Ekspresija gena za serotoninski receptor tip 2C u podlinijama štakora Wistar-Zagreb 5HT

Surić, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:217:207193

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

Lucija Surić

Ekspresija gena za serotoninski receptor tip 2C u podlinijama štakora Wistar-Zagreb 5HT

Diplomski rad

Zagreb, 2018. godina

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju, na Zavodu za molekularnu biologiju, Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof.dr. sc. Jasminke Štefulj, više znanstvene suradnice IRB. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, radi stjecanja zvanja magistre molekularne biologije.

Zahvale

Veliku zahvalnost dugujem mentorici, izv. prof.dr. sc. Jasminki Štefulj na njezinom vodstvu, korisnim savjetima i pomoći prilikom izrade ovog diplomskog rada. Nadalje, želim se zahvaliti prof.dr.sc Dubravki Hranilović na njezinoj susretljivosti, što je pristala biti su-voditeljica ovog rada.

Posebno hvala dr.sc.Maji Kesić na neizmjernom trudu i strpljenju, te svemu što sam od nje imala prilike naučiti.

Želim se zahvaliti i svojim prijateljima i prijateljicama, koji su uvijek bili uz mene te su svojim prisustvom razdoblje studiranja učinili zabavnim i nezaboravnim.

Na kraju, najveću zahvalnost za svoja postignuća pripisujem svojim roditeljima i sestrama, te ostatku obitelji na njihovoj bezuvjetnoj podršci, strpljenju, razumijevanju i ljubavi.

Veliko Hvala svima!

„And I'll climb
The hill in my own way
just wait a while, for the right day
And as I rise above the treeline and the clouds
I look down
Fearlessly“

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Ekspresija gena za serotoninski receptor tip 2C u podlinijama štakora Wistar-Zagreb 5HT

Lucija Surić

Roseveltov trg 6,10 000 Zagreb, Hrvatska

Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je važna signalna molekula uključena u brojne fiziološke funkcije, uključujući i regulaciju energetske ravnoteže organizma. Učinci serotonina posredovani su njegovim membranskim receptorima kojih ima ukupno 14 tipova. Serotoninski receptor tipa 2C (5HT-2C) igra važnu ulogu u regulaciji tjelesne mase i metabolizma glukoze te predstavlja farmakološku metu za tretman pretilosti i kontrolu glikemije. Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) štakor je animalni model razvijen usmjerenom selekcijom životinja prema ekstremnim vrijednostima trombocitnih serotoninskih parametra. Sastoji se od dviju podlinija štakora, hiposerotonergične (5HT-niske) i hiperserotonergične (5HT-visoke) podlinije. Životinje iz 5HT-niske i 5HT-visoke podlinije štakora WZ-5HT značajno se razlikuju u tjelesnoj masi, nakupljanju masnog tkiva, unosu hrane i metabolizmu glukoze. Cilj ovog rada bio je usporediti ekspresiju gena za 5HT-2C (*Htr2c*) između 5HT-niske i 5HT-visoke podlinije WZ-5HT štakora. Ekspresiju *Htr2c* analizirali smo u hipotalamusu i gonadalnom bijelom masnom tkivu mužjaka iz navedenih podlinija (n=10 po podliniji) metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom nakon reverzne transkripcije (RT-qPCR). Rezultati ovog rada pokazali su da životinje iz 5HT-visoke podlinije imaju, u odnosu na životinje iz 5HT-niske podlinije višu relativnu ekspresiju mRNA za receptor 5HT-2C u gonadalnom bijelom masnom tkivu, što upućuje na potencijalnu ulogu ovog receptora u regulaciji količine masnog tkiva. U hipotalamusu nismo opazili statistički značajne razlike u ekspresiji gena *Htr2c* između životinja iz dviju podlinija štakora WZ-5HT pa možemo zaključiti da hipotalamička ekspresija mRNA za receptor 5HT-2C ne pridonosi razlici u tjelesnoj masi između ovih podlinija.

(38 stranica, 11 slika, 6 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: serotonin, receptor 5HT-2C, WZ-5HT štakor, hipotalamus, masno tkivo

Voditelj: izv. prof.dr. sc. Jasminka Štefulj, viša znanstvena suradnica, IRB, Zagreb

Suvoditelj: prof.dr.sc. Dubravka Hranilović, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb

Ocjenitelji:

dr.sc. Dubravka Hranilović, izv. prof.

dr. sc. Maja Matulić, izv. prof.

dr. sc. Renata Šoštarić, doc.

Rad prihvaćen: 14.02.2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation thesis

Expression of the serotonin receptor type 2C gene in sublines of the Wistar-Zagreb 5HT rat

Lucija Surić

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Serotonin (5-hydroxytryptamine, 5-HT) is an important signaling molecule involved in numerous physiological functions, including regulation of the energy balance of the organism. The effects of serotonin are mediated by 14 different types of its membrane receptors. Serotonin receptor type 2C (5HT-2C) plays an important role in regulation of body weight and glucose metabolism and represents a pharmacological target for the treatment of obesity and control of glycemia. Wistar-Zagreb 5HT (WZ-5HT) rat is an animal model developed by selective breeding according to extreme values of platelet serotonin parameters. It consists of two sublines of the rat, hyposerotonergic (5HT-low) and hyperserotonergic (5HT-high) subline. Animals from the 5HT-low and 5HT-high sublines of the WZ-5HT rats differ significantly in body mass, adiposity, food intake, and glucose metabolism. The aim of this paper was to compare expression of the 5HT-2C receptore gene (*Htr2c*) between 5HT-low and 5HT-high subline of WZ-5HT rats. Expression of the *Htr2c* was analyzed in the hypothalamus and gonadal white adipose tissue of males from the above mentioned sublines (n = 10 per subunit) by the reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method. Results of this study showed that animals from the 5HT-high subline, as compared to animals from the 5HT-low subline, had a higher relative expression of mRNA encoding 5HT-2C receptor in gonadal white adipose tissue, suggesting the potential role of this receptor in the regulation of adiposity. In the hypothalamus we did not notice statistically significant differences in the expression of the *Htr2c* gene between animals from the two sublines of the WZ-5HT rat, so we can conclude that hypothalamic expression of the mRNA for the 5HT-2C receptor does not contribute to the differences in the body mass regulation between these sublines.

(38 pages, 11 pictures, 6 tables, 51 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: serotonin, 5HT-2C receptor, WZ-5HT rat, hypothalamus, adipose tissue

Supervisor: Assoc. Prof. Jasminka Štefulj, PhD, Senior Research Associate, RBI

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dubravka Hranilović, PhD, Faculty of Science

Reviewers:

dr.sc. Dubravka Hranilović, Assoc. Prof.

dr.sc. Maja Matulić, Assoc.Prof.

dr.sc. Renata Šoštarić, Asst. Prof.

Thesis accepted: 14.02.2018.

POPIS KRATICA

ARC- arkuatna jezgra *(arcuate nucleus)*

AADC- aminokiselinska dekarboksilaza

BAT- smeđe masno tkivo

BMI- indeks tjelesne mase

BW- tjelesna težina

d-FEN- lijek za mršavljenje

GABA- γ-amino-maslačna kiselina (γ-*aminobutyric acid)*

GDS- serotonin sintetiziran u enterokromafinskim stanicama probavnog sustava (*gut-derived serotonin)*

GPCR- metabotropni receptor *(G-protein coupled receptor)*

gWAT- gonadalno bijelo masno tkivo

MAO- monoamin oksidaza

LGIC- ionotropni receptor (*ligand-gated ion channel)*

RT-qPCR- reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

SERT- monoaminski prijenosnik serotonina (*sodium-dependent serotonin transporter)*

SSRI- selektivni inhibitor povratnog unosa (*selective serotonin reuptake inhibitor)*

SŽS- središnji živčani sustav

TPH- triptofan hidroksilaza

WZ štakor- Wistar-Zagreb štakor

αMSH- melanokortinski peptid (α-*melanocyte stimulating hormone)*

β-ME- β-merkaptoetanol

5HT- serotonin

5HT-2C receptor- serotoninski receptor tipa 2C

SADRŽAJ

1.UVOD 1
1.1.Serotonin u organizmu sisavaca 1
1.1.1.Struktura, sinteza i razgradnja serotonina 1
1.1.2. Uloge serotonina u organizmu sisavaca 3
1.1.3. Regulacija aktivnosti serotoninskog sustava 4
1.1.4. Serotoninski receptori tipa 2C 5
1.2. Regulacija energetske ravnoteže organizma 7
1.2.1. Uloga 5HT i receptora 5HT-2C u regulaciji energetske ravnoteže organizma 9
1.3.Wistar-Zagreb 5HT štakor 12
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 13
3.MATERIJALI I METODE 14
3.1.Materijali 14
3.1.1.Animalno tkivo 14
3.1.2.Kemikalije i otopine 14
3.1.3.Tehnička oprema 15
3.1.4.Kompjutorski program 15
3.2.Metode 16
3.2.1. Homogenizacija tkiva i izolacija 16
3.2.2. Reverzna transkripcija 17
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu 18
3.2.4. Statistička obrada podataka 20
4.REZULTATI 21
4.1. Izolacija RNA 21
4.2.Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR) 21
4.3. Ekspresija mRNA za 5HT receptor 2C u hipotalamusu štakora WZ-5HT 23
4.4. Ekspresija mRNA za 5HT receptor 2C u gonadalnom masnom tkivu štakora WZ-5HT 25
5.RASPRAVA 28
6.ZAKLJUČAK 32
7.LITERATURA 34
8.ŽIVOTOPIS 39

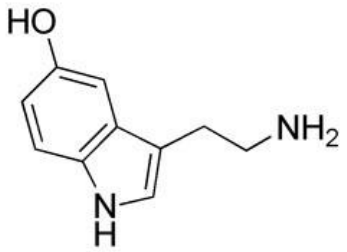
1.UVOD

1.1.Serotonin u organizmu sisavaca

Metabolička homeostaza u organizmu održava se uz pomoć živčanog sustava i hormona. Serotonin (5-hidroksitriptamin, 5HT) je važna signalna molekula uključena u brojne fiziološke funkcije. Za razliku od klasičnih hormona, serotonin se proizvodi na različitim anatomskim lokacijama. U mozgu djeluje kao neurotransmitor, a na periferiji može djelovati kao hormon, autoparakrini i/ili parakrini faktor, ili kao intracelularna signalna molekula. Serotonin ne može prijeći krvno-moždanu barijeru stoga postoje dva velika odvojena „izvora“ ovog bioamina. Čak 95% serotonina proizvodi se periferno (El-Merahbi i sur., 2015.).

1.1.1.Struktura, sinteza i razgradnja serotonina

Kemijska formula serotonina je $C_{10}H_{12}N_2O$, a struktura je prikazana Slikom 1. Kod čovjeka se primarno nalazi u središnjem živčanom sustavu (SŽS), gastrointestinalnom traktu i u trombocitima, ali nalazimo ga i u masnom tkivu i drugim tkivima (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/serotonin#section=Top).



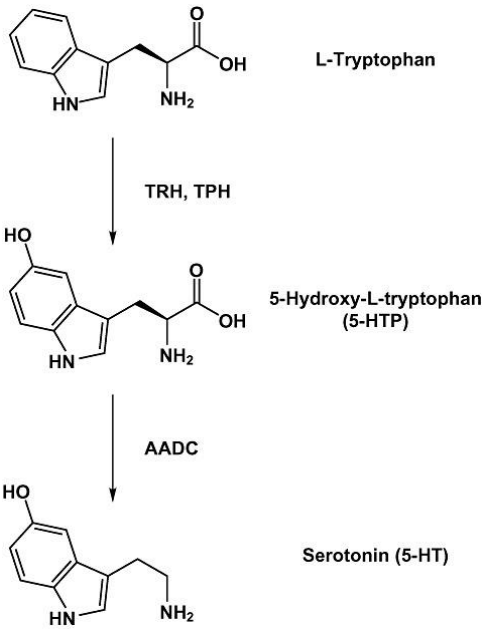
Slika 1. Struktura serotonina – IUPAC ID: 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol, 5-Hidroksitriptamin

(preuzeto sa: http://www.ithacaaudio.com/wp-content/uploads/2012/05/Serotonin.jpg)

Serotonin se sintetizira iz esencijalne aminokiseline L-triptofan, kratkim metaboličkim procesom koji uključuje dva bitna enzima: triptofan-hidroksilazu (TPH) i aminokiselinsku dekarboksilazu (AADC) (Slika 2.) U slučaju da je TPH blokirana, neće doći do sinteze 5-hidroksitriptofana (kritični korak), a time će izostati i drugi korak sinteze čiji je krajnji produkt serotonin (Chugani, 2011.). TPH postoji u dvije izoforme: TPH1 je eksprimirana u perifernim tkivima dok se TPH2 primarno nalazi u središnjem živčanom sustavu (Watts i sur., 2012.). Sinteza serotonina se u mozgu događa u serotonergičnim neuronima koji su grupirani

u jezgrama rafe smještenima u moždanom deblu. Na periferiji, sinteza se u najvećoj mjeri odvija unutar neurona i enterokromafinskih stanica gastrointestinalnog trakta koje su zaslužne za oko 90% ukupne količine serotonina u tijelu. Jedina razlika u sintezi serotonina u probavnom sustavu u odnosu na SŽS je u izoformi enzima triptofan hidroksilaza: u SŽS-u je aktivna TPH2 dok je u enterokromafinskim stanicama aktivna TPH1 (Jenkins i sur., 2016.). Uz 5HT neurone i enterokromafine stanice, trombociti pripadaju u stanice najbogatije serotoninom. S obzirom da trombocitima nedostaje ključni enzim za sintezu serotonina triptofan-hidrozilaza, serotonin se unosi u unutrašnjost trombocita uz pomoć serotoninskog prijenosnika, membranskog proteina koji posreduje unos serotonina iz krvne plazme u unutrašnjost trombocita. Na membrani gustih granula nalazi se vezikularni monoaminski prijenosnik koji posreduje unos serotonina iz trombocitne citoplazme u guste (delta) granule.

