Utjecaj perinatalne primjene tranilcipromina i 5-hidroksitriptofana na ekspresiju gena za triptofan hidroksilazu i monoamin-oksidazu u odraslih štakora

Zlatar, Ivo

Master's thesis / Diplomski rad

2011

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:371354

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

IVO ZLATAR

Utjecaj perinatalne primjene tranilcipromina i 5-hidroksitriptofana na ekspresiju gena za triptofan hidroksilazu i monoamin-oksidazu u odraslih štakora

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, siječanj 2011.

Ovaj diplomski rad, izrađen na Zavodu za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom Prof. dr. sc. Dubravke Hranilović, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja dipl. ing. biologije, smjer molekularna biologija.

Mentorici prof. dr. sc. Dubravki Hranilović, zahvaljujem na ukazanom povjerenju pri dodjeli teme te svesrdnoj pomoći i vođenju kroz rad.

Veliko hvala asistentici Sofiji Blažević za praćenje mog rada, ugodan boravak u laboratoriju, zanimljivim savjetima te velikoj pomoći kod obrade statističkih podataka.

Hvala svim prijateljima i kolegama na podršci i druženju tijekom svih ovih godina.

Posebna hvala mojim roditeljima i sestri na razumijevanju i podršci te velikom strpljenju, dočekavši tako kraj mog studiranja.

Najljepša hvala mojoj Ivani na pažnji, razumijevanju i ogromnoj podršci tijekom svih godina studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Utjecaj perinatalne primjene tranilcipromina i 5-hidroksitriptofana na ekspresiju gena za triptofan hidroksilazu i monoamin-oksidazu u odraslih štakora

Ivo Zlatar
Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Biološki odsjek, Zavod za animalnu fiziologiju
Rooseveltov trg 6, Zagreb

SAŽETAK

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je biološki aktivan amin kojeg nalazimo u mozgu i drugim organima gdje vrši različite fiziološke uloge. 5HT također kontrolira razvoj mozga i vlastitih neurona u prenatalno doba. Promjene u sustavu koji regulira metabolizam i funkciju 5HT mogle bi predstavljati jednu od mogućih bioloških podloga poremećaja ponašanja u koje spada i autizam. Visoka koncentracija serotonina u krvi je jedan od najčešćih fizioloških simptoma u osoba oboljelih od autizma. Smatra se da visoka razina 5HT-a u krvi u doba fetalnog i ranog postnatalnog razvoja može inhibirati rast i razvoj 5HT neurona i tako dovesti do anatomskih i funkcionalnih promjena u mozgu. Kako bi se istražile posljedice visoke razine 5HT u doba prenatalnog razvoja na ekspresiju gena u središnjem i perifernom odjeljku 5HT, jedna skupina štakora je tretirana prekursorom serotonina, 5-hidroksitriptofanom (5HTP, 25 mg/kg), a druga skupina neselektivnim inhibitorom monoamin-oksidaze, tranilcipromin (TCP, 2 mg/kg), od 13. gestacijskog dana do 21. postnatalnog dana života. Kontrolna skupina štakora tretirana je na isti način fiziološkom otopinom. U ovom radu sam istražio utjecaj spomenutih tretmana na ekspresiju gena za triptofan hidroksilazu (Tph 1 i 2) i monoamin-oksidazu (Mao A) u odraslih štakora. Tretmani 5HTP-om i TCP-om nisu uzrokovali statistički značajne promjene u ekspresiji gena za Tph 1 i Mao A u perifernom odjeljku 5HT. U središnjem odjeljku 5HT došlo je do smanjenja metabolizma serotonina i nakon primjene prekursora serotonina (5HTP) i nakon primjene inhibitora monoamin-oksidaze (TCP). Uočio sam značajno sniženu ekspresiju gena za Mao A i indikativno sniženu ekspresiju gena za Tph 2. Rezultati upućuju na zaključak da su perinatalni tretmani 5-hidroksitriptofanom i tranilcipromin doveli do trajnih kompenzatornih promjena u ekspresiji gena za metabolizam serotonina.

(45 stranica, 10 slika, 7 tablica, 40 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)
Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.
Ključne riječi: serotonin, 5-hidroksitriptofan, tranilcipromin, ekspresija gena, hiperserotoninemija
Voditelj: dr. sc. Dubravka Hranilović, prof
Ocjenitelji: dr. sc. Dunja Leljak-Levanić, doc., dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, doc.
Rad prihvaćen: 12. 01. 2011.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Division of Biology

Graduation thesis

The effect of the perinatal treatment with tranylcypromine or 5-hydroxytryptophan at gene expression for tryptophan hydroxylase and monoamine-oxidase in adult rats

Ivo Zlatar
Faculty of Science, University of Zagreb
Division of Biology, Department of Animal Physiology
Rooseveltov trg 6, Zagreb

ABSTRACT

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5HT) is a biologically active amine present both, in the brain and the periphery, where it has different physiological functions. 5HT also regulates brain development and development of its own neurons during prenatal period. Alterations in the system that regulates metabolism and function of 5HT could be one of the possible biological basis of behavioral disordes that include autism. High concentrations of serotonin in blood is one of the most common physiological symptoms in persons with autism. It is assumed that high 5HT concentrations present in blood during fetal and early postnatal development can inhibit growth and development of 5HT neurons and lead to anatomical and functional changes in the brain. In order to examine the effects oh high levels of 5HT during the prenatal development on 5HT-related gene expression in the central and peripheral 5HT compartments, one group of rats was treated with serotonin precursor (5HTP, 25 mg/kg), and another group with non-selective inhibitor of monoamine-oxidase (TCP, 2 mg/kg), from gestational day 13 to postnatal day 21. The control group was treated with saline solution in the same manner. In this study I examined the impact of these treatments on the expression of genes for tryptophan hydroxylase (Tph 1 i 2) and monoamine oxidase (Mao A). Treatments with 5HTP and TCP did not cause statistically significant alterations in gene expression of Tph 1 and Mao A in the periphery. In the central compartment I observed decreased serotonin metabolism in the group treated with serotonin precursor (5HTP) and in the group treated with monoamine-oxidase inhibitor (TCP). I detected a significant decrease in *Mao A* gene expression and indicative decrease in *Tph 2* gene expression.

The results suggest that the perinatal treatments with 5-hydroxytriptophan and tranylcypromine have induced long-lasting compensatory changes in the expression of genes involved in 5HT metabolism.

(45 pages, 10 figures, 7 tables, 40 references, original in: Croatian)
Thesis deposited in Central biological library.
Key words: serotonin, 5-hydroxytryptophan, tranylcipromine, gene expression, hyperserotonemia
Supervisor: Dr. Dubravka Hranilović, Prof.
Reviewers: Dr. Dunja Leljak-Levanić, Asst. Prof., Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Asst. Prof.
Thesis accepted: 12. 01. 2011.

POPIS KRATICA

5-HIAA	5-hidroksiindoloctena kiselina
5-HT	5-hidroksitriptamin
5-HTt	serotoninski transporter
5-HTP	5-hidroksitriptofan
ACTB	β-aktin
ASD	spektar autističnih poremećaja (engl. *autism spectar disorder*)
MAO A	monoamin-oksidaza A
MAO B	monoamin-oksidaza B
PCR	lančana reakcija polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*)
TCP	tranilcipromin
TPH 1	triptofan hidroksilaza 1
TPH 2	triptofan hidroksilaza 2

Sadržaj

1 UVOD ... 1
1.1 SEROTONIN ... 2
1.1.1 Serotoninski sustav u mozgu ... 4
1.1.2 Periferni serotoninski odjeljak ... 6
1.1.3 Povezanost središnjeg i perifernog serotoninskog sustava ... 7
1.2 METABOLIZAM SEROTONINA ... 8
1.2.1 Triptofan hidroksilaza ... 8
1.2.2 Monoamin-oksidaza ... 9
1.3 HIPERSEROTONINEMIJA I AUTIZAM ... 10
1.4 KVANTITATIVNA LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (QRT-PCR) ... 12
1.4.1 Metoda SYBR Green ... 12
1.4.2 Metoda Taq man ... 13
2 CILJ ISTRAŽIVANJA ... 14
3 MATERIJALI I METODE ... 16
3.1 MATERIJALI ... 17
3.1.1 Uzorci tkiva ... 17
3.1.2 Kemikalije ... 17
3.1.3 Tehnička pomagala i pribor ... 18
3.2 METODE ... 19
3.2.1 Homogenizacija ... 19
3.2.2 Izolacija RNA ... 19
3.2.3 Čistoća i koncentracija RNA ... 20
3.2.4 Elektroforeza izolirane RNA ... 20
3.2.5 Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom ... 21
3.2.6 Elektroforeza umnoženih produkata ... 22
3.2.7 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) ... 23
3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA ... 23
4 REZULTATI ... 25
4.1 IZOLACIJA RNA ... 26
4.2 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM NAKON OBRNUTOG PREPISIVANJA (RT-PCR) ... 27
4.3 LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM U STVARNOM VREMENU (QRT-PCR) ... 28
4.3.1 Ekspresija gena za metabolizam serotonina u jejunumu ... 29
4.3.2 Ekspresija gena za metabolizam serotonina u kori velikog mozga ... 31
5 DISKUSIJA ... 34
5.1 METODOLOŠKI ASPEKTI ... 35
5.2 UČINCI TRETMANA AGONISTA SEROTONINA NA EKSPRESIJU GENA ZA METABOLIZAM SEROTONINA 36
6 ZAKLJUČAK ... 38
7 LITERATURA ... 40

