, Riederer P (1993) Primary structure of the human platelet serotonin uptake site: identity with the brain serotonin transporter. Journal of Neurochemistry 60:2319-2322

Leysen JE (2004) 5-HT_2 receptors. Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders 3:11-26

Li Q, Wichems C, Heils A, Lesch KP, Murphy DL (2000) Reduction in the density and expression, but not G-protein coupling, of serotonin receptors (5-HT_{1A}) in 5-HT transporter knock-out mice: gender and brain region differences. Journal of Neuroscience 20:7888-7895

Li Q, Wichems C, Heils A, Van de Kar L, Lesch KP, Murphy DL (1999) Reduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT)$_{1A}$-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT_{1A} binding sites in 5-HT transporter knockou mice. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 291:999-1007

Li Q, Wichems C, Ma L, Van de Kar L, Garcia F, Murphy DL (2003) Brain region-specific alterations of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors in serotonin transporter knockout mice. Journal of Neurochemistry 84:1256-1265

Lichtermann D, Hranilović D, Trixler M, Franke P, Jernej B, Delmo CD, Knapp M, Schwab SG, Maier W, Wildenauer DB (2000) Support for allelic association of a polymorphic site in the promoter region of the serotonin transporter gene with risk for alcohol dependence. American Journal of Psychiatry 157:2045-2047

Linthorst ACE, Flachskamm C, Barden N, Holsboer F, Reul JMHM (2000) Glucocorticoid receptor impairment alters CNS responses to a psychological stressor: an in vivo microdialysis study in transgenic mice. European Journal of Neuroscience 12:283-291

Linthorst ACE, Penalva RG, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JMHM (2002) Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. European Journal of Neuroscience 16:2441-2452

Linthorst ACE, Reul JMHM (2007) Stress and the brain: solving the puzzle using microdialysis. Pharmacology Biochemistry and Behavior doi:10.1016/j.pbb.2007.09.019

Liu XY, Wu SX, Wang YY, Wang W, Zhou L, Li YQ (2005) Changes of 5-HT receptor subtype mRNAs in rat dorsal root ganglion by bee venom-induced inflammatory pain. Neuroscience Letters 375:42-46

Lopez JF, Chalmers DT, Little KY, Watson SJ (1998) Regulation of serotonin$_{1A}$, glucocorticoid, and mineralocorticoid receptor in rat and human hippocampus: implications for the neurobiology of depression. Biological Psychiatry 43:547-573

Lopez JF, Liberzon I, Vazquez DM, Young EM, Watson SJ (1999) Serotonin 1A receptor messenger RNA regulation in the hippocampus after acute stress. Biological Psychiatry 45:934-937

Lucki I (1998) The spectrum of behaviors influenced by serotonin. Biological Psychiatry 44:151-162

Luna-Munguía H, Manuel-Apolinar L, Rocha L, Meneses A (2005) 5-HT$_{1A}$ receptor expression during memory formation. Psychopharmacology 181:309-318

Lund A, Mjellem N (1993) Chronic, combined treatment with desipramine and mianserin: enhanced 5-HT$_{1A}$ receptor function and alteres 5-HT$_{1A}$/5-HT$_2$ receptor interaction in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 45:777-783

Malleret G, Hen R, Guillou JL, Segu L, Buhot MC (1999) 5-HT1B receptor knock-out mice exhibit increased exploratory activity and enhanced spatial memory performance in the Morris water maze. Journal of Neuroscience 19:6157-6166

Mannoury la Cour C, Boni C, Hanoun N, Lesch KP, Hamon M, Lanfumey L (2001) Functional consequences of 5-HT transporter gene disruption on 5-HT$_{1A}$ receptor-mediated regulation of dorsal raphe and hippocampal cell activity. Journal of Neuroscience 21:2178-2185

Mashoodh R, Wright LD, Hebert K, Perrot-Sinal TS (2008) Investigation of sex differences in behavioural, endocrine, and neural measures following repeated psychological stressor exposure. Behavioural Brain Research 188:368-379

Mathews TA, Fedele DE, Coppelli FM, Avila AM, Murphy DL, Andrews AM (2004) Gene dose-dependent alteration in extraneuronal serotonin but not dopamine in mice with reduced serotonin transporter expression. Journal of Neuroscience Methods 140:169-181

McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. Behavioral Brain Research 101:129-152

McKittrick CR, Blanchard DC, Blanchard RJ, McEwen BS, Sakai RR (1995) Serotonin receptor binding in a colony model of chronic social stress. Biological Psychiatry 37:376-382

Meijer OC, de Kloet ER (1994) Corticosterone suppresses the expression of 5-HT$_{1A}$ receptor mRNA in rat dentate gyrus. European Journal of Pharmacology 266:255-261

Meneses A, Perez-Garcia G (2007) 5-HT$_{1A}$ receptors and memory. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 31:705-727

Mokrović G (2007) Serotonin i alkohol: istraživanja na modelu štakora s promijenjenom serotonergičnom homeostazom. Magistarski rad, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Mokrović G, Matošić A, Hranilović D, Štefulj J, Novokmet M, Orešković D, Balija M, Marušić S, Čičin-Šain L (2008) Alcohol dependence and polymorphisms of serotonin-related genes: association studies. Collegium Antropologicum 32 (Suppl. 1): 127-131

Moret C, Briley M (2000) The possible role of 5-HT$_{1B/D}$ receptors in psychiatric disorders and their potential as a target for therapy. European Journal of Pharmacology 404:1-12

Müller CP, Carey RJ, Huston JP, De Souza Silva MA (2007) Serotonin and psychostimulant addiction: focus on 5-HT_{1A}-receptors. Progress in Neurobiology 81:133-178

Myers RL, Airey DC, Manier H, Shelton RC, Sanders-Bush E (2007) Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT_{2A} receptor gene (HTR2A) influence gene expression. Biological Psychiatry 61:167-173

Myers RD, Lanford MF, Björk A (1993) 5-HT_2 receptor blockade by amperozide suppresses ethanol drinking in genetically preferring rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 45:741-747

Nakamura K, Kikushui T, Takeuchi Y, Mori Y (2008) Changes in social instigation- and food restriction-induced aggresive behaviors and hippocampal 5HT1B mRNA receptor expression in male mice from early weaning. Behavioural Brain Research 187:442-448

Nakamura T, Matsushita S, Nishiguchi N, Kimura M, Yoshino A, Higuchi S (1999) Association of a polymorphism of the 5HT2A receptor gene promoter region with alcohol dependence. Molecular Psychiatry 4:85-88

Neumaier JF, Edwards E, Plotsky PM (2002) 5-HT_{1B} mRNA regulation in two animal models of altered stress reactivity. Biological Psychiatry 51:902-908

Neumaier JF, Petty F, Kramer GL, Szot P, Hamblin MW (1997) Learned helplessness increases 5-hydroxytryptamine$_{1B}$ receptor mRNA levels in the rat dorsal raphe nucleus. Biological Psychiatry 41:668-674

Neumaier JF, Sexton TJ, Hamblin MW, Beck SG (2000) Corticosteroids regulate 5-HT_{1A} but not 5-HT_{1B} receptor mRNA in rat hippocampus. Molecular Brain Research 82:65-73

Neumaister A, Young T, Stastny J (2004) Implications of genetic research on the role of the serotonin in depression: emphasis on the serotonin type 1_A receptor and the serotonin transporter. Psychopharmacology 174:512-524

Nevo I, Langlois X, Laporte AM, Kleven M, Koek W, Lima L, Maudhuit C, Martres MP, Hamon M (1995) Chronic alcoholization alters the expression of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptor subtypes in rat brain. European Journal of Pharmacology 281:229-239

Newman ME, Shalom G, Ran A, Gur E, Van de Kar LD (2004) Chronic fluoxetine-induced desensitization of 5-HT1A and 5-HT1B autoreceptors: regional differences and effects of WAY-100635. European Journal of Pharmacology 486:25-30

Nishizawa S, Benkelfat C, Young SN, Leyton M, Mzengeza S, De Montigny C, Blier P, Diksic M (1997) Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. Proceedings of National Academy of Sciences USA 94:5308-5313

Nowak KL, Ingraham CM, McKinzie DL, McBride WJ, Lumeng L, Li TK, Murphy JM (2000) An assesment of novelty-seeking behavior in alcohol-preferring and nonpreferring rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 66:113-121.