Serotonin se metabolizira pomoću enzima monoamin oksidaza (MAO), čijim djelovanjem nastaje 5-hidroksiindol-octena kiselina (5HIAA). Glavno mjesto razgradnje serotonina na periferiji su jetra i pluća (Jonnakuty i Gragnoli, 2008.).



Slika 2. Sinteza serotonina u dva koraka (Watanabe i sur., 2011.)

Serotonin uzet oralno neće ući u serotonergične puteve središnjeg živčanog sustava budući da, kao što je prije spomenuto, ne prolazi krvno-moždanu barijeru. Međutim, triptofan i njegov metabolit 5-hidroksitriptofan (5-HTP) prolaze kroz krvno-moždanu barijeru te se stoga koriste kao dodaci prehrani. Bitno je napomenuti da se to odnosi samo na čisti triptofan bez dodatnih aminokiselina jer je transportni sustav preko krvno-moždane barijere neselektivan i nastaje kompeticija ukoliko su prisutne i druge aminokiseline (Young, 2007).

1.1.2. Uloge serotonina u organizmu sisavaca

Serotonergični sustav čini mrežu unutar središnjeg živčanog sustava i igra važnu ulogu u regulaciji ponašanja, pažnje, spavanja, agresije i disanja. Regulira tjelesnu masu modificiranjem apetita i potrošnje energije, te je na taj način izravno uključen u patogenezu pretilosti (više o tome u 1.2.1.) (Watanabe i sur., 2016.). Niske razine serotonina su povezane sa slabljenjem pamćenja i depresijom. Osim što djeluje kao neurotransmitor, serotonin ima važnu ulogu i u plastičnosti mozga te aktivnost receptora za serotonin igra krucijalnu ulogu u kaskadi događaja koji stoje u podlozi neuroplastičnosti (Lesh i Waider, 2012). Serotonin ima ulogu i faktora rasta tijekom embriogeneze tako što djeluje na rast i formiranje neurona, njihovu migraciju, proliferaciju i apoptozu (Sodhi i Sanders-Bush, 2004.).

Periferni serotonin također ima važnu ulogu u pretilosti, budući da regulira metabolizam glukoze i lipida u raznim metaboličkim organima (Watanabe i sur., 2016.). Najveća količina perifernog serotonina sintetizirana je u enterokromafinskim stanicama probavnog sustava (eng. *gut-derived serotonin*, GDS), te može djelovati lokalno u probavnom sustavu ili može ući u krvotok, te djelovati u drugim metaboličkim organima (npr. jetri). Osim enterokromafinskih stanica, glavni izvori perifernog serotonina čine adipociti i β stanice gušterače (više o tome u 1.2.1.) (El-Merahbi i sur., 2015.).

Postoji izravna veza između mozga i gastrointestinalnog trakta, eng. *brain-gut axis.* To je dvosmjerni sustav komunikacije između mozga i gastrointestinalnog trakta koji povezuje emotivne i kognitivne centre mozga s funkcijama probavnog sustava. Serotonin igra ključnu ulogu u toj poveznici, djelujući kao neurotransmiter u SŽS-u i crijevnom živčanom sustavu koji se nalazi u stijenci organa probavnog sustava (Jenkins i sur., 2016). Uloge serotonina uključuju kontrolu normalne pokretljivosti, sekrecije i osjetljivosti probavnog sustava, te rast stanica. Abnormalnost serotonergične funkcije vodi do sindroma iritabilnog crijeva i drugih inflamatornih i upalnih procesa, te nereguliranog rasta stanica (Hasler, 2009.). Bakterije prisutne u probavnom sustavu utječu na metabolizam triptofana, a time i na serotonergični

sustav. Istraživanja su provedena na laboratorijski uzgojenim miševima bez mikroorganizama u probavnom sustavu. Takve su životinje pokazale povišene razine cirkulirajućeg triptofana, te snižene razine serotonina. Kad su se životinjama u probavni sustav unijele bakterije koje metaboliziraju triptofan, cirkulirajuće razine triptofana su opale, te je došlo do povišenja razine koncentracije hipokampalnog serotonina (Jenkins i sur., 2016). Međutim, crijevna flora probavnog sustava je vrlo raznolika, te su, osim bakterija koje metaboliziraju triptofan, prisutne mnoge druge vrste mikroorganizama koje imaju drugačije učinke na serotonergični sustav. Reigstad i suradnici su 2015. godine pokazali da konvencionalno uzgojeni miševi i miševi s unešenim humanim mikroorganizmima probavnog sustava imaju više razine mRNA gena *Tph1*, veću koncentraciju proteina Tph1 i veće koncentracije serotonina u debelom crijevu od miševa bez mikroorganizama u probavnom sustavu. Potrebna su daljna istraživanja kako bi se bolje razumjeli mehanizmi utjecaja mikroorganizama probavnog sustava na domaćina, te razvili novi lijekovi za poboljšanje ljudskog zdravlja.

1.1.3. Regulacija aktivnosti serotoninskog sustava

Kao što je spomenuto, u mozgu, 5HT djeluje kao neurotrasmitor. Neurotrasmitori su kemijski spojevi pomoću kojih je moguća komunikacija između neurona. Naime, neuroni su međusobno potpuno odvojeni uskim izvanstaničnim prostorom i ne mogu direktno komunicirati. Neuron koji oslobađa neurotransmitor se naziva presinaptički neuron te sadrži specijaliziranu strukturu na kraju aksona koja se naziva aksonski završetak i sadrži vezikule ispunjene molekulama neurotransmitora (sinaptičke vezikule). Kad akcijski potencijal dođe do aksonskog završetka, potiče se spajanje vezikula s membranom aksona i otpuštanje neurotransmitora u sinaptičku pukotinu. Neurotransmitori se ubrzo uklanjanju iz sinaptičke pukotine, a to obavljaju specifični prijenosnici neurotransmitora. Nalaze se u staničnoj membrani i aktivno unose molekule neurotransmitora u unutrašnjost stanice (povratni unos ili eng. *re-uptake* serotonina) (Lovinger, 2008.).

SERT (eng. *sodium- dependent serotonin transporter*) je jedan od monoaminskih prijenosnika odgovoran za prijenos serotonina iz sinaptičke pukotine u presinaptički neuron. Povratni unos serotonina ovisi o koncentraciji K^+ u citoplazmi i koncentracijama Cl^- i Na^+ u izvanstaničnoj tekućini. Prvi korak je vezanje Na^+ za proteinski prijenosnik. Protonirani oblik serotonina ($5HT^+$) se veže za prijenosnik, uz istovremeno vezanje Cl^-. Kompleks Na^+, Cl^- i $5HT^+$ izaziva promjenu konformacije u proteinskom prijenosniku, te se vezane komponente ispuštaju u citoplazmu neurona. Unutarstanični K^+ se veže za SERT i reorijentira proteinski prijenosnik za novi prijenos, te se K^+ tako otpušta izvan stanice. (Gill i sur., 2008.). Životinje

s nefunkcionalnim SERT-om imaju nisku koncentraciju 5HT u krvi, ali se koncentracija 5HT u crijevima ne razlikuje od divljeg tipa. To je zato jer je sposobnost sinteze 5HT zadržana, ali ne i sposobnost trombocita da unose 5HT (Watts i sur., 2012).

Selektivni inhibitori povratnog unosa serotonina (eng. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRIs) su vrsta lijekova koji se koriste u liječenju depresije, anksioznosti, opsesivno-kompulzivnog poremećaja i bulimije. SSRI-i djeluju specifično na koncentraciju serotonina u sinaptičkoj pukotini blokirajući njegov povratni unos u presinaptički neuron putem SERT-a, te na taj način povećavaju koncentraciju serotonina raspoloživu za vezanje na membranske receptore postsinaptičkog neurona (Fitzgerald i Bronstein, 2013.).

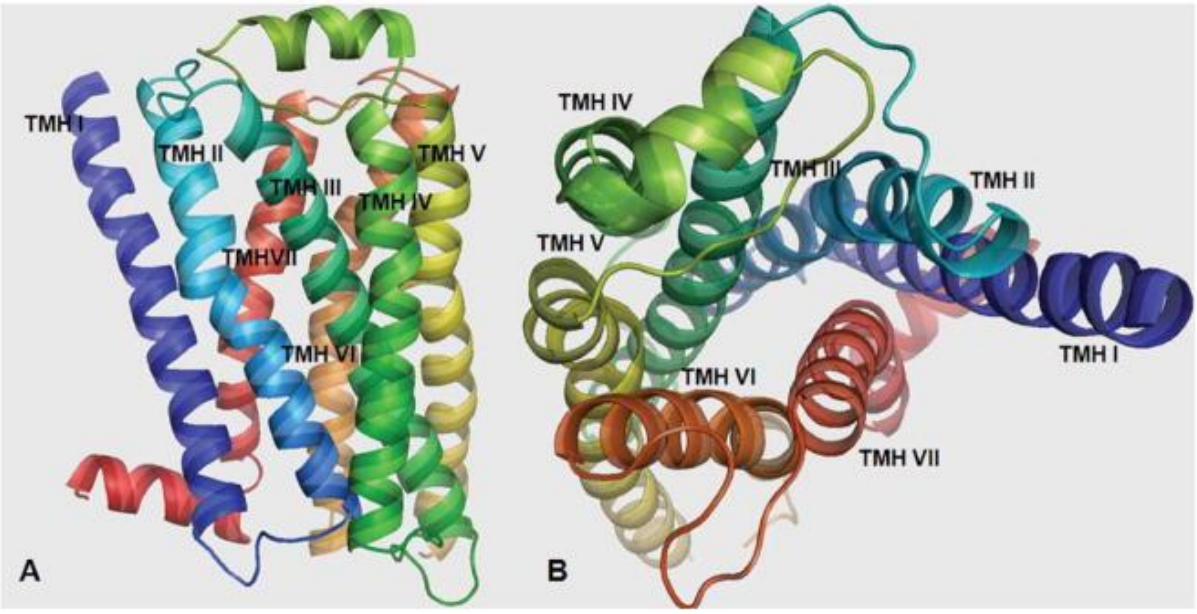
1.1.4. Serotoninski receptori tipa 2C

Učinci serotonina posredovani su njegovim membranskim receptorima kojih ima ukupno 14 tipova, od kojih su 13 metabotropni receptori povezani s G-proteinima (GPCR eng.*G-protein coupled receptors*) i jedan ionotropni receptor (LGIC eng. *ligand-gated ion channel*) (McCorvy i Roth, 2015). Ionotropni receptori specijalizirani su za brzu transdukciju neurotransmiterskih kemijskih signala. U svojoj strukturi sadrže hidrofilnu poru propusnu za specifičnu vrstu iona. Jedini takav serotoninski receptor je 5HT-3 receptor, propustan za katione. Metabotropni receptori (GPCR) su transmembranski proteini specijalizirani za vezanje molekule neurotransmitera i time započinjanje biokemijske reakcije koja može utjecati na različite stanične funkcije. GPCR-ovi sadrže sedam transmembraskih α heliksa (TMH) s N-terminalnim krajem na izvanstaničnoj domeni i C-terminalnim krajem na unutarstaničnoj domeni (Slika 3.) (Rdova- Sintjago i sur., 2012.). GPCR proteini svojom unutarstaničnom domenom stupaju u interakciju s unutarstaničnim proteinima nazvanim G-proteini te ih aktiviraju. G-proteini vežu GTP i GDP. Kad dođe do vezivanja molekule neurotransmitera za GPCR, dolazi do izmjene GTP za GDP, te se G-protein dijeli na dvije podjedinice (α i βγ podjedinice) koje disociraju s proteina. Oslobođene jedinice mogu stupiti u interakciju s različitim proteinima unutar stanice i mijenjati njihovu aktivnost. Obje podjedinice djeluju kao efektori proteina te mijenjaju biokemiju stanice, fiziologiju i gensku ekspresiju (Lovinger, 2008.).

Serotoninski receptori se nalaze u središnjem i/ili perifernom živčanom sustavu (ovisno o tipu receptora). Izmjenjene aktivnosti 5HT receptora su pronađene kod mnogih psihičkih poremećaja uključujući anksioznost, depresiju, napadaje panike, poremećaje prehrane i šizofreniju (Roth, 1994), ali i kod sindroma iritabilnog crijeva, povraćanja, hipertenzije, te

stoga 5HT receptori predstavljaju farmakološku metu za sintezu različitih lijekova (Pytliak i sur, 2011). Na serotonergični sustav SŽS-a djeluju različite psihoaktivne droge poput LSD-a i meskalina koji su agonisti serotoninskog receptora 2C (vidi dalje u tekstu), te derivati amfetamina (MDMA/ ecstasy) koji djeluju na aktivnost serotoninskog prijenosnika (Lovinger, 2008.).

Serotoninski receptor 2C (5HT-2C receptor) je jedan od 13 metabotropnih receptora za serotonin. Receptor je vezan za G-protein, signalizira uz pomoć fosfolipaze C i posreduje ekscitatornu neurotransmisiju. Gen koji kodira receptor smješten je na kromosomu X.



Slika 3. 3D prikaz strukture receptora 5HT2C.

A- Transmembranske domene (TM= transmembranski α heliksi) prikazane s izvanstaničnom domenom gore, a unutarstaničnom domenom dolje

B- Prikaz s izvanstanične strane receptora; vidljivo vezno mjesto liganda (Rdova- Sintjago i sur., 2012.)