1 Uvod

1.1 Serotonin

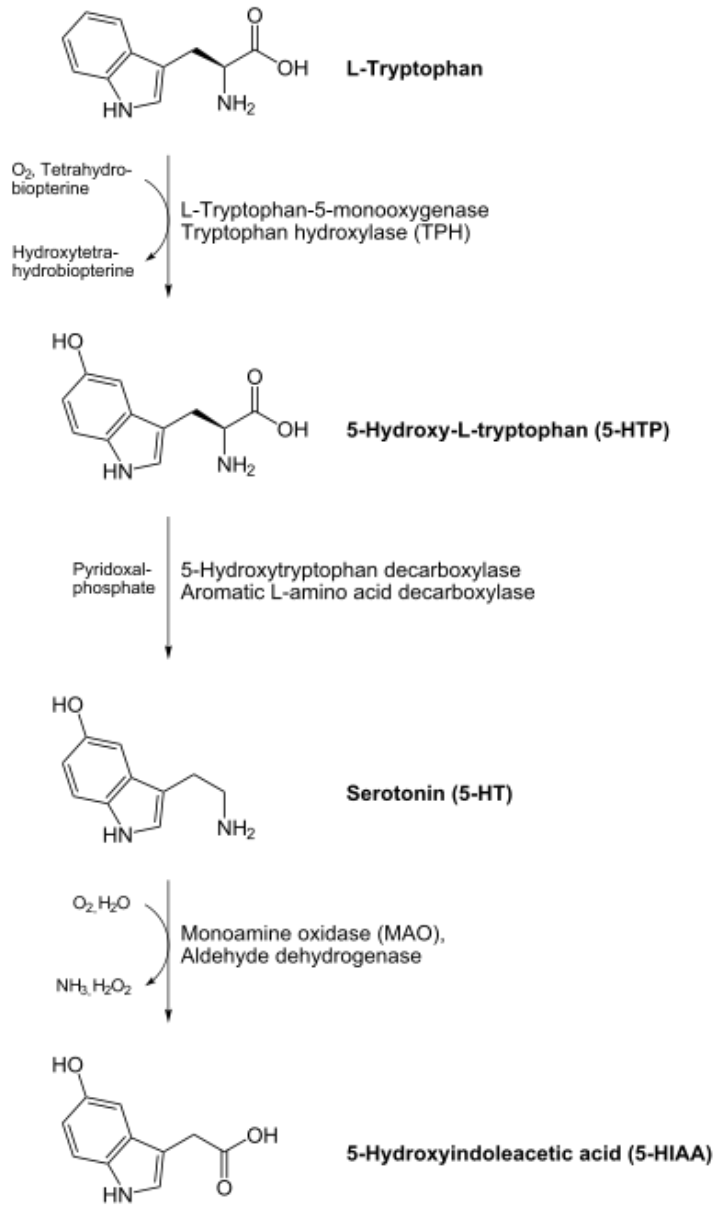
Serotonin ili 5-hidroksitriptamin (5-HT) je monoaminski neurotransmiter. Spada u biogene amine zajedno s katekolaminskim neurotransmiterima dopaminom, adrenalinom i noradrenalinom, koji se sintetiziraju iz aminokiseline tirozin. Za razliku od njih, serotonin nastaje iz aminokiseline triptofan. Serotonin pripada grupi aromatskih spojeva koji se nazivaju indolima (prema IUPAC-u je 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol), a on je indolamin jer sadrži jednu amino skupinu. Prvi puta ga spominje V. Erspamer 1937. godine, a primijetio ga je u ekstraktu enterokromafinih stanica gdje je uzrokovao kontrakciju stanica tankoga crijeva. Naziva ga enteraminom. Godine 1948. M. Rapport i suradnici izolirali su ga iz krvnoga seruma, a zbog njegovih vazokonstrikcijskih svojstava koja su i ranije primijećena u krvnom serumu, nazvali su ga serotonin (Whitaker-Azimitia 1999). U prirodi ga nalazimo u plodovima različitih biljaka (ananasu, banani, kiviju rajčici), a najveće koncentracije su nađene u orasima. Nalazimo ga i u gljivama te životinjama gdje se pojavljuje vrlo rano u evoluciji (kod bilateralno simetričnih životinja).

Serotonin je izvanstanična signalna molekula koja u ljudskom tijelu sudjeluje u regulaciji mnogobrojnih fizioloških funkcija kao što su raspoloženje, spavanje, spolna aktivnost i druge. U organizmu sisavaca razlikujemo dva serotoninska odjeljka: središnji – kojem pripadaju serotoninski neuroni u središnjem živčanom sustavu i periferni – koji čine ostali organski sustavi. Ova dva odjeljka su međusobno odvojena krvno-moždanom barijerom, a većina serotonina (oko 90%) se nalazi u perifernom odjeljku gdje sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima (Nakatani i sur. 2008).

Serotonin se sintetizira u mozgu i u enterokromafinim stanicama sluznice tankoga crijeva. Sinteza se odvija u dva koraka od kojih je prvi korak ujedno i ograničavajući faktor sinteze. Prvi korak je hidroksilacija L-triptofana pri čemu nastaje nestabilni međuprodukt 5-hidroksitriptofan (5-HTP). Reakcija je katalizirana enzimom triptofan hidroksilaza (TPH) koji je jedini specifičan enzim za sintezu serotonina. Postoje dva izoenzima TPH1 i TPH2 koja su kodirana sa 2 različita gena. Ekspresija gena za TPH1 se odvija u epifizi i enterokromafinskim stanicama, a ekspresija gena za TPH2 u serotonergičnim neuronima i neuronima mijenteričnoga pleksusa (Cote i sur. 2003). U

drugom koraku nastaje serotonin (5-HT) dekarboksilacijom međuprodukta (5-HTP) uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatskih kiselina.

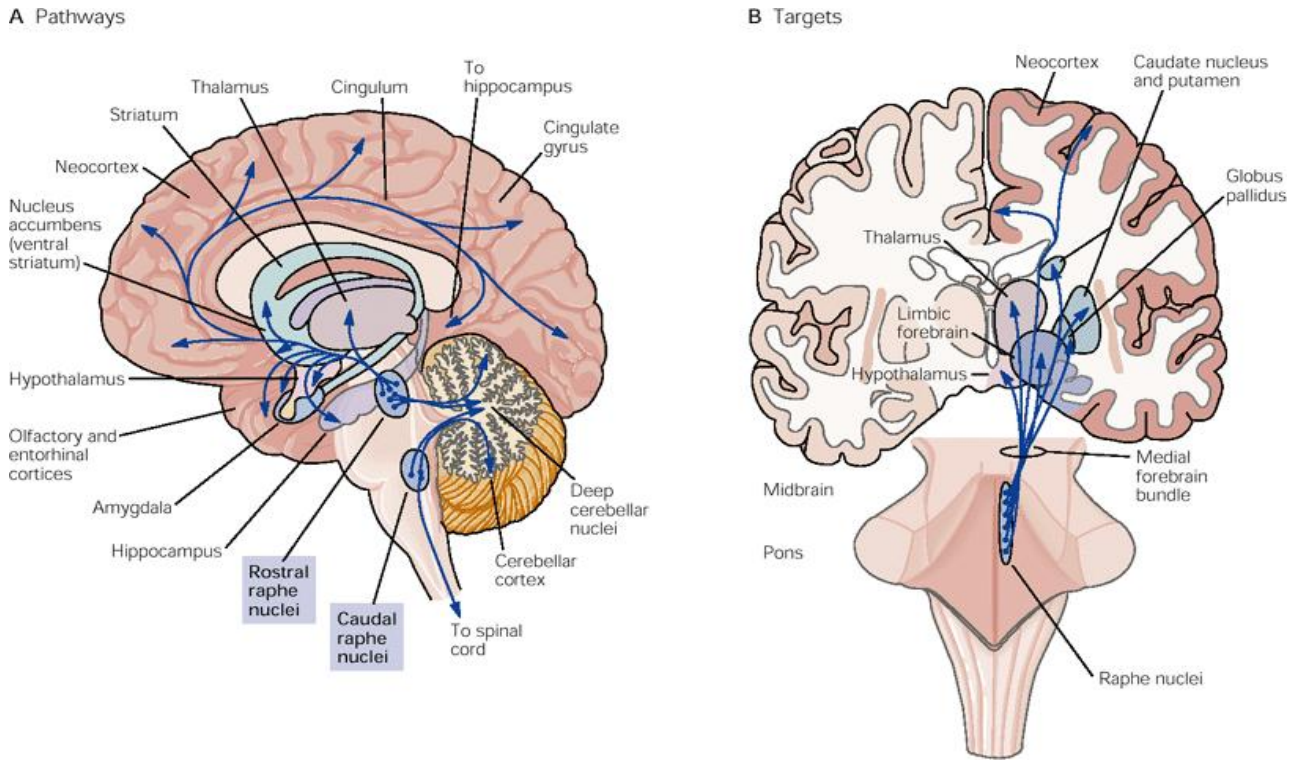
Razgradnja serotonina se odvija u jetri i plućima. Katalizira je enzim monoamin-oksidaza (MAO) pri čemu nastaje 5-hidroksiindolacetaldehid. On se dalje oksidira u 5-hidroksiindoloctenu kiselinu (5-HIAA) pomoću enzima aldehid dehidrogenaze te se izlučuje urinom (Slika 1.1).



Slika 1.1. Metabolizam serotonina (preuzeto sa www.drugs-forum.com)

1.1.1 Serotoninski sustav u mozgu

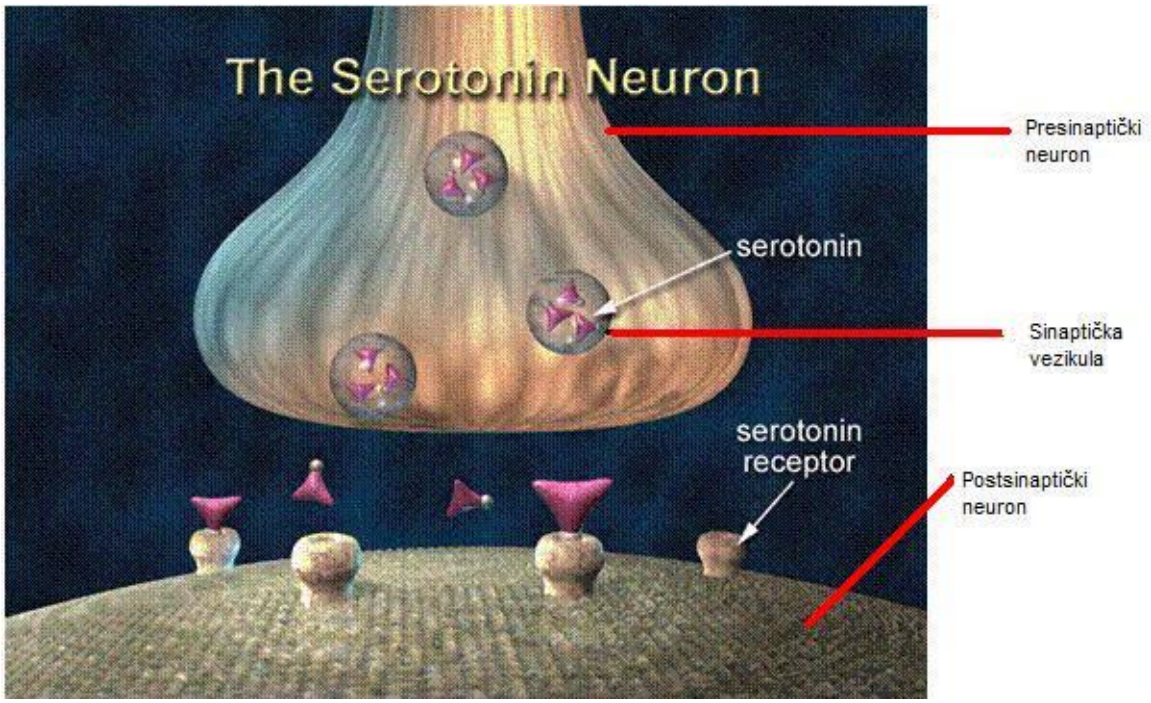
Tijela serotonergičnih neurona nalaze se duž dorzalne središnje linije moždanoga debla kojeg nazivamo jezgre rafe (lat. *raphe nuclei*). Aksoni serotonergičnih neurona se projiciraju u gotovo sva područja mozga te čine jako složeni eferentni sustav (Slika 1.2). Zahvaljujući tolikoj razgranatosti, serotoninski sustav sudjeluje u modulaciji niza bihevioralnih i fizioloških procesa u organizmu te je uključen u regulaciju raspoloženja, pažnje i ostalih kognitivnih sposobnosti (Lesch i Moessner 1998). Uz kognitivne sposobnosti, serotonin regulira i mnoge fiziološke procese koji su povezani s cirkadijanim i neuroendokrinim ritmovima kao što su hranjenje, seksualno ponašanje i spavanje (Lacković 1994, Frazer i Hensler 1999). Tako mnogobrojne funkcije serotonina mogu se objasniti postojanjem 14 podtipova receptora koji moduliraju i podešavaju stanične odgovore na serotonin. Svi tipovi receptora su prisutni u svim strukturama mozga, a neke vrste ponašanja i procesa regulira više tipova receptora (Hoyer i sur. 1994, Whitaker-Azmitia 2005).