Nutt D (1999) Alcohol and brain. British Journal of Psychiatry 175:114-119

Olivier B, van Oorschot R (2005) 5-HT_{1B} receptors and aggression: a review. European Journal of Pharmacology 526:207-217

Ossowska G, Nowak G, Kata R, Klenk-Majewska B, Danilczuk Z, Żebrowska-Łupina I (2001) Brain monoamine receptors in a chronic unpredictable stress model in rats. Journal of Neural Transmission 108:311-319

Österlund MK, Halldin C, Hurd YL (2000) Effects of chronic 17β-estradiol treatment on the serotonin 5-HT_{1A} receptor mRNA and binding levels in the rat brain. Synapse 35:39-44

Ota M, Nakashima A, Mori K, Hamanaka T, Ota A (1999) Risperidone, an atypical antipsychotic, affects the mRNA expressions of monoamine oxidase type B and vesicular monoamine transporter-2 in rat brain. Biogenic Amines 15:197-216

Ou XM, Jafar-Nejad H, Storring JM, Meng JH, Lemonde S, Albert PR (2000) Novel dual repressor elements for neuronal cell-specific transcription of the rat 5-HT1A receptor gene. Journal of Biological Chemistry 275:8161-8168

Papp M, Moryl E, Willner P (1996) Pharmacological validation of the chronic mild stress model of depression. European Journal of Pharmacology 296:129-136

Parsian A, Cloninger CR (2001) Serotonergic pathway genes and subtypes of alcoholism: association studies. Psychiatric Genetics 11:89-94

Parsons MJ, D'Souza UM, Arranz MJ, Kerwin RW, Makoff AJ (2004) The -1438A/G polymorphism in the 5-hydroxytryptamine type 2A receptor gene affects promoter activity. Biological Psychiatry 56:406-410

Pecins-Thompson M, Brown NA, Bethea CL (1998) Regulation of serotonin re-uptake transporter mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. Molecular Brain Research 53:120-129

Pierce PA, Xie GX, Levine JD, Peroutka SJ (1996) 5-hydroxytryptamine receptor subtype messenger RNAs in rat peripheral sensory and symphatetic ganglia: a polymerase chain reaction study. Neuroscience 70:553-559

Pineyro G, Blier P. (1999) Autoregulation of serotonin neurons: role in antidepressant drug action. Pharmacological Reviews 51: 534-579

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. (1992) Distribution and cellular localization of mRNA coding for 5-HT_{1A} receptor in the rat brain: correlation with receptor binding. Journal of Neuroscience 12: 440-453

Pompeiano M, Palacios JM, Mengod G. (1994) Distribution of the serotonin 5-HT_2 receptor family mRNAs: comparison between 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors. Molecular Brain Research 23: 163-178

Popova NK (2006) From genes to aggressive behavior: the role of serotonergic system. BioEssays 28:495-503

Popova NK, Avgustinovich DF, Kolpakov VG, Plyusnina IZ (1998) Specific [^{3}H]8-OH-DPAT binding in brain regions of rats genetically predisposed to various defense behavior strategies. Pharmacology Biochemistry and Behavior 59:793-797

Popova NK, Naumenko VS, Plyusnina IZ (2007) Involvement of brain serotonin 5-HT_{1A} receptors in genetic predisposition to aggressive behavior. Neuroscience and Behavioral Physiology 37:631-635

Popova NK, Naumenko VS, Plyusnina IZ, Kulikov AV (2005) Reduction in 5-HT_{1A} receptor density, 5-HT_{1A} mRNA expression, and functional correlates for 5-HT_{1A} receptors in genetically defined aggresive rats. Journal of Neuroscience Research 80:286-292

Pou C, Nénonéné EK, Reader TA, Fargin A (1997) The human 5-HT_{1A} receptor: comparison of its binding properties in transfected cells and cortical tissue. General Pharmacology 29:737-747

Preuss UW, Koller G, Bondy B, Bahlmann M, Soyka M (2001) Impulsive traits and 5-HT2A receptor promoter polymorphism in alcohol dependents: possible association but no influence of personality disorders. Neuropsychobiology 43:186-191

Proudnikov D, LaForge KS, Hofflich H, Levenstien M, Gordon D, Barral S, Ott J, Kreek MJ (2006) Association analysis of polymorphisms in serotonin 1B receptor (HTR1B) gene with heroin addiction: a comparison of molecular and statistically estimated haplotypes. Pharmacogenetics and Genomics 16:25-36