5HT-2C receptori eksprimirani su u različitim regijama mozga: hipokampusu, hipotalamusu i korteksu, a koje su uključene u regulaciju sna, apetita, raspoloženja, endokrine regulacije i ovisnosti o drogama. Mnogi različiti psihoaktivni agensi stupaju u interakciju s ovim receptorima kao što su halucinogene tvari, antipsihotici, antidepresivi i antiksiolitici (Herrick-Davis i sur., 2014.). Jedan od takvih lijekova je Olanzapine, antipsihotik koji potiče povećan unos hrane, promijenjenu fizičku aktivnost i količinu energije u miševa koji imaju receptore 2C, za razliku od miševa s izbačenim genom 5Ht2c (eng.*knockout* miševi) koji nisu

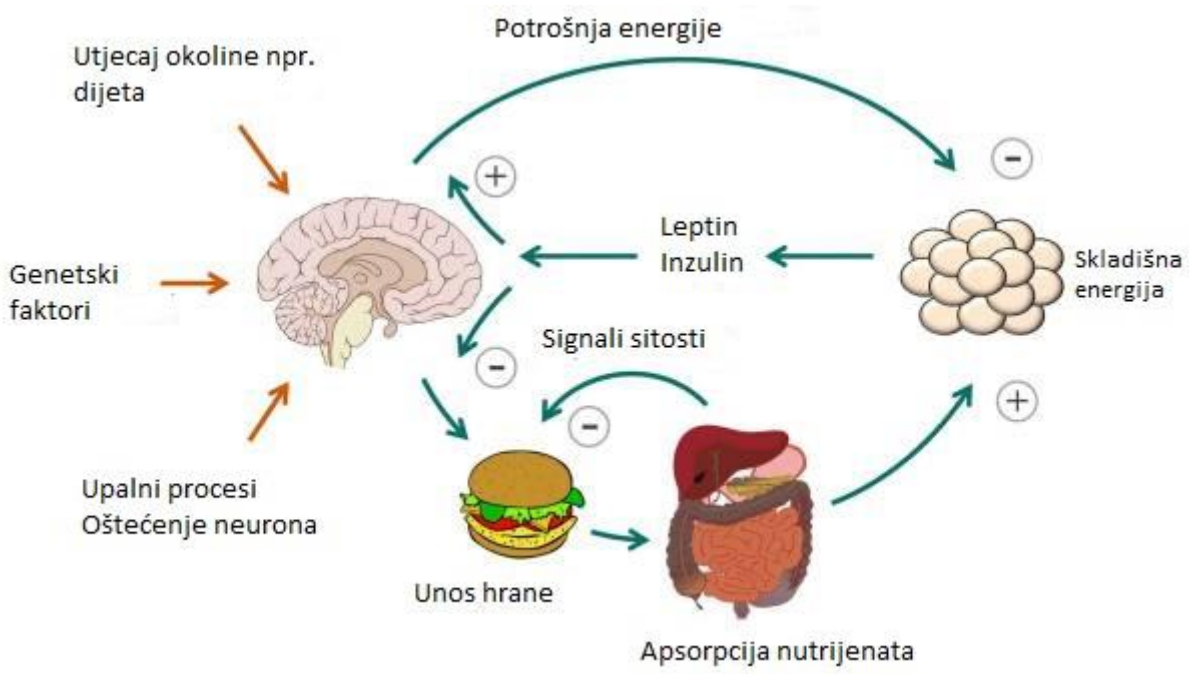
pokazali takve simptome. Može se zaključiti da lijek djeluje i na receptore 2C i da su oni uključeni u takve fiziološke procese (više o lijekovima u 1.2.1.1.) (Lord i sur., 2017.).

Receptor 5HT-2C jedini je serotoninski receptor podložan editiranju pre-mRNA (eng. *precursor messenger* RNA), i to editiranju adenozina u inozin. Specifični enzimi adenozin deaminaze prepoznaju adenozin u regijama dvostruke zavojnice pre-mRNA i deaminiraju ih u inozin koji translacijska mašinerija stanice prepoznaje kao gvanozin. Rezultat je smanjena aktivnost receptora. Kod oboljelih od depresije i žrtava samoubojstva pronađen je povećan broj editiranih mRNA (eng. *messenger* RNA, glasnička RNA) receptora 5HT-2C, kao i kod oboljelih od bipolarnog poremećaja i šizofrenije (Lyddon i sur., 2013.).

1.2. Regulacija energetske ravnoteže organizma

Održavanje energetske ravnoteže zahtijeva regulaciju količine i učestalosti unosa hrane te njezine potrošnje u organizmu. Serotonin u središnjem živčanom sustavu (SŽS) sudjeluje u regulaciji energetske ravnoteže putem raznih serotoninskih receptora, posebice onih smještenih unutar hipotalamusa (Donovan i Tecott, 2013.). Bitne regije u mozgu za održavanje energetske ravnoteže su i moždano deblo i dijelovi korteksa i limbičkog sustava, no mnogi drugi dijelovi su također uključeni i pridonose kompleksnom sustavu regulacije apetita. Kao što je prikazano slikom 4., vidimo da su bitni faktori regulacije unosa hrane i tjelesne mase genetska predispozicija, okolišni čimbenici (fizička aktivnost, dostupnost hrane, nagrađivanje hranom i sl.) te razni neurološki upalni procesi, koji determiniraju količinu tjelesne mase (Guyenet i Schwartz, 2012.).

U perifernom sustavu glavnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže imaju gastrointestinalni trakt, gušterača, jetra, mišići i adipozno tkivo. Sve te komponente su povezane s mozgom putem autonomnog živčanog sustava ili hormonima i metabolitima.



Slika 4. Model regulacije unosa hrane i tjelesne mase putem središnjeg živčanog sustava (SŽS) (Guyenet i Schwartz, 2012.)

Hipotalamus sačinjavaju jezgre (nakupine neurona, eng. *nuclei*) koje su osjetljive na nutrijente i hormone te modificiraju ekspresiju, sekreciju i aktivaciju specifičnih neurotransmitera i neuromodulatora. Lateralne jezgre hipotalamusa služe kao centar za glad, dok ventromedijalne jezgre hipotalamusa djeluju kao centar za sitost (Konturek i sur., 2005.).

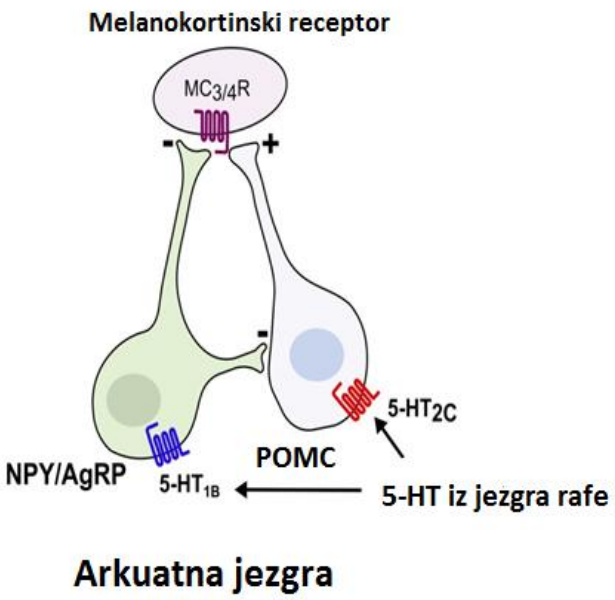
U sisavaca su posebice neuroni arkuatne jegre (eng. *arcuate nucleus*, ARC) uključeni u regulaciju energetske homeostaze. Dijele se u dvije vrste ovisno potiču li ili suprimiraju unos hrane. Neuroni koji oslobađaju neuropeptid Y ili peptid srodan agutiju (AgRP) su ti koji stimuliraju unos hrane, dok neuroni koji oslobađaju proopiomelanokortin (POMC) te transkript reguliran kokainom i amfetaminom (CART) inhibiraju unos hrane. Neuroni koji oslobađaju POMC sintetiziraju i oslobađaju melanokortinske peptide kao što je α-MSH (eng. *α-melanocyte stimulating hormone*) koji je agonist melanokortinskog receptora tipa 4 (MC4R) te djeluje anoreksigeno (inhibira unos hrane), a stimuliran je leptinom i inzulinom. Grelin (kojeg izlučuju stanice želuca), upravo suprotno, aktivira neurone NPY/AgRP što rezultira porastom unosa hrane i smanjenjem energetske potrošnje. Ti neuroni izlučuju GABA (eng.*γ-aminobutyric acid*) inhibitorski neurotransmiter koji djeluje oreksigeno (potiče apetit) (Dieguez i sur., 2011.). Osim navedenih hormona, nutrijenti kao što su masne kiseline,

glukoza i aminokiseline se također vežu na receptore u ARC-u te reguliraju osjećaj gladi odnosno sitosti (Guyenet i Schwartz, 2012.).

Adipozno tkivo je metabolički dinamičan organ, primarno je mjesto za skladištenje suvišne energije, a ponaša se i kao endokrini organ sposoban za sintezu biološki aktivnih spojeva koji reguliraju metaboličku homeostazu. U sisavaca razlikujemo dvije vrste adipoznog tkiva: bijelo i smeđe. Smeđe masno tkivo (eng. *brown adipose tissue,* BAT) igra bitnu ulogu u termogenezi. Pri rođenju ga imamo u najvećoj količini, a s godinama se smanjuje te u odraslih čini samo oko 1% ukupne tjelesne težine. Boju mu daju gusto pakirani mitohondriji i izrazita vaskularizacija. Bijelo adipozno tkivo (eng. *white adipose tissue,* WAT) rasprostranjeno je po cijelom tijelu i služi kao mehanička zaštita, olakšava pokretanje mišića i ima bitnu ulogu u održavanju tjelesne temperature. Ima sposobnost sekrecije nekoliko hormona, faktora rasta, enzima i citokina, te sadrži receptore za mnoge od faktora uključenih u procese koji reguliraju unos hrane, utrošak energije, metaboličku homeostazu, imunitet i održavanje krvnog tlaka. Jedan od hormona koje izlučuje bijelo adipozno tkivo je leptin koji je, kako je već spomenuto, bitan za homeostazu metabolizma. Kod nekih ljudi nalazimo mutacije leptina zbog čega ne osjećaju sitost, što vodi do nemogućnosti kontroliranja unosa hrane i izrazitog povećanja tjelesne težine (Coelho i sur., 2013.).

1.2.1. Uloga 5HT i receptora 5HT-2C u regulaciji energetske ravnoteže organizma

Serotonin se smatra jednom od glavnih meta lijekova za pomoć pri mršavljenju s obzirom na povezanost količine serotonina u tijelu sa unosom hrane. Inhibicijom sinteze serotonina u mozgu inhibitorom triptofan hidrozilaze tipa 2 (TPH2), potiče se debljanje u štakora. Možemo zaključiti da serotonin u SŽS-u djeluje kao anoreksigeni neurotransmiter na način da aktivira POMC neurone vezujući se na receptore 5HT-2C, inhibira NPY/AgRP neurone putem receptora 5HT-1B (Slika 5.) (Namkung i sur., 2015.).



Slika 3. Serotonin iz jezgara rafe suprimira unos hrane aktivirajući proopiomelanokortinske (POMC) neurone putem receptora 5HT-2C i inhibirajući neurone NPY/AgRP putem receptora 5HT-1B u arkuatnoj jezgri hipotalamusa (Wyler i sur., 2017.)

Periferni 5HT ima suprotan učinak od centralnog 5HT-a, što se tiče regulacije tjelesne težine. Kao što je već spomenuto, serotonin sintetiziran u enterokromafinskim stanicama probavnog sustava može djelovati lokalno ili ulazi u krvotok. U krvotoku, 98% serotonina unosi u unutrašnjost trombocita, a 2% serotonina je slobodno i može djelovati kao hormon u raznim metaboličkim organima. U bijelom masnom tkivu potiče lipolizu, te se oslobađaju masne kiseline i glicerol u krvnu plazmu. U adipocitima se sintetizira serotonin koji regulira lipogenezu: potiče je putem receptora 5HT-2A, a suprimira putem receptora 5HT-2B. (El-Merahbi i sur., 2015.). Studije su pokazale da inhibicija TPH1 štiti od pretilosti i potiče termogenezu u BAT-u (Oh i sur., 2015.).

Mala količina 5HT-a sintetizira se u Langerhansovim otocima u gušterači gdje je potreban za regulaciju sekrecije inzulina (Wyler i sur., 2017.). Inzulin potiče unos glukoze u perifernim stanicama, sintezu glikogena i proteina i lipogenezu *de novo*, dok u isto vrijeme suprimira glukoneogenezu i lipolizu. Miševi s inhibiranom TPH1 intolerantni su na glukozu i pokazuju blaži tip dijabetesa (El-Merahbi i sur., 2015.).

U stanju sitosti, jetra prevodi glukozu u glikogen i aktivira sintezu lipida *de novo*. Kod gladovanja, obrnuto, jetra otpušta glikogen te potiče glukoneogenezu. GDS stimulira glukoneogenezu i inhibira unos glukoze tijekom stanja gladovanja (Wyler i sur., 2017.).

Korištenje selektivnih inhibitora povratnog unosa serotonina (SSRI) dovodi do privremenog povećanje tjelesne težine. Nekoliko studija je pokazalo povećanu sintezu serotonina i koncentraciju serotonina u krvi kod slučajeva pretilosti i dijabetesa (Namkung i sur., 2015.).