Slika 1.2. Serotonergične projekcije iz jezgara rafe (Kandel i sur, 2000)

Serotonin se pojavljuje rano u prenatalnom razvoju mozga. Serotonergični neuroni se razvijaju u mozgu u petom tjednu gestacije, a do petnaestog tjedna se organiziraju u strukturu jezgara rafe (Sundstrom i sur. 1993). U drugoj godini života čovjeka serotoninski sustav doseže svoj funkcionalni maksimum, a u petoj godini dolazi do razine karakteristične za odraslu dob (50% najveće koncentracije u ranom djetinjstvu). Sličan razvojni put serotoninskoga sustava nalazimo u mozgu štakora. Prvi serotonergični neuroni se pojavljuju 12. gestacijskog dana, a razvoj traje do 21. postnatalnog dana kada dolazi do njegovog vrhunca (Whitaker-Azmitia 2001, 2005).

Nakon što se formiraju, serotonergični neuroni šalju aksonske nastavke prema ciljnim neuronima gdje serotonin služi kao signalna molekula za diferencijaciju i pravilno smještanje neurona unutar kore mozga i hipokampusa. Osim što utječu na razvoj ostalih struktura mozga, serotonergični neuroni autoreguliraju i svoj razvoj. Poticanje rasta i razvoja se vrši indirektno preko faktora rasta S-100β kojeg izlučuju stanice stimulirane serotoninom dok se inhibicija odvija negativnom povratnom spregom direktno preko receptora za serotonin $5HT_{1B}$ (Whitaker-Azmitia 2001, 2005).



Slika 1.3. Shematski prikaz sinapse (preuzeto sa www.drugabuse.gov)

Serotonin se nakon sinteze u citoplazmi pohranjuje aktivnim transportom u sinaptičke mjehuriće na aksonskim završecima serotonergičnih neurona te se u vezikulama veže na specifični protein SBP (eng. *serotonin binding protein*). Promjenom membranskoga potencijala dolazi do otvaranja Ca^{2+} kanala (kompleks Ca^{2+}-kalmodulin) te ulaska kalcijevih iona u aksonski završetak iz sinaptičke pukotine. Povećana koncentracija kalcijevih iona u aksonskom završetku uzrokuje ispuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu. Ispuštanje serotonina se odvija pomoću egzocitoze sinaptičkog mjehurića u membranu stanice. Serotonin se zatim veže za 5-HT receptore na postsinaptičkoj stanici te izaziva ekscitacijski ili inhibitorni signal, ovisno o tipu receptora (Slika 1.3). Da bi sinapsa pravilno funkcionirala serotonin mora imati ograničeno vrijeme djelovanja unutar sinaptičke pukotine te se serotonin prekidom djelovanja vraća u aksonski završetak (presinaptički neuron) aktivnim transportom pomoću serotoninskoga transportera (5-HTt). U presinaptičkom neuronu serotonin se razgradi (monoamin oksidazom i aldehid dehidrogenazom) ili se vraća u sinaptičke mjehuriće (Melikian 2004).

1.1.2 Periferni serotoninski odjeljak

U perifernom odjeljku organizma serotonin se sintetizira u enterokromafinim stanicama sluznice tankoga crijeva i pohranjuje u sekretorne vezikule. Otpušta se u portalni krvotok parakrinom sekrecijom kao odgovor na razne podražaje te sudjeluje u fiziološkim procesima većine organskih sustava. Preko vaskularnog sustava kontrolira krvni tlak, te ovisno o tipu receptora kojeg aktivira, potiče vazokonstrikciju ili vazodilataciju; regulira proliferaciju crijevnih epitelnih stanica. U probavnom sustavu djeluje na sekreciju sluznice i kontrakciju glatkih mišića tankog crijeva potičući na taj način peristaltiku crijeva te kao neurotransmiter u mijenteričnom spletu interneurona. Serotonin regulira sekreciju testosterona i krvni protok kroz testise u muškom genitourinarnom sustavu, kontrolira lučenje želučane kiseline te stimulira aktivaciju trombocita tijekom zgrušavanja krvi (Berger i sur. 2009, Watts i sur. 2009).

U optjecajnom sustavu 99% serotonina je pohranjeno u trombocitima (Cook Jr i Leventhal 1996), a kako oni nemaju enzim triptofan hidroksilazu koji katalizira prvi korak u sintezi serotonina, 5-HT u trombocite ulazi aktivnim transportom iz krvne plazme pomoću serotoninskog transportera (5-HTt). Serotonin se u trombocitima pohranjuje u citoplazmatskim organelama (tzv. delta granulama ili gustim granulama) pomoću vezikularnog transportera koji preko membrane organela omogućuje unos serotonina iz citoplazme. Osim serotoninskog transportera na trombocitima se nalazi i receptor za serotonin, 5-HT2A. Vezanjem serotonina na ovaj receptor dolazi do aktivacije trombocitnog odgovora (otpuštanje serotonina egzocitozom i pojačana agregacija trombocita). Serotonin tako sudjeluje u procesu zgrušavanja krvi, pa iako spada u kategoriju slabih trombocitnih agonista, u prisutnosti drugih agonista postaje snažan pojačivač trombocitnog odgovora (Berger i sur. 2009).

1.1.3 Povezanost središnjeg i perifernog serotoninskog sustava

Mozak i optjecajni sustav odijeljeni su krvno-moždanom barijerom te se tako omogućava normalno funkcioniranje središnjeg živčanog sustava u uravnoteženom okolišu bez ionskih, toksičnih i hormonskih tvari koje cirkuliraju krvotokom. Budući da je pri fiziološkim uvjetima u organizmu serotonin (5-HT) hidrofilna molekula (zbog hidroksilne grupe i dušika) kao takav ne može proći krvno-moždanu barijeru. Posljedica toga je funkcionalna odvojenost perifernog i središnjeg serotoninskog sustava (Whitaker-Azmitia 2001, 2005).

Krvno-moždana barijera je građena od endotelnih stanica koje oblažu kapilare u mozgu i nastavaka astrocita. Endotelne stanice kapilara međusobno tvore čvrsta spojišta te tako onemogućavaju prolaz tvari između pojednih stanica dok astrociti predstavljaju mjesto izmjene tvari između krvi i izvanstanične tekućine mozga. Hipofiza, epifiza i donji dio moždanoga debla ipak nisu obloženi krvno-moždanom barijerom. Njima je potreban kontakt s krvožilnim sustavom zbog pravilnog funkcioniranja endokrinog izlučivanja (hipofiza) i hormonske regulacije (epifiza). Izmjena tvari preko krvno-moždane barijere se odvija putem jednostavne difuzije (za male nenabijene molekule

topive u mastima i plinove) i olakšane difuzije kojom prolaze neke hidrofilne molekule (glukoza, L- aminokiseline, vitamini) te specifičnim transporterima kojima se unose tvari potrebne za razvoj i funkcioniranje mozga (Kandel i sur. 2000).

Komunikacija između dva serotoninska odjeljka prisutna je tijekom fetalnog i ranog postnatalnog razvoja mozga. To razdoblje traje do druge godine kod čovjeka te dvadesetog postnatalnog dana kod štakora. Do tada krvno-moždana barijera nije u potpunosti razvijena te endotelne stanice moždanih kapilara nisu u potpunosti povezane čvrstim spojištima. Budući da nije u potpunosti formirana krvno-moždana barijera omogućuje prolazak serotonina između perifernog i središnjeg odjeljka serotoninskog sustava (Whitaker-Azmitia 1996, 2001, 2005).

Iako se smatralo da je krvno-moždana barijera u kasnijem razdoblju nepropusna za serotonin, u nekim studijama dokazana je prisutnost mRNA serotoninskog transportera (5-HTt) u endotelnim stanicama mozga (Brust i sur. 2000, Wakayama i sur. 2002). To bi značilo da postoji mogućnost aktivnog transporta serotonina kroz krvno-moždanu barijeru te da osim funkcije prepreke, krvno-moždana barijera sudjeluje u regulaciji razine serotonina u cerebrospinalnoj tekućini i na taj način povezuje središnji i periferni serotoninski sustav (Nakatani i sur. 2008).

1.2 Metabolizam serotonina

1.2.1 Triptofan hidroksilaza

Triptofan hidroksilaza (TPH) spada u skupinu hidroksilaza aminokiselina. Katalizira hidroksilaciju L-triptofana uz molekularni kisik i tetrahidrobiopterin (BH4) te Fe^{2+} ion kao kofaktore (Fitzpatrick 1999). TPH je tetrameran enzim, a svaka podjedinica se sastoji od 445 aminokiselina. Na C-kraju se nalazi posebna domena koja omogućuje povezivanje podjedinica. Triptofan hidroksilaza se nalazi u svim stanicama koje sintetiziraju serotonin, od enterokromafinih stanica u tankom crijevu u perifernom dijelu organizma, do jezgara rafe i epifize u centralnom živčanom sustavu.

Postoje dvije homologne forme triptofan hidroksilaze, TPH1 i TPH2. Gen za TPH1 se nalazi na kromosomu 11 na položaju q15.3-p14 dok se gen za TPH2 nalazi na kromosomu 12 na položaju q15. Njihova homologija u aminokiselinskom slijedu je 72 %. TPH2 izoforma se eksprimira isključivo u središnjem živčanom sustavu u dorzalnim i medijalnim jezgrama rafe, dok se TPH1 eksprimira prvenstveno na periferiji, u stanicama tankog crijeva. U središnjem živčanom sustavu se eksprimira tijekom embrionalnog razvoja, a u odrasloj dobi u epifizi. Izoforma TPH2 razlikuje se u građi jer na N-kraju ima posebnu regulatornu domenu s dodatnom 41 aminokiselinom koja utječe na smanjenu stabilnost i topljivost tog enzima (Alenina i sur. 2009, Savelieva i sur. 2008).

1.2.2 Monoamin-oksidaza

Monoamin-oksidaza (MAO) je enzim koji pripada obitelji enzima koji kataliziraju oksidativnu deaminaciju monoamina uz pomoć flavina kao kofaktora. U reakciji se koristi kisik koji odvaja amino grupu s monoamina i FAD kao kofaktor koji preuzima vodikove ione pri čemu nastaje aldehid i amonijak. Nalaze se vezani za vanjsku mitohondrijsku membranu u većini tkiva sisavaca i sudjeluju u razgradnji serotonina do 5-hidroksiindolacetaldehida.