Pucadyil TJ, Kalipatnapu S, Chattopadhyay A (2005) The serotonin$_{1A}$ receptor: a representative member of the serotonin receptor family. Cellular and Molecular Neurobiology 25:553-580

Quevedo G, Moscoso O, Prado-Moreno A, Čičin-Šain L, Jernej B, Delgado-Garcia JM (2002) Behavioral and molecular studies in rats over-expressing and under-expressing serotonin transporter. COST B10 Meeting, Trinity College, Dublin, Ireland

Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. (2001) Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. Pharmacology & Therapeutics 92:179-212

Ricca V, Nacmias B, Cellini E, Di Bernardo M, Rotella CM, Sorbi S (2002) 5-HT_{2A} receptor gene polymorphism and eating disorders. Neuroscience Letters 323:105-108

Rioux A, Fabre V, Lesch KP, Moessner R, Murphy DL, Lanfumey L, Hamon M, Martres MP (1999) Adaptive changes of serotonin 5-HT_{2A} receptors in mice lacking the serotonin transporter. Neuroscience Letters 262:113-116

Romero L, Jernej B, Bel N, Čičin-Šain L, Cortes R, Artigas F (1998) Basal and stimulated extracellular serotonin concentration in the brain of rats with altered serotonin uptake. Synapse 28:313-321

Roth BL, Berry SA, Kroeze WK, Willins DL, Kristiansen K (1998) Serotonin 5-HT_{2A} receptors: molecular biology and mechanisms of regulation. Critical Reviews in Neurobiology 12:319-338

Rutz S, Riegert C, Rothmaier AK, Buhot MC, Cassel JC, Jackisch R (2006) Presynaptic serotonergic modulation of 5-HT and acetylcholine release in the hippocampus and the cortex of 5-HT_{1B}-receptor knockout mice. Brain Research Bulletin 70:81-93

Saiz PA, Garcia-Portilla MP, Arango C, Morales B, Martinez-Barrondo S, Alvarez C, San Narciso G, Carreño E, Alvarez V, Coto E, Bobes J (2008) Association between heroin dependence and 5-HT_{2A} receptor gene polymorphisms. European Addiction Research 14:47-52

Samson HH, Adron Harris R (1992) Neurobiology of alcohol abuse. Trends in Pharmacological Sciences 13:206-211

Sanders AR, Cao Q, Taylor J, Levin TE, Badner JA, Cravchik A, Comeron JM, Naruya S, Del Rosario A, Salvi DA, Walczyk KA, Mowry BJ, Levinson DF, Crowe RR, Silverman JM, Gejman PV (2001) Genetic diversity of the human serotonin receptor 1B (HTR1B) gene. Genomics 72:1-14

Sanders-Bush E, Hazelwood L (2003) Serotonin 5-HT_2 receptors: molecular and genomic diversity. Molecular Interventions 3:319-330

Sargent PA, Kjaer KH, Bench CJ, Rabiner EA, Messa C, Meyer J, Gunn RN, Grasby PM, Cowen PJ (2000) Brain serotonin$_{1A}$ receptor binding measured by positron emission tomography with [^{11}C]WAY-100635. Archives of General Psychiatry 57:174-180

Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC, Hen R. (1994). Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT1B receptor. Science 265:1875-1878

Sari Y. (2004) Serotonin$_{1B}$ receptors: from protein to physiological function and behavior. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 28:565-582

Schuckit MA, Mazzanti C, Smith TL, Ahmed U, Radel M, Iwata N, Goldman D (1999) Selective genotyping for the role of 5-HT$_{2A}$, 5-HT$_{2C}$, and GABA$_{\alpha 6}$ receptors and the serotonin transporter in the level of response to alcohol: a pilot study. Biological Psychiatry 45:647-651

Sellers EM, Higgins GA, Sobell MB (1992) 5-HT and alcohol abuse. Trends in Pharmacological Sciences 13:69-75

Selye H (1936) A syndrome produced by diverse nocious agents. Nature 138:32

Serretti A, Drago A, De Ronchi D (2007) HTR2A gene variants and psychiatric disorders: a review of current literature and selection of SNPs for future studies. Current Medicinal Chemistry 14:2053-2069