Miševi s izbačenim genom za receptor 5HT-2C skloni su pretilosti, pokazuju hiperglukagonemiju, hiperglikemiju, rezistenciju na inzulin i hiperplaziju (Berglund i sur., 2013.). U miševa tretiranih neurotoksinima selektivnim za receptor 5HT-2C također je zabilježeno povećanje tjelesne mase, a tretman je rezultirao deplecijom serotonina u SŽS-u. Pokazano je i da varijanta receptora 5HT-2C s nepravilnom funkcijom pridonosi hiperplaziji i pretilosti u pacijenata s Prader-Wilijevim sindromom (Kishore i Stamm, 2006.).

S obzirom da receptori 5HT-2C reguliraju homeostazu glukoze, mogu poslužiti kao meta za liječenje dijabetesa tipa 2 (Berglund i sur., 2013.). Studije su pokazale da agonisti receptora 5HT-2C poboljšavaju tolerantnost na glukozu i smanjuju koncentraciju inzulina u plazmi kod pretilosti i dijabetesa tipa 2. Općenito poboljšavaju homeostazu glukoze, utrošak energije, lokomotornu aktivnost i tjelesnu težinu. Delecija samo jednog gena koji kodira za receptor 5HT-2C uzrokuje sve prije navedene tegobe vezane za metabolizam glukoze i regulaciju unosa hrane (Zhon i sur., 2007.).

D-fenilfluramin (d-FEN) je lijek za mršavljenje koji je bio popularan 90-ih godina, međutim povučen je s tržišta jer je uzrokovao komplikacije sa srcem i plućima (Berglund i sur., 2013.). Djelovao je na način da je povećavao razinu serotonina stimulirajući otpuštanje serotonina u sinaptičku pukotinu i vezanje na receptore 5HT-2C. Problem je bila nedovoljna selektivnost; aktivirao je i druge serotoninske receptore te pokretao neželjene fiziološke reakcije. Lorcaserin je danas jedini odobren 5HT lijek za tretiranje ekstremne pretilosti kod ljudi. Vrlo je selektivan za receptor 5HT-2C i njegov agonist. Ima vrlo slabi afinitet za ostale podtipove 5HT receptora koji su povezani s kardiovaskularnim bolestima, te tretman lijekom nema ozbiljnijih nuspojava, kao što je bio slučaj s d-fenilfluraminom (Hurren i Berlie, 2011.). U određenim dozama, Lorcaserin poboljšava glikemijsku kontrolu bez gubitka tjelesne mase u miševa oboljelih od dijabetesa tipa 2, te predstavlja potencijalni lijek za ovu bolest koja je sve više u porastu (Burke i sur., 2017.)

Melanokortinski signalni put se smatra nizvodnim putem 5HT-2C receptora i posreduje efekte tog receptora na ponašanje vezano za unos hrane. POMC neuroni su koeksprimirani s 5HT-2C receptorima i primaju informacije sa serotoninskih živčanih završetaka. Znači 5HT lijekovi (uključujući d-FEN i Lorcaserin) aktiviraju POMC neurone putem mehanizama povezanih s 5HT-2C receptorima (Burke i sur., 2017.). Također, agonisti 5HT-2C receptora stimuliraju POMC ekspresiju u neuronima arkuatne jezgre, pa možemo zaključiti da su aktivni melanokortinski putevi potrebni za regulaciju ravnoteže energije putem 5HT-2C receptora (Xu i sur, 2008.).

Ne može se još sa sigurnošću reći mijenja li gladovanje ili povećan unos hrane koncentraciju serotonina u krvi s obzirom na različitost rezultata dosadašnjih provedenih studija stoga to još uvijek ostaje otvoreno, i vrlo interesantno pitanje. (Namkung i sur., 2015.).

1.3.WISTAR-ZAGREB 5HT ŠTAKOR

U Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković razvijen je model štakora s promijenjenom serotoninskom homeostazom nazvan štakor Wistar- Zagreb 5HT (WZ-5HT) (Čičin-Šain i Jernej, 2010.) Wistar-Zagreb 5HT štakori sastoje se od dvije podlinije, 5HT-visoke (hiperserotonergične) i 5HT-niske (hiposerotonergične) podlinije, s konstitucijski promijenjenim vrijednostima aktivnosti trombocitnog serotoninskog prijenosnika te vrijednostima razine trombocitnog serotonina (Čičin-Šain i Jernej, 2010.). Razvoj modela započet je selektivnim parenjem štakora soja Wistar prema ekstremnim vrijednostima razine trombocitnog serotonina (eng. *platelet serotonin level*, PSL) (Jernej i Čičin-Šain,1990.) Selektivnim parenjem životinja s ekstremno niskim, odnosno visokim vrijednostima razine trombocitnog 5-HT kroz više generacija, dobivene su dvije odvojene podlinije štakora s konstitucijski visokom (5HT-visoka podlinija, eng. *high-5HT subline*), odnosno niskom (5-HT-niska podlinija, eng. *low-5HT subline*) vrijednošću ovog parametra. (Čičin-Šain i sur., 1995., prema Čičin-Šain i Jernej, 2010.).

Osim promjena u perifernoj homeostazi serotonina, 5HT-niska i 5HT-visoka podlinija štakora WZ-5HT također pokazuju promjene i u centralnom serotonergičnom sustavu, na što upućuju neurokemijska i bihevioralna istraživanja. Životinje tih dviju podlinija značajno se razlikuju i u fenotipu: tjelesnoj masi, nakupljanju masnog tkiva, unosu hrane i metabolizmu glukoze (Erjavec i sur., 2016.). Životinje iz visoke 5-HT podlinije imaju veću tjelesnu masu (BW od eng. *body weight*), indeks tjelesne mase (omjer tjelesne mase i duljine tijela, BMI od

eng. *body mass index*), te značajno veću količinu adipoznog tkiva od životinja iz niske 5-HT podlinije (Kesić i sur., 2014.).

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja je usporediti ekspresiju gena za serotoninski receptor tipa 2C (5HT2C) između 5HT-niske i 5HT-visoke podlinije štakora WZ-5HT:

- U hipotalamusu
- U gonadnom bijelom masnom tkivu

Dobiveni rezultati doprinijeti će molekularnoj karakterizaciji navedenog animalnog modela te boljem razumijevanju molekularnih mehanizama regulacije tjelesne mase.

3.MATERIJALI I METODE

3.1.MATERIJALI

3.1.1.Animalno tkivo

U istraživanju je korišteno prethodno izdvojeno tkivo štakora Wistar-Zagreb dobivenih selektivnim uzgojem u Laboratoriju za neurokemiju i molekularnu neurobiologiju Zavoda za molekularnu biologiju Instituta Ruđer Bošković. U istraživanje su bili uključeni samo mužjaci i to 10 iz 5-HT-niske i 10 životinja iz 5-HT-visoke podlinije. Za istraživanje se analiziralo tkivo hipotalamusa i gonadnog bijelog masnog tkiva (gWAT, od eng. *gonadal white adipose tissue*). Neposredno nakon žrtvovanja životinje, tkivo se izdvojilo uhodanim postupcima i pohranilo u tekućinu za očuvanje RNA (RNAlater, Qiagen) do daljne obrade.

3.1.2.Kemikalije i otopine

- Homogenizacija tkiva i izolacija RNA se provela uz pomoć komercijalnog kompleta RNeasy Mini Kit (Qiagen) koji sadrži:

- RLT pufer (eng. *lysis buffer*), pufer za lizu
- RPE pufer (eng.*wash buffer*), pufer za ispiranje
- *Rneasy spin column*
- DNaza I
- RDD pufer
- RW1 pufer (eng.*wash buffer*), pufer za ispiranje
- Voda bez RNaza (eng.*RNeasy- free water*)
- Epruveta za skupljanje

- Korištene kemikalije izvan kompleta:

- β-merkaptoetanol (β-ME)- koristi se za razaranje disulfidnih mostova
- Etanol (96%)
- voda tretirana DEPC-om (eng. *diethyl pyrocarbonate*), sterilna kupovna voda bez nukleaza

- Za reverznu transkripciju korišten je komplet High Capacity RNA- to-cDNA Syntesis Kit (Life Technologies) prema preporukama izvođača

- Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (RT-qPCR) se provela pomoću Syber Green Master Mix-a (Applied Biosystems)
- Za izvođenje elektroforeze:

- agaroza

-TAE pufer (*Tris-acetate-EDTA*, 20x)

- etidij bromid (0.1µL/mL)

-*Midori Green Advance DNA Stain* (Nippon Genetics Europe), boja za vizualizaciju

- molekularna ljestvica 100pb (Sigma)

3.1.3.Tehnička oprema

- Aparat za homogenizaciju (Gentle Macs Dissociater, Miltenyi Biotec)
- Spektrofotometar za određivanje čistoće i koncentracije uzorka (Nanodrop)
- Aparat za PCR (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, SAD)
- Aparat za PCR u stvarnom vremenu (7300 Real Time PCR System, Applied Biosystems)

3.1.4.Kompjutorski program

- GraphPad Prism za statističku analizu

3.2.METODE

3.2.1. Homogenizacija tkiva i izolacija

Postupak izolacije je isti za tkivo hipotalamusa i bijelog masnog tkiva (gWAT). Svi koraci su izvedeni na sobnoj temperaturi (RT). Centrifugiranje je izvedeno na 20-25ºC (pažljivo da temperatura ne bi pala ispod 20ºC). Prije samog pokusa, sav pribor korišten za izolaciju RNA je tretiran preko noći s DEPC tretiranom vodom u svrhu inaktivacije RNA-nukleaza. Također su pripremljene otopine, po uputama proizvođača, koje su korištene u pokusu: 10µL β-ME pomiješano je s 1mL RLT pufera iz RNeasy Mini Kit-a. Tako pripremljena otopina može stajati na RT i do mjesec dana. Dodano je 4 volumena etanola (96%) u RPE pufer (također iz kompleta) kako bi dobili radnu otopinu. Priređena je DNase I stock otopina na način da se lipofilna DNase I otopi u 550 µL RNase-free vodi- paziti kad se otvara poklopac da ne bi došlo do gubitka praha. Otopina je izmiješana laganim okretanjem (nikako na vorteks), te alikvotirana i pohranjena na -20ºC. Pripremljen je i 70%-tni alkohol.

Za homogenizaciju korišteno je 20 uzoraka tkiva hipotalamusa i 20 uzoraka gonadnog bijelog masnog tkiva. Uzeti su komadići gonadnog masnog tkiva prosječne mase 77mg (raspon 64-79mg) i tkiva hipotalamusa prosječne mase 32 mg (raspon 21-42mg). Izolacija svakog tkiva se radila zasebno. Navedeni volumeni otopina su korišteni za izolaciju iz tkiva hipotalamusa (oko 32mg), a za izolaciju iz masnog tkiva prilagođeni su volumeni s obzirom na veću masu. Tkiva su prebačena u M-tube, te je dodano 700µL prethodno pripremljene otopine RLT pufera i β-ME. Homogenizacija se provela na aparatu gentleMACS Dissociator, a korišten je program RNA 02.01. Nakon homogenizacije, lizat je oboren na centrifugi (15 sekundi na 1100 rpm Hettich, Njemačka), zatim je sav lizat prebačen u novu epruvetu tretiranu s DEPC i pohranjen na -20ºC do sutradan kad je nastavljeno s pokusom.

Idući dan, prije početka izolacije, izmiješan je sadržaj epruvete na vorteksu, zatim oboren u centrifugi 3 minute na 16100xg (Eppendorf Research, Njemačka). Supernatant je pažljivo uklonjen pipetiranjem (600 µL) i prebačen u novu epruvetu tretiranu DEPC-om. Nakon toga je slijedila procedura za izolaciju RNA: dodan je 1 volumen 70%-tnog etanola (600 µL) na lizat i pomiješano pipetiranjem. 600 µL uzorka, uključujući i talog koji je nastao, prebačeno je na RNeasy kolonu smještenoj u epruvetu za kolekciju volumena 2 mL. Poklopac je lagano zatvoren i centrifugirano je 15 sekundi na 8000xg (Eppendorf Research, Njemačka). Tekućina koja je prošla kolonu je bačena. Postupak je ponovljen s ostatkom uzorka. Zatim je

slijedila digestija DNazom na koloni: dodano je 350 µL RW1 pufera na RNeasy kolonu, zatvoren čep, te centrifugirano 15 sekundi na 8000xg (Eppendorf Research, Njemačka). Tekućina koja je prošla kolonu je bačena. Dodano je 500 µL RPE pufera na RNeasy kolonu, zatvoren čep, te centrifugirano 15 sekundi na 8000xg (Eppendorf Research, Njemačka), bačena tekućina koja je prošla kroz kolonu (ovaj korak je za ispiranje membrane). Postupak je ponovljen, ali s kraćim trajanjem centrifugiranja (2 minute). Duže centrifugiranje suši membranu, osiguravajući da se etanol ne prenese u sljedeće korake (to je vrlo bitno, da ne bi interferirao s RNA). Nakon centrifugiranja, RNeasy kolona je pažljivo uklonjena, kako ne bi došla u kontakt s propuštenom tekućinom. RNeasy kolona je stavljena u novu epruvetu za kolekciju volumena od 2 ml, zatvoren je poklopac te centrifugirano 1 minutu na 16100xg (Eppendorf Research, Njemačka). Nakon toga je RNeasy kolona stavljena u novu epruvetu za kolekciju volumena od 1.5 mL, dodano je 35 µL vode bez RN-aza direktno na membranu kolone i zatvoren poklopac. Inkubacija je trajala 10-15 minuta nakon čega je slijedila centrifuga 1 minutu na 8000xg (Eppendorf Research, Njemačka) kako bismo eluirali RNA.