Postoje dva tipa monoamin-oksidaze, MAO A i MAO B. Obje forme se nalaze u centralnom živčanom sustavu u neuronima i astrogliji, a u perifernom serotoninskom odjeljku enzim MAO A se nalazi u jetri i probavnom sustavu, dok se MAO B nalazi u trombocitima.

Oba gena za ova 2 enzima se nalaze jedan do drugoga na kraćem kraku kromosoma X na položaju p11.4-p11.3. Podudaraju se u 70% aminokiselinskoga slijeda, a mutacija u tom dijelu uzrokuje Brunnerov sindrom. Razlike između ova dva homologna enzima se očituju u razgradnji različitih monoamina. MAO A preferira noradrenalin i serotonin, MAO B preferira feniletilamin dok je dopamin supstrat za obje izoforme (Frazer i Hensler 1999).

1.3 Hiperserotoninemija i autizam

Autizam je neurorazvojni poremećaj kojeg karakteriziraju nedostatak socijalne interakcije, poremećene komunikacijske vještine te ograničeni ponavljajući i stereotipni obrasci ponašanja i aktivnosti. Autizam se pojavljuje u ranoj razvojnoj fazi, najkasnije do treće godine života uz pojavljivanje jednog od spomenutih oštećenja. Kod većine bolesnika je u većoj ili manjoj mjeri prisutna mentalna retardacija i smanjena inteligencija (Lord i sur. 2000).

Budući da postoje različiti simptomi povezani s autizmom, koji variraju od osobe do osobe, govorimo o spektru autističnih poremećaja (ASD). Tom spektru pripadaju, uz autistički poremećaj, još Aspergerov sindrom, dječji disintegrativni poremećaj (CDD), pervazivni razvojni poremećaj (PDD) te Rettov poremećaj (RD). Aspergerov sindrom je sličan autizmu po nedostatku socijalnih vještina i komunikaciji, ali ipak ne postoji značajnija odgoda u kognitivnom razvoju, razvoju jezika te adaptivnog ponašanja i znatiželje. PDD također karakterizira prisutnost jednog ili više simptoma autizma, ali zbog kasnijeg razvitka bolesti zove se još i atipični autizam. Za dječji disintegrativni poremećaj i Rettov sindrom je karakterističan kasniji početak bolesti u kojem dolazi do gubitka već stečenih jezičnih, motoričkih i socijalnih sposobnosti (Owley i sur. 2003).

Uzroci autizma još nisu razjašnjeni, ali se zna da bolest ima genetičku podlogu. Učestalost ASD-a u općoj populaciji je od 3 do 6 oboljelih na 1000 stanovnika dok u slučaju braće i sestara učestalost i postotak raste na 5%. Najizraženiji pokazatelj da bolest ima genetičku podlogu je velika učestalost oboljevanja kod blizanaca. Kod dvojajčanih blizanaca šansa da oboje obole od autizma je 24% dok kod jednojajčanih blizanaca iznosi 60-90%. Na genetičku podlogu bolesti ukazuje i omjer između muške i ženske djece oboljele od autizma pri čemu je 4 puta više muške djece oboljelo od autizma. Unatoč tome nije pronađen gen koji bi pokazao zašto dolazi do takvog omjera, te je li autizam X - vezano svojstvo, već se uz razvoj autizma povezuje veći broj gena. Nastale promjene ne moraju biti isključivo genetske prirode već i izmjenjenih epigenetičkih procesa (Lord i sur. 2000, Crawley i sur. 2007, Moy i Nadler 2008).

Biološka osnova autizma se očituje u promjenama struktura u mozgu koje možemo povezati s različitim simptomima bolesti. Nepravilan razvoj mozga je vidljiv u

patološkim promjenama u korteksu (stereotipna i repetitivna ponašanja), malom mozgu, hipokampusu i amigdali (socijalni nedostaci). Te promjene dovode do oslabljenih funkcija tih dijelova mozga i promjene živčanih puteva.

Donedavno je autizam bio modeliran kao isključivo genetski poremećaj i bolest mozga no postoje mnoge studije i hipoteze koje govore o interakciji gena i okolišnih faktora te kako to pridonosi tolikoj raznovrsnosti simptoma izraženih u autizmu i ASD-u. Na pogoršanje ili poboljšanje simptoma može se utjecati i promjenom okolišnih čimbenika kao što su toksini, virusne infekcije, alkohol i drugi (Whitaker-Azmitia i sur. 1996, DiCicco-Bloom i sur. 2006). Različite biološke podloge bolesti udružuju se na zajedničkom putu koji utječe na sposobnost spajanja neurona tijekom razvoja mozga i vode k nastanku autizma (Herbert 2005).

Hiperserotoninemija je povišena razina serotonina u krvi te je jedan od najučestalijih fizioloških simptoma autističnog poremećaja koji se javlja u 30 - 50% oboljelih (Cook Jr i Leventhal 1996, Hranilović i sur. 2009). Još uvijek nije razjašnjeno zašto se samo kod nekih, a ne svih oboljelih od autizma, pojavljuje hiperserotoninemija. Postoji više mogućih uzroka hiperserotoninemije, a neki od njih su povećana sinteza ili smanjena razgradnja serotonina u perifernom odjeljku, promjene u otpuštanju serotonina iz enterokromafinih stanica, povećani unos serotonina u trombocite ili smanjeno otpuštanje iz trombocita (Anderson 1987, Croonenberghs i sur. 2005, Janusonis 2005, Hranilović i sur. 2009).

Zanimljivo je da je kod autističnih osoba uočena smanjena razina serotonina u mozgu unatoč pojavi hiperserotoninemije na periferiji, u krvožilnom sustavu. Razina serotonina u krvi nije nužno odraz razine serotonina u mozgu kod odraslih osoba. Na to utječe krvno-moždana barijera i enzim triptofan hidroksilaza koji se razlikuje u središnjem serotoninskom sustavu (TPH 2) od onog perifernog (TPH 1). Tijekom razvoja organizma dok krvno-moždana barijera nije formirana dolazi do slobodnog prijelaza serotonina između mozga i krvožilnog sustava. Budući da serotoninski sustav ima mogućnost samoregulacije, odnosno serotonin utječe na razvoj serotonergičnih neurona, povišena koncentracija 5-HT u razvojnom stadiju može negativnom povratnom spregom inhibirati rast i razvoj završetaka serotonergičnih neurona. Gubitak završetaka

serotonergičnih neurona tijekom razvoja mozga dovodi do raznih poremećaja u funkcioniranju sustava reguliranih serotoninom, i u fiziološkom i u socijalnom smislu (Whitaker-Azmitia 2001, 2005).

1.4 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Real time PCR ili kvantitativna lančana reakcija polimerazom jedna je od najjačih i najosjetljivijih tehnika za gensku analizu. Pomoću nje se može mjeriti razina genske ekspresije, vršiti SNP (eng. *single nucleotide polimorphisam*) analiza, otkrivati patogeni i mjeriti RNA interferencija. U kombinaciji s reverznom transkripcijom, može se kvantificirati i količina RNA u stanicama i tkivima. Kod *real time* PCR-a, mjerenje količine nastalog PCR produkta se odvija u stvarnom vremenu, što je i jedna od najvećih razlika u odnosu na klasični PCR.

Postoji nekoliko metoda kojima se koristi pri *real time* PCR-u, a najčešće su *Taq man*i SYBR *Green*.

1.4.1 Metoda *SYBR Green*

Ova metoda je prva upotrijebljena u qRT-PCR-u. Kad se boja SYBR Green I doda u uzorak, ona se odmah veže za dvolančanu molekulu DNA. Za vrijeme reakcije PCR, polimeraza umnaža ciljnu DNA pri čemu nastaju produkti. Na svaku novu dvolančanu molekulu DNA se opet veže boja SYBR Green I. Što se PCR duže odvija, nastaje sve više produkta (dvolančana DNA) i raste intezitet fluorescencije.

Prednosti *SYBR Green* metode su što se može pratiti umnažanje bilo kojeg dvolančanog DNA slijeda, bez potrebe za specifičnim sondama, što smanjuje troškove postupka. Nedostaci ove metode su što se nespecifično veže za bilo koju dvolančanu molekulu DNA pa na taj način može doći do lažno pozitivnih rezultata.

1.4.2 Metoda *Taq man*

Taq man metoda koristi specifičnu sondu s dvije vrste fluorofora. Dok je sonda vezana za DNA, prije početka polimerazne aktivnosti, fluorofor prigušivač (obično boja velike valne duljine, crvena) spriječava fluorescenciju fluorofora reportera (obično boja kratke valne duljine, zelena). Ovakav način blokade je moguć zbog fluorescentnog rezonantnog transfera energije (FRET) pri čemu je jedan fluorofor inhibiran drugim bez otpuštanja protona. Fluorofor reporter se nalazi na 5' kraju sonde dok se fluorofor prigušivač nalazi na 3' kraju. Kada je sonda vezana za specifični uzorak DNA nakon denaturacije i hlađenja dolazi do vezivanja početnica za DNA te *Taq* polimeraza počinje dodavati nukleotide i pomiče sondu s DNA predloška. Tako se razdvaja prigušivač od fluorofornog reportera i dopušta reporteru emitirati energiju (svjetlost) koja se bilježi na računalu.

2 Cilj istraživanja

Ovaj rad dio je sveobuhvatnijeg istraživanja na modelu štakora, kojemu je cilj istražiti utjecaj povišene koncentracije serotonina u doba perinatalnog razvoja na serotoninsku homeostazu u odraslom mozgu. U tu svrhu jedna skupina štakora je tretirana neposrednim prekursorom serotonina 5-hidroksitriptofanom (5-HTP), a druga skupina neselektivnim inhibitorom razgradnog enzima serotonina tranilciprominom (TCP) u razdoblju intenzivnog razvoja serotonergičnih neurona: od 13. prenatalnog dana do 21. postnatalnog dana.

Cilj ovog diplomskog rada bio je utvrditi da li je došlo do promjene u količini ekspresije gena koji sudjeluju u metabolizmu serotonina kod tretiranih skupina životinja u odnosu na kontrolnu skupinu. U tu svrhu životinje su žrtvovane 80. postnatalnog dana, uzeti su im uzorci jejunuma, kore velikog mozga i jezgara rafe te je u njima određena relativna razina ekspresije gena za TPH1, TPH2 i MAO A pomoću qRT-PCR-a.

3 Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Uzorci tkiva

U istraživanju je korišteno 8 ženki i tri mužjaka Wistar štakora iz uzgoja Hrvatskog instituta za istraživanje mozga (Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu). Tri ženke i njezini potomci su tretirani s 25 mg/kg prekursorom serotonina (5HTP), tri ženke i njezini potomci s 2 mg/kg inhibitorom monoamin oksidaze (TCP) te dvije ženke i njezini potomci su bili kontrolna skupina tretirana fiziološkom otopinom (u istom periodu, na isti način). Perinatalni tretman 5HTP-om je opisan u diplomskom radu Dolenec P. (2009), a TCP-om u znanstvenom radu (Blažević i sur. 2010).