Sibille E, Sarnyai Z, Benjamin D, Gal J, Baker H, Toth M. (1997) Antisense inhibition of 5-hydroxytryptamine$_{2a}$ receptor induces an antidepressant-like effect in mice. Molecular Pharmacology 52:1056-1063

Sinha R, Cloninger CR, Parsian A (2003) Linkage disequilibrium and haplotype analysis between serotonin receptor 1B gene variations and subtypes of alcoholism. American Journal of Medical Genetics B 121:83-88

Soyka M, Preuss UW, Koller G, Zill P, Bondy B (2004) Association of 5-HT1B receptor gene and antisocial behavior in alcoholism. Journal of Neural Transmission 111:101-109

Spurlock G, Heils A, Holmans P, Williams J, D'Souza UM, Cardno A, Murphy KC, Jones L, Buckland PR, McGuffin P, Lesch KP, Owen MJ (1998) A family base association study of T102C polymorphism in 5HT2A and schizophrenia plus identification of new polymorphisms in the promoter. Molecular Psychiatry 3:42-49

Stahl SM (1985) Platelets as pharmacologic models for the receptors and biochemistry of monoaminergic neurons. U: The Platelets: Physiology and Pharmacology, Longenecker GL (ur.), Academic Press, 307-340

Stamatakis A, Mantelas A, Papaioannou A, Pondiki S, Fameli M, Stylianopoulou F (2006) Effect of neonatal handling on serotonin 1A sub-type receptors in the rat hippocampus. Neuroscience 140:1-11

Stark KL, Hen R. (1999) 5-HT$_{1B}$ receptor knockout mice: a review. International Journal of Neuropsychopharmacology 2:145-150

Steciuk M, Kram M, Kramer GL, Petty F (2000) Acute stress does not alter 5-HT1A receptor density. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 24:155-161

Sun HS, Chang Y, Fann CS, Chang C, Chen Y, Hsu Y, Yu W, Cheng AT. (2002) Association study of novel human serotonin 5-HT$_{1B}$ polymorphisms with alcohol dependence in Taiwanese Han. Biological Psychiatry 51:896-901

Štefulj J (2005). Triptofan hidroksilaza: polimorfizam i ekspresija gena u uvjetima promijenjene serotonergične homeostaze. Doktorska disertacija, Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet

Štefulj J, Büttner A, Škavić J, Zill P, Balija M, Eisenmenger W, Bondy B, Jernej B (2004) Serotonin 1B receptor polymorphism in suicide victims: association studies in German and Slavic population. American Journal of Medical Genetics B 127:48-50

Thellin O, Zorzi W, Lakaye B, De Borman B, Coumans B, Hennen G, Grisar T, Igout A, Heinen E (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. Journal of Biotechnology 75:291-295

Toth M. (2003) 5-HT_{1A} receptor knockout mouse as a genetic model of anxiety. European Journal of Pharmacology 463:177-184

Tronche F, Kellendonk C, Kretz O, Gass P, Anlag K, Orban PC, Bock R, Klein R, Schütz G (1999) Disruption of the glucocorticoid receptor gene in the nervous system results in reduced anxiety. Nature Genetics 23:99-103

Tu GC, Israel Y (1995) Alcohol consumption by Orientals in North America is predicted largely by a single gene. Behavior Genetics 25:59-65

Underwood MD, Mann JJ, Huang YY, Arango V (2008) Family history of alcoholism is associated with lower 5-HT_{2A} receptor binding in the prefrontal cortex. Alcoholism: Clinical and Experimental Research 32:593-599

Van Oekelen D, Luyten W, Leysen JE. (2003) 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors and their atypical regulation properties. Life Sciences 72:2429-2449

Van Oekelen D, Megens A, Meert T, Luyten WHML, Leysen JE (2002) Role of 5-HT2 receptors in the tryptamine-induced 5-HT syndrome in rats. Behavioural Pharmacology 13:313-318

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology 3: research0034

Vanhoenacker P, Haegeman G, Leysen JE (2000) 5-HT_7 receptors: current knowledge and future prospects. Trends in Pharmacological Sciences 21:70-77

Vazquez DM, Eskandari R, Zimmer CA, Levine S, Lopez JF (2002) Brain 5-HT receptor system in the stressed infant rat: implications for vulnerability to substance abuse. Psychoneuroendocrinology 27:245-272