Nakon izolacije RNA, izmjerena je koncentracija i čistoća RNA na spektrofotometru (*NanoDrop*) i provedena elektroforeza na gelu. Za ta dva koraka ispipetirano je 5 µL uzorka u novu epruvetu, a ostatak je pohranjen na -80ºC. Za elektroforezu pripremljen je 1.5%-tni gel (65mL pufera (1xTAE) + 0.975mg agaroze), a u jažice je ispipetirano 2µL uzorka i 1 µL pufera za nanošenje uzorka. Etidijev bromid je korišten za vizualizaciju u volumenu od 6.5 µL na 65mL gela.

3.2.2. Reverzna transkripcija

Reverzna transkripcija provedena je koristeći komplet High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems) prema uputstvima proizvođača. Uzorci su napravljeni u unikatu, a standard u duplikatu. Kako bi se smanjile pogreške u pipetiranju, za sve uzorke pripremi se skupna otopina (eng. *master mix*) zajedničkih sastojaka. Sastav reakcijske smjese prikazan je tablicom 1. Ukupni volumen reakcijske smjese iznosio je 20 µL. Količina RNA po reakciji iznosila je 1333 ng za gonadalno masno tkivo i 1400 ng za hipotalamus. Da bismo provjerili moguću prisutnost zaostale genomske DNA u uzorcima RNA, pripremljena je i kontrolna reakcija bez dodatka enzima reverzna transkriptaza (-RT).

Tablica 1. Sastav reakcijske smjese za reverznu transkripciju i uvjeti reakcije

sastojak	V(µL)/uzorku	V(µL)/uzorku
	+RT	-RT
2x RT pufer	10µL	10µL
20x enzim	2µL	/
uzorak	1333* /1400 ng**	1333* /1400 ng**
H2O	varijabilno	varijabilno
Ukupni volumen	20µL	20µL

*za masno tkivo, **za hipotalamus

Reakcija reverzne transkripcije se odvijala 60 min pri 37 °C, nakon čega je reakcijska smjesa zagrijavana 5 min pri 95 °C kako bi se inaktivirala reverzna transkriptaza. Dobivena cDNA razrijeđena je do koncentracije od 5 ng/µL te su alikvoti pohranjeni na - 80ºC.

3.2.3. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu

Pojedini fragmenti cDNA umnoženi su metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu (eng. *real time reverse transcription-polymerase chain reaction,* RT-PCR) uz korištenje SYBR Green tehnologije. SYBR Green je boja koja fluorescira kada je vezana na dvolančanu molekulu DNA te na taj način omogućava kontinuirano praćenje nastajanja produkata lančane reakcije polimerazom (u stvarnom vremenu).

Postupak započinje vađenjem uzoraka i početnica (Tablica 2.) iz zamrzivača i otapanjem na ledu. Nakon što se otope, potrebno ih je izmiješati na vorteksu i oboriti na centrifugi. Slijedi priprema razrjeđenja standarda: korišteno je 5 standarda (S_1,S_2,S_3,S_4 i S_5), a pripremali su se na način da je prvi standard (S_1) originalni standard, a S_2-S_5 pipetiranjem S_{n-1} i vode (eng. *RNase free water*) u omjeru 1:2. Nakon toga slijedi priprema skupne otopine (eng. *Master Mix,* MM) koja se napravi za sve uzorke, a onda odgovarajući volumen pipetira u svaku jažicu odgovarajuće pločice za PCR. Sastav reakcijske smjese prikazan je u tablici 3. Reakcija za svaki uzorak je rađena u triplikatu, standardi u duplikatu.

Tablica 2. Početnice

Gen	Oznaka početnice	Sekvenca 5'→3'	Veličina produkta (bp)
GAPDH	rnGAPDH-f rnGAPDH-r	F: TGCCCCCATGTTTGTGATG R: TGGTGGTGCAGGATGCATT	84
beta-aktin	rnACTIN-f rnACTIN-r	F:GCGCAAGTACTCTGTGTGGA R:ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	61
5HTR2c	5HTR2c-f 5HTR2c-r	F:GCAAGCATAGGCCAACGAAC R:TTAGGTGCATCAGGAGCGAG	156

Tablica 3. Sastav reakcijske smjese za PCR. Jednak sastav reakcijske smjese korišten je i za uzorke hipotalamusa i gWAT-a.

sastojak	V(µL)/ uzorku
Pufer (2x Syber Green)	6
uzvodna početnica (10µM)	0.6
nizvodna početnica (10µM)	0.6
H_2O	1.8
cDNA (5 ng/ µL)	3
Ukupni volumen	12

Prvo se napravi zajednička smjesa (MM) pufera, početnica i vode za sve uzorke. Na 9 µL zajedničke smjese doda se 3 µL cDNA, zalijepi se folija na pločicu, centrifugira i pokrene uređaj za Real-Time PCR na odgovarajući program:

1. korak – 1 ciklus 10 min pri 95 °C (denaturacija cDNA i aktivacija Taq polimeraze);

2. korak – 40 ciklusa od 15 sek pri 95 °C, 1 min pri 60 °C (u ovom koraku prikupljaju se podaci o fluorescenciji);

3. korak – 1 ciklus 15 sek pri 95 °C, 1 min pri 60 °C, 15 sek pri 95 °C, 15 sek pri 60 °C.

Da bi se provjerila specifičnost reakcije, provedena je elektroforeza na 3% agaroznom gelu pripremljenom dodatkom 0.9g agaroze u 30 mL 1xTAE pufera. Za vizualizaciju se koristila boja Midori u volumenu 1.5 µL na 30 mL gela. Uzorcima u jažicama na ploči dodano je 2µL boje, na gel nanešeno 10µL uzorka i 5µL markera Sigma.

Normalizacija je provedena da bi se dobila relativna ekspresija serotoninskog receptora 2C, a kao referentni geni koristili su se beta-aktin (Actb) i gliceraldehid-trifosfat dehidrogenaza (Gapdh). Dakle, osim za serotoniski receptor 2C, u oba tkiva proveli smo qPCR i za b-aktin i gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu prema prethodno uhodanim protokolima. Ekspresija 5HT receptora tipa 2C normirana je s obzirom na b-aktin, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenazu te srednju vrijednost ta dva referentna gena.

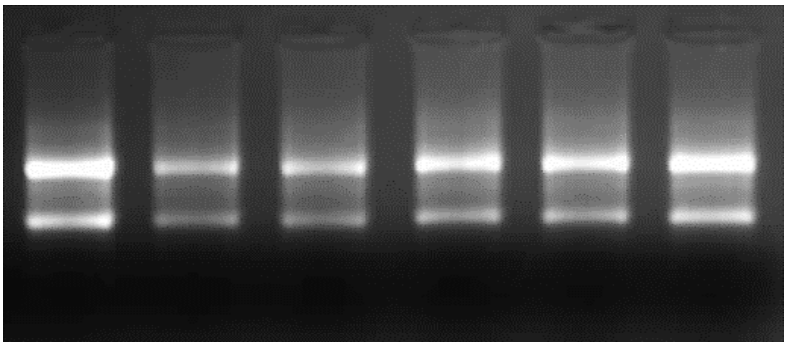
3.2.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišten je program GraphPad Prism. Normalnost raspodjele testirana je Shapiro-Wilkovim testom. Statistička značajnost razlika između skupina testirana je dvostranim t-testom u slučaju normalne raspodjele odnosno dvostranim Mann-Whitneyevim testom u slučaju kada raspodjela nije bila normalna. Prag značajnosti postavljen je na 0.05.

4.REZULTATI

4.1. Izolacija RNA

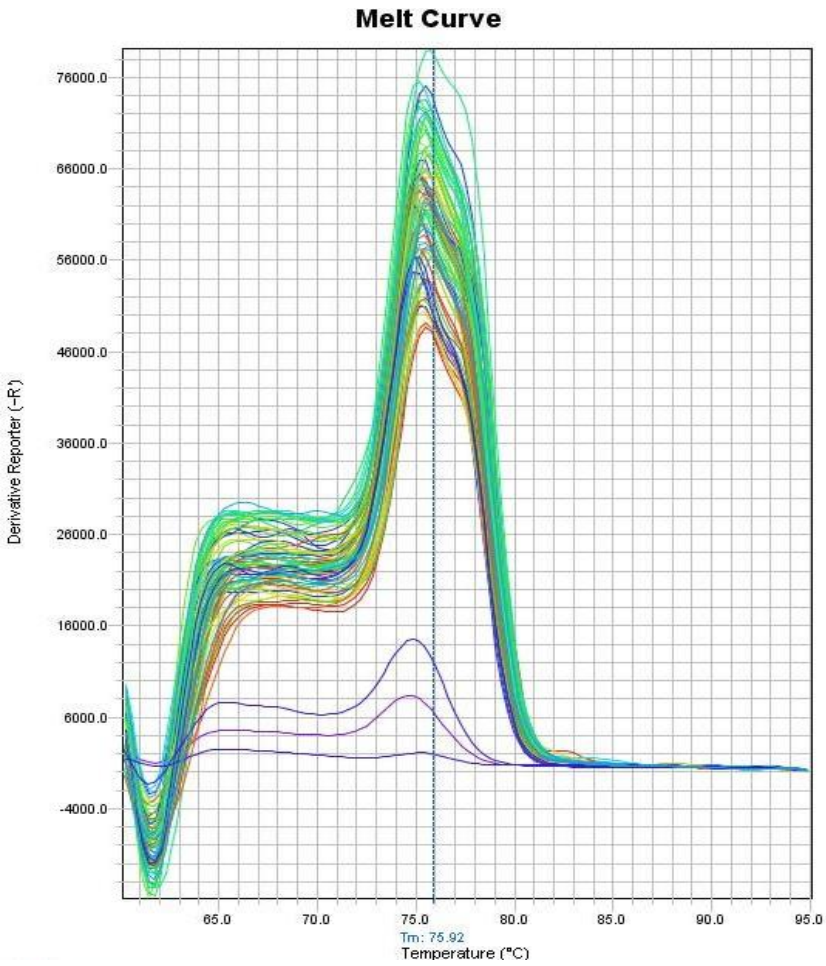
RNA je izolirana iz tkiva hipotalamusa i gonadalnog masnog tkiva mužjaka štakora sojeva 5HT-niske i 5HT-visoke podlinije koji se razlikuju u razini serotonina u krvi . Analizirani su uzorci tkiva iz ukupno 20 životinja, po 10 iz svake skupine (40 uzoraka RNA). Nakon izolacije izmjerena je koncentracija i čistoća RNA na Nanodropu. Cjelovitost svih uzoraka RNA provjerena je elektroforezom na 1%-tnom agaroznom gelu (Slika 6.).



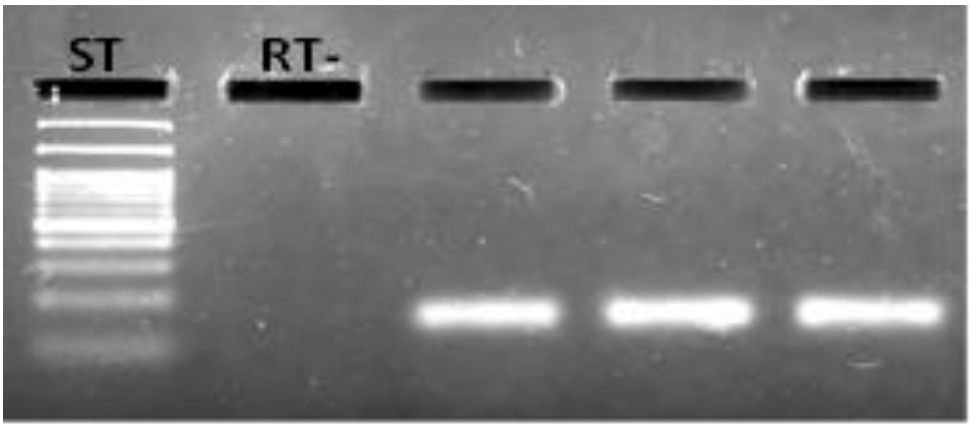
Slika 6. Reprezentativna slika elektroforeze uzoraka RNA izolirane iz gonadalnog masnog tkiva. Elektroforeza je provedena je na 1%-tnom agaroznom gelu pri naponu od 60 V tijekom 45 minuta. Gel je bojan etidij-bromidom, bojom koja se interkalira u lanac nukleinskih kiselina, te ih čini vidljivima pri izlaganju gela UV zrakama. Gornja vrpca odgovara 28S RNA, donja 18S RNA. Diskretne vrpce 28S i 18S upućuju na cjelovitost RNA.

4.2.Reverzna transkripcija i lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (RT-qPCR)

Specifičnost qPCR-a provjeravana je analizom krivulje taljenja (Slika 7.) i elektroforezom reprezentativnih produkata qPCR-a na 3 %-tnom agaroznom gelu (Slika 8.). Postojanje samo jednog vrška na krivulji taljenja ukazuje na specifičnost reakcije (Slika 7.). Manji vrškovi na Slici 7. odgovaraju RT- kontroli. Broj ciklusa u kojem se detektirao signal (Cq, od eng. *quantification cycle*) bio je za RT- kontrolu više od 15 ciklusa viši od Cq odgovarajućeg uzorka te nije utjecao na kvantifikaciju odgovarajuće cDNA. Na Slici 8. vidljiva je samo jedna vrpca očekivane dužine (156 pb), što također potvrđuje specifičnost qPCR-a, dok signal u RT- kontroli nije bio vidljiv.