3.1.2 Kemikalije

korištene u izolaciji RNA:

- RNAqueous-4PCR komplet (Applied Biosystems, SAD)

korištene kod obrnutog prepisivanja i lančane reakcije polimerazom:

- 10X PCR pufer II (Applied Biosystems, SAD)
- 25 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems, SAD)
- 10 mM smjesa deoksiribonukleotida (dATP, dCTP, dTTP, dGTP; svaki 2,5 mM) (Applied Biosystems, SAD)
- AmpliTaq DNA polimeraza, 5 U/μL (Applied Biosystems, SAD)
- oligonukleotidne početnice 0,50 μM (Applied Biosystems, SAD)
- voda bez nukleaza

korištene pri elektroforezi na 1% i 1,5% agaroznom gelu:

- agaroza (Sigma, SAD)

- 0.5× TBE pufer (45 mM Tris-borat, 1 mM EDTA)
- 6× pufer za nanošenje uzoraka DNA na gel (glicerol 50%, bromfenol plavo 25%, 1mM EDTA)
- Sybr Safe DNA boja za gel 10,000× koncentrat u DMSO (Invitrogen, SAD)
- standard: DNA biljeg molekularne mase XIII, ljestvica od 50 pb, 250 μg/ml (Boehringer Mannheim, Njemačka)

korištene u lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu (*real-time* PCR):

- TaqMan Gene Expression Master mix, 20X (Applied Biosystems, SAD)
- Početnica za gen monoamin-oksidazu A je Rn01430961_m1 (assay ID)
- Početnica za gen triptofan hidroksilazu 1 je Rn01476869_m1 (assay ID)
- Početnica za gen triptofan hidroksilazu 2 je Rn00598017_m1 (assay ID)
- Početnica za gen β-aktin je 4352340E (part number)

3.1.3 Tehnička pomagala i pribor

- vibracijska mješalica, EV-100 (Tehnica, Slovenia)
- stolna mini centrifuga Cat. No. 05-090-129 (Fischer Scientific, Koreja)
- vaga EV-100 (Tehtnica Železniki, Jugoslavija)
- GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, SAD)
- GeneAmp PCR System 7300 (Applied Biosystems, SAD)
- Microamp optical 8-cap strip(Applied Biosystems, SAD)
- Microamp optical 8-tube strip, 0,2 mL (Applied Biosystems, SAD)
- Termomixer comfort (Eppendorf, Njemačka)
- DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer, SAD)
- hladnjak i zamrzivač
- mikrovalna pećnica
- Izvor napona Power Pac 300 (Bio-Rad, SAD)
- UV transiluminator (Vilber Lourmat, Francuska)
- autoklav/ekspres lonac

- sustav za elektroforezu na agaroznom gelu Sub-Cell GT (Bio-Rad, SAD)
- mikropipete (Transferpette, Njemačka)
- mikropipeta Pipetman P10 (Gilson, SAD)
- Sustav za fotografiranje gelova:
- Camedia C-4000 Zoom (Olympus, Japan)
- UV Transilluminator TR2000 (Bio-Rad, SAD)

3.2 Metode

3.2.1 Homogenizacija

Nakon što su uzorci jejunuma i kore velikog mozga prikupljeni iz žrtvovanih životinja, brzo su smrznuti tekućim dušikom na -172 °C. Zatim su stavljeni u otopinu guanidinij-tiocijanata, homogenizirani ultrazvučnim homogenizatorom te ostavljeni na -80 °C do izolacije.

3.2.2 Izolacija RNA

Izolacija RNA je napravljena pomoću kompleta *RNAqueous-4PCR kit* prema priloženom protokolu. Uzorke sam odledio, protresao na mješalici i centrifugirao (1 min, 13000×g). Supernatant sam prebacio u novu mikroepruvetu bez RNaza te sam dodao jednaki volumen 64% etanola. Dobivenu otopinu sam promješao i filtrirao kroz kolonice (V_{maks} = 700 µL) te centrifugirao (1 min, 13000×g). Postupak sam ponavljao dok nisam iskoristio čitavi volumen otopine, a filtrat sam odbacivao nakon svakoga centrifugiranja. Isprao sam kolonice sa 700 µL otopine za ispiranje #1, ponovno centrifugirao uzorke (1 min, 13000×g) te odbacio filtrat. Slijedilo je dvostruko ispiranje kolonice sa po 500 µL otopine za ispiranje # 2/3, te centrifugiranje (1 min, 13000×g) i odbacivanje filtrata.

Kolonicu u kojoj se nalazila otopljena RNA sam stavio u novu mikroepruvetu, dodao sam 40 µL otopine za eluciju (zagrijanu na 75 °C) te centrifugirao (30 s, 13000×g) pri sobnoj temperaturi.

Da bih izbjegao kontaminaciju uzoraka s DNA, svakom uzorku sam dodao 1 µL enzima DNaze 1 i 0,1 volumena 10x pufera za DNazu 1, lagano sam promiješao i inkubirao (15 min pri 37 ºC).

Na kraju sam dodao 0,1 volumen otopine za inaktivaciju DNaze koju sam prethodno protresao na mješalici, smjesu sam inkubirao 2 minute tijekom kojih sam 2 puta lagano promiješao epruvetu s uzorkom. Nakon inkubacije, tubicu s uzorkom sam centrifugirao (1 min, 11000×g) te sam supernatant odvojio od taloga. Ukupni volumen uzoraka (pročišćene RNA) u mikroepruvetama nakon izolacije je bio 50 µL.

3.2.3 Čistoća i koncentracija RNA

Čistoću i koncentraciju izdvojene RNA sam odredio pomoću spektrofotometra. Mjerio sam apsorbanciju na 260 i 280 nm uz razrjeđenje RNA 1:50 u TE puferu. Čistoću uzorka sam odredio iz omjera A260/A280, a rezultati između 1,8-2,1 su ukazivali na visoku čistoću uzorka. Koncentraciju sam izračunao iz apsorbancije pri valnoj duljini 260nm:

A260 × faktor razrjeđenja × 40 = RNA µg /mL.

3.2.4 Elektroforeza izolirane RNA

Uspješnost izolacije i cjelovitost RNA sam provjerio i elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu. Za bojanje gela i vizualizaciju RNA korištena je boja 10000× Syber Safe. Od svakoga uzorka korišteno je 2 µl pomiješanoga s 2 µl 6× pufera za nanošenje (Tablica 3.1). Elektroforetsko razdvajanje je trajalo 40 minuta pri naponu struje od 80V. Po završetku elektroforeze gel je osvjetljen UV svjetlom kako bi se vizualizirale vrpce RNA.

Tablica 3.1. Priprema uzoraka za elektorforezu

Priprema gela		Priprema uzoraka	
TBE 0,5% pufer	35 mL	Pufer za nanošenje	2 µL
Agaroza	0,35 g	diH2O	6 µL
Sybersafe	3,5 µL	RNA	2 µL

3.2.5 Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom

Nakon izolacije RNA iz tkiva slijedila je reverzna transkripcija. Prema protokolu za reverznu transkripciju u mikroepruvete sam redom dodavao: ReH_2O, inhibitor RNaze, početnicu oligo-dT i RNA. Svaki uzorak sam promješao na mješalici i oborio te stavio u uređaj za PCR 5 minuta pri 65 °C (tablica 3.2). U međuvremenu sam pripremio *mastermix* prema tablici 3.2. Smjesu sam promješao na mješalici i oborio te sam po 9,5 µL dodao u mikroepruvete s RNA. Ponovno sam promješao i oborio te vratio u uređaj za PCR do kraja programa.

Tablica 3.2. Priprema uzoraka za reverznu transkripciju

	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen / µL
RNA*	1 µg	0,05 µg/µL	} 9 µL
H_2O*			
Oligo (dT) početnica	0,50 µg/µL	0,025 µg/µL	1
Inhibitor RNaze	40 U/µL	1 U/µL	0,5
Ukupan volumen			10,5
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	4
RT pufer	10X	1X	2
dNTP	10 mM	2,5 mM	2
Inhibitor RNaze	40 U/µL	1 U/µL	1
Enzim MulV	20 U/µL	0,75 U/µL	0,5
Ukupan reakcijski volumen			20

*svaki uzorak je imao drugu koncentraciju te sam ih dodavao u različitim volumenima što je uzrokovalo i drugačiji volumen H_2O

Lančanom reakcijom polimerazom umnožio sam gene za monoamin-oksidazu i triptofan hidroksilazu kako bih provjerio uspješnost reverzne transkripcije. Prema tablici 3.3 pripremio sam *mastermix* za PCR. U svaku mikroepruvetu sam najprije dodao 13,5 µL *mastermixa,* a zatim 1,5 µL uzorka, te umnožio željenu DNA prema odgovarajućem programu u uređaju za PCR.

Tablica 3.3. Priprema uzoraka za PCR

Sastojci PCR smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen / µL
H_2O			9,04
PCR pufer	10X	1X	1,5
$MgCl_2$	25 mM	1,5 mM	0,9
dNTP mix	2,5 mM	200 µM	1,2
Početnice	10 µM	0,5 µM	0,75
AmpliTaq DNA polimeraza	5 U/µL	0,037 U/µL	0,11
cDNA	100 ng/µL	100 ng/µL	1,5
Ukupan reakcijski volumen			15

3.2.6 Elektroforeza umnoženih produkata

Umnožene produkte razdvojio sam elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu (tablica 3.4). Za bojanje produkata korištena je boja 10000× Syber Safe. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo 40 minuta pri naponu struje od 80 V. Po završetku elektroforeze gel je osvjetljen UV svjetlom kako bi se vizualizirali umnoženi produkti i na taj način provjerila uspješnost reverzne transkripcije.

Tablica 3.4. Priprema gela za elektorforezu umnoženih produkata

Priprema gela		Priprema uzoraka	
TBE 0,5% pufer	30 mL	Pufer za nanošenje	3 µL
Agaroza	0,45 g		
Sybersafe	3,0 µL	cDNA	5 µL

3.2.7 Kvantitativna lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

qRT-PCR je izveden pomoću kompleta *Taqman gene expression assays*. Reakcijski volumen smjese svake mikroepruvete je bio 20 µl (Tablica 3.5).

Tablica 3.5. Priprema uzoraka za qRT-PCR

Sastojci PCR smjese	Početna koncentracija	Konačna koncentracija	Volumen / µL
H_2O			6
TaqMan Gene Expression Master Mix	2×	1×	10
Početnice i sonda kontrolnog gena (ACTB)	20×	1×	1
Početnice i sonda istraživanog gena*	20×	1×	1
Uzorak cDNA		20 ng **, 25 ng ***	2
Ukupan reakcijski volumen			20

* Tph 1 i 2, Mao A; **jejunum; ***kora velikog mozga

Svi uzorci cDNA su se prvo zagrijavali 2 min pri 50 °C, zatim je slijedila aktivacija *Taq* polimeraze 10 min pri 95°C te 40 ciklusa denaturacije pri 95 °C po 15 s i umnažanje DNA 1 min pri 60 °C.