Vicentic A, Francis D, Moffett M, Lakatos A, Rogge G, Hubert GW, Harley J, Kuhar MJ (2006) Maternal separation alters serotonergic transporter densities and serotonergic aA receptors in rat brain. Neuroscience 140:355-365

Whitaker-Azmitia PM (2001) Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Brain Research Bulletin 56:479-485

Weisstaub NV, Zhou M, Lira A, Lambe E, Gonzalez-Maeso J, Hornung JP, Sibille E, Underwood M, Itohara S, Dauer WT, Ansorge MS, Morelli E, Mann JJ, Toth M, Aghajanian G, Sealfon SC, Hen R, Gingrich JA (2006) Cortical 5-HT_{2A} receptor signaling modulates anxiety-like behaviors in mice. Science 313:536-540

Williams RB, Marchuk DA, Gadde KM, Barefoot JC, Grichnik K, Helms MJ, Kuhn CM, Lewis JG, Schanberg SM, Stafford-Smith M, Suarez EC, Clary GL, Svenson IK, Siegler IC (2003) Serotonin-related gene polymorphisms and central nervous system serotonin function. Neuropsychopharmacology 28:533-54

Xia Z, Sheffler DJ, Roth BL (2006) 5-HT receptor-associated proteins (FRAPs). U: The Serotonin Receptors, Roth BL (ur.), Humana Press, 257-276

Zhuang X, Gross C, Santarelli L, Compan V, Trillat AC, Hen R (1999) Altered emotional states in knockout mice lacking 5-HT1A or 5-HT1B receptors. Neuropsychopharmacology 21:52S-60S

8. ŽIVOTOPIS

Tatjana Bordukalo Nikšić rođena je 16. prosinca 1975. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu školu i prirodoslovno-matematičku gimnaziju. Studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala je 1994. godine. Diplomirala je 1998. s radom "Istraživanje biološkog učinka diazena", izrađenim u Laboratoriju za genotoksične agense Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Tijekom 1999. godine radila je u istom laboratoriju kao volonter. Od listopada 1999. radi kao znanstveni novak u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Instituta Ruđer Bošković. Iste je godine upisala poslijediplomski studij iz molekularne i stanične biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Magistrirala je 16. lipnja 2003. godine s radom "Ekspresija gena za elemente serotonergične sinapse u mozgu štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom".
Dosad je sudjelovala na tri domaća i jednom međunarodnom kongresu. Koautor je sedam znanstvenih članaka citiranih u *Current Contents* te tri poglavlja u knjizi "Metode u molekularnoj biologiji". Kao predavač sudjeluje je na stručnom tečaju "Metodološki tečajevi u biologiji i medicini". Član je Hrvatskog biološkog društva.

Popis radova:

1. Osmak M, Bordukalo T, Košmrlj J, Kvajo M, Marijanović Z, Eljuga D, Polanc S (1999) Diazenes: modificators of tumor cell resistance to cisplatin. Neoplasma 46: 201-206.

2. Osmak M, Bordukalo T, Jernej B, Košmrlj J, Polanc S (1999) Diazene JK-279: potential anticancer drug. Anti-Cancer Drugs 10:853-859.

3. Osmak M, Bordukalo T, Ambriović-Ristov A, Jernej B, Košmrlj J, Polanc S (2000) Diazenes as modificators of drug-resistance in tumor cells. Neoplasma 47**:**390-395.

4. Bordukalo-Nikšić T, Čičin-Šain L, Jernej B (2004) Expression of brain and platelet serotonin transporters in sublines of rats with constitutionally altered serotonin homeostasis. Neuroscience letters 369:44-49

5. Hranilović D, Čičin-Šain L, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2005) Rats with constitutionally upregulated/downregulated platelet 5HT transporter: Differences in anxiety-related behavior. Behavioural Brain Research 165:271-277

6. Čičin-Šain L, Froebe A, Bordukalo-Nikšić T, Jernej B (2005) Serotonin transporter kinetics in rats selected for extreme values of platelet serotonin level. Life sciences 77:452-461

7. Bordukalo-Nikšić T, Mokrović G, Jernej B, Čičin-Šain L (2008) Expression of 5HT-1A and 5HT-1B receptor genes in brains of Wistar-Zagreb 5HT rats. Collegium Antropologicum 32 (Suppl. 1):37-41