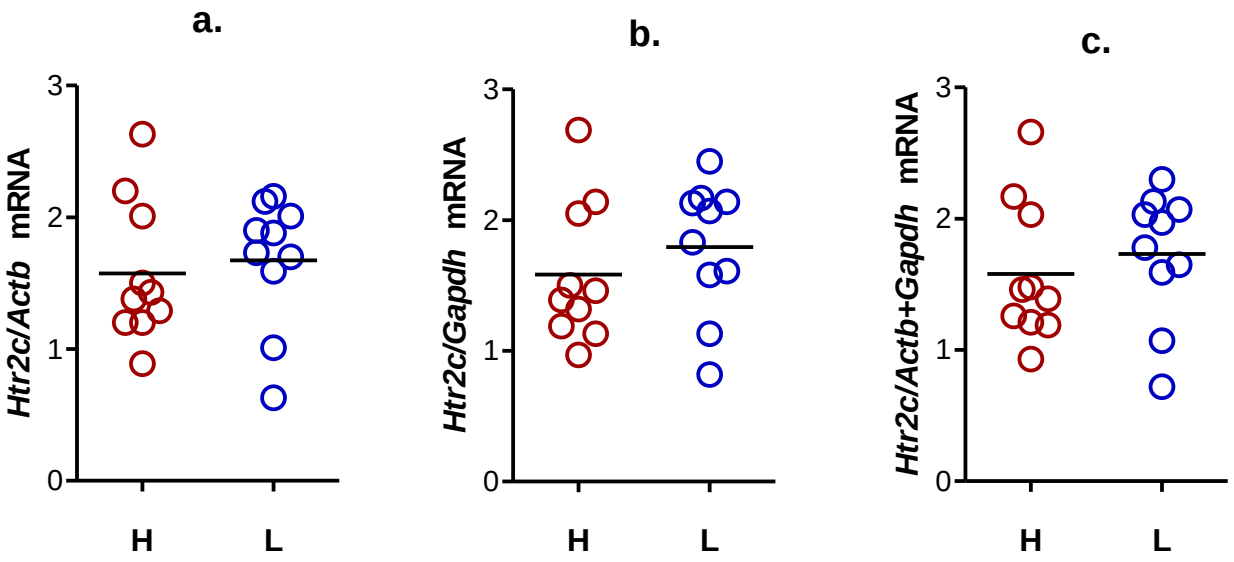
Slika 7. Krivulja taljenja produkata umnožavanja cDNA za serotoninski receptor 2C metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu. Krivulja taljenja prikazuje fluorescenciju u odnosu na temperaturu, a postojanje samo jednog vrška upućuje na specifičnost reakcije (prisutnost samo jednog produkta).



Slika 8. Elektroforeza reprezentativnih produkata umnožavanja cDNA za serotoninski receptor 2C metodom lančane reakcije polimerazom u stvarnom vremenu.
Elektroforeza je provedena na 3%-tnom agaroznom gelu, pri naponu od 60V tijekom 25 minuta. Gel je bojan bojom Midori, manje štetnom alternativom etidij bromida.Slikano na UVITEC aparatu (UVITEC *Chemiluminescence Documentation Systems*). ST, molekularna ljestvica (100 pb); RT-, kontrolni uzorak bez reverzne transkriptaze, u svrhu isključenja lažno pozitivnih rezultata kontaminacije genomskom DNA. Dobivena je očekivana dužina produkata qPCR od 156pb prisutna u tri neobilježene jažice.

4.3. Ekspresija mRNA za 5HT receptor 2C u hipotalamusu štakora WZ-5HT

Reakcija kvantitativnog PCR-a za 5HT receptor tipa 2C s uzorcima hipotalamusa provedena je u dva neovisan pokusa, svaki u triplikatu. Dobiveni su slični rezultati, te su prikazane srednje vrijednosti ta dva pokusa. Crvenom bojom su označeni uzorci 5HT-visoke podlinije, a plavom bojom uzorci 5HT-niske podlinije štakora WZ-5HT (Slika 9.), a usporedba rezultata prikazana je i Tablicom 4. Iz prikaza rezultata vidljivo je da nema značajne razlike u ekspresiji mRNA za 5HT receptor 2C između dviju podlinija.



Slika 9. Relativna ekspresija mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u hipotalamusu životinja iz 5HT-visoke (H) i 5HT-niske (L) podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti ekspresije normalizirane s obzirom na (**a**) β-aktin, (**b**) gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu i (**c**) srednju vrijednost ova dva gena. Horizontalna linija označava srednju vrijednost.

Tablica 4. Usporedba relativne ekspresije mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u hipotalamusu životinja iz 5HT-visoke i 5HT-niske podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti ekspresije normalizirane s obzirom na srednju vrijednost dva referentna gena (β-aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu).

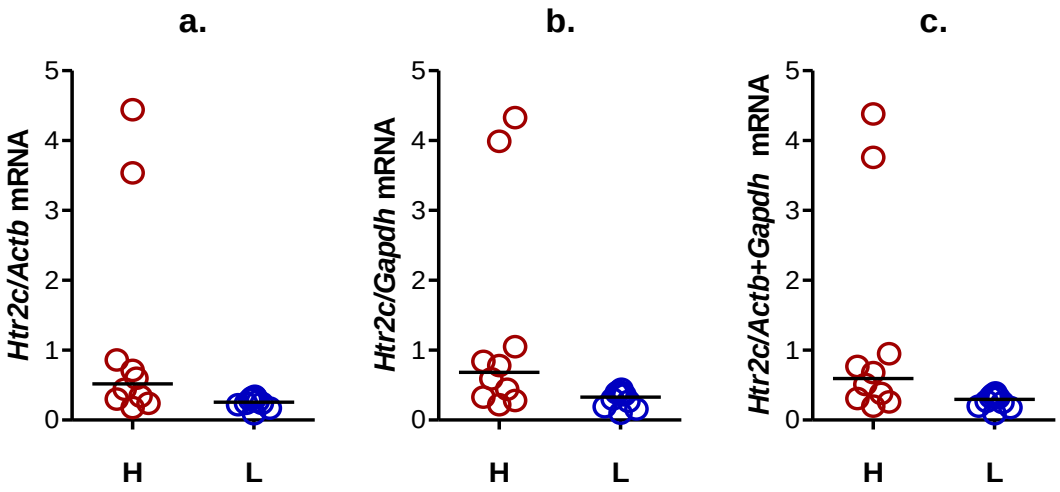
Podlinija štakora	**N**	**Normalnost distribucije**	**Srednja vrijednost**	**Standardna devijacija**	**Medijan**	***P*-vrijednost***
5HT-visoka	10	da	1.58	0.54	1.43	*0.5171*
5HT-niska	10	da	1.73	0.50	1.88	

N – broj životinja

*t-test

4.4. Ekspresija mRNA za 5HT receptor 2C u gonadnom masnom tkivu štakora WZ-5HT

Reakcija kvantitativnog PCR-a s uzorcima gonadnog bijelog masnog tkiva provedena je u tri neovisna pokusa, svaki u triplikatu. Dobiveni su slični rezultati, te su prikazane srednje vrijednosti sva tri pokusa (Slika 10.) Kod sva tri pokusa uočena su dva ista uzorka s vrijednostima koje su odskakale od vrijednosti ostalih uzoraka (stršeće vrijednosti, eng. *outliers*), oba iz 5HT-visoke podlinije (v. sliku 10.). Tablicom 5. prikazane su brojčane vrijednosti, te usporedba dvaju podlinija. Vrijednosti ekspresije 5HT receptora 2C u gonadalnom masnom tkivu bile su statističkii značajno više (P=0.0233, Mann-Whitney U test) kod životinja iz 5HT-visoke podlinije u odnosu na životinje iz 5HT-niske sublinije (Tablica 5.).



Slika 10. Relativna ekspresija mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u gonadnom masnom tkivu životinja iz 5HT-visoke (H) i 5HT-niske (L) podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti ekspresije normalizirane s obzirom na (**a**) β-aktin, (**b**) gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu i (**c**) srednju vrijednost ova dva gena. Horizontalna linija označava medijan.

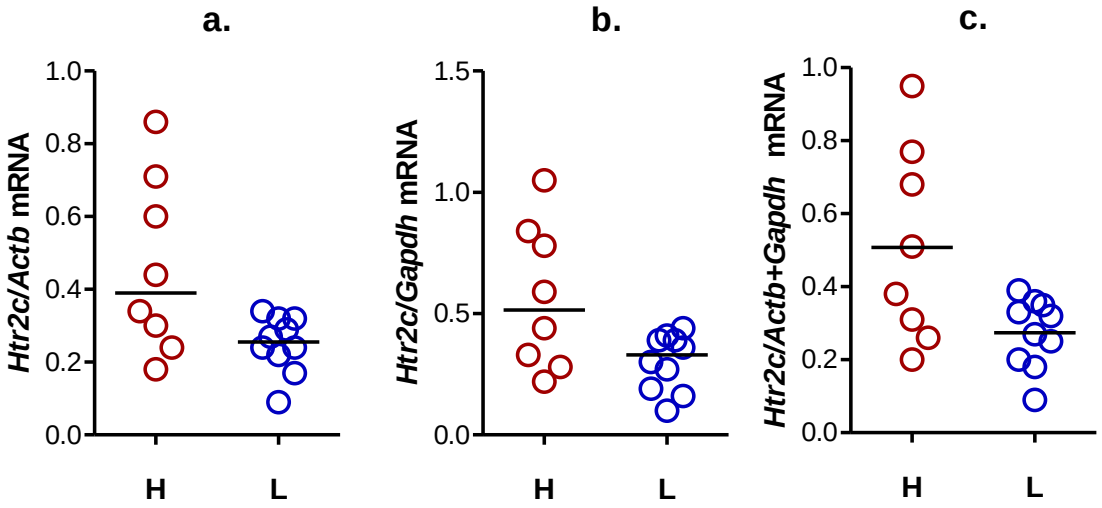
Tablica 5. Usporedba relativne ekspresija mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u gonadnom masnom tkivu životinja iz 5HT-visoke i 5HT-niske podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti normalizirane s obzirom na srednju vrijednost dva referentna gena (β-aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu).

Podlinija štakora	**N**	**Normalnost distribucije**	**Srednja vrijednost**	**Standardna devijacija**	**Medijan**	***P*-vrijednost***
5HT-visoka	10	ne	1.22	1.53	0.595	***0.0233***
5HT-niska	10	da	0.27	0.09	0.295	

N – broj životinja

*Mann-Whitney test

Budući da smo primjetili da dvije životinje iz 5HT-visoke podlinije imaju ekstremno visoke vrijednosti relativne ekspresije mRNA za *Htr2c* receptor u odnosu na druge životinje, napravili smo i dodatnu analizu iz koje smo izostavili te dvije životinje (Slika 11.). Rezultati su i ovaj put pokazali da je razlika dosegla statističku značajnost (P=0.0471, t test s Welchovom korekcijom) ekspresiju mRNA za *Htr2c* kod životinja iz 5HT-visoke podlinija u odnosu na životinje iz 5HT-niske podlinije (Tablica 6.).



Slika 11. Relativna ekspresija mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u gonadnom masnom tkivu životinja iz 5HT-visoke (H) i 5HT-niske (L) podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti ekspresije normalizirane s obzirom na srednju vrijednost β-aktina i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze. Broj životinja u visokoj subliniji je 8 (izostavljene su dvije životinje s ekstremno velikim vrijednostima ekspresije), a u niskoj subliniji 10. Horizontalna linija označava srednju vrijednost.

Tablica 6. Usporedba relativne ekspresija mRNA za serotoninski receptor 2C (*Htr2c*) u gonadnom masnom tkivu životinja iz 5HT-visoke i 5HT-niske podlinije štakora WZ-5HT. Prikazane su vrijednosti normalizirane s obzirom na srednju vrijednost dva referentna gena (β-aktin i gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu). Iz 5HT-visoke sublinije izostavljene su dvije životinje s ekstremno visokim vrijednostima ekspresije.

Podlinija štakora	**N**	**Normalnost distribucije**	**Srednja vrijednost**	**Standardna devijacija**	**Medijan**	***P*-vrijednost***
5HT-visoka	8	da	0.51	0.27	0.445	***0.0471***
5HT-niska	10	da	0.27	0.09	0.295	

N – broj životinja

*t-test s Welchovom korekcijom

5. RASPRAVA

Pretilost predstavlja ozbiljan zdravstveni problem sa stalnim porastom broja oboljelih. Ukoliko se nastavi dosadašnji trend, procjenjuje se da će do 2030. godine 38% svjetske populacije odrasle dobi imati prekomjernu težinu, a još 20% će biti pretilo. Najgore procjene su u SAD-u gdje se procjenjuje da će do 2030. godine čak 85% odraslih imati prekomjernu težinu ili će biti pretili (Hruby i Hu, 2015.). Pretilost predstavlja rizični faktor za razvoj različitih metaboličkih bolesti kao što su dijabetes tipa 2 i hipertenzija, te za razne vrste karcinoma (npr. karcinom dojke i debelog crijeva). Fundamentalni tretmani za pretilost uključuju promjenu stila života: promjenu prehrane, fizičku aktivnost i bihevioralnu terapiju. To često nije dovoljno, već je potrebna i primjena lijekova. (Joo i Lee, 2014.) Da bi se moglo u potpunosti pomoći oboljelima i odrediti uspješnu terapiju, potrebno je znati mehanizam regulacije apetita i faktore koji na njega utječu.

Serotonin (5HT), osim brojnih fizioloških funkcija, uključujući i gotovo sve oblike ponašanja, sudjeluje u regulaciji unosa hrane i metabolizma glukoze. Učinci serotonina posredovani su njegovim membranskim receptorima. U ovom radu analizirali smo ekspresiju serotoninskog receptora tipa 2 (5HT-2C) koji je odabran na temelju istraživanja koja su pokazala da je upravo ovaj podtip serotoninskog receptora eksprimiran u regijama mozga koje su zaslužne za regulaciju hranjenja, ali i u nekim perifernim tkivima koja su povezana s održavanjem energetske ravnoteže (Konturek i sur., 2005.) Najnovija istraživanja na miševima uputila su na ulogu receptora 5HT-2C u molekularnoj podlozi kompulzivnog prejedanja (eng. *binge eating*) (Xu i sur., 2017.). To je relativno nova dijagnoza, a očituje se u epizodama prejedanja uz nemogućnost samokontrole. Ljudi koji imaju ovaj poremećaj koriste hranu kako bi se nosili sa stresnim situacijama i teškim emotivnim fazama Sva dosadašnja istraživanja ovog receptora i njegova uključenost u regulaciju unosa hrane i energetske ravnoteže općenito, rezultirala je upravo njegovim odabirom, od brojnih serotoninskih receptora (ukupno 14 tipova), za ovaj rad.