3.3 Statistička obrada podataka

Pri obradi podataka koristio sam $2^{-\Delta C}{}_T$ metodu. Nakon uvrštavanja vrijednosti C_T za gene od interesa i kontrolni gen (ACTB) u formulu $2^{-\Delta C}{}_{T,}$ izračunao sam relativnu ekspresiju gena za Mao A i Tph 1 i 2 u jejunumu i kori (Tablice 4.1 i 4.2).

Podatke sam analizirao u programu GraphPad Prism 5. Za određivanje pravilnosti distribucije upotrijebio sam Kolmogorov–Smirnov test (s korekcijom pomoću Lillieforovog testa). Parametre koji su imali pravilnu distribuciju sam usporedio jednosmjernom

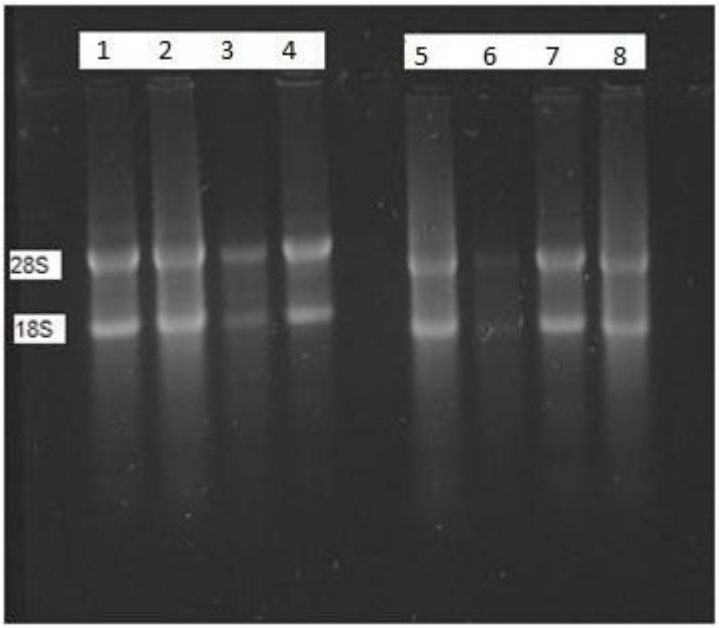
analizom varijance (ANOVA) s naknadnim Tukeyevim testom, a one koji nisu neparametrijskom Kruskal-Wallis analizom s naknadnim Dunnovim testom.

U tabličnom prikazu koristio sam srednju vrijednost ± standardnu devijaciju (M ± SD), a u grafičkom srednju vrijednost ± standardnu pogrešku (M ± SEM). Značajnost rezultata je prihvaćena kod $p < 0,05$. U rezultatima nekih pokusa sam isključio jedinke čiji su rezultati odstupali od prosječne vrijednosti više od dvije standardne devijacije.

4 Rezultati

4.1 Izolacija RNA

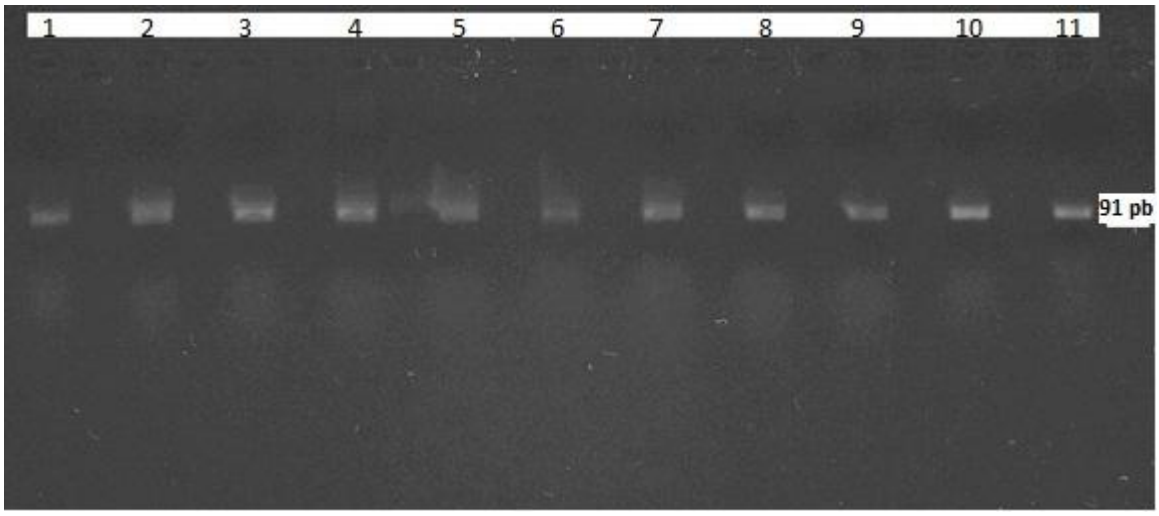
Nakon žrtvovanja životinja i uzimanja uzoraka za analizu, napravio sam izolaciju RNA iz jejunuma koji je predstavljao periferni dio serotoninskog sustava te iz jezgara rafe i kore mozga koje su predstavljale serotoninski sustav središnjeg živčanog sustava. Uspješnost izolacije RNA iz tkiva životinja provjerio sam elektroforezom na gelu agaroze. U jažicama 1, 3, 5 i 7 nalaze se uzorci jejunuma, a u jažicama 2, 4, 6 i 8 uzorci kore mozga (Slika 4.1).



Slika 4.1. Elektroforetsko razdvajanje RNA nakon izolacije

4.2 Lančana reakcija polimerazom nakon obrnutog prepisivanja (RT-PCR)

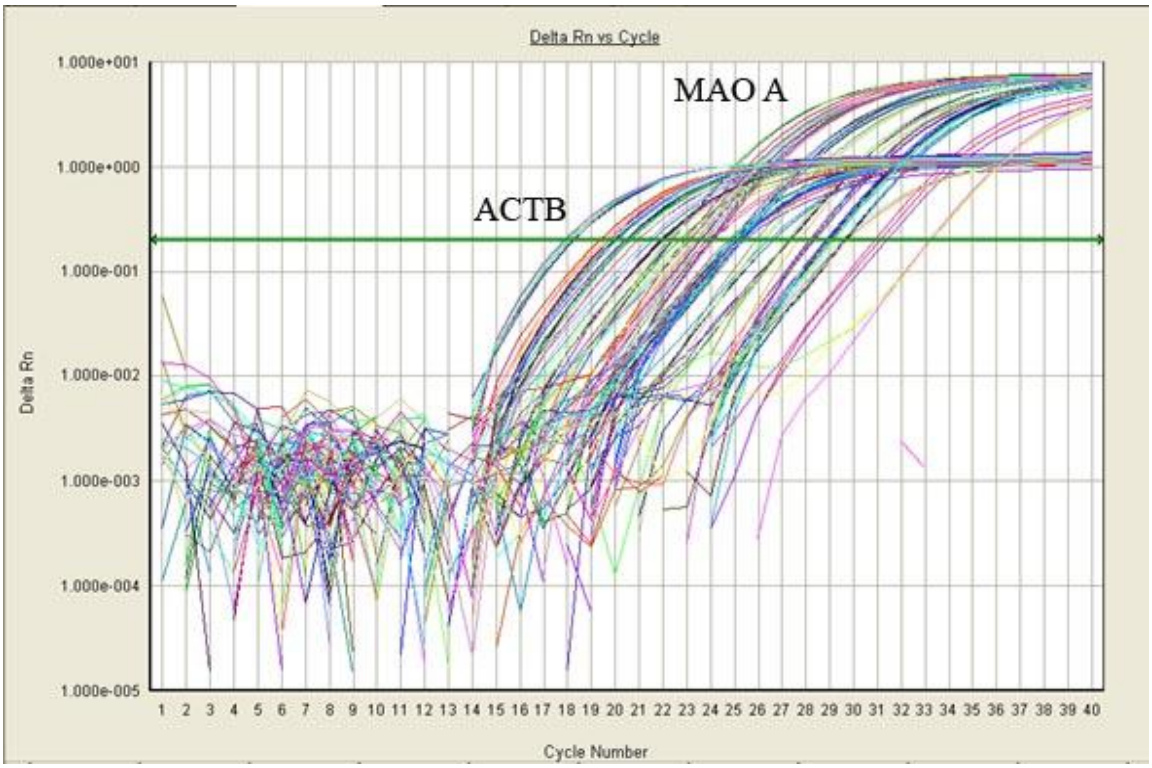
Nakon što sam provjerio količinu i kvalitetu RNA izoliranih uzoraka, uslijedio je postupak obrnutog prepisivanja RNA u komplementarnu DNA (cDNA). Uspješnost reverzne transkripcije sam provjerio umnožavanjem gena za β-aktin klasičnom *end-point* reakcijom PCR (Slika 4.2) .



Slika 4.2. Umnoženi odsječci gena za β-aktin nakon elektroforetskog razdvajanja na 1,5%-tnom agaroznom gelu

4.3 Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Ovom metodom sam istraživao kolika je relativna ekspresija gena *Tph 1* i *Mao A* u jejunumu te gena *Tph 2* i *Mao A* u kori velikoga mozga. Kao kontrolni gen odabrao sam β-aktin (ACTB) čiji je produkt znan kao jedan od najkonzerviranijih proteina, sa stalnom ekspresijom unutar organizma. Na njega nisu utjecali tranilcipromin i 5-hidroksitriptofan (5-HTP), kemikalije koje su prethodno perinatalno davane pokusnim životinjama i kojima sam pokušao utjecati na ekspresiju gena koje sam istraživao. Tipični rezultat umnažanja gena putem qRT-PCR prikazan je na slici 4.3.



Slika 4.3. Rezultati umnažanja gena za MAO A i gena za ACTB

Na temelju dobivenih podataka izračunao sam relativnu ekspresiju gena za Mao A u jejunumu i kori velikog mozga (Tablica 4.1) te Tph 1 u jejunumu i Tph 2 u kori velikog mozga (Tablica 4.2).

Tablica 4.1. Relativna ekspresija gena za Mao A u jejunumu i kori velikog mozga štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)

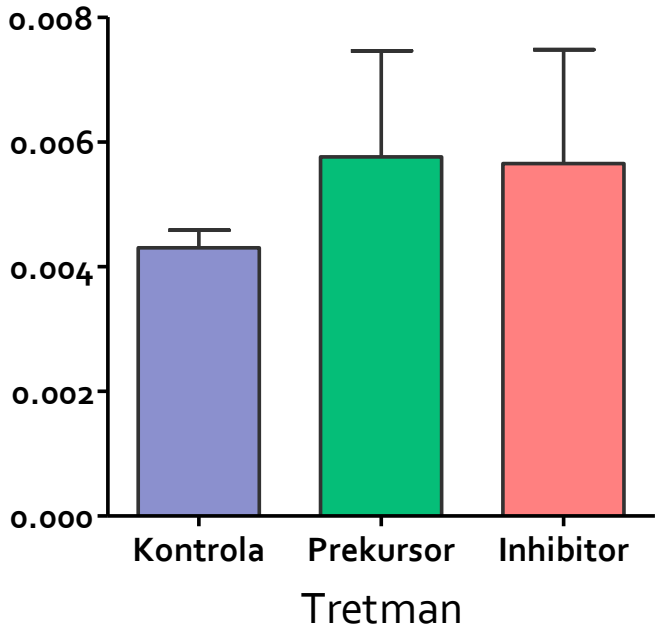
Mao A	Jejunum			Kora velikog mozga		
	kontrola	prekursor	inhibitor	kontrola	prekursor	inhibitor
Srednja vrijednost	0,07493	0,05366	0,0431	0,1265	0,05489	0,05548
Standardna devijacija	0,0265	0,03475	0,02527	0,06241	0,02895	0,02716
N (broj životinja)	8	6	5	8	5	5

Tablica 4.2. Relativna ekspresija gena za Tph 1 u jejunumu i Tph 2 u kori velikoga mozga štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)

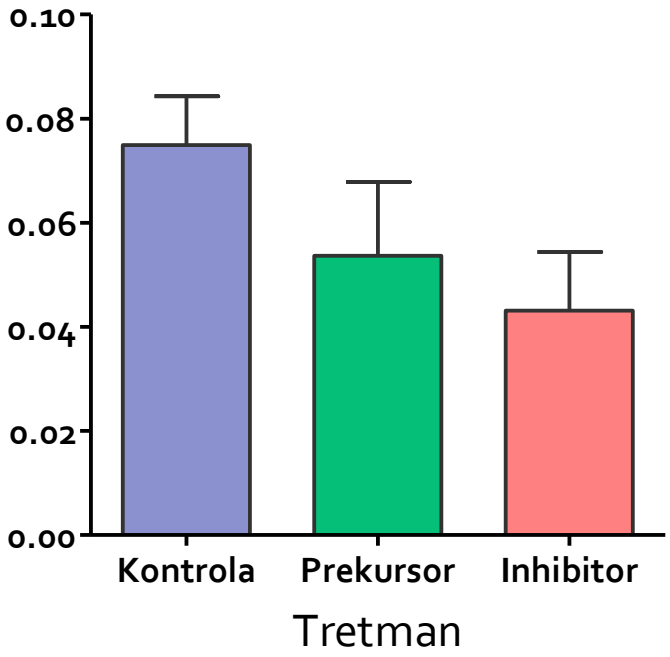
Tph 1 i 2	Jejunum			Kora velikog mozga		
	kontrola	prekursor	inhibitor	kontrola	prekursor	inhibitor
Srednja vrijednost	0,004303	0,005759	0,005654	0,006133	0,00535	0,004908
Standardna devijacija	0,000745	0,003804	0,004086	0,002959	0,004197	0,002298
N (broj životinja)	8	6	5	8	5	5

4.3.1 Ekspresija gena za metabolizam serotonina u jejunumu

Iako se ekspresija gena za TPH 1 i MAO A nije značajno razlikovala između ispitivanih skupina (KW = 0,01569, p = 0,9922 i F = 2,044, p = 0,1619), mogli smo uočiti indikativno veću ekspresiju gena za sintetizirajući enzim (Slika 4.4) te indikativno manju ekspresiju gena za razgradni enzim (Slika 4.5) u jejunumu štakora tretiranih agonistom serotonina u usporedbi s kontrolnim štakorima.



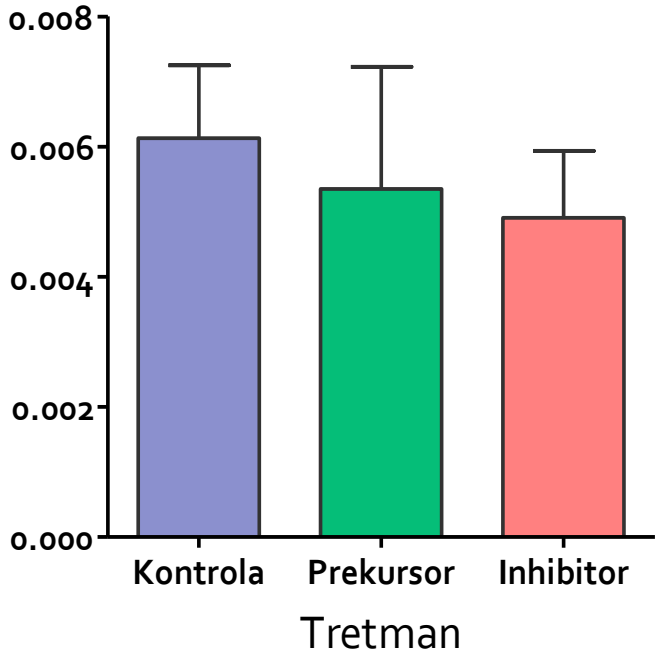
Slika 4.4. Relativna ekspresija gena za TPH 1 u jejunumu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)



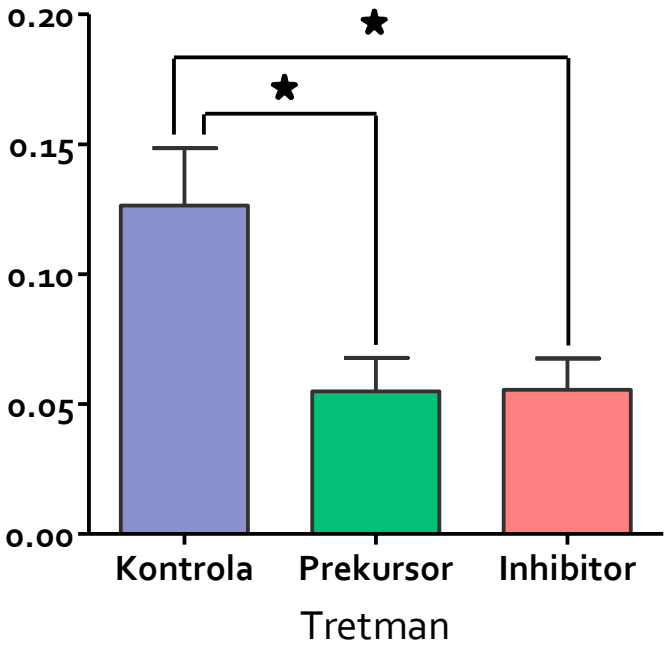
Slika 4.5. Relativna ekspresija gena za MAO A u jejunumu štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)

4.3.2 Ekspresija gena za metabolizam serotonina u kori velikog mozga

U kori velikog mozga ekspresija gena za sintetski enzim kod štakora tretiranih agonistom serotonina bila je indikativno snižena (KW = 0,4706, p = 0,7903, slika 4.6), a gena za razgradni enzim značajno snižena (F = 5,049, p = 0,0211, slika 4.7) u odnosu na štakore tretirane fiziološkom otopinom, što ukazuje na smanjeni metabolizam serotonina u središnjem odjeljku.



Slika 4.6. Relativna ekspresija gena za TPH 2 u kori mozga štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)



Slika 4.7. Relativna ekspresija gena za MAO A u kori mozga štakora tretiranih fiziološkom otopinom (kontrola), 5-hidroksitriptofanom (prekursor) i tranilciprominom (inhibitor)

5 Diskusija

5.1 Metodološki aspekti

Cilj istraživanja je bio proučiti je li inducirana hiperserotoninemija utjecala na ekspresiju gena koji sudjeluju u sintezi i razgradnji serotonina u središnjem i perifernom serotoninskom odjeljku. Hiperserotoninemija kod štakora je izazvana na dva načina:

- neposrednim prekursorom serotonina (5-hidroksitriptofanom, 5HTP) koji se kvantitativno prevodi u serotonin i tako povećava njegovu koncentraciju u organizmu,
- neselektivnim inhibitorom MAO (tranilciprominom, TCP) koji inhibira enzime uključene u razgradnju serotonina - MAO A i B.

5HTP nastaje iz prekursora serotonina, esencijalne aminokiseline triptofana. Početnu molekulu sinteze serotonina, triptofan, nisam koristio jer sudjeluje u različitim metaboličkim procesima (uglavnom sinteza proteina) pa nije moguće pretpostaviti koliko će ga se prevesti u serotonin. Suprotno 5HTP je uključen isključivo u u put sinteze serotonina i sav 5HTP prelazi u serotonin. Nisam koristio ni sam serotonin jer on ne prelazi posteljicu (dio tretmana se vršio tijekom prenatalnog razdoblja) za razliku od 5HTP-a koji je slobodno prelazi (Birdsall, 1998).

Drugi način izazivanja hiperserotoninemije je bila perinatalna primjena neselektivnog inhibitora izoenzima MAO A i MAO B, tranilcipromina, kojim se sprječava razgradnja serotonina. TCP inhibira oksidativnu deaminaciju što je ključan korak u razgradnji egzogenih amina i monoaminskih neurotransmitera u koje spada i serotonin (Billet, 2004). Iako izoenzimi imaju različite afinitete prema supstratima pri normalnim fiziološkim uvjetima, oba enzima mogu razgrađivati iste supstrate u slučaju da jedan od enzima zakaže ili bude namjerno blokiran. Korištenjem TCP-a kao inhibitora, postiže se inhibicija oba izoenzima te se na taj način smanjuje aktivnost MAO A i razgradnja serotonina (Celada i Artigas, 1993) čime se povećava koncetracija serotonina u organizmu (Malyszko i sur. 1993).

Za analizu ekspresije gena koristili smo qRT-PCR, a ne klasični *end-point* PCR. qRT-PCR je puno brža i jednostavnija metoda od klasičnog PCR-a te što je još važnije ona je i puno preciznija i osjetljivija. PCR metoda se sastoji od 3 faze – eksponencijalne, linearne i plato faze. Kod klasičnoga PCR-a koncentracije produkata se uspoređuju nakon završetka PCR-a kada uzorci dostignu plato fazu te se rezultati gledaju nakon elektroforeze na agaroznom gelu. Tako se gubi na preciznosti, osjetljivosti, rezoluciji i vremenu. Korištenjem qRT-PCR-a ubrzava se proces, dobivaju se puno precizniji, osjetljiviji i kvalitetniji rezultati. Cijela metoda je automatizirana, te se rezultati dobivaju u stvarnom vremenu, a išćitavaju se iz eksponencijalne faze kada je efikasnost reakcije najuspješnija.

Postoje dvije metode koje se koriste pri lančanoj reakciji polimerazom u stvarnom vremenu, *SYBR green* i *Taqman*. Ja sam koristio potonju jer se smatra pouzdanijom. Kod ove metode dolazi do specifične hibridizacije između ciljne DNA i obilježene sonde kako bi se stvorio fluorescentni signal čime se izbjegavaju lažno pozitivni rezultati. Ova metoda nam je omogućila da u jednoj mikorepruveti označimo sonde s više različitih reportera te na taj način pratimo umnažanje više različitih slijedova.