Kao modelni animalni organizam odabran je Wistar-Zagreb 5HT štakor, koji je dobiven selekcijom životinja prema aktivnosti trombocitnog 5HT prijenosnika. Kako je selekcija dovela i do razlika u tjelesnoj težini i količini masnog tkiva, WZ-5HT štakor predstavlja originalan pristup istraživanjima serotonergičnih mehanizama u molekularnoj podlozi pretilosti. Životinje iz 5HT-visoke podlinije pretile su u usporedbi s životinjama iz 5HT-niske podlinije: imaju veću tjelesnu težinu, veći indeks tjelesne mase te veću količinu adipoznog

tkiva (visceralnog, retroperitonealnog, gonadalnog i potkožnog) (Kesić i sur., 2014.). Također, istraživanja su pokazala da životinje iz 5HT-visoke podlinije provođenjem testova tolarancije na glukozu i inzulin (eng. *glucose tolerance test,* GTT i eng. *insulin tolerance test,* ITT*)* razvijaju intoleranciju na glukozu, rezistenciju na inzulin, te povećanu koncentraciju hemoglobina A1c (glikolizirani hemoglobin koji nastaje vezanje glukoze na molekulu hemoglobina) što ukazuje na promjenu metabolizma glukoze. Također, starije životinje iz 5HT-visoke podlinije pokazuju povišenje ukupne količine kolesterola u serumu, povećane količine visceralnog masnog tkiva, te povećanje broja i veličine Langerhansovih otočića u gušterači (Erjavec i sur., 2016.)

Ciljevi ovog rada bili su usporediti životinje iz WZ-5HT podlinija s obzirom na ekspresiju mRNA serotoninskog receptora 2C u hipotalamusu, glavnoj moždanoj regiji odgovornoj za regulaciju apetita, te bijelom masnom tkivu. Bijelo adipozno tkivo je vrlo interesantno; dugo se smatralo samo kao skladišni organ, dok se nije uvidjela njegova važnost i kao endokrinog organa. S obzirom da je manje je istražena uloga 2C receptora u ovom tkivu, smatramo da bi rezultati naših mjerenja u ovom radu mogli doprinjeti boljem razumijevanju uloge adipoznog tkiva u serotonergičnom sustavu.

Budući da smo ekspresiju receptora 5HT-2C mjerili na razini glasničke RNA (mRNA), metoda koju smo koristili je bila reverzna transkripcija (RT)-kvantitativni PCR (qPCR) (eng. *reverse- transcription- quantitative polymerase chain reaction , RT-qPCR*). Nakon izolacije RNA iz tkiva, preveli smo je u cDNA koja je služila kao kalup (eng.*template*) u qPCR-u.

Preduvjet za analizu ekspresije gena na razini glasničke RNA je uspješna izolacija RNA, zadovoljavajuće količine i kvalitete, iz ispitivanog uzorka. Jedan od bitnih koraka za dobivanje cjelovite RNA je ispravna homogenizacija uzorka. Sam postupak homogenizacije tkiva i izolacije RNA je išao po protokolu komercijalnog kompleta te nije bilo poteškoća niti potrebe za mijenjanjem postupka.

Potpuno uklanjanje tragova genomske DNA iz RNA je neophodno kod RT-qPCR analize ekspresije gena kako genomska DNA ne bi interferirala s qPCR. Genomsku DNA uklonili smo uključivanjem u postupak izolacije RNA korak digestije DNA s DNazom (na kolonici za izolaciju). Također koristili smo kontrolni uzorak pripremljen bez reverzne transkriptaze (RT-), u svrhu kontrole potencijalne kontaminacije naših uzoraka genomskom DNA. Budući da su qvantifikacijski ciklusi (Cq) u uzorku RT- bili za 15 do 20 ciklusa viši

nego u uzorcima cDNA, zaključili smo da genomska DNA ne interferira s našom specifičnom reakcijom.

RT-qPCR-om dobili smo vrijednosti mRNA za receptor 5HT-2C u tkivima hipotalamusa i gWAT-a. Normalizacija se provela uz pomoć referentnih gena beta aktina (Actb) i gliceraldehid-trifosfat dehidrogenaze (Gapdh). To su geni koji reguliraju neku od osnovnih staničnih funkcija i čija razina ekspresije u istraživanom tkivu ne pokazuje interindividualne varijacije .

Na temelju dosadašnjih istraživanja, rezultati koje smo dobili u adipoznom tkivu su vrlo zanimljivi. Rezultati ovog rada pokazali su da životinje iz 5HT-visoke podlinije imaju veću relativnu ekspresiju mRNA serotoninskog receptora 2C, što upućuje na promijenjenu homeostazu serotoninskog sustava u masnom tkivu te potencijalnu ulogu ovog receptora u regulaciji količine masnog tkiva. Dobivenu razliku bilo bi dobro u nastavku istraživanja potvrditi i na razini samog proteina 5HT receptora 2C (npr. *western-blot* analizom). Budući da se receptori 5HT-2C nalaze i u BAT-u, daljna istraživanja mogu se usmjeriti i na tu vrstu adipoznog tkiva, a sve je veće zanimanje i za svjetlo smeđe (bež) masno tkivo. To je zapravo potkožno bijelo masno tkivo (eng. *subcutaneous white adipose tissue*, scWAT) čija se biološka važnost u homeostazi energije još detaljnije istražuje, a potencijalna je meta za tretman protiv pretilosti i dijabetesa tipa 2 (McGlashon i sur., 2015.).

U uzorcima hipotalamusa nismo opazili razlike u ekspresiji mRNA receptora 5HT-2C između životinja iz dvaju podlinija WZ-5HT štakora. To nam može poslužiti kao smjernica za daljnja istraživanja. Postavlja se pitanje djeluje li serotonin putem nekih drugih receptora, koji drugi hormoni ili neurotrasmiteri utječu na tjelesnu težinu, te putem kojih receptora i signalnih puteva djeluju. Moguće je da u ovom tkivu leptin igra glavnu ulogu putem svojih receptora, a ne treba odbaciti ni rezultate istraživanja koji pokazuju kako je i serotoninski receptor 5HT-1B (Slika 5.) također vrlo bitan za održavanje homeostaze energije. Dakle, u nastavku istraživanja, bilo bi korisno analizirati ekspresiju serotoninskog receptora 5HT-1B i leptinskih receptora u tkivu hipotalamusa. Međutim, nije samo hipotalamus uključen u homeostazu energije već i drugi dijelovi SŽS-a (vidi poglavlje 1.2.). To se posebice odnosi na dijelove limbičkog sustava i to ventralni medijalni prefrontalni korteks (eng. *ventral medial prefrontal cortex*, vMPFC) koji igra važnu ulogu u regulaciji apetita putem receptora 5HT-2C (Stanquini i sur., 2015.), pa bi bilo od interesa istražiti ekspresiju gena *Htr2c* i tkivu vMPFC, te vidjeti ima li razlike u ekspresiji serotoninskog receptora 5HT-2C između dviju podlinija

WZ-5HT štakora. Također, moguće je da postoje razlike među podlinijama u editiranju pre-mRNA za receptor 5HT-2C, količini njegovog proteina ili regulaciji aktivnosti (postranslacijske modifikacije). Ove mogućnosti bilo bi dobro istražiti u nastavku istraživanja. Također, bilo bi dobro ponoviti istraživanje sa ženkama WZ-5HT štakora ukoliko postoje moguće spolne razlike, budući da je ovo istraživanje provedeno isključivo na mužjacima WZ-5HT štakora. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako su žene podložnije razvijanju poremećaja prehrane, te sklonije debljanju sa čak dvostruko većim šansama za razvitak morbidne pretilosti u odnosu na muškarce (Asarian i Geary, 2013.). Kao što je spomenuto u 1.2., serotonergična transmisija igra bitnu ulogu u regulaciji energetske ravnoteže organizma, a pitanje je razlikuje li se serotonergična regulacija i na koji način ovisno o spolu. Jedna studija je pokazala da fenfluramin inhibira unos hrane u punom većem postotku kod ženki u odnosu na mužjake štakora (Eckel i sur., 2005.), međutim u nekim daljnim istraživanjima nije bilo razlike. Pokazale su se razlike i među ženkama; učinak fenfluramina je bio puno veći u ženki tretiranih estradiolom u odnosu na netretirane ženke (Rivera i Eckel, 2005.). Također, injektiranjem selektivnog antagonista receptora 5HT-2C, povećao se unos hrane kod ženki štakora tretiranih estradiolom u odnosu na kontrolnu skupinu koju su činile ženke s uklonjenim jajnicima. Nadalje, Rivera i suradnici 2012. godine su pokazali da je tretman estradiolom uzrokovao povećanu količinu receptora 5HT-2C u kaudalnom mozgu, ali ne i u hipotalamusu. Rezultati ovih istraživanja upućuju da estrogen utječe na serotonergičnu signalizaciju, no zbog dobivenih oprečnih rezultata potrebno je provesti još istraživanja kako bi se dobili konkretni zaključci. Vrlo je zanimljivo istraživanje provedeno 2016.godine (Burke i sur.) na štakorima oba spola, kojima je nedostajao hipotalamički *Pomc*. Kao rezultat toga, štakori su imali smanjenu fizičku aktivnost, povećane količine adipoznog tkiva, te kompromitiranu aktivnost BAT-a. Vraćenom funkcijom *Pomc* isključivo unutar stanica s receptorima 5HT-2C, štakori su transformirani u zdrave životinje sa znantno manjom tjelesnom težinom. Ono što je zanimljivo je da je transformacija uspjela samo kod mužjaka. Ženke su, usprkos normaliziranim nivoima inzulina i pravilnim hranjenjem, ostale fizički neaktivne, s manjim utroškom energije, kompromitiranim BAT-om, te pretile. Ovi rezultati daju dokaze da je postoje spolne razlike u regulaciji energetske ravnoteže organizma.

Cilj ovog rada je bio korak ka boljem razumijevanju molekularnih mehanizama regulacije tjelesne mase i održavanja energetske ravnoteže. Apetit i energetska ravnoteža općenito su kontrolirani raznim neurotransmiterima i hormonima, a novija istraživanja sve više pažnje posvećuju zajedničkim djelovanjima takvih molekula, odnosno na koji način

stupaju u interakciju i da li međusobno pojačavaju efekte u određenim regijama mozga. Wierucka i suradnici, 2016. svojim su radom pokazali interakcije serotonina i leptina u regulaciji apetita i to putem leptinskog receptora u jezgrama rafe, stoga da bi u potpunosti razumjeli regulaciju tjelesne mase i farmakološki učinak u svrhu pomoći za oboljele, potrebna su još mnoga istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

Istraživanja u ovom radu smo proveli na originalnom animalnom modelu Wistar-Zagreb 5HT štakor koji se sastoji od dviju podlinija s konstitucijski različitom homeostazom serotonina, dobivenim usmjerenom genetičkom selekcijom životinja prema aktivnosti perifernog serotoninskog prijenosnika. Cilj rada bio je istražiti razlikuju li se ove podlinije u ekspresiji gena za 5HT-2C rceptor u hipotalamusu i gonadnom masnom tkivu (gWAT). Rezultati su pokazali da:

- U tkivu hipotalamusa nema značajne razlike u vrijednostima mRNA između dviju podlinija
- U gonadnom bijelom masnom tkivu imamo znantno veće vrijednosti kod 5HT visoke podlinije u odnosu na 5HT nisku podliniju

Prema dobivenim rezultatima možemo zaključiti da 5HT-2C receptor najvjerojatnije nema ulogu u hipotalamičkim mehanizmima regulacije tjelesne mase kod podlinija WZ-5HT štakora, ali bi mogao imati ulogu u održavanju energetske ravnoteže na razini masnog tkiva. Potrebno je nastaviti istraživanja da bi se potvrdili dobiveni rezultati masnog tkiva, a u tkivu hipotalamusa mjeriti ekspresiju nekih drugih receptora vezanih za regulaciju tjelesne mase.

Ovi rezultati, uz dosadašnja istraživanja na WZ-5HT štakoru, mogu poslužiti boljem razumijevanju uloge serotonergičkih mehanizama u održavanju energetske ravnoteže i molekularnoj podlozi pretilosti.

7. LITERATURA

Asarian L, Geary N. *Sex differences in the physiology of eating*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2013; 305(11)

Berglund E.D., Liu C., Sohn J.W., Liu T., Kim M.H. et *al Serotonin 2C receptors in pro-opiomelanocortin neurons regulate energy and glucose homeostasis*. J Clin Invest. 2013;123(12):5061-70

Burke L.K., Doslikova B., D'Agostino G., Greenwald-Yarnell M.,Georgescu T., Chianese R., Martinez de Morentin P.B. et al *Sex difference in physical activity, energy expenditure and obesity driven by a subpopulation of hypothalamic POMC neurons*. Mol Metab. 2016; 5(3): 245–252

Burke L.K., Ogunnowo-Bada E., Georgescu T., Cristiano C., Martinez de Morentin P.B. *Lorcaserin improves glycemic control via a melanocortin neurocircuit*. Mol Metab. 2017; 6(10): 1092–1102

Chugani D.C. *α-methyl-l-tryptophan: mechanisms for tracer localization of epileptogenic brain*. Biomark Med. 2011; 5(5): 567–575

Čičin-Šain L., Jernej B. *Wistar-Zagreb 5HT rats: A rodent model with constitutional upregulation/downregulation of serotonin transporter*. Cambridge University Press, 2010, Cambridge, pp 214-243

Coelho Marisa, Oliveira Teresa, Fernandes Ruben *Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ*. Arch Med Sci. 2013; 9(2): 191–200

Diéguez C., Vazquez M.J., Romero A., López M., Nogueiras R. *Hypothalamic Control of Lipid Metabolism: Focus on Leptin, Ghrelin and Melanocortins*. Neuroendocrinology 2011;94:1–11

Donovan M.H., Tecott L.H. *Serotonin and the regulation of mammalian energy balance*. Front Neurosci. 2013; 7: 36

Eckel L.A., Rivera H.M., Atchley D.P. *The anorectic effect of fenfluramine is influenced by sex and stage of the estrous cycle in rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2005;288(6):R1486-91

El-Merahbi R., Löffler M., Mayer A., Sumara G. *The roles of peripheral serotonin in metabolic homeostasis.* FEBS Lett. 2015;589(15):1728-34

Erjavec I., Bordukalo-Nikšić T., Brkljačić J., Grčević D., Mokrović D., Kesić M., Rogić D., Zavadoski W., Paralkar V.M., Grgurević L., Trkulja V., Čičin-Šain L., Vukičević S. *Constitutively Elevated Blood Serotonin Is Associated with Bone Loss and Type 2 Diabetes in Rats.* PLoS One. 2016; 11(2): e0150102

Fitzgerald K.T., Bronstein A.C. *Selective serotonin reuptake inhibitor exposure.* Top Companion Anim Med. 2013;28(1):13-7

Gill R.K., Pant N., Saksena S., Singla A., Nazir T.M., Vohwinkel L., Turner J.R., Goldstein J., Alrefai W.A., Dudeja P.K. *Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2008;294(1):G254-62

Guyenet S.J., Schwartz M.W. *Regulation of Food Intake, Energy Balance, and Body Fat Mass: Implications for the Pathogenesis and Treatment of Obesity.* J Clin Endocrinol Metab. 2012; 97(3): 745–755

Hasler W.L., *Serotonin and the GI tract.* Curr Gastroenterol Rep. 2009;11(5):383-91

Hruby A., Hu F.B. *The Epidemiology of Obesity: A Big Picture.* Pharmacoeconomics. 2015; 33(7): 673–689

Hurren K.M., Berlie H.D. *Lorcaserin: an investigational serotonin 2C agonist for weight loss.* Am J Health Syst Pharm. 2011;68(21):2029-37

Konturek P.C., Konturek J.W., Cześnikiewicz-Guzik M., Brzozowski T., Sito E., Konturek S.J. *Neuro-hormonal control of food intake: basic mechanisms and clinical implications.* J Physiol Pharmacol. 2005;56 Suppl 6:5-25

Jenkins T.A., Nguyen J.C.D, Polglaze K.E., Bertrand P.P. *Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis.* Nutrients. 2016; 8(1): 56

Jernej B., Čičin-Šain L. *Platelet serotonin level in rats is under genetic control.* Psychiat Res 32 (1990) 167-174

Jonnakuty C., Gragnoli C. *What do we know about serotonin?* J Cell Physiol. 2008; 217(2):301-6

Joo J.K., Lee K.S. *Pharmacotherapy for Obesity.* J Menopausal Med. 2014; 20(3): 90–96

Lesch K.P., Waider J. *Serotonin in the modulation of neural plasticity and networks: implications for neurodevelopmental disorders.* Neuron. 2012;76(1):175-91

Lord C.C., Wyler S.C., Wan R., Castorena C.M., Ahmed N., Mathew D., Lee S., Liu C., Elmquist J.K. *The atypical antipsychotic olanzapine causes weight gain by targeting serotonin receptor 2C.* J Clin Invest. 2017;127(9):3402-3406

Lovinger D.M. *Communication networks in the brain: neurons, receptors, neurotransmitters, and alcohol.* Alcohol Res Health. 2008;31(3):196-214

Lyddon R., Dwork A.J., Keddache M., Siever L.J., Dracheva S. *Serotonin 2c receptor RNA editing in major depression and suicide.* World J Biol Psychiatry. 2013 Dec; 14(8): 590–601

McCorvy J.D., Roth B.L. *Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors.* Pharmacol Ther. 2015;150:129-42

McGlashon J.M., Gorecki M.C., Kozlowski A.E., Thirnbeck C.K., Markan K.R., Leslie K.L., Kotas M.E., Potthoff M.J., Richerson G.B., Gillum M.P. *Central serotonergic neurons activate and recruit thermogenic brown and beige fat and regulate glucose and lipid homeostasis.* Cell Metab. 2015; 21(5): 692–705

Namkung J., Kim H., Park S. *Peripheral Serotonin: a New Player in Systemic Energy Homeostasis.* Mol Cells. 2015; 38(12): 1023–1028

Oh C.M., Namkung J., Go Y., Shong K.E., Kim K., Park B.Y., Lee H.W., Jeon Y.H., Song J., Shong M., Yadav V.K., Karsenty G., Kajimura S., Lee I.K., Park S., Kim H. *Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues.* Nature Communications 2015; 6794

Pytliak M., Vargová V., Mechírová V., Felšöci M. *Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications.* Physiol Res. 2011;60(1):15-25

Rdova-Sintjago T.C., Villa N., Canal C., Booth R. *Human Serotonin 5-HT2C G Protein-Coupled Receptor Homology Model from the β2 Adrenoceptor Structure: Ligand Docking and Mutagenesis Studies.* Int J Quantum Chem. 2012; 112(1): 10

Reigstad Christopher S., Salmonson Charles E., Rainey III John F., Szurszewski Joseph H., Linden David R., Sonnenburg Justin L., Farrugia Gianrico, Kashyap Purna C *Gut microbes promote colonic serotonin production through an effect of short-chain fatty acids on enterochromaffin cells.* FASEB J. 2015; 29(4): 1395–1403

Rivera H.M., Eckel L.A. *The anorectic effect of fenfluramine is increased by estradiol treatment in ovariectomized rats.* Physiol Behav. 2005;86(3):331-7

Rivera H.M., Santollo J., Nikonova L.V., Eckel L.A. *Estradiol increases the anorexia associated with increased 5-HT2C receptor activation in ovariectomized rats.* Physiol Behav. 2012 Jan 18; 105(2): 188–194

Roth B.L., *Multiple serotonin receptors: clinical and experimental aspects*. Ann Clin Psychiatry. 1994;6(2):67-78

Sodhi M.S., Sanders-Bush E. *Serotonin and brain development*. Int Rev Neurobiol. 2004;59:111-74

Stanquini L.A., Resstel L.B., Corrêa F.M., Joca S.R., Scopinho A.A. *Prelimbic cortex 5-HT1A and 5-HT2C receptors are involved in the hypophagic effects caused by fluoxetine in fasted rats.* Pharmacol Biochem Behav. 2015;136:31-38

Watanabe H., Nakano T., Saito R., Akasaka D., Saito K., Ogasarawa H. Et al *Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice*. PLoS One. 2016;11(1):e0147143

Watts S.W., Morrison S.F., Davis R.P., Barman S.M., *Serotonin and Blood Pressure Regulation.* Pharmacol Rev. 2012; 64(2): 359–388

Wierucka-Rybak M., Wolak M., Juszczak M., Drobnik J., Bojanowska E. *The inhibitory effect of combination treatment with leptin and cannabinoid CB1 receptor agonist on food intake and body weight gain is mediated by serotonin 1B and 2C receptors.* J Physiol Pharmacol. 2016;67(3):457-63

Wyler S.C., Lord C.C., Lee S., Elmquist J.K., Liu C. *Serotonergic Control of Metabolic Homeostasis.* Front Cell Neurosci. 2017; 11: 277

Xu P., He Y., Cao X., Valencia-Torres L., Yan X., Saito K. et al *Activation of Serotonin 2C Receptors in Dopamine Neurons Inhibits Binge-like Eating in Mice.* Biol Psychiatry. 2017;81(9):737-747

Xu Y., Jones J.E., Kohno D., Williams K.W., Lee C.E. et al *5-HT2CRs expressed by pro-opiomelanocortin neurons regulate energy homeostasis.* Neuron. 2008;60(4):582-9

Young S.N. *How to increase serotonin in the human brain without drugs* J Psychiatry Neurosci. 2007; 32(6): 394–399

Zhou L., Sutton G.M., Rochford J.J., Semple R.K., Lam D.D. et al *Serotonin 2C receptor agonists improve type 2 diabetes via melanocortin-4 receptor signaling pathways*. Cell Metab. 2007 Nov;6(5):398-405

Kongresno priopćenje:

Kesić M., Orešković D., Čičin-Šain L. *Obesity phenotype of rats with constitutional hyperactivity of serotonin transporter.* The Interplay of Biomolecules, 2014.

Internetske stranice:

http://www.ithacaaudio.com/wp-content/uploads/2012/05/Serotonin.jpg

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/serotonin#section=Top

https://www.researchgate.net/figure/51244448_fig5_Figure-1-Serotonin-5-HT-synthesis-pathway-in-insects-5-HT-is-synthesized-from

8. ŽIVOTOPIS

Osobni podaci	
Ime / Prezime	**Lucija Surić**
E-mail	lsuric@hotmail.com
Državljanstvo	Hrvatsko
Datum rođenja	1.9.1989.
Spol	Ž
Radno iskustvo	
Datumi	2012.-2014.
Zanimanje ili radno mjesto	Prodavač
Naziv i adresa poslodavca	Domino Shop, Zadar
Datumi	2015.-danas
Zanimanje ili radno mjesto	Sales assistant
Naziv i adresa poslodavca	Zara Hrvatska, Zagreb
Obrazovanje i osposobljavanje	**Diplomski studij molekularne biologije**
Datumi	29/09/2014–danas
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	

Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine	- Mutageneza i karcinogeneza, Neurofiziologija, Molekularna genetika, Molekularna biologija stanice, Genetičko inženjerstvo u biotehnologiji, Metode istraživanja u molekularnoj biologiji, Fiziologija endokrinog sustava, Molekularna onkologija, Biologija starenja, Metode istraživanja nukleinskih kiselina, Molekularna citogenetika itd.
Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb (Hrvatska)
	Preddiplomski studij biologije i kemije
Datumi	1/10/2008.–11/11/2013.
Naziv dodijeljene kvalifikacije / zvanje	Sveučilišni prvostupnik biologije i kemije
Glavni predmeti / stečene profesionalne vještine	Opća kemija, Biologija stanice, Organska i anorganska kemija, Botanika, Fiziologija (čovjeka, biljaka i životinja) , Histologija, Biokemija, Genetika, Mikrobiologija, Zoologija itd. - determiniranje pojedinih vrsta biljaka, životinja i algi - rad na terenu i uzorkovanje - rad u laboratoriju
Naziv i vrsta ustanove pružatelja obrazovanja i osposobljavanja	Prirodoslovno-matematički fakultet, Split (Hrvatska)

Osobne vještine i kompetencije	
Materinski jezik	**Hrvatski**
Drugi jezik(ci)	**Engleski, Njemački**

Samoprocjena	**Razumijevanje**		**Govor**		**Pisanje**
Europska razina (*)	Slušanje	Čitanje	Govorna interakcija	Govorna produkcija	

Engleski_ jezik	B2		B2		B2		B2		B2	
Njemački_ jezik	A1		A2		A1		A1		A1	

(*) Zajednički europski referentni okvir za jezike

Komunikacijske vještine

izvrsna snalažljivost u timskom radu stečena brojnim projektima u sklopu udruge Lacerta, te radom u paru i grupama u laboratoriju
- također mogućnost samostalnog rada
- dobre komunikacijske i socijalne vještine stečene dugogodišnjim radom u prodaji, te pouzdanost i točnost u radu
-vještine stečene tijekom fakultetskog obrazovanja, izlaganjem različitih seminara, prijedloga istraživanja i slično
- sposobnost prilagodbe multikulturalnom okruženju stečena tijekom rada u laboratoriju prilikom izrade diplomskog rada

Organizacijske / rukovoditeljske vještine

organizacijske vještine stečene na fakultetu, vođenjem i sudjelovanjem na određenim projektima u sklopu udruge Lacerta
-sposobnost preuzimanja uloge vođe tima i upravljanje ljudima

Poslovne vještine

- upoznata s radom u laboratorijima, opremom i strojevima koja se u njima nalaze
- upoznata s radom na terenu (obnova Botaničkog vrta u Splitu)
- znanje stečeno kroz brojne praktikumske zadatke i izradu diplomskoga rada

Računalne vještine i kompetencije

SAMOPROCJENA

Obrada informacija	Iskusni korisnik
Komunikacija	Iskusni korisnik
Stvaranje sadržaja	Temeljni korisnik
Sigurnost	Samostalni korisnik
Rješavanje problema	Samostalni korisnik

Dovoljno dobro znanje za izradu MS Word i Excel dokumenata te PowerPoint prezentacija. Vrlo dobro se služim radom na računalu, uključujući korištenje brojnih programa i interneta te uklanjanja pogrešaka ukoliko se pojave.

Ostale vještine	slušam online predavanja na www.coursera.org iz različitih područja biologije npr. Whole genome sequencing of bacterial genomes, Medical neuroscience, Vital signs: Understanding what the body is telling us, Human physiology i slično - volim sve vrste umjetnosti i u slobodno vrijeme crtam - povremeno volontiram u Socijalnoj samoposluzi
Vozačka dozvola	B kategorija