5.2 Učinci tretmana agonista serotonina na ekspresiju gena za metabolizam serotonina

Ekspresija gena za TPH 1 i MAO A u jejunumu nije se značajno razlikovala između eksperimentalnih skupina i kontrolne skupine štakora. Ipak, uočio sam indikativno višu razinu ekspresije gena za sintetski enzim i indikativno nižu razinu ekspresije gena za razgradni enzim u obje skupine eksperimentalnih životinja. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima ranije provedenih istraživanja razine serotonina u ovih životinja koja su pokazala da perinatalni tretman 5HTP-om uzrokuje prolazni, a TCP-om trajni porast koncentracije serotonina u krvi tretiranih životinja (Hranilović i sur, u pripremi). Nažalost, u literaturi nisam pronašao rezultate istraživanja koja bi se bavila

utjecajem hiperserotoninemije, TCP-a ili 5HTP-a na ekspresiju gena za sintezu i razgradnju serotonina, a s kojima bih mogao usporediti dobivene rezultate.

Utjecaj perinatalne primjene agonista serotonina na ekspresiju gena u kori velikog mozga vidi se u indikativno smanjenoj ekspresiji gena za enzim za sintezu serotonina, TPH 2, te statistički značajno smanjenoj ekspresiji gena za enzim za razgradnju serotonina, MAO A. Takvi rezultati me navode na zaključak da sam poremetio homeostazu serotonina u središnjem živčanom sustavu, što je u skladu s ranijim studijama koje su uočile da perinatalna primjena 5-HTP-a i TCP-a dugoročno snižava koncentraciju serotonina u kori velikog mozga. Zašto dolazi do toga, mogle bi reći neke sudije koje su se bavile utjecajem drugih prekursora serotonina (5-metoksitriptamin, triptofan) na razvoj serotonergičnih neurona. Prema tim studijama suvišak serotonina u mozgu, izazvan primjenom prekursora, dovodi do inhibicije razvoja serotonergičnih neurona (Whitaker-Azmitia i Azmitia, 1986; Eaton i sur., 1995; Shemer i sur., 1988; Shemer i sur. 1991). Smanjena ekspresija monoamin-oksidaze i triptofan hidroksilaze u kori velikog mozga ukazuje na smanjenu razinu serotonina u mozgu zbog utjecaja serotonina na serotonegrične neurone u perinatlano doba.

Prikazani rezultati dobiveni su na relativno malom broju životinja, što je vjerojatno razlog pretežnoj indikativnosti razlika između eksperimentalnih i kontrolne skupine te bi se istraživanje trebalo ponoviti na većoj skupini životinja.

6 Zaključak

Cilj ovoga rada bio je otkriti utjecaj perinatalne primjene neposrednog prekursora serotonina, 5-hidroksitriptofana i neselektivnog inhibitora monoamin-oksidaze, tranilcipromina, na ekspresiju gena uključenih u metabolizam serotonina u odraslih štakora. Zaključci su sljedeći:

- U perifernom serotoninskom odjeljku uočio sam indikativno povećanu ekspresiju gena za Tph 1 i indikativno smanjenu ekspresiju gena za Mao A u eksperimentalnim u odnosu na kontrolnu skupinu životinja
- U središnjem serotoninskom odjeljku (kora velikog mozga) uočio sam indikativno smanjenu ekspresiju gena za Tph 1 i značajno smanjenu ekspresiju gena za Mao A u eksperimentalnim u odnosu na kontrolnu skupinu životinja
- Pretpostavljam da je perinatalni tretman 5-hidroksitriptofanom i tranilciprominom doveo do trajnih kompenzatornih promjena u ekspresiji gena za metabolizam serotonina, od kojih je ona za Mao A u kori velikog mozga statistički značajna.

7 Literatura

Alenina N, Kikic D, Todiras M, Mosienko V, Qadri F i sur. Growth retardation and altered autonomic control in mice lacking brain serotonin. Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(25): 10332-7.

Anderson GM. Monoamines in autism: an update of neurochemical research on a pervasive developmental disorder. Med Biol. 1987; 65: 67–74.

Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin. Annu Rev Med. 2009; 60: 355-66.

Billett E. Monoamine Oxidase (MAO) in Human Peripheral Tissues. NeuroToxicology. 2004; 25: 139-148.

Birdsall TC. 5-Hydroxytryptophan: a clinically-effective serotonin precursor. Altern Med Rev. 1998; 3(4): 271-80.

Blažević S, Jurčić Ž, Hranilović D. Perinatal treatment of rats with MAO inhibitor tranylcypromine. Translational Neuroscience. 2010; 1: 49–54.

Brust P, Friedrich A, Krizbai IA, Bergmann R, Roux F i sur. Functional expression of the serotonin transporter in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. J Neurochem. 2000; 74: 1241–1248.

Celada P, Artigas F. Monoamine oxidase inhibitors increase preferentially extracellular 5-hydroxytryptamine in the midbrain raphe nuclei. A brain microdialysis study in the awake rat, N-S. Arch. Pharmacol. 1993; 347: 583-590.

Cook EH Jr, Leventhal BL. The serotonin system in autism. Curr Opin Pediatr. 1996; 8: 348–354.

Cote F, Thevenot E, Fligny C, Fromes Y, Darmon M i sur. Disruption of the nonneuronal tph1 gene demonstrates the importance of peripheral serotonin in cardiac function. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100 (23): 13525–30.

Crawley JN, Chen T, Puri A, Washburn R, Sullivan TL i sur. Social approach behaviors in oxytocin knockout mice: comparison of two independent lines tested in different laboratory environments. Neuropeptides. 2007; 41(3): 145-63.

Croonenberghs J, Verkerk R, Scharpe S, Deboutte D, Maes M. Serotonergic disturbances in autistic disorder: L-5-hydroxytryptophan administration to autistic youngsters increases the blood concentrations of serotonin in patients but not in controls. Life Sci. 2005; 76: 2171–2183.

DiCicco-Bloom E, Lord C, Zwaigenbaum L, Courchesne E, Dager SR i sur. The developmental neurobiology of autism spectrum disorder. J Neurosci. 2006; 26: 6897–906.

Eaton MJ, Staley JK, Globus MY, Whittemore SR. Developmental regulation of early serotonergic neuronal differentiation: the role of brain-derived neurotrophic factor and membrane depolarization. Dev Biol. 1995; 170(1): 169–182.

Fitzpatrick PF. Tetrahydopterin-dependent amino acid hydroxylases. Ann Rev Biochem. 1999; 68: 355–381.

Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel, G.J. et al. (Eds.), Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. (Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia) 1999; 263–292.

Herbert MR. Autism: a brain disorder or a disorder that affects the brain? Clin Neuropsychiat. 2005; 2(6): 354-379.

Hoyer D, Clarce DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR i sur. VII International Union of Pharmacology Classification of Receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeustics. 1994; 46: 157-203.

Hranilović D, Bujas-Petković Z, Tomičić M, Blažević S i sur. Hyperserotonemia in autism: activity of 5HT-associated platelet proteins. J Neural Transm. 2009; 116: 493–501.

Janusonis S. Serotonergic paradoxes of autism replicated in a simple mathematical model. Med Hypotheses. 2005; 64: 742-750.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM i sur. Principles of Neural Science 4 Ed. (McGraw-Hill, New York) 2000.

Lacković Z. Neurotransmiteri u zdravlju i bolesti. Zagreb: Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. 1994; 158-165.

Lesch KP, Moessner R. Genetically driven variation in serotonine uptake: is there a link to affective spectrum, neurodevelopmental, and neurodegenerative disorders? Biol Psychiat. 1998; 44: 179-192.

Lord C, Risi S, Lambrecht L, Cook Jr. EH, Leventhal BL i sur. The Autism Diagnostic Observation Schedule-Generic: a standard measure of social and communication deficits associated with the spectrum of autism. J Aut Dev Dis. 2000; 30: 205–223.

Malyszko J, Urano T, Serizawa K, Yan D, Kozima Y i sur. Serotonergic measures in blood and brain and their correlations in rats treated with tranylcypromine, a monoamine oxidase inhibitor. Jpn J Physiol. 1993; 43: 613-626.

Melikian HE. Neurotransmitter transporter trafficking: endocytosis, recycling, and regulation. Pharmacol Therapeut. 2004; 104(1): 17-27.

Moy SS, Nadler JJ. Advances in behavioral genetics: mouse models of autism. Mol Psychiatr. 2008; 13(1): 4-26.

Nakatani Y, Sato-Suzuki I, Tsujino N, Nakasato A i sur. Augmented brain 5-HT crosses the blood–brain barrier through the 5-HT transporter in rat. Euro J Neurosci. 2008; 27: 2466–2472.

Owley T, Leventhal BL, Cook EH. Childhood disorders: The autism spectrum disorders. Tasman A, Kay J, Lieberman JA (Eds), Psychiatry, 2nd edition (Wiley, Chichester). 2003; 757-768.

Savelieva KV, Zhao S, Pogorelov VM, Rajan I, Yang Q i sur. Genetic disruption of both tryptophan hydroxylase genes dramatically reduces serotonin and affects behavior in models sensitive to antidepressants. PLoS ONE. 2008; 3, e3301.

Shemer A, Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Effects of prenatal 5-methoxytryptamine and parachlorophenylalanine on serotonergic uptake and behavior in the neonatal rat. Pharmacol Biochem Be. 1988; 30: 847–851.

Shemer AV, Azmitia EC, Whitaker-Azmitia PM. Dose-related effects of prenatal 5-methoxytryptamine (5-MT) on development of serotonin terminal density and behavior. Dev Brain Res. 1991; 59: 59-65.

Sundstrom E, Kolare S, Souverbie F, Samuelsson EB, Pschera H i sur. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. Dev Brain Res. 1993; 75 (1): 1–12.

Wakayama K, Ohtsuki S, Takanaga H, Hosoya K, Terasaki T. Localization of norepinephrine and serotonin transporter in mouse braincapillary endothelial cells. Neurosci Res. 2002; 44: 173–180.

Watts SW, Priestley JR, Thompson JM. Serotonylation of vascular proteins important to contraction. PLoS One. 2009; 4(5): e5682.

Whitaker-Azmitia PM, Azmitia EC. Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: role of high affinity serotonin receptors. Neurosci Lett. 1986; 67: 307–312.

Whitaker-Azmitia PM, Druse M, Walker P, Lauder JM. Serotonin as a developmental signal. Behav Brain Res. 1996; 73 (1–2): 19–29.

Whitaker-Azimitia PM. The discovery of serotonin and its role in neuroscience. Neuropsychopharmacol. 1999; 21.

Whitaker-Azmitia PM. Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. Brain Res Bulletin. 2001; 56(5): 479-485.

Whitaker-Azmitia PM. Behavioral and cellular consequences of serotonergic activity during brain devleopment: a role in autism? Int J Devl Neurosci. 2005; 23: 75-83.